

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACÉUTICA



*Excelencia que trasciende*

Desarrollo y validación de un método analítico para la evaluación de los  
constituyentes:  $\alpha$ -pineno, alcanfor y 1,8-cineol del aceite esencial de  
Romero (*Rosmarinus officinalis* L.)

Trabajo de graduación presentado por Lilia Sofía Guerrero López para optar al grado académico de  
Licenciada en Química Farmacéutica

Guatemala  
2011



Desarrollo y validación de un método analítico para la evaluación de los  
constituyentes:  $\alpha$ -pineno, alcanfor y 1,8-cineol del aceite esencial de  
Romero (*Rosmarinus officinalis* L.)

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

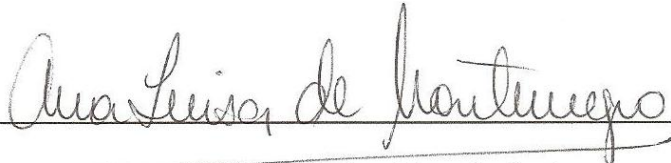
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACÉUTICA

Desarrollo y validación de un método analítico para la evaluación de los  
constituyentes:  $\alpha$ -pineno, alcanfor y 1,8-cineol del aceite esencial de  
Romero (*Rosmarinus officinalis* L.)

Trabajo de graduación presentado por Lilia Sofía Guerrero López para optar al grado académico  
de Licenciada en Química Farmacéutica

Guatemala  
2011


Vo. Bo.:

(f)   
Licenciada Ana Luisa Mendizábal  
Asesora

Tribunal:

(f)   
Licenciada Ana Luisa Mendizábal  
Asesora

(f)   
Licenciada Lesbia Judith Pérez Camey

(f)   
Doctor Élfego Rolando López García

Fecha de aprobación: Guatemala, 5 de diciembre de 2011

«Si veo más lejos es porque he conseguido subirme a hombros de gigantes».

Isaac Newton

Dedicado a mis padres, por haberme ofrecido sus  
hombros y enseñarme que el único límite es el  
cielo.

## AGRADECIMIENTOS

*A Dios*, por infundir fuerza en mi ser, a fin de no rendirme en el camino, convirtiéndose en mi arma principal para la conclusión de esta etapa.

*A mis padres*, por siempre permanecer a mi lado, brindándome su amor, paciencia y apoyo incondicional a lo largo de mi vida, por inculcarme valores y principios esenciales para alcanzar la excelencia, demostrándome que con perseverancia y dedicación nada es imposible.

*A mi hermano, Joaquín Alberto Guerrero*, por su apoyo incondicional, por su enseñanza y sobre todo por creer en mí y darme la oportunidad de ser tía de dos preciosas princesas, que han sido la luz y la esperanza para ser mejor cada día.

*A mi hermana, Tania Guerrero*, por ser mi amiga, por su apoyo y sus consejos, por ayudarme a ser fuerte y no dejarme caer, y sobre todo enseñarme que en esta vida todo tiene una recompensa.

*A mis abuelos*, por enseñarme, apoyarme y guiarme con el ejemplo, por haber formado y formar parte importante de mi vida.

*A mis establecimientos educativos*, Universidad del Valle de Guatemala y Colegio Capouilliez, por abrirme sus puertas hacia el aprendizaje, brindándome las herramientas necesarias para formarme como persona y profesional.

*A mi director del Departamento de Farmacia*, Licenciado Élfego Rolando López, por su incondicional apoyo durante la realización de este trabajo, para que este se llevara a cabo con éxito, y por formar parte de mi formación como profesional.

*A mi asesora, Licenciada Ana Luisa Mendizábal*, por su colaboración y dedicación a este trabajo, por alentarme a seguir adelante y sacar lo mejor de mí.

*A mis profesores*, quienes me impartieron más que instrucción, modales y valores humanos. Su enseñanza y vocación me motivaron a estudiar, aprender y crecer académica, personal y profesionalmente cada día.

*A LANCASCO y Centro Médico Militar* por abrirme las puertas para realizar mis prácticas y brindarme el apoyo y conocimientos para desarrollarme como una profesional.

*A mis amigos*, por su comprensión, lealtad y cariño en los buenos y malos momentos, siempre los llevo en mi corazón.

*A Zara Salguero*, por todos los desvelos compartidos, la enseñanza mutua, por los ánimos a no decaer a pesar de la presión, pero sobre todo por no sólo ser mi compañera de estudio sino también por brindarme su amistad.

# ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS .....	vi
LISTA DE CUADROS.....	x
LISTA DE ILUSTRACIONES Y GRÁFICOS .....	xi
RESUMEN .....	xii
ABSTRACT .....	xiii
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. Romero .....	5
B. Aceite esencial.....	7
C. Aceite esencial de Romero ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L).....	10
D. Métodos de extracción de aceites esenciales .....	17
E. Métodos de cuantificación de aceites esenciales .....	19
IV. MARCO METODOLÓGICO.....	26
A. Objetivos.....	26
B. Población .....	27
C. Muestra.....	27
D. Procedimientos o instrumentos.....	27
E. Diseño de investigación.....	29
F. Análisis estadístico .....	29
V. MARCO OPERATIVO .....	30
A. Recabación y tratamiento de datos .....	30
B. Recursos .....	30
C. Aspectos económicos .....	31
VI. RESULTADOS .....	32
A. Identificación.....	32
B. Curva de calibración.....	32

C. Parámetros de validación.....	33
D. Cuantificación de los componentes en la muestra.....	34
VII. DISCUSIÓN .....	35
VIII. CONCLUSIONES .....	38
IX. RECOMENDACIONES.....	39
X. BIBLIOGRAFÍA .....	40
XI. ANEXOS .....	44
A. Glosario .....	44
B. Ficha técnica del aceite esencial de Romero ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ) del proveedor Chikach. ....	48
C. Análisis del aceite esencial de Romero ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ) del proveedor Chikach .....	49
D. Match de cromatograma para la identificación .....	52
E. Curvas de calibración iniciales .....	55
F. Cuadros utilizados para realizar los cálculos de los parámetros de validación. ....	57

## LISTA DE CUADROS

Cuadro No.		Página
1	Principales compuestos presentes en el aceite esencial de la especie <i>Rosmarinus officinalis</i> de diferentes orígenes	13
2	Concentración mínima inhibidora de aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> (v/v).	14
3	Resultados de la actividad inhibitoria del aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> .	15
4	Descripción de los componentes mayoritarios del aceite esencial de <i>R. officinalis</i> .	18
5	Detectores de cromatografía de gases.	25
6	Parámetros de validación según categoría del método	29
7	Concentración de los constituyentes a estudiar en la solución madre.	31
8	Preparación de los estándares para la curva de calibración.	32
9	Parámetros de rampas del horno del cromatógrafo.	32
10	Presupuesto detalle de los recursos a utilizar.	35
11	Identificación de los constituyentes mayoritarios en el aceite esencial de romero	36
12	Datos de regresión lineal de 1,8-cineol	36
13	Datos de regresión lineal de $\alpha$ -pineno.	36
14	Datos de regresión lineal de alcanfor.	37
15	Resultados de selectividad y especificidad.	38
16	Resultados de exactitud del método para los constituyentes.	38
17	Resultados de precisión	38
18	Resultados de linealidad.	38
19	Resultados de rango.	38
20	Concentración de los constituyentes en la muestra de aceite esencial de romero.	38
21	Cálculo de parámetros de validación de $\alpha$ -pineno.	57
22	Cálculo de parámetros de validación de 1,8-cineol.	57
23	Cálculo de parámetros de validación de alcanfor.	58

## LISTA DE ILUSTRACIONES Y GRÁFICOS

Imagen		Página
No.		
1	Estructura de Mirceno	9
2	Estructura de Limoneno	10
3	Estructura de $\alpha$ -pineno	10
4	Estructura de Farnerol	10
5	Estructura de Bisaboleno	10
6	Estructura de Cadineno	10
7	Estructura de $\alpha$ -Santaleno	10
8	Espectro de 1,8-cineol	19
9	Espectro de alcanfor	19
10	Espectro de $\alpha$ -pineno	20
11	Esquematización del paso de una muestra por los principales componentes de un instrumento de espectroscopia de masas	26
Gráfico		Página
No.		
1	Curva de calibración para $\alpha$ -pineno	36
2	Curva de calibración para 1,8-cineol	37
3	Curva de calibración para alcanfor	37

## RESUMEN

El trabajo tiene como objetivo proponer y validar un método de identificación y cuantificación para los componentes  $\alpha$ -pineno, 1,8-cineol y alcanfor presentes en el aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) por medio de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (CG/MS). Para llevarlo a cabo, se realizaron varias pruebas, encontrando que la metodología con el uso de estándar interno es la mejor opción para disminuir la variación de los resultados del método para la cuantificación de los componentes del aceite esencial.

Se estableció que los parámetros de validación cumplen con los criterios de aceptación establecidos para el desarrollo de la metodología. Por lo tanto se concluye que el método desarrollado es lineal, exacto, preciso y selectivo para la cuantificación e identificación de los componentes mayoritarios  $\alpha$ -pineno, 1,8-cineol y alcanfor para el aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis* L.).

Finalmente, se recomienda que este método se utilice como base y que se realicen más corridas tanto de estándares a diferentes concentraciones, como muestras para verificar sus parámetros de validación y se garantice su robustez, para la cuantificación de los componentes mayoritarios de un aceite esencial.

## ABSTRACT

The work aims to propose and validate a method for identifying and quantifying the components  $\alpha$ -pinene, 1.8-cineole and camphor present in rosemary's essential oil (*Rosmarinus officinalis* L.) by gas chromatography with mass spectrometry detector (GC / MS). To accomplish this, several tests were conducted, finding that the methodology with the use of internal standard is the best option to reduce the variation in the results of the method the method for the quantification of the essential oil components.

It was established that the validation parameters meet the acceptance criteria established for the development of the methodology. Therefore we conclude that the developed method is linear, accurate, precise and selective for the quantification and identification of major components  $\alpha$ -pinene, 1.8-cineole and camphor for the essential oil of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.).

Finally, it is recommended that this method is used as a base and more runs are made aware of standards at different concentrations, as samples to check its settings validation and robustness is guaranteed for the quantification of the major components of an essential oil.

## I. INTRODUCCIÓN

El romero (*Rosmarinus officinalis*), pertenece a la familia de las Lamiaceae, éste es originario de la Europa mediterránea, tiene un significado simbólico desde la antigua Grecia por sus poderes tanto medicinales como culturales. En la Edad Media se siguió utilizando por sus propiedades terapéuticas, pero también por sus propiedades relajantes y estimulantes, ya que era considerado como un afrodisiaco.

Actualmente, el romero es considerado una de las plantas aromáticas más utilizadas por sus distintas propiedades terapéuticas, las cuales son atribuidas a su aceite esencial, así como también por sus propiedades antioxidantes y sus facultades de condimento en la industria alimenticia.

El aceite esencial de romero es una mezcla compleja, que contiene los siguientes compuestos:  $\alpha$ -pineno, canfeno, 1,8-cineol, alcanfor, borneol, acetato de bornilo, mirceno,  $\alpha$ -felandreno, limoneno,  $\gamma$ -terpineno,  $\rho$ -cimeno, linalool, cariofileno. De los cuales, únicamente, se identificará y cuantificará el  $\alpha$ -pineno, 1,8-cineol y alcanfor, debido a que presentan una mayor actividad terapéutica.

Este trabajo de investigación tiene como objetivo desarrollar una metodología analítica para la evaluación de los componentes principales del aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) mediante la técnica de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas, la cual se utiliza comúnmente para la identificación y cuantificación de los componentes anteriormente mencionados.

## II. MARCO CONCEPTUAL

### A. Antecedentes

En la actualidad, el aceite esencial de romero presenta una creciente demanda en la industria alimenticia y farmacéutica guatemalteca; pero su importancia se remonta a las civilizaciones más antiguas, como son los romanos, egipcios, griegos, etc., los cuales apreciaban sus propiedades medicinales, además de ser considerado como parte esencial en los ritos culturales. Un ejemplo de ello eran los egipcios, los cuales consideraban al aceite esencial de romero como un aceite sagrado, debido a sus distintas propiedades curativas, cualidades místicas y un profundo sentido del misterio. (Elías, 2009)

El romero era tan apreciado, que Carlomagno incluyó su cultivo entre las 73 plantas de obligatorio cultivo en todos los monasterios del imperio. El aceite esencial de romero fue destilado por primera vez por Arnau de Vilanova en 1300. Durante el siglo XVI el alcoholato de romero se denominaba “Agua de la Reina de Hungría” y se le atribuían grandes virtudes cosméticas, ya que conservaba fresca la piel de las mujeres entradas de edad; además de utilizarse para la gota y la parálisis. (Arango, 2006)

El aceite esencial de romero posee muchas propiedades medicinales entre ellas: analgésico, astringente, antidepresivo, digestivo, tónico, estimulante, además ayuda a la memoria. Todas estas propiedades han hecho del aceite uno de los más versátiles a través del tiempo. Por lo mismo, se han realizado distintas investigaciones no solo de su potencial terapéutico sino también de los componentes que conforman el aceite esencial, para conocer cuáles son aquellos que le brindan todas sus propiedades. Entre ellos se puede mencionar los siguientes artículos científicos, los cuales utilizan la técnica de cromatografía de gases con detector de masas para identificar y cuantificar los componentes del aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*):

- Giorgio Pintore, *et al.* realizaron en el 2002 el estudio *Chemical composition and antimicrobial activity of Rosmarinus officinalis L. oils from Sardinia and Corsica* el cual realiza un análisis completo de 3 quimiotipos de romero de Sardinia y Corsica, identificando sus compuestos por medio de CG/MS y analizando su actividad antimicrobiana, obteniendo respuesta positiva para las bacterias Gram-negativo.
- LECO Corporation, en 2008 realizó el estudio *Advances in Essential Oils Analysis Using Comprehensive Two-Dimensional GC and Time-of-Flight Mass Spectrometer (GCxGC-TOFMS) Detection* con el objetivo de comparar los componentes químicos del aceite esencial de tres distintos quimiotipos de romero; además de comparar los resultados obtenidos con esta técnica contra una técnica unidimensional.

- Sonia A. Socaci, Maria Tofană, Carmen Socaciu, realizaron en el 2008 el estudio *GC-MS analysis of Rosemary Essential Oil* se comparó la composición del aceite esencial de romero en función de la edad de la planta. Los aceites esenciales se extrajeron de cuatro muestras de material vegetal con diferentes edades, utilizando la técnica de hidrodestilación. El análisis de la composición de los aceites esenciales se llevó a cabo mediante un sistema de GC-MS.
- R. Jamshidi, Z. Afzali y D. Afzali, en el 2009 realizaron el estudio *Chemical Composition of Hydrodistillation Essential Oil of Rosemary in Different Origins in Iran and Comparison with Other Countries*, el cual identificó y cuantificó los componentes químicos del aceite esencial de romero de varios orígenes geográficos (Keran y Lalehzar) y se comparó entre ambos para conocer los constituyentes mayoritarios por medio de CG/MS.
- Christine Tschiggerl, Franz Bucar, en 2010 realizaron el estudio *Investigation of the Volatile Fraction of Rosemary Infusion Extracts* el cual compara el rendimiento de los componentes del aceite esencial de romero, extraídos por dos métodos diferentes: hidrodestilación y extracción en fase sólida.

Las investigaciones presentadas, como puede observarse, tienen diferentes enfoques pero utilizan la misma técnica para identificar y cuantificar los componentes del aceite esencial de Romero, mediante cromatografía de gases con detector de masas.

## B. Justificación

El aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*), posee propiedades terapéuticas amplias, por lo que su demanda actual en la industria farmacéutica guatemalteca ha aumentado considerablemente. Es por esto que, este trabajo de investigación propone el desarrollo de una metodología para la identificación y cuantificación de los componentes principales del aceite esencial:  $\alpha$ -pineno, alcanfor y 1,8-cineol, los cuales son de importancia terapéutica.

La metodología se llevará a cabo por medio de la técnica de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas, la cual proporciona tanto una identificación inequívoca de los componentes del aceite esencial como la separación y cuantificación de estos de la mezcla compleja. Es preciso mencionar, que se realizará la validación del método analítico para garantizar la confiabilidad, selectividad y especificidad del mismo.

El desarrollo de esta propuesta es necesario para identificar y cuantificar los principios activos que proporciona el aceite esencial de romero, utilizado como materia prima en los distintos preparados farmacéuticos; como primer paso para asegurar la calidad del producto y cumplir así con las normas reguladoras de nuestro país.

A pesar que en la actualidad existen varios métodos analíticos de cuantificación, el desarrollo de esta metodología representará un beneficio para la industria guatemalteca, pues su diseño será acorde a los recursos disponibles, ya que no todas constan de los necesarios para llevarlas a cabo.

### C. Planteamiento del problema

¿Con los recursos disponibles, es posible el desarrollo y validación de un método de identificación y cuantificación, por medio de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (CG/MS) para los componentes  $\alpha$ -pineno, 1,8-cineol y alcanfor presentes en el aceite esencial puro de *Rosmarinus officinalis* L?

### D. Alcances y límites

Alcances: se identificará y cuantificará únicamente los componentes  $\alpha$ -pineno, 1,8-cineol y alcanfor del aceite esencial de Romero (*Rosmarinus officinalis*), mediante la técnica de cromatografía de gases con detector de masas, ya que poseen mayor importancia terapéutica.

Límites: validación de la metodología incluirá el estudio de los siguientes parámetros: precisión, exactitud, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, selectividad y especificidad.

### III. MARCO TEÓRICO

#### A. Romero

Familia: Lamiaceae/ Labiatae

Nombre científico: *Rosmarinus officinalis* L.

Nombre común: Romero

1. Descripción botánica. Es un arbusto aromático, perenne, siempre verde que puede llegar a medir hasta 2 m de alto, posee un tallo erecto, ramas numerosas y corteza exfoliante, finamente purulenta. Posee ramas muy divididas cubiertas densamente por hojas sésiles y amargas, opuestas, lanosas, obtusas y glandulares, miden de 1-3 cm de largo, casi cilíndricas que están dobladas hacia adentro, se puede observar que son brillantes por el haz y tomentosas por el envés. También posee flores en pequeños grupos terminales, las cuales tienen un cáliz bilabiado y son de color violeta o de azul pálido. El fruto es ovalado y es dividido en 4 secciones. Esta planta florece de marzo a octubre. (Cáceres, 2006) (Ortiz, 1995)

2. Origen y distribución geográfica. El romero es nativo del Mediterráneo, sobre todo de las áreas donde el suelo es especialmente seco, arenoso y rocoso. Crece desde la costa hasta 1,500 metros de altitud. Esta planta también crece en los jardines de casas en la India, México, América Central y Sur América. (Cáceres, 2006) (Ortiz, 1995)

En Guatemala, es cultivado en tierra caliza y en un clima templado, en especial en el altiplano central y en el occidente del país. Debe cultivarse debido a que no se encuentra de forma silvestre. (Cáceres, 2006) (Ortiz, 1995).

3. Obtención. Tolerante a las sequías, puede crecer en suelos rocosos o arenosos, drenados poco profundos. Se propaga por cortes o semillas. Se cosechan 2 veces al año y se utilizan las hojas y los brotes florales, los cuales se prefieren para la extracción del aceite esencial. (Cáceres, 2006)

4. Usos medicinales y populares. El romero se utiliza como un agente medicinal, se utiliza de forma ornamental, industrial y culinaria. Por ejemplo, el aceite esencial se utiliza en vinos, cosméticos, perfumes, jabones, desodorantes y como tónicos del cabello. En la cocina, se utiliza para sazonar comidas como pollo, pescado, pato, y otros. También se ha mencionado que el uso de

la loción de romero estimula el crecimiento del cabello y previene la calvicie. (Cáceres, 2006) (Duke, 2001) (Cunningham, 1999)

En Latinoamérica lo utilizan como insecticida debido a su olor tan fuerte. En Centro América, lo utilizan como control de la fertilidad, el cual produce esterilidad temporal y posiblemente interfiere con la implantación del óvulo o afecta la menstruación. (Duke, 2001)

La infusión de romero puede curar dolor de cabeza por nervios y tiene un efecto benéfico en el cerebro; por lo que también es utilizado para mejorar la memoria. Otros usos reportados son para el tratamiento de amigdalitis, anemia, resfríos, cólicos, dispepsia, neuralgia, tensión, bronquitis, cefaleas, debilidad, depresión, desórdenes circulatorios, hipotensión, indigestión, náuseas, parasitismo, reumatismo, tos y vértigo; además posee propiedades antioxidantes, por lo que puede ayudar al cáncer, bactericidas y fungicidas. (Cáceres, 2006) (Duke, 2001) (Cunningham, 1999)

También se le atribuyen poderes mágicos como protección, amor, deseo sexual, poderes mentales, exorcismo, purificación, curación, sueño y juventud. (Cunningham, 1999)

5. Composición química. Las hojas poseen polifenoles, pigmentos flavónicos, glucósidos, ácidos orgánicos, alcaloides diterpénicos, flavonas, diterpenoides, ácido ursólico, taninos, salvigenina, hepidulina, genkwareno y nepetina. Además posee aceite esencial el cual está compuesto por (Cáceres, 2006):

- |                        |                       |
|------------------------|-----------------------|
| • $\alpha$ -pineno     | • Limoneno            |
| • Canfeno              | • $\gamma$ -terpineno |
| • 1,8-cineol           | • P-cimeno            |
| • Alcanfor             | • Linalool            |
| • Borneol              | • Cariofileno         |
| • Acetato de bornilo   | (Cáceres, 2006)       |
| • Mirceno              |                       |
| • $\alpha$ -felandreno |                       |

6. Farmacognosia. Se utilizan las hojas y las ramitas tiernas como materia médica. Se ha reportado que el aceite esencial, tópicamente, se le atribuyen propiedades antisépticas, antiparasitarias, antiartríticas, analgésicas, cicatrizantes y estimulantes del crecimiento del cabello. (Cáceres, 1996)

Los ácidos orgánicos que posee, le confieren las propiedades de colerética, colagoga y diurética. Estas propiedades se ven reforzadas por la presencia de flavonoides, los cuales son espasmolíticos. Otro componente importante es el ácido rosmarínico, el cual tiene actividad antibacteriana, antiviral, antiinflamatoria y antioxidante. El mecanismo de acción del ácido rosmarínico como antiinflamatorio, es por medio de la inhibición de la quimioluminiscencia por superóxido y mieloperoxidasa. (Cáceres, 1996) (Duke, 2001)

7. Precauciones y contraindicaciones del uso. Es contraindicado en embarazo y problemas gastrointestinales. Se debe tener precaución con el uso de las hojas y el aceite ya que pueden causar irritación renal, gástrica, nefritis, convulsiones y dermatitis con el uso tópico. (Cáceres, 1996)

## B. Aceite esencial

1. Reseña histórica. La existencia de los aceites esenciales se remonta 4,000 a.C; siendo utilizados por los egipcios, griegos, romanos, persas, chinos e indios para sus ritos religiosos, mágicos y por sus propiedades sanadoras. Los antiguos egipcios fueron de los primeros en utilizar los aceites esenciales, para los cosméticos, la relajación y para embalsamar los cuerpos de las momias, ya que utilizaban las propiedades antisépticas de los aceites para la preservación de los cuerpos; también fueron los primeros en utilizar el método de destilación para la extracción de los aceites. (Dan, 2010) (Essential Depot, 2010)

La civilización griega aprendió el uso de los aceites por los egipcios, ellos usaron el aceite con fines terapéuticos, para relajación e incluso en procedimientos quirúrgicos. Los indios y los chinos también utilizaban los aceites para curar enfermedades, sanar heridas y lesiones; ambas culturas tienen la base de sus prácticas medicinales naturales por el uso de los aceites, en especial la India que hasta la fecha perdura su sistema medicinal Ayurveda. (Dan, 2010) (Essential Depot, 2010)

Los romanos adoptaron el uso de los aceites esenciales para la curación, en base a los griegos. También practicaron los métodos de extracción de los aceites. Un personaje muy importante en la historia, fue Claudio Galeno (150 d.C.), el cual utilizó el aceite esencial para la curación de heridas a los gladiadores, además de ser el médico personal de Marco Aurelio, a quien abogó por tratamientos de aceites esenciales. (Dan, 2010)

En 1,000 d.C. los árabes perfeccionaron los métodos de extracción de los aceites, siendo el médico Avicena (980 – 1.307 d.C.), el mayor precursor del mejoramiento de la técnica de destilación a vapor. (Dan, 2010)



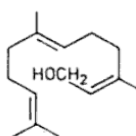
- 3 ciclos: no se conocen ejemplos de este tipo de estructura. (Gennaro, 2003)

Por otro lado los sesquiterpenos tiene la fórmula  $C_nH_{2n-6}$ , su estructura se basa en 3 unidades de isoprenos. Las moléculas pueden unirse para formar una cadena hidrocarbonada alifática o un sistema cíclico, el cual puede ser mono-, bi-, y tricíclicos. Estos compuestos presentan actividad antifúngica, antibiótica, antiinflamatoria, según sea el caso. (McMurry, 2008) (Gennaro, 2003) (Castillo & Martínez, 2007)

Ejemplo de sesquiterpenos (Beyer, Barluenga, & Walter, 2000):

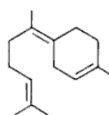
- Alifático: farnesol

Imagen 4: Estructura de Farnesol



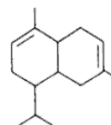
- Monocíclico: bisaboleno

Imagen 5: Estructura de Bisaboleno



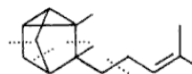
- Bicíclico: cadineno

Imagen 6: Estructura de Cadineno



- Tricíclico:  $\alpha$ -santaleno

Imagen 7: Estructura de  $\alpha$ -santaleno



3. Propiedades físicas. Los aceites esenciales poseen características físicas propias, las cuales son importantes para la identificación de estos; entre ellas se puede mencionar las siguientes (Paz, 2009):

- Son líquidos volátiles a temperatura ambiente.
- En la primera destilación son incoloros o ligeramente amarillos.
- Tienen una densidad inferior a la del agua.
- Tienen rotación óptica e índice de refracción elevado.
- Solubles en solventes orgánicos. A pesar de su poca solubilidad en agua, los aceites son arrastrados por el vapor de agua.
- Liposolubles.

4. Clasificación de los aceites esenciales. Los aceites esenciales se pueden clasificar según: consistencia, origen y naturaleza química.

Según la consistencia los aceites se pueden clasificar en:

- Esencias: tienen la característica de ser líquidos fluidos volátiles a temperatura ambiente. (Paz, 2009) (McMurry, 2008)
- Bálsamos: se caracterizan por tener un alto contenido de ácido benzoico y cinámico, y algunos esteres. Tienen una consistencia más espesa, no son tan volátiles y pueden sufrir reacciones de polimerización. (Paz, 2009) (McMurry, 2008)
- Grupo de resinas:
  - Resinas: tienen una naturaleza química compleja, son amorfos sólidos o semisólidos. Su origen puede ser fisiológico o fisiopatológico. (Paz, 2009) (Gennaro, 2003)
  - Oleorresinas: ésta es una mezcla de aceites esenciales y resinas, se caracteriza por ser homogénea. También se le conoce como oleorresinas a los extractos vegetales obtenidos por solventes, estos tienen la característica de tener el aroma de una forma más concentrada y son líquidos muy viscosos y en algunos casos son semisólidos. Son utilizados en la industria alimenticia como sustitutos de especias, en la industria farmacéutica por la ventaja de poder incorporarse al producto terminado. (Paz, 2009) (Gennaro, 2003)
  - Gomorresinas: formado de gomas y resinas. (Paz, 2009)

Según su origen, los aceites se pueden clasificar en:

- Naturales: son los obtenidos directamente de la planta, no sufren modificaciones físicas ni químicas, tienden a tener bajo rendimiento por lo que son muy costosos. (Paz, 2009)
- Artificiales: son esencias que son enriquecidas con uno o varios componentes, como por ejemplo le agregan linalol a un aceite de rosas. (Paz, 2009)
- Sintéticos: estos se producen por medio de la combinación de sus componentes que son producidos, en su mayoría, por síntesis química. (Paz, 2009)

Según su naturaleza química los aceites esenciales pueden diferenciarse por sus quimiotipos, el cual determina la composición del aceite esencial incluso dentro de la misma especie de planta. Las pequeñas variaciones que existen pueden producirse por cambios ambientales, geográficos, genéticas, etc., que pueden tener o no tener un efecto en la morfología de la planta pero sí en la producción de metabolitos secundarios, entre ellos los aceites esenciales que en una época pueden tener más componentes que en otra. (Paz, 2009)

### C. Aceite esencial de Romero (*Rosmarinus officinalis* L)

1. Composición química. Anteriormente, se mencionó que el aceite esencial de romero está compuesto por:

- $\alpha$ -pineno
- Canfeno
- 1,8-cineol
- Alcanfor
- Borneol
- Acetato de bornilo
- Mirceno
- $\alpha$ -felandreno
- Limoneno
- $\gamma$ -terpineno
- P-cimeno
- Linalool
- Cariofileno

(Cáceres, 2006) (EP, 2005)

Varios estudios sobre *R. officinalis* describen la composición química de su aceite esencial (Ver Cuadro No. 1). Como se mencionó anteriormente, el tipo y contenido de los compuestos presentes en la esencia se atribuye, en gran medida, a factores intrínsecos como el quimiotipo, estado de desarrollo fenológico, parte de la planta, etc., y extrínsecos, como las condiciones climáticas, labores culturales, tratamiento post-cosecha, etc., de la planta y a los métodos de obtención y análisis del aceite. (Paz, 2009)

Cuadro No. 1: Principales compuestos presentes en el aceite esencial de la especie *Rosmarinus officinalis* de diferentes orígenes.

Origen	Composición química del aceite esencial de romero
Grecia	1,8-Cineol (51.2 %), $\alpha$ -pineno (10.3 %), borneol (4.7 %), y canfeno (4.0 %). (Skrubis, 1972)
Bulgaria	$\alpha$ -Pineno (31.1 %), canfeno (9.2 %), $\beta$ -pineno (5.9 %), mirceno (8.0 %), $\alpha$ -fenantreno (2.6 %), limoneno (5.6 %), $\alpha$ -terpineno+1,8-cineol (16.7 %), alcanfor (7.3 %), acetato de isobornilo (1.4%), terpineno + terpinoleno (11.0 %). (Devetak., 1977)
Hungría	$\alpha$ -Pineno + canfeno (24.9 %), 3-octenona (10.0 %), $\beta$ -pineno (3.8 %), 1,8-cineol (20.1 %), alcanfor (14.7 %), borneol (3.0 %), $\alpha$ -terpinol (0.5 %), verbenona (0.8 %), acetato de bornilo (6.0 %), <i>trans</i> - $\beta$ -cariofileno (9.7 %). (Hethelyi, et al. 1987)
Portugal	Mirceno (20-52 %) y $\alpha$ -pineno (12-30 %), $\alpha$ -Pineno (11,2 %-12,1 %), mirceno (31,5%-36,2%), 1,8 cineol (12,8%-14,9%), alcanfor (8,7%-14,4%). (Mateus, et al. 2006)
Colombia	1,8-Cineol + limoneno (7-24%), alcanfor (20-21 %), $\alpha$ -pineno (2-11 %), canfeno (1- 11 %), $\beta$ -pineno (2-10%), borneol (2-5%), acetato de bornilo (2-4 %). (Checira & Lozano, 1992)
Algeria	1,8-Cineol (31.9 %-52.4 %), alcanfor (12.6 %-19.7 %), $\alpha$ -pineno (0.4 %-5.2 %), canfeno (0.3 %-3.0%), $\beta$ -pineno (0.3 %-5.7 %), borneol (3.4 %-12.1 %), $\alpha$ -terpinol (2.1 %-12.8 %), $\beta$ -cariofileno (3.0%-4.2 %). (Boutekedjiret, et al. 2003)
Brasil	$\alpha$ -Pineno (41.63%), 1,8-cineol (19.35%), canfeno (4.73%), verbenona (3.86%) y borneol (3.10%). (Atti-Santos & et al., 2005)
Turquía	Identificaron aceite esencial de tres regiones cercanas al mediterráneo: <i>Mersin</i> : 1,8-Cineol (58-1 %), alcanfor (12.1 %), $\alpha$ -pineno (8.8 %). <i>Izmir</i> : $\alpha$ -Pineno (14.2 %), 1,8-cineol (15.5 %), alcanfor (13.7 %), verbenona (11.8 %), borneol (8.1%). <i>Canakkale</i> : $\alpha$ -Pineno (12.6 %), 1,8-cineol (12.3 %), alcanfor (16.0 %), verbenona (12.2 %), borneol (7.4 %). (Yesil Celiktas & et al., 2007)
Egipto	Identificaron aceite esencial de dos regiones (Soliman & et al., 1994): <i>Sinai</i> : Verbenona (12.3%), alcanfor (11-3%), acetato de bornilo (7.6%), limoneno (7.1%) y linalool (6.60%), no se encontró alcanfor. <i>Giza</i> : Alcanfor (14.9%), $\alpha$ -pineno (9.3%), 1,8-cineol (9.0%) y linalool (5.44%).
Italia	Identificaron dos quimiotipos (Flamini & et al., 2002): <i>Quimiotipo I (<math>\alpha</math>-pineno)</i> : $\alpha$ -Pineno (28.6 %), canfeno (7.44 %), 1,8-cineol (8.50%), alcanfor (9.26 %), borneol y verbenona (5.97 %). <i>Quimiotipo II (1,8-cineol)</i> : $\alpha$ -Pineno (18.6%), $\beta$ -pineno (6.79%), 1,8-cineol (43,3%) y borneol (8.96%).

Como se puede observar, la concentración de los componentes varía según su origen, pero se mantienen constantemente  $\alpha$ -pineno, alcanfor y 1,8-cineol como los principales constituyentes del aceite esencial de romero.

2. Usos medicinales. El aceite esencial se utiliza como espasmolítico, colerético colagogo, diurético, emenagogo no hormonal, carminativo, mucolítico, rubefaciente, antiparasitario (tópico). Además de tener propiedades relajantes por medio de una acción antagonista a los canales de calcio. También es utilizado en Alzheimer, crecimiento de cabello, cuidado de la piel, aliviar problemas respiratorios y dolores musculares. (NYULMC, 2011)

3. Bioactividad. La bioactividad es la capacidad que tiene un agente sobre los organismos vivos o un tejido, por ejemplo el efecto que tiene el aceite esencial de romero sobre las bacterias, hongos u otro agente patológico. Se han realizado varios estudios los cuales indican la acción del aceite de romero en distintas bacterias y hongos, cada prueba tiene diferentes condiciones, por lo que los resultados varían. Los resultados pueden ser expresados por MIC, el cual es la mínima concentración inhibitoria de una sustancia expresada en g/mL, que inhibe el crecimiento de un microorganismo in vitro. También se puede expresar por su actividad, ya sea negativa o positiva sobre un organismo. (Hüsnü & Buchbauer, 2010)

Según el estudio *In vitro antibacterial activity of some plant essential oils* realizado por Prabuseenivasan, et al. 2006, el aceite esencial de romero presentó los siguientes resultados:

Cuadro No. 2: Concentración mínima inhibidora de aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (v/v).

Bacteria	MIC (mg/ml)
<i>S. aureus</i>	>12.8
<i>B. subtilis</i>	>6.4
<i>K. pneumoniae</i>	>12.8
<i>P. vulgaris</i>	>6.4
<i>E. coli</i>	>6.4
<i>P. aeruginosa</i>	>6.4

(Prabuseenivasan, Jayakumar, & Ignacimuthu, 2006)

Estos resultados indican que posee una actividad moderada ante estas bacterias.

Otra fuente importante es el Handbook of Essential Oils, el cual posee información sobre la actividad inhibitoria del aceite esencial de romero, obtenidos del test realizado en la fase de vapor. Los resultados más importantes son:

Cuadro No. 3: Resultados de la actividad inhibitoria del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*.

Microorganismo	Clase de Microorganismo	Actividad
<i>Aerobacter tumefaciens</i>	Bacteria Gram negativa	Negativa
<i>Escherichia coli</i>	Bacteria Gram negativa	Negativa a +++
<i>Haemophilus influenza</i>	Bacteria Gram negativa	Negativa
<i>Neisseria sp.</i>	Bacteria Gram negativa	Negativa
<i>Proteus vulgaris</i>	Bacteria Gram negativa	+++
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Bacteria Gram negativa	+++
<i>Pseudomona pisi</i>	Bacteria Gram negativa	+++
<i>Pseudomona tabaco</i>	Bacteria Gram negativa	+++
<i>Salmonella typhi</i>	Bacteria Gram negativa	+++
<i>Xanthomonas versicolor</i>	Bacteria Gram negativa	+++
<i>Bacillus subtilis</i>	Bacteria Gram positiva	Negativa
<i>Micrococcusureae</i>	Bacteria Gram positiva	+++
<i>Pneumococcus sp.</i>	Bacteria Gram positiva	Negativa
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bacteria Gram positiva	Negativa
<i>Streptococcus faecalis</i>	Bacteria Gram positiva	Negativa
<i>Streptococcus haemolyticus</i>	Bacteria Gram positiva	Negativa
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Bacteria Gram positiva	Negativa
<i>Aspergillus sp.</i>	Hongo	+++
<i>Botrytis cinera</i>	Hongo	+++
<i>Eurotium sp.</i>	Hongo	+++
<i>Fusarium sp.</i>	Hongo	Negativa
<i>Penicillium sp.</i>	Hongo	+++
<i>Rhizoctonia solani</i>	Hongo	+++
<i>Candida albicans</i>	Levadura	Negativa
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levadura	Negativa

(Hüsni & Buchbauer, 2010)

Se puede observar que el aceite esencial de romero tiene una actividad antimicrobiana y antifúngica variada, por lo cual tiene mucho uso tanto de forma medicinal como de preservante.

4. Farmacología. Según el artículo *Pharmacology of rosemary (Rosmarinus officinalis L.) and its therapeutic potentials* realizado por M. R. Al-Sereitia, K. M. Abu-Amerb & P. Sena en 1999, indican que la acción farmacológica del romero se divide en:

- Efectos en el sistema nervioso central: el aceite esencial administrado por vía oral o inhalada produce relajación en el sistema nervioso, relajando así la actividad respiratoria y el aparato locomotor en ratones. (Al-Sereitia, Abu-Amerb, & Sena, 1999)
- Efectos en el sistema circulatorio: reportan que el uso del aceite esencial en forma de baño estimula la piel y mejora la circulación, además de mejorar las enfermedades arteriales. (Al-Sereitia, Abu-Amerb, & Sena, 1999)
- Efectos en el músculo liso: en conejos y conejillos de indias, el aceite esencial inhibe la contracción del músculo liso traqueal inducida por la acetilcolina y la histamina en los conejos y conejillos de india, además inhibe la contracción inducida por una solución alta de  $K^+$ . (Al-Sereitia, Abu-Amerb, & Sena, 1999)
- Efectos colerético y hepatoprotectores: se demostró experimentalmente estos efectos por medio del uso del extracto etanólico y el liofilizado del extracto acuoso de los brotes jóvenes *R. officinalis*, los cuales demostraron una actividad colerético y protección al hígado contra el tetracloruro de carbono inducido en ratas. Estos resultados se pudieron observar por medio del aumento significativo en el flujo de bilis y una reducción en las enzimas hepáticas. Por lo tanto, el estudio concluyó que el extracto de *R. officinalis* posee una actividad antilipoperoxidante, ya que reduce la formación de malonaldehído y disminuye la liberación de deshidrogenasa láctica (LDH) y aspartatoaminotransferasa (ASAT), reacción que es dependiente de la dosis. (Al-Sereitia, Abu-Amerb, & Sena, 1999)
- Efecto antitumoral: algunos de los componentes de la dieta diaria han demostrado tener propiedades antioxidantes previniendo la formación de cáncer. Se ha encontrado en los extractos de hojas de romero una potente actividad antioxidante, por lo que es utilizado como preservante en la industria alimenticia y no produce ninguna reacción tóxica aguda, según resultados en pruebas con animales. (Al-Sereitia, Abu-Amerb, & Sena, 1999)
- También se ha demostrado que el extracto de romero posee una actividad inhibitoria contra células KB, por medio de un ensayo utilizado para identificar a los agentes contra el cáncer en productos naturales. Además se realizó una investigación para evaluar la potencialidad del extracto de romero para inhibir la tumorigénesis mamaria inducida en ratas hembras y para evitar formación de aductos carcinógenicos de ADN en células epiteliales mamarias. Esta investigación utilizó un suplemento dietético con un 1% w/w del extracto en ratas tratadas con DMBA, obteniendo como resultado un reducción del 47% de la tumorogénesis mamarias y un 42% de inhibición total de la unión de DMBA al ADN de las células epiteliales mamarias; por lo tanto se concluye que el extracto de romero posee componentes antioxidantes individuales que pueden utilizarse como agentes quimiopreventivos y deben ser investigados a mayor profundidad. (Al-Sereitia, Abu-Amerb, & Sena, 1999)

- Actividad antimicótica: la infección por *Candida* oral es muy importante en pacientes inmunocomprometidos, ya que por la cantidad de medicamentos que utilizan, no responden al tratamiento con nistatina para evitar la candidiasis. El aceite esencial de romero inhibió el crecimiento de *Candida albicans in vitro*. Se tienen datos de la acción *in vivo* del aceite, por medio de una emulsión de aceite de romero en agua con una relación 1:10, la cual se aplica por medio de un hisopo en la boca 5 veces al día en pacientes con diferentes tipos de cáncer u otra enfermedad inmuno-supresora, que no responden al tratamiento con nistatina, obteniendo como resultado una inhibición completa del crecimiento de la levadura en 2-4 días. (Al-Sereitia, Abu-Amerb, & Sena, 1999)

5. Toxicología. El aceite esencial de romero puede ser tóxico en bajas concentraciones y no se conoce a ciencia cierta a dosis máxima segura. Un efecto débil es el aumento del índice del hígado en la desactivación de estrógeno en el cuerpo, por lo que puede indicar riesgo para los pacientes que utilicen medicamentos con estrógeno. Además, se ha reportado que el romero tiene propiedades abortivas y efectos embriotóxicos por lo que no se debe utilizar en mujeres embarazadas o que quieran embarazarse. (Saldaña & *et al*, 2010)

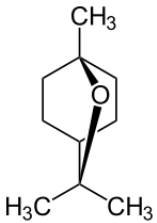
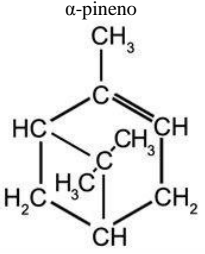
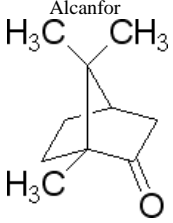
El estudio *Experimental diuretic effects of Rosmarinus officinalis and Centaurium erythraea*, realizado por Haloui M, Louedec L, Michel JB, *et al.* en 2000; sugiere que el romero posee un efecto diurético por lo que en teoría podría tener interacción con el litio, presentando riesgo para el paciente que los consume. (Haloui, Louedec, Michel, & *et al.*, 2000)

6. Usos farmacéuticos, industriales y cosméticos. El aceite esencial se utiliza en la industria alimenticia como preservante de alimentos, también se utiliza en el área de cosméticos para productos que ayudan al crecimiento del cabello y aromaterapia. En el área farmacéutica se utiliza para la producción de jarabes o productos para las vías respiratorias y pomadas antibacterianas para las heridas en la piel. También es utilizado para preparar repelentes contra mosquitos y polillas. (Paz, 2009) (Hüsnü & Buchbauer, 2010)

## 7. Componentes mayoritarios de interés

## a. Descripción

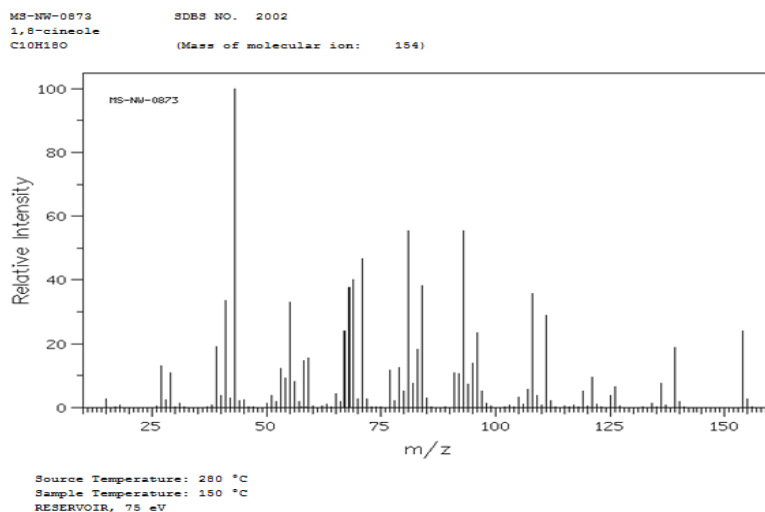
Cuadro No. 4: Descripción de los componentes mayoritarios del aceite esencial de *R. officinalis*.

Nombre	Descripción	Propiedades fisicoquímicas	Usos	Métodos de identificación
1,8-cineol 	También es conocido como Eucalyptol, es incoloro, espeso con un olor sugerente de alcanfor y con un sabor picante. Posee un peso molecular de 154.24 g/mol y la fórmula $C_{10}H_{18}O$ .	<ul style="list-style-type: none"> <li>Solubilidad: soluble en alcohol y escasamente soluble en agua fría y caliente.</li> <li>Densidad de: 0.921-0.923 g/cm<sup>3</sup> a 25°C.</li> <li>Punto de ebullición de 176-177°C.</li> <li>Punto de fusión: 1.5°C.</li> <li>Índice de refracción a 20°C: 1.455-1.460.</li> </ul>	Usado para preparados farmacéuticos aplicados oral o de forma tópica. Oral: sirve como expectorante para bronquitis crónica. Tópico: es anestésico y antiséptico para inflamaciones. También es usado para sprays ambientales, lociones y cosméticos.	Se puede caracterizar por medio de: <ul style="list-style-type: none"> <li>Derivados del yodo.</li> <li>Adición de bromuro de hidrógeno.</li> <li>Adición de componentes hidroxil aromáticos.</li> <li>Oxidación con permanganato de potasio caliente.</li> <li>Reacciones cualitativas de color.</li> </ul>
$\alpha$ -pineno 	Es un terpeno incoloro, de olor característico. Se resinifica al exponerse al aire. Posee tendencia a isomerizarse bajo la influencia del calor, ácidos o catálisis. Tiene un peso molecular de 136.23 g/mol y la fórmula $C_{10}H_{16}$ .	<ul style="list-style-type: none"> <li>Solubilidad: insoluble en agua. Soluble en alcohol, cloroformo y solventes orgánicos.</li> <li>Densidad de: 0,858-0,867 g/cm<sup>3</sup> a 20°C.</li> <li>Punto de ebullición de 155°C.</li> <li>Punto de fusión: 64°C.</li> <li>Rotación óptica: -50,7°</li> </ul>	Su principal uso es en la manufactura de componentes sintéticos como: borneol, alcanfor y terpineol. Es un componente importante en las imitaciones de aceites esenciales. También se utiliza para producir sales de baño, insecticidas, sprays aromáticos, desinfectantes	Se puede identificar por medio de los siguientes métodos: <ul style="list-style-type: none"> <li>Preparación del cloruro nitroso ópticamente inactivo.</li> <li>Derivado confirmatorio: cloruro.</li> <li>Forma un compuesto cristalino con anhídrido maléico.</li> <li>Oxidación por medio de permanganato de potasio a ácido pinónico.</li> <li>Oxidación por medio de acetato de mercurio para identificar pequeñas cantidades de <math>\alpha</math>-pineno.</li> </ul>
Alcanfor 	Es una cetona bicíclica, con un peso molecular de 152.23g/mol y la fórmula $C_{10}H_{16}O$ . Es cristalino, incoloro, masa transparente, se evapora fácilmente a temperatura ambiente. Resistente a la acción de agentes oxidantes.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Solubilidad: soluble en solventes orgánico, en agua a temperatura ambiente en la proporción 1:598 y poco soluble en agua caliente y fría.</li> <li>Densidad: 0.9920 a 25°C.</li> <li>Punto de ebullición: 207°C</li> <li>Punto de fusión: 178-182 °C.</li> <li>Actividad óptica: +43°40' en alcohol a 20°C.</li> </ul>	Se utiliza en la preparación de productos medicinales como anestésico local y remedios para problemas reumatoides, musculares e inflamaciones. También se utiliza como calmante y estimulante de la circulación.	Se caracteriza por un numero de derivados funcionales, los cuales se obtienen de las formas estereo del alcanfor y poseen distintos puntos de ebullición; entre los derivados se puede mencionar: semicarbazona, hidrazona, oxima, azina, <i>l</i> -menthydrazona, <i>p</i> -iodobenzohidrazona, etc.

(Güntner, Vol:2. 2007)

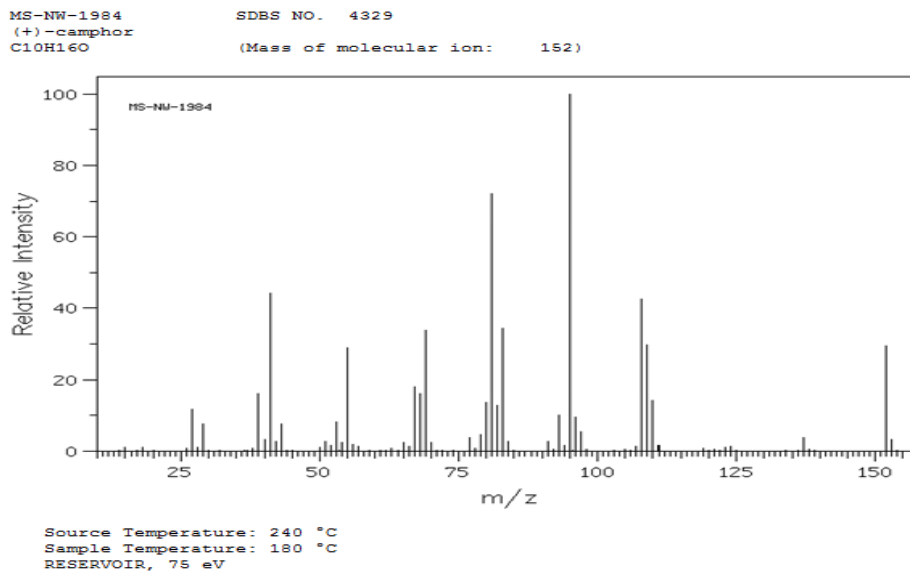
## b. Espectros por espectrometría de masas

- Imagen 8: Espectro de masas de 1,8-cineol.



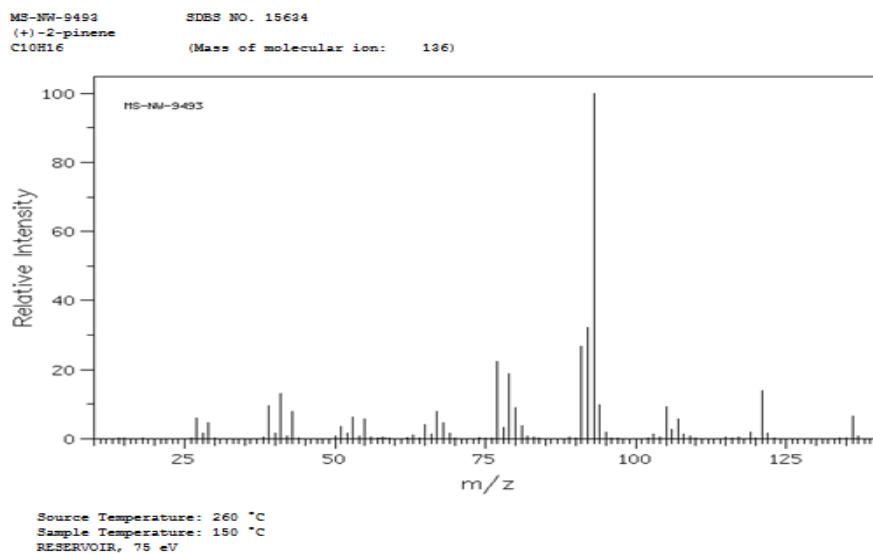
(AIST, 2007)

- Imagen 9: Espectro de masas de alcanfor.



(AIST, 2007)

- Imagen 10: Espectro de masas de  $\alpha$ -pineno.



(AIST, 2007)

## D. Métodos de extracción de aceites esenciales

1. Enfleurage. Este método se basa en la utilización de grasa natural, la cual debe tener un punto de ablandamiento de 40 °C. Esta grasa suele ser de cerdo, la cual está refinada, blanqueada y desodorizada. Este método se utiliza principalmente para obtener esencias las cuales su proceso de extracción no poseen buen rendimiento por medio de la destilación. Para su preparación, se esparce la grasa en una bandeja con una profundidad no mayor de 0.5 cm y se coloca el material vegetal o la flor

y se deja reposar durante 3 a 5 días. Posteriormente, se recoge la materia y se reemplaza con material fresco, esto con el objetivo de saturar la grasa, formado una pomada fragante. Ésta se lava con alcohol de perfumería, el cual se destila a vacío hasta obtener un volumen del 80% del alcohol utilizado, y en el fondo queda el residuo conocido como absoluto. (Sánchez, 2006) (Güenther, Vol:1. 2007)

2. Extracción con solventes. Este método se basa principalmente en la utilización de solventes volátiles para la extracción. Consiste en primero macerar el material vegetal, esto para permitir una mayor área de contacto con el solvente; seguidamente, se le agrega el solvente se agita constantemente. Este procedimiento debe realizarse a temperatura y presión del ambiente; por lo cual se puede ejecutar con el uso de un solvente altamente puro como éter de petróleo o en extractores como soxhlet. Este método puede utilizar los siguientes solventes: etanol, metanol, isopropanol, hexano, éter de petróleo, tolueno, acetato de etilo, acetona, cloroformo, etc. El solvente se recupera por medio de la destilación, la ventaja de esto es que el solvente puede re-utilizarse. La desventaja, es que este método también extrae otros componentes como colorantes, gomas, proteínas u otros metabolitos afines al solvente. (Sánchez, 2006) (Güenther, Vol:1. 2007).

3. Extracción por prensado. Se somete a presión el material vegetal es sometido a presión en equipos como: Tornillo sin fin de alta o de baja presión, extractor centrífugo y rodillos de prensa. Antiguamente, se realizaba por medio de esponjas. El procedimiento consistía en exprimir manualmente las cáscaras con una esponja, esta se empapaba y se exprimía liberando los aceites esenciales. Los aceites obtenidos por este método, se les comercializa como expresión en frío y se utilizan como odorizantes y saborizantes. (Sánchez, 2006) (Güenther, Vol:1. 2007)

4. Extracción con fluidos supercríticos. Para un gas o vapor, el punto crítico es la condición de temperatura y presión por encima de la cual la sustancia ya no puede licuarse al incrementar la presión. La sustancia que más se utiliza es el CO<sub>2</sub>; ya que presenta baja viscosidad, tensión superficial y un alto coeficiente de difusión. Esto ayuda a tener un alto contacto con la superficie del material, debido a que penetra hasta en los pequeños poros lo que asegura una buena extracción en corto tiempo. Al final del proceso, se remueve el solvente y se realiza a una temperatura baja, con el objetivo de disminuir la pérdida de sustancias volátiles y evitar la formación de sabores y olores extraños. La desventaja de este proceso es que la inversión es alta, aún para equipos en pequeña escala; esto se debe a que el equipo utilizado tiene ciertas características debido a las altas presiones de operación. (Sánchez, 2006) (Güenther, Vol:1. 2007)

5. Hidrodestilación. En este proceso se coloca agua en un tanque y se coloca una parrilla con el contenido vegetal a extraerse; posteriormente, se calienta el tanque y los vapores arrastran el aceite esencial de la planta. La salida de los vapores pueden ser de forma lateral al tanque, por donde sale el vapor hacia un condensador, seguidamente el vapor condensado con el aceite esencial se recolectan en un separador de fases. Una característica importante del separador, es que debe tener una altura y diámetro apropiado para evitar cualquier pérdida de aceite. Las ventajas de este método, es que son fáciles de instalar, fáciles de operar y no consumen mucha energía; la desventaja es que los aceites necesitan una etapa posterior de refinación. (Sánchez, 2006) (Güenther, Vol:1. 2007)

6. Extracción por arrastre con vapor. Este método es utilizado para separar sustancias orgánicas ligeramente volátiles e insoluble en agua, de mezclas como resinas u otros compuestos orgánicos. (Sánchez, 2006)

Esta técnica se fundamenta en la Ley de Dalton de presiones parciales, la cual dice:

«Que dos o más gases o vapores, que no reaccionan entre sí, se mezclan a temperatura constante, cada gas ejerce la misma presión que si estuviera solo y la suma de las presiones de cada uno, es igual a la presión total del sistema»<sup>1</sup>

Se conoce la Ley de Dalton por medio de la siguiente expresión matemática:

$$\text{Ecuación No. 1} \quad P_T = P_1 + P_2 + \dots P_n$$

Es importante mencionar, que al destilar una mezcla de líquidos inmiscibles, su punto de ebullición será inferior a la cual la suma de las presiones de vapor es igual a la atmosférica. Esta temperatura será inferior al punto de ebullición del componente más volátil. Los aceites esenciales se liberan por medio del rompimiento del tejido vegetal, debido al efecto de la temperatura de vapor a 100°C en un determinado tiempo. Por lo tanto, la técnica es utilizada cuando los compuestos cumplen con las condiciones de ser volátiles, inmiscibles en agua, tener presión de vapor baja y punto de ebullición alto. (Sánchez, 2006) (Chamorro, 2009)

## E. Métodos de cuantificación de aceites esenciales

### 1. Cromatografía de gases

*a. Fundamentos y principios básicos.* La cromatografía de gases es una técnica que separa los componentes de una muestra cuando esta es vaporizada. Los componentes se separan a consecuencia de su reparto entre un fase móvil, la cual es un gas, y una estacionaria líquida o sólida contenida en una columna. Para realizar la separación, la muestra a ser analizada se vaporiza y se inyecta en la

<sup>1</sup> Chamorro, L; *et al. Destilación por arrastre de vapor.* (España: UVA, Ingeniería Química, 2009). Extraído de: <http://www.iq.uva.es/separacion/archivos/arrastrevapor.pdf>

cabeza de la columna. La elución de los componentes se logra por medio del flujo de una fase móvil de gas inerte, el cual no interacciona con las moléculas del analito, solamente lo transporta a lo largo de la columna. (Skoog & al, 2005) (Skoog, Holler, & Crouch, 2008)

Existen dos tipos de cromatografía de gas:

- **Cromatografía de gas-líquido:** la cual se caracteriza por tener una fase móvil, que es un gas, y una fase estacionaria, que es un líquido retenido sobre una superficie de un sólido inerte por adsorción o por enlace químico. Esta técnica es la más utilizada en la ciencia y su nombre es abreviado a cromatografía de gases. (Skoog, Holler, & Crouch, 2008)
- **Cromatografía de gas-sólido:** también posee como fase móvil un gas y la estacionaria es un sólido que retiene los analitos por medio de la adsorción física. Esta técnica se utiliza para la separación de componentes de bajo peso molecular; su aplicación es limitada, ya que retiene de forma semipermanente moléculas activas o polares; y los picos de elución presentan grandes colas, no en todo los casos, debido a la naturaleza no lineal del proceso de adsorción. (Skoog, Holler, & Crouch, 2008) (Rivera, 2008)

La cromatografía de gases es una técnica de análisis que ofrece resoluciones excelentes con sensibilidad del orden de miligramos a picogramos. Los resultados son cuantitativos y se obtienen en un espacio de tiempo relativamente corto. Los componentes de las muestras deben ser estables a la temperatura de operación, las muestras tienen que ser volátiles. Por lo que es uno de los métodos más utilizados para caracterización y cuantificación de componentes de los aceites esenciales. (Skoog, Holler, & Crouch, 2008) (Rivera, 2008)

#### *b. Instrumentación*

- **Fase móvil:** es también conocido como gas portador, este proporciona un rápido equilibrio entre las fases con mayor eficiencia en la obtención de los análisis. La principal característica de un gas, es que debe ser inerte, por lo que no debe interactuar con la fase estacionaria ni con la muestra, debe de ser de bajo costo, ser compatible con el detector y de alta pureza, entre los más utilizados son: helio, argón, nitrógeno e hidrógeno. (Skoog & al, 2005)
- **Sistema de inyección de muestra:** para obtener una mejor eficiencia de la columna, la muestra debe ser de un tamaño adecuado y que se introduzca como un bolo de vapor; una inyección lenta o una muestra de tamaño grande afectan la resolución. La inyección de la muestra se realiza por medio de una micro jeringa, ya que el volumen inyectado no debe superar la capacidad de la columna y entre más pequeño sea el volumen usado de la muestra mayor será la eficiencia y reproducibilidad del análisis. (Skoog, Holler, & Crouch, 2008)
- **Configuración de columna y sistema de control de temperatura:** una variable importante para la columna es la temperatura, por lo que se debe controlar con exactitud, por esta razón la columna

se coloca en un horno con termostato. La temperatura óptima de la columna va a depender del punto de ebullición de la muestra y el grado de separación. En muestras con intervalos amplios de ebullición se utiliza un programa de temperaturas, la cual consiste en incrementar la temperatura de la columna de forma continua o escalonada durante la elución. (Skoog, Holler, & Crouch, 2008) (Skoog & al, 2005)

- *Sistemas de detección:* la muestra pasa a través de la columna, en donde es separado y pasa a un sistema de detección. Para cromatografía de gases el detector debe contar con las siguientes características (Skoog & al, 2005):
  - Sensibilidad adecuada.
  - Buena estabilidad y reproducibilidad.
  - Respuesta lineal a solutos que tengan varias órdenes de magnitud.
  - Intervalos de temperatura que abarcan desde la ambiente hasta los 400°C.
  - Tiempo de respuesta corto e independiente de la velocidad de flujo.
  - Alta fiabilidad y manejo sencillo.
  - Respuesta predecible y selectiva hacia una clase de soluto o una respuesta similar para los solutos.
  - No destruya la muestra.

Existen varios tipos de detectores para cromatografía de gases, pero los más utilizados son los siguientes:

Cuadro No. 5: Detectores de cromatografía de gases.

Tipo	Principio
Ionización de llama (FID)	Se basa en la captura de iones producidos durante la pirolisis de analitos orgánicos en una flama. Responde a los compuestos con enlace C-H. Grupos carbonilo, alcohol y halógeno se ionizan poco y dan una señal baja. Es un detector de elevada sensibilidad y amplio intervalo lineal.
Conductividad térmica (DCT)	Depende de la medida de conductividad térmica del gas que rodea la columna. La detección puede ser menos satisfactoria con gases portadores que poseen conductividad muy similar a los muchos compuestos de la muestra. La ventaja de este detector es que no es destructivo, posee un gran intervalo lineal, su respuesta general a las especies orgánicas e inorgánicas. Su desventaja es la poca sensibilidad.
Captura electrónica	Se utiliza para muestras ambientales por su selectividad a compuestos orgánico que contienen halógenos. La detección se lleva a cabo por la producción de una corriente de electrones, por medio del paso del eluyente de la muestra de una columna pasa sobre un emisor beta y un electrón emisor causa la ionización del gas portador. Este detector es muy sensible y no altera la muestra, pero la respuesta lineal está limitada a unas 2 órdenes de magnitud.
Espectrómetro de masas	Mide la relación masa/carga de iones que se producen a partir de la muestra. Esto permite tanto la separación de los componentes de la muestra como la identificación de cada uno. Se utiliza mucho para mezclas complejas, por medio de la ionización de los fragmentos de la muestra; seguidamente, la información obtenida se analiza por medio de la suma de abundancia de iones en cada espectro y se gráfica en un cromatograma de iones totales, se puede seleccionar iones de interés y el espectro de estos se les conoce como cromatograma de masas.
Termoiónico	Es semejante al FID, es altamente sensible a muestras que contienen fósforo o nitrógeno. Se produce una gran corriente iónica a partir de las moléculas de fósforo o nitrógeno, lo cual se utiliza para determinar compuestos que contienen estos dos elementos.
Conductividad eléctrica	Detecta las moléculas de compuestos clorados/ bromados exclusivamente por reacción del cloro o bromo con oxígeno para producir dióxido de cloro o dióxido de bromo y mide la conductividad de la fase gaseosa a una temperatura de 1000°C. A esta temperatura los dióxidos de cloro / bromo son buenos conductores.
Fotoionización	Utiliza radiación ultravioleta para ionizar especies de analito, se utilizan para compuestos aromáticos y no saturados. Las corrientes que se generan, se amplifican y registran, son proporcionales a la concentración del analito.

(Skoog, Holler, & Crouch, 2008) (Skoog & al, 2005)

- *Columnas:* La columna consiste en un tubo largo que contiene la fase estacionaria. Los materiales más usados son el cobre, el acero, el aluminio, el vidrio y el teflón. El material de la columna no debe interactuar con la fase estacionaria ni con la muestra. (Skoog & al, 2005) (Rivera, 2008)
- *Fase estacionaria:* es un líquido inmobilizado sobre el cual se reparte la especie de analito durante el paso de la fase móvil. La fase estacionaria debe tener las siguientes propiedades: baja volatilidad, estabilidad térmica, ser químicamente inerte y características de solvente. El tiempo de retención de la muestra en la columna depende de su constante de distribución, que está relacionada con la naturaleza química de la fase estacionaria. Es importante mencionar, que existen fases estacionarias polares que tienen grupo funcionales como  $-\text{CN}$ ,  $-\text{CO}$  y  $-\text{OH}$ ; y las no polares son los hidrocarburos y dialquilsiloxanos.; además es necesario que el analito tenga cierto grado de solubilidad con la fase estacionaria, ya que semejante disuelve a semejante. La elección de la fase estacionaria, será según la polaridad de la muestra y de la fase para tener una buena separación. (Skoog, Holler, & Crouch, 2008)

2. Cromatografía de gases con espectrometría de masas GC/MS. La espectrometría de masas se basa en la separación de las partículas moleculares o atómicas por su diferencia de masas. Las principales cualidades del método son (Skoog, Holler, & Crouch, 2008):

- Capacidad de identificación por medio de un espectro característico de cada molécula.
- Mide la concentración de la muestra.
- Sensibilidad alta.
- Específico y universal.
- Proporciona información de la estructura sobre la molécula analizada.
- Proporciona información isotópica.
- Técnica rápida.

El proceso de espectrometría comprende cuatro pasos: ionización de la muestra, aceleración de los iones por un campo eléctrico, dispersión de los iones según su masa/carga, y por último, la detección de los iones y producción de la señal eléctrica. (Corral, 2006) (Skoog, Holler, & Crouch, 2008).

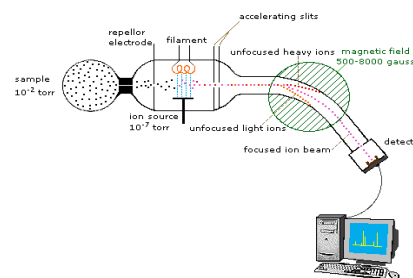


Imagen 11: Esquematización del paso de una muestra por los principales componentes de un instrumento de espectroscopia de masas.

Como se sabe, la cromatografía (CG) es una técnica de separación de mezclas complejas, al obtener la separación se puede cuantificar e identificar, pero la identificación es más complicada, ya que únicamente se tiene el tiempo de retención para conocer el componente. Por otra parte, la espectrometría de masas (MS) puede identificar de manera inequívoca cualquier sustancia pura, pero no puede separar los componentes de la muestra. Por lo que la asociación de ambas técnicas (CG/MS) permite la separación e identificación de los componentes de una mezcla compleja. (Gutiérrez & Droguet, 2002) (Skoog, Holler, & Crouch, 2008)

La instrumentación de espectrómetro de masas, básicamente consta de:

- Sistema de entrada de muestras: por este sistema entran las moléculas de una sustancia pura. En el caso de la asociación con CG, la muestra entra en forma de vapor, por lo que la entrada debe hacer de interfase entre el sistema de CG a presión atmosférica y el sistema del MS que debe estar a baja presión. (Skoog, Holler, & Crouch, 2008)
- Fuente de ionización: tienen la función de ionizar la muestra; estas fuentes tienen suficiente energía para romper los enlaces químicos de las moléculas. La fuente más utilizada es la de impacto electrónico (EI), este bombardea las moléculas con un haz de electrones de alta energía, fragmentando así las moléculas en iones positivos, negativos y neutros. Por lo tanto, esta fuente es muy útil para la identificación de las especies moleculares y se utiliza tanto en espectrometría como en CG/MS. (Skoog, Holler, & Crouch, 2008)
- Analizadores: Este separa los iones según sus valores  $m/z$ . Los más frecuentes en CG/MS son el filtro de masas de cuadrupolo y la trampa de iones. (Skoog, Holler, & Crouch, 2008)
- Detector de iones: la detección de los iones se da por medio de la colisión de estos contra una superficie detectora, emitiendo así electrones, fotones y otros iones. Esto se repite creando una cascada de electrones que se amplifica y se registra por métodos electrónicos. Uno de los más utilizados es el multiplicador de electrones; otro es el de resonancia de ciclotrón, en donde los iones inducen una señal cuya frecuencia es inversamente proporcional a los valores  $m/z$ ; esta frecuencia es decodificada por el método de transformada de Fourier. (Skoog, Holler, & Crouch, 2008)

Esta técnica tiene varias aplicaciones en el campo de la ciencia, entre ellos se puede mencionar: la separación e identificación de los componentes de aceites esenciales, esclarecimiento de la estructura de moléculas orgánicas y biológicas; determinación del peso molecular de péptidos y proteínas; identificación de drogas de abuso y sus metabolitos en sangre, orina y saliva; datación de ejemplares en arqueología, etc. (Skoog, Holler, & Crouch, 2008) (Gutiérrez & Droguet, 2002)

En este estudio nos centraremos en su aplicación para la identificación y cuantificación de los componentes  $\alpha$ -pineno, 1,8-cineol y alcanfor, los cuales están presentes en el aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*).

*a. Estudio de aceites esenciales.* La cromatografía en fase gaseosa acoplada a la espectrometría de masas (CG-MS) para la separación y la identificación de los componentes químicos de aceites esenciales, tiene una amplia aplicabilidad, por lo que actualmente se utiliza de forma rutinaria en muchos laboratorios.

Otra aplicación del CG-MS es el estudio del ciclo vegetativo en la producción de aceites esenciales, de esta forma se determina la composición química del aceite en función del metabolismo vegetativo de la planta, por lo que el productor de aceites esenciales puede determinar el período correcto para la obtención de un producto de calidad y composición constante, con rendimientos excelentes. (Rivera, 2008) (Gutiérrez & Droguet, 2002)

3. Validación de método. La validación de un método analítico es un proceso mediante el cual se establece que las características de funcionamiento del método cumplen con los requerimientos para la aplicación analítica para la cual fue descrita. Con esto se garantiza la reproducibilidad y seguridad de los resultados obtenidos, cuando lo realizan diferentes operadores en equipos similares pero en diferentes laboratorios. El programa de validación varía según el método y su aplicación. (Hearn, 1992)

Para validar un método se deben tomar en cuenta los siguientes parámetros:

- *Precisión:* es el grado de acuerdo entre los resultados individuales obtenidos cuando se aplica el método de muestreo múltiple de una muestra homogénea. Es una medida de reproducibilidad de todo el método. La precisión se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones. Este se ve afectado por los errores aleatorios, los cuales corresponden a las fluctuaciones aleatorias en la señal de medición, también al ruido y otros factores. También lo afecta los errores sistemáticos, los cuales corresponden a errores en el método, el equipo, el operador. (Hearn, 1992)
- *Exactitud:* es una medida de la cercanía de los resultados del análisis obtenidos por el método del valor verdadero. Indica la desviación entre la media del valor encontrado y el valor verdadero. Se calcula por medio de los resultados del análisis como porcentaje del analito recuperado por el ensayo. Esta se ve afectada, al igual que a la precisión, por los errores sistemáticos. (Hearn, 1992)
- *Linealidad:* es la habilidad del método para obtener resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito entre un rango determinado. Se obtiene por medio del cálculo de regresión lineal. (Hearn, 1992)

- *Rango*: es el intervalo entre los valores más bajos y más altos de un analito, los cuales se determinaron con precisión, exactitud y linealidad aceptable. Se puede observar en una curva lineal o no lineal. (Hearn, 1992)
- *Límite de detección*: es la cantidad más pequeña de muestra que puede ser detectada por una única medición, con un nivel de confianza determinado, pero no necesariamente lo cuantifica. (Hearn, 1992)
- *Límite de cuantificación*: es la cantidad más baja del analito en la muestra que puede ser cuantificada con una precisión y exactitud aceptable. (Hearn, 1992)
- *Selectividad*: es la habilidad para medir exacta y específicamente el analito en presencia de componentes que pueden estar presentes en la muestra. (Hearn, 1992)
- *Especificidad*: es la habilidad para evaluar de forma certera el analito de interés en presencia de componentes como impurezas, productos de degradación, excipientes u otros interferentes. (Hearn, 1992)

Estos parámetros se definen según la categoría del estudio, las cuales se dividen en 3 (USP, 2010):

- Categoría 1: Cuantificación de componentes mayoritarios.
- Categoría 2: Impurezas
- Categoría 3: Características de funcionamiento.

Cuadro No. 6: Parámetros de validación según categoría del método.

Parámetro	Categoría 1	Categoría 2		Categoría 3
		Cuantificación	Ensayos límite	
Exactitud	Sí	Sí	*	*
Precisión	Sí	Sí	No	Sí
Especificidad/selectividad	Sí	Sí	Sí	*
Límite de detección	No	No	Sí	*
Límite de cuantificación	No	Sí	No	*
Linealidad	Sí	Sí	No	*
Rango	Sí	Sí	*	*
Robustez	Sí	Sí	Sí	*

\*Puede ser requerido dependiendo de la naturaleza de la prueba específica. (USP, 2010)

Un método debe validarse cuando: este es nuevo, se introduce como un método rutinario o cuando es introducido a un laboratorio diferente. Por lo tanto, la validación de métodos tiene como objetivos (Cortés, 2009):

- Evaluar las características de desempeño del método.
- Demostrar que el método desarrollado por el laboratorio es útil para la aplicación propuesta.
- Demostrar que las modificaciones realizadas a un método no afectan su desempeño, obteniendo resultados confiables.
- Demostrar que los procedimientos son equivalentes.

## IV. MARCO METODOLÓGICO

### A. Objetivos

#### 1. Generales

- a. Proponer un método de identificación y cuantificación para los componentes  $\alpha$ -pineno, 1,8-cineol y alcanfor presentes en el aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) por medio de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (CG/MS).
- b. Validar la metodología realizada para la cuantificación de los componentes  $\alpha$ -pineno, 1,8-cineol y alcanfor presentes en el aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) por medio de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (CG/MS).

#### 2. Específicos

- a. Identificar los distintos constituyentes volátiles presentes en el aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) por medio de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas.
- b. Optimizar el método de cuantificación de los componentes  $\alpha$ -pineno, 1,8-cineol y alcanfor presentes en el aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) por medio de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas.
- c. Generar información acerca de la composición del aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) utilizado como materia prima en la Industria Farmacéutica de Guatemala.
- d. Aplicar los conocimientos sobre validación de métodos analíticos; y garantizar la confiabilidad, especificidad y selectividad de la metodología desarrollada.

## B. Población

La población a estudiar es el aceite esencial de Romero (*Rosmarinus officinalis*) del Municipio de Cunén, Departamento de Quiché, Guatemala en muestra extraída de lo recolectado en agosto del 2010.

## C. Muestra

La muestra son 10 mL de aceite esencial de Romero (*Rosmarinus officinalis*) extraído por el método de hidrodestilación por arrastre de vapor de las hojas y el tallo de la planta.

## D. Procedimientos o instrumentos

Se desarrolló la metodología en 4 fases:

- *Fase 1:* Identificación de los constituyentes,  $\alpha$ -pineno, alcanfor y 1,8-cineol, los cuales son los mayoritarios que están presentes en el aceite esencial de Romero por medio de la técnica de Cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas.
  - Se inyectó en triplicado la muestra para la identificación de los 3 constituyentes.
- *Fase 2:* Cuantificación de los constituyentes mayoritarios,  $\alpha$ -pineno, alcanfor y 1,8-cineol, presentes en el aceite esencial de Romero, con base en 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. Los estándares se prepararon de la siguiente manera:
  - Se preparó una solución madre de 50mL con los tres constituyentes a estudiar con las siguientes concentraciones:

Cuadro No.7: Concentración de los constituyentes a estudiar en la solución madre.

Cineol (mg/ml)	Pineno (mg/ml)	Alcanfor (mg/ml)
73.76	257.4	15.01

Para llegar a estas concentraciones, se tomó 15mL del estándar de  $\alpha$ -pineno, 4mL de 1,8-cineol y se pesó 0.7506g de alcanfor, todos aforados con etanol en un balón de 50 ml.

También se preparó una solución de estándar interno, en este caso butanol, con una concentración de 0.1 v/v.

- Seguidamente se extrajo una alícuota de la solución madre y se aforó con etanol en un balón de 10ml y se agregó un 1 ml de estándar interno (Butanol), para los 5 estándares como se describe a continuación:

Cuadro No. 8: Preparación de los estándares para la curva de calibración.

Estándar	Alícuota (ml)	Cineol (mg/ml)	Pineno (mg/ml)	Alcanfor (mg/ml)
1	0.5	3.688	12.87	0.7505
2	1	7.376	25.74	1.501
3	2	14.752	51.48	3.002
4	3	22.128	77.22	4.503
5	4	29.504	102.96	6.004

Se trabajó en triplicado para la obtención de la curva de calibración para cada uno de los componentes.

- *Fase 3: Validación del método de cuantificación.*

Se utilizó un Cromatógrafo Agilent 6850 network GC system con un detector de triple eje de espectrometría de masas Agilent 5975C VLMSD.

Se trabajó con base a las siguientes condiciones:

- Horno
  - Temperatura inicial: 50°C
  - Rampas

Cuadro No. 9: Parámetros de rampas del horno del cromatógrafo.

No. Rampa	Velocidad (ac/min)	Temperatura final (°C)	Tiempo final (min.)
1	3.00	150	0.00
2	10.00	250	5.00

- Inyector
  - Modo: Split
  - Temperatura: 250°C
  - Tipo de gas: Helio
- Columna
  - Columna capilar Hp-5MS (5% Phenyl Methyl Siloxane)
  - Características: longitud 30m; diámetro de 0.25mm; grosor del film 0.25µm.
  - Flujo inicial: 0.5 mL/min.
- Interfase
  - Temperatura 280°C

Los parámetros que se evaluaron para la validación del método fueron:

- Selectividad/especificidad: se inyectó tres veces la muestra para obtener los cromatograma e identificar los constituyentes a estudiar.
- Exactitud: se realizó cinco inyecciones de tres estándares para cada muestra, los estándares escogidos fueron: 1, 3, 5. Los cuales representan la concentración más baja, la mediana y la más

alta. El valor de la exactitud se obtuvo por medio del recobro, con un criterio de aceptación de 90-110% de recuperación. (ICH, 1995)

- Precisión: se trabajó por medio de la repetibilidad, inyectando cinco veces tres estándares para cada muestra, los estándares escogidos fueron: 1, 3, 5. El valor de la precisión se obtuvo por medio de la desviación estándar relativa (RSD%). Con un criterio de aceptación de  $RSD\% \leq 5\%$  con un margen de error de  $\pm 1\%$  debido a los errores sistemáticos que pueden afectar a la precisión. (Bloom, 2006)
- Linealidad: se trabajó en triplicado para cada estándar y se obtuvo un promedio de cada uno y conforme a esto se realizó la curva de calibración para cada constituyente. Se trabajó con un criterio de aceptación de  $R^2 \geq 0.990$ . (Huber, 2010) (ICH, 1995)
- Rango: se calculó por medio de la curva de la regresión lineal, el cual debe estar en 80-120% de las concentraciones. (ICH, 1995) (US Pharmacopeia, 2010)
- *Fase 4:* Cuantificación de los constituyentes en una muestra del aceite esencial de romero.
  - Se preparó una muestra de 1 ml de aceite esencial de romero y se agregó 1 ml de estándar interno, esta mezcla se aforó con etanol en un balón de 10ml.
  - Se trabajó en triplicado y se obtuvo la concentración de cada constituyente por medio de las curvas de calibración.

## E. Diseño de investigación

Se llevó a cabo un análisis cualitativo al identificar los constituyentes de los aceites esenciales por medio de un cromatógrafo de gases con detector de espectrometría de masas, estos aceites fueron extraídos por el método de hidrodestilación con arrastre vapor y se cuantificará los componentes mayoritarios,  $\alpha$ -pineno, alcanfor y 1,8-cineol. Se realizó la validación del método de cuantificación y se presentó los resultados por medio de estadística descriptiva.

## F. Análisis estadístico

- Microsoft Excel: se utilizó para obtener la regresión lineal de la curva de calibración para cada constituyente:  $\alpha$ -pineno, 1,8-cineol y alcanfor, para su cuantificación. También se utilizó para obtener la desviación estándar, desviación estándar relativa, promedio de cada uno de los parámetros del método de validación.
- Software ChemStation®: proporcionó la información de los picos obtenidos del cromatograma.

## V. MARCO OPERATIVO

### A. Recabación y tratamiento de datos

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

ChemStation® ofrece los procedimientos de cálculo siguientes para determinar la concentración de cada componente presente en una mezcla (Agilent, 2009):

- Porcentaje relativo
- Normalización
- Estándar externo o ESTD (External Standard)
- % de ESTD
- Estándar interno o ISTD (Internal Standard)
- % de ISTD

Los cálculos utilizados para determinar la concentración de un compuesto en una muestra desconocida se basan en la curva de regresión. Cada procedimiento de cálculo utiliza el área o la altura de pico e identifica los picos obtenidos por medio del tiempo de retención de estos y los compara con su base de datos. (Agilent, 2009)

### B. Recursos

#### 1. Humanos

- Autora: Lilia Sofía Guerrero López
- Asesora: Licda. Ana Luisa Mendizábal
- Colaboradores:
  - Director del Departamento de Farmacia: Lic. Élfego Rolando López
  - Maestro destilador de Bosque Los Cimientos, S.A.: Emilio Manjón.

#### 2. Documentos

Libros científicos, tesis de la Universidad de San Carlos de Guatemala, artículos científicos, páginas de internet, base de datos de espectros.

#### 3. Materiales

##### a. *Materiales y suministros*

- Aceite esencial puro 10 mL.
- Reactivos y estándares:

- $\alpha$ -pineno
- 1,8-cineol
- Alcanfor
- Alcohol absoluto
- Hexano
- Éter
- Helio
- Hojas
- Tinta
- Fotocopias

*b. Mobiliario y equipo*

- Cromatógrafo de gases Agilent 6850 Network GC System con detector de triple eje de espectrometría de masas Agilent 5975C VLMSD.
- Computadoras
- Cristalería e instrumentos de laboratorio
- Laboratorio de Análisis Instrumental Avanzado de la Universidad del Valle de Guatemala.
- Impresora
- Fotocopiadora

C. Aspectos económicos

1. Presupuesto

Cuadro No. 10: Presupuesto detallado de los recursos a utilizar.

RUBRO
Servicios no personales
Impresión, encuadernación y reproducción
Materiales y suministros
Alcanfor
1,8-cineol
$\alpha$ -pineno
Etanol
Butanol
Luz, agua y usos de instalaciones
Equipo
Columna HP-5
Gas Helio
Mantenimiento por 1 mes del cromatógrafo GC/MS
Depreciación: 1 mes uso del cromatógrafo GC/MS

## VI. RESULTADOS

### A. Identificación

Cuadro No. 11: Identificación de los constituyentes mayoritarios en el aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*).

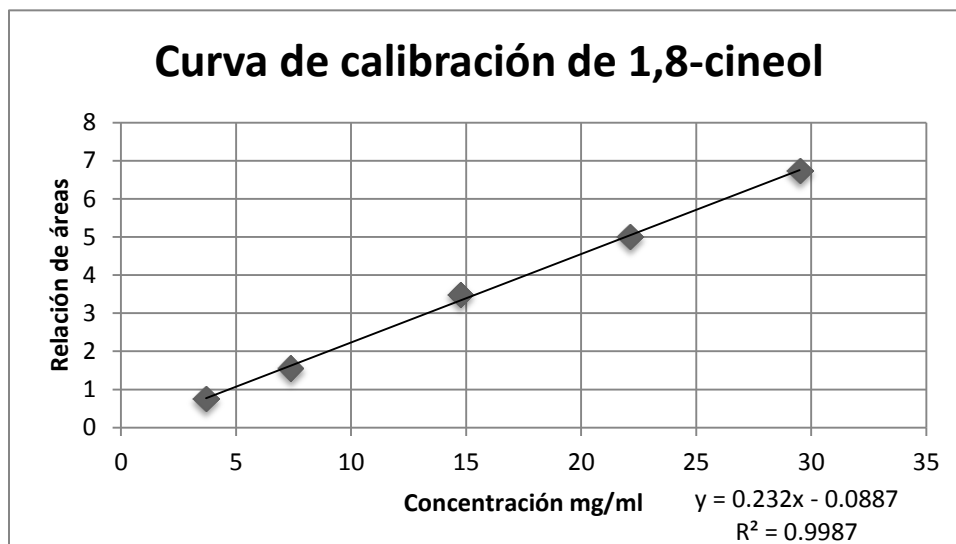
Componente	Tiempo de retención	% de concentración
1,8-cineol	14.827	26.990%
$\alpha$ -pineno	10.137	43.123%
Alcanfor	20.248	1.640%

### B. Curva de calibración

Cuadro No. 12: Datos de regresión lineal de 1,8-cineol.

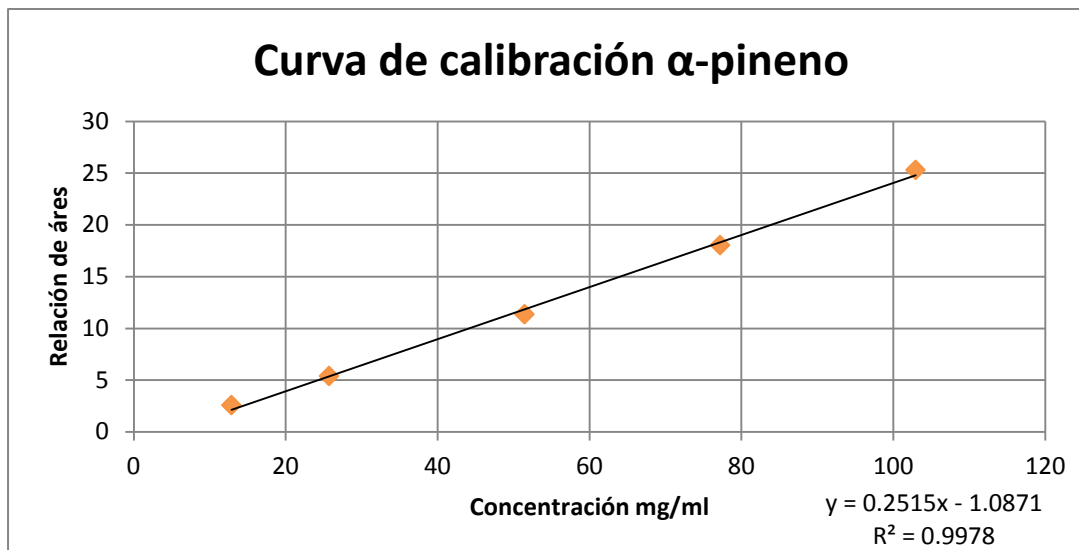
Parámetro	Coefficientes
Intercepción	-0.08872
Concentración	0.23205
R <sup>2</sup>	0.99873

Gráfico No. 1: Curva de calibración de 1,8-cineol.



Cuadro No. 13: Datos de regresión lineal de  $\alpha$ -pineno.

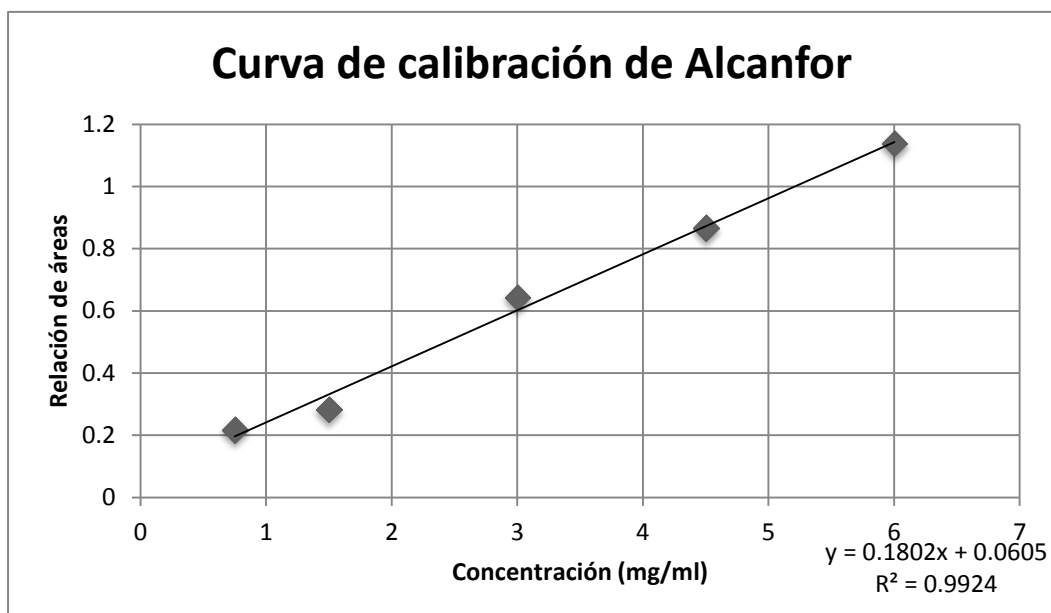
Parámetro	Coefficientes
Intercepción	-1.08707
Concentración	0.25147
R <sup>2</sup>	0.99782

Gráfico No. 2: Curva de calibración de  $\alpha$ -pineno.

Cuadro No. 14: Datos de regresión lineal de alcanfor.

Parámetro	Coefficientes
Intercepción	0.06055
Concentración	0.18023
$R^2$	0.99238

Gráfico No. 3: Curva de calibración de alcanfor.



### C. Parámetros de validación

Cuadro No. 15: Resultados de selectividad y especificidad.

Se realizó por medio de la comparación de las corridas de la muestra con la biblioteca que proporciona el software del equipo. (Ver anexos, sección D; Resultados, sección A)

Cuadro No. 16: Resultados de exactitud del método para los constituyentes.

Componente	% Recobro (90-110%)
$\alpha$ -pineno	104.06
1,8-cineol	100.47
Alcanfor	106.25

Cuadro No. 17: Resultados de precisión

Componente	% RSD $\leq 5\%$
$\alpha$ -pineno	2.34
1,8-cineol	3.15
Alcanfor	5.97

Cuadro No. 18: Resultados de linealidad.

Componente	Ecuación	R <sup>2</sup>
$\alpha$ -pineno	$y = 0.2515x - 1.0871$	0.9978
1,8-cineol	$y = 0.232x - 0.0887$	0.9987
Alcanfor	$y = 0.1802x + 0.0605$	0.9924

Cuadro No. 19: Resultados de rango.

Componente	Rango teórico	Rango experimental
$\alpha$ -pineno	10.296-123.552	11.747-124.970
1,8-cineol	2.9504-35.4048	2.9027-35.4758
Alcanfor	0.6004-7.2048	0.6889-7.2558

#### D. Cuantificación de los componentes en la muestra.

Cuadro No. 20: Concentración de los constituyentes en la muestra de aceite esencial de romero.

Componente	Concentración (mg/ml)	Desviación estándar
$\alpha$ -pineno	34.23	1.5162
1,8-cineol	20.02	0.5065
Alcanfor	1.14	0.0904

## VII. DISCUSIÓN

La demanda para el desarrollo de una metodología analítica para la cuantificación de los constituyentes en aceites esenciales aumenta continuamente, debido a la necesidad de controlar y verificar la calidad, seguridad y bioactividad de los productos naturales. Por lo que también aumenta la necesidad de validar los métodos para obtener resultados selectivos, precisos y exactos.

El objetivo de este trabajo de tesis fue proponer y validar un método de identificación y cuantificación para los constituyentes  $\alpha$ -pineno, 1,8-cineol y alcanfor presentes en el aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) por medio de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (CG/MS).

Previo a la determinación de la metodología propuesta en este trabajo se desarrolló varias pruebas con los estándares de los constituyentes (Ver anexos, sección E), para concluir cuál tenía la menor variación en los resultados. Se consideró el uso de un estándar interno, ya que éste disminuye los errores y elimina las fluctuaciones instrumentales. Esto se debe a que ambos, tanto el analito como el estándar interno, experimentan las mismas variaciones.

Por lo tanto, se añadió una concentración conocida del estándar interno, en este caso 1-butanol al 0.1%, a las soluciones estándar y a la muestra, con la cual se obtuvo una relación entre las áreas de los estándares y del butanol, y se presentó contra las concentraciones reales de los estándares en la curva de calibración. Se pudo observar que la curva de calibración sin el estándar interno presentaba menor correlación entre los datos que la curva con el estándar interno concluyendo así el uso necesario del butanol para llevar a cabo la metodología.

Para identificar los constituyentes  $\alpha$ -pineno, 1,8-cineol y alcanfor, se realizó una corrida en triplicado de la muestra del aceite esencial puro para detectar los tiempos de retención de cada compuesto, como se puede observar en el Cuadro No. 11. Los tiempos de retención se identificaron por medio de la comparación con la base de datos del sistema ChemStation®, logrando así la localización de los tres componentes.

Con base en esto, también se determinó la selectividad del método el cual se realizó por medio de un “match” entre los cromatogramas obtenidos de la muestra y de los estándares, comprobando de forma efectiva la ubicación del pico de cada compuesto.

Seguidamente, se realizó la curva de calibración para cada constituyente obteniendo los siguientes resultados: para  $\alpha$ -pineno se obtuvo la ecuación de la recta  $y = 0.2515x - 1.0871$  con un  $R^2=0.9978$ ; para 1,8-cineol es de  $y = 0.232x - 0.0887$  con un  $R^2= 0.9987$ ; para alcanfor es de  $y = 0.1802x + 0.0605$  con un  $R^2=0.9924$ ; con lo cual se puede decir que hay una relación estrecha entre los datos obtenidos de cada componente, ya que el  $R^2$  es mayor a 0.99, además se acepta para el parámetro de linealidad debido a que el  $R^2$  está por arriba del criterio de aceptación para la validación.

Con base en la curva de calibración, se procedió a obtener los distintos parámetros de validación, los cuales se definieron por medio de la categoría del análisis. En este caso la metodología desarrollada aplica en la Categoría 1, ya que es un procedimiento de cuantificación de constituyentes mayoritarios; por lo tanto los parámetros a evaluar son los siguientes: exactitud, precisión, selectividad/especificidad, linealidad y rango. (US Pharmacopeia, 2010) (ICH, 1995) (Huber, 2010)

Como se mencionó anteriormente la linealidad esta validada por el criterio de aceptación. Seguidamente se obtuvo los resultados de exactitud, los cuales se obtuvieron por medio de la evaluación de tres estándares de cada constituyente a diferente concentración.

Se llevaron a cabo cinco inyecciones de cada constituyente y se procedió a obtener el porcentaje de recuperación (recobro), el cual tiene un criterio de aceptación de 90-110% según la ICH Q2A. Se obtuvo un porcentaje de recuperación para el  $\alpha$ -pineno de 104.06%; para 1,8-cineol de 100.47% y para alcanfor de 106.25%; concluyendo así que los tres constituyentes cumplen con el criterio de aceptación de la exactitud para la validación del método.

Se prosiguió a evaluar el parámetro de precisión el cual se realizó por medio de la repetibilidad. Este dato se obtuvo por medio de la inyección de cinco veces el estándar 1, 3 y 5; con las cuales se calculó un promedio y la desviación estándar relativa para cada constituyente. Los resultados para el  $\alpha$ -pineno fue de 2.34%; para 1,8-cineol de 3.15% y para alcanfor de 5.97%. Por lo tanto se puede concluir que el método es preciso y repetible para los tres constituyentes, ya que cumplen con el criterio de aceptación.

Sin embargo, el alcanfor tiene una variación del 0.97% del criterio establecido, pero se acepta debido al margen de error establecido en la metodología de  $\pm 1\%$ . El cual se estableció debido a que la precisión puede ser afectada por errores sistemáticos; así como también por la naturaleza y complejidad de la muestra. También es importante mencionar que, conforme mayor es la concentración del estándar, el RSD% aumenta, por lo que es esencial tomarlo en cuenta para un futuro. Al igual que el cálculo de

incertidumbre, ya que este es parte de la variación de los resultados, y es un requisito para la validación y cálculos analíticos según el sistema de calidad ISO 17025 y el Informe 44 de la OMS de Buenas prácticas de manufactura.

Por último, se obtuvo el rango en base al 80-120% de la concentración esperada del analito, como se puede observar en el Cuadro No. 19, cumpliendo así con el criterio de aceptación para este parámetro.

Además se realizó la cuantificación de los constituyentes en una muestra de aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) al 0.1% con 1 ml del estándar interno 1-butanol. La muestra se trabajó en triplicado, obteniendo las siguientes concentraciones para cada constituyente:  $\alpha$ -pineno fue de 34.23mg/ml con una desviación estándar de  $\pm 1.5162$ ; para 1,8-cineol de 20.02mg/ml con una desviación estándar de  $\pm 0.5065$ ; y para alcanfor de 1.14mg/ml con una desviación estándar de  $\pm 0.0904$ . Como se puede observar en el Cuadro No. 20, las concentraciones están dentro del rango establecido de la linealidad de cada constituyente.

Por lo tanto el método es lineal, preciso, exacto y selectivo para la cuantificación e identificación de los constituyentes mayoritarios  $\alpha$ -pineno, 1,8-cineol y alcanfor para el aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis* L.).

Este método es una base, el cual debe verificarse sus parámetros de validación utilizando diferentes concentraciones de estándar y diferentes muestras; así como también un mayor número de inyecciones para tener una mejor desviación de los resultados y garantizar así la robustez del método para la cuantificación de los componentes mayoritarios de un aceite esencial.

## VIII. CONCLUSIONES

1. El método desarrollado es selectivo para la identificación de los constituyentes mayoritarios  $\alpha$ -pineno, 1,8-cineol, alcanfor utilizando el GC/MS.
2. La utilización de un estándar interno mejora la variación de los resultados, ya que éste las elimina durante el desarrollo del método.
3. El método es lineal, exacto, preciso para los tres constituyentes del aceite esencial de romero, cumpliendo con el criterio de aceptación establecido para la validación de la metodología.
4. La precisión de alcanfor es aceptable, ya que se estableció un margen de error de  $\pm 1\%$  debido al efecto del error sistemático que se puede presentarse en el desarrollo del método.
5. Las concentraciones encontradas para cada constituyente están dentro del rango establecido para la cuantificación.

## IX. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar la aptitud del sistema con el objetivo de reducir las variaciones a las que puede ser susceptible el método; además de la robustez para comprobar que el método es reproducible.
2. Tomar en cuenta el factor tiempo para desarrollar una metodología con aceite esencial, ya que por ser una mezcla compleja y susceptible a cambios es necesaria la realización de cinco o más inyecciones para lograr una mejor desviación de los resultados.
3. Reducir las concentraciones de los estándares más concentrados, ya que esto puede ayudar a disminuir el RSD% de los resultados de precisión.
4. Realizar el ajuste de la incertidumbre, ya que esta puede afectar los resultados finales; además de ser un requisito para el sistema de calidad ISO 17025 y parte del anexo 44 de las Buenas Prácticas de Manufactura.
5. Comparar el método de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas contra el detector FID, para determinar cual tiene mayor reproducibilidad.

## X. BIBLIOGRAFÍA

1. Agilent, T. (2009). *Familiarización con ChemStation*. Alemania: Agilent Technologies.
2. AIST, N. I. (2007). *Spectral Database for Organic Compounds SDBS*. Recuperado el 20 de mayo de 2011, de SDBS Compounds and Spectral Search: [http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct\\_frame\\_top.cgi](http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi)
3. Al-Sereitia, M. R., Abu-Amerb, K. M., & Sena, P. (Febrero de 1999). Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. *Indian Journal of Experimental Biology*, 37, 124-131.
4. Arango, M. C. (2006). *Plantas medicinales: botánica de interés médico*. Colombia.
5. Atti-Santos, A., & al., e. (2005). Physicoquimical evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil. *Brazilian Archives of Biology and Technology. An Internacional Journal*(48), 1035-1039.
6. Beyer, H., Barluenga, J., & Walter, W. (2000). *Manual de Química Orgánica*. España: Reverte.
7. Bloom, D. J. (2006). *Desarrollo y Validación de Metodología Analítica*. Puerto Rico: Universidad de Puerto Rico.
8. Boutekedjiret, C., Bentahar, F., Belabbes, R., & Bessiere, J. M. (2003). Extraction of rosemary essential oil by steam distillation and hydrodistillation. *Flavour and Fragrance Journal*(18), 481-484.
9. Cáceres, A. (1996). *Plantas de Uso Medicinal en Guatemala*. Guatemala: Universidad San Carlos de Guatemala.
10. Cáceres, A. (2006). *Vademécum Nacional de Plantas Medicinales*. Guatemala: Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social; Universidad de San Carlos de Guatemala.
11. Castillo, E., & Martínez, I. (2007). *Manual de Fitoterapia*. España: Elsevier.
12. Chamorro, L. e. (2009). *Destilación por arrastre de vapor*. España: UVA, Ingeniería Química.
13. Checira, G., & Lozano, Z. (1992). Estudio de la composición química de los aceites esenciales extraídos de las plantas medicinales (Lepechina, mejorana, romero y salvia). Facultad de Ciencias. Universidad Industrial de Santander.
14. Corporation, L. (2008). Advances in Essential Oils Analysis Using Comprehensive Two-Dimensional GC and Time-of-Flight Mass Spectrometer (GCxGC-TOFMS) Detection. *LECO Corporation*, 1-4.
15. Corral, A. (2006). *Fundamentos y Funciones de la Espectrometría de Masas*. Valencia, España: Universidad de Valencia.

16. Cortés, R. (2009). *Validación de métodos de medición*. México: Entidad Mexicana de Acreditación, A.C.
17. Cunningham, S. (1999). *Enciclopedia de las Hierbas Mágicas*. St. Paul, Minnesota, USA: Llewellyn Español.
18. Dan, C. (25 de Noviembre de 2010). *Historias alternativas: La historia de los aceites esenciales*. Recuperado el 16 de abril de 2011, de Otra medicina.com: <http://www.otramedicina.com/2010/11/25/historias-alternativas-la-historia-de-los-aceites-esenciales>
19. Devetak. (1977). *Production of the essential oil of rosemary on the island of Hvar*. Zagreb: Zbornik Simpozija Hvar u Prirodnim Znanostima.
20. Duke, J. A. (2001). *Handbook of Medicinal Herbs*. Estados Unidos: Universidad de California.
21. Elías, V. (2009). *The Effects of Rosemary Essential Oil*. Recuperado el 28 de julio de 2011, de eHOW.com: [http://www.ehow.com/about\\_5065858\\_effects-rosemary-essential-oil.html](http://www.ehow.com/about_5065858_effects-rosemary-essential-oil.html)
22. EP, E. P. (2005). *Monograph 1560: Rosemary oil*. European Pharmacopoeia.
23. Essential Depot, I. (4 de Enero de 2010). *Aceites Esenciales y Aromaterapia: Una visión histórica*. Recuperado el 16 de abril de 2011, de Oil and Herbs.com: [http://essential-oil.com/es/history-of-essential-oils\\_essential-oils-and-aromatherapy-a-historic-overview\\_531.html](http://essential-oil.com/es/history-of-essential-oils_essential-oils-and-aromatherapy-a-historic-overview_531.html)
24. Flamini, G., & al., e. (2002). Main agronomic-productive characteristics of two ecotypes of *Rosmarinus officinalis* L. and chemical composition of their essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*(50), 3512-3517.
25. Gennaro, A. (2003). *Remington Farmacia* (20 ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.
26. Güenther, P. E. (2007). *The Essential Oils: : Individual Essential Oils of the Plant Families* (Vol. 2). Estados Unidos: D. Van Nostrand Company, Inc.
27. Güenther, P. E. (2007). *The Essential Oils: History-Origin in Plants, Production and Analysis* (Vol. 1). Estados Unidos: D. Van Nostrand Company, Inc.
28. Gutiérrez, M., & Droguet, M. (2002). La Cromatografía de Gases y la Espectrometría de Masas: Identificación de Compuestos causantes de mal olor. *Boletín INTEXTER (U.P.C.)*(122), 35-41.
29. Haloui, M., Louedec, L., Michel, J., & al., e. (2000). Experimental diuretic effects of *Rosmarinus officinalis* and *Centaureum erythraea*. *Journal Ethnopharmacol*(71), 465-472.
30. Hearn, G. (1992). *A Guide to Validatin in HPLC*. Estados Unidos: Perkin Elmer.
31. Herrmann, A. (2011). *The Chemistry and Biology of Volatiles*. Switzerland: John Wiley & Sons.
32. Hethelyi, E., Kaposi, P., Domonkos, J., & and Kernoczi, Z. (1987). GC/MS investigation of the essential oils *Rosmarinus officinalis* L. *Acta Pharmaceutica Hungarica*(57), 159-169.
33. Huber, D. L. (2010). *Validation of Analytical Methods*. Alemania: Agilent Technologies .

34. Hüsni, K., & Buchbauer, G. (2010). Handbook of Essential Oil: Science, Technology and Applications. Estados Unidos: CRC Press.
35. ICH, Q. (1995). Text on Validation of Analytical Procedures. ICH.
36. Jamshidi, R., Afzali, Z., & Afzali, D. (2009). Chemical Composition of Hydrodistillation Essential Oil of Rosemary in Different Origins in Iran and Comparison with Other Countries. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 5(1), 78-81.
37. Katzung, M. P. (2009). *Farmacología Básica y Clínica* (11va ed.). México: McGraw Hill.
38. Manjón, E. (2010). Monografía del Aceite Esencial de Romero (*Rosmarinus officinalis*). Guatemala: Bosque Los Cimientos, S.A.
39. Martín, D. A. (2009). *Diccionario Médico*. España: PortalesMedicos; S.L.
40. Martín-Aragón, S., & Benedí, J. (2004). Farmacoterapia mucolítico-expectorante. *Farmacia Profesional*, 44-49.
41. Martínez, D. I. (2000). Quimiopreención del cáncer. *Revista Cubana de Oncología*, 67.
42. Mateus, E., Lopes, C., Nogueira, T., & Lourenco, J. a. (2006). Pilot Steam Distillation of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) from Portugal. *Silva Lusitana*, 2(14), 203-217.
43. McMurry, J. (2008). *Química Orgánica* (7 ed.). Estados Unidos: Cengage Learning.
44. Merriam-Webster. (2011). © 2011 Merriam-Webster, Incorporated. Recuperado el 26 de septiembre de 2011, de © 2011 Merriam-Webster: <http://www.merriam-webster.com/medical/tumorigenesis>
45. NYULMC, N. L. (2011). *Romero: Rosmarinus officinalis*. Estados Unidos: NYU.
46. Ortiz, C. (1995). Tesis: Efecto inhibitorio de la infusión del Romero (*Rosmarinus officinalis*), sobre el crecimiento de microorganismos cariogénicos, *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus mutans* in vitro. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.
47. OSMAN, O. d. (1997). *Diccionario de Definiciones*. España: OMS.
48. Paz, M. (2009). *Uso Industrial de Plantas Aromáticas y Medicinales*. España: Universidad Politécnica de Madrid.
49. Pintore, G., & et.al. (2002). Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*, 17(1), 15-19.
50. Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., & Ignacimuthu, S. (30 de noviembre de 2006). In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6(39), 1-8.
51. Rivera, D. (2008). Caracterización de aceites esenciales por Cromatografía de Gases de tres especies del género Piper y la evaluación de la actividad citotóxica. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala: USAC.

52. RUMC, R. U. (6 de marzo de 2011). © *Rush University Medical Center, Chicago, Illinois*. Recuperado el 26 de septiembre de 2011, de © Rush University Medical Center, Chicago, Illinois: <http://www.rush.edu/spanish/speds/derm/glossary.html#I>
53. Saldaña, D., & al, e. (2010). *Plantas Tóxicas de Guatemala* (1 ed.). Santo Domingo de Heredia, Costa Rica: INBio.
54. Sánchez, F. (2006). *Extracción De Aceites Esenciales*. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
55. Skoog, D., & al, e. (2005). *Fundamentos de Química Analítica* (Octava ed.). México: Thomson.
56. Skoog, D., Holler, J., & Crouch, S. (2008). *Principios de Análisis Instrumental* (Sexta ed.). México: Cengage Learning.
57. Skrubis, G. (1972). Seven wild aromatic plants growing in Greece and their. Flavour Industry.
58. Socaci, S. A., Tofană, M., & Socaciu, C. (2008). GC-MS ANALYSIS OF ROSEMARY ESSENTIAL OIL. *Bulletin UASVM, Agriculture*, 65(2), 405-409.
59. Soliman, F., & al., e. (1994). Analysis and biological activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. from Egypt. *Flavour and Fragrance Journal*(9), 29-33.
60. Teitel, M. A. (28 de junio de 2011). *MedlinePlus*. Recuperado el 26 de septiembre de 2011, de Gota: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000422.htm>
61. Tschiggerl, C., & Bucar, F. (2010). Investigation of the Volatile Fraction of Rosemary Infusion Extracts. *Scientia Pharmaceutica*, 78, 483-492.
62. US Pharmacopeia, 3. (2010). *Chapter <1225> Validation of Compendial Methods*. United States: Pharmacopeial Convention.
63. Wagner, H., Bladt, S., & Rickl, V. (2009). *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. Alemania: Springer.
64. Yesil Celiktas, O., & al., e. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*(100), 553-559.

## XI. ANEXOS

### A. Glosario

1. Adsorción: proceso por el cual átomos, iones o moléculas son atrapadas o retenidas en la superficie de un material, en contraposición a la absorción, que es un fenómeno de volumen. (Skoog & al, 2005)
2. Aductos carcinogénicos: complejo que se forma cuando un compuesto químico se une a una molécula biológica, como ADN o proteínas, al exponerse a componentes carcinogénicos. (Al-Sereitia, Abu-Amerb, & Sena, 1999)
3. Alcoholato: medicamento resultante de la destilación del alcohol sobre una o varias sustancias aromáticas. (Cáceres, 2006)
4. Amorfos: polímero que no tiene estructura definida.
5. Analgésico: medicamentos que tienen la capacidad de disminuir o eliminar el dolor. (Katzung, 2009)
6. Analito: especie o especies de una muestra que van a ser objeto de un análisis químico. (Skoog & al, 2005)
7. Antagonista: sustancia, natural o sintética, que se une a los receptores del organismo en cuestión, bloqueándolos contra la acción de los agonistas y no produce ningún efecto sobre el cuerpo. (Katzung, 2009)
8. Antidepresivo: fármaco que eleva el tono del ánimo; se usa para combatir la depresión. (Katzung, 2009)
9. Antimicótico: fármaco que impide el crecimiento de hongos. (Katzung, 2009)
10. Antimicrobiano: sustancia química que, a bajas concentraciones, actúa contra los microorganismos, destruyéndolos o inhibiendo su crecimiento. (Katzung, 2009)
11. Antioxidante: sustancia que inhibe directa o indirectamente las oxidaciones causadas por el oxígeno. (Cáceres, 2006)
12. Antitumoral: sustancias que contrarrestan o previenen la formación de tumores malignos. (Cáceres, 2006)
13. Aromaterapia: parte de la fitoterapia que utiliza los aceites esenciales de las plantas de forma terapéutica. (Dan, 2010)
14. Astringente: sustancia con capacidad de favorecer la contracción de los tejidos y reducir las secreciones. (Cáceres, 2006)
15. Coeficiente de difusión: valor que representa la facilidad con que cada soluto en particular se mueve en un disolvente determinado. Depende del tamaño y forma del soluto, viscosidad del solvente y la temperatura. (Skoog & al, 2005)
16. Colagoga: agente que estimula y aumenta la secreción de bilis. (Cáceres, 2006)
17. Conductividad térmica: propiedad física de cualquier material que mide la capacidad de conducción del calor a través del mismo. (Skoog & al, 2005)

18. Cromatografía: método físico de separación para la caracterización de mezclas complejas, la cual está basada en el principio de retención selectiva, cuyo objetivo es separar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificar y determinar las cantidades de dichos componentes. (Skoog & al, 2005)
19. Cromatograma: registro gráfico producido por un método de cromatografía. (Skoog & al, 2005)
20. Analizador de cuadrupolo: consiste en cuatro rodillos paralelos a los que se aplica una corriente continua (DC) sobre la que se superpone un potencial de radiofrecuencia (RF). (Skoog & al, 2005)
21. Dermatitis: proceso inflamatorio de la piel, hay diferentes tipos, entre los principales se encuentra: por contacto, atópica, seborreica, estasis y numular. (Cáceres, 2006)
22. Desarrollo fenológico: desarrollo que responde a estímulos ambientales que les permite controlar el momento de la floración de manera que su etapa reproductiva ocurra en una estación determinada. (Cáceres, 2006)
23. Desodorizado: procesos que eliminan de una corriente gaseosa los compuestos que provocan los malos olores. (Cáceres, 2006)
24. Destilación: operación de separar, mediante evaporización y condensación, los diferentes componentes líquidos, sólidos disueltos en líquidos o gases licuados de una mezcla, aprovechando los diferentes puntos de ebullición de cada una de las sustancias. (Chamorro, 2009)
25. Dispepsia: cualquier dolor o molestia localizada en la parte central del abdomen superior y que puede estar asociado a una sensación de plenitud, saciedad precoz, distensión, eructos, náuseas y vómitos. (Cáceres, 2006)
26. Electrón: partícula subatómica que se reconoce por el símbolo  $e^-$  que tiene como principal función la atracción entre átomos. (Skoog & al, 2005)
27. Elución: proceso en el cual los solutos son arrastrados a través de una fase estacionaria por el movimiento de una fase móvil. (Skoog & al, 2005)
28. Eluyente: fase móvil que se emplea en cromatografía para transportar solutos a través de una fase estacionaria. (Skoog & al, 2005)
29. Embriotóxico: cualquier sustancia dañina para un embrión en cualquier sentido. (OSMAN, 1997)
30. Emenagogo: sustancias que promueven el flujo menstrual y tiene efecto en el sistema reproductor femenino. (Martín, 2009)
31. Errores aleatorios: son errores imprevistos cuya magnitud y signo no pueden predecirse ni calcularse. Se producen por efecto de variables que no se pueden controlar como por ejemplo: pequeños cambios en la temperatura, humedad, corrientes de aire al pesar, etc. (Skoog & al, 2005)
32. Errores sistemáticos: son errores que pueden determinarse, y probablemente, corregirse; entre ellos se puede mencionar: error instrumental, mala calibración del equipo, etc. (Skoog & al, 2005)
33. Espectro: gráficos de intensidad de absorbancia, transmitancia o emisión en función de longitud de onda, frecuencia o número de onda. (Skoog & al, 2005)
34. Espectrometría de masas: método que se basa en formar iones en la fase gaseosa y separarlos según la proporción entre masa y carga. (Skoog & al, 2005)

35. Exfoliante: sustancia que tiene la capacidad de remover las células muertas de la piel más superficiales. (Cáceres, 2006)
36. Farmacología: estudio de las sustancias que interactúan con los sistemas vivos a través de procesos bioquímicos, sobre todo mediante la unión con las moléculas reguladoras y activadoras o por la inhibición de procesos corporales normales. (Katzung, 2009)
37. Fotones: paquetes de energía de la radiación electromagnética. (Skoog & al, 2005)
38. Enfermedad de gota: tipo de artritis provocado por la acumulación de ácido úrico en la sangre causando inflamación articular. (Teitel, 2011)
39. Hepatoprotectores: sustancias que protegen al hígado. (Cáceres, 2006)
40. Hidrocarburos: compuestos orgánicos formados únicamente por carbono e hidrógeno. (McMurry, 2008)
41. Infusión: operación de verter agua hirviendo sobre sustancias vegetales y dejar reposar para obtener sus principios activos. (Cáceres, 2006)
42. Inmuno-comprometidos: condición anormal en la cual la capacidad del organismo para combatir infecciones se encuentra reducida. (RUMC, 2011)
43. Energía de ionización: cantidad de mínima de energía necesaria para expulsar un electrón de la envoltura electrónica de los mismos. (McMurry, 2008)
44. Isomerización: proceso químico mediante el cual una molécula es transformada en otra que posee los mismos átomos pero dispuestos de forma distinta. (McMurry, 2008)
45. Isótopos: elementos químicos similares a uno dado pero con un número diferente de protones o neutrones en el núcleo. (McMurry, 2008)
46. Liofilizado: proceso para deshidratar mediante temperaturas muy bajas productos o elementos orgánicos para conservarlos por más tiempo. (McMurry, 2008)
47. Liposolubles: sustancias que son solubles en aceites, ceras o grasas. (McMurry, 2008)
48. Macerar: operación de someter 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. (Cáceres, 2006)
49. Mucolítico: sustancias que tienen la capacidad de destruir las distintas estructuras quimiofísicas de la secreción bronquial anormal, consiguiendo una disminución de la viscosidad y, de esta forma, una más fácil y pronta eliminación. (Martín-Aragón & Benedí, 2004)
50. Nefritis: amplio grupo de enfermedades renales caracterizada por inflamación y alteración de la función renal. (Cáceres, 2006)
51. Neuralgia: dolor provocado por la presión sobre un nervio o por una alteración funcional. (RUMC, 2011)
52. Parálisis: pérdida o disminución de la motricidad, o de la contractilidad de uno o varios músculos, debido a lesiones de las vías nerviosas o de los mismos músculos. (RUMC, 2011)
53. Perenne: que perdura más de dos años, generalmente floreciendo cada año. (Cáceres, 2006)
54. Pirolisis: descomposición térmica de un material en ausencia de oxígeno o cualquier otro reactante. (McMurry, 2008)

55. Quimioluminiscencia: emisión de energía en forma de radiación electromagnética que se lleva a cabo durante una reacción química. (Skoog & al, 2005)
56. Quimiopreventivos: sustancias químicas, naturales o sintéticas con vistas a impedir o revertir la carcinogénesis evitando el desarrollo de una neoplasia maligna invasora. (Martínez, 2000)
57. Quimiotipos: forma de clasificación química, biológica y botánica que designa la molécula con mayor presencia en el aceite esencial y permite definirlo terapéuticamente de forma clara y segura. (Paz, 2009)
58. Radiación ultravioleta: radiación electromagnética cuya longitud de onda está comprendida aproximadamente entre los 400-15 nm. (Skoog & al, 2005)
59. 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 medias. (Skoog & al, 2005)
60. Resonancia de ciclotrón: método directo de aceleración de electrones por medio de la diferencia de potencial. (Skoog & al, 2005)
61. Reumatismo: dolor o inflamación de las articulaciones con rigidez de alguna porción del aparato locomotor. (Cáceres, 2006)
62. Rubefaciente: que ruboriza la piel, se aplica a sustancia que producen un aporte sanguíneo en el punto de aplicación, y que por lo general se emplean en forma de ungüento para combatir los dolores musculares. (Cáceres, 2006)
63. Saturar: absorbido o disuelto la máxima cantidad de una determinada sustancia. (Skoog & al, 2005)
64. Sésiles: que carece de pecíolo o de pedúnculo. (Cáceres, 2006)
65. Termostato: Dispositivo que mide y regula la temperatura en un nivel prefijado encendiendo y apagando automáticamente el aparato climatizador. (Skoog & al, 2005)
66. Tomentosas: hojas cubiertas de pelos finos. (Cáceres, 2006)
67. Tónico: agente o fármaco, que se administra para mejorar el tono normal de un órgano o del organismo en general. (Cáceres, 2006)
68. Tumorigénesis: proceso de iniciar y promover el desarrollo de un tumor. (Merriam-Webster, 2011)
69. Vértigo: sensación de falta de estabilidad o de situación en el espacio. (Cáceres, 2006)
70. Volátil: tendencia de una sustancia a pasar a vapor. (McMurry, 2008)

## B. Ficha técnica del aceite esencial de Romero (*Rosmarinus officinalis*) del proveedor Chikach.

El aceite esencial de Romero –quimiotipo Verbenona- es obtenido por destilación de las sumidades floridas, hojas y tallos tiernos del arbusto conocido como Romero, (*Rosmarinus officinalis* Linn. , familia Labiatae). Aunque originario del Sur de Europa, en varias aldeas del municipio de Cunén, Departamento de El Quiché, se cultiva orgánicamente una variedad tipo Verbenona, denominado así por su alto contenido de este compuesto. La planta fresca y algo oreada se destila con vapor de agua en un alambique de acero inoxidable, obteniendo rendimientos del 0.6% y 0.7% por kilogramo de planta fresca, de un aceite esencial rico en terpenos, alcaloides, ésteres, cetonas (alcanfor), variando según la especie. (Manjón, 2010)

Es un líquido fluido y transparente, volátil a temperatura ambiente, de coloración amarillo pálido, o ligeramente verde con toque amarillo, de olor característico, algo picante y amargo, cálido y fresco a la vez, penetrante, con toque herbáceo y alcanforado. Gravedad específica 0.895 a 0.920 gr/ml a 15°. Índice de saponificación entre el 12 y 20 y un índice de refracción oscila entre 1.466 y 1.472. (Manjón, 2010)

- Método de extracción: Hidrodestilación con arrastre vapor.
- Fecha de recolección: agosto 2010.
- Estado de la materia prima destilada: hojas y tallos tiernos oreados, pero frescos aún.
- Lugar: Cunén, El Quiché.
- Soluble en alcohol de 80° grados (1 a 5 por 10). Insoluble en agua.
- Constituyentes principales: derivados terpénicos, carburos como alfa pineno (27.3%), 1-8 Cineol (Eucalyptol, 21.7%), verbenona (12.7%), Germacren D (4.85%) Canfeno (2.68%), alcanfor (2.82%). (Manjón, 2010)
- Propiedades: Anticatarral, mucolítico (deshace el moco), estimulante del sistema hepatobiliar, drenaje del hígado, lipolíticas (quemar grasas), equilibrio del sistema nervioso, antiséptico, antiinfeccioso. (Manjón, 2010)
- Usos y aplicaciones: En uso externo es antiséptico, antiparasitario, antirreumático, analgésico, cicatrizante y estimulante del cuero cabelludo. Acné, eczema, celulitis, estrías, cicatrices. En uso interno, por vía oral, es estimulante del sistema nervioso central, corazón y circulación. Por su quimiotipo es muy apropiado para tratar la congestión del hígado y vesícula biliar, hepatitis vírica, cirrosis, colesterol, sinusitis, bronquitis. En medicina se usa como detergente, analgésica, en linimentos antirreumáticos, como el Alcohol de Romero (5 gr de esencia en 95 gr de alcohol de 95°). En veterinaria, en forma de alcoholato, como antiparasitario y para evitar la caída del pelo. Se utiliza en

perfumería, jabonería y cosmética, en lociones capilares. En diversos productos industriales, como aromatizantes de ambientadores, detergentes, insecticidas, etc. (Manjón, 2010)

- Precauciones: Uso externo con precaución: mujeres embarazadas, lactancia y niños menores. Para uso interno utilizar sólo bajo prescripción médica correspondiente. Contraindicado para personas hormona-dependientes. (Manjón, 2010)

### C. Análisis del aceite esencial de Romero (*Rosmarinus officinalis*) del proveedor Chikach



ANALYTIK / QUALITÄTSMANAGEMENT  
BACKWAREN  
BIOTECHNOLOGIE / UMWELT  
NACHWACHSENDE ROHSTOFFE / LEBENSMITTELTECHNOLOGIE  
TECHNOLOGIETRANSFER

Herrn  
Robert Glass  
Alte Engter Str. 2

49565 Bramsche

Fax 05461/ 968484

Bergholz-Rehbrücke, 15.09.2002  
Seite 1 von 1

**Ihr Auftrag vom 04.09.2002**

#### Prüfbericht

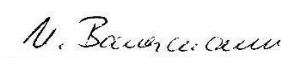
Bezeichnung der Probe:	1 Muster Rosmarinöl, Guatemala
Probenahme:	durch Auftraggeber
Probeneingang:	08.09.2002
Untersuchungsauftrag:	GC- Hauptkomponentenanalyse
Probenvorbereitung:	Verdünnung des ätherischen Öles 1 : 100 in Isooctan
Analysenmethode:	gaschromatographisch (Berechnung nach Flächenprozenten) Gerät/Detektor: HP 5890 II/FID; 250°C Säule: DB wax 60 m, ID 0,25mm, df 0,25 µm Trärgas: Stickstoff

#### Ergebnisse der Untersuchung:

alpha- Pinen	27,3 %
1,8- Cineol	21,7 %
Verbenon	12,7 %

Chromatogramm siehe Anlage

  
Dr. Ralph Thomann

  
Ulrike Bauermann

IGV Institut für Getreideverarbeitung GmbH  
Geschäftsführer: Peter Kretschmer  
Arthur-Scheunert-Allee 40/41, 14558 Bergholz-Rehbrücke  
Tel. (033200) 89 0, Fax (033200) 89 230, E-mail IGV-Office@igv-gmbh.de  
Bankverb.: Deutsche Bank AG, Konto-Nr. 3000874, BLZ 120 700 00  
Berliner Volksbank, Konto-Nr.: 8271111003, BLZ 100 900 00  
Eingetragen beim Amtsgericht Potsdam HRB-Nr. 7611  
USt-IdNr.: DE 171022945  
Vorsitzender des Aufsichtsrates: Dietmar Schulze



Durch das DAP Deutsches  
Akkreditierungssystem  
Prüfwesen akkreditiertes  
Prüflaboratorium  
Die Akkreditierung gilt für  
die in der Urkunde  
aufgeführten Prüfverfahren

(Manjón, 2010)

File C:\HPCHEM\1\DATA\E030911\002F0201.D

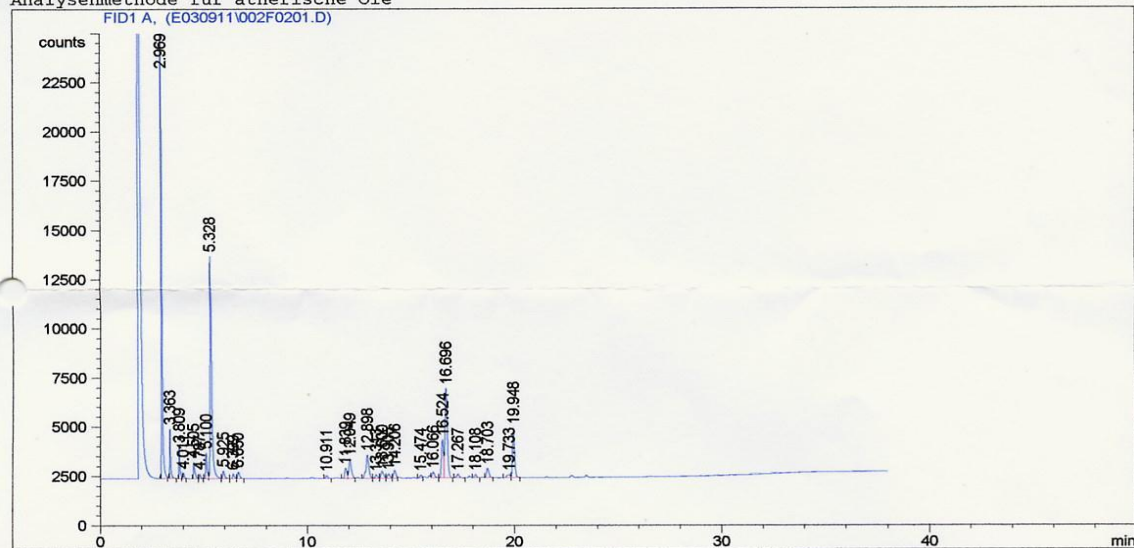
Sample Name: GlaßRosmari09/03

```

=====
Injection Date : 11.09.03 09:50:06          Seq. Line : 2
Sample Name   : GlaßRosmari09/03          Vial : 2
Acq. Operator : Bauermann                  Inj : 1
                                           Inj Volume : 1 µl

Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\PHENOL.M
Last changed  : 28.08.03 10:32:05 by Mrowietz
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\ETHOEL.M
Last changed  : 16.09.03 10:52:37 by Otto
                                           (modified after loading)
  
```

Analysenmethode für ätherische Öle



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : 16.09.03 10:52:26
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
  
```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area counts*s	Area %	Name
1	2.969	VV	0.0371	7.85156e4	27.26783	alpha-Pinen
2	3.363	VP	0.0449	7743.00391	2.68908	Camphen
3	3.809	PV	0.0506	5628.76563	1.95483	beta-Pinen
4	4.011	VV	0.0594	1204.04138	0.41815	?
5	4.505	BV	0.0721	4174.80469	1.44988	?
6	4.787	VB	0.0682	1110.63867	0.38572	?
7	5.100	BV	0.0724	6520.94775	2.26467	?
8	5.328	VV	0.0784	6.24955e4	21.70418	1,8-Cineol (Eucalyptol)
9	5.925	VB	0.0869	2425.28931	0.84228	?
10	6.399	BV	0.0814	1394.96106	0.48446	?
11	6.650	VB	0.0892	2185.28784	0.75893	?
12	10.911	PB	0.0858	1036.87439	0.36010	?
13	11.839	VV	0.0983	3809.55493	1.32303	?
14	12.049	VV	0.1087	8120.22412	2.82009	Campher
15	12.898	VV	0.1264	1.12284e4	3.89953	?
16	13.313	VV	0.1066	1563.26563	0.54291	?
17	13.600	VV	0.1052	3224.31787	1.11978	?

(Manjón, 2010)

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\E030911\002F0201.D

Sample Name: GlabRosmari09/03

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area counts*s	Area %	Name
18	13.905	VV	0.1172	2061.74438	0.71603	?
19	14.206	VV	0.0952	3225.77856	1.12029	?
20	15.474	VV	0.1058	1268.17114	0.44043	?
21	16.066	VP	0.1082	2662.69092	0.92473	?
22	16.524	VV	0.0901	1.39921e4	4.85935	Germacren D
23	16.696	VB	0.1021	3.64464e4	12.65754	Verbenon
24	17.267	BB	0.1091	1566.42603	0.54401	?
25	18.108	VB	0.0855	1180.35840	0.40993	?
26	18.703	VB	0.1000	3931.18433	1.36527	?
27	19.733	VV	0.1367	1821.36731	0.63255	?
28	19.948	VB	0.0955	1.74045e4	6.04444	?

Totals : 2.87942e5

Results obtained with enhanced integrator!

7 Warnings or Errors :

Warning : Invalid calibration curve, (alpha-Pinen)  
Warning : Invalid calibration curve, (Camphen)  
Warning : Invalid calibration curve, (beta-Pinen)  
Warning : Invalid calibration curve, (1,8-Cineol (Eucalyptol))  
Warning : Invalid calibration curve, (Campher)  
Warning : Invalid calibration curve, (Germacren D)  
Warning : Invalid calibration curve, (Verbenon)

\*\*\* End of Report \*\*\*

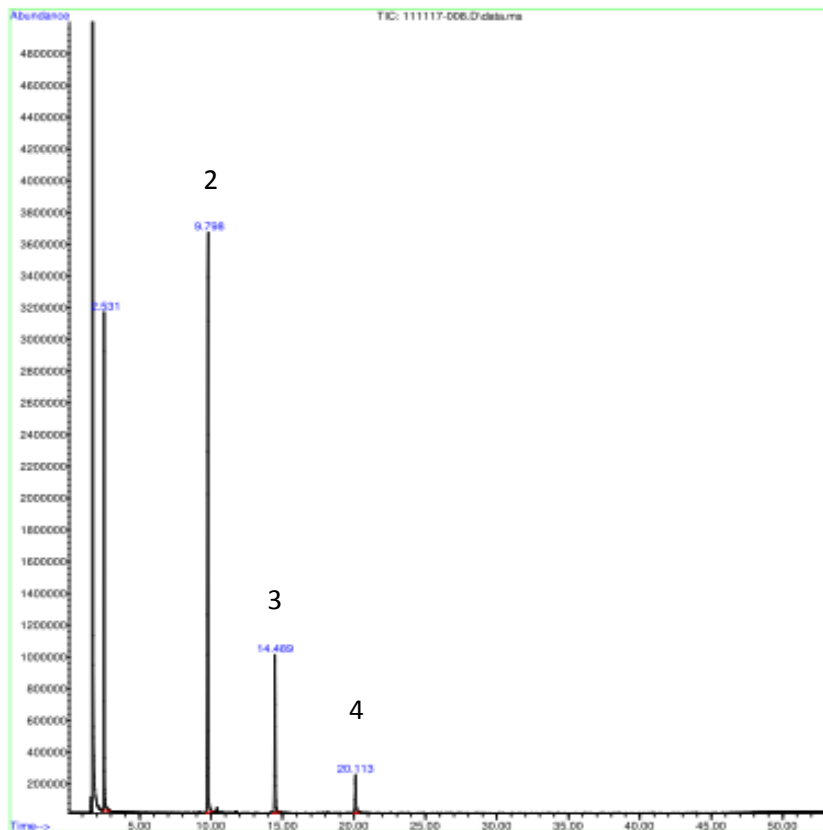
## D. Match de cromatograma para la identificación

### 1. Eventos integrados de la mezcla de estándares y cromatograma

Unknown Spectrum: Apex  
Integration Events: ChemStation Integrator - mentol.E

Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	2.530	21.43	C:\Database\NIST05a.L			
			1-Butanol	817	000071-36-3	95
			1-Butanol	823	000071-36-3	91
			1-Butanol	822	000071-36-3	90
2	9.796	57.47	C:\Database\NIST05a.L			
			1R-.alpha.-Pinene	15186	007785-70-8	96
			1S-.alpha.-Pinene	15185	007785-26-4	96
			.alpha.-Pinene	15178	000080-56-8	95
3	14.491	16.48	C:\Database\NIST05a.L			
			Eucalyptol	25509	000470-82-6	99
			Eucalyptol	25507	000470-82-6	98
			Eucalyptol	25508	000470-82-6	98
4	20.111	4.62	C:\Database\NIST05a.L			
			Bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 1,7,7-trimethyl-, (1R)-	24299	000464-49-3	98
			Bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 1,7,7-trimethyl-, (1R)-	24298	000464-49-3	98
			Camphor	24021	000076-22-2	98

File: I:\msdchem\1\DATA\Tesis\Sofia y Sara calib\111117-008.D  
Operator: Adm  
Acquired: 17 Nov 2011 23:45 using AcqMethod CALIB TESIS.M  
Instrument: GC-MSD  
Sample Name: Estandar S-1-5  
Misc Info: Estandar S-1-5  
Vial Number: 5

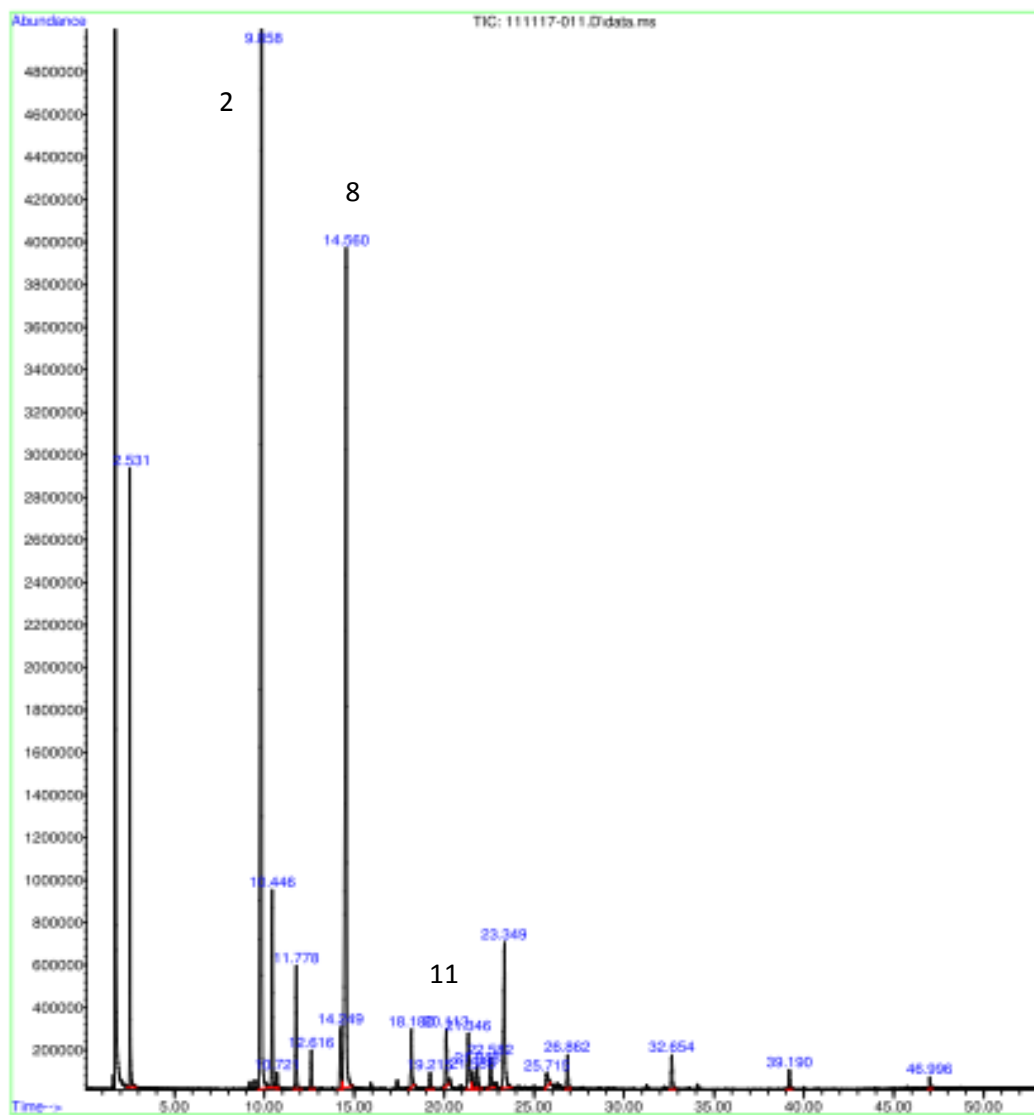


## 2. Eventos integrados y cromatograma de la muestra del aceite esencial de romero

Unknown Spectrum: Apex  
Integration Events: ChemStation Integrator - mentol.E

#	RT	Area	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	2.530	5.93	C:\Database\NIST05a.L 1-Butanol 1-Butanol 1-Butanol	817 823 822	000071-36-3 000071-36-3 000071-36-3	95 94 91
2	9.858	42.80	C:\Database\NIST05a.L 1R-.alpha.-Pinene 1S-.alpha.-Pinene .alpha.-Pinene	15186 15185 15178	007785-70-8 007785-26-4 000080-56-8	96 96 95
3	10.448	4.21	C:\Database\NIST05a.L Camphene Camphene Bicyclo[2.2.1]heptane, 2,2-dimethyl-3-methylene-, (1S)-	15161 15152 15387	000079-92-5 000079-92-5 005794-04-7	96 96 96
4	10.723	0.35	C:\Database\NIST05a.L Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 4-methylene-1-(1-methylethyl)- Benzene, butyl- Benzene, butyl-	14461 14339 14337	036262-09-6 000104-51-8 000104-51-8	50 43 43
5	11.778	2.80	C:\Database\NIST05a.L Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene-, (1S)- .beta.-Pinene .beta.-Pinene	15390 15171 15176	018172-67-3 000127-91-3 000127-91-3	96 94 94
6	12.615	0.81	C:\Database\NIST05a.L Cyclohexene, 4-methylene-1-(1-methylethyl)- .beta.-Myrcene .beta.-Pinene	15324 15177 15171	000099-84-3 000123-35-3 000127-91-3	72 70 64
7	14.249	1.77	C:\Database\NIST05a.L Benzene, 1-methyl-2-(1-methylethyl)- Benzene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)- Benzene, 1-methyl-3-(1-methylethyl)-	14430 14425 14426	000527-84-4 000099-87-6 000535-77-3	97 97 95
8	14.558	25.41	C:\Database\NIST05a.L Eucalyptol Eucalyptol Eucalyptol	25509 25508 25507	000470-82-6 000470-82-6 000470-82-6	99 98 98
9	18.180	1.51	C:\Database\NIST05a.L 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl- 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl- 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-, 2-aminobenzoate	25643 25636 107591	000078-70-6 000078-70-6 007149-26-0	86 86 52
10	19.213	0.51	C:\Database\NIST05a.L Benzenemethanol, 4-methyl- 1,3-Cyclopentadiene, 5,5-dimethyl-2-ethyl-	9646 9745	000589-18-4 1000162-25-6	87 81
11	20.111	1.44	C:\Database\NIST05a.L Bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 1,7,7-trimethyl-, (1R)- Bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 1,7,7-trimethyl-, (1R)- Bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 1,7,7-trimethyl-, (1S)-	24299 24291 24296	000464-49-3 000464-49-3 000464-48-2	98 97 97
12	21.347	2.07	C:\Database\NIST05a.L Bicyclo[2.2.1]heptan-2-ol, 1,7,7-trimethyl-, (1S-endo)- Bicyclo[2.2.1]heptan-2-ol, 1,7,7-trimethyl-, (1S-endo)- Borneol	25824 25830 25498	000464-45-9 000464-45-9 000507-70-0	95 94 91

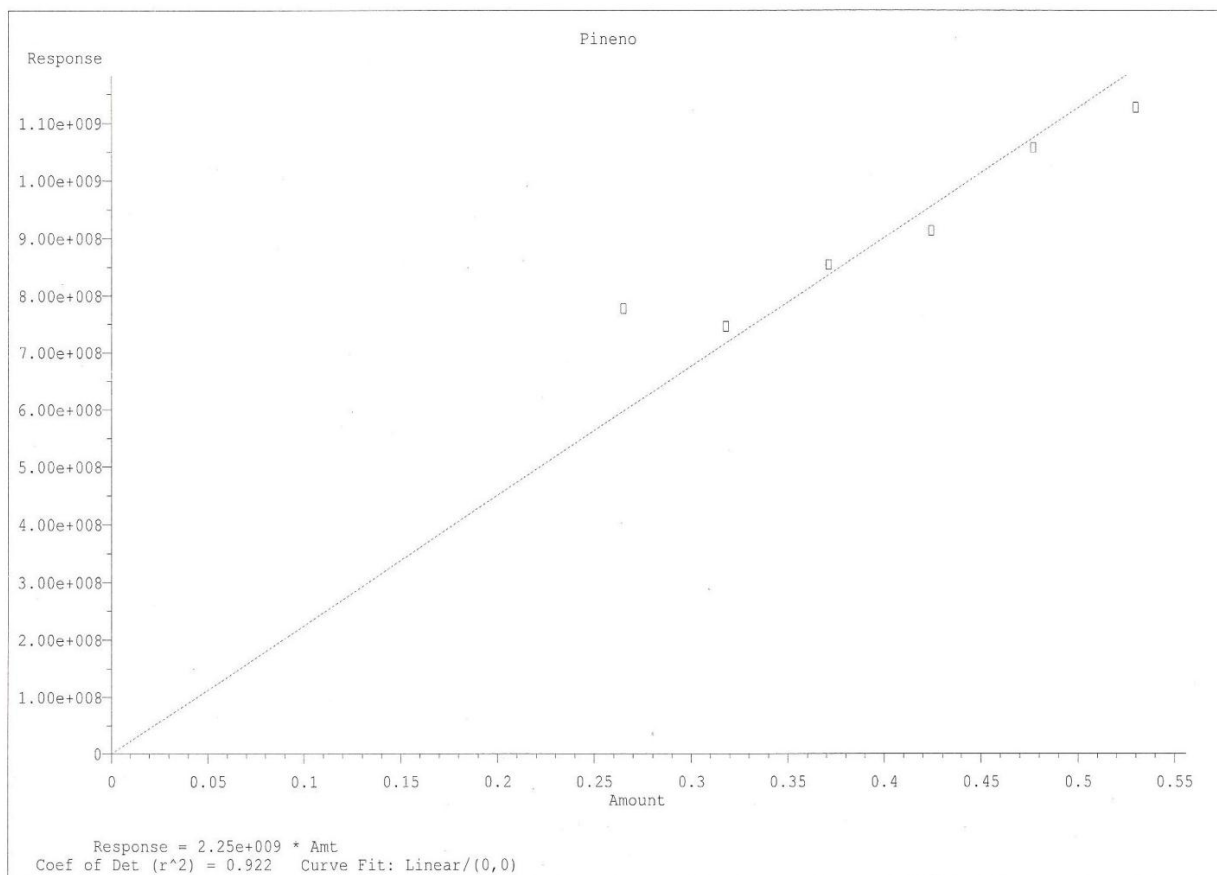
File :C:\msdchem\1\DATA\Tesis\Sofia y Sara calib\111117-011.D  
Operator : AdeM  
Acquired : 18 Nov 2011 2:49 using AcqMethod CALIB TESIS.M  
Instrument : GC-MSD  
Sample Name: Mu S-1-1rep  
Misc Info : Mu S-1-1rep  
Vial Number: 2



## E. Curvas de calibración iniciales

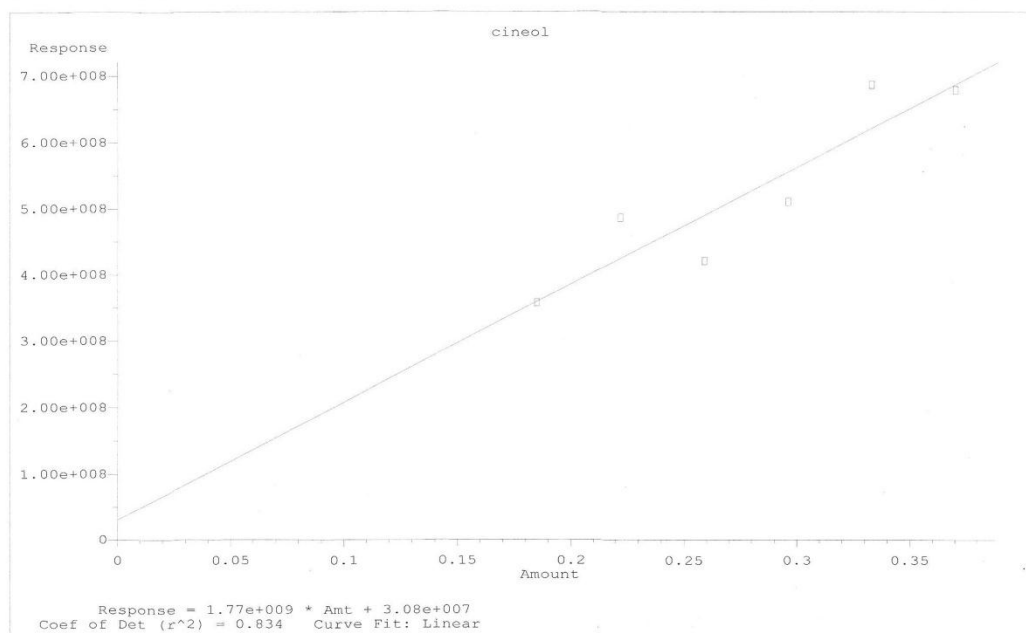
### 1. Curva de calibración de $\alpha$ -pineno

LvLID	Amount (ratio)	Response (ratio)	bias (%)	Data File
1	0.2650	776941687.000000	30.06	C:\msdchem\1\DATA\Tesis\Sofia\111110-12.D
2	0.3180	745551369.000000	4.00	C:\msdchem\1\DATA\Tesis\Sofia\111110-11.D
3	0.3710	853607003.000000	2.07	C:\msdchem\1\DATA\Tesis\Sofia\111110-10.D
4	0.4240	912447070.000000	-4.54	C:\msdchem\1\DATA\Tesis\Sofia\111110-8.D
5	0.4770	1057272649.000000	-1.67	C:\msdchem\1\DATA\Tesis\Sofia\111110-7.D
6	0.5300	1126532675.000000	-5.71	C:\msdchem\1\DATA\Tesis\Sofia\111110-9.D



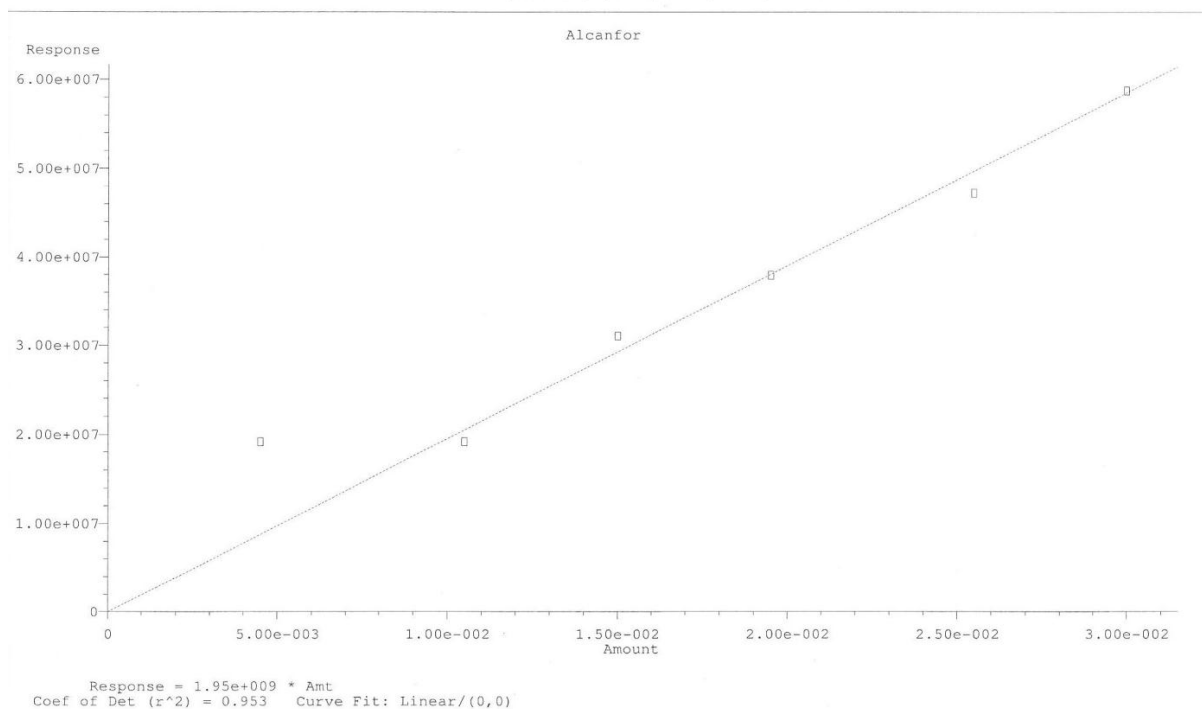
## 2. Curva de calibración de 1,8-cineol

LvLID	Amount (ratio)	Response (ratio)	bias (%)	Data File
3	0.1850	356907967.000000	-0.61	C:\msdchem\1\DATA\Tesis\Sofia y Zara calib\111114-008.D
2	0.2220	486398300.000000	14.50	C:\msdchem\1\DATA\Tesis\Sofia y Zara calib\111114-011.D
1	0.2590	420930264.000000	-14.17	C:\msdchem\1\DATA\Tesis\Sofia y Zara calib\111114-014.D
4	0.2960	510288369.000000	-8.24	C:\msdchem\1\DATA\Tesis\Sofia y Zara calib\111111-15.D
5	0.3330	686587162.000000	10.42	C:\msdchem\1\DATA\Tesis\Sofia y Zara calib\111111-16.D
6	0.3700	678591939.000000	-1.29	C:\msdchem\1\DATA\Tesis\Sofia y Zara calib\111111-17.D



## 3. Curva de calibración de alcanfor

LvLID	Amount (ratio)	Response (ratio)	bias (%)	Data File
1	0.0045	19145951.000000	118.23	C:\msdchem\1\DATA\Tesis\Sofia\111110-5.D
2	0.0105	19145951.000000	-6.47	C:\msdchem\1\DATA\Tesis\Sofia\111110-5.D
3	0.0150	31015520.000000	6.06	C:\msdchem\1\DATA\Tesis\Sofia\111110-4.D
4	0.0195	37892754.000000	-0.33	C:\msdchem\1\DATA\Tesis\Sofia\111110-1.D
5	0.0255	47219126.000000	-5.02	C:\msdchem\1\DATA\Tesis\Sofia\111110-2.D
6	0.0300	58714705.000000	0.39	C:\msdchem\1\DATA\Tesis\Sofia\111110-3.D



## F. Cuadros utilizados para realizar los cálculos de los parámetros de validación.

Cuadro No. 21: Cálculo de parámetros de validación de  $\alpha$ -pino.

1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
12.87	25.74	51.48	77.22	102.96	12.87	25.74	51.48	77.22	102.96
2.5253	5.2208	11.2323	18.1423	24.4584	14.3633	25.0812	48.9837	76.4589	101.5724
2.4884	5.1942	11.4353	17.5801	25.7066	14.2169	24.9755	49.7909	74.2236	106.5354
2.6376	5.7078	11.3470	18.2821	25.6264	14.8101	27.0174	49.4399	77.0146	106.2168
2.6680		11.4933		24.1911	14.9307		50.0216		100.5097
2.7106		11.8022		25.5404	15.1002		51.2499		105.8747
					No.		1	3	5
					Concentración		12.87	51.48	102.96
					Exactitud	Promedio	14.6842	49.8972	104.1418
						%Recobro	114.0967	96.9254	101.1478
						Promedio recobro	104.0566		
					Precisión	Desviación estándar	0.3778	0.8515	2.8650
						RSD%	2.5731	1.7065	2.7510
						Promedio RSD%	2.3436		
					Rango	Inferior	11.7474	Superior	124.9702

Cuadro No. 22: Cálculo de parámetros de validación de 1,8-cineol.

1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
3.688	7.376	14.752	22.128	29.504	3.688	7.376	14.752	22.128	29.504
0.7351	1.5445	3.3871	5.1354	7.1644	3.5510	7.0398	14.9819	22.5176	31.2633
0.7675	1.5693	3.5390	5.1225	6.3569	3.6905	7.1465	15.6367	22.4622	27.7827
0.7452	1.5542	3.5355	4.7517	6.6753	3.5943	7.0814	15.6217	20.8638	29.1550
0.7472		3.2840		6.9867	3.6028		14.5376		30.4975
0.7705		3.4093		6.6665	3.7032		15.0774		29.1174
					No.		1	3	5
					Concentración		3.688	14.752	29.504
					Exactitud	Promedio	3.6284	15.1711	29.5632
						%Recobro	98.3836	102.8407	100.2006
						Promedio recobro	100.4750		
					Precisión	Desviación estándar	0.0657	0.4652	1.3508
						RSD%	1.8106	3.0665	4.5693
						Promedio RSD%	3.1488		
					Rango	Inferior	2.9027	Superior	35.4758

Cuadro No. 23: Cálculo de parámetros de validación de alcanfor.

Relación Estándar/Butanol					Concentraciones				
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
0.7505	1.501	3.002	4.503	6.004	0.7505	1.501	3.002	4.503	6.004
0.2109	0.2776	0.6086	0.9006	1.2477	0.8350	1.2051	3.0419	4.6619	6.5883
0.2208	0.2963	0.6439	0.9006	1.0205	0.8897	1.3089	3.2379	4.6619	5.3278
0.2174	0.2721	0.67574	0.7929	1.1435	0.8709	1.1740	3.4142	4.0648	6.0103
0.2133		0.5698		1.2143	0.8482		2.8261		6.4031
0.2157		0.5981		1.1243	0.8618		2.9836		5.9032
					No.	1	3	5	
					Concentración	0.7505	3.002	6.004	
					Exactitud	Promedio	0.8611	3.1007	6.0465
						%Recobro	114.74	103.29	100.71
						Promedio recobro	106.2477669		
					Precisión	Desviación estándar	0.0209	0.2289	0.4897
						RSD%	2.4373	7.3835	8.0986
						Promedio RSD%	5.9731		
					Rango	Inferior	0.6889	Superior	7.2558