



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE INGENIERO QUÍMICO

**Caracterización química y física del aceite esencial de *Ambrossia peruviana*
(Marco) obtenido por extracción tradicional y fluidos supercríticos.**

TRABAJO DE TITULACIÓN.

AUTOR: Hidalgo Ramírez, Francisco Daniel.

DIRECTOR: Valarezo Valdez, Benito Eduardo, Ph.D.

LOJA – ECUADOR



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

2018

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Ph.D.

Benito Eduardo Valarezo Valdez

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

Que el presente trabajo, denominado: **Caracterización química y física del aceite esencial de *Ambrossia peruviana* (Marco) obtenido por extracción tradicional y fluidos supercríticos** cumple con los requisitos establecidos en las normas generales para la graduación en la Universidad Técnica Particular de Loja, tanto en el aspecto de forma como de contenido, por lo cual me permito autorizar su presentación para los fines pertinentes.

Loja, febrero del 2018.

f.....

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Francisco Daniel Hidalgo Ramírez declaro ser autor del presente trabajo de titulación: **Caracterización química y física del aceite esencial de *Ambrossia peruviana* (Marco) obtenido por extracción tradicional y fluidos supercríticos**, de la titulación de Ingeniería Química, siendo Benito Eduardo Valarezo Valdez director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Formar parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la universidad”

f) _____

Autor: Francisco Daniel Hidalgo Ramírez

Cédula: 1716000847

DEDICATORIA

Para Francisco, Jannet, Michelle, Omar y Claudia; por ser mi apoyo incondicional para alcanzar esta meta.

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer a mis padres, su ayuda ha sido muy importante para alcanzar esta meta. A Michelle, por estar presente y ser mi pilar fundamental para la finalización de este trabajo. Agradezco a mi director Dr. Eduardo Valarezo, y revisores Dr. Miguel Ángel Meneses y Dr. Jorge Ramírez, por su ayuda y guía para la correcta realización del presente trabajo de titulación.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I.....	4
1 MARCO TEÓRICO.....	5
1.1 Aceites Esenciales.....	5
1.1.1. Clasificación.....	5
1.1.2. Extracción de los aceites esenciales.....	6
1.1.2.1. Expresión.....	6
1.1.2.2. Destilación por arrastre de vapor o hidrodestilación.....	7
1.1.2.3. Extracción con fluidos supercríticos.....	8
1.1.3. Caracterización de los aceites esenciales.....	12
1.1.3.1. Cromatografía de gases.....	13
1.1.4. Propiedades de los aceites esenciales.....	14
1.1.5. Usos y aplicaciones de los aceites esenciales.....	15
1.2. Plantas Medicinales.....	15
1.3. Flora Ecuatoriana.....	16
1.4. La familia Asteraceae.....	16
1.4.1. <i>Ambrossia peruviana</i>	17
CAPÍTULO II.....	19
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
2.1. Metodología experimental.....	20
2.2. Recolección de la materia vegetal.....	20
2.2.1. Determinación de la humedad relativa.....	21
2.2.2. Tratamiento post cosecha de la muestra vegetal.....	22

2.3.	Extracción.....	23
2.3.1.	Destilación del aceite esencial.....	23
2.3.1.1.	Determinación del Rendimiento.....	24
2.3.2.	Descripción del proceso de extracción supercrítico.....	24
2.3.3.	Determinación de propiedades físicas.....	25
2.4.	Determinación composición química.....	27
2.4.1.	Cromatografía de gases.....	27
2.4.1.2.	Cromatografía en columna DB-5 MS acoplada a espectrometría de masas.....	28
2.4.1.3.	Cromatografía en la columna HP – INOWAX acoplada a espectrometría de masas.....	29
2.4.2.	Identificación de compuestos químicos.....	30
CAPÍTULO III		31
3	RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	32
3.1.	Recolección de la materia vegetal.....	32
3.1.1	Humedad relativa de <i>Ambrossia peruviana</i>	32
3.2.	Extracción.....	33
3.2.1.	Obtención del Aceite esencial de <i>Ambrossia peruviana</i> mediante destilación con arrastre de vapor.....	33
3.2.2.	Obtención de extractos de partes aéreas de la planta <i>Ambrossia peruviana</i>	34
3.3.	Propiedades físicas.....	35
3.3.1.	Densidad relativa del aceite esencial de <i>Ambrossia peruviana</i>	35
3.3.2.	Índice de refracción del aceite esencial de <i>Ambrossia peruviana</i>	35
3.4.	Composición química.....	36
3.4.1.	Análisis cualitativo del aceite esencial de <i>Ambrossia peruviana</i> extraído mediante destilación con arrastre de vapor.....	36
3.4.2.	Análisis cualitativo del extracto de <i>Ambrossia peruviana</i> obtenido mediante extracción con CO ₂ -SC.....	42
3.4.2.1.	Espectros de Masas de los compuestos no identificados.....	43
CONCLUSIONES.....		52
RECOMENDACIONES.....		53
BIBLIOGRAFÍA.....		54
ANEXOS.....		58

ANEXO 1: Determinación de humedad relativa.....	59
ANEXO 2: Determinación del porcentaje de rendimiento.....	60
ANEXO 3: Determinación de densidad relativa a 20°C.....	61
ANEXO 4: Determinación del índice de refracción.....	63
ANEXO 5: Bibliografía Índice de Kovats.....	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades críticas de los fluidos supercríticos.....	11
Tabla 2. Humedad relativa de <i>Ambrossia peruviana</i> recolectada	33
Tabla 3. Rendimiento (v/p) del aceite esencial de <i>Ambrossia peruviana</i>	34
Tabla 4. Densidad del aceite esencial de <i>Ambrossia peruviana</i>	36
Tabla 5. Índice de refracción del aceite esencial de <i>Ambrossia peruviana</i>	37
Tabla 6. Composición química del aceite de <i>Ambrossia peruviana</i> (GS/MS columna no polar DB-5 y columna polar HP-INOWAX).....	38
Tabla 7. Compuestos detectados en columna DB5-MS del extracto obtenido con dióxido de carbono supercrítico CO ₂ -SC.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de destilación por arrastre de vapor.	8
Figura 2. Diagrama de fases sólido/líquido/gas, Fluido supercrítico.	10
Figura 3. Proceso básico de extracción supercrítica.	12
Figura 4. Aplicaciones de los aceites esenciales en las diferentes industrias.	15
Figura 5. <i>Ambrosia peruviana</i>	18
Figura 6. Esquema del procedimiento de obtención del aceite esencial de <i>Ambrossia peruviana</i> , y pasos para determinar composición química y propiedades físicas.	20
Figura 7. Mapa de la provincia de Loja.	21
Figura 8. Determinación de humedad relativa de <i>Ambrossia peruviana</i> , lámpara de calentamiento modelo ULTRA X.	22
Figura 9. Muestra vegetal de <i>Ambrossia peruviana</i> deshidratada y triturada para extracción con dióxido de carbono supercrítico (CO ₂ -SC).	23
Figura 10. Destilador tipo Clevenger.	24
Figura 11. Aceite esencial <i>Ambrossia peruviana</i>	24
Figura 12. Diagrama de flujo del equipo de fluidos supercríticos, laboratorio de Alimentos de la Universidad Técnica Particular de Loja.	25
Figura 13. Determinación de densidad relativa.	26
Figura 14. Determinación del índice de refracción.	27
Figura 15. Condiciones de operación para la corrida cromatográfica.	29
Figura 16. Condiciones de operación para la corrida cromatográfica.	30
Figura 17. Extracto de <i>Ambrossia peruviana</i> obtenido con dióxido de carbono supercrítico (CO ₂ -SC), adherido a paredes del separador.	35
Figura 18. Compuestos mayoritarios en la columna no polar DB5-MS.	41
Figura 19. Compuestos mayoritarios en la columna polar HP-INOWAX.	42
Figura 20. Compuesto no identificado en la columna DB5 MS del extracto de <i>Ambrossia peruviana</i> obtenido con dióxido de carbono supercrítico (CO ₂ -SC).	45
Figura 21. Compuesto no identificado en la columna DB5 MS del extracto de <i>Ambrossia peruviana</i> obtenido con dióxido de carbono supercrítico (CO ₂ -SC).	46
Figura 22. Compuesto no identificado en la columna DB5 MS del extracto de <i>Ambrossia peruviana</i> obtenido con dióxido de carbono supercrítico (CO ₂ -SC).	47
Figura 23. Compuesto no identificado en la columna DB5 MS del extracto de <i>Ambrossia peruviana</i> obtenido con dióxido de carbono supercrítico (CO ₂ -SC).	48
Figura 24. Compuesto no identificado en la columna DB5 MS del extracto de <i>Ambrossia peruviana</i> obtenido con dióxido de carbono supercrítico (CO ₂ -SC).	49
Figura 25. Compuesto no identificado en la columna DB5 MS del extracto de <i>Ambrossia peruviana</i> obtenido con dióxido de carbono supercrítico (CO ₂ -SC).	50
Figura 26. Compuesto no identificado en la columna DB5 MS del extracto de <i>Ambrossia peruviana</i> obtenido con dióxido de carbono supercrítico (CO ₂ -SC).	51
Figura 27. Compuesto no identificado en la columna DB5 MS del extracto de <i>Ambrossia peruviana</i> obtenido con dióxido de carbono supercrítico (CO ₂ -SC).	52

RESUMEN

El aceite esencial de la especie *Ambrossia peruviana* (Asteraceae) la cual crece de manera silvestre en la sierra del Ecuador se obtuvo mediante destilación con arrastre de vapor y por extracción con dióxido de carbono supercrítico (CO₂ - SC). La muestra vegetal presentó un rendimiento promedio de aceite esencial del 0,02% y una humedad relativa del 74% en la extracción del aceite esencial mediante destilación con arrastre de vapor, el aceite presenta una densidad a 20°C de 0,8869 g/cm³ y un índice de refracción de 1,4957. En la extracción con CO₂ – SC se obtuvo un rendimiento de 0,20% en extracciones con una presión de 150 bar y temperaturas entre 35 y 40 °C. La composición química del aceite obtenido por destilación con arrastre de vapor y del extracto obtenido con CO₂ – SC se analizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa CG. Los compuestos mayoritarios identificados en el aceite esencial de *Ambrossia peruviana* fueron: α-Farnesene (1,73%), ar-Curcumene (3,53%), γ-Curcumene (37,17%), Germacrene D (21,35), Myrcene (3,82%). En el extracto obtenido con dióxido de carbono supercrítico (CO₂ – SC) se determinaron 25 compuestos.

Palabras clave: *Ambrossia peruviana*, destilación con arrastre de vapor, extracción con dióxido de carbono supercrítico (CO₂ – SC), CG/MS.

ABSTRACT

The essential oil of the species *Ambrossia peruviana* (Asteraceae) which grows wild in the mountains of Ecuador was obtained by steam distillation and by extraction with supercritical carbon dioxide (CO₂ - SC). The vegetable sample showed an average yield of essential oil of 0,02% and a relative humidity of 74% in the extraction of the essential oil by steam distillation, the oil has a density at 20 ° C of 0,8869 g / cm³ and a refractive index of 1,4957. In the extraction with CO₂ - SC a yield of 0.20% was obtained in extractions with a pressure of 150 bar and temperatures between 35 and 40 ° C. The chemical composition of the oil obtained by steam distillation and the extract obtained with CO₂-SC was analyzed by gas chromatography coupled to GC mass spectrometry. The major compounds identified in the essential oil of *Ambrossia peruviana* were: α-Farnesene (1,73%), ar-Curcumene (3,53%), γ-Curcumene (37,17%), Germacrene D (21,35) , Myrcene (3,82%). In the extract obtained with supercritical carbon dioxide (CO₂ - SC), 25 compounds were determined.

Key words: *Ambrossia peruviana*, steam distillation, extraction with supercritical carbon dioxide (CO₂ - SC), CG / MS.

INTRODUCCIÓN

El presente estudio consiste en la determinación de las propiedades físicas y químicas del aceite esencial de *Ambrossia peruviana* extraído mediante destilación por arrastre de vapor y con dióxido de carbono supercrítico (CO₂-SC). Este se divide en 3 capítulos, en el primer capítulo denominado Marco teórico se desarrolla el estudio del arte sobre este tema, en el segundo capítulo se describen las técnicas y equipos utilizados para llevar a cabo la investigación, en el capítulo final se expone y analiza los resultados. Esta investigación contribuye al estudio de la flora aromática de la Región Sur del Ecuador y específicamente al proyecto “Extracción, caracterización química, física y biológica y creación del banco de aceites esenciales” que se ejecuta en la sección de Ingeniería de Procesos del Departamento de Química y Ciencias Exactas de la Universidad Técnica Particular de Loja. Con dicho estudio se pretende aportar conocimiento sobre los aceites esenciales de las especies vegetales de Ecuador, abriendo las puertas para los diferentes usos industriales en el que se puede aplicar este producto como la industria farmacéutica, alimenticia, cosmética, etc.

El objetivo general es desarrollar el estudio de aceites esenciales provenientes de especies vegetales, determinar su composición química y propiedades físicas, asimismo están considerados como componentes del proyecto: Extracción de aceite esencial de *Ambrossia peruviana* mediante destilación por arrastre de vapor y extracción CO₂-SC, calcular el rendimiento real del aceite esencial, determinar su composición química las cuales nos permitirán establecer sus posibles condiciones de uso y especificar los compuestos mayoritarios que conforman el aceite en estudio. Para la obtención del aceite esencial mediante destilación por arrastre de vapor, se inició con la recolección del material vegetal, luego de realizar el tratamiento post cosecha se le extrajo el aceite esencial, al aceite obtenido se le determino la densidad relativa según la norma AFNOR NF T75-111 (ISO 279:1998), el índice de refracción mediante la norma AFNOR NF 75-112 (ISO 280:1998), la composición química se determinó utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas CG/MS. En la extracción con CO₂-SC, la materia vegetal recolectada fue sometida a un proceso de deshidratación, para luego ser triturada y tamizada con la finalidad de obtener un tamaño de partícula entre 200 – 250 micrómetros, ésta materia vegetal fue sometida al proceso de extracción con CO₂-SC como disolvente. La composición química del extracto obtenido se determinó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas CG/MS.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Aceites Esenciales

Los aceites esenciales son una mezcla compleja de sustancias odoríferas naturales responsables de la fragancia de las flores y otros órganos vegetales. Son sintetizadas y segregadas por determinadas estructuras histológicas especializadas, frecuentemente localizadas sobre o próximas de la superficie de la planta: células oleíferas, conductos o cavidades secretoras, pelos glandulosos y tejidos específicos. Con frecuencia los aceites esenciales están asociados a otras sustancias del vegetal como gomas, resinas y tienden a resinificarse por exposición al aire (López, 2004).

Dichos aceites son inflamables, no tóxicos, aunque pueden provocar alergias en personas sensibles a determinados terpenoides. Sufren degradación química en presencia de la luz solar, aire, calor, ácidos y álcalis fuertes, generando oligómeros de naturaleza indeterminada (Rodríguez, Alcaraz, & Real, 2012).

Los aceites esenciales son de naturaleza oleosa y con una composición compleja ya que al ser compuestos heterogéneos están constituidos por sustancias químicas como monoterpenos, sesquiterpenos, ácidos, ésteres y compuestos alifáticos de bajo peso molecular (Palacio, 2015).

En el mundo vegetal están muy extendidas en numerosas especies botánicas. Son especialmente abundantes en las coníferas, lamiáceas, apiáceas, mirtáceas, rutáceas y asteráceas. Se le atribuyen variadas funciones en las plantas como protección frente a insectos y herbívoros, adaptación frente al estrés hídrico y son de gran importancia en la polinización (López, 2004).

De los millones de plantas existentes, se conocen alrededor de 4000 que producen aceites esenciales distintos, no todas las plantas presentan estas sustancias, aunque existen plantas que presentan una concentración de aceite tan baja que hace imposible su obtención (Ortuño, 2006).

1.1.1. Clasificación

Los aceites esenciales se clasifican de acuerdo con su consistencia, origen y naturaleza de los componentes mayoritarios. En lo que concierne a su consistencia los aceites esenciales se clasifican en esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas. Las esencias fluidas son líquidos volátiles a temperatura ambiente. Los bálsamos son de consistencia espesa, son poco

volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización. Las oleorresinas tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas (Martinez, 2003).

De acuerdo con su origen los aceites esenciales se clasifican como naturales, artificiales y sintéticos. Los naturales se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores. Los artificiales se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes. Los aceites esenciales sintéticos como su nombre lo indica son los producidos por la combinación de sus componentes los cuales son la mayoría de las veces producidos por procesos de síntesis química (Martinez, 2003).

Desde el punto de vista químico y a pesar de su composición compleja los aceites esenciales se pueden clasificar de acuerdo con los componentes mayoritarios. Según esto los aceites esenciales ricos en monoterpenos se denominan aceites esenciales monoterpénicos (por ej. hierbabuena, albahaca, salvia, etc.). Los ricos en sesquiterpenos son los aceites esenciales sesquiterpénicos (por ej. copaiba, pino, junípero, etc.). Los ricos en fenilpropanos son los aceites esenciales fenilpropanoides (por ej. clavo, canela, anís, etc.) (Martinez, 2003).

1.1.2. Extracción de los aceites esenciales

Los aceites esenciales pueden ser extraídos de las plantas aromáticas mediante varios métodos como son: expresión, destilación por arrastre de vapor, extracción con solventes volátiles, enfleurage y con fluidos supercríticos (Martinez, 2003).

1.1.2.1. Expresión

Es un método simple por medio del cual es posible obtener aceites esenciales de características muy cercanas al producto natural, porque no se realizan tratamientos térmicos. Sin embargo, esta técnica extractiva sólo es aplicable a materiales vegetales que contienen la esencia, en gran contenido, en las células superficiales (Vargas & Bottia, 2008).

En este método de extracción, el material vegetal es exprimido para liberar el aceite esencial, este pasa a ser recolectado y filtrado (Martinez, 2003).

1.1.2.2. Destilación por arrastre de vapor o hidrodestilación

Se puede definir como el proceso para obtener el aceite esencial de una planta aromática, mediante el uso del vapor saturado a presión atmosférica. El generador de vapor no forma parte del recipiente donde se almacena la materia prima, es externo y suministra un flujo constante de vapor. Su presión es superior a la atmosférica, pero el vapor efluente, que extrae al aceite esencial está a la presión atmosférica. La materia prima forma un lecho compacto y se desprecia el reflujó interno de agua debido a la condensación del vapor circundante (Rodríguez, Alcaraz, & Real, 2012).

La destilación por arrastre de vapor es el método más utilizado para la extracción de aceites esenciales, dicho método aprovecha la propiedad que tienen las moléculas de agua en estado de vapor de asociarse a las moléculas de aceite. En este método de extracción (Figura 1) la muestra vegetal generalmente fresca es cortada en trozos pequeños y encerrada en una cámara inerte sometida a una corriente de vapor saturado a presión atmosférica, la esencia arrastrada por el vapor es posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa (Martinez, 2003). La fase orgánica formada por el aceite esencial se separa con facilidad de la fase acuosa al tener distinta densidad y ser inmiscibles, normalmente el aceite esencial es menos denso y flota sobre la fase acuosa aunque suelen existir excepciones (Ortuño, 2006).

La destilación por arrastre de vapor es utilizada a nivel industrial debido a su alto rendimiento para la extracción de aceites esenciales y por los factores descritos a continuación:

- Alta pureza del aceite obtenido.
- No requiere de tecnología sofisticada.
- Es energícamente eficiente.
- Se tiene un mayor control en la velocidad de destilación.
- Este método satisface las operaciones comerciales a mayor escala, al proveer resultados más constantes y reproducibles (Martinez, 2003).

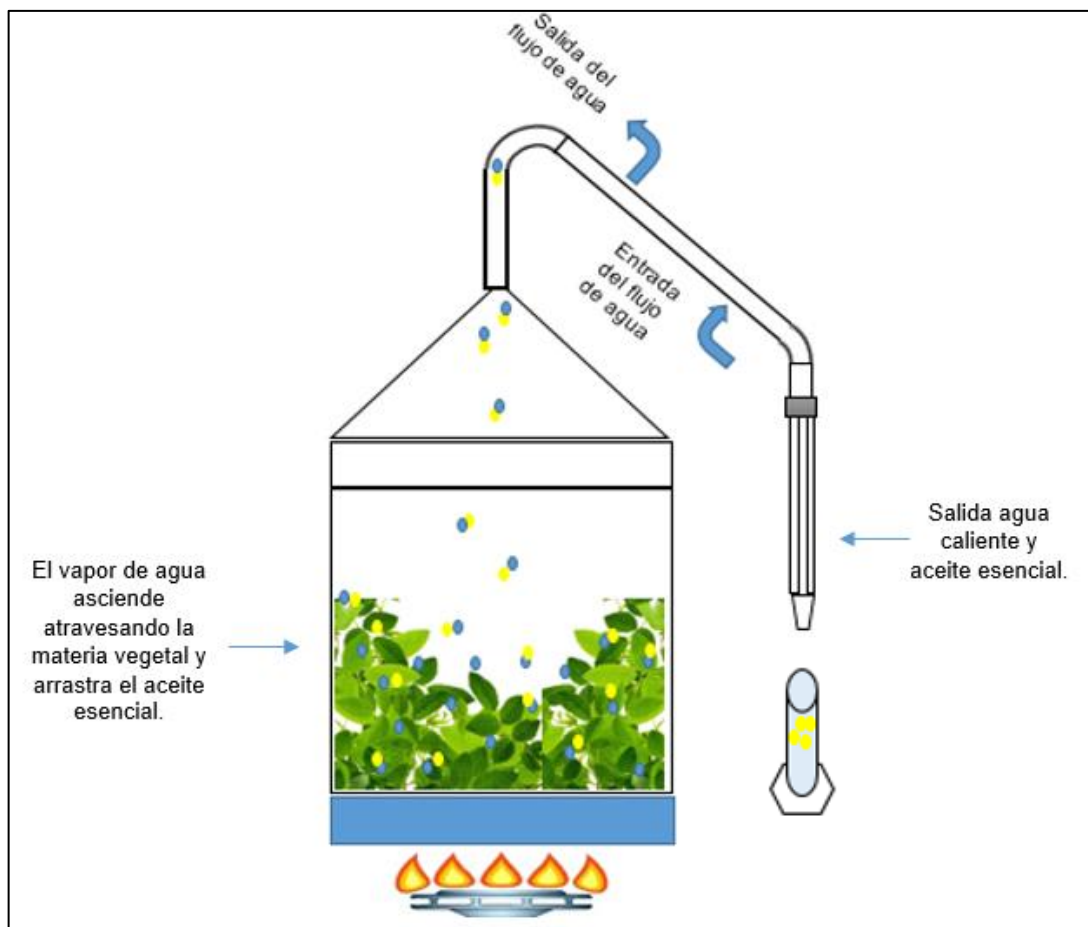


Figura 1. Proceso de destilación por arrastre de vapor.
Fuente: El autor.

Elaboración: El autor.

1.1.2.3. Extracción con fluidos supercríticos

Es una operación unitaria que explota el poder disolvente de los fluidos en condiciones encima de su temperatura y presión crítica, con este método es posible obtener extractos libres de disolventes y la extracción es más acelerada que con la utilización de disolventes orgánicos convencionales. Estas ventajas son debidas a la alta volatilidad de los fluidos supercríticos y sus propiedades de transporte mejoradas (Peredo, Palou, & López, 2009). El proceso de extracción supercrítica es similar al de una extracción clásica, con la diferencia de utilizar como agente extractor un fluido en condiciones supercríticas en lugar de un líquido. Sin embargo, en esta técnica, las propiedades del estado supercrítico hacen que sus características generales se aproximen a la de un proceso de extracción ideal, el cual debe ser, rápido, simple, barato, no contaminante, selectivo y conducir a la obtención de extractos finales listos para el análisis (Valverde, 2002).

La extracción con fluidos supercríticos es uno de los métodos para extracción de aceites esenciales más actuales, en este el material vegetal cortado en trozos pequeños, licuado o molido, se empaca en un extractor de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un fluido supercrítico (por ejemplo dióxido de carbono), las esencias son así solubilizadas y arrastradas y el fluido supercrítico que actúa como solvente extractor se separa del extracto por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente, y finalmente se obtiene una esencia pura (Martinez, 2003).

1.1.2.3.1. Fluido Supercrítico

Un fluido supercrítico no es en sí un estado de agregación de la materia, sin embargo es una fase en la que el fluido se comporta como un gas, llena y toma la forma de su contenedor; características que no tiene al estar en estado líquido, sin embargo, tiene la densidad de un líquido y por tanto su poder disolvente. También puede definirse como un gas con poder disolvente controlable, o bien como una forma de la materia en la que los estados líquido y gaseoso son indistinguibles entre sí (Luque de Castro, Válcárcel, & Tena, 1993).

Un diagrama de fases para una sustancia pura (Figura 2) muestra las regiones de temperatura y presión donde la sustancia existe como una fase única. Éstas están separadas por las curvas de coexistencia de dos fases, sólido-gas, sólido-líquido y líquido-gas; correspondientes a los equilibrios de sublimación, fusión y evaporación respectivamente. (Luque de Castro, Válcárcel, & Tena, 1993).

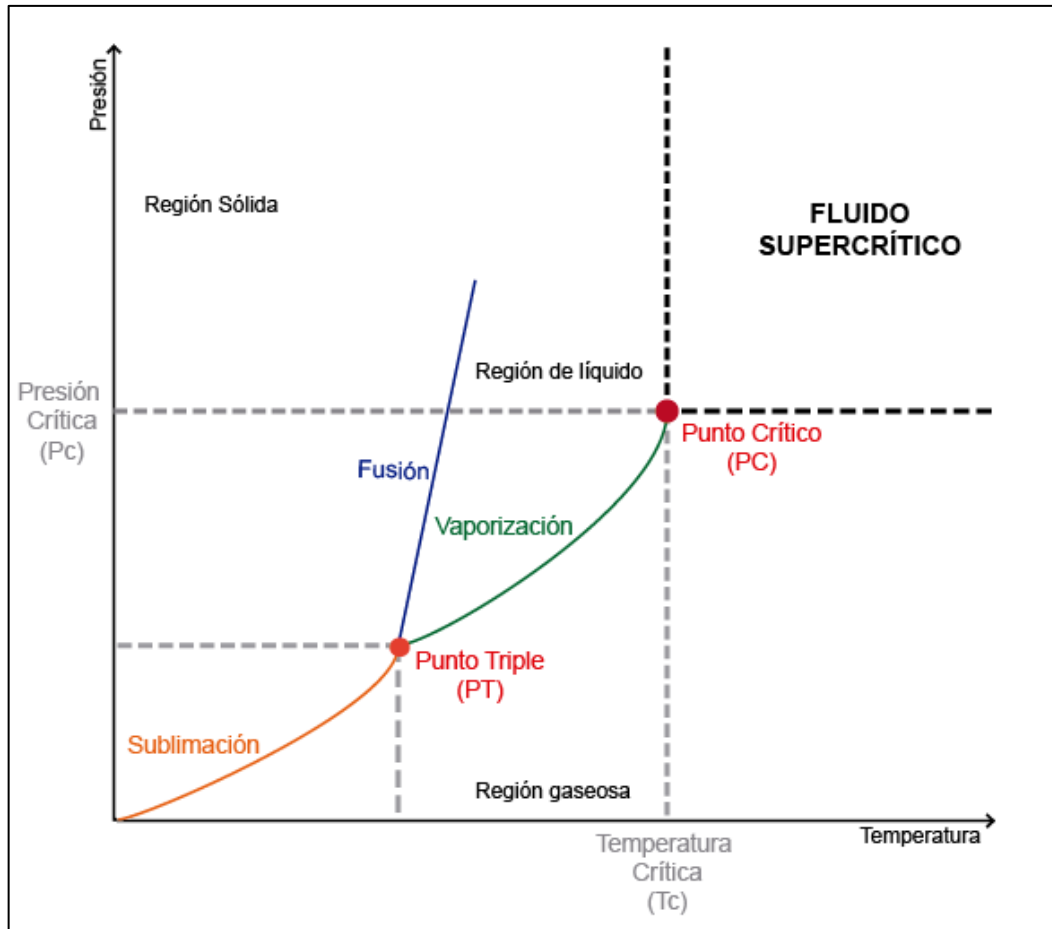


Figura 2. Diagrama de fases sólido/líquido/gas, Fluido supercrítico.
Fuente: Mendiola (2008).
Elaboración: El autor.

A temperaturas o presiones más altas, líquido y gas son indistinguibles; es decir, constituyen una única fase. Esta zona de temperatura y presiones por encima del punto crítico es lo que conocemos como región supercrítica. Por lo tanto, un fluido supercrítico es un gas que se ha calentado por encima de su temperatura crítica mientras que simultáneamente se ha comprimido a una presión mayor que su presión crítica (Luque de Castro, Válcárcel, & Tena, 1993). Un fluido supercrítico puede cambiar rápidamente la densidad con pequeños cambios en la temperatura o presión. Estas propiedades lo hacen conveniente como un sustituto de los solventes orgánicos en los procesos de extracción (Velasco, Villada, & Carrera, 2007).

Los fluidos supercríticos (FSC) tienen la capacidad de extraer ciertos compuestos químicos con el uso de determinados solventes específicos bajo la combinación de temperatura y presión (Velasco, Villada, & Carrera, 2007). En la Tabla 1 se muestran las propiedades críticas de algunos compuestos generalmente utilizados para extracción con fluidos supercríticos.

Tabla 1. Propiedades críticas de los fluidos supercríticos

Compuesto	T_c (°C)	P_c (bar)	ρ (kg/m³)
Acetileno	36,00	62,47	232,14
Acetona	235,00	47,00	278,00
Agua	374,00	220,90	322,60
Dióxido de Carbón	31,00	73,86	467,60
Etano	32,00	48,71	135,75
Etanol	240,40	61,40	276,00
Etileno	9,00	50,40	195,80
Metano	-83,00	45,95	161,43
Metanol	239,40	80,90	272,00
Propano	97,00	42,47	225,64
Propileno	91,80	46,00	323,00

Fuente: Velasco, Villada, & Carrera (2007).

Elaboración: El autor.

El CO₂ es el fluido supercrítico más utilizado debido a que es no tóxico, no inflamable, no corrosivo, no es costoso, se elimina fácilmente, no deja residuos, sus condiciones críticas son relativamente fáciles de alcanzar y se consigue con diferentes grados de pureza, se puede trabajar a baja temperatura y por tanto, se pueden separar compuestos termolábiles (Velasco, Villada, & Carrera, 2007). La única desventaja que presenta el CO₂ frente a otros fluidos supercríticos es su carácter apolar, lo que hace que no sea adecuado para extraer analitos de alta polaridad. Para la extracción de este tipo de compuestos se pueden utilizar otros fluidos polares tales como el amoníaco o metanol (Valverde, 2002).

1.1.2.3.2. Proceso de Extracción Supercrítica

Como se presenta en la imagen (Figura 3), el CO₂ procedente del tanque (A) es impulsado por la bomba (B), hasta que en la celda de extracción (C), donde se encuentra la materia prima a extraer, se alcanza la presión de trabajo, esta presión es controlada por la válvula (D). La celda de extracción se encuentra termostatazada para poder operar en condiciones de temperatura controlada (superior a la TC). Los componentes de la materia prima disueltos o arrastrados por el CO₂ precipitan en el separador (E) debido a la disminución del poder solvente del CO₂ al reducir la presión. En caso de adicionar modificadores (F), éstos se mezclan a la corriente con ayuda de una bomba (G). Si se requiere realizar un

fraccionamiento de los extractos obtenidos, se utiliza un segundo separador (H) (Mendiola, 2008).

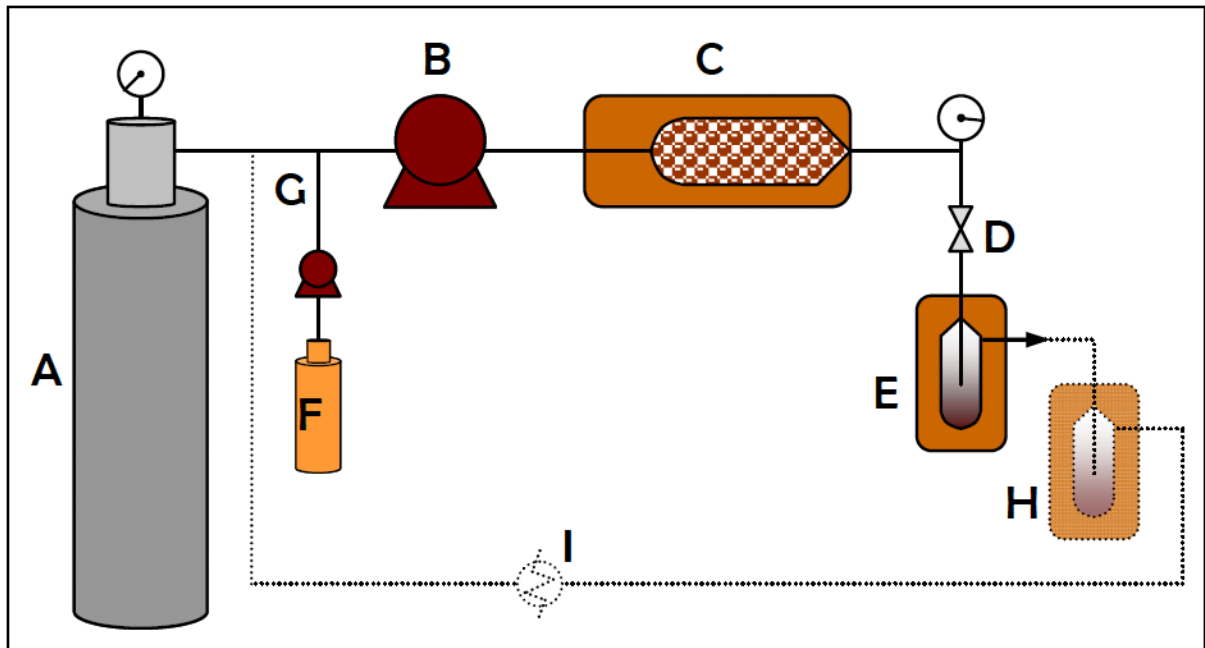


Figura 3. Proceso básico de extracción supercrítica.

Fuente: Mendiola (2008).

Elaboración: Mendiola (2008).

El Intercambiador de calor (I), se utiliza para licuar mediante una tapa de enfriado el CO₂ proveniente de los separadores, esto en caso de hacer una recirculación del mismo.

1.1.3. Caracterización de los aceites esenciales

Los aceites esenciales son líquidos y volátiles a temperatura ambiente, presentan una coloración amarilla leve cuando son extraídos mediante destilación y su densidad es menor a la del agua. Son sustancias solubles en alcoholes y disolventes orgánicos comunes, de igual manera son liposolubles y poco solubles en agua pero pueden ser arrastrados mediante vapor de agua. Los aceites esenciales presentan un elevado índice de refracción (Bruneton, 2001).

Los componentes de los aceites esenciales se pueden clasificar en terpenoides y no terpenoides. Los terpenos son una clase de sustancia química que se encuentran en los aceites esenciales, resinas y distintas sustancias aromáticas de las plantas (Rios, et. al., 2007).

Los no terpenoides son sustancias alifáticas de cadena corta, sustancias aromáticas, sustancias con azufre y nitrogenadas. En cuanto a sus usos y aplicaciones no son tan importantes en comparación a los terpenoides.

Los terpenoides con lo que respecta a sus propiedades son aplicados ampliamente en el ámbito comercial. De acuerdo al número de unidades $(C_5)_n$ presentes en el esqueleto hidrocarbonado, los terpenos y sus similares sustituidos se clasifican como monoterpenoides $(C_5)_2$, sesquiterpenoides $(C_5)_3$, diterpenoides $(C_5)_4$, sesterpenoides $(C_5)_5$, triperpenoides $(C_5)_6$, y tetraterpenoides $(C_5)_8$, basándose en la configuración de sus estructuras moleculares también, pueden ser clasificados como terpenoides de cadena abierta o cíclicos de uno, dos o más anillos (Vargas & Bottia, 2008).

1.1.3.1. Cromatografía de gases

La cromatografía de gases es un método aplicado para reconocer la presencia o ausencia de componentes en mezclas que contengan un número limitado de especies posibles cuya identidad se conoce (Skoog, West, & James, 2001). Dicha técnica permite separar los componentes de una muestra vaporizada aprovechando que estos se distribuyen entre una fase gaseosa móvil y una fase estacionaria líquida o sólida encontrada en la columna. La muestra a analizar se lleva a la fase gaseosa y se inyecta en la columna cromatográfica. La elusión de los componentes se realiza mediante flujo de una fase gaseosa móvil, ésta a diferencia de otros métodos cromatográficos, es inerte y no interactúa con las moléculas de las especies de la muestra, sólo las transporta a través de la columna (Rivera, 2008).

En cromatografía de gases, la mezcla a separar, una vez volatilizada se hace pasar a través de la columna con ayuda de un gas inerte, basándose la separación en la distinta velocidad de los compuestos a su paso por ésta, los cuales van llegando al sistema de detección. Las señales del detector se registran, obteniéndose una serie de picos que constituyen el cromatograma. El tiempo de retención (posición de los picos) se utiliza con fines cualitativos, mientras que el área se relaciona con la concentración de los compuestos (Cedrón, 2004).

Ésta técnica analítica de separación ha experimentado un gran desarrollo desde sus inicios, sus posibilidades han ido ampliándose conforme se ha mejorado la instrumentación (columnas capilares, integradores computarizados, sistema de gradiente de temperatura, nuevos detectores, etc.). La cromatografía de gases es la que ofrece mejor poder de resolución para los compuestos volátiles, su principal limitación se encuentra en la fragilidad

de los solutos, los cuales deben ser estables a la temperatura requerida para su volatilización (Cedrón, 2004).

1.1.4. Propiedades de los aceites esenciales

Los aceites esenciales se caracterizan por sus propiedades físicas, como densidad, viscosidad y actividad óptica. Con la excepción de algunos, la mayoría de aceites esenciales tiene una densidad inferior a la del agua. El índice de refracción es una propiedad característica de los aceites esenciales, esta cambia al mezclar los aceites esenciales con otras sustancias (Peredo, Palou, & López, 2009). Otra propiedad de los constituyentes de una esencia es su variabilidad estructural, lo que permite generar por semisíntesis estructuras novedosas. En cuanto a sus solubilidades, tienen la particularidad de que, si bien son solubles en medio no polar también suelen tener una alta solubilidad en etanol, lo que es ampliamente explotado en la elaboración de fragancias y extractos hidroalcohólicos para las industrias farmacéutica y cosmética (Bandoni, 2002).

Los aceites esenciales poseen una química compleja, generalmente consisten en una mezcla de un grupo heterogéneo de sustancias orgánicas como hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, etc. Tienen un peso molecular menor de 400 Da y presión de vapor suficientemente alta para volatilizarse a temperatura ambiente, son derivadas del metabolismo secundario de las plantas y asociadas o no a otros componentes (Vargas & Bottia, 2008).

Las propiedades funcionales de los aceites esenciales varían de acuerdo a la proporción de los compuestos presentes, diversas investigaciones indican que la composición de los aceites esenciales y extractos pueden variar dependiendo del método de extracción utilizado. Es importante identificar los efectos de diversos métodos de obtención sobre las propiedades y composición de los aceites esenciales y otros extractos obtenidos (Peredo, Palou, & López, 2009).

Son variadas y beneficiosas las propiedades que presentan los aceites esenciales para el ser humano, debido a esto son cotizados en el mundo cuando son de origen natural. La mayoría de aceites esenciales presentan propiedades a diferentes niveles, los cuales darán el uso que tendrá el mismo (Chamba, 2015)

1.1.5. Usos y aplicaciones de los aceites esenciales

Los aceites esenciales tienen un amplio campo de aplicación (Figura 4), éstos suelen ser utilizados en la industria alimenticia, farmacéutica, cosmética y química siendo aplicados a productos de consumo.

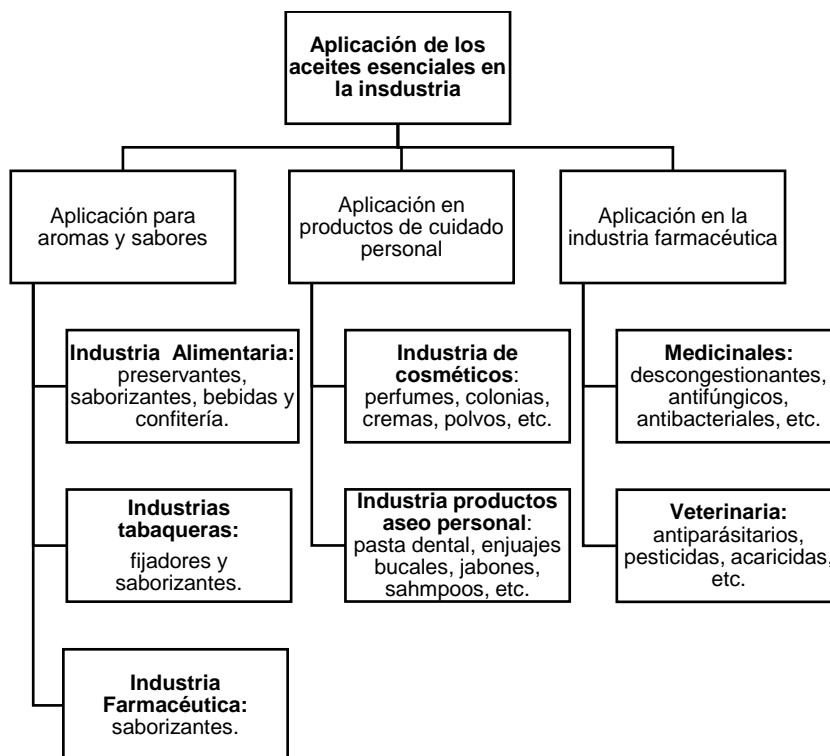


Figura 4. Aplicaciones de los aceites esenciales en las diferentes industrias.
Fuente: (Bandoni, 2002)
Elaboración: (Bandoni, 2002).

1.2. Plantas Medicinales

Las plantas medicinales son vegetales que sintetizan productos llamados principios activos, estos son sustancias que ejercen una acción farmacológica beneficiosa o perjudicial sobre el organismo vivo. Su principal utilidad es disminuir o neutralizar el desequilibrio orgánico que es la enfermedad, constituyen aproximadamente la séptima parte de las especies vegetales existentes (Muñoz, 2002).

Es evidente la importancia de las plantas medicinales en la medicina actual, desde tiempos ancestrales los remedios naturales y las plantas medicinales eran el principal medio que disponía el médico para tratar o aliviar enfermedades. En todas las culturas, a lo largo y

ancho del planeta y durante todos los tiempos, han usado las plantas medicinales como base de su propia medicina. La diversidad de plantas medicinales disponible varía según las regiones y los ecosistemas de cada zona donde habitan, debido a ello es importante la conservación del medio ambiente que las sustenta (Hernández, 2008).

1.3. Flora Ecuatoriana

Es muy variada y abundante la flora ecuatoriana, debido a la diversidad de los medios ecológicos. En el Ecuador existen 22000 especies vegetales diferentes. La presencia de los andes como elemento altitudinal, otorga al Ecuador una fisonomía única en donde existen diferentes climas y formas de vida, de igual manera en las profundidades de las cordilleras donde se encuentran condiciones únicas para la vida vegetal. A pesar de encontrarse en la zona ecuatorial, al Ecuador no se lo considera como un país completamente tropical o tórrido, sino que presenta la más amplia variedad de climas según la localización orográfica o topográfica (Patzelt, 2002).

La flora ecuatoriana ha sido desde siempre reconocida por ser inmensamente rica en plantas útiles (Baslev, De la Torre, Navarrete, & Macía, 2008). Desde tiempos antiguos el conocimiento del uso de plantas ha evolucionado y ha sido transmitido durante generaciones en las poblaciones indígenas, mestizas y afroecuatorianas. Los usos medicinales de las plantas reportados en Ecuador son numerosos, principalmente utilizadas para aliviar diferentes sintomatologías y otras afecciones (De la Torre, et. al., 2008).

1.4. La familia Asteraceae

La familia Asteraceae o Compositae, compone el grupo vegetal más diverso de plantas vasculares sobre el planeta. Su distribución es prácticamente mundial y es una de las familias más comunes en la mayor parte de los hábitats. Asteraceae representa un grupo natural con un número elevado de especies y amplia variación en cuanto a formas de vida, estructura floral, mecanismos de polinización y dispersión de semillas (García, Sánchez, & Villaseñor, 2014).

Las asteráceas comprenden más de 1700 géneros y unas 24.000 - 30.000 especies distribuidas por todo el mundo, excepto en la Antártida, incluyen desde pequeñas hierbas de 1 cm de altura hasta árboles de más de 30 m. Las asteráceas se reconocen por su

estructura reproductiva, donde las flores se disponen en forma sésil sobre un receptáculo ensanchado (Katinas, Gutiérrez, Grossi, & Crisci, 2007). Uno de los generos de la familia asteraceae es el género *Ambrosia* el cual consta de 42 especies pródigamente distribuidas, generalmente en el oeste de América del Norte (Caldas, 2012). En el Ecuador el género *Ambrosia* está representado por las especies *Ambrossia arborescens* Mill., *Ambrossia vulgaris* y *Ambrossia peruviana* (Jorgensen & León, 1999).

1.4.1. *Ambrossia peruviana*

La *Ambrossia peruviana* conocida comúnmente como Marco o Altamisa presenta tallo aterciopelado y alcanza una altura entre 50 cm - 2 m, sus hojas son apinadas alternas, en su parte superior son verdes y el envés es de color verde blanquecino aterciopelado; las flores brotan en la parte superior del vegetal y poseen un fruto de color café oscuro, en la figura 5 se presenta una planta de *Ambrossia peruviana* y su descripción taxonómica. Sus semillas son dispersadas por el viento lo que permite su crecimiento de manera silvestre. Por esta razón es una planta de alta adaptabilidad a diferentes tipos de ambientes (Caldas, 2012).

El Marco presenta propiedades desinfectantes, emoliente y emenagogo. De igual manera aplaca los dolores menstruales, es utilizado contra el reuma articular, hemorroides, inflamación de las piernas y dolores intestinales, bueno para combatir parásitos intestinales. Se aplica en el sector agrícola como un eficaz repelente contra insectos (Hinojosa & Moreno, 2013).



Figura 5. *Ambrosia peruviana*.

Fuente: El autor.

Elaboración: El autor.

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Subfamilia: Asteroideae

Tribu: Heliantheae

Subtribu: Ambrosinae

Género: *Ambrosia*

Especie: *Ambrosia peruviana*

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Metodología experimental

La presente investigación se realizó en el Departamento de Química y Ciencias Exactas, Sección de Ingeniería de Procesos de la Universidad Técnica Particular de Loja, para lo cual se utilizó la siguiente metodología:

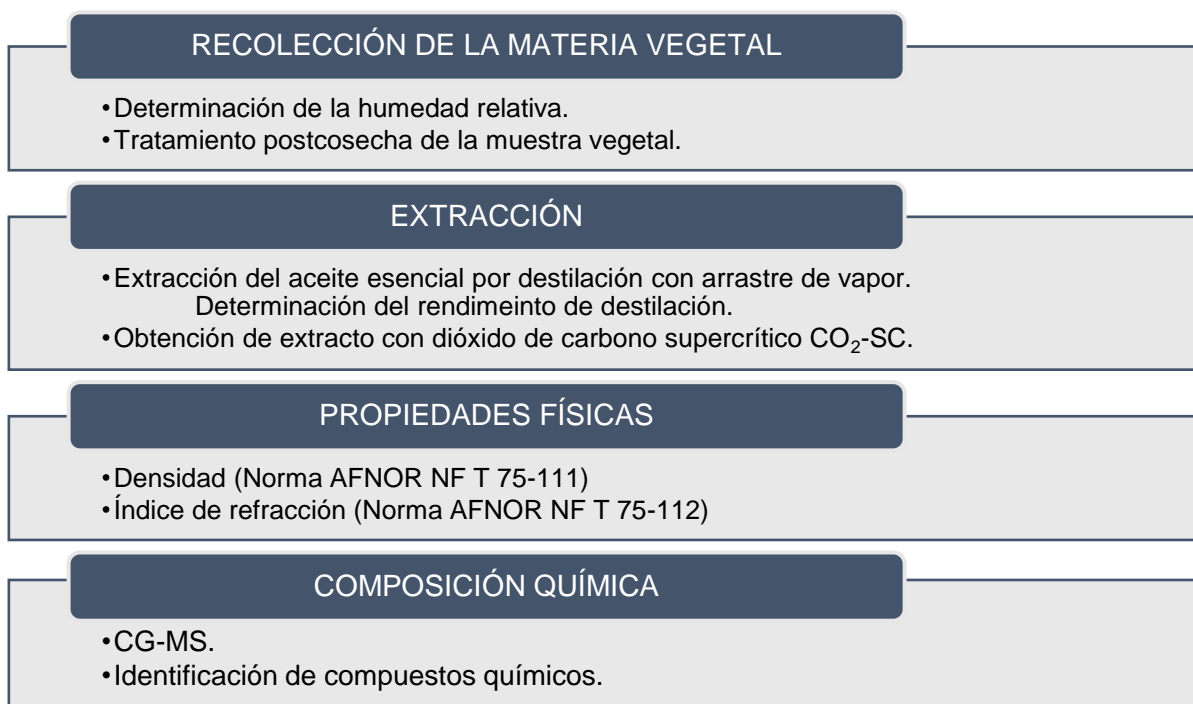


Figura 6. Esquema del procedimiento de obtención del aceite esencial de *Ambrossia peruviana*, y pasos para determinar composición química y propiedades físicas.

Fuente: El autor.

Elaboración: El autor

2.2. Recolección de la materia vegetal

La especie *Ambrossia peruviana* fue recolectada en la ciudad de Loja (Figura 7), barrio “los Operadores” – Época, a una altitud de 2.080 m.s.n.m., en las siguientes coordenadas: 03° 39′ 55″ y 04° 30′ 38″ de altitud Sur (9501249 N – 9594638 N); y, 79° 05′ 58″ de latitud oeste (661421 E – 711075 E).

Una muestra botánica de la especie *Ambrossia peruviana* se encuentra en el Herbario de la Universidad Técnica Particular de Loja, con el código 5132.

La recolección de la materia vegetal se realizó en tres salidas de campo con el fin de obtener un valor medio de representación de la planta en el lugar, posteriormente la muestra

fue trasladada a los laboratorios de Ingeniería de Procesos, para su respectivo tratamiento previo a la extracción del aceite esencial.

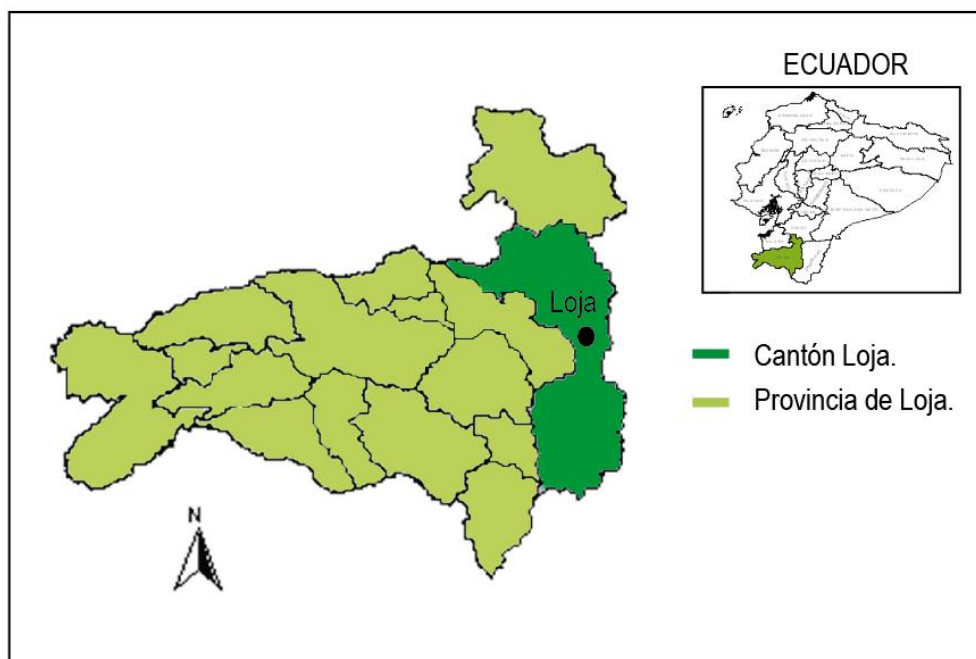


Figura 7. Mapa de la provincia de Loja.

Fuente: El autor.

Elaboración: El autor

2.2.1. Determinación de la humedad relativa

El ensayo de determinación de humedad de *Ambrossia peruviana*, se inició cortando en pequeños pedazos las hojas, con el objetivo de obtener una muestra más compacta y homogénea; se pesó aproximadamente 1 gr de muestra en cápsulas de aluminio, para luego ser introducidas en una lámpara de calentamiento modelo ULTRA X (Figura 8) a 37°C, por un tiempo de 15 minutos. Pasado este tiempo, se sacaron las capsulas para ser enfriadas en un desecador y proceder a pesarlas. Este proceso fue repetido hasta que el peso de la muestra seca se mantuvo constante.

La determinación de humedad se realizó por triplicado en cada recolección con el fin de obtener resultados confiables. Con los datos registrados del peso de la muestras, se realizaron los respectivos cálculos para la determinación de humedad (Anexo I).



Figura 8. Determinación de humedad relativa de *Ambrossia peruviana*, lámpara de calentamiento modelo ULTRA X.

Fuente: El autor.

Elaboración: El autor.

2.2.2. Tratamiento postcosecha de la muestra vegetal

2.2.2.1. Tratamiento de la muestra vegetal para destilación por arrastre de vapor

Una vez recolectada la materia vegetal, se procedió a realizar el tratamiento post cosecha en el cual se seleccionaron las hojas y tallos en buen estado, desechando las partes dañadas del vegetal, de igual manera se eliminó mediante tamizado toda impureza que existiera en la muestra recolectada. Posteriormente la materia vegetal fue pesada, para proceder a depositarla en la cámara del destilador.

2.2.2.2. Tratamiento de la muestra vegetal para extracción con CO₂-SC

La materia vegetal fue sometida a un proceso de deshidratación para obtener un porcentaje de humedad aproximado al 12%, utilizando aire caliente a una temperatura de 30°C, para este proceso se utilizó un secador de bandejas. La muestra vegetal seca fue triturada utilizando un molino vibratorio de discos para luego ser tamizada y obtener un tamaño de partícula entre 200 – 250 micrómetros (Figura 9), finalmente la muestra fue almacenada en refrigeración para conservar sus propiedades (Jiménez, 2015).



Figura 9. Muestra vegetal de *Ambrosia peruviana* deshidratada y triturada para extracción con dióxido de carbono supercrítico (CO₂-SC).

Fuente: El autor.

Elaboración: El autor.

2.3. Extracción

2.3.1. Destilación del aceite esencial

Una vez tratada la materia vegetal, se procedió a realizar el proceso de hidrodestilación, el cual consiste en la separación de componentes insolubles en agua como son los aceites esenciales, mediante vapor para luego ser condensado y recolectado.

La extracción del aceite esencial se realizó en un destilador tipo Clevenger (Figura 10), éste consta de un tanque de acero inoxidable en el que se vierte cierto volumen agua, seguido por una placa perforada, donde se deposita la muestra vegetal. Después de tapar el tanque del destilador, se colocaron las mangueras de entrada y salida de agua del refrigerante, así como el sello de agua en los bordes del destilador; el recipiente se expuso a una fuente de calor ubicada en la parte inferior de tal forma que el vapor de agua generado circule a través de la material vegetal y, al salir del cuello del cisne se enfríe en el condensador en donde pasa al estado líquido. El líquido obtenido del destilador se deposita en un florentino, en donde por diferencia de densidades se produce la separación de agua y el aceite esencial. El proceso de destilación se realizó por cada recolección, obteniéndose las muestras de aceite esencial.

El volumen de aceite esencial obtenido de cada destilación fue medido en una probeta. Los aceites esenciales fueron envasados en frascos de color ámbar respectivamente etiquetado con los datos de cada extracción y almacenados en refrigeración a -4 ° C, con el objetivo de conservar las propiedades de los mismos (Figura 11).



Figura 10. Destilador tipo Clevenger para extracción de aceites esenciales.

Fuente: El autor.

Elaboración: El autor.



Figura 11. Aceite esencial *Ambrosia peruviana* obtenido por destilación con arrastre de vapor.

Fuente: El autor.

Elaboración: El autor.

2.3.1.1. Determinación del Rendimiento

El mismo se calcula relacionando el volumen de aceite esencial recolectado a partir de la cantidad de muestra vegetal sometida a la destilación (Anexo II).

2.3.2. Descripción del proceso de extracción supercrítico

Para emplear el equipo de fluidos supercríticos (Figura 12) se inició conectando correctamente las tuberías y controladores eléctricos. Estableciendo la temperatura a trabajar en la estufa y verificando que la temperatura establecida coincida con controlador

(TIC). Se abrió la válvula de la parte superior del cilindro de CO₂ para la circulación del fluido por la tubería hasta el extractor, a partir de este momento la presión se incrementó y se verificó con el manómetro (P1), que registró mínimo 56 bares para abastecer al sistema la presión deseada. Se encendió la bomba y dependiendo del requerimiento de presión a alcanzar se manipuló manualmente la bomba (P2) regulando con la válvula micrométrica a la salida del extractor, midiendo el valor de presión con el manómetro (P3) hasta que llegue al valor deseado, luego se abrió dicha válvula micrométrica (V2) el flujo de CO₂ fue regulado con la válvula (contrapresión) (V3) ubicada luego del separador hasta obtener un flujo de 10 000 ml CO₂/min (Jiménez, 2015).

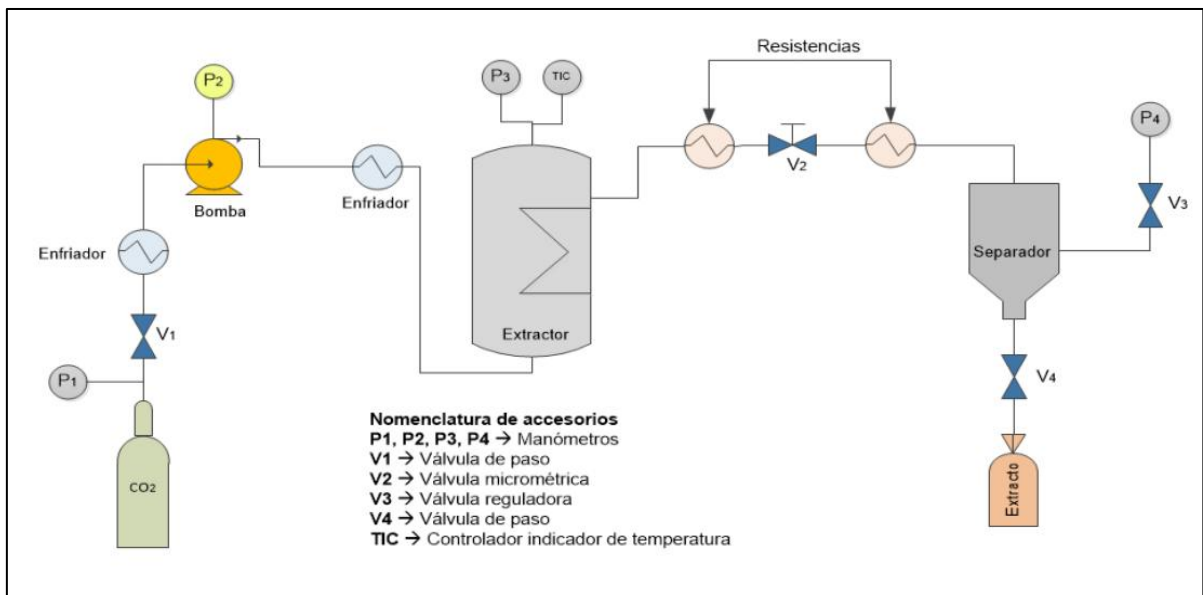


Figura 12. Diagrama de flujo del equipo de fluidos supercríticos, laboratorio de Alimentos de la Universidad Técnica Particular de Loja.

Fuente: Jiménez, G.

Elaboración: Jiménez, G.

Finalizando el proceso de extracción, se apagó la bomba, y se procedió a cerrar la válvula del cilindro de CO₂ para despresurizar el equipo a las mismas condiciones en que se trabajó de la extracción, terminado con esto se procedió a desmontar el extractor y separador del equipo.

Para la extracción del aceite esencial de la *Ambrossia peruviana*, se realizaron cuatro corridas a una presión de 150 bares, con temperaturas de 35 – 40 ° C. Para esto, se pesaron 30 g de muestra que se cargaron en el extractor, la muestra se mezcló con perlas de cristal para evitar la formación de grumos y distribuir uniformemente la presión y el flujo de CO₂, con esto se logra buen contacto entre el CO₂ y las partículas de la muestra pulverizada de *Ambrossia peruviana* durante el proceso de extracción.

2.3.3. Determinación de propiedades físicas

Las propiedades físicas que se determinaron al aceite esencial de *Ambrossia peruviana* fueron, la densidad relativa según la norma AFNOR NF T 75-111 y el índice de refracción según la norma AFNOR NF T 75-112.

La densidad relativa se determinó siguiendo el procedimiento descrito en el Anexo III, para este análisis se mezclaron los aceites esenciales recolectados de las tres destilaciones, y se midió la densidad relativa con ayuda de un picnómetro (Figura 13), un termómetro y una balanza analítica. Para los valores registrados se calculó la media, desviación estándar y el coeficiente de variación.

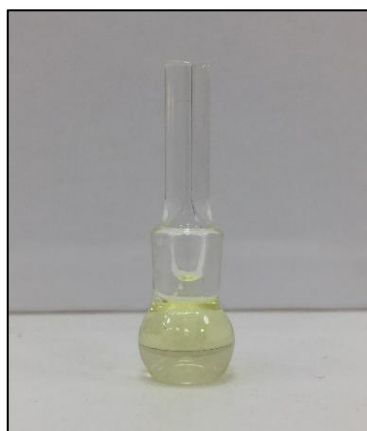


Figura 13. Determinación de densidad relativa del aceite esencial: Picnómetro con aceite esencial de *Ambrossia peruviana*.

Fuente: El autor.

Elaboración: El autor.

La determinación del índice de refracción se realizó siguiendo el procedimiento que consta en el Anexo IV, en el cual se utilizó un refractómetro ABBE BOECO GERMANY (Figura 14), donde se colocó una gota de aceite esencial y se efectuó la respectiva lectura. Con los datos registrados se procedió a calcular el índice de refracción del aceite esencial utilizando la fórmula existente en el Anexo IV.



Figura 14. Determinación del índice de refracción del aceite esencial *Ambrossia peruviana*, refractómetro ABBE BOECO GERMANY.

Fuente: El autor

Elaboración: El autor.

2.4. Determinación composición química

La identificación de los componentes químicos del aceite esencial de *Ambrossia peruviana* se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa CG-EM, ésta se efectuó en la columna no polar DB-5ms y columna polar HP-INOWAX con la finalidad de llevar un análisis cualitativo de los compuestos existentes en el aceite esencial estudiado.

2.4.1. Cromatografía de gases

2.4.1.1. Preparación de las muestras.

Para poder realizar el análisis cromatográfico se debe dar un tratamiento a las muestras de aceite esencial en estudio. Este tratamiento consiste en la deshidratación de la muestra de aceite, ya que producto de la destilación suelen quedar residuos de agua en los frascos que conservan el aceite, se realiza este paso como precaución para evitar cualquier obstrucción en la columna. Para esto se utilizó sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4), se agrega en una cantidad proporcional al agua existente en la muestra, se dejó reposar por aproximadamente 45 minutos para luego trasvasar el aceite a un nuevo frasco ámbar. Este aceite esencial deshidratado es óptimo para realizar el análisis cromatográfico.

De la muestra deshidratada se colocaron 10 μL del aceite esencial de *Ambrossia peruviana* y 990 μL de Diclorometano grado HPLC, obteniendo 3 disoluciones a una concentración del

1%, fue importante rotular cada uno de los viales que contenían los aceites, con el objetivo de evitar errores en las corridas cromatográficas. Además se realizó la inyección de hidrocarburos (C10-decano a C25-pentacosano) comercialmente conocidos como TPH-6RPM de CHEM SERVICE, los Hidrocarburos fueron inyectados tanto en la columna DB-5ms como en HP-INOWAX.

El tiempo de retención de los hidrocarburos nos sirven como guía para la determinación de los índices de Kovats, éstos son precisos para la identificación de los compuestos químicos, los hidrocarburos fueron inyectados bajo los mismos parámetros que las muestras de aceites esenciales (Chamba, 2015).

2.4.1.2. Cromatografía en columna DB-5ms acoplada a espectrometría de masas

Para realizar la cromatografía en la columna DB-5ms, las muestras de aceite esencial y los hidrocarburos fueron preparados como se mencionó anteriormente. Las condiciones de trabajo utilizadas para realizar la corrida cromatográfica fueron las siguientes (Figura 15):

Sistema de inyección	<ul style="list-style-type: none"> - Modo: split. - Gas utilizado: helio. - Temperatura inicial: 250 °C. - Radio de partición: 50:1.
Horno (Programación de temperatura)	<ul style="list-style-type: none"> - Temperatura inicial: 50 °C. - Temperatura final: 220 °C. - Tiempo inicial: 3 min. - Rampa: 2,50 °C/min.
Columna	<ul style="list-style-type: none"> - DB5-MS - Modo: Flujo constante. - Velocidad promedio: 35 cm/seg. - Flujo inicial: 0,9 mL/min. - Presión inicial nominal: 5,50 psi. - Presión de salida: vacío. - Temperatura máxima: 360 °C.

Detector	<ul style="list-style-type: none"> - Temperatura: 250 °C. - Gas utilizado: nitrógeno.
-----------------	---

Inyector	<ul style="list-style-type: none"> - Volumen de inyección: 1 µL
-----------------	--

Figura 15. Condiciones de operación para la corrida cromatográfica en la columna DB-5 MS.

Fuente: El autor.

Elaboración: El autor.

2.4.1.3. Cromatografía en la columna HP – INOWAX acoplada a espectrometría de masas

Las muestras del aceite esencial de *Ambrossia peruviana* y de hidrocarburos fueron inyectadas en la columna polar HP-INNOWAX, los parámetros bajo los cuales se realizó el análisis cromatográfico se muestran a continuación:

Sistema de inyección	<ul style="list-style-type: none"> - Modo: split. - Gas utilizado: helio. - Temperatura inicial: 250 °C. - Radio de partición: 50:1.
-----------------------------	--

Horno (Programación de temperatura)	<ul style="list-style-type: none"> - Temperatura inicial: 50 °C. - Temperatura final: 220 °C. - Tiempo inicial: 3 min. - Rampa: 2,50 °C/min.
---	--

Columna	<ul style="list-style-type: none"> - HP-INOWAX - Modo: Flujo constante. - Velocidad promedio: 35 cm/seg. - Flujo inicial: 0,9 mL/min. - Presión inicial nominal: 6,49 psi. - Presión de salida: vacío. - Temperatura máxima: 270 °C.
Detector	<ul style="list-style-type: none"> - Temperatura: 250 °C. - Gas utilizado: nitrógeno.
Inyector	<ul style="list-style-type: none"> - Volumen de inyección: 1 µL

Figura 16. Condiciones de operación para la corrida cromatográfica en la columna HP-INOWAX

Fuente: El autor.

Elaboración: El autor.

2.4.2. Identificación de compuestos químicos

Para el reconocimiento de los compuestos químicos que conforman el aceite esencial de *Ambrossia peruviana*, se procedió a integrar los picos de los compuestos detectados por el cromatógrafo, ya que es una manera confiable que permite tener una determinada cantidad de compuestos en cada una de las muestras analizar (Chamba, 2015). Esto se realizó mediante un sistema de integración propio del software del equipo, para procederé a trabajar con los picos integrados.

Una vez obtenidos los cromatogramas se calcularon los índices de Kovats (IK) de los picos integrados, se realizó comparando el tiempo retención de los hidrocarburos con el tiempo de retención de los componentes del aceite esencial aplicando la siguiente formula:

$$IK = 100n + 100 * \frac{t_{RX} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}}$$

Donde:

IK= índice de Kovats;

n= número de átomos de carbonos en el n-alcano.

t_{RX}= tiempo de retención del compuesto analizado, que eluye en el centro de n-alcanos.

t_{RN}= tiempo de retención de n-alcano que eluye después del compuesto analizado.

t_{Rn}= tiempo de retención de n-alcano que eluye antes del compuesto analizado.

La determinación de los compuestos se llevó a cabo basándose en los índices de Kovats (IK) determinados experimentalmente en los análisis cromatográficos tanto en la columna polar como en la no polar, valores que fueron comparados con los reportados por Adams (2009), bases de datos electrónicas como Nist (National Institute of Standards and Technology) y en artículos de revistas. Además se tomaron en cuenta parámetros como el número CAS que presenta cada compuesto de tal modo que facilite la búsqueda y la identificación de los IK de los constituyentes químicos del aceite esencial de *Ambrossia peruviana*.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1. Recolección de la materia vegetal

La materia vegetal utilizada para la extracción del aceite esencial de *Ambrossia peruviana* mediante destilación por arrastre de vapor, fue recogida en tres salidas de campo obteniendo en la primera recolección un total de 14,374 kg, en la segunda recolección 10,604 kg y en la tercera 10,316 kg. A esta materia vegetal se le realizó el tratamiento postcosecha para ser aplicada en el proceso de extracción del aceite esencial.

Para la obtención de extractos de *Ambrossia peruviana* con dióxido de carbono supercrítico (CO₂-SC), se recolectó un total de 10,356 Kg de materia vegetal, la cual fue deshidratada en una cámara de secado hasta llegar a una humedad de 11,72%. La materia vegetal seca fue triturada y tamizada para luego ser utilizada en el proceso de extracción.

3.1.1 Humedad relativa de *Ambrossia peruviana*

En la tabla 2 se presenta el porcentaje de humedad del vegetal recolectado, de igual manera se expone el valor promedio de humedad obtenido por cada recolección, el valor calculado de la desviación estándar y el coeficiente de variación.

Tabla 2. Humedad relativa de *Ambrossia peruviana* recolectada

Recolección	Humedad relativa (%)	\bar{X}	σ
AP 1	77,44		
AP 2	77,02	74,61	4,54
AP 3	69,37		

AP 1: primera recolección, AP 2: segunda recolección, AP 3: tercera recolección,

\bar{X} : Media aritmética correspondiente a las diferentes recolecciones,

σ : Desviación estándar.

Fuente: El autor.

Elaboración: El autor.

La muestra vegetal recolectada para cada destilación presenta una humedad promedio de 74,61%, como se puede observar en la tabla, la muestra vegetal de la tercera recolección tiene un porcentaje de humedad bajo en comparación al resto de muestras vegetales, la diferencia de este resultado se puede atribuir a las condiciones climáticas en las que se encontraba la planta antes y durante su recolección, debido a que factores ambientales

como la luz y la temperatura influyen directamente en la pérdida de agua en el vegetal (Marguilis & Dorion, 2012).

3.2. Extracción

3.2.1. Obtención del Aceite esencial de *Ambrossia peruviana* mediante destilación con arrastre de vapor

El aceite esencial de *Ambrossia peruviana* obtenido, es un líquido oleoso de coloración amarillo leve con un olor herbal dulce. En la primera destilación se obtuvieron un total de 3 ml, en la segunda destilación 2,3 ml y en la tercera destilación 2 ml. A partir del aceite esencial extraído se pudo determinar el rendimiento de extracción y sus propiedades físicas.

3.2.1.1. Rendimiento del aceite esencial de *Ambrossia peruviana* extraído mediante destilación con arrastre de vapor

El rendimiento de *Ambrossia peruviana* se calculó relacionando el volumen de aceite esencial recolectado para la cantidad de muestra vegetal (tallo y hojas) sometida a la destilación. En la tabla 3 se expone el porcentaje de rendimiento obtenido en cada destilación y el valor calculado de la variación estándar.

Tabla 3. Rendimiento (v/p) del aceite esencial de *Ambrossia peruviana*

Recolección	Rendimiento (%)	\bar{X}	σ
AP 1	0,028		
AP 2	0,021	0,023	0,004
AP 3	0,020		

AP 1: primera recolección, AP 2: segunda recolección, AP 3: tercera recolección,

\bar{X} : Media aritmética correspondiente a las diferentes recolecciones,

σ : Desviación estándar.

Fuente: El autor.

Elaboración: El autor.

Los porcentajes de rendimiento presentados en la tabla 3, el rendimiento más alto 0,028% que corresponde a la primera destilación se obtuvo a partir de 14374 g de materia vegetal con un volumen de 3 mL de aceite esencial, el rendimiento más bajo obtenido en la tercera destilación fue de 0,020% a partir de 10316 g con 2 mL de aceite esencial.

En un estudio reciente (Ruiz, Díaz, & Rojas, 2015) determinaron un rendimiento de 0,04% del aceite esencial de *Ambrossia peruviana* a partir de 21800 g de materia vegetal y 9 ml de aceite esencial, indicando que el rendimiento varía por factores como el estado del vegetal al

momento de realizar la destilación de igual manera por la temperatura y presión que se ejerció durante la misma.

3.2.2. Obtención de extractos de partes aéreas de la planta *Ambrossia peruviana*

El extracto obtenido mediante la técnica de extracción con fluidos supercríticos presenta una coloración amarilla, de olor herbal dulce característico de la especie estudiada, de consistencia grumosa y pegajosa debido a que los componentes extraídos con CO₂-SC son lipofílicos (Albuquerque, et. al 2014). En la figura 17 se presenta una imagen del extracto recogido en el separador, dichos extractos están libres de solventes esto se puede atribuir a que la extracción con fluidos supercríticos no deja residuos químicos (Velasco, Villada, & Carrera, 2007).



Figura 17. Extracto de *Ambrossia peruviana* obtenido con dióxido de carbono supercrítico (CO₂-SC) , adherido a paredes del separador.

Fuente: El autor.

Elaboración: El autor.

3.2.2.1. Rendimiento de extracción con dióxido de carbono supercrítico (CO₂-SC)

En las extracciones supercríticas realizadas para la obtención del aceite esencial de *Ambrossia peruviana*, los extractos obtenidos reflejan un rendimiento de 0,20% para la cantidad de material vegetal aplicado en cada extracción (30 g). Esto se puede atribuir al bajo rendimiento que presenta la *Ambrossia peruviana* en cualquier método de extracción (Ruiz, Díaz, & Rojas, 2015). Otro factor que influye en el bajo rendimiento es la pérdida de

extracto, debido a la adhesión del aceite esencial en las tuberías del equipo EFSC durante las extracciones realizadas.

3.3. Propiedades físicas

3.3.1. Densidad relativa del aceite esencial de *Ambrossia peruviana*

La densidad relativa del aceite esencial fue determinada con el método del picnómetro por diferencias de pesos. En la tabla 4 se presenta la densidad promedio de los aceites esenciales obtenidos en cada destilación. El aceite de mayor densidad registró 0,9079 g/cm³ (primera recolección), y la menor densidad obtenida fue 0,8664 g/cm³ (segunda recolección). La densidad promedio del aceite esencial de *Ambrossia peruviana* fue 0,8869 g/cm³.

Tabla 4. Densidad del aceite esencial de *Ambrossia peruviana*.

Recolección	Densidad relativa (g/cm ³)	\bar{X}	σ
AP 1	0,9079		
AP 2	0,8664	0,8869	0,02
AP 3	0,8863		

AP 1: primera recolección, AP 2: segunda recolección, AP 3: tercera recolección,

\bar{X} : Media aritmética correspondiente a las diferentes recolecciones,

σ : Desviación estándar.

Fuente: El autor.

Elaboración: El autor.

La densidad del aceite esencial de *Ambrossia peruviana* a 20 °C es menor a la densidad del agua (1 g/cm³), está en el promedio en comparación a otros aceites esenciales de especies obtenidos por diferentes métodos de extracción, debido a que la mayoría de aceites esenciales están formados principalmente por compuestos orgánicos con átomos ligeros como carbono, hidrógeno u oxígeno formando cadenas y anillos (Ochoa, Paredes, Bejarano, & Silva, 2012).

3.3.2. Índice de refracción del aceite esencial de *Ambrossia peruviana*

En la tabla 5 se presentan los valores del índice de refracción obtenido del aceite esencial de cada destilación, el valor calculado de la variación estándar y coeficiente de variación.

Tabla 5. Índice de refracción del aceite esencial de *Ambrossia peruviana*

Recolección	Índice de refracción (n_d)	\bar{X}	σ
AP 1	1,4963		
AP 2	1,4950	1,4958	0,001
AP 3	1,4960		

AP 1: primera recolección, AP 2: segunda recolección, AP 3: tercera recolección,
 \bar{X} : Media aritmética correspondiente a las diferentes recolecciones,
 σ : Desviación estándar.

Fuente: El autor.

Elaboración: El autor.

Como se expone en la tabla 5, el valor más alto del índice de refracción del aceite esencial de *Ambrossia peruviana* se obtuvo en la primera recolección 1,4963 y el valor más bajo fue la segunda destilación 1,4950. El índice de refracción se determina con la finalidad de verificar la calidad y pureza de los aceites esenciales a nivel laboratorio e industrial (Cano, Bonilla, Roque, & Ruiz, 2008).

3.4. Composición química

3.4.1. Análisis cualitativo del aceite esencial de *Ambrossia peruviana* extraído mediante destilación con arrastre de vapor

En la tabla 6 se presentan los compuestos químicos identificados del aceite esencial de *Ambrossia peruviana* en la columna no polar DB5-MS y en la columna polar HP-INOWAX, se encuentran organizados de acuerdo con el orden de elución de la columna DB5-MS. Cada compuesto presenta su índice de Kovats calculado y el índice reportado en referencias; junto a la cantidad relativa que corresponde al porcentaje de participación de cada compuesto para la primera (AP 1), segunda (AP 2) y tercera recolección (AP 3) se expone el área promedio por compuesto, la desviación estándar y el coeficiente de variación. El porcentaje de cantidad relativa de los compuestos, por cada recolección es el resultado del promedio de las áreas de cada compuesto identificado en los aceites esenciales obtenidos de las tres destilaciones.

El aceite esencial extraído de las muestras frescas de *Ambrossia peruviana* fue analizado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa (CG-EM), donde se detectaron 49 compuestos en la columna DB-5 MS con un porcentaje de identificación de 89,70%.

Tabla 6. Composición química del aceite de *Ambrossia peruviana* (GS/MS columna no polar DB-5 y columna polar HP-INOWAX)

Nº	COMPUESTOS	DB-5 MS							HP INOWAX						
		% de Cantidad Relativa					\bar{X}	σ	% de Cantidad Relativa					\bar{X}	σ
		IK ^{cal}	IK ^{ref}	AP1	AP2	AP3			IK ^{cal}	IK ^{ref}	AP1	AP2	AP3		
1	α -Thujene	906	924 ^a	0,5688	0,1362	0,35	0,31
2	Santolina triene	913	906 ^a	1,3741	1,0694	1,22	0,22	1056	1043 ^l	0,5464	0,4858	1,0319	0,69	0,30
3	α -Pinene	921	932 ^a	0,4953	0,5431	0,4725	0,50	0,04	1047	1030 ^l	0,4145	0,4051	0,3039	0,37	0,06
4	β -Pinene	960	974 ^a	1,602	1,60	1123	1118 ^k	0,8818	0,88
5	β -Phellandrene	967	1025 ^a	0,1494	0,15
6	Myrcene	975	988 ^a	2,2893	2,5597	3,8764	2,91	0,85	1196	1167 ^l	4,3665	3,9098	5,9319	4,74	1,06
7	α -Phellandrene	990	1002 ^a	1,3968	1,7005	1,103	1,40	0,30
8	P- Cymene	1008	1020 ^a	0,1604	0,1365	0,4247	0,24	0,16	1288	1281 ^l	0,2121	0,2727	0,4046	0,30	0,10
9	Limonene	1011	1024 ^a	0,4405	0,8915	0,9227	0,75	0,27	1226	1201 ^m	0,4349	0,3876	0,9581	0,59	0,32
10	1,8-Cineole	1014	1026 ^a	0,4331	0,1846	0,31	0,18	1233	1220 ^l	0,382	0,3874	0,38	0,00
11	(E)- β -ocimene	1036	1044 ^a	0,6636	0,66	1286	1266 ⁿ	0,382	0,3426	0,36	0,03
12	γ -Terpinene	1040	1054 ^a	0,4097	0,3541	0,38	0,04	1275	1254 ⁿ	0,2499	0,5113	0,38
13	Terpinolene	1066	1086 ^a	0,4985	1,3278	0,91	0,59	1314	1290 ^o	0,6702	0,5988	1,6972	0,99	0,61
14	Chrysanthenone	1112	1124 ^a	7,6461	3,9836	5,0832	5,57	1,88	1535	1540 ^p	1,2582	1,1295	0,8335	1,07	0,22
15	Bornyl Acetate	1264	1284 ^a	1,5921	1,59	1604	1591 ^q	1,4926	1,8733	1,68	0,27
16	α -Cubebene	1350	1352 ^b	0,2081	0,4583	0,7302	0,47	0,26
17	β -Cubebene	1363	1387 ^d	0,4985	0,4583	0,7302	0,56	0,15	1563	1549 ^q	2,4964	2,2324	2,7381	2,49	0,25
18	β -Elemene	1365	1362 ^e	0,3102	0,2274	0,4442	0,33	0,11
19	α -Cedrene	1385	1410 ^a	0,0831	0,1442	0,11	0,04
20	Caryophyllene	1399	1417 ^f	2,1027	1,9007	2,0175	2,01	0,10	1615	1599 ^f	2,089	0,2173	2,1878	1,50	1,11

21	Thujopsene (cis)	1409	1429 ^g	0,2583	0,26
22	β-Gurjunene	1410	1431 ^h	1,7575	0,2355	0,1943	0,73	0,89	1683	1612 ^s	0,8417	0,84
23	Aromadendrene	1430	1439 ^a	0,5001	0,4570	0,1586	0,37	0,19
24	β-Farnesene (Z)	1434	1440 ^a	0,4512	0,6289	0,54	0,13
25	α-Humulene	1435	1452 ^a	0,5658	0,3908	0,48	0,12	1687	1671 ^t	0,7439	0,7243	0,73	0,01
26	β-Cadiene	1446	1471 ^a	0,3004	1,0108	1,2373	0,85	0,49
27	γ-Curcumene	1455	1481 ^a	52,023	38,6442	54,7399	48,47	8,62	1728	1704 ^q	24,6842	22,138	30,7496	25,86	4,42
28	D-Germacrene	1467	1484 ^a	0,1406	0,3129	0,672	0,38	0,27	1734	1726 ^q	21,9414	19,6762	22,4217	21,35	1,47
29	Ar-Curcumene	1467	1479 ^a	2,7503	5,9740	6,4546	5,06	2,01	1798	1789 ^j	1,4366	1,2881	3,2497	1,99	1,09
30	γ-Elemene	1468	1434 ^a	7,3158	2,44
31	β-Cadinene	1470	1473 ^a	0,2882	0,4136	0,35	0,09
32	α-Muurolene	1481	1478 ^a	0,4082	0,3923	0,40	0,01
33	α-Farnasene	1484	1505 ^a	2,2171	2,0778	2,15	0,10	1778	1750 ^v	2,3963	0,2217	1,31	1,54
34	Cedrane	1494	1441 ^a	1,3916	0,1442	0,77	0,88
35	β-Sesquiphellandrene	1499	1521 ^a	0,1064	0,2102	0,16	0,07	1791	1775 ^w	0,2991	0,30
36	Spathulenol	1548	1577 ^a	0,7828	0,4532	0,62	0,23
37	Germacrene B	1559	1559 ^a	1787	1789 ^x	4,6553	4,1745	0,4651	3,10	2,29
38	β-Eudesmol	1594	1649 ^a	0,2062	0,2718	0,24	0,05
39	Globulol	1556	1590 ^a	0,7839	0,0844	0,43	0,49
40	Viridiflorol	1564	1592 ^a	0,358	0,1421	0,25	0,15	2096	2098 ^l	0,5364	0,4795	0,51	0,04
41	Carotol	1572	1594 ^a	0,5483	1,2352	0,89	0,49
42	β-Oplopenone	1583	1607 ^a	0,3113	0,31	2078	2099 ^y	0,3522
43	1-Octadecene	1776	1789 ^a	0,6483	0,65
44	t-Muurolol	1548	1640 ^a	1,1795	0,39	2244	2201 ^z	0,1951	0,07

45	β -Selinene	1739	1717 ^u	0,972	0,8721	0,7008	0,85	0,14
TOTAL IDENTIFICADO**									89,70	TOTAL IDENTIFICADO***					73,45
<p>AP1: aceite extraído primera destilación; AP2: aceite extraído segunda destilación; AP3: aceite extraído tercera destilación;</p> <p>*: promedio calculado en base al % del área de picos reportados tanto en la columna DB5-MS y HP-INOWAX. **: sumatoria del porcentaje relativo de los compuestos identificados en la columna DB5-MS. ***: sumatoria del porcentaje relativo de los compuestos identificados en la columna HP-INOWAX.</p> <p>\bar{X}: promedio; O: desviación estándar; IK^{cal}: índice de Kovats determinado experimentalmente; IK^{ref}: índice de Kovats descrito en bibliografía (a, ref: 1; b, ref: 2; c, ref: 3; d, ref: 4; e, ref: 5; f, ref: 6; g, ref: 7; h, ref: 8; h, ref: 9; i, ref: 10; j, ref: 11; k, ref: 12; l, ref: 13; m, ref: 14; n, ref: 15; o, ref: 16; p, ref: 17; q, ref: 18; r, ref: 19; s, ref: 20; t, ref: 21; u, ref: 22; v, ref: 23; w, ref: 24; x, ref: 25; y, ref: 26; z, ref: 27) ANEXO 5.</p>															

Fuente: El autor.

Elaboración: El autor.

En la figura 18 se presentan los compuestos con mayor cantidad relativa identificados en la columna no polar DB5-MS, entre ellos tenemos: α -Farnesene (2,15%), γ -Elemene (2,44%), α -Curcumene (5,06%), γ -Curcumene (48,47%), Chrysanthenone (5,57%), Myrcene (2,91%).

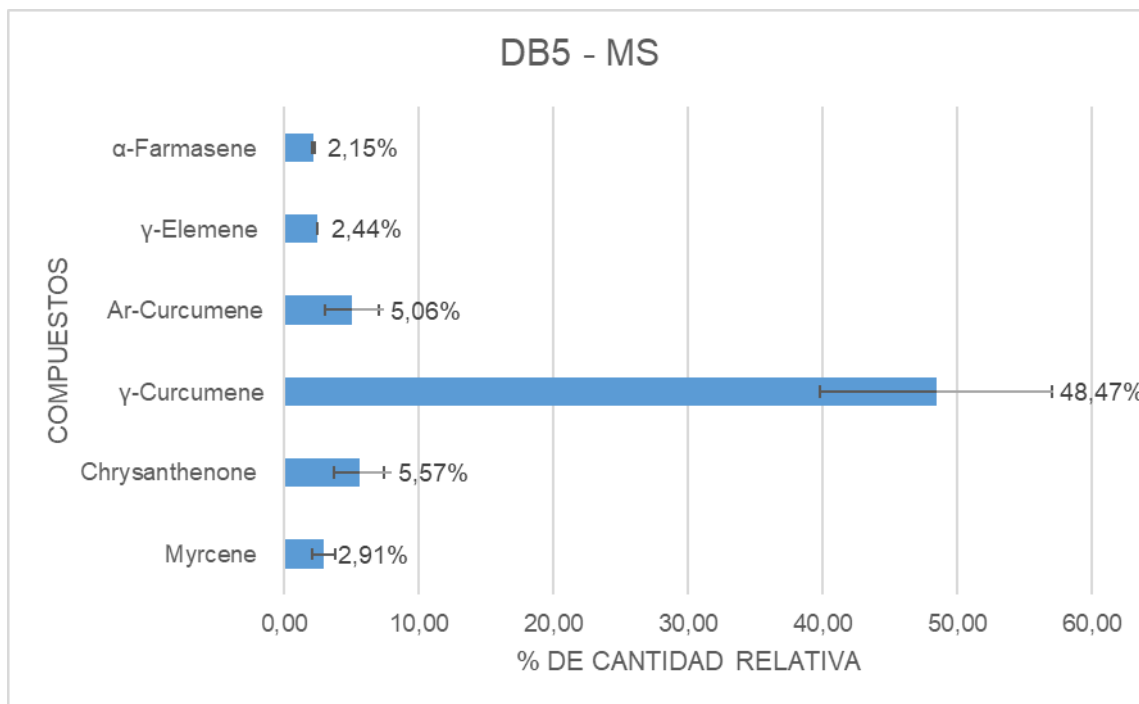


Figura 18. Compuestos mayoritarios en la columna no polar DB5-MS.

Fuente: El Autor.

Elaboración: El autor.

Los compuestos con mayor cantidad relativa detectados en la columna polar HP-INOWAX se muestran en la figura 19, éstos fueron: α -Curcumene (1,99%), Germacrene B (3,10%), α -Farnesene (1,31%), Germacrene D (21,35%), γ -Curcumene (25,86%), β -Cubebene (2,49%), Myrcene (4,74%).

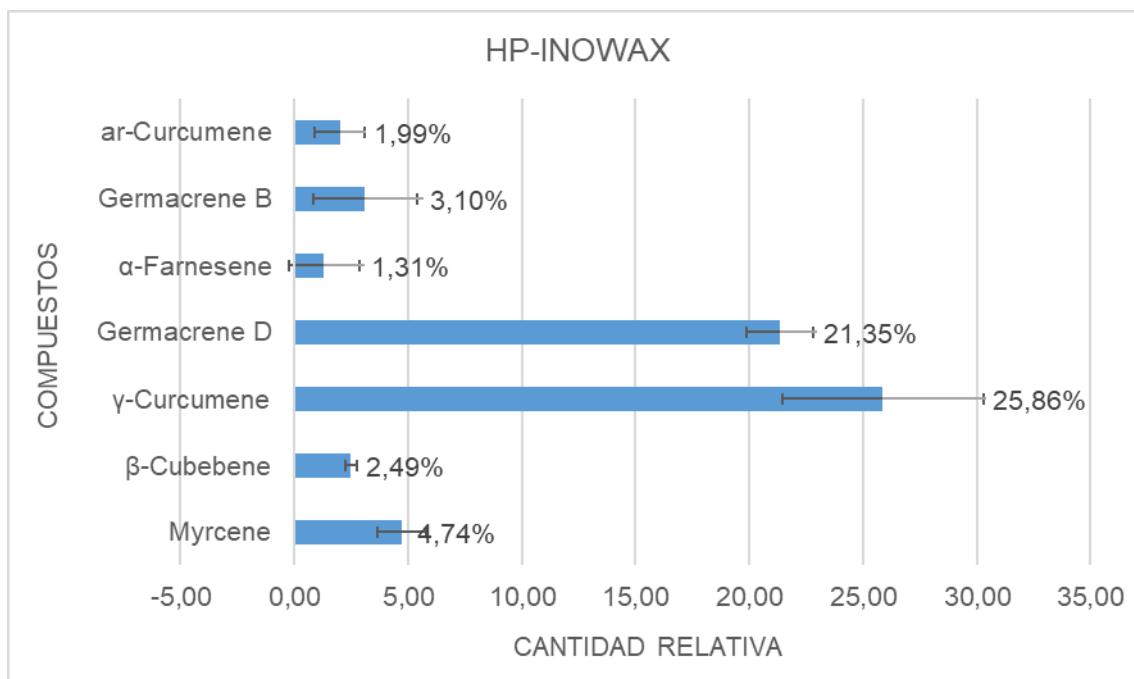


Figura 19. Compuestos mayoritarios en la columna polar HP-INOWAX.

Fuente: El Autor.

Elaboración: El autor.

En el aceite esencial de la especie *Ambrossia peruviana* recolectada en la ciudad de Loja, fueron identificados 26 compuestos en ambas columnas y los compuestos predominantes fueron, α-Farnesene (1,73%), ar-Curcumene (3,53%), γ-Curcumene (37,17%), Germacrene D (21,35), Myrcene (3,82%).

Yáñez et. al., (2011) identificaron 22 compuestos en el aceite esencial obtenido de *Ambrossia peruviana* Willd recolectado en Guasualito (Venezuela), describiendo como principales al gamma-curcumene (23,99%), seguido de ar-curcumene (14,08%), acetato de bornilo (10,35%), camfor (5,03%) y epóxido de oximene (4,79%).

En la composición química del aceite esencial de *Ambrosia artemisiifolia* de República Serbia, se presentan a Germacrene D (24,1%), limoneno (16,83%), alfa-pineno (8,0%) y mircineno (7,4%) como compuestos mayoritarios, y observaron importante actividad bactericida y fungicida (Yáñez, et. al., 2011).

Las variaciones en la composición del aceite esencial se puede atribuir al ambiente en el que se desarrolló la planta, así como las condiciones aplicadas para su extracción (Ruiz, Díaz, & Rojas, 2015).

Uno de los compuestos mayoritarios que conforma el aceite esencial de *Ambrossia peruviana* fue γ -Curcumene, al cual se le atribuye un fuerte efecto antibacteriano (Stupar, et. al., 2014).

3.4.2. Análisis cualitativo del extracto de *Ambrossia peruviana* obtenido mediante extracción con CO₂-SC

Del extracto de *Ambrossia peruviana* resultado de la extracción con CO₂-SC se detectaron 25 compuestos en la columna no polar DB5-MS, los cuales difieren considerablemente con los compuestos identificados en el aceite esencial obtenido por destilación por arrastre de vapor. Dichos compuestos no pudieron ser identificados por los métodos utilizados en el aceite esencial obtenido por destilación por arrastre de vapor., se considera que los compuestos existentes en el extracto de *Ambrossia peruviana* obtenido por EFSC pueden ser otro tipo de hidrocarburos o presentan estructuras que no corresponden a terpenos. Sánchez, et. al., (2009) señalan que este tipo de compuestos no son posibles de conseguir por destilación por arrastre de vapor ya que la temperatura de ebullición no permite su eficiente extracción.

En la tabla 7, se presenta los compuestos detectados en la columna no polar DB5-MS de acuerdo al orden de elusión de la misma.

Tabla 7. Compuestos detectados en columna DB5-MS del extracto obtenido con dióxido de carbono supercrítico CO₂-SC.

Nº	COMPUESTOS	IK ^{cal}	IK ^{ref}	%
1	β -Himachalene	1477	1490 ^{a1}	1.84
2	β -Cubebene	1479	1434 ^{b1}	3.92
3	NI 1 (PM: 220 g/mol)	1563	0.84
4	NI 2 (PM: 205 g/mol)	1575	0.68
5	NI 3 (PM: 220 g/mol)	1601	0.82
6	NI 4 (PM: 220 g/mol)	1622	0.42
7	NI 5 (PM: 234 g/mol)	1830	7.82
8	NI 6 (PM: 256 g/mol)	1962	3.94
9	NI 7 (PM: 272 g/mol)	1993	0.92
10	NI 8 (PM: 272 g/mol)	2040	0.67
11	NI 9 (PM: 216 g/mol)	2054	0.91
12	NI 10 (PM: 259 g/mol)	2124	3.00
13	NI 11 (PM: 290 g/mol)	2242	17.26

14	NI 12 (PM: 236 g/mol)	2247	3.36
15	NI 13 (PM: 286 g/mol)	2260	1.97
16	NI 14 (PM: 248 g/mol)	2272	1.37
17	NI 15 (PM: 250 g/mol)	2278	1.98
18	NI 16 (PM: 332 g/mol)	2301	0.86
19	NI 17 (PM: 332 g/mol)	2333	27.50
20	NI 18 (PM: 341 g/mol)	2342	1.44
21	NI 19 (PM: 288 g/mol)	2354	1.61
22	NI 20 (PM: 248 g/mol)	2372	10.19
23	NI 21 (PM: 247 g/mol)	2377	0.80
24	NI 22 (PM: 262 g/mol)	2400	5.35
25	NI 23 (PM: 302 g/mol)	2400	0.5358
NI: Compuesto no identificado. IK^{cal} : índice de Kovats determinado experimentalmente; IK^{rel} : índice de Kovats descrito en bibliografía (a1, ref: 28; b1, ref: 29).				

Fuente: El autor.

Elaboración: El autor.

3.4.2.1 Espectros de Masas de los compuestos no identificados

Desde la figura 20 a la 27, se pueden observar los espectros de masa de los picos que no se logró identificar en la columna DB5 MS del extracto de *Ambrossia peruviana* obtenido con fluidos supercríticos. Se consideraron los valores de abundancia de los diferentes iones (eje Y del espectro de masas) en función de la relación masa/carga (eje X del espectro de masas). En los datos indicados al pie de cada espectro, el primer valor corresponde a la relación masa/carga y el segundo valor entre parentesis indica la abundancia relativa de cada ion.

Compuestos no identificados:

Espectro de masas del compuesto NI 5

El espectro de masas del compuesto NI 5 que tiene un tiempo de retención 48,1196 minutos, se muestra en la figura 20. Este compuesto tiene una abundancia relativa de 7,82% y un ión molecular de 234 m/z.

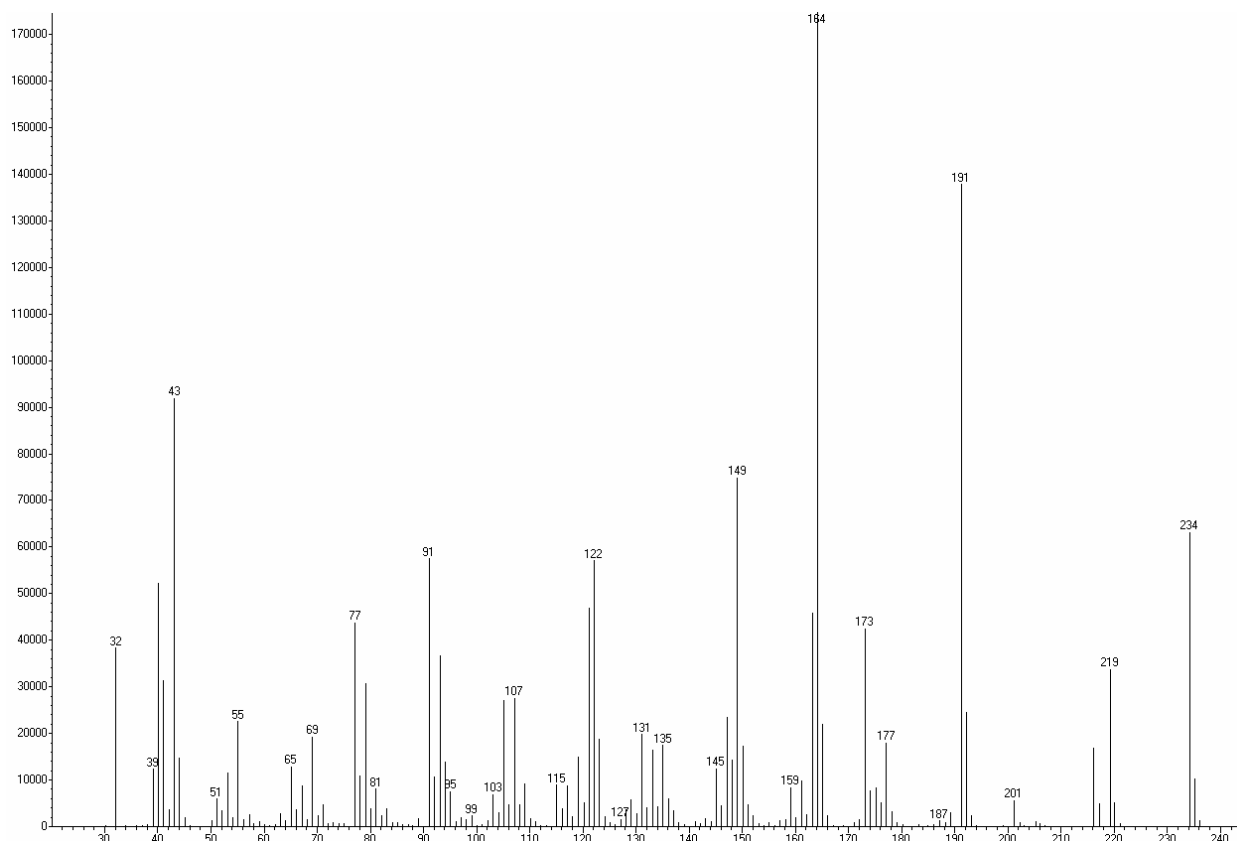


Figura 20. Compuesto no identificado en la columna DB5 MS del extracto de *Ambrosia peruviana* obtenido con dióxido de carbono supercrítico (CO₂-SC).

Fuente: El autor.

Elaboración: El autor.

Los picos de del espectro de masas con su respectiva abundancia para el compuesto NI 5 son: 234 (35,80); 219 (19,46); 201 (3,24); 191 (77,30); 187 (0,58); 177 (10,18); 173 (23,86); 164 (100,00); 159 (4,46); 149 (41,53); 145 (7,51); 135 (9,54); 131 (11,79); 127 (0,94); 122 (32,32); 115 (5,37); 107 (15,85); 103 (4,01); 99 (1,39); 95 (4,04); 91 (33,32); 81 (4,78); 77 (24,59); 69 (10,90); 65 (7,11); 55 (12,44); 51 (3,53); 43 (53,35); 39 (7,00); 32 (21,57).

Espectro de masas del compuesto NI 10

El espectro de masas del compuesto NI 10 que tiene un tiempo de retención 57,5213 minutos, se muestra en la figura 21. Este compuesto tiene una abundancia relativa de 3,00% y un ión molecular de 259 m/z.

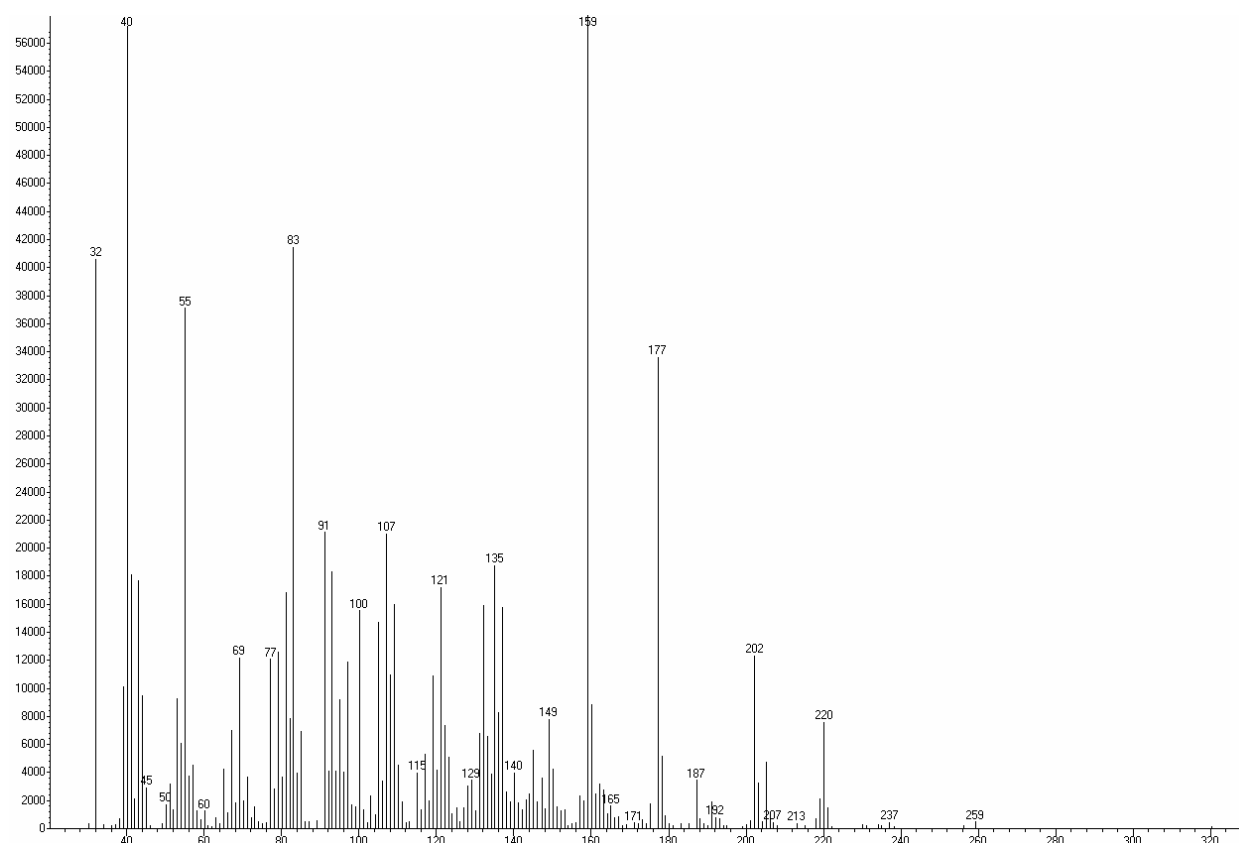


Figura 21. Compuesto no identificado en la columna DB5 MS del extracto de *Ambrosia peruviana* obtenido con dióxido de carbono supercrítico (CO₂-SC).

Fuente: El autor.

Elaboración: El autor.

Los picos de del espectro de masas con su respectiva abundancia para el compuesto NI 10 son: 259 (0,85); 237 (0,74); 220 (13,08); 213 (0,62); 207 (0,79); 202 (21,23); 192 (1,34); 187 (5,96); 177 (57,94); 171 (0,69); 165 (2,75); 159 (100,00); 149 (13,44); 140 (6,85); 135 (32,33); 129 (5,97); 121 (29,68); 115 (6,85); 107 (36,26); 100 (26,81); 91 (36,43); 83 (71,48); 77 (20,81); 69 (21,01); 60 (2,18); 55 (64,01); 50 (2,98); 45 (5,05); 40 (98,65); 32 (70,00).

Espectro de masas del compuesto NI 11

El espectro de masas del compuesto NI 11 que tiene un tiempo de retención 60,9714 minutos , se muestra en la figura 22. Este compuesto tiene una abundancia relativa de 17,26% y un ión molecular de 290 m/z.

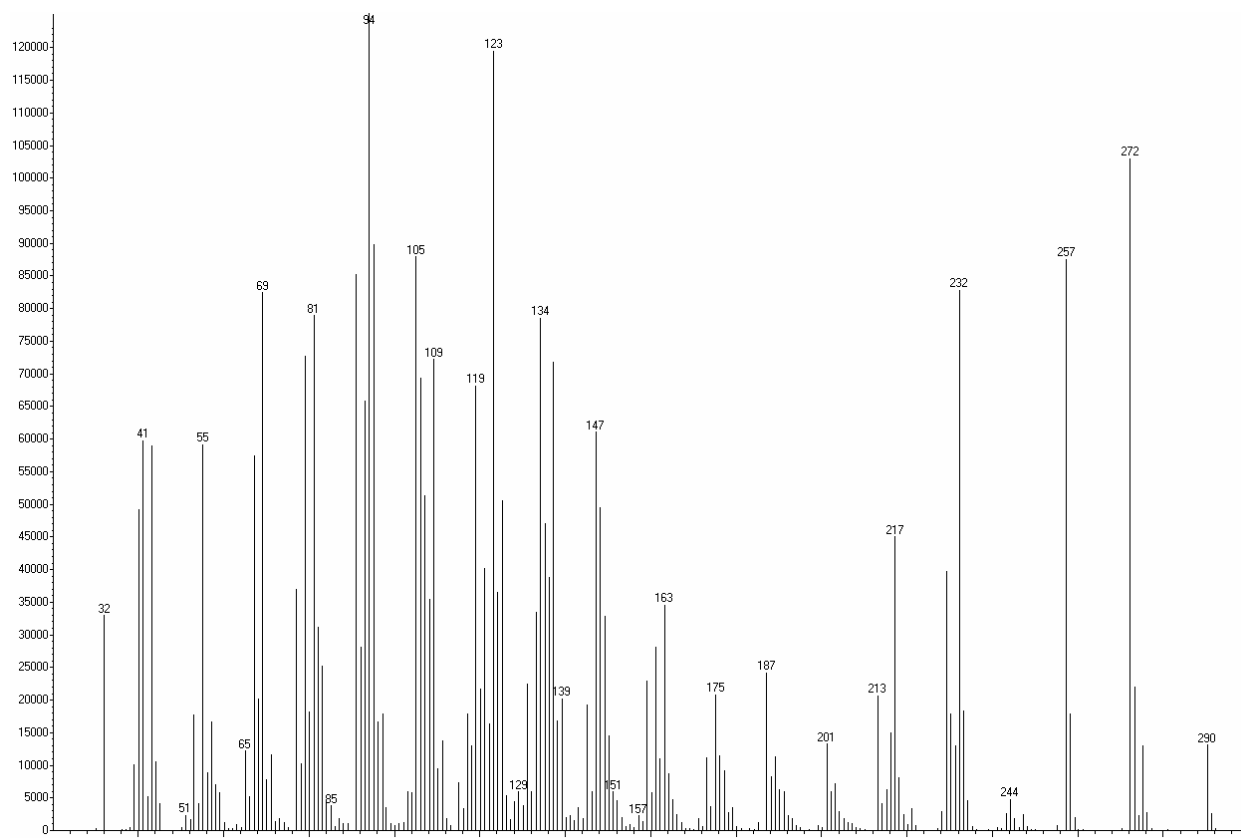


Figura 22. Compuesto no identificado en la columna DB5 MS del extracto de *Ambrosia peruviana* obtenido con dióxido de carbono supercrítico (CO₂-SC).

Fuente: El autor.

Elaboración: El autor.

Los picos de del espectro de masas con su respectiva abundancia para el compuesto NI 11 son: 290 (10,48); 272 (82,22); 257 (69,90); 244 (3,80); 232 (66,13); 217 (35,94); 213 (16,52); 201 (10,57); 187 (19,28); 175 (16,60); 163 (27,58); 157 (1,83); 151 (4,75); 147 (48,76); 139 (16,12); 134 (62,71); 129 (4,72); 123 (95,43); 119 (54,43); 109 (57,68); 105 (70,22); 94 (100,00); 85 (3,05); 81 (63,00); 69 (65,83); 65 (9,71); 55 (47,24); 51 (1,86); 41 (47,72); 32 (26,32).

Espectro de masas del compuesto NI 12

El espectro de masas del compuesto NI 12 que tiene un tiempo de retención 61,1195 minutos, se muestra en la figura 23. Este compuesto tiene una abundancia relativa de 3,36% y un ión molecular de 236 m/z.

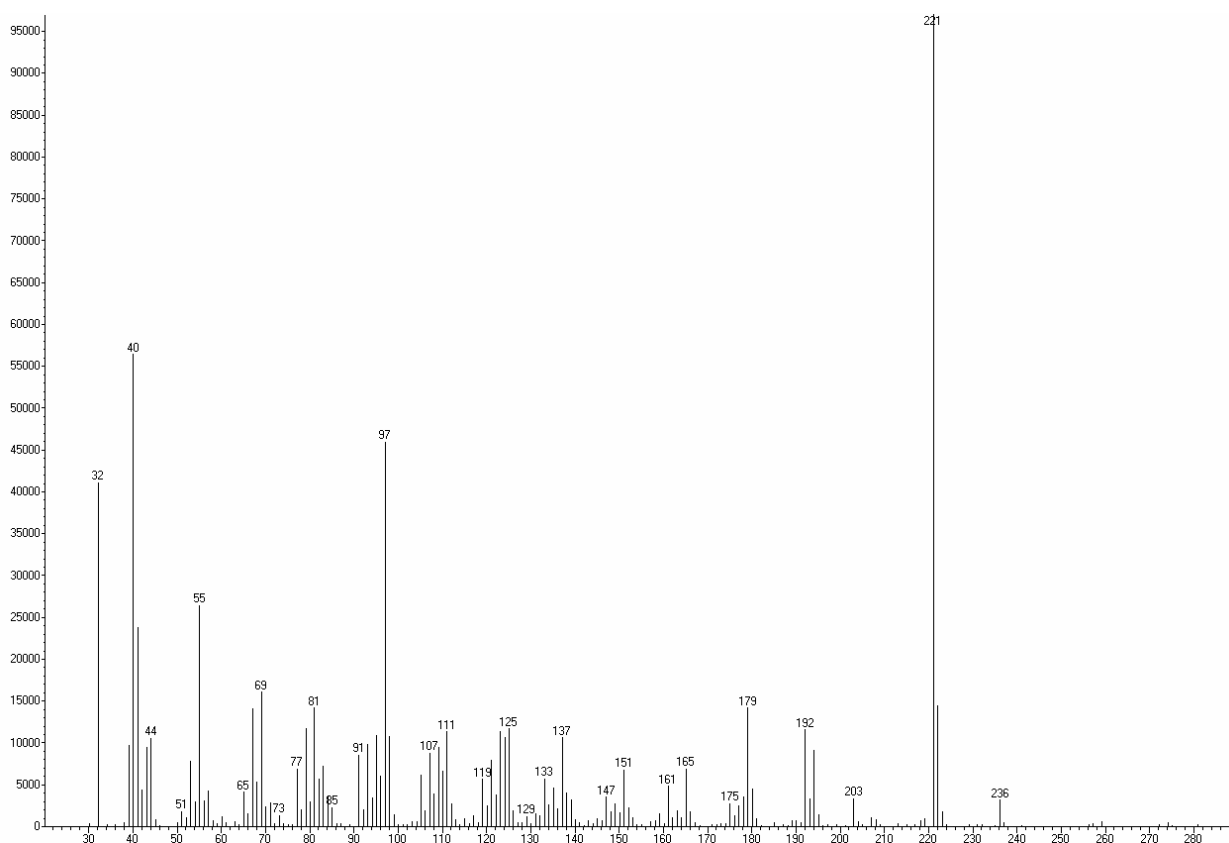


Figura 23. Compuesto no identificado en la columna DB5 MS del extracto de *Ambrosia peruviana* obtenido con dióxido de carbono supercrítico (CO₂-SC).

Fuente: El autor.

Elaboración: El autor.

Los picos de del espectro de masas con su respectiva abundancia para el compuesto NI 12 son: 236 (3,25); 221 (100,00); 203 (3,43); 192 (11,91); 179 (14,61); 175 (2,86); 165 (7,09); 161 (4,99); 151 (6,99); 147 (3,64); 137 (10,97); 133 (5,86); 129 (1,25); 125 (12,02); 119 (5,82); 111 (11,71); 107 (9,05); 97 (47,37); 91 (8,82); 85 (2,34); 81 (14,61); 77 (7,08); 73 (1,40); 69 (16,54); 65 (4,24); 55 (27,20); 51 (1,89); 44 (10,89); 40 (58,15); 32 (42,37).

Espectro de masas del compuesto NI 15

El espectro de masas del compuesto NI 15 que tiene un tiempo de retención 62,0001 minutos, se muestra en la figura 24. Este compuesto tiene una abundancia relativa de 1,98% y un ión molecular de 250 m/z.

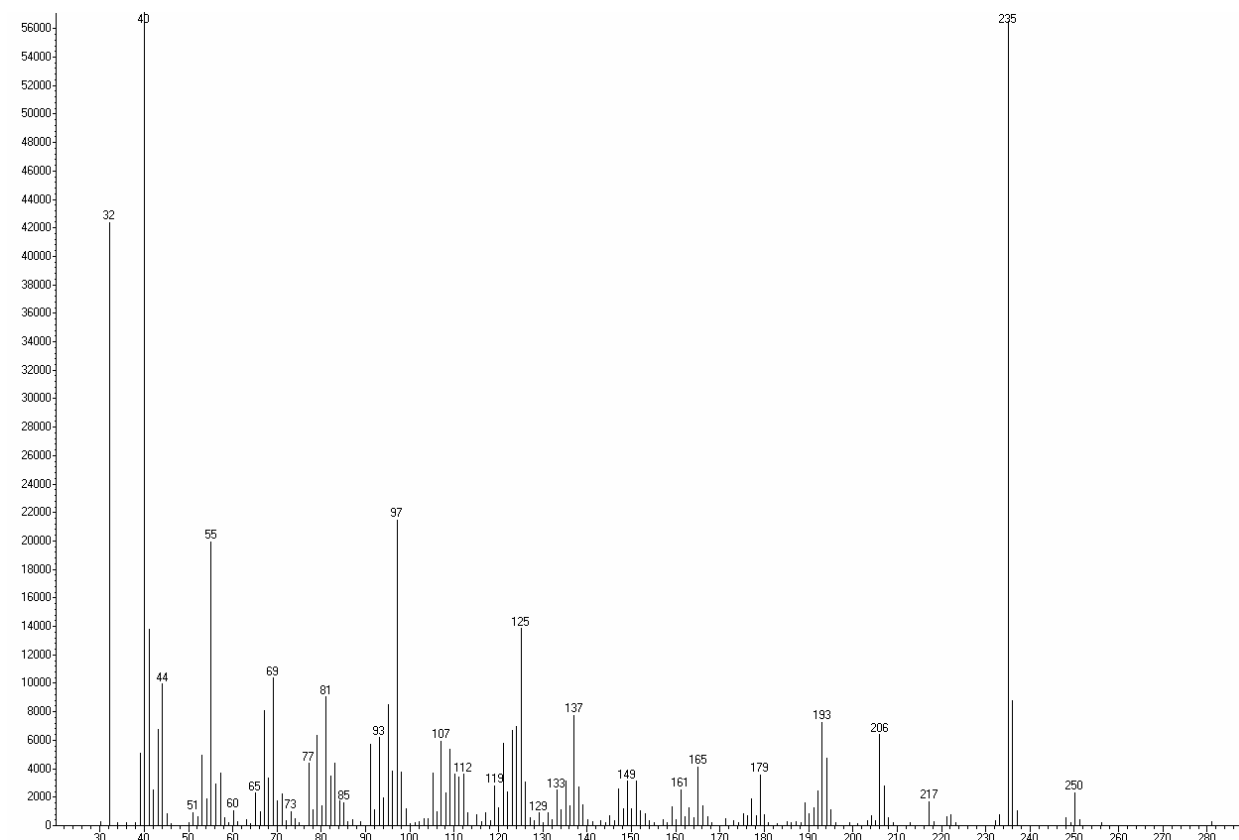


Figura 24. Compuesto no identificado en la columna DB5 MS del extracto de *Ambrosia peruviana* obtenido con dióxido de carbono supercrítico (CO₂-SC).

Fuente: El autor.

Elaboración: El autor.

Los picos de del espectro de masas con su respectiva abundancia para el compuesto NI 15 son: 250 (3,64); 235 (100,00); 217 (2,83); 206 (11,11); 193 (12,39); 179 (5,76); 165 (7,51); 161 (4,44); 149 (5,37); 137 (13,46); 133 (4,44); 129 (1,67); 125 (25,20); 119 (4,64); 112 (5,80); 107 (10,83); 97 (35,68); 93 (10,30); 85 (2,80); 81 (16,17); 77 (7,40); 73 (2,02); 69 (18,39); 65 (3,92); 60 (1,68); 55 (34,95); 51 (1,71); 44 (16,30); 40 (93,42); 32 (70,42).

Espectro de masas del compuesto NI 17

El espectro de masas del compuesto NI 17 que tiene un tiempo de retención 63,6056 minutos, se muestra en la figura 25. Este compuesto tiene una abundancia relativa de 27,50% y un ión molecular de 332 m/z.

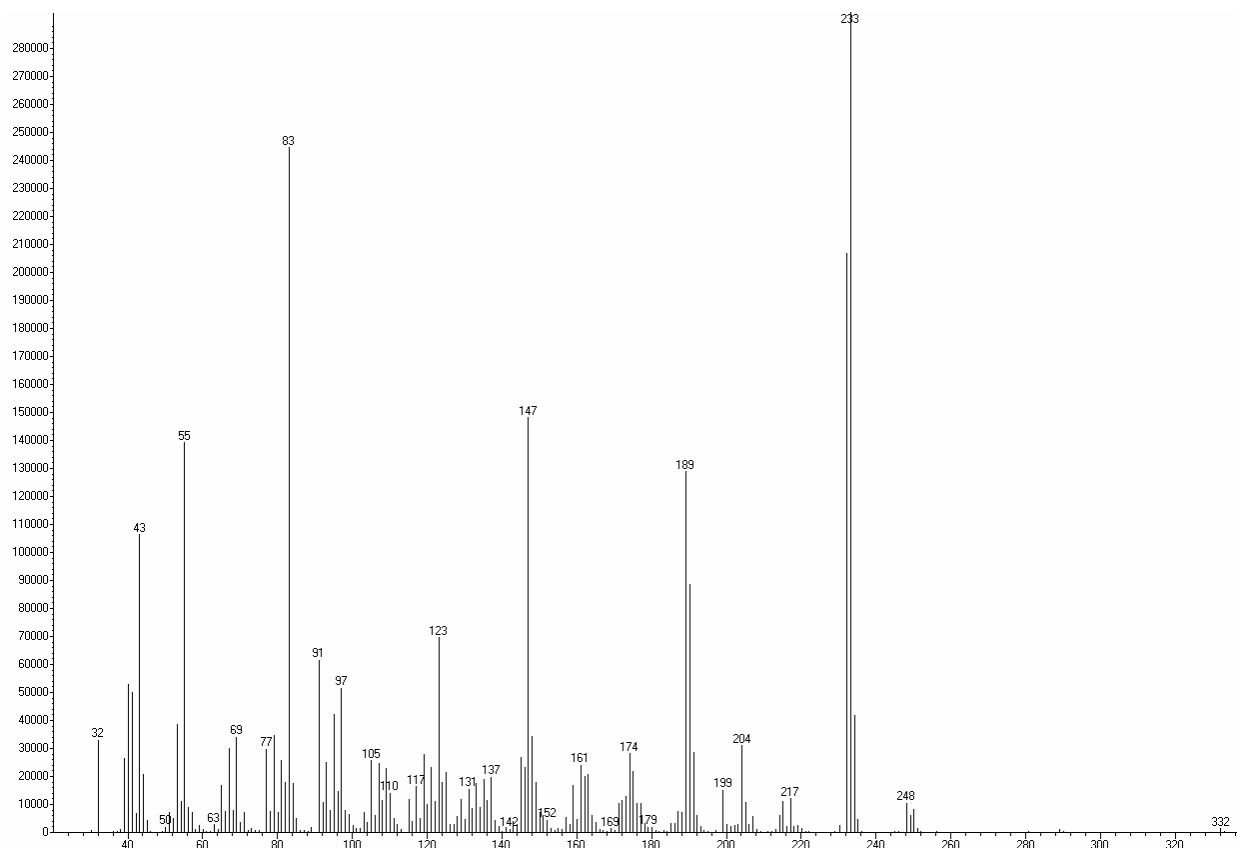


Figura 25. Compuesto no identificado en la columna DB5 MS del extracto de *Ambrosia peruviana* obtenido con dióxido de carbono supercrítico (CO₂-SC).

Fuente: El autor.

Elaboración: El autor.

Los picos de del espectro de masas con su respectiva abundancia para el compuesto NI 17 son: 332 (0,44); 248 (3,54); 233 (100,00); 217 (4,10); 204 (10,55); 199 (5,18); 189 (44,03); 179 (0,65); 174 (9,58); 169 (0,47); 161 (8,19); 152 (1,51); 147 (50,59); 142 (0,40); 137 (6,71); 131 (5,26); 123 (23,75); 117 (5,57); 110 (4,80); 105 (8,75); 97 (17,57); 91 (21,04); 83 (83,48); 77 (10,18); 69 (11,64); 63 (0,93); 55 (47,53); 50 (0,62); 43 (36,30); 32 (11,28).

Espectro de masas del compuesto NI 20

El espectro de masas del compuesto NI 20 que tiene un tiempo de retención 64,7784 minutos, se muestra en la figura 26. Este compuesto tiene una abundancia relativa de 10,19% y un ión molecular de 248 m/z.

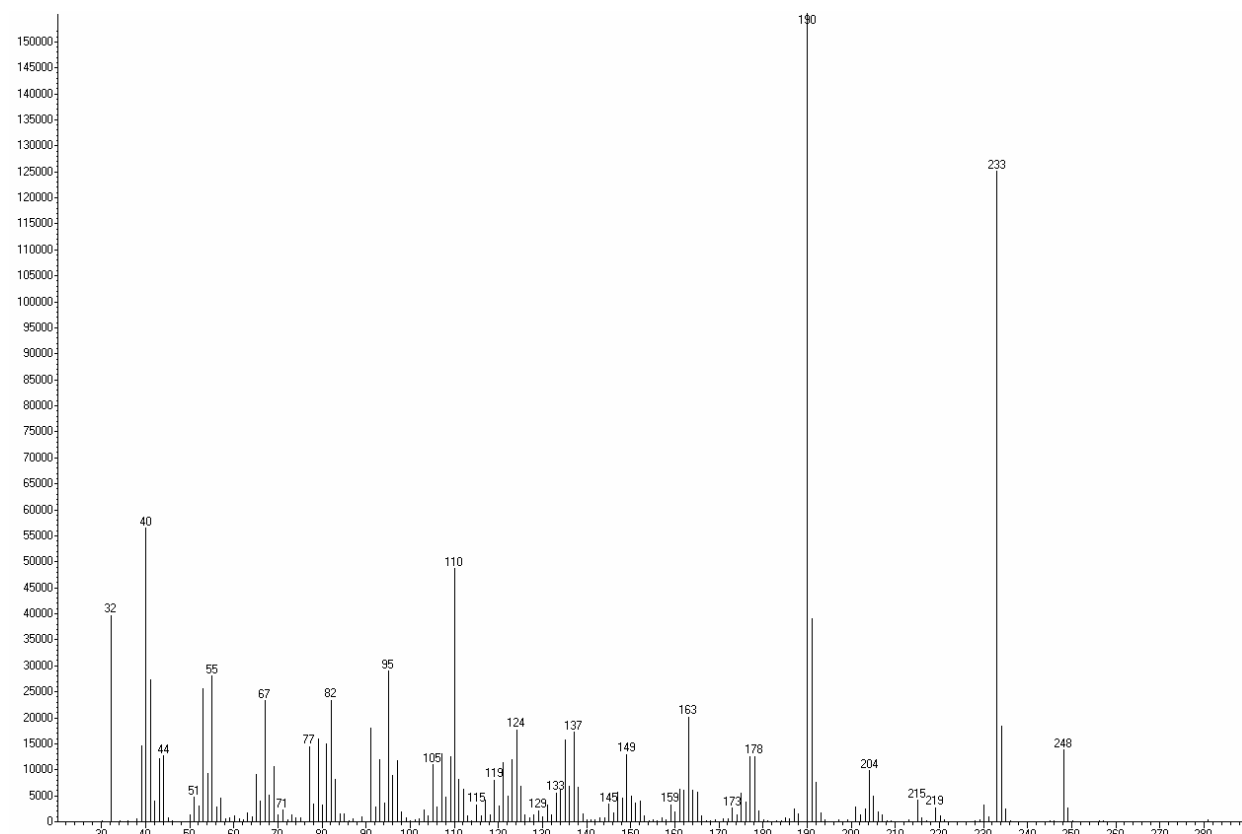


Figura 26. Compuesto no identificado en la columna DB5 MS del extracto de *Ambrosia peruviana* obtenido con dióxido de carbono supercrítico (CO₂-SC).

Fuente: El Autor.

Elaboración: El autor.

Los picos de del espectro de masas con su respectiva abundancia para el compuesto NI 20 son: 248 (8,88); 233 (80,45); 219 (1,73); 215 (2,64); 204 (6,33); 190 (100,00); 178 (8,11); 173 (1,67); 163 (12,94); 159 (2,10); 149 (8,30); 145 (2,17); 137 (11,04); 133 (3,58); 129 (1,40); 124 (11,34); 119 (5,15); 110 (31,32); 105 (7,02); 95 (18,61); 82 (15,06); 77 (9,30); 71 (1,44); 67 (14,96); 55 (18,04); 51 (3,01); 44 (8,17); 40 (36,29); 32 (25,53).

Espectro de masas del compuesto NI 22

El espectro de masas del compuesto NI 20 que tiene un tiempo de retención 65,6514 minutos, se muestra en la figura 27. Este compuesto tiene una abundancia relativa de 5,35% y un ión molecular de 262 m/z.

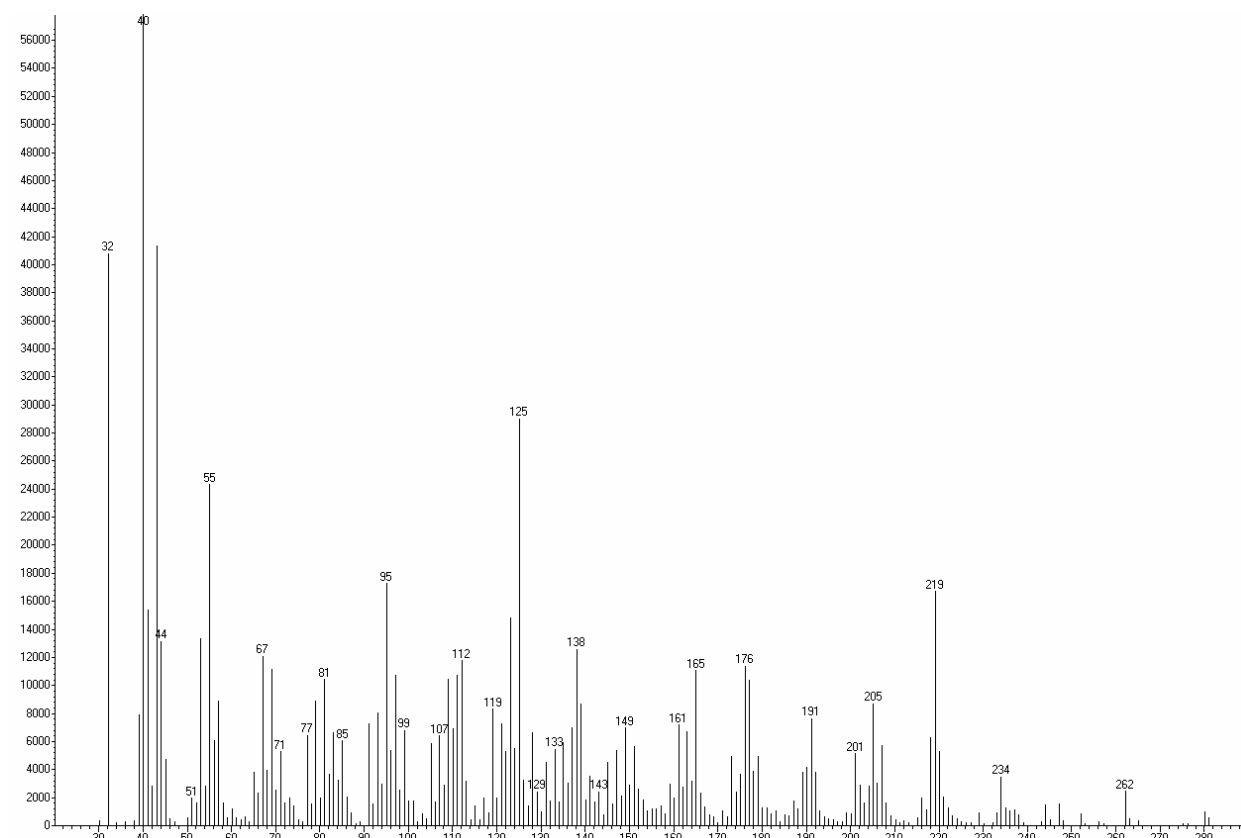


Figura 27. Compuesto no identificado en la columna DB5 MS del extracto de *Ambrosia peruviana* obtenido con dióxido de carbono supercrítico (CO₂-SC).

Fuente: El autor.

Elaboración: El autor.

Los picos de del espectro de masas con su respectiva abundancia para el compuesto NI 22 son: 262 (5,06); 234 (5,74); 219 (27,59); 205 (14,96); 201 (8,70); 191 (13,23); 176 (19,40); 165 (20,43); 161 (12,19); 149 (12,70); 143 (4,37); 138 (22,05); 133 (10,65); 129 (4,00); 125 (51,45); 119 (14,59); 112 (19,91); 107 (11,33); 99 (12,40); 95 (29,55); 85 (10,71); 81 (18,33); 77 (11,08); 71 (9,00); 67 (21,15); 55 (41,99); 51 (3,32); 44 (23,14); 40 (100,00); 32 (71,74).

CONCLUSIONES

- En el aceite esencial de *Ambrossia peruviana* extraído por hidrodestilación se identificaron 45 compuestos, de los cuales 26 estuvieron presentes en la columna no polar DB5-MS y la columna polar HP-INOWAX.
- Se determinaron como compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial de *Ambrossia peruviana* obtenido por hidrodestilación, α -Farnesene (1,73%), α -Curcumene (3,53%), γ -Curcumene (37,17%), Germacrene D (21,35), Myrcene (3,82%).
- Fue posible la aplicación de la tecnología de extracción con fluidos supercríticos para la obtención del extracto de *Ambrossia peruviana*.
- El rendimiento obtenido con EFSC fue de 0,20% (peso extracto/ peso materia vegetal) a condiciones del CO₂-SC de 40°C de temperatura y 150 bares de presión.

RECOMENDACIONES

- Previo a realizar la recolección de la materia vegetal se debe verificar la profusión de ésta en la zona, con el fin de evitar extinción de la misma.
- Durante el proceso de tratamiento post cosecha, cerciorarse de eliminar la mayor cantidad de impurezas que estén presentes en la muestra vegetal, con lo cual se evitara la contaminación del aceite esencial, conservando sus propiedades.

BIBLIOGRAFÍA

- Albuquerque, T., Santos, F., Sánchez, A., Oliveira, M., Bento, A., & Costa, H. (2014). *Food Chemistry*. 193, 187-195.
- Bandoni, A. (2002). *Los Recursos Vegetales Aromáticos en América Latina*. Buenos Aires, Argentina: CYTED Ciencia y tecnología para el desarrollo.
- Baslev, H., De la Torre, L., Navarrete, H., & Macía, M. (2008). *Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador*. Quito, Ecuador: Herbario QCA & Herbario AAU.
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinales*. Zaragoza, España: Acribia Editorial.
- Caldas, A. (2012). Optimización, escalamiento y diseño de una planta piloto de extracción sólido líquido. Universidad de Cuenca.
- Cano, C., Bonilla, P., Roque, M., & Ruiz, J. (2008). Actividad antimicótica in vitro y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (Muña). *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 25(3), 298-301.
- Cedrón, M. T. (2004). *Estudio analítico de compuestos volátiles en el vino, caracterización quimiométrica de distintas denominaciones de origen*. Tesis Doctoral. España.: Universidad de la Rioja.
- Chamba, F. (2015). Determinación de la composición química, propiedades físicas y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de individuos con flores masculinas de la especie *Hedyosmum racemosum* (Ruiz & Pav.) G. Don de la provincia de Loja, obtención del título en Bioquímica y Farmacia. Universidad Técnica Particular de Loja.
- De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M., & Balslev, H. (2008). Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador. *Quito & Aarhus (Herbario QCA & Herbario AAU)*, 105-114.
- García, C., Sánchez, A., & Villaseñor, J. (2014). La familia Asteraceae en el Parque Nacional Los Mármoles, Hidalgo, México. *Acta Botánica Mexicana*, 97-116.
- Hernández, A. (2008). Plantas Medicinales. *Revista Biocenosis*. 21 (1-2), 21.
- Hinojosa, R., & Moreno, M. (2013). Evaluación del Marco (*Ambrosia arborescens*) en el tratamiento contra garrapatas (*Ixodes ricinus*) en cuyes (*Cavia cobayo*) . Angaraes , Perú: Universidad para el Desarrollo Andino.

- Jiménez, G. (2015). Extracción supercrítica de antioxidantes lipofílicos es subproductos de guayaba "Pisidium guajava L", obtención del título a Ingeniero Químico. Universidad Técnica Particular de Loja .
- Jorgensen, P., & León, S. (1999). *Catálogo de las plantas vasculares del Ecuador*. St. Louis, Missouri: Missouri Botanical Garden Press.
- Katinas, L., Gutiérrez, D., Grossi, M., & Crisci, J. (2007). Panorama de la Familia Asteraceae (Compositae) en la República Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. 42 (1-2), 113-129.
- López, M. T. (2004). Los Aceites Esenciales. *Offram*. 23 (7), 88-89.
- Luque de Castro, M. D., Válcárcel, M., & Tena, M. T. (1993). *Extracción con Fluidos Supercríticos en el proceso analítico*. Barcelona, España: Editorial Reverté S. A.
- Marguilis, L., & Dorion, S. (2012). El proceso de nutrición en las plantas. *Biología - Geología*. 11 (1), 247.
- Martínez, A. (2003). *Aceites Esenciales*. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquía. p.p. 1-34.
- Mendiola, A. J. (Abril de 2008). *Extracción de compuestos bioactivos de microalgas mediante fluidos supercríticos*. Madrid, España: Universidad Autónoma de Madrid.
- Muñoz, F. (2002). *Plantas Medicinales y Aromáticas, estudio, cultivo y procesado*. Madrid, España: Ediciones Multiprensa. (1996).
- Ochoa, K., Paredes, L., Bejarano, D., & Silva, R. (2012). Extracción, caracterización y evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd (*Wiskataya*). *Scientia Agropecuaria* 3, 291 - 302.
- Ortuño, M. (2006). *Manual Práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes*. Madrid, España: AIYANA ediciones.
- Palacio, C. (2015). Determinación de la composición química, propiedades físicas y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de *Piper lanceifolium* de la provincia de Zamora, obtención del título de Bioquímica Farmacéutico. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Patzelt, E. (2002). *Flora del Ecuador*. Quito, Ecuador: Ministerio del Ambiente 2000.

- Peredo, H., Palou, E., & López, A. (2009). Aceites esenciales: métodos de extracción. *Temas Selectos de Ingeniería en Alimentos*. 1 (3), 24-32.
- Rios, L., Lopera, G., Caicedo, R., Granda, F., Montoya, A., Restrepo, G., & Suarez, R. (2007). Extracción y caracterización del aceite esencial de cardamomo (*Elettaria cardamomum*). *DYNA: Revista de la Facultad de Minas, Universidad Nacional de Colombia sede Medellin*. 74 (151), 47-52.
- Rivera, D. (2008). Caracterización de aceites esenciales por cromatografía de gases de tres especies del género Piper y evaluación de la actividad citotóxica, obtención del título de Químico Farmacéutico. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Rodríguez, M., Alcaraz, L., & Real, S. (2012). Procedimientos para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas. México DF, México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S.C. Instituto Politécnico Nacional.
- Rosales, J. (2012). Determinación de la composición química, propiedades físicas y actividad biológica del aceite esencial de *Baccharis obtusifolia* Kunth (Asteraceae) de la provincia de Loja, obtención del título en Bioquímica y Farmacia. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Ruiz, C., Díaz, C., & Rojas, R. (2015). Composición química de aceites esenciales de 10 plantas aromáticas peruanas. *Rev. Soc. Quím. Perú*, 83.
- Skoog, D., West, D., & James, H. (2001). *Fundamentos de Química Analítica*. Barcelona, España: Editorial REVERTÉ S. A. .
- Stupar, M., Ijaljević, M., Džamić, A., Unković, N., Ristić, M., & Vukojević, J. (2014). Antifungal activity of *HELICHRYSUM ITALICUM* (ROTH) G. DON (ASTERACEAE) essential oil against fungi isolated from cultural heritage objects. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 66 (4), 1539-1545.
- Valverde, A. (2002). Extracción con fluidos supercríticos: principios y aplicaciones al análisis de residuos de plaguicidas. *AOAC*, 141-154.
- Vargas, A., & Bottia, E. (2008). Estudio de la composición química de los aceites esenciales de seis especies vegetales cultivadas en los municipios de Bolívar y El Peñón – Santander, Colombia, obtención del título de Ingeniero Químico. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga - Colombia.
- Velasco, R. J., Villada, H. S., & Carrera, J. E. (2007). Aplicaciones de los Fluidos Supercríticos en la Agroindustria. *Información Tecnológica* , 53-65.

Yáñez, C., Ríos, N., Mora, F., Rojas, L., Díaz, T., Velasco, J., Melendez, P. (2011). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Ambrosia peruviana* Willd. de los llanos venezolanos. *Rev. peru. biol.* 18(2), 149-151.

ANEXOS

ANEXO 1

DETERMINACIÓN DE HUMEDAD RELATIVA

PRINCIPIO:

Establecer la humedad mediante la pérdida de peso de la muestra, debido a que es sometida a temperaturas altas en una estufa durante un tiempo determinado.

MATERIAL:

- Lámpara
- Pinza
- Balanza
- Crisol
- Desecador

PROCEDIMIENTO:

- Pesar en una cápsula o luna de reloj de 0,5 a 1 gr de la muestra; seguidamente colocarla durante 45 minutos en la lámpara ULTRA X a 37 °C.
- Enfriar la cápsula en el desecador por 5 minutos aproximadamente, hasta que la temperatura de la cápsula se iguale a la temperatura ambiente. Luego pesar y anotar el peso.
- Colocar la cápsula nuevamente en la estufa durante 15 minutos, enfriar en el desecador y pesar.
- Repetir el procedimiento hasta que el peso de la cápsula sea constante.

CÁLCULO:

$$Hm = \frac{(m_1 - m_2)}{(m_1 - m)} * 100$$

Dónde:

Hm: %de humedad

m: peso de la cápsula vacía (gr)

m₁: peso de la cápsula + muestra a analizar (gr).

m₂: peso de la cápsula + muestra seca (gr).

ANEXO 2

DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO

Para establecer el rendimiento de los aceites esenciales estudiados, se correlaciona el volumen de aceite esencial obtenido en cada destilación, con el peso de la material vegetal utilizada, aplicando la siguiente fórmula:

$$\%R = \frac{\text{Volumen (mL)}}{\text{Peso (gr.)}} * 100$$

Dónde:

R: Rendimiento expresado en porcentaje.

V: Volumen del aceite esencial extraído en mL.

P: Peso de la materia vegetal empleada en la destilación.

ANEXO 3

DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA A 20°C

(Método de Referencia)

Según la AFNOR NF T 75-111 JUNIO 1982

PROPUESTA:

La presente norma está asentada en la norma ISO 279-1981 publicada por la Organización Internacional de Normalización.

OBJETIVO DE APLICACIÓN:

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

REFERENCIAS:

- NF T 75-003 Aceites esenciales-Reglas generales para la preparación.
- NF T 75-110 Aceites esenciales-Preparación de la muestra previa al análisis.

PRINCIPIO:

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

NOTA:

- Si es necesario operar a una temperatura diferente debido a la naturaleza del aceite para indicar la norma referente al aceite esencial. La corrección para 20°C es de 0,0007 a 0,0008 por grado centígrado.
- La masa volumétrica a 20°C de un aceite esencial se reporta como la masa de un cierto volumen del aceite esencial a 20°C.

APARATOS:

- Picnómetro de vidrio.
- Baño termostático, mantenido a una temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$.
- Termómetro de precisión graduado de 10 a 30°C , con una variación de $0,2^{\circ}\text{C}$ a $0,1^{\circ}\text{C}$.
- Balanza analítica.

PROCEDIMIENTO:

- **Preparación del Picnómetro:** Limpiar rigurosamente y luego enjuagar el picnómetro, lavar con etanol y luego con acetona, pasarlo por una corriente de aire seco. Si es necesario secar el exterior del picnómetro con un trapo seco o con papel filtro. Cuando se equilibre la temperatura en el cuarto de balanza, pesar el picnómetro, con el tapón en su sitio con 1mg de precisión.
- **Peso del agua destilada:** Llenar el picnómetro con agua recién destilada, que esté a una temperatura de 20°C . Coloque el picnómetro en el baño termostático. Durante 30 minutos ajustar el nivel del agua hasta la marca, poner el tapón del picnómetro en su sitio, secar el exterior del picnómetro con un trapo seco o papel filtro. Cuando se equilibre la temperatura con el cuarto de balanzas, pesar el picnómetro lleno con el tapón en su sitio con un mg de precisión lleno igual que en el caso anterior.
- **Peso del aceite esencial:** Vaciar el picnómetro, luego enjuagar y secar como en el inicio. Efectuar las mismas operaciones solo que esta vez será con aceite esencial en lugar de agua.

EXPRESIÓN DE RESULTADOS:

La densidad relativa d_{20}^{20} se la expresa con la siguiente fórmula:

$$d_{20}^{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

Dónde:

d_{20}^{20} : Densidad relativa a 20°C , referido al agua a 20°C .

m_0 : masa en gramos del picnómetro vacío.

m_1 : masa en gramos del picnómetro con agua.

m_2 : masa en gramos del picnómetro con aceite esencial.

Se expresarán los resultados con tres decimales.

ANEXO 4

DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN

PRINCIPIO:

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

DEFINICIÓN:

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

La longitud de onda específica es $(589,3 \pm 0,3)$ nm, correspondiente a la radiación D1 y D2 del espectro de sodio.

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

APARATOS:

Refractómetro: Utilicé un refractómetro clásico que permita la lectura de los índices de refracción entre: 1,300 y 1.700 o con una precisión de $\pm 0,0002$.

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

1,3330 para agua destilada.

1,4906 para el p-cimeno.

1,5685 para el benzoato de bencilo.

1,6585 para el 1-bromo naftaleno.

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

MODO DE OPERACIÓN:

Determinación

Pasar una corriente de agua en el refractómetro, a fin de mantener el aparato a la temperatura de referencia de 20°C salvo para los aceites esenciales que no son líquidos a esa temperatura. En este caso deben adoptarse las temperaturas de 20°C y 30°C, según el punto de fusión del aceite esencial considerado. Esta temperatura no debe diferir de la temperatura de referencia más de ±0,2°C y debe mantenerse a ±0,2°C.

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

Resultados:

Cálculos. El índice de refracción a la temperatura de referencia está dado por la fórmula.

$$n_D^{t'} = n_D^t + 0.0004 (t' - t)$$

Dónde:

n_D^t = valor de la lectura, obtenida a la temperatura t , o aquella a la que se ha efectuado la determinación.

F = factor de corrección (0,0004)

t' = temperatura a la que se efectuó la lectura

t = temperatura a 20°C

Nota:

Expresar los resultados con cuatro cifras decimales.

La precisión de la determinación es de ±0,0002.

ANEXO 5

BIBLIOGRAFÍA INDICE DE KOVATS

De acuerdo con Tabla 8, Composición química del aceite de *Ambrossia peruviana* (GS/MS columna no polar DB-5 y columna polar HP-INOWAX).

1. Adams, R. (2009) Identification of Essential oil components by chromatography/ MS Spectrometry. Vol. 4.
2. Lucero, M.E.; Fredrickson, E.L.; Estell, R.E.; Morrison, A.A.; Richman, D.B., Volatile Composition of *Gutierrezia sarothrae* (Broom Snakeweed) as Determined by Steam Distillation and Solid Phase Microextraction, *J. Essent. Oil Res.*, 2006, 18, 2, 121-12.
3. Sefidkon, F.; Khajavi, M.S., Chemical composition of the essential oils of two *Salvia* species from Iran: *Salvia verticillata* L. and *Salvia santolinifolia* Boiss., *Flavour Fragr. J.*, 1999, 14, 2, 77-78.
4. Adams, R.P.; Nguyen, S., Infra-specific variation in *Juniperus deppeana* and *J. Sperryi* in the Davis Mountains of Texas: variation in leaf essential oils and random amplified polymorphic DNAs (RAPDs), *Phytologia*, 2005, 87, 2, 96-108.
5. Senatore, F.; de Feo, V., Chemical composition of the essential oil from *Tagetes mandonii* Sch. Bip. (Asteraceae), *Flavour Fragr. J.*, 1999, 14, 1, 32-34.
6. Angioni, A.; Barra, A.; Cereti, E.; Barile, D.; Coisson, J.D.; Arlorio, M.; Dessi, S.; Coroneo, V.; Cabras, P., Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L., *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52, 11, 3530-3535.
7. Marongiu, B.; Piras, A.; Pani, F.; Porcedda, S.; Ballero, M., Extraction, separation and isolation of essential oils from natural matrices by supercritical CO₂, *Flavour Fragr. J.*, 2003, 18, 6, 505-509.
8. Lucero, M.E.; Estell, R.E.; Frederickson, E.L., The essential oil composition of *Psoralea scoparius* (A. Gray) Rydb., *J. Essent. Oil Res.*, 2003, 15, 2, 108-111.
9. Baser, K.H.C.; Demirci, B.; Tabanca, N.; Özek, T.; Gören, N., Composition of the essential oils of *Tanacetum armenum* (DC.) Schultz Bip., *T. balsamita* L., *T. chiliophyllum* (Fisch. Mey.) Schultz Bip. var. *chiliophyllum* and *T. haradjani*

- (Rech. fil.) Grierson and the enantiomeric distribution of camphor and carvone, *Flavour Fragr. J.*, 2001, 16, 3, 195-200.
10. Saroglou, V.; Marin, P.D.; Rancic, A.; Veljic, M.; Skaltsa, H., Composition and antimicrobial activity of the essential oil of six *Hypericum* species from Serbia, *Biochem. Syst. Ecol.*, 2007, 35, 3, 146-152.
 11. Couladis, M.; Baziou, P.; Petrakis, P.V.; Harvala, C., Essential oil composition of *Hypericum perforatum* L. growing in different locations in Greece, *Flavour Fragr. J.*, 2001, 16, 3, 204-206.
 12. Kundakovic, T.; Fokialakis, N.; Kovacevic, N.; Chinou, I., Essential oil composition of *Achillea lingulata* and *A. umbellata*, *Flavour Fragr. J.*, 2007, 22, 3, 184-187.
 13. Tzakou, O.; Couladis, M.; Slavkovska, V.; Mimica-Dukic, N.; Jancic, R., The essential oil composition of *Salvia brachyodon* Vandas, *Flavour Fragr. J.*, 2003, 18, 1, 2-4.
 14. Menichini, F.; Tundis, R.; Bonesi, M.; de Cindio, B.; Loizzo, M.R.; Conforti, F.; Statti, G.A.; Menabeni, R.; Bettini, R.; Menichini, F., Chemical composition and bioactivity of *Citrus medica* L. cv. Diamante essential oil obtained by hydrodistillation, cold-pressing and supercritical carbon dioxide extraction, *Nat. Prod. Res.*, 2011, 25, 8, 789-799.
 15. Grujic-Jovanovic, S.; Skaltsa, H.D.; Marin, P.; Sokovic, M., Composition and antibacterial activity of the essential oil of six *Stachys* species from Serbia, *Flavour Fragr. J.*, 2004, 19, 2, 139-144.
 16. Formisano, C.; Rigano, D.; Napolitano, F.; Senatore, F.; Arnold, N.A.; Piozzi, F.; Rosselli, S., Volatile constituents of *Calamintha ariganifolia* Boiss. growing wild in Lebanon, *Natural Product Communications*, 2007, 2, 12, 1253-1256.
 17. Viljoen, A.; van Vuuren, S.; Ernst, E.; Klepser, M.; Demirci, B.; Baser, H.; van Wyk, B.-E., *Osmitopsis asteriscoides* (Asteraceae)-the antimicrobial activity and essential oil composition of a Cape-Dutch remedy, *J. Ethnopharmacol.*, 2003, 88, 2-3, 137-143.
 18. G. Özek a,, T. Özek a, G. Işcan a, K.H.C. Başer a, E. Hamzaoglu b, A. Duran. Comparison of hydrodistillation and microdistillation methods for the analysis of fruit volatiles of *Prangos pabularia* Lindl., and evaluation of its antimicrobial activity.
 19. Tzakou, O.; Couladis, M.; Slavkovska, V.; Mimica-Dukic, N.; Jancic, R., The essential oil composition of *Salvia brachyodon* Vandas, *Flavour Fragr. J.*, 2003, 18, 1, 2-4.

20. Noorizadeh, H.; Farmany, A., Exploration of linear and nonlinear modeling techniques to predict of retention index of essential oils, *J. Chin. Chem. Soc.*, 2010, 1268-1277.
21. Frizzo, C.D.; Serafini, L.A.; Dellacassa, E.; Lorenzo, D.; Moyna, P., Essential oil of *Baccharis uncinella* DC. from Southern Brazil, *Flavour Fragr. J.*, 2001, 16, 4, 286-288.
22. Capetanos, C.; Saroglou, V.; Marin, P.D.; Simic, A.; Skaltsa, H.D., Essential oil analysis of two endemic *Eringium* species from Serbia, *J. Serb. Chem. Soc.*, 2007, 72, 10, 961-965.
23. Bisio, A.; Ciarallo, G.; Romussi, G.; Fontana, N.; Mascolo, N.; Capasso, R.; Biscardi, D., Chemical Composition of Essential Oils from some *Salvia* species, *Phytother. Res.*, 1998, 12, S1, s117-s120.
24. Viña, A.; Murillo, E., Essential oil composition from twelve varieties of basil (*Ocimum* spp) grown in Columbia, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2003, 14, 5, 744-749.
25. Bertoli, A.; Pistelli, L.; Morelli, I.; Fraternali, D.; Giamperi, L.; Ricci, D., Volatile constituents of different parts (roots, stems and leaves) of *Smyrniololus* L., *Flavour Fragr. J.*, 2004, 19, 6, 522-525.
26. Tabanca N.; Demirci B.; Crockett S.L.; Baser K.H.C.; Wedge D.E., Chemical composition and antifungal activity of *Arnica longifolia*, *Aster hesperius*, and *Chrysothamnus nauseosus* essential oils, *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55, 21, 8430-8435.
27. Joichi, A.; Yomogida, K.; Awano, K.; Ueda, Y., Volatile components of tea-scented modern roses and ancient Chinese roses, *Flavour Fragr. J.*, 2005, 20, 2, 152-157.
28. Pavlovic, M.; Tzakou, O.; Petrakis, P.V.; Couladis, M., The essential oil of *Hypericum perforatum* L., *Hypericum tetrapterum* Fries and *Hypericum olympicum* L. growing in Greece, *Flavour Fragr. J.*, 2006, 21, 1, 84-87.
29. Boukhris, M.; Bouaziz, M.; Feki, I.; Jemai, H.; El Feki, A.; Sayadi, S., Hypoglycemic and antioxidant effects of leaf essential oil of *Pelargonium graveolens* L'Her. in alloxan induced diabetic rats, *Lipids in Health and Disease*, 2012, 11, 1, 1-10.