



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Bioquímica y Farmacia

Evaluación de la variación geográfica de la composición del aceite esencial de
Ruta graveolens proveniente de los cantones de Cuenca y Morona

Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de Bioquímico
Farmacéutico.

Autores:

Max Andrés Galarza Crespo

CI: 1400616163

max.galarza.971@gmail.com

Ramón Esteban Sacaquirin Jiménez

CI: 0107156499

ramon.sacaquirin97@gmail.com

Tutora:

Silvia Johana Ortiz Ulloa

CI: 0301082897

Cuenca, Ecuador

16-diciembre-2021

**Resumen:**

Ruta graveolens, conocida como ruda, es una planta de la familia de la Rutaceae, nativa de Europa e introducida en América en la Edad Media. Su aceite esencial está compuesto por terpenos y terpenoides como los: flavonoides, cumarinas, furanocomarinas y mayoritariamente por cetonas. Además, al aceite esencial de *R. graveolens* se le ha atribuido varias propiedades biológicas como una actividad antimicrobiana en contra de especies de bacterias patógenas (Gram positivas y Gram negativas), así como actividad insecticida y anticancerígena.

En este trabajo se evaluó la composición del aceite esencial de *Ruta graveolens* obtenidos de diferentes zonas geográficas, en los cantones de Cuenca y Morona. El análisis se realizó mediante un método optimizado para cromatografía de gases con detección de ionización a la llama (GC-FID). En la optimización del método se observó que una mayor área de picos cromatográficos se obtuvó a una de temperatura de inyección 160 °C. Sin embargo, una mejor resolución se obtiene a 220 °C y para cubrir el amplio rango de temperaturas de ebullición de los posibles componentes del aceite esencial, se continuó los análisis subsecuentes a esta temperatura. Los principales componentes del aceite esencial de *Ruta graveolens* identificados fueron el 2-nananona y 2-undecanova, tanto en los ejemplares del cantón Cuenca como los del cantón Morona. Al comparar la composición general de los aceites de los ejemplares de ambos cantones, se observó una diferencia significativa atribuida a las variaciones por la zona geográfica donde se recolectaron las muestras.

Palabras claves: Aceite esencial. *Ruta graveolens*. Morona. Cuenca. Variación geográfica.

**Abstract:**

Ruta graveolens, known as rue, is a plant of the Rutaceae family, native to Europe and introduced to America in the Middle Ages. Its essential oil is composed of terpenes and terpenoids such as: flavonoids, coumarins, furancomarins and mainly ketones. In addition, the essential oil of *R. graveolens* has been attributed several biological properties such as antimicrobial activity against pathogenic bacteria species (Gram positive and Gram negative), as well as insecticidal and anticancer activity.

In this work, the composition of *Ruta graveolens*' essential oil obtained from different geographical areas, in the cantons of Cuenca and Morona, were evaluated. The analysis was performed using an optimized method for gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID). In the optimization of the method, it was observed that a major area of chromatographic peaks was obtained at an injection temperature of 160 °C. However, a better resolution is obtained at 220 °C and, to cover the wide range of boiling temperatures of the possible components of the essential oil, subsequent analyzes were continued at this temperature. The main components of the essential oil of *Ruta graveolens* identified were 2-nonenone and 2-undecanone, both in the specimens from the Cuenca canton and those from the Morona canton. When comparing the general composition of the oils of the specimens from both cantons, a significant difference was observed attributed to the variations by the geographical area where the samples were collected.

Keywords: Essential oil. *Ruta graveolens*. Morona. Cuenca. Geographic variation.



Índice del Trabajo

Resumen:	2
Abstract:	3
Introducción.....	14
Hipótesis del estudio	14
Objetivo general	14
Objetivos específicos	15
I. Marco teórico	16
1.1 Descripción botánica de Ruta graveolens	16
1.2 Descripción etnobotánica de Ruta graveolens.....	16
1.3 Aceites esenciales	16
1.4 Composición química del aceite esencial R. graveolens	17
1.5 Características físicas del aceite esencial de Ruta graveolens	17
1.6 Actividad biológica del aceite esencial de Ruta graveolens	18
1.7 Factores que influyen en la composición de aceites esenciales.....	20
1.7.1 Factores geográficos	21
1.7.2 Condiciones del suelo	22
1.7.3 Estado fenológico	22
1.7.4 Procesamiento de la planta.....	23
1.8 Métodos de extracción de aceites esenciales	24
1.8.1 Prensado.....	24
1.8.2 Destilación por arrastre de vapor	25
1.8.3 Extracción con solventes volátiles	25
1.8.4 Enfloración	25
1.8.5 Fluidos supercríticos	26
1.8.6 Hidrodestilación	26
1.8.7 Extracción por microondas.....	26
1.9 Métodos analíticos para aceites esenciales	27
1.9.1 Cromatografía de gases (GC)	27
II. Metodología	28
2.1 Diseño de investigación	28
2.2 Marco muestral.....	28
2.2.1 Población y área de estudio.....	28
2.2.2 Tamaño y toma de muestra	29
2.3 Métodos y materiales.....	29
2.3.1 Materiales, equipos y reactivos	29



2.3.2 Preparación de la muestra	31
2.3.3 Extracción del aceite esencial.....	31
2.3.4 Determinación del rendimiento de los aceites esenciales.....	32
2.4 Método analítico	32
2.4.1 Soluciones de estándares.....	33
2.4.2 Pre-validación del método analítico	39
2.4.3 Análisis de datos.....	41
III. Resultados y discusión	42
3.1 Rendimiento de extracción del aceite esencial de <i>Ruta graveolens</i> .	42
3.2 Parámetros analíticos del método optimizado	43
3.3 Caracterización química del aceite esencial de <i>Ruta graveolens</i>	48
3.3.1 Caracterización química según la zona geográfica.....	53
IV. Conclusiones y Recomendaciones.....	56
4.1 Conclusiones.....	56
4.2 Recomendaciones.....	56
Referencias	57
Anexos	65



Lista de tablas

Tabla 1. Características físicas del aceite esencial de Ruta graveolens. <i>Fuente:</i> (Liberty Natural, 2021; SVA organic, 2021).....	18
Tabla 2. Lugar de recolección de ejemplares de Ruta graveolens	28
Tabla 3. Ficha de datos de recolección de ejemplares de <i>R. graveolens</i>	29
Tabla 4. Materiales, equipos y reactivos	30
Tabla 5. Parámetros analíticos del método optimizado en GC-FID	32
Tabla 6. Estándares analíticos. (ChemSpider, 2021; Merck, 2021)	33
Tabla 7. Rendimiento en % p/p obtenido de las muestras de Ruta graveolens de los cantones Morona y Cuenca.	42
Tabla 8. Parámetros analíticos de pre-validación: Límites de detección (LOD), límites de cuantificación (LOQ), precisión intra e interdía y linealidad, y ventanas de tiempo de retención (tR)	44
Tabla 9. Comparación de las áreas de los estándares inyectados a 160 y 220°C por triplicado (n total = 40). DE Desviación estándar. IC: Intervalo de confianza..	46
Tabla 10. Composición química porcentual, de los compuestos identificados, en los aceites esenciales de Ruta graveolens.	49
Tabla 11. Composición química ($\mu\text{g}/\text{ml}$) del aceite esencial de <i>R. graveolens</i> de los ejemplares colectados en Cuenca y Morona. (n=69). DE: Desviación estándar. IC: Intervalo de confianza	53



Cláusula de Propiedad Intelectual

Max Andrés Galarza Crespo, autor del trabajo de titulación “Evaluación de la variación geográfica de la composición del aceite esencial de Ruta graveolens proveniente de los cantones de Cuenca y Morona”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 16 de diciembre del 2021

Max Andrés Galarza Crespo

C.I: 1400616163



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio
Institucional

Max Andrés Galarza Crespo en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Evaluación de la variación geográfica de la composición del aceite esencial de Ruta graveolens proveniente de los cantones de Cuenca y Morona”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 16 de diciembre del 2021

Max Andrés Galarza Crespo

C.I: 1400616163



Cláusula de Propiedad Intelectual

Ramón Esteban Sacaquirin Jiménez, autor del trabajo de titulación "Evaluación de la variación geográfica de la composición del aceite esencial de Ruta graveolens proveniente de los cantones de Cuenca y Morona", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 16 de diciembre del 2021

Ramón Esteban Sacaquirin Jiménez

C.I: 0107156499



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio
Institucional

Ramón Esteban Sacaquirin Jiménez en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación de la variación geográfica de la composición del aceite esencial de Ruta graveolens proveniente de los cantones de Cuenca y Morona", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 16 de diciembre del 2021

Ramón Esteban Sacaquirin Jiménez

C.I: 0107156499



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a mi familia: a mis padres, Marcia y Rómulo, quienes son mi apoyo y fortaleza, que siempre han estado ahí para apoyarme en todos los pasos que he dado en mi vida. A mis tíos las cuales me han brindado siempre acogida y ayuda.

De igual manera quiero expresar mi agradecimiento a la Universidad de Cuenca y a sus docentes que me han formado principalmente como una persona ética y profesional que es capaz de desenvolverse en su carrera.

Así mismo quiero agradecer a nuestra tutora de tesis, la Dra. Johana Ortiz U. que ha demostrado ser una excelente docente además de una persona con una gran paciencia y un enorme deseo de compartir su amplio conocimiento científico.

A nuestro asesor el Ing. David Vanegas que siempre ha sido una persona amable y carismática y en cada momento ha estado dispuesto a brindarnos su soporte y conocimiento.

Un sincero agradecimiento al grupo de investigación de Plantas Medicinales y Productos Naturales, Departamento de Biociencias, y en especial a las Dras. Andrea, Jéssica y Salomé, que han demostrado ser personas con una solidaridad inigualable y siempre hemos podido contar con su apoyo.

Por último, pero no menos importante, a todas las personas que siempre han estado presentes, me han acompañado, brindando su amistad todos estos años de estudio y que se han ganado un lugar en mi corazón.

Max Galarza



En primer lugar quisiera agradecer a Dios por permitirme cumplir con este logro que es muy importante para mi y mi familia, por guiarme a lo largo de mi vida y ser fortaleza en todo momento.

Gracias a mis padres: Ramón Sacaquirín y Lorena Jiménez por ser los principales pilares en mi formación como persona y profesional, gracias por todo el apoyo que me brindaron, por creer y confiar en mi, gracias a ellos aprender a no rendirme y llegar a ser mejor todos los días.

Agradezco también a toda mi familia por estar presentes en cada paso de doy y siempre a estar presta en darme una mano y un consejo cuando mas lo necesito.

Agradezco a la Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Químicas, por permitirme formar parte esta institución, de igual manera agradezco a todos los docentes por haber compartido sus conocimientos a la largo de mi preparación profesional.

De manera especial agradezco a la Dra. Johana Ortiz U, por ser tutora de nuestro proyecto de investigación y al Ing. David Vanegas por ser nuestro asesor quienes con su paciencia, sabiduría, enseñanzas, y dirección nos enriquecemos de conocimiento y permitieron la culminación de este trabajo.

También agradezco al grupo de investigación de Plantas Medicinales y Productos Naturales, Departamento de Biociencias, de manera especial a las doctoras: Andrea, Jéssica y Salomé por brindarnos ese apoyo incondicional y aconsejarnos en todo momento.

Finalmente agradezco a todos esas personas que me han brindado su amistad, por ser parte de mi vida, acompañándome en los buenos y malos momentos y estar presente en todo momento. También agradezco a Max por ser amigo y compañero, por permitirme trabajar con el y ser un apoyo para todo este proceso. De igual manera agradezco a mis amigos Mark y Tom por ese apoyo que me han brindando estos últimos años.

Ramón Sacaquirín

12



DEDICATORIAS

El presente trabajo va dedicado a mis padres, Marcia y Rómulo, por ser los artífices para que yo logre cumplir mis metas y a los cuales les estaré eternamente agradecidos.

A todas las personas que me han brindado su amistad y apoyo incondicional demostrándome que yo puedo cumplir lo que me proponga.

Max Galarza

Esta tesis está dedicada a:

A mis padres Ramón y Lorena

A mis hermanos Xavier, Andrea, Felipe y Viviana

A mis abuelitas María y Blanca

A mis amigos más cercanos

Por el amor, cariño y apoyo que me han demostrado a lo largo de mi vida.

Ramón Sacaquirín



Introducción

Las plantas, como seres vivos, dependen para su desarrollo de factores geográficos, climáticos, nutricionales, entre otros. En respuesta a estos factores, las plantas generan variaciones fenotípicas, así como en la producción de metabolitos primarios y secundarios.

Ruta graveolens es una planta introducida de origen europeo, comúnmente conocida en el Ecuador con el nombre de Ruda. Esta planta es ampliamente utilizada en la medicina tradicional y, debido a su resistencia y adaptabilidad a diferentes factores ambientales, es cultivable en las cuatro regiones del Ecuador.

Los aceites esenciales de las plantas son un conjunto de metabolitos secundarios, principalmente compuestos volátiles, que le brindan a la planta características de sabor, olor y actividad biológica que podría ser de interés farmacológico. En particular, el aceite esencial de *Ruta graveolens* está compuesto principalmente por metil- cetonas, los cuales le confieren sus propiedades de interés biológico.

Debido al amplio uso de *R. graveolens*, al interés farmacológico de determinados compuestos de su aceite esencial, y considerando que el cultivo de la ruda puede adaptarse a diferentes regiones geográficas y condiciones climáticas del Ecuador, en este trabajo de titulación se planteó la evaluación de las diferencias en la composición del aceite esencial entre ejemplares de la región amazónica (cantón Morona) y la región interandina (cantón Cuenca).

Hipótesis del estudio

Existen diferencias cuali-cuantitativas en la composición del aceite esencial de *R. graveolens* obtenidas de los cantones Cuenca y Morona.

Objetivo general

Evaluar la variación de la composición del aceite esencial de *R. graveolens* entre muestras de la especie provenientes del cantón Cuenca y Morona.



Objetivos específicos

- Estimar el rendimiento del aceite esencial de ejemplares de *R. graveolens* recolectados en los cantones Cuenca y Morona.
- Determinar la composición de los aceites esenciales extraídos de las muestras de *R. graveolens* mediante GC-FID.
- Analizar las diferencias entre la composición de los aceites esenciales de los ejemplares de *R. graveolens* de las zonas estudiadas.



I. Marco teórico

1.1 Descripción botánica de *Ruta graveolens*

La especie de *Ruta graveolens* pertenece a la familia de las *Rutaceae*, considerada como una hierba lampiña y en su base puede ser leñosa. Esta planta es perenne y posee una altura que puede oscilar entre 30 y 60 cm. Posee hojas alternas, bi o tri-pinnado-partidas, punteadas-glandular, segmentos lineares, elípticos u obovados. Sus flores se disponen en grupos terminales de un color amarillo, con la corola de 4 o 5 pétalos. El fruto se encuentra en forma capsular de 4-5 lóbulos (Calderín & Calderín, 2020; Rojas et al., 2011).

1.2 Descripción etnobotánica de *Ruta graveolens*

Los saberes tradicionales son parte importante para las diferentes culturas de Latinoamérica. *R. graveolens*, comúnmente conocida como Ruda en Ecuador, posee una amplia aplicación empírica y tradicional. Su infusión se suele usar para el tratamiento de cólicos y problemas gastrointestinales. También se suele usar en rituales para curar el espanto. Las partes que se utilizan con estos fines son las hojas y el tallo, y se lo toma en modo de infusión, decocción o macerado (Galvis & Torres, 2017; Zambrano et al., 2015).

1.3 Aceites esenciales

Los aceites esenciales son líquidos oleosos aromáticos extraídos de diferentes partes de la planta como las hojas, corteza, semillas, flores y cáscaras (Ansah et al., 2019). Químicamente, los aceites esenciales son mezclas complejas de hidrocarburos pertenecientes de la serie polietilénica del grupo mono y sesquiterpenos, y de otros compuestos oxigenados como alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos, esteres y óxidos (Labrada et al., 2018). Los aceites esenciales son considerados como compuestos bioactivos naturales que pueden brindar efectos positivos al crecimiento y salud de los animales (Omonijo et al., 2018).



Los aceites esenciales pueden clasificarse según varios criterios relacionados con diferentes métodos de extracción, composición química, aroma, etc. Con respecto al aroma, los más reconocidos son los aceites cítricos, herbáceos, alcanforados, florales, leñosos, terrosos y picantes. Estos aromas suelen atribuirse a la parte de la planta de la que se extrae el aceite. Tal es el caso de los aceites leñosos que se obtienen de la corteza y partes leñosas de las plantas; o los aceites terrosos son extraídos de las raíces u otras partes subterráneas de las plantas (Ansah et al., 2019).

1.4 Composición química del aceite esencial *R. graveolens*

La composición química de los aceites esenciales puede ser muy variada. Entre los principales componentes están alcoholes (unidos a la estructura terpénica), aldehídos cíclicos y terpenoides; cetonas, éter fenólico, éster, fenilpropanos y sesquiterpenos (Ansah et al., 2019) (Anexo 1).

Se ha reportado que los compuestos que mayoritariamente se encuentra en el aceite esencial *R. graveolens* son la 2-undecanona, 2-nananona, 1-nananona. Se considera que las metil-2-cetonas, en particular la 2-undecanona y la 2-nananona, representan aproximadamente más del 50% de la composición total del aceite (Attia et al., 2018; Chaaban et al., 2019; Perera et al., 2019; Poonkodi et al., 2017).

1.5 Características físicas del aceite esencial de *Ruta graveolens*

Los aceites esenciales poseen características físicas generales que incluyen ser ópticamente activas, volátiles, densidad inferior al agua e insolubles en el mismo. Las características físicas del aceite esencial de *R. graveolens* se presenta en la Tabla 1 (Montoya, 2010).



Tabla 1. Características físicas del aceite esencial de *Ruta graveolens*. Fuente: (Liberty Natural, 2021; SVA organic, 2021).

Aspecto a 20°C:	Líquido
Color:	De incoloro a amarillo pálido
Rotación óptica:	-3 a 4°
Densidad a 20°C:	0,826 - 0,876 g/ml
Índice de refracción nD20:	1,4250 a 1,4850
Solubilidad en agua:	Insoluble

1.6 Actividad biológica del aceite esencial de *Ruta graveolens*

Al aceite esencial de ruda se le han atribuido algunas propiedades de tipo biológico incluyen hepatotoxicidad, antioxidante, antiinflamatorio, citotóxico, antitumoral, antifúngico, anticonceptivo e infertilidad, además de cierta actividad anticancerígena e insecticida (Gentile et al., 2018; Ghamrah et al., 2020; Poonkodi et al., 2017).

- **Actividad citotóxica**

El aceite esencial de *Ruta graveolens* presenta un efecto citotóxico con una viabilidad menor al 40% en seis horas de cultivo de linfocitos humanos (Mena et al., 2016). El aceite esencial de *Ruta graveolens* utilizado en concentraciones mayores 75 µl/ml manifiesta citotoxicidad en el desarrollo de los embriones de *Tetraoygus niger* (Castro et al., 2011).

En el extracto acuoso de *R. graveolens* se han reportado compuestos como alcaloides de tipo acridinas y quinolinas, flavonoides, cumarinas, fitotoxinas y terpenos, los cuales le confieren las propiedades citotóxicas de la planta (Ghamrah et al., 2020; Rojas et al., 2011).



- **Actividad antioxidante**

Dentro del cuerpo humano se producen especies reactivas de carácter oxidativo que provocan efectos negativos a largo plazo, dichas especies reactivas pueden verse neutralizados por sustancias antioxidantes (Coronado et al., 2015).

La actividad antioxidante del aceite esencial de *Ruta graveolens* evaluada mediante el método del radical 2,2-difenilpicrilhidrazil (DPPH) obteniendo resultados relativamente bajos, presentando un IC₅₀ de 16,14 mg/ml esto frente al ácido ascórbico de 2,4 µg/ml, se considera estos resultados podría deberse a la ausencia de compuestos aromáticos (Castro et al., 2011).

- **Actividad antimicrobiana**

El aceite esencial de *Ruta graveolens* presenta una actividad antimicrobiana ante microorganismos Gram positivos y Gram negativos patógenos para el ser humano (Ghramh et al., 2020).

La actividad antibacteriana del aceite esencial de *R. graveolens* ha presentado mayor efecto sobre las cepas de *S. aureus* (Delgadillo et al., 2017). También presenta actividad antimicrobiana frente a *K. pneumoniae* ATCC 10031 (MIC 4,5-5,2 µg/ml), *P. aeruginosa* ATCC 10145 (MIC 5,8-6,3 µg/ml) y *E. coli* ATCC 8739 (7,5-7,94 µg/ml), *S. aureus* ATCC6538 (MIC 3,5-3,9 µg/ml) (Attia et al., 2018).. El aceite esencial de *R. graveolens* tiene una mayor actividad antibiótica con *S. aureus* (ATCC 25923), *B. cereus* (ATCC 10876), *M. flavus* (ATCC 25923), *E. faecalis* (ATCC 49452), *P. mirabilis* (ATCC 35659) con zonas de inhibición mayores a 20 mm (MIC 1,48 µg/ml) indicando que el aceite esencial de *R. graveolens* presenta una mayor actividad antimicrobiana sobre las bacterias gram positivas (Reddy & Al-Rajab, 2016).

Por otro lado, el aceite esencial de ruda posee actividad antifúngica contra cepas *C. albicans* (ATCC 10231). Además las cepas *A. fumigatus* (MNHN 566) y *F. oxyporum*



(MNHN 963917) son más sensibles al aceite esencial en relación con la anfotericina B (Attia et al., 2018; Reddy & Al-Rajab, 2016).

- **Actividad insecticida**

La actividad insecticida del aceite esencial de ruda depende de la concentración del aceite, la especie que se somete y el periodo de exposición (Chaabani et al., 2019). Se ha reportado una actividad insecticida efectiva en larvas de mosca (Ghramh et al., 2020). El aceite esencial de *Ruta graveolens* posee una actividad insecticida significativa frente a *C. cephalonica* y *S. zeamais*, que puede deberse a las 2 metil cetonas, que son sus constituyentes principales (Perera et al., 2019).

- **Actividad antitumoral y anticancerígena**

El aceite esencial de *R. graveolens* produce una disminución en la angiogénesis en células endoteliales umbilicales humanas, pero manteniendo la viabilidad celular (Gentile et al., 2018). La actividad anticancerígena se ha descrito en líneas celulares de HeLa y HepG2 además de reducción del crecimiento en estas últimas (Ghramh et al., 2020).

- **Actividad abortiva**

Esta propiedad se le ha atribuido al extracto acuoso de *R. graveolens* que interfiere en el sistema reproductivo, alterando el nivel hormonal y la morfología de los ovarios en ratas hembra (Rojas et al., 2011).

1.7 Factores que influyen en la composición de aceites esenciales

Los componentes del aceite esencial están sujetos a las exigencias que presentan las plantas en su proceso biológico que está condicionado por factores que influyen en su composición. Entre estos factores están el origen de la especie, la parte que se somete para la extracción, las condiciones climáticas, la temperatura, calidad de tierra, humedad, entre otros (Usano et al., 2014). En particular, la procedencia de



las plantas, es decir la zona geográfica, y las condiciones de crecimiento influyen de manera significativa la composición del aceite esencial, así como en su actividad biológica (Zarate et al., 2018).

1.7.1 Factores geográficos

La variabilidad de la composición del aceite esencial de *R. graveolens* podría verse influenciado por efectos climáticos, variacion estacional, el lugar de crecimiento, las precipitaciones, las condiciones geográficas, la salinidad del suelo, el periodo de cosecha y el efecto de la luz (Reddy & Al-Rajab, 2016), así como se ha observado en otras especies. Por ejemplo, se han reportado diferencias en las actividades antioxidantes e inhibidoras de la acetilcolinesterasa de aceites esenciales de especies de *Hertia cheirifolia* que fueron recolectadas de diferentes zonas bioclimáticas de Túnez (Rahali et al., 2020). También se reportó diferencias significativas en la composición del aceite esencial de *Salvia verbenaca* atribuido a las diferencias en zona geográfica y altitud de los lugares donde fueron recolectadas las muestras (Mannu et al., 2020).

Para el caso de *Ruta graveolens*, la composición del aceite de plantas provenientes de los estados de Mérida y Miranda en Venezuela presentó diferencias en sus componentes mayoritarios 2-nonanona, 2-undecanova y pregeijereno, así como su actividad antibacteriana, según el lugar de recolección de las muestras. Con respecto a especies del género *Ruta*, se ha reportado variabilidad del aceite esencial de *R. montana* en su composición, rendimiento, actividad antioxidante y antimicrobiana, entre muestras recolectadas de diferentes zonas geográficas de Algeria. El rendimiento varió entre 0,43% hasta 1,45%. En cuanto a la composición del aceite esencial, se observó que los componentes mayoritarios son cetonas como: 2-undecanova, 2-nonanona y 2-decanona, además de una diferencia significativa en la composición porcentual según las zonas geográficas. Así mismo, se reportó una diferencia significativa en la capacidad de eliminación de radicales libres DPPH estables, así como en el halo de inhibición del aceite esencial en diferentes especies patógenas de bacterias (Mohammedi et al., 2020).



1.7.2 Condiciones del suelo

La composición del suelo y condiciones climáticas tienen gran influencia sobre los compuestos producidos por una planta, e incluso esta variación puede manifestarse en individuos de la misma especie (Vásquez et al., 2020; Zarate et al., 2018).

El rendimiento del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* varía significativamente según las características del suelo como el pH, el carbonato de calcio total y activo y la relación nitrógeno-fósforo. De igual manera el aceite esencial de *Thymus algeriensis* varía en su rendimiento según el pH, salinidad y relación nitrógeno-fósforo (Mehalaine & Chenchouni, 2020)

Los componentes principales de *Zanthoxylum armatum* varían significativamente en relación al contenido de nitrógeno total, carbono orgánico y pH del suelo. El mayor contenido linalool, limoneno, 2-undecanona, mirceno, 2-tridecanona y alfa bergamoteno se obtuvieron a una menor concentración de carbono orgánico en el suelo (Phuyal et al., 2019)

Se ha reportado que el aceite esencial de *R. graveolens* presenta variaciones en su composición según los niveles de estrés hídrico, existiendo una relación directamente proporcional y también se ha observado que algunos compuestos no se encuentran en el aceite esencial de los ejemplares expuestos a un mayor estrés hídrico (Huertas et al., 2008).

1.7.3 Estado fenológico

Se ha reportado que existe variación en la composición del aceite esencial de *Salvia officinalis* de acuerdo con su estado fenológico (etapa vegetativa, etapa de floración y etapa de fructificación). En particular, en la etapa de floración existe una mayor concentración de eucaliptol (20,4%); mientras que el alcanfor presentó su menor concentración (7,2%) en la etapa vegetativa y un mayor valor (21,8%) en la etapa de fructificación. Por su parte, el viridiflorol mostró su mayor concentración en la



etapa vegetativa (12,0%) y la menor en la etapa de fructificación (3,3%) (Ben et al., 2016).

La composición del aceite esencial de *Salvia verbenaca* está influenciada por el estado fenológico en la que se encuentra la misma. Los principales constituyentes del aceite esencial variaron significativamente según la etapa de floración, etapa de fructificación temprana, etapa de fructificación tardía. En la etapa floración la concentración de p-cimeno es del 11,4% frente a un 5,6% presente en la etapa fructificación temprana. Mientras que el viridiflorol varía su porcentaje en las tres etapas: floración (7%), fructificación temprana (9,1%) y un 13,5% en la fructificación tardía (Ben et al., 2019).

En ejemplares de *Lavanda angustifolia* se ha observado que el contenido de linalool y acetato de linalilo varían entre el estado en floración y durante el fin del florecimiento. El aceite obtenido de plantas en floración se caracterizó por contener 41,4% de linalool y 21,5% de acetato de linalilo; mientras que de las plantas que estaban en el fin del florecimiento fue de 43,5% y 18,9%, respectivamente (Cantor et al., 2018).

Estas variaciones también han sido observadas en el aceite esencial de *Valeriana jatamansi*, en el que la composición porcentual del aceite presentó diferencias significativas con respecto a las diferentes etapas de su ciclo de vida de la planta. En particular, el aceite de la planta en etapa de pre-floración presentó una concentración más alta de compuestos fenólicos (Jugran et al., 2021).

1.7.4 Procesamiento de la planta

Uno de los principales procesos para secar una planta es la utilización de aire caliente; sin embargo, se ha evidenciado una variación en la composición del aceite esencial que se obtiene por este método debido a la degradación de compuestos termolábiles. Específicamente, el rendimiento del aceite esencial de una planta presenta variaciones al ser sometida a diferentes condiciones de secado y de flujo



de aire, donde un aumento de temperatura y flujo permite un secado más rápido pero el rendimiento disminuye (Silveira et al., 2019).

La influencia del secado ha sido reportada en varias especies. Por ejemplo, el perfil de composición química del aceite esencial de *Mentha x piperita L* varia significativamente según el método de secado. La concentración de mentol se incrementa con el secado por microondas; mientras que la concentración de mentona es significativamente menor en las plantas secadas por este método (Beigi et al., 2018). En el aceite esencial de *Thymus daenesis* se ha reportado un mayor rendimiento con el secado por horno al vacío a 35°C, sin tratamiento pre-secado. La mayor concentración de timol se obtiene por secado al vacío a 55°C, sin embargo, existe una reducción de monoterpenos como: α-tujeno, α-pineno, mirceno, α y γ terpineno, p-cimeno y eucaliptol (Dehghani et al., 2018).

1.8 Métodos de extracción de aceites esenciales

Los métodos de extracción convencionales generalmente consumen una mayor cantidad de energía, por lo que se han ido desarrollando nuevos métodos que son más eficientes y ecológicos (Stratakis & Koidis, 2016).

El método de extracción del aceite esencial puede influir en la composición y rendimiento del mismo. Por ejemplo, el aceite esencial de *Flos chrysanthemi* presenta un mayor rendimiento con fluidos supercríticos, así como una mayor cantidad de compuestos oxigenados al igual que en la extracción por microondas. En cambio el aceite esencial obtenido por hidrodestilación posee una mayor cantidad de terpenos (Jing et al., 2019). A continuación, se presentan los métodos más comúnmente utilizados en la extracción de aceites esenciales.

1.8.1 Prensado

Es el método de extracción de aceites esenciales más antiguo. Este método se realiza mediante la aplicación de cualquier tipo de presión sobre las glándulas que contienen aceite esencial, en las cáscaras o cutículas de la planta. La aplicación de



este método es prácticamente exclusiva en plantas del género *Citrus* debido a que su aceite posee una amplia gama de compuestos termolábiles (Stratakos & Koidis, 2016).

1.8.2 Destilación por arrastre de vapor

El método consiste en depositar la materia vegetal en un recipiente cerrado por el que va a pasar vapor. El material vegetal no mantiene contacto con el agua, el calor del vapor provoca que la estructura celular vegetal se rompa y degrade liberando así el aceite esencial y siendo arrastrado por el vapor. El vapor se debe condensar hasta el estado líquido en donde se encuentra el aceite esencial que finalmente debe ser extraído. Este método presenta algunas desventajas como la transformación o degradación de compuestos termolábiles y un contacto con el agua al final de procesos puede producir hidrólisis (Tongnuanchan & Benjakul, 2014).

1.8.3 Extracción con solventes volátiles

Este método conocido como extracción sólido-líquida consiste en sumergir a la droga vegetal en solventes. La mezcla líquida se filtra y se destila para la separación del aceite esencial. Durante el proceso de extracción se usan temperaturas bajas por lo que el método puede ser aplicado para aceites esenciales con compuestos termolábiles (Stratakos & Koidis, 2016).

1.8.4 Enfloración

Se usa principalmente para la extracción de aceites esenciales de flores. El proceso consiste en dispersar una grasa fría inodora purificada sobre el material vegetal. El aceite esencial aromático que se desprende de las flores se impregna en la grasa y el proceso se repite hasta conseguir la saturación de la grasa. Finalmente, el aceite esencial se extrae de la grasa con el uso de alcohol. Es un proceso que requiere bastante trabajo y tiempo (Stratakos & Koidis, 2016).



1.8.5 Fluidos supercríticos

Este método presenta un mayor rendimiento que los procesos de destilación, una mayor conservación de compuestos volátiles y menor tiempo de extracción. La extracción consiste en colocar el material vegetal en un recipiente por el cual pasan fluidos supercríticos a un flujo determinado hasta conseguir las condiciones de extracción adecuadas. Debido a que no se utilizan temperaturas elevadas para el proceso de extracción, este método no descompone compuestos termolábiles y es un método más ecológico debido a que no usa solventes orgánicos tóxicos (Stratakos & Koidis, 2016).

1.8.6 Hidrodestilación

La hidrodestilación se usa principalmente para la extracción de compuestos insolubles en agua con un elevado punto de ebullición. El proceso de extracción consiste en sumergir a la materia vegetal en agua dentro de un recipiente. Posteriormente se somete a una elevada temperatura hasta llegar a ebullición. Este método previene el sobrecalentamiento debido a que la materia vegetal está rodeada de agua, mientras que el aceite esencial se condensa en una fracción acuosa, y finalmente se separa de la fase acuosa por decantación o uso de solventes (Tongnuanchan & Benjakul, 2014).

1.8.7 Extracción por microondas

Se usa principalmente para la extracción de aceites esenciales de plantas aromáticas, especias y semillas secas. Este método presenta ventajas como: un mayor rendimiento, menor tiempo de extracción y ecológico, en relación con la hidrodestilación y destilación por arrastre de vapor. El método combina el calentamiento por microondas, donde también existe un cambio en la polaridad del agua por las ondas y el calor juega el rol de producir destilación en seco, se realiza a presión atmosférica sin ningún tipo de solvente y se extraen los aceites esenciales en una sola etapa (El-Shemy, 2020; Tongnuanchan & Benjakul, 2014).



1.9 Métodos analíticos para aceites esenciales

Existe una gran variedad de métodos y técnicas que nos permiten elaborar los perfiles químicos de los aceites esenciales. Por lo general, para determinar la composición y calidad del aceite esencial se aplican métodos cromatográficos y Espectrometría de masas (MS). Debido a la volatilidad de los compuestos presentes en el aceite esencial uno de los métodos más adecuados para trabajar es por cromatografía de gases (Beale et al., 2017; El-Shemy, 2020).

1.9.1 Cromatografía de gases (GC)

Este método se fundamenta en la separación de compuestos que provienen de una matriz compleja (aceite esencial) en función a la afinidad a sus dos fases, una móvil y otra fija, así como de la temperatura. La fase móvil es aquella que se puede mover dentro de la columna ya sea por capilaridad o presión transportando los compuestos a través de la fase fija. Por lo general la fase móvil es un gas de una elevada pureza, mientras que la fase fija se trata de un sólido que permitirá la retención de los compuestos en relación con su afinidad. En el análisis de aceites esenciales se usan solventes apolares (hexano y pentano) para ser introducidos al inyector el cual se encuentra a una elevada temperatura. La fase móvil transporta la mezcla del aceite esencial con el solvente a través de la columna. En la columna la temperatura puede bajar a 50 °C y se establece un gradiente de temperatura creciente donde los componentes alcanzan diferentes distancias a lo largo de la columna. Los compuestos que recorren la columna tienen un punto de volatilización donde por medio de un detector se captará la señal producida por el compuesto y se proyecta en el monitor mostrándose como picos. La detección del compuesto se puede realizar por el índice de retención (El-Shemy, 2020).



II. Metodología

2.1 Diseño de investigación

Analítico experimental de corte transversal.

2.2 Marco muestral

Son los elementos de la población que forman parte de la muestra finalmente seleccionada (ACCID, 2017).

2.2.1 Población y área de estudio

Los ejemplares de *Ruta graveolens* analizados fueron plantas adultas, sexualmente maduras. Los ejemplares se obtuvieron de cultivos en el cantón Cuenca, provincia del Azuay, y en el cantón Morona, cuya cabecera cantonal es Macas, provincia Morona Santiago.

En las áreas de estudio se registraron los datos de la latitud y longitud de los puntos exactos de colección mediante un GPS (Aplicación maps.me). Estos datos se presentan en la Tabla 2 y la ubicación en el mapa en el Anexo 2.

Tabla 2. Lugar de recolección de ejemplares de *Ruta graveolens*

Cantón	Coordenadas (latitud y longitud)	Referencia	Codificación
Morona	-2.261814,-78.140198	Proaño	M1
Morona	-2.288491,-78.122686	La Florida	M2
Morona	-2.306327,-78.117032	27 de Febrero	M3
Cuenca	-2.920234,-79.075254	Baños	C1
Cuenca	-2.896585,-79.075254	San Joaquín	C2
Cuenca	-2.921932,-79.088184	Barabón	C3



2.2.2 Tamaño y toma de muestra

Se recolectó una muestra de *R. graveolens* de tres puntos distintos dentro del cantón Cuenca y del cantón Morona. Las muestras se analizaron individualmente según el lugar de recolección, resultando en un total de seis muestras analíticas.

Al momento de obtener la muestra se aplicó las buenas prácticas de recolección de material vegetal y se registraron los siguientes datos: nombre de la persona que colecta, fecha y hora, tiempo estimado hasta procesar la muestra, nombre de la especie recolectada, provincia y cantón (Tabla 3).

Tabla 3. Ficha de datos de recolección de ejemplares de *R. graveolens*

Fecha	Hora	Provincia	Cantón
03/01/21	09:58	Morona	Morona
		Santiago	
03/01/21	11:16	Morona	Morona
		Santiago	
03/01/21	12:44	Morona	Morona
		Santiago	
03/01/21	14:37	Azuay	Cuenca
03/01/21	15:45	Azuay	Cuenca
03/01/21	10:31	Azuay	Cuenca
07/01/21	10:05	Morona	Morona
		Santiago*	
10/01/21	09:16	Azuay*	Cuenca

*Se volvió a tomar la muestra por extracción ineficiente del aceite esencial

2.3 Métodos y materiales

2.3.1 Materiales, equipos y reactivos

La analítica de la presente tesis se desarrolló en el Laboratorio de fitoquímica del grupo de investigación de Plantas Medicinales y Productos Naturales,



Departamento de Biociencias, y en el laboratorio de Análisis instrumental de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Cuenca.

El listado de los equipos, materiales, reactivos e insumos utilizados se presenta encuentran en la Tabla 4.

Tabla 4. Materiales, equipos y reactivos

Equipos	Cromatógrafo de gases, modelo 6890N, equipado con un detector de ionización a la llama (FID) y un inyector split/splitless (Agilent Technologies)
	Balanza analítica (Ohaus)
	Generador de hidrógeno H2-90 (Parker)
	Homogeneizador vórtex (Biobase)
	Pipetas automáticas de 10-100 µl; 100-1000 µl (Glassco)
	Ultra Freezer -80 °C (Fisher Scientific)
	Recirculador para refrigeración (VWR)
	Manta calefactora (Termo Scientific)
Materiales	Matraz balón 1000 ml
	Tubos de ensayo medianos con tapones
	Tubos cónicos plásticos de 15 ml
	Frascos volumétricos de 50, 100 y 500 ml
	Puntas descartables para micropipetas
	Vasos de precipitación de 50, 100 y 500 ml
	Microtubos
	Microjeringas de inyección para GC
	Férulas
Reactivos y estándares	Columna capilar GC Zebron ZB-5 (60 m x 0.25 mm x 0,25 µm)
	Agua destilada
	Aires sintético ultrapuro
	Nitrógeno ultrapuro



	Sulfato de sodio anhidro
	Hexano grado cromatográfico
	Mezcla de estándares de sustancias volátiles*
Insumos de laboratorio	Guantes
	Mascarillas
	Zapatones
	Cofias
	Jabón

*Lista completa de estándares descritos en la Tabla 6

2.3.2 Preparación de la muestra

Los ejemplares colectados de *R. graveolens* fueron llevados al laboratorio dentro de las primeras 24 horas después del muestreo. Las muestras fueron inspeccionadas de manera visual y se eliminaron manualmente las impurezas (orgánicas e inorgánicas). El material vegetal seleccionado para la extracción fueron las hojas y tallos no leñosos, que fueron lavadas primero con agua corriente y después en agua destilada. Finalmente, el material vegetal lavado fue colocado en una estufa a 37 °C durante un periodo de 1 a 5 días, hasta alcanzar peso constante.

2.3.3 Extracción del aceite esencial

La extracción se realizó a partir del material vegetal seco por hidrodestilación. El proceso se realizó según el PNT OG 007 del Laboratorio de fitoquímica del proyecto VLIR de la Universidad de Cuenca, se tomaron alrededor de 100 gramos de hojas secas en un balón de aforo de fondo redondo y se agregó agua destilada, manteniendo una proporción 1/10. La hidrodestilación se llevó a cabo por tres horas, obteniéndose una mezcla agua-aceite esencial en un tubo de ensayo. Para separar la fase oleosa del exceso de la fase acuosa, se añadió una cantidad suficiente de sulfato de sodio anhidro en el tubo de ensayo y se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos para finalmente por medio de pipeta eliminar el agua residual (Tongnuanchan & Benjakul, 2014).



El aceite esencial resultante se separó, con el uso de una micropipeta, en dos viales con un volumen igual en cada uno. Las muestras fueron almacenadas a temperatura de refrigeración (2-8 °C) hasta su análisis posterior.

2.3.4 Determinación del rendimiento de los aceites esenciales

El rendimiento, expresado en porcentaje p/p del aceite esencial obtenido frente a la cantidad de muestra inicial. Se determinó mediante la fórmula:

% aceite esencial = (masa del aceite esencial/masa de la muestra seca) x 100
(Fuller et al., 2018).

2.4 Método analítico

La determinación de la composición del aceite esencial de *Ruta graveolens* se realizó por cromatografía de gases con detección por ionización a la llama (GC-FID).

Los parámetros del método analítico optimizado se presentan a continuación (Tabla 5).

Tabla 5. Parámetros analíticos del método optimizado en GC-FID

Parámetros analíticos	Condición optimizada
Temperatura del inyector	160; 220 °C
Inyector split/splitless	Split 1:10
Rampa de temperatura del horno	Se inicia 60 °C por 1 min, luego se eleva hasta 120 °C a 10 °C/min, se continuó con otra rampa a 5 °C/min hasta 150 °C, se mantuvo una isoterma por 7 min. Finalmente se elevó la temperatura hasta 270 °C a

razón de 3 °C/min y se mantuvo a esa temperatura por 5 min.

Flujo de nitrógeno en la columna 1 ml/min

Flujo de aire/hidrógeno detector FID 300:30 ml/min

Temperatura del detector FID 280 °C

2.4.1 Soluciones de estándares

Para el análisis y caracterización de la composición del aceite esencial de *R. graveolens* se contó con 37 estándares analíticos (Tabla 6). Se prepararon soluciones stock individuales de 1000 µg/ml en hexano, con excepción de β-cariofileno y cinamaldehído que fueron disueltos en metanol debido a que eran soluciones comerciales disueltos en este solvente.

Tabla 6. Estándares analíticos. (ChemSpider, 2021; Merck, 2021)

Estándar	Número CAS	Fórmula estructural	Fórmula	Punto de ebullición (°C)
2-nananona	821-55-6		C ₉ H ₁₈ O	195
(-)-α-Tujona	546-80-5		C ₁₀ H ₁₆ O	201
(+)-Mentona	3391-87-5		C ₁₀ H ₁₈ O	207



(+)-Terpinen-4-ol	2438-10-0		C ₁₀ H ₁₈ O	212
(-)-Carveol, mezcla de isómeros	99-48-9		C ₁₀ H ₁₆ O	227
2-undecanona	112-12-9		C ₁₁ H ₂₂ O	231
Acetato de citronelilo	150-84-5		C ₁₂ H ₂₂ O	240
Eugenol	97-53-0		C ₁₀ H ₁₂ O ₂	254
(-)- α -Bisabolol	23089-26-1		C ₁₅ H ₂₆ O	153
(+)- α -Pineno	7785-70-8		C ₁₀ H ₁₆	158



(-)- β -Pineno	18172-67-3		C ₁₀ H ₁₆	166
Eucaliptol	470-82-6		C ₁₀ H ₁₈ O	172
(-)-Linalool	126-91-0		C ₁₀ H ₁₈ O	198
(-)-Isopulegol	89-79-2		C ₁₀ H ₁₈ O	212
Citral	5392-40-5		C ₁₀ H ₁₆ O	225
Geraniol	106-24-1		C ₁₀ H ₁₈ O	230
Acetato de geranilo	105-87-3		C ₁₂ H ₂₀ O ₂	245



Nerolidol	7212-44-4		C ₁₅ H ₂₆ O	122
6-Metil-5-hepten-2-ona	110-93-0		C ₈ H ₁₄ O	173
α -Terpineno	99-86-5		C ₁₀ H ₁₆	174
γ -Terpineno	99-85-4		C ₁₀ H ₁₆	182
(\pm)-Citronelal	106-23-0		C ₁₀ H ₁₈ O	208
Acetato de linalilo	115-95-7		C ₁₂ H ₂₀ O ₂	220

(+)-Carvona	2244-16-8		C ₁₀ H ₁₄ O	231
Carvacrol	499-75-2		C ₁₀ H ₁₄ O	236,8
Farnesol	4602-84-0		C ₁₅ H ₂₆ O	111
β-Mirceno	123-35-3		C ₁₀ H ₁₆	167
(R)-(+)-Limoneno	5989-27-5		C ₁₀ H ₁₆	176
Hidrato de sabineno	546-79-2		C ₁₀ H ₂₀ O ₂	200
Terpinoleno	586-62-9		C ₁₀ H ₁₆	185



(+)-Isopulegol	104870-56-6		C ₁₀ H ₁₈ O	212
DL-Mentol	89-78-1		C ₁₀ H ₂₀ O	212
(+)-Pulegona	89-82-7		C ₁₀ H ₁₆ O	224
(-)-Óxido de cariofileno	1139-30-6		C ₁₅ H ₂₄ O	263
Esclareol	515-03-7		C ₂₀ H ₃₆ O ₂	220

Cinamaldehído	104-55-2		C ₉ H ₈ O	248
β-Cariofileno	87-44-5		C ₁₅ H ₂₄	130

Los estándares en solución, a una concentración de 1000 µg/ml, fueron inyectados individualmente en el GC-FID y analizados con la finalidad de determinar el tiempo de retención y constatar la aplicabilidad del método optimizado.

Para los experimentos de pre-validación, se prepararon 5 pools de 7 a 8 estándares que difieran considerablemente en el tiempo de retención (Anexo 2). La concentración de cada pool fue de 100 µg/ml. Se realizaron diluciones sucesivas a partir de cada pool hasta concentraciones de 75, 50, 25, 10 y 5 µg/ml respectivamente.

2.4.2 Pre-validación del método analítico

La pre-validación del método analítico se realizó siguiendo la estrategia “single-laboratory” que corresponde a la evaluación de los parámetros mínimos y necesarios para asegurar la calidad y aplicabilidad del método optimizado. Los parámetros por evaluarse fueron el rango dinámico lineal, la linealidad, la precisión inter-día e intra-día, los límites de detección y los límites de cuantificación (Taverniers et al., 2004).



- ***Linealidad y rango dinámico lineal***

La linealidad hace referencia a la proporcionalidad directa entre la señal del equipo y la concentración del analito dentro de un mismo rango; y el rango dinámico lineal corresponde al intervalo entre la concentración más baja y alta del compuesto analizado, manteniendo la linealidad (Shabir, 2003).

La linealidad y el rango dinámico lineal se evaluaron construyendo las curvas de calibración, siguiendo el método de estandarización externa, para cada uno de los estándares, para lo que se analizaron los pools de estándares preparados a 5, 10, 25, 50, 75 y 100 µg/ml. Los análisis se realizaron por triplicado.

- ***Precisión inter-día e intra-día***

La precisión es un indicador sobre la proximidad que existe entre los valores obtenidos mediante mediciones repetidas de una cantidad en condiciones específicas (Araujo, 2009).

La precisión intra-día de cada compuesto se determinó a 6 niveles de concentración (5, 10, 25, 50, 75 y 100 µg/ml) analizando cada pool por triplicado a cada nivel de concentración. La precisión inter-día se determinó analizando cada pool por triplicado durante 3 días consecutivos a una concentración de 75 µg/ml. La precisión inter e intra-día fueron expresadas como coeficiente de variación (% CV). El % CV inter-día se calculó como el pooled CV de cada día en base a un análisis de varianza de un factor; mientras que el % CV intra-día se calculó como el valor de % CV promedio de los 3 días analizados (Kamala et al., 2015; Taverniers et al., 2004).

- ***Límites de detección y límites de cuantificación***

El límite de detección (LOD) es aquella concentración del analito que se puede detectar, pero no necesariamente se puede cuantificar (Shrivastava & Gupta, 2011). El límite de cuantificación (LOQ) hace referencia de la concentración mínima



de un analito que se puede detectar con una precisión y exactitud aceptables dentro de la prueba indicada (Shrivastava & Gupta, 2011).

En este estudio, el límite de detección (LOD) para cada analito se calculó a partir de la curva de calibración de los 4 niveles más bajos analizados, usando la fórmula:

$$\text{LOD} = 3 * S_{eb}/m$$

Donde S_{eb} es el error estándar del intercepto y m es la pendiente de la curva de calibración.

El límite de cuantificación (LOQ) se calculó como $\text{LOD} \times 2$.

2.4.3 Análisis de datos

Los picos cromatográficos fueron identificados por comparación con los tiempos de retención (tR) de los estándares, estimando una ventana tR con un valor de $\pm 0,05$ min del promedio de los tiempos obtenidos de los pools a una concentración de 75 ppm analizados por triplicado durante tres días consecutivos.

Las concentraciones de cada analito en las muestras fueron calculadas por interpolación del área de cada compuesto en la curva de calibración.

La comparación de la composición del aceite esencial de los ejemplares de *R. graveolens* del cantón Cuenca con los ejemplares del cantón Morona se realizó mediante una prueba T pareada. Además, se aplicó otra prueba T pareada para evaluar si existieron diferencias entre las inyecciones a 160 y 220 °C. Los cálculos de los parámetros de pre-validación se realizaron en el software Microsoft Excel y el análisis estadístico en el software Stata 10.0, con un nivel de confianza del 95 %.

III. Resultados y discusión

3.1 Rendimiento de extracción del aceite esencial de *Ruta graveolens*

El aceite esencial de *Ruta graveolens* fue obtenido de hojas y tallos no leñosos de las muestras mediante hidrodestilación. El rendimiento final de cada muestra analizada fue ligeramente diferente, incluyendo la variante de las zonas de recolección de los cantones Cuenca (Región Interandina) y Morona (Región Amazónica) (Tabla 7).

Tabla 7. Rendimiento en % p/p obtenido de las muestras de *Ruta graveolens* de los cantones Morona y Cuenca.

Muestra	Región geográfica de recolección	Rendimiento (% p/p)
Proaño	Amazonía	0,56
La Florida	Amazonía	0,47
27 de Febrero	Amazonía	0,52
Baños	Interandina	0,27
Barabón	Interandina	0,70
San Joaquín	Interandina	0,29

Un rendimiento similar (0,39%) se ha reportado en frutos secos de *Ruta graveolens* (Semerdjieva et al., 2019) y de la misma manera se han presentado rendimientos mayores a 1,7% de partes aéreas de *Ruta graveolens* (Bouabida & Dris, 2020) lo cual indicaría la variabilidad de contenido de aceite esencial en la planta. La variabilidad en el rendimiento del aceite esencial puede deberse a diferentes factores como las condiciones climáticas, el suelo, estaciones del año, entre otros. Esta variabilidad en el rendimiento del aceite esencial de *R. graveolens* también se ha reportado en ejemplares en México en un rango de 0,58 % a 0,62 % (Rojas et al., 2011). Así mismo el aceite esencial de *Siparuna muricata*, recolectada en cuatro localidades diferentes del Ecuador, presentó diferencias significativas en su composición y rendimiento, las mismas que fueron influenciadas por el suelo y sus elementos químicos (Burneo et al., 2021).



3.2 Parámetros analíticos del método optimizado

En este trabajo se optimizó el método analítico por GC-FID con la mejor resolución cromatográfica para el análisis de aceite esencial de *R. graveolens*. En el método optimizado se evaluaron los parámetros analíticos considerados en un proceso de pre-validación. En la Tabla 8 se presentan los valores de pre-validación para cada uno de los 37 estándares que conformaron la biblioteca de compuestos analizados con el método analítico optimizado, así como los tR promedio y las ventanas de tR.

En la optimización del método también se evaluó la temperatura de inyección, que luego de revisión bibliográfica y pruebas preliminares se optó por inyectar a 160 y 220 °C. Para algunos compuestos se observó una clara variación según la temperatura de inyección, específicamente para Carveol, Nerolidol, Bisabolol, Farnesol, Geraniol y Citral. Las áreas de los picos analizados a 160 °C y 220 °C fueron comparadas mediante una prueba T pareada. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.0004$) entre las áreas resultantes de las 2 temperaturas de inyección, siendo mayores las áreas obtenidas a 160 °C. Los resultados de estos análisis se presentan en la Tabla 9.

Tabla 8. Parámetros analíticos de pre-validación: Límites de detección (LOD), límites de cuantificación (LOQ), precisión intra e interdía y linealidad, y ventanas de tiempo de retención (tR)

Compuestos	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)	Precisión Intradía (%CV)	Precisión Interdía (%CV)	R ²	Rango lineal ($\mu\text{g/ml}$)	tR (min)	Ventana tR (min)
2-nananona	10,55	21,10	1,30	1,41	0,9884	5-75	12,81	12,76 ; 12,86
(-) - α -Tujona	10,46	20,91	1,28	1,38	0,9885	5-75	13,43	13,38 ; 13,48
(+)-Mentona	10,38	20,75	1,28	1,38	0,9942	5-100	14,57	14,52 ; 14,62
(+)-Terpinen-4-ol	10,37	20,75	1,27	1,39	0,9887	5-75	15,19	15,14 ; 15,24
(-) -Carveol, mezcla de isómeros	10,49	20,97	1,16	1,29	0,9886	5-75	16,22	16,17 ; 16,27
(-) -Carveol, mezcla de isómeros	10,43	20,86	1,23	1,38	0,9887	5-75	16,59	16,54 ; 16,64
2-undecanona	10,43	20,87	1,22	1,41	0,9887	5-75	18,41	18,36 ; 18,46
Acetato de citronelilo	10,55	21,10	1,29	1,47	0,9888	5-75	20,67	20,62 ; 20,72
Eugenol	10,86	21,72	1,97	2,14	0,9880	5-75	21,32	21,27 ; 21,37
(-) - α -Bisabolol	10,60	21,21	1,65	1,75	0,9889	5-75	35,49	35,44 ; 35,54
(+)- α -Pineno	7,30	14,60	4,59	4,79	0,9915	5-75	9,94	9,89 ; 9,99
(-) - β -Pineno	7,07	14,14	4,54	4,75	0,9917	5-75	10,80	10,75 ; 10,85
Eucaliptol	7,01	14,01	4,48	4,67	0,9919	5-75	11,84	11,79 ; 11,89
(-) -Linalool	7,01	14,03	4,37	4,55	0,9921	5-75	13,02	12,97 ; 13,07
(-) -Isopulegol	7,24	14,48	4,37	4,55	0,9918	5-75	14,37	14,32 ; 14,42
Citral	7,51	15,02	4,31	4,45	0,9914	5-75	16,78	16,73 ; 16,83
Geraniol	7,13	14,26	4,06	4,20	0,9916	5-75	17,02	16,97 ; 17,07



Citral	7,38	14,76	4,20	4,34	0,9914	5-75	17,67	17,62	; 17,72
Acetato de geranilo	7,21	14,42	3,93	4,04	0,9918	5-75	22,00	21,95	; 22,05
Nerolidol	6,65	13,31	3,56	3,65	0,9928	5-75	28,89	28,84	; 28,94
Nerolidol	6,59	13,17	1,82	2,06	0,9928	5-75	30,22	30,17	; 30,27
6-Metil-5-hepten-2-oná	8,25	16,49	2,52	2,59	0,9915	5-75	10,68	10,63	; 10,73
α -Terpineno	8,18	16,36	2,42	2,52	0,9917	5-75	11,47	11,42	; 11,52
γ -Terpineno	8,15	16,31	2,39	2,51	0,9917	5-75	12,30	12,25	; 12,35
(\pm)-Citronelal	8,34	16,69	2,36	2,47	0,9913	5-75	14,25	14,20	; 14,30
Acetato de linalilo	7,61	15,23	2,68	2,74	0,9919	5-75	17,02	16,97	; 17,07
(+)-Carvona	8,27	16,55	2,38	2,46	0,9959	5-100	17,10	17,05	; 17,15
Carvacrol	10,55	21,10	2,52	2,60	0,9957	5-100	18,71	18,66	; 18,76
Farnesol	7,93	15,87	2,25	2,26	0,9959	5-100	36,73	36,68	; 36,78
β -Mirceno	1,35	2,69	3,60	4,40	0,9948	5-100	10,79	10,74	; 10,84
(R)-(+)-Limoneno	1,21	2,42	2,90	3,31	0,9947	5-100	11,72	11,67	; 11,77
Hidrato de sabineno	1,36	2,73	2,76	3,20	0,9947	5-100	12,52	12,47	; 12,57
Terpinoleno	1,40	2,80	2,83	3,24	0,9948	5-100	12,96	12,91	; 13,01
(+)-Isopulegol	1,44	2,88	2,85	3,27	0,9946	5-100	14,36	14,31	; 14,41
DL-Mentol	1,24	2,48	2,72	3,18	0,9948	5-100	14,98	14,93	; 15,03
(+)-Pulegona	10,55	21,10	2,71	3,12	0,9950	5-100	17,01	16,96	; 17,06
(-)-Óxido de cariofileno	1,22	2,45	2,73	3,06	0,9950	5-100	31,82	31,77	; 31,87
Esclareol	0,69	1,38	2,24	2,30	0,9919	5-100	54,26	54,21	; 54,31
Cinamaldehído	3,70	7,40	6,55	7,77	0,9985	5-100	23,12	23,07	; 23,17
β -Cariofileno	4,75	9,50	5,97	7,36	0,9985	5-100	24,65	24,60	; 24,70

Tabla 9. Comparación de las áreas de los estándares inyectados a 160 y 220°C

Compuesto	Área a 220°C	Área a 160°C
2-nonanona	1286,3	1192,4
(-)- α -Tujona	1020,7	1318,4
(+)-Mentona	1154,4	1064,9
(+)-Terpinen-4-ol	855,3	1276,2
(-)-Carveol, mezcla de isómeros	260,9	557,2
(-)-Carveol, mezcla de isómeros	241	489,1
2-undecanona	1287,5	1215,1
Acetato de citronelilo	1028,6	1079,8
Eugenol	1008,7	605
(-)- α -Bisabolol	977,3	750,2
(+)- α -Pineno	867,5	1171,4
(-)- β -Pineno	996,4	1538,9
Eucaliptol	1481,1	1441,7
(-)-Linalool	873	817,3
(-)-Isopulegol	2445,6	2641,3
Citral	261,7	392,4
Geraniol	430,8	669,5
Citral	683,2	1237,1
Acetato de geranilo	978,2	1087,8
Nerolidol	318	402,1
Nerolidol	401,8	519
6-Metil-5-hepten-2-ona	624,5	854,8
α -Terpineno	651,7	965
γ -Terpineno	917,7	1404,4
(\pm)-Citronelal	918,8	1007,7
Acetato de linalilo	681,7	954,4
(+)-Carvona	905,4	877,7



Carvacrol	949	1290,3
Farnesol	369,6	420
β -Mirceno	125	126,6
(R)-(+)-Limoneno	991,4	1462,1
Hidrato de sabineno	106,2	110,5
Terpinoleno	902,9	1316,7
(+)-Isopulegol	1350,9	1162,9
DL-Mentol	166,6	173,1
(+)-Pulegona	649,5	1342,1
(-)-Óxido de cariofileno	103,1	105,5
Esclareol	127,8	122,6
Cinamaldehído	99,7	98,7
β -Cariofileno	94,3	128,4
Promedio ± DE		739,85 ± 487,55
		884,76 ± 537,08
		P = 0.0004

Los valores representan la media para muestras por triplicado (n total = 40). DE Desviación estándar. IC: Intervalo de confianza.

La inyección a 160 °C produjo picos cromatográficos con áreas mayores, lo que podría explicarse por una menor degradación de los compuestos (Turek & Stintzing, 2013). Sin embargo, los análisis subsecuentes se realizaron a 220 °C, pues esta temperatura asegura la volatilidad de los posibles compuestos encontrados en las muestras, ya que además cubre el rango de puntos de ebullición de al menos los estándares disponibles. Esta es una práctica común, así como lo observado en la optimización de un método cromatográfico para el análisis del aceite esencial de *Zingiber officinale* var.*Amaurm* se tomaron como variables diferentes parámetros cromatográficos, donde la mejor resolución del cromatograma fue dada con una mayor temperatura del inyector y una menor tasa de incremento de temperatura (Fitri & Sawitri, 2020).



3.3 Caracterización química del aceite esencial de *Ruta graveolens*

Los picos cromatográficos, que representan los compuestos de la muestra los cuales fueron identificados por comparación con los tiempos de retención (tR) de los estándares para los compuestos presentes en el aceite esencial de *Ruta graveolens*: β -mirceno, 2-nananona, 2-undecanona, Terpinen-4-ol, Terpinolene, (-) Isopulegol, Acetato de linalilo y Eugenol. Para el caso del β -mirceno y el (-)- β -Pineno, por poseer ventanas de tR muy semejantes, se descartó este segundo debido a que no se ha reportado en la composición química del aceite esencial de esta especie (ver Anexo 1). En la Tabla 10 se presenta la composición química porcentual de los compuestos identificados en el aceite esencial de *R. graveolens* en las muestras obtenidas del cantón Cuenca y Morona.

Tabla 10. Composición química porcentual (%), de los compuestos identificados, en los aceites esenciales de *Ruta graveolens*.

Compuesto	tR	M1	M2	M3	C1	C2	C3
β-mirceno	10,78	0,45		0,35	0,12	0,19	0,12
2-nonenona	12,84	43,42	26,24	38,92	31,56	39,01	37,66
Terpinolene	12,96	0,25	0,38	0,22	0,33	0,22	0,21
1-nonanol*	13,11	0,25	0,13	0,34	0,13	0,23	0,22
(-) Isopulegol	14,36	2,10	2,65	2,83	1,66	2,35	2,57
Terpinen-4-ol	15,21	2,28	2,24	2,35	2,46	2,34	2,25
Acetato de linalilo	17,11	0,17	0,24	0,20	0,18	0,20	0,20
2-undecanona	18,40	46,22	60,23	48,97	57,92	50,26	51,27
Eugenol	21,33	1,60	2,69	2,14	1,81	1,82	1,83
1-pentadeceno*	22,60	1,10	1,64	1,28	1,87	1,41	1,52
Ácido linoleico*	27,76	0,18	0,72	0,46	0,26	0,25	0,21
Pireno*	34,94	1,98	2,85	1,94	1,69	1,72	1,94

*Compuestos identificados mediante revisión bibliográfica según su orden de elución. Fuente: (Babushok et al., 2011; Babushok & Zenkevich, 2009).

M1: Muestra de Macas-Proaño; **M2:** Muestra de Macas-La Florida; **M3:** Muestra de Macas-27 de Febrero; **C1:** Muestra de Cuenca-Barabón; **C2:** Muestra de Cuenca-Baños; **C3:** Muestra de Cuenca San Joaquín.

Figura 1. Cromatogramas del aceite esencial de *Ruta graveolens* del cantón Morona

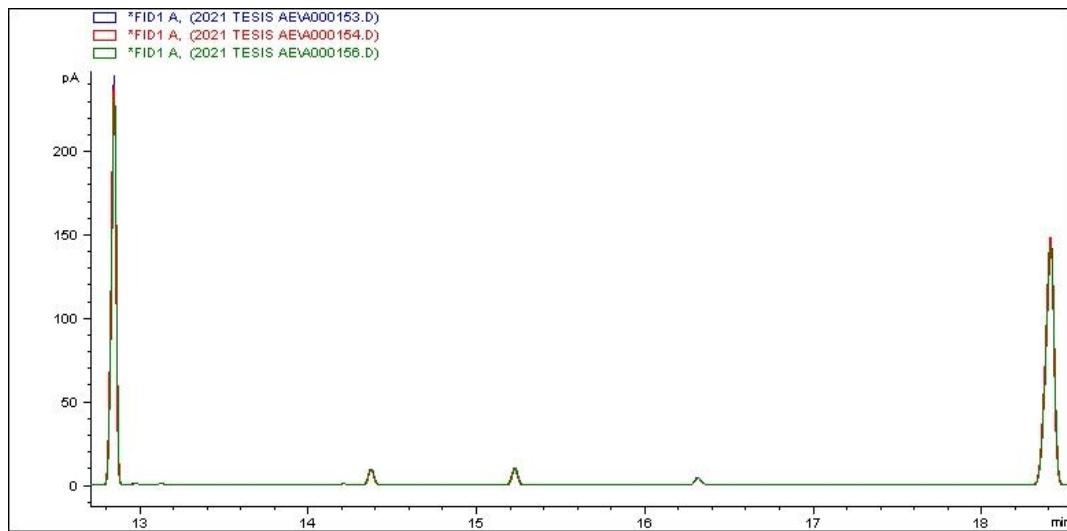


Fig 1a. Cromatograma Macas-Proaño, Temperatura de inyección 220 °C. Se encuentran sobreuestas las réplicas por triplicado.

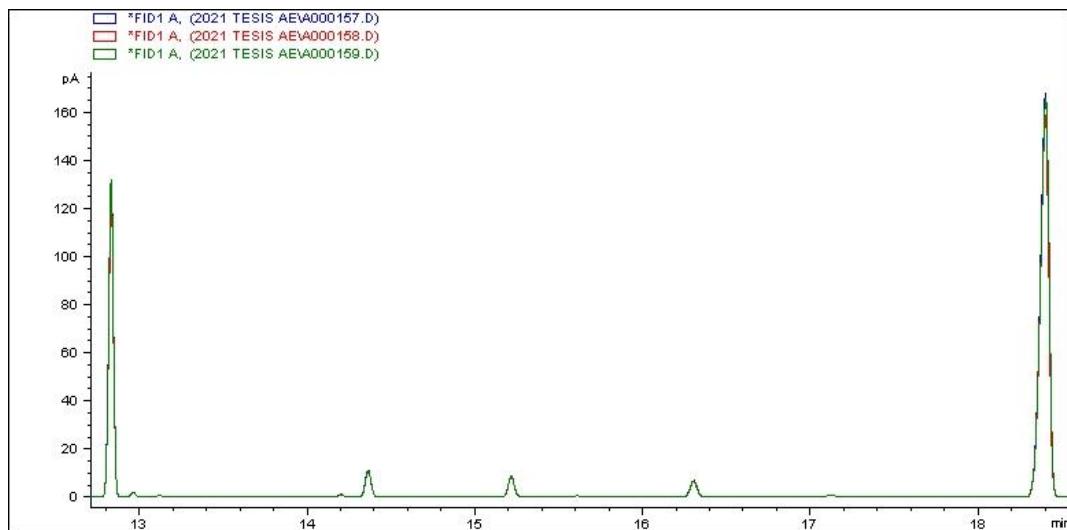


Fig 1b. Cromatograma Macas-La Florida, Temperatura de inyección 220 °C. Se encuentran sobreuestas las réplicas por triplicado.

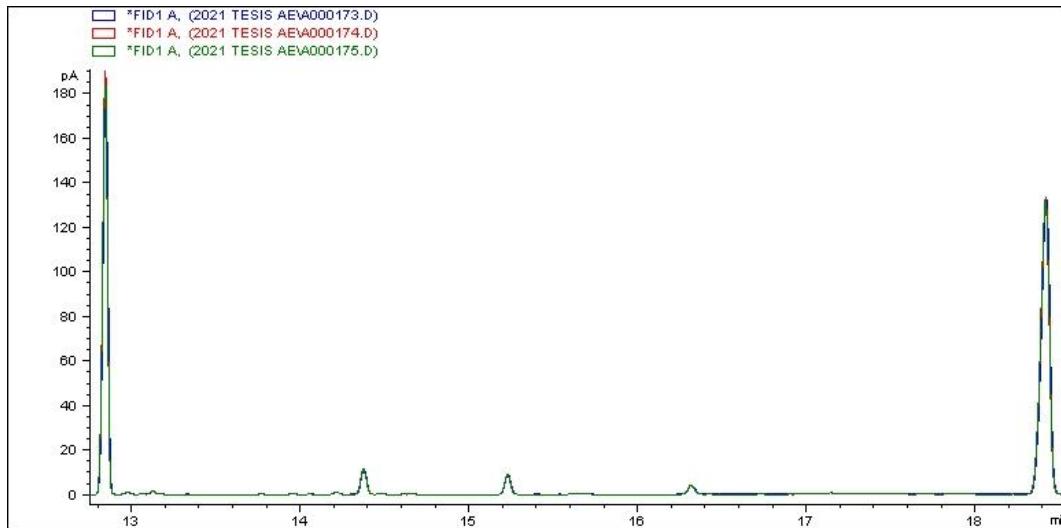


Fig 1c. Cromatograma Macas-27 de Febrero, Temperatura de inyección 220 °C. Se encuentran sobreuestas las réplicas por triplicado

Figura 2. Cromatogramas del aceite esencial de *Ruta graveolens* del cantón Cuenca

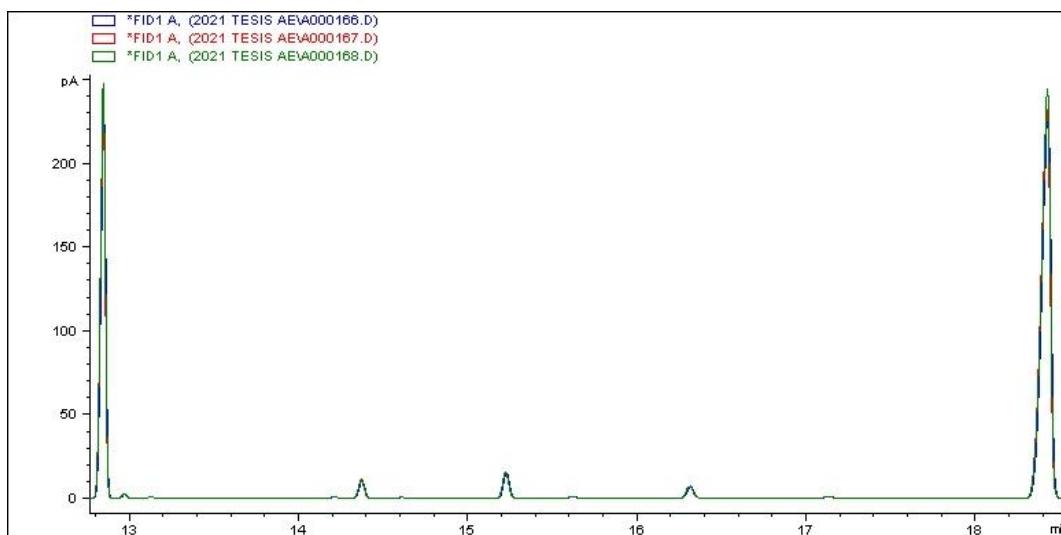


Fig 2a. Cromatograma Cuenca-Barabón, Temperatura de inyección 220 °C. Se encuentran sobreuestas las réplicas por triplicado.

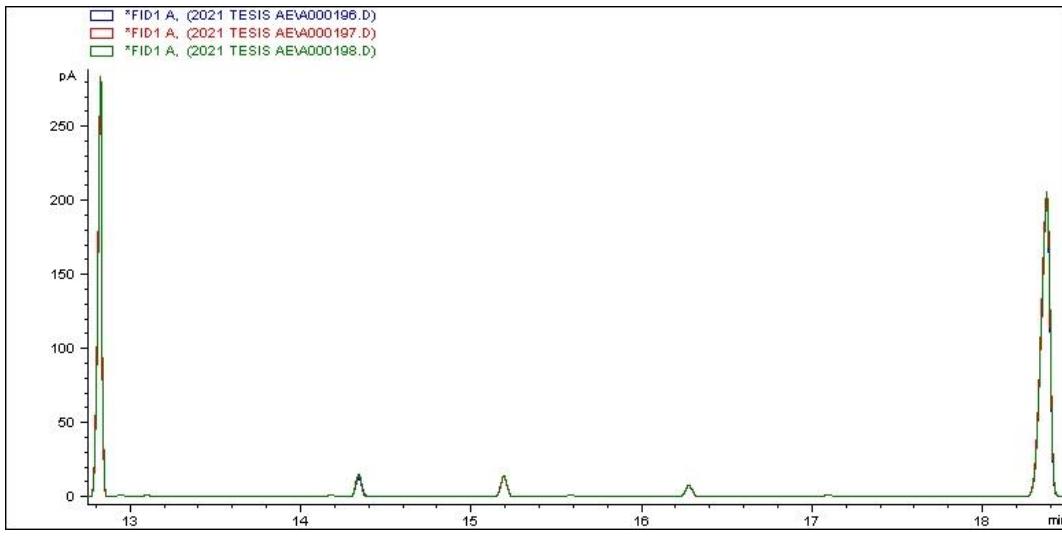


Fig 2b. Cromatograma Cuenca-Baños, Temperatura de inyección 220 °C. Se encuentran sobreuestas las réplicas por triplicado.

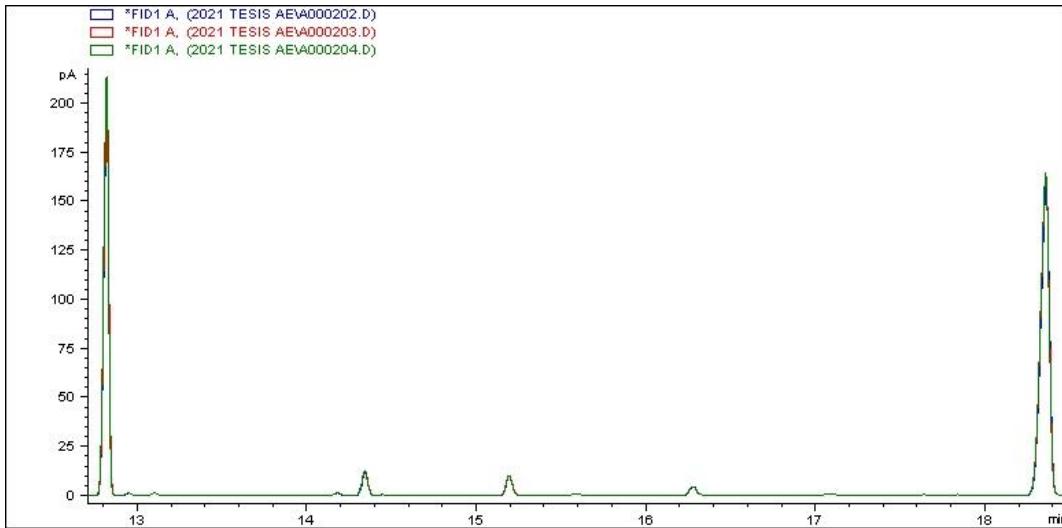


Fig 2c. Cromatograma Cuenca-San Joaquín, Temperatura de inyección 220 °C. Se encuentran sobreuestas las réplicas por triplicado

Los compuestos mayoritarios identificados en las muestras fueron la 2-nonenona y la 2-undecanona, llegando a representar entre un 60 a 80% de la composición relativa del aceite esencial; esto ha sido previamente reportado en ejemplares de *Ruta graveolens* en Sri Lanka (Perera et al., 2019). En un estudio realizado en Ecuador por Ramón, 2020 también se destacó al 2-undecanona y 2-nonenona en el perfil químico del aceite esencial con porcentajes de 39,9 y 38,1 %,



respectivamente (Ramón, 2020). Se ha reportado similares porcentajes de 2-nonenol (34,25%) en el aceite esencial obtenido en India, indicando que existe una mayor variabilidad en la composición porcentual (Poonkodi et al., 2017).

3.3.1 Caracterización química según la zona geográfica

La composición química del aceite esencial de *Ruta graveolens* se comparó entre los ejemplares recolectados en el cantón Cuenca y el cantón Morona. Al considerar solamente los picos identificados con los estándares, se observó una diferencia significativa entre la concentración general de los compuestos ($p<0.006$), siendo mayor la concentración en los ejemplares de Cuenca (107,2 vs 80,11 $\mu\text{g/ml}$). Estos resultados se presentan en la Tabla 11.

Tabla 11. Composición química ($\mu\text{g/ml}$) del aceite esencial de *R. graveolens* de los ejemplares colectados en Cuenca y Morona.

Composición	Cuenca			Morona		
β -mirceno	2,54	\pm	0,76	5,09	\pm	1,05
2-nananona	348,77	\pm	46,63	263,66	\pm	70,34
Terpinoleno	2,80	\pm	0,90	2,30	\pm	0,49
(-) Isopulegol	14,14	\pm	1,57	12,68	\pm	0,59
Terpinen-4-ol	10,02	\pm	10,91	8,19	\pm	7,97
Acetato de linalilo	5,05	\pm	0,56	3,97	\pm	0,35
2-undecanona	409,42	\pm	76,90	293,45	\pm	28,51
Eugenol	30,33	\pm	3,81	26,53	\pm	3,97
Promedio \pm DE	107,20 \pm 166,61			80,11 \pm 122,07		P=0,006

(n=69). DE: Desviación estándar. IC: Intervalo de confianza



El aceite esencial de *R. graveolens* presentó un mayor número de compuestos que los estándares disponibles que permiten su identificación por comparación del tiempo de retención. Por esta razón, se realizó una revisión de literatura por el orden de elución de otros posibles compuestos presentes en los aceites. En base a la revisión, se propusieron 4 posibles compuestos adicionales que se encontrarían en las muestras, los cuales no pueden cuantificarse por carecer de sus estándares analíticos; sin embargo, al incluir estos posibles compuestos y contar con las áreas de los picos, fue posible determinar la composición porcentual del aceite (Tabla 10).

Considerando que la composición porcentual provee datos relativos que, en suma, tendrán el mismo valor en todas las muestras, no se realizó la comparación de la composición porcentual por zona geográfica ni en función de la temperatura de inyección.

La composición química del aceite esencial de las plantas puede verse influenciada por diversos factores como las condiciones medioambientales, la fertilidad del suelo, la humedad, presencia de sombra, las variaciones estacionales, el ciclo vegetativo, la diversidad genética y la localización geográfica (Elansary et al., 2020; Valarezo et al., 2021). Las condiciones climáticas y geográficas que caracterizan al cantón Cuenca y Morona son diferentes y esto podría influenciar en la variación de la composición del aceite esencial de *Ruta graveolens*. Cuenca es una zona templada y seca, con una temperatura promedio anual de 12.4 °C ubicada a 2.550 metros sobre el nivel del mar; mientras que Morona es una zona más cálida y húmeda, con una temperatura promedio anual que sobrepasa los 20 °C y ubicada aproximadamente a 1050 metros sobre el nivel del mar. Este tipo de influencia se ha observado variaciones geográficas del aceite esencial de esta misma especie en un estudio realizado entre los estados de Mérida y Miranda en Venezuela (Rojas et al., 2011), y también otras especies como *Allium sativum*, *Zingiber officinale*, *Tagetes minuta* y *Lantana camara* (Mugao et al., 2020).

En este trabajo se observó una composición del aceite esencial de *R. graveolens* cualitativamente similar entre los ejemplares de los 2 cantones estudiados, pero en



concentración diferente que, de manera general, fue mayor en el cantón Cuenca. Esto podría explicarse por una mayor influencia de factores de estrés en la producción de metabolitos secundarios para la especie de *Ruta graveolens* en este cantón. El estrés abiótico como temperatura, salinidad, irrigación, radiación ultravioleta conduce a la planta a generar una mayor cantidad de metabolitos secundarios (Molina, 2018). Se ha observado un aumento aproximadamente de un 21% en las cetonas del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* en plantas sometidas a un estrés por falta de irrigación frente a las plantas irrigadas adecuadamente (Sarmoum et al., 2019). En otro estudio, se encontró que el aceite esencial de *Ruta graveolens* presenta mayor concentración de 2-nonenona en un 100% de irrigación de la capacidad del campo (CC), mientras que la concentración de 2-undecanona fue mayor a una irrigación del 50% CC y con la presencia de ácido salicílico (Attia et al., 2018). En cuanto al clima, los cambios climáticos durante diferentes estaciones presentan una influencia en la composición del aceite esencial de *Juniperus polycarpos*, mostrando una mayor concentración de sus componentes principales (monoterpenos) en la estación de invierno, la cual presentó temperaturas más bajas del año (Moghaddam et al., 2018).



IV. Conclusiones y Recomendaciones

4.1 Conclusiones

En este trabajo se optimizó un método analítico para el análisis de aceites esenciales por cromatografía de gases con detector FID (GC-FID) para el análisis de aceites esenciales, basándose en los parámetros pre-analíticos idóneos para asegurar la calidad y la aplicabilidad del método. Así mismo se determinó que temperatura de inyección más adecuada es de 220 °C debido a que presenta una mayor resolución.

Tras analizar las muestras de los ejemplares de *Ruta graveolens* de distinta zona geográfica, se corroboró que los componentes mayoritarios de este aceite esencial son 2-undecanona y 2-nonanona.

La concentración de los compuestos identificados en el aceite esencial de esta especie según la zona geográfica en la que se desarrolló la planta, cantón Cuenca y cantón Morona, presentó una diferencia estadísticamente significativa. La concentración de los metabolitos analizados fue mayor en los ejemplares provenientes del cantón Cuenca, lo que se atribuyó a las diferencias climáticas y posible estrés abiótico.

4.2 Recomendaciones

- Ampliar la biblioteca de estándares para la identificación de compuestos presentes en aceites esenciales.
- Realizar un estudio de la variabilidad del aceite esencial de *Ruta graveolens* de acuerdo con su tratamiento pre-extracción, fenofase y condiciones de estrés controladas.
- Complementar el estudio del aceite esencial de *Ruta graveolens* en función de sus propiedades biológicas y la zona geográfica.



Referencias

- ACCID. (2017). *Cómo investigar* (Gráficas Rey (ed.); 1a ed.).
- Ansah, R., Ayepa, E., Shittu, S., Senyo, S., & Wang, J. (2019). Essential Oils and Their Applications -A Mini Review. *Advances in Nutrition & Food Science*, 4(4). <https://doi.org/10.33140/ANFS.04.04.08>
- Araujo, P. (2009). Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography B*, 877(23).
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.09.030>
- Attia, E. Z., Abd El-Baky, R. M., Desoukey, S. Y., El Hakeem Mohamed, M. A., Bishr, M. M., & Kamel, M. S. (2018). Chemical composition and antimicrobial activities of essential oils of *Ruta graveolens* plants treated with salicylic acid under drought stress conditions. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4(2). <https://doi.org/10.1016/j.fjps.2018.09.001>
- Babushok, V., Linstrom, P., & Zenkevich, I. (2011). Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 40(4). <https://doi.org/10.1063/1.3653552>
- Babushok, V., & Zenkevich, I. (2009). Retention Indices for Most Frequently Reported Essential Oil Compounds in GC. *Chromatographia*, 69(3–4).
<https://doi.org/10.1365/s10337-008-0872-3>
- Beale, D., Morrison, P., Karpe, A., & Dunn, M. (2017). Chemometric Analysis of Lavender Essential Oils Using Targeted and Untargeted GC-MS Acquired Data for the Rapid Identification and Characterization of Oil Quality. *Molecules*, 22(8). <https://doi.org/10.3390/molecules22081339>
- Beigi, M., Torki, M., & Ghasemi, A. (2018). Quantity and chemical composition of essential oil of peppermint (*Mentha × piperita* L.) leaves under different drying methods. *International Journal of Food Properties*, 21(1).
<https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1453839>
- Ben, M., Jordán, M., Chaouch, R., Landoulsi, A., & Sotomayor, J. (2016). Phenophase effects on sage (*Salvia officinalis* L.) yield and composition of essential oil. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*,



3(3). <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2016.02.001>

Ben, M., Sotomayor, J., & Jordán, M. (2019). Salvia verbenaca L. essential oil:

Variation of yield and composition according to collection site and phenophase. *Biochemical Systematics and Ecology*, 82.

<https://doi.org/10.1016/j.bse.2018.12.002>

Bouabida, H., & Dris, D. (2020). Effect of rue (Ruta graveolens) essential oil on mortality, development, biochemical and biomarkers of Culiseta longiareolata.

South African Journal of Botany, 133.

<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.07.005>

Burneo, J., Benítez, Á., Calva, J., Velastegui, P., & Morocho, V. (2021). Soil and Leaf Nutrients Drivers on the Chemical Composition of the Essential Oil of

Siparuna muricata (Ruiz & Pav.) A. DC. from Ecuador. *Molecules*, 26(10).

<https://doi.org/10.3390/molecules26102949>

Calderín, J., & Calderín, E. (2020). *De materia verde: Fitoterapia y apiterapia*. (1a ed.). Editorial Científico-Técnico.

Cantor, M., Vlas, N., Szekely, Z., Jucan, D., & Zaharia, A. (2018). The influence of distillation time and the flowering phenophase on quantity and quality of the essential oil of Lavandula angustifolia cv. 'Codreanca'. *Romanian Biotechnological Letters*, 23(6), 14146–14152.

Castro, A., Juaréz, J., Ramos, N., Suárez, S., Retuerto, F., & Gonzales, S. (2011). Elucidación estructural del aceite esencial de Ruta graveolens L. Ruda, actividad antioxidante y bioensayo de citotoxicidad. *Ciencia e Investigación*, 14(1), 25–28.

Chaabani, S., Hamdi, S., Mahjoubi, K., & Jemâa, J. (2019). Composition and insecticidal activity of essential oil from Ruta graveolens, Mentha pulegium and Ocimum basilicum against Ectomyelois ceratoniae Zeller and Ephestia kuehniella Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Plant Diseases and Protection*, 126(3). <https://doi.org/10.1007/s41348-019-00218-8>

ChemSpider. (2021). *ChemSpider | Search and share chemistry* .

<http://www.chemspider.com/>

Coronado, M., Vega y León, S., Gutiérrez, R., Vázquez, M., & Radilla, C. (2015).



- Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista chilena de nutrición*, 42(2). <https://doi.org/10.4067/S0717-75182015000200014>
- Dehghani, M., Larijani, K., Mehrafarin, A., & Naghdi, H. (2018). Changes in the essential oil content and composition of *Thymus daenensis* Celak. under different drying methods. *Industrial Crops and Products*, 112. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.12.012>
- Delgadillo, L., Bañuelos, R., Delgadillo, O., Silva, M., & Gallegos, P. (2017). Composición química y efecto antibacteriano in vitro de extractos de *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare*, *Artemisa ludoviciana* y *Ruta graveolens*. *Nova Scientia*, 9(19). <https://doi.org/10.21640/ns.v9i19.1019>
- El-Shemy, H. (2020). *Essential Oils - Oils of Nature* (1a ed.). IntechOpen.
- Elansary, H., Szopa, A., Kubica, P., Ekiert, H., El-Ansary, D., Al-Mana, F., & Mahmoud, E. (2020). Polyphenol Content and Biological Activities of *Ruta graveolens* L. and *Artemisia abrotanum* L. in Northern Saudi Arabia. *Processes*, 8(5). <https://doi.org/10.3390/pr8050531>
- Fitri, N., & Sawitri, P. (2020). Optimization of gas chromatography operational conditions for analysis of ginger oil from *Zingiber officinale* var. *Amarum*. <https://doi.org/10.1063/5.0005471>
- Fuller, N., Pegg, R., Affolter, J., & Berle, D. (2018). Variation in Growth and Development, and Essential Oil Yield between Two *Ocimum* Species (*O. tenuiflorum* and *O. gratissimum*) Grown in Georgia. *HortScience*, 53(9). <https://doi.org/10.21273/HORTSCI13156-18>
- Galvis, M., & Torres, M. (2017). Etnobotánica y usos de las plantas de la comunidad rural de Sogamoso, Boyacá, Colombia. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 8(2). <https://doi.org/10.22490/21456453.2045>
- Gentile, M., Russo, R., Pastorino, O., Cioffi, S., Barbieri, F., Illingworth, E., Grieco, M., Chambery, A., & Colucci-D'Amato, L. (2018). *Ruta graveolens* water extract inhibits cell-cell network formation in human umbilical endothelial cells via MEK-ERK1/2 pathway. *Experimental Cell Research*, 364(1). <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.01.025>
- Ghramh, H., Ibrahim, E., Kilnay, M., Ahmad, Z., Alhag, S., Khan, K., Taha, R., &



Asiri, F. (2020). Silver Nanoparticle Production by *Ruta graveolens* and Testing Its Safety, Bioactivity, Immune Modulation, Anticancer, and Insecticidal Potentials. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/5626382>

Huertas, J., García, J., Benavides, N., & Yépez, M. (2008). Evaluacion de la variacion de los compuestos presentes en aceite esencial de *Ruta graveolens* L., sometida a condiciones de estrés hídrico. *Centro de estudios en salud*, 1(10), 120–130.

Jing, C.-L., Huang, R.-H., Su, Y., Li, Y.-Q., & Zhang, C.-S. (2019). Variation in Chemical Composition and Biological Activities of *Flos Chrysanthemi* indic Essential Oil under Different Extraction Methods. *Biomolecules*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/biom9100518>

Jugran, A. K., Rawat, S., Bhatt, I. D., & Rawal, R. S. (2021). Essential oil composition, phenolics and antioxidant activities of *Valeriana jatamansi* at different phenological stages. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 155(4). <https://doi.org/10.1080/11263504.2020.1810803>

Kamala, A., Ortiz, J., Kimanya, M., Haesaert, G., Donoso, S., Tiisekwa, B., & De Meulenaer, B. (2015). Multiple mycotoxin co-occurrence in maize grown in three agro-ecological zones of Tanzania. *Food Control*, 54. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.002>

Labrada, Y., Cordovi, J., Ladea, J., Rapado, M., & Rosabal, Ú. (2018). Caracterización física y química del aceite esencial de Azaridachta indica A Juss expuesto a radiación gamma. *Rev. Cubana de Quimica*, 30, 470–482.

Liberty Natural. (2021). Rue spain - *Ruta graveolens* 'essential oil' Material Safety Data Sheet. En *MSDS*. <https://www.libertynatural.com/msd/72.htm>

Mannu, A., Melito, S., Petretto, G. L., Manconi, P., Pintore, G. M., & Chessa, M. (2020). Geographical variation of the chemical composition in essential oils extracted from Sardinian *Salvia verbenaca*. *Natural Product Research*. <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1788021>

Mehalaine, S., & Chenchouni, H. (2020). Plants of the same place do not have the



same metabolic pace: soil properties affect differently essential oil yields of plants growing wild in semiarid Mediterranean lands. *Arabian Journal of Geosciences*, 13(23). <https://doi.org/10.1007/s12517-020-06219-4>

Mena, S., García, J., Nicola, S., & Yépez, M. (2016). Inocuidad citotóxica y mutagénica de los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* L. y *Ruta graveolens* L. promisorios para el tratamiento complementario de la infección por *Helicobacter pylori*. *Actualidades Biológicas*, 38(104).
<https://doi.org/10.17533/udea.acbi.v38n104a04>

Merck. (2021). Merck. En *Sigmaaldrich*. <https://www.sigmaaldrich.com/EC/es>
Moghaddam, M., Ghasemi, A., & Farhadi, N. (2018). Seasonal variation in *Juniperus polycarpos* var. *turcomanica* essential oil from northeast of Iran. *Journal of Essential Oil Research*, 30(3).
<https://doi.org/10.1080/10412905.2018.1427637>

Mohammedi, H., Mecherara, S., & Hassani, A. (2020). Variability in essential oil composition, antioxidant and antimicrobial activities of *Ruta montana* L. collected from different geographical regions in Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, 32(1). <https://doi.org/10.1080/10412905.2019.1660238>

Molina, A. (2018). *La influencia del estrés abiótico en la síntesis de metabolitos secundarios de plantas medicinales*. Universidad de la Laguna.

Montoya, G. (2010). *Aceites esenciales. Una Alternativa de Diversificación para el Eje Cafetero*.

<https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/55532/9588280264.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Mugao, L., Gichimu, B., Muturi, P., & Mukono, S. (2020). Characterization of the Volatile Components of Essential Oils of Selected Plants in Kenya. *Biochemistry Research International*, 2020.
<https://doi.org/10.1155/2020/8861798>

Omonijo, F. A., Ni, L., Gong, J., Wang, Q., Lahaye, L., & Yang, C. (2018). Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production. *Animal Nutrition*, 4(2).
<https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.09.001>

Perera, A., Karunaratne, M., & Chinthaka, S. (2019). Qualitative Determination,



Quantitative Evaluation and Comparative Insecticidal Potential of *Ruta Graveolens* Essential Oil and Its Major Constituents in the Management of Two Stored Pests *Sitophilus Zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) And *Corcyra Cephalon*. *Sustainable Development Research* (ISSN 2690-9898 e-ISSN 2690-9901), 1(1). <https://doi.org/10.30560/sdr.v1n1p55>

Phuyal, N., Jha, P., Raturi, P., Gurung, S., & Rajbhandary, S. (2019). Essential oil composition of *Zanthoxylum armatum* leaves as a function of growing conditions. *International Journal of Food Properties*, 22(1).
<https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1687517>

Poonkodi, K., Gomathi, K., & Akila, M. (2017). GC-MS ANALYSIS AND IN VITRO ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF RUTA GRAVEOLENS L. FROM WESTERN GHATS REGION –SOUTH INDIA. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 10(5). <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10i5.17477>

Rahali, N., Younsi, F., Boussaid, M., & Messaoud, C. (2020). Chemical variability of *Hertia cheirifolia* (L.) Kuntze essential oils and incidence on antioxidant and anticholinesterase activities. *Journal of Essential Oil Research*, 32(1).
<https://doi.org/10.1080/10412905.2019.1622603>

Ramón, J. (2020). *EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE LA RUDA (*Ruta graveolens* L.) Y EL MARCO (*Ambrosia chamissonis*) PARA SU POTENCIAL USO COMO PLAGUICIDA.*
UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL.

Reddy, D. N., & Al-Rajab, A. J. (2016). Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of *Ruta graveolens* L . volatile oils. *Cogent Chemistry*, 2(1). <https://doi.org/10.1080/23312009.2016.1220055>

Rojas, J., Mender, T., Rojas, L., Gullien, E., Buitrago, A., Lucena, M., & Cárdenas, N. (2011). Estudio comparativo de la composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Ruta graveolens* L. recolectada en los estados Mérida y Miranda, Venezuela. *Avances en Química*, 6(003), 89–93.

Sarmoum, R., Haid, S., Biche, M., Djazouli, Z., Zebib, B., & Merah, O. (2019). Effect of Salinity and Water Stress on the Essential Oil Components of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Agronomy*, 9(5).



<https://doi.org/10.3390/agronomy9050214>

Semerdjieva, I., Burducea, M., Astatkie, T., Zheljazkov, V., & Dincheva, I. (2019).

Essential Oil Composition of *Ruta graveolens* L. Fruits and *Hyssopus officinalis* Subsp. *aristatus* (Godr.) Nyman Biomass as a Function of Hydrodistillation Time. *Molecules*, 24(22).

<https://doi.org/10.3390/molecules24224047>

Shabir, G. A. (2003). Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conf. *Journal of Chromatography A*, 987(1–2). [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01536-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01536-4)

Shrivastava, A., & Gupta, V. (2011). Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists*, 2(1). <https://doi.org/10.4103/2229-5186.79345>

Silveira, L., Duarte, A., Lima, C., Bezerra, C., Hauth, M., Cardoso, G., & Schoeninger, V. (2019). Effect of air temperature and velocity on drying kinetics and essential oil composition of *Piper umbellatum* L. leaves. *Industrial Crops and Products*, 142. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111846>

Stratakos, A., & Koidis, A. (2016). Methods for Extracting Essential Oils. In *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Elsevier.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00004-3>

SVA organic. (2021). Rue Essential Oil-Specification sheet.

<https://www.svanaturals.com/rue-essential-oil.html>

Taverniers, I., Loose, M. De, & Bockstaele, E. Van. (2004). Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23(8).

<https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.04.001>

Tongnuanchan, P., & Benjakul, S. (2014). Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *Journal of Food Science*, 79(7).

<https://doi.org/10.1111/1750-3841.12492>

Turek, C., & Stintzing, F. (2013). Stability of Essential Oils: A Review.



Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 12(1).

<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12006>

Usano, J., Jesús, P., & Díaz, S. (2014). Aceites esenciales: conceptos básicos y actividad antibacteriana. *Reduca (Biología)*, 7(2), 60–70.

Valarezo, E., Vullien, A., & Conde, D. (2021). Variability of the Chemical Composition of the Essential Oil from the Amazonian Ishpingo Species (*Ocotea quixos*). *Molecules*, 26(13).

<https://doi.org/10.3390/molecules26133961>

Vásquez, S., Villarreal, F., Amaya, N. I., & Hernández, L. R. (2020). Producción y composición química del aceite esencial de Dalea bicolor en diferentes regiones de Chihuahua, México. *Botanical Sciences*, 98(4).

<https://doi.org/10.17129/botsci.2602>

Zambrano, L., Buenaño, M., Mancera, N., & Jiménez, E. (2015). Estudio etnobotánico de plantas medicinales utilizadas por los habitantes del área rural de la Parroquia San Carlos, Quevedo, Ecuador / Ethnobotanical study of medicinal plants used by rural inhabitants of the parish San Carlos Quevedo in Ecuador. *Rev. Universidad y Salud*, 17(1), 97–111.

Zarate, J., Castañeda, E. L., Cuevas, J. A., Carrillo, C. L., Ortiz, C., Ibarra, E., & Serrato, M. A. (2018). ACEITE ESENCIAL DE ALGUNAS POBLACIONES DE Tagetes lucida CAV. DE LAS REGIONES NORTE Y SUR DEL ESTADO DE MÉXICO. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 41(2).

<https://doi.org/10.35196/rfm.2018.2.199-209>



Anexos

Anexo 1. Composición química porcentual del aceite esencial de *Ruta graveolens*.

Fuente: (Chaabani, et al, 2019; Kathirvel, Poonkodi, Gomathi & Akila, 2017, Perera, Karunarante & Chinthaka, 2019; Attia. et al, 2018).

Compuesto	Porcentaje
2-undecanona	16,2-42,6
2-nonalanol	34,3
2-nonanona	11,9 - 32,1
1-nonenol	19,4
Metil nonil éster	15,4
1-pentadeceno	12,6
Limoneno	7,3
4-hidroxipiridina-1-óxido	6,7
Pireno	5,4
(Z)-8-(3,5-dimetil-4-hidroxifenil)-2-octeno	4,1
Geireno	3,8
3-terbutil catecol	3,4
Antraceno	3,1
Isomaturinina	2,6
5,6-dietil-1-metil-ciclohexeno	2,3
2-decanona	2,2-2,7
Tumeronol B	2,2
Ácido trans-4-anisil cinámico	2



Alcohol de diacetona	1,6
Acetosiringona	1,5
Hedicariol	1,4
3-etoxi-4-hidroxi-4-(4-metoxi fenil) ciclopent-2-enona	1,4
Fluoranteno	1,2
2-dodecanona	1,2-2,7
Sabinena	1,1
α-Eudesmol	1
2-etenil naftaleno	0,9
Dibenzofurano	0,8
1H-fenileno	0,6
α-pineno	0,5
2-octanona	0,5
β-mirceno	0,5
Nonil dicloro acetato	0,5
Ácido hexadecanoico	0,5
4-etil-1,2-dimetoxi benceno	0,5
Nonanal	0,4
α-Farneseno	0,4
Octadecano	0,3
Metil eugenol	0,3
2-tridecanona	0,3-2,5
Alfa-farneseno	0,3



2,3-dimetoxi tolueno	0,3
4-(3,4-metilendioxi fenil)-2-butanona	0,3
Neoftadieno	0,3
2,3-dimetil anisol	0,3
4-hidroxi-3-pentil ciclohexanona	0,2
Bifenileno	0,2
3,4-metilendioxi bencil acetona	0,2
Bifenil	0,2
Hexadecano	0,2
4-amorfen-11-ol	0,2
Decanal	0,2
1-metoxi-2-metil benceno	0,2
Dodecil acetato	0,2
2-fenilnaftaleno	0,2
2-metil anisol	0,2
β -damascenona	0,2
Fenantreno	0,1-0,7
2-acetoxi tetradecano	0,1-0,2
Propanoato de linalilo	0,1
Fitol	0,1-1,7
1-metoxi-4-metil benceno	0,1
D-limoneno	0,1
Bencenobutanol	0,1



1-metil fenantreno	0,1
Hexahidrofarnesil acetona	0,11
γ -Eudesmol	0,09-0,19
Pentacosano	0,09
1-etil-4-metoxi benceno	0,07
3,5-dimetil anisol	0,06
δ -cadineno	0,06
Elemol	0,05-0,26
1-nonanol	0,05
Indeno	0,05
5-(2,2-dimetil etil) 1,3-benzodioxol	0,05
4,5-metilen fenantreno	0,05
2-pentil-ciclohexano-1,4-diol	0,05
1-hexadecanol	0,05
1,3-ciclooctadieno	0,05
Ácido mirístico	0,05
9,12,15-octadecatrienal	0,04
Alcohol behenílico	0,03
γ -Terpineno	0,03
Ácido lineoleico	0,02

Anexo 2. Ubicación geográfica de los lugares de colección de los ejemplares de *R. graveolens* (cantones Cuenca y Morona, Ecuador)



**Anexo 3. Pools de estándares agrupados por diferencias en el tiempo de retención**

Compuesto	Tiempo de retención 220°C	Tiempo de retención 160°C	Pool análisis
2-nonanona	12,8	12,8	1
(-)-α-Tujona	13,5	13,5	1
(+)-Mentona	14,6	14,6	1
(+)-Terpinen-4-ol	15,2	15,2	1
(-)-Carveol, mezcla de isómeros	16,2	16,3	1
2-undecanona	18,4	18,4	1
Acetato de citronelilo	20,7	20,8	1
Eugenol	21,4	21,4	1
(-)-α-Bisabolol	35,6	35,6	1
(+)-α-Pineno	10,0	10,0	2
(-)-β-Pineno	10,8	10,8	2
Eucaliptol	11,9	11,9	2
(-)-Linalool	13,0	13,1	2
(-)-Isopulegol	14,4	14,4	2
Citral	16,8	16,8	2
Geraniol	17,1	17,1	2
Acetato de geranilo	22,1	22,1	2
Nerolidol	29,0	29,0	2
6-Metil-5-hepten-2- ona	10,7	10,7	3
α-Terpineno	11,5	11,5	3
γ-Terpineno	12,3	12,3	3
(±)-Citronelal	14,3	14,3	3
Acetato de linalilo	17,1	17,1	3
(+)-Carvona	17,2	17,2	3
Carvacrol	18,8	18,8	3
Farnesol	36,8	36,8	3
β-Mirceno	10,8	10,8	4
(R)-(+) -Limoneno	11,7	11,8	4
Hidrato de sabineno	12,6	12,5	4
Terpinoleno	13,0	13,0	4
(+)-Isopulegol	14,4	14,3	4
DL-Mentol	15,0	15,0	4
(+)-Pulegona	17,1	17,1	4
Cinamaldehído	31,9	31,8	4
β-Cariofileno	54,3	54,3	4
(-)-Óxido de cariofileno	23,2	23,2	5
Esclareol	24,7	24,7	5