

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

Implementación de un método para determinar
la calidad del aceite esencial de limón (*Citrus aurantifolia*)
por cromatografía en capa fina y espectroscopía
ultravioleta
como método alternativo a la cromatografía de gases.

Claudia Alejandra De León Solís

QUÍMICA

Guatemala, noviembre de 2004.

JUNTA DIRECTIVA

M.Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán	Decano
Licda. Jannette Sandoval Madrid de Cardona	Secretaria
Licda. Gloria Elizabeth Navas Escobedo	Vocal I
Lic. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jiménez	Vocal III
Br. Roberto José Garnica Marroquín	Vocal IV
Br. Rodrigo José Vargas Rosales	Vocal V

ÍNDICE

	<i>Página</i>
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
III. ANTECEDENTES	5
A. Características del aceite esencial de limón (<i>Citrus aurantifolia</i> y <i>Citrus latifolia</i>)	5
B. Evaluación de Calidad del aceite esencial de limón (<i>Citrus aurantifolia</i>)	9
C. Análisis de aceites esenciales por cromatografía en capa fina	9
D. Análisis de aceites esenciales por cromatografía de gases	10
E. Análisis de aceites esenciales por espectroscopia ultravioleta	10
F. El <i>p</i> -Cimeno y la oxidación del aceite esencial de limón	11
G. Comparación de presupuestos	12
IV. JUSTIFICACIONES	14
V. OBJETIVOS	15
A. Generales	15
B. Específicos	15

VI. HIPÓTESIS	16
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	17
A. Universo de trabajo	17
B. Recursos	17
VIII. RESULTADOS	24
IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	34
X. CONCLUSIONES	39
XI. RECOMENDACIONES	41
XII. REFERENCIAS	42
XIII. ANEXOS	45

ÍNDICE DE TABLAS

	<i>página</i>
Tabla-1: <i>Presupuesto para el montaje de la técnica por CG</i>	12
Tabla-2: <i>Presupuesto para el montaje de la técnica por CCF-UV</i>	13
Tabla-3: <i>Lecturas de absorbancia de 10 muestras blanco para la determinación de los límites de detección y de cuantificación del método ($\lambda=265\text{nm}$)</i>	24
Tabla-4: <i>Determinación de los límites de detección y de cuantificación del método</i>	24 25

Tabla-5: <i>Análisis de reproducibilidad del método</i>	25
Tabla-6: <i>Análisis de repetibilidad del método</i>	26
Tabla-7: <i>Comparación del método propuesto (CCF-UV) con el método de Referencia (CG)</i>	27
Tabla-8: <i>Perfil de precisión del método propuesto (CCF-UV)</i>	28
Tabla-9: <i>Resultados de relación de frente (Rf) de γ-terpineno, p-cimeno y una mezcla de ambos en diferentes fases móviles.</i>	29
Tabla-10: <i>Picos de absorción del p-Cimeno</i>	30
Tabla-11: <i>Cuantificación de p-Cimeno producido por oxidación de Aceite esencial de limón</i>	31
Tabla-12: <i>Cuantificación de γ-Terpineno por el método de referencia (GC)</i>	31
Tabla 13: <i>Valores para la determinación del orden de reacción</i>	32
Tabla-14: <i>Valores de las constantes para $n=1$ y $n=2$</i>	

ÍNDICE DE GRÁFICAS

	<i>página</i>
Gráfica-1: <i>Perfil de Precisión</i>	27
Gráfica-2: <i>Cromatograma de la mancha aislada por cromatografía en capa fina en una muestra de aceite esencial de limón (Citrus aurantifolia)</i>	28
Gráfica-3: <i>Espectro de absorción de los compuestos γ-terpineno y p-cimeno en la región entre 220 y 400nm</i>	29
Gráfica-4: <i>Comportamiento cinético de primer orden</i>	32
Gráfica-5: <i>Comportamiento cinético de segundo orden</i>	32
Gráfica-6: <i>Comportamiento polinomial de la descomposición</i>	33

I. RESUMEN

Se propuso la implementación de un método para determinar la calidad del aceite esencial de limón (*Citrus aurantifolia*) aislando uno de los compuestos de oxidación (*p*-cimeno) por cromatografía en capa fina y cuantificándolo por espectroscopía ultravioleta. La gran similitud entre las características estructurales del precursor (γ -terpineno) y su producto de oxidación no permitieron aislar ambos compuestos, obteniéndose una sola mancha por cromatografía en capa fina. Tomando en cuenta que el γ -terpineno no absorbe en la región ultravioleta, se trabajó con una mezcla de ambos en la posterior cuantificación.

El método propuesto se evaluó con respecto a parámetros de repetibilidad y reproducibilidad, comparándose con el método de referencia (cromatografía de gases). Para este fin, se sometieron muestras del estándar γ -terpineno a una fotooxidación con luz ultravioleta y se tomaron diferentes alícuotas, las cuales fueron analizadas por ambos métodos. De esta forma se determinó que el método de cromatografía en capa fina y espectroscopía ultravioleta (CCF-UV) es reproducible (los ensayos presentan las mismas tendencias) mas no repetible (los valores entre ensayos difieren), debido sobretodo a errores en la extracción del compuesto *p*-cimeno de la fase estacionaria. Asimismo, el método propuesto fue equivalente estadísticamente al método de cromatografía de gases.

Se determinaron los límites de detección y de cuantificación los cuales fueron del orden de 10^{-1} ppm.

Finalmente se realizó un estudio cinético preliminar de la formación de *p*-cimeno, midiendo la concentración de γ -terpineno en muestras oxidadas de aceite esencial de limón (*Citrus aurantifolia*) por cromatografía de gases. Se determinó la constante de velocidad y el orden de reacción, el cual fue igual a 2. El análisis de estas muestras por el método CCF-UV, reveló que una reacción secundaria durante la oxidación consume el *p*-cimeno formado y por lo tanto el método es útil para

muestras de reciente extracción o destilación que no hayan sido sometidos al efecto de la luz y del aire del ambiente.

De acuerdo con los cálculos realizados, este método redujo la inversión para el análisis del aceite esencial de limón en aproximadamente una quinta parte, lo cual podría ser importante al querer montar una planta de extracción.

II. INTRODUCCIÓN

Las especies y sus principios saborizantes, los aceites esenciales, han sido utilizados como saborizantes desde tiempos inmemoriales. Está por demás mencionar su amplio uso en perfumería, cosméticos y perfumado de jabones. Los aceites volátiles y sus compuestos aromáticos aislados sirven también para cubrir olores de algún modo objetables lo cual ha rentabilizado nuevos campos para los fabricantes de otros materiales como el cuero. Algunos aceites volátiles son antisépticos externos o internos más o menos poderosos, otros poseen una acción analgésica, hemolítica o antienzimática, y aún otros actúan como sedantes, estimulantes y digestivos (1). Dependiendo de la calidad del aceite, está la vida útil del producto en el que éste se encuentra incluido.

Los aceites esenciales se constituyen de compuestos oxigenados y terpenoides en su gran mayoría, y son estos últimos los que determinan la calidad del mismo, ya que a mayor cantidad de terpenos, menor es la calidad del aceite. Esto se debe a que los compuestos insaturados son fácilmente oxidables y producen, compuestos de olores y sabores distintos, lo que altera las cualidades del aceite en cuestión y da como resultado un producto no aceptable en el mercado. Es por esta razón que la mayoría de aceites esenciales son "*desterpenizados*" para incrementar la vida útil del mismo y así mejorar su calidad, pero esto no siempre es conveniente, ya que las características organolépticas deseadas pueden depender de estos compuestos (1).

El aceite esencial de limón (*C. aurantifolia* y *C. latifolia*) es uno de los más utilizados en la industria de alimentos y uno de los más ricos en compuestos terpenoides. El de mayor interés para este estudio es el γ -terpineno el cual se oxida muy fácilmente por exposición al aire a *p*-cimeno. Aunque el primero es un compuesto minoritario, da como producto de oxidación un compuesto estable y poco volátil (punto de ebullición del *p*-cimeno:176-178°C), lo cual permite su fácil determinación y, además, es un indicador del estado de envejecimiento del aceite.

Debido a su carácter aromático, el *p*-cimeno puede ser cuantificado por espectroscopía ultravioleta.

La cromatografía de gases es la técnica utilizada comúnmente para determinar el grado de oxidación de un aceite esencial. Si bien es ampliamente aceptada, el equipo y reactivos necesarios para determinar el grado de envejecimiento de las esencias tiene un alto costo y no siempre se cuenta con ellos. La falta de dicho equipo ocurre sobre todo en empresas que trabajan con estos materiales para sus productos terminados, las cuales podrían requerir de una prueba en sus laboratorios que les garantice el buen estado del aceite esencial.

Tomando en cuenta estos aspectos, se planteó una prueba útil y que no requiriera de equipo de alto costo para el análisis de una muestra de aceite de limón (*Citrus aurantifolia*), utilizando la cantidad de *p*-cimeno presente en la muestra como parámetro para la determinación de la calidad del mismo. Se realizó el envejecimiento acelerado de un estándar de γ -terpineno, exponiendo una pequeña cantidad de éste a una fuente de luz UV y se tomaron muestras durante 72 horas para realizarles una cromatografía en capa fina y una cromatografía de gases. Al identificar una de las manchas como *p*-cimeno, ésta se colectó y filtró con *n*-hexano para su posterior análisis de concentración a través de una curva de calibración de absorbancia contra concentración. De una manera similar, se identificó el pico correspondiente al *p*-cimeno en el cromatograma de gases y se cuantificó con una curva de calibración de área de pico contra concentración. La confiabilidad de la prueba fue dictaminada por la correlación entre las concentraciones obtenidas por el método propuesto y el método de referencia (cromatografía de gases).

III. ANTECEDENTES

A. CARACTERÍSTICAS DEL ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN (*Citrus aurantifolia* y *Citrus latifolia*)

1. Producción

El aceite de limón puede ser obtenido por prensado o por destilación, y es este último el que se produce a mayor escala. Existen dos variedades de limón que son importantes en la producción del aceite de limón en Guatemala: el limón criollo o mexicano (*C. aurantifolia*) y el limón persa (*C. latifolia*). El primero tiene frutos pequeños, redondos de color verde o amarillo con muchas semillas; y el último tiene frutos más grandes, generalmente sin semillas (2).

El limón mexicano se cultiva en México, las Antillas y Perú y el limón persa, en Brasil y Florida aunque éste es el que tiene la menor concentración de los compuestos organolépticos típicos (2).

La mayoría de las 1200 toneladas métricas producidas anualmente son destiladas. México (280 TM), Haití (200 TM) y Perú (180 TM) son los máximos productores. Brasil, Cuba, Costa de Marfil, Dominicana, Guatemala, Jamaica, Ghana y Swazilandia también destilan aceite de limón. Brasil (90 TM), Estados Unidos (40 TM) y México (25 TM) son los mayores productores de aceite por prensado (3).

2. Características del aceite destilado

Este se obtiene por destilación por arrastre con vapor de agua de una emulsión aceite-jugo que se obtiene al partir el fruto entero. El ácido presente en el jugo actúa sobre el aceite extraído de la cáscara y altera sus características. Los componentes originales son modificados para formar una nueva serie de compuestos (2).

El aceite de limón criollo obtenido por destilación, es incoloro o ligeramente amarillo con un olor característico el cual difiere del obtenido a partir de frutos frescos por prensado. Posee las siguientes propiedades

- d_{20} 0.856 - 0.865
- n_D 1.474 -1.478
- α_D +34° - +45°
- Contenido de compuestos carbonílicos (calculados como citral) 1.5% máximo
- Residuo de evaporación 2.5% máximo (2).

La ciclación catalizada por ácido y la deshidratación del citral y del linalool producen varios compuestos los cuales se encuentran en altas concentraciones y contribuyen al aroma típico del aceite destilado (1,4-cineol; 1,8-cineol; 2,2,6-trimetil-6-viniltetrahidropirano y 2-(2-buten-2-ol)-5,5-dimetiltetrahidrofurano) (2).

3. Características del aceite prensado

Por prensado se obtiene el aceite raspando y perforando la cáscara. También se pueden cortar los frutos y la emulsión jugo-aceite obtenida se centrifuga. Este aceite se caracteriza por su color amarillo a amarillo verdoso, con un olor fuerte y característico, parecido al del limón *C. limonum*¹, y por poseer las características siguientes,

- d_{20} 0.874 - 0.882
- n_D 1.482 -1.486
- α_D +35° - +40°
- Contenido de compuestos carbonílicos (calculados como citral) 4.5 -9.0%
- Residuo de evaporación 8.0 - 13.5% (2)

¹ El limón persa y el criollo conocidos en Guatemala, son clasificados por su género y especie como limas en los libros de Guenther [6] y Bower [2].

4. Aplicaciones

El aceite de limón es uno de los saborizantes más importantes, utilizado ampliamente en todo tipo de bebidas, refrescos en polvo y entabletados. También se emplea en alimentos para hornear como pasteles, pastas, rellenos para pasteles, confitería, centros de dulces, gelatinas, helados, etc. Su uso se extiende a la perfumería, en la fabricación de aguas de colonia y cosméticos a los cuales les imparte una nota refrescante. Tiene importancia también en los productos de limpieza (4).

Al aceite esencial de limón se le atribuyen propiedades curativas y se emplea para disminuir la fiebre asociada con resfriados, amigdalitis y gripe, y ayuda al sistema inmune. Disminuye la tos, la bronquitis y la sinusitis, así como el asma. Se emplea para mejorar los problemas de artritis, reumatismo y de mala circulación sanguínea entre otros (5).

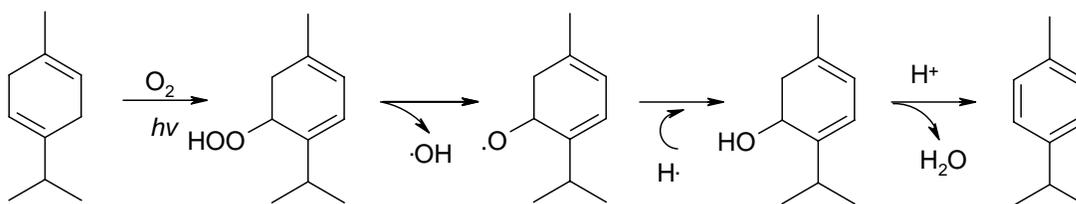
5. Acción Farmacológica

Los aceites esenciales de *Citrus* tienen actividad antimicrobiana de amplio espectro y repelente, ligera propiedad sedante, carminativa, diurética, espasmolítica e hipnótica [1]. Este aceite en especial es antiescorbútico, antiséptico, antiviral, aperitivo, bactericida, febrífugo, restaurativo y tónico (5). El limoneno que se encuentra presente en cantidades importantes en la cáscara del fruto es un expectorante. Este puede obtenerse por expresión en frío de la cáscara, por el proceso de esponja (*écuelle à piquer*) o mecanizado. El uso permitido de este aceite de acuerdo al *Vademecum de Prescripción médica* es en las siguientes proporciones: jarabes, 65 ppm; bebidas no alcohólicas, 230 ppm; productos horneados, 580 ppm; caramelos, 1100 ppm; gomas de mascar, 1900 ppm [6]. En el *anexo 1* se puede observar las cantidades usuales de aceite esencial de limón que se añaden a otra clase de productos y las cantidades máximas que se permiten agregar a éstos.

Toxicología: Algunos de los componentes del aceite esencial (como el bergapteno) al exponerse al sol pueden desencadenar fenómenos de fotosensibilidad (6).

6. Presencia de γ -terpineno y *p*-cimeno en el aceite de limón

El contenido de γ -terpineno en el aceite de limón depende de la especie y de la época en que se coseche la materia prima, pero en general su contenido en el aceite esencial prensado es de 1.3% y en el destilado es de 7.8% (7). La exposición del aceite a la luz y al ambiente provoca la oxidación del γ -terpineno a *p*-cimeno por un mecanismo de reacción radicalar:



γ -terpineno

p-cimeno

(8)

Esto se lleva a cabo con suma facilidad y el incremento de la concentración del *p*-cimeno en el aceite es uno de los responsables del cambio en las características organolépticas del mismo. Aunque el *p*-cimeno no sea el compuesto que mayormente contribuye al olor en el aceite envejecido, puede ser un parámetro para indicar el grado de aceptabilidad de éste (8).

De acuerdo a estudios realizados con anterioridad, se tiene que el valor umbral de *p*-cimeno aceptado en el aceite de limón es de 1% y que a concentraciones mayores, las características organolépticas ya no corresponden al estándar del aceite (8).

B. EVALUACIÓN DE CALIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN (*Citrus aurantifolia*)

El International Standard, en su sección ISO 3519, especifica algunas características que debe tener el aceite esencial de limón [*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle]⁴, obtenido por destilación, con el propósito de facilitar su evaluación de calidad. Estas características se presentan en la tabla del *anexo 2*. Asimismo se describen los métodos para determinar la densidad relativa, el índice de refracción y la rotación óptica a 20°C. Además, indica los métodos preestablecidos para medir el residuo de evaporación y el valor carbonílico, así como el tipo de empaque, etiqueta, marcado y almacenaje que requiere el aceite esencial. Finalmente presenta los cromatogramas típicos de este obtenidos por cromatografía de gases (ver *anexo 3*, figuras 3.a y 3.b) (7).

C. ANÁLISIS DE ACEITES ESENCIALES POR CROMATOGRFÍA EN CAPA FINA

Wagner y Bladt reportaron los compuestos de los aceites esenciales que se caracterizan por el método de cromatografía en capa fina [9]. De ellos, el único presente en el aceite esencial de limón (*Citrus aurantifolia*) es el 1,8-cineol. El sistema de solventes recomendado para el análisis y la comparación directa de los compuestos importantes de los aceites, fue tolueno-acetato de etilo (93:7). Se propuso la exposición de las cromatoplasas a la luz ultravioleta como método de detección, así como mezclas de ácido sulfúrico con anisaldehído o vainillina como reveladores (9).

⁴ En este texto el limón de esta especie es también considerado como lima.

D. ANÁLISIS DE ACEITES ESENCIALES POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

En 1969, Abraham Lifshitz y sus colaboradores publicaron sus estudios sobre la caracterización del aceite esencial de limón israelí y la detección de su adulteración por medio de la cromatografía gas-líquida. De esta forma lograron caracterizar siete picos del cromatograma obtenido del aceite esencial. Estos fueron el *d*-Limoneno, decanal (y/o linalool), acetato de linalilo, citronelol, acetato de geranilo, neral y geranial (10).

De forma similar G. Ojeda de Rodríguez y colaboradores identificaron y cuantificaron los componentes del aceite esencial de limón venezolano por HRGC y GC-MS, empleando un estándar interno y factores de respuesta. El análisis de cromatografía de gases del aceite esencial de limón reveló un total de 51 constituyentes de los cuales el compuesto más abundante fue el monoterpeno limoneno (65,65%) y los principales aldehídos fueron geranial (1,43%) y neral (0,87%) (11).

E. ANÁLISIS DE ACEITES ESENCIALES POR ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE

Levi y Laughton determinaron citral en té de limón y en aceites cítricos por condensación con ácido barbitúrico. Mostraron que el aldehído α - β insaturado se condensaba al ser tratado con ácido barbitúrico en solución etanólica para producir el ácido citrilidenbarbitúrico. El producto de esta reacción presentó una fuerte absorbancia a 336 nm, y se pudo utilizar la intensidad de la banda observada a esta longitud de onda para mediciones cuantitativas, bajo condiciones controladas. El método se probó útil para el proceso de control y evaluación de calidad de los

materiales en la industria de aceites esenciales, saborizantes y cosméticos, ya que es altamente específico, rápido, fácil de ejecutar y requiere solamente una pequeña cantidad de muestra y no de equipos ni reactivos especiales (12).

Stanley, Lindwall y Vannier realizaron simultáneamente un procedimiento para determinar citral en aceite esencial de limón basado en el desarrollo de una coloración verde cuando el aldehído reaccionaba con vainillina y piperidina en una solución etanólica (12).

F. EL *p*-CIMENO Y LA OXIDACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN

Lösing, Degener y Matheis investigaron el envejecimiento de aceites cítricos con la ayuda de la espectroscopía I.R. Ésta se basó en la formación de *p*-cimol (*p*-cimeno) a partir de γ -terpineno, la cual puede observarse claramente en un espectro infrarrojo debido a sus bandas características (1515 cm^{-1}). Las muestras de aceite se sometieron a un envejecimiento rápido con la ayuda de un sencillo dispositivo de ensayo (ver *anexo 4*) y las muestras se analizaron tanto instrumental como sensorialmente. De esto resultó la posibilidad de poder detectar claramente la formación de componentes "*off-flavor*" antes de que se alcanzaran los valores umbral sensoriales(8).

G. COMPARACIÓN DE PRESUPUESTOS

La siguiente tabla presenta el cálculo detallado del presupuesto que se requiere para montar el método de análisis del aceite esencial de limón por Cromatografía de gases (CG):

Tabla-1: Presupuesto para el montaje de la técnica por CG.

DESCRIPCIÓN	COSTO (Q)
Cromatógrafo de gases HP 6890 modelo G1530 A con detector de ionización de llama y columna siloxano 5% pH ME 30m x 0.32mm x 0.25µm	248, 754.00 ²
Cilindro de hidrógeno	1, 945.39
Cilindro de aire	1, 945.39
Cilindro de nitrógeno	1, 945.39
(Duración del análisis : 1 hora, aproximadamente) ³	
TOTAL	254, 590.14

³ Fuente : Laboratorio INLASA.

² Los valores indicados pueden variar con el precio del dólar en Guatemala y con los impuestos de importación.

La siguiente tabla presenta el cálculo detallado del presupuesto que se requiere para montar el método de análisis del aceite esencial de limón por Cromatografía en capa fina y espectroscopía ultravioleta:

Tabla-2: Presupuesto para el montaje de la técnica por CCF-UV.

DESCRIPCIÓN	COSTO (Q)
Espectrofotómetro de UV-VIS Thomas Scientific 8405-C15	44, 608.00 ⁴
Lámpara de U.V. 254nm	1, 588.00
Cámara cromatográfica (1 unidad)	1, 152.35
Placas cromatográficas con silicagel (25unidades)	1, 366.70
Microjeringa (10unidades)	833.60
Embudo de vidrio	18.00
Balón aforado de 10mL (10 unidades)	457.50
Micropipeta	0.75
Hexano (4L)	1, 923.00
Acetato de etilo (4L)	318.00
<i>p</i> -Cimeno (100mL)	2, 015.48 ⁴
(Duración del análisis: 1 h 45 min, aproximadamente)	
TOTAL	53, 869.63

⁴ Ver nota 2 en página anterior

IV. JUSTIFICACIONES

Los análisis de calidad para los aceites esenciales se realizan comúnmente por cromatografía de gases. Aun cuando este método es considerado el más adecuado para analizar estos compuestos, el equipo y reactivos necesarios tienen un alto costo y no siempre se cuentan con ellos o con el presupuesto necesario para implementarlo. Es probable que con esta visión otros países, como Alemania y Canadá, estén buscando nuevas alternativas para evaluar la calidad de aceites esenciales (3 y12).

Es importante tomar también en cuenta que la cromatografía de gases no tiene una respuesta lineal en todos los rangos de concentraciones por lo que en algunos casos, se pueda requerir el empleo de otro método (13).

Tomando en cuenta estos aspectos se plantea un método práctico a un costo bastante menor de inversión para el análisis de una muestra de aceite esencial de limón (y adaptable a otros aceites esenciales), el cual sea útil y representativo de la muestra que se analice. Este método presenta la ventaja de no requerir material especial ni de alto costo, ya que la separación del compuesto deseado se realiza por cromatografía en capa fina y su cuantificación por espectroscopía ultravioleta-visible.

Aunque el análisis de los mismos se podría realizar por otros métodos, se escogió la cuantificación de *p*-cimeno como parámetro de calidad, ya que este compuesto es estable, poco volátil y proviene únicamente de la oxidación del γ -terpineno.

V. OBJETIVOS

A. GENERALES

1. Establecer un método que utilice cromatografía en capa fina y espectrometría de UV/VIS para determinar la calidad del aceite esencial de limón (*Citrus aurantifolia*), el cual sea equivalente a la cromatografía de gases.

B. ESPECÍFICOS

1. Oxidar aceite esencial de limón (*Citrus aurantifolia*) y un estándar de γ -terpineno promoviendo el envejecimiento por exposición a una lámpara de luz blanca.
2. Separar e identificar por cromatografía en capa fina, el compuesto *p*-cimeno, producto de la oxidación del γ -terpineno.
3. Cuantificar por espectrometría de UV/VIS el *p*-cimeno.
4. Comparar los resultados obtenidos con el método propuesto con la técnica de cromatografía de gases.
5. Estudiar la cinética de forma preliminar de la oxidación del γ -terpineno a *p*-cimeno en una muestra de aceite esencial de limón (*Citrus aurantifolia*) con el método propuesto

VI. HIPÓTESIS

Es posible determinar por Cromatografía en Capa Fina y Espectroscopía ultravioleta-visible, la calidad del Aceite Esencial de Limón (*Citrus aurantifolia*) utilizando como parámetro la concentración de *p*-cimeno en el aceite como método alternativo a la cromatografía de gases.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. UNIVERSO DE TRABAJO

1. Muestra

La muestra fue constituida por una muestra de aceite esencial de limón (*Citrus aurantifolia*) destilado, el cual proviene de la empresa George Uhe Co, Inc. Cuyo representante para Guatemala es la empresa APAESA y un estándar de γ -terpineno producido por ALDRICH &Co.

B. RECURSOS

1. Humanos

- a) Estudiante investigadora: Claudia Alejandra De León Solís
- b) Asesor: MSc. Adolfo León Gross
- c) Asesor: PhD. Óscar Cóbar Pinto

2. Físicos

- a) Reactivos
 - ◆ Estándar de *p*-cimeno (Aldrich, 98%)
 - ◆ Estándar de γ -terpineno (Aldrich, 97%)
 - ◆ Hexano
 - ◆ Tolueno
 - ◆ Acetato de etilo
 - ◆ Yodo metálico
- b) Placas cromatográficas
 - ◆ Sílica gel GF-254 para cromatografía en capa fina
 - ◆ Placas de vidrio

- c) Equipo y cristalería
- ◆ Tubos de ensayo con tapa de rosca
 - ◆ Lámpara de luz U.V. 254nm
 - ◆ Cámara cromatográfica
 - ◆ Probeta de 25mL
 - ◆ Microjeringa de 10µL
 - ◆ Cuchilla
 - ◆ Espátula
 - ◆ Embudo de vidrio pequeño
 - ◆ Balones aforados de 10mL
 - ◆ Micropipetas
 - ◆ Espectrofotómetro Cary 50 de UV-VIS
 - ◆ Cromatógrafo de gases Hewlett Packard
 - ◆ Desecadora

- d) Otros
- ◆ Fibra de vidrio
 - ◆ Lámpara de escritorio
 - ◆ Bombilla de luz negra de 25W

3. Institucionales

- ◆ Departamento de Fisicoquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.
- ◆ Unidad de Análisis Instrumental, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.
- ◆ Departamento de Toxicología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.
- ◆ Laboratorio de Análisis Químico, Universidad del Valle de Guatemala.

- ◆ Laboratorio INLASA
- ◆ Biblioteca de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC
- ◆ Biblioteca de la Universidad del Valle de Guatemala
- ◆ Aromas, Perfumes y Aceites Esenciales, S.A. (APAESA)

4. Metodología

a) Determinación del sistema cromatográfico

Para determinar la mezcla de solventes más adecuada para el aislamiento de este compuesto se realizaron pruebas de ensayo-error utilizando diferentes fases móviles y como única fase estacionaria, sílica gel. Para estas pruebas se utilizaron como agentes reveladores, una lámpara de luz ultravioleta de 254nm de longitud de onda y vapor de yodo los cuales permitieron observar claramente la resolución de la cromatografía. Se aceptaría la mezcla de solventes que permitiera la obtención de una sola mancha aislada de *p*-cimeno tanto en el estándar como en el aceite esencial de limón (*Citrus aurantifolia*).

Se realizó en los ensayos preliminares, una cromatografía de gases de la mancha aislada par verificar que se constituyera únicamente del compuesto *p*-cimeno.

Al haber determinado la mezcla de solventes ideal, se tomó una alícuota de 1 μ L del aceite y se colocó sobre una placa cromatográfica elaborada de sílica gel con un soporte de vidrio. Asimismo, se colocó una muestra de *p*-cimeno y de γ -terpineno estándar para identificar la mancha del compuesto en la cromatografía que se desarrollaba. Se utilizaron 30mL de la fase móvil determinada para desarrollar la placa con la muestra y el estándar en una cámara cromatográfica para placas de 20 x 20 cm. Se dejó que el frente del solvente alcanzara los 18 cm desde el punto de aplicación de las muestras.

La placa ya desarrollada se dejó secar y luego se colocó bajo una lámpara de luz U.V. Inmediatamente, se marcó con lápiz la mancha que correspondió en el aceite al compuesto *p*-cimeno.

b) Oxidación del estándar de γ -terpineno⁵.

Se expusieron 4 muestras de estándar de γ -terpineno en diferentes tubos de ensayo con tapa de rosca, al efecto de una radiación de luz durante 312 horas. La fuente de luz fue una bombilla de luz negra (ultravioleta) la cual se hizo incidir dentro de una cámara de oxidación (ver anexo 4). Cada muestra fue extraída de la cámara de oxidación a diferente tiempo (72, 144, 240 y 312) y se guardó una sin exponer ($t=0$). Se tomaron alícuotas de cada tubo, las cuales fueron cromatografiadas con el sistema determinado anteriormente.

Se cortó la porción de sílica gel que contenía la mancha de *p*-cimeno encontrada en el estándar de γ -terpineno oxidado y se colocó cuidadosamente sobre un embudo previamente saturado con fibra de vidrio. Se extrajo el compuesto con hexano dentro de un balón aforado de 10 mL.

Para la cuantificación se determinó primeramente el máximo de absorción del *p*-cimeno en el espectrómetro de UV-VIS Cary 50, realizando un barrido a una solución de éste. Luego se hizo una curva de calibración (absorbancia contra concentración) con soluciones estándares de *p*-cimeno, leídas a la longitud de onda encontrada previamente. Para esto se pesó 0.10-0.15g de *p*-cimeno en un balón aforado de 25mL y se aforó con hexano. A partir de esta solución patrón, se prepararon cinco estándares con concentraciones entre 0.5 y 200ppm. Finalmente se leyó la muestra eluida y se calculó su concentración de acuerdo a la ecuación de calibración.

El procedimiento total se repitió tres veces con el fin de realizar un cálculo de desviación estándar y tomar como valor de concentración en cada tiempo, el promedio obtenido de las tres mediciones.

⁵ ver en el anexo 5 el diagrama del procedimiento.

Después de analizar el contenido de cada tubo de ensayo a un tiempo determinado, éste fue desechado.

c) Cromatografía de gases

Se tomó una alícuota del estándar de γ -terpineno sometido al envejecimiento para ser analizado como por cromatografía de gases. Las condiciones de operación del cromatógrafo de gases se describen a continuación a continuación:

Alícuotas de 0.4 μ L se inyectaron en un cromatógrafo de gases (HP-5890) equipado con un inyector split/splitless, operando en modo split, a una temperatura de 240°C. La separación de los compuestos se realizó en una columna SPB-5 de 30m de longitud, 0.53mm de diámetro interno y 0.5 μ m de espesor de película y se utilizó nitrógeno como gas portador. Se empleó un detector FID a 300°C y la temperatura de la columna se programó para que se mantuviera en isoterma a 60°C por 5 minutos, luego una rampa de 60 a 255°C a una velocidad de 10°C/min, temperatura a la cual se mantuvo por 56 minutos más.

Las áreas de las alícuotas se compararon contra una curva de calibración similar a la descrita en el apartado *b*) para calcular las concentraciones de *p*-cimeno por este método.

d) Evaluación del método.

Debido a la naturaleza de la prueba y de la muestra que se analiza, la evaluación fue determinada en primera instancia por la repetibilidad, la reproducibilidad, un perfil de precisión, la cantidad mínima detectable y la cantidad mínima cuantificable del aceite esencial.

La repetibilidad se determinó calculando el promedio y la desviación estándar de seis alícuotas que se tomaron al tiempo $t = 312$ horas en uno de los estudios que se realizaron. Se eligió este tiempo ya que se esperaba que esa muestra contuviera la mayor cantidad de *p*-cimeno. El coeficiente de variación de acuerdo al método utilizado no debía ser mayor al 3%.

La reproducibilidad se determinó realizando tres procesos de oxidación con tres muestras del estándar de γ -terpineno (por conveniencia).

El perfil de precisión se determinó tomando alícuotas en los tiempos $t = 0, 7, 32, 48$ y 72 de los estudios que se realizaron y calculando la linealidad entre los coeficientes de desviación estándar y los promedios de las concentraciones obtenidas. El coeficiente de variación se calculó en este caso de la siguiente forma:

$$CV = \frac{S}{\bar{X}}$$

Para los límites de detección y cuantificación se leyeron 10 muestras blanco distintas y se calculó su desviación estándar. El límite de detección y el límite de cuantificación se calculó como sigue:

$$LD = \frac{X_{bl} + 3S}{m} \quad LC = \frac{X_{bl} + 10S}{m}$$

donde X_{bl} es el promedio de lecturas de las muestras blanco y S es la desviación estándar de las lecturas de los blanco y m es la pendiente de la curva de calibración (14).

Con los datos de las curvas de linealidad obtenidas por la cromatografía de gases y por espectroscopía ultravioleta-visible, se realizó una prueba de colinealidad para determinar si los dos métodos son equivalentes o no, de acuerdo a las siguientes hipótesis:

Ho:	$b_1 = b_2$
Ho:	$a_1 = a_2$

El análisis estadístico en ambos casos fue la prueba de t de Student. Si los estándares eran los mismos, se realizaría una prueba de t de Student pareada.

Se realizó un análisis de correlación con los mismos datos, colocando en el eje X las concentraciones reportadas por el método de cromatografía de gases y en el eje Y , las concentraciones reportadas por el método de espectroscopía ultravioleta-visible. Se evaluó el coeficiente de correlación por medio de t de Student y se probó la hipótesis:

Ho:	b = 1
Ho:	a = 0

Lo cual confirmaría la igualdad entre los métodos o establecería las diferencias entre ellos.

Asimismo se hizo un análisis de correlación de concordancia (r_c) donde

$$r_c = \frac{\sigma_1^2 + \sigma_2^2 - (\sigma_{1-2})^2}{\sigma_1^2 + \sigma_2^2 - (y_1 - y_2)^2}$$

Se aceptaría la correlación de concordancia como válida si el valor de r_c era superior a 0.75.

Finalmente se hizo un análisis descriptivo (comparativo) entre los resultados de todos los aspectos que se analizaron en la evaluación.

e) Estudio cinético preliminar

Para este efecto, se sometió una serie de muestras del aceite esencial de limón (*Citrus aurantifolia*) al envejecimiento acelerado como se describió en el inciso *b*). Se tomó una alícuota a las 7, 32, 48 y 72 horas a las cuales se les analizó su contenido de *p*-cimeno con el método propuesto y se analizó la muestra al tiempo 0 (para determinar su concentración de *p*-cimeno inicial).

Los datos obtenidos se analizaron para determinar el orden y la constante de velocidad de la reacción y si el orden era sencillo, entonces se calcularía la vida media del compuesto en el aceite.

VIII. RESULTADOS

A. EVALUACIÓN DEL MÉTODO PROPUESTO DE CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA Y ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA

Tabla-3: Lecturas de absorbancia de 10 muestras blanco para la determinación de los límites de detección y de cuantificación del método ($\lambda=265\text{nm}$).

ENSAYO ¹	ABSORBANCIA
1	0.0002
2	0.0004
3	0.0004
4	0.0004
5	0.0004
6	0.0004
7	0.0005
8	0.0005
9	0.0005
10	0.0005

Tabla-4: Determinación de los límites de detección y de cuantificación del método.

PARÁMETRO	CÁLCULO	VALOR
Desviación estándar	s	9.18937E-05
Límite de detección	$(X_{bl} + 3s)/m$	0.23345 ppm
Límite de cuantificación	$(X_{bl} + 10s)/m$	0.44931 ppm

¹ Se utilizó n-hexano como blanco del método

Tabla-5: Análisis de reproducibilidad del método.²

MUESTRA	TIEMPO (horas)	CONCENTRACIÓN (g/100mL) ³			S
		Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	
Tubo 1	0	1.18	0.36	1.38	0.5404936
Tubo 2	72	4.51	2.31	3.80	1.12280898
Tubo 3	144	6.27	5.53	4.96	0.65683585
Tubo 4	240	21.54	20.72	22.70	0.99485342
Tubo 5	312	25.07	24.71	24.96	0.18448125

Tabla-6: Análisis de repetibilidad del método.

ENSAYO	CONCENTRACIÓN ⁴ (g _{P-CIMENO} /100mL)
1	23.12
2	21.96
3	22.98
4	24.90
5	25.07
6	24.71
7	24.96
Promedio	23.96
D. STD.	1.24794116
C. V.	5.2091%

² Ver el Ver el informe dado por la Unidad de Biometría y Estadística de la Facultad de CCQQ y Farmacia en el anexo 6.

³ Ver los reportes obtenidos por el espectrofotómetro de ultravioleta-visible CARY50 en el Anexo 7.

⁴ Ver el reporte obtenido por el espectrofotómetro de ultravioleta visible CARY-50 en el Anexo 8 y se tomaron en cuenta las concentraciones obtenidas en los tres ensayos anteriores.

Tabla-7: Comparación del método propuesto (CCF-UV) con el método de Referencia (CG).⁵

TIEMPO (horas)	CONCENTRACIÓN (g _{P-CIMENO} /100mL)	
	Método CCF-UV	Método GC ⁶
0	0.97	0.75
72	3.54	4.37
144	5.59	6.63
240	21.65	38.12
312	24.91	36.52

$$C_{\text{CCF-UV}}^7 = 1.05056282 + 0.59563822 C_{\text{GC}}^8$$

$$r = 0.99020689$$

Pruebas de hipótesis

1. Ho: b=1 t=-0.0062
 p=0.9954
 Ho se acepta

2. Ho: a=0 t=0.9075
 p=0.4310
 Ho no se rechaza

⁵ Ver el informe dado por el Departamento de Biometría y Estadística de la Facultad de CCQQ y Farmacia en el anexo 9.

⁶ Ver los cromatogramas obtenidos en el anexo 10.

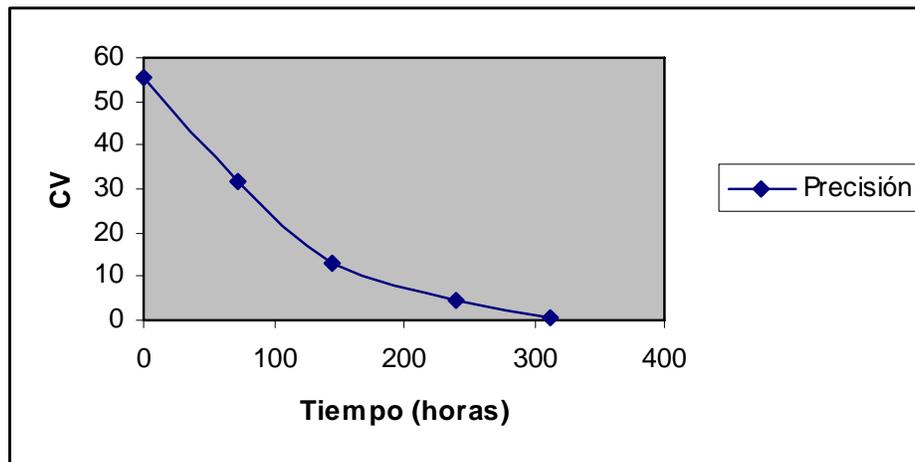
⁷ Concentración obtenida por el método de cromatografía de Gases

⁸ Concentración obtenida por el método de cromatografía en capa fina y espectroscopía ultravioleta

Tabla-8: Perfil de precisión del método propuesto (CCF-UV).

MUESTRA	ENSAYO 1	ENSAYO 2	ENSAYO 3	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	COEFICIENTE VARIACIÓN
Tubo 1	1.18	0.36	1.38	0.97	0.54	55.53
Tubo 2	4.51	2.31	3.80	3.54	1.12	31.72
Tubo 3	6.42	5.53	4.96	5.64	0.74	13.05
Tubo 4	21.54	20.72	22.70	21.65	0.99	4.59
Tubo 5	25.07	24.71	24.96	24.91	0.18	0.74

Gráfica-1: Perfil de Precisión.

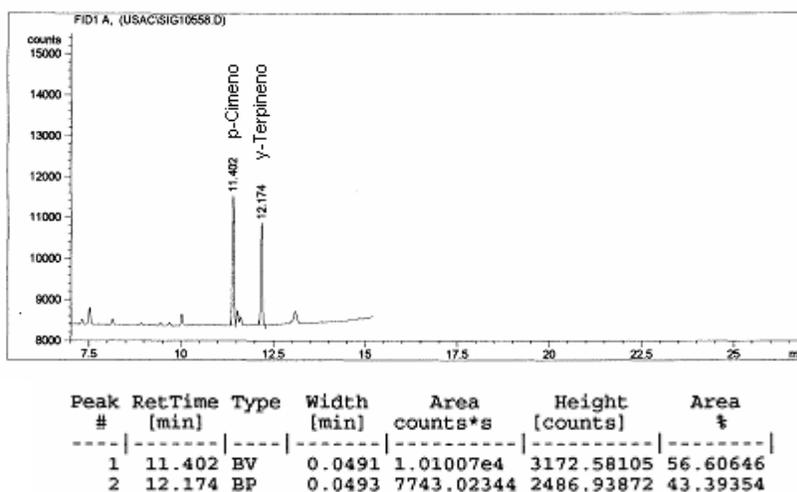


B. DETERMINACIÓN DE LA FASE MÓVIL MÁS ADECUADA PARA AISLAR EL *p*-CIMENO

Tabla-9: Resultados de relación de frente (*R_f*) de γ -terpineno, *p*-cimeno y una mezcla de ambos en diferentes fases móviles.

FASE MÓVIL	RELACIÓN DE FRENTE			
	γ -Terpineno estándar	<i>p</i> -Cimeno estándar	γ -Terpineno en mezcla	<i>p</i> -Cimeno en mezcla
Hexano-Acetato de etilo (7:3)	0.91	0.93	0.92	0.92
Hexano-Acetato de etilo-Metanol (21:9:5)	0.87	0.88	0.87	0.87
Hexano	0.69	0.68	0.67	0.69
Hexano-Pentano (1:1)	0.58	0.49	0.58	0.47
Tolueno	0.49	0.52	0.49	0.51
Tolueno-Acetato de etilo (93:7)	0.85	0.83	0.84	0.84

Gráfica-2: Cromatograma de la mancha aislada por cromatografía en capa fina en una muestra de aceite esencial de limón (*Citrus aurantifolia*).



C. DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA DE MÁXIMA
ABSORCIÓN DEL *p*-CIMENO Y DEL γ -TERPINENO.

Gráfica-3: *Espectro de absorción de los compuestos γ -terpineno y *p*-cimeno en la región entre 220 y 400nm.*

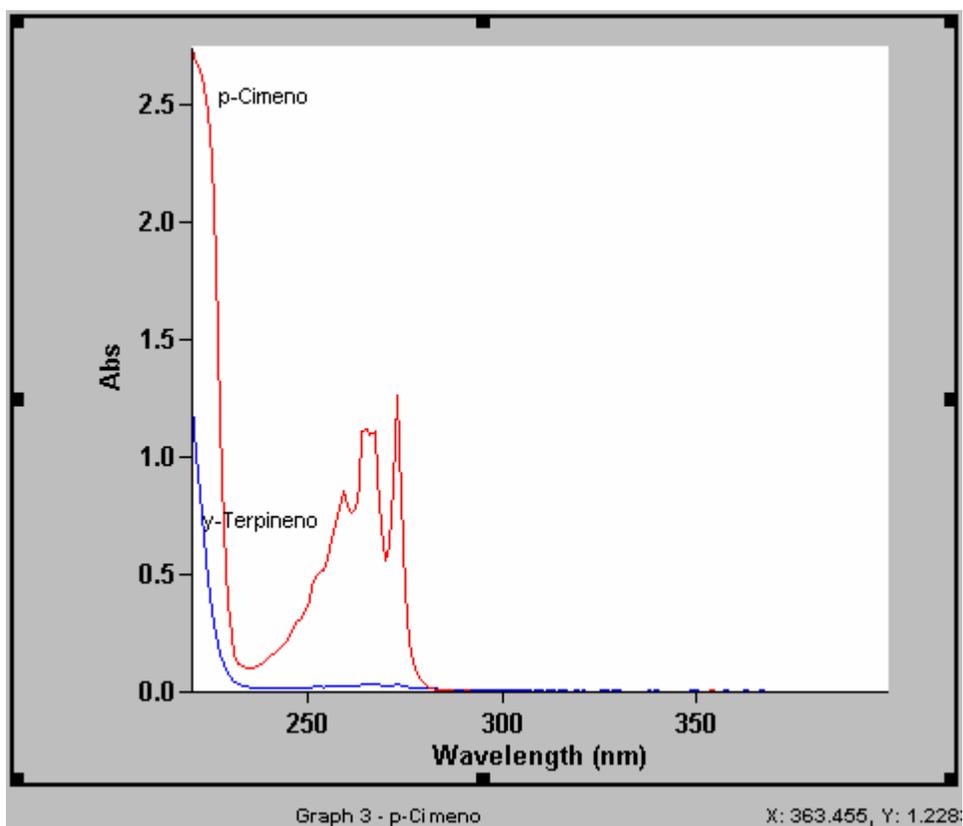


Tabla-10: *Picos de absorción del *p*-Cimeno.*

LONGITUD DE ONDA	ABSORBANCIA
273.0	1.2630
267.1	1.1131
265.0	1.1219
259.0	0.8547

D. ESTUDIO CINÉTICO PRELIMINAR DE LA OXIDACIÓN DEL γ -TERPINENO EN ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN (*Citrus aurantifolia*).

Tabla-11: Cuantificación de *p*-Cimeno producido por oxidación de Aceite esencial de limón (*Citrus aurantifolia*) por el método propuesto (CCF-UV).

MUESTRA ⁹	TIEMPO (horas)	CARACTERÍSTICAS	CONCENTRACIÓN g ^{P-CIMENO} /100mL ¹⁰
Tubo 1	0	Líquido fluido, incoloro con olor fuerte a limón, ligeramente soluble en hexano	49.53
Tubo 2	24	Líquido fluido, incoloro con olor fuerte a limón, ligeramente soluble en hexano	32.24
Tubo 3	48	Líquido fluido, incoloro con olor fuerte a limón, ligeramente soluble en hexano	14.96
Tubo 4	72	Líquido menos fluido que la muestra anterior, amarillento con olor parecido a limón, poco soluble en hexano	14.37
Tubo 5	96	Líquido viscoso, amarillento con olor parecido a limón, poco soluble en hexano	12.04
Tubo 6	168	Líquido viscoso, amarillento con olor leve a limón, poco soluble en hexano	9.70
Tubo 7	192	Líquido viscoso, amarillo con olor muy leve a limón, poco soluble en hexano	4.40

⁹ La muestra corresponde a un aceite esencial de limón destilado de la empresa George Uhe Co, Inc., cuyo representante para Guatemala es la empresa APAESA.

¹⁰ Ver el reporte obtenido con el espectrofotómetro ultravioleta visible CARY50 en el anexo 9.

Tabla-12: Cuantificación de γ -Terpineno por el método de referencia (GC).

MUESTRA	TIEMPO	CONCENTRACIÓN $\text{g}_{\gamma\text{-TERPINENO}}/\text{100mL}$ ¹¹
Tubo 1	0	29.25
Tubo 2	7	25.65
Tubo 3	32	23.83
Tubo 4	48	23.09
Tubo 5	72	21.94

Tabla 13: Valores para la determinación del orden de reacción.

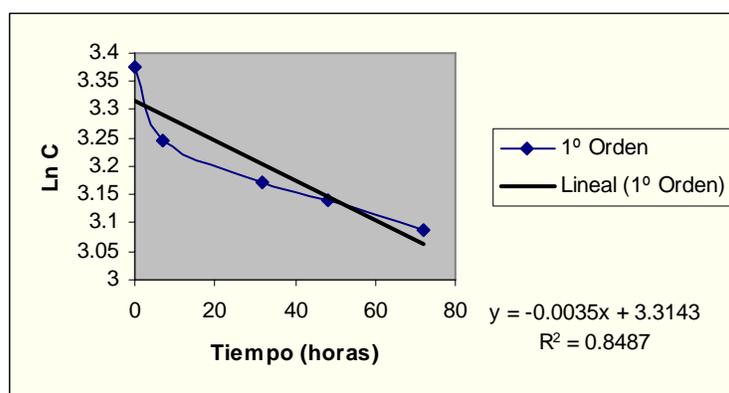
TIEMPO	CONCENTRACIÓN (C)	Ln C	1/C
0	29.25	3.37587957	0.0341880
7	25.65	3.24454357	0.0389864
32	23.83	3.17094529	0.0419639
48	23.09	3.13939962	0.0433088
72	21.94	3.08831145	0.0455788

¹¹ Ver el reporte obtenido con el cromatógrafo de gases Hewlett Packard en el anexo 10.

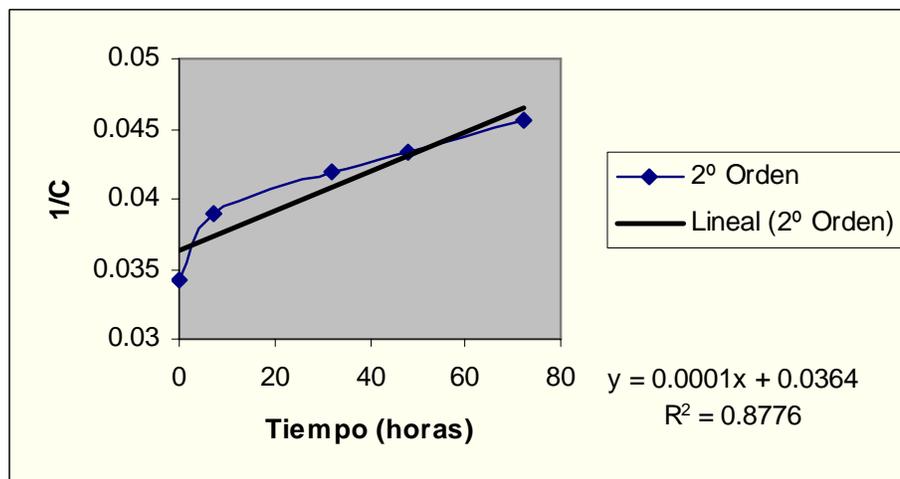
Tabla-14: Valores de las constantes para $n=1$ y $n=2$.

ORDEN	k	INTERCEPTO	r
1	0.00347383	3.31428359	-0.92123149
2	0.0001393	0.0363754	0.93681766

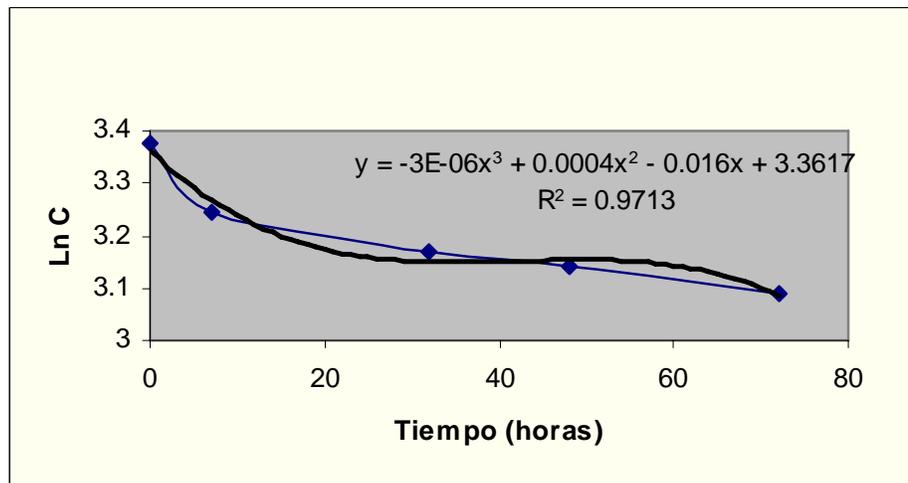
Gráfica-4: Comportamiento cinético de primer orden.



Gráfica-5: Comportamiento cinético de segundo orden.



Gráfica-6: Comportamiento polinomial de la descomposición.



IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Wagner (9) y otros como Kirchner, Miller y Keller (15) listan diferentes fases móviles para separar los compuestos de los aceites esenciales cítricos. Debido a que uno de los objetivos del estudio era aislar el compuesto *p*-cimeno por cromatografía en capa fina, se realizaron ensayos de prueba-error para determinar cuál era la fase móvil más adecuada para este efecto utilizando ambos estándares. El análisis preliminar de las estructuras de los compuestos, permitía esperar que esta separación no fuera fácil. De hecho, se requirió de dos métodos de revelado para poder distinguir en una mezcla la mancha correspondiente al *p*-cimeno y al γ -terpineno. Debido a que este último no cuenta con dobles enlaces conjugados, su absorción en la región ultravioleta no es significativa (ver gráfica 3 de los resultados). De esta forma, con una lámpara de luz ultravioleta de 254nm, era posible identificar el *p*-cimeno y luego por sometimiento de la placa a la presencia de yodo en una cámara, se podía identificar el γ -terpineno. En ningún caso se obtuvo una separación verdadera de ambas sustancias como se puede apreciar en la tabla 9 de los resultados. El revelado con yodo, mostró una sola mancha, correspondiente a la mezcla de compuestos, la cual contenía la mancha identificada como *p*-cimeno con luz UV. Con la imposibilidad de poder separar ambas sustancias por un método de cromatografía sencillo, se optó por trabajar con la mezcla, tomando en cuenta que el γ -terpineno no absorbe significativamente en la región ultravioleta y por lo tanto no interfiere en la cuantificación posterior del *p*-cimeno. Sin embargo, se tomó como referencia la mancha obtenida con la detección por exposición a luz ultravioleta 254nm, ya que de esa forma se identificó de mejor manera el *p*-cimeno y se evitó problemas de traslape con otras manchas, sobre todo en las muestras de aceite esencial. Aunque de acuerdo a la tabla 3 de los resultados, la mezcla más adecuada para separar los compuestos es la de hexano-pentano (1:1), esta fase móvil no presentaba resultados favorables con el aceite esencial de limón. Otros de los compuestos presentes en el aceite esencial se

traslapaban con el *p*-cimeno disminuyendo la resolución de la cromatografía. Por esta razón la fase móvil elegida fue la mezcla hexano-acetato de etilo (7:3), la cual mostró una mejor resolución en la separación de los compuestos al ser revelados con luz ultravioleta. La gráfica 2 de los resultados muestra el cromatograma de la mancha aislada con esta fase móvil y es evidente que se compone únicamente de los dos compuestos mencionados.

Se oxidaron muestras de aceite esencial de limón (*Citrus aurantifolia*) y de estándar de γ -terpineno para cuantificar el producto de oxidación *p*-cimeno utilizando cromatografía de gases en ambas, y el método propuesto de cromatografía en capa fina y espectroscopía ultravioleta solamente con la muestra del estándar. Se monitoreó la temperatura dentro de la cámara para la oxidación acelerada, la cual se mantuvo entre 24°C y 27°C para evitar que otros factores interfirieran en el desarrollo de la reacción. En algunos tubos, sobre todo los que estuvieron mayor tiempo expuestos a la radiación, se pudo observar una pequeña cantidad de agua en el fondo del tubo, verificando así parte del mecanismo de reacción propuesto por Lösing (8). Estas observaciones permiten a la vez detectar algunos factores que se deben tomar en cuenta con respecto al manejo de las muestras de aceite esencial: la cámara de aire que se deja dentro del envase debe ser la mínima, el envase debe estar debidamente sellado para evitar que se introduzca aire dentro del recipiente y por último es preferible que la muestra no se agite para evitar que el aire que aún permanece dentro del recipiente esté en mayor contacto con el aceite.

Debido a que se deseaba implementar un método alternativo para el análisis de calidad del aceite esencial de limón (*Citrus aurantifolia*), era necesario compararlo con el método estándar que se utiliza actualmente, la cromatografía de gases. Para este efecto, se analizaron muestras de estándar de γ -terpineno oxidado por ambos métodos, con el fin de determinar la diferencia entre las concentraciones obtenidas. Debido a que el análisis por cromatografía de gases tiene un costo elevado, solamente una serie de muestras del estándar fue analizada por este

método. Esto no permitió que se pudiera realizar un análisis de colinealidad y correlación de concordancia como se había propuesto en primera instancia. La evaluación del método constó entonces únicamente de la determinación de la cantidad mínima detectable y cuantificable, la reproducibilidad, la repetibilidad y la realización de un perfil de precisión. De acuerdo a la tabla 4 de los resultados, los valores de los límites de detección y de cuantificación son 0.23345 y 0.44931ppm, respectivamente. Cabe notar que estos resultados están ligados al método de espectroscopía ultravioleta y no dependen de la cromatografía en capa fina.

Para el análisis de reproducibilidad, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA), debido a que durante la oxidación del estándar se esperaba que aumentara la concentración de *p*-Cimeno, la respuesta con respecto el tiempo debía cambiar, no así la respuesta entre ensayos. El análisis mostró que el método es reproducible en el rango de concentraciones analizadas ya que el valor “p” entre ensayos (igual a 0.0778) es inferior al valor crítico (igual a 0.05) por lo que se concluye que no existe diferencia entre éstos.

El análisis de repetibilidad del método muestra que entre ensayos, el valor de la desviación estándar es aceptable como lo indica la tabla 6 de los resultados. En cambio, el coeficiente de variación, cuyo valor es igual a 5.21 %, está por encima del valor 3.5% aceptado (16). Esta diferencia pudo deberse a errores indeterminados y al raspado del compuesto en la cromatopla. Además, es posible que una pequeña proporción del compuesto permaneciera adsorbida en la fase estacionaria cuando éste se recuperó en hexano, lo cual pudo acarrear fuentes de error (17).

Finalmente, a partir del perfil de precisión (tabla 8 y gráfica 1 de los resultados), se observa que el método es preciso a medida que incrementa la concentración de *p*-cimeno pues presentan valores de coeficientes de variación más bajos.

La comparación entre ambos métodos reveló que las hipótesis:

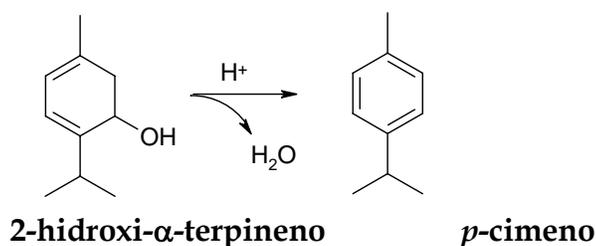
$$H_0: b=1 \quad \text{y} \quad H_0: a = 0$$

no se rechazan (valores "p"), aunque los valores a simple vista, son diferentes (tabla-5 de los resultados).

El aceite esencial de limón producido en Guatemala es obtenido por medio de la destilación de la cáscara del fruto con vapor de agua. Con este método, se obtiene siempre un aceite el cual contiene ya una pequeña cantidad de *p*-cimeno (ver Anexo 3). La tabla 11 muestra las concentraciones de *p*-cimeno obtenidas en aceite esencial de limón por el método propuesto. Se observa que a mayor exposición a la radiación del aceite, menor es la cantidad cuantificada. Debido a que con el estándar se verificó la formación de *p*-cimeno a partir de γ -terpineno, fue posible determinar entonces que el *p*-cimeno se consume formando otro producto de oxidación. La misma tabla indica que a partir de la muestra 3, parte del aceite esencial (y ya en las últimas muestras, la mayor parte) no es soluble en hexano. Los terpenos pueden formar polímeros por medio de mecanismos de oxidación radicalares como el que se llevó a cabo en este experimento. Cuando hay presencia de más de un sustrato para la polimerización, se forman co-polímeros cuya estructura puede variar según la cantidad de cada uno de los sustratos y el número de éstos (18). En el aceite esencial de limón, los compuestos más susceptibles de ser polimerizados son el limoneno, el β -pineno, el canfeno, el mirceno y el 1,8-cineol, debido a que éstos tienen dobles enlaces terminales, fácilmente polimerizables (18). Es posible que durante la oxidación de los terpenos del aceite esencial, estos formen un polímero que consuma el *p*-cimeno y se obtengan entonces concentraciones decrecientes de éste en el aceite. Esto no indica de ninguna forma que el método propuesto no funcione para cuantificar el *p*-cimeno. Solamente indica que en muestras de aceite esencial con concentraciones menores a 25.65% (p/v) de γ -terpineno, la cantidad de *p*-cimeno contenido no puede ser utilizada como parámetro para determinar la calidad del mismo. Debido a que no se cuentan con muestras entre los tiempos 0 y 24 horas, no se conoce con exactitud, el desarrollo de la reacción durante ese período de tiempo. Sin embargo es de

esperarse que en muestras de reciente extracción, los efectos de la luz sean mínimos por lo que éste tendría un comportamiento similar al estándar de γ -terpineno. En el caso de la muestra de aceite esencial analizada, el valor umbral de 1.5% de *p*-cimeno presente se excede en sobremanera (49.53%) por lo que éste no es apto para fines de consumo (8).

Fue necesario entonces, emplear el decaimiento de la concentración de γ -terpineno en el aceite esencial, como parámetro para realizar el estudio cinético preliminar de la formación de *p*-cimeno a partir de éste. Con el método de integración, se calculó la constante de velocidad para ordenes de reacción $n=1$ y $n=2$. Además, se evaluó el grado del polinomio obtenido al graficar $\ln C$ contra el tiempo para corroborar el orden de reacción (19). El análisis de las gráficas y los coeficientes de correlación obtenidos para ambos órdenes de reacción indican que la formación de *p*-cimeno es de orden 2 y la constante de velocidad tiene un valor de $1.39 \cdot 10^{-4}$ dL/g.h (Tabla 12). Asimismo, del mecanismo propuesto por Lösing (8), se deduce que el paso lento de la reacción podría ser la protonación del 2-hidroxi- α -terpineno, la cual provoca la deshidratación del mismo y consecuentemente la formación del *p*-cimeno:



Este hecho podría comprobarse verificando el efecto del pH en la velocidad de la reacción: si hay variación, el paso lento de la reacción está dado por la protonación (20).

X. CONCLUSIONES

- A. Es posible cuantificar el compuesto *p*-cimeno contenido en muestras de aceite esencial de limón (*Citrus aurantifolia*) por el método de cromatografía en capa fina y espectroscopía ultravioleta.
- B. El método propuesto es útil para aceites esenciales de reciente extracción o que no hayan sido expuestos a los efectos de la luz y del aire.
- C. El sistema cromatográfico más apropiado para el método propuesto fue: placas de sílica gel G como fase estacionaria y hexano-acetato de etilo (7:3) como fase móvil.
- D. Con el sistema cromatográfico propuesto, es posible cuantificar el *p*-cimeno, a pesar que el γ -terpineno tiene un valor de Rf similar.
- E. Se determinó que la reacción de formación del *p*-cimeno es de orden 2 y tiene una constante de velocidad igual a $1.39 \cdot 10^{-4} \text{dL/g.h}$.
- F. La comparación estadística entre el método propuesto (CCF-UV) y el de referencia (GC) indicó que éstos son equivalentes pero esto no se puede generalizar debido al reducido número de muestras.
- G. La evaluación estadística del método indicó que éste es reproducible.
- H. La repetibilidad del mismo se ve afectada por errores aleatorios en la extracción de la muestra de la fase estacionaria sobre la que se cromatografía

- I. Los límites de detección y de cuantificación del método propuesto son 0.23345 y 0.44931ppm, respectivamente.

- J. La inversión para el análisis de muestras por el método propuesto (CCF-UV) fue menor a la requerida por el método de referencia (GC).

XI. RECOMENDACIONES

- A. Se puede realizar una cromatografía bidimensional para intentar separar los compuestos γ -terpineno y *p*-cimeno.
- B. El envejecimiento del aceite esencial de limón (*Citrus aurantifolia*) debe realizarse en envases abiertos ya que el proceso de oxidación consume el oxígeno presente en el medio.
- C. El aceite esencial de limón (*Citrus aurantifolia*) debe mantenerse en envase sellado protegido de la luz y del calor.
- D. Determinar la estructura del producto de la oxidación del aceite esencial de limón con radiación ultravioleta.
- E. Comprobar que la protonación del 2-hidroxi- α -terpineno es la etapa lenta de la reacción, evaluando el efecto del pH en la velocidad de reacción.
- F. Determinar el rango de concentraciones en las cuales el método es más preciso.
- G. Evaluar el deterioro del aceite esencial de limón (*Citrus aurantifolia*) bajo condiciones normales de almacenaje.
- H. Evaluar la aplicabilidad del método a otros aceites esenciales que contengan el compuesto γ -terpineno.

XII. REFERENCIAS

1. Guenther, E. "The essential Oils". Volume I. D. Von Nostrand Company, Inc. U.S.A., 1948. Pt: XVI + 427.
2. Bower, K. Et al. "Common Fragrance and Flavor Materials". Third Edition. Wiley-VCH. U.S.A., 1997. Pt: XII + 278.
3. Swaine, R.L. Et al. "Citrus Oils: Processing, Technology and applications" Perfumer and Flavorist. 1993. No. 6. 13: 3-11.
4. Guenther, E. "The essential Oils"; U.S.A. D. Von Nostrand Company, Inc. Volume III. U.S.A., 1950. Pt: XVI + 777.
5. Esoteric Oils (Pty) Ltd. "Oil Properties"; consultado el 19 noviembre 2002
Disponibile http://www.essentialoils.co.zaa/essential_oils/lime.htm
6. Arteche, A. Et al. "Fitoterapia, Vademecum de Prescripción" Tercera Edición. Masson, S.A. España, 1999. Pt: 1119.
7. International Standard "Oil of Lime [Citrus aurantifolia (Christm.) Swingle], obtained by distillation" Second Edition. 1997. Pt: 5 ISO 3519:1997 (E).
8. Lösing, G. Et al. "Investigación del envejecimiento de aceites cítricos con ayuda de la espectroscopía IR" Seguridad de producto Aromas, DRAGOCO. Alemania, 1998. 181-187

9. Wagner, H. Blatt, S. "Plant Drug Analysis: A thin Layer Chromatography Atlas" Second edition. SPRINGER. Alemania, 1996. Pt: XV + 384.
10. Lifshitz, A. Stepak, Y. Basker, H. (1969). "Characterization of Israel Lemon oil and Detection of its adulteration" Journal of Food Science. No.3, 34:254-257.
11. Ojeda , G. Et al. "Composition of Venezuelan Lemon essential oil *Citrus limon* (L) Burm. f." 1998. Consultado el 21 noviembre 2002.
Disponible http://www.redpav-fpolar.info.ve/fagroluz/v15_4/v154z005.html
12. Levi, L. Laughton, P. "Determination of Citral in Lemongrass and Citrus oils by condensation with barbituric acid" Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1959. No. 12, 7: 850 – 859.
13. de Geus, HJ. de Boer, UA. Brinkman, Th. "Multidimensionality in gas chromatography". Trends Anal. Chem. 1996. 15: 398-408.
14. Harvey, D. "Química Analítica Moderna" McGraw-Hill. España, 2002. Pt: XVI + 571.
15. Kirchner, J. Miller, J. Keller, G. "Separation and Identification of some Terpenes by a New Chromatographic Technique" Milestones in Analytical Chemistry ACS. 1994. 92-98.
16. Miller, JC. Miller, JN. "Estadística para Química Analítica" Segunda Edición. Addison-Wesley Iberoamericana. E.U.A., 1993. Pt: XII + 211.
17. Skoog, D. Principles Instrumental Análisis. Third Edition. Saunders Collage Publishing. U.S.A., 1985. Pt: VII + 879.

18. Hendrickson, J. et al. "Organic Chemistry" Third Edition. U.S.A. McGraw-Hill Book Company. U.S.A., 1970. Pt: XV+ 1279.
19. Silvestri, MG. Dills, C. "A Kinetic Study of the Diels-Alder Reaction". Journal of Chemical Education. 1989. 66: 690-691.
20. Wiberg, KB. "Physical Organic Chemistry" WILEY. U.S.A., 1963. Pt: XVI + 1077.
21. "Lemon Oil [CASRN 8008-56-8] Lime Oil [CASRN 8008-26-2]" 2000.
Consultado el 19 noviembre 2002
Disponible http://ntp-server.nih.gov/htdocs/chem_background

XIII. ANEXOS

ANEXO-1: Cantidad de Aceite esencial de limón (*Citrus aurantifolia*) utilizado en diferentes productos [20]

PRODUCTO	ACEITE PENSADO EN FRÍO		ACEITE DESTILADO	
	USUAL (%P/P)	MÁXIMO (%P/P)	USUAL (%P/P)	MÁXIMO (%P/P)
Jabones	0.05	0.25	0.05	0.25
Detergentes	0.005	0.025	0.005	0.025
Cremas/ Lotions	0.03	0.1	0.03	0.1
Perfumes	0.5	1.5	0.4	1.5

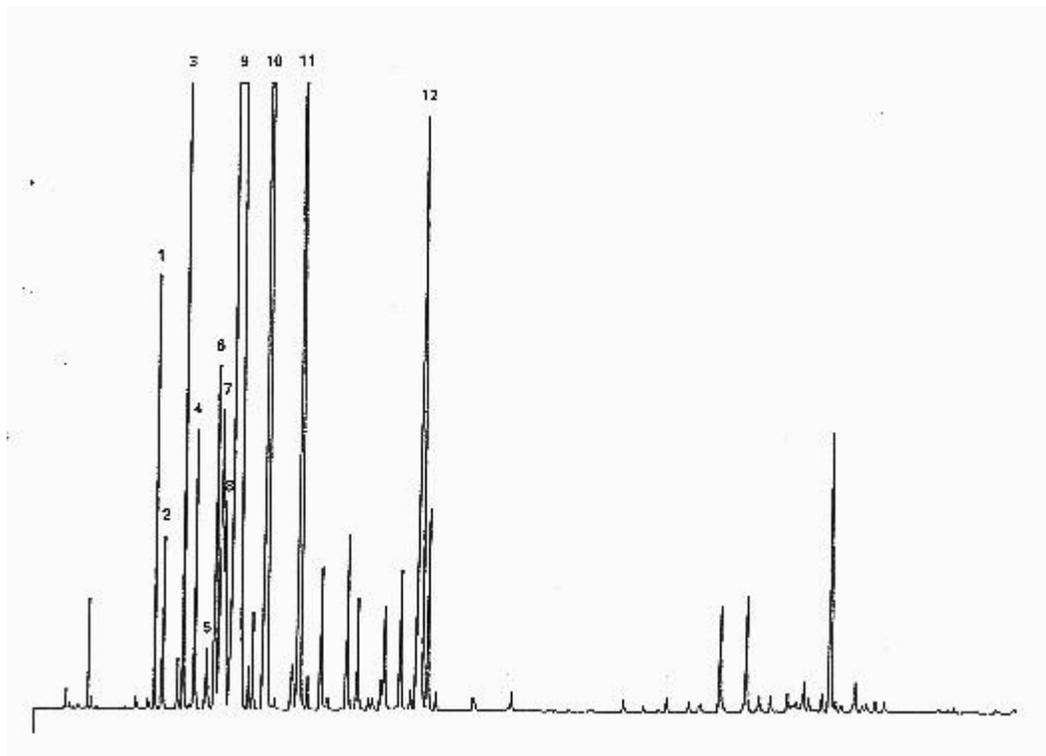
ANEXO-2: Propiedades físicas requeridas para el aceite esencial de limón [*Citrus aurantifolia* Chrism.) Swingle], obtenido por destilación [7].

APARIENCIA	COLOR	OLOR	FLASHPOINT	VALOR CARBONÍLICO
Líquido fluido, claro	De incoloro a amarillo pálido.	Característico del aceite pero distinto de la fruta fresca.	El valor medio es +56°C.	Máximo: 5.5, correspondiente a 1.5%p/p de compuestos carbonílicos, expresados como citral.

	DENSIDAD RELATIVA (20°C)	ÍNDICE DE REFRACCIÓN (20°C)	ROTACIÓN ÓPTICA (20°C)	RESIDUO DE EVAPORACIÓN (20°C)
MÁXIMO	0.856	1.474 0	+ 34°	2.5% p/p
MÍNIMO	0.865	1.478 0	+ 45°	---

ANEXO-3: Cromatogramas típicos del aceite esencial
de limón (*Citrus aurantifolia*) obtenido por destilación [7]

Figura 3.a: Cromatograma tomado en una columna apolar



Identificación de picos

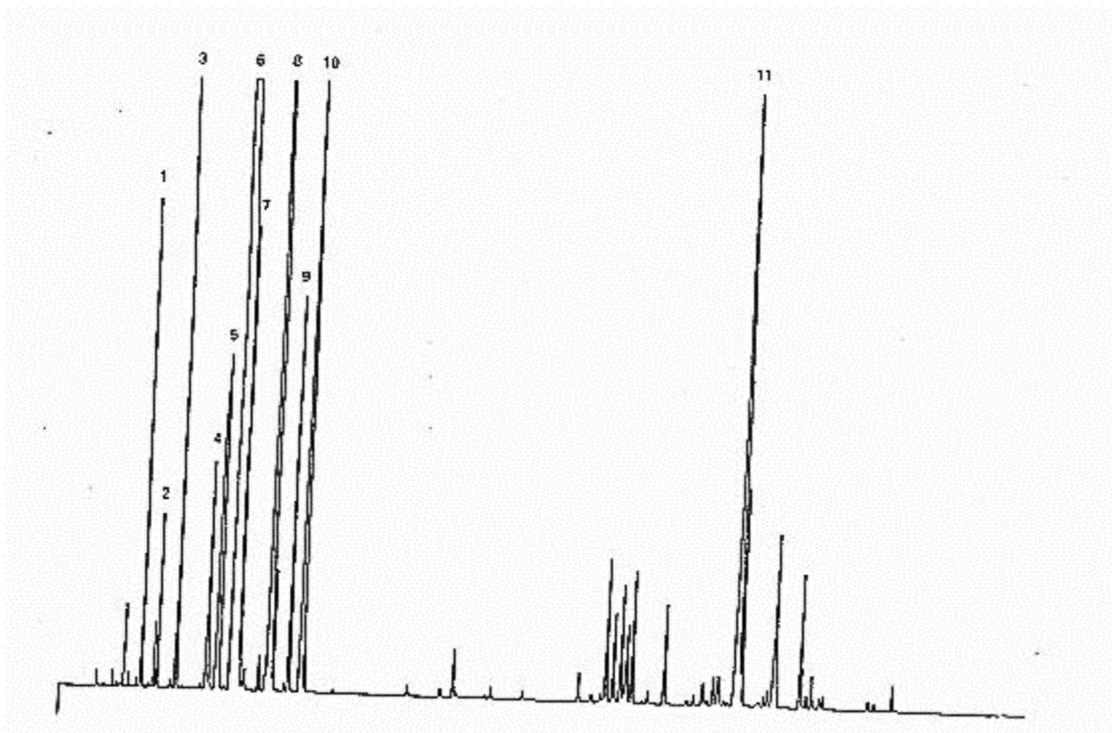
α -Pineno
 Canfeno + α -Fencheno
 β -Pineno
 Mirceno
 α -Felandreno
 1,4-Cineol
 α -Terpineno
 p -Cimeno
 Limoneno + 1,8-Cineol
 γ -Terpineno
 Terpinoleno
 α -Terpineol

Condiciones de operación

Columna :capilarfundido de sílica; 50 metros de largo, 0.32mm de diámetro
 Fase estacionaria: polidimetilsiloxano (OV 101)
 Grosor de película: aprox. 0.2 μ m
 Temperatura de horno: 65°C durante 5 min; luego de 65°C a 115°C a una velocidad de 2°C/min; luego de 115°C a 200°C a una velocidad de 2°C
 Temperatura del inyector: 230°C
 Temperatura del detector: 250°C
 Detector: ionización de llama
 Gas portador: Hidrógeno
 Flujo: 60mL/min
 Volumen inyectado: aprox. 0.2 μ L
 Velocidad lineal del gas portador: 0.48m/s

ANEXO-3: Cromatogramas típicos del aceite esencial de limón
(*Citrus aurantifolia*) obtenido por destilación [7] (Continuación)

Figura 3.b: Cromatograma tomado en una columna polar



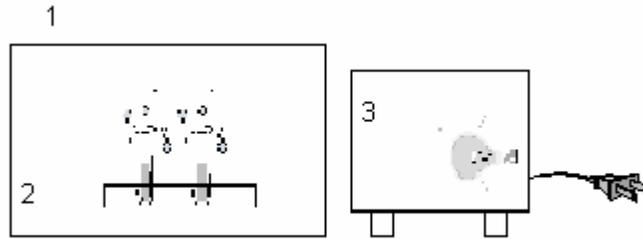
Identificación de picos

α -Pinoeno
 Canfeno
 β -Pinoeno
 Mirceno + α -Felandreno
 α -Terpineno + 1,4-Cineol
 Limoneno
 1,8-Cineol
 γ -Terpineno
 p -Cimeno
 Terpinoleno
 α -Terpineol

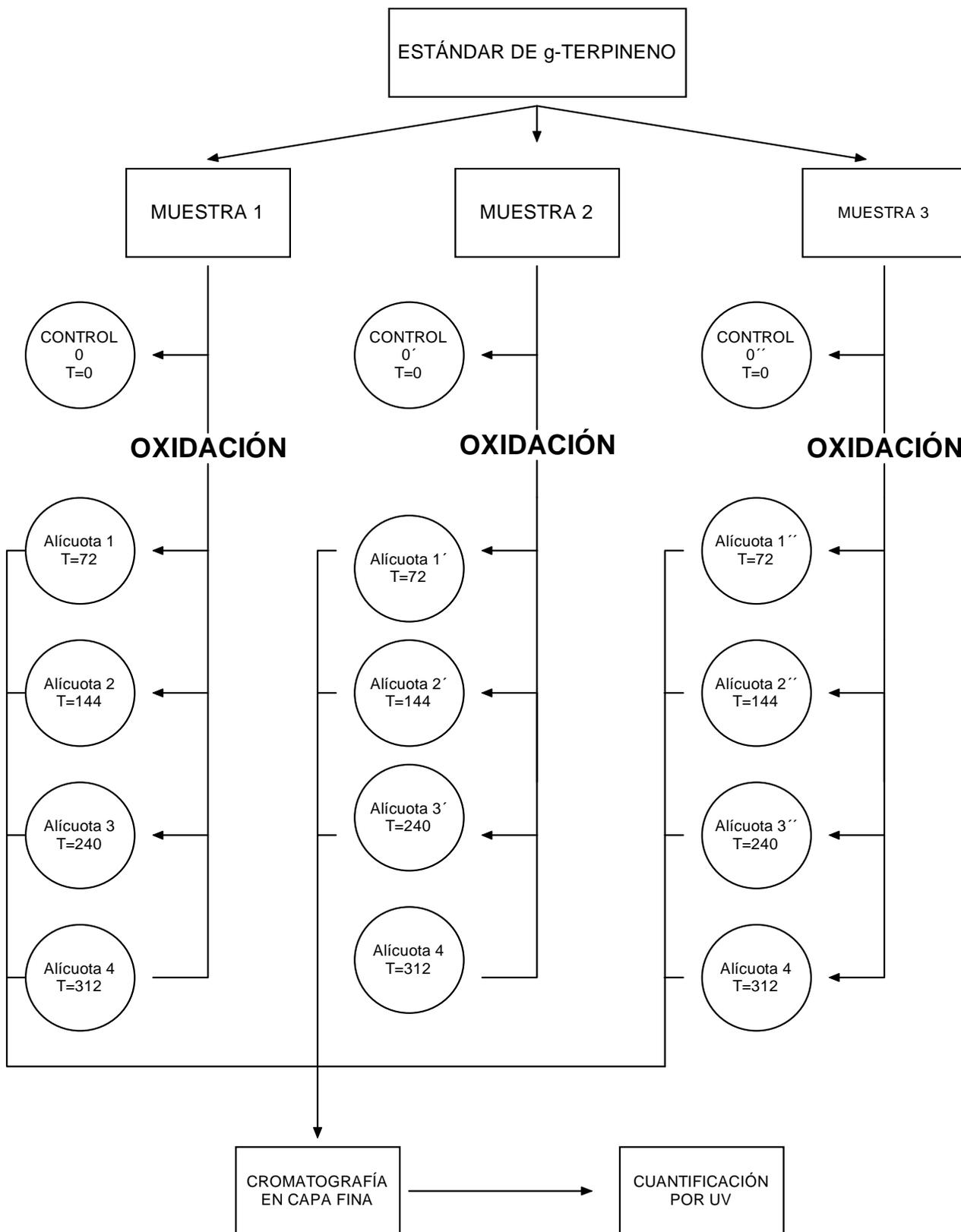
Condiciones de operación

Columna :capilarfundido de sílica; 50 metros de largo, 0.22mm de diámetro
 Fase estacionaria: polietilenglicol (Carbowax 20M)
 Grosor de película: aprox. 0.2 μ m
 Temperatura de horno: 65°C durante 5 min; luego de 65°C a 155°C a una velocidad de 2°C/min; luego de 155°C a 200°C a una velocidad de 3°C/min
 Temperatura del inyector: 230°C
 Temperatura del detector: 250°C
 Detector: ionización de llama
 Gas portador: Hidrógeno
 Flujo: 60mL/min
 Volumen inyectado: aprox. 0.2 μ L
 Velocidad lineal del gas portador: 0.38m/s

ANEXO-4: Dispositivo para el envejecimiento acelerado
del aceite esencial de limón [8]



- 1: *Cámara de oxidación*
- 2: *Tubos de ensayo con muestra*
- 3: *Fuente de luz ultravioleta*

ANEXO 5: Diagrama de la oxidación del estándar de γ -terpineno.

ANEXO-6: Informe de reproducibilidad del método, departamento
de Biometría y Estadística

TIEMPO	ENSAYO	RESPUESTA
1	1	1.18
1	2	0.36
1	3	1.38
2	1	4.51
2	2	2.31
2	3	3.8
3	1	6.42
3	2	5.53
3	3	4.96
4	1	21.54
4	2	20.72
4	3	22.7
5	1	25.07
5	2	24.71
5	3	24.96

. anova respuest tiempo ensayo

Number of obs = 15 R-squared = 0.9978
Root MSE = .641597 Adj R-squared = 0.9961

Source	Partial SS	df	MS	F	Prob > F
Model	1477.25072	6	246.208453	598.11	0.0000
tiempo	1474.30782	4	368.576956	895.37	0.0000
ensayo	2.94289572	2	1.47144786	3.57	0.0778
Residual	3.29317434	8	.411646793		
Total	1480.54389	14	105.753135		

Existe diferencia entre tiempos
No existe diferencia entre ensayos
El método es reproducible

ANEXO 7: Reportes de los análisis de envejecimiento del estándar de γ -terpineno por espectroscopia ultravioleta.

ENSAYO 1

Calibration

Collection time 10/03/04 10:29:03 a.m.

Standard	Concentration mg/L	F	Mean	SD	%RSD	Readings
Std 1	0.00		0.0007	0.0008	>100	0.0016
						0.0002
						0.0004
Std 2	0.96		0.0084	0.0001	0.83	0.0084
						0.0084
						0.0085
Std 3	24.00		0.0747	0.0001	0.18	0.0746
						0.0748
						0.0747
Std 4	48.00		0.1569	0.0002	0.14	0.1571
						0.1567
						0.1569
Std 5	96.00		0.2966	0.0002	0.08	0.2968
						0.2965
						0.2964
Std 6	192.00		0.5739	0.0002	0.04	0.5739
						0.5737
						0.5741

Calibration eqn Abs = 0.00298*Conc +0.00604
 Correlation Coefficient 0.99944
 Calibration time 10/03/04 10:35:06 a.m.

Results Flags Legend

U = Uncalibrated O = Overage
 N = Not used in calibration R = Repeat reading

Analysis

Collection time 10/03/04 10:38:20 a.m.

Sample	FD	Concentration mg/L	F	Mean	SD	%RSD	Readings
Tubo 1	2500	1.18e4		0.0201	0.0001	0.29	0.0201
							0.0202
							0.0201
Tubo 2	2500	4.51e4		0.0598	0.0002	0.28	0.0599
							0.0596
							0.0598
Tubo 3	2500	6.27e4		0.0808	0.0003	0.39	0.0812
							0.0807
							0.0806
Tubo 4	2500	2.15e5		0.3389	0.0005	0.15	0.3394
							0.3385
							0.3387
Tubo 5	2500	2.51e5	R	0.3049	0.0001	0.05	0.3050
							0.3050
							0.3048

ENSAYO 2**Calibration**

Collection time 11/03/04 11:49:35 a.m.

Standard	Concentration mg/L	F	Mean	SD	%RSD	Readings
Std 1	0.00		0.0002	0.0001	50.6	0.0001
						0.0003
						0.0003
Std 2	0.96		0.0155	0.0001	0.62	0.0155
						0.0155
						0.0156
Std 3	24.00		0.0768	0.0002	0.30	0.0768
						0.0765
						0.0770
Std 4	48.00		0.1614	0.0001	0.04	0.1615
						0.1614
						0.1614
Std 5	96.00		0.3013	0.0003	0.09	0.3012
						0.3011
						0.3016
Std 6	192.00		0.5797	0.0004	0.07	0.5795
						0.5801
						0.5794

Calibration eqn Abs = 0.00299*Conc +0.00910
 Correlation Coefficient 0.99908
 Calibration time 11/03/04 11:53:37 a.m.

Results Flags Legend

U = Uncalibrated O = Overage
 N = Not used in calibration R = Repeat reading

Analysis

Collection time 11/03/04 11:54:31 a.m.

Sample	DF	Concentration mg/L	F	Mean	SD	%RSD	Readings
Tubo 1	2500	3.60e3		0.0134	0.0002	1.51	0.0136
							0.0132
							0.0135
Tubo 2	2500	2.31e4		0.0367	0.0001	0.36	0.0368
							0.0368
							0.0366
Tubo 3	2500	5.53e4		0.0753	0.0002	0.28	0.0755
							0.0751
							0.0754
Tubo 4	2500	2.07e5		0.2572	0.0002	0.10	0.2573
							0.2573
							0.2569
Tubo 5	2500	2.47e5	R	0.3050	0.0003	0.10	0.3050
							0.3047
							0.3053

ENSAYO 3**Calibration**

Collection time 11/03/04 11:49:35 a.m.

Standard	Concentration mg/L	F	Mean	SD	%RSD	Readings
Std 1	0.00		0.0002	0.0001	50.6	0.0001
						0.0003
						0.0003
Std 2	0.96		0.0155	0.0001	0.62	0.0155
						0.0155
						0.0156
Std 3	24.00		0.0768	0.0002	0.30	0.0768
						0.0765
						0.0770
Std 4	48.00		0.1614	0.0001	0.04	0.1615
						0.1614
						0.1614
Std 5	96.00		0.3013	0.0003	0.09	0.3012
						0.3011
						0.3016
Std 6	192.00		0.5797	0.0004	0.07	0.5795
						0.5801
						0.5794

Calibration eqn Abs = 0.00299*Conc +0.00910
 Correlation Coefficient 0.99908
 Calibration time 11/03/04 11:53:37 a.m.

Results Flags Legend

U = Uncalibrated O = Overage
 N = Not used in calibration R = Repeat reading

Analysis

Collection time 11/03/04 03:29:37 p.m.

Sample	DF	Concentration mg/L	F	Mean	SD	%RSD	Readings
Tubo 1	2500	1.38e4	R	0.0257	0.0002	0.84	0.0259
							0.0255
							0.0256
Tubo 2	2500	3.80e4	R	0.0546	0.0002	0.39	0.0543
							0.0547
							0.0547
Tubo 3	2500	4.96e4	R	0.0685	0.0001	0.21	0.0685
							0.0683
							0.0686
Tubo 4	2500	2.27e5	R	0.2808	0.0007	0.26	0.2805
							0.2817
							0.2803
Tubo 5	2500	2.50e5	R	0.3079	0.0002	0.08	0.3078
							0.3076
							0.3081

ANEXO-8: Reporte de Repetibilidad para la muestra 5 obtenido por espectroscopia ultravioleta

Calibration

Collection time 12/03/04 09:48:08 a.m.

Standard	Concentration mg/L	F	Mean	SD	%RSD	Readings
Std 1	0.00		0.0005	0.0002	33.8	0.0005
						0.0007
						0.0003
Std 2	0.48		0.0074	0.0002	3.00	0.0076
						0.0073
						0.0072
Std 3	23.88		0.0646	0.0002	0.24	0.0644
						0.0647
						0.0646
Std 4	47.76		0.1509	0.0002	0.14	0.1511
						0.1507
						0.1509
Std 5	95.52		0.2879	0.0002	0.07	0.2879
						0.2882
						0.2878
Std 6	191.04		0.5781	0.0004	0.06	0.5783
						0.5784
						0.5777

Calibration eqn Abs = 0.00302*Conc +0.00116
 Correlation Coefficient 0.99946
 Calibration time 12/03/04 09:52:02 a.m.

Results Flags Legend

U = Uncalibrated O = Overage
 N = Not used in calibration R = Repeat reading

Analysis

Collection time 12/03/04 09:57:11 a.m.

Sample	Concentration mg/L	F	Mean	SD	%RSD	Readings
Tubo 5-1	92.55		0.2805	0.0004	0.13	0.2802
						0.2803
						0.2809
Tubo 5-2	87.92		0.2665	0.0004	0.17	0.2664
						0.2661
						0.2670
Tubo 5-3	92.00		0.2788	0.0006	0.21	0.2783
						0.2787
						0.2794
Tubo 5-4	98.84	R	0.3050	0.0003	0.10	0.3050
						0.3047
						0.3053

ANEXO-9: Informe de la comparación de métodos, unidad
de Biometría, Facultad de CCQQ y Farmacia

GC (X)	CCF-UV (Y)	
0.75	0.97	0.5625
4.37	3.54	19.0969
6.63	5.64	43.9569
38.12	21.65	1453.1344
36.52	24.91	1333.7104

CORRELACION

	CCF-UV	GC
CCF-UV	1	
GC	0.99020689	1

Resumen

<i>Estadísticas</i>	
Coefficiente de correlación	0.99020689
Error típico	1.78659343
Observaciones	5

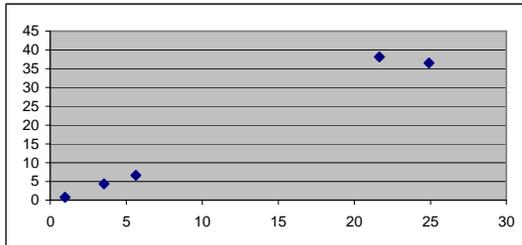
<i>Coefficientes</i>	
Intercepción (a)	1.05056282
Pendiente (b)	0.59563822

ECUACION:

$$Y = 1.05056282 + 0.59563822X$$

Pruebas de Hipótesis

- | | |
|------------|---|
| 1. Ho: b=1 | t=-0.0062
p=0.9954
Ho no se rechaza |
| 2. Ho: a=0 | t=0.9075
p=0.4310
Ho no se rechaza |



La pendiente y el intercepto no difieren significativamente de los valores esperados, sin embargo el reducido número de réplicas (5) puede que no sea adecuado para generalizar este hallazgo.

ANEXO-10: Análisis de las muestras de estándar de γ -terpineno por el método de cromatografía de gases

Figura a: Curva de calibración para la cuantificación de p-cimeno
En las muestras de γ -terpineno oxidado

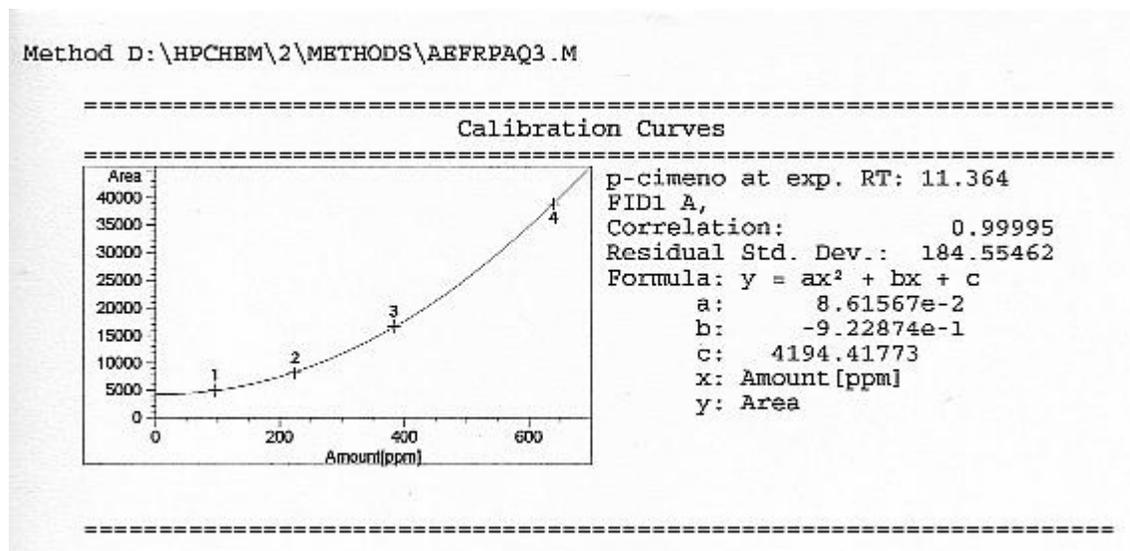


Figura b: Cromatograma de la muestra 1 de γ -terpineno

Data File D:\HPCHEM\2\DATA\USAC\SIG10552.D

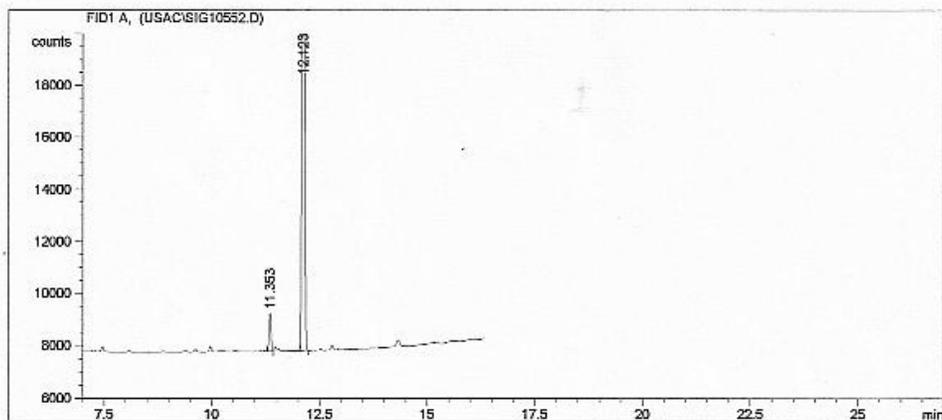
Sample Name: Tubo 1

```

=====
Injection Date : 20/2/04 9.40.59
Sample Name    : Tubo 1
Acq. Operator  : USAC-Claudia
Vial           : 1
Inj Volume    : Manually
Acq. Method   : D:\HPCHEM\2\METHODS\AEFRPAQ3.M
Last changed  : 20/2/04 7.47.50 by USAC-Claudia
                (modified after loading)
Analysis Method : D:\HPCHEM\2\METHODS\AEFRPAQ3.M
Last changed  : 20/2/04 10.47.13 by USAC-Claudia
                (modified after loading)
ANALISIS DE ACEITES ESENCIALES O FRAGANCIAS
POR CROMATOGRAFIA DE GASES
P. de Analisis Quimico, U. del Valle de Guatemala

Mestra pura, <0.5µl, H2 13psi, Aire 35psi, N2 40psi
Columna SPB-5 30m x 0.53mm di, 0.5µm film
Nitrogeno con split, acarreador inic col 2psi
Inyector 250C, Detector FID 300C
Horno 60C 5min, 10C/min hasta 255C, 5min
Sistema cromatografico HP 5890II / ChemStation

```



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Friday 20 20e February 20e 2004 10.46.15
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000

```

Instrument 2 20/2/04 10.47.13 USAC-Claudia

Page 1 of 2

Data File D:\HPCHEM\2\DATA\USAC\SIG10552.D

Sample Name: Tubo 1

```

Signal 1: FID1 A,
Uncalibrated peaks RF : 0.00000

```

RetTime [min]	Type	Area counts*s	Amt/Area	Amount [ppm]	Grp	Name
11.353	BV	4615.00000	1.63444e-2	7542.91979		p-cimeno
12.123	BB	2.85177e5	0.00000	0.00000		?

```
Totals : 7542.91979
```

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Data File D:\HPCHEM\2\DATA\USAC\SIG10553.D

Sample Name: Tubo 2

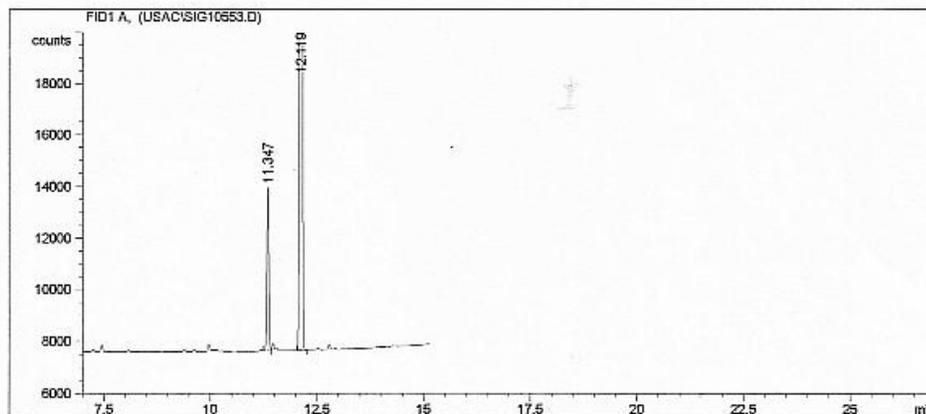
```

=====
Injection Date   : 20/2/04 10.01.04
Sample Name     : Tubo 2
Acq. Operator   : USAC-Claudia
Vial           : 1
Inj Volume     : Manually

Acq. Method     : D:\HPCHEM\2\METHODS\AEFRPAQ3.M
Last changed    : 20/2/04 7.47.50 by USAC-Claudia
                  (modified after loading)
Analysis Method : D:\HPCHEM\2\METHODS\AEFRPAQ3.M
Last changed    : 20/2/04 10.55.40 by USAC-Claudia
                  (modified after loading)
ANALISIS DE ACEITES ESENCIALES O FRAGANCIAS
POR CROMATOGRAFIA DE GASES
P. de Analisis Quimico, U. del Valle de Guatemala

Mestra pura, <0.5µl, H2 13psi, Aire 35psi, N2 40psi
Columna SPB-5 30m x 0.53mm di, 0.5µm film
Nitrogeno con split, acarreador inic col 2psi
Inyector 250C, Detector FID 300C
Horno 60C 5min, 10C/min hasta 255C, 5min
Sistema cromatografico HP 5890II / ChemStation

```



```

=====
External Standard Report
=====

```

```

Sorted By       : Signal
Calib. Data Modified : Friday 20 20e February 20e 2004 10.46.15
Multiplier      : 1.0000
Dilution       : 100.0000

```

Instrument 2 20/2/04 10.55.40 USAC-Claudia

Page 1 of 2

Data File D:\HPCHEM\2\DATA\USAC\SIG10553.D

Sample Name: Tubo 2

```

Signal 1: FID1 A,
Uncalibrated peaks RF : 0.00000

```

RetTime [min]	Type	Area counts*s	Amt/Area	Amount [ppm]	Grp	Name
11.347	VV	2.02353e4	2.15899e-2	4.36879e4		p-cimeno
12.119	BP	2.92478e5	0.00000	0.00000		?

```
Totals : 4.36879e4
```

```
Results obtained with enhanced integrator!
```

```
*** End of Report ***
```

Figura d: Cromatograma de la muestra 3 de γ -terpineno

Data File D:\HPCHEM\2\DATA\USAC\SIG10554.D

Sample Name: Tubo 3

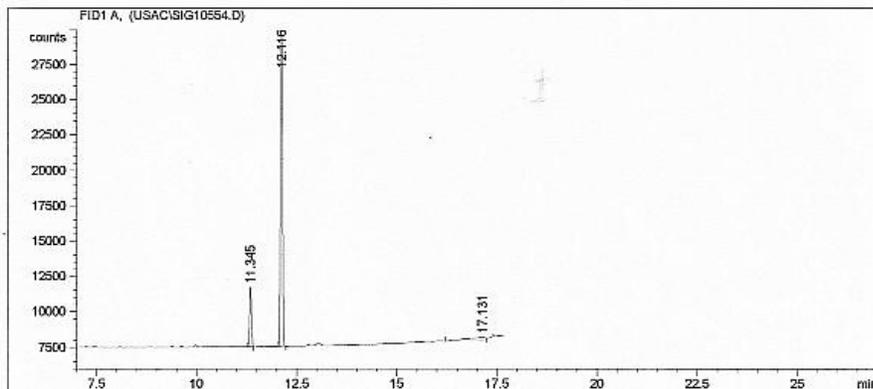
```

=====
Injection Date : 20/2/04 10.19.48
Sample Name    : Tubo 3
Acq. Operator  : USAC-Claudia
Vial           : 1
Inj Volume    : Manually

Acq. Method    : D:\HPCHEM\2\METHODS\AEFRPAQ3.M
Last changed   : 20/2/04 7.47.50 by USAC-Claudia
                (modified after loading)
Analysis Method : D:\HPCHEM\2\METHODS\AEFRPAQ3.M
Last changed   : 20/2/04 11.03.10 by USAC-Claudia
                (modified after loading)
ANALISIS DE ACEITES ESENCIALES O FRAGANCIAS
POR CROMATOGRAFIA DE GASES
P. de Analisis Quimico, U. del Valle de Guatemala

Mestra pura, <0.5µl, H2 13psi, Aire 35psi, N2 40psi
Columna SPB-5 30m x 0.53mm di, 0.5µm film
Nitrogeno con split, acarreador inic col 2psi
Injector 250C, Detector FID 300C
Horno 60C 5min, 10C/min hasta 255C, 5min
Sistema cromatografico HP 5890II / ChemStation

```



External Standard Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Friday 20 20e February 20e 2004 10.46.15
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 200.0000

```

Instrument 2 20/2/04 11.03.10 USAC-Claudia

Page 1 of 2

Data File D:\HPCHEM\2\DATA\USAC\SIG10554.D

Sample Name: Tubo 3

```

Signal 1: FID1 A,
Uncalibrated peaks RF : 0.00000

```

RetTime [min]	Type	Area counts*s	Amt/Area	Amount [ppm]	Grp	Name
11.345	BV	1.33598e4	2.48177e-2	6.63119e4		p-cimeno
12.116	BB	9.31874e4	0.00000	0.00000		?
17.131	BV	1.01250e4	0.00000	0.00000		?

```
Totals : 6.63119e4
```

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

Figura e: Cromatograma de la muestra 4 de γ -terpineno

Data File D:\HPCHEM\2\DATA\USAC\SIG10555.D

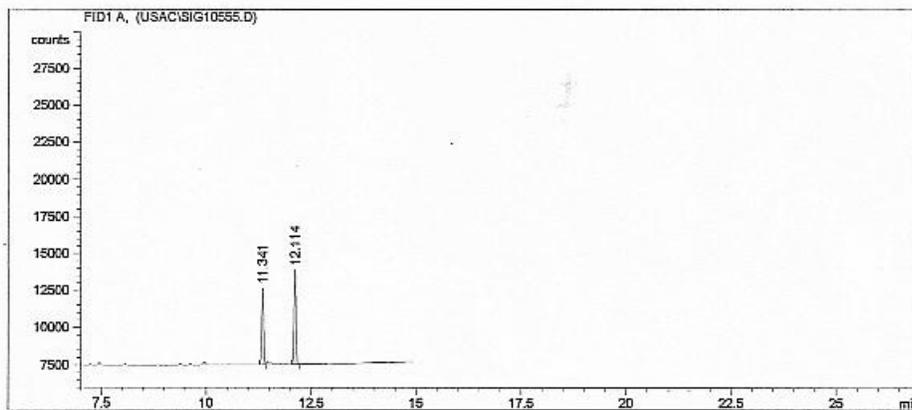
Sample Name: Tubo 4

```

=====
Injection Date : 20/2/04 10.41.34
Sample Name    : Tubo 4
Acq. Operator  : USAC-Claudia
Vial           : 1
Inj Volume    : Manually
Acq. Method   : D:\HPCHEM\2\METHODS\ABFRPAQ3.M
Last changed  : 20/2/04 7.47.50 by USAC-Claudia
                (modified after loading)
Analysis Method : D:\HPCHEM\2\METHODS\ABFRPAQ3.M
Last changed  : 20/2/04 11.04.18 by USAC-Claudia
                (modified after loading)
ANALISIS DE ACEITES ESENCIALES O FRAGANCIAS
POR CROMATOGRAFIA DE GASES
P. de Analisis Quimico, U. del Valle de Guatemala

Mestra pura, <0.5µl, H2 13psi, Aire 35psi, N2 40psi
Columna SPB-5 30m x 0.53mm di, 0.5µm film
Nitrogeno con split, acarreador inic col 2psi
Injector 250C, Detector FID 300C
Horno 60C 5min, 10C/min hasta 255C, 5min
Sistema cromatografico HP 5890II / ChemStation

```



External Standard Report

```

=====
Sorted By           : Signal
Calib. Data Modified : Friday 20 20e February 20e 2004 10.46.15
Multiplier          : 1.0000
Dilution            : 1.000e3

```

Instrument 2 20/2/04 11.04.18 USAC-Claudia

Page 1 of 2

Data File D:\HPCHEM\2\DATA\USAC\SIG10555.D

Sample Name: Tubo 4

```

Signal 1: FID1 A,
Uncalibrated peaks RF : 0.00000

```

RetTime [min]	Type	Area counts*s	Amt/Area	Amount [ppm]	Grp	Name
11.341	BV	1.63626e4	2.32973e-2	3.81204e5		p-cimeno
12.114	BB	1.99686e4	0.00000	0.00000		?

Totals : 3.81204e5

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Figura f: Cromatograma de la muestra 5 de γ -terpineno

Data File D:\HPCHEM\2\DATA\USAC\SIG10556.D

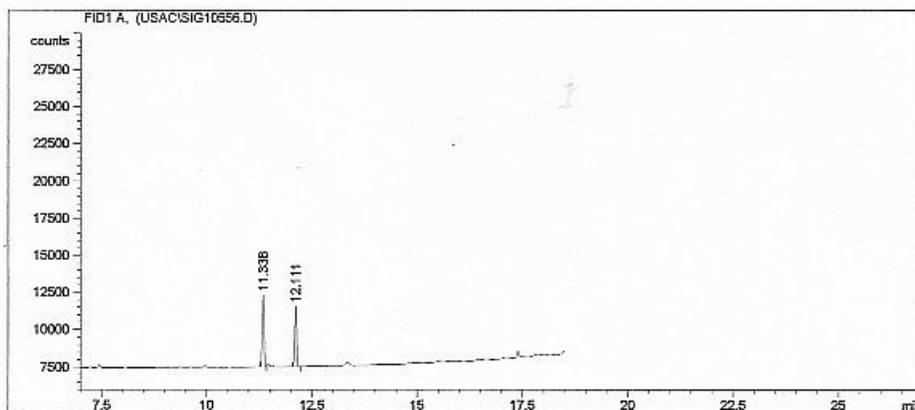
Sample Name: Tubo 5

```

=====
Injection Date : 20/2/04 11.00.03
Sample Name    : Tubo 5                      Vial : 1
Acq. Operator  : USAC-Claudia                Inj Volume : Manually
Acq. Method    : D:\HPCHEM\2\METHODS\AEFRPAQ3.M
Last changed   : 20/2/04 7.47.50 by USAC-Claudia
                (modified after loading)
Analysis Method : D:\HPCHEM\2\METHODS\AEFRPAQ3.M
Last changed   : 20/2/04 11.19.30 by USAC-Claudia
                (modified after loading)
ANALISIS DE ACEITES ESENCIALES O FRAGANCIAS
POR CROMATOGRAFIA DE GASES
P. de Analisis Quimico, U. del Valle de Guatemala

Mestra pura, <0.5µl, H2 13psi, Aire 35psi, N2 40psi
Columna SPB-5 30m x 0.53mm di, 0.5µm film
Nitrogeno con split, acarreador inic col 2psi
Injector 250C, Detector FID 300C
Horno 60C 5min, 10C/min hasta 255C, 5min
Sistema cromatografico HP 5890II / ChemStation

```



```

=====
External Standard Report
=====

```

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Friday 20 20e February 20e 2004 10.46.15
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.000e3

```

Data File D:\HPCHEM\2\DATA\USAC\SIG10556.D

Sample Name: Tubo 5

```

Signal 1: FID1 A,
Uncalibrated peaks RF : 0.00000

```

RetTime [min]	Type	Area counts*s	Amt/Area	Amount [ppm]	Grp	Name
11.338	BV	1.53516e4	2.37926e-2	3.65255e5		p-cimeno
12.111	BP	1.25187e4	0.00000	0.00000		?

```
Totals : 3.65255e5
```

```
Results obtained with enhanced integrator!
```

```
=====
*** End of Report ***
=====
```

**ANEXO 11: Análisis de las muestras de aceite esencial de limón
(*Citrus aurantifolia*) por espectroscopia ultravioleta**

Calibration

Collection time 12/03/04 09:48:08 a.m.

Standard	Concentration mg/L	F	Mean	SD	%RSD	Readings
Std 1	0.00		0.0005	0.0002	33.8	0.0005
						0.0007
						0.0003
Std 2	0.48		0.0074	0.0002	3.00	0.0076
						0.0073
						0.0072
Std 3	23.88		0.0646	0.0002	0.24	0.0644
						0.0647
						0.0646
Std 4	47.76		0.1509	0.0002	0.14	0.1511
						0.1507
						0.1509
Std 5	95.52		0.2879	0.0002	0.07	0.2879
						0.2882
						0.2878
Std 6	191.04		0.5781	0.0004	0.06	0.5783
						0.5784
						0.5777

Calibration eqn Abs = 0.00302*Conc +0.00116
 Correlation Coefficient 0.99946
 Calibration time 12/03/04 09:52:02 a.m.

Analysis

Collection time 12/03/04 12:43:14 p.m.

Sample	FD	Concentration g/100mL	F	Mean	SD	%RSD	Readings
Tubo 1	1667	4.95e5 OR		0.8981	0.0008	0.09	0.8980
							0.8972
							0.8989
Tubo 2	1667	3.22e5		0.5844	0.0004	0.06	0.5847
							0.5840
							0.5844
Tubo 3	1667	1.50e5		0.2720	0.0004	0.15	0.2718
							0.2719
							0.2725
Tubo 4	1667	1.44e5		0.2614	0.0001	0.03	0.2614
							0.2613
							0.2613
Tubo 5	1667	1.20e5		0.2257	0.0003	0.12	0.2257
							0.2260
							0.2255
Tubo 6	1667	9.70e4		0.1767	0.0003	0.19	0.1769
							0.1770
							0.1763
Tubo 7	1667	4.40e4		0.0808	0.0003	0.39	0.0812
							0.0807
							0.0806

ANEXO-12: Análisis del aceite esencial de limón (*Citrus aurantifolia*) por el método de cromatografía de gases

Tabla-A: Datos de la curva de Calibración

ESTÁNDAR	CONCENTRACIÓN	ÁREA DE PICO
1	155.84	23.33426
2	389.6	54.30828
3	1558.4	237.57817

Ecuación de calibración: $A = 0.1540584 \cdot C - 2.96450726$

$$r^2 = 0.99975741$$

Gráfica-A: Gráfica de la curva de calibración

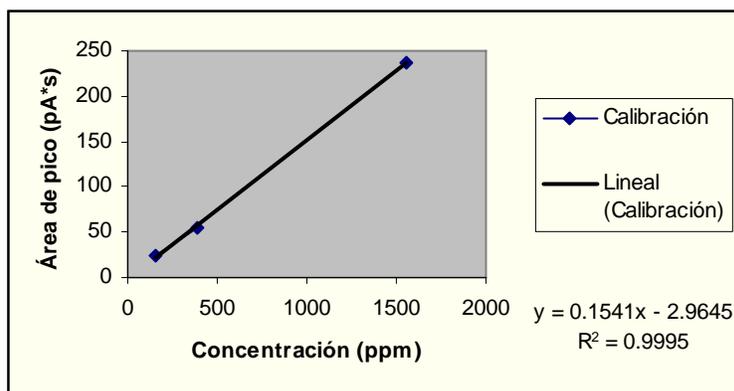
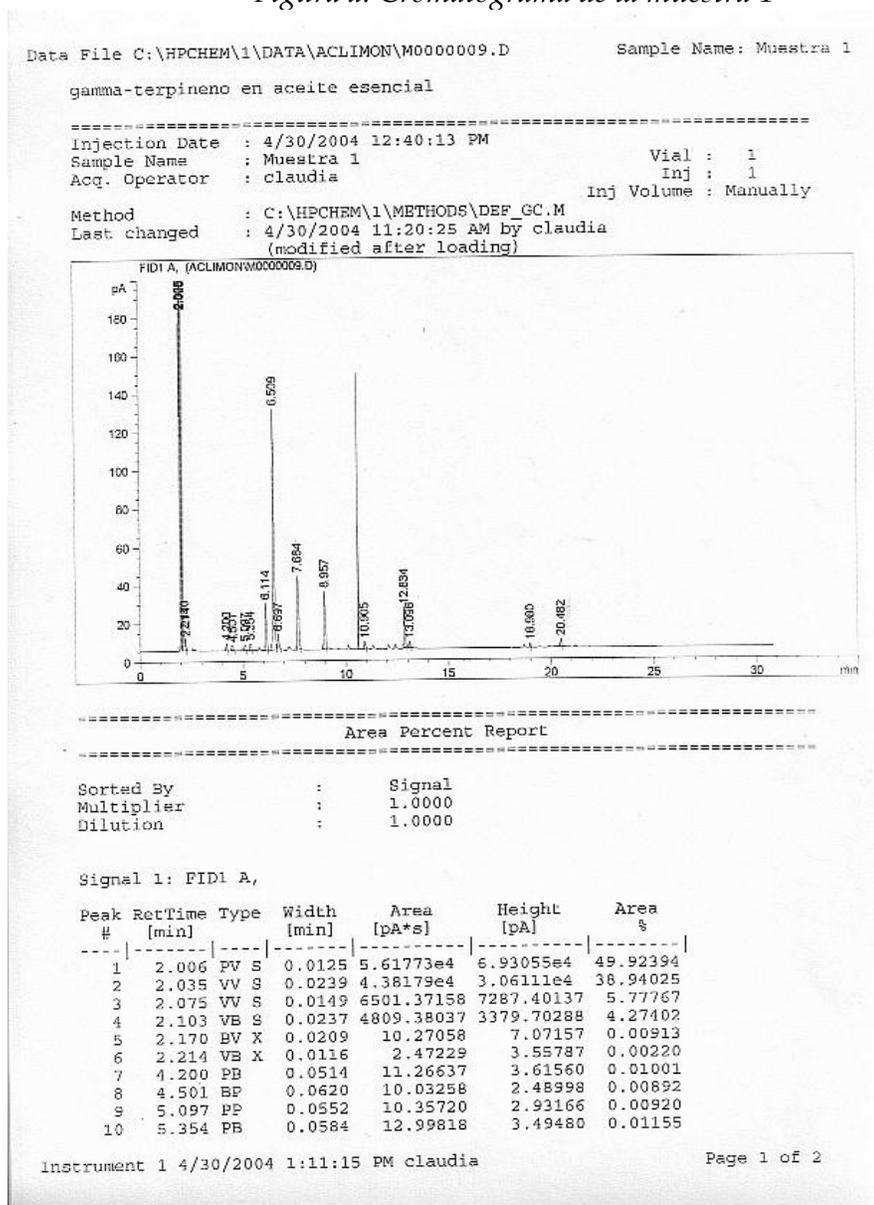


Figura a: Cromatograma de la muestra 1



Data File C:\HPCHEM\1\DATA\ACLIMON\M0000009.D Sample Name: Muestra 1

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
11	6.114	BB	0.0620	99.87672	24.80123	0.08876
12	6.509	BV	0.0692	563.82678	126.03271	0.50106
13	6.697	VB	0.0705	36.86520	7.89702	0.03276
14	7.654	PB	0.0736	188.15324	38.79599	0.16721
15	8.957	BB	0.0728	140.16350	30.41340	0.12456
16	10.905	PB	0.0610	16.20480	4.02494	0.01440
17	12.834	PB	0.0567	80.31905	21.41886	0.07138
18	13.096	PB	0.0588	13.49017	3.43680	0.01199
19	18.980	PB	0.0484	7.10403	2.21519	0.00631
20	20.482	BB	0.0577	16.51938	4.04141	0.01468
Totals :				1.12526e5	1.10870e5	

=====
 *** End of Report ***

Figura b: Cromatograma de la muestra 2

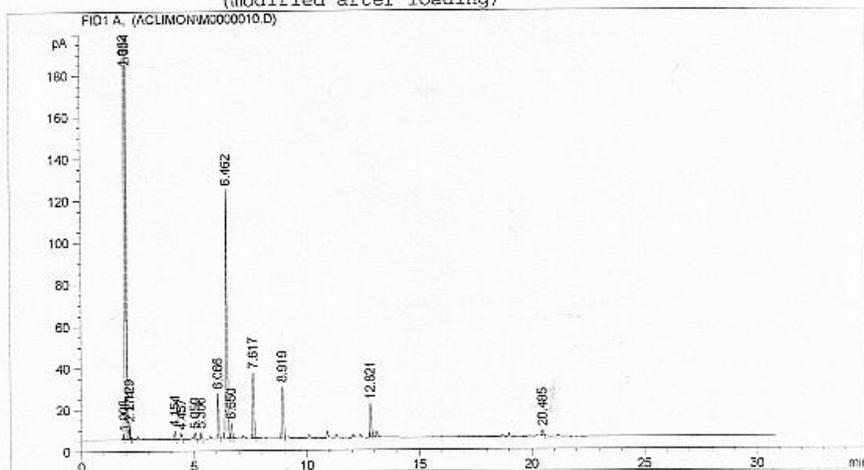
Data File C:\HPCHEM\1\DATA\ACLIMON\M0000010.D

Sample Name: Muestra 2

gamma-terpineno en aceite esencial

```

=====
Injection Date : 4/30/2004 1:20:53 PM
Sample Name    : Muestra 2
Acq. Operator  : claudia
Method         : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEF_GC.M
Last changed   : 4/30/2004 11:20:25 AM by claudia
                (modified after loading)
Vial           : 1
Inj           : 1
Inj Volume    : Manually
  
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
  
```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	1.908	BV	0.0165	2.59044	2.24636	0.00256
2	1.962	VV S	0.0153	9.07798e4	8.62431e4	89.60064
3	2.034	VE S	0.0168	9561.07422	9499.83203	9.43689
4	2.129	BV X	0.0161	12.09765	10.76010	0.01194
5	2.174	VB X	0.0158	5.72842	5.68016	0.00565
6	4.154	BB	0.0357	9.27339	4.05779	0.00915
7	4.457	BB	0.0451	7.86615	2.54393	0.00776
8	5.050	PB	0.0460	8.74920	3.00509	0.00864
9	5.306	PB	0.0503	10.33218	3.15111	0.01020
10	6.066	BB	0.0532	77.70750	22.00464	0.07670

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\ACLIMON\M0000010.D

Sample Name: Muestra 2

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
11	6.462	BB	0.0615	485.07901	119.05587	0.47878
12	6.650	BB	0.0626	29.87805	7.33051	0.02949
13	7.617	PB	0.0705	142.70689	31.70374	0.14085
14	8.919	BB	0.0664	109.73745	24.91143	0.10831
15	12.821	PB	0.0564	62.36721	16.37594	0.06156
16	20.485	PB	0.0596	11.01915	2.76157	0.01088

Totals : 1.01316e5 9.59986e4

*** End of Report ***

Figura c: Cromatograma de la muestra 3

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\ACLIMON\M0000012.D Sample Name: Muestra 3

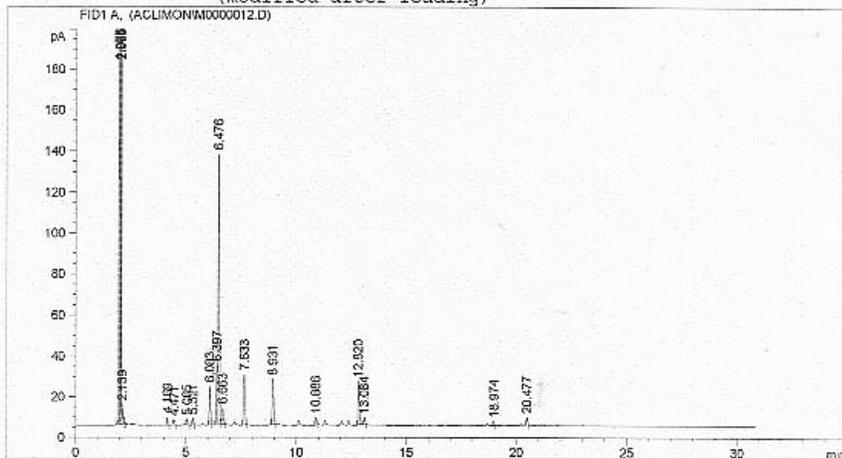
gamma-terpineno en aceite esencial

```

=====
Injection Date : 4/30/2004 2:35:15 PM
Sample Name    : Muestra 3
Acq. Operator  : claudia
Vial           : 1
Inj            : 1
Inj Volume     : Manually

Method         : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEF_GC.M
Last changed   : 4/30/2004 11:20:25 AM by claudia
                (modified after loading)
=====

```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
=====

```

Signal 1: PID1 A.

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	1.975	BV S	0.0125	5.24168e4	6.40400e4	45.90559
2	1.996	VV S	0.0195	4.94096e4	4.23311e4	43.27190
3	2.044	VV S	0.0140	6064.22070	7208.00928	5.31092
4	2.065	VB S	0.0193	5140.11426	4443.45850	4.50161
5	2.139	BB X	0.0301	18.97649	8.17112	0.01662
6	4.169	PB	0.0447	10.77715	3.84935	0.00944
7	4.471	BP	0.0571	9.74666	2.57905	0.00854
8	5.065	PB	0.0525	10.37920	3.14578	0.00909
9	5.321	PB	0.0541	12.21627	3.46974	0.01070
10	6.083	BB	0.0580	72.02406	19.08087	0.06308

Instrument 1 4/30/2004 3:06:10 PM claudia

Page 1 of 2

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
11	6.397	PV	0.0455	87.13181	29.49129	0.07631
12	6.476	VB	0.0628	542.65399	132.45186	0.47525
13	6.663	BB	0.0672	36.47295	8.30390	0.03194
14	7.633	PB	0.0733	118.76394	25.05863	0.10401
15	8.931	BB	0.0686	101.92858	22.61461	0.08927
16	10.886	PB	0.0628	16.28585	3.97365	0.01426
17	12.820	PB	0.0569	81.38672	21.64768	0.07128
18	13.084	PB	0.0566	12.84192	3.35907	0.01125
19	18.974	PB	0.0502	6.95346	2.12580	0.00609
20	20.477	BB	0.0568	14.69460	3.82361	0.01287

Totals : 1.14184e5 1.18316e5

*** End of Report ***

Figura d: Cromatograma de la muestra 4

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\ACLIMON\M0000013.D

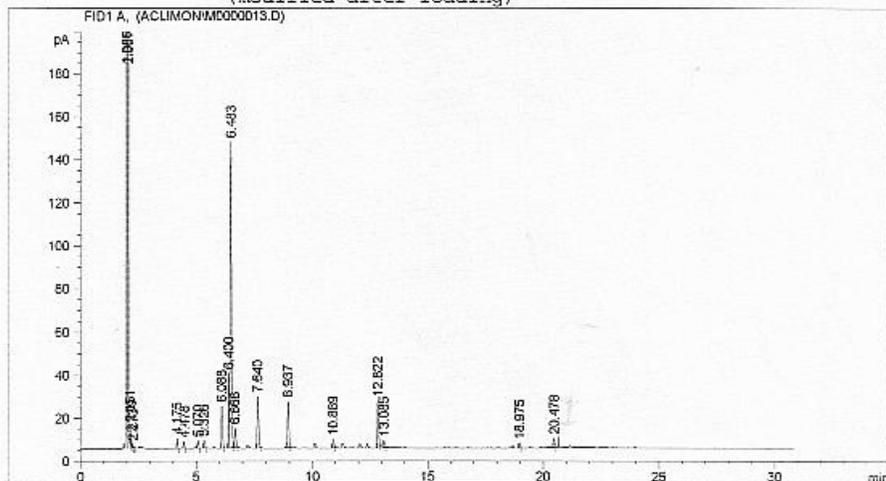
Sample Name: Muestra 4

gamma-terpineno en aceite esencial

```

=====
Injection Date : 4/30/2004 3:13:15 PM
Sample Name    : Muestra 4
Acq. Operator  : claudia
Method         : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEF_GC.M
Last changed   : 4/30/2004 11:20:25 AM by claudia
                (modified after loading)
Vial           : 1
Inj            : 1
Inj Volume     : Manually
=====

```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
=====

```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	1.986	BV S	0.0170	1.13306e5	1.01860e5	90.06447
2	2.061	VB S	0.0214	1.13446e4	8816.33887	9.01758
3	2.151	BV X	0.0255	14.29567	9.03001	0.01136
4	2.199	VV X	0.0227	7.20187	5.04585	0.00572
5	2.273	VB X	0.0216	1.62669	1.25763	0.00129
6	4.175	BB	0.0354	10.74917	4.75221	0.00854
7	4.478	BB	0.0453	9.41038	3.02339	0.00748
8	5.070	PP	0.0462	10.52428	3.58922	0.00837
9	5.326	PB	0.0498	12.23068	3.77656	0.00972
10	6.088	BB	0.0542	69.16496	19.59581	0.05498

Instrument 1 4/30/2004 3:44:11 PM claudia

Page 1 of 2

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\ACLIMON\M0000013.D

Sample Name: Muestra 4

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
11	6.400	PV	0.0472	105.21869	34.88405	0.08364
12	6.483	VB	0.0594	540.65533	141.99834	0.42976
13	6.668	BB	0.0620	36.10767	8.96298	0.02870
14	7.640	PB	0.0697	108.83796	24.09726	0.08651
15	8.937	BB	0.0682	95.13763	21.68587	0.07562
16	10.889	PB	0.0604	15.74222	3.95547	0.01251
17	12.822	PB	0.0563	81.24232	21.90035	0.06458
18	13.085	PB	0.0585	12.58386	3.29940	0.01000
19	18.975	BB	0.0475	7.41752	2.37018	0.00590
20	20.478	BB	0.0562	16.68265	4.40174	0.01326

Totals : 1.25805e5 1.10994e5

*** End of Report ***

Figura e: Cromatograma de la muestra 5

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\ACLIMON\M0000014.D Sample Name: Muestra 5

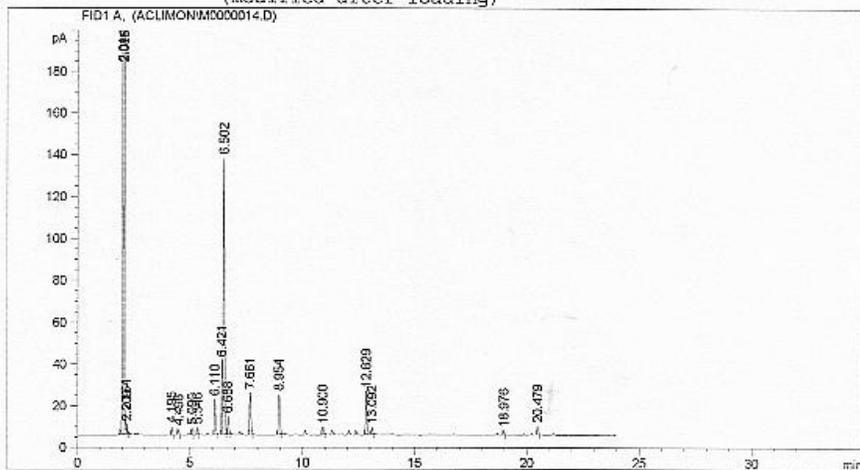
gamma-terpineno en aceite esencial

```

=====
Injection Date : 4/30/2004 3:50:14 PM
Sample Name    : Muestra 5
Acq. Operator  : claudia
Vial           : 1
Inj            : 1
Inj Volume     : Manually

Method         : C:\HPCHEM\1\METHODS\DEF_GC.M
Last changed   : 4/30/2004 11:20:25 AM by claudia
                (modified after loading)
=====

```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
=====

```

Signal 1: FID1 A.

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.014	BV S	0.0216	1.06125e5	6.66051e4	89.53138
2	2.085	VB S	0.0281	1.13111e4	6700.67480	9.54246
3	2.164	BV X	0.0237	13.12113	7.38997	0.01107
4	2.209	VB X	0.0289	5.52394	3.19092	0.00466
5	4.195	PB	0.0409	10.00609	3.90086	0.00844
6	4.498	BP	0.0513	9.13524	2.58368	0.00771
7	5.090	PB	0.0486	9.93850	3.16871	0.00838
8	5.346	PB	0.0510	11.30835	3.37910	0.00954
9	6.110	PB	0.0568	61.95300	16.89797	0.05227
10	6.421	PV	0.0481	110.09219	35.60496	0.09288

Instrument 1 4/30/2004 4:14:21 PM claudia

Page 1 of 2

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\ACLIMON\M0000014.D

Sample Name: Muestra 5

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
11	6.502	VB	0.0613	524.22638	132.08665	0.44226
12	6.688	BB	0.0657	35.75382	8.39458	0.03016
13	7.661	BB	0.0709	93.00794	20.11423	0.07847
14	8.954	BB	0.0701	85.46268	19.13725	0.07210
15	10.900	PB	0.0635	15.87886	3.81866	0.01340
16	12.829	PB	0.0570	78.29829	20.77732	0.06606
17	13.092	PB	0.0585	11.58990	3.03920	0.00978
18	18.976	PB	0.0492	6.89123	2.16304	0.00581
19	20.479	BB	0.0586	15.63195	3.99969	0.01319

Totals : 1.18534e5 7.35955e4

*** End of Report ***