



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
VERITATE SOLA NOVIS INPONETUR VIRILISTOGA. 1948

Facultad Química-Farmacia

DEPARTAMENTO DE FARMACIA

Tesis para optar por el título de Licenciado en Ciencias Farmacéuticas.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el
aceite esencial obtenido de las hojas de *Melaleuca
leucadendron* L.

Autor: Luis Miguel Pavia Quintero

Tutores: Dra. María Elisa Jorge Rodríguez

Lic. Urbano Monteagudo Moreno

Asesor: Dr. Luis Bravo Sánchez

Santa Clara.

2009





“Creo en la lucha armada como única solución para los pueblos que luchan por liberarse y soy consecuente con mis creencias.”

Che



Dedicatoria

Hay personas que con solo existir hacen de nuestras vidas un sendero feliz. A ellos les dedico este triunfo.

A mi mamá, por ser la luz de mi vida dedico este trabajo con mucho amor por hacerme comprender que siempre se puede llegar más lejos. Eres mi ejemplo y gracias a ti hoy estoy aquí. Eres la mejor de las madres, te quiero mucho, gracias por cuidarme y por llevarme en el buen camino con comprensión, paciencia y amor aun cuando proteste por creer tener la razón. En ti más que en nadie pensé en los momentos difíciles para poder seguir y culminar mis estudios, para que estés orgullosa de tu hijo en un momento como este por el cual te has esforzado tanto desde que salí de tu vientre y entre en tu corazón.

A mi papá, por su infinito cariño, por su sacrificio para ayudarme siempre a lo largo de esta carrera y de toda mi vida. Se que estarás muy contento de formar parte inseparable de este gran éxito que llena de una inexplicable e incomparable felicidad a mi vida y por tener la dicha de ser tu hijo.



Dedicatoria

A toda mi familia, en especial por parte materna, Arelis que se estará muy contenta y me quiere mucho, así como Lisba con la cual tuve la oportunidad de estudiar y es la prima que mas quiero, mis abuelos, mis tíos. A Elsita, Ronal, Mima Elsa, Elvis, Yisel y a Orestiquín para que siga mi ejemplo; a mis amigos y a todas aquellas personas que ahora tengo presente para las cuales necesitaría mil hojas para poner sus nombres. A todas esas personas que me quieren y estiman mucho.

Hay una persona que no podré olvidar nunca aunque ya no está entre nosotros, a la cual con mucho amor quiero dedicar también este triunfo. Donde quiera que te encuentres Maida Batista te queremos mucho hoy y siempre.

A todas aquellas personas de este mundo que no han tenido la oportunidad de poder estudiar. A ellos también dedico este triunfo para que no pierdan las esperanzas.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineole en el aceite esencial obtenido de las hojas de Melaleuca Leucadendron por GC.



Agradecimientos

La mejor forma de decir es hacer, por eso para mí la mejor forma de agradecer es estar siempre presente en la vida de todas aquellas personas que tanto quiero y me han ayudado.

*A mis **padres** infinito agradecimiento por el esfuerzo, el cariño, la dedicación, comprensión, por sus consejos y por todo lo que me han dado sin esperar nada a cambio llamado amor. En especial a mi madre de la cual estoy muy orgulloso y que siempre estuvo dispuesta a escucharme para así apoyarme y guiarme hasta este gran momento.*

A una persona maravillosa, única y tan excepcional que ha sido como una segunda madre para mí que siempre está dispuesta a ayudar a todos, que se me quiere mucho y estará muy feliz por este paso tan importante en mi vida; a ti Elsie mil gracias por darme un espacio en tu vida.

A Patry por estar a mi lado en este último año, por su amor sin igual en este mundo por su paciencia y confianza depositada en mí.

*A mis **Tíos** Dunia, Guille y Tin por la buena fe, la confianza y el apoyo inigualable que siempre me brindaron.*



*A mis **amigos** Yuriam, William, Yadira, Yusmilany que siempre me tuvieron presente, que tanto se preocuparon por mi, no los olvidare nunca y aunque he esperado tanto este momento no quisiera que acabara para seguir estando cerca de ustedes; a mi amigo Adriamny que siempre me apoyo y que nunca olvidare me dio aliento cuando caí en mi primera mala nota, por los gratos momentos que pasamos y por ser mi mejor amigo. A **mis compañeros de aulas** por estar siempre conmigo, por apoyarme en los momentos malos y buenos, la ayuda desinteresada y la paciencia infinita que me brindaron siempre. , por llenarme de alegría, por ser los mejores compañeros de aula los quiero mucho.*

*A mi **tutora** por tenerme mucha paciencia en estos meses de asistencia intermitente, por educarme, por ser la mejor de mis maestros a lo largo de estos cinco años, por estar siempre dispuesta a escuchar y ser tan comprensiva, por brindarme toda la ayuda posible e incondicional para que mi trabajo fuera un éxito.*

A Urbano por ayudarme incondicionalmente en este trabajo, ya que sin su apoyo, conocimiento y destreza no hubiese sido posible el desarrollo del mismo.

A mis suegros por ser los mejores que he tenido, que tanto me han ayudado y a toda la nueva familia que he ganado.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineole en el aceite esencial obtenido de las hojas de Melaleuca Leucadendron por GC



Agradecimientos

A Misleidy por su ayuda y esfuerzo en la realización de este estudio sobre el Cayeput.

A todas aquellas fuerzas y maravillas que existen en el mundo, que me han permitido vivir y llegar hasta este momento.

En fin deseo agradecer la dedicación al que se mostró espontáneo los que me enseñaron poniendo en mí su esperanza, su confianza, su respeto para que sea un mejor ser humano y en el futuro una mejor profesional.

A todos Muchas gracias

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineole en el aceite esencial obtenido de las hojas de Melaleuca Leucadendron por GC



Resumen

Dentro de las plantas aromáticas insertadas en el programa de medicina verde del Ministerio de Salud Pública se encuentra el *Melaleuca leucadendron* L cuyo extracto alcohólico, producido en todos los laboratorios de fitofármacos del país, se expende para su uso, como antiséptico, de las vías respiratorias. Teniendo en cuenta el efecto terapéutico propuesto y la poca información de esta planta en la literatura, relacionada con dicha acción, en el presente trabajo se propone estudiar el aceite esencial presente en las hojas de la planta buscando la relación del mismo con la acción farmacológica que está descrita en dicha guía y que coincide con el uso tradicional reportado para la población cubana. En el presente trabajo se realizó la extracción y determinación del rendimiento del aceite esencial de la planta en estudio empleando las técnicas de hidrodestilación y arrastre con vapor; para esto previamente se calculó el % de humedad presente en la planta mediante el método de desecación por tolueno, permitieron determinar el % de aceite en las hojas, en base seca, que resultó ser de **1.72%**.

La Cromatografía Gaseosa acoplada a la Espectrometría de Masa permitió estudiar la composición del aceite determinándose 3 componentes presentes en el mismo. El 1,8-Cineol constituyó el componente mayoritario siendo según lo reportado el de mayor interés para el estudio.

Como ensayo cualitativo se determinaron los índices de calidad reportados en la búsqueda bibliográfica para el aceite obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L., valores que se corresponden con los reportados para otros aceites esenciales en las farmacopeas vigentes. Finalmente en el trabajo se validó la Cromatografía de gases, como técnica analítica cuantitativa para realizar la determinación cuantitativa del Cineol presente en el aceite esencial del *Melaleuca leucadendron* L. La técnica resultó ser Lineal, Precisa, Exacta, Específica y Sensible. El contenido de Cineol fue de un **46.53%**.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de Melaleuca leucadendron L por GC.



ÍNDICE

Introducción.....	1
CAPÍTULO I. Revisión bibliográfica.....	4
1.1. Consideraciones generales acerca de las plantas medicinales. Plantas aromáticas.	4
1.2. Aceites esenciales.....	7
1.3. Análisis de aceites esenciales para su identificación y control de calidad.....	12
1.4. Determinación de los parámetros de desempeño de los métodos analíticos.....	20
1.5. <i>Melaleuca leucadendron</i> L.	25
1.6. Consideraciones finales del estudio bibliográfico.	28
CAPÍTULO II. Materiales y métodos.....	30
2.1. Aceite esencial, equipos y reactivos.....	30
2.2. Obtención del aceite. Determinación del rendimiento de aceite esencial obtenido a partir de las hojas de <i>Melaleuca leucadendron</i> L.	31
2.3. Determinación de la composición del aceite utilizando la técnica GC-MS.	35
2.4. Determinación de los índices de calidad del aceite esencial obtenido a partir de las hojas <i>Melaleuca leucadendron</i> L.	36
2.5. Identificación del Cineol presente en el aceite por CCD.	38
2.6. Perfil Cromatográfico del aceite.	38
2.7. Determinación cuantitativa del Cineol presente en el aceite esencial mediante Cromatografía gaseosa (GC).	39
2.7.1. Validación de la técnica analítica de Cromatografía de Gases (GC) para la cuantificación de Cineol en el material vegetal.	40
CAPÍTULO III. Análisis y discusión de los resultados.....	43
3.1. Determinación del rendimiento de aceite esencial de <i>Melaleuca leucadendron</i> L.	43
3.2. Resultados de los índices de calidad del aceite obtenido a partir de las hojas de <i>Melaleuca leucadendron</i> L.....	44
3.3. Identificación del Cineol presente en el aceite por CCD.	46
3.4. Perfil cromatográfico del aceite esencial de <i>Melaleuca leucadendron</i> L.	47
3.5. Determinación de la composición del aceite utilizando la técnica GC-MS.	50
3.6. Determinación cuantitativa de Cineol presente en el aceite esencial mediante Cromatografía gaseosa (GC).	52
Conclusiones.....	60
Recomendaciones.....	60
Bibliografía.....	61



Índice

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineole en el aceite esencial obtenido de las hojas de Melaleuca Leucadendron L. por GC.



Introducción

El aprovechamiento por el hombre de las plantas aromáticas y medicinales, así como la extracción y utilización de sus esencias, hay que buscarla en la más remota antigüedad, según consta en diversos testimonios históricos pertenecientes a distintas civilizaciones y culturas. Las primeras fuentes históricas de las esencias proceden de Egipto, donde 40 siglos antes de Jesucristo ya preparaban esencia de cedro. Los egipcios instruyeron en estas prácticas a los griegos, que a su vez las transmitieron a los romanos. En la Edad Media los árabes perfeccionaron la destilación de las plantas aromáticas favoreciendo así el desarrollo de la naciente y rudimentaria farmacia. En el siglo XIII los alquimistas vendían aceites esenciales, siendo uno de los más cotizados el de romero. En el siglo XV eran conocidas las esencias de almendras amargas, espliego, canela, ginebra, rosa, salvia y lavanda, entre otras. Un siglo después, más de sesenta esencias nuevas se añadían a estas, y en el siglo XVII prácticamente estaban aisladas todas las esencias. En el siglo XIX se practicaron los primeros análisis químicos de esencias y otros principios activos de los vegetales. Con la aplicación del microscopio y la química analítica nace la farmacoquímica. En 1811 se aísla la morfina del opio, se desarrolla un movimiento investigador, a escala mundial, para conocer la composición química de los vegetales, y se inicia la base de la industria farmacéutica, perfumera y condimentaria actual (**Palacio, L. 2000**).

Cada día se presta más atención al estudio de las plantas medicinales, de forma tal que la etnobotánica y la fitoterapia están tomando un gran auge en el mundo actual, tanto en la medicina aplicada como en la investigación experimental. El 80 % de la población mundial, aproximadamente unos cuatro mil millones de personas, utiliza las plantas como principal remedio medicinal en muchas de sus dolencias. Llama la atención la creciente demanda de esta terapia sobre todo en los países de mayor desarrollo donde resurge la necesidad de lo natural y el rechazo a una medicina iatrogénica; por su parte en los países de menor desarrollo constituye un recurso ancestral transmitido de generación en generación como parte de las tradiciones enraizadas en cada uno de ellos (**Martínez, I. 2000**).

Los aceites esenciales son sustancias aromáticas de gran importancia en la industria alimenticia, de jabonería y perfumería y en la industria farmacéutica, los cuales se han usado con fines terapéuticos desde tiempos antiguos en países tan diversos como Egipto, Italia, India y China.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de Melaleuca leucadendron L. por GC.



Actualmente tienen gran auge en Aromaterapia. La propiedad de los aceites esenciales de presentar pequeño tamaño molecular los convierte en uno de los pocos agentes terapéuticos que fácilmente penetran en los tejidos corporales.

Las plantas sintetizan y almacenan aceites esenciales en diversas partes como flores, hojas, brotes, tallos, madera, frutos, semillas, corteza, resinas, raíces y/o rizomas, y presentan estructuras secretoras especializadas que vierten la esencia al exterior (**Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. Marzo 2005**).

Desde el punto de vista histórico la producción de aceites esenciales se ha situado en los países desarrollados, importando la materia prima vegetal desde los países subdesarrollados. Debido a la sencillez y factibilidad económica se ha ido desplazando hacia los países subdesarrollados que antaño exportaban el material vegetal. En 1960 por primera vez en Cuba se realizaron investigaciones sobre aceites esenciales dirigidas por el Dr. Ernesto Gómez Mujica y con el apoyo del Dr. Juan Tomás Roig. (**Via, 1999**).

Actualmente el mercado de los aceites esenciales naturales está sometido a una presión creciente: por una parte los países en vías de desarrollo tratan de mantener, mediante aumento de los precios, el valor real de sus productos y por otra parte los que controlan financieramente las principales empresas de elaboración y composición de mezclas, obligan a sus técnicos a mantener, e incluso a reducir el costo de las fórmulas, lo cual los induce a usar ingredientes de origen sintético que son más abundantes y baratos en la actualidad. Esta situación, unido al hecho de la mayor uniformidad en la calidad y garantía del suministro de los productos de síntesis, determinan un escollo para la comercialización de estas sustancias en el mercado internacional (**Carballo, A. 1991**).

La flora cubana presenta una diversidad tal que justifica el interés de su estudio sistemático, con el objetivo de detectar la presencia y abundancia de productos que puedan ser interesantes como materias primas de valor en diversos campos industriales o de aplicación farmacéutica. Es importante destacar dentro de esta vegetación, la presencia de numerosas plantas aromáticas, endémicas o introducidas, que se han adaptado a nuestra geografía y clima. Algunas de ellas se utilizan como fuentes de aceites esenciales sin embargo existen otras aún no explotadas, cuyos extractos o aceites podrían ocasionar la creación de nuevos productos para sustituir importaciones o generar nuevos renglones exportables (**Bohemia, nov; 1999**).

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L. por GC.



Nuestro país no está exento de todo este rescate de la medicina popular lo cual tiene gran importancia desde el punto de vista económico y dentro del campo de la salud pública, constituyendo una alternativa a tener en cuenta por nuestros investigadores, debido a que posee una rica flora y una valiosa tradición en el uso de las plantas medicinales. Aunque es un país en vías de desarrollo y con limitados recursos económicos, tiene un cuadro de salud de eminentemente de nación desarrollada además de garantizar plenamente el acceso de toda la población a los servicios médicos de alta calidad que se perfeccionan cada año, especialmente con la inclusión del médico de la familia. Dentro de las plantas aromáticas insertadas en el programa de medicina verde del Ministerio de Salud Pública se encuentra el *Melaleuca leucadendron* L., cuyo extracto alcohólico, producido en todos los laboratorios de fitofármacos del país, se expende para su uso, como antiséptico de las vías respiratorias, (**Guía Fitofármacos, 1992**). Teniendo en cuenta el efecto terapéutico propuesto y la poca información de esta planta en la literatura, relacionada con dicha acción, en el presente trabajo se propone estudiar el aceite esencial presente en las hojas de la planta buscando la relación del mismo con la acción farmacológica que está descrita en dicha guía y que coincide con el uso tradicional reportado para la población cubana. Constituye, por tanto, el **problema científico** del presente trabajo que el aceite esencial, obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L., cultivada en Cuba, no posee estudios reportados que describan su composición, lo cual resultaría importante para explicar las acciones farmacológicas que justifican el uso de la planta en la medicina tradicional cubana. Tampoco se dispone de la información físico química necesaria para el establecimiento de los parámetros de control de la calidad del aceite esencial de dicha planta. Para resolver dicho problema se trazaron los siguientes objetivos:

1. Determinar el rendimiento de aceite esencial en las hojas de *Melaleuca leucadendron* L., aplicando la técnica de hidrodestilación y arrastre con vapor.
2. Evaluar y comparar la composición del aceite, obtenido por hidrodestilación y por arrastre con vapor, empleando la Cromatografía Gaseosa acoplada a la Espectrometría de Masa (GC/MS).
3. Realizar la evaluación de la calidad del aceite a través de los índices cualitativos establecidos en las Farmacopeas vigentes.
4. Desarrollar y validar la técnica de Cromatografía de gases para cuantificar el Cineol presente en el aceite esencial.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L. por GC.



CAPITULO I. REVISION BIBLIOGRAFICA

1.1. Consideraciones generales a cerca de las plantas medicinales. Plantas aromáticas.

Las plantas con propiedades beneficiosas para la salud humana vienen acompañando al hombre desde sus orígenes. En los tiempos más remotos, los pueblos primitivos atribuían los efectos curativos de las plantas a la intervención de alguno de sus dioses. En nuestros días, los científicos han descubierto y desarrollado drogas efectivas para el tratamiento de diversas afecciones a partir de compuestos aislados de diferentes plantas (**Barquero A., 2007**).

1.1.1. Definiciones

Sobre las plantas medicinales y aromáticas tenemos disímiles opiniones y conceptos aquí abordamos 4 tomadas de (**Palacio L., 2000**):

Planta oficial Es la que por sus propiedades farmacológicas está recogida en la farmacopea o que forma parte de un medicamento preparado conforme a las reglas de aquella.

Plantas aromáticas: Son aquellas plantas medicinales cuyos principios activos están constituidos, total o parcialmente, por esencias. Representan alrededor de un 0,7 por 100 del total de las plantas medicinales.

Plantas condimentarias o especias: Existe un cierto número de plantas aromáticas, por tanto medicinales, que el hombre utiliza por sus características organolépticas, que comunican a los alimentos y bebidas ciertos aromas, colores y sabores, que los hacen más apetitosos, gratos y sabrosos al olfato, vista y paladar. Son las llamadas plantas condimentarias, utilizadas en guisos, adobos, aliños y licorería, tales como ajedrea, anís, ajo, azafrán, cilantro, comino, hinojo, menta, orégano, romero, salvia, tomillo, etcétera, que además tienen propiedades antioxidantes, y conservantes de alimentos y bebidas.

Plantas medicinales: Son aquellos vegetales que elaboran unos metabolitos secundarios, llamados «Principios activos», sustancias que ejercen una acción farmacológica, beneficiosa o perjudicial, sobre el organismo vivo.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de Melaleuca leucadendron L. por GC.



Su utilidad primordial, a veces específica, es servir como droga o medicamento que alivie las enfermedades o restablezca la salud perdida. Constituyen aproximadamente la séptima parte de las especies existentes, un 14,5 por 100 de estas.

1.1.2. Precedentes históricos

Pero. *¿Qué antecedentes tenemos de esta relación entre el hombre y las plantas?* Son innumerables, desde los anecdóticos hasta los testimoniales, desde los personales hasta los culturales, desde los mitológicos hasta los científicos. La prueba más antigua que existe sobre el uso de las plantas como medicinas en el Paleolítico medio fue encontrada en 1960 por Ralph Solecki, al descubrir una tumba con varios restos fósiles de neandertales en la cueva de Shanidar, situada en las montañas de Zagros (Irak). Uno de los esqueletos, denominado Shanidar IV, estaba cuidadosamente colocado en posición fetal sobre un lecho de belcho junto con varias especies diferentes de flores: milenrama, aciano, cardo de San Banaby, hierva cana, jacinto, y una especie de malva, según se desprende del análisis de las muestras de polen y semillas halladas en el lugar. Estudios posteriores revelaron que siete de las ocho flores que se encontraron en esta tumba tienen propiedades medicinales que abarcan desde el alivio del dolor de muelas y la inflamación hasta su uso como cataplasma y para las convulsiones.

Este análisis hace suponer que la gente de Shanidar tenía conocimiento de algunas de las propiedades medicinales de las flores y que por eso las seleccionaron para el entierro de este individuo que, según Solecki, podía haber sido una especie de curandero o chamán en su grupo. Antes del nacimiento de la escritura, todos los conocimientos se transmitían oralmente, alrededor del año 2800 a.C. se encuentra el primer documento escrito que registra el uso de las plantas medicinales. Aparece en unas tablillas de arcilla pertenecientes a la cultura de los Sumerios, un pueblo que vivía al sur de los ríos Éufrates y Tigris. Aunque el primer tratado sobre el tema, el Pen Tsao, se le atribuye al emperador chino Shen Nung) que reinó en el siglo XXVII a.C., donde se describen y clasifican 366 hierbas con aplicaciones medicinales para aquella época. Los egipcios también utilizaban las plantas con fines curativos, el documento impreso más interesante es el Papiro de Ebers que comprende una extensa lista de plantas medicinales que se utilizan aún hoy en día como el opio y el aloe. Hipócrates de Cos (460-377 a.C.), considerado el padre de la medicina, sistematizó los grupos de medicamentos, dividiéndolos en purgantes, narcóticos y febrífugos, para prepararlos se usaban simples vegetales y minerales y algunas sales de naturaleza inorgánica.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L. por GC.



Claudio Galeno (130-200), considerado el fundador de la actual farmacia galénica, también hace referencia al uso de las plantas medicinales en su obra *De Simplicibus medicinis*. Las civilizaciones Prehispánicas del Nuevo Mundo también hacían uso de las plantas con propósitos curativos. Los Aztecas, Mayas e Incas tenían extensas farmacopeas. Durante la época de la conquista, el uso de las plantas medicinales se extendía a lo largo de todo el continente, desde el Ártico hasta Tierra del Fuego. Hay muchos documentos que relatan como las plantas se utilizan con fines terapéuticos en todo el mundo y desde tiempos remotos. Sin embargo, la idea de utilizar como medicamento un compuesto “puro” obtenido a partir de una planta con acción terapéutica, surge en 1803 con el aislamiento de los primeros alcaloides. El farmacéutico alemán Friedrich W.A. Sertürner los descubre intentando obtener el principio activo del opio (**Barquero A., 2007**).

Hasta la década 30 del pasado siglo, los productos naturales jugaban un rol principal dentro de los tratamientos terapéuticos, siendo desplazados a partir del auge de la síntesis química y el descubrimiento y uso de los antibióticos, lo que provoca el desarrollo acelerado de los medicamentos cuyos principios activos se obtenían de forma sintética. Sin embargo, en las últimas décadas puede observarse como tendencia mundial, un aumento del consumo de plantas medicinales, tanto en los países industrializados como los del tercer mundo (**Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas., Julio 2002**).

En el año 2006, el mercado farmacéutico mundial fue de 643 miles de millones de dólares y el mercado de las plantas medicinales llegó a los 62 miles de millones de dólares con una tasa anual de crecimiento estimada según un informe del Banco Mundial de entre el 5 y el 15%. Es decir, además de los fármacos derivados de plantas que se comercializan a través de la industria farmacéutica, existe un mercado de hierbas medicinales que se venden como suplementos dietarios o “medicinas naturales o tradicionales” que se encuentra en expansión. Para los países industrializados, estas se han convertido en fuentes importantes de ingredientes para el desarrollo de formulaciones farmacéuticas y al mismo tiempo su empleo directo como alternativa a las prescripciones sanitarias. Tal ha sido el éxito de las plantas como fuente para aislar compuestos bioactivos para su uso directo o como precursores de moléculas modificadas por síntesis química para producir nuevas entidades patentables con mayor actividad y/o menor toxicidad que, en la actualidad, casi el 25% de los fármacos que se prescriben contienen uno o más principios activos derivados de alguna planta, según datos del *National Prescription Audit* de los Estados Unidos obtenidos sólo de farmacias (**Barquero A., 2007**).

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L. por GC.



Para el segundo grupo (países del tercer mundo) que es la mayoría, las plantas medicinales, en más de un 80% de su población es la única alternativa posible para obtener recursos terapéuticos. En Asia, millones de personas mantienen su salud mediante el uso de hojas, raíces y cortezas de árboles. Es reconocido que las plantas medicinales y aromáticas constituyen cada vez más un mercado promisorio, en parte por el surgimiento del “consumo verde” que reconoce la unidad del hombre con la naturaleza (**Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas., Dic. 2002**).

Las plantas medicinales y aromáticas tienen múltiples fines, que van desde tratamientos de belleza, terapéuticos y medicinales hasta fuente de venenos y material prima para industrias de colores, aromas y sabores, así como en la industria alimenticia y agroquímica. Las plantas aromáticas y sus productos son en sí mismos medicamentos, que contienen principios activos, a los cuales el hombre imita para lograr los medicamentos de la industria farmacéutica que conocemos tradicionalmente. Las plantas sintetizan y almacenan aceites esenciales en diversas partes como: flores, hojas, brotes, tallos, madera, frutos, semillas, corteza, resinas, raíces y/o rizomas, y presentan estructuras secretoras especializadas que vierten la esencia al exterior (**Stamm M., 1970**).

1.2. Aceites Esenciales.

Los aceites esenciales son sustancias aromáticas de gran importancia en la industria alimenticia, de jabonería y perfumería y en la industria farmacéutica, los cuales se han usado con fines terapéuticos desde tiempos antiguos en países tan diversos como Egipto, Italia, India y China. Actualmente tienen gran auge en Aromaterapia. La propiedad de los aceites esenciales de presentar pequeño tamaño molecular los convierte en uno de los pocos agentes terapéuticos que fácilmente penetran en los tejidos corporales. Los aceites esenciales a partir de especies vegetales con propiedades terapéuticas son escasamente extraídos en nuestro país, la mayoría de las materias primas empleadas por la Industria farmacéutica cubana, derivadas de productos naturales son importadas.

1.2.1. Acción Farmacológica

Debe señalarse que muchos aceites volátiles poseen propiedades antisépticas; las acciones antibacterianas, antimicrobianas y antifúngicas de las esencias han sido objeto de una serie de investigaciones.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L. por GC.



Es probable que por este efecto bacteriostático se haya dado tanto valor a las especias durante el período babilónico, y que por eso se decía que **“Valen por su peso en oro”**. Por lo tanto debido a sus condiciones preservativas y a su fragancia, las especias se mezclaban con los alimentos desde la remota antigüedad. Es indudable que la presencia de aceites antisépticos en las especias evita el excesivo desarrollo de las bacterias que descomponen los alimentos (**Cook E. y col., 1953**). Esta acción es posiblemente la acción más conocida y usada de las esencias, casi no hay esencias que no tengan acción antimicrobiana, aunque hay muy pocas que tienen efecto antifúngico. Otras presentan acción antihelmíntica y antiparasitaria. Esta acción constituye la más abundante en los reportes de comprobación de la acción farmacológica de los aceites esenciales, como ejemplo citamos algunos artículos de los últimos años que muestran esta afirmación y que solo constituyen una ínfima representación (**Petrović S. y col., 2009; Kuźma L. y col., 2009; Shafaghat A. y col., 2009**).

Otra acción ampliamente estudiada ha sido el efecto antioxidante en varias esencias naturales como en: la manzanilla, la menta, el hinojo y el tomillo. Algunos efectos adversos reconocidos y que comúnmente presentan las esencias son: acción alergénica como la manzanilla, efecto fotosensibilizante como las esencias cítricas no descumarinizadas. Efectos alucinógenos y hepatotóxicos de especias con esencias ricas en tuyonas. Otras ricas en fenoles pueden provocar dermatitis por contacto o quemaduras (clavo, tomillo y algunas salvas). Posible efecto abortivo y hepatotóxico de esencias ricas en pulegona. Una gran variedad de aceites esenciales son empleados como repelentes de insectos, tanto en productos de uso hogareño, de uso industrial y agronómico. La esencia más común para esta finalidad es la de citronela, especialmente para mosquitos y moscas (**Bandoni A., 2000**).

1.2.2. Obtención de los aceites esenciales. (Bandoni A., 2000).

Se pueden obtener por los siguientes métodos: Expresión, extracción y destilación,

Los dos primeros métodos de extracción no incluyen el empleo de calor por lo que evitan la descomposición del aceite:

EXPRESIÓN:

El material del cual se pretende extraer el aceite se humedece al máximo posible y se tritura en pequeñas porciones; posteriormente (por medio de una prensa), se “exprime” obteniéndose un líquido, el cual se separa en dos capas al dejarse en reposo.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L. por GC.



EXTRACCIÓN:

Se utiliza cuando el aceite se descompone fácilmente o se haya en cantidades tan pequeñas que no es posible su obtención por los métodos citados. En estos casos se extrae por disolución o adsorción del aceite en disolventes inmiscibles entre ellos o volátiles a través de procesos como maceración, digestión, eufloación o lixiviación.

DESTILACION:

La Destilación es un método para separar los componentes de una solución, el que depende de la distribución de las sustancias entre las fases gaseosas y líquidas y es aplicable a los casos donde todos los componentes se haya presentes en ambas fases. En lugar de introducir una nueva sustancia a la mezcla, la nueva fase se crea de la solución original por evaporación y condensación.

Teniendo en cuenta que la destilación fue el método empleado en el presente trabajo a continuación se exponen los aspectos más importantes sobre este método (**Meireles A., 2009**) : El mismo se clasifica en:

- ✓ Destilación con agua (hidrodestilación)
- ✓ Destilación con agua y vapor de agua.
- ✓ Destilación con vapor directo (arrastré con vapor de agua)

Estos métodos están sujetos a las consideraciones teóricas para una destilación de sistema de dos fases.

La separación se realiza en virtud de la diferencia en las presiones de vapor de los componentes. La fase vapor se enriquecerá en los componentes más volátiles (mayor presión de vapor) y la fase líquida se enriquecerá de los componentes menos volátiles. Una mayor diferencia en las presiones de vapor, permite una mayor facilidad en la separación y obtención de mayor pureza en los componentes separados.

Cuando la diferencia en las presiones de vapor es muy pequeña y se desea obtener un componente relativamente puro se requiere una Destilación Fraccionada. Un criterio a tener en cuenta es el aumento proporcional del punto de ebullición con el peso molecular de hidrocarburos.

- ✓ Destilación con agua (hidrodestilación): Cuando se emplea este método ponemos en contacto directo el material vegetal con agua hirviendo. El material puede flotar en el agua o quedar totalmente sumergido en dependencia de su peso específico o de la cantidad del mismo que se emplee; el agua ebulle por aplicación del calor, que puede ser directo, por enchaquetamiento o serpentines cerrados.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L. por GC.



El rasgo característico de este método radica en el contacto directo entre el agua en ebullición y el material vegetal, por lo que la acción química del agua sobre el material es máxima. Este método se emplea generalmente cuando el material es seco y no se altera por ebullición, además presenta algunos inconvenientes.

Este método aparece reportado en la mayoría de las investigaciones relacionadas con aceites esenciales, que incluyen su extracción. Algunos ejemplos de los artículos publicados en los dos últimos años muestran su amplio uso (Rezaeinodehi A. y Khangholi S., 2008; Al-Harrasi A. y Al-Saidi S., 2008; Palacios S. y col., 2009; Cosge B. y col., 2009; Miller S. y col., 2009; Cavara S. y col., 2009).

- ✓ Destilación con agua y vapor de agua: En este método el material vegetal es soportado en una rejilla insertada a determinada altura sobre el fondo del destilador. La parte más baja del mismo es llenada con agua hasta un límite por debajo de la rejilla pudiendo calentarse esta por cualquiera de los métodos anteriormente descritos. Se emplea vapor saturado (húmedo) de baja presión, el cual asciende a través del lecho del material vegetal.
- ✓ Destilación con vapor vivo o directo (Arrastre con vapor): Este método se diferencia del anterior en que la parte inferior del destilador no se llena con agua. El vapor vivo, sobresaturado con presiones superiores a la atmosférica, se introduce por el fondo del alambique pasando a través de la carga de materia vegetal contenida en un cesto o rejilla. Este vapor arrastra las gotas de esencia hacia la cámara condensadora donde son condensados los vapores de la esencia y del agua resultante de la destilación, obteniéndose dos fases: una oleosa y una acuosa.

Se plantea que es preferible su uso cuando se trata de drogas frescas como menta y hierba buena, llevándose las partes cosechadas directamente a la cámara de destilación, sin que excluya la posibilidad de destilar material seco: en este último caso debe evitarse que el vapor se recaliente excesivamente ya que las altas temperaturas pueden afectar la calidad del aceite y aumentar la presión en el interior del destilador debido a la resistencia opuesta a su paso a través del material.



Este método aunque, en los últimos años ha sido desplazado por la hidrodestilación y otras técnicas modernas de extracción, mantiene su vigencia, muestra de ello es su uso en reportes de los últimos años.

Wang Y., 2008; Edris A. y col., 2009; Oliveira V. y col., 2009, por solo citar algunos ejemplos emplearon la técnica como vía para extraer el aceite esencial en las especies *Chrysanthemum morifolium*, *Nigella spp* y *Cymbopogon citratus*, respectivamente.

EL mayor inconveniente de este método se basa en que cuando están secas las membranas celulares, no son apenas permeables y el aceite esencial no puede fluir hacia el exterior, por esta razón en los casos que lo amerite, se debe someter el material a una tritución o molienda previa y es recomendable embeber el material con vista a que no se descompongan los componentes químicos, pues con esta operación se contribuye a regular la temperatura además de ayudar a la volatilización del aceite el cual puede alterarse a temperaturas tan elevadas como las que se alcanzan durante el proceso.

Existen autores que plantean la extracción de aceites esenciales mediante el método de extracción súper crítica, utilizando dióxido de carbono líquido como agente extractor, esto se ha probado en algunas plantas como: Jengibre, Nuez Moscada, Vainilla, Pimiento, Clavo, Bayas, etc. Este tipo de extracción brinda las ventajas de obtener aceites con mayor grado de pureza y mejor porcentaje de extracción, este método es muy eficiente, pero muy costoso, lo que no justifica por el momento su aplicación en nuestras condiciones (**Moyler D., 1998**).

El rendimiento de los aceites esenciales depende exclusivamente de su naturaleza y de las condiciones en que se encuentre la materia prima vegetal; puede darse como promedio normal para este tipo de industria un rendimiento de 1 % al 2 % para la mayor parte de los aceites extraídos por arrastres en corriente de vapor de agua. Existen casos extremos, así es el caso de la esencia de rosas, el rendimiento cae a un 0.025 % es decir, que se requieren destilar 4000 libras de pétalos de rosa para obtener una libra de aceite. Por el contrario el aceite esencial de clavo se obtiene con un rendimiento de 16 % (**Dalla V., 1999**).

Existen también factores que influyen en la calidad y rendimiento del aceite esencial, teniendo en cuenta el momento oportuno de la cosecha, como son: el período de vegetación, condiciones atmosféricas, latitud, altitud, condiciones del terreno, etc. (**Cuellar A., 1983**).

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron L.* por GC.



1.2.3. Composición de los aceites esenciales.

El contenido y la composición química de los aceites esenciales en las plantas se modifica en dependencia de diferentes factores como: tipo de suelo, condiciones climáticas y por tanto la época del año, edad de la planta, estados vegetativos y varía en los diferentes órganos del vegetal. Prácticamente todos los aceites volátiles consisten en mezclas de principios químicos que a menudo son muy complejos, y varían ampliamente en su composición química, la mayoría de los cuales hierven entre 150 y 300 °C.

En ellos puede haber casi cualquier tipo de compuesto orgánico y solamente unos pocos poseen un sólo componente en porcentaje elevado (la esencia de mostaza contiene no menos del 93% de isotiocianato de alilo, la esencia de clavo contiene no menos de 85% de sustancias fenólicas, principalmente eugenol) (Calcines H., 1993).

La palabra aceite esencial puede inducir a engaño, pues la mayor parte de su composición no es grasa. Se trata de sustancias muy volátiles que gracias a esta característica son captadas rápidamente por el olfato. Los constituyentes químicos fundamentales de los aceites esenciales corresponden a los terpenoides, que en su inmensa mayoría son múltiplos de unidades de isopreno, C_5H_8 , unidos de cabeza a cola (extremos). La mayor parte de los aceites volátiles están constituidos principalmente por monoterpenoides, íntimamente relacionados con ellos están los sesquiterpenoides y los diterpenoides no oxigenados. La oxigenación de los terpenoides puede producirse naturalmente, como lo demuestra la presencia de alcoholes, aldehídos, cetonas, fenoles, éteres fenólicos, ésteres y óxidos. Estos compuestos oxigenados son los responsables de los olores, sabores y propiedades terapéuticas de los aceites volátiles (Bandoni A., 2000).

1.3. Análisis de aceites esenciales para su identificación y control de calidad. (Cuellar A., 1983; Bandoni A., 2000).

Los parámetros analíticos utilizados en el control de calidad de los aceites esenciales, se realizan con el objetivo de normalizar las especificaciones de calidad de producciones nuevas o realizar el control de calidad de una producción determinada, además permite conocer si cierto aceite esencial ha sido adulterado o deteriorado, por el tiempo o por falta de condiciones de almacenamiento adecuadas.

Estos parámetros incluyen:

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de Melaleuca leucadendron L. por GC.



1. Características organolépticas:

- ✓ Olor: Es sumamente variable el olor de los aceites volátiles, que es su propiedad característica, y que se modifica notablemente cuando les da el aire. El aceite de trementina se puede rectificar por destilación en atmósfera de gas carbónico o al vacío, de suerte que sea casi inodoro o que tenga olor suave agradable. Con todo, basta que dé por breve el aire para que vuelva a adquirir su conocido olor desagradable. Otros aceites que contienen terpenos se oxidan rápidamente con mengua de la delicadeza y finura de su olor y su sabor, como sucede particularmente en los de naranja y limón.
- ✓ Color: La mayoría de éstos son incoloros en estado puro y cuando están recién preparados o se pueden hacer incoloros mediante la redestilación. Si se les deja en el aire, adquieren diversos colores: por ejemplo, el de ajeno se vuelve verde, el de menta amarillo, el de orégano, rojo, el de canela, pardo.

El color azul del aceite de manzanilla (camomila) es una de las propiedades inherentes a este, aún recién destilado y según se dice, es causado por el hidrocarburo sumamente insaturado, azuleno o ceruleína $C_{15}H_{18}$.

- ✓ Sabor: Este es casi tan variable como el olor; algunos son dulces, otros más o menos picantes, acres, cáusticos o ardientes.
- ✓ Apariencia: Estos son transparentes y no presentan sedimentos.

2. Determinaciones físicas:

- ✓ Densidad relativa: Es la relación entre la masa de un determinado volumen de aceite con la masa de un idéntico volumen de agua a 20 °C. Mediante este análisis se determina cuando un aceite esencial ha sido alterado con otra sustancia ya que el peso específico del mismo tiene un rango oscilatorio para reconocer. El peso específico de los aceites volátiles oficiales varía desde 0.842 hasta 1.172. La mayor parte de ellos son más ligeros que el agua.
- ✓ Rotación óptica: Es el ángulo que gira el plano de polarización de una determinada longitud de onda de luz, al atravesar ésta el aceite. Está basado en la propiedad que tienen las sustancias orgánicas de poseer actividad óptica debida a los carbonos alfa presentes en ellas, lo que hace variar el plano de vibración de la luz polarizada. Esta importante propiedad física sirve para investigar la pureza de muchos aceites.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L. por GC.



- ✓ Índice de refracción: Es la relación entre el seno del ángulo de incidencia y el seno del ángulo de refracción en el momento en que una longitud de onda determinada pasa del aire al aceite esencial siempre que la temperatura sea constante. Cuando la luz atraviesa el límite entre dos medios transparentes (dióctrios) el rayo de luz incidente será reflejado o refractado según el índice de pureza de la sustancia por medio de una desviación, lo que nos hará comprobar el grado de pureza de dicha sustancia. Este es de suma importancia, pues sirve para determinar con exactitud la identidad y pureza de aceites y grasas.
- ✓ Solubilidad: El agua es mal disolvente de los aceites volátiles, aunque estos le transmiten el olor y el sabor cuando se ponen en contacto con ella. Los aceites volátiles se disuelven en alcohol, éter, cloroformo, ácido acético glacial, bencina, benceno y muchos otros disolventes orgánicos. El alcohol es mejor disolvente de los aceites oxigenados que de los terpenoides no oxigenados. Muchos aceites oficiales deben ajustarse a pruebas específicas de solubilidad en alcohol de 70, 80 o 95%. Los aceites esenciales son buenos disolventes de los aceites fijos, grasas, resinas, alcanfores, azufre y fósforo. La solubilidad en alcohol de una esencia da una idea de su contenido en monoterpenos: cuanto mayor sea la solubilidad, menor será el contenido de estos en la esencia o mayor será su contenido de compuestos oxigenados, como alcoholes o fenoles, es además una técnica muy sencilla para detectar adulteraciones provocadas por el agregado de aceite vegetal o mineral que son insolubles en alcohol.

3. Índices químicos:

Estos comprenden una serie de determinaciones químicas que se relacionan a continuación, cuya utilización va decayendo debido a la implantación de métodos instrumentales de análisis, principalmente cromatográficos y espectroscópicos, que tienen las ventajas de ser más rápidos, completos y sensibles, sin embargo en algunos casos (por razones económicas, logísticas, etc.) siguen siendo muy útiles y por eso se incluyen en casi todas las normas existentes.

- ✓ Índice de acidez: Es el grado de acidez de un aceite esencial y se define como el número de miligramos de KOH necesarios para neutralizar los ácidos libres existentes en 1 g de la muestra.
- ✓ Índice de éster: Indica el contenido de éster de la muestra. Se define como el número de miligramos de KOH necesarios para saponificar los ésteres contenidos en 1 g de la muestra.
- ✓ Índice de saponificación: Es la suma de los índices de acidez y de éster.

4. Características espectroscópicas:

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de Melaleuca leucadendron L. por GC.



- ✓ Ultravioleta – visible (UV-VIS)
- ✓ Infrarroja (IRR)

5. Características cromatográficas:

Un parámetro muy importante que se tiene en cuenta en la evaluación de la calidad de cualquier aceite esencial es el perfil cromatográfico para lo cual se emplea la cromatografía de gases como técnica de elección.

Los ensayos antes mencionados se realizan en Cuba según las Normas Cubanas Estatales de Calidad de los Aceites Esenciales (**Quert A., 1998**).

Teniendo en cuenta que en el presente trabajo se emplea la Cromatografía Gaseosa y la Cromatografía Gaseosa acoplada a la Espectrometría de Masa como técnicas en el análisis del aceite esencial en estudio. A continuación se realiza un resumen de los aspectos más relevantes de estas técnicas:

✓ **Cromatografía gaseosa.**

La cromatografía gaseosa es una técnica de separación basada principalmente en fenómenos de partición entre una fase móvil gaseosa (helio, argón, hidrógeno, nitrógeno) y una fase estacionaria constituida por un líquido muy viscoso retenido en el interior de una columna cromatográfica. La columna se coloca en un horno con temperatura regulable y programable, lo que nos permite influir de forma decisiva en la separación de los componentes de la mezcla. El cromatógrafo se completa con un sistema de inyección, que nos permite introducir la muestra en la columna y un detector, detecta las diferentes sustancias a medida que va saliendo de la columna, una vez separadas. Las columnas cromatográficas utilizadas actualmente son de tipo capilar: están constituida por un tubo de cuarzo flexible (sílice fundido) de diámetro muy pequeño (normalmente de 0.25mm) y muy largo (25-60m, hasta 200m): proporcionan alta resolución y permite separar las mezclas multicomponentes de sustancias de diversas polaridad y/o peso molecular (monoterpenos, sesquiterpenos, etc.).

Para el análisis de aceites esenciales suelen emplearse dos tipos de fase estacionaria: polietilenglicol de peso molecular 20000 (Carbowax 20M®, que es una fase polar, y polidimetilsiloxano (OV101®, ultra 1®, HP-1®, DB-1®, etc.), que es una fase polar. La Cromatografía de gases no solo es útil para estudiar la composición de un aceite esencial, como veremos seguidamente, sino que también es una herramienta indispensable en el control de la calidad.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de Melaleuca leucadendron L. por GC.



Para la identificación de los componentes del aceites esencial mediante CG se a utilizados frecuentemente la comparación de sus tiempo de retención (tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la aparición del pico cromatográfico) con los patrones. Sin embargo los tiempos de retención están fuertemente influenciados por numerosas variables, como la técnica de inyección, las variaciones de temperatura o flujo de los gases. Los índice de retención de calculan a partir de los tiempo de retención y por comparación con una serie de sustancia a las cuales se le asignan valores arbitrarios de índice de retención. La identificación de los componentes del aceite se realiza a través de comparación de los índices retención de las sustancias patrones en dos fases estacionarias polares y apolar, con los índices obtenidos para los componentes del aceite esencial. Si bien la información que proporcionan los índices de retención respecto a la identidad de los componentes de la esencia es muy valiosa, la identificación de los mismo no puede basarse exclusivamente en ellos, ye que muchos componentes tienen índice coincidentes en ambas columnas. Por ellos es necesario aplicar otras técnicas entres las cuales se destacan la cromatografía de gases acopladas a la espectrometría de masa y la resonancia magnética nuclear de carbono 13 (^{13}C - RMN).

El detector de cromatógrafo de gases puede ser de dos tipos: universal o selectivo. El más utilizados en el caso de las esencias es el ionización de llama (FID) que es de tipo universal. El empleo de detectores selectivos puede ser de gran utilidad para identificar la presencia de componentes nitrogenados o azufrados. Generalmente la cuantificación de los componentes de un aceite esencial se efectúa por normalización de las áreas de los pico del cromatograma obtenido con un detector FID. No suelen utilizarse factores de corrección. Esta simplificación, que supones que todos los componentes de la esencia tienen el mismo grado de respuesta al detector, es comúnmente aceptada dada la dificultad para disponer de los patrones necesarios para otros tipos de análisis más exactos, como por ejemplo con un patrón interno.

A continuación se citan múltiples trabajos publicados en los últimos 5 años que poseen en común la utilización de la cromatografía de gases y su combinación con la Espectrometría de masas en el análisis de la composición de diferentes aceites esenciales obtenidos por diferentes metodologías de las plantas medicinales.

Skala E. y col., 2007, estudiaron el aceite esencial, obtenido de las hojas de la *Salvia przewaskii Maxim*, por hidrodestilación y determinaron por GC la composición del mismo relacionando la misma con los resultados positivos obtenidos al comprobar su actividad antimicrobiana y citotóxica (Leucemia)

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron L.* por GC.



Los constituyentes del aceites esencial presentes en las frutas secas y de las *A. Kebia quinat* fueron estudiadas por **Kawata J. y col., 2007**, quienes aplicaron la GC y GC-MS. Como condiciones cromatográficas se empleo un gradiente de temperatura desde 60°C hasta 240°C respectivamente. Los cromatograma del aceite de los frutos y las espigas mostraron 93 y 103 compuestos volátiles respectivamente. Los componentes mayoritarios del aceite de los frutos fueron el Limoneno, Eugenol, Octanal y p-cimeno. Los monoterpenos y aldehído de las cadenas corta C6- C10 fueron las principales fracciones volátiles. Por su parte en los espigas fueron identificados 9 componentes y los principales componentes eran el ácido hexanoico, ácido palmitito, decadeina, y el hexanol, demás el aceite tenia alto contenido de ácidos grasos saturados e insaturados.

La composición de aceite esencial de *Teucrium seordium* fue estudiado por **Morteza K. y col., 2007**. La extracción del aceite se realizó por el método de hidrodestilación utilizando el equipo Clevenger por 4 horas mientras que para el análisis fue realizada por cromatografía de gases con temperatura programada desde 60°C por 5 min. Y a continuación por un ascenso hasta 220 a 4°C/min. Los componentes se identificaron por el tiempo de retención relativos a los alcanos C 9- C28. Los resultados mostraron la presencia de 56 compuestos presente en el aceite siendo componente mayoritario el β - Caryofileno que se encuentra en un 22.8%.

Zhang Y. y Wang ZZ., 2007, aplicaron la cromatografía gaseosa y la GC-MS para identificar y cuantificar los componentes presentes en el aceite esencial de tres especies *Phlomes*. Este estudio arrojo que los principales constituyentes eran el ácido hexadecanoico, el trans-fitol y el octadecatrieno también se comparo la composición de estos aceites esenciales con trabajos previos y se obtuvo que la composición de aceites varía grandemente con respecto el medio geográfico principalmente la proporción de componentes alifáticos y terpenoides. Por su parte **Yang X., 2008**, determinó los constituyentes aromáticos del aceite esencial de 2 variedades de una planta china llamada *Huajiao* entre las cuales la mayor concentración correspondió al limonero y al Sinaloa en ambas plantas. La GC permitió determinar que las plantas poseen los componentes comunes con alto impacto de carácter aromáticos como son: linalol, α -terpinal, myrcena, 1.8-cineloe, limonera y geraniol. En este mismo año **Cha JD. y col., 2007**; **Morteza, K. y col. 2007**, estudiaron el aceite presente en la *Artemisa feddei* y la *Teucrium scordium* respectivamente. De forma general en estos trabajos la composición de los aceites esenciales es bien diferente en cuanto a los componentes no existiendo coincidencia alguna en estos aspectos.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L. por GC.



Orav A. y col., 2008, estudiaron la variación en la composición del aceite esencial de la fruta de *Pimpinella anisum* L cultivadas en diferentes áreas geográficas de Europa. Empleando la cromatografía gaseosa y GC-MS. Se comprobó que el componente mayoritario del aceite era el trans-anetole y se precisó la variación en la composición del aceite obtenido de plantas cultivadas en diferentes regiones Europeas.

Chang HT. y col., 2008, lo hacen en la *Calocedrus macrolepis* var; mientras que **Andrade EH., 2008**, estudió la composición química de los aceites esenciales obtenidos en 22 muestras de hojas de *Piper marginatum* J. Colectadas en diferentes áreas del amazona Brasileño.

Investigadores Iraníes han realizados estudios recientes para determinar la composición de aceites volátiles presentes en plantas tales como *Valeriana Officinales* L, empleando la GC Capillary, y el *Thalectrum minus* L (**Safaralie A. y col., 2008; Taherpour A. y col., 2008**). En ambos trabajos se emplearon como condiciones cromatográficas una temperatura en el horno desde 60°C hasta 260°C a razón de 6°C/min, la temperatura del inyector fue de 270°C y la del detector de 280°C.

✓ **Cromatografía en fase gaseosa acoplada a la espectrometría de masa: (Bubbert H. y Jennet H., 2002)**

La identificación de los componentes del aceite se realiza a través de comparación de los índices retención de las sustancias patrones en dos fases estacionarias polares y apolar, con los índices obtenidos para los componentes del aceite esencial. Existe una recopilación muy importante de los índices, realizada por (**Adams R., 2001**).

Si bien la información que proporcionan los índices de retención respecto a la identidad de los componentes de la esencia es muy valiosa, la identificación de los mismo no puede basarse exclusivamente en ellos, ya que muchos componentes tienen índice coincidentes en ambas columnas.

Por ellos es necesario aplicar otras técnicas más sensibles y específicas como detector entre las cuales se destaca la **Espectrometría de masas** que es una técnica experimental que permite la medición de iones derivados de moléculas. El espectrómetro de masas es un instrumento que permite analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos e isótopos atómicos, separando los núcleos atómicos en función de su relación masa-carga (m/z). Puede utilizarse para identificar los diferentes elementos químicos que forman un compuesto, o para determinar el contenido isotópico de diferentes elementos en un mismo compuesto.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de Melaleuca leucadendron L. por GC.



Con frecuencia se encuentra como detector de un cromatógrafo de gases, en una técnica híbrida conocida por sus iniciales en inglés, GC-MS. El espectrómetro de masas mide razones carga/masa de iones, calentando un haz de material del compuesto a analizar hasta vaporizarlo e ionizar los diferentes átomos. El haz de iones produce un patrón específico en el detector, que permite analizar el compuesto. En la industria es altamente utilizado en el análisis elemental de semiconductores, biosensores y cadenas poliméricas complejas. (Hoffmann E. y Stroobant V., 1999) detallan los Fundamentos de la espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS) como la técnica de **detección de iones** se basa en el fenómeno conocido como **desbastado** (*sputtering*, en inglés) de partículas centradas en un blanco, que son bombardeadas por iones, átomos o moléculas. Dependiendo del intervalo de energía de la partícula primaria, ocurren colisiones elásticas e inelásticas:

- En el intervalo de los keV, las interacciones dominantes son las *elásticas*.
- Las colisiones *inelásticas* aumentan como aumenta la energía. Estas son más comunes en el intervalo de energía de los MeV.

El proceso de dispersión produce iones secundarios en el rango de las energías cinéticas traslacionales. Las distribuciones de energía son distintas para iones atómicos o moleculares. La eficiencia de ionización del SIMS es definida como la fracción de los átomos esparcidos que se vuelven ionizados. La eficiencia varía con respecto al elemento de análisis en varios órdenes de magnitud. Las influencias más obvias son el potencial de ionización y la afinidad electrónica de los iones negativos.

Un espectrómetro de masas tiene tres componentes fundamentales: la fuente de ionización, el analizador de masa y el detector. La fuente de iones es el elemento del espectrómetro que ioniza el material a ser analizado (el analito). Luego los iones son transportados por los campos magnéticos o eléctricos al analizador total. El analizador de masa es la pieza más flexible del espectrómetro de masa.

Utiliza un campo eléctrico o magnético para afectar la trayectoria o la velocidad de las partículas cargadas de una cierta manera y el elemento final del espectrómetro total es el detector. El detector registra la carga inducida o la corriente producida cuando un ión pasa cerca o golpea una superficie. En un instrumento de exploración la señal es producida en el detector durante la trayectoria de la misma (en qué m/z) y producirá un espectro de masa, un expediente del m/z 's en el cual los iones están presentes (Hoffmann E. y Stroobant V., 1999).



Teniendo en cuenta la facilidad de aplicación de esta técnica en los aceites esenciales, la misma constituye la técnica de elección en los estudios de composición de los mismos. Una muy breve representación de trabajos reportados en la literatura da fe de esta afirmación: **Apel M. y col., 2009; Mohsen H. y Ali F., 2009; Aboaba S. y col., 2009; Sonboli A. y col., 2009; Shafaghat A. y col., 2009; Yousefzadi M. y col., 2009.** En todos estos trabajos la técnica es utilizada para el estudio de aceites que poseen entre sus componentes el 1,8 Cineole, componente mayoritario del *Melaleuca leucadendron* L.

1.4. Determinación de los parámetros de desempeño de los métodos analíticos:

Bibliografía consultada: Monteagudo U., 2008.

Validación de los métodos analíticos: La validación de los métodos analíticos utilizados en la actividades de control desempeña un papel determinante pues de ellos depende la comprobación confiable y reproducible de los índices de calidad de las materias primas y productos, lo cual contribuye notablemente al aseguramiento de la calidad, seguridad y eficiencia de los mismos.

Existen características de funcionamiento que definen la aptitud de un método analítico para el uso al que se destina. Dichas características son las siguientes.

Características de practicabilidad: Son las que deciden si el procedimiento analítico es fácil o difícilmente realizable en la práctica. Los parámetros de practicabilidad se evalúan en la fase de desarrollo del método analítico: tiempo, coste, tamaño de la muestra, calificación del personal, tipo de equipo e instrumentación, condiciones de seguridad, etc.

Características de idoneidad: Son el conjunto de parámetros que garantizan que el sistema responde, en el momento del análisis, a los requisitos fijados en la validación del método. La idoneidad verifica el buen funcionamiento del sistema (instrumento y método) en el momento de su uso.

Características de fiabilidad: Son las que demuestran la capacidad de un método analítico para mantener a lo largo del tiempo los criterios fundamentales de validación. Los parámetros que expresan la fiabilidad de los métodos analíticos son: linealidad, exactitud, precisión, límite de detección y cuantificación y selectividad.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de Melaleuca leucadendron L. por GC.



1.4.1. Linealidad:

Bibliografía consultada: Monteagudo U., 2008.

Este estudio se efectuará tanto sobre soluciones patrón de analito como sobre muestras problemas que contengan concentraciones crecientes del analito.

Los estudios de linealidad responderán a diseños similares a los que se describen a continuación:

a) El ensayo se puede efectuar tanto con material de referencia del analito, como con muestras problemas que contengan concentraciones crecientes de analito que cubran el intervalo del método. Cuando se trata de la valoración de una materia prima se analizarán de 3 a 5 soluciones patrón en un intervalo de concentraciones entre 80 y 120 % de la concentración teórica. Cuando se trata de la valoración del principio activo en un producto terminado se analizarán entre 5 y 7 soluciones patrón en un intervalo de concentraciones entre 50 y 150% de la concentración teórica del principio activo en la muestra. En los dos casos el análisis se realizará como mínimo por triplicado

b) Se evaluarán los datos estadísticamente a fin de verificar la linealidad y proporcionalidad según se describe a continuación:

- Significación de la regresión: Se determinará el coeficiente de correlación (debe ser $\geq 0,990$) y el de determinación (valores superiores a 0,98).
- Verificación de linealidad: Se efectuará por determinación del CV de los factores de respuesta (cociente respuesta / concentración), el cual no será superior al 5%. También se evaluará la varianza de la pendiente de la línea de regresión.
- Verificación de proporcionalidad: Los resultados de este ensayo deberán incluir el 0 para el grado de probabilidad definido.
- Prueba de falta de ajuste: Se implementará para demostrar que los valores se ajustan a una línea recta.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L. por GC.



1.4.2. Precisión:

Bibliografía consultada: Monteagudo U., 2008.

La precisión de un procedimiento analítico expresa el grado de concordancia entre una serie de mediciones obtenidas a partir de la misma muestra homogénea bajo las condiciones prescritas.

Debe investigarse la precisión utilizando muestras homogéneas, auténticas. Sin embargo, si no es posible obtener una muestra homogénea se emplean muestras artificialmente preparadas o una disolución de la muestra. La determinación de la precisión se realizará a 3 niveles, siempre que proceda: intraensayo (repetibilidad), interensayo (precisión intermedia) e interlaboratorios (reproducibilidad). Las muestras a incluir en este estudio serán lotes de producción (muestras reales).

a) Evaluación de la repetibilidad: (1) se utilizarán 2 o más concentraciones de una muestra homogénea, las cuales serán analizadas 6 veces como mínimo en una misma corrida, (2) se prepararan muestras de 3 concentraciones diferentes, una inferior, media y superior del intervalo especificado y realizar 3 replicas de cada una o (3) realizar un mínimo de 6 determinaciones a la concentración del 100 %.

b) Evaluación de la precisión intermedia: Se implementará un diseño donde se evaluarán 3 concentraciones de una muestra (como mínimo) en duplicado, por al menos 2 analistas en 3 días diferentes. Se recomienda, siempre que sea posible, que cada analista emplee instrumentos y materiales diferentes.

c) Evaluación de la reproducibilidad: Se implementará en forma de estudio interlaboratorio. Se evaluarán de 3 a 5 muestras (en un esquema de 2 a 4 concentraciones por muestra) por duplicado, involucrando diferentes analistas, reactivos e instrumentos en cada laboratorio. Las muestras se analizarán en 6 ensayos independientes como mínimo.

1.4.3. Especificidad:

Bibliografía consultada: Monteagudo U., 2008.

La especificidad es la capacidad de un método analítico de detectar inequívocamente el analito en presencia de compuestos que pueden estar presentes en la muestra (impurezas, productos de degradación, componentes de la matriz, etc.).

Esto implica en ensayos de identificación asegurar la identidad del analito en cuestión y en ensayos cuantitativos asegurar que todo el procedimiento analítico ejecutado brinda una respuesta exacta del contenido del analito en la muestra.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L. por GC.



La tendencia mayoritaria es la utilización de métodos relativamente específicos (cromatografía líquida y de gases) en los que la presencia de otros componentes tienen escasa influencia en los resultados.

La especificidad de un método analítico se determina comparando los resultados del análisis de muestras conteniendo impurezas, productos de degradación, sustancias relacionadas o excipientes con los resultados del análisis de muestras que no contienen dichas sustancias.

La evaluación de la especificidad, en función de las características de los métodos de ensayo, deberá estar dirigida a los siguientes aspectos:

- a) Identidad: Se demostrará que el método es capaz de identificar el principio activo en presencia de otras sustancias.
- b) Pureza: Se demostrará que el método permite una evaluación cualitativa o cuantitativa de las impurezas específicas.
- c) Determinación cuantitativa de un componente (o para ensayos de actividad): Se asegurará que la señal medida por el método analítico corresponde exclusivamente al analito sin interferencias de excipientes, productos de degradación y/o impurezas.

1.4.4. Exactitud:

Bibliografía consultada: Monteagudo U., 2008.

La determinación de la exactitud deberá realizarse por estudios de adición y recuperación de cantidades conocidas de muestras de referencia o patrones a excipientes a fin de comparar el valor medido experimentalmente (observado) con el valor real (esperado).

La determinación de este parámetro podrá realizarse por diferentes métodos:

- a) Análisis repetido de una muestra de concentración conocida: Se realizará por adición de una concentración conocida de un analito o patrón a un placebo. Deberán implementarse entre 6 y 10 ensayos y se calculará el porcentaje de recuperación. Se implementarán pruebas de significación apropiadas.
- b) Análisis repetidos de muestras de concentraciones conocidas diferentes: Se seguirá un diseño similar al anterior. Se utilizarán 3 concentraciones como mínimo (intervalo alto, medio y bajo) y se realizarán los análisis por triplicado. En este tipo de estudio, se evaluará la influencia del factor concentración.
- c) Método de adición de patrón: Se tomarán alícuotas de una muestra a las que se añaden cantidades conocidas de un patrón, dejando una alícuota como control de muestra.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L. por GC.



Dichas muestras se analizarán en paralelo por triplicado y se evaluarán contra una curva de calibración preparada con soluciones patrones. Se calculará la recuperación como medida de exactitud y su significación por pruebas estadísticas apropiadas.

1.4.5. Limite de Detección y Cuantificación:

Bibliografía consultada: Monteagudo U., 2008.

Limite de cuantificación: Cantidad más baja de analito que puede medirse cuantitativamente en una muestra con exactitud y precisión aceptables.

Limite de detección: Cantidad más baja de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse, como una concentración o cantidad exacta.

La evaluación de ambos parámetros puede efectuarse y responder a los siguientes diseños.

- a) Relación señal ruido: Se compararán la respuesta del blanco (matriz sin analito) con las muestras que contienen pequeñas cantidades de analito adicionadas al blanco. Deberá obtenerse el nivel medio de ruido del blanco y se multiplicará por 2 o 3 para el límite de detección o por 6 o 10 para el de cuantificación. Posteriormente se compararán estos valores con las respuestas de las series blanco + analito y se hallará la concentración de analito que corresponda al valor de la señal.
- b) Estudio de la menor cantidad detectable: Muy recomendado para cromatografía de capa delgada en la detección de impurezas y/o productos de degradación en IFA. Se determinará la carga máxima de IFA que se separa correctamente en las condiciones cromatográficas establecidas, y posteriormente se prepararán diluciones constantes de esta IFA (a una concentración ya evaluada) más cantidades decrecientes del analito a estudiar. El límite de detección se calculará a partir de la dilución en que no sea posible distinguir entre la respuesta del analito y la del blanco. El resultado se expresará en valor absoluto o en porcentaje (con respecto a la carga máxima).

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L. por GC.



1.5. Melaleuca leucadendron L.

- ✓ **Aspectos generales de la planta.** Estos aspectos aparecen citados en la página web www.rednaturaleza.com; www.ecovisiones.cl, consultada en junio, 2009.

El *Melaleuca leucadendron* L.: es un árbol de corteza blanquecina perteneciente a la familia del eucalipto. El aceite esencial se extrae mediante destilación al vapor de las de las hojas y capullos. Tiene una tonalidad verdoso-amarillento lo cual lo distingue de otros aceites de especies provenientes del género *Melaleuca*. Tiene un olor muy penetrante, medicinal y alcanforado.

Componentes activos: Aceite esencial (1%), rico en cineol o eucaliptol (entre 45 y 65%), l-pineno, terpineol, l-limoneno, dipenteno, aldehídos (valeraldehído, benzaldehído), sesquiterpenos, azuleno. La corteza contiene ácido betulínico.

Uso Terapéutico: Inhalado se utiliza para combatir el resfriado y otras infecciones respiratorias. Inhibe las bacterias que se forman en el moco y descongestiona las fosas nasales. También ayuda a reducir los dolores de garganta y de cabeza. Pero es un fuerte estimulante por lo que se desaconsejable utilizarlo antes de irse a dormir, salvo que se haya mezclado con otro aceite sedante para contrarrestar el efecto. A causa de sus efectos antisépticos, el aceite esencial es un componente apropiado para cremas y aceites para la piel, muy útiles en caso de enfermedades cutáneas y heridas. Además, es eupéptica, hemostática, digestiva y aplicada externamente tiene propiedades rubefacientes. Terapéuticamente se utiliza en fricciones contra el dolor reumático, la artritis y la gota. Pero tiene el inconveniente de ser fuertemente irritante, por lo que es mejor sustituirlo por otros aceites con las mismas propiedades como el niauli o en caso de utilizarlo que esté muy diluido. Tiene efectos calmantes y alivia en caso de dolor de muelas y de oído.

Características Botánicas: El *Melaleuca leucadendron* L. es un árbol perteneciente a la familia de las mirtáceas, que se caracteriza por sus flores regulares, de cinco pétalos, con numerosos estambres y el rudimento del fruto situado debajo de la flor. La naturaleza del fruto suele ser bastante variable en esta familia. Se compone de unas 2800 especies, que predominan en los países cálidos, arbustos o árboles entre los que se cuentan los más elevados del globo. Por lo común las hojas nacen parejas, esto es, dos a dos en cada nudo, una enfrente de otra, y tienen numerosos y diminutos depósitos de esencias muy aromáticas, lo mismo que los frutos.

Floración: El *Melaleuca leucadendron* L. florece en primavera. De la recolección interesan las hojas, muy ricas en esencia. Se deben recolectar cuando el árbol todavía no se encuentra florido, o cuando se están

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L. por GC.



abriendo las flores, coincidiendo esta época en primavera. Esta esencia es muy aromática, por lo que se deben extremar las condiciones de almacenamiento a fin de conservar la mayor parte posible de la misma.

Partes utilizables de la planta: Las hojas frescas y la corteza de las ramas jóvenes. Las hojas del cayeput contienen tanino, resina, sustancias amargas y, sobre todo, un **aceite esencial**: se trata de un líquido entre amarillo y verdoso, de olor muy agradable, que está compuesto principalmente de pineno, cineol, dipenteno, un hidrocarburo, mirtol y mirtenol.

En general, todas las plantas de esta familia son extremadamente ricas en esencia, siendo esta de parecida composición en todas ellas. Los taninos confieren a la planta propiedades astringentes.

Formas de Administración:

.- Decocción. En un litro de agua se hierven 20 g de hojas durante cinco minutos; se filtra el líquido, se edulcora con miel y se toman seis cucharadas al día hasta que remita la inflamación bronquial.

.- Infusión. Se prepara a partir de una cucharada de café por taza, que corresponde a 15 g de la planta fresca por litro de agua. Se pueden tomar tres tazas al día.

.- Esencia. De 1 a 2 gotas, tres veces al día, antes de las principales comidas. La esencia también se puede aplicar en forma de aerosol, o como inhalaciones.

Es conveniente recordar que se trata de una esencia, por lo que se debe tener precaución y no aplicar grandes dosis a niños, por la posible aparición de reacciones alérgicas. Lo mejor es dejarse aconsejar por un profesional médico o farmacéutico.

✓ **Estudios fitoquímicos y farmacológicos.**

Los estudios realizados a la planta son pocos y los primeros datan de principios de la década de los 90. Constituyentes biológicamente activos de la *Melaleuca leucadendron* L.: inhibidores de la liberación inducida de histamina. **Tsuruga T. y col., 1991**, en un estudio realizado por un grupo de investigadores de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Tokio en Japón obtuvieron, mediante extractos realizados de cloroformo y metanol a los frutos de la *Melaleuca leucadendron* L., metabolitos activos que inhibieron en gran medida la liberación de histamina. El ácido Orsolic, un triterpeno fue el compuesto mas activo contenido en el extracto de cloroformo.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L. por GC.



Hiermann A. y Bucar F., 1994, publicaron un trabajo sobre la Influencia de algunas plantas medicinales tradicionales de Senegal en la biosíntesis de prostaglandina donde se investigaron extractos acuosos de *Melaleuca leucadendron* L. para el cual no se obtuvo resultado sobre la biosíntesis de prostaglandina (PG12, PGD2, PGE2).

Por otra **Sweeney, M., y col. 1994**, realizaron un estudio sobre la Inmunodetección y comparación del polen de la *Melaleuca leucadendron* L.; donde extractos de polen de dicha planta se analizaron para la reactividad cruzada antigénica y alérgica usando SDS-PAGE y Western-blotting con resultados satisfactorios.

Los primeros estudios fitoquímicos de la planta fueron realizados por **Lee C., en 1998**, quien aisló un nuevo nortriterpeno nombrado como 28-norlup-20(29)-ene-3beta, 17beta-diol de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L. por métodos químicos y espectrales.

Nawawi A. y col., 1999, estudiaron los efectos inhibitorios de plantas medicinales de Indonesia sobre la infección del virus del herpes simple tipo 1, realizando un estudio con extractos de metanol de la fruta de *Melaleuca leucadendron* L. para ensayos de infección en ratones ASV-1, donde dicho extracto prolongo significativamente el desarrollo de las lesiones cutáneas y redujo la mortalidad.

Los estudios de **Lee C. y Chang M., 1999**, determinaron cuatro nuevos triterpenos presentes en el corazón de la *melaleuca leucadendron*. Los nuevos triterpenos upha-7,24-diene-3beta, 22beta-diol (1), 20-taraxastene-3alpha, 28-diol (2), 3alpha, 27-dihydroxy-28, 20beta-taraxastanolide (3), y 3alpha-hydroxy-13(18)-oleanene-27, 28-dioic acid (4), se le determinaron sus estructuras y estereoquímica mediante el análisis espectroscópico.

Más recientemente **Farag R. y col., 2004**, realizaron la evaluación química y biológica de los aceites esenciales de diferentes especies de *Melaleuca*; en este estudio se analizaron los aceites esenciales de las hojas frescas de *M. ericifolia*, *M. leucadendron* L., *M. armillaris* y *M. styphelioides*, los cuales fueron aislados por hidrodestilación y analizados con un cromatógrafo de gases y espectrometría de masa. Este aceite esencial, cultivado en Nigeria, resultó rico en 1,8-cineole (64.30%); seguido del terpinen-4-ol (18.79%). Los aceites esenciales de estas especies poseían actividad antimicrobiana y antifúngica, siendo la *M. ericifolia* la de efectos inhibitorios mas altos frente a *Bacillus subtilis* y *Aspergillus niger*. Se realizó también un estudio de actividad de los aceites frente al virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1), en células de riñón de monos verdes de África por ensayos de placa reducida. El aceite volátil de *M. armillaris* fue el mas efectivo con hasta un (99%) por encima del de *M. leucadendron* L. (92%) y *M. ericifolia* (91.5%).

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L. por GC.



Estudios antioxidantes demostraron que el aceite esencial de la *M. armillaris* mostró un efecto marcado, mejorando la vitamina E, la vitamina C y los parámetros dismutase superóxidos por lo que puede ser usado como un supresor de radicales libres.

En el año 2006 fueron publicados dos trabajos de la planta. **Usia T. y col., 2006**, realizaron un estudio para evaluar la inhibición de CYP3A4 y CYP2D6 en mecanismos por parte de plantas medicinales Indonesas, dio a conocer que extractos de metanol realizados a las hojas de la *Melaleuca leucadendron* L. mostraron un crecimiento de un 30% de inhibición de CYP2D6, dependiente de a NADPH. Por su parte **Amer A. y col., 2006** evaluaron el aceite como repelente de mosquitos, para el estudio se disolvió el mismo en diferentes solventes al 1% y se obtuvieron resultados muy satisfactorios en todos los casos.

Recientemente, extractos etanólicos de la planta fueron estudiados por investigadores cubanos, **Valdés A. y col., 2008**, quienes evaluaron la actividad antifúngica, *in Vitro*, frente a *Microsporum canis* y *Candida albicans*, antibacteriana (*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*) y antiprotozoaria (*Trypanosoma b. brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum* y *Plasmodium falciparum*), obteniéndose que el extracto de la *Melaleuca leucadendron* L tenía una actividad selectiva frente a los microorganismos analizados.

1.6. Consideraciones finales del estudio bibliográfico.

Las hojas de la *Melaleuca leucadendron* L son utilizadas en la medicina tradicional cubana como antiséptico de las vías respiratorias. Los estudios fitoquímicos de la planta son escasos y tampoco hay reportes de la relación de estos con la acción citada. Teniendo en cuenta que la tradición en Cuba incluye su uso como antiséptico de las vías respiratorias y conociendo que dicho aceite esencial pudiera ser el responsable de esta acción, en el presente trabajo se estudia la composición del mismo y concretamente se buscan componentes que pudieran estar relacionados con la acción antiséptica. Por otra parte es importante destacar que en Cuba existe un fitofármaco producido en los laboratorios de fitofármacos, que es recomendado para las infecciones de las vías respiratorias altas.

A pesar de la importancia farmacéutica de estas acciones para la terapéutica cubana no existen ingredientes activos estandarizados que puedan ser usados en la elaboración de formas farmacéuticas para su dispensación, no existe una monografía analítica, reportada en las farmacopeas recientes, y tampoco hay un metabolito responsable de esta acción farmacológica.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de Melaleuca leucadendron L. por GC.



Después de haberse realizado una exhaustiva revisión de la literatura especializada se puede resumir lo siguiente: (I)- Los aceites esenciales poseen una gran cantidad y variedad de componentes, entre los cuales abundan aldehídos de cadena corta, terpenos, sesquiterpenos, etc.; (II)- Las técnicas de extracción de aceite más empleadas suelen ser la hidrodestilación y el arrastre con vapor (III)-La técnica analítica de elección para cuantificar los componentes presentes en un aceite es la cromatografía de gases; (IV)- Las acciones farmacológicas más abundantes en los aceites esenciales son la antibacteriana y la antifúngica; (IV)- Los estudios reportados de la planta son escasos.



CAPITULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realiza en el Departamento de Farmacia de la Facultad de Química y Farmacia, durante la etapa comprendida desde Septiembre de 2008 hasta Junio de 2009; utilizando las partes aéreas de la planta procedente del laboratorio de fitofármacos de Topes de Collantes.

Se emplea en todos los procedimientos desarrollados, cristalería específica de laboratorio, previamente descontaminada. Se emplean reactivos de calidad analítica y equipos certificados como aptos para el uso.

2.1. Aceite esencial, equipos y reactivos.

Aceite esencial

Para la obtención del aceite se utilizaron las hojas secas de *Melaleuca leucadendron* L. recolectadas en las montañas del macizo Guamuaya en la zona de Topes de Collantes. El aceite se extrajo utilizando el método de Hidrodestilación empleando una Trampa tipo Clevenger.

Equipos:

- ❖ Balanza digital, Boeco, *Alemania*.
- ❖ Cromatógrafo Gaseoso, *Agilent 6890N series, Estados Unidos*.
- ❖ Refractómetro digital de Abbe, *WYA-S, Alemania*.
- ❖ Espectrofotómetro UV-VIS, Termo electrón, *Genesys 10UV, Estados Unidos*.
- ❖ Espectrofotómetro IR,
- ❖ Cromatofolios Al de sílica gel 60, *Fluka*.
- ❖ Microjeringuilla de 20 µL, *Hamilton, USA*.
- ❖ Cámara para cromatografía (25 x 10cm)
- ❖ Baño ultrasónico, *BRANSON 1510, GRD*.
- ❖ Lámpara UV, *CAMAG*.

Reactivos y disolventes utilizados:

- ❖ Ácido Clorhídrico, *Panreac*.
- ❖ Metanol, *Lichrosolv, Merck*
- ❖ Ácido Acético Glacial, *Merck*.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de Melaleuca leucadendron L. por GC.



- ❖ Almidón, *Merck*.
- ❖ Fenolftaleína, *Merck*.
- ❖ Sulfato de sodio anhidro, *Merck*.
- ❖ Cloruro de sódio, *Merck*.
- ❖ Hidróxido de Potasio, *Panreac*.
- ❖ Cloroformo, *Fluka*.
- ❖ Tiosulfato de Sodio, *Merck*.
- ❖ Diclorometano, *Merck, Alemania*.
- ❖ Tolueno, *Panreac*.
- ❖ Éter, *UNI-CHEM*.
- ❖ Ioduro de Potasio, *Merck*.
- ❖ Bromuro de Yodo, *Merck*.
- ❖ Acetona, *UNI-CHEM*.
- ❖ Ferrocianide de Potasio, *UNI-CHEM*.
- ❖ Ácido Tricloroacético, *EPB "Carlos J Finlay"*
- ❖ Cloruro Férrico, *Panreac*.
- ❖ Hexamina, *BDH*.
- ❖ Sulfato Ferroso
- ❖ TetraMetil Murexide, *UNI-CHEM*.
- ❖ Ácido EtilendiaminoTetracético (EDTA), *UNI-CHEM*.
- ❖ Ácido Ascórbico, *UNI-CHEM*.

2.2. Obtención del aceite. Determinación del rendimiento de aceite esencial obtenido a partir las hojas de *Melaleuca leucadendron* L.

2.2.1. Determinación del contenido de aceite en la planta, utilizando la Trampa de Clevenger.

El método más tradicional utilizado es el que prescribe la farmacopea Europea (**Farmacopea Europea 2005**). Se basa en efectuar una Hidrodestilación de un peso conocido de material vegetal y recoger el aceite esencial en un tubo graduado (1mL dividido en 0,01mL) que se encuentra en un colector de destilación especialmente diseñado para este tipo de análisis.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L. por GC.

El colector se acopla a un matraz que contiene el material vegetal y un cierto volumen de agua, el cual se calienta mediante una manta calefactora de potencia regulable para provocar la destilación. Tras la destilación, se puede medir el volumen de esencia destilado y fácilmente calcular el contenido, que se expresa en porcentaje volumen/peso (mL de aceite esencial por 100g de material vegetal).

Aunque este equipo también llamado **trampa de tipo Clevenger**, (Figura 2.1) está universalmente aceptado, y esta citado salvo mínimas variaciones, por casi todas las normas existentes sobre extracción de esencia, conviene tener en cuenta que los resultados que se obtienen con el mismo no siempre pueden extrapolarse a un proceso realizado a escala industrial. Pero si se quiere utilizar la información obtenida del equipo siempre es conveniente ensayar previamente en una escala intermedia o piloto, para confirmar los resultados en escala de laboratorio y así poder extrapolar a escala industrial.

Finalmente, debe considerarse que el proceso que se realiza en esta trampa, es más un proceso de cohobación que de destilación simple, pues el agua condensada en el refrigerante vuelve al matraz o balón extractor, por lo que permite hacer una extracción más exhaustiva de los componentes hidrosolubles.

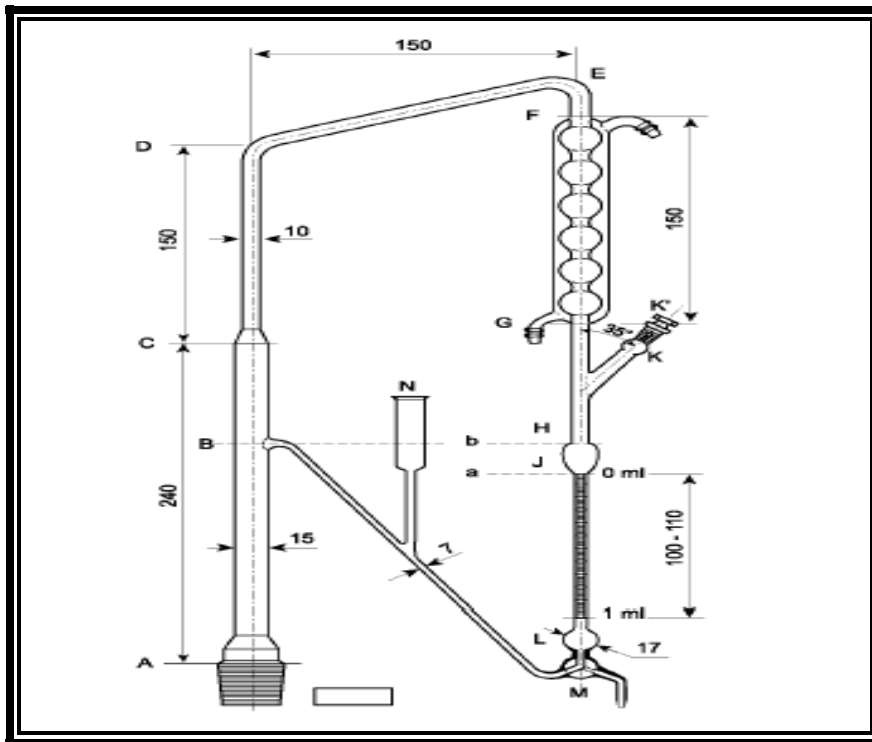


Figura 2.1. Equipo de destilación de aceite esencial (Trampa Clevenger)

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L. por GC.

2.2.2. Obtención del aceite empleando la técnica de arrastre con vapor.

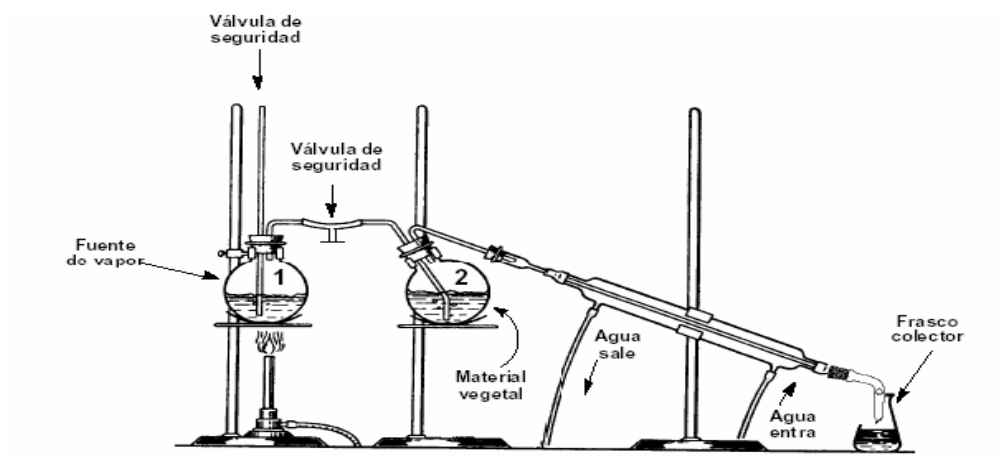


Figura 2.2. Equipo de arrastre con vapor.

Esta técnica incluye 3 partes fundamentales (Figura 2.2): 2 balones y un condensador.

Procedimiento: Colocar el agua destilada en el balón no. 1: generador de vapor y agregue cuerpos porosos. En el matraz no. 2 colocar el *Melaleuca leucadendron* L cortado en trozos pequeños. Al tapar este matraz, cuidar que la conexión de vidrio no se obstruya con los trozos de la planta; pues de ser así, no habrá paso de la corriente de vapor.

Calentar con el mechero el matraz no. 1 hasta ebullición, con el fin de generar el vapor que pasará al matraz no. 2, extrayéndose de esta manera el aceite esencial del *Melaleuca leucadendron* L.; el cual es inmediatamente arrastrado por el vapor de agua en un proceso de codestilación.

Suspender el calentamiento cuando el volumen del destilado sea de 100 o 150 mL aproximadamente; de este codestilado, extraer totalmente el aceite esencial, mediante extracciones con acetato de etilo, las fases acuosas se desechan y los extractos orgánicos se colectan en un matraz Erlenmeyer, agregar entonces la cantidad necesaria de sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua remanente. Decantar.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L. por GC.



2.2.3. Determinación del rendimiento de aceite esencial obtenido a partir las hojas de *Melaleuca leucadendron* L.

Antes de proceder a realizar la determinación del rendimiento de aceite fue necesario determinar el contenido de agua en el material vegetal, lo que permitió realizar la determinación del rendimiento en base a droga seca.

✓ Determinación del contenido de agua en la planta por el método del tolueno.

Aparato. El aparato ver (Figura 2.3) está formado por un matraz de vidrio unido por un tubo de conexión a un tubo cilíndrico de condensación con un tubo colector graduado. El refrigerante está situado sobre el tubo cilíndrico.

El tubo colector está graduado en 0,1 mL. La fuente de calor que debe utilizarse preferentemente es un calentador eléctrico regulado por un reostato o un baño de aceite. La parte superior del matraz y el tubo de conexión pueden estar aislados.

Procedimiento. Limpiar el tubo colector y el refrigerante del aparato, enjuagar cuidadosamente con agua y después secar. En el matraz seco introducir 200 mL de *tolueno R* y aproximadamente 2 mL de *agua R*. Destilar durante 2 h, dejar enfriar durante 30 min. aproximadamente y leer el volumen de agua con una aproximación de 0,05 mL. A continuación introducir en el matraz la cantidad de sustancia a examinar (10 g), pesada con una aproximación del 1 %, que pueda contener de 2 mL a 3 mL de agua aproximadamente. Si se trata de una sustancia pastosa, pesarla en una navicilla constituida por una lámina de metal. Calentar suavemente el matraz durante 15 min. en presencia de algunos trozos de material poroso para asegurar una ebullición regular. Cuando el tolueno empieza a hervir, destilar a la velocidad de aproximadamente 2 gotas por segundo, hasta que se haya arrastrado la mayor parte del agua, seguidamente aumentar la velocidad de destilación hasta 4 gotas por segundo. Cuando toda el agua ha sido arrastrada, enjuagar el interior del tubo refrigerante con *tolueno R*. Continuar la destilación durante 5 min. , parar la calefacción y dejar enfriar el tubo colector hasta temperatura ambiente. Hacer caer cualquier gota de agua adherida todavía a la pared del tubo. Cuando el agua y el tolueno se hayan separado, leer el volumen de agua y calcular en porcentaje la concentración en agua de la sustancia a examinar a partir de la siguiente relación:

$$1000(n_2-n_1)/m$$

m = masa en gramos de la muestra a examinar.

n_1 = número de mililitros de agua obtenidos en la primera destilación.

n_2 = número total de mililitros de agua obtenidos en las dos destilaciones.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L. por GC.

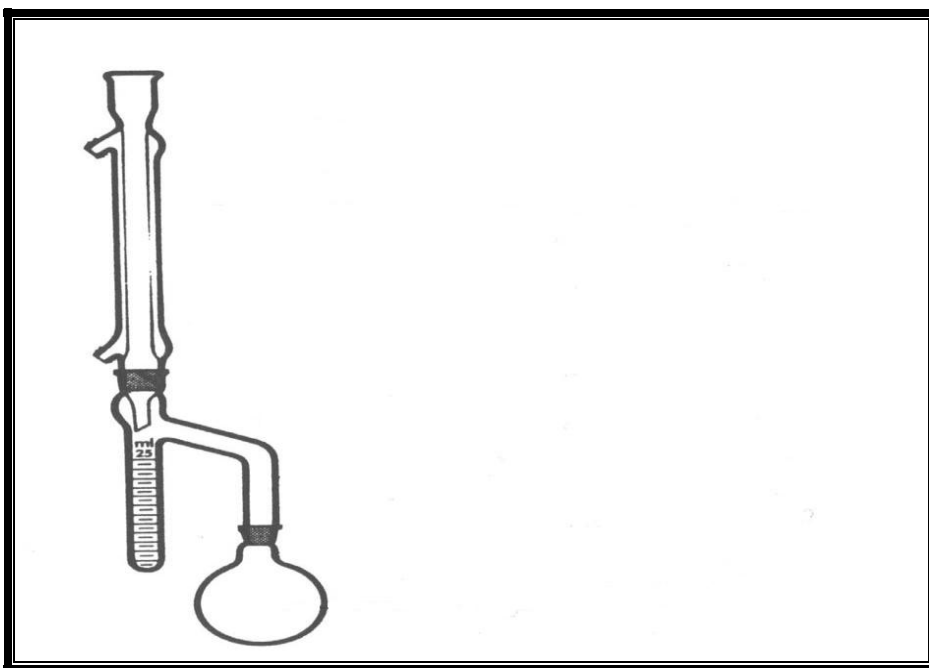


Figura 2.3. Equipo de arrastre de agua en aceites esenciales (método del tolueno)

✓ **Determinación del rendimiento de aceite**

Tras la destilación, se midió volumen de esencia destilado, en ambas técnicas y se calculó el contenido, que se expresó en porcentaje volumen/peso (mL de aceite esencial por 100g de material vegetal) en base a la droga seca.

2.3. Determinación de la composición del aceite utilizando la técnica GC-MS.

El análisis se realizó en un cromatógrafo GCMS-QP5050A Shimadzu.

Condiciones cromatográficas

- Se utilizó una columna capilar DB-5MS.
- Como gas portador se utilizó He. Flujo del gas a través de la columna de 0,7 mL/min con una razón de separación de 49 mL/min.
- Programa de temperatura del horno: 50-150 a razón de $3^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ manteniendo la temperatura de 150 $^{\circ}\text{C}$ durante 15 min (el tiempo del análisis es de 48 min)
- Temperatura del inyector de 250 $^{\circ}\text{C}$.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de Melaleuca leucadendron L. por GC.



- Temperatura de la interfase de 290 °C. Impacto electrónico estándar (EI); rango de escaneo de mas de 50-500 amu a 70 eV; una velocidad de escaneo de 2000 y un voltaje de 0,80 kV.

Preparación de la muestra

Se realizaron dos identificaciones a partir de los aceites obtenidos por los métodos de Hidrodestilación y Arrastre con vapor respectivamente. Para ambas muestras de aceite esencial se tomó:

- 50 µL y se diluyeron en 1 mL de acetona (muestra concentrada).
- 20 µL y se diluyeron en 1 mL de acetona (muestra diluida).

2.4. Determinación de los índices de calidad del aceite esencial obtenido a partir de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L.

Los índices de calidad del aceite fueron seleccionados teniendo en cuenta los incluidos en las monografías de control de la calidad de aceites esenciales reportados en las farmacopeas relativamente recientes (**B.P., 2004 y Eur Ph., 2005**), *estos son*: Espectro UV, Índice de refracción, Densidad relativa, Índice de saponificación, Índice de acidez e Índice de peróxidos. A continuación se exponen los procedimientos de trabajo para cada ensayo.

2.4.1. Características organolépticas: Se determinó el olor, color, sabor y apariencia del aceite.

2.4.2. Espectro UV: A 0,05 g de la sustancia a examinar, se le añadió ciclohexano y se diluyó hasta 50,0 mL con el mismo disolvente. Se desarrolló el espectro de absorción en el intervalo de longitud de onda comprendido entre 200 y 300nm.

2.4.3. Espectro IR: Se desarrolló el espectro IR en el intervalo comprendido entre 500 y 4000cm⁻¹.

2.4.4. Índice de refracción: Se realizó la determinación, utilizando un refractómetro digital de Abbe, teniendo como condiciones $20 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ en relación a la longitud de onda de la línea D del sodio ($\lambda = 589,3 \text{ nm}$). Se determina el ángulo límite.

2.4.3. Densidad relativa: Se determinó por la relación entre la masa de 2 mL del aceite a 20 °C y la masa de un volumen igual de agua a la misma temperatura en un matraz aforado.

2.4.4. Índice de saponificación: Se introdujo 2 g del aceite en un matraz de vidrio borosilicatado de 250 mL y acoplado a un condensador a reflujo. Se añadió 25 mL de hidróxido de potasio alcohólico 0,5 mol/L. Se acopló un condensador y se calentó a reflujo durante 1 hora. Luego se añadió 1 mL de disolución de fenoltaleína y se valoró inmediatamente (mientras esté caliente) con HCl 0,5 mol/L (n_1 mL de HCl 0,5 mol/L).

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L. por GC.



Se realizó un ensayo en blanco en las mismas condiciones (n_2 mL de HCl 0,5 mol/L), siendo M la masa de la sustancia a examinar en gramos, se calculó el Índice de saponificación por la siguiente expresión:

$$I_s = \frac{28,05 \cdot (n_1 - n_2)}{M}$$

2.4.5. Índice de acidez: Se disolvió 2 g del aceite en 10 mL de una mezcla formada por volúmenes iguales de alcohol y éter (el disolvente debe ser neutralizado previamente con hidróxido de potasio 0,1M en presencia de 0,5 mL de disolución de fenolftaleína). Una vez disuelto, se valoró con hidróxido de potasio 0,1mol/L. La valoración se da por terminada cuando el color rosa persiste durante 15 segundos por lo menos (n mL de hidróxido de potasio 0,1 mol/L). La masa de la muestra (**M**) se expresó en **g**. Se calculó el Índice de acidez empleando la siguiente expresión:

$$I_A = \frac{5,61n}{M}$$

2.4.6. Índice de peróxidos: En un matraz cónico de 250 mL con tapón esmerilado se introdujo 5 g del aceite. Se añadió 30 mL de una mezcla de 3 volúmenes de ácido acético glacial y 2 volúmenes de cloroformo. Se agitó hasta disolver la sustancia y se añadió 0,5 mL de disolución saturada de yoduro de potasio. Se continuó la agitación durante un minuto exactamente, a continuación, se añadió 30 mL de agua. Se valoró con tiosulfato de sodio 0,01 mol/L, añadido lentamente sin dejar de agitar hasta que la coloración amarilla hubiera prácticamente desaparecido. A continuación se añadió 5 mL de disolución de almidón y se prosiguió la valoración agitando enérgicamente hasta la desaparición de la coloración (n_1 mL de tiosulfato de sodio 0,01 mol/L). Se realizó una valoración en blanco en las mismas condiciones (n_2 mL de tiosulfato de sodio 0,01 M). La valoración en blanco no debe requerir más de 0,1 mL de tiosulfato de sodio 0,01 mol/L, siendo M la masa de la sustancia en gramos. Se calculó el Índice de peróxido por la siguiente expresión:

$$I_p = \frac{10 (n_1 - n_2)}{M}$$

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de Melaleuca leucadendron L. por GC.



2.5. Identificación del Cineol presente en el aceite por CCD.

Procedimiento

Disolución problema: Tomar 10 μ L del aceite, obtenido de las hojas de la *Melaleuca leucadendron* L.

Disolución de referencia: Tomar 10 μ L de Cineol.

Condiciones Cromatográficas:

Fase Estacionaria: Placas de gel de sílice F254 para cromatografía.

Fase móvil: Cloruro de metileno R, tolueno R (50:50 V/V).

Aplicación: 10 μ L en bandas.

Desarrollo: 2 veces, hasta una distancia de 10 cm.

Secado: al aire.

Detección A: examinar la placa a la luz ultravioleta a 254 nm.

2.6. Perfil Cromatográfico del aceite.

El perfil cromatográfico del aceite se realizó empleando la Cromatografía de Gases siguiendo el siguiente procedimiento:

Disolución problema. Se preparó una dilución del aceite en acetona (50 μ L\1000 μ L)

Disoluciones de referencia. Fueron probadas 8 sustancias de referencias, que constituyen componentes comunes reportados en múltiples aceites esenciales: Cineol, Anisaldehído, Ciclohexanol, Eugenol, Mentol, α -Pino, Salicilato de Metilo y Terpineno.

Todas las sustancias de referencias fueron preparadas en acetona en la proporción 50 μ L\1000 μ L

La cromatografía se llevó a cabo utilizando las siguientes condiciones cromatográficas:

- ✓ Columna capilar de Silice fundida de 30 m de longitud y 0,32 mm de diámetro interno.
- ✓ Programa de temperatura: manteniendo la temperatura de la columna a 55 °C durante 1 min, luego aumentándola a una velocidad de 3 °C por minuto hasta 150 °C y aumentar nuevamente a razón de 2 °C por minuto hasta 200 °C y luego mantener durante 5 min antes de inyectar.
- ✓ Nitrógeno para cromatografía R como gas portador.
- ✓ Detector de ionización en llama, 280 °C.
- ✓ Inyector Split/Splitless: 250 °C.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de Melaleuca leucadendron L. por GC.



- ✓ Inyectar aproximadamente 1 μL de la disolución de referencia y la muestra problema. Registrar los tiempos de retención de estas sustancias.

2.7. Determinación cuantitativa del Cineol presente en el aceite esencial mediante Cromatografía gaseosa (GC).

- **Materiales, utensilios y equipos de medición.**

- ✓ Balanza analítica digital. BOECO, error 0.1 mg, LSP 210 g, GDR.
- ✓ GC, *Agilent 1100 series*
- ✓ Microjeringuilla *Hamilton* de 20 μL
- ✓ Acetona, *UNI-CHEM, Barcelona*
- ✓ Filtro miliporo de 0,45 μm
- ✓ Baño ultrasónico, *BRANSON 1510*.
- ✓ Agua desionizada y destilada.
- ✓ Cristalería de laboratorio.

- **Preparación de la solución patrón de Cineol.**

Solución madre: Disolver 9,3 mg de Cineol en 10mL de Acetona. Tomar 300 μL de esta disolución, transferir a un matraz aforado de 2 mL y completar el volumen.

- **Preparación de la muestra.**

Disolución problema. Se preparó una dilución del aceite en acetona (18,6mg\ 5mL). Luego se tomaron 50 μL de esta disolución, se transfirió a un matraz aforado de 1 mL y se completó el volumen.

- **Procedimiento.**

La cromatografía se llevó a cabo utilizando las condiciones cromatográficas descritas en el epígrafe 2.6. Cuando los cromatogramas se registran en las condiciones indicadas, los componentes eluyen en el orden indicado en la composición de la disolución de referencia. Registrar los tiempos de retención de estas sustancias.



Expresión de los resultados.

La expresión de cálculo empleada para la cuantificación en el GC es la siguiente:

Ap: Área bajo la curva del patrón.

Am: Área bajo la curva de la muestra.

Cm: Concentración de la muestra. ($\mu\text{g/mL}$)

Cp: Concentración del patrón. ($\mu\text{g/mL}$)

La expresión de cálculo deducida para determinar el porcentaje de Cineol en el aceite esencial mediante la técnica por GC es la siguiente:

$$\% \text{ Cineol} = \frac{m_{\text{Cineol}}}{m_{\text{Aceite esencial}}} \cdot 100\%$$

$$m_{\text{cineol}} = C_m \cdot 100$$

Donde:

m_{Cineol}: Masa de Cineol que se determina en el desarrollo de la técnica de análisis.

m_{aceite esencial}: Masa del aceite esencial presente en la solución de prueba.

2.7.1. Validación de la técnica analítica de Cromatografía de Gases (GC) para la cuantificación de Cineol en el material vegetal.

✓ **Linealidad.**

Preparación de la disolución patrón

Solución madre: Disolver 9,3 mg de Cineol en 10 mL de Acetona.

Preparación de las disoluciones de ensayo.

Se prepararon cinco disoluciones de concentraciones crecientes conocidas a partir de la solución inicial de concentración 0,93 mg/mL, estas son las siguientes: 0,0465 mg/mL; 0,093 mg/mL; 0,139 mg/mL; 0,186 mg/mL; 0,232 mg/mL.

Las condiciones cromatográficas coinciden con las señaladas en el epígrafe 2.7 (Determinación cuantitativa de Cineol por GC).

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L. por GC.



Procedimiento.

Se realizan tres curvas de cinco puntos, haciéndose dos réplicas para cada valor de concentración. Estos datos se procesan mediante el tabulador electrónico EXCEL, 2007, para obtener los resultados de la pendiente (b), el término independiente (a) y el coeficiente de correlación (r). El coeficiente de variación de los factores respuesta (CV_f), la desviación estándar relativa de la pendiente ($S_{b\ rel}$) y los límites de confianza del término independiente se obtienen a través de las fórmulas descritas en el epígrafe (I.4).

✓ **Precisión.**

Procedimiento: Este parámetro incluyó la repetibilidad y la precisión intermedia. Para la repetibilidad se procesaron cinco muestras del aceite esencial (según se describe en el epígrafe 2.7) a las cuales se les aplicó la técnica a validar en condiciones homogéneas, un mismo analista y en un mismo día; mientras que la precisión intermedia consistió en un procedimiento similar, con la misma concentración, realizado por diferentes días. En ambos casos se determinó el coeficiente de variación de los resultados.

Criterios adoptados: El coeficiente de variación (CV) para la repetibilidad $CV \leq 1,5\%$ y para la precisión intermedia $CV \leq 3\%$. Para evaluar la precisión intermedia se usó, además, el Test de Cochran, el Coeficiente de Variación de Horwitz y un análisis de varianza.

✓ **Exactitud.**

Procedimiento: Se utilizó el método de adición del patrón. Se preparó una dilución del aceite en acetona (18,6mg\ 5mL). Luego se tomaron 50 μ L de esta disolución, se transfirió a un matraz aforado de 1 mL y se completó el volumen.

Se adicionaron cantidades crecientes del patrón de Cineol (0,0232; 0,0465; 0,0695 mg/mL). Se realizaron tres réplicas de cada una de las concentraciones añadidas. Las concentraciones añadidas y recuperadas se representaron en un gráfico y se evaluó el recobrado como el valor obtenido para la pendiente del mismo (Fernández A., 1996). Además, se calculó el porcentaje de recuperación de la muestra analizada.

Criterio adoptado: Recobrado en el intervalo 97–103% (Fernández A., 1996).

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L. por GC.



✓ Especificidad

Procedimiento: Se compararon los tiempos de retención de las sustancias presentes en la muestra y el patrón. Se midió, el ancho de la semialtura y se calcularon los factores de simetría de los picos en los cromatogramas correspondientes a cinco inyecciones de patrón y cinco de muestras; se determinó la media y la varianza del patrón y de la muestra, se halló la T de Student y se calculó la F de Fisher, se compararon los valores de T y de F con los tabulados, con el objetivo de descartar posibles solapamientos de picos.

En todos los casos se calcularon los límites de detección (LD) como la concentración de analito que produce una señal igual a tres veces la desviación estándar del blanco (criterio 3σ de la IUPAC) (Thompson A., 1995 y 1999; ICH., 1996) bajo las condiciones experimentales óptimas.

Se tomó como límite de cuantificación (LC) la concentración de analito que produce una señal igual a diez veces la desviación estándar del blanco (Thompson A., 1995 y 1999; ICH., 1996; Eurachem., 1998) bajo las condiciones experimentales óptimas.

✓ Sensibilidad

Procedimiento: Como una medida de la sensibilidad se tomó el valor de la pendiente de la curva así como los límites de detección (LD) y límite de cuantificación (LC). Los cálculos se realizaron por el criterio de 3S y 10S, es decir el límite de detección (LD) como la concentración de analito que produce una señal igual a tres veces la desviación estándar del blanco (criterio 3σ de la IUPAC) bajo las condiciones experimentales óptimas. Por su parte el límite de cuantificación (LC) la concentración de analito que produce una señal igual a diez veces la desviación estándar del blanco bajo las condiciones experimentales óptimas. Una vez calculados los LD y LC se comprobaron los mismos, aplicando las dos técnicas evaluadas (Thompson M. y Word R., 1995; ICH., 1996; Eurachem., 1998; Thompson M. y col., 1999).



CAPITULO III. ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS.

3.1. Determinación del rendimiento de aceite esencial de *Melaleuca leucadendron* L.

3.1.1. Determinación del % de humedad de la planta, utilizando el método de determinación de agua por arrastre (método del tolueno).

Mediante el procedimiento anteriormente descrito se obtuvo un contenido de humedad de 9% para el *Melaleuca leucadendron* L. Este valor fue utilizado en la determinación del rendimiento de aceite en la planta, en base a droga seca.

3.1.2. Metodología de extracción del aceite esencial. Determinación del rendimiento de aceite en las hojas del *Melaleuca leucadendron* L.

Para la extracción se empleó el método de Hidrodestilación que consiste en llevar a estado de ebullición una suspensión acuosa de la planta, de tal manera que los vapores generados puedan ser condensados y colectados. El aceite, que es inmiscible en agua, es posteriormente separado. Se estableció el tiempo total de destilación como 1 hora teniendo en cuenta que a partir del mismo no ocurre ningún aporte de aceite en el tubo graduado (1mL dividido en 0,01mL) que se encuentra en el colector de destilación especialmente diseñado para recoger y medir el aceite. Con el uso de la trampa de tipo Clevenger, universalmente aceptado, se obtuvo un rendimiento de aceite en las hojas del *Melaleuca leucadendron* L. de 1,72%, en base seca, este valor constituye una novedad del presente trabajo si se tienen en cuenta que en la literatura consultada no se encontró ningún reporte del mismo. Con respecto al rendimiento obtenido en el método de arrastre con vapor se obtuvo un rendimiento de 2.43% en igual periodo de destilación lo que también constituye una novedad. Este rendimiento obtenido en el arrastre con vapor representa aproximadamente el doble del rendimiento obtenido en la técnica de hidrodestilación aplicada al mismo material vegetal. Las diferencias en los resultados obtenidos en las técnicas de destilación podría estar dado por la mayor eficacia lograda al utilizar la destilación de arrastre con vapor, de acuerdo al fundamento teórico del método (Meireles A., 2009).

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineole en el aceite esencial obtenido de las hojas de Melaleuca leucadendron L. por GC.



3.2. Resultados de los índices de calidad del aceite obtenido a partir de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L.

Para realizar la evaluación físico-química cualitativa del aceite se utilizaron los ensayos que refieren las farmacopeas, (Eur. Ph., 2005 y B.P., 2004), para el control de calidad de los aceites esenciales, extraídos por Hidrodestilación.

3.2.2. Características organolépticas: El aceite de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L. es obtenido por Hidrodestilación y posee como características organolépticas fundamentales que es un líquido translúcido, incoloro. Miscible con éter de petróleo, parcialmente miscible en etanol e inmiscible en agua.

3.2.2. La Densidad Relativa se determinó utilizando 10 μ L de aceite esencial de la planta y determinando la relación entre el peso de este y el peso del H₂O el valor de la densidad se muestra en la (Tabla 3.1).

3.2.2. El Índice de Refracción del aceite obtenido de la planta se relaciona en la (Tabla 3.1). El valor de este parámetro no aparece reportado en la literatura y tiene interés para detectar adulteraciones y envejecimiento y sus principales ventajas son la rapidez y sencillez con que se pueden obtener. Además pudiera ser la técnica de elección para el seguimiento de proceso extractivos o de fraccionamiento del aceite, cuando no se dispone de un cromatógrafo.

3.2.3. El Índice de Acidez del aceite se muestra en la (Tabla 3.1) el cual indica la presencia de muy pocos grupos ácidos en su composición.

3.2.4. I. Saponificación: El aceite es insaponificable pues al desarrollar la valoración el aceite se separa del disolvente.

Tabla 3.1. Valores obtenidos para los índices de calidad.

	Densidad	I. Refracción	I. Acidez	I. Saponificación
Melaleuca leucadendron L	0,96	1,4625	2,2	No saponificable

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineole en el aceite esencial obtenido de las hojas de Melaleuca leucadendron L. por GC.

3.2.5. Espectro UV para el aceite obtenido de *Melaleuca leucadendron* L.

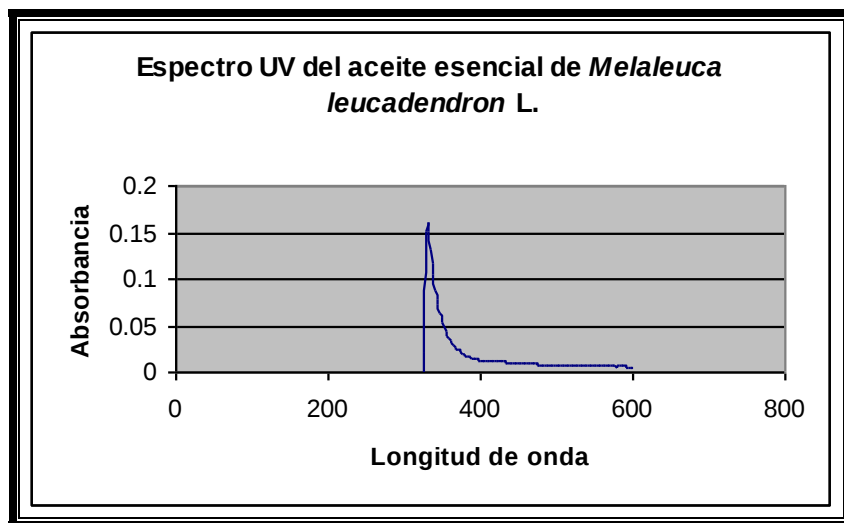


Figura 3.1. Espectro UV del aceite esencial obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L. $\lambda_{\text{máx}}=330\text{nm}$.

La presencia de una banda en la zona de los 330 nm aproximadamente indica la existencia de insaturaciones o grupos funcionales con pares de electrones libres que son capaces de conjugarse con dichas insaturaciones, como los grupos carbonilo (COOH), nitro (N^{2+}) entre otros.

3.2.6. Espectro infrarrojo (IR) para el aceite esencial de la *Melaleuca leucadendron* L.

La primera banda que aparece a los $3451,71\text{ cm}^{-1}$ aunque se muestra ancha debido a su intensidad pudiera indicar la presencia de OH alcohólico. La banda que parece a los $2958,59\text{ cm}^{-1}$ corresponde a la presencia de $\text{Csp}_3\text{-H}$. La intensidad del pico que se encuentra a $1744,33\text{ cm}^{-1}$ no es elevada, pero pudiera indicar que hay presencia de grupos carbonilo que señalaría la existencia de aldehídos o cetonas. Por último las bandas correspondientes a $1452,73$ y $1379,41\text{ cm}^{-1}$ muestran la presencia de Csp_2 y Csp_3 respectivamente.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineole en el aceite esencial obtenido de las hojas de Melaleuca leucadendron L. por GC.

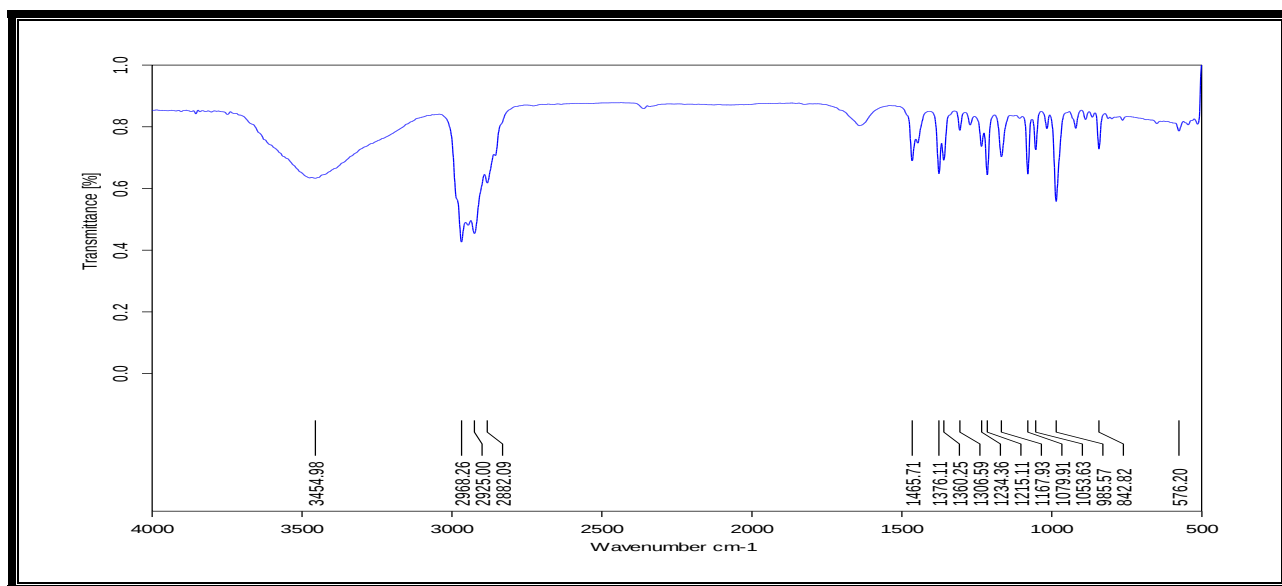


Figura 3.2. Espectro infrarrojo (IR) para el aceite obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L.

3.3. Identificación del Cineol presente en el aceite por CCD.

La identificación del Cineol en el aceite se realizó empleando la cromatografía en capa delgada (CCD). Las condiciones cromatográficas empleadas se extrajeron de las condiciones cromatográficas descritas por la **Farmacopea Europea, 2005** como ensayo cualitativo de identificación de los aceites esenciales. Como resultado se obtuvo (Figura 3.3) que el Cineol aportó una sola mancha con un valor de R_f es 0,65 para la fase móvil Tolueno-Diclorometano. La coincidencia en el valor de R_f al obtenido para el patrón y la muestra permite asegurar la presencia del Cineol en el aceite, aunque esto debe ser corroborado por técnicas más fiables.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineole en el aceite esencial obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L. por GC.

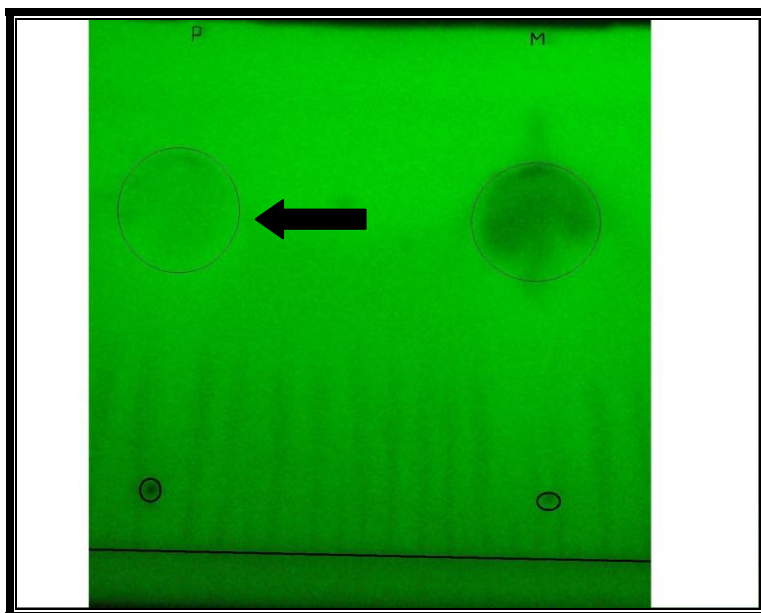


Figura. 3.3. Cromatografía en capa delgada obtenida para el producto aislado, empleando el sistema de corrida Tolueno- Diclorometano (50:50). Patrón (P) y Muestra (M).

3.4. Perfil cromatográfico del aceite esencial de *Melaleuca leucadendron* L.

La técnica cromatográfica más adecuada para el análisis de los aceites esenciales sin duda es la cromatografía de gases (GC). En el control de la calidad esta se utiliza para obtener el perfil cromatográfico y cuantificar los componentes del aceite esencial, es decir los mayoritarios o aquellos que, sin ser mayoritarios, tengan una especial trascendencia para la calidad. El perfil cromatográfico de un aceite esencial constituye uno de los ensayos que conforman la monografía analítica de control de calidad del mismo y tienen como objetivo identificar los principales componentes presentes en el aceite. Para proponer dicho perfil la primera tarea resultó ser la selección de condiciones cromatográficas que permitieran una separación adecuada de los distintos picos obtenidos en el cromatograma del aceite.

Para esta selección se tuvieron en cuenta las condiciones más empleadas para este fin en la literatura consultada y que fueron señaladas en el [Capítulo 1 (Pág. 15-18)] del presente trabajo, con la salvedad de que en este trabajo la fase móvil utilizada fue el Nitrógeno, ante la no disponibilidad de Helio.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineole en el aceite esencial obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L. por GC.

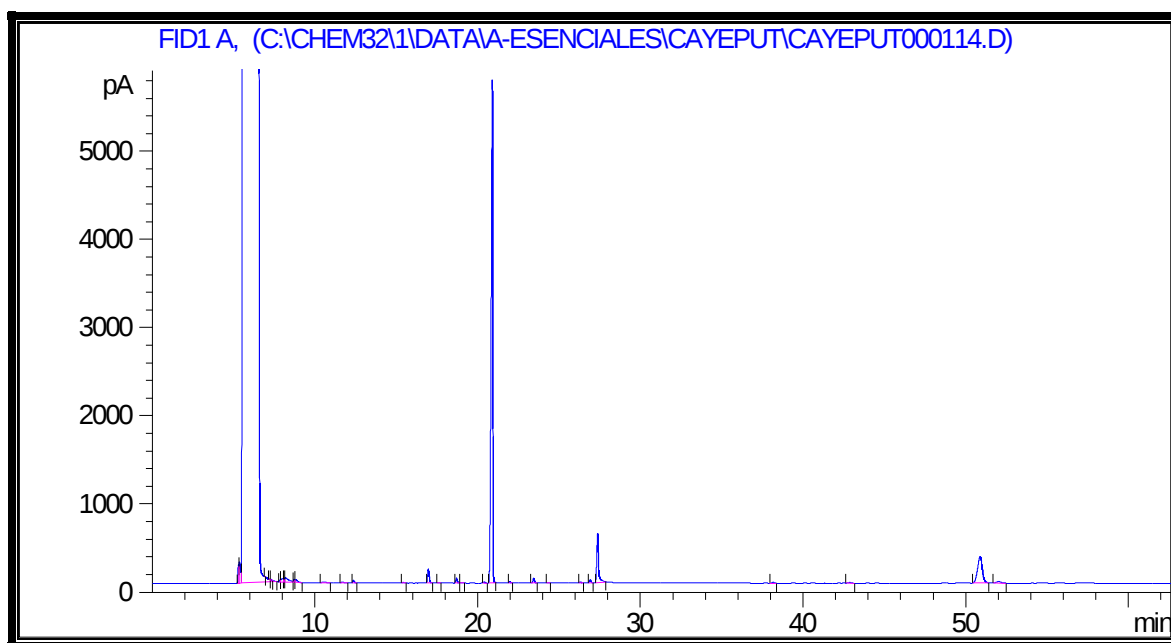


Figura 3.4. Cromatograma GC del aceite esencial obtenido a partir de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L.

En la (Figura 3.4) muestra el cromatograma obtenido para el aceite. Como se observa, a diferencia de la mayoría de los aceites esenciales, la cantidad de componentes es muy baja solo se distinguen claramente tres picos que deben corresponder a los compuestos presentes en el aceite. En la (Tabla 3.2) se muestran los parámetros cromatográficos obtenidos para cada pico

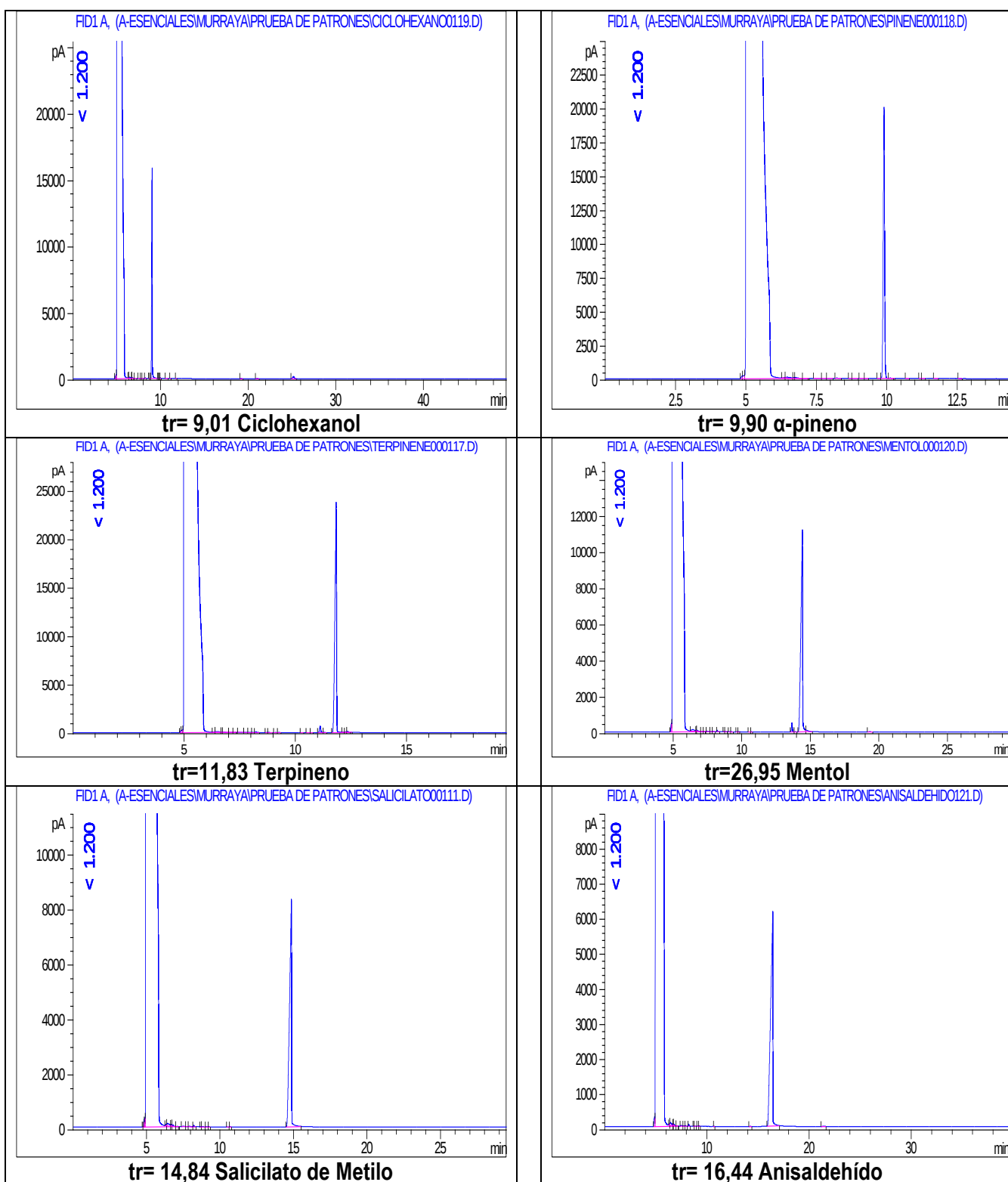
Tabla 3.2. Resultados de los parámetros cromatográficos obtenidos para el aceite del *Melaleuca leucadendron* L. al aplicar la técnica GC

No. Pico	t. retención	Área	% Área
1	20,92	40045,6	68,11
2	27,30	4239,0	7,24
3	50,86	639,4	10,14

Con vistas a identificar la presencia de alguno de los patrones de componentes de aceites esenciales, disponibles en el laboratorio, para su uso como trazador analítico en el aceite, se compararon los cromatogramas obtenidos para el patrón (Figura 3.4), bajo las mismas condiciones cromatográficas que la muestra, obteniéndose la coincidencia de los tiempos de retención solo para el Cineol.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineole en el aceite esencial obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L. por GC.



Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineole en el aceite esencial obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L. por GC.

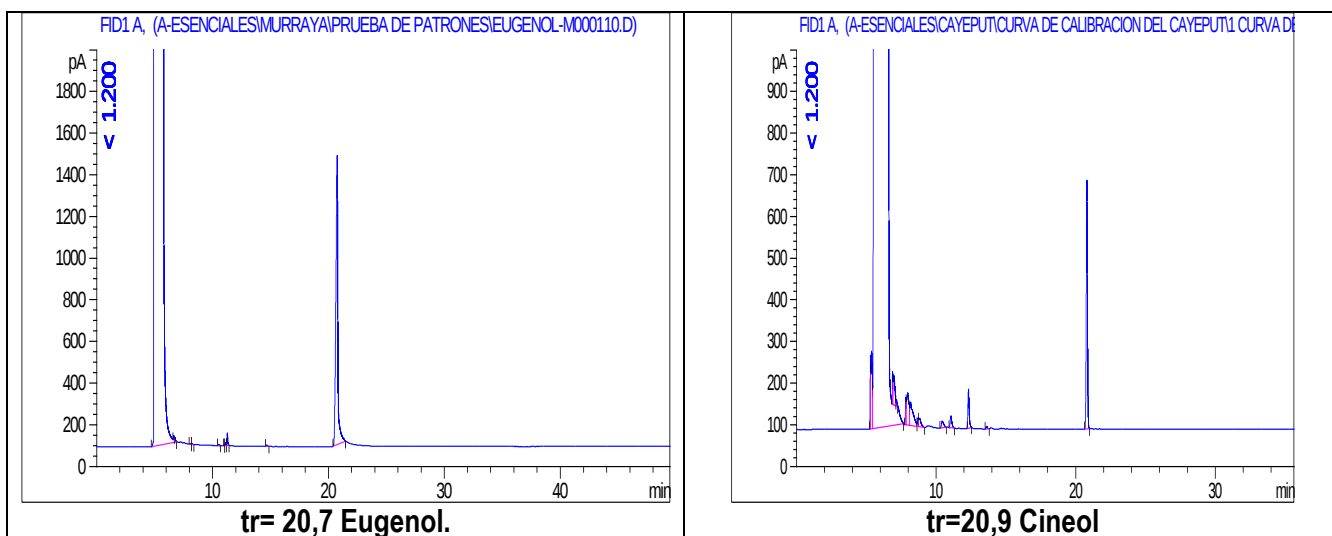


Figura 3.4. Cromatogramas correspondientes a los 8 patrones utilizados.

Con vistas a corroborar esta posibilidad el aceite fue estudiado, empleando la CG acoplada a la Espectrometría de Masa.

3.5. Determinación de la composición del aceite utilizando la técnica GC-MS.

La (Figura 3.5) muestra el cromatograma obtenido en el GC-MS para el aceite obtenido por hidrodestilación, en el mismo se reafirma la presencia de tres picos a pesar de que en este caso hubo un cambio de fase móvil.

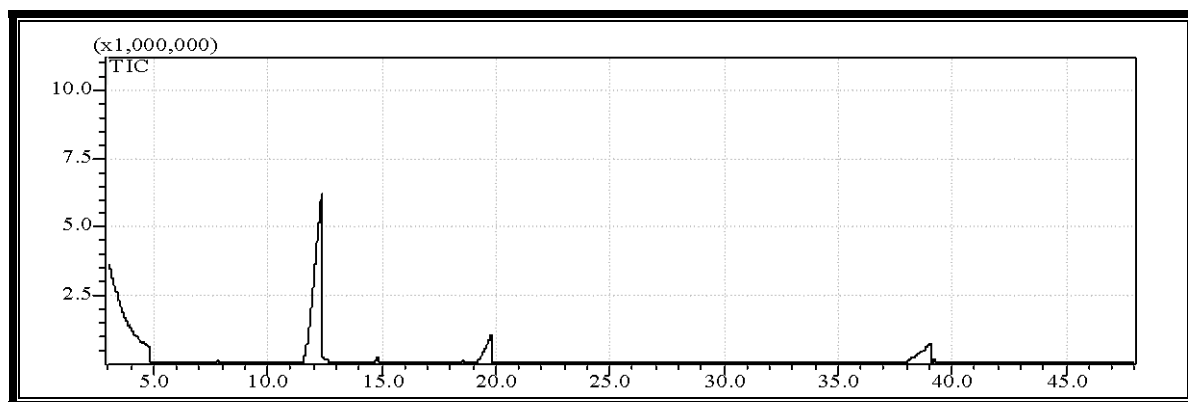


Figura 3.5. Cromatograma GC-MS del aceite esencial obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L. obtenido por hidrodestilación.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineole en el aceite esencial obtenido de las hojas de Melaleuca leucadendron L. por GC.

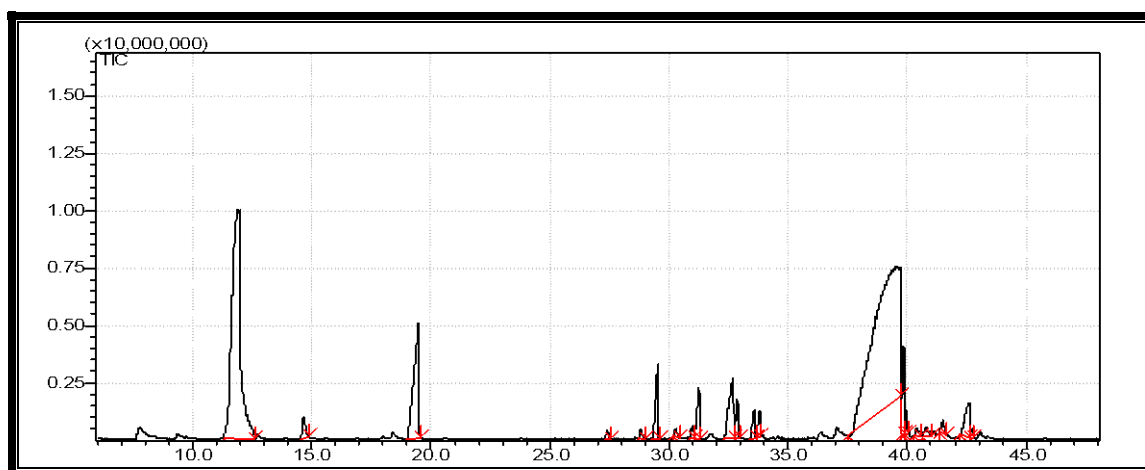


Figura 3.6. Cromatograma GC-MS del aceite esencial obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L. obtenido por arrastre con vapor.

Por su parte en la (Figura 3.6) se presenta el cromatograma obtenido para el aceite de esta planta obtenido en la técnica de arrastre con vapor en el cual aparecen un número mayor de picos entre los 29 y 45 min. de tiempos de retención, mientras los picos mayoritarios se mantienen sin alteración. Al superponer ambos cromatogramas (Figura 3.7) se denota claramente la aparición de nuevos picos en los mayores tiempos de retención lo cual podría estar dado por la mayor eficacia lograda al utilizar la destilación de arrastre con vapor, de acuerdo al fundamento teórico del método (Meireles A., 2009).

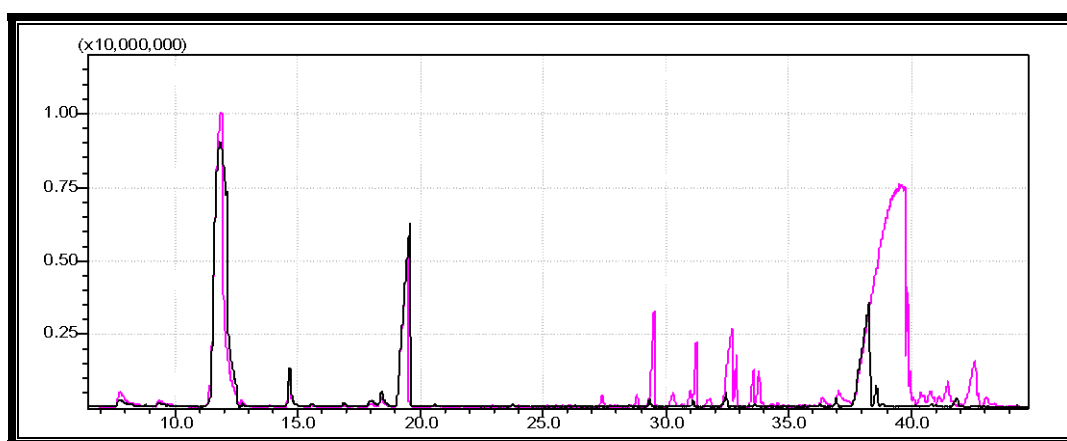


Figura 3.7. Cromatograma GC-MS del aceite esencial obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L. obtenido por ambos métodos.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineole en el aceite esencial obtenido de las hojas de Melaleuca leucadendron L. por GC.

El análisis exhaustivo del espectro de masa de cada pico, empleando la librería NIST, permitió el pico mayoritario, cuyo espectro de masa se presenta en la (Figura 3.8). Es importante señalar que este resultado coincide con lo reportado en el único artículo publicado sobre la composición química del aceite en estudio, en el mismo, investigadores obtuvieron que el 1,8 Cineol era el componente mayoritario y se encontraba en un 64,30% del aceite de la planta. (Frag R. y col., 2004).

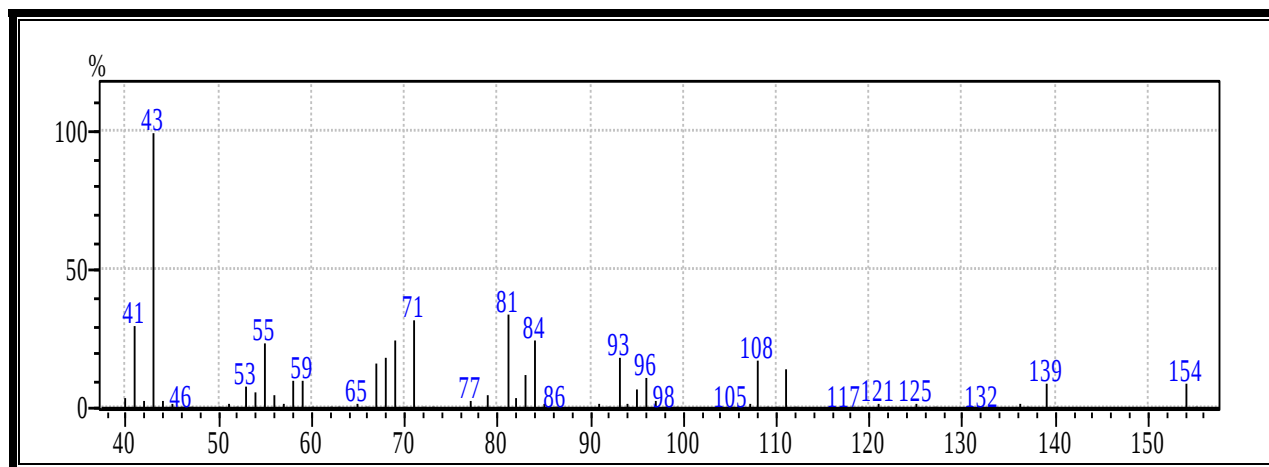


Figura 3.8. Espectro de masas del componente mayoritario del aceite esencial de *Melaleuca leucadendron* L.

3.6. Determinación cuantitativa de Cineol presente en el aceite esencial mediante Cromatografía gaseosa (GC).

✓ Linealidad

Teniendo en cuenta que el objetivo de la técnica era determinar cuantitativamente el contenido del Cineol presente en el aceite fue necesario demostrar la linealidad para este patrón. A continuación se exponen, los resultados:

La (figura 3.9) muestra la curva de calibración obtenida al evaluar la linealidad en la cromatografía de gases utilizada para la determinación cuantitativa del Cineol en la muestra. Los criterios estadísticos utilizados para evaluar el parámetro aparecen en la (Tabla 3.3).

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineole en el aceite esencial obtenido de las hojas de Melaleuca leucadendron L. por GC.

Si se comparan los valores obtenidos en cada parámetro con los criterios establecidos por las normas **ICH, 1996**, se puede afirmar que en todos los casos se encuentran dentro del intervalo especificado: La ecuación de la recta obtenida para el Cineol fue $y = 27541x - 129,9$ con un coeficiente de correlación de 0,99 un coeficiente de variación de los factores respuesta 4,61 (inferior al 5%). La fiabilidad de la ecuación se evaluó además a través del error típico cuyo valor es 0,03 muy inferior a la desviación estándar de la variable Y. Con vistas a corroborar los resultados anteriores se realizó un análisis de varianza en el cual se obtuvo un valor de 5745,32 (F mucho mayor que el F crítico), estadísticamente significativo. Se puede plantear entonces que el método es **lineal** en el intervalo de concentración evaluado.

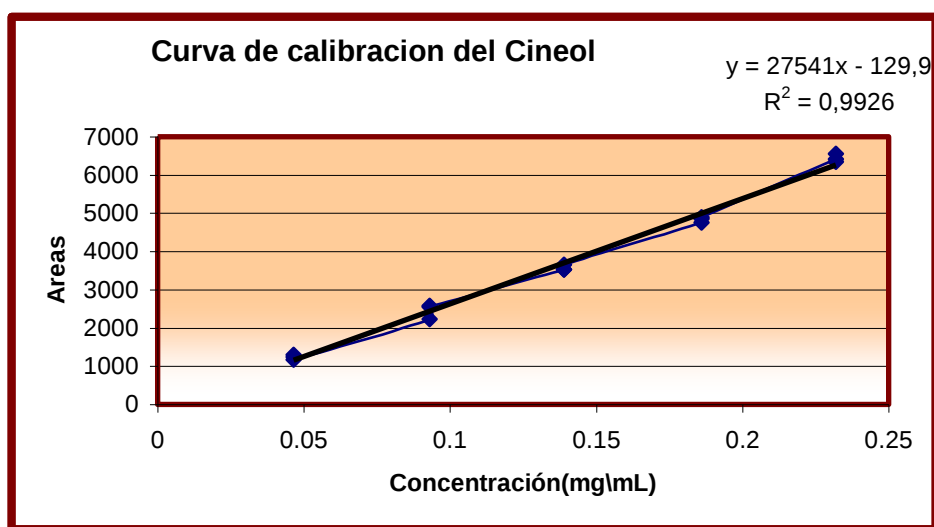


Fig. 3.9. Curva de calibración para la determinación del Cineol por cromatografía gaseosa.

Tabla 3.3. Resultados de los criterios estadísticos utilizados para evaluar la linealidad en la técnica de cromatografía de gases para el Cineol.

Concentración del patrón (mg/L)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Ecuación de la recta
0.0465	1236,9	1301,4	1176,9	$y = 27541x - 129,9$
0.093	2228,61	2576,7	2547,3	
0.139	3531,56	3526,9	3657,7	
0.186	4756,21	4854,78	4895,23	
0.232	6412,3	6347,03	6548,2	
Coeficiente de correlación múltiple	R^2 ajustado	Error típico	C.V.F (%)	
0,99	0,99	0,03	4,61	

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineole en el aceite esencial obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L. por GC.



ANÁLISIS DE VARIANZA					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	7,189	7,189	5745,32	1,02279E-12
Residuos	8	0,01	0,001		
Total	9	7,2			
	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Coeficiente de calidad (%)
Intercepción	-0,02	0,03	-0,75	0,46	-2,83
Criterios establecidos: r_i : Coeficiente de correlación ($r_i \geq 0,99$) C.V.F: Coeficiente de variación de los factores de respuestas ($C.V.F \leq 5\%$) Error típico de la regresión ($0 \leq \text{Error típico} \leq S_y$ (S_y desviación Standard de Y) CC: Coeficiente de calidad ($CC < 2,5\%$)					

✓ Precisión

Este parámetro incluye los términos repetibilidad y precisión intermedia. Para el primer caso la técnica se repitió sin alterar las condiciones, mientras que en el segundo la técnica se desarrolló en diferentes días.

En la (Tabla 3.4), se muestran los resultados estadísticos obtenidos al evaluar ambos parámetros para el Cineol. El coeficiente de variación obtenido para la repetibilidad de la muestra fue de (1.32%), que resultó ser menor que el establecido para este ensayo cuando es realizado a materias primas farmacéuticas ($\leq 1.5\%$) lo que indica que la técnica posee buena repetibilidad. Por su parte en la precisión intermedia se obtuvo también un coeficiente de variación (1.56%) inferior al establecido ($\leq 3\%$), además, en este parámetro se evaluaron otros parámetros estadísticos que garantizan la veracidad de los resultados y cuyos estadígrafos aparecen también reflejados en la misma tabla.

El análisis de varianza realizado muestra que no hay diferencias significativas entre los grupos al obtenerse en la prueba Fischer una $F_{cal} < F_{Crítica.}$ Esto es ratificado por el Test de Cochrans ($C_{cal} = 0.33$) en el cual se obtuvo una $C_{cal} < C_{Crítica.}$

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineole en el aceite esencial obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L. por GC.



Tabla 3.4. Resultados estadísticos obtenidos al evaluar el parámetro precisión en la técnica de cromatografía de gases del **Cineol**.

REPETIBILIDAD				
Réplica 1	Parámetros estadísticos			
2138	Media =	46.368		
2198,74	SD=	0.614		
2147	CV (%)=	1.32		
2184,91				
2136,42				
2192,04				
PRECISIÓN INTERMEDIA				
Dia I	Dia II	Dia III	Media=	46.573
2138	2147	2136,42	SD=	0.713
2298,74	2184,91	2192,04	CV (%) =	1.53
			Horwitz =	2.24
Dentro de los Grupos S(%) =0,364 ; CV(%) =0,781				
Cochrans (C calculada)= 0,0005				
Cochrans (C crítica) =0,59				
Horwitz =2.24				

✓ Exactitud

Las concentraciones añadidas del Cineol como patrón y las recuperaciones obtenidas se recogen en la (Tabla 3.5). El porcentaje de recuperación promedio fue de $99,94 \pm 0,91\%$. El recobrado medio de los tres niveles de concentración, una vez calculado y es realizado una prueba t-Student en la cual se obtuvo como resultados una $t_{\text{calc.}} < t_{\text{crit.}}$ Permite corroborar que el recobrado obtenido no es significativamente diferente de 100%. Los resultados anteriores se ratificaron con la curva de recuperación, (Figura 3.10), el valor de la pendiente se corresponde con la recuperación y posee coincidencia con el valor de recobrado promedio anteriormente calculado. Estos valores demuestran una elevada exactitud en las determinaciones del Cineol presente en las muestras de aceite (*Melaleuca leucadendron* L), con el procedimiento utilizado.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineole en el aceite esencial obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L. por GC.

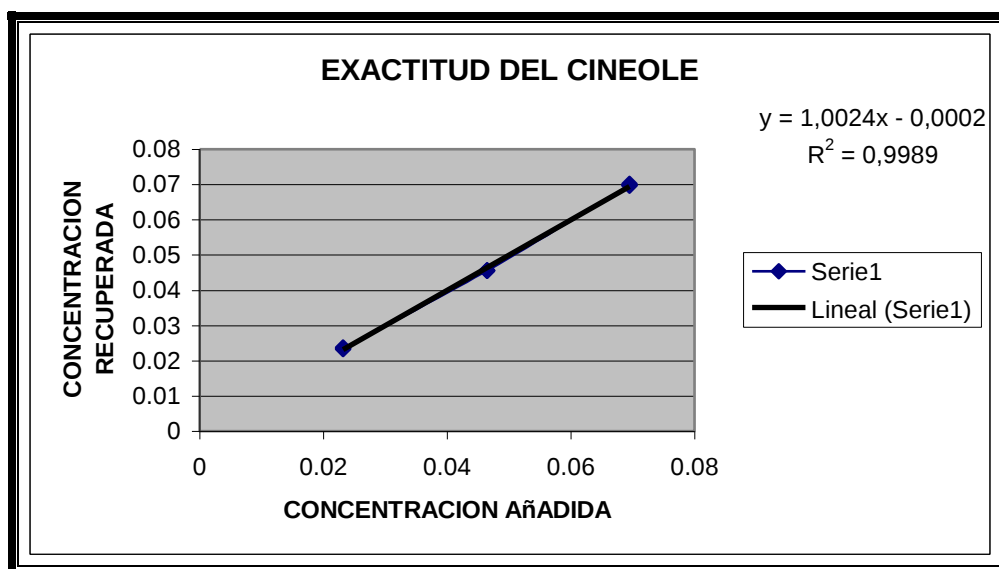


Figura 3.10. Curva de recuperación del Cineol.

Tabla 3.5. Resultados estadísticos obtenidos al evaluar el parámetro exactitud en la técnica de cromatografía de gases para el Cineol.

Conc añadida (mg/L)	Resp.exp. Patrón añadido Yp antes	Resp.exp. Patrón añadido + Muestra	Resp.exp. Patrón recuperado	Conc. Recup.(ppm) $x=(y+129,9)/27541$	Recuperación (R)	Resp.exp. Muestra Ym antes	Media de R
0,0232	279,63	2290,06	522,06	0,023	102,03	1768	99,94
0,0232	297,76	2285,27	517,27	0,023	101,28		
0,0232	304,58	2279,31	511,31	0,023	100,35		
0,0465	659,83	2893,65	1125,65	0,045	98,039		
0,0465	654,97	2895,36	1127,36	0,045	98,173		
0,0465	681,37	2891,22	1123,22	0,045	97,84		
0,0695	1161,78	3558,37	1790,37	0,069	100,32		
0,0695	1169,36	3560,21	1792,21	0,069	100,41		
0,0695	1154,3	3571	1803	0,070	100,98		

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineole en el aceite esencial obtenido de las hojas de Melaleuca leucadendron L. por GC.

✓ **Sensibilidad.**

Como se puede observar en la (Figura 3.12) la inyección del blanco solo demostró la no existencia de interferencias al tiempo de retención de las sustancias presentes en la muestra. El resultado del LD y LC para el Cineol se recogen en la (Tabla 3.6). Como Límite de Detección para el Cineol se obtuvo un valor de 0,00006 mg/L y Límite de Cuantificación 0,0002 mg/L, valores que se encuentran por debajo del valor más bajo de concentración evaluado en la técnica.

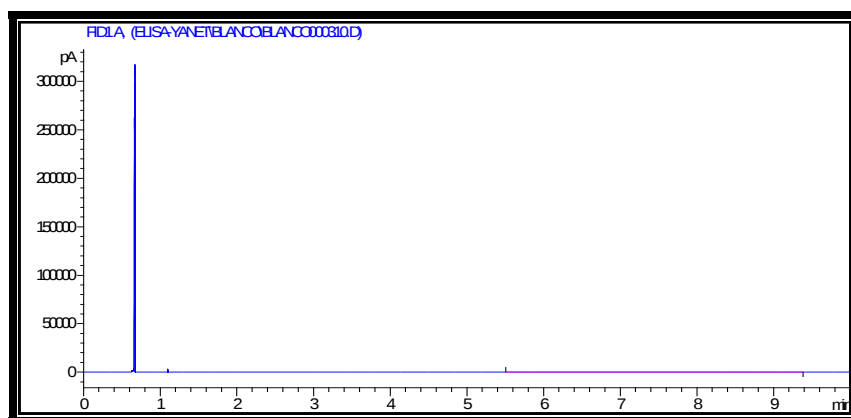


Figura 3.12. Cromatograma del Blanco.

Tabla 3.6. Resultados estadísticos obtenidos al evaluar el parámetro sensibilidad en la técnica de Cromatografía de gases para el Cineol.

Resp. Blanco (áreas de los picos)	Media	Desv. Estándar	Pendiente	Limite de detección (LD) (mg/L)	Limite de cuantificación (LC) (mg/L)
17,882	17,548	0,576	27541	0,00006	0,0002
17,88					
16,882					



✓ **Especificidad**

Se compararon los picos cromatográficos del patrón (**Cineol**) con los correspondientes en la muestra bajo las condiciones óptimas de análisis (Tabla 3.2) donde no se observaron a simple vista colas, ni frentes difusos u hombros, se puede inferir que no debe haber solapamientos de picos. Tampoco se observaron variaciones significativas en los tiempos de retención, los cuales se mantienen dentro de un intervalo de $\pm 2\%$.

Los resultados discutidos hasta el momento demuestran que no existen interferencias apreciables que puedan afectar la determinación confiable del Cineol en el aceite de la *Melaleuca leucadendron* L. Con todos estos resultados se puede afirmar, entonces que el método es específico para ser utilizado en el control de la calidad del aceite esencial de *Melaleuca leucadendron* L.

Se analizaron comparativamente los cromatogramas obtenidos para el patrón de Cineol y para la muestra, registrados bajo las mismas condiciones de análisis, observándose que no hay sustancias en la muestra que interfieran en la determinación de los mismos. Además, el pico del los patrón y el pico del Cineol presente en la muestra, posee similares valores de simetría y ancho en la semialtura, tanto para el patrón como en la muestra por lo que pueden superponerse, lo anterior descarta posibles solapamientos.

Patrón de Cineol

Para comparar los factores de simetría del pico para patrón y la muestra, se calculó los intervalos de confianza de dichos factor, de forma tal que un intervalo incluye al otro. Para la muestra este intervalo va desde 1,04 hasta 0,97 y en el caso del patrón los intervalos oscilan desde 1,00 hasta 0,99.

Límite de Confianza para los factores de simetría:

$$\bar{X} \pm \frac{t \cdot S}{\sqrt{n}}$$

Patrón

$$\bar{X} = 1,01$$

$$t = 2,13$$

$$S = 0,036$$

$$n = 5$$

Muestra

$$\bar{X} = 0,99$$

$$t = 2,13$$

$$S = 0,007$$

$$n = 5$$

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineole en el aceite esencial obtenido de las hojas de Melaleuca leucadendron L. por GC.



Con los resultados obtenidos en los cinco parámetros de validación se puede afirmar que la técnica de cromatografía de gases evaluada para la determinación de aceite esencial en el aceite de la *Melaleuca leucadendron* L., es fiable.

Una vez validada la técnica se aplicó en la determinación del contenido de Cineol presente en el aceite esencial, obteniéndose que este componente representa el 46,36% de todos los componentes presentes.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineole en el aceite esencial obtenido de las hojas de Melaleuca leucadendron L. por GC.



Conclusiones

1. El contenido de aceite esencial en las hojas de *Melaleuca leucadendron* L., aplicando la técnica de hidrodestilación, fue de 1,72%, mientras que en el arrastre con vapor se obtuvo un rendimiento de 2,43%.
2. La técnica de Cromatografía Gaseosa acoplada a Masa (GC/MS) permitió corroborar la presencia de 1,8- Cineol presente en el aceite obtenido por las dos técnicas de destilación.
3. La comparación de las dos técnicas de destilación empleadas en la obtención, realizada a través de GC-MS, permitió comprobar la similitud en la composición de ambos aceites y la marcada diferencia en la cantidad de los componentes presentes para cada técnica.
4. Los resultados de la evaluación de la calidad del aceite, a través de índices establecidos, fueron similares a los reportados en las Farmacopeas vigentes, para otros aceites esenciales.
5. El procedimiento de validación realizado a la técnica de Cromatografía de Gases, para la determinación cuantitativa de Cineole en el aceite, permitió demostrar que la misma es fiable y posibilita su uso en el control de la calidad de dicho aceite.
6. El aceite posee un 46,53% de Cineol, siendo su componente mayoritario.

Recomendaciones

1. Continuar los estudios de la composición del aceite hasta lograr identificar todos los componentes presentes en el mismo.
2. Emplear la técnica de destilación por arrastre con vapor, como método de obtención del aceite por su mayor rendimiento y cantidad de componentes extraídos.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L por GC.



BIBLIOGRAFIA

1. (1992) Guía Terapéutica Dispensarial de Fitofármacos y Apifármacos., Ciudad de La Habana. Cuba.
2. (1996) "International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Validation of analytical procedures and Methodology, ICH-Q2 A y B., Geneva.
3. (1996) "International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Validation of analytical procedures and Methodology, ICH-Q2 A y B., Geneva.
4. (1998) "The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics". Londres.Reino Unido.
5. (1998) "The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics". Londres. Reino Unido.
6. (1998) British Pharmacopoeia, Norwich. Reino Unido., The Estationery Office.
7. (1999) Bohemia.
8. (2004) British Pharmacopoeia, Norwich. Reino Unido., The Estationery Office.
9. (2005) Farmacopea EAUROPEA, Strasbourg. France. , Council of Europa.
10. (2005) Farmacopea EAUROPEA, Strasbourg. France. , Council of Europa.
11. (2005) Farmacopea EAUROPEA., Strasbourg. France. , Council of Europa.
12. (2005) Farmacopea EAUROPEA., Strasbourg. France. , Council of Europa.
13. ABOABA SA, O. I., WALKER TM, SETZER WN, OLADOSU IA, EKUNDAYO O. (2009) Essential oil composition, antibacterial activity and toxicity of the leaves of *Tetrapleura tetraptera* (Schum. & Thonn.) taubert from Nigeria. *Nat Prod Commun.* , 4, 287-90.
14. ADAMS, R. (2001) Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy, New York, Allure Publisher.
15. AE., E. (2009) Anti-cancer properties of *Nigella* spp. essential oils and their major constituents, thymoquinone and beta-elemene. . *Curr Clin Pharmacol.*, 4, 43-6.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de Melaleuca leucadendron L. por GC.



16. AL-HARRASI A, A.-S. S. (2008) Phytochemical analysis of the essential oil from botanically certified oleogum resin of *Boswellia sacra* (Omani Luban). . Pak J Biol Sci., 13, 2181-9.
17. AMER A, M. H. (2006) The sensilla of *Aedes* and *Anopheles* mosquitoes and their importance in repellency. Parasitol Res. , 99, 491-9.
18. ANDRADE EH, C. L., DA SILVA MH, DA SILVA JD, BASTOS CN, SOUSA PJ, GUIMARÃES EF, MAIA JG. (2008) Variability in essential-oil composition of *Piper marginatum sensu lato*. Chem Biodivers., 5, 197-208.
19. APEL MA, S. R. V., BORDIGNON SA, HENRIQUES AT, VON POSER G. (2009) Chemical composition and toxicity of the essential oils from *Cunila* species (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Parasitol Res.
20. BANDONI, A. (2000) Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica. La Plata, Buenos Aires, U.N.L.P.
21. BANDONI, A. (2000) Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica. La Plata, Buenos Aires, U.N.L.P.
22. BANDONI., A. (2000) Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamerica. La Plata, Buenos Aires, U.N.L.P.
23. BANDONI., A. (2000) Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamerica. La Plata, Buenos Aires, U.N.L.P.
24. BARQUERO, A. (2007) PLANTAS SANADORAS: PASADO, PRESENTE Y FUTURO.
25. BARQUERO, A. (2007) PLANTAS SANADORAS: PASADO, PRESENTE Y FUTURO.
26. BOLETIN ECONOMICO DE ICE, 31.
27. BUBBERT H., J. H. (2002) Surface & thin films Analysis., Wiley-vch.
28. CALCINES HUERTAS, D. (1993) Los aceites esenciales., Santiago de las Vegas, Pueblo y Educacion.
29. CAVARA S, M. M., VIDIC D (2009) The essential oil of *Thymus aureopunctatus* (Beck) K. Malý. . Nat Prod Commun., 4, 415-20.
30. CHA JD, J. E., KIL BS, LEE KY. (2007) Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from *Artemisia feddei*. . J Microbiol Biotechnol., 17, 2061-5.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de *Melaleuca leucadendron* L. por GC.



31. CHANG HT, C. Y., WU CL, CHANG .ST, CHANG .TT, SU . (2008) Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* Florin leaf against plant pathogenic fungi. . *Bioresour Technol.* , 99, 6266-70. .
32. CK., L. (1998) A New Norlupene from the Leaves of *Melaleuca leucadendron*. *J Nat Prod.* , 61, 375-6.
33. COOK, E. F., MARTÍN, E. W. Y COL (1953) *Farmacía práctica de Remington*, Editorial Hispano Americana.
34. COSGE B, T. A., IPEK A, GURBUZ B. (2009) Chemical compositions and antibacterial activities of the essential oils from aerial parts and corollas of *Origanum acutidens* (Hand.-Mazz.) letswaart, an endemic species to Turkey. . *Molecules.*, 14, 1702-12.
35. CUELLAR CUELLAR, A. (1983) *Química de los Fármacos Naturales.*, Ciudad de La Habana. Cuba, Edición Revolucionaria.
36. CUELLAR CUELLAR, A. (1983) *Química de los Fármacos Naturales.*, Ciudad de La Habana. Cuba, Edición Revolucionaria.
37. FARAG RS, S. A., EL-BAROTY GA, IBRAHIM NA, ALI MA, HASSAN EM. (2004) Chemical and biological evaluation of the essential oils of different *Melaleuca* species. *Phytother Res.*, 18, 30-5.
38. FARAG RS, S. A., EL-BAROTY GA, IBRAHIM NA, ALI MA, HASSAN EM. (2004) Chemical and biological evaluation of the essential oils of different *Melaleuca* species. *Phytother Res.*, 18, 30-5.
39. FERNÁNDEZ, A. (1996) *Ciclo de conferencias sobre validación de métodos analíticos.*, La Habana, Cuba.
40. FÍTOQUIMICA, S. L. D. (2002) *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas.*
41. GARCÍA, L. P. (2000) Las plantas medicinales y aromáticas. Una alternativa de futuro para el desarrollo rural. *BOLETIN ECONOMICO DE ICE*, 30.
42. GARCÍA, L. P. (2000) Las plantas medicinales y aromáticas. Una alternativa de futuro para el desarrollo rural.
43. GUDRUN, V. D. (1999) *Manual Práctico de Aromaterapia*, Barcelona España, Oceano Ibis.
44. GUDRUN., V. D. (1999) *Manual Práctico de Aromaterapia.*, Barcelona. España, Oceano Ibis.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de Melaleuca leucadendron L. por GC.



45. GUO QS, Y. X., XU WB, TAO HY. (2008) Characterization of chemical components of essential oil from flowers of *Chrysanthemum morifolium* produced in Anhui province. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.*, 33, 2207-11.
46. HIERMANN A, B. F. (1994) Influence of some traditional medicinal plants of Senegal on prostaglandin biosynthesis. *J Ethnopharmacol.*, 42, 111-6.
47. HOFFMANN E., S. V. (1999) Mass spectroscopy, principles y applications.
48. HOFFMANN E., S. V. (1999) Mass spectroscopy, principles y applications.
49. KAWATA J, K. M., MIYAZAWA M. (2007) Constituents of essential oil from the dried fruits and stems of *Akebia quinata* (THUNB.) DECNE. *J Oleo Sci.*, 56, 59-63.
50. KUŹMA L, K. D., RÓZALSKI M, RÓZALSKA B, WIECKOWSKA-SZAKIEL M, KRAJEWSKA U, WYSOKIŃSKA H (2009) Chemical composition and biological activities of essential oil from *Salvia sclarea* plants regenerated in vitro. *Molecules.*, 14, 1438-47.
51. LEE CK, C. M. (1999) Four new triterpenes from the heartwood of *Melaleuca leucadendron*. *J Nat Prod.*, 62, 1003-5.
52. MEIRELES, A. (2009) *Extracting Bioactive Compounds for Food Products. Theory and Applications.*, Dublin. Irlanda., CRC Press.
53. MEIRELES, A. (2009) *Extracting Bioactive Compounds for Food Products. Theory and Applications.*, Dublin. Irlanda., CRC Press.
54. MEIRELES, A. (2009) *Extracting Bioactive Compounds for Food Products. Theory and Applications.*, Dublin. Irlanda., CRC Press.
55. MILLER SL, H. W., SETZER WN (2009) Chemical composition of the leaf essential oil of *Casimiroa edulis* La Llave & Lex. (Rutaceae) from Monteverde, Costa Rica. *Nat Prod Commun.*, 4, 425-6.
56. MOHSEN H, A. F. (2009) Essential oil composition of *Artemisia herba-alba* from southern Tunisia. *Molecules.*, 14, 1585-94.
57. MORTEZA-SEMNANI K, S. M., AKBARZADEH M. (2007) Essential oil composition of *Teucrium scordium* L. *Acta Pharm.*, 57, 499-504.
58. MORTEZA-SEMNANI K, S. M., AKBARZADEH M. (2007) Essential oil composition of *Teucrium scordium* L. *Acta Pharm.*, 57, 499-504.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de Melaleuca leucadendron L. por GC.



59. MOYLER, D. (1998) Liquid CO₂ extraction in the flavor and fragrance industries. *Chemistry and Industry*, 75, pp 1-4.
60. NAWAWI A, N. N., HATTORI M, KUROKAWA M, SHIRAKI K. (1999) Inhibitory effects of Indonesian medicinal plants on the infection of herpes simplex virus type 1. *Phytother Res.* , 13, 37-41.
61. OLIVEIRA VC, M. D., LOPES JA, DE ANDRADE PP, DA SILVA NH, FIGUEIREDO RC. (2009) Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. . *Parasitol Res.*, 104, 1053-9.
62. ORAV A, R. A., ARAK E. 2008, FEB; 22(3): (2008) Essential oil composition of *Pimpinella anisum* L. fruits from various European countries. *Nat Prod Res.*, 22, 227-32.
63. PALMA, A. C. (1991) *Fundamentos Científicos de Fitoterapia y la Medicina Tradicional*, Topes de Collantes.
64. PEÑALVER, I. M. (2000) Las Plantas Medicinales. *Rev Cubana Oncol*, 16, 66.
65. PETROVIĆ S, P. M., MAKSIMOVIĆ Z, MILENKOVIĆ M, COULADIS M, TZAKOUC O, NIKETIĆ M. (2009) Composition and antimicrobial activity of *Marrubium incanum* Desr. (Lamiaceae) essential oil. *Nat Prod Commun.*, 4, 431-4.
66. QUERT ÁLVAREZ ROLANDO, M. J. M., GELABERT AYÓN FISMA. (1998) Contenido de los aceites esenciales. *Rev. Cub. Farmacia*.
67. REZAEINODEHI A, K. S. (2008) Chemical composition of the essential oil of *Artemisia absinthium* growing wild in Iran. . *Pak J Biol Sci*, 11, 946-9.
68. ROMERO., U. M. (2008) Identificación y cuantificación de los Ácidos Grasos presentes en el aceite de la semilla de *Cucurbita* spp. . Departamento de Farmacia. Santa Clara. Cuba. , Marta Abreu.
69. ROMERO., U. M. (2008) Identificación y cuantificación de los Ácidos Grasos presentes en el aceite de la semilla de *Cucurbita* spp. Departamento de Farmacia. Santa Clara. Cuba. , Marta Abreu.
70. ROMERO., U. M. (2008) Identificación y cuantificación de los Ácidos Grasos presentes en el aceite de la semilla de *Cucurbita* spp. Departamento de Farmacia. Santa Clara. Cuba. , Marta Abreu.
71. ROMERO., U. M. (2008) Identificación y cuantificación de los Ácidos Grasos presentes en el aceite de la semilla de *Cucurbita* spp. Departamento de Farmacia. Santa Clara. Cuba , Marta Abreu.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de Melaleuca leucadendron L. por GC.



72. ROMERO., U. M. (2008) Identificación y cuantificación de los Ácidos Grasos presentes en el aceite de la semilla de Cucurbita spp. Departamento de Farmacia. Santa Clara. Cuba. , Marta Abreu.
73. ROMERO., U. M. (2008) Identificación y cuantificación de los Ácidos Grasos presentes en el aceite de la semilla de Cucurbita spp. Departamento de Farmacia. Santa Clara. Cuba. , Marta Abreu.
74. SAFARALIE A, F. S., SEFIDKON FATEMEH. (2008) Essential oil composition of Valeriana officinalis L. roots cultivated in Iran. Comparative analysis between supercritical CO2 extraction and hydropdistillation. Journal of Chromatography A., 1180, 159-164.
75. SHAFAGHAT A, N. Y., ZAIFIZADEH M. (2009) Composition and antibacterial activity of essential oils of Artemisia fragrans Willd. leaves and roots from Iran. . Nat Prod Commun. , 4, 279-82.
76. SHAFAGHAT A, N. Y., ZAIFIZADEH M. Composition and antibacterial activity of essential oils of Artemisia fragrans Willd. leaves and roots from Iran. Nat Prod Commun. , 4, 279-82.
77. SKALA E, K. D., WAJS A, RÓZALSKI M, KRAJEWSKA U, RÓZALSKA B, WIECKOWSKA-SZAKIEL M, WYSOKIŃSKA H. (2007) In vitro propagation and chemical and biological studies of the essential oil of Salvia przewalskii Maxim. Z Naturforsch, 62, 839-48.
78. SONBOLI A, G. A., YOUSEFZADI M, MOJARRAD M. (2009) Antibacterial activity and composition of the essential oil of Nepeta menthoides from Iran. Nat Prod Commun., 4, 283-6.
79. STAMM, M. D. (1970) Modernos conocimientos sobre la química de los aceites esenciales. Plantas Aromaticas y Medicinales de España, 2, 2-4.
80. SUBEHAN , U. T., IWATA H, KADOTA S, TEZUKA Y. (2006) Mechanism-based inhibition of CYP3A4 and CYP2D6 by Indonesian medicinal plants. J Ethnopharmacol. , 105, 449-55.
81. SWEENEY M, H. S., HUNTER S, KLOTZ SD, GENNARO RN, WHITE RS. (1994) Immunodetection and comparison of melaleuca, bottlebrush, and bahia pollens. Int Arch Allergy Immunol. , 105, Immunodetection and comparison of melaleuca, bottlebrush, and bahia pollens.
82. THOMPSON M, E., SL, FAJGELJ ALES, WILLETTS P, WOOD R. (1999) Harmonized guidelines for the use of recovery information in analytical measurement (Technical Report). Pure Appl. Chem. , 71, 337-348.
83. THOMPSON M, E., SL, FAJGELJ ALES, WILLETTS P, WOOD R. (1999) Harmonized guidelines for the use of recovery information in analytical measurement (Technical Report). Pure Appl. Chem. , 71, 337-348.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de Melaleuca leucadendron L. por GC.



84. THOMPSON M, W. R. (1995) Harmonised guidelines for internal quality control in analytical chemistry laboratories. . Pure Appl. Chem., 67, 49–56.
85. THOMPSON M, W. R. (1995) Harmonised guidelines for internal quality control in analytical chemistry laboratories. . Pure Appl. Chem., 67, 49–56.
86. TSURUGA T, C. Y., EBIZUKA Y, SANKAWA U. (1991) Biologically active constituents of *Melaleuca leucadendron*: inhibitors of induced histamine release from rat mast cells. Chem Pharm Bull 32, 3276-8.
87. VALDÉS AF, M. J., LIZAMA RS, VERMEERSCH M, COS P, MAES L. (2008) In vitro anti-microbial activity of the Cuban medicinal plants *Simarouba glauca* DC, *Melaleuca leucadendron* L and *Artemisia absinthium* L. Mem Inst Oswaldo Cruz. , 103, 615-8.
88. WWW.ECOVISIONES.CL (2008) Cayeput.
89. WWW.FIA.CL (2002) Al rescate de nuestras especies nativas.
90. WWW.FIA.GOB.CL (2005) BÚSQUEDA DE AROMAS FLORALES PARA FINES INDUSTRIALES.
91. WWW.REDNATURALEZA.COM (2009) Cayeput (*Melaleuca leucadendron*).
92. YANG., X. (2008) Aroma Constituents and Alkylamides of Red and Green Huajiao (*Zanthoxylum bungeanum* and *Zanthoxylum schinifolium*). . J Agric Food Chem. , 56, 1689-96. .
93. YOUSEFZADI M, E. S., SONBOLI A, MIRAGHASI F, GHIASI S, ARMAN M, (2009) Cytotoxicity, antimicrobial activity and composition of essential oil from *Tanacetum balsamita* L. subsp. *balsamita*. Nat Prod Commun. , 4, 119-22.
94. ZZ., Z. Y. Y. W. (2008) Comparative analysis of essential oil components of three *Phlomis* species in Qinling Mountains of China. . Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis., 47, 213-217.

Luis Miguel Pavia Quintero.

Obtención, composición y determinación de Cineol en el aceite esencial obtenido de las hojas de Melaleuca leucadendron L. por GC.
