

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERÍA

**EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DEL ACEITE ESENCIAL
DEL PROTIUM COPAL, A NIVEL LABORATORIO**

TESIS

**PRESENTADA A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE INGENIERÍA**

POR

MILDRED CARMINA LÓPEZ ORIZABAL

**AL CONFERÍRSELE EL TÍTULO DE
INGENIERA QUÍMICO**

GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 1999.



HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

Cumpliendo con los preceptos que establece la ley de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración mi trabajo de tesis titulado:

**EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DEL ACEITE
ESENCIAL DEL PROTIUM COPAL, A NIVEL LABORATORIO**

Tema que me fuera asignado por la dirección de la Escuela de Ingeniería Química con fecha 17 de agosto de 1998.

Mildred Carmina López Orizabal

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERÍA

NÓMINA DE JUNTA DIRECTIVA

DECANO	ING. HERBERT RENÉ MIRANDA BARRIOS
VOCAL 1º.	ING. JOSÉ FRANCISCO GÓMEZ RIVERA
VOCAL 2º.	ING. CARLOS HUMBERTO PÉREZ RODRÍGUEZ
VOCAL 3º.	ING. JORGE BENJAMÍN GUTIERREZ QUINTANA
VOCAL 4º.	Br. OSCAR STUARDO CHINCHILLA GUZMÁN
VOCAL 5º.	Br. MAURICIO ALBERTO GRAJEDA MARISCAL
SECRETARIA	ING. GILDA MARINA CASTELLANOS BAIZA DE ILLESCAS

TRIBUNAL QUE PRACTICÓ EL EXAMEN
GENERAL PRIVADO

DECANO	ING. JULIO ISMAEL GONZÁLEZ PODSZUECK
EXAMINADOR	ING. OSCAR RENÉ ROSAL HIGUEROS
EXAMINADOR	ING. RODOLFO FRANCISCO ESPINOSA SMITH
EXAMINADOR	ING. JULIO ALBERTO RIVERA PALACIOS
SECRETARIO	ING. FRANCISCO JAVIER GONZÁLEZ LÓPEZ



FACULTAD DE INGENIERIA

Ref. WGAM.0047.99

Guatemala, 23 de agosto de 1999

Ingeniero
Otto Raúl de León de Paz
Director
Escuela Ingeniería Química
Presente.

Estimado Ingeniero de León:

Atentamente me dirijo a usted para responder a su oficio Ref. EIQ. 201.99, mediante el cual se solicita revisar el informe final de tesis de la estudiante universitaria MILDRED CARMINA LOPEZ ORIZABAL, titulado "EXTRACCION Y CARACTERIZACION PRELIMINAR DEL ACEITE ESENCIAL DE PROTIUM COPAL, A NIVEL LABORATORIO" el cual fue asesorado por la Ingeniera Telma Maricela Cano Morales.

Al respecto, me permito informarle que después de haber terminado la revisión del mencionado informe y de haberle hecho las correcciones pertinentes, considero que llena los requisitos para ser aprobada por parte de la Escuela como trabajo de tesis, por lo cual se lo remito y lo pongo a su consideración.

Agradeciendo la atención a la presente, le saluda respetuosamente,

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"

M. en Ing. Williams G. Alvarez Mejía
Profesor Titular V
Area de Operaciones Unitarias



CENTRO DE INVESTIGACIONES DE INGENIERIA
FACULTAD DE INGENIERIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA



Guatemala, 20 de agosto de 1999.

Señor Director
Otto Raúl de León de Paz
Escuela de Ingeniería Química
Facultad de Ingeniería
Universidad de San Carlos de Guatemala
Presente

Señor Director:

Atentamente me dirijo a usted, para informarle que ha sido concluido satisfactoriamente el trabajo de tesis titulado: **"EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DEL ACEITE ESENCIAL DE PROTIUM COPAL, A NIVEL LABORATORIO"**, desarrollado por la estudiante Mildred Carmina López Orizabal, tema para el cual fui asignada como asesora.

Considero que se ha cumplido con los objetivos propuestos al inicio del trabajo, por lo que lo remito a su consideración para proseguir con los trámites correspondientes.

Atentamente,

Inga. Telma Maricela Cano Morales
Jefe del Departamento de Química Industrial
Asesora de Tesis
Colegiado No. 433

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS
DE GUATEMALA



FACULTAD DE INGENIERIA

El Director de la Escuela de Ingeniería Química, Ing. Otto Raúl de León de Paz, después de conocer el dictamen del Asesor con el Visto Bueno del Jefe de Departamento, al trabajo de Tesis de la estudiante, **Mildred Carmina López Orizabal**, titulado: **EXTRACCION Y CARACTERIZACION PRELIMINAR DEL ACEITE ESENCIAL DEL PROTIUM COPAL, A NIVEL LABORATORIO**, procede a la autorización del mismo.


Ing. Otto Raúl de León de Paz
DIRECTOR ESCUELA INGENIERIA QUIMICA

Guatemala, noviembre de 1,999.

/ga

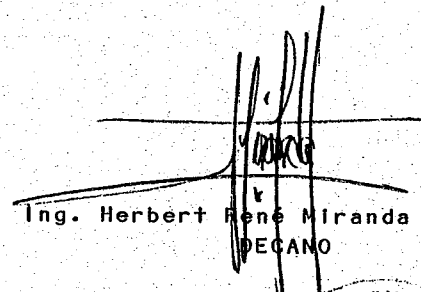
**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS
DE GUATEMALA**



FACULTAD DE INGENIERIA

El Decano de la Facultad de Ingeniería, luego de conocer la autorización por parte del Director de la Escuela de Ingeniería Química, al trabajo de Tesis titulado: **EXTRACCION Y CARACTERIZACION PRELIMINAR DEL ACEITE ESENCIAL DEL PROTIUM COPAL, A NIVEL LABORATORIO**, de la estudiante **Mildred Carmina López Orizabal**, procede a la autorización para la impresión de la misma.

IMPRIMASE:


Ing. Herbert René Miranda Barrios
DECANO



Guatemala, noviembre de 1,999.

/ga

DEDICATORIA

A Dios:

por su infinita misericordia y fidelidad.

A mi patria:

Guatemala, bendita tierra.

A mis padres:

Celso López Gramajo y Rita Orizabal Guerra,
por ayudarme a construir mi escala de valores.

A mis amados hermanos:

Rolando, Fredy, Beto, Tavo, Guto, Pany, Soraya, Lesbia y José,
por su amistad, apoyo, comprensión, por sus consejos y en fin, por
ser mi mayor estímulo para seguir adelante.

A mis cuñados:

Rosa Vilma, Otto, Aracely, Antonio, Jenny, Soralia y Betty, gracias
por decidir ser parte de mi familia.

A mis sobrinos:

Ixchel, José, Luis Carlos, Marya, Edgar, Gustavito, Andrea, Luis
Daniel, Silvia, Benjamín, Rita, Ottoniel, Moisés, Humberto,
Lourdes, Mildred e Isabelita, mis pequeños amigos.

A la familia:

López Cifuentes, especialmente a Jorge y Amparo, porque
siempre han estado con nosotros en los momentos más difíciles.

A mi amiga:

Melvi Lorena Medina Patzán, porque su amistad fue el mejor de
los hallazgos.

A mi amigo:

Marco Antonio Donado Miranda, por aceptarme como soy y
obviar todos mis defectos.

A mis compañeros y amigos:

Paty, Jacqueline, Jeannette, Ruth, Deborah, Vilma, Sandra,
Pamela, Gilda, Benjamín, Nelson, Byron, Manolo, Ingrid,
Leonardo, Juan Antonio, Alvaro, Luisa y José.

AGRADECIMIENTOS

A la Inga. Telma Maricela Cano Morales, por su asesoría, por su apoyo y sobre todo por estimularme a seguir adelante.

Al Ing. Williams Álvarez, por la revisión del presente trabajo.

Al Dr. Arnaldo L. Bandoni, porque sin su ayuda no se hubieran concretado los objetivos del presente trabajo. Gracias Dr. Bandoni, por personas como usted, este mundo sigue en pie.

A mi amigo Marco Antonio García Martínez

A ProPetén, especialmente al Dr. Simon Commerford.

A la Facultad de Agronomía: especialmente al Ing. Juan José Castillo y a David y al Ing. Marino Barrientos, por compartir sus conocimientos sin esperar nada a cambio.

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia: especialmente a Lic. Roberto Benavides, Licda Silvia Echeverría y al Lic. Armando Cáceres.

A mi amigo Nelson Chanquín

A la sección de Química Industrial: especialmente al Ing. César García y a la Licda. Ingrid Benítez.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	iv
LISTA DE SÍMBOLOS	vii
GLOSARIO	viii
RESUMEN	x
INTRODUCCIÓN	xii
ANTECEDENTES	xv
JUSTIFICACIÓN	xix
OBJETIVOS	xx
HIPÓTESIS	xxi
1. MARCO TEÓRICO	1
1.1 Definición de aceites esenciales	1
1.2 Composición química de los aceites esenciales	1
1.2.1 Compuestos que contienen carbono e hidrógeno	2
1.2.2 Compuestos que contienen carbono, hidrógeno y oxígeno	2
1.3 Tratamiento de la materia prima previo a la obtención de aceites esenciales	3
1.3.1 Naturaleza del material vegetal	3

1.3.2 Reducción de la partícula	4
1.3.3 Técnicas de recolección, secado y conservación de las plantas que contienen aceites esenciales	4
1.4 Métodos de obtención de aceites esenciales	6
1.4.1 Destilación	6
1.4.1.1 Destilación con agua	7
1.4.1.2 Destilación con agua y vapor	7
1.4.1.3 Destilación con vapor	7
1.4.2 Enfloración	8
1.4.3 Maceración	9
1.4.4 Extracción con solventes volátiles	9
1.5 Rectificación de los aceites esenciales	10
1.6 Análisis de los aceites esenciales	11
1.7 Cuidado y preservación de los aceites esenciales	11
1.8 Usos y aplicaciones de los aceites esenciales	12
2. MÉTODO DE INVESTIGACIÓN	13
2.1 Localización	13
2.2 Recursos humanos	14
2.3 Recursos materiales	14
2.4 Equipo y cristalería	15

2.5 Metodología	16
2.5.1 Diseño del experimento	16
2.5.2 Diseño de tratamientos	16
2.5.3 Unidad experimental y variable respuesta	16
2.5.4 Manejo del experimento	17
2.5.5 Análisis de la información	20
3. RESULTADOS	21
4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	26
CONCLUSIONES	32
RECOMENDACIONES	33
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
BIBLIOGRAFÍA	36
APÉNDICES	37

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

FIGURAS

No.	TÍTULO	PÁGINA
1	Rendimiento (%) de aceite esencial de la cáscara del fruto de <i>Protium copal</i> en función del tiempo de destilación	21
2	Composición química del aceite esencial de la cáscara del fruto de <i>Protium copal</i>	24
3	Composición química del aceite esencial de la cáscara del fruto de <i>Protium copal</i> comparativa en tres tiempos de destilación	25
4	Fotografía del fruto de <i>Protium copal</i>	39
5	Fotografía de la flor de <i>Protium copal</i>	40
6	Esquema del equipo utilizado para la destilación del aceite esencial.....	41
7	Detalle del aparato de la farmacopea europea para hidrodestilación	42
8	Cromatograma del aceite esencial de la cáscara del fruto de <i>Protium copal</i>	47

9	Cromatograma con identificación de los componentes del aceite esencial de la cáscara del fruto de <i>Protium copal</i>	48
10	Cromatograma del aceite esencial de la cáscara del fruto de <i>Protium copal</i> , destilado durante una hora.....	50
11	Cromatograma del aceite esencial de la cáscara del fruto de <i>Protium copal</i> , destilado durante dos horas	51
12	Cromatograma del aceite esencial de la cáscara del fruto de <i>Protium copal</i> , destilado durante tres horas	52

TABLAS

No.	TÍTULO	PÁGINA
I	Rendimiento (%) del aceite esencial de la cáscara del fruto de <i>Protium copal</i> , a tres distintos tiempos de destilación	21
II	Resultados del análisis de varianza de los rendimientos del aceite esencial de la cáscara del fruto de <i>Protium copal</i>	22
III	Resultados de la prueba de Tukey para los rendimientos del aceite esencial de la cáscara del fruto de <i>Protium copal</i>	22
IV	Composición química del aceite esencial de la cáscara del fruto de <i>Protium copal</i>	23
V	Propiedades fisicoquímicas del aceite esencial de la cáscara del fruto de <i>Protium copal</i>	25
VI	Cantidad de aceite esencial extraído de la cáscara del fruto de <i>Protium copal</i> , obtenido en cada unidad experimental	43
VII	Propiedades fisicoquímicas del aceite esencial de la cáscara del fruto de <i>Protium copal</i> determinadas en cada tiempo de destilación	43
VIII	Composición química del aceite esencial de la cáscara del fruto de <i>Protium copal</i> comparativa en tres tiempos de destilación	49

LISTA DE SÍMBOLOS

SÍMBOLO	DESCRIPCIÓN
H_0	Hipótesis nula
H_a	Hipótesis alterna
μ	Media de la variable respuesta
ml	Mililitros
μ l	Microlitros
$Z(i,j,k)$	Variable respuesta de la i, j, k-ésima unidad de tratamiento
X_i	Efecto del i-ésimo tratamiento
$\epsilon_{i,j,k}$	Efecto del error experimental
G.L.	Grados de libertad
F_0	Razón de la media de cuadrados de los tratamientos y el error experimental
R	Coeficiente de correlación
C.V.	Coeficiente de variación
d_t	Peso específico a la temperatura del ambiente
n_D^t	Índice de refracción a la temperatura del ambiente
T_b	Temperatura de ebullición a presión atmosférica normal
$(\alpha)_D$	Rotación óptica a la temperatura del ambiente
T_f	Temperatura de fusión

GLOSARIO

Aceites esenciales	Sustancias volátiles de algunas plantas olorosas, obtenidas por destilación a base de vapor.
Analgésico	Fármaco o medicamento que calma el dolor.
Barniz	Disolución de una resina en un líquido volátil, con la que se protegen las superficies delicadas.
Cohobación	Corresponde a una hidrodestilación en la cual los vapores del agua y de aceite esencial arrastrado se condensan a reflujo, pero sólo el agua vuelve al balón de destilación, quedando el aceite esencial en la trampa o dispositivo.
Destilación	Separación de los componentes de una solución por diferencia de volatilidades.
Hidrodestilación	Destilación con agua, en la cual se separan los componentes de una mezcla de dos o más líquidos en virtud de sus presiones de vapor mediante la vaporización parcial de la mezcla y la recuperación por separado del vapor y los residuos.

Incienso	Gomorresina que se extrae de las incisiones en el tronco de algunas <i>burseraceae</i> , que al arder desprende un olor agradable y que se emplea en ciertas ceremonias religiosas.
Organoléptico	Dícese de las propiedades de los cuerpos que se pueden percibir por los sentidos.
Resina	Sustancia orgánica sólida o pastosa, transparente e insoluble en agua, con poca tendencia a cristalizar. Se obtiene de las plantas, principalmente de las coníferas.
Terpenos	Nombre común aplicado a determinados hidrocarburos que se encuentran en los aceites volátiles obtenidos de ciertas plantas.

RESUMEN

Se realizó la extracción del aceite esencial de la cáscara del fruto de *Protium copal*, utilizando el método de hidrodestilación y dejando fijo el tamaño de muestra, tamaño de partícula y temperatura de condensación, con el objetivo de determinar y comparar los rendimientos del aceite esencial de esta especie vegetal en función de tres tiempos de destilación: una, dos y tres horas.

Los resultados obtenidos bajo estas condiciones se evaluaron estadísticamente por medio del análisis de varianza, cuya interpretación indicó que el rendimiento promedio de aceite esencial de la cáscara del fruto de *Protium copal*, extraído durante una hora (3.70%) difiere significativamente de los rendimientos promedio del aceite esencial extraído durante dos horas (4.84%) y tres horas (5.06%) y que la diferencia entre los rendimientos promedio del aceite esencial extraído durante dos y tres horas no es significativa.

De acuerdo a los resultados derivados del análisis de varianza, se dedujo que cuando se desea optimizar el rendimiento del aceite esencial de la cáscara del fruto de *Protium copal* no es conveniente destilar durante una hora y, puesto que no existe diferencia significativa en los rendimientos de aceite esencial al destilar durante dos y tres horas, bajo las condiciones estipuladas en el diseño experimental del presente estudio, se puede utilizar indistintamente ambos tiempos de destilación.

También se realizó la caracterización preliminar de este aceite esencial, por medio de una cromatografía de gases. Dicha caracterización mostró que el aceite esencial del fruto de *Protium copal* tiene por componentes mayoritarios al mirceno (24-35%), sabineno (19-22%), β -felandreno (14-17%), α -pineno (9-11%) y limoneno (6-9%).

Los componentes mayoritarios del aceite esencial de la cáscara del fruto de *Protium copal* identificados en la cromatografía gaseosa fueron los mismos y en similares porcentajes para los tres tiempos de destilación evaluados, es decir, que esta variable no afectó la composición química de este aceite esencial.

Además, se determinó que este aceite esencial es insoluble en agua y en ácido clorhídrico diluido, soluble en solución de hidróxido de sodio al 5% y, con peso específico de 0.7855 y un índice de refracción de 1.4602.

INTRODUCCIÓN

Guatemala es un territorio en el cual las condiciones de clima, tipo de suelo y precipitación fluvial favorecen indistintamente el cultivo y en muchos de los casos, el crecimiento silvestre de una amplia diversidad de especies vegetales, entre las cuales están las plantas productoras de aceites esenciales.

El cultivo de plantas productoras de aceites esenciales y la extracción de los mismos en Guatemala data desde 1914, incipientes investigaciones hechas por el señor Julio Samayoa dieron inicio a incontables estudios acerca del tema referente a "aceites esenciales", pues actualmente es sabida la utilidad de los mismos en las industrias de cosméticos, adhesivos, alimentos, condimentos, preparados dentales, perfumes y pinturas.

Estas plantas han sido objeto de cuidadosas investigaciones y se han logrado controlar los factores agronómicos que inciden en la producción de aceite esencial, entre éstos: época de siembra y cosecha, humedad, tipo de suelo, clima, etc.

A diferencia de las plantas cultivadas, están las plantas silvestres, de las cuales se tiene poca o ninguna información. En algunas se tiene conocimiento de usos tradicionales y populares desde tiempos inmemoriales, datos que han brindado las bases para iniciar investigaciones formales acerca de estas especies vegetales.

Un ejemplo claro de las plantas no cultivadas y de interés medicinal es el *Protium copal*, un árbol de la familia *burceraceae*, con una altura media de 26 m, nativo de Guatemala y que crece en las selvas del Petén, Alta Verapaz, Izabal, San Marcos, Quiché y Huehuetenango.

Acerca del *Protium copal* se sabe que produce una resina tradicionalmente usada como incienso en ritos religiosos y medicinalmente se utiliza para tratar dolor de muelas y reumatismo. En 1997, un estudio científico de la resina mostró que hay dos componentes, una laca muy adhesiva a la madera (con alta claridad) y una cera (tal vez saponificable y con actividad biológica contra hongos). El mismo estudio mostró que la cáscara del fruto contiene bastante aceite esencial, aún no cuantificado ni caracterizado.

Precisamente, cuantificar y caracterizar el aceite esencial de la cáscara del fruto de *Protium copal*, fue la razón que conllevó a plantear los objetivos específicos del presente estudio, para lo cual se realizó un diseño experimental unifactorial, y se evaluó la influencia de la variable tiempo de destilación en la variable respuesta: rendimiento de aceite esencial.

El análisis de varianza mostró que existe diferencia significativa al comparar los rendimientos promedio de aceite esencial obtenidos a partir de una hora con respecto a los rendimientos promedio obtenidos durante dos y tres horas de destilación, pero que al comparar los rendimientos promedio de aceite esencial destilado durante dos y tres horas no hay una diferencia significativa.

La caracterización del aceite esencial de la cáscara del fruto de *Protium copal* fue el segundo objetivo planteado en el presente estudio, el cual se concretó por medio de una cromatografía de gases y la determinación de las siguientes propiedades fisicoquímicas: densidad relativa, índice de refracción y solubilidad; concluyéndose que este aceite esencial es una fuente natural de mirceno y que su composición química no se ve afectada por el factor tiempo de destilación, en los niveles evaluados.

ANTECEDENTES

Desde los albores de la humanidad, los productos obtenidos de las plantas han sido útiles a las más antiguas civilizaciones, es así como los aceites esenciales se produjeron y usaron por primera vez en Egipto, Persia y la India.

Hacia el año 485 A. C. ya se conocía el aceite de trementina en Grecia. En la Edad Media, la destilación se utilizaba con la finalidad de obtener aguas de flores y los aceites odoríficos se obtenían a partir del contacto con flores, hojas, raíces, etc.

El médico español Arnoldo de Villanova (1235-1311) describió por primera vez la destilación de aceites esenciales con fines terapéuticos. Philippus Von Hohenheim (1493-1541), un célebre médico suizo, desarrolló su teoría acerca de la "quinta esencia", la parte más sutil de una sustancia, utilizada para fines terapéuticos. A través de varias publicaciones de finales del siglo XVI se supo sobre el "arte" de la destilación, de la manera de separar el aceite del agua y que el aceite esencial de espliego procedía de Provenza, Francia.

En los siglos XVII y XVIII, los farmacéuticos: Baumé, Rovellet, Bindheim, Hoffman y Glauber se interesaron profundamente por la naturaleza de los aceites esenciales. Sin embargo, fue hasta el siglo XIX a consecuencia de los trabajos experimentales de Lavoisier cuando surgió la industria de los aceites esenciales.

En los inicios del siglo XX, el científico G. Houston de la Billardiere publicó un exhaustivo estudio sobre el aceite de trementina, en el que encontró una proporción de carbono e hidrógeno de 5:8, la cual se estableció más adelante para todos los hemiterpenos, terpenos, sesquiterpenos y politerpenos. El término "terpeno" lo empleó por vez primera Kekulé, pero quien profundizó en la investigación sobre estas sustancias contenidas en los aceites esenciales fue O. Wallace. Desde entonces, se incrementaron los conocimientos y proliferaron las investigaciones acerca de los aceites esenciales, tal es el caso de estudios hechos por O. Aschan, E. Gildemeister, H. Walbaum, S. Bertran, A. Heisse, C. Kleber, E. Kremers, P. Barbier, L. Bouveault, E. Charabot Guenther, etc.¹

En Guatemala, el inicio del cultivo de plantas productoras de aceites esenciales, se debe al señor Julio Samayoa, en su finca Cerritos, durante 1914 y 1918. Luego siguieron René y Mynor Keilhauer. Estas plantaciones aromáticas corresponden al *Cimbopogon nardus rendle*, el *Cimbopogon citratus* (decandolle) y al *Cimbopogon flexuosus*. Estas dos últimas crecen muy bien a una altura de 400 a 2000 pies sobre el nivel del mar, en clima tropical, abundante sol y donde no falte la lluvia. El aceite esencial se encuentra en las hojas, su extracción se hace con arrastre de vapor en alambiques de hierro.²

Recientemente se elaboraron varios estudios acerca de extracciones de aceite esencial de plantas medicinales, entre los cuales cabe citar los siguientes: "Propuesta de escalonamiento a nivel industrial de la obtención de aceites esenciales de la cáscara de naranja, a partir de la optimización de la extracción, a nivel de planta piloto" realizada por el Ing. Miguel Lemus en 1993, en la que se llegó a predecir la rentabilidad del proceso y su escalonamiento a nivel industrial.³

En el mismo año se publicó la tesis titulada "Determinación de una combinación de variables apropiadas en la extracción del aceite de la hoja de eucalipto, a partir de la evaluación de métodos de extracción convencionales", en el la que el Ing. Juan José Rodríguez concluyó que el mejor método para la extracción de aceite esencial de eucalipto es el arrastre con vapor. ⁴

En 1994 el Ing. Leo Mérida publicó su estudio titulado "Determinación del conjunto de variables apropiadas en el proceso de extracción de aceite de pulpa de aguacate, con solventes a partir de pruebas a nivel de laboratorio y a nivel de planta piloto" llegando a ecuaciones que describen el rendimiento del proceso de extracción de aceite de aguacate en función de la relación solvente-aguacate. ⁵

El estudio hecho por la Inga. Ruth Emilsa Reyes, referente a la extracción de aceite esencial de la semilla de ambrette publicado en 1996 mostró que la condición óptima del método de extracción por solventes volátiles, se obtiene utilizando 30 gramos de materia prima y agitando durante 60 minutos, para los niveles evaluados de tamaño de muestra y tiempo de agitación. ⁶

En 1997 se publicó el trabajo del Ing. Benjamín Piedrasanta, que versa sobre la extracción de aceite esencial del romero a nivel laboratorio y planta piloto, llegando a determinar que el rendimiento de aceite esencial de romero es directamente proporcional al tamaño de lote usado y que el promedio de rendimiento de este aceite esencial es significativamente diferente en al menos uno de los tres tamaños de lote utilizados. ⁷

No obstante, todas las investigaciones citadas anteriormente, no existen aún estudios sistematizados acerca de la extracción de aceite esencial de *Protium copal*. Únicamente se tiene conocimiento de un estudio preliminar acerca de la resina de esta especie vegetal, que mostró que existen dos componentes: una laca altamente adhesiva a la madera y con alta claridad y una cera probablemente saponificable y con actividad biológica contra hongos. Además, el mismo estudio mostró que la cáscara del fruto contiene un aceite esencial de rendimiento y composición química desconocida.⁸

JUSTIFICACIÓN

Los resultados que se obtengan del presente estudio, servirán de base para la caracterización química e investigaciones referentes a la farmacología, farmacognosia, toxicología e indicaciones terapéuticas para el uso y aplicación del aceite esencial de la cáscara del fruto de *Protium copal* en las industrias de medicamentos, perfumería, alimentos, etc. De esta manera, se aprovechará el fruto de este árbol para obtener un producto nuevo al servicio de la humanidad, sin incurrir en la desmesurada deforestación con fines comerciales, de la cual han sido objeto las exuberantes selvas de Guatemala. Simultáneamente, se dará auge a la siembra, cuidado y protección de esta especie vegetal, en vías de la preservación de la flora.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

1. Contribuir al desarrollo de la investigación científica de especies vegetales nativas de Guatemala.
2. Aportar datos confiables para darle continuidad al estudio del aceite esencial del *Protium copal*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar y comparar los rendimientos del aceite esencial de la cáscara del fruto de *Protium copal*, en tres distintos tiempos de destilación.
2. Extraer aceite esencial de la cáscara del fruto de *Protium copal*, para su caracterización preliminar por medio de cromatografía de gases y la determinación de su peso específico, índice de refracción y solubilidad.

HIPÓTESIS

Es factible obtener aceite esencial de la cáscara del fruto del *Protium copal*, utilizando el método de hidrodestilación.

HIPÓTESIS ESTADÍSTICA

Hipótesis nula

Ho: no existe diferencia significativa en los rendimientos del aceite esencial de la cáscara del fruto de *Protium copal*, obtenidos a partir de una, dos y tres horas de destilación, utilizando el método de hidrodestilación.

$$\mu_1 = \mu_2 = \mu_3$$

Hipótesis alterna

Ha: existe diferencia significativa en los rendimientos del aceite esencial de la cáscara del fruto de *Protium copal*, obtenidos a partir de una, dos y tres horas de destilación, utilizando el método de hidrodestilación.

$$\mu_i \neq \mu_j \text{ para al menos un par } (i,j)$$

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Definición de los aceites esenciales

El término "aceite esencial" es utilizado en general para designar aquellas sustancias volátiles obtenidas por destilación a base de vapor de las plantas, o por otros métodos de extracción. Con esta definición, es claro que se quiere hacer una distinción entre los aceites grasos y los que son fácilmente volátiles. Su volatilidad y origen vegetal son las propiedades básicas que caracterizan a estos aceites. El término popular más común con el que se conocen estas sustancias es el de "esencias", que también se conocen por el nombre de "aceites volátiles o etéreos".⁹

1.2 Composición química de los aceites esenciales

La mayor parte de los aceites volátiles están compuestos de terpenos, sustancias oxigenadas, sesquiterpenos y pequeñas cantidades de residuos no volátiles. Los principales componentes de estos aceites pueden, por consiguiente, dividirse en dos amplias clases de compuestos orgánicos: los que solamente contienen carbono e hidrógeno y los que contienen carbono, hidrógeno y oxígeno. Las excepciones son pocas: isotiocianatos orgánicos (de los aceites de mostaza); disulfuros orgánicos (del ajo y de la cebolla); cianuros orgánicos; indol; escatol; antranilato de metilo y N-metilantranilato de metilo (de ciertas cortezas, flores y hojas de los cítricos); algunas aminas (componentes menores de los aceites de alcaravea, pachulí, etc.), y unos cuantos compuestos de importancia relativamente escasa.

1.2.1 Compuestos que contienen carbono e hidrógeno

En los aceites volátiles se han hallado las siguientes clases de hidrocarburos: alcanos, olefinas, hidrocarburos aromáticos, terpenos (olefínicos, monocíclicos y bicíclicos), unos pocos homólogos de terpenos inferiores, sesquiterpenos (alifáticos, monocíclicos, bicíclicos y tricíclicos), diterpenos y azulenos. De todos ellos son los terpenos y los sesquiterpenos los más característicos en los aceites esenciales. La unidad fundamental en la estructura de los terpenos es el isopreno, C_5H_8 , que es un hemiterpeno. Dos de esas unidades forman los terpenos, $C_{10}H_{16}$; tres componen los sesquiterpenos, $C_{15}H_{24}$; cuatro, los diterpenos, $C_{20}H_{32}$.

1.2.2 Compuestos que contienen carbono, hidrógeno y oxígeno

Estos son los componentes de que dependen las grandes diferencias de olor observadas en varios aceites esenciales. Ordinariamente representan la porción más soluble del aceite.

Esta amplia clase comprende alcoholes, aldehídos, cetonas y ésteres. Entre estas sustancias hay compuestos saturados y no saturados, alifáticos y aromáticos, terpénicos y sesquiterpénicos (alifáticos, monocíclicos, bicíclicos y aún sesquiterpenos tricíclicos). Otros componentes importantes son fenoles, éteres fenólicos, ácidos (ordinariamente esterificados), lactonas, óxidos y cumarinas. De menor importancia son los derivados furánicos, las cumaronas y las quinonas.⁹

1.3 Tratamiento de la materia prima previo a la obtención de aceites esenciales

Es necesario conocer las características de las materias primas, así como la forma en que se obtendrán los aceites esenciales. Para satisfacer las condiciones de economía, fiabilidad, resistencia a la temperatura, calidad de los aceites esenciales, es necesario el conocimiento de los siguientes factores

1.3.1 Naturaleza del material vegetal

La materia prima empleada en la extracción de los aceites esenciales, se clasifica de la siguiente manera:

- a) Semillas y frutos
- b) Hierbas y hojas
- c) Flores y pétalos
- d) Racimos y rizomas

Generalmente, las semillas, frutos, racimos y rizomas no se degradan pasado el almacenamiento. Las hierbas, hojas y flores para el corte no prevenido entre el almacenamiento y conservación se degradan y es necesario un período corto en la recolección. Para la mejor extracción del aceite esencial es necesario que el intervalo de tiempo entre el proceso de recolección y el proceso de obtención del aceite, sea de diez a treinta horas. Ciertas materias vegetales se deben reducir de tamaño y así favorecer la obtención del aceite.

1.3.2 Reducción de la partícula

La materia prima que se emplea con más frecuencia en la extracción del aceite esencial se presenta en forma de sólidos. Para aumentar la superficie de contacto y obtener la forma más apta de reacción, la operación preliminar a la extracción es generalmente la trituración.

Se debe emplear el seccionamiento que consiste en la división de los sólidos por medio de cortadoras y luego empleando una banda de cuchillas. También se debe emplear el proceso de percusión, cuyo efecto de rompimiento se realiza por golpes bruscos de martillos.

1.3.3 Técnicas de la recolección, secado y conservación de las plantas que contienen aceites esenciales

Desde el momento en que es cortada una sección del cuerpo vegetal, se produce una serie de transformaciones biológicas en la parte separada. Las células vegetales empiezan a marchitarse. Al separar la parte aérea de su raíz se provoca ante todo la interrupción del flujo alimenticio y de transpiración: ascensión del agua hasta las células, transportando los nutrientes que lleva disueltos. Si la planta no es inmediatamente extendida al aire en finas capas, corre el peligro de estropearse. Las enzimas que contiene, y que antes favorecían la formación de materias activas, empiezan ahora a descomponerla. En el organismo vegetal las anteriores reacciones de síntesis orgánica comienzan a ser suplantadas por reacciones de degradación, y el producto se transforma desde el punto de vista químico. Una forma incorrecta de secado aumenta aún más la cantidad de productos de degradación sin valor terapéutico, perdiendo así el principio activo su calidad.

El secado de las plantas medicinales y las de uso técnico-industrial, debe ser realizado por el productor o por el propio recolector. Se determina la época de la recolección, tanto de las plantas silvestres como de las cultivadas, en función del contenido de materias activas a lo largo de su ciclo vegetativo. En general deberán ponerse a secar las plantas lo más rápidamente posible después de su recolección, para evitar así que se requemen al marchitarse. Normalmente, se no se recomienda el secado a pleno sol, pues los rayos solares producen una pérdida de materias activas, un amarilleo con un rápido oscurecimiento de los vegetales y una alteración de su valor medicinal o aromático.

Las plantas recogidas por sus aceites esenciales pierden así hasta un tercio de sus materias activas. Sin embargo, se recomienda, en algunos casos excepcionales, practicar un corto secado previo al sol, para después continuar con el secado, por medio de una corriente de aire, incluso en ocasiones colocando las plantas ante un ventilador.

A menudo será necesario, antes de practicar el secado, regar la cosecha con agua, para eliminar de esa forma el polvo y las impurezas, las partículas de tierra, etc. También puede efectuarse la última fase en un secadero, junto a una fuente de calor artificial. El secado debe durar hasta la obtención de una consistencia perfectamente fiable: las partes relativamente duras deben ser fáciles de partir al curvarlas.

Un secado excesivo provoca sin embargo la pulverización de las plantas y en consecuencia, la pérdida de sus materias activas. Por el contrario, si su humedad residual permanece alta, se corre el peligro de verlas podrirse o enmohecerse durante su conservación.

En verano, en lugares cerrados, con el calor natural, las flores se secan entre tres y ocho días, las hojas entre cuatro y seis días; en otoño y primavera es necesario prever más tiempo. ¹⁰

1.4 Métodos de obtención de aceites esenciales

1.4.1 Destilación

La mayoría de aceites esenciales pueden ser siempre obtenidos por el método de destilación con vapor o generalmente por hidrodestilación. Los problemas prácticos relacionados con la destilación de plantas aromáticas son por esto de mayor importancia en la producción actual de aceites esenciales. Aceites volátiles o etéreos son mezclas de compuestos volátiles, líquidos y sólidos que varían en relación a su composición y puntos de ebullición; cada sustancia con un determinado punto de ebullición es volátil y posee una presión de vapor definida, que depende de la temperatura, y en muy pocos casos de sustancias con alto punto de ebullición.

La destilación puede ser definida como "la separación de los componentes de una mezcla de dos o más líquidos en virtud de sus presiones de vapor". El método de destilación es de vital importancia para la elaboración de aceites esenciales. En el desarrollo de la industria de aceites esenciales, hay una terminología que distingue tres tipos de hidrodestilación.

1.4.1.1 Destilación con agua

En este método, el material vegetal está en contacto directo con el agua hirviendo; éste puede flotar en el agua o estar completamente inmerso, lo cual depende de la gravedad específica y la cantidad de material por carga. El agua

es hervida por aplicación de calor por métodos usuales, por ejemplo: fuego directo, chaqueta de vapor, con serpentín de vapor, o en algunos casos, con serpentines de vapor perforado o abiertos. Este método se emplea con frecuencia para la destilación del aceite de pétalos (aceite de azahar y aceite de rosas); el material de la planta no se aglutina en pellas que el vapor no puede penetrar.

1.4.1.2 Destilación con agua y vapor

Cuando este segundo método de destilación es utilizado, el material es soportado sobre una red perforada o una reja insertada a una distancia sobre el fondo del destilador. La parte baja del destilador es llenada con agua a un nivel un poco abajo de la red y el agua puede ser calentada por alguno de los métodos previamente mencionados. Las características típicas de este método son:

- El vapor está siempre saturado, húmedo y nunca sobrecalentado
- El material está en contacto solamente con el vapor y no con el agua hirviendo.

1.4.1.3 Destilación con vapor

El tercer método conocido como destilación con vapor o destilación con vapor directo, es semejante al anterior. El vapor se genera en una caldera separada (se emplea vapor seco).

En algunos casos, se introduce vapor recalentado a presión ligeramente superior a la atmosférica, el cual sale por los orificios de un serpentín situado bajo la carga.

Considerando los principios fundamentales de la destilación de los líquidos inmiscibles, poca diferencia puede haber en estos tres métodos de hidrodestilación; pero en la práctica intervienen factores importantes. El aceite esencial no está distribuido por igual en el material de la planta, sino que se haya en muchas pequeñas glándulas de aceite, sacos odoríferos o pelos glandulares. Para que el vapor esté en contacto con el aceite, hay que desgarrar los tejidos y romper las membranas de las glándulas o hacer que el aceite se difunda a través de esas membranas. Este proceso complejo de difusión y ósmosis recibe el nombre de hidrodifusión. La destilación con vapor recalentado tiende a impedir la hidrodifusión; la destilación en agua la facilita.

1.4.2 Enfloración

Este método es llevado a la práctica sólo en países de Europa, es restringido a estas flores: jazmín, tuberosa y algunas otras que después de cortadas continúan con su actividad fisiológica formando y emitiendo perfume. El método de extracción con grasa fría es sencillo y consiste en poner en contacto las flores con una capa delgada de grasa dentro de cámaras pequeñas. Al desprenderse el perfume de las flores, se fija en la grasa, debido a su gran afinidad, y después de renovar varias veces las flores se dejan los pétalos 24 horas sobre la grasa (cuerpo). Pasados 60 días aproximadamente, al final del período de recolección, la grasa (que no ha sido renovada) llega a estar saturada con el aceite de la flor.

La extracción alcohólica de la grasa olorosa, llamada *pomada*, da una solución llamada *extracto*; eliminando el alcohol por destilación, se produce el absoluto de enfloración.

En este caso, la producción de aceite esencial de flor es mayor que con otros métodos; no obstante, este método últimamente ha sido reemplazado por extracción con solventes volátiles; porque el método de enfloración es muy delicado y un proceso muy largo que requiere mucha experiencia y tiempo.

1.4.3 Maceración

Como la mayor parte de las flores dejan de producir perfume después de recolectadas, se pueden emplear ventajosamente otros métodos distintos de la enfloración. Uno de ellos es la maceración, o extracción con grasa caliente.

El método es, en general, parecido a la enfloración, salvo que los pétalos se sumergen en grasa caliente en lugar de ser extendidos sobre un recipiente. La maceración es un método breve y produce: pomadas, extractos y absolutos de pomada, correlativos de los productos de enfloración. En general, los productos de la maceración son de calidad inferior a los de la extracción con solventes volátiles.

1.4.4 Extracción con solventes volátiles

De igual aplicación, este método, es hoy utilizado para muchos tipos de flores en varios países. Está basado en el hecho de que los solventes volátiles penetran rápidamente en los pétalos y disuelven, con las ceras y algunas materias colorantes, casi todas las sustancias odoríferas naturales.

La eliminación del disolvente a baja temperatura da un aceite concentrado, semisólido, llamado *concreto*. Este producto puede ser tratado con alcohol de gran concentración, en el cual no son solubles la mayor parte de las ceras; después de la refrigeración, para eliminar la mayor cantidad posible de cera disuelta, la solución alcohólica se concentra a presión reducida para obtener un absoluto sin alcohol.⁹

1.5 Rectificación de los aceites esenciales

Una destilación con arrastre de vapor, una destilación al vacío o cualquier otro tipo donde se aplique una segunda destilación a un aceite esencial, puede ser considerada como una rectificación. La destilación fraccionada a presión reducida presenta muchas ventajas como lograr que los puntos de ebullición desciendan considerablemente, suprime la acción oxidante del aire sobre los productos calientes. Para llevar a cabo la destilación fraccionada de compuestos orgánicos de peso molecular medio o alto, la cantidad de calor necesaria, aún a presión reducida, es tal que provoca la destrucción de la molécula.

Dada la necesidad de destilar y separar estos productos, se empieza a emplear la técnica de destilación molecular, que está basada en la evaporación y no en la ebullición de los diferentes componentes.¹¹

1.6 Análisis de los aceites esenciales

Los fines principales del análisis de los aceites volátiles son el descubrimiento de adulteración y la evaluación de la calidad de un aceite no adulterado. Rara vez se realiza un análisis para identificación.

Inicialmente se hace un examen preliminar y organoléptico, en el cual se coloca una muestra del aceite en un frasco o probeta graduada. Se observan el color, la claridad, la viscosidad, la presencia o ausencia de sedimento, las ceras separadas y el agua. A continuación se caracteriza la muestra por medio de una cromatografía gaseosa, para identificar los principales componentes, y de ser posible cuantificarlos. Finalmente se evalúan sus propiedades fisicoquímicas como densidad, rotación óptica, solubilidad e índice de refracción. También se ejecutan pruebas especiales según el aceite que se está ensayando como: contenido de ésteres, contenido total de alcoholes, punto de congelación, residuo de evaporación, contenido de aldehídos, etc.⁹

1.7 Cuidado y preservación de los aceites esenciales

Generalmente, el deterioro es atribuido a reacciones de oxidación, resinificación, polimerización, hidrólisis de ésteres o interacción de grupos funcionales. Estos procesos parecen estar activados por calor, aire (oxígeno), humedad, luz y en algunos casos posiblemente por metales.

Se aconseja que cualquier aceite esencial sea tratado antes de almacenarlo, removiéndole impurezas metálicas, humedad y materia suspendida. Los envases deben quedar completamente llenos, colocándose en un lugar fresco y protegido de la luz.

Antes de sellar los recipientes, es conveniente burbujear nitrógeno o anhídrido carbónico para desalojar del envase la cámara de aire que pudiera haber quedado dentro del aceite.¹¹

1.8 Usos y aplicaciones de los aceites esenciales

Los aceites esenciales tienen una gran variedad de aplicaciones, sus propiedades más apreciadas son sus olores. Por ejemplo, el jabón, perdería muchos de sus atractivos si no tuviera un olor agradable debido a la aplicación de aceites esenciales. Este concepto es aplicable también a muchos artículos de consumo, como lociones, perfumes, desodorantes ambientales y cosméticos en general. Además de su aplicación como aromatizantes, algunos de ellos son usados como saborizantes en bebidas y alimentos. Otra relevante aplicación de los aceites esenciales es la que se les da con fines terapéuticos.¹²

2. MÉTODO DE INVESTIGACIÓN

2.1 Localización

- Concesión comunitaria forestal de Carmelita, Petén, Guatemala: región donde se recolectó, limpió y secó el fruto de *Protium copal*.
- Laboratorio de investigaciones de química de productos naturales, de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos: en este laboratorio se realizó la molienda de la materia prima y la extracción del aceite esencial.
- Unidad de análisis instrumental de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos: en estas instalaciones se realizó la caracterización preliminar del aceite esencial del *Protium copal*, por cromatografía de gases, así como la determinación de las siguientes propiedades físicas: peso específico, índice de refracción y solubilidad.

2.2 Recursos Humanos

Autora de la investigación: Mildred Carmina López Orizábal

Asesora de la investigación: Inga. Qca. Telma Maricela Cano Morales

Coasesor de la investigación: Lic. Mynor Hernández

2.3 Recursos Materiales

Para cada unidad experimental

- 35 gramos de materia prima
- 500 ml de agua desmineralizada
- 30 gramos de cloruro de sodio
- 10 ml de hexano
- 1 gramo de sulfato de sodio
- kilogramos de hielo
- 50 ml de acetona
- Agua para recirculación y Baño María
- 5 ml de xilol para el refractómetro
- 25 ml de hidróxido de sodio al 5% (solubilidad)
- 25 ml de bicarbonato de sodio al 5% (solubilidad)
- 25 ml de ácido clorhídrico al 5% (solubilidad)
- 25 ml de ácido sulfúrico concentrado (solubilidad)

2.4 Equipo y cristalería

- Aparato de la farmacopea europea para destilación
- Rotavapor
- Balanza analítica
- Plancha de calentamiento
- Bomba hidráulica
- Centrífuga
- Cromatógrafo de gases
- Picnómetro de 1ml
- Refractómetro
- Manguera de caucho
- Soportes
- Pinzas
- Cronómetro
- Papel filtro
- Pizeta
- Recipiente para agua de recirculación
- Balón de destilación
- Balón de 100 ml para rotavapor
- Balón de 1,000 ml
- Earlenmeyer de 50 ml
- Tubos de ensayo
- Varillas de agitación
- Perlas de ebullición
- Viales de 1 ml
- Micropipetas con bulbo
- Beackers de 50 ml

2.5 Metodología

2.5.1 Diseño del experimento

El rendimiento de aceite esencial de la cáscara del fruto del *Protium copal* se evaluó por medio de la hidrodestilación a tres diferentes tiempos de destilación: una, dos y tres horas. De esta manera se obtuvo tres tratamientos con cinco repeticiones cada uno, es decir quince observaciones.

2.5.2 Diseño de tratamientos

Se aplicó un modelo completamente al azar a un estudio factorial con tres tratamientos para el único factor y cinco repeticiones de cada tratamiento, por lo que se obtuvo un total de quince datos, los cuales fueron interpretados por medio de un análisis de varianza.

2.5.3 Unidad experimental y variable respuesta

Cada unidad experimental correspondió a 35 gramos de la cáscara del fruto del *Protium copal* destilados bajo las siguientes condiciones: método de hidrodestilación, tamaño de partícula 1.4-1.7mm, temperatura de condensación 4°C y variando tres tiempos de destilación: una, dos y tres horas.

La variable respuesta fue el rendimiento de aceite esencial de 35 gramos de materia prima, extraído a partir de las condiciones mencionadas anteriormente.¹³

2.5.4 Manejo del experimento

a) Preparación de la materia prima

Secado: el secado se realizó al aire libre en la aldea de Carmelita, Petén a una temperatura de 32°C.

Molienda: la granulometría se realizó en el laboratorio de química industrial, con los siguientes números de tamices: 12, 14, 20, 30, 35 y 50.

b) Destilación del aceite esencial

- Armar el equipo como se muestra en la figura 6 (apéndice C).
- Colocar 35 grs. de muestra vegetal en un balón de destilación de 1,000 ml.
- Agregar solución de cloruro de sodio al 5% a la muestra vegetal.
- Colocar agua en la región de descarga del aparato de destilación, hasta el nivel de descarga hacia el balón que contiene el material vegetal.
- Agregar 2 ml de hexano sobre el agua en la sección de descarga.
- Encender bomba hidráulica para recircular el agua del condensador.
- Agregar calor con la plancha de calentamiento hasta que se inicie la ebullición.
- Dejar destilar durante una, dos y tres horas .
- Apagar plancha de calentamiento y esperar que termine de producir condensado.
- Recolectar el destilado de la región de descarga en un tubo de ensayo.
- Agregar más hexano en la región de descarga.
- Centrifugar el condensado durante cinco minutos.
- Separar la solución de hexano del agua con micropipetas.

- Agregar 0.1 gramos de sulfato de sodio anhidro a la solución recuperada, hasta secar totalmente.
- Limpiar el balón del rotavapor, secarlo y tararlo.
- Trasladar la solución al balón del rotavapor y eliminar hexano a un vacío de 350 mm de Hg, y una temperatura en el Baño María de 45° celsius; hasta que no se observe recolección de hexano en el recuperador.
- Aplicar vacío máximo durante 10 segundos.
- Evaporar hexano remanente en la campana durante 12 horas.
- Pesar el balón para determinar la cantidad de aceite obtenido.

c) Análisis del aceite esencial obtenido

Cromatografía de gases

Equipo y método utilizado

Cromatógrafo en fase gaseosa Hewlett Packard 5890 serie II.

Inyector split (1:100). Con divisor de flujo hacia dos columnas. Temperatura: 250 °C.

Cantidad inyectada: 0.2 µl.

Fase móvil: nitrógeno (1 ml/min).

Columnas: ambas de sílice fundido, de 60 metros por 0.25mm y 0.25 M de espesor de fase estacionaria.

Fases: HPWax (Carbowax 20 M) unida químicamente y HP-1 (metil silicona) unida químicamente.

Programación del horno: 60 °C por 3 minutos, luego a razón de 3 °C/min.

Hasta 220 °C, constante por 40 minutos.

Detectores: 2 FID. Temperatura: 225 °C.

Identificación de los picos: por tr en dos fases distintas, y por comparación con bases de datos del Dr. Arnaldo L. Bandoni.¹⁴

Peso específico

- El picnómetro perfectamente limpio y seco se pesa (P1).
- Llevar el picnómetro hasta el borde con agua destilada, y colocar el termómetro-tapadera, se producirá un pequeño rebalse por el canal lateral; colocar la tapadera del canal lateral. Secar perfectamente y pesar (P2).
- Vaciar el picnómetro y secar, llenar con la muestra, y pesar (P3).¹⁵

$$\text{Peso específico} = (P3 - P1) / (P2 - P1)$$

Índice de refracción

- Filtrar la muestra para eliminar cualquier impureza y trazas de humedad.
- Ajustar la temperatura en el refractómetro (para aceites esenciales 20°); limpiar los prismas con xilol y verter unas gotas de la muestra en el prisma inferior, ajustando ésta contra el prisma superior en forma tal que quede entre ellos una capa de muestra libre de burbujas de aire.
- Dejar en reposo de 1 a 2 minutos o hasta que la muestra alcance la temperatura que corresponda.
- Girar los prismas hasta que el campo aparezca dividido en una porción oscura y otra iluminada, procurando que en la separación de ambas porciones no aparezca una banda de dispersión, sino una línea nítida. Se ajusta la posición de esta línea de modo que pase por el punto de intersección de los hilos del retículo y se lee sobre la escala el valor del índice de refracción de la muestra.¹⁵

Solubilidad

- Colocar 0.2 ml de la muestra en un tubo de ensayo.
Añadir, e porciones, 3 ml del solvente a usar.
- Agitar vigorosamente después de la adición de cada porción de disolvente, poniendo especial atención en mantener la mezcla a la temperatura ambiente. Si el compuesto se disuelve totalmente, anotarlo y continuar con otros solventes. ¹⁶

2.5.5 Análisis de la información

Modelo estadístico

$$Z_{(i, j, k)} = X_i + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

$Z_{(i, j, k)}$ = variable respuesta de la i, j, k-ésima unidad de tratamiento

X_i = efecto del i-ésimo tratamiento

$\epsilon_{i, j, k}$ = efecto del error experimental ¹³

Análisis estadístico

Los resultados que se obtuvieron a partir del diseño de tratamientos indicado anteriormente, se interpretaron por medio de un análisis de varianza con el objeto de aceptar o rechazar las hipótesis estadísticas planteadas.

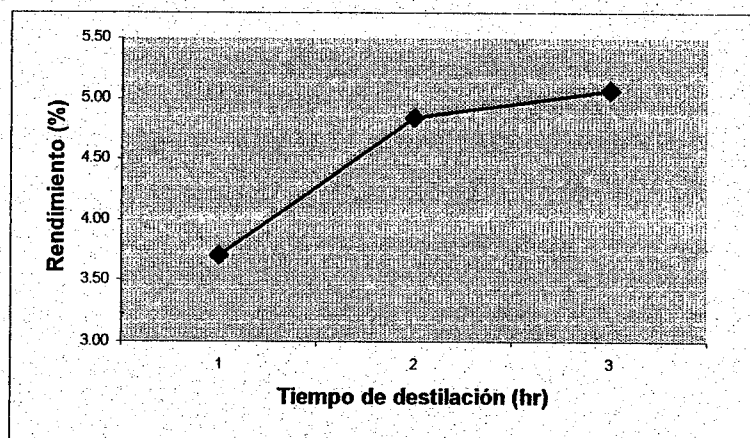
3. RESULTADOS

Tabla I. Rendimiento (%) de aceite esencial de la cáscara del fruto de *Protium copal*, a tres distintos tiempos de destilación.

REPETICIÓN	TIEMPO DE DESTILACIÓN		
	1 HORA	2 HORAS	3 HORAS
1	3.78	4.80	5.24
2	4.16	4.65	5.78
3	3.36	4.97	4.23
4	3.60	5.00	5.74
5	3.59	4.76	4.33

Fuente: tabla VI , apéndice D.

Gráfica 1. Rendimiento (%) de aceite esencial de la cáscara del fruto de *Protium copal* en función del tiempo de destilación.



Fuente: tabla VI, apéndice D

Tabla II. Resultados del análisis de varianza de los rendimientos de aceite esencial de la cáscara del fruto de *Protium copal*.

Fuente de variación	G.L.	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Fo	F _{0.05,2,12}
Tratamientos	2	5.3549	2.6774	12.00	3.89
Error	12	2.6772	0.2231		
Total corregido	14	8.0321			

Coefficiente de correlación (R)	Coefficiente de variación (C.V.)	Raíz media del error estándar	Rendimiento promedio
0.8165	10.4205	0.4723	4.5327

Fuente: Programa SAS de computadora

Tabla III. Resultados de la prueba de Tukey para los rendimientos de aceite esencial de la cáscara del fruto de *Protium copal*.

Agrupamientos de Tukey	Medias	Repeticiones	Tiempo
A	5.064	5	3
A	4.836	5	2
B	3.698	5	1

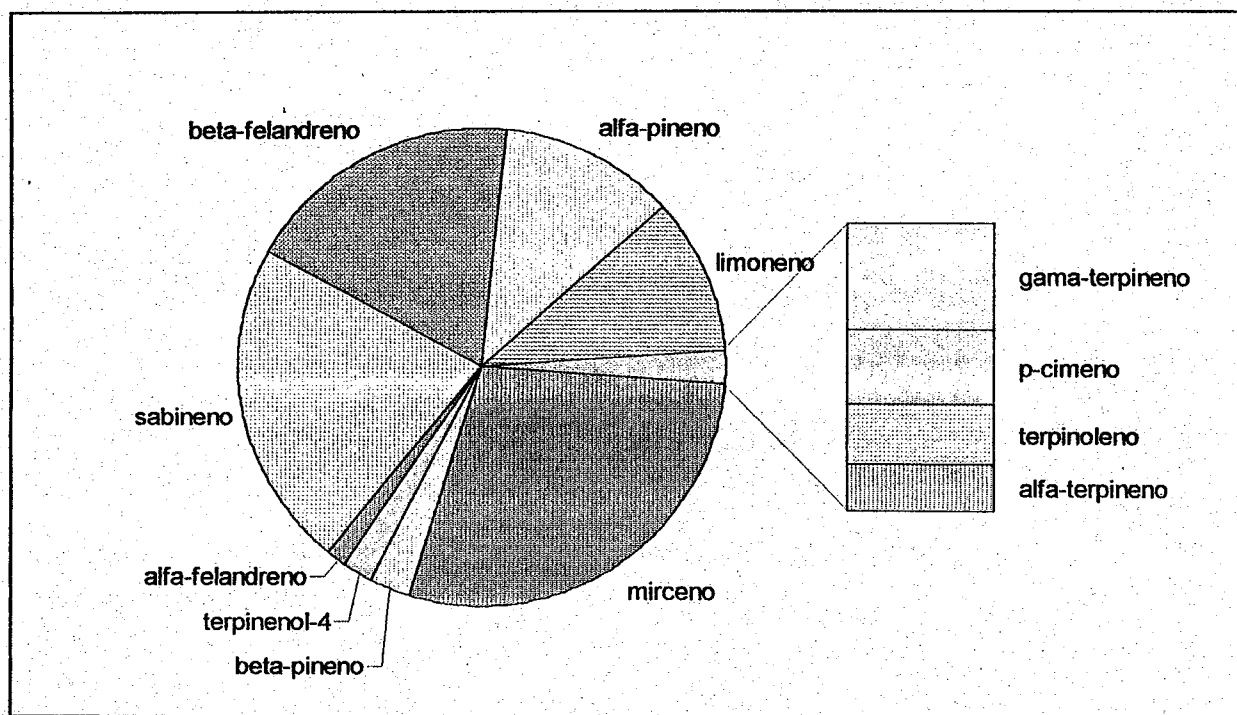
Fuente: Programa SAS de computadora

Tabla IV. Composición química del aceite esencial de la cáscara del fruto de *Protium copal*.

COMPUESTO	(%)
α -pineno	9.6
Sabineno	18.6
Mirceno	23.9
β -pineno	2.2
α -felandreno	1.1
α -terpineno	0.3
<i>p</i> -cimeno	0.5
Limoneno	8.8
β -felandreno	15.5
γ -terpineno	0.7
Terpinoleno	0.4
Terpineno/-4	1.8
No identificados	16.6

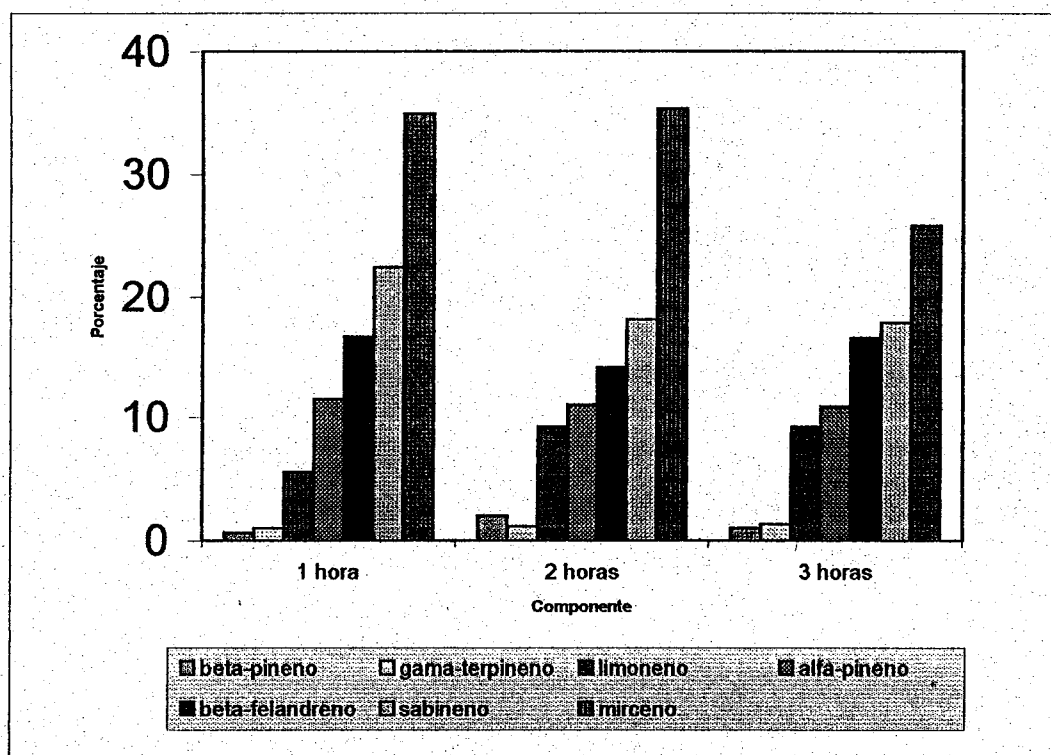
Fuente: Figuras 8 y 9 del apéndice F

Gráfica 2. Composición química del aceite esencial de la cáscara del fruto de *Protium copal*.



Fuente: Tabla IV, sección de resultados

Gráfica 3. Composición química del aceite esencial de la cáscara del fruto de *Protium copal* comparativa en tres tiempos de destilación.



Fuente: Tabla 9 del apéndice F

Tabla V. Propiedades fisicoquímicas del aceite esencial de la cáscara del fruto de *Protium copal*.

Peso específico (d_{20})	0.7855
Índice de refracción (n_D^{20})	1.4602
Solubilidad en H_2O	(-)
Solubilidad en HCl al 5%	(-)
Solubilidad en NaOH al 5%	(+)

Fuente: Tabla VII, apéndice D

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Para alcanzar los objetivos del presente estudio se realizó un diseño experimental aleatorizado, tomando en cuenta que existen variables que afectan directa o indirectamente el rendimiento y composición química del aceite esencial, algunas de éstas controlables y otras no controlables.

Entre las variables que inciden en el rendimiento y composición química del aceite esencial, que fueron controladas en el diseño del presente experimento, están: el método de destilación, tamaño de partícula, tamaño de muestra, temperatura de condensación y tiempo de destilación.

Entre los métodos de destilación de aceites esenciales se prefirió el método de hidrodestilación o cohobación, porque cuenta con la ventaja de ser un método práctico, puesto que no necesita agregado de agua y no se recoge aparte el vapor condensado, evitando así la precaución de extraer el aceite esencial proveniente del agua de arrastre.⁹

La exposición de las células aceitosas, el área de transferencia y la cantidad de compartimentos abiertos para que fluya libremente el vapor dependen de la trituración de la materia prima a utilizar. Sin embargo, cuando el método a utilizar es la hidrodestilación, el tamaño de partícula que no afecta el proceso de destilación es de 1-2mm, dependiendo de la planta a utilizar. En el caso del *Protium copal* se trituró la cáscara seca del fruto y después se hizo la granulometría, la cual indicó un tamaño de partícula de 1.4-1.7mm.¹⁷

También se fijó un valor puntual de 35 gramos para el tamaño de muestra, debido a que previas experiencias hechas con otras plantas, por ejemplo, romero, ajo y jengibre demostraron que no es eficiente saturar demasiado de materia prima el equipo para la destilación, principalmente porque el vapor no fluye por todos los espacios intersticiales y por ende, el rendimiento disminuye. Lo mismo sucedió en tres pruebas preliminares que se realizaron con el *Protium copal*, evaluando someramente los inconvenientes de alimentar cantidades menores de 30 gramos y mayores de 35 gramos.

Los aceites esenciales tienen por principales constituyentes a los terpenos, familia de compuestos sumamente volátiles, razón por la cual es tan necesario controlar la temperatura a la que se destilan éstos, es decir, la temperatura de condensación, que no debe exceder de 10°C. Sin embargo, para el diseño experimental del presente estudio se logró minimizar y fijar la temperatura de condensación hasta un valor de 4 °C , temperatura que permitió asegurar que no se volatilizarán las fracciones más livianas del aceite esencial de *Protium copal*. (Véase figuras 10, 11 y 12).

Los diferentes constituyentes del aceite esencial, se obtienen por fraccionamiento de acuerdo al orden de sus puntos de ebullición. Así, las fracciones de alta ebullición serán las últimas en destilar, generalmente con muy poco aceite. Las destilaciones rápidas pierden componentes de alto punto de ebullición, por lo que el tiempo de destilación debe ser elegido con cuidado, de tal manera que se extraigan desde los componentes más livianos hasta los más pesados, obteniendo así datos confiables respecto a la composición química del aceite esencial. De acuerdo al criterio del Lic. Mynor Hernández, el tiempo de destilación adecuado para la extracción del *Protium copal*, varía entre una y tres horas.¹⁸

Aplicando los criterios que preceden se realizó un diseño experimental simple, en el que la variable respuesta (rendimiento del aceite esencial de la cáscara del fruto de *Protium copal*) se determinó en función del tiempo de destilación (único factor) en tres niveles diferentes: una, dos y tres horas, y eligiendo como variables controlables del proceso el método de destilación, la temperatura de condensación y el tamaño de partícula y muestra.

Para mayor confiabilidad de los resultados se realizaron cinco repeticiones para cada unidad experimental, obteniéndose los rendimientos tabulados y graficados en la página inicial de la sección de resultados, datos que se distribuyen normalmente.

De la tabla I y su respectiva gráfica se pueden observar a simple vista dos hechos importantes: que el rendimiento de aceite esencial depende del tiempo de destilación y que la extracción de aceite esencial durante una hora da rendimientos menores que cuando se destila durante dos y tres horas. Sin embargo, la interpretación objetiva de estos datos, se realizó por medio del análisis de varianza, mostrados en la Tabla II.

La fuente de variación del experimento se debió a los tratamientos y al error experimental, ambos con dos y doce grados de libertad, respectivamente. De aquí se observa que la media de cuadrados entre tratamientos es mayor que la media de cuadrados del error dentro de tratamientos, lo que indica la baja probabilidad de que las medias de tratamientos sean iguales, es decir, que la hipótesis nula se rechace y se acepte la hipótesis alterna.

Puesto que se acepta la hipótesis alterna con un índice de confiabilidad del 95% y un coeficiente de variación válido para el experimento realizado (10.42), entonces, se deduce que sí existe una diferencia significativa en al menos un par de los tratamientos, para los niveles evaluados del factor tiempo de destilación. Esta diferencia es significativa en los rendimientos de aceite esencial obtenidos para una hora de destilación, comparados con dos y tres horas de destilación. No obstante, no existe diferencia significativa entre los rendimientos de aceite esencial durante dos y tres horas de destilación.

La tabla III, muestra los resultados de la prueba de Tukey, también llamada "agrupamientos de Tukey", pues, como su nombre lo indica, agrupa bajo la misma literal las medias de la variable respuesta, cuando no existe diferencia significativa entre éstas.¹³ Como se observa en la tabla III, las medias para los rendimientos de aceite esencial extraídos durante dos y tres horas (5.064% y 4.836%, respectivamente), están agrupados con la letra A, pues entre ambas medias no existe diferencia significativa, no así para la media de los rendimientos de aceite esencial, extraídos durante una hora de destilación (3.698%), la cual está en el grupo B, debido a que difiere significativamente con las medias de dos y tres horas de destilación, resultados que coinciden con los del análisis de varianza.

La composición química del aceite esencial de la cáscara del fruto de *Protium copal* se muestra en la tabla IV y la gráfica 2, ambas extraídas de la cromatografía de gases realizada e interpretada por el Dr. Arnaldo L. Bandoni. (El equipo y método utilizado por el Dr. Bandoni, se especifican en la página 18 de este informe).

Este aceite esencial está constituido principalmente por mirceno, sabineno, β -felandreno, α -pineno y limoneno; hidrocarburos muy volátiles, de los cuales se sabe que solamente el α -pineno y el limoneno tienen aplicaciones importantes en las industrias de la perfumería, saborizantes y en la síntesis de aceites esenciales.

Por ejemplo, el principal uso del α -pineno es en la obtención sintética del borneol, alcanfor y terpineol. Fracciones que contienen α y β -pineno son ampliamente usadas como solventes y como aditivos de muchas preparaciones odorizantes. Por ejemplo, las sales de baño, sprays, desinfectantes, insecticidas, etc. Últimamente el α y β -pineno son usados para la síntesis de aceite artificial de pino blanco.

En cambio, el limoneno es ampliamente empleado para perfumar cosméticos, jabones y toda clase de productos técnicos, así como para dar sabor a productos farmacéuticos. Uno de los usos más importantes del limoneno es en la simulación de aceites cítricos y generalmente en imitación de aceites esenciales.

Sin embargo, el aceite esencial extraído de la cáscara del fruto de *Protium copal* es una fuente natural de mirceno, sabineno y β -felandreno, de los cuales se desconoce aún las aplicaciones prácticas que puedan tener en la industria, por lo que es necesario darle continuidad al presente estudio.

Los constituyentes minoritarios del aceite esencial de la cáscara del fruto de *Protium copal* son: β -pineno, terpinenol-4, α -felandreno, γ -terpineno, *p*-cimeno, terpinoleno y α -terpineno, algunos como el *p*-cimeno y terpinoleno utilizados como odorizantes para disfrazar olores desagradables y en la síntesis de otros compuestos. ¹

La gráfica 3 muestra la comparación de los componentes del aceite esencial de la cáscara del fruto de *Protium copal* en función de los tres tiempos de destilación evaluados. Esta gráfica está basada en la cromatografía de gases realizada e interpretada por la Licda. Silvia Echeverría (figuras 10, 11 y 12). Como se puede observar en esta gráfica, se reportan los mismos componentes para los tres tiempos de destilación, lo que indica que aún destilando hasta tres horas, no se obtuvo ningún otro componente pesado, ni se perdió ningún componente volátil. Sin embargo, esta gráfica carece de algunos componentes minoritarios (α -felandreno, terpinenol-4, *p*-cimeno, terpinoleno y α -terpineno), por ser poco representativos.

Para concretar el segundo objetivo específico planteado en el presente estudio, se determinaron las propiedades fisicoquímicas del aceite esencial de la cáscara del fruto de *Protium copal*, datos que se muestran en la tabla V. Estos resultados son comparables con otros aceites esenciales, comúnmente más livianos que el agua, índices de refracción entre 1.44-1.47, insolubles en agua y otros compuestos inorgánicos, además de sus propiedades cualitativas como su olor, intenso y agradable, similar al de los frutos cítricos y color amarillo claro.

Con los resultados obtenidos referentes a la caracterización y cuantificación del aceite esencial de la cáscara del fruto de *Protium copal*, se aportaron datos confiables para darle continuidad al estudio del aceite esencial del *Protium copal* y se contribuyó al desarrollo de la investigación científica de especies vegetales nativas de Guatemala, es decir, que se alcanzaron los objetivos generales del presente estudio.

CONCLUSIONES

1. El factor tiempo de destilación afecta significativamente el rendimiento de aceite esencial de la cáscara del fruto de *Protium copal*, en al menos uno de los niveles evaluados.
2. El rendimiento de aceite esencial de la cáscara del fruto de *Protium copal* extraído durante dos y tres horas de destilación es significativamente mayor que el rendimiento obtenido durante una hora de destilación.
3. La composición química del aceite esencial de la cáscara de fruto de *Protium copal*, no se ve afectada por el factor tiempo de destilación, en los niveles evaluados.
4. El aceite esencial extraído de la cáscara del fruto de *Protium copal* es una fuente natural de mirceno.

RECOMENDACIONES

1. Evaluar los rendimientos de aceite esencial de la cáscara del fruto de *Protium copal* en un rango intermedio de tiempos de destilación entre una y dos horas y más allá de tres horas, bajo las mismas condiciones del presente estudio.
2. Evaluar los rendimientos y la composición química del aceite esencial de la cáscara del fruto de *Protium copal* utilizando otros métodos de destilación.
3. Confirmar los componentes mayoritarios del aceite esencial de la cáscara del fruto de *Protium copal* por espectros de masas.
4. Realizar pruebas de extracción de aceite esencial de la cáscara del fruto de *Protium copal* a nivel planta piloto y comparar los rendimientos para un rango de 1-4 horas de destilación.
5. Realizar un estudio y análisis de costos de la extracción de aceite esencial de la cáscara del fruto de *Protium copal* a nivel planta piloto.
6. Hacer estudios sistematizados para evaluar la farmacología, farmacognosia, toxicología e indicaciones terapéuticas del aceite esencial de la cáscara del fruto de *Protium copal*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ernest Guenther. **The essential Oils**. Editorial Van Nostrand, U.S.A. 1996. Vol I Pp. 118-140. Vol. II Pp. 8-69, 198-199 y 258-265.
2. Sergio Ortiz. **La producción de aceites esenciales en Guatemala y sus posibilidades de ensanchamiento**. (Tesis Ingeniero Agrónomo. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, 1959.) Pp. 7-19.
3. Miguel Arnoldo Lemus Gudiel. **Propuesta de un escalonamiento a nivel Industrial de la obtención de aceites esenciales de la cáscara de naranja a partir de la optimización de la extracción a nivel de planta piloto**. (Tesis Ingeniero Químico. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, 1993.) Pp. 9-25.
4. Juan José Rodríguez. **Determinación de una combinación de variables apropiadas en la extracción del aceite de la hoja de eucalipto a partir de la evaluación de métodos de extracción convencionales**. (Tesis Ingeniero Químico. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, 1993.) Pp. 13-45.
5. Leo Amado Mérida Noriega. **Determinación del conjunto de variables, apropiadas para el proceso de extracción de aceite de pulpa de aguacate con solventes, a partir de pruebas a nivel de laboratorio y a nivel de planta piloto**. (Tesis Ingeniero Químico. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, 1994.) Pp. 1-50.
6. Ruth Emilsa Reyes Barrera. **Extracción de aceite esencial de la semillade ambrette (Hibiscus Abelmoschus, Linn) por medio de éter etílico variando el tiempo de agitación y la cantidad de semilla molida a un volumen constante de 100 ml**. (Tesis Ingeniera Química. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, 1996.) Pp. 2-35.
7. Benjamín Piedrasanta Batz. **Extracción de aceite esencial de romero con la aplicación del método de destilación por arrastre de vapor, variando los tamaños de batch a partir de pruebas a nivel de laboratorio y pruebas a nivel de planta piloto**. (Tesis Ingeniero Químico. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, 1997.) Pp. 3-42.
8. Simon Commerford. Guatemala, 9 de julio de 1998. Comunicación personal.

9. Raymond Kirk *et al.* Enciclopedia de Tecnología Química. (Unión Tipográfica, Editorial Hispano-americana, España, 1961) Vol. I Pp. 61-81.
10. Armando Cáceres. Plantas de uso medicinal en Guatemala. (Editorial Universitaria, Guatemala 1996). Pp. 19-23.
11. H. Küster *et al.* Importancia de los aceites esenciales naturales y sus perspectivas para el futuro. (Editorial Dragoco, España, Reporte 1971). Pp. 10-17.
12. E.J. Parry. Chemistry of essential oils and artificial perfumes. (4ta. Edición, Inglaterra, s.p.i. 1992.) Vol. I, Pp. 12-25.
13. Douglas Montgomery. Diseño y análisis de experimentos. (Grupo Editorial Iberoamérica, México 1991). Pp. 5-25.
14. Arnaldo L. Bandoni. Guatemala, 22 de octubre de 1998. Comunicación por correo electrónico. abandoni@infovia.com.ar.
15. Beatriz Medinilla. Manual de Laboratorio de Farmacognosia. (Universidad de San Carlos, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Escuela de Química Farmacéutica, Departamento de Análisis Aplicado, Guatemala, 1996). Pp. 5-7.
16. Ralph Shriner *et al.* Identificación Sistemática de Compuestos Orgánicos. (Traducción: Xorge Domínguez. Editorial Limusa, México 1988). Pp. 68-71 y 81-86.
17. Ronald Giovanni Monzón Castellanos. Determinación del rendimiento de aceite esencial de hoja de naranja agria (*Citrus aurantium*) en función del tamaño de partícula y el tamaño de muestra obtenido por medio del proceso de arrastre con vapor. (Tesis Ingeniero Químico. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala 1998.) Pp. 39 , 41.
18. Mynor Hernández. Guatemala, 12 de junio de 1998. Comunicación personal.
19. Paul Standley *et al.* Flora Of Guatemala. (Fieldiana: Botany.1946). Volume 24, part V, Pp. 442

BIBLIOGRAFÍA

1. AKTHAR, Husain. **Major Essential Oil-bearing Plants of India**. Editorial Interprises, New Delhi, India. 1969. Pags. 12-96.
2. ANDERSEN, A. J. *et al.* **Refining of oils and fats**. 2nd ed. England: Pergamon Press. 1962. Pags. 34-40.
3. ARCTANDER, Steffen. **Perfume and flavor chemicals (aroma chemicals)**. Published by the Author 1969, Montclair, N.J. (U.S.A.). Printed in Denmark. Volume II, Pags. 201-674.
4. BERNARDINI, E. **Tecnología de aceites esenciales y grasas**. España: Editorial Alhambra, S.A. 1,981. Pags. 1-125.
5. GREENBERG, León A. *et al.* **Handbook of cosmetic materials**. U.S.A. Interscience Publishers, inc. 1954. Pags. 1-192.
6. LEUNG, Albert Y. **Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetics**. New Jersey, U.S.A.: Wiley-Interscience publication, Pags. 32-141.
7. RETAMAR, Juan Alberto. **Aceites Esenciales de especies vegetales diversas, sus posibilidades químicas**. IPNAYS, CONICET-UNL-FIQ. Santiago del Estero, Santa Fe- Argentina, 1982. Pags. 15-347.
8. WINGROVE, Alan, *et al.* **Química Orgánica**. Trad. Lic. Alicia Chu Pulido. Editorial Harla S.A. de C.V., México 1984. Pags. 600-784.

APÉNDICE A

INFORMACION GENERAL DEL PROTIUM COPAL

Sinonimias

Pom (Maya)

Pom-té (Quecchi)

Nombres populares

Copal

Chom

Descripción botánica

Especie de árbol de la familia *burceraceae*, de tamaño medio, alrededor de 30 metros de altura, con tronco grueso, de madera morena, ligeramente rojiza hacia la zona medular, textura media, uniforme, resinosa, moderadamente pesada o subpesada, compacta, fuerte y resistente. Las hojas son largas y lisas, puntiagudas, subagudas a la base, algunas veces abruptamente cortas, enteras, correosas, de 10 a 18 centímetros de largo. Las flores, sostenidas en manojos mezclados o menos frecuentemente en racimos; comúnmente dioicas, los pétalos con estambres bicíclicos, granos de polen binucleares, endosperma envuelto nuclear. La fruta de 1.5 a 3 centímetros de largo, de mesocarpo carnoso y endocarpo leñoso y con una sola semilla o germen aceitoso.

Hábitat

Se encuentra con relativa abundancia en los bosques de América Central y América del Sur. En las selvas húmedas o secas, principalmente a 350 metros o menos. En Guatemala existe en el Petén, Alta Verapaz, Izabal, San Marcos, Quiché y Huehuetenango.

Historia

Los indígenas del altiplano como Chichicastenango y San Francisco El Alto, lo utilizaban en ritos religiosos como incienso. Los antiguos mayas utilizaban la resina como barniz.

Usos medicinales atribuidos

La resina se utiliza para curar heridas y para enfermedades respiratorias; además, se le atribuyen propiedades analgésicas.

Otros usos populares

El copal es quemado en incensarios, emitiendo humo con un fragante olor, para aromatizar y alejar insectos del ambiente.¹⁹

Farmacología, composición química, farmacognosia, toxicología e indicaciones terapéuticas aún no investigadas.

APÉNDICE B

Figura 4. Fotografía del fruto de *Protium copal*



Fuente: Herbario BIGUA de la Facultad de Farmacia USAC

APÉNDICE B-1

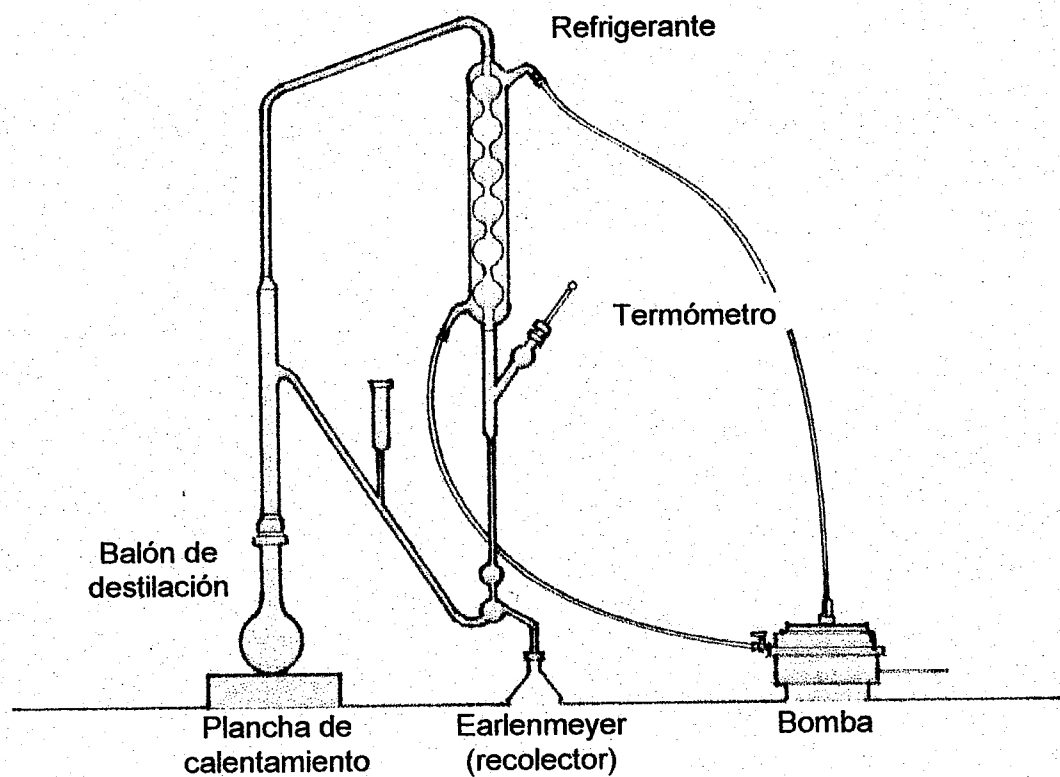
Figura 5. Fotografía de la flor de *Protium copal*



Fuente: Herbario BIGUA de la Facultad de Farmacia USAC

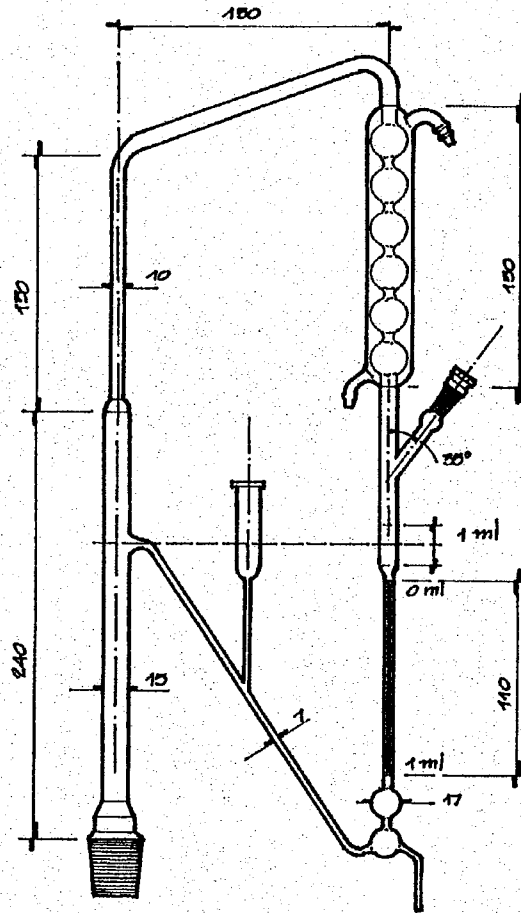
APÉNDICE C

Figura 6. Esquema del equipo utilizado para la destilación del aceite esencial



APÉNDICE C-1

Figura 7. Detalle del aparato para hidrodestilación de la farmacopea europea.



Fuente: Página 19. Farmacopea europea de Stahl y Schild

APÉNDICE D

DATOS ORIGINALES

Tabla VI. Cantidad de aceite esencial extraído de la cáscara del fruto de *Protium copal*, obtenido en cada unidad experimental.

REPETICIÓN	TIEMPO DE DESTILACIÓN		
	1 HORA	2 HORAS	3 HORAS
1	1.3231	1.6779	1.8342
2	1.4560	1.6275	2.0231
3	1.1759	1.7395	1.4805
4	1.2601	1.7502	2.009
5	1.2565	1.6701	1.5155

Tabla VII. Propiedades fisicoquímicas del aceite esencial de la cáscara del fruto de *Protium copal* determinadas en cada tiempo de destilación.

PROPIEDAD	TIEMPO DE DESTILACIÓN		
	1 HORA	2 HORAS	3 HORAS
d_{27}	0.7802	0.7798	0.7797
n_D^{27}	1.4568	1.4572	1.4570
Sol. H ₂ O	-	-	-
Sol. HCl 5%	-	-	-
Sol. NaOH 5%	+	+	+

APÉNDICE E

MUESTRA DE CÁLCULO

1. Cálculo del rendimiento de aceite esencial:

$$R(\%) = \frac{\text{masa de aceite}}{\text{masa de materia prima}} * 100$$

Ejemplo: $R(\%) = \frac{1.3231 \text{ g}}{35 \text{ g}} * 100 = 3.78\%$ (Repetición 1, 1 hora destilación)

2. Cálculo del peso específico del aceite esencial:

$$d_t = \frac{(P3 - P1)}{(P2 - P1)}$$

Donde:

d_t = peso específico a la temperatura ambiente en °C

P1 = peso del picnómetro vacío

P2 = peso del picnómetro más agua

P3 = peso del picnómetro más aceite

Ejemplo: $d_{27} = \frac{15.0963 - 11.3308}{16.1590 - 11.3308} = \frac{3.7655}{4.8282} = 0.7799$ (Promedio)

3. Corrección de temperatura para el peso específico:

$$d_{20} = d_t + 0.0008 (t-20)$$

Ejemplo: $d_{20} = 0.7799 + 0.0008 (27-20) = 0.7855$ (Promedio de las tres horas)

4. Corrección de temperatura para el índice de refracción:

$$n_D^{20} = n_D^t + 0.00045 (t - 20)$$

Donde:

n_D^{20} = índice de refracción a 20 °C

n_D^t = índice de refracción a la temperatura ambiente en °C

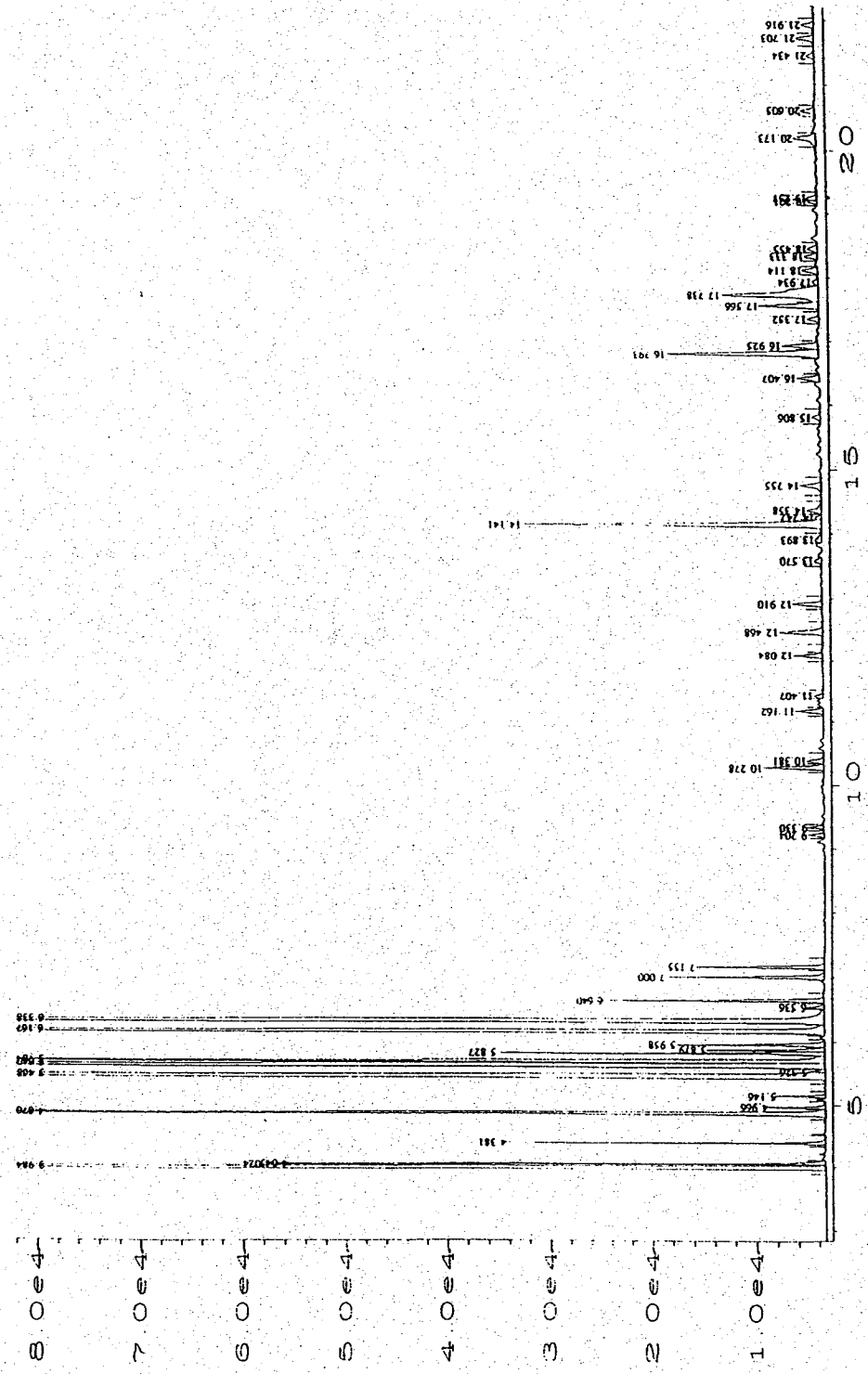
Ejemplo: $n_D^{20} = 1.4570 + 0.00045 (27-20) = 1.4602$ (Promedio de las tres horas)

Nota: el cálculo de muestra del análisis de varianza se realizó con la ayuda del paquete SAS para computadora.

APÉNDICE F

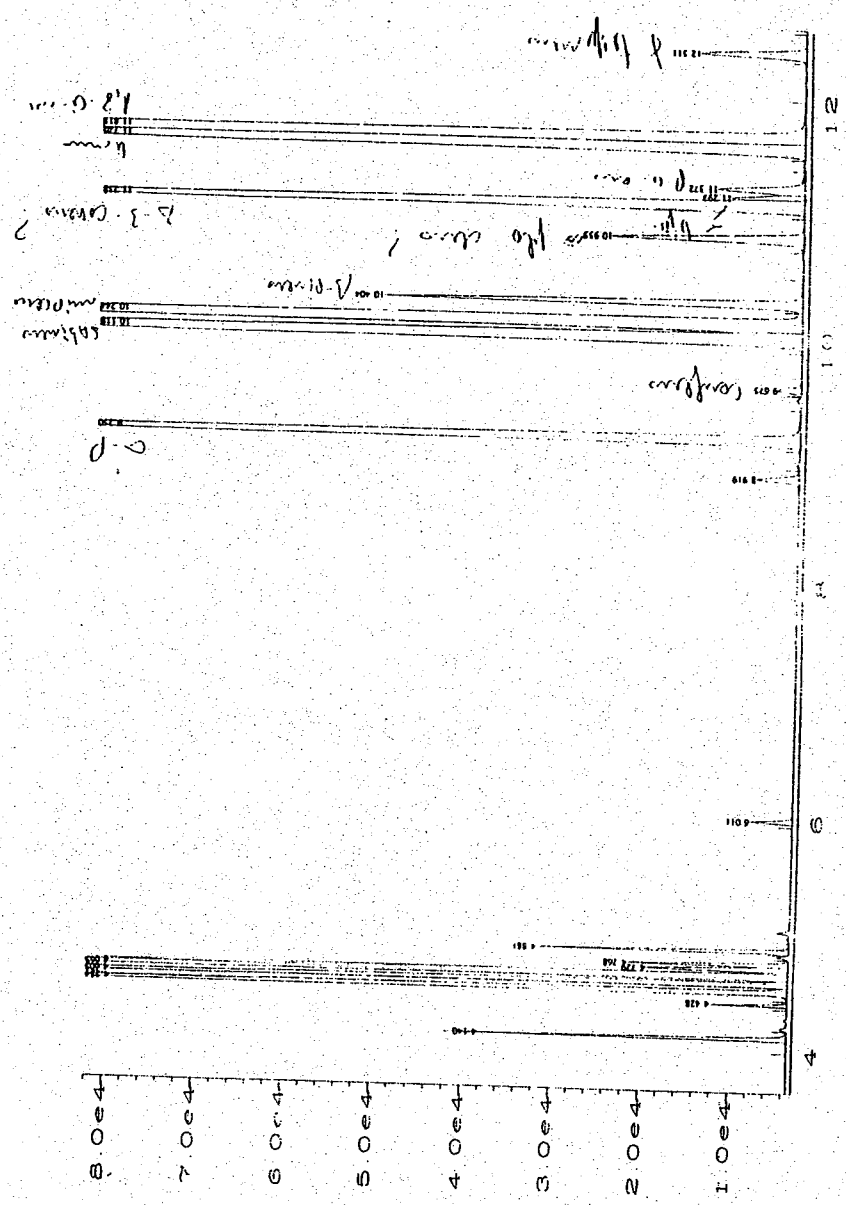
INFORME DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES

Figura 8. Cromatograma del aceite esencial de la cáscara del fruto de *Protium copal*



Fuente: Dr. Arnaldo L. Bandoni.

Figura 9. Cromatograma con identificación de los componentes del aceite esencial de la cáscara del fruto de *Protium copal*



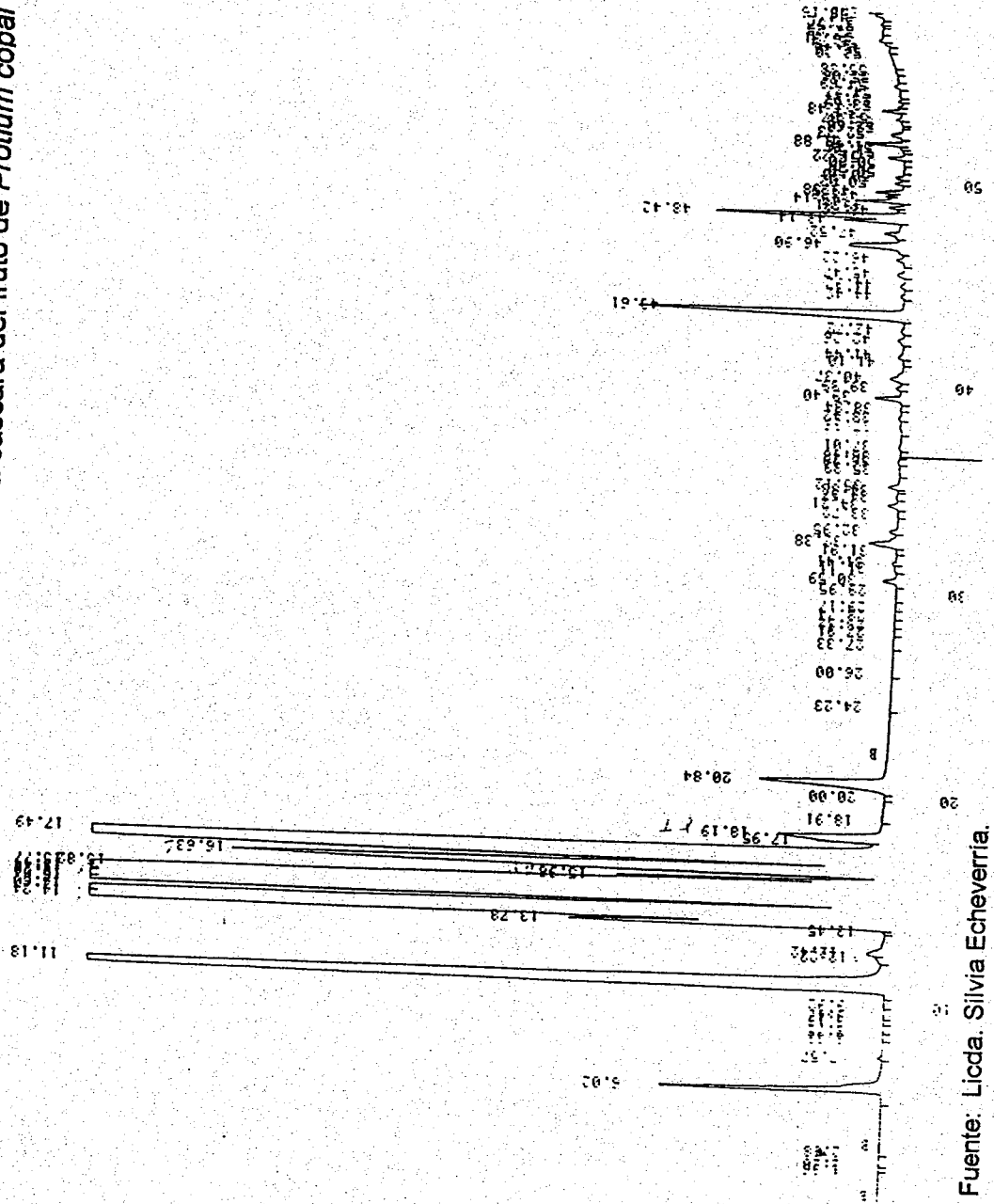
Fuente: Dr. Arnaldo L. Bandoni.

Tabla VIII. Composición química del aceite esencial de la cáscara del fruto de *Protium copal* comparativa en tres tiempos de destilación.

Compuesto	Porcentajes (%)		
	1 HORA	2 HORAS	3 HORAS
α -pineno	11.5	11.0	10.9
Camfeno	0.2	0.2	Presente
Sabineno	22.4	18.1	17.8
Mirceno	34.9	35.3	25.8
β -pineno	0.6	2.0	1.0
Limoneno	5.6	9.2	9.2
β -felandreno	16.7	14.1	16.6
γ -terpineno	1.0	1.1	1.3
No identificados	7.1	9.0	17.5

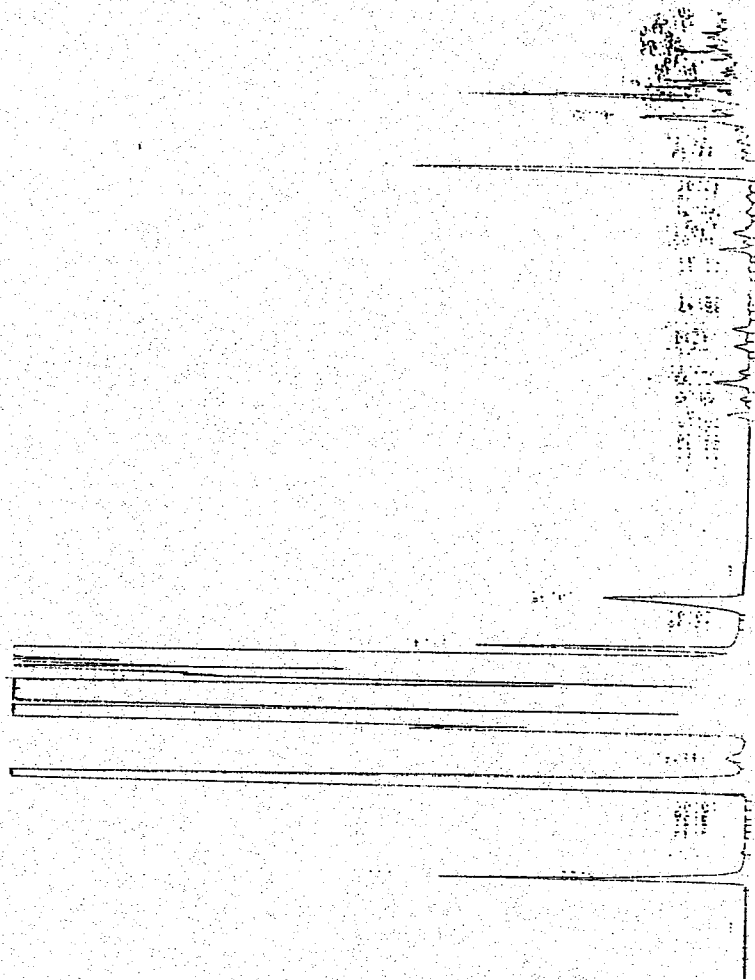
Fuente: Figuras 10, 11 y 12.

Figura 10. Cromatograma del aceite esencial de la cáscara del fruto de *Protium copal*, destilado durante una hora



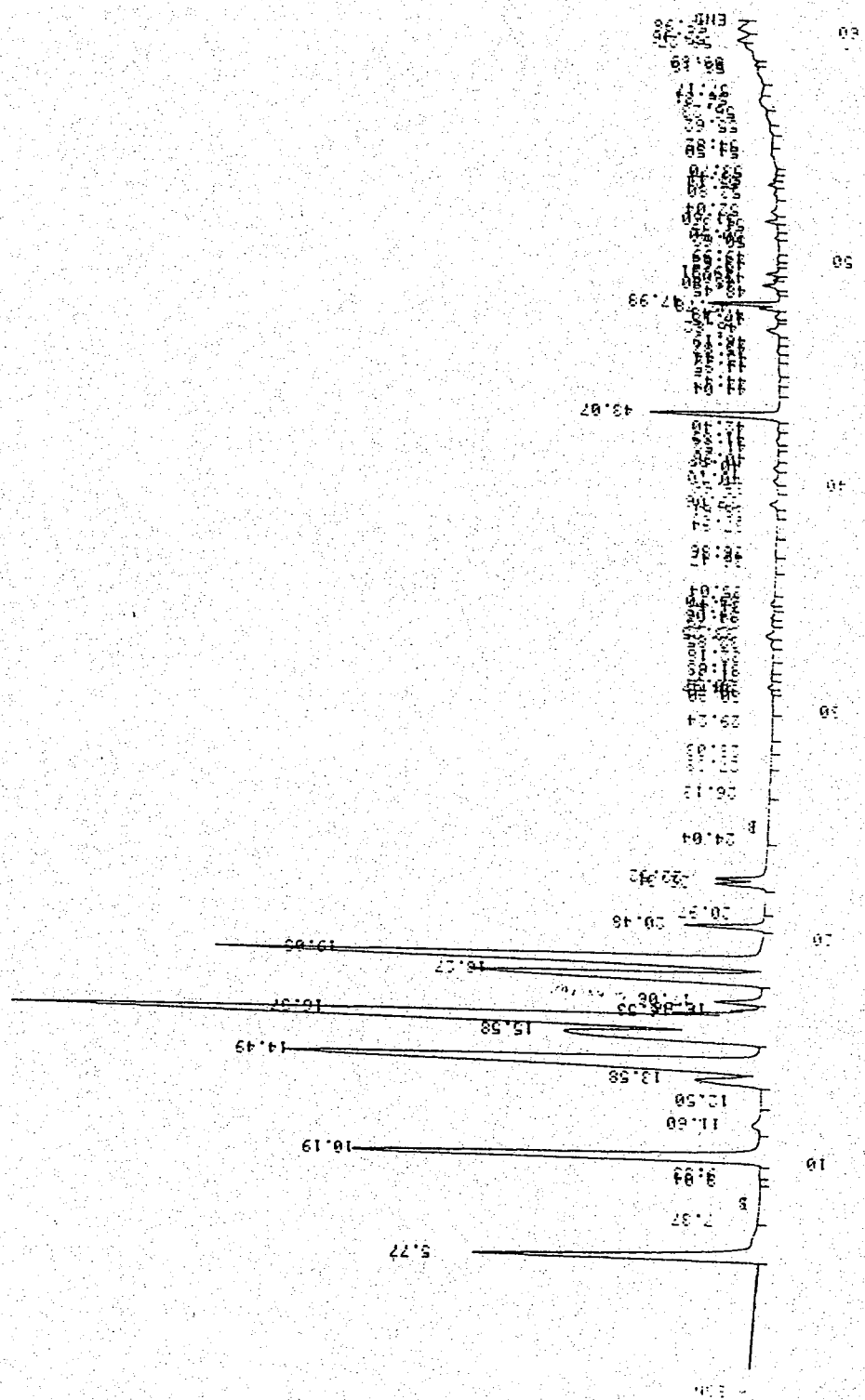
Fuente: Licda. Silvia Echeverría.

Figura 11. Cromatograma del aceite esencial de la cáscara del fruto de *Protium copal*, destilado durante dos horas



Fuente: Licda. Silvia Echeverría.

Figura 12. Cromatograma del aceite esencial de la cáscara del fruto de *Protium copal*, destilado durante tres horas



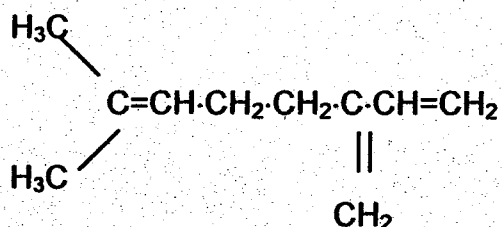
Fuente: Licda. Silvia Echeverría.

APÉNDICE G

INFORMACIÓN GENERAL DE LOS COMPONENTES MAYORITARIOS DEL ACEITE ESENCIAL DE LA CÁSCARA DEL FRUTO DE PROTIUM COPAL¹

Mirceno: (2-metil-6-metileno-2,7-octadieno) C₁₀H₁₆

Estructura:



El mirceno posee el mismo esqueleto de carbón que el linalool.

Ocurrencia: se ha encontrado cantidades significativas de mirceno en el aceite de laurel (*Myrcia acris*). También en aceite de verbena (*Lippia citriodora*), aceite de gálbano y en el aceite de té de limón.

Aislamiento: el aceite de laurel es tratado con Hidróxido de sodio en solución y la porción insoluble repetidamente fraccionada en vacío.

Propiedades: debido a la facilidad de la polimerización de estos hidrocarburos saturados, las variaciones en los datos fisicoquímicos registrados son considerables. Las más definitivas constantes parecen ser aquellas reportadas por Palkin y Wells, listadas a continuación:

T_b = 166° - 167° (760 mmHg)

d₄²⁰ = 0.791

n_D²⁰ = 1.465

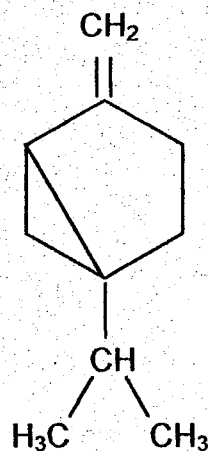
El mirceno en general, es más estable que su isómero ocimeno. Constantemente el mirceno sufre polimerización en ambos; dimirceno $C_{20}H_{32}$ y también a polimirceno $(C_{10}H_{16})_x$. Ambos forman nitrositos con bajo punto de ebullición: 163° .

Cuando es tratado con permanganato de potasio acuoso, el mirceno es oxidado a ácido succínico. La polimerización del mirceno causa decaimiento de su solubilidad en alcohol. Esta es la razón principal, por la que los aceites de té de limón pierden su originalmente buena solubilidad en alcohol. También al oxidar mirceno con dióxido de selenio, se obtiene mircenol y ácido mircénico.

Uso: no se ha encontrado ningún uso en las industrias de perfumería y saborizantes.

Sabineno: (1-isopropil-4-metilenobiciclo (3.1.0) hexano) $C_{10}H_{16}$

Estructura:



Ocurrencia: *d*-sabineno es el principal constituyente (aproximadamente del 30%) del aceite de sabina (*Juniperus sabina* L.) Está presente también en los aceites de cardamomo y mejorana.

l-sabineno se encuentra en el aceite destilado a partir de semillas de *Xantoxylum budrunga* Wall, en aceite de savina y *Vitex negundo*, Linn.

dl-sabineno ocurre en el aceite de *cubeba* y en el aceite de las hojas de *Murraya koenigii* Spreng.

Aislamiento: por destilación fraccionada de aceite de savina y otros.

Propiedades: las propiedades físicas del sabineno, como se registran en la literatura, varían considerablemente. Simonsen registró los siguientes valores promedio:

d-sabineno

$$T_b = 163^\circ - 165^\circ \text{ (760 mmHg)}$$

$$d_4^{20} = 0.842$$

$$(\alpha)_D = -80^\circ 10'$$

$$n_D^{20} = 1.465$$

l-Sabineno

$$T_b = 161^\circ - 163^\circ \text{ (760 mmHg)}$$

$$d_4^{20} = 0.8407$$

$$(\alpha)_D = -46^\circ 11'$$

$$n_D^{20} = 1.465$$

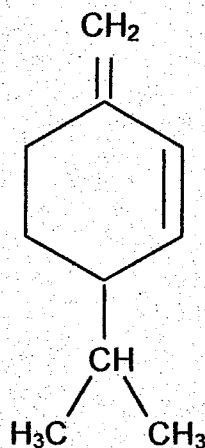
El sabineno tiene la tendencia a pasar dentro de los derivados del α -terpineno; por ejemplo, en agitación con ácido sulfúrico en frío, el sabineno es transformado en terpinen-4-ol (ópticamente activo) y en 1,4-terpeno.

En ebullición con ácido sulfúrico diluido, el sabineno pasa a terpineno. Con ácido clorhídrico, ácido bromhídrico y otros, el sabineno forma terpineno y dihalogenuros de terpeno.

Uso: el sabineno, como tal, no se ha utilizado en la industria de perfumes y sabores, no obstante, su olor agradable.

β -felandreno: (1-metileno-4-isopropil-2-ciclohexano) $C_{10}H_{16}$

Estructura:



Ocurrencia: al igual que el α -felandreno, el β -felandreno ocurre en forma dextro y levorotatoria: *d*- β -felandreno se encuentra en el aceite de anís, angélica, hinojo, jengibre africano, etc. El *l*- β -felandreno en aceite de pimienta japonesa, aceite de trementina del *Pinus contorta*, etc. β -felandreno de rotación desconocida ha sido observado en el aceite de limón, canela, eucalipto, etc.

Aislamiento: por destilación fraccionada en vacío.

Propiedades: β -felandreno es un líquido que posee un peculiar, pero no desagradable olor.

Se reportaron las siguientes propiedades para el *d*- β -felandreno:

T_b = 171° - 172° (760 mmHg)

$d_4^{20} = 0.852$

$(\alpha)_D = +14^\circ45'$ a $18^\circ32'$

$n_D^{20} = 1.4788$

El β -felandreno puro tiene una rotación óptica aproximada $(\alpha)_D = 65^\circ$. Los valores reportados son mucho más bajos, debido a la mezcla del *dl*- β -felandreno.

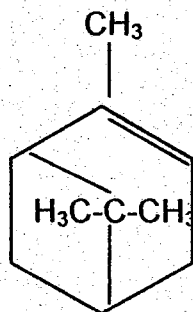
En la destilación bajo presión atmosférica, el β -felandreno sufre polimerización, la cual es acompañada por la inversión de la actividad óptica. El β -felandreno es muy inestable. En ebullición prolongada y destilación a presión atmosférica, se polimeriza a difelandreno.

La oxidación en presencia de luz solar del β -felandreno produce 4-isopropil-2-ciclohexen-1-ona. Cuando actúa con ácido clorhídrico en solución alcohólica, el β -felandreno se convierte en dihidrocloruro de terpineno.

Uso: no ha sido aprovechado, raramente es usado en la industria de los perfumes y sabores.

α -pineno: (4,6,6-trimetilbiciclo-(3-1.1.)-3-hepteno) $C_{10}H_{16}$

Estructura:



Ocurrencia: muchas formas de este terpeno han sido encontradas en productos naturales. α -pineno está presente en muchos aceites destilados de hojas, cortezas y maderas. Forma el principal constituyente del aceite de trementina destilado a partir de la oleorresina de muchos géneros y especies pertenecientes a la familia *Pinaceae*.

d- α -pineno ocurre en el aceite de trementina de Grecia (*Pinus halepensis* Mill) (cerca del 95%), en el aceite de trementina de Rusia (*Pinus sylvestris*) (cerca del 81%), en aceite de madera del Hinoki (aproximadamente 70%), en el aceite destilado a partir de la madera de *Chamaecyparis lawsoniana* Parl. (cerca del 60%); pequeñas cantidades fueron encontradas en el aceite de trementina americana y en muchos otros aceites esenciales.

l- α -pineno ocurre en aceite de trementina española (*Pinus laricio monspeliensis* Hort.) (cerca del 90%), en aceite de trementina de Austria (*Pinus laricio* variedad austriaca Endl.) (cerca del 96%), en aceite de trementina de Francia y de América, en aceite de *Pinus pumilio*, en aceite de *Abies alba* y en muchos otros aceites esenciales.

dl- α - pineno ha sido encontrado en aceite de limón, olíbano (incienso), semillas de culantro, semillas de comino, pimienta americana, etc.

α y β -pineno probablemente se encuentran como mezclas en muchos aceites que contienen pinenos, el poder rotatorio de las fracciones ha sido aproximadamente determinado por la preponderancia del *d* ó *l*-rotación. Este rasgo es importante en el aislamiento de las formas ópticamente activas de las fracciones del aceite esencial.

Aislamiento: α -pineno puede ser aislado de aceites esenciales por destilación fraccionada y subsecuente purificación.

d- α -pineno puede obtenerse, por ejemplo, del aceite esencial de trementina griega, calentando inicialmente el aceite con hidróxido de potasio sólido, destilando con vapor de agua y después refraccionando el terpeno en sodio metálico.

l- α -pineno puede obtenerse del aceite esencial de trementina de Francia, por medio del tratamiento del aceite con carbonato de sodio, y después purificándolo por destilación fraccionada, recolectando la fracción principal destilada cerca de 156° a 760 mmHg.

El α -pineno es uno de los pocos terpenos que pueden ser obtenidos fácilmente, pero no ópticamente puros. Para obtener el inactivo α -pineno, inicialmente debe transformarse a un nitrosocloruro. Estos *dl*-productos pueden ser descompuestos calentándolos con anilina en solución alcohólica. El α -pineno obtenido de esta manera siempre es ópticamente inactivo.

Propiedades: el α -pineno es un líquido aceitoso incoloro, como muchos terpenos, se resinifica parcialmente al exponerse al aire.

Este hidrocarburo tiene una tendencia a isomerizarse bajo la influencia del calor, ácidos o catalizadores. A continuación las propiedades físicas de isómeros ópticos del α -pineno:

Constante	<i>d</i> - α -pineno:	<i>l</i> - α -pineno:	<i>dl</i> - α -pineno
Tb _{760 mmHg}	156° - 156.52°	156°-157°	156.2°
Tf	-57°	-55°	-120.2°
d_4^{20}	0.8584-0.86	0.8590-0.8598	0.8582-0.8592
(α) _D	+51°8'	-51°17'	...
n_D^{20}	1.4658-1.4663	1.4662-1.4670	1.4658-1.4664

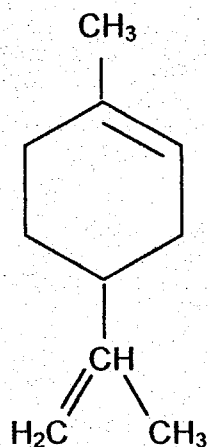
Como otros terpenos bicíclicos el α -pineno muestra una tendencia hacia rearrreglos moleculares, principalmente a sustancias con diferentes estructuras de anillo, esto puede ser causado por oxidación, hidrogenación, hidratación o por la acción de ácidos como catalizadores o calor, etc. Estas reacciones han cobrado gran importancia técnica para la síntesis del borneol, alcanfor y otros productos.

Usos: el principal uso del α -pineno es en la obtención sintética del borneol, alcanfor y terpineol. El α -pineno también es útil como un componente importante de muchos aceites esenciales artificiales.

Fracciones que contienen α - y β -pineno son ampliamente usadas como solventes y como aditivos de muchas preparaciones odorizantes. Por ejemplo, las sales de baño, sprays, desinfectantes, insecticidas, etc. Últimamente el α y β -pineno son usados para la síntesis de aceite artificial de pino blanco.

Limoneno: (1-metil-4-isopropenil-1-ciclohexano) $C_{10}H_{16}$

Estructura:



Ocurrencia: el limoneno es uno de los terpenos más ampliamente distribuidos, ocurre en muchos aceites volátiles, en algunos como el principal constituyente, especialmente en aceite de cítricos.

d-limoneno: (formalmente llamado carveno o citreno), ha sido identificado en aceite de naranja (cerca del 90%), limón, mandarina, lima, toronja, bergamota, nerolí, elemí, alcaravea (40%), eneldo, hinojo, apio (60%), etc.

l-limoneno: ocurre en los aceites de pino, *Abies alba*, trementina, anís, santónico americano, pimienta, hierbabuena, resina de copal, *Eucalyptus staigeriana*.

En muchos casos en los cuales el limoneno ha sido registrado como un constituyente de aceites esenciales, pero la rotación óptica se ha especificado.

Aislamiento: el limoneno puede ser aislado desde aceites volátiles por destilación fraccionada y redestilación sobre sodio metálico. El limoneno crudo es finalmente purificado, por la preparación de su tetrabromuro y por la reducción del tetrabromuro con zinc en solución alcohólica.

Otro método para la bromación es por reducción con magnesio metálico en éter, para preparar una muestra pura de limoneno.

Un método completamente diferente, pero que produce alrededor de 35% de limoneno, es por medio del tratamiento de la fracción de limoneno en solución de éter con acetato de mercurio durante 48 horas. El precipitado formado es descompuesto con aluminio y carbonato de sodio y el limoneno fraccionado.

Propiedades: aparentemente ha sido difícil preparar limoneno libre de isómeros, por muchas razones las observaciones hechas por muchos autores no siempre son parecidas. El limoneno ha sido objeto de muchas investigaciones importantes, iniciándose con la teoría de Born-Gans, relativa a la determinación del poder rotatorio. Naves y Angla han aplicado el principio del efecto del solvente en la rotación óptica del limoneno.

Las propiedades listadas a continuación han sido reportadas, después de estudios cuidadosos tanto del limoneno natural como del sintetizado.

Constante	<i>l</i> -limoneno	<i>d</i> -limoneno	<i>dl</i> -limoneno
T _b 760 mmHg	177.6°-178°	177.6-178°
d ₄ ²⁰	0.8407	0.8403	...
(α) _D	-122°6'	+126°8'
n _D ²⁰	1.4747	1.4725

Después de experimentar con la oxidación del limoneno con ozono, Escourrou expresó que el limoneno siempre contiene algún terpinoleno y α -terpineno; en otras palabras, el limoneno es una mezcla de isómeros de hidrocarburos difíciles de separar. De esta manera el producto examinado por Escourrou consistía de 80% de limoneno, 12% de terpinoleno y 8% de α -terpineno.

El limoneno es de color amarillo pálido y posee un agradable olor parecido al de la naranja. Cuando es protegido del aire y la luz, el limoneno es relativamente estable; de otra forma se oxida fácilmente. Este puede ser destilado a presión atmosférica sin descomponerse.

Mezclando el *d* y *l*-limoneno se produce el dipenteno inactivo ópticamente. Éste es formado también si los limonenos ópticamente activos son calentados o tratados con ácidos. Así, el limoneno o dipenteno, cuando es tratado con ácido clorhídrico en presencia de humedad, produce dicloruro de dipenteno. Este dihidrocloruro también ha sido preparado por la saturación con una solución fría de el terpeno en ácido acético glacial, con ácido clorhídrico.

La acción de los ácidos en frío puede causar hidratación y la formación de terpineol e hidrato de terpino, pero en calentamiento los alcoholes pueden deshidratar otra vez los hidrocarburos. En calentamiento con ácidos minerales, el limoneno es convertido en terpineno y algún *p*-cimeno. Oxidando el limoneno con una solución de permanganato de potasio diluida, se ha obtenido *p*-mentan-1,2,8,9-tetrol (limonetrilo).

La autoxidación del limoneno a carvon y carveol bajo la influencia de aire y humedad es probablemente uno de los principales factores que reducen el alto contenido de limoneno en los aceites que lo contienen: aceite de cítricos, por ejemplo. Esto es particularmente notable en aceites de naranja viejos, parecido a la alcaravea, considerando esto en el aceite de limón, es enmascarado por un olor a *p*-cimeno originado tal vez por la oxidación del isocitral.

Usos: el limoneno es ampliamente empleado para perfumar cosméticos, jabones y toda clase de efectos técnicos, así como para dar sabor a productos farmacéuticos. Uno de los usos más importantes del limoneno es en la simulación de aceites cítricos y generalmente en imitación de aceites esenciales.

En cualquier uso contemplado para el limoneno, el fabricante y/o usuario debe informarse acerca de investigaciones preliminares, en las que el producto fue reportado como la causa de dermatitis y debe manejarlo y prepararlo con precaución.