



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**  
*La Universidad Católica de Loja*

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**Extracción y caracterización física y química del aceite  
esencial aislado del fruto de *Citrus x limonia***

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:

**BIOQUÍMICA FARMACEÚTICA**

**Autora:** Paucar Costa, Giselle Jailene

**Director:** Valarezo Valdez, Benito Eduardo

LOJA

2024



*Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NC-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>*

2024

## Aprobación del director del Trabajo de Titulación

Loja, 19 de marzo del 2024

Magister.

Claudia Teresa Cruz Erazo

**Director de la carrera de Bioquímica y Farmacia**

Ciudad. -

De mi consideración:

Me permito comunicar que, en calidad de director del presente Trabajo de Titulación denominado: Extracción y caracterización física y química del aceite esencial aislado del fruto de *Citrus x limonia* realizado por Giselle Jailene Paucar Costa ha sido orientado y revisado durante su ejecución, así mismo ha sido verificado a través de la herramienta de similitud académica institucional, y cuenta con un porcentaje de coincidencia aceptable. En virtud de ello, y por considerar que el mismo cumple con todos los parámetros establecidos por la Universidad, doy mi aprobación a fin de continuar con el proceso académico correspondiente.

Particular que comunico para los fines pertinentes.

Atentamente,

Director: Benito Eduardo Valarezo Valdez, PhD.

C.I.: 1103906473

Correo electrónico: bevalarezo@utpl.edu.ec

### **Declaración de autoría y cesión de derechos**

Yo, Giselle Jailene Paucar Costa, declaro y acepto en forma expresa lo siguiente:

Ser autor (a) del Trabajo de Titulación denominado: Extracción y caracterización física y química del aceite esencial aislado del fruto de *Citrus x limonia*, de la carrera de Bioquímica y Farmacia, específicamente de los contenidos comprendidos en: Capítulo uno. Marco Teórico; Capítulo dos. Metodología; Capítulo tres. Resultados y Discusiones; Conclusiones y recomendaciones, siendo Benito Eduardo Valarezo Valdez. PhD., director del presente trabajo; también declaro que la presente investigación no vulnera derechos de terceros ni utiliza fraudulentamente obras preexistentes. Además, ratifico que las ideas, criterios, opiniones, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad. Eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones judiciales o administrativas, con relación a la propiedad intelectual de este trabajo.

Que la presente obra, producto de mis actividades académicas y de investigación, forma parte del patrimonio de la Universidad Técnica Particular de Loja, de conformidad con el artículo 20, literal j), de la Ley Orgánica de Educación Superior; y, artículo 91 del Estatuto Orgánico de la UTPL, que establece: "Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad", en tal virtud, cedo a favor de la Universidad Técnica Particular de Loja la titularidad de los derechos patrimoniales que me corresponden en calidad de autor/a, de forma incondicional, completa, exclusiva y por todo el tiempo de su vigencia.

La Universidad Técnica Particular de Loja queda facultada para ingresar el presente trabajo al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública, en cumplimiento del artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

.....

Autor: Giselle Jailene Paucar Costa

C.I.: 1150596706

Correo electrónico: [gjpaucar1@utpl.edu.ec](mailto:gjpaucar1@utpl.edu.ec)

### **Dedicatoria**

A Dios por darme la oportunidad de la vida, por darme salud, valentía para salir adelante día a día y por ser guía en esta travesía para cumplir mis metas.

A mis padres, por ser los pilares fundamentales en este proceso, por su apoyo incondicional y sacrificio para que yo pudiera llegar hasta aquí.

A mi abuelo paterno Francisco, por siempre creer en mí y aunque ya no está a mi lado, sé que me dio la sabiduría, paciencia y fortaleza para culminar con esta gran meta.

A mi hermana Salome por ser gran apoyo en momentos difíciles, por siempre creer en mí.

A mi mascota Pochita por ser mi compañera incondicional en las largas noches de vela para lograr culminar esta meta.

***Giselle Jailene Paucar Costa.***

## **Agradecimiento**

A Dios por darme la oportunidad de la vida, por darme salud, valentía para salir adelante día a día y por ser guía en esta travesía para cumplir mis metas.

A mis padres, mi hermana, mi mascota, mis tías y primas maternas que siempre creyeron en mí y me dieron su apoyo moral y motivación en momentos difíciles.

A mi tutor, Benito Eduardo Valarezo Valdez. PhD. Por la paciencia, motivación y compartirme sus conocimientos para el desarrollo del presente trabajo de titulación.

## Índice de contenido

|   |     |
|---|-----|
| Carátula.....   | I   |
| Aprobación del director del Trabajo de Titulación .....       | II  |
| Declaración de autoría y cesión de derechos .....             | III |
| Dedicatoria.....  | V   |
| Agradecimiento.....   | VI  |
| Índice de contenido .....                                     | VII |
| Resumen .....   | 1   |
| Abstract.....   | 2   |
| Introducción .....  | 3   |
| Capítulo uno .....  | 5   |
| Marco teórico .....   | 5   |
| 1.1 Biodiversidad del Ecuador .....                           | 5   |
| 1.2 Plantas aromáticas.....                                   | 6   |
| 1.2.1 Generalidades de los cítricos .....                     | 7   |
| 1.2.2 <i>Citrus x limonia</i> .....                           | 7   |
| 1.2.2.1 Taxonomía de la especie <i>Citrus x limonia</i> ..... | 7   |
| 1.3 Aceites Esenciales .....                                  | 8   |
| 1.3.1 Clasificación de los aceites esenciales.....            | 8   |
| 1.4 Métodos de extracción de aceites esenciales .....         | 9   |
| 1.4.1 Destilación por arrastre de vapor.....                  | 9   |
| 1.4.2 Extracción con disolventes.....                         | 10  |
| 1.4.3 Extracción con fluido super crítico.....                | 10  |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1.5   | Propiedades de los aceites esenciales.....  | 10 |
| 1.5.1 | <i>Diversos usos y aplicaciones de los aceites esenciales</i> .....   | 11 |
| 1.5.2 | <i>Aceites esenciales en la farmacología</i> .....  | 11 |
| 1.5.3 | <i>Caracterización de los aceites esenciales</i> .....  | 11 |
| 1.5.4 | <i>Cromatografía de gases</i> .....   | 12 |
| 1.5.5 | <i>Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS)</i> .....  | 13 |
| 1.5.6 | <i>Detector de ionización de llama (FID)</i> .....  | 13 |
| 1.5.7 | <i>Análisis enantiomérico</i> .....   | 14 |
|       | Capítulo dos .....  | 15 |
|       | Metodología.....  | 15 |
| 2.1   | Parte experimental .....  | 15 |
| 2.2   | Recolección de la materia vegetal.....  | 16 |
| 2.3   | Determinación de humedad de la cáscara del fruto Citrus x limonia .....   | 17 |
| 2.4   | Extracción de aceite esencial de Citrus x limonia .....   | 18 |
| 2.4.1 | <i>Determinación del rendimiento del aceite esencial de Citrus x limonia</i> .....  | 19 |
| 2.5   | Determinación de las propiedades físicas .....  | 19 |
| 2.5.1 | <i>Densidad Relativa</i> .....  | 19 |
| 2.5.2 | <i>Índice de refracción</i> .....   | 20 |
| 2.5.3 | <i>Actividad óptica</i> .....   | 21 |
| 2.5.4 | <i>Determinación del color</i> .....  | 21 |
| 2.6   | Determinación de la composición química del aceite esencial.....  | 22 |
| 2.6.1 | <i>Descripción de las características del equipo cromatográfico y sistema para analizar el aceite esencial por cromatografía de gases</i> ..... | 22 |

|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| <b>2.6.2</b> | <b><i>Preparación de la muestra</i></b> .....  | <b>22</b> |
| <b>2.6.3</b> | <b><i>Corrida cromatográfica en columna no polar TR5MS acoplada a espectrómetro de masas</i></b> .....       | <b>23</b> |
| <b>2.6.4</b> | <b><i>Identificación de compuestos de la columna TR5MS y TRWAX en GC-MS</i></b> .....                        | <b>24</b> |
| <b>2.6.5</b> | <b><i>Corrida cromatográfica en columna polar TRWAX acoplada a espectrometría de masas</i></b> .....         | <b>24</b> |
| <b>2.6.6</b> | <b><i>Identificación de compuestos de la columna TR5MS y TRWAX en CG-FID</i></b> . ....                      | <b>25</b> |
| <b>2.6.7</b> | <b><i>Lectura cromatográfica en columna quiral DET-MS acoplada a espectrómetro de masas</i></b> .....        | <b>25</b> |
| <b>2.6.8</b> | <b><i>Lectura cromatográfica en columna quiral DAC-MS acoplada a espectrómetro de masas</i></b> .....        | <b>26</b> |
|              | <b>Capítulo tres</b> .....   | <b>28</b> |
|              | <b>Resultados y discusiones</b> .....  | <b>28</b> |
| <b>3.1</b>   | <b>Porcentaje de humedad de la cáscara de Citrus x limonia</b> .....   | <b>28</b> |
| <b>3.2</b>   | <b>Determinación del rendimiento del aceite esencial de Citrus x limonia</b> .....                           | <b>28</b> |
| <b>3.3</b>   | <b>Determinación de las propiedades físicas del aceite esencial de la cáscara de Citrus x limonia</b> . .... | <b>29</b> |
| <b>3.3.1</b> | <b><i>Densidad Relativa</i></b> .....  | <b>29</b> |
| <b>3.3.2</b> | <b><i>Índice de Refracción</i></b> .....   | <b>29</b> |
| <b>3.3.3</b> | <b><i>Actividad Óptica</i></b> .....   | <b>30</b> |
| <b>3.3.4</b> | <b><i>Determinación del color del aceite esencial de Citrus x limonia</i></b> .....                          | <b>31</b> |
| <b>3.4</b>   | <b>Determinación de la composición del aceite esencial de Citrus x limonia</b> .....                         | <b>31</b> |
| <b>3.5</b>   | <b>Compuestos mayoritarios del aceite esencial de Citrus x limonia</b> .....                                 | <b>39</b> |

|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| <b>3.5.1</b> | <b><i>Limoneno</i></b> .....   | <b>39</b> |
| <b>3.5.2</b> | <b><i>β-pinene</i></b> .....   | <b>39</b> |
|              | <b>Conclusiones</b> .....  | <b>41</b> |
|              | <b>Recomendaciones</b> .....   | <b>42</b> |
|              | <b>Referencias</b> .....   | <b>43</b> |
|              | <b>Apéndice</b> .....  | <b>2</b>  |
|              | <b>Apéndice A. Determinación del rendimiento</b> .....   | <b>2</b>  |
|              | <b>Apéndice B. Determinación de la densidad relativa a 20°C</b> .....                                    | <b>3</b>  |
|              | <b>Apéndice C. Determinación del índice de refracción</b> .....  | <b>5</b>  |
|              | <b>Apéndice D. Determinación de la actividad óptica</b> .....  | <b>7</b>  |
|              | <b>Apéndice E. Determinación del índice de retención con la ecuación de Van den Dool and Kratz</b> ..... | <b>10</b> |
|              | <b>Apéndice F. Determinación del exceso enantiomérico</b> .....  | <b>11</b> |

**Índice de tablas**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Tabla 1 Taxonomía de la especie Citrus x limonia.....</b>   | <b>8</b>  |
| <b>Tabla 2 Condiciones operacionales para la corrida cromatográfica en la columna no polar TR5MS en CG-MS.....</b>                       | <b>23</b> |
| <b>Tabla 3 Condiciones operacionales para la corrida cromatográfica en la columna polar TRWAX acoplado a espectrómetro de masas.....</b> | <b>24</b> |
| <b>Tabla 4 Condiciones de trabajo de la columna DET-MS en GC-MS .....</b>  | <b>25</b> |
| <b>Tabla 5 Condiciones de trabajo de la columna DAC-MS en GC-MS.....</b>   | <b>26</b> |
| <b>Tabla 6 Porcentaje de humedad de Citrus x limonia.....</b>  | <b>28</b> |
| <b>Tabla 7 Rendimiento del aceite esencial de Citrus x limonia.....</b>  | <b>28</b> |
| <b>Tabla 8 Densidad relativa del aceite esencial de Citrus x limonia .....</b>   | <b>29</b> |
| <b>Tabla 9 Índice de refracción del aceite esencial de Citrus x limonia .....</b>  | <b>30</b> |
| <b>Tabla 10 Actividad óptica del aceite esencial de Citrus x limonia .....</b>   | <b>30</b> |
| <b>Tabla 11 Propiedad física del aceite esencial Citrus x limonia.....</b>   | <b>31</b> |
| <b>Tabla 12 Tabla de identificación de compuestos en la columna no polar TR5MS .....</b>   | <b>33</b> |
| <b>Tabla 13 Compuestos mayoritarios obtenidos del CG-FID con la columna TR5 .....</b>  | <b>35</b> |
| <b>Tabla 14 Tabla de identificación de compuestos en la columna polar TRWAX.....</b>   | <b>36</b> |
| <b>Tabla 15 Compuestos mayoritarios obtenidos del CG-FID con la columna TRWAX....</b>  | <b>37</b> |
| <b>Tabla 16 Enantiómeros del aceite esencial de Citrus x limonia .....</b>   | <b>38</b> |

**Índice de figuras**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figura 1 Componentes cromatógrafo de gases .....</b>                                   | <b>13</b> |
| <b>Figura 2 Metodología empleada de manera experimental.....</b>                          | <b>15</b> |
| <b>Figura 3 Ubicación geográfica de la especie Citrus x limonia.....</b>                  | <b>16</b> |
| <b>Figura 4 Medición del porcentaje de humedad .....</b>                                  | <b>17</b> |
| <b>Figura 5 Obtención de aceite esencial .....</b>  | <b>18</b> |
| <b>Figura 6 Almacenamiento del aceite esencial.....</b>                                   | <b>19</b> |
| <b>Figura 7 Medición de la densidad relativa .....</b>                                    | <b>20</b> |
| <b>Figura 8 Medición del índice de refracción .....</b>                                   | <b>21</b> |
| <b>Figura 9 Equipo Polarímetro digital Mrc-Automatic Polarimeter P810 .....</b>           | <b>21</b> |
| <b>Figura 10 Cromatógrafo de Gases Thermo Scientific trace 1310.....</b>                  | <b>22</b> |
| <b>Figura 11 Muestras de aceite esencial preparadas para inyectar .....</b>               | <b>23</b> |
| <b>Figura 12 Cromatograma de la columna TR5ms del aceite esencial Citrus x limonia..</b>  | <b>32</b> |
| <b>Figura 13 Cromatograma de la columna TRWAX del aceite esencial Citrus x limonia</b>    | <b>32</b> |
| <b>Figura 14 Compuestos mayoritarios identificados en la columna no polar TR5MS .....</b> | <b>35</b> |
| <b>Figura 15 Estructura molecular de Limoneno en 2D.....</b>                              | <b>39</b> |
| <b>Figura 16 Estructura molecular de beta pinene en 2D.....</b>                           | <b>40</b> |

## Resumen

En el presente trabajo de fin de titulación se estudió el aceite esencial obtenido de la cáscara de *Citrus x limonia*, la humedad de la cáscara fue de  $76.68 \pm 2.27\%$  y se determinó utilizando una termobalanza. El aceite esencial de *Citrus x limonia* fue obtenido mediante destilación por arrastre de vapor dando un rendimiento de  $0.79 \pm 0.37\%$ . Las propiedades físicas del aceite evaluadas con las normas AFNOR, mostraron los siguientes resultados. La densidad del aceite esencial fue de  $0.8717\text{g/cm}^3 \pm 0.0039$ , el índice de refracción fue  $1.4821 \pm 0.0015$  y la actividad óptica fue  $6.15^\circ \pm 0.19^\circ$ . La composición química del aceite esencial se determinó mediante cromatografía de gases equipada con un espectrómetro de masas y cromatografía de gases acoplada al detector de ionización de llama. La identificación de los compuestos se fundamentó en el índice de retención, en total se identificó 37 compuestos que corresponden al 98.82% de la composición total del aceite esencial. Los compuestos mayoritarios identificados en el aceite esencial fueron: limonene (57.38%), terpinene  $\langle\gamma\rangle$  (13.01%) y  $\beta$ -pinene (12.04%). La quiralidad de los compuestos se identificó utilizando una columna enantiomérica. Siendo identificados cuatro monoterpenos los cuales fueron: (+) (-)  $\beta$ -pinene, (+/-)-D-limonene, (+/-)-terpineol $\langle\alpha\rangle$  y (+/-)-thujene  $\langle\alpha\rangle$ .

*Palabras claves:* *Citrus x limonia*, aceite esencial, cromatografía de gases, composición enantiomérica.

### Abstract

In this final degree project, the essential oil obtained from the peel of *Citrus x limonia* was studied. The humidity of the peel was  $76.68 \pm 2.27\%$  and was determined using a thermobalance. The essential oil of *Citrus x limonia* was obtained by steam distillation giving a yield of  $0.79 \pm 0.37\%$ . The physical properties of the oil evaluated with AFNOR standards showed the following results. The density of the essential oil was  $0.8717\text{g/cm}^3 \pm 0.0039$ , the refractive index was  $1.4821 \pm 0.0015$ , and the optical activity was  $6.15^\circ \pm 0.19^\circ$ . The chemical composition of the essential oil was determined by gas chromatography equipped with a mass spectrometer and gas chromatography coupled to the flame ionization detector. The identification of the compounds was based on the retention index, in total 37 compounds were identified that correspond to 98.82% of the total composition of the essential oil. The major compounds identified in the essential oil were: limonene (57.38%), terpinene  $\langle\gamma\rangle$  (13.01%) and  $\beta$ -pinene (12.04%). The chirality of the compounds was identified using an enantiomeric column. Four monoterpenes were identified, which were: (+) (-)  $\beta$ -pinene, (+/-)-D-limonene, (+/-)-terpineol $\langle\alpha\rangle$  and (+/-)-thujene  $\langle\alpha\rangle$ .

*Keywords:* *Citrus x limonia*, essential oil, gas chromatography, enantiomeric composition.

## Introducción

El presente trabajo de investigación se encuentra enfocado en la determinación de la composición química y las propiedades físicas del aceite esencial de *Citrus x limonia*, El presente documento está distribuido en tres capítulos, el primero es el Marco Teórico en donde se describe la biodiversidad del Ecuador, las plantas aromáticas, los aceites esenciales y su caracterización, la técnica de cromatografía de gases, etc. En el segundo capítulo se redacta toda la metodología que se efectuó para la ejecución de esta investigación, los materiales, equipos y métodos implementados. El tercer y último capítulo especifica todos los resultados y la discusión, referente a la determinación de la composición química y las propiedades físicas del aceite esencial analizado.

En el Departamento de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL), se desarrolló la investigación con la finalidad de generar un aporte en cuanto al estudio de las plantas aromáticas medicinales de la Amazonía ecuatoriana.

El objetivo general se enfocó en determinar la composición química del aceite esencial de *Citrus x limonia*, utilizando la técnica de cromatografía de gases, que permite determinar los compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial de nuestra especie vegetal y también determinar las propiedades físicas, para lo cual se realizó la determinación de la densidad relativa del aceite esencial siguiendo la norma internacional AFNOR NF T75-111(ISO 279:1998), la actividad óptica mediante un polarímetro digital MrcAutomatic Polarimeter P810 en base a la norma ISO 592:1998, la determinación del índice de refracción mediante la norma AFNOR T75-112(ISO 280:1998). El color subjetivo se obtuvo online, para lo cual se subió a la página web de PINETOOL (<https://pinetools.com/>) una fotografía del aceite esencial tomada con fondo blanco.

La composición química se efectuó a través de una técnica analítica donde se empleó un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (CG-MS) y un detector de ionización de llama (FID). Para el análisis cualitativo y cuantitativo, se empleó una columna no polar TR5-MS y polar TRWAX, permitiendo así determinar los compuestos mayoritarios y minoritarios del aceite esencial de *Citrus x limonia*. Además, se logró la identificación de

compuestos quirales a través de una columna enantiomérica, con el cálculo del exceso enantiomérico y la distribución enantiomérica.

El análisis cualitativo se ejecutó utilizando una curva de alcanos inyectada junto al aceite esencial. Con estos tiempos de retención para cada compuesto y posteriormente con bases de datos y literatura existente se comprobó estos índices de retención. Con respecto al análisis cuantitativo, se contrastaron las áreas de los picos obtenidos en el CG-MS con el cromatograma global de FID. De este modo, se determine el porcentaje de cada compuesto identificado.

## Capítulo uno

### Marco teórico

#### 1.1 Biodiversidad del Ecuador

Ecuador cuenta con una gran biodiversidad, formando parte de los 17 países megadiversos, dicha designación es debido a la cantidad de diferentes especies que alberga en su extensión de 283 560 km<sup>2</sup>, ocupando cerca del 0.17% de superficie terrestre del planeta (Bravo, 2014).

En el *Catálogo de las Plantas Vasculares del Ecuador* se documenta 15306 especies de plantas nativas, de estas 4173 son reconocidas como endémicas, representando el 27,3% de la totalidad de especies, lo que le ha permitido a Ecuador ocupar el séptimo lugar en concentración de riqueza a nivel mundial (Jorgensen et al., 1999).

En Ecuador existen hábitats naturales como páramos, bosques húmedos, bosques secos, manglares, océanos y desiertos habitados por una gran cantidad de flora y fauna silvestre (Mena Vásconez, 2005). La mega diversidad está influenciada por varios factores, principalmente su ubicación en el neotrópico, también la presencia de zonas montañosas como la cordillera de los Andes y el paso de corrientes marinas por las zonas costeras del país (INABIO, 2016)

Dentro de los componentes de la diversidad biológica del Ecuador, las plantas vasculares han sido centro de muchas investigaciones para conocer sus posibles propiedades medicinales. En la Tierra se estima que existen entre 260000 y 320000 especies de plantas vasculares. En Ecuador la estimación vegetal calculada este alrededor de las 17000 especies, de las cuales la cuarta parte han sido reconocidas como especies endémicas, y de esta el 7% han sido reportadas como útiles. La gran variedad de especies proviene de diferentes zonas tropicales y subtropicales del planeta posiblemente por la misma acción humana, pues el ser humano ha sido un gran difusor, sobre todo de las plantas útiles. Esa utilidad se ha venido dando desde el asentamiento de los primeros seres humanos en lo que hoy se conoce como Ecuador, pues se sabe que desde la antigüedad ellos ya

aprendieron a usar plantas como medicina para tratar sus dolencias y enfermedades (Balslev et al., 2008)

En nuestro país la gran diversidad de ecosistemas se debe a diferentes factores, entre ellos la cordillera de los Andes, las corrientes marinas y la actividad volcánica, desarrollando flora y fauna única, siendo un país que aloja gran variedad de vida. En Zamora Chinchipe, las características geográficas, pisos altitudinales y condiciones ambientales aptas generan hábitats en donde se desarrolla diversidad florística (Cueva et al., 2019).

## **1.2 Plantas aromáticas**

La historia del ser humano está estrechamente relacionada con el uso de plantas aromáticas y medicinales, desde sus inicios su subsistencia dependía de frutos y hierbas extraídos directo de las plantas, siendo en el siglo XVII el apogeo de las plantas aromáticas, y la fitoterapia se convirtió en su principal valor. En la actualidad, a nivel mundial el 80% de la población cuando se trata de atender su salud hacen uso de la medicina tradicional (Fretes, 2010).

Las plantas aromáticas pertenecen al grupo de plantas medicinales, siendo estas últimas, las que producen principios activos que aportan efectos beneficiosos o nocivos en el cuerpo humano, representando la séptima parte de las especies que existen. La mayoría de las plantas aromáticas son medicinales, sin embargo, no todas las plantas medicinales son aromáticas, variando en estas los metabolitos secundarios (Bandoni et al., 2003).

Por lo tanto, se definen a las plantas aromáticas como aquellas que generan productos aromáticos al ser sometidas a un proceso fisicoquímico, de los cuales sus principios activos están constituidos parcial o totalmente por aceites esenciales (Montoya Cadavid, 2010).

Una premisa que se debe excluir del vocabulario es decir que, todos los productos aromáticos deben tener características organolépticas agradables, existen excepciones, ya que una especie puede tener un olor típico no tan agradable, pero tiene gran valor al ser procesada correctamente su esencia (Bandoni et al., 2003).

En Ecuador el sector de plantas medicinales y aromáticas presentan un crecimiento exponencial, desarrollando diferentes productos para la exportación, en mercados como el

alimenticio, cosmético y farmacéutico. La producción de hierbas aromáticas y medicinales en el ámbito comunitario del sector rural se ha convertido en parte de los ingresos económicos para familias que se dedican a la agricultura y que cuentan con conocimientos ancestrales sobre plantas aromáticas y medicinales (Poveda et al., 2019).

### **1.2.1 Generalidades de los cítricos**

Poseen ricas fuentes de fibra dietética, vitamina C, fenoles y flavonoides, se cree que los cítricos tienen propiedades para promover la salud, las mismas son uno de los cultivos frutales más cultivados, a pesar de la diversidad genética sustancial y la fertilidad interespecífica, el género *Citrus* incluye algunas de las especies más difíciles de producir, el mismo debido a las dificultades para la reproducción convencional (Amorim et al., 2016)

Las técnicas clásicas de selección genética, transferencia de genes, injertos y micro injertos pueden contribuir a la mejora de *Citrus* y la propagación de especies seleccionadas, por ello los procedimientos de manipulación in vitro conducen a una regeneración rápida y directa de las yemas para una micropropagación eficiente y una transformación genética (Donmez et al., 2013).

### **1.2.2 *Citrus x limonia***

Limón mandarina (*Citrus x limonia*), también llamado limón chino, es un híbrido entre la mandarina (*Citrus retícula*) y el limón (*Citrus limón*). El fruto del limón mandarina posee un sabor ácido, cáscara y pulpa anaranjada. La limón mandarina es usada en algunos países como portainjerto como también para la elaboración de refrescos. Las plantas injertadas son vigorosas y grandes. El tamaño de su fruto va de pequeño a mediano, es de sabor fuertemente ácido, refrescante y jugoso, además de brindar una gran cantidad de semillas, pequeñas y altamente poliembriónicas (Vanegas, 2002).

#### **1.2.2.1 Taxonomía de la especie *Citrus x limonia***

La taxonomía de la especie *Citrus x limonia* es la siguiente:

**Tabla 1***Taxonomía de la especie Citrus x limonia*

|                      |                         |
|----------------------|-------------------------|
| <b>División:</b>     | Magnoliophyta           |
| <b>Clase:</b>        | Magnoliopsida           |
| <b>Subclase:</b>     | Rosidae                 |
| <b>Orden:</b>        | Sapindales              |
| <b>Familia:</b>      | Rutaceae                |
| <b>Género:</b>       | Citrus                  |
| <b>Especie:</b>      | <i>Citrus x limonia</i> |
| <b>Nombre común:</b> | Limón mandarina         |

### 1.3 Aceites Esenciales

Los aceites esenciales son una mezcla de varios compuestos químicos volátiles presentes en diferentes proporciones, encargados de dar características propias a cada aceite esencial. Son parte del sistema inmune de las plantas, pues son sintetizados para su protección ante amenazas de depredadores y medioambientales. Las plantas aromáticas son las que comúnmente contienen mayor cantidad de aceite esencial, por lo que constituyen la materia prima para la obtención, ya sea de toda la planta, o de las raíces, hojas, flores o frutos (Ortuño Sanchez, 2006).

Dentro de la composición de los aceites esenciales se encuentra componentes mayoritarios y minoritarios como; hidrocarburos terpénicos, aldehídos, alcoholes, fenoles, éteres, ésteres, cetonas, compuestos fenólicos, entre otros. Cada compuesto presenta una estructura distinta, por lo que su tamaño, forma y vínculos químicos son únicos (Ruiz et al., 2015).

Desde el punto de vista terapéutico o farmacológico los aceites esenciales son de mucha importancia pues han demostrado tener propiedades antiinflamatorias, antisépticas, antitóxicas, antifúngicas, etc. Dentro de las aplicaciones farmacológicas son usados para la obtención de principios activos en la elaboración de medicamentos. Por otra parte, también se aplican en las industrias cosméticas en la elaboración de perfumes o (López Luegon, 2004)

#### 1.3.1 Clasificación de los aceites esenciales

De acuerdo con Montoya (2010) los aceites esenciales se clasifican en base a los criterios mencionados a continuación: consistencia, origen y naturaleza química de

componentes mayoritarios.

Por su consistencia en:

- Esencias fluidas: líquidos y volátiles a temperatura del ambiente
- Bálsamos: con consistencia más espesa, poco volátiles pero propensos a polimerizarse
- Las oleorresinas: líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas
- Los concretos: semi-sólidos constituidos por compuestos apolares

Por su origen en:

- Naturales: obtenidos de la planta, sin ninguna modificación y costosos.
- Artificiales: se obtienen al enriquecerlos con esencias naturales
- Sintéticos: se obtienen mediante la mezcla de varios productos sintetizados por procesos químicos.

Por la naturaleza química de componentes mayoritarios:

- En tres principales grupos: monoterpenoides, sesquiterpenoides y compuestos oxigenados.

#### **1.4 Métodos de extracción de aceites esenciales**

Son variados los métodos utilizados para la extracción de aceites esenciales ya sean físicos o químicos dependiendo la variedad de la planta, las condiciones en las que se cultivó, parte de la planta, actividad biológica, su estabilidad, propiedades, etc. Por ende, a continuación, se describen tres métodos más utilizados y modernos.

##### **1.4.1 Destilación por arrastre de vapor.**

Es uno de los métodos que comúnmente se usa. Se basa en la capacidad que tienen las moléculas de agua, en forma de vapor, para asociarse con las moléculas del aceite. La extracción se da en el momento que el vapor mediante presión atraviesa la planta, liberando así los compuestos volátiles. Cuando el vapor se condensa, en un recipiente se observa el aceite esencial flotando en la parte superior gracias a la insolubilidad con el agua. Este método resulta adecuado para la extracción de aceite esencial de plantas frescas o secas (Montoya, 2010).

### **1.4.2 Extracción con disolventes**

Este método implica el uso de disolventes orgánicos como el hexano o etanol. La planta sometida para la extracción de su aceite se macera junto con el disolvente permitiendo que todos los compuestos volátiles se disuelvan en el líquido. Posteriormente el disolvente se evapora dejando así solo el aceite esencial. Generalmente esta metodología es adecuada para plantas cuyos componentes son sensibles al calor (Acosta Meza & Barahona Celis, 2021)

### **1.4.3 Extracción con fluido super crítico**

La extracción de aceites esenciales mediante fluido supercrítico es un método moderno y eficaz para la obtención de aceites de alta pureza y calidad. El fluido supercrítico es una sustancia que está en un estado intermedio entre líquido y gaseoso, pero sometida a condiciones altas de temperatura y presión. El fluido comúnmente más utilizado en la extracción de aceites es el CO<sub>2</sub>, pues cuenta con propiedades únicas como disolver selectivamente los compuestos deseados de la planta sin dejar impurezas y alterar su calidad (Esquivel & Vargas, 2007)

## **1.5 Propiedades de los aceites esenciales**

Los aceites esenciales presentan varias propiedades, entre ellas las propiedades físicas que pueden ser: elevada volatilidad, insolubilidad en agua, aspecto oleoso, punto de ebullición de entre 150 a 300°C, densidad menor que el agua, alto grado de inflamabilidad, solubilidad con otros aceites, alcohol y varios solventes orgánicos, además, son los responsables de dar olor, sabor o aroma característicos de las plantas. Otra de las propiedades presentes en un aceite esencial son las farmacológicas, y al igual que medicamentos como antibióticos o alcaloides siempre se debe considerar que pueden ser muy peligrosos si no se controlan o manipulan bajo las medidas de un profesional en cuanto a dosis y formas apropiadas de uso. Se pueden encontrar propiedades antisépticas, antiinflamatorias, cicatrizantes, antispasmodicas, antirreumáticas, antineurálgicas, antiparasitarias, entre otras, que son usadas en el campo de la medicina moderna (Flórez & Mario, 2014)

### **1.5.1 Diversos usos y aplicaciones de los aceites esenciales**

El uso de aceites esenciales dentro de distintas industrias es variado, pueden ser empleados como ambientadores y aromatizantes. También son usados en la elaboración de champús, jabones, perfumes, licores, desodorantes y en determinadas ocasiones en alimentos. Dentro de la industria farmacéutica los han sido muy explotados, pues el origen de muchos medicamentos proviene de los compuestos encontrados en las plantas. Gracias a las propiedades antisépticas de algunos aceites esenciales se han tratado problemas de las vías respiratorias, infecciones de la piel, problemas de vías urinarias, en enjuagues bucales y en el campo de la odontología. En general, los aceites esenciales se usan y aplican a muchas enfermedades, también en industrias para crear cremas dentales, de baño, perfumes y ambientadores (Flórez & Mario, 2014)

### **1.5.2 Aceites esenciales en la farmacología**

Un aceite esencial con una dosis específica puede ser tan efectivo como un medicamento, alcaloide, antibiótico o enzima. Desde tiempos ancestrales, las plantas se han utilizado con fines medicinales y como sahumerios religiosos para purificar los ambientes, dando origen a la perfumería moderna. Actualmente, especias como la canela y la manzanilla se emplean tanto en medicamentos como en la cocina para aromatizar y dar sabor a los alimentos. A lo largo de la historia, los perfumes y aceites esenciales han sido estudiados en el ámbito farmacéutico, y muchos de ellos poseen propiedades farmacológicas beneficiosas. Sin embargo, es importante destacar que algunas esencias pueden ser peligrosas si no se utilizan adecuadamente y con la dosis recomendada. Por lo tanto, es fundamental tener precaución y usarlos de manera responsable para evitar cualquier efecto adverso (Páez, 2013)

### **1.5.3 Caracterización de los aceites esenciales**

Existen diversos métodos analíticos para caracterizar los aceites esenciales y se aplicaran dependiendo a la finalidad que se persiga. Si se requiere la identificación de compuestos es necesario aplicar el método de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) y si se busca determinar la cantidad de constituyentes

volátiles es necesario emplear el método de cromatografía de gases con detector de llama (GC-FID). Otras técnicas aplicables para la caracterización también son la resonancia magnética nuclear (RMN) y espectroscopia infrarroja (IR), sin embargo, en la mayoría de las investigaciones se utilizan las dos primeras técnicas mencionadas (Pino Alea, 2015)

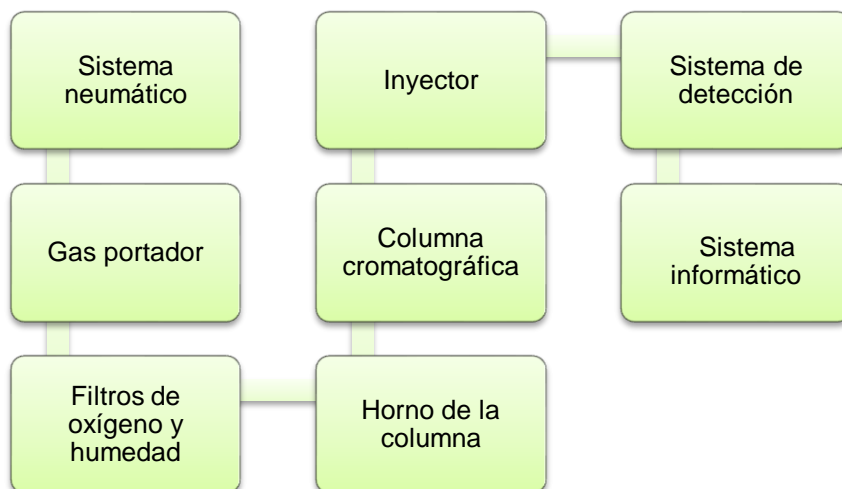
#### **1.5.4 Cromatografía de gases**

La cromatografía de gases es una técnica analítica de separación que proporciona una información cualitativa y cuantitativa de los componentes presentes en una mezcla. Se trata de un proceso mediante el cual una mezcla es separada en sus componentes por medio de una fase móvil gaseosa que pasa a través de una fase estacionaria (Challo Chata, 2021)

Las técnicas cromatográficas se fundamentan o se basan en el fenómeno de partición, entre dos fases: la móvil (que usa hidrogeno, nitrógeno, helio, argón) y una estacionaria que arrastra los componentes de una muestra por la columna (Montoya, 2010).

Un cromatógrafo lo constituye un sistema de inyección que permite colocar e introducir la muestra en la columna, y un detector encargado de atribuir la presencia de varios compuestos que salen por la columna según el tiempo, que se reflejan en un cromatograma. En cuanto al análisis e identificación de los compuestos presentes en un el aceite esencial por cromatografía de gases, se comparan los tiempos de retención, que corresponde al tiempo que ha transcurrido desde la inyección y la presencia del pico cromatográfico, con patrones recopilados en literatura como el libro de Adams. Hay que considerar que los tiempos de retención pueden sufrir cambios por variables como técnica de inyección, modificaciones de temperatura, diseño del equipo, flujo del gas, etc. Por eso, hay que emplear otros parámetros como el índice de retención, calculados por un grupo de n-alcanos corridos también en la columna cromatográfica en las mismas condiciones que el analito (Castañeda et al., 2007).

Los componentes indispensables de un cromatógrafo de gases son:

**Figura 1***Componentes cromatógrafo de gases*

### **1.5.5 Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS)**

La GC-MS es una técnica que ha sido muy utilizada en especial para analizar la composición química de los aceites esenciales. El acoplamiento de la espectrometría de masas a un cromatógrafo no solo permite separar componentes, sino que también permite identificarlos, pues estos son compuestos volátiles con bajo peso molecular, por lo que la GC-MS necesita solo de una pequeña muestra de aceite esencial y que esta se encuentre en la fase gaseosa para realizar su análisis (Stashenko & Martínez, 2010).

### **1.5.6 Detector de ionización de llama (FID)**

El detector de ionización de llama (FID) es uno de los detectores extensamente utilizados, es un detector de tipo universal que un cromatógrafo de gases utiliza para cuantificar los compuestos de un aceite esencial. Posee una elevada sensibilidad, poco ruido y amplio intervalo de respuesta lineal. Al ser de tipo universal, el proceso se realiza por normalización de áreas de picos del cromatograma. Generalmente no se utilizan factores de corrección, porque los componentes del aceite esencial son volátiles y tienden a tener el mismo grado de respuesta al detector (Gomis Yagües, 2008).

### **1.5.7 Análisis enantiomérico**

El análisis enantiomérico se refiere a la determinación y separación de los enantiómeros, que son las formas quirales de una molécula. Los enantiómeros son imágenes especulares una de la otra que tienen la misma fórmula química, pero se diferencian en la disposición tridimensional de sus átomos correspondientes. Este análisis es importante dentro de muchos campos como la química, biología, farmacología, etc. Los enantiómeros pueden tener propiedades físicas, químicas y biológicas distintas, es por ello, que su análisis determina si un enantiómero es biológicamente activo o inactivo. Entre los métodos y técnicas principales para el análisis de enantiómeros está la cromatografía en fase líquida de alta resolución (HPLC) y la cromatografía de gases (GC). El análisis enantiomérico es fundamental para caracterizar sustancias quirales y garantizar la pureza y calidad, en este caso, del aceite esencial (Morante Zarco, 2006).

## Capítulo dos

### Metodología

#### 2.1 Parte experimental

El presente trabajo de titulación se efectuó en la Universidad Técnica Particular de Loja, específicamente en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, efectuado con la metodología detallada en la Figura 2.

#### Figura 2

*Metodología empleada de manera experimental*



#### 1. Obtención de la materia vegetal

La recolección de la materia prima vegetal se la realizó en el sector La Florida perteneciente al cantón Palanda.



#### 2. Extracción del aceite esencial

Se llevo a cabo mediante destilación por arrastre de vapor.



#### 3. Determinación de las propiedades físicas

- Densidad relativa: Picnómetro (Norma AFNOR NF T 75-111)
- Índice de refracción: Refractómetro (Norma AFNOR NF T 75-112):
- Actividad óptica: Polarímetro (Norma ISO 592-1998)



#### 4. Determinación de la composición química

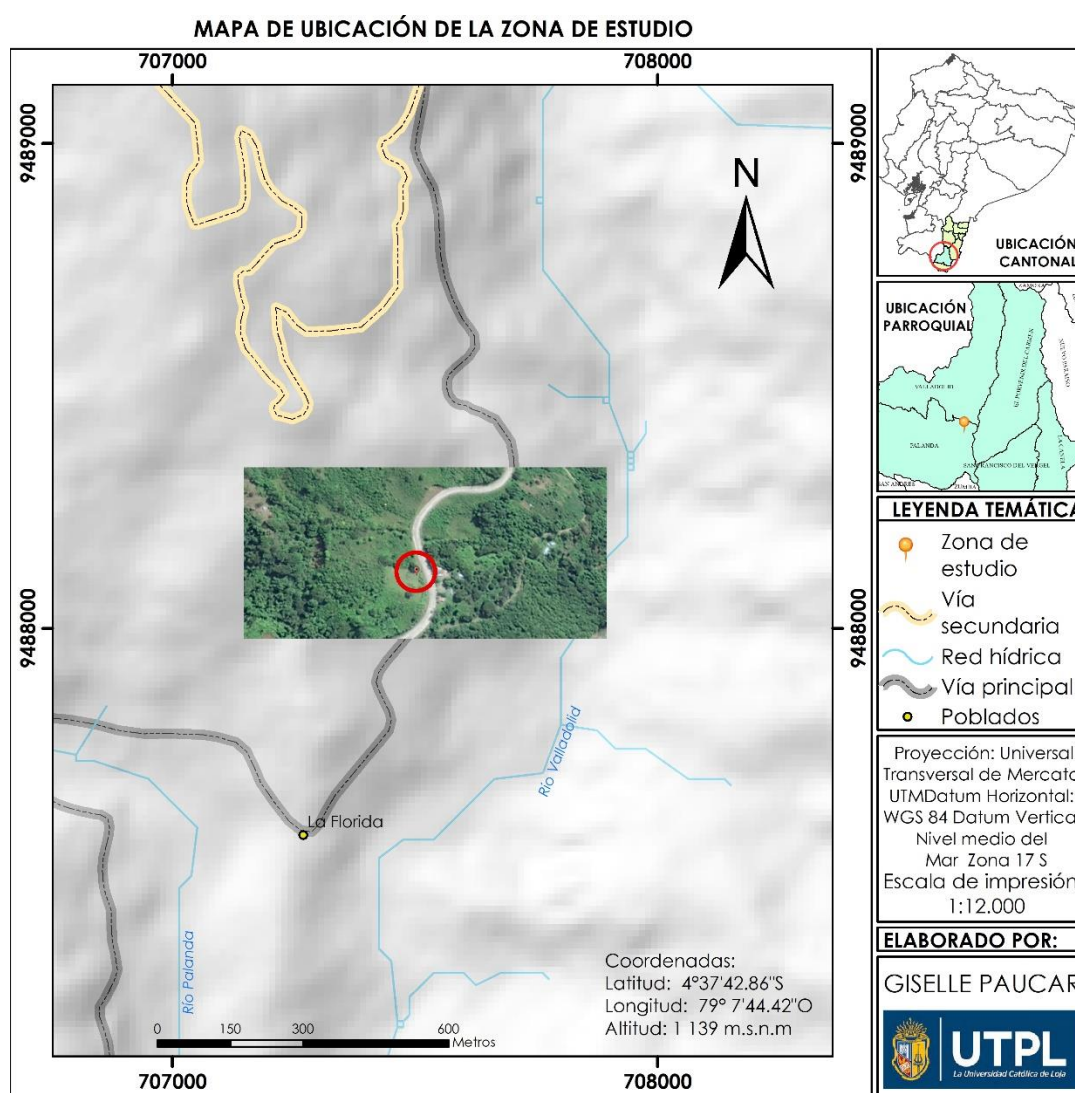
- Se efectuó con la técnica analítica: CG-MS y CG-FID.
- Se utilizó diversas columnas de diferente polaridad las cuales fueron: Apolar( TR-5ms), polar(TRWAX) y columna enantioselectiva.

## 2.2 Recolección de la materia vegetal

El fruto de la especie *Citrus x limonia* fue recolectado en el sector La Florida del cantón Palanda perteneciente a la provincia de Zamora Chinchipe. El material fue recolectado en tres salidas de campo, cada una realizada con intervalos de 15 días entre cada una, en los meses de abril y mayo, en la figura 3, se visualiza la ubicación geográfica de la especie con sus correspondientes coordenadas.

**Figura 3**

*Ubicación geográfica de la especie Citrus x limonia*



Una vez recolectada la muestra vegetal fue llevada hasta los laboratorios del Departamento de Química y Ciencias Exactas de la UTP en donde se realizó el tratamiento

post cosecha, con la finalidad de seleccionar el material vegetal, eliminando así las partes deterioradas, secas o en putrefacción de las hojas, todo esto se lleva a cabo para evitar posibles contaminantes que puedan interferir en nuestros resultados. Debido a que el deterioro es acelerado cuando se trata de materia fresca, para esto se prevé que el tiempo entre la recolección y la destilación no sea superior a 12 horas para impedir la contaminación por descomposición del componente vegetal en la extracción del aceite vegetal.

### **2.3 Determinación de humedad de la cáscara del fruto *Citrus x limonia***

Para determinar el porcentaje de humedad se tomaron muestras de la cáscara del fruto *Citrus x limonia*, se procede a colocar en la termobalanza, en la que se troceó en pequeños pedazos para tener homogeneidad y buena distribución para su determinación.

Estas muestras se colocaron en una cápsula de aluminio para ser ingresadas en un analizador de humedad tipo BMA 150, el cual mediante un radiador IR permite el análisis con un rango de temperatura automática de máximo de 160°C, hasta eliminar toda la humedad en el material vegetal, es decir, se mantenga constante su peso.

Cabe recalcar que para la determinación de humedad se realizó por triplicado en cada una de las recolecciones, y finalmente se obtiene el porcentaje de humedad de la muestra, ver Figura 4.

**Figura 4**

*Medición del porcentaje de humedad*



## 2.4 Extracción de aceite esencial de *Citrus x limonia*

El aceite esencial se obtuvo a partir de la cáscara del fruto de *Citrus x limonia*. La extracción fue realizada en un equipo de destilación por arrastre a vapor (ver Figura 5), el cual consiste en un tanque cilíndrico de acero inoxidable expuesto a la llama y que en su interior contiene una placa perforada y debajo de esta se coloca agua, luego sobre la placa se procede a colocar el material vegetal, previo a tapar se coloca agua en los bordes del tanque, la tapa del tanque tiene forma cónica con una salida conectada a un tubo enroscado a un florentino que es acoplado al condensador, se ubican las mangueras tanto para la entrada y salida de agua del refrigerante así también para el agua en forma de vapor que se recircula al tanque.

**Figura 5**

*Obtención de aceite esencial*



Pesado de la cáscara de  
*Citrus x limonia*



Proceso de destilación



Obtención del aceite esencial

Una vez el equipo estaba totalmente armado se procedió a encender la fuente de calor, a medida que se iba produciendo el vapor por la ebullición del agua, este atravesó la materia vegetal rompiendo los conductos oleíferos de las plantas, permitiendo arrastrar la mezcla del aceite esencial hasta el tubo condensador. El condensado que se forma por la

destilación se recogió en un florentino, en donde por diferencias de densidades el aceite reposó en la parte superior.

El aceite esencial se conservó en el florentino hasta que se acabó de realizar la destilación, y luego de unas horas al no visualizar aumento en su volumen se apagó la fuente de calor, luego se esperó a que el destilador se enfrió para recolectar el aceite esencial en una probeta y proceder a medir su volumen. El aceite obtenido se traspasó a un frasco ámbar y se almacenó en un refrigerador para sus respectivos análisis (Figura 6). Este proceso se efectuó por tres repeticiones en total, con diversos lapsos de tiempo.

**Figura 6**

*Almacenamiento del aceite esencial*



#### **2.4.1 Determinación del rendimiento del aceite esencial de *Citrus x limonia***

A continuación del proceso de extracción y, por ende, haber obtenido el aceite esencial, se examinó la eficacia del proceso de destilación determinado el rendimiento, para ello, se utilizó el peso de la materia prima que se obtuvo antes del proceso de destilación y también el volumen obtenido después de realizar la misma y se calculó el rendimiento con la ecuación descrita en el procedimiento del Apéndice A.

### **2.5 Determinación de las propiedades físicas**

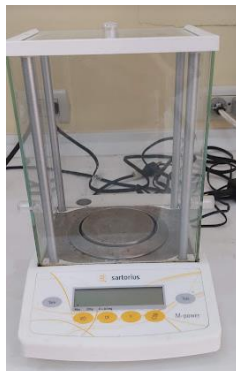
La determinación de las propiedades físicas del aceite esencial de *Citrus x limonia* realizadas fueron: la densidad relativa, el índice de refracción y la actividad óptica.

#### **2.5.1 Densidad Relativa**

Para el cálculo de la densidad se relacionó la masa con el volumen del aceite esencial, se hizo el análisis de acuerdo con la norma AFNOR NF T75-111, se utilizó el picnómetro de 1 mL y también una balanza analítica. (Figura 7).

**Figura 7**

*Medición de la  
densidad relativa*



En el proceso de determinación de la densidad del aceite esencial de *Citrus x limonia*, primero se homogenizó las muestras que se obtuvieron en cada destilación, seguidamente se colocó el picnómetro vacío en la balanza analítica para calcular su peso, se pesó nuevamente el picnómetro con agua destilada y finalmente se pesó el picnómetro con el aceite esencial de *Citrus x limonia*. El cálculo empleado se realizó de acuerdo con el procedimiento establecido en el Apéndice B.

**2.5.2 Índice de refracción**

La determinación del índice de refracción se efectuó según lo mencionado en la norma AFNOR NF 75-112 25, con el uso del refractómetro ABBE (Figura 8), un equipo especializado que permite medir la velocidad de propagación de la luz en el aceite esencial a temperatura de 20°C. Para seguir con el análisis se colocó aproximadamente una gota de aceite en medio de la placa y se procedió con la lectura.

**Figura 8**

*Medición del índice  
de refracción*



Una vez obtenido los resultados se calculó un valor promedio entre las muestras de aceite de cada lote. En el Apéndice C describe el fundamento y procedimiento para la determinación del índice de refracción.

### **2.5.3 Actividad óptica**

La determinación de la actividad óptica del aceite esencial de *Citrus x limonia* se efectuó en base a la norma ISO 592:1998, Apéndice D. Se preparó la muestra de aceite esencial en un balón de aforo de 10 mL, se pesó 0.5 g de muestra y se aforo con diclorometano hasta completar el volumen. Cuando la muestra estuvo diluida se la inserto en una celda del equipo polarímetro digital, que tiene la finalidad de medir la rotación óptica del aceite esencial (Figura 9). El resultado queda expresado en grados de ángulo (°).

**Figura 9**

*Equipo Polarímetro digital  
Mrc-Automatic Polarimeter P810*



### **2.5.4 Determinación del color**

La determinación del color subjetivo se realizó mediante la página online PINETOOL, en la cual se procedió a subir una foto del aceite esencial *Citrus x limonia* una vez captura se ingresa al programa en la cual se asignó el código HEX correspondiente al color subjetivo.

## 2.6 Determinación de la composición química del aceite esencial

La determinación de los compuestos químicos presentes en el aceite esencial de *Citrus x limonia* se efectuó aplicando la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y también al detector de ionización de llama (GC-FID) en donde se emplearon dos tipos de columnas; no polar TR5MS y polar TRWAX, obteniendo resultados cualitativos y cuantitativos.

### 2.6.1 Descripción de las características del equipo cromatográfico y sistema para analizar el aceite esencial por cromatografía de gases

El cromatógrafo utilizado para el análisis e identificación de compuestos volátiles del aceite esencial fue un equipo automático Thermo Scientific trace 1310 (Figura 10) acoplado a espectrometría de masas (ISQ7000) y detector de ionización de llama (FID).

**Figura 10**

*Cromatógrafo de Gases Thermo Scientific trace 1310*



### 2.6.2 Preparación de la muestra

En el proceso de inyectar las muestras en el equipo cromatográfico se efectuó una dilución seriada, primeramente, se añadió 10  $\mu\text{L}$  de aceite esencial de *Citrus x limonia* en un vial de color ámbar y luego 990  $\mu\text{L}$  de diclorometano, obteniendo así una dilución de 1 mL. Este procedimiento se lo realiza para las tres muestras de aceite esencial de *Citrus x limonia* extraído y se rotula con los siguientes códigos: CL1, CL2 y CL3 (Figura 11).

Sucesivamente se realiza la inyección de hidrocarburos (C10-decano a C25 pentacosano), este procedimiento se realiza con el fin de establecer un índice de retención e

identificación de cada uno de los compuestos obtenidos en la extracción de la muestra, estos fueron inyectados en condiciones similares que los viales con muestras del aceite esencial.

**Figura 11**

*Muestras de aceite esencial  
preparadas para inyectar*



### **2.6.3 Corrida cromatográfica en columna no polar TR5MS acoplada a espectrómetro de masas**

Para poder realizar la corrida cromatográfica en la columna TR5MS se inyectaron de manera automática las tres muestras de aceite esencial en el cromatógrafo de gases Thermo Scientific trace 1310 acoplado al espectrómetro de masas en el cual también, anteriormente, se inyectaron hidrocarburos (C10-C25) en las mismas condiciones en las que se inyectó el aceite. (Tabla 2). Los hidrocarburos reciben comercialmente el nombre de TPH-6RPM.

**Tabla 2**

*Condiciones operacionales para la corrida cromatográfica en la columna no polar TR5-ms en GC-MS*

| <b>Parámetros</b>           | <b>Datos</b>             | <b>Condiciones de trabajo</b> |
|-----------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| <b>Sistema de inyección</b> | Gas empleado             | Helio                         |
|                             | Modo                     | Split                         |
| <b>Horno</b>                | Temperatura inicial (°C) | 230                           |
|                             | Radio de partición       | 40:1                          |
|                             | Presión (psi)            | 11.02                         |
|                             | Temperatura inicial (°C) | 50                            |
|                             | Tiempo inicial (min)     | 3                             |
|                             | Temperatura final (°C)   | 230                           |
|                             | Rampa (°C/min)           | 3                             |
| <b>Columna</b>              | Tipo                     | TR5-MS                        |
|                             | Modo                     | Flujo constante               |
|                             | Temperatura máxima (°C)  | 350                           |

|  |                               |       |
|--|-------------------------------|-------|
|  | Flujo inicial (mL/min)        | 0.9   |
|  | Presión inicial nominal (psi) | 11.02 |
|  | Velocidad promedio (cm/s)     | 23    |
|  | Presión de salida (atm)       | 1     |
| <b>Detector</b><br><b>Espectrómetro de gases</b> | Temperatura (°C)              | 250   |

#### 2.6.4 Identificación de compuestos de la columna TR5MS y TRWAX en GC-MS

Una vez obtenido el cromatograma se realizó una integración automatizada por el equipo mediante el programa “MSD-Chemstation d.01.00SP1” para tener mayor precisión, esta permitió obtener un número determinado de compuestos para analizar e identificar. Los datos se extrajeron en Excel, con anterioridad se extrajeron los datos de los hidrocarburos (C10-C25) para estructurar la curva de Van Den Dool y Krats, útil para calcular el índice de retención que permite la identificación correcta del compuesto basándose en bibliografía. Una vez estructurada la curva se comparó el tiempo de retención de los compuestos que fueron hallados en el aceite esencial de *Citrus x limonia* con el tiempo de retención de los hidrocarburos inyectados. Este procedimiento del Apéndice E se realizó con el propósito de determinar los índices de retención (IR) de cada compuesto.

#### 2.6.5 Corrida cromatográfica en columna polar TRWAX acoplada a espectrometría de masas

Se inyectaron las muestras de manera automática con las siguientes condiciones en el equipo cromatográfico (Tabla 3).

**Tabla 3**

*Condiciones operacionales para la corrida cromatográfica en la columna polar TRWAX acoplada a espectrómetro de masas*

| Parámetros                  | Datos                    | Condiciones de trabajo |
|-----------------------------|--------------------------|------------------------|
| <b>Sistema de inyección</b> | Gas empleado             | Helio                  |
|                             | Modo                     | Split                  |
| <b>Horno</b>                | Temperatura inicial (°C) | 230                    |
|                             | Ratio de partición       | 40:1                   |
|                             | Presión (psi)            | 11,02                  |
|                             | Temperatura inicial (°C) | 50                     |

|  |                               |                 |
|--|-------------------------------|-----------------|
|  | Tiempo inicial (min)          | 3               |
|  | Temperatura final (°C)        | 230             |
|  | Rampa (°C/min)                | 3               |
| <b>Columna</b>                                   | Tipo                          | TRWAX           |
|  | Modo                          | Flujo constante |
|  | Temperatura máxima (°C)       | 350             |
|  | Flujo inicial (mL/min)        | 0.9             |
|  | Presión inicial nominal (psi) | 11.02           |
|  | Velocidad promedio (cm/s)     | 23              |
|  | Presión de salida (atm)       | 1               |
| <b>Detector</b><br><b>Espectrómetro de gases</b> | Temperatura (°C)              | 250             |

### 2.6.6 Identificación de compuestos de la columna TR5MS y TRWAX en CG-FID.

En los cromatogramas que se obtuvieron se observó el tiempo de retención y el área de los picos de los compuestos detectados por el detector de ionización de llama (FID). Se extrajeron los datos en Excel y de acuerdo con el área relativa y tamaño de los picos se fueron ajustando con los compuestos identificados en GC-MS.

### 2.6.7 Lectura cromatográfica en columna quiral DET-MS acoplada a espectrómetro de masas

Para determinar la distribución enantiomérica las muestras fueron inyectadas en el cromatógrafo de gases provisto de una columna denominada MEGA-DEX DET-Beta (Mega, Legnano, MI, Italia) de 30 m de largo, 0.25 m de diámetro interno y 0.25 µm de espesor y de fase estacionaria (Diethyl tertbutylsilyl-BETA-Cyclodextrin).

Como se puede observar en la tabla 5 se encuentran las condiciones de trabajo empleadas para la columna.

**Tabla 4**

*Condiciones de trabajo de la columna DET-MS en GC-MS*

| Parámetros                  | Datos                    | Condiciones de trabajo |
|-----------------------------|--------------------------|------------------------|
| <b>Sistema de inyección</b> | Gas empleado             | Helio                  |
|                             | Modo                     | Split                  |
| <b>Horno</b>                | Temperatura inicial (°C) | 230                    |
|                             | Radio de partición       | 40:1                   |

|  |                               |                   |
|--|-------------------------------|-------------------|
|  | Presión (psi)                 | 6.19              |
|  | Temperatura inicial (°C)      | 50                |
|  | Tiempo inicial (min)          | 3                 |
|  | Temperatura final (°C)        | 230               |
|  | Rampa (°C/min)                | 3                 |
| <b>Columna</b>                             | Tipo                          | Mega 15388 Quiral |
|  | Modo                          | Flujo constante   |
|  | Temperatura máxima (°C)       | 350               |
|  | Flujo inicial (mL/min)        | 1                 |
|  | Presión inicial nominal (psi) | 6.19              |
|  | Velocidad promedio (cm/s)     | 40                |
|  | Presión de salida (atm)       | 1                 |
| <b>Detector<br/>Espectrómetro de gases</b> | Gas empleado                  | Nitrógeno         |
|  | Temperatura (°C)              | 250               |

### 2.6.8 Lectura cromatográfica en columna quiral DAC-MS acoplada a espectrómetro de masas

Se inyectó en el cromatógrafo de gases utilizando una columna quiral denominada DAC-MS (MEGA-DEX DAC-Beta, Mega, Legnano, MI, Italia) de 30 m de largo, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor y de fase estacionaria (Diacetyl tertbutylsilyl-BETA-Cyclodextrin).

Como se puede observar en la tabla 6 se encuentran las condiciones de trabajo empleadas para la columna.

**Tabla 5**

*Condiciones de trabajo de la columna DAC-MS en GC-MS*

| Parámetros                  | Datos                    | Condiciones de trabajo |
|-----------------------------|--------------------------|------------------------|
| <b>Sistema de inyección</b> | Gas empleado             | Helio                  |
|                             | Modo                     | Split                  |
| <b>Horno</b>                | Temperatura inicial (°C) | 230                    |
|                             | Ratio de partición       | 40:1                   |
|                             | Presión (psi)            | 6.19                   |
|                             | Temperatura inicial (°C) | 50                     |
|                             | Tiempo inicial (min)     | 3                      |
|                             | Temperatura final (°C)   | 230                    |
|                             | Rampa (°C/min)           | 3                      |

|                               |                               |                   |
|-------------------------------|-------------------------------|-------------------|
| <b>Columna</b>                | Tipo                          | Mega 15388 Quiral |
|                               | Modo                          | Flujo constante   |
|                               | Temperatura máxima (°C)       | 350               |
|                               | Flujo inicial (mL/min)        | 1                 |
|                               | Presión inicial nominal (psi) | 6.19              |
|                               | Velocidad promedio (cm/s)     | 40                |
|                               | Presión de salida (atm)       | 1                 |
| <b>Detector</b>               | Gas empleado                  | Nitrógeno         |
| <b>Espectrómetro de gases</b> | Temperatura (°C)              | 250               |

## Capítulo tres

### Resultados y discusiones

#### 3.1 Porcentaje de humedad de la cáscara de *Citrus x limonia*

Los resultados obtenidos del porcentaje de humedad, el valor de la media aritmética y desviación estándar de la cáscara de *Citrus x limonia*, se detallan en la tabla 5.

**Tabla 6**

*Porcentaje de humedad de Citrus x limonia*

| Recolecciones | Humedad (%) | $\bar{X}$ (%) | $\sigma$ |
|---------------|-------------|---------------|----------|
| CL1           | 74.359      |               |          |
| CL2           | 78.892      | 76.68         | 2.27     |
| CL3           | 76.790      |               |          |

CL: *Citrus x limonia*: 1 Primera recolección; 2 Segunda recolección; 3 Tercera recolección  
 $\bar{X}$ : Media aritmética respecto a las diversas repeticiones  
 $\sigma$ : Desviación estándar

Nuestra especie en estudio se caracterizó por su notable presente de agua, visualizada notoriamente en la humedad promedio que es de 76.68%, no obstante, se puede estimar que existe una variación mínima en las humedades de las recolecciones de materia vegetal, por ende, se puede recalcar que la variación de estos resultados se debe a las condiciones climáticas en el día, horario y lugar de recolección de la especie.

#### 3.2 Determinación del rendimiento del aceite esencial de *Citrus x limonia*

En la Tabla 6 se visualiza la ración de aceite esencial extraído en cada recolección, en total se destilo 10,84 kg de materia vegetal, obteniendo como volumen final 87 mL.

**Tabla 7**

*Rendimiento del aceite esencial de Citrus x limonia*

| Recolecciones | Peso (Kg) | Volumen (mL) | Rendimiento (%) | $\bar{X}$ (%) | $\sigma$ |
|---------------|-----------|--------------|-----------------|---------------|----------|
| CL1           | 3.44      | 13           | 0.38            |               |          |
| CL2           | 3.70      | 34           | 0.92            | 0.79          | 0.37     |
| CL3           | 3.70      | 40           | 1.08            |               |          |
| <b>Total</b>  | 10.84     | 87           |                 |               |          |

CL: *Citrus x limonia*: 1 Primera recolección; 2 Segunda recolección; 3 Tercera recolección  
 $\bar{X}$ : Media aritmética respecto a las diversas repeticiones  
 $\sigma$ : Desviación estándar

### 3.3 Determinación de las propiedades físicas del aceite esencial de la cáscara de *Citrus x limonia*.

#### 3.3.1 Densidad Relativa

En la Tabla 7, se observa los resultados finales, los cálculos de su media y desviación estándar de la determinación de la densidad relativa del aceite esencial en cuanto a nuestro aceite esencial en estudio se realizó por triplicado.

**Tabla 8**

*Densidad relativa del aceite esencial de Citrus x limonia*

| Recolecciones | Densidad | $\bar{X}$ (%) | $\sigma$ |
|---------------|----------|---------------|----------|
| CL1           | 0.8672   | 0.8717        | 0.0039   |
| CL2           | 0.8739   |               |          |
| CL3           | 0.8740   |               |          |

**CL:** *Citrus x limonia*: 1 primera recolección; 2 Segunda recolección; 3 Tercera recolección. Media aritmética; correspondiente a las diferentes repeticiones. **SD:** Desviación estándar

Podemos visualizar en la Tabla 7 el resultado de la densidad fue de  $0.8717 \pm 0.0039$  g/cm<sup>3</sup>, por lo que, por ende, podemos deducir con estos resultados obtenidos que es menor a la densidad del agua, facilitando de esta manera la separación del aceite esencial con el agua durante el proceso de destilación mediante la técnica de arrastre de vapor. En cuestión, se puede recalcar que el valor obtenido se mantiene dentro de la densidad relativa que posee los aceites esenciales la cual es de 0.85 a 1.18; estos valores fluctúan según la especie vegetal que está tratando y de su lugar de origen (Jaramillo Correa, 2021).

Se debe destacar mucho este procedimiento ya que por medio del análisis de densidad se puede deducir la calidad y pureza del aceite esencial estudiado.

#### 3.3.2 Índice de Refracción

La Tabla 8 muestra los resultados obtenidos, cálculos de la media aritmética y desviación estándar de la determinación del índice de refracción del aceite esencial en estudiado.

**Tabla 9***Índice de refracción del aceite esencial de Citrus x limonia*

| Recolecciones | Índice de refracción | $\bar{X}$ (%) | $\sigma$ |
|---------------|----------------------|---------------|----------|
| <b>CL1</b>    | 1.4811               | 1.4821        | 0.0015   |
| <b>CL2</b>    | 1.4838               |               |          |
| <b>CL3</b>    | 1.4813               |               |          |

**CL:** *Citrus x limonia*: 1 primera recolección; 2 Segunda recolección; 3 Tercera recolección. Media aritmética; correspondiente a las diferentes repeticiones. SD: Desviación estándar

Nuestro resultado obtenido del índice de refracción del aceite esencial en estudio fue de  $1.4821 \pm 0.0015$ , basándonos en (Mettler Toledo, 2018) que nos menciona que el índice de refracción promedio es de generalmente los aceites de manera general están en un valor de 1.4 y 1.6, por lo cual nuestro resultado se mantiene dentro del valor referencial según la bibliografía.

### 3.3.3 Actividad Óptica

En la Tabla 9 se describen los resultados obtenidos en las tres repeticiones de la actividad óptica, de nuestro aceite esencial estudiado.

**Tabla 10***Actividad óptica del aceite esencial de Citrus x limonia*

| Recolecciones | Actividad óptica | $\bar{X}$ (%) | $\sigma$ |
|---------------|------------------|---------------|----------|
| <b>CL1</b>    | 6.18             | 6.15          | 0.19     |
| <b>CL2</b>    | 6.33             |               |          |
| <b>CL3</b>    | 5.95             |               |          |

**CL:** *Citrus x limonia*: 1 primera recolección; 2 Segunda recolección; 3 Tercera recolección. Media aritmética; correspondiente a las diferentes repeticiones. SD: Desviación estándar

La actividad óptica es una característica física que permite calcular la capacidad de desviar la luz polarizada en una dirección específica. Esta propiedad se clasifica como dextrógiro (+) cuando la luz se desvía en el sentido de las manecillas del reloj, y levógiro (-)

cuando se desvía en sentido contrario a las manecillas del reloj (Medicinales Aromáticas, 2007). Con respecto al aceite analizado, los datos presentados muestran una rotación promedio dextrógira de  $6.15 \pm 0.19$ .

### 3.3.4 Determinación del color del aceite esencial de *Citrus x limonia*

El color es la propiedad sensorial más importante relacionada con el sentido de la vista, aunque además existen otros atributos sensoriales detectados por medio de este sentido que son apariencia, forma, superficie, etc.


El color es una propiedad básica en cuanto a la evaluación de calidad además de constituir una propiedad fundamental en los análisis, esta propiedad y determinación del color se puede ver afectado debido a la madurez de la planta o hojas, zona de producción, el proceso de obtención y la manera de conservación.

En el presente caso, como se puede observar en la tabla 10 mediante la utilización de un selector de color HTML el cual mediante el código de color nos dio como resultado un código de CBC96F, haciendo referencia a que nuestro aceite esencial posee un color verde mostaza.

**Tabla 11**

*Propiedad física del aceite esencial Citrus x limonia.*

| Color subjetivo     | Verde mostaza        |
|---------------------|----------------------|
| Valor de color RGB  | R:203; G:201; B:111  |
| Valor de color HSL  | H:59; S:45; L:62     |
| Valor de color CMYK | C:0; M:1; Y:45; K:20 |
| Código de color HEX | CBC96F               |



#CBC96F  
203, 201, 111

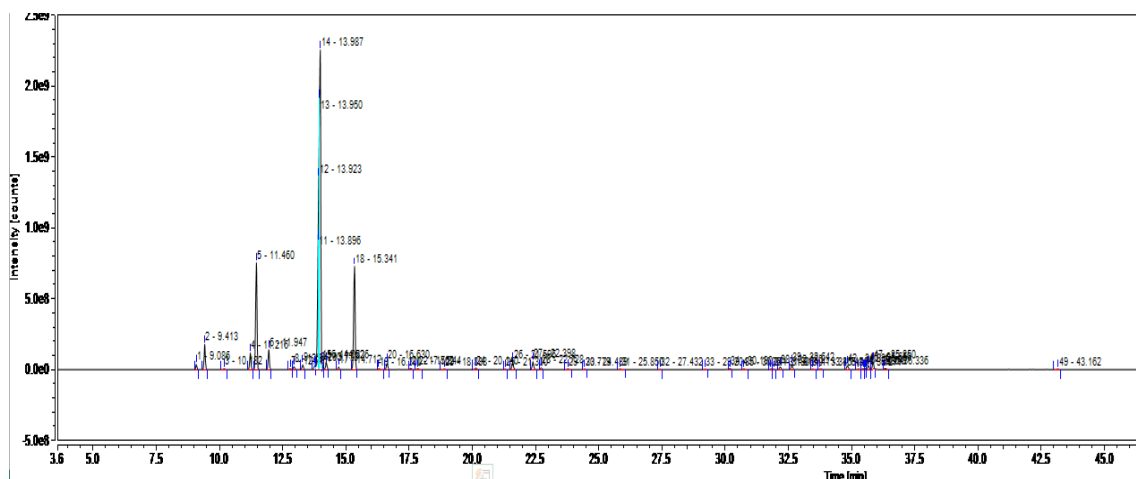
### 3.4 Determinación de la composición del aceite esencial de *Citrus x limonia*

La composición química del aceite esencial de *Citrus x limonia* se efectuó a través de la inyección de tres muestras en las columnas TR5MS (No polar) y TRWAX (Polar), respectivamente acoplados a GC-MS (Espectrometría de masas) y GC-FID (Detector de ionización de la llama). En los perfiles cromatográficos (Figura 12 y 13) se visualizan los

compuestos químicos aislados en la columna TR5MS y TRWAX; cada pico representa un compuesto y los cuales se visualizan conforme al orden de elución y tiempo de retención. Los compuestos mayoritarios se pueden visualizar como los picos presentes con mayor altitud.

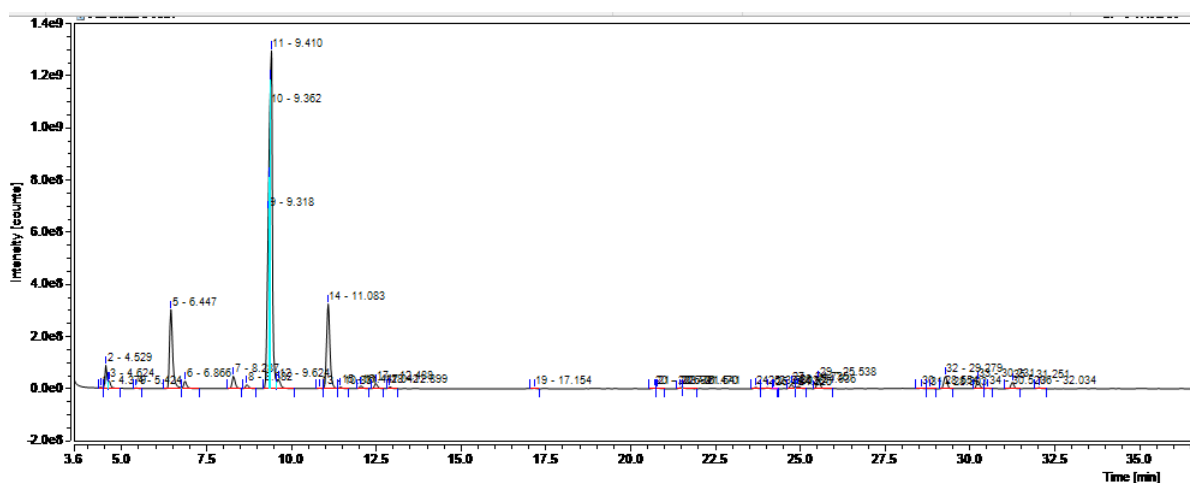
**Figura 12**

*Cromatograma de la columna TR5ms del aceite esencial Citrus x limonia*



**Figura 13**

*Cromatograma de la columna TRWAX del aceite esencial Citrus x limonia*



La identificación de análisis cuantitativo, se efectuó en la columna TR5MS los resultados obtenido se visualizan en la Tabla 11 en la cual se observa los compuestos identificados en la columna no polar TR5MS, el índice de retención calculado con la ecuación de Van Den Dool y Krtas, el índice de retención de referencia en la literatura de Adams, la cantidad relativa de los compuestos obtenidos en GC-MS, la media y desviación

estándar de las cantidades relativas y el porcentaje total de compuestos identificados.

Adicional en la tabla, se enmarcan los compuestos mayoritarios presente en el aceite esencial de *Citrus x limonia*.

**Tabla 12**

*Tabla de identificación de compuestos en la columna no polar TR5MS*

| No. | Compuesto                | TR-5ms |                    |                                 |       |       | $\bar{x}$ | DS   |
|-----|--------------------------|--------|--------------------|---------------------------------|-------|-------|-----------|------|
|     |                          | IR     | IR <sup>Ref.</sup> | %Cantidad Relativa <sup>+</sup> |       |       |           |      |
|     |                          | Cal    |                    | CL1                             | CL2   | CL3   |           |      |
| 1   | Thujene < $\alpha$ ->    | 926    | 924                | 0.42                            | 0.50  | 0.46  | 0.46      | 0.04 |
| 2   | Pinene < $\alpha$ ->     | 934    | 932                | 2.40                            | 2.47  | 2.31  | 2.39      | 0.08 |
| 3   | Camphene                 | 951    | 946                | 0.07                            | 0.08  | 0.06  | 0.07      | 0.01 |
| 4   | Sabinene                 | 975    | 969                | 0.96                            | 1.69  | 1.76  | 1.47      | 0.44 |
| 5   | $\beta$ -Pinene          | 981    | 974                | 11.32                           | 12.52 | 12.27 | 12.04     | 0.63 |
| 6   | $\beta$ -Myrcene         | 992    | 988                | 1.90                            | 1.99  | 1,87  | 1.92      | 0.06 |
| 7   | Octanal                  | 1013   | 1005               | 0.28                            | 0.33  | 0.31  | 0.31      | 0.02 |
| 8   | Terpinene < $\alpha$ ->  | 1020   | 1014               | 0.69                            | 0.56  | 0.46  | 0.57      | 0.11 |
| 9   | Cymene < $\alpha$ ->     | 1030   | 1022               | 0.24                            | 0.55  | 0.62  | 0.47      | 0.20 |
| 10  | Limonene                 | 1032   | 1031               | 56.13                           | 57.87 | 58.15 | 57.38     | 1.09 |
| 11  | Cineole <1,8->           | 1040   | 1038               | 0.74                            | 0.81  | 0.80  | 0.79      | 0.04 |
| 12  | Ocimene <(E)- $\beta$ -> | 1050   | 1044               | 0.23                            | 0.25  | 0.25  | 0.24      | 0.01 |
| 13  | Terpinene < $\gamma$ ->  | 1063   | 1054               | 13.44                           | 12.76 | 12.82 | 13.01     | 0.37 |
| 14  | Terpinolene              | 1089   | 1089               | 0.97                            | 0.80  | 0.74  | 0.84      | 0.12 |
| 15  | Linalool                 | 1109   | 1106               | 0.18                            | 0.15  | 0.16  | 0.16      | 0.01 |
| 16  | Nonanal                  | 1114   | 1108               | 0.09                            | 0.10  | 0.10  | 0.10      | 0.01 |
| 17  | Fenchol <exo->           | 1131   | 1122               | 0.03                            |       |       | 0.03      | 0.00 |
| 18  | Citronellal              | 1162   | 1161               | 0.15                            | 0.20  | 0.24  | 0.20      | 0.04 |
| 19  | Terpinen-4-ol            | 1192   | 1190               | 1.62                            | 0.89  | 0.83  | 1.11      | 0.44 |
| 20  | Terpineol < $\alpha$ ->  | 1208   | 1207               | 1.70                            | 0.95  | 0.97  | 1.21      | 0.42 |
| 21  | Decanal                  | 1215   | 1208               | 0.23                            | 0.19  | 0.20  | 0.21      | 0.02 |

|                              |                               |      |      |      |      |      |              |      |
|------------------------------|-------------------------------|------|------|------|------|------|--------------|------|
| 22                           | Neral                         | 1252 | 1249 | 0.04 | 0.03 | 0.03 | 0.03         | 0.01 |
| 23                           | Geranial                      | 1282 | 1279 | 0.06 | 0.04 | 0.04 | 0.05         | 0.01 |
| 24                           | Undecanal                     | 1317 | 1310 | 0.03 | 0.03 |      | 0.03         | 0.00 |
| 25                           | Copaene < $\alpha$ ->         | 1379 | 1378 | 0.10 | 0.09 | 0.10 | 0.10         | 0.01 |
| 26                           | Cubebene < $\beta$ ->         | 1391 | 1391 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05         | 0.00 |
| 27                           | Dodecanal                     | 1418 | 1412 | 0.04 | 0.02 |      | 0.03         | 0.01 |
| 28                           | Caryophyllene <(E)->          | 1424 | 1417 | 0.44 | 0.33 | 0.36 | 0.38         | 0.06 |
| 29                           | Bergamotene < $\alpha$ -cis-> | 1435 | 1433 | 0.82 | 0.56 | 0.60 | 0.66         | 0.14 |
| 30                           | Caryophyllene <(Z)->          | 1440 | 1434 | 0.03 |      |      | 0.03         | 0.00 |
| 31                           | Humulene < $\alpha$ ->        | 1462 | 1460 | 0.07 | 0.05 | 0.06 | 0.06         | 0.01 |
| 32                           | Germacrene D                  | 1487 | 1485 | 0.65 | 0.51 | 0.54 | 0.57         | 0.07 |
| 33                           | Bicyclogermacrene             | 1502 | 1500 | 0.07 | 0.07 | 0.08 | 0.07         | 0.01 |
| 34                           | Farnesene <(E,E)- $\alpha$ -> | 1507 | 1505 | 0.83 | 0.50 | 0.57 | 0.63         | 0.18 |
| 35                           | Bisabolene < $\beta$ ->       | 1512 | 1505 | 1.36 | 0.89 | 1.06 | 1.10         | 0.24 |
| 36                           | Cadinol < $\alpha$ ->         | 1671 | 1670 | 0.02 |      |      | 0.02         | 0.00 |
| 37                           | Bisabolol < $\alpha$ ->       | 1700 | 1697 | 0.05 | 0.03 | 0.04 | 0.04         | 0.01 |
| <b>*TOTAL IDENTIFICADOS=</b> |                               |      |      |      |      |      | <b>98.82</b> |      |

Nota.\*= Suma total del porcentaje relativo de compuestos identificados en la columna TR-5ms

**CL1**= muestra N°1 de aceite esencial; **CL2**= muestra N°2 de aceite esencial; **CL3**= muestra N°3 de aceite esencial

**IR<sup>Cal</sup>** = índice de Van Den Dool y Krats calculado

**IR<sup>Ref</sup>** = índice de retención referido en bibliografía

**MS**: porcentaje de áreas de los compuestos analizados por GC-MS

**FID**: porcentaje de áreas relativas de los compuestos analizados por GC-FID

$\bar{x}$ = Media de las cantidades relativas de los compuestos

**DS**= Desviación estándar

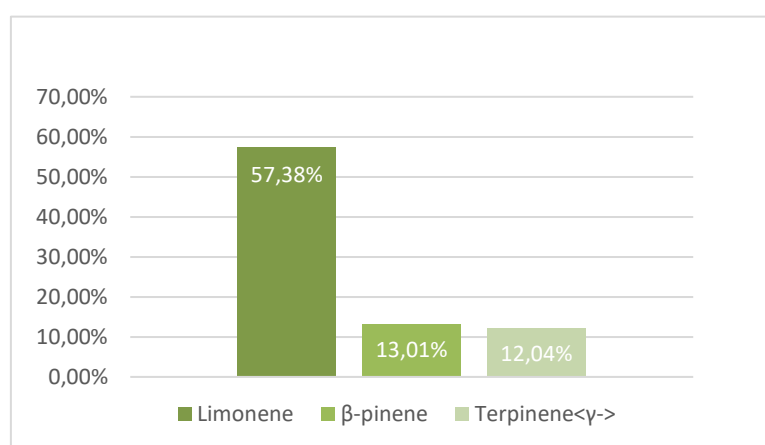
En la investigación realizada se obtuvo como resultado un total de 37 compuestos identificados correspondiente a la columna TR5ms que equivale al 98.82% de todos los compuestos presentes en el aceite esencial estudiado. Por ende, cabe mencionar los

compuestos mayoritarios que se destacaron del aceite esencial de *Citrus x limonia* en los que resaltan: limonene (57.38%) terpinene< $\gamma$ -> (13.01%) y  $\beta$ -pinene(12.04%).

En un estudio realizado por Martins et al., (2017) sobre los efectos esquistosomicidas de los aceites esenciales de *Citrus x limonia* y *citrus reticulata* contra *Schistosoma Mansoni*, determinaron que el aceite esencial de limón mandarina estaba compuesto de limonene (29,9%), pinene < $\beta$ -> (12,0%), citronellal (9,0 %), sabinene (9,0%).

**Figura 14**

Compuestos mayoritarios identificados en la columna no polar TR5MS



En cuanto a la comparación de la cantidad relativa de los compuestos presentes en el aceite esencial (Figura 14), se describen de nuevo los compuestos mayoritarios obtenidos por GC-MS: limonene (57.38%), terpinene < $\gamma$ -> (13.01%) y  $\beta$ -Pinene (12.04%).

**Tabla 13**

Compuestos mayoritarios obtenidos del CG-FID con la columna TR5

| Compuesto                  | TR5                 |       |       |       |       |       | MS        |      | FID       |       |
|----------------------------|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------|------|-----------|-------|
|                            | % Cantidad relativa |       |       |       |       |       | $\bar{x}$ | DS   | $\bar{x}$ | DS    |
|                            | CL1                 |       | CL2   |       | CL3   |       |           |      |           |       |
| MS                         | FID                 | MS    | FID   | MS    | FID   |       |           |      |           |       |
| $\beta$ -Pinene            | 11.32               | 10.62 | 12.52 | 10.40 | 12.27 | 10.10 | 12.04     | 0.63 | 10.37     | 0.26  |
| Limonene                   | 56.13               | 66.72 | 57.87 | 59.39 | 58.15 | 35.35 | 57.38     | 1.09 | 53.82     | 16.41 |
| Terpinene<br>< $\gamma$ -> | 13.44               | 10.52 | 12.76 | 8.61  | 12.82 | 8.42  | 13.01     | 0.37 | 9.18      | 1.16  |

Nota. CL1= muestra N°1 de aceite esencial; CL2= muestra N°2 de aceite esencial; CL3= muestra N°3 de aceite esencial; MS= Espectrometría de masas; FID= Ionización de llama.

En la Tabla 12 se puede observar lo que respecta a la determinación de los compuestos mayoritarios en CG-FID se consideró tres de los cuáles presentan un alto

porcentaje a diferencia del resto de compuestos. Por lo tanto, la identificación de estos en FID, se la llevó a cabo a través de una comparación con los compuestos identificados en espectrometría de masas. De esta manera se obtuvo los compuestos mayoritarios a continuación mencionados: limonene (53.82%),  $\beta$ -Pinene (10.37%) y terpinene  $\langle\gamma\rangle$  (9.18%).

**Tabla 14**

*Tabla de identificación de compuestos en la columna polar TRWAX*

| No. | Compuesto                                     | TRWax     |                    |                                 |       |       |           |      |
|-----|---|-----------|--------------------|---------------------------------|-------|-------|-----------|------|
|     |   | IR<br>Cal | IR <sup>Ref.</sup> | %Cantidad Relativa <sup>+</sup> |       |       | $\bar{x}$ | SD   |
|     |   |           |                    | CL1                             | CL2   | CL3   |           |      |
| 1   | Pinene $\langle\alpha\rangle$                 | 1036      | 1032               | 209.                            | 2.31  | 2.23  | 2.21      | 0.11 |
| 2   | Thujene $\langle\alpha\rangle$                | 1039      | 1038               | 0.74                            | 0.84  | 0.88  | 0.82      | 0.08 |
| 3   | Camphene                                      | 1064      | 1063               | 0.07                            | 0.07  | 0.07  | 0.07      | 0.00 |
| 4   | $\beta$ -Pinene                               | 1095      | 1092               | 11.15                           | 13.00 | 12.87 | 12.34     | 1.04 |
| 5   | Sabinene                                      | 1108      | 1108               | 1.08                            | 1.54  | 1.72  | 1.45      | 0.33 |
| 6   | Limonene                                      | 1185      | 1185               | 58.98                           | 59.49 | 59.18 | 59.22     | 0.26 |
| 7   | Terpinene $\langle\gamma\rangle$              | 1232      | 1231               | 12.68                           | 11.89 | 11.85 | 12.14     | 0.47 |
| 8   | $\beta$ -Ocimene                              | 1241      | 1239               | 0.23                            | 0.24  | 0.26  | 0.24      | 0.02 |
| 9   | <i>o</i> -Cymene                              | 1256      | 1254               | 0.40                            | 0.63  | 0.73  | 0.59      | 0.17 |
| 10  | $\alpha$ -Terpinolene                         | 1268      | 1266               | 0.76                            | 0.61  | 0.59  | 0.65      | 0.10 |
| 11  | Octanal                                       | 1278      | 1278               | 0.24                            | 0.27  | 0.28  | 0.26      | 0.02 |
| 12  | Nonanal                                       | 1382      | 1382               | 0.06                            | 0.07  | 0.08  | 0.07      | 0.01 |
| 13  | Copaene $\langle\alpha\rangle$                | 1470      | 1470               | 0.10                            |       | 0.09  | 0.09      | 0.00 |
| 14  | Decanal                                       | 1487      | 1485               | 0.15                            | 0.14  | 0.15  | 0.15      | 0.01 |
| 15  | Linalool                                      | 1542      | 1538               | 0.18                            | 0.15  | 0.16  | 0.16      | 0.01 |
| 16  | Bergamotene $\langle\alpha$ -trans- $\rangle$ | 1568      | 1568               | 0.62                            | 0.44  | 0.48  | 0.51      | 0.10 |
| 17  | Caryophyllene $\langle Z\rangle$              | 1573      | 1573               | 0.39                            | 0.31  | 0.34  | 0.35      | 0.04 |
| 18  | Terpinen-4-ol                                 | 1588      | 1586               | 1.40                            | 0.81  | 0.72  | 0.98      | 0.37 |
| 19  | Terpineol $\langle\alpha\rangle$              | 1684      | 1683               | 1.87                            | 1.21  | 1.28  | 1.45      | 0.36 |

|                              |                            |      |      |      |      |      |      |              |
|------------------------------|----------------------------|------|------|------|------|------|------|--------------|
| 20                           | Bisabolene < $\beta$ ->    | 1709 | 1708 | 1.14 | 0.84 | 0.91 | 0.96 | 0.16         |
| 21                           | Geranial                   | 1717 | 1714 | 0.08 | 0.05 |      | 0.06 | 0.02         |
| 22                           | (E,Z)- $\alpha$ -Farnesene | 1737 | 1737 | 0.87 | 0.62 | 0.69 | 0.73 | 0.13         |
| 23                           | Citronellol                | 1758 | 1757 | 0.15 |      | 0.09 | 0.12 | 0.04         |
| 24                           | Globulol                   | 2060 | 2055 | 0.05 |      |      | 0.05 | 0.00         |
| 25                           | Bisabolol < $\alpha$ ->    | 2201 | 2201 | 0.07 | 0.05 | 0.05 | 0.06 | 0.01         |
| <b>*TOTAL IDENTIFICADOS=</b> |                            |      |      |      |      |      |      | <b>95.73</b> |

Nota.\*= Suma total del porcentaje relativo de compuestos identificados en la columna TR-5ms

**CL1**= muestra N°1 de aceite esencial; **CL2**= muestra N°2 de aceite esencial; **CL3**= muestra N°3 de aceite esencial

**IR<sup>Cal</sup>** = índice de Van Den Dool y Krats calculado

**IR<sup>Ref</sup>** = índice de retención referido en bibliografía

**MS**: porcentaje de áreas de los compuestos analizados por GC-MS

**FID**: porcentaje de áreas relativas de los compuestos analizados por GC-FID

$\bar{x}$ = Media de las cantidades relativas de los compuestos

**DS**= Desviación estándar

En la Tabla 13 se observa los compuestos mayoritarios por medio de la cantidad relativa de su área en cada muestra estudiada. Por lo cual como resultado se obtuvo un total de 25 compuestos identificados respectivamente a la columna TRWAX que corresponde al 95.73% de todos los compuestos presentes en el aceite esencial estudiado. Por ende, cabe mencionar los compuestos mayoritarios que se destacaron del aceite esencial de *Citrus x limonia* en los que resaltan: limonene (59.22%),  $\beta$ -pinene(12.34%) y terpinene < $\gamma$ -> (12.14%)

**Tabla 15**

Compuestos mayoritarios obtenidos del CG-FID con la columna TRWax

| Compuesto                        | TRWax               |       |       |       |       |       |           |      |           |      |
|----------------------------------|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------|------|-----------|------|
|                                  | % Cantidad relativa |       |       |       |       |       | MS        |      | FID       |      |
|                                  | CL1                 |       | CL2   |       | CL3   |       | $\bar{x}$ | SD   | $\bar{x}$ | SD   |
| MS                               | FID                 | MS    | FID   | MS    | FID   |       |           |      |           |      |
| <b><math>\beta</math>-Pinene</b> | 11.15               | 10.16 | 13.00 | 11.75 | 12.87 | 12.22 | 12.34     | 1.04 | 11.38     | 1.08 |
| <b>Limonene</b>                  | 58.98               | 65.83 | 59.49 | 65.83 | 59.18 | 35.35 | 59.22     | 0.26 | 65.99     | 0.28 |

|                   |       |       |       |      |       |      |       |      |      |      |
|-------------------|-------|-------|-------|------|-------|------|-------|------|------|------|
| <b>Terpinene</b>  | 12.68 | 10.22 | 11.89 | 9.53 | 11.85 | 8.42 | 12.14 | 0.47 | 9.72 | 0.44 |
| <b>&lt;γ-&gt;</b> |       |       |       |      |       |      |       |      |      |      |

Nota. **CL1**= muestra N°1 de aceite esencial; **CL2**= muestra N°2 de aceite esencial; **CL3**= muestra N°3 de aceite esencial; **MS**= Espectrometría de masas; **FID**= Ionización de llama.

En la Tabla 14 se visualiza los correspondientes resultados obtenidos en la determinación de los compuestos mayoritarios en CG-FID utilizando la columna TRWAX se recalcó a tres compuestos como mayoritarios de los cuáles por ende presentan un mayor porcentaje a comparación del resto de compuestos. Por lo cual, la identificación de estos en FID, se la llevó a cabo a través de una comparación con los compuestos identificados en espectrometría de masas. Luego de las comparaciones pertinentes se obtuvieron los siguientes resultados: limonene (65.99%), β-Pinene (11.38%) y terpinene <γ-> (9.72%).

#### **Determinación de la composición enantiomérica del aceite esencial de *Citrus x limonia***

El aceite esencial de Citrus x limonia dio como resultado 5 pares de enantiómeros (Tabla 15) con su respectiva distribución y exceso enantiomérica. Donde se destaca que todos pertenecen al grupo de los monoterpenos. Los compuestos que presentan un mayor exceso enantiomérico son: (+/-)-D-Limonene y (+/-)-Terpineol<α->.

**Tabla 16**

*Enantiómeros del aceite esencial de Citrus x limonia*

| RT           | COMPUESTO         | IR   | DISTRIBUCION ENANTIOMÉRICA (%) | EXCESO ENANTIOMÉRICO (%) |
|--------------|-------------------|------|--------------------------------|--------------------------|
| <b>4.79</b>  | (±)-Thujene <α->  | 915  | 40.72                          | 18.55                    |
| <b>4.87</b>  |                   | 917  | 59.28                          |                          |
| <b>6.16</b>  | (+)-β-Pinene      | 1013 | 50.92                          | 1.85                     |
| <b>6.38</b>  | (-)-β-Pinene      | 1019 | 49.08                          |                          |
| <b>7.35</b>  | (±)-D-Limonene    | 1043 | 16.58                          | 66.83                    |
| <b>7.39</b>  |                   | 1044 | 83.42                          |                          |
| <b>30.35</b> | (±)-Terpineol<α-> | 1396 | 17.95                          | 64.11                    |
| <b>30.56</b> |                   | 1399 | 82.05                          |                          |

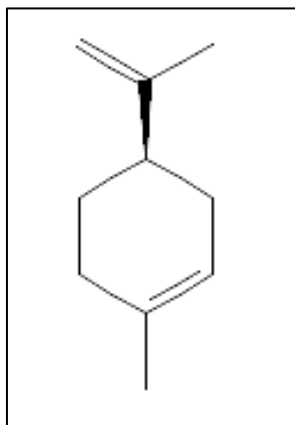
### 3.5 Compuestos mayoritarios del aceite esencial de *Citrus x limonia*

#### 3.5.1 Limoneno

El limoneno se destaca por ser un compuesto químico principalmente presente en las cáscaras de los cítricos, su fórmula química es  $C_{10}H_{16}$ , la cual sobresale por ser una molécula apolar, por ende, no dispone de cargas diferentes en su estructura, lo que le permite ejercer la función de disolvente con aquellas sustancias que posean las mismas características, tiene un peso molecular de 136.23 g/mol, el cual dispone de una configuración (4R). Entre su función destacable es como metabolito vegetal. Considerado un enantiómero de un (4S)-limoneno.

**Figura 15**

*Estructura molecular de  
Limoneno en 2D*



*Nota: Obtenido de  
PubChem, (2024)*

El mismo es común en productos cosméticos, como principal componente del olor de los cítricos, el mismo es usado para la fabricación de alimentos y algunos medicamentos, por ejemplo, como aromatizante para enmascarar el sabor amargo de los alcaloides y como fragante en perfumería (Dionisio et al., 2018).

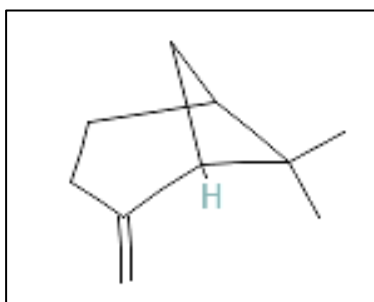
#### 3.5.2 $\beta$ -pinene

$\beta$ -pinene es considerado un isómero del pineno el cual se destaca por tener un doble enlace exo-cíclico. Componente presente en varios aceites esenciales de muchas plantas. Cumple un papel muy importante como metabolito vegetal.

El beta-pineno es un producto natural que se encuentra en *Nepeta nepetella*, *Teucrium montanum* y otros organismos, es un líquido incoloro con olor a trementina, posee un sabor a pino, parecido a la trementina, posee un punto de ebullición de 166°C, en cuanto a su solubilidad es insoluble en agua, soluble en alcohol, éter, benceno y otros solventes y muy soluble en cloroformo (Dionisio et al., 2018).

**Figura 16**

*Estructura molecular de beta  
pinene en 2D*



*Nota: Obtenido de PubChem,  
(2024).*

## Conclusiones

Con el uso de la técnica de destilación por arrastre de vapor se logró obtener un total de 87 ml de aceite esencial de las tres destilaciones, con un rendimiento promedio de 0.79%.

Se determinaron las propiedades físicas del aceite esencial de *Citrus x limonia* cuyos resultados fueron: densidad de 0.8717 g/cm<sup>3</sup>, índice de refracción de 1.4821 y actividad óptica de 6.15.

En cuanto a la composición química, en la columna no polar TR-5ms se identificaron compuestos con un total de 98.82% de identificación. Los compuestos mayoritarios que se presentaron en el aceite esencial fueron: limonene (57.38%), terpinene <γ-> (13.01%) y β-Pinene (12.04%).

En la columna polar TR-WAX se identificaron 25 compuestos, con un total de identificación del 95.73%. Los compuestos mayoritarios fueron: limonene (59.22%), β-Pinene (12.34%), terpinene <γ-> (12.14%)

Los compuestos enantioméricos identificados fueron: cuatro monoterpenos; (+) (-) β-pinene, (+/-)-D-limonene, (+/-)-terpineol<α-> y (+/-)-Thujene <α->. El compuesto que mayor exceso enantiomérico presentó fue (+/-)-D-limonene(66.83%).

### Recomendaciones

Realizar un tratamiento postcosecha permitente y cuidadoso que permita conseguir la eliminación de posibles partes estropeadas, otros materiales contaminantes, partes de otras plantas, tierra, etc.

Para la identificación de los compuestos químicos en la columna no polar TR-5ms y polar TR-WAX es necesario usar el programa AMDIS, con la finalidad de identificar correctamente cada compuesto basándose en su espectro.

Realizar una investigación más profunda sobre los compuestos químicos mayoritarios encontrados en el aceite esencial de *Citrus x limonia*, puesto que este fruto presenta extensos beneficios medicinales que podrían ser exitosamente aprovechados para realizar diversos productos.

## Referencias

- Acosta Meza, Z. L., & Barahona Celis, N. M. (2021). Evaluación de dos disolventes en la extracción de aceite a partir de borra de café. *Ingeniería de Alimentos*. [https://ciencia.lasalle.edu.co/ing\\_alimentos/726](https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_alimentos/726)
- Amorim, J. L., Simas, D. L. R., Pinheiro, M. M. G., Moreno, D. S. A., Alviano, C. S., Da Silva, A. J. R., & Fernandes, P. D. (2016). Anti-Inflammatory Properties and Chemical Characterization of the Essential Oils of Four Citrus Species. *PLOS ONE*, 11(4), e0153643. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0153643>
- Balslev, H., Navarrete, H., de la Torre, L., & Macía, M. J. (2008). *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador*. 1–3.
- Bandoni, A. L., Cañigual i Folcarà, Salvador., & CYTED (Associació). Suprograma de Biomasa como Fuente de Productos Químicos y Energía. (2003). *Los Recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores*. [el autor].
- Bravo, E. (2014). *La biodiversidad en el Ecuador*.
- Castañeda, M. L., Muñoz, A., Martínez, J. R., & Stashenko, E. E. (2007). Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas. *Scientia Et Technica*, XIII(33), 165–166. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84903338>
- Challo Chata, R. (2021). *Determinación de metanol y etanol por cromatografía de gases en vinos tintos elaborados en el distrito de Calana, Tacna – 2020*.
- Cueva, E., Lozano, D., & Yaguana, C. (2019). Effect of the altitudinal gradient in the floristic composition, structure and arboreal biomass of the andean dry forest, Loja, Ecuador. *Bosque*, 40(3), 365–378. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002019000300365>
- Dionisio, K. L., Phillips, K., Price, P. S., Grulke, C. M., Williams, A., Biryol, D., Hong, T., & Isaacs, K. K. (2018). Data Descriptor: The Chemical and Products Database, a resource for exposure-relevant data on chemicals in consumer products. *Scientific Data*, 5. <https://doi.org/10.1038/SDATA.2018.125>

- Donmez, D., Simsek, O., Izgu, T., Aka Kacar, Y., & Yalcin Mendi, Y. (2013). Genetic transformation in citrus. *The Scientific World Journal*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/491207>
- Esquivel, A., & Vargas, P. (2007). Uso de aceites esenciales extraídos por medio de fluidos supercríticos para la elaboración de alimentos funcionales. *Tecnología En Marcha*, ISSN 0379-3962, ISSN-e 2215-3241, Vol. 20, N°. 4, 2007, 20(4), 7. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4835787&info=resumen&idioma=SPA>
- Flórez, A., & Mario, A. (2014). *Introducción a la industria de los aceites esenciales extraídos de plantas medicinales y aromáticas*.
- Fretes, F. (2010). *PLANTAS MEDICINALES Y AROMÁTICAS*. www.SxC.hU
- Gomis Yagües, V. (2008). Tema 3. *Cromatografía de gases*. <https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8247/4/T3gascromat.pdf>
- INABIO. (2016). *Datos de diversidad biológica: estado y tendencias de la diversidad biológica*. <http://inabio.biodiversidad.gob.ec/perfil-de-biodiversidad/>
- Jaramillo Correa, C. R. (2021). *Determinación de la composición química del aceite esencial de Morella pubescens*. Universidad Técnica particular de Loja.
- Jorgensen, P., David A. Neill, & Susana León-Yáñez. (1999). Catalogue of Vascular Plants of Ecuador. (Missouri Bot. Gard, Vol. 75). Monogr. Syst. Bot.
- López Luegon, M. T. (2004). Los aceites esenciales. *Offarm*, 23(7), 88–91. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-los-aceites-esenciales-13064296>
- Martins, M. H. G., Fracarolli, L., Vieira, T. M., Dias, H. J., Cruz, M. G., Deus, C. C. H., Nicolella, H. D., Stefani, R., Rodrigues, V., Tavares, D. C., Magalhães, L. G., & Crotti, A. E. M. (2017). Schistosomicidal Effects of the Essential Oils of Citrus limonia and Citrus reticulata Against Schistosoma mansoni. *Chemistry and Biodiversity*, 14(1). <https://doi.org/10.1002/cbdv.201600194>
- Medicinales Aromáticas, P. (2007). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de*. 6(5), 270–271. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85617508069>
- Mena Vásconez, P. (2005). *la biodiversidad del Ecuador L I*.

- Mettler Toledo. (2018). *Medición del índice de refracción de grasas y aceites | AOAC 921.08*.  
<https://www.mt.com/es/es/home/library/applications/lab-analytical-instruments/refractive-index-of-oils-and-fats-aoac-92108.html>
- Montoya Cadavid, G. (2010). *ACEITES ESENCIALES. Una Alternativa de Diversificación para el Eje Cafetero* (Primera). Universidad Nacional de Colombia.
- Morante Zarcero, S. (2006). *Desarrollo de métodos analíticos para la separación quiral y su aplicación al estudio de procesos de síntesis asimétrica*.  
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=253532&info=resumen&idioma=SPA>
- Ortuño Sanchez, M. F. (2006). *Manual Práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes*. Aiyana.  
[https://books.google.com/books/about/Manual\\_pr%C3%A1ctico\\_de\\_aceites\\_esenciales\\_a.html?hl=es&id=cW5TsDKqx9wC](https://books.google.com/books/about/Manual_pr%C3%A1ctico_de_aceites_esenciales_a.html?hl=es&id=cW5TsDKqx9wC)
- Páez, Á. (2013, March). *Generalidades de los aceites esenciales*.  
[https://www.academia.edu/29012998/Unidad\\_1\\_Generalidades\\_de\\_los\\_aceites\\_esenciales\\_SENA](https://www.academia.edu/29012998/Unidad_1_Generalidades_de_los_aceites_esenciales_SENA)
- Pino Alea, J. A. (2015). *Aceites esenciales: química, bioquímica, producción y usos* (Universitaria).
- Poveda, D., Director, T., & Pinzón, A. (2019). *Análisis de oportunidades para la comercialización de plantas medicinales y aromáticas*.
- Ruiz, C., Díaz, C., & Rojas, R. (2015). *Composición química de aceites esenciales de 10 plantas aromáticas peruanas*. <https://www.redalyc.org/pdf/3719/371942316002.pdf>
- Stashenko, E. E., & Martínez, J. R. (2010). Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Scientia Chromatographica*, 2(1), 29-47.
- Vanegas, M. de J. (2002). *Guía técnica del Limón Mandarina*.

## Apéndice

### Apéndice A. Determinación del rendimiento

Para obtener el porcentaje del rendimiento %R del aceite esencial de *Citrus x limonia* se relaciona el volumen del aceite esencial obtenido en cada destilación, con el peso del material vegetal a destilar, utilizando la siguiente ecuación:

$$\%R = \frac{V(mL)}{P(gr)} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

**Donde:**

**%R:** es el porcentaje de rendimiento

**V:** volumen del aceite esencial extraído en ml.

**P:** peso de la materia vegetal utilizada en la destilación expresada en gr.

## Apéndice B. Determinación de la densidad relativa a 20°C.

Según la norma AFNOR NF T 75-111 1982

### Propuesta:

La presente norma esta basada en la norma ISO 279-1981 por la Organización Internacional de Normalización.

### Objetivo de la aplicación:

La presente norma especifica el método referido a la determinación de la densidad relativa a 20°C de los aceites esenciales.

### Referencias:

NF T 75-003 Aceites esenciales- Reglas generales para su preparación.

NF T 75-110 Aceites esenciales- Preparación de la muestra previo a su análisis.

### Principio:

La densidad relativa a 20°C de un aceite esencial se define como la masa de un determinado volumen de aceite esencial a 20°C sobre la masa de un volumen igual de agua destilada a 20°C.

**Nota:** si es necesario operar a una temperatura diferente debido a la naturaleza del aceite para indicar la norma referente al aceite esencial. La corrección para 20°C es de 0.0007 a 0.0008 por grado centígrado. La masa volumétrica a 20°C de un aceite esencial se reporta como la masa de un cierto volumen del aceite esencial a 20°C.

### Aparatos:

Picnómetro vacío.

Baño termostático, manteniendo a una temperatura de 20°C  $\pm$  0.2°C.

Termómetro de precisión graduado de 10 a 30°C, con una variación de 0.2°C a 0.1°C.

Balanza analítica.

### Procedimiento:

**Preparación del picnómetro:** limpiar rigurosamente el picnómetro y luego enjuagar el picnómetro, lavar con etanol y luego acetona, pasarlo por una corriente de aire seco. Si es necesario secar el exterior del picnómetro con un trapo seco o con papel filtro. Cuando se equilibre la temperatura en el cuarto de la balanza, pesar el picnómetro, con el tapón en su

sitio con 1mg de precisión.

**Peso del agua destilada:** Llenar el picnómetro con agua recién destilada, que este a una temperatura de 20°C. Coloque el picnómetro en baño termostático. Durante 30 minutos ajustar el nivel del agua hasta la marca, poner el tapón del picnómetro en su sitio, secar el exterior del picnómetro con un trapo seco o papel filtro. Cuando se equilibre la temperatura con el cuarto de balanza, pesar el picnómetro lleno con el tapón en su sitio con un mg de precisión lleno igual que en el caso anterior.

**Peso del aceite esencial:** Vaciar el picnómetro, luego enjuagar y secar como en ele inicio. Efectuar las mismas operaciones solo que en esta vez será con aceite esencial en lugar de agua.

**Expresión de resultados:**

$$d \frac{20}{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \quad (\text{Ecuación 2})$$

**Donde:**

$d \frac{20}{20}$  = Densidad relativa a 20°C, referido al agua a 20°C.

$m_0$ : masa en gramos del picnómetro vacío.

$m_1$ : masa en gramos del picnómetro con agua.

$m_2$ : masa en gramos del picnómetro con aceite esencial.

Se expresan los resultados con cuatro decimales.

## Apéndice C. Determinación del índice de refracción

### Según la AFNOR NF T 75-112/1988

Según el tipo de aparato que utilice, la medida directa del ángulo de refracción o la observación del límite de refracción total. El aceite se mantendrá dentro de las condiciones de iso-tropismo y de transparencia.

#### **Definición:**

El índice de refracción de un aceite esencial es el producto entre el seno del ángulo de incidencia  $i$  y el seno del ángulo de refracción de un rayo luminoso de longitud de onda determinada, que pasa desde el aire a través del Aceite Esencial, manteniendo la temperatura constante.

La longitud de onda específica es  $(589.3 \pm 0.3)$ , correspondiente a la radiación D1 y D2 del espectro de sodio.

La temperatura de referencia es de 20°C, salvo para los aceites esenciales que no son líquidos a esa temperatura. En este caso se deben adoptar las temperaturas de 25 y 30 °C según el punto de fusión del aceite considerado.

#### **Aparatos:**

**Refractómetro:** utilice un refractómetro clásico que permita la lectura de los índices de refracción entre 1.300 y 1.700 o con una precisión de  $\pm 0.0002$ .

Ajuste el aparato de manera que, a una temperatura de 20°C, se tengan los siguientes índices de refracción según:

- 1.3330 para agua destilada.
- 1.4906 para el p-cimeno.
- 1.5685 para el benzoato de bencilo.
- 1.6585 para el 1-bromo naftaleno.

Los productos patrón deben ser puros, de calidad para refractometría, deben también ajustarse con una lámina de índice de refracción conocidas según las indicaciones de fabricación del equipo.

#### **Modo de operación:**

#### **Determinación:**

Pasar una corriente de agua en el refractómetro, a fin de mantener el aparato a la temperatura de referencia de 20°C salvo para los aceites esenciales que no son líquidos a esa temperatura. En este caso deben adoptarse las temperaturas de 20°C y 30°C, según el punto de fusión del aceite esencial considerado. Esta temperatura no debe diferir de la temperatura de referencia más de  $\pm 0.2^\circ\text{C}$  y debe mantenerse a  $\pm 0.2$

Antes de poner la muestra en el instrumento, llevarla a una temperatura igual a la que se realizara la medida. Para efectuar la lectura esperar que la temperatura sea estable.

**Resultados:**

Cálculos. El índice de refracción a la temperatura de referencia esta dado por la ecuación.

$$n^2D - n^2D + 0.004 (t' - t) \quad (\text{Ecuación 3})$$

**Donde:**

**n<sup>2</sup>D:** valor de la lectura, obtenida a la temperatura t, o aquella a la que se ha efectuado la determinación.

**F:** factor de corrección (0.0004).

**t':** temperatura a la que se efectuó la lectura.

**t:** temperatura a 20°C.

**Nota:**

Expresar los resultado con cuatro cifras decimales. La precisión de la determinación es de  $\pm 0.0002$ .

## Apéndice D. Determinación de la actividad óptica

### Según la norma ISO 592-1998

#### Principio:

Siempre que se trabaje con aceites sólidos o parcialmente sólidos, aceites de alta viscosidad en un rango de temperatura, o aceites de colores fuertes, la determinación transcurre en una solución de aceite.

#### Definiciones:

##### Rotación óptica de un aceite esencial: $\alpha_D$

Angulo expresado en mili radianes y/o grados del ángulo descrito por la polarización plana de una radiación luminosa cuya longitud de onda es  $589.3\text{nm} \pm 0.3\text{nm}$ , correspondiente a las líneas de sodio, cuando el trayecto de la luz atraviesa 100nm del espesor de un aceite esencial, a ciertas temperaturas.

**Nota:** cuando la determinación ocurre con diferentes espesores el valor de la rotación óptica deberá ser computado con relación al espesor de 100nm. También la medida acordada por el Faraday magneto-óptico en principio es posible. El espesor de la muestra en este caso es de 10nm.

##### Rotación de un aceite esencial en solución (rotación específica $\alpha$ ).

La rotación óptica de una solución de aceite esencial dividida para la masa del aceite esencial por unidad de volumen.

#### Reactivos:

Los reactivos deben ser de grado analítico. Use agua destilada o de equivalente pureza.

#### Solvente:

(Solo para aceites esenciales que necesiten ensayarse en solución). Se utilizará preferiblemente etanol al 95% en volumen, es necesario considerar la rotación óptica del mismo.

#### Aparatos:

Polarímetro: con una precisión no menor de  $\pm 0.5 \text{ mrad}$  ( $\pm 0.03^\circ$ ) y ajustado de  $0^\circ$  a  $180^\circ$  con agua. El polarímetro constara de un plato de cuarzo de rotación óptica conocida, si esto es inaccesible, con una solución acuosa con un contenido de 36g de sacarosa anhidrida

pura por 100mL de solución. La rotación óptica de una solución es de  $\pm 604$  mrad en 200mm de pasta a una temperatura de 20°C. El instrumento deberá ser usado en la oscuridad.

La fuente de luz: comprende un dispositivo a una longitud de onda de  $589.3\text{nm} \pm 0.5\text{nm}$  con una lámpara de vapor de sodio.

Tubos polarímetros: usualmente de  $100\text{mm} \pm 0.5\text{mm}$  de longitud. Para muestras ligeramente coloreadas o de baja rotación óptica se deben usar tubos de más o menos  $200\text{mm} \pm 0.5\text{mm}$ , tubos de  $50\text{mm} \pm 0.05\text{mm}$  o  $10\text{mm} \pm 0.05\text{mm}$  o menos si es necesario para muestras fuertemente coloreadas. En la determinación se deben trabajar a 20°C o anotar la temperatura específica, utilice un tubo de ensayo de pared gruesa, equipado con un termómetro, asegurar la circulación del agua a la temperatura requerida. Para la determinación de la temperatura ambiente ver el tipo de tubo de ensayo que se debe utilizar, si bien es aconsejable utilizar los descritos en la parte anterior.

Termómetro: graduado de 0.2°C o 0.1°C permitiendo la determinación de temperaturas entre 10 y 30°C.

#### **Procedimiento:**

Es necesario mantener la temperatura de la muestra a  $20^\circ\text{C} \pm 0.2^\circ\text{C}$  o especificar la temperatura para la muestra que va en el tubo polarímetro apropiado. Mantener el agua que esta circulando con un control termostático, mantener la temperatura específica durante la determinación. Llenar el tubo con la muestra y asegurarse de la ausencia de burbujas. Coloque el tubo en el polarímetro y lea la dextro rotación (+) o la levo rotación (-) del aceite que en la escala muestra el instrumento.

#### **Resultados:**

##### **Cálculos y formulas.**

La rotación óptica expresada en mili radianes o en grados del ángulo esta dada por la siguiente ecuación:

$$\alpha'D = \frac{A}{l} \times 100 \quad (\text{Ecuación 4})$$

#### **Donde:**

A: es el valor del ángulo de rotación en mrad o grados del ángulo

l: es la longitud del tubo usado en mm.

Marque como (+) la rotación hacia la derecha en el sentido de las manecillas del reloj y como (-), en el sentido contrario a las manecillas del reloj. Cuando por los tubos de la pared gruesa la circulación de agua no es correcta, es necesario aplicar factores de corrección apropiadas o de acuerdo con el aceite ensayado (para aceites esenciales de cítricos y para otros se conocen factores de corrección específicos).

**Nota:** los factores de corrección deberían ser dados en las especificaciones para cada aceite.

#### **Rotación óptica de un aceite en solución "Rotación específica".**

La rotación específica expresada en mili radianes o grados del ángulo está dada por la siguiente ecuación.

$$[\alpha] = \alpha' \frac{D}{C} \quad (\text{Ecuación 5}).$$

**Donde:**

$\alpha'D$ : es la rotación óptica del aceite en solución "Rotación específica".

**C**: concentración de la solución del aceite, en gramos de aceite por mL de solución.

Con el valor de la actividad óptica leída en el equipo se obtiene la actividad óptica calculada aplicando la siguiente fórmula:

$$\alpha = \left( \frac{\alpha t}{l * c} \right) - \alpha s \quad (\text{Ecuación 6}).$$

**Donde:**

$\alpha$ : actividad óptica calculada

$\alpha t$ : actividad óptica leída

$l$ : dimensión del tubo (dm)=1

$\alpha s$ : actividad óptica del solvente = 0.00 0 Z

$c$ : concentración muestra (g/mL).

## Apéndice E. Determinación del índice de retención con la ecuación de Van den Dool and Kratz

Para calcular los índices de retención se hizo la comparación de los tiempos de retención, de los hidrocarburos tomados como referencia, con el tiempo de retención de los picos que eluyeron en el análisis del aceite esencial, utilizando la siguiente fórmula.

$$AI = 100n + 100x \frac{t_{RX} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \quad (\text{Ecuación 7}).$$

**Donde:**

**AI:** índice de retención obtenido con la ecuación de Van den Dool and Kratz.

**n:** número de átomos de carbono en n-alcano.

**t<sub>RX</sub>:** tiempo de retención del compuesto analizado, que eluye en el centro de n-alcanos.

**t<sub>Rn</sub>:** tiempo de retención n-alcano que eluye antes del compuesto analizado.

**t<sub>RN</sub>:** tiempo de retención de n-alcano que eluye después del compuesto analizado.

## Apéndice F. Determinación del exceso enantiomérico

Para la determinación del exceso enantiomérico es necesario relacionar la distribución enantiomérica, resultado de la fórmula que se muestra a continuación.

$$ee(\%) = \frac{R - S}{R + S} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 8.}$$

**ee (%)**: Exceso enantiomérico

**R**: Enantiómero (+)

**S**: Enantiómero (-)