

DETERMINACION DEL CONTENIDO DE CARVONA
EN ACEITE ESENCIAL DE HIERBABUENA
(MENTHA SPICATA L) DE ALGUNOS ESTADOS
DE LA REPUBLICA MEXICANA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
**LICENCIADA EN QUIMICA
FARMACEUTICA BIOLÓGICA**
P R E S E N T A :
ENELUD PINEDA VERGARA

DIRECTOR DE TESIS: M.C. LINO JOEL REYES TREJO

MEXICO, D. F.,

1997.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	Pág.
I.- INTRODUCCION	1
II.- ANTECEDENTES	
1.-Aceites esenciales	4
2.-Aceite esencial de Menthas	7
3.-Aceite esencial de Mentha Spicata L	
a).-Descripción de la planta	9
b).-Distribución en la República Mexicana y a nivel mundial.	11
c).-Producción de aceites esenciales de hierbabuena.	14
d).-Composición química del aceite esencial.	18
e).-Variables que influyen en el contenido de aceite esencial.	19
f).-Usos.	22
4.-Métodos de análisis.	
a).-Análisis fisicoquímicos.	23
b).-Análisis por el método del bisulfito.	26
III.-MATERIAL Y METODOS	27
IV.-PARTE EXPERIMENTAL	
1.-Recolección de muestras de hierbabuena.	30
2.-Preparación de la materia prima.	30
3.-Determinación de humedad.	31
4.-Determinación de las condiciones óptimas de extracción.	33
5.-Extracción del aceite esencial.	33
6.-Análisis por Ultravioleta.	35
7.-Análisis por Cromatografía de Gases.	37

VI.-DISCUSION DE RESULTADOS	47
VII.-CONCLUSIONES	52
VIII.-BIBLIOGRAFIA	53

1.- INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales se encuentran en muchas y diferentes especies de plantas.^{1,2}

Estos aceites se distinguen de los aceites grasos o fijos por el hecho de ser volátiles y poder separarse de la planta por medio de una corriente de vapor y en muchos casos sin un cambio importante en su composición. Aunque no todas las plantas olorosas deben su aroma a los aceites esenciales, en general, es verdad que plantas que son claramente aromáticas no contienen estos aceites.

La mayoría de los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos orgánicos, y su valor generalmente depende de la presencia de uno o más de estos compuestos importantes que les dan sus propiedades características.

Muchos aceites esenciales poseen propiedades terapéuticas y tienen gran uso en medicina, sin embargo, un gran número de aceites comercialmente importantes encuentran su aplicación industrial proporcionando un olor o sabor agradable a algunos productos tales como: perfumes, jabones, artículos de tocador y confitería etc.

Uno de los aceites esenciales más apreciados por su olor y sabor, es el de hierbabuena, por lo que existe una gran demanda a nivel mundial. En México no se dispone de la materia suficiente para satisfacer la demanda de aceite esencial de hierbabuena a pesar de que cuenta con los terrenos y condiciones apropiadas

para el cultivo de la planta, por lo que nuestro país es un gran importador de este aceite.

En nuestro país existen dos tipos de hierbabuena la llamada "hierbabuena de comer" (*Mentha spicata* L.) y la "hierbabuena de olor" (*Mentha piperita* L.), siendo más común la primera. Ambas son cultivadas en pequeña escala, destinándose toda la producción para su uso como condimento o infusiones medicinales.

Los principales productores de hierbabuena en México son los estados de Tlaxcala y Puebla.³

El principal constituyente del aceite esencial de hierbabuena (*Mentha spicata* L.) es la L-Carvona la cuál se encuentra en una proporción de 42-67 %, esta proporción varía según el origen de la planta.^{4,5}

En la literatura se tienen datos del contenido de L-Carvona y demás componentes en el aceite esencial de diferentes partes del mundo excepto de nuestro país,^{6,7} por lo que se consideró conveniente realizar un estudio con respecto a este punto, de esta forma, los objetivos planteados en este trabajo son los siguientes:

- a).- Optimizar las condiciones necesarias para la extracción del aceite esencial.

- b).- Cuantificar la L-Carvona obtenida del aceite esencial de hierbabuena por los métodos espectroscopicos y cromatografía de gases.

c).- Efectuar una comparación de los resultados obtenidos de las diferentes muestras de aceite esencial.

II.- ANTECEDENTES

1.- ACEITES ESENCIALES

Se les llamó aceites esenciales o esencias porque se creyó que por su olor y sabor en ellos se concentraba la quinta esencia de las plantas, estos se caracterizan por su olor agradable, y se obtienen por extracción de plantas (flores, raíces, hojas, cortezas etc.).⁸

Una definición absolutamente científica de los aceites volátiles es difícilmente posible; más para todos los fines prácticos pueden ser definidos como cuerpos odoríferos de naturaleza oleosa, obtenidos casi exclusivamente de fuentes vegetales generalmente líquidos (algunas veces semisólidos o sólidos).

La función del aceite esencial de la planta no se conoce bien, quizá los olores de las flores atraen o repelen a ciertos insectos y así ayudan a la selección natural.

Los aceites de las raíces, del leño y de las hojas tal vez protegen contra plantas parásitas y contra las depredaciones de los animales.

Las exudaciones oleo-resinosas formadas cuando se hiere el tronco de un árbol parecen actuar como obturación protectora contra enfermedades y parásitos.

Existen alrededor de 3000 tipos de aceite identificados del enorme número de especies de vegetales y varios cientos comercializados, muchas de estas especies habitan en zonas geográficas remotas en condiciones excepcionalmente primitivas pero el hombre civilizado ha demandado desde hace tiempo sus preciosos productos.

En siglos pasados, algunos aceites se usaron como productos medicinales, otros para inciensos y perfumes.

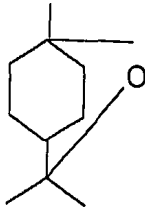
La mayor parte de los aceites volátiles están compuestos de terpenos, sustancias oxigenadas, sesquiterpenos y pequeña cantidad de residuos no volátiles.

Muchos de los componentes de los aceites esenciales pueden sintetizarse económicamente con materias de otros orígenes, principalmente derivados del alquitrán de hulla y del petróleo. De ello resulta la disponibilidad de muchos productos químicos sintéticos para perfumes y condimentos (tales como el Cinamaldehído, la vainilla y el alcohol fenilético).

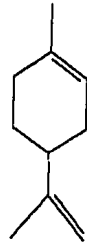
Los aceites esenciales son mezclas de un número variable de sustancias orgánicas olorosas, entre ellos están los que se muestran a continuación:⁹



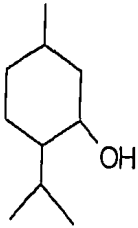
α - pineno



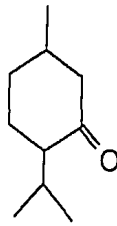
cineol



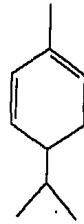
d - limoneno



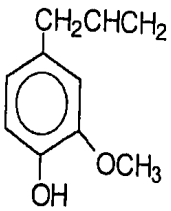
mentol



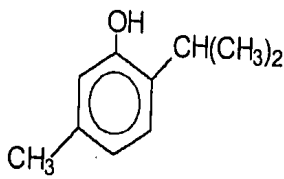
mentona



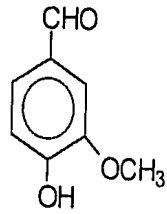
felandreno



Eugenol



Timol



Vainillina

2.- ACEITE ESENCIAL DE MENTHAS.

El aceite esencial de mentas es muy común, puesto que su producción es a un costo muy bajo y no necesita de cuidados especiales porque crece como planta silvestre, existen muchos tipos de menta, entre ellas las siguientes:¹⁰

Mentha piperita folium. Tiene de 1.3 a 2.1 % de aceite esencial su principal constituyente es el Mentol que esta en un 50-78 % y (-) mentona en un 10-30 %.

Mentha piperita lamiaceae: Este tipo de menta contiene acetato de metilo 5-20 %, mentofurano de 2.5 a 5 % el valor de isomentona es bajo, pulegona, piperitona, cineol, limoneno y jasmona en una proporción de 0.1 %.

No es tan específico el 1.2 % de aceite esencial, contiene 4.5-10 % de esteroides (tomando en cuenta el acetato de metilo) 44 % de alcohol (tomando en cuenta el mentol) y el 15-32 % de cetonas (tomando en cuenta la mentona e isomentona).

Mentha arvensis variedad piperascens: Tiene de 0.2 - 0.3 % de aceite esencial aproximadamente. Cualitativamente la composición es parecida al aceite de Mentha piperita excepto mentofurano y cineol que no tiene. 3-17 % de esteroides tomando en cuenta el acetato de metilo y el 42 % de alcohol (tomando en cuenta el mentol) y el 25-40 % de cetonas (tomando en cuenta la mentona).

Mentha pulegium lamiaceae Esta es una mezcla de Mentha piperita y Mentha arvensis). Tiene de 1-2 % de aceite esencial, pulegona (80-95 %) y bajo el contenido de piperitona y mentol.

Mentha crispae folium. Contiene de 1-2 % de aceite esencial.

Mentha spicata lamiaceae variedad crispera tiene L -carvona de un 42-67 %, acetato de dihidrocarvol y alcohol dihidrocuminil, pineno, limoneno y felandreno.

3.-ACEITE ESENCIAL DE MENTHA SPICATA L.

a).- DESCRIPCION DE LA PLANTA

Planta de 30 a 50 cm (figura No.1),hojas más o menos arrugadas y mezcladas con numerosos segmentos de los tallos, estos son cuadrangulares a menudo con ramas opuestas generalmente de 1 a 3 mm de anchura.

Inflorescencia ,limbo tetrahendido, 4 estambres iguales que se extienden por encima del tubo de la corola, estilo bihendido en el ápice. ¹¹

Reino: Vegetal

Subdivisión: Angiospermae

Familia:Labiatae

Género:Mentha

Especie: Spicata

Nombre Científico: Mentha Spicata L.

Nombres Vulgares: Menta verde, menta romana

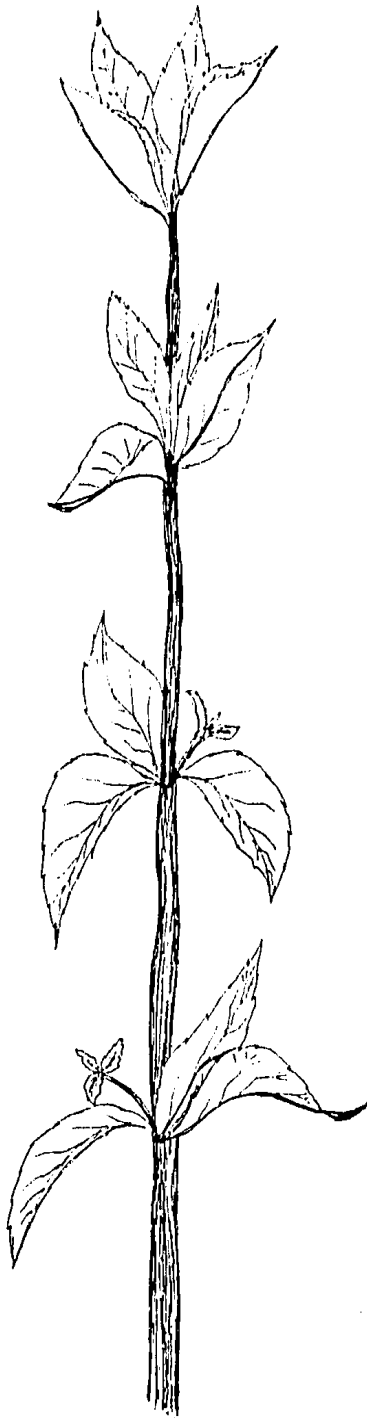


Figura 1: PLANTA DE HERBABUENA

b).- DISTRIBUCION EN LA REPÚBLICA MEXICANA Y A NIVEL MUNDIAL.

La hierbabuena es una planta silvestre que crece en todo tipo de clima y no necesita cuidados especiales.¹²

Es cultivada en Inglaterra, Estados Unidos Japón Grecia, Italia, Francia, Alemania etc. La más grande proporción del abastecimiento proviene de Estados Unidos pero dado que el valor intrínseco de este aceite se encuentra en su aroma y sabor el producto inglés conserva el primer lugar

Este hecho se ve debatido en algunas ocasiones por compañías continentales, pero el precio de cualquier mercancía casi invariablemente indican su calidad.

En Inglaterra se cultivan dos variedades; *Mentha piperita officinalis* forma *rubescens* camus, la menta negra, la *mentha Piperita* variedad *officinalis* forma *pallescens*, esta última es más ampliamente cultivada por ser más robusta y por producir una mayor cantidad de aceite volátil.

También en Michigan e Indiana crecen dos tipos la llamada Americana o común y la llamada Scotch o hierbabuena Highland.

La hierbabuena Scotch entró al país aproximadamente por el año de 1910, la planta típica o nativa es menos resistente, es más fácilmente destrozada por las heladas. La gran ventaja de la hierbabuena Scotch se dice que es por su alto contenido de aceite por hectarea.¹³

La hierbabuena cultivada en Rusia y el aceite obtenido de esta, es muy diferente al de América, al Inglés y Alemania esto se debe al bajo contenido de Carvona y un alto contenido de Linalol y Cineol, (tabla I).

El olor del aceite de Rusia no es tan fuerte como el que tiene el aceite de América.¹⁴

En Japón la industria de la *Mentha* florece en Hokkaido, Okayama e Hiroshima donde se conocen dos variedades, la *Mentha arvensis* y la *Mentha* japonesa, esta última germina a principios de primavera y florece en el otoño.

En Italia se producen actualmente muy finos aceites de *Mentha* y constituyen un buen sustituto para el carísimo aceite inglés. Las *Menthas* ricas en carvona son cultivadas en un límite de extensión porque sus campos son bajos en nutrientes y la productividad es muy pobre.¹⁵

En México existen dos tipos de hierbabuena la llamada hierbabuena de comer (*Mentha Spicata* L.) y la hierbabuena de olor (*Mentha Piperita* L.) siendo la más común la primera.

Los estados de Tlaxcala y Puebla son los principales productores de hierbabuena, también se cultiva en otros estados pero en cantidades muy pequeñas como son: Michoacán, Estado de México, Chiapas, Guerrero, Campeche, Colima, Veracruz y el bajo.

En nuestro país no existen datos en la literatura de estudios que se le hallan hecho a la hierbabuena.

Tabla comparativa de diferentes tipos de hierbabuena a nivel mundial.

Muestra número	Lugar de origen	Gravedad específica	Rotación óptica	Comentarios	Índice de refracción	Número de éster	Contenido de carvona
1	Americano	0.919	-50 a 15	Analizado por Messrs Fritsch Bros. Inc.	1.4851	12.4	57.0- %
	(U.S.A.)	0.933	-60 a 10		1.4899		71.5 %
2	Ditto	0.9290	-52 a 10	Aceite destilado de Michigan valor de acetil 36.4.	1.4866		66.0%
3	Ingles	0.926, 0.935	-39 a 52				38- 48 %
4	Austria	0.936,0.952	-38 a 52		1.4890,1.4930		61- 72 %
5	Rusia	0.880,0.895	20 a 28	Bajo contenido en carvona		15-25	5-10 %

TABLA I

c).- PRODUCCIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE HIERBABUENA.

Hay tres métodos de producción de aceites volátiles: destilación con vapor de agua, expresión y extracción. Esta puede hacerse con grasa fría (enfloración), con grasa caliente (maceración) o con disolventes volátiles, en el caso del aceite de hierbabuena el método más recomendable es el de extracción por arrastre con vapor.

DESTILACIÓN CON VAPOR DE AGUA

La destilación con vapor de agua es el método más común de separar los aceites esenciales del material de la planta tal como se aplica actualmente en la industria de aceites esenciales, abarca los tres tipos de hidrodestilación que se describen a continuación.

Destilación en agua.

En este procedimiento, el material vegetal está en contacto directo con el agua hirviendo el calor se aplica por los métodos usuales (fuego directo, camisa de vapor, etc.).

Este método se emplea con frecuencia para la destilación del aceite de pétalos (ejemplos: aceite de azahar y aceite de rosas); el material de la planta no se aglutina y el vapor puede penetrar sin dificultad.

Destilación con agua y vapor.

El material de la planta se suspende sobre una rejilla que sirve de doble fondo en el contenedor. En éste se agrega agua hasta un nivel un poco inferior al

de la rejilla. Así, el material de la planta está en contacto con el vapor saturado a baja presión, pero no está, sumergido en el agua hirviendo.

Destilación con vapor directo.

Este método es semejante al anterior, salvo que no hay agua en el fondo del contenedor. El vapor se genera en una caldera separada (esto es: se emplea vapor "seco").

Considerando los principios fundamentales de la destilación de dos líquidos inmiscibles, poca diferencia existe en estos tres métodos de hidrodestilación; pero en la práctica intervienen factores importantes. El aceite esencial no está distribuido por igual en el material de la planta, sino que se halla en muchas pequeñas glándulas de aceite, para que el vapor se ponga en contacto con el aceite, hay que desgarrar los tejidos y romper las membranas de las glándulas o hacer que el aceite se difunda a través de esas membranas.

Este proceso complejo de difusión y de ósmosis recibe el nombre de hidrodifusión. Otro factor es la solubilidad relativa de cada componente del aceite en el agua del contenedor. La destilación con vapor recalentado tiende a impedir la hidrodifusión; la destilación en agua la facilita.

Por medio de ensayos se ha averiguado qué método de destilación es mejor para cada aceite esencial. Se ha encontrado por ejemplo, que la destilación con agua no es conveniente para el jengibre, a causa del elevado contenido de almidón en estos rizomas. En muchos casos, es importante cargar uniformemente el alambique para evitar la formación de canales de vapor con la resultante disminución del rendimiento.

Los aceites más solubles requieren con frecuencia destilación repetida de las aguas de destilación con nueva cantidad de material vegetal con el fin de aumentar el rendimiento y obtener un aceite de buena calidad. Los aceites que tienen una densidad próxima a la del agua requieren una batería de frascos florentinos para la suficiente separación de los dos líquidos condensados.

El aceite de mircia (canela aclavillada) y algunos otros requieren dos separadores, uno para la fracción más densa y el otro para la fracción más ligera que el agua.

Los aceites de los frutos cítricos se obtienen por expresión. El aceite esencial está contenido en numerosas celdillas ovales distribuidas irregularmente en el epicarpio (flavedo, parte coloreada exterior de la corteza). Exprimiendo la corteza se rompen las celdillas y sale de ellas el aceite, que se recoge como líquido turbio con el agua de las células. El aceite se separa y clarifica por decantación, centrifugación, filtración u otro procedimiento.

Los frutos cítricos de los que se obtienen aceites esenciales por expresión son los siguientes: naranja dulce, naranja amarga, limón, mandarina, naranja tangerina, bergamota y lima.

En el caso del aceite de lima, la mayor parte de la producción industrial es de aceite destilado con vapor.

Ciertas flores no producen aceite directamente por destilación (por ejemplo: el jazmín, la gardenia, la tuberosa y la violeta). O bien el aceite se destruye por la acción del vapor, o las pequeñísimas cantidades del aceite realmente destilado están completamente disueltas en el gran volumen del agua

de destilación y no pueden ser obtenidas económicamente. Para las flores de este tipo deben emplearse métodos diferentes de la destilación con vapor.

Para este fin se han creado técnicas sumamente especializadas en las fábricas de la región de Grasse, del sur de Francia. Grasse se ha convertido en el centro de esta industria y ha conseguido renombre mundial.

Tres métodos se emplean para obtener los aceites esenciales de flores: enfloración, maceración y extracción con disolventes volátiles.

El fundamento de la extracción con grasa fría es sencillo. Si los pétalos frescos del jazmín, por ejemplo, se ponen en contacto con una delgada capa de grasa, el perfume emitido por las flores es absorbido.

Extracción con disolventes.

Este método está basado en el hecho de que los disolventes volátiles (éter de petróleo y benceno) penetran rápidamente los pétalos y disuelven.

La elección del material de las plantas y del disolvente original determinan la calidad del producto obtenido.

d).-COMPOSICION QUIMICA DEL ACEITE ESENCIAL.

El principal constituyente del aceite esencial de hierbabuena es la carvona que se encuentra en una proporción de alrededor de 56 %. Además contiene otros compuestos en menor proporción como muestra la figura 2.

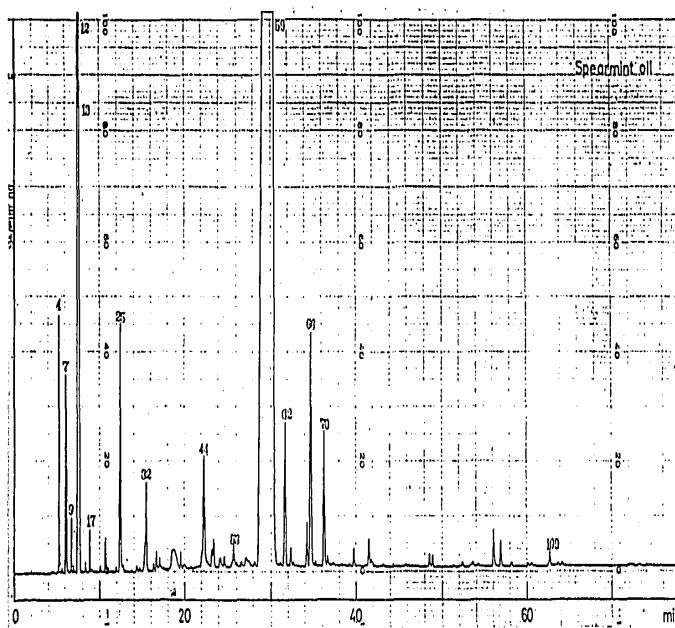


Fig. 2 Chromatogram of Spearmint Oil (Y. Massda).
4. α -pinene, 7. β -pinene, 9. α -phellandrene, 12. limonene, 13. cineol, 17. p-cymene,
25. octanol-3, 32. menthone, 44. neomenthol, 53. menthol, 59. carvone.

e).- VARIABLES QUE INFLUYEN EN EL CONTENIDO DE ACEITE ESENCIAL

El contenido de aceite esencial disminuye considerablemente durante la floración de la planta.¹⁵

El cultivo de hierbabuena debe ser libre de malas hierbas ya que pueden ser destiladas causando olor y sabor desagradable.

Disminuye el contenido de aceite también si el cultivo es expuesto a altas temperaturas.

La época de corte siendo la mejor la de los meses de febrero a junio puesto que temperaturas muy altas o muy bajas afectan a la planta así como la época de lluvia.

El secado inadecuado de la planta es otro factor que se debe cuidar para evitar que disminuya el contenido de aceite esencial y esto se puede hacer no poniendo la muestra directamente al sol ni por tiempos prolongados.

La presencia de dimetil sulfuro en aceites de hierbabuena, disminuye su olor y sabor. Esto se debe a la contaminación por *Mentha Piperita* en la cual es muy común dicho compuesto.¹⁶

El contenido de aceite esencial es mayor en las hojas que en tallos.

La apropiada preparación del material vegetal es de gran importancia en la producción del aceite esencial. La trituración expone más glándulas de aceite y reduce el grueso del material, esto permite una destilación más rápida, mayor rendimiento y mejor calidad del aceite al mismo tiempo que menor consumo de combustible.

En general se ha observado que existen diferentes factores que influyen tanto en el contenido de aceite esencial como en el porcentaje de carvona en hierbabuena M.L:Sharma,¹⁷ y colaboradores encontraron el tiempo óptimo de cosecha y los meses en que el porcentaje de aceite esencial aumenta.(tabla II).

Tabla II : Determinación del tiempo óptimo de cosecha de la hierbabuena en Lucknow.

FECHA DE CORTE	HUMEDAD	CONTENIDO DE ACEITE ESENCIAL %
15/MARZO/1972	82	0.73
22/MARZO/1972	78	0.99
29/MARZO/1972	75	1.25
05/ABRIL/1972	75	1.25
12/ABRIL/1972	75	1.40
19/ABRIL/1972	75	1.50
26/ABRIL/1972	75	1.55
03/MAYO/1972	75	1.65
10/MAYO/1972	75	2.05
17/MAYO/1972	75	1.95
24/MAYO/1972	75	1.33
03/JUNIO/1972	75	1.25
10/JUNIO/1972	75	1.00
17/JUNIO/1972	75	0.77
24/JUNIO/1972	75	0.75
02/JULIO/1972	75	0.70

f).- USOS

El aceite esencial de hierbabuena es ampliamente usado como agente saborizante y en fragancias son muchas sus aplicaciones, por ejemplo en pastas dentales, enjuagues bucales, aromatizantes, limpiadores de pisos, como condimento .como repelente de insectos . en dulces, helados, gomas de mascar, en preparaciones farmacéuticas etc.

4.-METODOS DE ANALISIS

a).-ANALISIS FISICOQUIMICOS

Gravedad específica.¹

La gravedad específica de un aceite esencial puede ser definida como la relación de peso de un volumen dado de aceite esencial entre,el peso de un volumen igual de agua, a una temperatura establecida.

La gravedad específica es un criterio importante de la calidad y pureza de un aceite esencial. Así, debido a que los terpenos poseen una baja gravedad específica, al ser removidos del aceite esencial este aumenta su gravedad específica.

Los valores de gravedad específica para aceites esenciales varían entre los límites de 0.696 a 1.188 a 15° C , siendo generalmente menor de 1.000.

Los picnómetros ofrecen el método más conveniente y rápido para la determinación de esta propiedad.

Rotación óptica.

La mayor parte de los aceites esenciales cuando son expuestos a una emisión de rayos de luz polarizada poseen la propiedad de rotarla a la derecha (dextrogira) o a la izquierda (levogira). La extensión de la actividad óptica de un aceite esencial es determinada por el uso de un polarímetro y es medida en grados de rotación. El polarímetro más conveniente para usar en aceites esenciales es el de tipo Lippich de media sombra.

El ángulo de rotación depende de la naturaleza del líquido, longitud de la columna a través de la cual pasa la luz, longitud de onda de la luz usada y de la temperatura.

La escala de la lectura es directamente proporcional a la longitud de la columna de transmisión del líquido, por esto es necesario emplear un tubo patrón de 100 mm de longitud. Si por alguna razón es utilizado un tubo largo o más corto, la rotación óptica debe ser calculada para un tubo de 100 mm y se reportara como tal. Es usual en el polarímetro utilizar luz de sodio para su iluminación.

La rotación óptica de los aceites esenciales es influenciada por la temperatura y por tal razón en toda determinación debe reportarse la temperatura de trabajo.

Índice de refracción.

Cuando un rayo de luz pasa de un medio de baja densidad a un medio de mayor densidad, este es inclinado o "refractado" con respecto a la normal y se le denomina rayo refractado. El índice de refracción es entonces la relación entre los senos del ángulo de incidencia y el ángulo de refracción.

Los terpenos poseen bajo índice de refracción, es por esto que un aceite esencial destilado presenta un índice de refracción más alto con respecto al del aceite original.

El refractómetro de Abbe, con un rango de índices de refracción de 1.3 a 1.7 es recomendado para análisis de rutina de aceites esenciales. Es adecuado, pero no necesario, realizar las determinaciones empleando luz de sodio amarilla como fuente de iluminación.

El índice de refracción está en función de la temperatura por lo cuál se ha convenido reportarlo, para aceites esenciales a 200°C

.Solubilidad en etanol.

Muchos de los aceites esenciales son solo ligeramente solubles en agua y son miscibles en etanol absoluto. En general aceites ricos en compuestos oxigenados son más solubles en etanol que aceites ricos en terpenos.

La solubilidad de un aceite esencial puede cambiar con la edad de éste. Por esto, la solubilidad es una prueba muy importante que puede contribuir a revelar una posible oxidación y además algún caso de adulteración. La polimerización es a menudo acompañada de una disminución de la solubilidad.

Para la determinación de esta propiedad física, se emplean probetas graduadas de 10 ml con tapón esmerilado y alcohol etílico de diversas graduaciones comprendidas entre 60 y 900. La determinación se efectúa usualmente a 200°C. El resultado se expresa indicando la relación aceite/ etanol empleada y la graduación de este último.

b).-ANALISIS POR EL METODO DEL BISULFITO

Este método se basa en la solubilidad del aceite en solución de bisulfito de sodio.¹

La porción insoluble se mide visualmente y el aceite se calcula por diferencia, el método del bisulfito tiene ciertas desventajas inherentes en el proceso de absorción.

Este método es aplicable solamente en aceites que contengan una gran cantidad de aldehidos y cetonas.

El agua soluble en sulfonato puede ser que forme el noncarbonyl compuesto que puede interferir en la precisión de los resultados analíticos.

Este método no es recomendable para las cetonas como son la carvona, thujone, pulegona, mentona etc. Aunque se utiliza mucho para estas no hay mucha confiabilidad en los resultados. Es recomendable por su buen resultado en el aceite de Cassia

III.- MATERIAL Y METODOS

MATERIAL DE VIDRIO

- 1.- Matracas Erlenmeyer de (25 y 500 ml).
- 2.- Equipo para destilación a presión reducida y por arrastre de vapor.
- 3.- Refrigerantes.
- 4.- Matracas bola de (25, 100 y 250 ml).
- 5.- Embudos de separación.
- 6.- Vasos de precipitado de (50 ml).
- 7.- Probetas de vidrio (100 ml).
- 8.- Embudos de porcelana.
- 9.- Termómetro.
- 10.- Frascos color ámbar para muestras.
- 11.- Matracas kitazato de 1 litro.
- 12.- Vidrio de reloj.
- 13.- Pipetas graduadas.

OTRO TIPO DE MATERIAL

- 1.- Soportes universal.
- 2.- Anillos para soporte.
- 3.- Espátulas de Cromo- Níquel.
- 4.- Recipientes para baño con hielo.
- 5.- Canastillas eléctricas.
- 6.- Pinzas para soporte.
- 7.- Fibra de vidrio.
- 8.- Mangueras de hule delgadas.

APARATOS

- 1.- Rotavapor.
- 2.- Bomba de vacío.
- 3.- Agitadores magnéticos.
- 4.- Balanza analítica.
- 5.- Refrigerador.
- 6.- Espectrófotometro Perkin-Elmer Hitachi 200.
- 7.- Cromatógrafo de gases 5890-A Hewlett Packard

REACTIVOS

- 1.- Metanol
- 2.- Eter etílico.
- 3.- Sulfato de sodio anhidro.
- 4.- Cloruro de sodio.
- 5.- Acetona.
- 6.- Iso-eugenol

IV.- PARTE EXPERIMENTAL

1.-RECOLECCION DE MUESTRAS DE HIERBABUENA.

Para realizar el presente estudio se obtuvieron muestras de 10 kg de hierbabuena fresca proveniente de San Rafael Tlanalapa, San Martín Texmelucan, Santiago Michá, San Miguel Xochitecatitlan y Cuautlixco.

2.-PREPARACION DE LA MATERIA PRIMA.

De la planta fresca se separaron manualmente las hojas de los tallos, y se pusieron a secar sobre papel periódico por espacio de tres semanas a temperatura ambiente, protegiéndolas de que no les diera el sol directamente y removiéndolas regularmente para lograr un secado más homogéneo y evitar la descomposición.

Se utilizó únicamente las hojas secas.

Ya seca la materia prima se pulverizó manualmente para evitar pérdidas de aceite esencial por contacto mecánico.

3.-DETERMINACION DE HUMEDAD

Se determinó por el método de arrastre con tolueno.⁴

Se pesaron 20 g de muestra seca pulverizada en un matraz redondo y se le agregaron 100 ml de tolueno anhidro.

Se armó el aparato, se comenzó a calentar suavemente por medio de una canastilla eléctrica regulada con reóstato hasta que el tolueno empezó a ebullición.

Se reguló el destilado a aproximadamente dos gotas por segundo y se continuó la destilación por 2 horas.

Se dejó enfriar el aparato y se leyó directamente el volumen de agua. Se calculó el % de humedad de la muestra. (Figura 3)

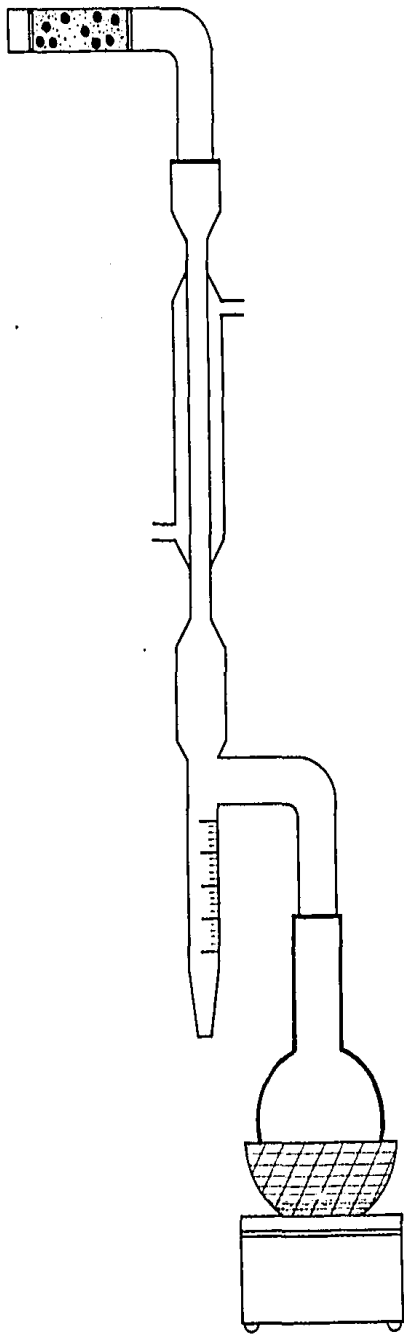


Figura 3: EQUIPO EMPLEADO PARA LA DETERMINACION DE HUMEDAD

4.- DETERMINACION DE LAS CONDICIONES OPTIMAS DE EXTRACCION DEL ACEITE ESENCIAL.

La extracción se efectuó por arrastre con vapor, durante las extracciones de los aceites esenciales, se recolectó el líquido en un matraz para medir en intervalos de 30 minutos, la cantidad obtenida de aceite esencial por tiempo de destilación.

Se emplearon 50 g de hierbabuena seca y se realizó por triplicado para comprobar si los resultados eran reproducibles.

5.-EXTRACCION DE LOS ACEITES ESENCIALES

Se realizó utilizando un matraz de 3 bocas con juntas esmeriladas 24/40 de una capacidad de 1 litro, una "l" de destilación, dos refrigerantes, un matraz bola de 500 ml, 3 soportes metálicos y un anillo de hierro. (Figura 4)

Se inyectó vapor al sistema por medio de un matraz Erlenmeyer de 2 litros, conectado por medio de un tubo de vidrio con un pedazo de manguera a una de las bocas del matraz donde se encontró contenido el material de la planta.

Se emplearon 50 g de hojas de hierbabuena seca.

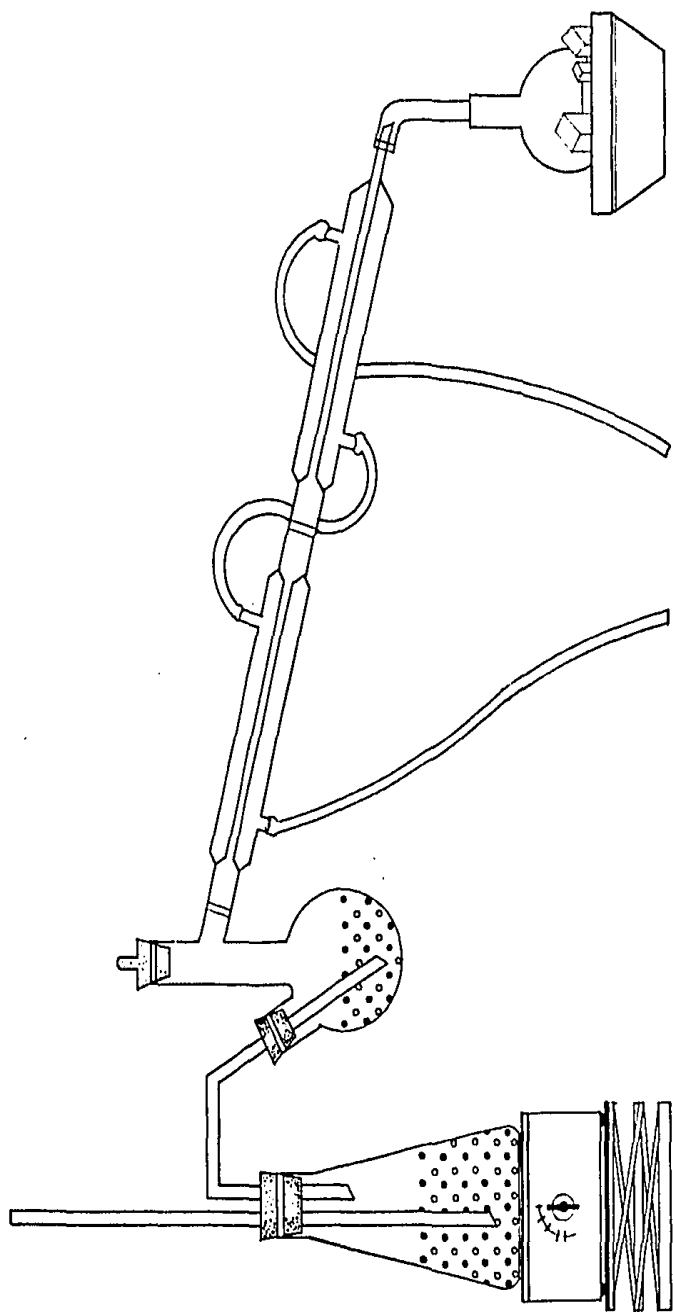


Figura 4: EQUIPO EMPLEADO PARA LA OBTENCION DE LOS ACEITES ESENCIALES.

Al aceite-agua recolectado se le hicieron tres extracciones con éter anhidro.

El éter que contenía el aceite esencial se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró y después utilizando el rotavapor se eliminó el éter, quedando únicamente el aceite esencial. Este se guardó en frascos color ámbar y en refrigeración.

6.-ANALISIS POR ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA

Se utilizó un espectrófotometro marca Perkin-Elmer Hitachi 200 con celdas de cuarzo de 1 cm.

Se preparó una curva patrón de una solución de l-Carvona pura en metanol, pesando 10 mg de l-Carvona y diluyendo en 100 ml de metanol a partir de esta solución se tomaron 8 ml y se aforaron con 50 ml de metanol lo anterior se hizo por triplicado y a partir de ahí se tomaron 6,7 y 8 ml para aforar con 10 ml de metanol y leer la absorbancia de cada una de las soluciones.

Las absorbancias obtenidas se graficaron contra las concentraciones de cada una de las soluciones.

Se pesaron 10 mg de cada una de las muestras de aceite de los diferentes lugares por analizar y se aforaron con 50 ml de metanol y se hicieron las diluciones necesarias para tener la concentración adecuada y leer la absorbancia.

Cada muestra se pesaba por triplicado para ver si los resultados eran reproducibles. Y el día que se pesaba la muestra se efectuaba el análisis para evitar dejarlo en refrigeración con el disolvente y pudiera haber algún cambio en la muestra.

7.- ANALISIS POR CROMATOGRAFIA DE GASES

La cuantificación de la l- carvona en las muestras de aceite esencial de la hierbabuena se inició con una identificación de su pico característico, para esto se realizaron corridas de cada una de las muestras así como también de la solución patrón de la l- carvona (comercial). Esta identificación nos ayudó para localizar la posición de la carvona y así como también definir la muestra patrón interna que puede ser usado. En base a los resultados obtenidos durante la búsqueda de esta muestra, observamos que el iso- eugenol cumplía satisfactoriamente ya que lo que se pretendía era que no interfiriera con los picos que presentan cada una de las muestras. Hay que recalcar que el objetivo de esta muestra patrón es básicamente el de eliminar los errores que puedan presentarse durante las etapas de inyección.

Las condiciones bajo las cuales se llevaron acabo cada una de las corridas son las que se presentan:

CONDICIONES DE OPERACION

Cromatografo: Cromatografo de gases 5890-A

Hewlett Packard

Columna Carbowax 30 mts

Gas portador Hidrógeno

Flujo de gas 30 ml/ min

Temperatura Inicial 60 grados

Tiempo inicial 1 minuto

Temperatura final del horno 220 grados

a 10 grados por minuto

Tiempo final de 20 minutos

Detector: Detector de flama (Hidrógeno)

Temperatura del detector 200 grados

Disolvente Metanol

Las condiciones de operación se definieron en relación con las condiciones a las que la columna opera.

A estas condiciones se realizaron las corridas de las muestras para identificar la posición de la carvona, las cuales se muestran a continuación:

PRUEBAS DEL PATRON INTERNO

Después de haber llevado a cabo la identificación de la carvona y haber definido la muestra patrón interno , se procedió a realizar diferentes pruebas de concentración tanto a la solución de carvona como del iso-eugenol.

Estas pruebas consistieron básicamente en realizar corridas a diferentes concentraciones de la solución de carvona y del iso-eugenol, hasta el momento en el que las áreas de los picos de estas soluciones se asemejen al promedio de las áreas los picos de la carvona encontrada en las muestras.

Las concentraciones que se obtuvieron como las más adecuadas para la solución de carvona , de el iso-eugenol y de las muestras son las que se muestran:

Concentración de las muestras 0.05% en volumen

Concentración de la solución patrón 0.025 % en volumen

Concentración del patrón interno 0.02% en volumen

Estas concentraciones son las que se manejaron durante todas las actividades restantes, pero hay que tomar en cuenta que en los cálculos posteriores se utiliza la concentración en % en peso.

PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Las muestras fueron preparadas de la siguiente manera:

a) Primeramente se peso 1 microlitro de cada una de las muestras, así como también de la solución patrón de l-carvona, los cuales son los que a continuación se muestran en la tabla.

b) Cada una de las muestras de los aceites esenciales se prepararon tomando 1 ml al 0.1 % en volumen y se adicionó 0.4 ml (400 microlitros) de la muestra de iso-eugenol al 0.1 % en volumen y se aforó hasta 2 ml con metanol como disolvente.

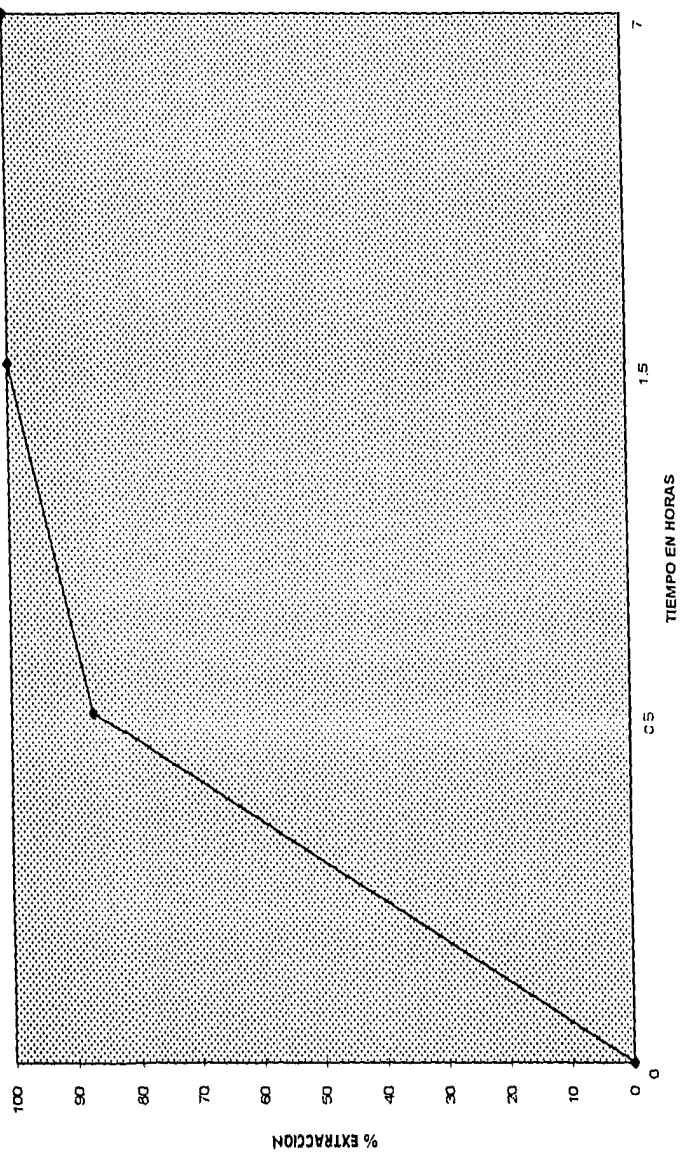
c) La solución patrón de L-carvona se preparó tomando 0.5 ml (500 microlitros) al 0.1 % en volumen, se adiciono el iso-eugenol (0.4 ml al 0.1 % y se aforó hasta 2 ml con metanol,

V.- RESULTADOS

El presente trabajo tuvo como fin cuantificar el contenido de aceite esencial y l carvona en hierbabuena (*Mentha Spicata L*) de diferentes estados de la República Mexicana por cromatografía de gases y espectroscopia ultravioleta y comparar ambos métodos.

Primeramente se tomó el tiempo óptimo de destilación en el cual se obtuvo que es en la primera hora cuando se recolecta la mayor cantidad de aceite como lo muestra la gráfica.

GRAFICA 1: DETERMINACION DEL TIEMPO OPTIMO DE EXTRACCION DEL ACEITE ESENCIAL



Por espectroscopia Ultravioleta se hizo una curva patrón utilizando L-carvona pura haciendo diluciones y ha varias concentraciones quedando como se muestra en la grafica II.

GRAFICA 2:CURVA PATRON L- CARVONA

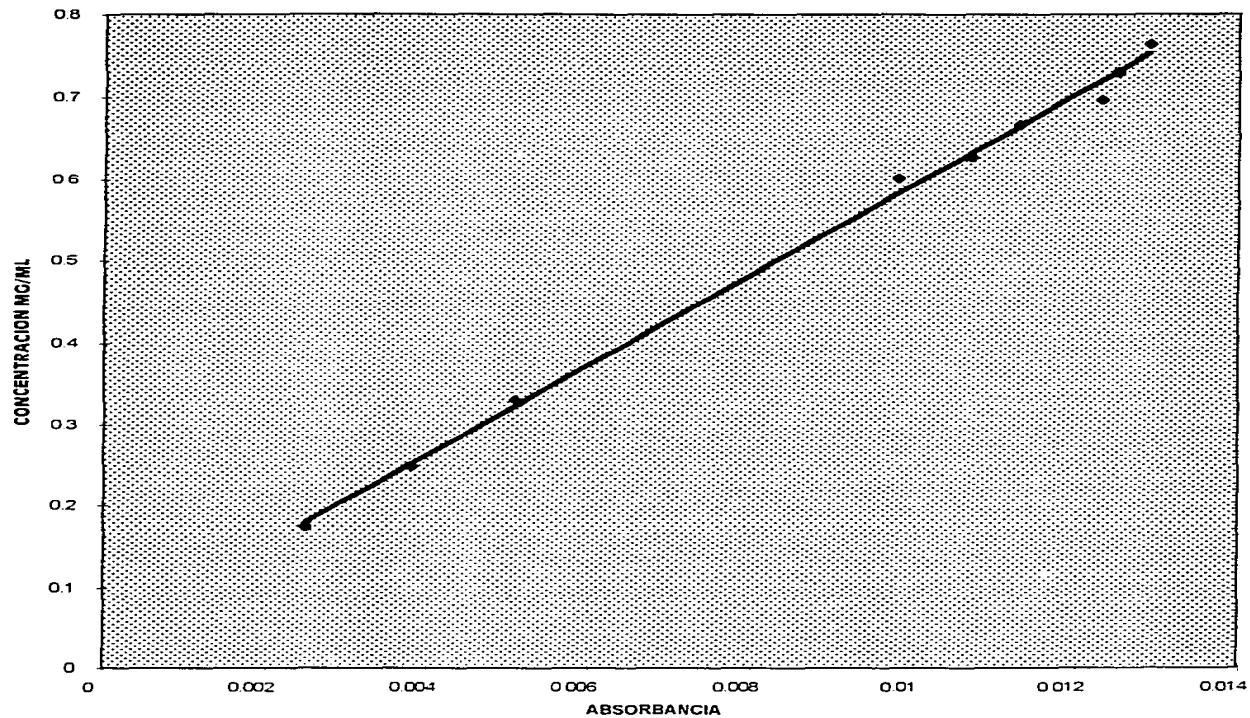


Tabla.III Resultados obtenidos de la determinación del contenido de

I- carvona por espectroscopia ultravioleta.

PUEBLO	% DE ACEITE	%DE HUMEDAD	% DE CARVONA
SANTIAGO MICA. (TLAXCALA).	0.8	8	44.07
SAN MARTIN TEXMELUCAN (PUEBLA).	0.8	9	46.51
SAN MIGUEL XOCHITECATITL AN.(TLAXCALA).	0.6	8	51.87
CUAUTLIXCO. (MORELOS)	0.9	9	56.68
SAN RAFAEL TLANALAPA. (PUEBLA)	0.8	9	59.87
ACEITE ESENCIAL COMERCIAL			87.02

Tabla IV : Resultados obtenidos por cromatografía de gases.

	CONTENIDO DE L- CARVONA (%)
SANTIAGO MICHA.	35.00
(TLAXCALA)	
SAN MARTIN TEXMELUCAN.	37.60
(PUEBLA)	
SAN MIGUEL XOCHITECATITLAN.	42.32
(TLAXCALA)	
CUAUTLIXCO MORELOS	45.68
SAN RAFAEL TLANALAPA.	48.26
(PUEBLA)	
ACEITE ESENCIAL COMERCIAL.	67.86

TABLA IV

VI.- DISCUSION DE RESULTADOS

La extracción del aceite esencial se realizó en 2 horas, tiempo mayor al óptimo (1.5 hrs, grafica 1).

En la tabla III se observa que el contenido de aceite esencial de las muestras analizadas es bajo comparado con el reportado en la literatura, sin embargo, este puede cambiar con el tiempo de cosecha, variable que no fué considerada en el presente estudio.

Por otro lado, la carvona tradicionalmente se determina por el método del bisulfito pero este es muy poco confiable.²²

Los métodos más recomendados para el análisis es por cromatografía de gases y por luz ultravioleta.

El análisis de cromatografía de gases da resultados más bajos que aquellos obtenidos por espectroscopia ultravioleta a 235 nm, esto debido a su mayor selectividad, la diferencia entre ambos conjuntos de valores usualmente es del 5 al 6 % cuando este es llevado a cabo en muestras recientemente destiladas o cuidadosamente al macenadas (atmósfera de nitrógeno y a 5 °C), (tabla V).

Algunos componentes que contribuyen a la absorción de luz ultravioleta a 235 nm evidentemente no son detectados por cromatografía de gases bajo las condiciones experimentales aplicadas estas observaciones sirven para demostrar que los resultados obtenidos por Espectroscopia Ultravioleta no son completamente confiables.

Tabla V : Tabla de comparación del contenido de carvona en E.U. y Canadá por cromatografía de gases y Espectroscopia Ultravioleta.

LUGAR	CROMATOGRAFIA DE GASES %	ULTRAVIOLETA %	DIFERENCIA ENTRE AMBOS METODOS %
MTRA 1 E.U.	65.6	69.4	3.8
MTRA 2 E.U.	61.1	68.1	7.0
MTRA 3 E.U.	66.4	72.6	6.2
MTRA 4 E.U.	64.0	68.8	4.8
MTRA 5 E.U.	54.8	64.2	9.4
CANADA	42.7	56.7	14.0

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Tabla VI : Tabla comparativa del contenido de carvona de los diferentes estados de la República Mexicana realizados por los métodos de cromatografía de gases y espectroscopia ultravioleta.

PROCEDENCIA	CROMATOGRAFIA DE GASES %	ULTRAVIOLETA %	DIFERENCIA ENTRE AMBOS METODOS %
SANTIAGO MICHA	35.0	44.07	9.07
SAN MARTIN TEXMELUCAN	37.60	46.51	8.91
SAN MIGUEL XOCHITECATI- TLAN	42.32	51.87	9.55
CUAULIXCO	45.68	56.68	11.00
SAN RAFAEL TLANALAPA	48.26	59.87	11.61
ACEITE ESENCIAL COMERCIAL	67.86	87.02	19.16

La mayor diferencia observada en los valores de carvona (tabla VI) en el presente estudio posiblemente se debe a la composición de la hierbabuena mexicana; es probable que algunas sustancias presentes en su aceite esencial absorban en la misma región ultravioleta que la carvona.

En general, el contenido de l- carvona presente en las muestras analizadas de los diferentes lugares de México, es más bajo que las correspondientes a E.U., y similares a los publicados para Canadá. Por lo cual podemos concluir que la hierbabuena (*Mentha Spicata* L) de los estados de Puebla Tlaxcala y Morelos es adecuada para su comercialización. Dado que el aceite esencial de Puebla resulta el más alto en contenido de carvona, se recomienda un estudio agronómico que vuelva factible la explotación del cultivo de hierbabuena en esta región, para la extracción y comercialización del aceite esencial.

VII.- CONCLUSIONES

1.-Se determinó el contenido de carvona en el aceite esencial de hierbabuena (*Mentha Spicata L*) de los estados de Puebla Tlaxcala y Morelos utilizando los métodos de Espectroscopia Ultravioleta y cromatografía de gases.

2.-Se encontró que en general, el contenido de carvona en estos lugares es ligeramente más bajo que el de los Estados Unidos y muy similar al de Canadá.

3.-Particularmente el aceite esencial procedente del estado de Puebla (San Rafael Tlanalapa) resultó el de más alta calidad.

4.-Todo esto lleva a recomendar el cultivo intensivo de hierbabuena (*Mentha Spicata L*) en esta región, para la extracción y comercialización de su aceite esencial.

VIII.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Guenther E., the essential oil, D. Van nostrand Company Inc., Vol.I pág. 17-50
(1949)
- 2.- Guenther E., The essential oil, D. Van nostrand Company Inc., Vol. II (1949).
- 3.- Osvaldo A: Torres y Juan A: Retamar, Instituto de Química Orgánica , San Miguel de Tucumán (Argentina) Aceite esencial de Mentha Viridis (Mentha Spicata).
- 4.-Wagner S. Bladt E.Zgainski E., Plant drug analysis, página 5-12 New York (1984)
- 5.-Kirk-Othmer, Enciclopedia de Tecnología Química, Vol. I página 62-76, Uteha (1961).
- 6.- D. Morison Smith, William skakum and Leo Levi, Agricultural and Food Chemistry. Vol. II , página 268-273, may-june 1963.
- 7.- Arnaldo Codignola and Maurizio Fieschi,Essential oil from Mentha Spicata L. (Spearmint) cultivated in Italy, Flavour and fragrance journal vol. I página 105-109 (1986).

- 8.- Poucher W. A., *Perfumes cosmetics and Soaps*, Chapman hall, 9 th edition, página 372 (1991).
- 9.- Dr. Xorge Alejandro Dominguez *Métodos de Investigación Fitoquímica*, Limusa (1988).
- 10.-Wagner S., Blatt E., Zgainski E, *Plant drug analysis*, página 5-12 New York (1984).
- 11.-Osvaldo A. Torres y Juan A. Retamar, *Universidad Nacional de Tucumán (Argentina)* 1975.
- 12.- S. Kokkini y D. Vokou, *Mentha Spicata (lamiaceae) chemotypes Growing wild in Greece Economic Botany*, página 192-202 (1989).
- 13.- Robert H. Reitsema Frederick, *Agricultural and food chemistry* vol. 5 No. 10 october 1957.
- 14.- D.R. Dhingra and G: N: Gupta, *oil of Spearmint*. página 279-280 March (1952)
- 15.- Massimo maffei, *Essential oil from Mentha Spicata L. (Spearmint) cultivated in Italy. Flavour and fragrance Journal* vol. I, página 105-109 (1986).
- 16.- Kik- Othmer, *Enciclopedia de Tecnología Química*, Vol. I. (1961).

- 17.- M:L: Sharma V: Chandra and a. Singh, Determination of optimum harvesting time for essential oil Bearing Crops raised at lucknow, Indian Perfumer , Página 26-29 (1973).
- 18.- Mc- Nair M. H, Cromatografía de gases, Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, programa regional de desarrollo Científico y Tecnológico, Washington, D:C: (1981).
- 19.-Pecsok L:R: Shields L.D., Métodos Modernos de Análisis químico , página 155-161, Limusa, México (1973)
- 20.- Vogel A: I., Practical Organic Chemistry, página 145-149, London (1956).
- 21.- Reitsema R: H. y Faas W. E., Journal of the american pharmaceutical association página 381, (1957).
- 22.- D. Morison Smith, William Skakum , Agricultural and Food Chemistry, vol 11, página 269-276, may- june 1963