

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Desarrollo y validación de un método analítico para la evaluación de carvona y mentol en el aceite esencial de hierbabuena (*Mentha spicata*)

Zara Lucía Salguero Hernández

Guatemala

2011

Desarrollo y validación de un método analítico para la evaluación de carvona y mentol en el aceite esencial de hierbabuena (*Mentha spicata*)

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



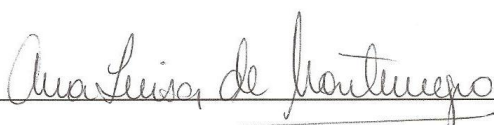
Desarrollo y validación de un método analítico para la evaluación de carvona y mentol en el aceite esencial de hierbabuena (*Mentha spicata*)

Trabajo de graduación presentado por Zara Lucía Salguero Hernández para optar al grado académico de
Licenciada en Química Farmacéutica

Guatemala

2011


Vo. Bo. :

(f) 
Licenciada Ana Luisa Mendizábal
Asesora

Tribunal Examinador:

(f) 
Licenciada Ana Luisa Mendizábal
Asesora

(f) 
Licenciada Lesbia Judith Pérez Camey

(f) 
Doctor Elfege Rolando López García

Fecha de aprobación: Guatemala, 05 de diciembre de 2011

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE GRÁFICOS.....	x
RESUMEN.....	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO CONCEPTUAL.....	2
A. Antecedentes	2
B. Justificación	3
C. Planteamiento del problema.....	4
D. Alcances y límites.....	4
III. MARCO TEÓRICO.....	5
A. Hierbabuena.....	5
1. Nombre científico	5
2. Familia.....	5
3. Nombre común	5
4. Descripción botánica.....	5
5. Hábitat	5
6. Agricultura.....	5
7. Usos medicinales atribuidos.....	6
8. Farmacognosia.....	6
9. Indicaciones terapéuticas.....	7
10. Composición química.....	7
B. Aceites esenciales.....	7
1. Reseña histórica y definición.....	7
2. Clasificación de los aceites esenciales.....	9
3. Distribución y estado natural.....	9
C. Uso de extractos y aceites esenciales de hierbabuena	10
1. Composición y propiedades químicas.....	10
2. Usos medicinales.....	11
3. Bioactividad.....	11

4.	Farmacología.	12
5.	Toxicología.	13
6.	Usos farmacéuticos, cosméticos e industrial del aceite esencial.	13
7.	Componentes	14
D.	Métodos de extracción de aceites esenciales	18
1.	Prensado	18
2.	Destilación por arrastre con vapor de agua.	18
3.	Extracción con disolventes.	18
4.	Enflorado	19
5.	Extracción con fluidos supercríticos.	19
E.	Métodos de separación de aceites esenciales	19
F.	Métodos de cuantificación de aceites esenciales	20
1.	Cromatografía de gases.	20
a.	Fundamentos y principios básicos.....	20
1)	Cromatografía gas-sólido.	20
2)	Cromatografía gas-líquido.....	20
b.	Instrumentación	21
1)	Fase móvil.	21
2)	Sistema de inyección de muestra.....	21
3)	Columna y sistema de control de temperatura.....	22
4)	Detectores.	24
a)	Detector de ionización de llama.....	24
b)	Detector de conductividad térmica.	25
c)	Detector termoiónico.....	25
d)	Detector de captura de electrones.	25
e)	Detector de emisión atómica.	25
5)	Fase estacionaria	25
c.	Espectrometría de masas (EM) como complemento de cromatografía de gases (CG).	26
d.	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y su papel en el estudio de aceites esenciales.....	26

G.	Validación de metodologías analíticas	27
1.	Definición general.....	27
2.	Parámetros de validación.....	27
IV.	MARCO METODOLÓGICO	29
A.	Objetivos	29
1.	Objetivo general.....	29
2.	Objetivos específicos	29
B.	Población.....	29
C.	Muestra	29
D.	Procedimiento o instrumentos.....	30
1.	Instalaciones	30
2.	Procedimiento	30
a.	Fase No.1	30
b.	Fase No. 2.....	30
c.	Fase No. 3	31
E.	Equipo	33
F.	Diseño de investigación	34
1.	Análisis estadístico.....	34
V.	MARCO OPERATIVO	36
A.	Recabación y tratamiento de datos.....	36
B.	Recursos	36
1.	Recurso humano	36
2.	Recurso material	36
a.	Documentos	36
b.	Suministros	36
c.	Reactivos.....	37
d.	Equipo	37
e.	Cristalería	37
VI.	RESULTADOS	38
A.	Parámetro de exactitud	38

B.	Parámetro de precisión	38
C.	Parámetro de selectividad/especificidad.....	39
D.	Parámetro de rango.....	41
E.	Parámetro de linealidad	41
F.	Cuantificación de carvona y mentol en la muestra de hierbabuena (<i>Mentha spicata</i>) 44	
VII.	DISCUSIÓN.....	45
VIII.	CONCLUSIONES.....	49
IX.	RECOMENDACIONES	51
X.	BIBLIOGRAFÍA.....	52
XI.	ANEXOS.....	55

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Comparación de porcentajes de composición de diversas mentas	10
2	Propiedades químicas del aceite esencial de hierbabuena (<i>Mentha spicata</i>)	11
3	Concentración mínima inhibidora de aceite esencial de hierbabuena (<i>Mentha spicata</i>) (% v/v)	12
4	Caracterización de componentes mayoritario y de interés del aceite esencial de hierbabuena (<i>Mentha spicata</i>)	14
5	Concentraciones de soluciones para la curva de calibración	32
6	Condiciones de trabajo del cromatógrafo de gases	35
7	Exactitud para el método de análisis cuantificación de mentol y carvona	39
8	Repetibilidad para el método de análisis cuantificación de mentol y carvona	39
9	Rango para el método de análisis cuantificación de mentol y carvona	42
10	Linealidad para el método de análisis cuantificación de mentol y carvona	42
11	Cuantificación de mentol y carvona en muestra de aceite esencial de hierbabuena	45
12	Análisis estadístico de mentol en método no optimizado	69
13	Análisis estadístico de carvona en método no optimizado	70
14	Resultados de concentraciones de método analítico	71

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico		Página
1	Estructura y espectro de masas de (-)-mentol	15
2	Estructura y espectro de masas de mentol	16
3	Estructura y espectro de masas de (l)-carvona	17
4	Sistema de cromatografía de gases	21
5	Horno con columna capilar	22
6	Tipos de columnas cromatográficas	23
7	Selectividad para el método de análisis de identificación de mentol y carvona con base al patrón	40
8	Selectividad para el método de análisis de identificación de mentol y carvona con base a la muestra de aceite esencial de hierbabuena	41
9	Curva de calibración de mentol	43
10	Curva de calibración de carvona	44

RESUMEN

Este trabajo de investigación consiste en el desarrollo y validación de una metodología analítica para la identificación y cuantificación de mentol y carvona en el aceite esencial de hierbabuena (*Mentha spicata*).

El propósito es desarrollar y validar un método analítico, el cual cumpla con los parámetros establecidos en la United States Pharmacopeia (USP 34) y las normas de validación de la Conferencia Internacional Tripartita sobre Armonización (ICH), empleando la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Para demostrar la obtención de resultados válidos y confiables con el empleo de este método, se evaluaron los parámetros estadísticos de exactitud, precisión, especificidad/selectividad, rango y linealidad del mismo, donde se demostró que cumple con los parámetros de exactitud, especificidad/selectividad, rango y linealidad, pero no cumple el parámetro de precisión para el análisis farmacéutico.

Este trabajo de investigación es un punto de partida para guiar futuras investigaciones, donde se busque optimizar el método modificando parámetros, condiciones y accesorios (columna, liner, etc.), que busquen analizar de forma rápida y eficiente los constituyentes principales del aceite esencial de hierbabuena, empleado tanto en la industria farmacéutica como de alimentos.

I. INTRODUCCIÓN

La hierbabuena (*Mentha spicata*), pertenece a la familia de las Lamiaceae, es una planta considerada originaria de Europa, aunque se desconoce el origen exacto de la misma. Es ampliamente utilizada como condimento en alimentos, pero también se usa por sus propiedades terapéuticas. Desde la antigüedad en Grecia, la Edad Media, a la actualidad su uso es heterogéneo y progresivo debido a las mejores técnicas de extracción y estudios que respaldan los atributos medicinales del mismo.

Actualmente la hierbabuena, se utiliza ampliamente en la industria farmacéutica, para el aprovechamiento de sus propiedades medicinales, incorporándolo entre los principios activos de las diversas formulaciones, con el fin de impulsar su origen natural.

El aceite esencial de hierbabuena es una mezcla compleja, constituida por por l-carvona (50-70%), l-limoneno (13-20%), felandreno, α -pineno y β -pineno (2-5%), d-pineno, mentol, β -bourboneno, cariofileno, 1,8-cineol, hidrato de trans sabineno, alcohol octílico, acetato de dihidrocarveol, mentol y cineol (2-4%). Siendo (l)-carvona y (-)-mentol los constituyentes a identificar y cuantificar, debido a su importancia terapéutica.

Este trabajo de investigación, tiene como objetivo fundamental desarrollar una metodología analítica para la evaluación cualitativa y cuantitativa de los constituyentes principales del aceite esencial de hierbabuena (*Menta spicata*) utilizando la técnica de cromatografía de gases, con detector de espectrometría de masas, el desarrollo de dicha metodología contribuye al control de calidad de los productos farmacéuticos que lo involucren.

II. MARCO CONCEPTUAL

A. Antecedentes

Los aceites esenciales son sustancias de gran aplicación en el ámbito industrial donde mayor importancia poseen. En la actualidad el uso del aceite esencial de hierbabuena (*Mentha spicata*), se ha incrementado, ya que no sólo se utiliza en la industria de alimentos sino también en la industria farmacéutica, por las propiedades terapéuticas que posee. Otra razón del incremento de su uso, es que se utiliza como sustituto de la *Menta piperita*.

La hierbabuena es empleada desde la antigüedad, los griegos la utilizaban como tónico y aroma. Se le atribuyó la fama de curar enfermedades de transmisión sexual como la gonorrea, al tiempo también se le atribuían virtudes afrodisiacas. Los romanos introdujeron la hierbabuena en Gran Bretaña, en donde se utilizó fundamentalmente para evitar que se cortara la leche. En la Edad Media, se empleó para higiene oral, en el tratamiento de llagas en las encías y para blanquear dientes (Sellar, 2003).

Al aceite esencial de hierbabuena, se le atribuyen diversas propiedades medicinales, entre otras, como antiprurítico, antiespasmódico, carminativo, emenagogo, insecticida, reconstituyente y estimulante. Además que agrega un sabor particular a los alimentos, por ello su uso se ha ampliado a través del tiempo. Por lo que debido a su uso, se han realizado diversos estudios, tanto de sus propiedades, como de su composición, para conocer los constituyentes responsables de las propiedades que este aceite esencial posee (Sellar, 2003).

Entre los estudios que se han efectuado para identificar y cuantificar los constituyentes del mismo se listan a continuación:

- Consuelo Díaz-Maroto, *et al.* realizó en 2003 el estudio *Influence of Drying on the Flavor Quality of Spearmint (Mentha spicata, L.)* donde comparó tres métodos de secado para la planta e identificó 28 constituyentes de esta por CG-MS.

- Isabel Morayma, *et al.* realizó en el 2006 el estudio *Análisis cuantitativo de mentol en el aceite esencial de menta*, en dicho análisis se obtuvo aceite esencial a partir de una extracción por arrastre de vapor y se cuantificó el mentol.
- Massimo Maffei, *et al.* realizó en 2006 el estudio *Essential oil from Mentha spicata L. (spearmint) cultivated in Italy*, en él se determinó por CG-MS la cantidad de carvona presente en diversas especies de hierbabuena, siendo éstas *Mentha longifolia* y *Mentha spicata*.
- A Hussain, *et al.* realizó en 2010 el estudio *Chemical Composition, and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oil of Spearmint (Mentha spicata, L) From Pakistan*, en el cual se investigó la composición química y acción oxidante de *Mentha spicata* por GC-MS, identificando 19 constituyentes químico del aceite esencial y una buena actividad antioxidante.
- Aly Derbalah, *et al.* realizó en 2010 el estudio *Efficacy of spearmint oil and powder as alternative of chemical control against C. maculatus in Cowpea Seeds*, en el cual por medio de GC-MS identificó la posible actividad biológica de los componentes del aceite esencial.

Los estudios presentados evalúan los constituyentes presentes en el aceite esencial de hierbabuena, utilizando cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas. En los diversos estudios se obtuvieron diferentes resultados, lo cual muestra la variabilidad de constituyentes presentes en hierbabuena dependiendo del área de cultivo.

B. Justificación

El aceite esencial de hierbabuena (*Mentha spicata*), es un aceite al cual se le atribuyen diversas propiedades terapéuticas, en Guatemala se utiliza en la industria farmacéutica. Por lo que en el presente trabajo de investigación se desarrolló una metodología analítica para identificar y cuantificar los constituyentes carvona y mentol en el aceite esencial de hierbabuena (*Mentha spicata*), para ello se empleo la técnica de cromatografía de gases con un detector de espectrometría de masas.

En la actualidad la industria farmacéutica guatemalteca debe asegurar que la materia prima que utiliza para la elaboración de medicamentos, así como la calidad del producto terminado cumple con los estándares de calidad establecidos. Las entidades regulatorias deben asegurar que la industria farmacéutica cumpla con los requerimientos de calidad de los medicamentos y que los métodos utilizados sean válidos y confiables, para garantizar la invariabilidad de los resultados.

Mediante el presente trabajo de investigación se desarrolló una metodología analítica validada, para efectuar análisis de aceite esencial de hierbabuena (*Mentha spicata*), que resulta ser una herramienta útil para el control de calidad del aceite esencial en sus diversas presentaciones y usos.

C. Planteamiento del problema

¿Mediante cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas, es factible tener resultados válidos y confiables, para la identificación y cuantificación de los constituyentes, carvona y mentol, en el aceite esencial de hierbabuena (*Mentha spicata*)?

D. Alcances y límites

Entre los alcances del estudio se lista la identificación y cuantificación de los componentes principales, (l)-carvona y (-)-mentol, en el aceite esencial de hierbabuena (*Mentha spicata*), utilizando cromatografía de gases con detector de masas.

Los límites del estudio consisten en obtener la validación de una metodología analítica que evalué carvona y mentol en el aceite esencial de hierbabuena, cumpliendo con los parámetros estadísticos de precisión, exactitud, linealidad, selectividad y rango.

III. MARCO TEÓRICO

A. Hierbabuena

1. Nombre científico.

Mentha spicata, L. (Cáceres, 1996).

2. Familia.

Lamiaceae (Cáceres, 1996).

3. Nombre común. Alavina, arvino, menta dulce, pan sut, yerba buena, hierbabuena (Cáceres, 1996).

4. Descripción botánica. Hierba aromática perenne, tallo rastrero, cuadrangular, pubescente, de 1 m de alto. Hojas verde brillante, sin peciolo, elíptico-oblongas, lanceoladas, ápice puntiagudo, 3-8 cm de largo, dentadas. Inflorescencias delgadas, flores funeliformes, 4 lóbulos, 3-4mm de largo, lavanda o rosadas, brácteas delgadas, al final de las ramas. Presenta 4 semillas, pero la mayoría son abortadas (Cáceres, 2009).

5. Hábitat. La hierbabuena es una planta cosmopolita de origen desconocido, se considera que posiblemente sea de origen europeo. Es una planta domesticada desde épocas remotas, su propagación y conservación es fácil, requiere suelos profundos, clima templado y húmedo, se reproduce en una altura de 1,500 a 2700 msnm. En Guatemala se cultiva en el Altiplano Central, en huertos y jardines familiares (Cáceres, 1996).

6. Agricultura. Requiere suelo medio, profundo, húmedo, clima templado o húmedo. Se propaga por estolones, que se siembran a 7-10 cm de profundidad y distancia de 35-60 cm, forma masas que luego se dividen para propagación. Su crecimiento es relativamente rápido, se recomienda fertilizar con 100-120 kg N/ha boro y cinc. Las principales plagas son orugas (*Diacrisia obliqua*) y hongos (*Corynospora cassicola*, *Erysiphe cichoracearum*, *Puccinia menthae*). Suelen hacerse dos cortes, las hojas se

colectan al máximo follaje antes de la floración, se separan del tallo y se secan a la sombra a no más de 35°C (Cáceres, 1996).

7. Usos medicinales atribuidos. La infusión o decocción de la planta se usa por vía oral para tratar afecciones digestivas (cólico, indigestión, diarrea, dispepsia, flatulencia, gastralgia, náusea y vómito), dismenorrea, dolores, reumatismo y neuralgia. Tópicamente se usa en cataplasma y compresas para tratar abscesos, piodermia, reumatismo y tumores; en baños para desodorizar los pies, lavar heridas y raspones. La decocción y el jugo de hojas se aplican en cataplasma y baños para cáncer, endurecimientos, tumores y úlceras (Cáceres, 2009).

Por lo que se le atribuye propiedad analgésica, antiséptica, antiemética, calmante, carminativa, diaforética, digestiva, diurética, emenagoga, espasmolítica, estimulante, estomáquica, expectorante, febrífuga, hipotensora, sudorífica y vermífuga (Cáceres, 2009).

8. Farmacognosia. El material con atributos médicos consiste en hojas secas, color verde brillante, sin color púrpura, olor fuerte y característico, microscópicamente presentan epidermis compuesta por células grandes, con paredes delgadas y sinuosas, hay tricomas en la epidermis y finas estrías cuticulares (Cáceres, 1996).

La planta contiene una importante cantidad de ácido rosmarínico (4-3% del peso seco) y derivados hidroxicinámicos totales (6-5% del peso seco), que son responsables de su actividad antioxidante (Cáceres, 1996).

El aceite esencial se obtiene por destilación a vapor de las hojas, es incoloro o ligeramente amarillo, densidad de 0.919-0.933, rotación óptica de $-50^{\circ} 15'$ a $+60^{\circ} 10'$, índice de refracción de 1.4851-1.4899, contenido de carvona de 57-71%, soluble a 25°C en volúmenes iguales de etanol 80%. Es usado como saborizante, tiene propiedades carminativas y se usa ampliamente en la industria para la formulación de dentífricos, lavados o enjuagues bucales y gomas de mascar (Cáceres, 1996).

9. Indicaciones terapéuticas. Por sus propiedades espasmolíticas, carminativas y calmantes se utiliza en el tratamiento de afecciones gastrointestinales y dolores espasmódicos. Se recomienda administrar tres veces al día en dosis de 2-4 g/taza en infusión o 1-3 mL de tintura 1-8 etanol 35%. El aceite esencial se recomienda para prevenir náuseas y dolores espasmódicos (Cáceres, 1996).

El aceite esencial, posee beneficio en una amplia gama de problemas respiratorios, refresca los músculos, relaja. Por lo que se utiliza además, para obtener un balance del metabolismo, como antiséptico, antifúngico, antiespasmódico, antiinfeccioso, antiparasitario, antiinflamatorio, bronquitis, catarro, mala respiración, hipertensión; obteniendo un gran beneficio en catarro, fiebre, cólicos, retención urinaria, náusea, fatiga, migraña, problemas nerviosos, estrés (Cáceres, 1996).

10. Composición química. La composición de esta planta es variable y compleja, ya que mediante un tamizaje fitoquímico se determinó la presencia de alcoholes, ácidos orgánicos, derivados diterpenicos y aceite esencial. El aceite esencial de las hojas contiene 1-carvona (50-70%), 1-limoneno (13-20%), felandreno, α y β -pineno (2-5%), d-pineno, alcohol octílico, acetato de dihidrocarveol, mentol y cineol (2-4%) (Cáceres, 1996).

B. Aceites esenciales

1. Reseña histórica y definición. Los aceites esenciales, así como las resinas y extractos son conocidos desde la antigüedad por su aplicación en el campo de la perfumería, cosmetología y por su uso medicinal. Este dato se basa en que existen referencias en manuscritos de las grandes civilizaciones antiguas, tales como Egipto, China y además hay alrededor de 200 citas en la Biblia relacionada con estas sustancias (Ortuño, 2006).

Por lo que en el siglo XVI se utilizó por primera vez el término de aceite esencial, descrito por Paracelso, quien lo definió como medicamento y los considero como “la quintaesencia”, en referencia a la teoría de Aristóteles dos mil años antes que

define el agua, la tierra, el aire y el fuego como elementos fundamentales que conforman un ser vivo o ser inanimado (Ortuño, 2006).

Entre los siglos XVI y XVII se prepararon en las farmacias por primera vez la mayor parte de aceites esenciales disponibles en la actualidad; con la llegada de la medicina moderna, el uso de vacunas y antibióticos sustituyó su uso, dejando en segundo plano, sin embargo en el siglo XIX su demanda creció hasta el punto de industrializar su producción (Ortuño, 2006).

En la actualidad, los modernos métodos de análisis permiten identificar de manera exhaustiva los componentes presentes en los aceites esenciales, particularmente los que están en cantidades traza, responsables del perfil aromático, sutileza y finura, lo que abre nuevas posibilidades en la obtención de productos interesantes, además que su uso en sustancias medicinales es un aplicación que actualmente vive un gran impulso (Ortuño, 2006).

Se definen como fracciones líquidas volátiles que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas, con importancia en la industria de alimentos como condimento y saborizantes, la industria cosmética en perfumes y aromatizantes y en la industria farmacéutica por sus funciones terapéuticas (Martínez, 2001). Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes que pueden tener la siguiente naturaleza química:

- Hidrocarburos terpénicos: terpenos y terpenoides.
- Aldehídos: aldehído benzoico, aldehído cinámico, butanal, propanal.
- Ácidos: acético, palmítico.
- Alcoholes: linalol, geraniol, mentol.
- Fenoles: anetol, eugenol.
- Ésteres: acetato de linalilo, acetato de geranilo.
- Cetonas: tuyona.
- Otros: éteres, derivados nitrogenados, sulfuros, tioéteres, tioésteres (Ortuño, 2006).

2. Clasificación de los aceites esenciales. Los criterios para la clasificación de los aceites esenciales son la consistencia, el origen y naturaleza (Aguilar, 2006).

Según su consistencia pueden ser:

- Esencias fluidas, que son líquidos muy volátiles a temperatura ambiente.
- Bálsamos, que se encuentran compuestos principalmente por sesquiterpenoides y poseen consistencia más viscosa, poca volatilidad y propensión a la volatilización.
- Oleorresinas, que poseen los aromas característicos de las plantas de las que son extraídos y son líquidos sumamente viscosos o sustancias semisólidas (Aguilar, 2006).

Según su origen pueden ser:

- Naturales, obtenidos directamente de la planta sin ser sometidos posteriormente a modificaciones físicas o químicas.
- Artificiales, obtenidos a través de los procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno de sus componentes o a partir de mezclas de varias esencias naturales extraídas de distintas plantas.
- Sintéticos, mezclas de diversos productos obtenidos por medio de procesos químicos (Aguilar, 2006).

3. Distribución y estado natural. Los aceites esenciales de las plantas aromáticas son una mezcla de sustancias aromáticas concentradas en forma de minúsculas gotas en diferentes partes de la planta: las hojas, la raíz, las flores, el tallo y las semillas (Olaya, 2003).

Son sustancias muy concentradas, por lo que se recomienda manejarlas con precaución. Las plantas deben provenir de cultivos orgánicos, cuidados y recolectados con esmero y atención, y para su uso no debe adulterarse el aceite esencial con diluciones (Olaya, 2003).

C. Uso de extractos y aceites esenciales de hierbabuena

1. Composición y propiedades químicas. El aceite esencial de hierbabuena (*Mentha spicata*) está constituido por l-carvona (50-70%), l-limoneno (13-20%), felandreno, α -pineno y β -pineno (2-5%), d-pineno, mentol, β -bourboneno, cariofileno, 1,8-cineol, hidrato de trans sabineno, alcohol octílico, acetato de dihidrocarveol y cineol (2-4%) (Cáceres, 2009).

Cuadro No. 1: Comparación de porcentajes de composición de diversas mentas

<i>Componente</i>	<i>Porcentaje de composición</i>		
	<i>Peppermint</i>	<i>Spearmint</i>	<i>Cornmint</i>
Mentol	27-50	0.1-0.3	65-80
Mentona	13-32	0.7-2	3-15
Isomentona	2-10	Trazas	1.9-4.8
1,8-cineol	5-14	1-2	0.1-0.3
(-)-limoneno	1-3	8-12	0.7-6.2
(-)-carvona	0	58-70	0
<i>Cis</i> -Dihidrocarvona	0	Trazas	0
<i>Trans</i> -Dihidrocarvona	0	Trazas	0

(Lis-Balchin, 2006).

Cuadro No. 2: Propiedades químicas del aceite esencial de hierbabuena (*Mentha spicata*)

<i>Propiedad</i>	<i>Valor</i>
Gravedad específica a 20° C	0.915-0.938
Índice de refracción a 20° C	1.4830-1.4910
Rotación óptica a 20° C	-40 a 60°
Solubilidad	1:1 en 80% alcohol

(Panda, 2011).

2. Usos medicinales. Este aceite esencial se le denomina en inglés “Spearmint”, se le atribuyen muchas propiedades, por ello posee gran uso medicinal. Entre las patologías que son tratadas en aromaterapia se listan la fatiga, cefalea, migraña, nerviosismo, estrés, además de tratar problemas gastrointestinales como vómitos, diarrea, flatulencia y constipación; así mismo trata cólicos, dispepsia, desórdenes hepato-biliares, estimula el apetito, mejora la respiración, trata la retención urinaria, problemas menstruales, asma, bronquitis, catarro, sinusitis, enfermedades severas de la piel, dermatitis, además de usarse como anestésico local (Lis-Balchin, 2006).

A este aceite esencial se le atribuyen propiedades anestésicas (local), antiinflamatorias, antisépticas, antiespasmódicas, astringentes, carminativas, colagogas, cicatrizantes, febrífuga, hepáticas, nerviosas, estimulantes, estomáticas y sedantes (Lis-Balchin, 2006).

3. Bioactividad. La actividad *in vitro* e *in vivo* que se ha estudiado de dicho aceite esencial indica que provoca una acción sobre el musculo liso, ya que en dilución con agua causa una relajación de la pared gástrica y disminuye las contracciones en el intestino y colón de perros (Lis-Balchin, 2006).

Posee actividad antimicrobial, ya que inhibe la proliferación de *Helicobacter pylori* y *Stafhylococcus aureus*. Además posee actividad inhibitoria contra *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus* y *Furarium moniliforme* a 3000ppm (alta concentración) (Lis-Balchin, 2006).

El aceite esencial de *Mentha spicata* (% v/v) posee una concentración mínima inhibidora (MICs), la cual se define como la menor concentración de un antimicrobiano que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo luego de su incubación (Andrews, 2001), con respecto a 10 diferentes microorganismo, los cuales se presentan a continuación.

Cuadro No. 3: Concentración mínima inhibidora de aceite esencial de hierbabuena
(*Mentha spicata*) (% v/v)

<i>Microorganismo</i>	<i>MIC</i>	<i>Microorganismo</i>	<i>MIC</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0.25	<i>Serratia marcescens</i>	0.5
<i>Aeromonas sobria</i>	0.25	<i>Staphylococcus aureus</i>	>2.0
<i>Candida albicans</i>	0.12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.5
<i>Enterococcus faecalis</i>	2.0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.25
<i>Escherichia coli</i>	0.25	<i>Salmonella typhimurium</i>	0.25

(Hammer, 1999).

4. Farmacología. Estudios antibacterianos demuestran que el extracto etanólico es activo contra *S. pyogenes* y *S. aureus*, la tintura es inactiva contra bacterias gram-negativo. El aceite esencial es antibacteriano. El extracto etanólico es un potente antifungico (*Furarium oxysporum*) (Cáceres, 1996).

Estudios farmacológicos evidencian que la infusión de hojas administrada por vía oral tiene una moderada actividad diurética en ratas. El extracto etanólico tiene actividad espasmolítica, calmante y carminativa (Cáceres, 1996).

5. Toxicología. El aceite esencial posee una toxicidad aguda, siendo su valor oral DL_{50} 5g/Kg para ratas y dérmico DL_{50} >5g/Kg en conejos y DL_{50} 2g/Kg para cerdos (Martindale, 1990).

Este aceite esencial muestra ser seguro al 4%, pero debe ser reducido a 0.1% en personas que padecen sensibilidad en pasta dental, ya que puede causar alergias, estomatitis y dermatitis. Y debido a que su constituyente principal es la carvona, se indica que el consumo de carvona es arriba de 1.0m g/Kg de peso corporal (Martindale, 1990).

6. Usos farmacéuticos, cosméticos e industrial del aceite esencial. El aceite esencial de *Mentha spicata* es utilizado, tanto en la industria farmacéutica, como es cosméticos y en la industria de alimentos. Es utilizado en baños, con el fin de refrescar la piel, además se utiliza en tratamientos faciales para limpiar la piel y en lociones (Lis-Balchin, 2006).

Este aceite además es utilizado en la industria para la elaboración de dentífricos, enjuague bucal, goma de mascar, dulces, aceite para el cabello, perfumes, cigarrillos y productos cosméticos de diferente índole. Otro uso que se le da a este aceite, es en la preparación de infusiones o en gotas del mismo, el cual es agregado a otros productos y lo utilizan para masajes, cremas y champús (Lis-Balchin, 2006).

En la industria de alimentos, es utilizado para añadir sabor a las comidas, también es ampliamente utilizado en la elaboración de dulces, galletas, jaleas, goma de mascar, jugos, carnes y otras bebidas. Otra industria que lo utiliza es la de fragancias para el hogar, quienes lo utilizan en el popurrí, sobres y aerosoles habitación, se combina con jazmín, lavanda y bergamota (Lis-Balchin, 2006).

7. Componentes:

Cuadro No. 4: Caracterización de componentes mayoritario y de interés del aceite esencial de hierbabuena (*Mentha spicata*)

<i>Propiedad</i>	<i>Mentol</i>	<i>Carvona</i>
Descripción	Cristales incoloros hexagonales y aciculares, con olor agradable similar menta. El (-)-mentol se funde entre 41°C y 44°C.	Aceite incoloro con olor característico.
Propiedades Físicas	Solubilidad: muy soluble en alcohol, cloroformo o éter, totalmente soluble en ácido acético glacial, aceite mineral o aceites fijos y volátiles, muy poco soluble en agua. Gravedad específica: 0.89 g/mL	Punto de fusión: 224-225°C. Gravedad específica : 0.956 - 0.959 g/mL Solubilidad: insoluble en agua caliente y fría. Soluble en etanol, éter, cloroformo, propilenglicol. Incompatibilidad: reacciona con agentes oxidantes.
Identificación	Pruebas diferenciales, 3,5-dinitrobenzoato, p-nitrobenzoato, complejo de ácido fosfórico, acetato de mentoxi, sulfonato d-camfor ácido pftalato.	Pruebas de sulfuro de hidrogeno oximas y caracterización fisicoquímica.
Usos	Uso en la industria farmacéutica como anestésico local, para aliviar dolor de cabeza y antiséptico del tracto respiratorio. Además de usos en dentífricos, enjuagues bucales y otras preparaciones bucales.	Uso como saborizante de productos alimenticios y bebidas. Además de gran uso en la industria farmacéutica en preparaciones bucales, pastas dentales y otros.

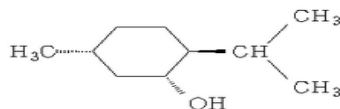
(Güenther, Vol:2. 2007).

Espectros: Espectros de masas de los principales constituyentes del aceite esencial de hierbabuena (*Mentha spicata*), siendo estos (-)-mentol y (l)-carvona (Spectral Database for Organic Compounds SDBS).

- (-) Mentol

Gráfica No. 1: Estructura y espectro de masas de (-)-mentol

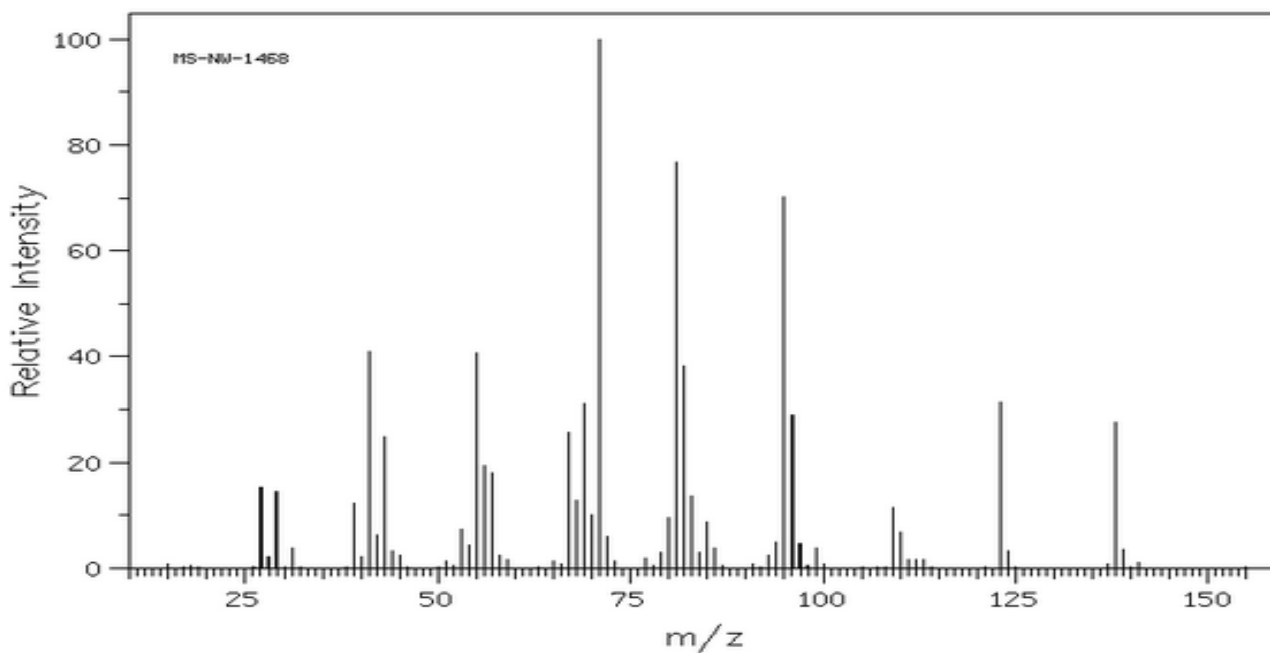
SDBS No: 2543 CAS Registry No.: 2216-51-5
 Molecular Formula: C₁₀H₂₀O Molecular Weight: 156.3
 SDBS-NO= 2543
 (-) -MENTHOL



Compound Name:
 (-)-menthol
 (1R,2S,5R)-2-isopropyl-5-methylcyclohexanol
 (1R-(1alpha,2beta,5alpha))-2-isopropyl-5-methylcyclohexanol

SDBS-Mass

MS-NW-1468 SDBS NO. 2543
 (-)-menthol
 C₁₀H₂₀O (Mass of molecular ion: 156)



Source Temperature: 250 °C
 Sample Temperature: 170 °C
 RESERVOIR, 75 eV

- Mentol

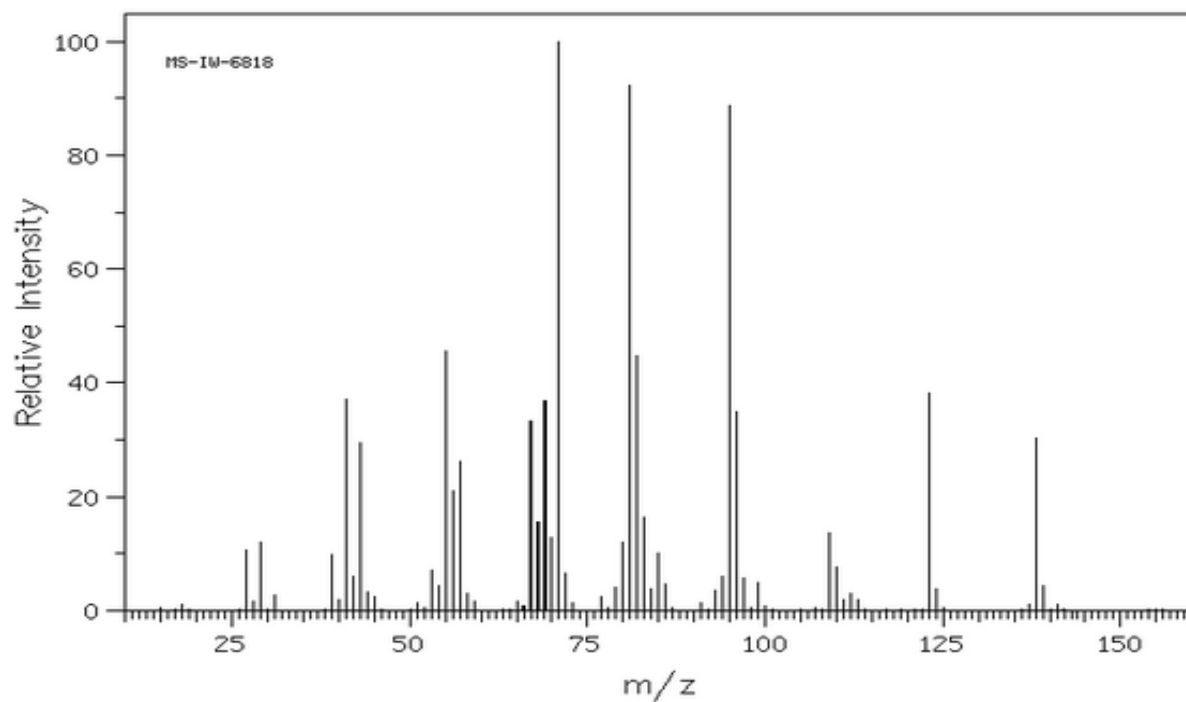
Gráfica No. 2: Estructura y espectro de masas de mentol

SDBS No: 37195 **CAS Registry No.:**
Molecular Formula: $C_{10}H_{20}O$ **Molecular Weight:** 156.3

Compound Name:
menthol
2-isopropyl-5-methylcyclohexanol

SDBS-Mass

MS-IW-6818 SDBS NO. 37195
menthol
C₁₀H₂₀O (Mass of molecular ion: 156)

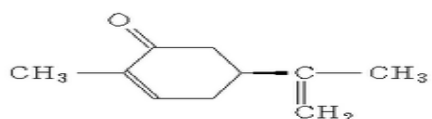


Source Temperature: 230 °C
Sample Temperature: 150 °C
RESERVOIR, 75 eV

- Carvona

Gráfica No. 3: Estructura y espectro de masas de (l)-carvona

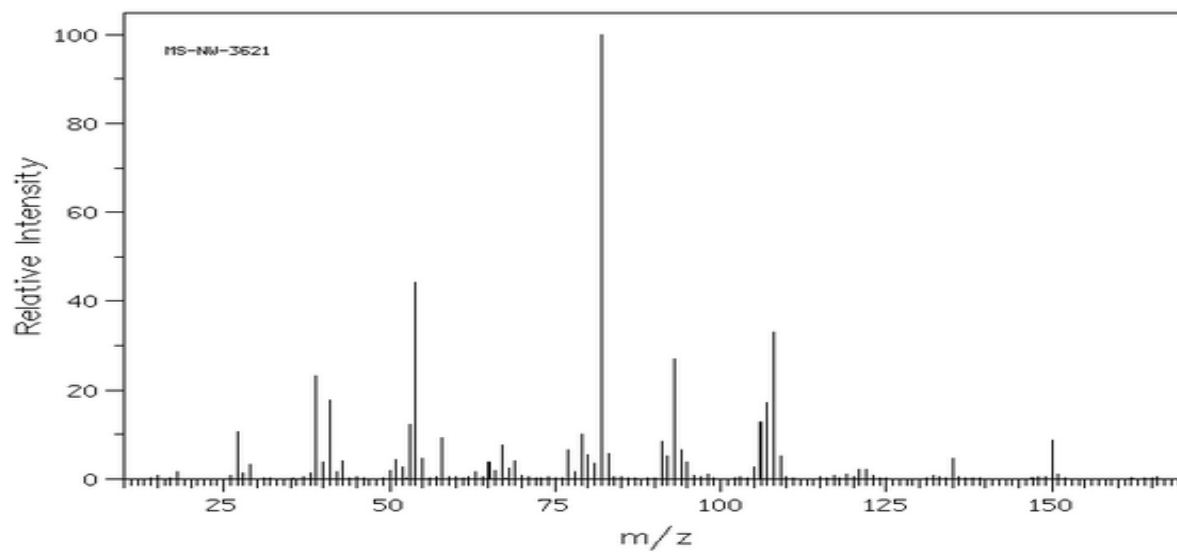
SDBS No.: 6738 **CAS Registry No.:** 2244-16-8
Molecular Formula: C₁₀H₁₄O **Molecular Weight:** 150.2
 SDBS-NO= 6738
 (S)-(+)-6,8-p-MENTHADIEN-2-ONE



Compound Name:
 (S)-(+)-6,8-p-menthadien-2-one
 (S)-(+)-carvone
 (S)-(+)-2-methyl-5-isopropenyl-2-cyclohexene-1-one

SDBS-Mass

MS-NW-3621 SDBS NO. 6738
 (S)-(+)-6,8-p-menthadien-2-one
 C₁₀H₁₄O (Mass of molecular ion: 150)



Source Temperature: 280 °C
 Sample Temperature: 180 °C
 RESERVOIR, 75 eV

D. Métodos de extracción de aceites esenciales.

Los aceites esenciales, son extraídos a partir de la planta por diversos métodos que permiten obtener ese metabolito que es el más útil y frágil elaborado por el vegetal. Las técnicas para extraer el aceite esencial son varias y pueden ser de expresión, destilación, extracción con solventes, enflorado, extracción con fluidos supecríticos, percolación, maceración, de agotamiento e incisión (Romero, 2004).

1. Prensado. Técnica que consiste en efectuar una fuerte presión sobre el vegetal, con la finalidad de exprimir mecánicamente, se libera liberando así el aceite, recolectándolo y filtrando para su purificación (Romero, 2004).

2. Destilación por arrastre con vapor de agua. Técnica que consiste en tomar la muestra vegetal fresca y cortada en trozos pequeños, se coloca en un recipiente cerrado el cual es sometido a una corriente de vapor de agua sobrecalentado, el aceite esencial así es arrastrado y posteriormente condensado, recolectado y separado de la fracción acuosa. Dicha técnica es ampliamente utilizada en aceites esenciales fluidos. Es muy utilizado en la industria cosmética, ya que es un método económico que permite la obtención de un aceite esencial con alta pureza y no requiere tecnología sofisticada (Journal of Chemical Education, 1980).

3. Extracción con disolventes. Técnica que se basa en la propiedad que tienen las partes aromáticas de las plantas, para disolverse en algunos solventes de los que luego son separados (Olaya, 2003). En el método de extracción con disolventes volátiles, la muestra seca y molida se coloca en contacto con disolventes, como etanol absoluto, cloroformo, éter etílico, hexano, etc. Dichos disolventes, solubilizan el aceite esencial pero también solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas y ceras, obteniéndose al final un aceite esencial impuro, por lo que su uso es limitado a la escala de laboratorio (Journal of Chemical Education, 1991).

4. Enflorado. Técnica utilizada en flores que contienen un muy bajo contenido de aceite esencial, por lo cual se colocan las flores en grasa, la cual va absorbiendo poco a poco la esencia, que una vez satura es decantada. Se utiliza ampliamente en flores como el jazmín, rosa, mimosa e iris. Una desventaja de este método es que posee un rendimiento en aceite muy bajo, sin embargo es muy utilizado en perfumería (Olaya, 2003).

5. Extracción con fluidos supercríticos. Técnica que consiste en colocar el material vegetal, cortado en trozos pequeños, licuado o molido en una cámara de acero inoxidable, se hace circular a través de la muestra un fluido en estado supercrítico (CO_2), los aceites esenciales así solubilizados son arrastrados por el fluido supercrítico que actúa como disolvente extractor, la presión del sistema se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente, obteniéndose un aceite esencial cuyo grado de pureza depende de las condiciones de extracción. Esta técnica presenta varias ventajas, ya que proporciona un rendimiento alto de extracción, es inocuo para el medio ambiente, el disolvente se elimina fácilmente e inclusive se puede reciclar así como las bajas temperaturas utilizadas para la extracción no cambian químicamente los componentes del aceite esencial; pero el equipo requerido es relativamente costoso ya que se requieren bombas de alta presión y sistemas de extracción también resistentes a las altas presiones (Yonei, 1995).

E. Métodos de separación de aceites esenciales.

La cromatografía en fase gaseosa es una técnica de separación de sustancias volátiles, la cual es realizada sobre una columna especial. La separación se basa en la diferencia del coeficiente de separación de los productos a separar, existentes entre una fase gaseosa (fase móvil) y una fase sólida (fase estacionaria) (Romero, 2004).

El método consiste en inyectar en la cabeza de la columna una pequeña cantidad de la muestra a analizar, luego se evapora con la mezcla de gas soporte, los compuestos son demorados en la fase estacionaria de la columna. La demora va a depender de la afinidad que tienen los componentes del aceite esencial con la fase estacionaria y móvil.

Los resultados obtenidos son proporcionados mediante el empleo de un detector que se sitúa al final de la columna (Romero, 2004).

F. Métodos de cuantificación de aceites esenciales.

1. Cromatografía de gases. Es una técnica analítica usada rutinariamente en multitud de laboratorios universitarios, industriales y de investigación, ya que posee una alta resolución, sensibilidad y selectividad (Hernández, 2002).

Mediante cromatografía de gases, la muestra es volatilizada y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica, lo cual implica que la muestra debe ser volátil y térmicamente estable. La elución se produce por el flujo de un gas inerte, que comúnmente es helio, nitrógeno o hidrógeno, que va a depender del tipo de detector (Barquero, 2006). Para la elución de la muestra se usa un gas inerte como fase móvil, de esta manera la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito, simplemente transporta el analito a través de la columna (Skoog, 2001).

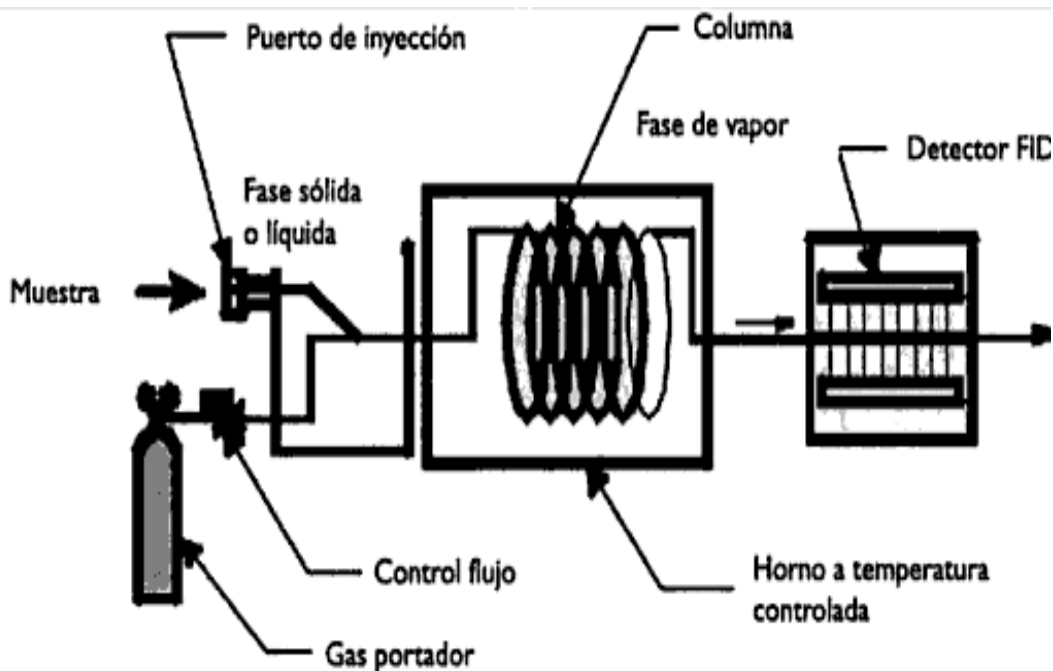
a. Fundamentos y principios básicos.

1) Cromatografía gas-sólido. En este tipo de cromatografía la fase estacionaria es sólida y la retención de los analitos se produce mediante adsorción. Este proceso de adsorción, el cual no es lineal, provoca que su aplicación sea limitada, ya que la retención del analito sobre la superficie es semipermanente y se obtienen picos de elución con colas. Su única aplicación es la separación de especies gaseosas de bajo peso molecular (Skoog, 2001).

2) Cromatografía gas-líquido. En este tipo de cromatografía, la fase estacionaria está constituida por moléculas de líquido inmovilizadas sistema de inyección de muestra, columna (generalmente dentro de un horno), y detector (Skoog, 2001). sobre la superficie de un gas inerte. Consiste en un sistema compuesto de gas portador, sistema de inyección de muestra, columna (generalmente dentro de un horno) y detector (Skoog, 2001).

b. Instrumentación. Los principales componentes de un cromatógrafo de gases son: gas portador, regulador de presión, filtros de oxígeno y humedad, inyector con sistema para control de temperatura, columna cromatográfica, detector con un sistema para el control de temperatura, sistema receptor, procesador y almacenamiento de información y registrador o monitor.

Gráfica No. 4: Sistema de cromatografía de gases



(Barquero, 2006).

1) Fase móvil. De naturaleza gaseosa, líquida o fluido supercrítico (potencia disolvente de los fluidos a temperaturas y presiones superiores al punto crítico). Dichas fases suelen ser gases inertes como Helio, Argón o Nitrógeno. El gas portador lleva las moléculas del analito a través de la columna, dicho movimiento es inhibido por la adsorción que presenta el analito tanto en las paredes de la columna cuanto en los materiales empaquetados en la misma (Rodríguez, 2004).

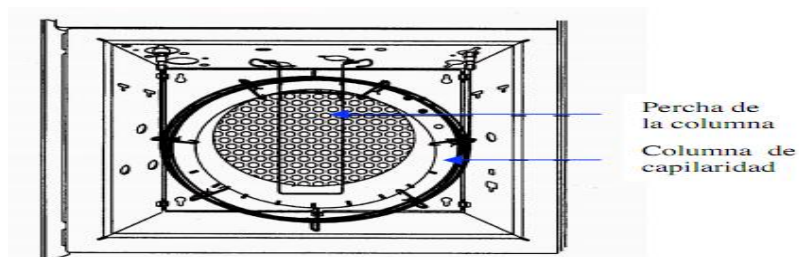
2) Sistema de inyección de muestra. El sistema de inyección de muestra, consiste en un dispositivo que permite la introducción de la muestra en la corriente del gas portador. Hay una gran variedad de diseños, la cual se basa en la muestra

a tratar. El más común es el inyector de líquidos, que puede utilizarse para sólidos (en disolución) y gases (mediante jeringas especiales). Dicho inyector se trata de una cámara situada a la entrada de la columna y calentada independientemente de ésta (a temperatura superior del punto de ebullición del componente más volátil de la muestra), que suele tener una membrana de caucho a través de la cual se introduce la muestra con la ayuda de una microjeringa hipodérmica (Rodríguez, 2004).

La temperatura de inyección debe ser 10-50°C mayor a la temperatura en la columna. Las jeringas son de varios tipos, por ejemplo existen de aguja fija o removible, varían en tamaño y ángulos, además los volúmenes de la muestra van desde 1 µl, líquidos de 0.1-10 µl y gases 0.5-5 ml (Rodríguez, 2004).

3) Columna y sistema de control de temperatura. Dentro de un horno que posee un sistema para controlar la temperatura se encuentra situada la columna, dicha columna está conectada en un extremo al puerto de inyección y en el otro extremo al detector. La columna debe estar en el centro del horno sin tener contacto con las paredes (ver Gráfica No. 5).

Gráfica No. 5: Horno con columna capilar



(Rodríguez, 2004).

Las columnas están hechas de diversos materiales, tales como cobre, acero inoxidable o tubos de vidrio, que pueden estar dobladas o enrolladas.

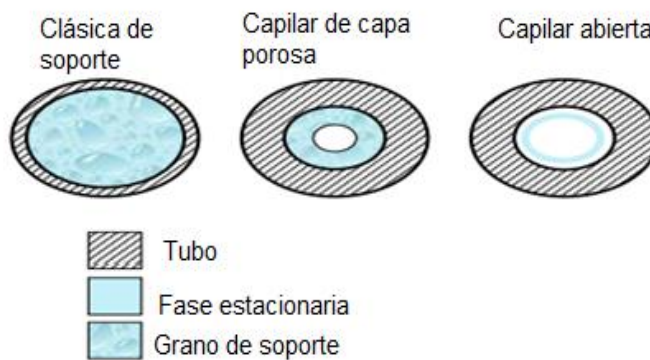
Las columnas analíticas tienen una longitud de 1-50 m. de longitud y de 2-4 mm. de diámetro. Según se encuentre en ella distribuida la fase estacionaria y el valor que alcance la relación de fases se originan los diferentes tipos de columnas. La

separación de la mezcla se realiza dentro de la columna, por lo tanto, es la parte más importante del cromatógrafo (Rodríguez, 2004).

Existen dos tipos de columnas:

- Empaquetadas o de relleno: estas columnas empaquetadas contienen un soporte sólido inerte con una cubierta delgada de la fase líquida. El soporte sólido es frecuentemente tierra de diatomeas. La fase líquida puede tener una viscosidad baja y una alta solubilidad para la mezcla de componentes (Rodríguez, 2004).
- Tubulares abiertas o capilares (más eficaces y rápidas): las columnas de capilaridad contienen una capa de revestimiento sólido dentro de ella con poro en el centro. Estas columnas son mejores porque se les puede aplicar una velocidad óptima de flujo más rápida (aprox. de 2- 5 ml por min en lugar de 1 ml por min). Debido a este tipo de columnas, los análisis han podido ser más sensibles (Rodríguez, 2004).

Gráfica No. 6: Tipos de columnas cromatográficas



(Rodríguez, 2004).

Entre los factores que disminuyen la eficacia de una columna se encuentran:

- Longitud de la columna, que provoca tiempos de análisis muy largos y de baja resolución.
- Diámetro de la columna, factor importante en columnas capilares abiertas, por la resistencia que opone la fase móvil a la transferencia de masas.
- Tamaño de la partícula de relleno.

- Naturaleza de las fases, en donde el gas portador afecta según su viscosidad y valores del coeficiente de difusión en la fase móvil.
- Cantidad de fase estacionaria, ya que a menor cantidad mayor eficacia.
- Temperatura de la columna, ya que al aumentar ésta disminuye la eficacia al afectar directamente en el coeficiente de reparto.
- Velocidad del gas portador, debido a que una velocidad elevada es la óptima.
- Cantidad de muestra inyectada (Rodríguez, 2004).

4) Detectores. Son dispositivos que indican y miden los solutos presentes en la corriente del gas acarreador, convirtiendo una señal no medible directamente en una señal elaborable de una propiedad física, esta es elaborada por comparación entre el gas acarreador puro y el mismo gas con cada uno de los componentes previamente separados en la columna, lo cual es traducido a una señal eléctrica que se amplifica y registra al momento de salir de la columna (Rodríguez, 2004).

Las características de un buen detector indican que debe ser altamente sensible (sensibilidad), tiene una respuesta lineal (linealidad) sobre un amplio rango de concentración y es relativamente insensible a variaciones de flujo y temperatura (rango dinámico lineal) (Rodríguez, 2004).

a) Detector de ionización de llama. Se refiere a un quemador de hidrógeno/oxígeno en donde se mezcla el eluyente con hidrógeno. En esta cámara se produce una chispa para causar ignición, los compuestos orgánicos al quemarse se pirolizan y producen iones y electrones, aprovechando que se convierte en conductor se induce una corriente eléctrica, para detectar iones desprendidos. Es un detector de masa, puesto que aproximadamente el número de iones desprendidos es igual al número de carbonos transformados (Skoog, 2001).

b) Detector de conductividad térmica. Éste detector se basa en el calentamiento de una resistencia mediante el uso de una corriente eléctrica. Esta resistencia tiene una temperatura que depende del gas circundante. La resistencia es un hilo que puede ser de tungsteno, platino u oro (Skoog, 2001).

c) Detector termoiónico. Detector utilizado para compuestos fosforados y nitrogenados, su funcionamiento es parecido al detector de ionización de llama, ya que el eluyente se mezcla con hidrógeno y se quema. El gas se pasa alrededor de una esfera de rubidio calentado a 600°C y es sometida a 180 V, creando un plasma en el cual se forman gran cantidad de iones que producen una corriente medible, la intensidad es proporcional al número de iones formados y así se determina la concentración o porcentaje del analito (Skoog, 2001).

d) Detector de captura de electrones. Su funcionamiento se basa en la emisión de una partícula β por parte de átomos como Ni o tritio, el electrón emitido ioniza el gas portador y emite una ráfaga de electrones, esta ráfaga es sensible a una corriente eléctrica que se puede medir. En el caso de especies orgánicas los electrones son absorbidos, disminuyendo la intensidad de la corriente (Skoog, 2001).

e) Detector de emisión atómica. En este detector el gas se introduce en un plasma de helio inducido por microondas, la alta temperatura ioniza toda la muestra y se miden los espectros de emisión mediante un espectrofotómetro acoplado al sistema (Skoog, 2001).

5) Fase estacionaria. La fase estacionaria es la encargada de separar los componentes de la muestra. Puede ser un sólido o un líquido los cuales están dispuestos sobre un sólido que actúa como soporte (columna). El sólido de la fase estacionaria puede ser de aluminio, sílica gel, carbón o tierra de diatomeas; mientras el líquido de la fase estacionaria debe tener una baja viscosidad y una alta y diferencial solubilidad. Cuando la fase estacionaria es un sólido, la interacción que puede tener con la fase móvil se puede clasificar en: adsorción, intercambio iónico y de filtración sobre geles

porosos. Cuando es un líquido, la interacción con la fase móvil recibe el nombre de reparto, esta última es la forma más usual de hacer cromatografía de gases (Rodríguez, 2004).

Una fase estacionaria líquida inmovilizada requiere:

- Características de reparto.
- Baja volatilidad.
- Baja reactividad.
- Estabilidad térmica. (Skoog, 2001).

c. Espectrometría de masas (EM) como complemento de cromatografía de gases (CG). La cromatografía de gases es una técnica que permite realizar separaciones, pero puede convertirse en un instrumento analítico con ayuda de la espectrometría de masas. El punto de acoplamiento de ambas técnicas está en utilizar el espectrómetro de masas como un tipo de detector muy selectivo en el cromatógrafo de gases, por lo que se puede obtener no sólo una separación de los componentes de la mezcla sino también información referente a su peso molecular y patrón de fragmentación estructural característico de cada componente (Gasco, 1969).

d. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y su papel en el estudio de aceites esenciales. La acoplación de la espectrometría de masas a la cromatografía de gases, resulta ser un método atractivo para el análisis de aceites esenciales. Esto debido a que permite obtener un espectro de masas para cada componente eluido, obteniendo datos como su peso molecular e información estructural (Crippen, 1973).

Otro punto importante a tener en cuenta es la existencia de bases de datos con los espectros de masas de muchos componentes, por lo que mediante el conocimiento del índice de Kovats (determinado en dos columnas de diferente polaridad) y el espectro de masas, es posible realizar la identificación química de muchos de los componentes de un

aceite esencial, sean monoterpenos u otros tipos de sustancias características de dichos aceites (Crippen, 1973).

G. Validación de metodologías analíticas.

1. Definición general: según el Reglamento Técnico centroamericano:

«Validación es el establecimiento de la evidencia documental que un procedimiento analítico conducirá con un alto grado de seguridad a la obtención de resultados precisos y exactos dentro de las especificaciones y atributos de calidad previamente establecidos» (RTCA, 2006: 4).

Siendo la validación de un procedimiento analítico:

«La validación de un procedimiento analítico consiste en Procedimiento para establecer pruebas documentales que demuestren científicamente que un método analítico tiene las características de desempeño que son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas. Implica la demostración de la determinación de las fuentes de variabilidad y del error sistemático y al azar de un procedimiento, no sólo dentro de la calibración sino en el análisis de muestras reales » (RTCA, 2006: 4).

2. Parámetros de validación: Para llevar a cabo la validación de un método analítico, el cual es la adaptación específica de una técnica analítica para un propósito de medición seleccionado identificando los recursos, materiales y el procedimiento; se deben medir ciertos parámetros de desempeño analítico, siendo estos: exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad e intervalo de linealidad.

- a. Exactitud o veracidad: se refiere a la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese método y el valor verdadero.
- b. Precisión: expresa el grado de concordancia entre una serie de mediciones individuales obtenidas de múltiples muestreos de una misma muestra homogénea

original o bien a partir de varias muestras obtenidas por dilución de la muestra bajo condiciones establecidas. Existen tres formas de determinación: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

- c. Especificidad o selectividad: se refiere a la capacidad de evaluar, medir e identificar simultánea o separadamente, los analitos de interés de forma inequívoca sin interferencias de impurezas, productos de degradación, compuestos relacionados, excipientes u otras sustancias previsibles presentes en la matriz de la muestra.
- d. Límite de detección: es la mínima cantidad de analito en una muestra que puede ser detectada por una única medición, pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto. Es comúnmente expresado como concentración del analito.
- e. Límite de cuantificación: es la mínima cantidad del analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con precisión y exactitud aceptable. Es un parámetro del análisis cuantitativo para niveles bajos de compuestos en matrices de muestra y se usa particularmente para la determinación de, impurezas y productos de degradación.
- f. Linealidad: se refiere a la capacidad para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras en un intervalo dado.
- g. Intervalo: es la amplitud entre las concentraciones inferior y superior de analito (incluyendo esos niveles), en la cual se puede determinar el analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad utilizando el método según se describe (RTCA, 2006).

IV. MARCO METODOLÓGICO

A. Objetivos

1. Objetivo general

Proponer un método validado para la identificación y cuantificación de (-)-mentol y (l)-carvona en aceite esencial de hierbabuena (*Mentha spicata*) por cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (CG-MS).

2. Objetivos específicos

a. Generar información acerca de la composición del aceite esencial de hierbabuena (*Mentha spicata*) usado como materia prima para la fabricación de productos farmacéuticos y naturales en la industria guatemalteca.

b. Identificar los distintos constituyentes volátiles del aceite esencial puro de hierbabuena (*Mentha spicata*) por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-MS).

c. Cuantificar carvona y mentol en el aceite esencial puro de hierbabuena (*Mentha spicata*) por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-MS).

B. Población

La población a estudiar es el aceite esencial de hierbabuena (*Mentha spicata*), colectado en diversos puntos de Guatemala.

C. Muestra

Cantidad requerida de aceite esencial de hierbabuena (*Mentha spicata*), colectado en diversos puntos de Guatemala.

D. Procedimiento o instrumentos

1. Instalaciones. Laboratorio de Análisis Instrumental Avanzado de la Universidad del Valle de Guatemala Edificio II-1, 18 avenida 11-95 zona 15 Vista Hermosa III, Guatemala.

2. Procedimiento. La metodología se realizó en tres fases:

a. Fase No.1. Identificación de los componentes del aceite esencial de hierbabuena, (l)-carvona y (-)-mentol, siendo estos los principales constituyentes, por medio de la técnica de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas. Para ello se corrió una muestra de aceite esencial de hierbabuena (*Mentha spicata*), para la verificación de la presencia de mentol y carvona, la confirmación de la presencia de estos constituyentes se realizó mediante la identificación de los picos obtenidos por medio de su espectro de masas y este se comparó con la base de datos NIST V2.0.

b. Fase No. 2. Cuantificación de los componentes principales de hierbabuena, (l)-carvona y (-)-mentol, en base a la realización de una curva de calibración con soluciones estándares de distinta concentración de cada uno; por medio de la técnica de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas.

1) *Preparación de estándar interno.* Para la preparación del estándar interno se transfirieron 10 mL de 1-butanol 99.5% en un balón volumétrico de 100 mL, el cual se aforó con etanol absoluto 99.5% y se mezcló. La concentración final del estándar interno fue de 0.1M.

2) *Preparación de patrón.* Para la preparación de la solución madre compuesta, la cual contiene carvona y mentol, se pesó una cantidad de 0.1024 g de mentol en cristales y 3.83488 g de carvona líquida, se transfirieron a un balón volumétrico de 50 mL, el cual se aforó con etanol absoluto 99.5% y se mezcló. La concentración final de la solución madre compuesta fue de 2.049 mg/mL de mentol y 76.696 mg/mL de carvona.

3) *Preparación de soluciones para la curva de calibración.* Para la preparación de las soluciones de la curva de calibración, se transfirieron 1, 2, 4, 6 y 8 mL del patrón a balones volumétricos de 10 mL, adicionando a cada balón 1 mL de estándar interno y se mezcló. La concentración final de cada solución se presenta en el siguiente cuadro.

Cuadro No. 5: Concentraciones de soluciones para la curva de calibración.

<i>No</i>	<i>Mentol</i> (mg/mL)	<i>Carvona</i> (mg/mL)
1	0.2049	7.6696
2	0.4099	15.3392
3	0.8198	30.6784
4	1.2296	46.0176
5	1.6395	61.3568

4) *Preparación de la muestra.* Para la preparación de la muestra de aceite esencial de hierbabuena (*Mentha spicata*), se transfirió una alícuota de 1 mL de aceite esencial de hierbabuena a un balón volumétrico de 50 mL, se adicionó 5 mL de estándar interno y se mezcló.

c. Fase No. 3. Validación del método de cuantificación, utilizando un cromatógrafo Agilent 6850 network GC system con un detector de triple eje de espectrometría de masas Agilent 5975C VLMSD.

Para validar la metodología de análisis, se determino que se trabaja con un ensayo categoría I, con base en la United States Pharmacopeia 34, se evaluaron los siguientes parámetros de desempeño analítico que sugiere la USP 34:

1) Exactitud. La exactitud se determinó mediante la aplicación del método analítico a una prueba de recobro, para ello se obtuvieron tres repeticiones de cuantificación de tres concentraciones diferentes de la curva de calibración, siendo estas la solución 1, 3 y 5; se prosigue a determinar el porcentaje de recobro de cada solución.

Los resultados se compararon con el criterio de aceptación de porcentaje de recuperación %R: 95.00% - 105.00%.

2) Precisión. La precisión se determinó mediante la medida del grado de repetibilidad, la prueba se realizó analizando la muestra en un mismo laboratorio, bajo las mismas condiciones de operación, por el mismo analista, con los mismos aparatos y reactivos y en el curso de la misma serie de análisis efectuados. Se analizaron las soluciones de la curva de calibración 1, 3 y 5, un mínimo de cinco veces cada una.

Se calculó la desviación estándar de la serie de datos y la desviación estándar relativa, con un criterio de aceptación de $\leq 5\%$ para análisis farmacéutico y $\leq 20\%$ para análisis de alimentos (Huber, 2006).

3) Linealidad. Para la linealidad se preparó una solución patrón (solución madre) y a partir de ésta se realizaron las diluciones necesarias obteniéndose como mínimo cinco diferentes concentraciones (soluciones hijas). La curva de calibración se obtuvo con los resultados de las soluciones hijas, las cuales se analizaron con el mismo método analítico, bajo las mismas condiciones, el mismo aparato o instrumento, el mismo día y el mismo analista.

Se determinó la ecuación de la regresión lineal ($y = mx + b$) calculada por el método de mínimos cuadrados basada los datos de relación (y) versus concentración (x). Se evaluó con $p = 0.05$.

Se demostraron los resultados de:

- Ecuación de la recta
- Coeficiente de correlación r
- Coeficiente de determinación r^2

Se presentaron los resultados de los criterios de aceptación con coeficiente de correlación múltiple $R \geq 0.990$ y coeficiente de determinación $R^2 \geq 0.990$ (Huber, 2006).

4) Rango. Para determinar el rango, se determinó la cuantificación menor y la mayor de las diversas lecturas realizadas, con un criterio de aceptación de 80 a 120% de las concentraciones en evaluación.

5) Especificidad/selectividad. La especificidad del método analítico se determinó mediante la medida del mismo de diferenciar el analito en presencia de otros componentes de la muestra, para ello se determinó por medio de la comparación de los picos obtenidos en el cromatograma con la biblioteca NIST 2.0, para determinar la presencia de mentol y carvona.

E. Equipo.

Se utilizó un Cromatógrafo Agilent 6850 network GC system y un detector de espectrometría de masas Agilent 5975C VLMSD con triple axis detector. Se trabajó con las siguientes condiciones:

Cuadro No. 6: Condiciones de trabajo del cromatógrafo de gases

<i>Parámetros instrumentales</i>	<i>Condiciones</i>
Horno	Temperatura inicial 50°C.
	Rampa 1: Velocidad 3.00 c/min. Temperatura final 150°C. Tiempo final 0.00 min.
	Rampa 2: Velocidad 10.00 c/min. Temperatura final 250°C. Tiempo final 5.00 min.
Inyector	Modo: Split.
	Temperatura: 250 °C.
	Gas: helio.
Columna	Columna capilar Hp-5MS (5% PhenylMethylSiloxane) longitud 30m; diámetro de 0.25mm; grosor del film 0.25µm.
Interfase	Temperatura 280°C.

F. Diseño de investigación

El diseño consiste en un análisis cualitativo y cuantitativo. La identificación y cuantificación de (l)-carvona y (-)-mentol presentes en el aceite esencial de hierbabuena (*Mentha spicata*) se llevó a cabo con base en la técnica de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas. Dicha metodología se validó y los resultados fueron tratados por estadística descriptiva.

1. Análisis estadístico

a. Estadística descriptiva. Se utilizó para determinar los parámetros del método de validación de la metodología analítica propuesta.

- 1) La media aritmética: también denominada promedio, es la suma de los valores de todas las observaciones divididas por el número total de datos (Skoog, 2001).
 - 2) Desviación estándar: es una medida de dispersión usada en estadística la cual indica cuánto tienden a alejarse los valores puntuales del promedio en una distribución (Skoog, 2001).
 - 3) Desviación estándar relativa: se refiere a la desviación estándar expresada como un porcentaje de la media (Skoog, 2001).
 - 4) Método de mínimos cuadrados: se refiere al análisis de regresión lineal, que permite generar la ecuación de la curva de calibración, $y = mx + b$, donde y es la relación de área, x la concentración, m la pendiente y b el intercepto. Se determina un valor de correlación R y el coeficiente de determinación R^2 , que indican la linealidad de los datos (Skoog, 2001).
- b. Software NIST V2.0: base de datos que proporciona información sobre los picos de los cromatogramas y espectros de masas de la biblioteca.
- c. Software ChemStation®: permite el manejo del equipo de cromatografía de gases con detector de masas, así como el manejo de datos.

V. MARCO OPERATIVO

A. Recabación y tratamiento de datos

La recabación y tratamiento de datos se llevó a cabo por medio del Software ChemStation® del Cromatógrafo Agilent 6850 network GC system y un detector de espectrometría de masas Agilent 5975C VLMSD con triple axis detector.

Los cálculos para la determinación de la concentración de un compuesto en la muestra desconocida se realizaron en base a la ecuación de la recta de la curva de calibración que se elaboró por regresión lineal. Además la identificación de los picos obtenidos se realizó por medio de su espectro de masas y este se compara con la base de datos NIST V2.0.

B. Recursos

1. Recurso humano

- a. Autora: Zara Lucía Salguero Hernández.
- b. Asesora: Licda. Ana Luisa Mendizábal de Montenegro.
- c. Colaborador: Lic. E. Rolando López.
- d. Gerente General de Extract S.A: Ing. César Vettorazzi.

2. Recurso material

a. Documentos

- 1) Referencias bibliográficas.
- 2) Tesis de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- 3) Artículos científicos.
- 4) Páginas de internet.
- 5) Base de datos de espectro AIST.
- 6) Manual Agilent.

b. Suministros

- 1) Hojas.
- 2) Tinta.
- 3) Fotocopias.

c. Reactivos

- 1) Aceite esencial puro 2 onzas.
- 2) Reactivos y estándares:
 - Etanol absoluto 99.5%.
 - Butanol 99.5%.
 - (S)-(+)-Carvona 99%.
 - (-)-Mentol 99%.

d. Equipo

- 1) Cromatógrafo de gases Agilent 6850 Network GC System con automuestreador.
- 2) Detector de espectrometría de masas Agilent 5975C VLMSD con triple axis detector.
- 3) Balanza analítica.
- 4) Computadora.
- 5) Impresora.
- 6) Espátula.
- 7) Fotocopiadora.

e. Cristalería

- 1) Balones volumétricos de 10, 50 y 100 mL.
- 2) Pipeta volumétrica de 1, 5 y 10 mL.
- 3) Beakers de 25 y 100 mL.
- 4) Pipeta pasteur.
- 5) Viales.

VI. RESULTADOS

A. Parámetro de exactitud

Cuadro No. 7: Exactitud para el método de análisis cuantificación de mentol y carvona

<i>Compuesto</i>	<i>Parámetro estadístico</i>	<i>Concentración 1 (mg/mL)</i>	<i>Concentración 2 (mg/mL)</i>	<i>Concentración 3 (mg/mL)</i>
Mentol	Nominal	0.2049	0.8198	1.6395
	Valor medio	0.2023	0.8483	1.4612
	%Recuperación	98.7241211	103.474346	89.1241793
	Promedio recuperación	97.1075		
Carvona	Nominal	7.6696	30.6784	61.3568
	Valor medio	6.9954	34.0065	54.1983
	%Recuperación	91.2089	110.8483	88.3330
	Promedio recuperación	96.7967		

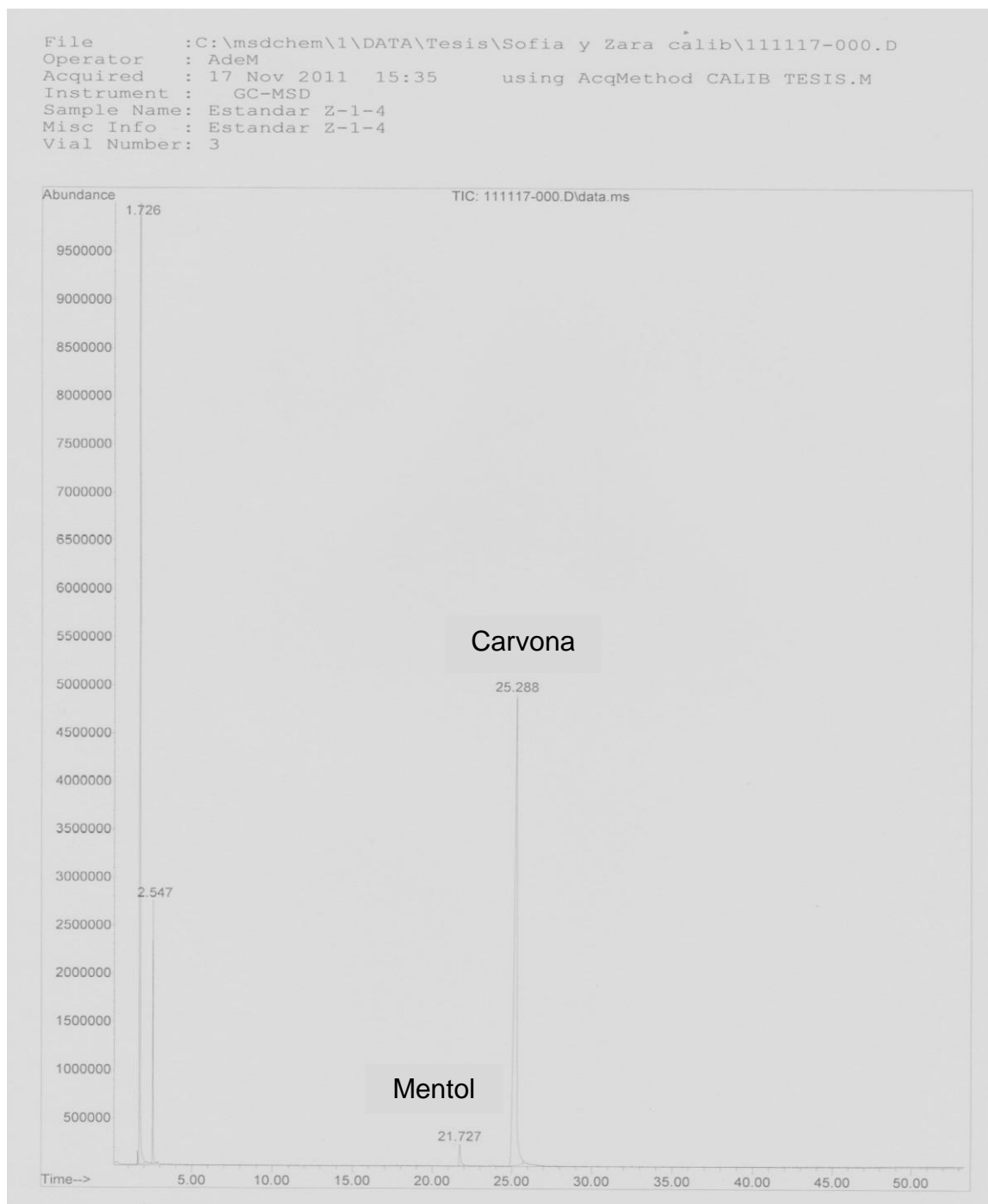
B. Parámetro de precisión

Cuadro No. 8: Repetibilidad para el método de análisis cuantificación de mentol y carvona

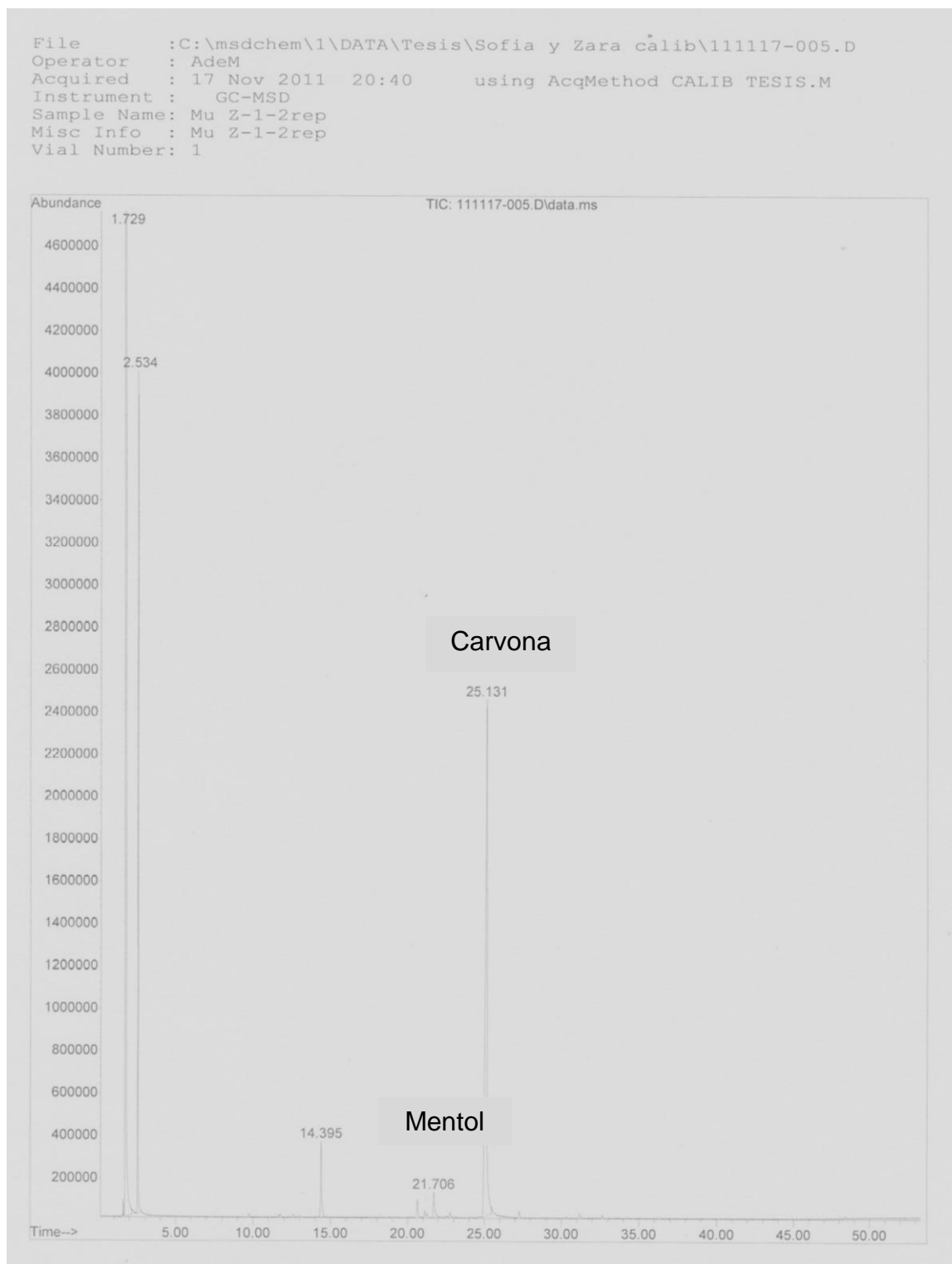
<i>Parámetro estadístico</i>	<i>Mentol</i>			<i>Carvona</i>		
Valor nominal (mg/mL)	0.2049	0.8198	1.6395	7.6696	30.6784	61.3568
Número de datos	5			5		
Valor medio (mg/mL)	0.2050	0.8424	1.4880	7.1562	33.5935	55.2536
Desviación estándar	0.0249	0.1162	0.1537	0.5593	4.5699	7.6916
Desviación estándar relativa (%RSD)	12.1268	13.7947	10.3322	7.8151	13.6034	13.9206
Valor medio de %RSD	12.0846			11.7797		

C. Parámetro de selectividad/especificidad

Gráfica No. 7: Selectividad para el método de análisis de identificación de mentol y carvona con base al patrón



Gráfica No. 8: Selectividad para el método de análisis de identificación de mentol y carvona con base en la muestra de aceite esencial de hierbabuena



D. Parámetro de rango

Cuadro No. 9: Rango para el método de análisis cuantificación de mentol y carvona

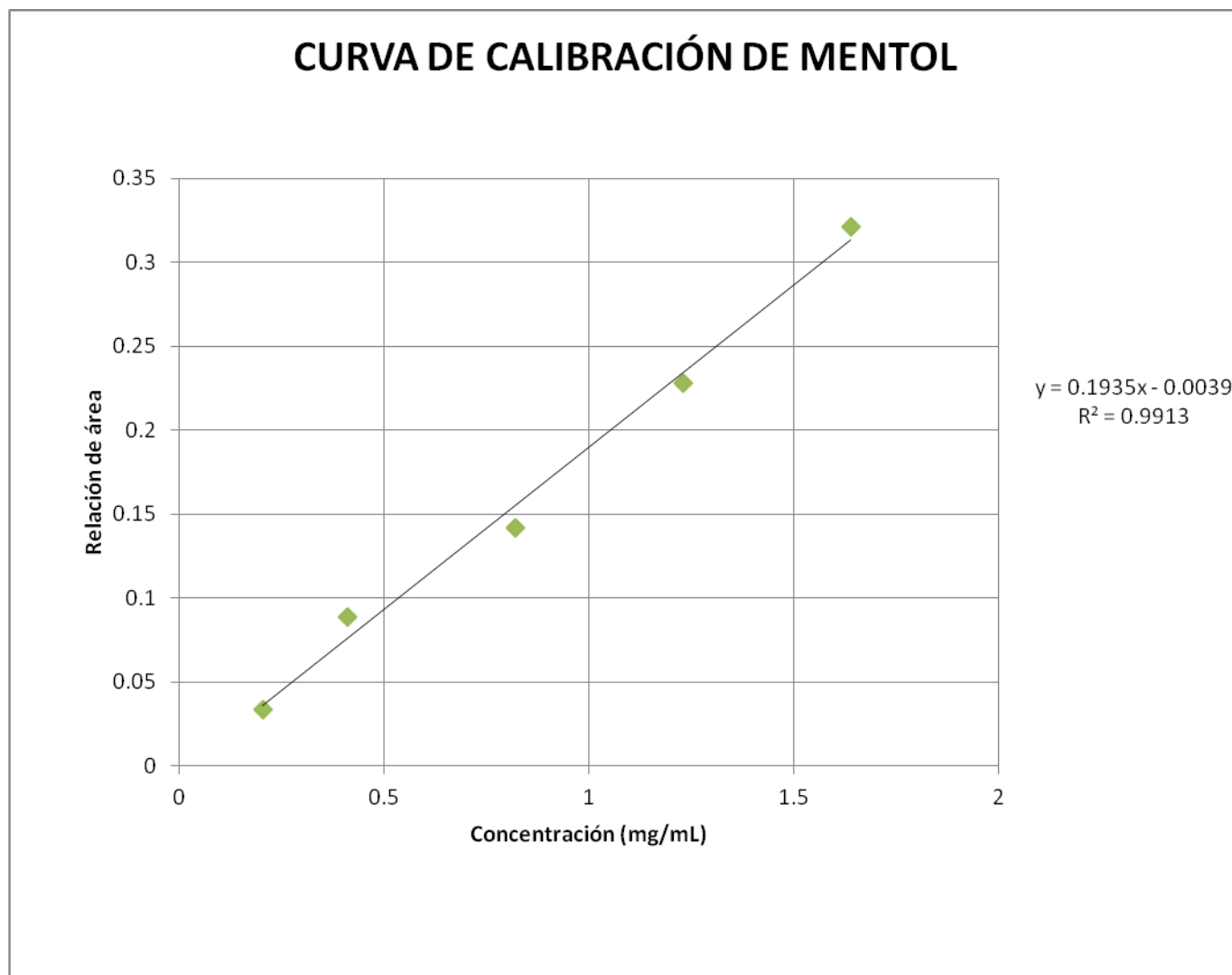
<i>Parámetro estadístico</i>	<i>Mentol</i>		<i>Carvona</i>	
Valores comprendidos (mg/mL)	0.2049	1.6395	7.6696	61.3568
Rango	0.1747-1.6802		6.3854-62.5624	
Rango de aceptación	0.1639-1.9674		6.1356-73.6282	

E. Parámetro de linealidad

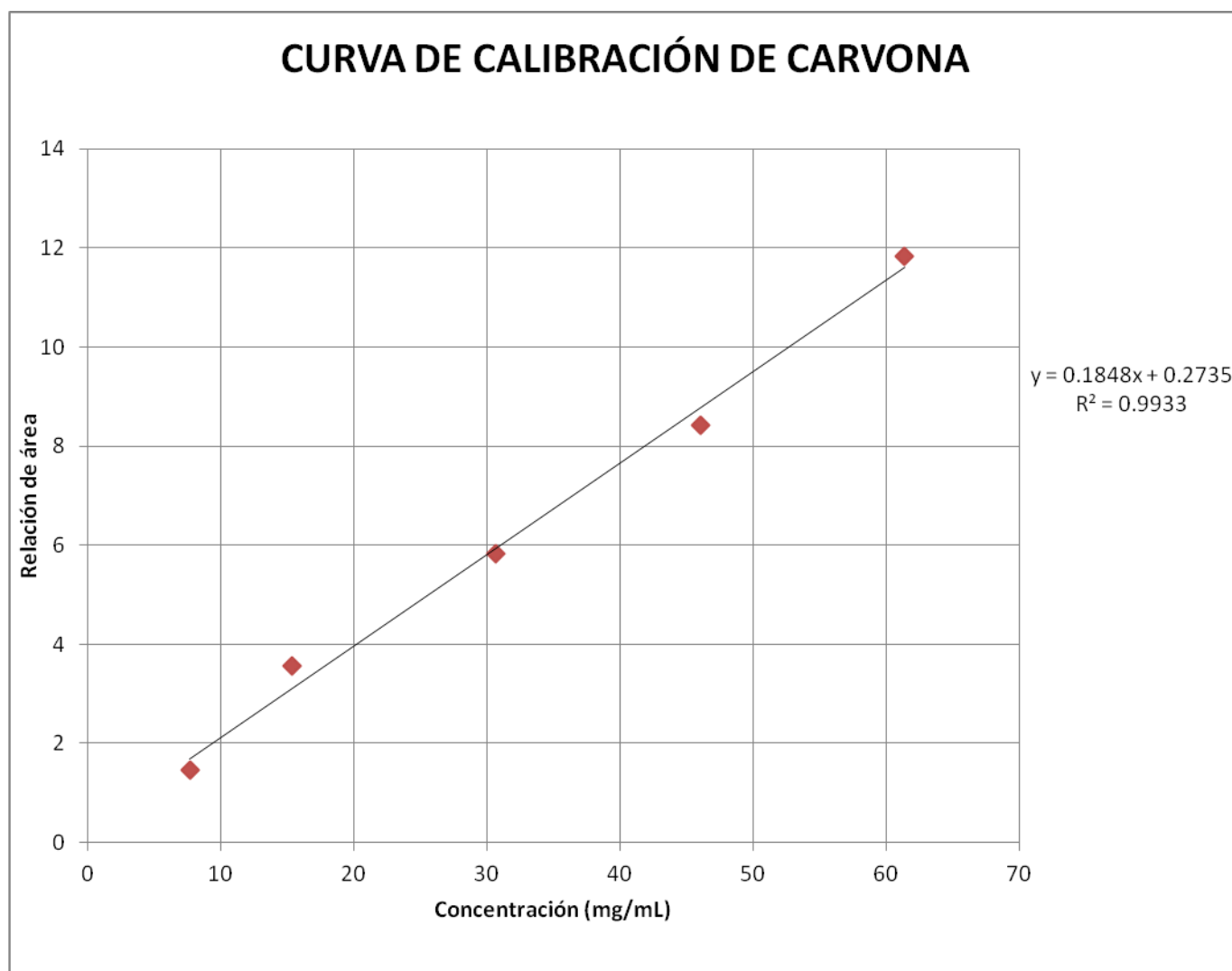
Cuadro No. 10: Linealidad para el método de análisis cuantificación de mentol y carvona

<i>Parámetro estadístico</i>	<i>Mentol</i>	<i>Carvona</i>
Ecuación de la recta	$Y = 0.1935 (\pm 0.0105) x - 0.0039 (\pm 0.0104)$	$Y = 0.1848 (\pm 0.0088) x + 0.2735 (\pm 0.3305)$
Coefficiente de correlación R	0.9956	0.9966
Coefficiente de determinación R^2	0.9913	0.9933

Gráfica No. 9: Curva de calibración de mentol



Gráfica No. 10: Curva de calibración de carvona



F. Cuantificación de carvona y mentol en la muestra de hierbabuena (*Mentha spicata*)

Cuadro No. 11: Cuantificación de mentol y carvona en muestra de aceite esencial de hierbabuena

<i>Parámetro estadístico</i>	<i>Mentol</i>	<i>Carvona</i>
Concentración 1 (mg/mL)	0.6857	14.9692
Concentración 2 (mg/mL)	0.6177	13.7685
Concentración 3 (mg/mL)	0.4979	11.7046
Valor medio (mg/mL)	0.6004	13.4808
Desviación estándar	0.0951	1.6512
Desviación estándar relativa (%RSD)	15.8367	12.2484

VII. DISCUSIÓN

A. Parámetro de exactitud

En los resultados de exactitud para las soluciones 1, 3 y 5, que representan el 80, 100 y 120% de la concentración, se demuestra un porcentaje de recuperación promedio para el mentol de 97.1075% y para la carvona de 96.7967% (Cuadro No. 7). Estos resultados están dentro del rango de aceptación de 95-105% de porcentaje de recuperación, lo que indica que el método muestra concordancia entre el valor experimental y el valor recuperado. Debido a que se muestra un buen recobro del estándar, se establece la exactitud en el método analítico.

Para la obtención de estos resultados, fue necesario optimizar el método, ya que previamente, al trabajar con 6 concentraciones diferentes, el triplicado de las concentraciones 1, 3 y 6 presentaba un porcentaje de recuperación promedio para mentol de 133.75% y para la carvona de 78.95% (Cuadro No. 12 y 13). Estos valores no presentaban un recobro adecuado, ya que no estaban dentro del rango de aceptación, por lo que se prosiguió a realizar los análisis utilizando un estándar interno, 1-butanol 0.1M, con la finalidad de disminuir los errores sistemáticos como de azar en la determinación de concentraciones de los componentes de interés, carvona y mentol. De esa forma la carvona y el mentol, así como el estándar interno responden proporcionalmente a las fluctuaciones del método y del instrumento que se emplea, siendo la razón de estas señales independiente a las fluctuaciones.

B. Parámetro de precisión

La precisión se evaluó por medio de la prueba de repetibilidad, para ello se analizó los estándares 1, 3 y 5 con 5 repeticiones cada uno, los resultados obtenidos para la repetibilidad muestran una desviación estándar relativa para el mentol de 12.1268, 13.7947 y 10.3322%, con un valor medio de 12.0846%. La desviación estándar relativa para la carvona fue de 7.8151, 13.6034 y 13.9206%, con un valor medio de 11.7797% (Cuadro No 8). Los resultados mostraron una desviación estándar relativa fuera de los criterios de aceptación establecidas para ese parámetro para un método farmacéutico

($\leq 5.0\%$) y dentro del rango para un método de alimentos ($\leq 20.0\%$) según indica la AOAC. Debido a que el método de interés es farmacéutico, se infiere que al analizar varias veces diversas soluciones, por un mismo analista, en el mismo día y equipo cromatográfico se obtienen datos con error relativo mayor al 13%. Por lo que se determina que el método de análisis no proporciona resultados confiables para parámetro de precisión, lo cual es evidencia en el cuadro No. 14 (ver anexos), donde se muestra la variabilidad de resultados obtenidos en las diversas lecturas de un mismo estándar, bajo las mismas condiciones de análisis, factor que además afecta la exactitud, ya que repercute en el valor del porcentaje de recuperación para cada estándar evaluado.

Debido a que la determinación de la relación de áreas se realizó utilizando un estándar interno, y a pesar de ello no se obtuvo una mayor precisión (ya que evita la incertidumbre asociada a la inyección de la muestra), se debe tomar en cuenta el estudio estructural del mentol y carvona, por lo que se sugiere utilizar una fase estacionaria más específica para dichos compuestos, siendo una alternativa la una fase estacionaria de polietilenglicol, comercialmente conocida como Carbowax, esta columna opera a una temperatura máxima de 250°C y es útil en el análisis de ácidos libres, alcoholes, esterés, aceites esenciales y glicoles; ya que la fase estacionaria de fenilmetilsiloxano utilizada en este método no posee gran aplicabilidad en el análisis de aceites esenciales, siendo su uso más limitado al análisis de drogas, esteroides, pesticidas y glicoles (Skoog, 2001).

Además es puntual mencionar que los criterios de precisión van a depender en gran manera del tipo de análisis que se realiza y que la precisión puede verse afectada por el tipo de muestra que se estudia. En el caso de la muestra que se analizó, esta resulta ser una muestra inestable, por la naturaleza de sus componentes, dado a su volatilidad, lo cual puede afectar el análisis de la misma y por consiguiente la repetibilidad de los datos obtenidos en las diferentes determinaciones.

C. Parámetro de selectividad/especificidad

La selectividad o especificidad del método se determinó por comparación del tiempo de retención del estándar de mentol y carvona con la base de datos NIST V2.0, y su posterior

comparación con los tiempos de retención de la muestra (ver gráfica No. 7 y No. 8). En estas gráficas se muestra un tiempo de retención del estándar de mentol de 21.727 min y para carvona de 25.288 min; siendo para la muestra de aceite esencial de hierbabuena (*Mentha spicata*) para mentol de 21.706 min y para carvona de 25.131 min. La comparación muestra que el método si determina de manera inequívoca la presencia de los carvona y mentol, analitos de interés, por sobre los componentes que puedan estar presentes. Por ello se establece la selectividad/especificidad en el método analítico.

D. Parámetro de rango

El rango es un parámetro que muestra el nivel inferior y superior de las concentraciones en estudio, los resultados obtenidos en esta metodología analítica muestran un rango para el mentol entre 0.1747-1.6802 (mg/mL) y para la carvona entre 6.3854-62.5624 (mg/mL), dichos rangos están dentro del rango de aceptación (Cuadro No. 9), que según la ICH para este tipo de ensayo debe ser proporcional del 80 al 120% de las concentraciones en estudio, de esta forma se establece el rango en el método analítico.

E. Parámetro de linealidad

La respuesta del equipo cromatógrafo de gases con detector de masas ante las diferentes concentraciones (mg/mL) demostró ser directamente proporcional a las distintas concentraciones y por ello lineal en este rango de concentraciones, para todos los componentes analizados.

En los resultados obtenidos (Cuadro No. 10) se muestra un coeficiente de correlación para el mentol de (r) de 0.9956 y un coeficiente de determinación (r^2) de 0.9913; siendo para la carvona el coeficiente de correlación (r) de 0.9966 y un coeficiente de determinación (r^2) de 0.9933, lo que muestra que hay relación entre las mediciones y las concentraciones de los componentes en estudio, ya que están dentro del criterio de aceptación ≥ 0.990 . El coeficiente de determinación (r^2) obtenido para mentol de 0.9913 demuestra que la curva de regresión se ajusta a los valores experimentales de las mediciones evaluadas. Caso que se repite para la carvona, con coeficiente de

determinación (r^2) de 0.9933. Por lo que se infiere que el coeficiente de correlación refleja un grado de relación lineal entre la respuesta del equipo y la variación proporcional de las concentraciones. Por lo que de esta forma se establece la linealidad en el método analítico.

F. Cuantificación de carvona y mentol en aceite esencial de hierbabuena

Para determinar la concentración de carvona y mentol presentes en el aceite esencial de hierbabuena, se utilizó la ecuación de la recta obtenida en el parámetro de linealidad (Cuadro No. 11), siendo para el mentol $Y = 0.1935 (\pm 0.0105) x - 0.0039 (\pm 0.0104)$ y para la carvona $Y = 0.1848 (\pm 0.0088) x + 0.2735 (\pm 0.3305)$. Por lo que en base a dichas ecuaciones de la recta, se determinó la concentración de mentol en el aceite esencial de hierbabuena con un valor medio de 0.6004 mg/mL y de carvona de 13.4808 mg/mL, ambos valores están dentro del rango del método analítico. Debido a que no se poseen datos de cuantificación de los constituyentes principales del aceite esencial, no se comparó el valor obtenido con un valor teórico.

VIII. CONCLUSIONES

- A. Se desarrolló un método analítico por cromatografía de gases con detector de masas que cumplió con los requerimientos y normas ICH y USP 34 para la identificación y cuantificación de carvona y mentol en el aceite esencial de hierbabuena (*Mentha spicata*).
- B. Se obtuvo un método de análisis selectivo/específico para la identificación de carvona y mentol en el aceite esencial de hierbabuena (*Mentha spicata*).
- C. Se determinó y demostró que la metodología propuesta cumple con los parámetros de exactitud, selectividad/especificidad, rango y linealidad según lo establece la USP 34 y las normas de validación de procedimientos analíticos de ICH.
- D. Se determinó y demostró que la metodología propuesta no cumple con el parámetro de precisión, que evaluó repetibilidad, con base en lo que establece la USP 34 y las normas de validación de procedimientos analíticos de ICH.
- E. Para un método de análisis de alimentos, la metodología propuesta si cumple con los parámetros de validación de exactitud, precisión, selectividad/especificidad, rango y linealidad.
- F. En consideración a la falta de precisión del método analítico desarrollado, se refiere a la inestabilidad de la muestra en estudio y a la falta de una columna específica para realizar el análisis.
- G. El método utilizado demostró ser lineal cuando se trabaja a concentraciones de 80% al 120% para cada uno de los componentes analizados, lo que significa que al trabajar en dicho rango la respuesta del equipo será directamente proporcional a las concentraciones del analito.

H. El uso de un estándar interno mejoró el método, reduciendo el error de la manipulación de las muestras en estudio al momento de la inyección, lo que permitió optimizar la metodología analítica.

IX. RECOMENDACIONES

- A. En consideración a la falta de precisión del método analítico desarrollado, se recomienda que la metodología sea ensayada y validada utilizando otras condiciones en el método, accesorios o un equipo cromatográfico de gases con diferente detector.
- B. Usar una columna con fase estacionaria más afín a aceites esenciales, siendo la de polietilenglicol (Carbowax) una columna más aplicable a este tipo de análisis en comparación con la empleada en este método con fase estacionaria de fenilmetilsiloxano.
- C. Tomar en cuenta la incertidumbre al momento de validar una metodología analítica, ya que de esta forma se cumple con lo establecido en la norma ISO 17, 025 y el anexo 44 de Buenas Prácticas de Manufactura.
- D. Tener en cuenta el parámetro robustez, para demostrar la fiabilidad de un análisis con respecto a las variaciones de los parámetros del método, con el objetivo de tener un control en las fuentes de variación que posea la metodología analítica.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Agilent, T. (2009). *Familiarización con ChemStation*. Alemania: Agilent Technologies.
2. Aguilar, Krista. 2006. *Evaluación de un método experimental de generación de datos a nivel de laboratorio para el estudio del sistema ternario aceite esencial de cardamomo (*Elletaria cardamomum*)- (alcohol isopropílico-agua)_{50%}-benceno en equilibrio a dos temperaturas diferentes y 640 mm Hg*. Tesis Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. 94 págs.
3. Aly Derbalah. 2010. *Efficacy of spearmint oil and powder as alternative of chemical control against C. maculatus in Cowpea Seeds*. Pesticides department faculty of Agriculture kafr-El-Shiekh University, Egypt.
4. Andrews, Jennifer. 2001. *Determination of minimum inhibitory concentrations*. The British Society for Antimicrobial Chemotherapy.
5. Barquero, Miriam. 2006. *Principios y aplicaciones de la cromatografía de gases*. Editorial Universidad de Costa Rica. 61 págs.
6. Cáceres, Armando. 1996. *Plantas de uso medicinal en Guatemala*. Guatemala. Editorial Universitaria. 493 págs.
7. Cáceres, Armando. 2009. *Vademécum nacional de plantas medicinales*. Guatemala. Editorial Universitaria, Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. 313 págs.
8. Crippen, Raymond. 1973. *Identification of Organic Compounds with a Gas Chromatography*. Mc Graw-Hill. USA. 123 págs.
9. Días, Maroto.; S, Pérez.; A. González. 2003. *Influence of Drying on the Flavor Quality of Spearmint (*Mentha spicata*L.)*. J. Agric. Food Chem. 51 (5), pp 1265–1269.
10. FDA. 2000. *Analytical Procedures and Methods Validation*. <http://www.labcompliance.de/documents/FDA/FDA-Others/Laboratory/f-505-method-validation-draft.pdf>
11. Gasco, Luis. 1969. *Teoría y Práctica de la Cromatografía en Fase Gaseosa*. Ediciones J.E.N. España. 234 págs.

12. Güenther, P. E. (2007). *The Essential Oils: : Individual Essential Oils of the Plant Families* (Vol. 2). Estados Unidos: D. Van Nostrand Company, Inc.
13. Güenther, P. E. (2007). *The Essential Oils: History-Origin in Plants, Production and Analysis* (Vol. 3). Estados Unidos: D. Van Nostrand Company, Inc.
14. Hammer, K.; C. Carson; T. Riley. 1999. *Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts*. Journal of Applied Microbiology. Volumen 86, 6ta Edición. 985-990 págs.
15. Hernández, Lucas.; C. González. 2002. *Introducción al análisis instrumental*. Editorial Ariel. 456 págs.
16. Huber, L. 2006. *Validation of Analytical Methods and Procedures*. http://www.labcompliance.com/tutorial/methods/default.aspx#08_paramters
17. Hussain, A. 2010. *Chemical Composition, and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oil of Spearmint (Mentha spicata L.) From Pakistan*. The Journal of Essential Oil Research. Journal of Chemical Education. 1980. Volumen 57. Pp. 138
18. ICH. 1995. Guidance for Industry.Q2A. *Text on Validation of Analytical Procedures*.
19. ICH. 1996. Guidance for Industry.Q2B. *Validation of Analytical. Procedures: Methodology*.
20. Lis-Balchin, María. 2006. *Aromatherapy science: a guide for healthcare professionals*. Pharmaceutical Press. 462 págs.
21. Maffei, Massimo.; A, Codignola.; M, Fieschi. 2006. Essential oil from Mentha spicata L. (spearmint) cultivated in Italy. Flavour and Fragrance Journal. Volume 1, Issue 3, pages 105–109.
22. Martindale. 1990. *Martindale, The extra pharmacopoeia*. 29th Edición. JEF Reynolds. London. Pharmaceutical Press.
23. Martínez, Alejandro. 2001. Aceites esenciales. Tesis Universidad de Antioquia, Colombia.
24. Olaya, Julia; J, Méndez. 2003. *Guía de plantas y productos medicinales*. UPAR. 32 págs.

25. Ortuño, Manuel. 2006. *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes*. Aiyana Ediciones. 276 págs.
26. Panda, H. 2011. *Essential Oils Handbook*. National Institute of Industrial Research. India. 774 págs.
27. Rodríguez, Héctor.; L; Olguín. 2004. *Cromatografía de gases*. Instituto de biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. 44 págs.
28. Romero, Monica. 2004. *Plantas aromáticas*. Editorial Kier. 224 págs.
29. RTCA, Reglamento Técnico Centroamericano. 2006. *Productos farmacéuticos: validación de métodos analíticos para la evaluación de la calidad de los medicamentos*. RTCA 11.03.39:06.
30. Sharapin, N. 2000. *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. CYTED. Págs. 247.
31. Skoog, Douglas. 2001. *Análisis Instrumental*. Quinta Edición, McGraw Hill/Interamericana de España S.A.
32. Skoog, Douglas. 2005. *Fundamentos de Química Analítica*. Octava Edición, McGraw Hill/Interamericana de España S.A.
33. Spectral Database for Organic Compounds SDBS. 2011. http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi
34. United States Pharmacopeia 34. 2011. *Validation of compendial methods*. Capítulo 1225
35. Yonei, Y.; Col. 1995. *Journal of Supercritic Fluids*. Volumen 8. 156 págs.

XI. ANEXOS

Anexo No 1: Glosario

1. **Ácidos:** especies capaces de donar protones a otras especies (Skoog, 2005).
2. **Aldehído:** compuesto orgánico que contiene un grupo carbonilo y se obtiene a partir de la deshidrogenación u oxidación de un alcohol primario.
3. **Antiemético:** sustancia que previene vómitos y trata las náuseas (Cacéres, 2009).
4. **Antiséptico:** sustancia que actúa contra los gérmenes infecciosos destruyéndolos (Cacéres, 2009).
5. **Bálsamo:** preparación semisólida usada por su efecto protector y emoliente o como vehículo para la administración local o endodérmica de un medicamento. Compuesto de diversas mezclas de grasas, ceras, aceites animales o vegetales, e hidrocarburos sólidos y líquidos (Cacéres, 2009).
6. **Banda cromatográfica:** distribución de la concentración de las especies diluidas alrededor de un valor central (Skoog, 2005).
7. **Carminativo:** relativo a una sustancia que combate la flatulencia y la distensión abdominal (Cacéres, 2009).
8. **Columna:** tubo con sus paredes interiores cubiertas de fase estacionaria (Skoog, 2001).
9. **Cromatografía:** método de separación de componentes, distribuyéndolos en dos fases, la fase móvil y fase estacionaria (Skoog, 2001).
10. **Cromatografía de gases:** método de separación de componentes, donde los componentes de una muestra vaporizada se separan como consecuencia que se reparten entre una fase gaseosa y una fase estacionaria contenida en una columna (Skoog, 2001).
11. **Cromatograma:** gráfica de alguna función de la concentración de un soluto frente al tiempo de elución o volumen de elución (Skoog, 2001).
12. **Destilación:** método de separación y purificación de líquidos que emplea la diferencia entre los puntos de ebullición de las sustancias que constituyen una mezcla para llevar a cabo la separación (Skoog, 2005).

13. **Detector:** dispositivo que indica y mide los solutos presentes en la corriente del gas acarreador, convirtiendo una señal no medible directamente en una señal elaborable de una propiedad física (Skoog, 2001).
14. **Diaforesis:** secreción de sudor, especialmente la secreción profusa que se asocia con la fiebre elevada, ejercicio físico, exposición al calor y estrés mental o emocional (Cacéres, 2009).
15. **Diurética:** fármaco o sustancia que tiende a promover la excreción de orina (Cacéres, 2009).
16. **Eficiencia de la columna:** medida del grado de ensanchamiento de una banda cromatográfica, se suele expresar en términos de altura H de los platos o del número N de platos teóricos (Skoog, 2005).
17. **Eluyente:** fase móvil que se emplea en cromatografía para transportar solutos a través de una fase estacionaria (Skoog, 2005).
18. **Emenagogo:** sustancia utilizada para promover el flujo menstrual (Cacéres, 2009).
19. **Espasmolítico:** sustancia utilizada para curar o tratar los espasmos (Cacéres, 2009).
20. **Extracto:** producto que se obtienen de un fármaco de origen animal o vegetal, sometándolo a la acción de un disolvente y evaporando el líquido resultante hasta la consistencia y volumen determinado, o evaporando del mismo, líquidos naturales como los zumos (Cacéres, 2009).
21. **Fase estacionaria:** sólido o líquido fase que se encuentra fija en el interior de la columna sobre el cual se reparte la especie del analito durante el paso de una fase móvil (Skoog, 2005).
22. **Fase móvil:** disolvente que desciende a través de la columna que transporta los analitos a través de la fase estacionaria, puede ser un líquido o un gas (Skoog, 2005).
23. **Fitoquímico:** análisis cualitativo y cuantitativo de los constituyentes de una planta (Sharapin, 2000).

24. **Fitoterapia:** ciencia que estudia la utilización de los productos de origen vegetal con finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, atenuar o curar un estado patológico (Cacéres, 2009).
25. **Follaje:** conjunto de hojas de arboles y otras plantas (Cacéres, 2009).
26. **Fluido supecrítico:** sustancia que se mantiene por encima de su temperatura crítica, sus propiedades son intermedias entre un líquido y un gas (Skoog, 2005).
27. **Hábitat:** detalles geográficos y ambientales acerca del lugar donde crece una planta (Cacéres, 2009).
28. **Hierba:** planta con tallos anuales o perennes, no lignificados (Cacéres, 2009).
29. **Inflorescencia:** conjunto de ramificaciones florales de una planta (Cacéres, 2009).
30. **Infusión:** operación de verter agua hirviendo sobre sustancias vegetales y dejar reposar para obtener sus principios medicamentosos, o poner el producto sobre una taza con agua hirviendo (Cacéres, 2009).
31. **Lanceolado:** de base moderadamente amplia, redondeada y atenuada hacia el ápice (Cacéres, 2009).
32. **Lavados:** aplicación de infusiones, cocimientos o tinturas diluidas para tratar tópicamente afecciones externas localizadas, como heridas, llagas, úlceras, hemorroides, vaginitis y otras afecciones de la piel o mucosas (Cacéres, 2009).
33. **Maceración:** operación de someter a una sustancia orgánica a la acción de un líquido durante el tiempo suficiente para obtener la disolución de los principios activos solubles en la misma (Cacéres, 2009).
34. **Oleoresina:** extractos de especias, que se obtienen por tratamiento de la droga seca con solventes. Están constituidos por aceites esenciales, aceites fijos, colorantes y principios activos de la planta (Sharapin, 2000).
35. **Perenne:** que perdura más de dos años, generalmente floreciendo cada año (Cacéres, 2009).
36. **Pubescente:** con vellos suaves y cortos (Cacéres, 2009).
37. **Resolución de columna:** medida de capacidad de una columna para separar dos bandas de analito (Skoog, 2005).

38. **Resolución:** mide la capacidad de una columna cromatográfica para separar dos analitos. Se define como la diferencia entre los tiempos de retención de dos picos dividida entre las anchuras medidas (Skoog, 2005).
39. **Tamizaje fitoquímico:** una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, en la que se determinan cualitativamente los principales grupos constituyentes químicos presentes en una planta (Sharapin, 2000).
40. **Tiempo de retención:** tiempo transcurrido entre la inyección de una muestra y la aparición de un pico de soluto en el detector de una columna cromatográfica (Skoog, 2001).
41. **Validación:** establecimiento de la evidencia documental que un procedimiento analítico conducirá con un alto grado de seguridad a la obtención de resultados precisos y exactos dentro de las especificaciones y atributos de calidad previamente establecidos (RTCA, 2006).
42. **Vermífuga:** que expulsa los gusanos del cuerpo (Cacéres, 2009).

Anexo No 2: Certificado de análisis

1. Aceite esencial de hierbabuena (*Mentha spicata*).

24 Avenida Calzada Atanasio Tzul
42-85, zona 12. - CP 01012
Guatemala, Guatemala, C.A.
PBX: (502) 2204-9400 Fax: 2479-4457
e-mail: extract@cardamomoil.com
www.cardamomoil.com

ACEITE ESENCIAL DE HIERBABUENA

HOJA DE ESPECIFICACIONES

Descripción:

El aceite de hierbabuena es un aceite volátil obtenido por la destilación al vapor de *Mentha spicata*. El aceite encuentra una amplia aplicación, especialmente, como saborizante de goma de mascar y últimamente también en pastas de dientes.

Nombre Común:

Aceite esencial de Hierbabuena.

Nombre Botánico:

Mentha spicata L. (*M. virdis* L.), Labiatae

Preparación:

Por destilación al vapor de las hojas y flores de la planta.

Características Físicas y Químicas:**Apariencia y Olor:**

Líquido incoloro, amarillo o amarillo verdoso; con olor característico a hierbabuena.

Gravedad específica:

A temperatura ambiente 0.9150 a 0.9380

Rotación Óptica:

A temperatura ambiente -40° a -60°

Índice de Refracción:

A temperatura ambiente 1.4830 a 1.4910

Solubilidad en Alcohol:

Soluble en volúmenes iguales de alcohol al 80%.

Almacenaje:

Guardar preferiblemente en contenedores galvanizados, bien cerrados y llenos, en un lugar fresco y protegidos de la luz.





24 Avenida Calzada Atanasio Tzul
42-85, zona 12. - CP 01012
Guatemala, Guatemala, C.A.
PBX: (502) 2204-9400 Fax: 2479-4457
e-mail: extract@cardamomoil.com
www.cardamomoil.com

HOJA DE SEGURIDAD

1. IDENTIFICACIÓN

Nombre:	Aceite de Hierbabuena
Nombre Botánico:	Mentha spicata
Naturaleza del Producto:	Aceite de Hierbabuena 100% puro y natural
Compañía:	EXTRACT, S. A.
Dirección:	24 Ave. Calzada Atanasio Tzul 42-85, Zona 12 Guatemala, Centro America C.P. 01012
Telephone No.:	(502) 2479-4394
Nombre Químico:	NA

2. COMPOSICIÓN/INFORMACIÓN DE INGREDIENTES

Método de Extracción:	Por destilación al vapor.
FEMA No.:	3032
CoE:	285n
CAS No.:	8008-79-5
Nombre INCI:	Cinnamomum zeylanicum
EINECS:	84696-51-5
FDA:	182.2
H-No:	3301.25
RIFM:	Monografía
FCC:	
IFRA:	Ver sección 16
Fórmula Molecular	NA
Sinónimos:	No encontrado

3. IDENTIFICACIONES DE RIESGO

Producto concentrado no ingerir.

4. MEDIDAS DE PRIMEROS AUXILIOS

Contacto con ojos:	Lavar inmediatamente con abundante agua por lo menos 15 minutos, contactar al doctor si los síntomas persisten.
Contacto con la Piel:	Remover ropa contaminada. Lavar completamente con agua y jabón, limpiar con abundante agua. Si la irritación persiste, buscar asistencia médica.
Inhalación:	Llevar al aire fresco. Mantener en reposo y obtener atención médica.
Ingestión:	Lavar la boca con agua. Buscar atención médica inmediatamente.
Otro:	Cuando se necesite tomar una acción, tomar en cuenta las frases de riesgo y seguridad

5. MEDIDAS PARA COMBATIR INCENDIOS

Medio Extinguidor:	CO ₂ , Polvo seco o espuma, asperje el medio en la base de la llama. No utilice agua sobre el material en llama.
Medidas Especiales:	Evite inhalar vapores. Manténgase fuera de las Fuentes de ignición. No fume. Vista ropa protectora y equipo para respirar. Evite los agentes oxidantes.
Procedimientos de Extinción:	Los contenedores pueden producir presión cuando están expuestos al calor y deben ser enfriados por aspersión de agua.

6. MEDIDAS POR LIBERACIÓN ACCIDENTAL

Precauciones Personales:	Evitar inhalación y contacto directo con piel y ojos. Utilice equipo individual protector (lentes de seguridad, botas a prueba de agua, ropa protectora) en caso de derrames mayores.
Precauciones Ambientales:	Mantener lejos de drenajes, suelos, superficies y aguas subterráneas.
Métodos de Limpieza Por derrames:	Remover todas las fuentes potenciales de ignición. Contener el material derramado. Cubrir con un material absorbente inorgánico inerte no combustible, o barrer hacia un contenedor para depósito del mismo autorizado. Observar las leyes y regulaciones del país.

7. MANEJO Y ALMACENAMIENTO

Precauciones en Manejo:	Aplicar las buenas prácticas de manufactura e higiene industrial, asegurando ventilación apropiada. Observar la buena higiene personal y no comer, beber o fumar mientras se maneja.
Condiciones de Almacenaje:	Guardar bien cerrado en los contenedores originales, en un área seca, fresca y ventilada lejos de fuentes de calor y protegida de la luz. Mantener el menor contacto con el aire.
Protección de Fuego:	Mantener lejos de fuentes de ignición y de llamas descubiertas. Tomar las precauciones para evitar descargas estáticas en el área de trabajo.

8. CONTROLES DE EXPOSICIÓN / PROTECCIÓN PERSONAL

Protección de ojos:	Utilizar lentes de seguridad.
Respiratorio:	Evitar respirar los vapores del producto. Aplicar ventilación local de ser posible.
Ventilación:	Asegure buena ventilación en el área de trabajo.
Protección Manos:	Evitar todo contacto con la piel. Utilizar guantes químicamente resistentes
Prácticas de Trabajo e Higiene:	Lavar manos con jabón y agua después de manipular el producto.

9. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

Color:	incoloro a amarillo pálido o amarillo verdoso
Apariencia:	Líquido
Olor:	Olor característico a hierbabuena, menta herbácea
Sabor:	fresco característico
pH:	No determinado
Punto de ebullición / Rango °C:	No determinado
Punto de fusión / Rango °C:	No determinado
Flamabilidad:	No determinado
Presión de Vapor :	No determinado
Auto flamabilidad:	No determinado
Propiedades Explosivas:	No determinado
Propiedades Oxidantes:	No determinado
Punto de Inflamación en cápsula cerrada °C:	65°
Gravedad Específica (@20°C):	0.9150 a 0.9380
Índice de Refracción (@20°C):	1.4830 a 1.4930
Rotación Óptica @ 20°C:	-40.0 a -60.0
Solubilidad en etanol al 80% @20°C:	Soluble en volúmenes iguales
Solubilidad:	Agua: Insoluble
Viscosidad:	No determinado

10. ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD

Reactividad:	No representa peligro de reactividad significativa por si mismo o en contacto con agua. Evitar contacto con ácidos fuertes, álcali o agentes oxidantes.
Descomposición:	responsable de provocar vapores ácidos durante combustión: monóxido de carbón, dióxido de carbón, y otros compuestos orgánicos no identificados pueden formarse.

11. INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA

Oral Aguda en ratas LD50: >5g/Kg

12. INFORMACIÓN ECOLÓGICA

Biodegradabilidad:	Producto Biodegradable
Precauciones:	Prevenir la contaminación de superficies de suelo, subsuelo y agua

13. CONSIDERACIONES PARA DISPOSICIÓN DE DESECHO

Evite disponer en sistemas de drenaje y en el ambiente. Busque la guía de un experto.

14. INFORMACIÓN DE TRANSPORTE

UN 1993:	
Tierra (RID/ADR):	n / a
Mar (IMDG):	n / a
Aire (ICAO/IATA):	n / a
Código de Tarifa armonizada:	-

15. OTRA INFORMACIÓN

Usos: Aromaterapia, productos para el cuidado de la piel entre otros. No emplear para uso personal bajo esta concentración o presentación. Solamente para uso Industrial

Sin embargo, los datos son proporcionados sin ninguna garantía, expresados o implicados, con respecto a su exactitud o la certeza. Es la responsabilidad del usuario a determinar condiciones seguras para el uso de este.

16. EMPAQUE

Tipo	Viabilidad
Vidrio	Si
Acero forrado/estaño	Si
Aluminio	Si
HMWP	Si
HPPE	No
F/HDPE	Si
Otro plástico	No

17. VIDA DE ESTANTE

Min 12 meses cuando se almacena bajo las condiciones especificadas.

18. REGULACIONES

Simbolo: n / a
Frase de Riesgo: n / a
Frase de Seguridad: n / a

19. REQUIRIMIENTOS

De acuerdo con las especificaciones generales del producto. Reanalice después de 6 meses.

20. DENEGACIÓN

La información contenida en esta es basada en datos considerados exactos y seguros. Sin embargo, los datos son proporcionados sin cualquier garantía, expresados o implicados con respecto a su exactitud o la certeza. Es la responsabilidad de usuarios determinar las condiciones seguras para el uso de estos productos, y para asumir la obligación para la pérdida, la herida, el daño, o el gasto que resulta del uso impropio de este producto.

2. Etanol absoluto 99.5%



Specification

1.07017.2511 Ethanol absolute for analysis EMPARTA® ACS

	Spec. Values	
Purity (GC)	≥ 99.5	%
Identity (IR)	conforms	
Colour	≤ 10	Hazen
Solubility in water	conforms	
Titration acid	≤ 0.0005	meq/g
Titration base	≤ 0.0002	meq/g
Acetone (GC)	≤ 0.001	%
Methanol (GC)	≤ 0.1	%
2-Propanol (GC)	≤ 0.003	%
Substances reducing potassium permanganate (as O)	≤ 0.0002	%
Readily carbonizable substances	conforms	
Evaporation residue	≤ 0.001	%
Water	≤ 0.2	%

Dr. Michael Savelsberg

responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature

3. 1-Butanol 99.5%



Specification

1.01990.2500 1-Butanol for analysis EMSURE®
ACS,ISO,Reag. Ph Eur

	Spec. Values	
Purity (GC)	≥ 99.5	%
Identity (IR)	conforms	
Appearance	clear	
Colour	≤ 10	Hazen
Titration acid	≤ 0.0008	meq/g
Density (d 20 °C/20 °C)	0.809 - 0.812	
Boiling point	116 - 119	°C
2-Butanol (GC)	≤ 0.05	%
Butyraldehyde (GC)	≤ 0.01	%
Dibutyl ether (GC)	≤ 0.1	%
Isobutanol (GC)	≤ 0.15	%
Aldehydes	conforms	
Carbonyl compounds (as CO)	≤ 0.01	%
Readily carbonizable substances	conforms	
Al (Aluminium)	≤ 0.00005	%
B (Boron)	≤ 0.000002	%
Ba (Barium)	≤ 0.00001	%
Ca (Calcium)	≤ 0.00005	%
Cd (Cadmium)	≤ 0.000005	%
Co (Cobalt)	≤ 0.000002	%
Cr (Chromium)	≤ 0.000002	%
Cu (Copper)	≤ 0.000002	%
Fe (Iron)	≤ 0.00001	%
Mg (Magnesium)	≤ 0.00001	%
Mn (Manganese)	≤ 0.000002	%
Ni (Nickel)	≤ 0.000002	%
Pb (Lead)	≤ 0.00001	%
Sn (Tin)	≤ 0.00001	%
Zn (Zinc)	≤ 0.00001	%
Evaporation residue	≤ 0.001	%
Water	≤ 0.1	%

Dr. Michael Savelsberg

responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature

4. (S)-(+)-Carvona



Specification

1.01990.2500 1-Butanol for analysis EMSURE®
ACS,ISO,Reag. Ph Eur

	Spec. Values	
Purity (GC)	≥ 99.5	%
Identity (IR)	conforms	
Appearance	clear	
Colour	≤ 10	Hazen
Titration acid	≤ 0.0008	meq/g
Density (d 20 °C/20 °C)	0.809 - 0.812	
Boiling point	116 - 119 °C	
2-Butanol (GC)	≤ 0.05	%
Butyraldehyde (GC)	≤ 0.01	%
Dibutyl ether (GC)	≤ 0.1	%
Isobutanol (GC)	≤ 0.15	%
Aldehydes	conforms	
Carbonyl compounds (as CO)	≤ 0.01	%
Readily carbonizable substances	conforms	
Al (Aluminium)	≤ 0.00005	%
B (Boron)	≤ 0.000002	%
Ba (Barium)	≤ 0.00001	%
Ca (Calcium)	≤ 0.00005	%
Cd (Cadmium)	≤ 0.000005	%
Co (Cobalt)	≤ 0.000002	%
Cr (Chromium)	≤ 0.000002	%
Cu (Copper)	≤ 0.000002	%
Fe (Iron)	≤ 0.00001	%
Mg (Magnesium)	≤ 0.00001	%
Mn (Manganese)	≤ 0.000002	%
Ni (Nickel)	≤ 0.000002	%
Pb (Lead)	≤ 0.00001	%
Sn (Tin)	≤ 0.00001	%
Zn (Zinc)	≤ 0.00001	%
Evaporation residue	≤ 0.001	%
Water	≤ 0.1	%

Dr. Michael Savelsberg

responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature

5. (-)-Mentol



Specification

1.01990.2500 1-Butanol for analysis EMSURE®
ACS,ISO,Reag. Ph Eur

	Spec. Values	
Purity (GC)	≥ 99.5	%
Identity (IR)	conforms	
Appearance	clear	
Colour	≤ 10	Hazen
Titration acid	≤ 0.0008	meq/g
Density (d 20 °C/20 °C)	0.809 - 0.812	
Boiling point	116 - 119 °C	
2-Butanol (GC)	≤ 0.05	%
Butyraldehyde (GC)	≤ 0.01	%
Dibutyl ether (GC)	≤ 0.1	%
Isobutanol (GC)	≤ 0.15	%
Aldehydes	conforms	
Carbonyl compounds (as CO)	≤ 0.01	%
Readily carbonizable substances	conforms	
Al (Aluminium)	≤ 0.00005	%
B (Boron)	≤ 0.000002	%
Ba (Barium)	≤ 0.00001	%
Ca (Calcium)	≤ 0.00005	%
Cd (Cadmium)	≤ 0.000005	%
Co (Cobalt)	≤ 0.000002	%
Cr (Chromium)	≤ 0.000002	%
Cu (Copper)	≤ 0.000002	%
Fe (Iron)	≤ 0.00001	%
Mg (Magnesium)	≤ 0.00001	%
Mn (Manganese)	≤ 0.000002	%
Ni (Nickel)	≤ 0.000002	%
Pb (Lead)	≤ 0.00001	%
Sn (Tin)	≤ 0.00001	%
Zn (Zinc)	≤ 0.00001	%
Evaporation residue	≤ 0.001	%
Water	≤ 0.1	%

Dr. Michael Savelsberg

responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature

Anexo 3: Datos de pruebas del método

Cuadro No. 12: Análisis estadístico de mentol en método no optimizado

Parámetro	No.	1	3	6
		Concentración	0.0006	0.0031
Exactitud	PROMEDIO 3	0.0015	0.0024	0.0477
	PROMEDIO 6		0.0024	
	%RECOBRO	246.2636	77.6820	77.3260
	PROMEDIO DE RECOBRO	133.7572501		
	PENDIENTE	0.764187094		
Precisión triplicado	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	0.00016	0.0008	0.01240
	DESVIACIÓN ESTÁNDAR RELATIVA	11.2583	34.5565	25.9999
	PROMEDIO	23.93825575		
Precisión hexa	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	0.000832		
	DESVIACIÓN ESTÁNDAR RELATIVA	34.9741665		
LOD	LD	104.922499		
LOC	LC	349.741665		
Rango	Experimental			0.0014-0.0618
	Rango de aceptación			0.0005-0.0740
Ecuación de la recta		$y = 4E+06x - 4017.$ $R^2 = 0.998$		

Cuadro No. 13: Análisis estadístico de carvona en método no optimizado

Parámetro	No.	1	3	6
		Concentración	0.0441	0.0618
Exactitud	PROMEDIO (3)	0.0327	0.0446	0.7987
	PROMEDIO (6)		0.0492	
	%RECOBRO	74.1164	72.2214	90.5218
	PROMEDIO RECOBRO	78.9532		
	PENDIENTE	0.9163		
Precisión triplicado	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	0.0046	0.0120	0.2555
	DESVIACIÓN ESTÁNDAR RELATIVA	14.1007	26.8256	31.9873
	PROMEDIO	24.3045		
Precisión hexa	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	0.0126		
	DESVIACIÓN ESTÁNDAR RELATIVA	25.6507		
LOD	LD	76.9520		
LOC	LC	256.5067		
Rango	Experimental		0.0277-0.5122	
	Rango de aceptación		0.0353-1.0588	
Ecuación de la recta		$y = 3E+06x - 9297.$ $R^2 = 0.998$		

Cuadro No. 14: Resultados de concentraciones de método analítico

Mentol					
No.	1	2	3	4	5
Concentración	0.2049	0.4099	0.8198	1.2296	1.6395
1	0.19286379	0.479087433	0.75218582	1.19963311	1.68015192
2	0.23926726		0.98249793		1.28195019
3	0.17472613		0.81016432		1.42147065
4	0.21905539		0.72164634		1.5895525
5	0.19899597		0.94549917		1.46712433
6			1.00079062		
Carvona					
No.	1	2	3	4	5
Concentración	7.6696	15.3392	30.6784	46.0176	61.3568
1	6.38535073	17.82150104	30.1300181	44.1623925	62.5623818
2	7.71482804		38.5159894		44.3248127
3	6.88588917		33.3734665		55.7076213
4	7.676172		28.1526224		62.2481928
5	7.11882508		37.795507		51.4250568
6			37.1558631		