

**ESTUDIO DE LA RECTIFICACIÓN POR DESTILACIÓN FRACCIONADA A
PRESIÓN REDUCIDA Y DE LA HIDRÓLISIS BÁSICA DEL ACEITE
ESENCIAL DE *Cymbopogon martinii* (PALMARROSA)**

CARLOS ALBERTO RUEDA SANABRIA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2012**

**ESTUDIO DE LA RECTIFICACIÓN POR DESTILACIÓN FRACCIONADA A
PRESIÓN REDUCIDA Y DE LA HIDRÓLISIS BÁSICA DEL ACEITE
ESENCIAL DE *Cymbopogon martinii* (PALMARROSA)**

CARLOS ALBERTO RUEDA SANABRIA

Tesis de grado presentada como requisito para optar el título de Químico

DIRECTORES:

ELENA E. STASHENKO, Química Ph.D

JAIRO RENÉ MARTÍNEZ, Químico Ph.D

CODIRECTOR:

NESTOR ARMANDO MARÍN, Químico

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2012

DEDICATORIA

*A Dios y mi ángel de la guarda que me han iluminado
y acompañado en todo momento.*

*A los padres más hermosos que Dios me pudo haber dado,
a quienes amo con todo mi corazón:*

*Hernando Rueda Lamus (q.e.p.d.) y Myriam Sanabria Ríos, así mismo, a mi abuela Carmen
Lamus Piñeres, a la mujer que acompaña mis pasos, mi cómplice, mi amiga, mi amor, mi
corazón y mi todo: Mónica Ramírez Mayorga, a mis suegros Miguel Antonio Ramírez y
Zoraida Mayorga, les dedico mis logros pues sin ustedes no lo habría logrado.*

*A mis hijos que son mi inspiración y mi razón de ser:
Santiago, Felipe y Nicolás .*

*A todos ellos les dedico mis triunfos y les agradezco
por haber creído en mí, por sus oraciones y bendiciones,
por sus besos abrazos, sonrisas y regaños,
por el tiempo que perdieron escuchándome
y dejaron todo por estar a mi lado.
Mil y mil gracias, los amo a todos sin igual.*

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elena E. Stashenko y al Dr. Jairo René Martínez, por el apoyo y las enseñanzas brindadas durante los últimos dos años de trabajo en CENIVAM, por los gratos momentos de tertulia alrededor de temas políticos, históricos, científicos y sociales, que nunca se olvidarán. Al CENIVAM, al Laboratorio de Cromatografía, a la Escuela de Química y a la Universidad Industrial de Santander, por el apoyo científico y económico brindado. A mis calificadores, Jairo R. Martínez y Aidé Perea, por su colaboración en el momento en que lo necesité, por la forma en que me corrigieron y supieron escucharme.

A toda mi familia: mis padres y hermanos, mi abuela, mi esposa e hijos y mis suegros, que siempre me apoyaron moral y económicamente. Gracias por continuar con mis sueños y esperanzas, por estar a mi lado en los momentos más complicados, por estar siempre de mi parte y por creer en mí en todo momento.

A mis amig@s, Néstor Armando Marín por haber sido mi codirector, antes que ser un químico, un gran amigo. A Hans Castro de quien aprendí que es la humildad y la perseverancia. A Carlos Ruíz, el compañero servicial, noble por excelencia y caballeroso, gracias por haberme enseñado la lealtad, la fuerza del trabajo y por todo aquel conocimiento que necesité a lo largo de mi estancia en el laboratorio. A Laura Castrillón y Marcela Domínguez, Arvind Kumar en la lejanía, Carlos Bathuel, Yaride Pérez, Joaquín Orozco, Carlos Cárdenas, mi viejo amigo Víctor Pérez, Corina Bernal, Andrea Gómez, Edwin Ramírez, Julián, Mario Llinás, Nathaly Gómez, Ginna Arias, Sebastián, Martín Fajardo (el churco), Paola, Gustavo, José Cárdenas, Camilo Durán y todos los demás amigos y compañeros, por hacer la estadía en el Laboratorio muy agradable al compartir con ellos en todo momento. Gracias a todos.

TABLA DE CONTENIDO

| | Pág. |
|---|------|
| INTRODUCCIÓN | 20 |
| 1 ESTADO DEL ARTE | 23 |
| 1.1 PALMARROSA (<i>Cymbopogon martinii</i>) | 23 |
| 1.2 ACEITES ESENCIALES | 24 |
| 1.2.1 Aceite esencial de <i>Cymbopogon martinii</i> | 25 |
| 1.2.2 Geraniol | 26 |
| 1.2.3 Linalol | 27 |
| 1.2.4 Acetato de geranilo | 28 |
| 1.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS | 29 |
| 1.3.1 Cromatografía de gases | 30 |
| 1.3.2 Detector de ionización en llama | 32 |
| 1.3.3 Espectrometría de masas | 33 |
| 1.4 DESTILACIÓN FRACCIONADA | 35 |
| 1.4.1 Destilación fraccionada a presión reducida | 37 |
| 1.4.2 <i>Spinning Band Distillation</i> | 39 |
| 1.4.3 Ecuación de <i>Antoine</i> | 41 |
| 1.5 DISEÑO EXPERIMENTAL FACTORIAL 2^k | 42 |
| 1.5.1 Construcción de un diseño 2^k | 43 |
| 2 METODOLOGÍA | 44 |

| | | |
|-------|---|----|
| 2.1 | EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE PALMARROSA. | 44 |
| 2.2 | IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL AE DE PALMARROSA Y DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS EN LA DESTILACIÓN FRACCIONADA. | 45 |
| 2.3 | RECTIFICACIÓN DEL AE DE PALMARROSA | 48 |
| 2.3.1 | Descripción del proceso | 50 |
| 2.3.2 | Determinación de las temperaturas de trabajo (T1 y T2) | 50 |
| 2.3.3 | Determinación de la presión de trabajo (P) | 51 |
| 2.4 | HIDRÓLISIS BÁSICA DEL ACETATO DE GERANILO | 52 |
| 2.4.1 | Determinación del tiempo de reacción | 53 |
| 2.4.2 | Diseño experimental | 53 |
| 2.4.3 | Cuantificación de las muestras obtenidas en cada experimento | 54 |
| 2.4.4 | Análisis estadístico y encaje de modelos polinómicos | 55 |
| 3 | ANÁLISIS DE RESULTADOS | 57 |
| 3.1 | RENDIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL DE PALMARROSA | 57 |
| 3.2 | COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AE DE <i>Cymbopogon martinii</i> | 57 |
| 3.3 | RECTIFICACIÓN DEL AE DE PALMARROSA | 61 |
| 3.3.1 | Estudios preliminares para la determinación de las temperaturas de trabajo (T1 y T2) | 61 |
| 3.3.2 | Determinación de la presión de trabajo | 66 |
| 3.3.3 | Estudios de precisión intermedia de la destilación fraccionada del AE de palmarrosa | 69 |
| 3.4 | ANÁLISIS DE LA HIDRÓLISIS BÁSICA DEL ACETATO DE GERANILO | 69 |
| 3.4.1 | Determinación del tiempo de reacción | 70 |
| 3.4.2 | Diseño experimental | 70 |
| 3.4.3 | Análisis estadístico y encaje de modelos polinómicos | 71 |

| | | |
|---|-----------------|----|
| 4 | CONCLUSIONES | 77 |
| 5 | RECOMENDACIONES | 79 |
| 6 | BIBLIOGRAFÍA | 80 |
| 7 | ANEXOS | 91 |

LISTADO DE FIGURAS

| | Pág. |
|--|------|
| Figura 1. <i>Cymbopogon martinii</i> (Roxb.) Wats var. <i>motia</i> sembrada en las instalaciones de CENIVAM-UIS. | 23 |
| Figura 2. Estructura química del geraniol. | 26 |
| Figura 3. Estructura química linalol. | 27 |
| Figura 4. Estructura química del acetato de geraniol. | 28 |
| Figura 5. Componentes básicos de un cromatógrafo de gases. | 32 |
| Figura 6. Componentes de un espectrómetro de masas. | 35 |
| Figura 7. Diagrama del sistema general de destilación fraccionada por lotes (<i>Batch fractional distillation</i>). X_D : fracción molar del destilado. | 37 |
| Figura 8. Esquema de la <i>Spinning band distillation</i> . (Tomado de www.brinstrument.com/fractional-distillation/spinning_band_distillation.html). | 40 |
| Figura 9. Eje rotatorio de teflón empleado en la <i>Spinning band distillation</i> . (Tomado de www.ars-fla.com/mainpages/custommanuf/Spinning-Band.htm). | 41 |
| Figura 10. Destilador por arrastre con vapor instalado en CENIVAM-UIS. | 45 |

- Figura 11. Cromatógrafo de gases *Agilent 6890 Plus*, acoplado a un detector de masas (*MSD*) y un inyector automático *Agilent technologies 7863 series*. 47
- Figura 12. Equipo de destilación fraccionada *B/R Instrument 800 – High Efficiency Micro Distillation*. 1. Sistema de calentamiento y agitación, 2. recipiente con aceite mineral, 3. columna de fraccionamiento, 4. reservorio, 5. controlador de temperatura, 6. medidor de temperatura, 7. balón de alimentación. 49
- Figura 13. Montaje utilizado en la hidrólisis básica del acetato de geranilo. Plancha de calentamiento (1), Recipiente con aceite mineral (2), balón de reacción de 100 mL (3), condensador para reflujo (4), controlador de temperatura (5). 52
- Figura 14. Perfil cromatográfico típico del AE de *C. martinii* obtenido por GC-MS. La identificación de los compuestos se reporta en la Tabla 6. 58
- Figura 15. Transformación del acetato de geranilo presente en el AE de palmarrosa a través del tiempo 70
- Figura 16. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC-FID de: (A) AE de palmarrosa transformado del experimento N° 6 y (B) AE de palmarrosa crudo; 1 Geraniol, 2 acetato de geranilo, 3 ISTD. 75
- Figura 17. Curva de calibración interna para cuantificar el geraniol presente en el AE de palmarrosa y en las fracciones FF que fueron obtenidas en los estudios de destilación fraccionada (Secciones 4.2.2. y 4.2.3). 94

- Figura 18. Curva de calibración interna para cuantificar el linalol presente en el AE de palmarrosa y las fracciones FF que fueron obtenidas en los estudios de destilación fraccionada (Secciones 4.2.2. y 4.2.3). 95
- Figura 19. Curva de calibración interna para cuantificar el acetato de geranilo presente en el AE de palmarrosa y las fracciones FF que fueron obtenidas en los estudios de destilación fraccionada (Secciones 4.2.2. y 4.2.3). 96
- Figura 20. Cromatogramas de las fracciones F1 obtenidas en las destilaciones del AE de palmarrosa a presión de 4 mmHg (Sección 4.2.2.). 1 linalol, 2 geraniol, 3 acetato de geranilo, 4 ISTD. 97
- Figura 21. Cromatogramas de las fracciones F2 obtenidas en las destilaciones del AE de palmarrosa a presión de 4 mmHg (Sección 4.2.2.). 1 linalol, 2 geraniol, 3 acetato de geranilo, 4 ISTD. 98
- Figura 22. Cromatograma de la fracción F3 obtenida en la destilación del AE de palmarrosa a presión de 4 mmHg (Sección 4.2.2.). 1 linalol, 2 geraniol, 3 acetato de geranilo, 4 ISTD. 99
- Figura 23. Cromatogramas de las fracciones FF obtenidas en la destilación del AE de palmarrosa a presión de 4 mmHg (Sección 4.2.2.). 1 linalol, 2 geraniol, 3 acetato de geranilo, 4 ISTD. 100
- Figura 24. Cromatogramas de las fracciones F1 obtenidas en la destilación del AE de palmarrosa a presión de 8 mmHg (Sección 4.2.2.). 1 *trans*- β -ocimeno, 2 linalol, 3 geraniol, 4 acetato de geranilo, 5 ISTD. 101

- Figura 25. Cromatogramas de las fracciones F2 obtenidas en la destilación del AE de palmarrosa a presión de 8 mmHg (Sección 4.2.2.). 1 linalol, 2 geraniol, 3 acetato de geranilo, 4 ISTD. 102
- Figura 26. Cromatogramas de las fracciones F3 obtenidas en la destilación del AE de palmarrosa a presión de 8 mmHg (Sección 4.2.2.). 1 linalol, 2 geraniol, 3 acetato de geranilo, 4 ISTD. 103
- Figura 27. Cromatogramas de las fracciones FF obtenidas en la destilación del AE de palmarrosa a presión de 8 mmHg (Sección 4.2.2.). 1 geraniol, 2 acetato de geranilo, 3 ISTD. 104
- Figura 28. Cromatogramas de las fracciones F1 obtenidas en la destilación del AE de palmarrosa a presión de 12 mmHg (Sección 4.2.2.). 1. 6-Metil-5-hepten-2-ona, 2. β -Mirceno, 3. *cis*- β -ocimeno, 4. *trans*- β -ocimeno, 5. linalol, 6. geraniol, 7. acetato de geranilo, 8. ISTD. 105
- Figura 29. Cromatogramas de las fracciones F2 obtenidas en la destilación del AE de palmarrosa a presión de 12 mmHg (Sección 4.2.2.). 1. 6-Metil-5-hepten-2-ona, 2. β -Mirceno, 3. *cis*- β -ocimeno, 4. *trans*- β -ocimeno, 5. linalol, 6. geraniol, 7. ISTD. 106
- Figura 30. Cromatogramas de las fracciones F3 obtenidas en la destilación del AE de palmarrosa a presión de 12 mmHg (Sección 4.2.2.). 1. 6-Metil-5-hepten-2-ona, 2. β -Mirceno, 3. *cis*- β -ocimeno, 4. *trans*- β -ocimeno, 5. linalol, 6. geraniol, 7. Acetato de geranilo, 8. ISTD, 9. *trans*- β -Cariofileno. 107

Figura 31. Cromatogramas de las fracciones F4 obtenidas en la destilación del AE de palmarrosa a presión de 12 mmHg (Sección 4.2.2.). 1. 6-Metil-5-hepten-2-ona, 2. β -Mirceno, 3. *cis*- β -ocimeno, 4. *trans*- β -ocimeno, 5. linalol, 6. geraniol, 7. Acetato de geranilo, 8. ISTD, 9. *trans*- β -Cariofileno.

108

Figura 32. Cromatogramas de las fracciones FF obtenidas en la destilación del AE de palmarrosa a presión de 12 mmHg (Sección 4.2.2.). 1 geraniol, 2 acetato de geranilo, 3 ISTD, 4 *trans*- β -Cariofileno.

109

LISTADO DE TABLAS

| | Pág. |
|--|------|
| Tabla 1. Matrices de experimentos para los diseños factoriales 2^2 , 2^3 y 2^4 | 43 |
| Tabla 2. Parámetros para la determinación de las temperaturas de trabajo (T1 y T2)..... | 50 |
| Tabla 3. Parámetros para la determinación de la presión de trabajo (P)..... | 51 |
| Tabla 4. Factores con sus respectivos niveles empleados en el diseño experimental central compuesto (factorial 2^2 + estrella + replicas en el centro)..... | 53 |
| Tabla 5. DCC desarrollado para evaluar el efecto de la relación entre la solución básica (mL) y el AE (g) y la concentración de la solución básica, sobre la transformación del acetato de geranilo presente en el AE de <i>Cymbopogon martinii</i> | 54 |
| Tabla 6. Identificación de los metabolitos secundarios volátiles de <i>Cymbopogon martinii</i> y sus correspondientes cantidades relativas (%). | 59 |
| Tabla 7. Cuantificación del linalol, geraniol y acetato de geranilo contenidos en el AE de palmarrosa de las cosechas 1 y 2. | 61 |
| Tabla 8. Condiciones experimentales de las destilaciones fraccionadas a 4, 6, 8, 10, 12 y 14 mmHg para determinar las temperaturas de trabajo. | 63 |

| | |
|--|----|
| Tabla 9. Porcentajes de áreas relativas de linalol, geraniol y acetato de geranilo presentes en las fracciones obtenidas en los estudios preliminares en el rango de presiones de 4, a 14 mmHg halladas por GC-FID. | 65 |
| Tabla 10. Condiciones experimentales de la destilación fraccionada a 4, 8, 12 mmHg para determinar la presión de trabajo. | 67 |
| Tabla 11. Composición porcentual (% m/m) del linalol, geraniol y acetato de geranilo presentes en cada una de las fracciones obtenidas a 4, 8, 12 mmHg halladas por GC-FID. | 68 |
| Tabla 12. Cuantificación de las fracciones FF obtenidas a 12 mmHg del AE de palmarrosa de las cosechas 1 y 2. | 69 |
| Tabla 13. Concentraciones del acetato de geranilo (g AG/mL AE), obtenidas en los diferentes experimentos correspondientes al diseño central compuesto. | 71 |
| Tabla 14. Anova del diseño experimental central compuesto implementado en el estudio de hidrólisis básica del acetato de geranilo presente en el AE de palmarrosa. | 72 |
| Tabla 15. Ecuaciones obtenidas en el proceso de optimización del proceso de la hidrólisis básica de acetato de geranilo. | 72 |
| Tabla 16. Datos de validación del modelo matemático obtenido para la hidrólisis básica del acetato de geranilo. | 73 |

| | |
|--|----|
| Tabla 17. Coeficientes de la ecuación polinómica ajustada al modelo matemático para las variables relación de Base (mL) : AE (g) y concentración de la base (M), en el proceso de la hidrólisis básica del acetato de geranilo. .. | 74 |
| Tabla 18. Valores óptimos de las variables empleadas en el proceso de la hidrólisis básica del acetato de geranilo presente en el AE de palmarrosa. | 74 |
| Tabla 19. Datos calculados usando la Ecuación 1 para hallar las presiones de vapor (mmHg) a diferentes temperaturas (°C) para el geraniol (Yaws <i>et al.</i> , 2009)..... | 91 |
| Tabla 20. Datos calculados usando la Ecuación 1 para hallar las presiones de vapor (mmHg) a diferentes temperaturas (°C) para el acetato de geranilo (Yaws <i>et al.</i> , 2009)..... | 92 |
| Tabla 21. Coeficientes de la Ecuación 1 para geraniol y acetato de geranilo (Yaws <i>et al.</i> , 2009)..... | 93 |
| Tabla 22. Datos de la curva de calibración interna para cuantificar el geraniol presente en el AE de palmarrosa y en las fracciones F1, F2, F3, F4 y FF que fueron obtenidas en los estudios de destilación fraccionada (Secciones 4.2.2. y 4.2.3). | 94 |
| Tabla 23. Datos de la curva de calibración interna para cuantificar el linalol presente en el AE de palmarrosa y en las fracciones F1, F2, F3, F4 y FF que fueron obtenidas en los estudios de destilación fraccionada (Secciones 4.2.2. y 4.2.3)..... | 95 |
| Tabla 24. Datos de la curva de calibración interna para cuantificar el acetato de geranilo presente en el AE de palmarrosa y las fracciones F1, F2, F3, F4 y | |

FF que fueron obtenidas en los estudios de destilación fraccionada
(Secciones 4.2.2. y 4.2.3). 96

LISTADO DE ANEXOS

| | Pág. |
|---|------|
| ANEXO A: ECUACIONES DE ANTOINE Y SUS COEFICIENTES | 91 |
| ANEXO B. CURVAS DE CALIBRACIÓN | 94 |
| ANEXO C: CROMATOGRAMAS | 97 |

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

| | |
|----------------------|---|
| AE | Aceite esencial o aceites esenciales. |
| ca. | Aproximadamente. |
| CA | California. |
| CENIVAM | Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales. |
| D_f | Espesor de la fase estacionaria, μm . |
| DI | Diámetro interno. |
| DCC | Diseño central compuesto. |
| EE.UU | <i>United States of America</i> (Estados Unidos). |
| e.g. | <i>Exempli gratia</i> (por ejemplo). |
| EI | <i>Electron Impact</i> (Impacto de electrones). |
| eV | Electron-voltio (s). |
| fc | Fase estacionaria. |
| FID | <i>Field Ionization Detector</i> (Detector de ionización en llama). |
| F1 | Fracción 1. |

| | |
|----------------------|--|
| F2 | Fracción 2. |
| F3 | Fracción 3. |
| F4 | Fracción 4. |
| FF | Fracción fondo. |
| GC | <i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases). |
| GD | Goteo o gotas del destilado. |
| GC/MS | <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas). |
| i.e. | <i>Id est.</i> (Esto es). |
| I_R | Índice(s) de retención lineal(es). |
| ISTD | Estándar interno. |
| LOF | <i>Lack of fit</i> (falta de ajuste). |
| MADR | Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. |
| MD | Maryland. |
| MB | <i>Monza e della Brianza</i> (Monza y Brianza). |
| MS | <i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas). |

| | |
|----------------------|---|
| MSD | <i>Mass Selective Detector</i> (Detector Selectivo de Masas). |
| m.s.n.m. | Metros sobre el nivel del mar. |
| m/z | Relación masa carga. |
| P | Presión de trabajo en mmHg. |
| PDMS | Poli(dimetilsiloxano). |
| PEG | Poli(etilenglicol). |
| ppm | Partes por millón. |
| RR | Reflujo. |
| RMSEC | <i>Root mean square error of calibration</i> (Raíz cuadrada del error de calibración promedio). |
| SBD | <i>Spinning Band Distillation</i> (Destilación de banda rotatoria). |
| TIC | <i>Total Ionic Current</i> (Corriente iónica total). |
| t_R | Tiempo de retención. |
| Tsc | Temperatura del sistema de calentamiento en °C. |
| T1 | Temperatura medida en la alimentación o de fondos en °C. |
| T2 | Temperatura medida en la columna de fraccionamiento en °C. |

VR Válvula de reflujo.

WI Wisconsin.

RESUMEN

TITULO: ESTUDIO DE LA RECTIFICACIÓN POR DESTILACIÓN FRACCIONADA A PRESIÓN REDUCIDA Y DE LA HIDRÓLISIS BÁSICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Cymbopogon martinii* (PALMARROSA) *

AUTOR: Carlos Alberto Rueda Sanabria **

PALABRAS CLAVES: *Cymbopogon martinii*, palmarrosa, destilación fraccionada a presión reducida, geraniol, acetato de geraniol, hidrólisis básica del acetato de geraniol.

El aceite esencial (AE) de la planta *Cymbopogon martinii* o palmarrosa posee un importante valor comercial por su contenido de geraniol, un alcohol terpénico de amplio uso en la perfumería. En esta investigación se reporta, cómo, la destilación fraccionada a presión reducida (2-14 Torr) empleando una columna de banda rotativa (*spinning band distillation*) y la hidrólisis alcalina del acetato de geraniol (AG) permiten concentrar el geraniol en el AE de palmarrosa, obtenido en el complejo agroindustrial CENIVAM. Como técnicas analíticas se emplearon la cromatografía de gases acoplada a un detector de fotoionización en llama (FID) y masas (GC-MS). Los principales componentes encontrados en el AE bajo estudio fueron: *cis*- β -ocimeno (ca. 0,5%), *trans*- β -ocimeno (ca. 1,6%), linalol (ca. 2,3%), geraniol (ca. 83%) y acetato de geraniol (ca. 9,6%). La rectificación del AE a 12 Torr permitió obtener 5 fracciones principalmente. La fracción mayoritaria fue de composición química reproducible, con un contenido de geraniol ca. 89,4-89,7% y acetato de geraniol ca. 11%. La hidrólisis del acetato de geraniol en el AE de palmarrosa usando soluciones acuosas de KOH, permitió concentrar el geraniol hasta un 91%. La ecuación que mejor modela la relación entre las variables, volumen (mL) de solución de KOH: cantidad (g) de AE(X_1), y concentración (M) de la solución básica (X_2), con base en un diseño experimental central compuesto 2^2 fue: $1,1008+0,3415 X_1-1,2028X_2-3,4325X_1^2 +0,4569X_2^2 +2,6773X_1^3$.

* Proyecto de Grado

** Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de química. Directores: Elena E. Stashenko y Jairo R. Martínez; Codirector: Néstor A. Marín.

ABSTRACT

TITLE: STUDY OF RECTIFICATION BY FRACTIONAL DISTILLATION UNDER REDUCED PRESSURE AND BASIC HYDROLYSIS OF ESSENTIAL OIL *Cymbopogon martinii* (PALMAROSA) *

AUTHOR: CARLOS ALBERTO RUEDA SANABRIA **

KEYWORDS: *Cymbopogon martinii*, palmarosa, fractional distillation under reduced pressure, geraniol, geranyl acetate, basic hydrolysis of geranyl acetate.

Cymbopogon martinii or palmarosa's essential oil (EO) has significant commercial value for its content of geraniol; a terpene alcohol is widely used in perfumery. Fractional distillation under reduced pressure (2-14 torr) using a spinning band distillation and alkaline hydrolysis of geranyl acetate can concentrate geraniol on the essential oil palmarosa, obtained in the agroindustrial complex CENIVAM was reported in this research. Were used gas chromatography coupled to a flame photoionization detector (FID) and mass spectrometry (GC-MS) as analytical techniques. The main components found in the essential oil were: *cis*- β -ocimene (ca. 0.5%), *trans*- β -ocimene (ca. 1.6%), linalool (ca. 2.3%), geraniol (ca. 83%), geranyl acetate (ca. 9.6%). The rectification of the essential oil to 12 torr yielded 5 fractions mainly. The major fraction was reproducible chemical composition, of geraniol containing ca. 89.4 to 89.7% and geranyl acetate ca. 11%. Hydrolysis of geranyl acetate in palmarosa' essential oil using aqueous solutions of KOH, allowed concentrating to 91% geraniol. The equation that best models the relationship between variables, volume (ml) solution of KOH: amount (g) EO (x1) and concentration (M) of the basic solution (x2), based on experimental design center compound 2² was: $1.1008 + 0,3415 x1 - 1, 2028x2 - 3, 4325x12 + 0.4569 + 2.6773 x22 x13$.

* Thesis college degree.

** Industrial University of Santander, Faculty of Science, School of Chemistry. Directors: Elena E. Stashenko and Jairo R. Martinez, Co-Director: Néstor A. Marin..

INTRODUCCIÓN

El género *Cymbopogon* contiene aproximadamente 120 especies, de las cuales sólo cuatro son de gran importancia dentro del mercado de aceites esenciales, (AE), *C. nardus*, *C. winterianus*, *C. flexuosus* y *C. martinii* var. *motia* (palmarrosa) (Tiwari, 2010). Esta última, es la planta bajo estudio. El AE de palmarrosa es apreciado por su agradable fragancia a rosas, debida a la presencia del alcohol terpénico geraniol. El geraniol es ampliamente utilizado en las industrias de sabores, aromas y farmacéutica (Mallavarapu *et al.*, 1998). El AE se emplea como materia prima para jabones, perfumes florales de rosas, en preparados cosméticos, para dar sabor a los productos del tabaco, alimentos y bebidas no alcohólicas (Dubey y Luthra, 2001) y en la fabricación de productos repelentes de mosquitos (Ansari y Razdan, 1995).

La palmarrosa es originaria de la India y éste fue hasta la década de los 90 el primer productor y exportador de su aceite esencial. Actualmente produce aproximadamente 100 toneladas al año. Sin embargo, países como Brasil, Indonesia, Honduras y Guatemala han entrado a competir en el mercado mundial con aceites de muy buena calidad e.g. 80-90% de contenido en geraniol (Tiwari, 2010). La importación del aceite esencial producido en la India está encabezada por los Estados Unidos (aprox. 10 ton/año) y algunos países europeos como Francia (aprox. 5 ton/año), Alemania (aprox. 4 ton/año) y los Países Bajos (aprox. 3 ton/año) (Tiwari, 2010). El mercado del AE de palmarrosa se debilitó con la producción de geraniol sintético (Tiwari, 2010); sin embargo, hay un resurgimiento de todo lo relacionado con productos naturales y cultivados bajo condiciones ambientalmente amigables, que hacen que la industria del aceite esencial sea nuevamente atractiva económicamente.

Partiendo del hecho de que se debe volver la mirada a lo natural y siendo esta el arma más poderosa para vender o promocionar los aceites esenciales en el mercado internacional, el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Tropicales Aromáticas y Medicinales (CENIVAM), abordó intensamente la temática investigativa orientada al uso sostenible de la biodiversidad en función de la cadena productiva de los AE. Dentro de este ámbito, *C. martinii* (Roxb) Wats var. *motia* surge como especie promisoría con fines agroindustriales en Colombia. Por su alto contenido de geraniol (65-85%), su bajo precio (25-35 €/kg, para compras ≥ 25 kg) (Bulletin Essential oils and oleoresins, 2011) en el mercado internacional, que hace que se deba rectificar el AE para obtener un producto con mayor valor agregado, son razones por las cuales se la debe tener en cuenta, ya que en otros países es una realidad.

En este proyecto se investigaron los procedimientos para la obtención de un AE de mayor calidad, *i.e.*, con un mayor contenido de geraniol. Para lograrlo, el AE crudo de *C. martinii*, se sometió a un proceso de rectificación a través de la destilación fraccionada a presión reducida, el cual se llevó a cabo a escala de laboratorio en un equipo *B/R Instrument 800 – High Efficiency Micro Distillation* (Easton, MD, EE.UU.), cuyo principio operacional es la destilación con columna rotatoria, *spinning band distillation*. Las temperaturas de ebullición tanto de geraniol como de acetato de geraniol se predijeron con la ecuación de *Antoine*. Se realizó una serie de experimentos con el fin de establecer las condiciones de temperatura y presión a las cuales se logra la mejor separación de los componentes. Para aumentar el contenido de geraniol en el AE de palmarrosa se realizó un estudio de la hidrólisis básica del acetato de geraniol presente en el AE. Esto, se llevó a cabo a través de un diseño experimental central compuesto 2^2 . Se empleó cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) para determinar la composición química de los AE de palmarrosa de las fracciones y de los AE hidrolizados. La cuantificación de los componentes mayoritarios se

realizó usando cromatografía de gases con detector de ionización en llama (GC-FID).

La presente investigación hace parte del proyecto “Estandarización, unificación de fichas técnicas de aceites esenciales como productos de exportación y obtención de algunos componentes y derivados”, enmarcado en el macro-proyecto que se está desarrollando para el fortalecimiento de la cadena productiva de AE en Colombia. Para el desarrollo de este proyecto se contó con el respaldo del Centro de Investigación CENIVAM y del Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander, así como del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR), de las empresas colombianas M&N, NEYBER y MORENOS Ltda y de las asociaciones campesinas del Socorro, a saber: Cooagrosocorro, Aproasesco y la asociación de mujeres Manuela Beltrán.

1 ESTADO DEL ARTE

1.1 PALMARROSA (*Cymbopogon martinii*)



Figura 1. *Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats var. *motia* sembrada en las instalaciones de CENIVAM-UIS.

Cymbopogon martinii (Roxb.) Wats var. *motia* (ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) comúnmente llamada palmarrosa es una planta aromática perenne perteneciente a la familia *Poaceae* o *Graminae*. Es originaria del sudeste asiático, especialmente de la India y Pakistán, aunque también se cultiva en otros países como Brasil, Paraguay, Madagascar, Guatemala, Indonesia (Sahu y Debata, 2000, Singh y Singh, 1998, Singh y Kumar, 2000) y recientemente en Colombia. En la India se encuentra en estado silvestre, adaptada a zonas marginales y suelos pobres (Kumar y Srivastava, 2007) o en sembradíos con y sin riego que abarcan diferentes zonas agroclimáticas (Maheshwari *et al.*, 1992). Se ha estudiado el requerimiento de agua, la productividad y eficiencia en el uso del agua de riego en cultivos de palmarrosa establecidos en suelo franco arenoso. El estudio se hizo probando ocho niveles de

riego 0,1, 0,3, 0,5, 0,7, 0,9, 1,1, 1,3 y 1.5 IW:CPE (relación entre profundidad de agua de riego y evaporación acumulada en cada riego) durante tres años, dando como resultado que el mayor rendimiento de AE se produce con un nivel de riego de 0,5 IW:CPE, lo que requiere la aplicación de 14 riegos, cada uno de 50 mm de profundidad durante el año de cosecha. Un riego por encima del valor encontrado para IW:CPE, causó un efecto adverso sobre el crecimiento y el rendimiento de palmarrosa (Singh *et al.*, 1997); así mismo, se comparó el uso de abono orgánico proveniente de estiércol de corral y fertilizantes nitrogenados en cultivos de palmarrosa sin riego en suelo franco arenoso con clima tropical semiárido en el sur de la India. La supervisión de los niveles de biomasa y los rendimientos de aceite esencial (Rao, 2001), encontró que en los dos años de estudio se obtuvieron siete cosechas, la producción total de biomasa fue de 23.6 - 37,2 t/ha y el rendimiento total de AE fue de 99.2 - 159,1 kg/ha. Además se concluyó que hubo un aumento aproximado del 10 % tanto para la biomasa como para el rendimiento del AE para los suelos fertilizados con estiércol, mientras que hubo un aumento aproximado del 60 % cuando se utilizaron fertilizantes inorgánicos, en comparación con suelos no fertilizados.

1.2 ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales son mezclas homogéneas de compuestos químicos orgánicos volátiles, en su mayoría pertenecientes a la familia química de los terpenos, junto con otros compuestos oxigenados (alcoholes, ésteres, éteres, aldehídos y compuestos fenólicos), provenientes del metabolismo secundario en plantas (Bandoni, 2000). Se obtienen de materia prima vegetal mediante destilación, ya sea con vapor o por inmersión en agua hirviendo y también a través de procesos mecánicos *e.g.* extrusión. Tienen la propiedad en común, de generar diversas fragancias agradables y perceptibles al ser humano. A condiciones ambientales, son líquidos menos densos que el agua, pero más viscosos (Muñoz, 2002, Peter; 2004).

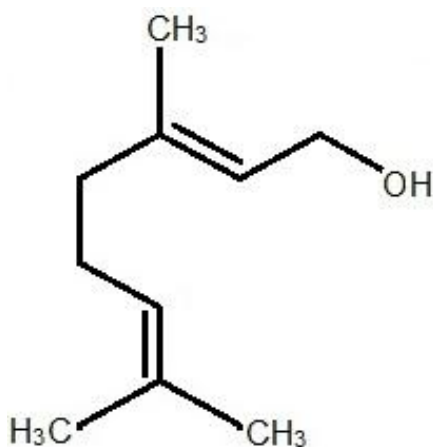
1.2.1 Aceite esencial de *Cymbopogon martinii*

Esta planta contiene un aceite esencial (AE) compuesto principalmente por el monoterpeno (E)- β -ocimeno (1.3–1.6%), los alcoholes terpénicos geraniol (78-85%) y linalol (2-2.5%), el éster acetato de geranilo (3-12%) y el sesquiterpeno (E,Z)-farnesol (0.8–2%), (Mallavarapu *et al.*, 1998; Rajeswara *et al.*, 2005). Por otro lado, ha sido estudiada la composición de la fracción de hidrocarburos del aceite esencial la cual representa menos del 5% del total del AE. Se encontraron 11 monoterpenos (ca. 46%), 28 sesquiterpenos (ca. 52%) y 16 *n*-alcanos (ca. 1.6%) de la serie homóloga de C₁₅ - C₃₀ (Gaydou y Randriamiharisoa, 1986). Este AE es muy apreciado en la industria perfumística por su fragancia a rosas con tonalidades herbáceas (Peter, 2004), a su vez en la aromatización del tabaco y jabones, como medicina tradicional y uso doméstico (Kumar y Srivastava, 2007). En la industria de la perfumería el aceite es la materia prima para la producción de geraniol aislado por destilación fraccionada a presión reducida (Tiwari, 2010).

Se han estudiado el rendimiento y la composición del AE durante el desarrollo de la inflorescencia, encontrándose que las mayores concentraciones de geraniol se presentan cuando la inflorescencia es madura (Dubey y Luthra, 1999; Dubey y Luthra, 2001). En el 2005 se publicó un método en el cual se recuperó el 97% del aceite esencial disuelto en el agua de condensación, utilizando hexano como solvente, en cuya extracción se encontraron compuestos oxigenados organolépticamente importantes, como el linalol (2,6-3,8%), geraniol (91,8-92,8%), y geranial (1,8-2,0%) (Rajeswara *et al.*, 2005). El AE de palmarrosa ha demostrado ser un eficaz repelente de insectos cuando se aplica a granos almacenados como los frijoles (Kumar y Srivastava, 2007), un antihelmíntico contra los nemátodos (Kumaran *et al.*, 2003), un antifúngico (Delespaul *et al.*, 2000) y repelente de mosquitos (Ansari y Razdan, 1995). Estudios realizados con el AE muestran actividad antibacteriana en cepas de *E. Coli* (Texeira *et al.*, 2007) y de *Pseudomona putida* aisladas de la carne de res, asociadas con su

descomposición (Oussalah *et al.*, 2006); así mismo acción antimicrobiana (Baratta *et al.*, 1998), especialmente en células de *Saccharomyces cerevisiae* (Prashar *et al.*, 2003).

1.2.2 Geraniol



Propiedades físicas del geraniol

Masa molar: 154.25 g/mol.

Punto de ebullición: 229 °C a 760 mmHg.

Índice de refracción: 1.469 – 1.478 (20°C).

Presión de vapor: 0.013 mmHg a 25.00 °C

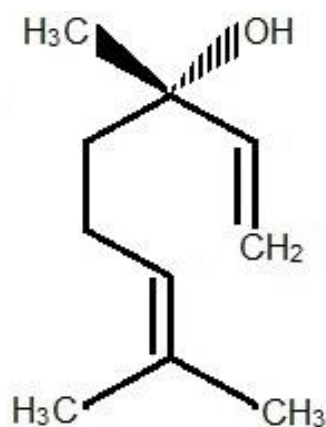
Toxicidad oral LD50: 3600 mg/kg

Figura 2. Estructura química del geraniol.

El geraniol (ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) es un alcohol monoterpénico acíclico. Se encuentra como componente principal en los aceites esenciales de ilang-ilang, palmarrosa, geranio, flor de naranja, hierba de limón (limonaria), lúpulo y lavanda. Es un líquido aceitoso de color amarillo pálido con una fragancia dulce a rosas (Tiwari, 2010). La biosíntesis de geraniol se da a través de la ruta del mevalonato y a su vez es importante para la biosíntesis de otros terpenos (Chen y Viljoen, 2010). Cuando se oxida, se convierte en geranial o citral. En soluciones ácidas, el geraniol se convierte en el cicloterpeno α -terpineol (Baxter *et al.*, 1978). Se utiliza en perfumería y saborizantes (Mallavarapu *et al.*, 1998). Se le atribuye acción antifúngica (Bard *et al.*, 1988), es fungistático contra el *Aspergillus niger*, hongos filamentosos como *Globosum chaetomium* y

Funiculosum penicillium (Delespaul *et al.*, 2000) y se considera que ofrece protección contra los mosquitos *Anopheles culicifacies* (Ansari y Razdan, 1995). *Cryptococcus neoformans*, un hongo que causa la infección durante las últimas etapas del SIDA es inhibido tanto por el aceite de palmarrosa como por el geraniol (Viollon y Chaumont, 1994). El geraniol es una feromona de determinadas especies de abejas, siendo secretada por las glándulas odoríferas de las abejas obreras para señalar la ubicación de flores con néctar y las entradas a sus colmenas (Free *et al.*, 1983).

1.2.3 Linalol



Propiedades físicas del linalol.

Masa molar: 154.24 g/mol.

Punto de ebullición: 198 °C a 760 mmHg.

Presión de vapor: 0.0905 mmHg a 25 °C

Índice de refracción: 1.4615 (20°C).

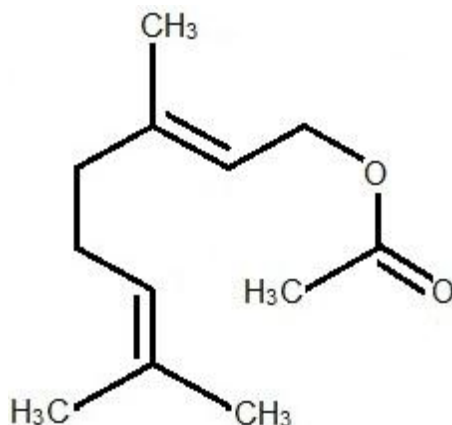
Toxicidad oral LD50: 3918 mg/kg

Figura 3. Estructura química linalol.

El linalol (ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) es un alcohol monoterpénico, frecuente en la fragancia de flores y hojas de diversas plantas. Se encuentra presente en los aceites esenciales de *Citrus bergamia* (bergamota), *Lavandula officinalis* (lavanda), *Cymbopogon martinii* (palmarrosa) entre otros (Raguso y Pichersky, 1999). Muestra propiedades quirales debido al carbono

hidroxilado, por lo cual se presentan dos formas enantioméricas (Casabianca *et al.*, 1997); el coriandrol o (R)-linalol se encuentra en el AE de *Cinnamomum camphora* (árbol del alcanfor) y el AE de *Lavandula officinalis* (lavanda), *Ocimum basilicum* (albahaca), *Aspidosperma polyneuron*, *Dalbergia latifolia*, *Dalbergia nigra*, *Jacaranda mimosifolia*, *Pterocarpus indicus*, *Tipuana tipu*, especies conocidas comúnmente como palo de rosa, por otro lado el licareol o (S)-linalol se encuentra en el AE de *Coriandrum sativum* L. (cilantro), *Cymbopogon martinii*, *Citrus sinensis* Osbeck (naranja dulce) entre otras plantas (Bauer *et al.*, 1990). Biosintéticamente el linalol se produce a través de la vía del isopentil pirofosfato a partir del intermediario (isoprenoide) universal geranil pirofosfato. Esto a través de un tipo de enzimas ligadas a la membrana celular llamadas monoterpene sintetasas. Una de estas, la linalol sintetasa (LIS), es la responsable de la producción de (S)-linalol en diversos tejidos florales (Lewinshon *et al.*, 2001). Se utiliza para dar fragancia a implementos de aseo personal tales como jabones, detergentes, champús cremas de afeitar y lociones, se emplea también como reactivo para producir sustancias como la vitamina E (Raguso y Pichersky, 1999).

1.2.4 Acetato de geranilo



Propiedades físicas del acetato de geranilo

Masa molar: 196.29 g/mol.

Punto de ebullición: 242 °C a 760 mmHg.

Presión de vapor: 0.116 mmHg a 25 °C.

Índice de refracción: 1.457 – 1.464 (20°C).

Toxicidad LD50: 633 mg/kg

Figura 4. Estructura química del acetato de geranilo.

El acetato de geranilo (ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) es el éster del alcohol terpénico geraniol. Se puede obtener de dos maneras: por destilación fraccionada de una selección de aceites esenciales o por la acetilación de geraniol (*Food and Drug Administration*, 1972). Se encuentra en los aceites esenciales de *Cymbopogon nardus* (citronela), *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon citratus* (hierba de limón o limonaria), petit grain (obtenido por hidrodestilación de ramas y hojas de cítricos), neroli (obtenido por hidrodestilación de flor de naranja), *Pelargonium* (geranio), *Coriandrum sativum* (cilantro), *Daucus carota* (zanahoria), y *Crocus sativus* (azafrán). Se usa principalmente como componente de perfumes para cremas y jabones, y como ingrediente saborizante (*National Toxicology Program*, 1987). Se puede encontrar en los siguientes alimentos: productos de panadería (17 ppm), dulces (15 ppm); helado (6,5 ppm) y goma de mascar (0,3 - 1,2 ppm) (National academy of Sciences, 1981; Smith *et al.*, 2003).

En un estudio realizado a plantas de palmarrosa en estado de inflorescencia inmadura, se observó que la enzima denominada como la esterasa geranil acetato de clivaje (GAE), participa en la transformación de acetato de geranilo a geraniol, la GAE era activa en el rango de pH alcalino con el óptimo a un pH de 8,5. La catálisis de acetato de geranilo fue lineal hasta 6 h y después de 24 h de incubación, el 75% del sustrato se hidroliza (Dubey y Luthra, 2001). Se realizó un estudio sobre el procedimiento de la hidrólisis del acetato de geranilo presente en el AE de *C. martinii* Stapf. var. Motia. La reacción se llevó a cabo en medio acuoso alcalino seguido de destilación fraccionada a presión reducida para obtener geraniol de alto grado de pureza (e.g. 94 - 95 %) y de gran valor en la perfumería. La concentración total de geraniol en el AE fue de 70-72% m/m (Aggarwal *et al.*, 1986).

1.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS

En la separación, identificación y caracterización de los componentes de un AE se emplean principalmente técnicas cromatográficas, espectrométricas y espectroscópicas. Las cromatográficas son consideradas separativas, mientras que las espectrométricas y espectroscópicas son las más apropiadas para la identificación de componentes; sin embargo, surge un problema con estas últimas debido a que se necesita que los componentes a identificar se encuentren aislados. Por tal motivo, se emplean en colaboración con técnicas de separación para mejorar los resultados. Las técnicas más empleadas y generalizadas con las cuales se consigue dicho cometido son: la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y la cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización en llama (GC-FID) (Sandra y Bicchi, 1987). En el presente estudio se utilizaron las técnicas GC-MS y GC-FID para la identificación y cuantificación de los componentes del AE de *Cymbopogon martinii*. A continuación se describirá brevemente cada una de estas técnicas.

1.3.1 Cromatografía de gases

Esta técnica se basa en la volatilización de la muestra y su posterior inyección en la cabeza de una columna cromatográfica (ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). La muestra se eluye a lo largo de la columna cromatográfica por medio de un gas inerte como fase móvil, de esta manera la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito, simplemente transporta el analito a través de la columna hasta el detector (Skoog, 2001). Las columnas cromatográficas que se utilizan en los últimos tiempos son de tipo capilar, conteniendo en su interior una fina capa de fase estacionaria sobre la cual se da la separación de los analitos. La separación está determinada por la distribución de cada uno de los componentes entre el gas de arrastre y la fase estacionaria, es decir, un analito que permanezca poco tiempo en la fase estacionaria eluye

rápidamente hacia su detección (Kitson *et al.*, 1996), esto se debe a la afinidad entre la sustancia y la fase estacionaria. En toda corrida cromatográfica hay unos parámetros de trabajo que deben permanecer constantes en el equipo de GC (Gutiérrez y Droguet, 2002), si se quiere comparar cromatogramas, cuantificar o identificar componentes de una matriz. A continuación se nombran dichos parámetros:

- **Flujo del gas de arrastre.** Presión de entrada (10-50 psi) y flujo de entrada (1-25 mL/min). El flujo será constante si la presión es constante (Skoog, 2001).

- **Modo de inyección.** Las columnas capilares exigen muestras con volúmenes menores de 10^{-3} μL , en este caso se programa la inyección en modo *split* para que a la columna entre una décima (1:10) o una trigésima (1:30) parte del contenido tomado con la jeringa; si el analito en cuestión se encuentra en baja proporción se procede en modo *splitless*, es decir sin división entrando todo el contenido a la columna (Skoog, 2001). Las anteriores formas de inyección se realizan volatilizandando las muestras antes de entrar a la columna, sin embargo existe una forma de inyección llamada *on column* que evita evaporar los analitos e ingresa la muestra directamente a la columna, se utiliza especialmente para compuestos termolábiles (Gutiérrez y Droguet, 2002).

- **Tipo de columna.** Las columnas pueden ser de dos tipos: con fase estacionaria polar (polietilenglicol) o fase estacionaria apolar (polidimetilsiloxano, poli(fenilmetil)siloxano) (Skoog, 2001).

- **Programación de la temperatura.** Las temperaturas de calentamiento para cada una de las unidades que conforman el equipo debe ser diferente, así mismo para cada muestra a analizar. La temperatura en el puerto de inyección debe ser mayor que la temperatura de ebullición del analito menos volátil. Si hay varios analitos se debe ajustar una rampa de temperatura en el horno donde se encuentra la columna, que consiste en aumentar la temperatura de forma gradual o por etapas hasta separar los analitos. Las temperaturas aplicadas a las columnas no deben ser tan altas como para dañar la fase estacionaria o producir una descomposición del analito (Gutiérrez y Droguet, 2002).

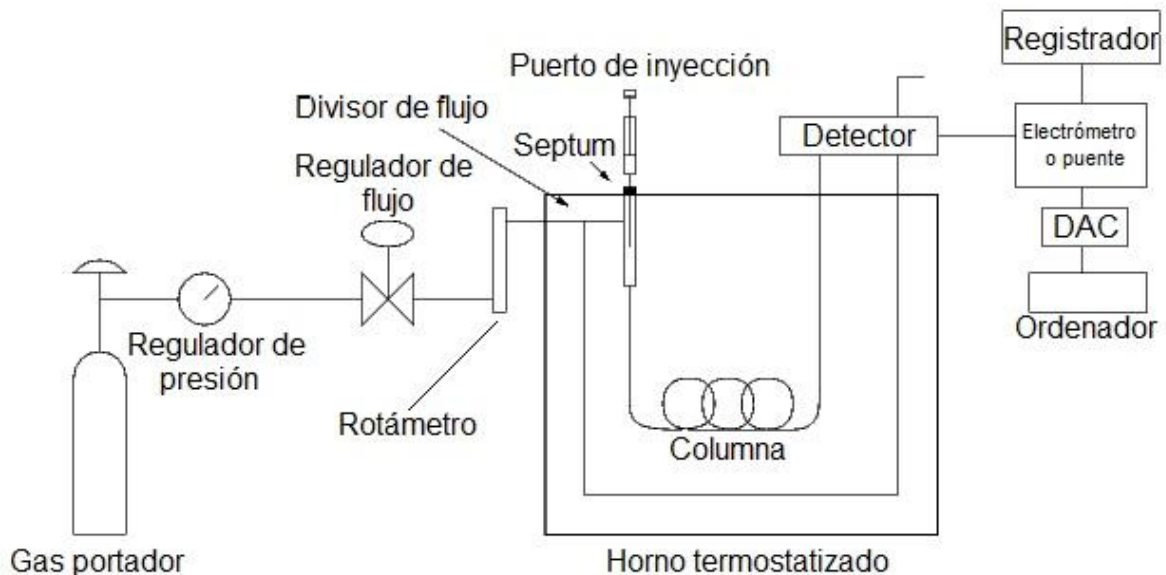


Figura 5. Componentes básicos de un cromatógrafo de gases.

1.3.2 Detector de ionización en llama

El detector de ionización en llama (FID) es uno de los detectores más utilizados en cromatografía de gases, puesto que con este acoplamiento se puede conocer cuánto de un analito en particular hay en una matriz. El detector está conformado por un quemador de hidrógeno/oxígeno, donde se mezcla el efluente de la

columna (gas de arrastre y analito) con hidrógeno, posteriormente, la mezcla gaseosa se enciende mediante una chispa eléctrica, produciéndose una llama de alta energía (Van Ruth, 2001).

Cuando un compuesto orgánico se somete a altas temperaturas se pirolyza, produciéndose iones y electrones, que son conductores eléctricos, generándose una diferencia de potencial de unos centenares de voltios entre la parte inferior del quemador y un electrodo colector situado por encima de la llama. A su vez, la corriente debida a la diferencia de potencial es baja (del orden de los 10-12 A), por lo tanto debe ser amplificada mediante un amplificador de alta impedancia (Skoog, 2001).

La ionización producida en la llama es bastante compleja, sin embargo, se puede aproximar el número de iones producidos al número de átomos de carbono transformados en la llama, lo que indica que el detector sea sensible a la masa (al número de átomos de carbono que salen de la columna) y no a la concentración, por lo tanto no le afectan demasiado los cambios en el flujo de salida. Las ventajas que se tienen al usar el acoplamiento GC-FID son: (1) alta sensibilidad, del orden de 10-13 g/s; (2) amplio intervalo lineal de respuesta, 10⁷ unidades; (3) bajo ruido de fondo (elevada relación señal/ruido); (4) bajo mantenimiento. La desventaja del método tiene que ver con que la muestra se pirolyza, es decir, se destruye (Van Ruth, 2001).

1.3.3 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas (MS) es una de las técnicas analíticas más empleadas y completas que hay en este momento para la identificación de compuestos, ya que con dicha técnica se puede hallar la masa molecular y en algunos casos permite establecer la estructura espacial de una molécula. Presenta

una posición destacada entre los métodos de análisis, debida a características como: la alta sensibilidad (ca. 10^{-6} - 10^{-14} g), los límites de detección, la velocidad en los análisis y la diversidad de sus aplicaciones (Dass, 2007).

La MS mide la relación masa a carga (m/z) de iones e iones fragmento en fase gaseosa, formados por la ionización y posterior fragmentación de las moléculas de analito en la cámara de ionización, además proporciona una medida de la abundancia de cada especie iónica; esto se expresa en Daltons o unidades de masa atómica (umas), ya que la carga de los iones es casi siempre uno.

Al final se obtiene un espectro de masas que relaciona las masas de los iones específicos con sus respectivas concentraciones en la corriente iónica total (TIC) (Niessen, 2001). En química analítica la MS se aplica rutinariamente en el control de la contaminación ambiental, el control de alimentos, la ciencia forense, productos naturales (e.g. AE) o control de procesos.

Otras aplicaciones dentro de la química incluyen: cinética de reacción, geocronología, análisis químicos inorgánicos, reacciones ión-molécula, determinación de parámetros termodinámicos (e.g. ΔG°_f , K_a et. al) y análisis de composición elemental de sustancias (MS de alta resolución) (De Hoffman y Stroobant, 2007).

El instrumento (ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) está conformado por seis componentes principales, estos son: (1) sistema de entrada; (2) cámara de ionización; (3) analizador de masas; (4) detector; (5) sistema de cómputo; (6) bomba de alto vacío.

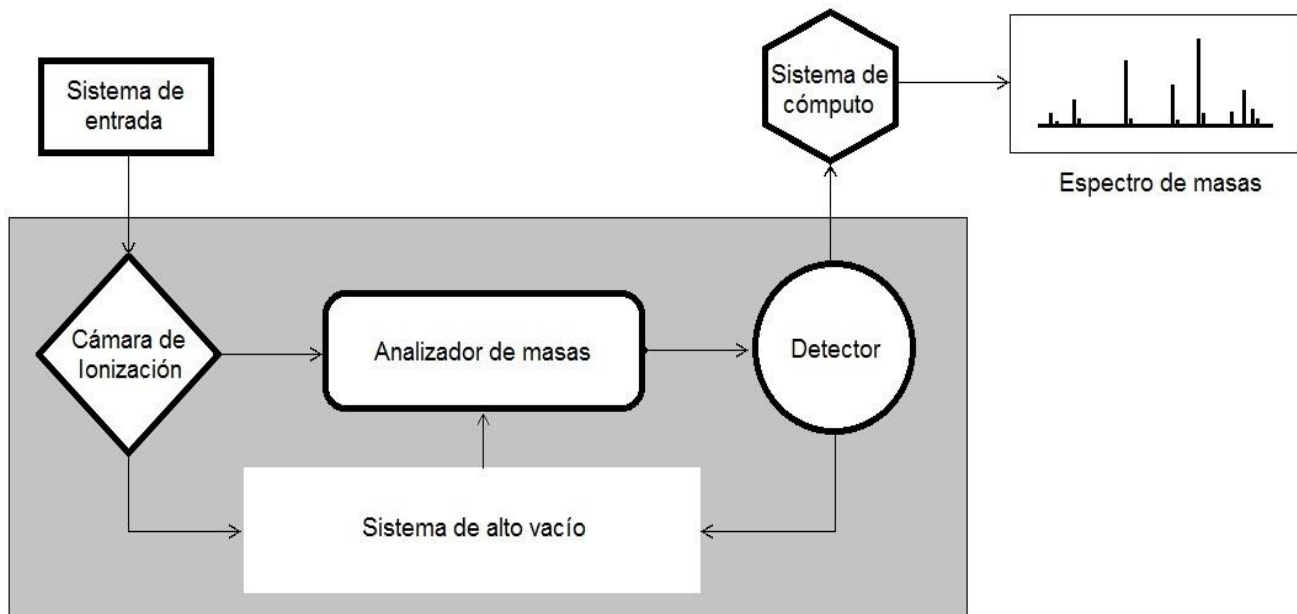


Figura 6. Componentes de un espectrómetro de masas.

1.4 DESTILACIÓN FRACCIONADA

La destilación es el proceso de separación o aislamiento de dos o más componentes de una mezcla líquida, aprovechando las diferentes temperaturas de ebullición de los líquidos a separar, a una presión determinada. La destilación depende de parámetros como: el equilibrio líquido - vapor, la temperatura, la presión y la composición de cada sustancia (Fair, 2009).

En el proceso de destilación simple, la solución es sometida a calentamiento hasta producir vapor para luego condensarlo, sin permitir que éste retorne al recipiente

de alimentación. En cambio, la destilación fraccionada se basa en el retorno de una parte del condensado a la columna de destilación, es decir, ocurre reflujo, en unas condiciones tales que el líquido que retorna se pone en íntimo contacto con los vapores que ascienden hacia el condensador (Mujtaba, 2004). Este proceso se realiza cuando las temperaturas de ebullición de los componentes de la mezcla son muy cercanas entre sí.

Una columna de destilación fraccionada proporciona una gran superficie para el intercambio de calor, en las condiciones de equilibrio, que se establece entre el vapor que asciende y el líquido condensado que desciende (ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Esto tiene como consecuencia una serie completa de evaporaciones y condensaciones parciales en toda la longitud de la columna de fraccionamiento.

Cuando el condensado en algún punto de la columna toma calor del vapor, parte se evapora de nuevo y el vapor formado es más rico en el componente más volátil. Al mismo tiempo, cuando el vapor cede calor al condensado, parte del mismo se condensa, siendo este condensado más rico en el componente menos volátil.

De acuerdo con esto, podemos decir que partiendo de la base de la columna, a medida que aumenta la altura, aumenta el enriquecimiento del componente más volátil y disminuye el componente menos volátil. También se establece a lo largo de la columna un gradiente de temperaturas que varían desde el punto de ebullición del componente más volátil hasta el punto de ebullición del componente menos volátil (McCabe, 2004).

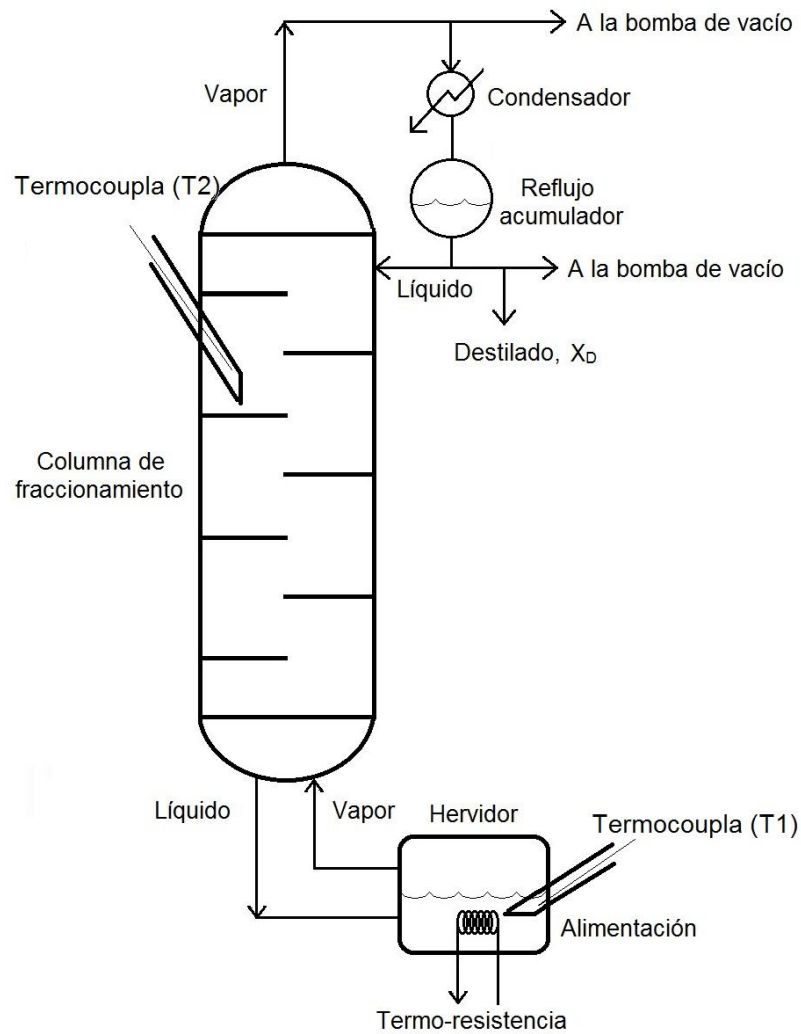


Figura 7. Diagrama del sistema general de destilación fraccionada por lotes (*Batch fractional distillation*). X_D : fracción molar del destilado.

1.4.1 Destilación fraccionada a presión reducida

Muchos líquidos orgánicos no pueden ser destilados a presión atmosférica debido a que se descomponen al llegar a su punto de ebullición o por debajo de éste; esto es frecuente en compuestos que hierven por encima de los 200 °C. Estas sustancias se purifican o separan por destilación fraccionada a presión reducida para evitar su descomposición (Reinhard y Drefahl, 1999).

Se conoce que un líquido empieza a hervir cuando su presión de vapor iguala a la presión atmosférica o de operación. Por lo tanto, si se reduce la presión de operación se tendrá la ebullición a temperaturas menores.

Estudios realizados empleando este proceso, muestran su gran eficiencia en el aislamiento de componentes de aceites esenciales; éste se utilizó para fraccionar el AE de *Tsuga canadensis* (L.) (Abeto canadiense), obteniéndose 59 fracciones enriquecidas en triciclono, α -pineno, canfeno, β -pineno, mirceno, α -felandreno, limoneno, α -tujona y acetato de bornilo (Shaw, 1951).

También, en la desterpenación del AE de la piel de la naranja de Brasil, en la cual se trabajó a las temperaturas de 50, 65, y 80 °C, con presiones de 7,5, 15 y 22,5 mmHg y con relaciones de reflujo de 4:1, 2:1 y 4:3 (Stuart *et al.*, 2001).

En la rectificación del AE de *Myrtus communis* (mirto de Marruecos) se obtuvieron tres fracciones principales, la primera era rica en α -pineno (42-54,8%) y 1,8-cineol (27-53,6%), la segunda fracción estaba compuesta en su mayoría por 1,8-cineol (83-95,8%) y la tercera fracción se caracterizó por el contenido de acetato de mirtenilo (62-65%) (Farah *et al.*, 2006).

Se evaluó un método que enriquece el contenido de fenoles (74%) en el AE de *Lippia graveolens* H.B.K. (orégano); por medio de destilación fraccionada, se obtuvieron 2 fracciones en una proporción 50:50, en las cuales fue posible concentrar timol y carvacrol (Castillo *et al.*, 2007).

Se estudió la separación de α -pineno del AE de bayas de *Juniperus communis* L. (enebro común) del sur de Serbia, mediante la destilación fraccionada al vacío, utilizando una columna de 36 platos teóricos, de diámetro 29 mm y 2 m de altura, empaquetada con NORMAG tipo A. Las presiones utilizadas durante el proceso fueron 60,0 y 25,13 mmHg con una relación de reflujo de 5:1 (Milojević *et al.*, 2010).

En la revisión de la literatura no se encontró registro alguno en relación con la destilación fraccionada de AE de *C. martinii*. Sin embargo, se encontraron dos artículos en los cuales se aplicó dicho proceso a dos especies del género *Cymbopogon*. En el primer estudio, se utilizó un diseño factorial 2^2 para la separación de citral del AE de *C. citratus* (Plazas *et al.*, 2010) y en el segundo, se empleó para fraccionar el AE de *C. winterianus*, a las presiones de 3,75, 7,5 y 11,25 mmHg y relaciones de reflujo de 1:1, 5:1 y 10:1, para encontrar que las mejores condiciones fueron: relación de reflujo de 10:1 y presión 3,75 mmHg (Beneti *et al.*, 2011).

1.4.2 Spinning Band Distillation

La *Spinning Band Distillation* (SBD) (ver **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) es una técnica de destilación fraccionada, que utiliza un eje rotatorio helicoidal dentro de la columna de fraccionamiento, para crear un gran número de platos teóricos, a diferencia de las columnas empacadas que utilizan diferentes

tipos de relleno (e.g. anillos *Rasching* entre otros) para llevar a cabo el fraccionamiento. Los ejes rotatorios pueden ser de teflón o metal.

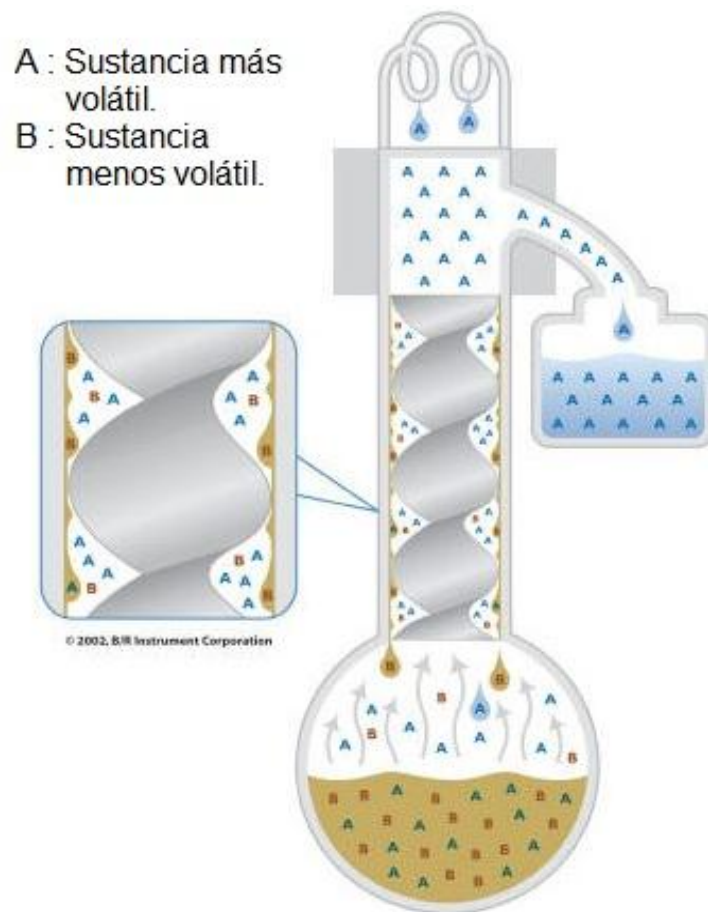


Figura 8. Esquema de la *Spinning band distillation*. (Tomado de www.brinstrument.com/fractional-distillation/spinning_band_distillation.html).

Aquellos que están hechos de Teflón (ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) se utilizan para la destilación por debajo de 225 °C, mientras que las de metal se utilizan para la destilación a temperaturas más elevadas (Jentof *et al.*, 1969).

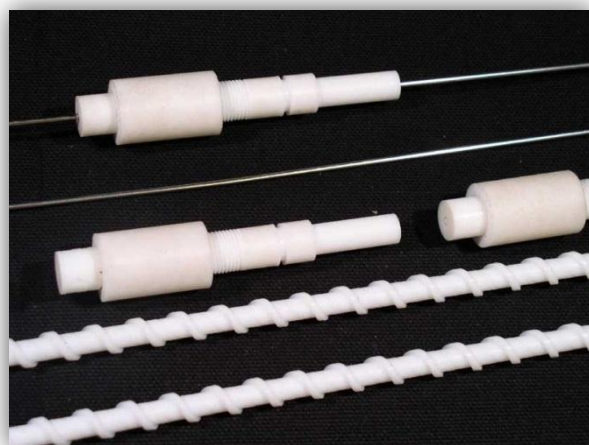


Figura 9. Eje rotatorio de teflón empleado en la *Spinning band distillation*. (Tomado de www.ars-fla.com/mainpages/custommanuf/Spinning-Band.htm).

La SBD crea un contacto íntimo entre la fase vapor que asciende y la fase líquida que desciende, por fuerzas centrífugas, en un proceso dinámico sobre la pared interna de la columna de destilación, debido a que la hélice gira a altas velocidades. Esto da como resultado una separación muy eficiente, en una columna de destilación corta (Baker *et al.*, 1940).

1.4.3 Ecuación de *Antoine*

La ecuación de *Antoine* (ver **Ecuación 1**) sirve para hallar la presión de vapor de sustancias puras a una temperatura determinada. Se deriva de la relación de *Clausius-Clapeyron*; sin embargo, esta relación no se emplea a altas presiones ni cerca del punto crítico, ya que en esas condiciones, la ecuación de *Clausius-Clapeyron* da resultados inexactos (Dykyj *et al.*, 1999).

$$\log P_{vap} = A - \frac{B}{C + T} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

A, *B* y *C*: son "coeficientes de *Antoine*", que varían de una sustancia a otra.

La ecuación de *Antoine* tiene una precisión de unos pocos puntos porcentuales en la mayoría de las sustancias volátiles (con presiones de vapor de más de 10 Torr).

La ecuación de *Antoine* se empleó para predecir las temperaturas de ebullición de los compuestos mayoritarios presentes en el AE de palmarrosa, a las presiones de trabajo en la destilación fraccionada a presión reducida.

1.5 DISEÑO EXPERIMENTAL FACTORIAL 2^K

El diseño de experimentos es un conjunto de herramientas estadísticas que permiten lograr la máxima eficiencia de los procesos con el mínimo costo. Esto se ha consolidado poco a poco tanto en la industria como en los laboratorios de investigación.

Un diseño experimental factorial 2^k es aquel en el que se trabaja con k factores (variables) y dos niveles (valores que toman las variables), los cuales se suelen denotar con (-) para el nivel menor y (+) para el nivel mayor. El número total de experimentos estará determinado por el número de niveles elevado al número de factores, por ejemplo, un diseño factorial 2^2 constará de 4 experimentos, un diseño 2^3 tendrá 8 experimentos y así sucesivamente. Este tipo de diseño resume los experimentos más adecuados donde se cubren todas las posibles combinaciones de los niveles en todos los factores, de esta manera, se puede conocer simultáneamente los efectos que tienen k factores sobre un observable y a la vez encontrar si existe interacción entre ellos (Ferré, 2003).

1.5.1 Construcción de un diseño 2^k

Para diseñar una matriz de experimentos 2^k no se necesita de un software especializado para construirla ni para analizar sus resultados. En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se muestran las matrices para los diseños 2^2 , 2^3 y 2^4 . Las matrices contienen 2^k filas, que indican el número de experimentos y k columnas, que corresponden a las k variables en estudio.

| Exp. | X_1 | X_2 |
|------|-------|-------|
| 1 | - | - |
| 2 | + | - |
| 3 | - | + |
| 4 | + | + |

| Exp. | X_1 | X_2 | X_3 |
|------|-------|-------|-------|
| 1 | - | - | - |
| 2 | + | - | - |
| 3 | - | + | - |
| 4 | + | + | - |
| 5 | - | - | + |
| 6 | + | - | + |
| 7 | - | + | + |
| 8 | + | + | + |

| Exp. | X_1 | X_2 | X_3 | X_4 |
|------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | - | - | - | - |
| 2 | + | - | - | - |
| 3 | - | + | - | - |
| 4 | + | + | - | - |
| 5 | - | - | + | - |
| 6 | + | - | + | - |
| 7 | - | + | + | - |
| 8 | + | + | + | - |
| 9 | - | - | - | + |
| 10 | + | - | - | + |
| 11 | - | + | - | + |
| 12 | + | + | - | + |
| 13 | - | - | + | + |
| 14 | + | - | + | + |

| | | | | |
|----|---|---|---|---|
| 15 | - | + | + | + |
| 16 | + | + | + | + |

Tabla 1. Matrices de experimentos para los diseños factoriales 2^2 , 2^3 y 2^4 .

En el presente estudio se utilizó un diseño factorial 2^2 para estudiar la hidrólisis básica en medio acuoso, del acetato de geranilo presente en el AE de palmarrosa.

2 METODOLOGÍA

La metodología que se desarrolló en este proyecto viene dada en tres partes. La primera parte fue la extracción del AE de palmarrosa, su identificación y cuantificación de los componentes mayoritarios. Una segunda parte fue la destilación fraccionada a presión reducida del AE de palmarrosa en el equipo (*B/R Instrument 800 - High Efficiency Micro Distillation*), para obtener un AE rectificado de composición química reproducible. Por último se hizo un estudio de la hidrólisis básica del acetato de geranilo presente en el AE de palmarrosa.

2.1 EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE PALMARROSA.

La extracción del AE de palmarrosa se hizo por destilación por arrastre con vapor de agua. Para ello, se utilizó material vegetal sembrado en parcelas experimentales pertenecientes al complejo agroindustrial CENIVAM ubicado en las instalaciones de la sede central de la Universidad Industrial de Santander. La palmarrosa se cosechó en dos temporadas diferentes durante un año. Los aceites fueron rotulados así: AE cosecha 1 y AE cosecha 2. La destilación se realizó con el material fresco recién cosechado.

Para realizar las destilaciones de las cosechas 1 y 2, se empleó un equipo de destilación conformado por un alambique con su respectivo intercambiador de calor y su vaso separador (Florentino) (ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) y como generador de vapor se utilizó una caldera (Tecnik, Bogotá, Colombia) de 58,86 kW. Se pesaron 200 kg y 367,5 kg de material vegetal respectivamente. Luego, se introdujo en el alambique de acero inoxidable de 300 kg de capacidad y se compactó para alcanzar una mayor densidad de la torta. Las destilaciones se llevaron a cabo a una presión de 552 kPa durante 1,5 horas.



Destilador multimodal (hidrodestilación, arrastre con vapor).
1. Reservorio para el material vegetal, 2. Cuello de cisne, 3. Condensador, 4. Florentino. 5. Caldera para generación de vapor.

Figura 10. Destilador por arrastre con vapor instalado en CENIVAM-UIS.

Una vez obtenidos los aceites esenciales se separaron del agua de condensación por medio de un embudo de decantación, posteriormente, se filtraron en una columna que contenía sulfato de sodio anhidro para eliminar restos de humedad. Se envasaron, se rotularon y se almacenaron a una temperatura de 5°C .

2.2 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL AE DE PALMARROSA Y DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS EN LA DESTILACIÓN FRACCIONADA.

La identificación tanto del AE como de las fracciones obtenidas en la destilación fraccionada se realizó por medio de los índices de retención y por comparación de los espectros de masas que se obtuvieron por GC-MS, con los espectros de masas que se encuentran consignados en las bases de datos *Adams*, *NIST* y *Wiley*. Los índices de retención (I_R), se calcularon teniendo en cuenta los tiempos de retención de una serie homóloga de patrones de hidrocarburos desde C10 hasta C25, que se corrieron en el GC bajo las mismas condiciones operacionales que los aceites esenciales. La ecuación que se usó fue:

$$I_R = 100n + 100 \left[\frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \right] \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

I_R : Índice de retención del compuesto de interés;

n : Número de átomos de carbono del n -alcano que eluye antes del compuesto de interés;

t_{RN} : Tiempo de retención del n -alcano que eluye después del compuesto de interés;

t_{Rx} : Tiempo de retención del compuesto de interés;

t_{Rn} : tiempo de retención del n -alcano que eluye antes del compuesto de interés.

Se utilizó un cromatógrafo *Agilent Technologies 6890 Plus Series* (Palo Alto, CA, EE.UU.) acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD*

5973 Network, equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (250 °C, relación de *split* 1:30), un inyector automático *Agilent Technologies 7893* y un *autosampler Agilent Technologies 7863 Series* (ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Se empleó una columna capilar apolar DB5-MS (*J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU*) con fase estacionaria de 5%-fenil-poli(metilsiloxano), de 60 m x 0,25 mm, D.I x 0,25 μm , d_f . El gas de arrastre fue helio, con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 16,47 psi, velocidad lineal de 26 cm s^{-1} y flujo constante de 1 mL min^{-1} . La temperatura del horno se programó desde 45 °C (5 min) @4 °C/min hasta 150 °C (2 min), después @5 °C/min hasta 250 °C (5 min) y por último @ 10 °C/min hasta 275 °C (15 min). Los espectros de masas fueron obtenidos por impacto con electrones (EI) con energía de 70 eV. Las temperaturas de la cámara de ionización, de la línea de transferencia y el cuadrupolo se mantuvieron a 230 °C, 285 °C y 150 °C respectivamente. Los espectros de masas y corrientes iónicas reconstruidas (TIC) fueron obtenidos en un cuadrupolo, por medio de barrido automático de frecuencia (*full scan*), en el rango de masas de m/z 40-350 con una velocidad de barrido de radiofrecuencia de 3,5 scans^{-1} . Cada una de las muestras se preparará adicionando 50 μL del analito, 2 μL de *n*-tetradecano y se aforó a 1,0 mL con diclorometano.

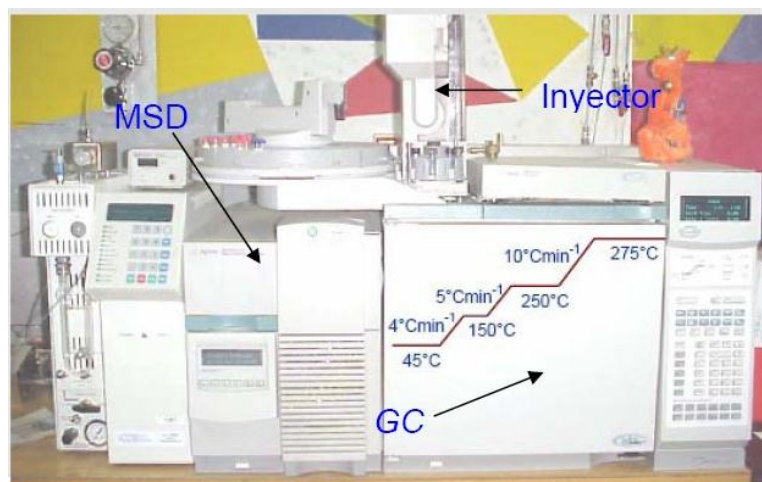


Figura 11. Cromatógrafo de gases *Agilent 6890 Plus*, acoplado a un detector de masas (*MSD*) y un inyector automático *Agilent technologies 7863 series*.

La cuantificación del linalol, geraniol y acetato de geranilo presentes en el AE de palmarrosa y las fracciones provenientes de la destilación fraccionada (ver **Sección 3.3.2 y 3.3.3**), se realizó por medio de curva de calibración interna de patrones certificados (geraniol 98%, acetato de geranilo 98% y linalol 97%), suministrados por la empresa *Aldrich Chemical Company Inc.* (Milwaukee, WI, EE.UU.) y como estándar interno, ISTD, *n*-tetradecano (*Merck KGaA, Darmstadt, Alemania, Reference Substance for Gas chromatography*). Se prepararon patrones entre 1000 y 6000 ppm para geraniol y acetato de geranilo, mientras que para linalol se prepararon patrones entre 60 y 4600 ppm. Se utilizó un cromatógrafo de gases *Agilent technologies 7890A* con detector de ionización en llama (GC-FID), equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (250 °C, relación de *split* 30:1), un inyector automático *Agilent Technologies 7893* y un *autosampler Agilent Technologies 7863 Series* con una columna capilar apolar DB-5 (*J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU*) de 60 m x 0,25 mm, D.I x 0,25 µm, d_f , con fase estacionaria 5%-fenil-poli(metilsiloxano). Se utilizó helio como gas de arrastre, con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 16,47 psi, velocidad lineal de 26 cm s^{-1} y flujo constante de 1 mL min^{-1} . La temperatura del horno se programó de la siguiente manera 45 °C (10 min) hasta 220 °C (15 min) @3 °C/min. Los datos cromatográficos fueron adquiridos y procesados con el sistema de datos *Hewlett-packard ChemStation G17001DA* (HP Rev. B.03.02).

Las muestras se prepararon de la siguiente manera: se pesaron entre 100 y 250 mg del analito y se aforaron a 1,0 mL con diclorometano, posteriormente, se tomaron 20 µL de cada solución, se les adicionó 2 µL del tetradecano y finalmente se aforaron a 1,0 mL con diclorometano.

2.3 RECTIFICACIÓN DEL AE DE PALMARROSA

El proceso de rectificación se desarrolló en un equipo de destilación fraccionada a escala laboratorio *B/R Instrument 800 – High Efficiency Micro Distillation* (Easton, MD, EE.UU.) (ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), compuesto por un balón de 25 mL de capacidad de alimentación, una columna de destilación fraccionada de vidrio de 30 platos teóricos dentro de la cual se halla una banda rotatoria de teflón (ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), válvula de reflujo manual, un reservorio con cinco colectores para viales con capacidad de 2 ml para recoger las fracciones, dos termocuplas para el control de temperatura y un sistema para vacío de control digital B/R VAC-1000 (Easton, MD, EE.UU.). Se hallaron las condiciones de presión (P) de operación a la cual se obtuvo la mejor separación, dicho proceso se dividió en dos etapas: (1) determinación de las temperaturas de equilibrio; (2) determinación de la presión de trabajo.

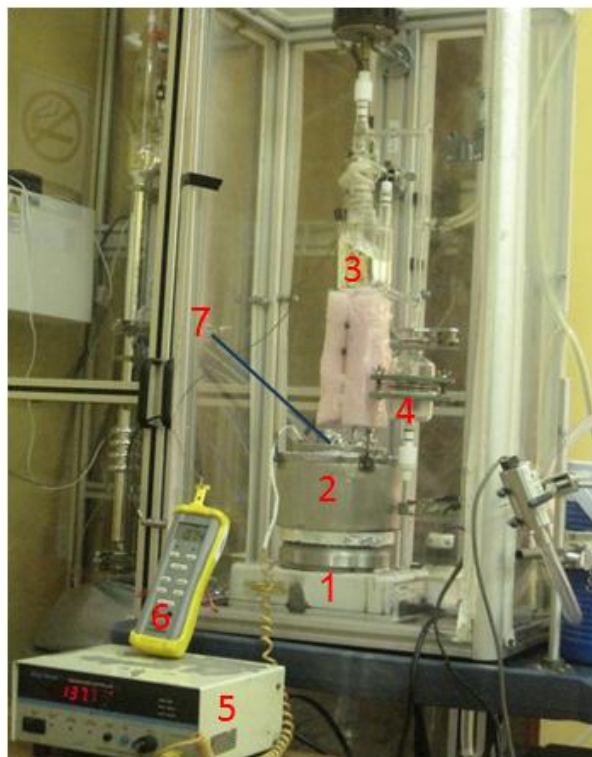


Figura 12. Equipo de destilación fraccionada *B/R Instrument 800 – High Efficiency Micro Distillation*. 1. Sistema de calentamiento y agitación, 2. recipiente con aceite mineral, 3. columna de fraccionamiento, 4. reservorio, 5. controlador de temperatura, 6. medidor de temperatura, 7. balón de alimentación.

Las temperaturas de ebullición del geraniol y acetato de geraniol se calcularon usando la **Ecuación 1** (Yaws *et al*, 2009).

2.3.1 Descripción del proceso

Al inicio se fijó la presión de trabajo (P) hasta que alcanzara el equilibrio. La masa de alimentación (AE) fue calentada a una razón de 4 °C/min hasta obtener la mínima temperatura (T1) en la cual se observó un goteo del destilado (GD). En ese instante se procedió a encender la *spinning band*; se esperó a que la temperatura medida en la columna de fraccionamiento (T2) aumentara hasta un valor constante. Posterior a ello, se abrió la válvula de reflujo (VR) para recoger la fracción (F1); al pasar el tiempo, la T2 disminuyó hasta un valor cercano al momento donde se observaron las primeras GD y en ese instante se cerró la VR. De esta misma manera, se procedió para obtener las demás fracciones.

2.3.2 Determinación de las temperaturas de trabajo (T1 y T2)

En esta etapa se destiló el AE para obtener fracciones siguiendo el procedimiento descrito en la **Sección 2.3.1** y así poder determinar los valores de T1 y T2 a las presiones de: 4, 6, 8,10, 12 y 14 mmHg. Para ello, se destiló por duplicado en cada presión. Los parámetros se presentan en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Parámetros para la determinación de las temperaturas de trabajo (T1 y T2).

| Propiedad | Descripción |
|-------------------------------------|--|
| Masa de AE | La cantidad de masa de AE de palmarrosa fue de $15 \pm 0,4$ g. |
| Temperatura máxima de calentamiento | Cuando se lleva a cabo calentamiento de un AE los componentes que lo conforman pueden sufrir cambios en sus propiedades fisicoquímicas y pueden sufrir descomposición térmica, por lo tanto se estableció una T1 máxima de $130\text{ }^{\circ}\text{C}$, para así seguir manteniendo las propiedades de los componentes una vez separados. |
| Tiempo de equilibrio | Se llamó tiempo en equilibrio (t) al tiempo que transcurría luego de observarse una T1 constante y unas GD iniciales hasta el momento de abrir la VR y empezar a recoger la fracción. Este tiempo se fijó en 15 min. |
| Reflujo | El reflujo (RR) se controló mediante una válvula que se operó manualmente y se estableció en 1,5 vueltas contadas a partir del punto cero marcado con una línea. |
| Agitación | El sistema de agitación (A) se llevó a cabo en los fondos para eliminar gradientes de temperatura y esta permaneciera constante en todo el volumen del AE. Esta se realizó con un agitador electromagnético del sistema de calentamiento y se mantuvo en 500 rpm. |

2.3.3 Determinación de la presión de trabajo (P)

Para la determinación de la presión de trabajo, se destiló por duplicado el AE de palmarrosa para obtener fracciones de composición química reproducible enriquecidas en geraniol, esto se hizo siguiendo el procedimiento descrito en la **sección 2.3.1**, a las presiones de: 4, 8 y 12 mmHg y empleando las temperaturas de trabajo obtenidas del desarrollo del procedimiento descrito en la **sección 2.3.2**. Para dicho procedimiento se tuvieron en cuenta los parámetros descritos en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

Tabla 3. Parámetros para la determinación de la presión de trabajo (P).

| Propiedad | Descripción |
|-------------------------------------|--|
| Masa de AE | La cantidad de masa de AE de palmarrosa fue de $16,03 \pm 0,01$ g. |
| Temperatura máxima de calentamiento | Se estableció una T1 máxima de 130 °C. |
| Tiempo de equilibrio | Este tiempo se fijó en 15 min. |
| Reflujo | Se estableció en 1,5 vueltas contadas a partir del punto cero marcado con una línea. |
| Agitación | Esta se realizó con un agitador electromagnético del sistema de calentamiento y se mantuvo en 500 rpm. |

2.4 HIDRÓLISIS BÁSICA DEL ACETATO DE GERANILO

Con el objetivo de aumentar la pureza del geraniol contenido en el AE de *C. martinii*, se propuso la transformación del acetato de geraniol a geraniol a través de una reacción de hidrólisis básica. Los experimentos se llevaron a cabo empleando el aceite esencial obtenido en la cosecha 1. Para ello, se empleó un balón de 100 mL acoplado a un condensador para permitir el reflujo; este se sumergió en un recipiente el cual contenía aceite mineral. Se usó una plancha de calentamiento RC *Velp scientifica* (Usmate, MB, Italia). El montaje completo se puede observar en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** La agitación se mantuvo en 750 rpm y la temperatura en 118 °C. Como solución básica se empleó hidróxido de potasio en lentejas (*Merck KGaA*, Darmstadt, Alemania), disuelto en agua.



Figura 13. Montaje utilizado en la hidrólisis básica del acetato de geranilo. Plancha de calentamiento (1), Recipiente con aceite mineral (2), balón de reacción de 100 mL (3), condensador para reflujo (4), controlador de temperatura (5).

2.4.1 Determinación del tiempo de reacción

Para la determinación del tiempo de reacción se prepararon 100 mL de una solución acuosa de hidróxido de potasio 0,5 M. Se tomaron 4 balones de 100 mL y a cada uno se le adicionaron 2 g de AE, 13 mL de solución básica y un agitador magnético (ver **Sección 2.4**). Los tiempos de reacción fueron de: 15, 30, 60 y 90 min. Una vez finalizada la reacción, la mezcla de reacción fue separada y lavada con volúmenes de agua en un embudo de decantación. La fase orgánica se envasó, se le agregó sulfato de sodio anhidro para eliminar restos de humedad, se rotuló y se almacenó a 5 °C, para su posterior estudio cromatográfico.

2.4.2 Diseño experimental

Con el objetivo de establecer las condiciones más apropiadas para los factores: 1) relación entre el volumen de solución básica de KOH (mL) y la masa de AE (g); 2) la concentración de la solución básica (M), en la hidrólisis básica del acetato de geranilo presente en el AE de palmarrosa, se evaluó la combinación de diferentes niveles entre los factores 1 y 2. Los valores de los niveles de cada factor se encuentran consignados en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

Tabla 4. Factores con sus respectivos niveles empleados en el diseño experimental central compuesto (factorial 2^2 + estrella + replicas en el centro).

| FACTORES | NIVELES | | | | |
|------------------------|-----------|------|-------|-------|----------|
| | $-\alpha$ | -1 | 0 | 1 | α |
| Base (mL) : AE (g) | 1:2 | 3:2 | 7:2 | 11:2 | 13:2 |
| Concentración base (M) | 0,03 | 0,05 | 0,125 | 0,250 | 0,500 |

Por tal motivo, se determinó desarrollar un diseño experimental factorial 2^2 mas estrella con tres replicas en el centro (diseño central compuesto, DCC). Como observable o factor respuesta para el diseño experimental, se tomaron los gramos de acetato de geranilo / ml de AE sin transformar en cada uno de los experimentos. En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se muestra el diseño experimental desarrollado y los valores de las variables estudiadas.

Tabla 5. DCC desarrollado para evaluar el efecto de la relación entre la solución básica (mL) y el AE (g) y la concentración de la solución básica, sobre la transformación del acetato de geranilo presente en el AE de *Cymbopogon martinii*.

| # EXP | X_1 | X_2 | RELACIÓN BASE (mL):AE (g) | CONCENTRACIÓN BASE (M) |
|-------|-----------|-----------|------------------------------|---------------------------|
| 1 | - | - | 1,50 | 0,0625 |
| 2 | - | + | 1,50 | 0,250 |
| 3 | + | - | 5,50 | 0,0625 |
| 4 | + | + | 5,50 | 0,250 |
| 5 | 0 | $-\alpha$ | 3,50 | 0,0312 |
| 6 | 0 | $+\alpha$ | 3,50 | 0,500 |
| 7 | $-\alpha$ | 0 | 0,50 | 0,125 |

| | | | | |
|-----|----|---|------|-------|
| 8 | +α | 0 | 6,50 | 0,125 |
| 9* | 0 | 0 | 3,50 | 0,125 |
| 10* | 0 | 0 | 3,50 | 0,125 |
| 11* | 0 | 0 | 3,50 | 0,125 |

* Casos empleados para determinar el error experimental del método.

2.4.3 Cuantificación de las muestras obtenidas en cada experimento

El acetato de geranilo remanente en las muestras obtenidas de cada experimento, se cuantificó por medio del método de adición de estándar interno. Este método se realizó teniendo en cuenta el área del estándar interno, ISTD, *n*-tetradecano (*Merck, KGaA, Darmstadt, Alemania Reference Substance for Gas chromatography*). Se adicionaron 2 µL de ISTD durante la preparación de cada muestra para el análisis cromatográfico. Este análisis se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Plus* (Palo Alto, CA, EE.UU.), cuyas características se describieron en la **Sección 2.2**.

El área del acetato de geranilo se comparó con el área del patrón interno. Haciendo la suposición de que la respuesta del detector del ISTD y de los compuestos es similar. La concentración del acetato de geranilo se determinó con la **Ecuación 3**.

$$C_x = \frac{C_A \times A_x}{A_A} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

C_x : Concentración del compuesto de interés (ppm);

C_A : Concentración del estándar interno (ppm);

A_x : Área del compuesto de interés (cuentas);

A_A: Área del estándar interno (cuentas).

2.4.4 Análisis estadístico y encaje de modelos polinómicos

Para el análisis estadístico de los resultados se empleó el programa MICROSOFT EXCEL 2010, con el cual se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y se utilizó el programa STATISTICAL DATA ANALYSIS R (versión 2.13.1 *Free Software Foundation, Inc.*, Boston, MA, USA) para hallar los modelos polinómicos con sus respectivos datos estadísticos. Para dichos análisis, se normalizaron los valores de los factores y del observable.

Se empleó el método de Yates para realizar el ANOVA con el fin de determinar cuáles factores o combinaciones de ellos, se debían tener en cuenta en los modelos polinómicos. Para ello, se usó el valor crítico del parámetro F para 1 y 2 grados de libertad, con un nivel de confianza de probabilidad de $P = 0,05$. Para determinar el modelo matemático que mejor se ajustó a las variables evaluadas, se compararon los R, R^2 ajustados, el error que el modelo no fue capaz de explicar (LOF) y la raíz cuadrada media del error de calibración (RMSEC).

Por medio de la matriz de datos de la superficie de respuesta, la cual se halló con la ecuación del modelo más factible, se seleccionaron los valores para cada variable en donde se observó mayor transformación del acetato de geranilo. Los valores se renormalizaron y aplicaron experimentalmente para corroborar el modelo obtenido. El procedimiento experimental para validar el modelo es el mismo descrito en la **sección 2.4**.

3 ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 RENDIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL DE PALMARROSA

El rendimiento del AE de *Cymbopogon martinii* o palmarrosa obtenidos de plantas cosechadas en el Complejo Agroindustrial CENIVAM, fue obtenido de la siguiente manera: se dividió el peso del AE obtenido sobre el peso de material vegetal (MV) introducido en el tanque o alambique de extracción. Para calcular el rendimiento, se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{W_{AE}}{W_{MV}} \times 100$$

Donde:

W_{AE} = Peso del aceite esencial (g); W_{MV} = Peso del material vegetal (g).

Se obtuvo 840 g de AE de la primera cosecha y 1580 g de AE de la segunda cosecha. Por lo tanto, los rendimientos de los AE obtenidos en las cosechas 1 y 2 fueron 0,42 y 0,43 % respectivamente.

3.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AE DE *Cymbopogon martinii*

En esta sección se muestran los resultados del análisis cromatográfico realizado para identificar y cuantificar los componentes principales presentes en el AE de *C. martinii*, procedimiento descrito en la **Sección 2.2**. En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se puede observar el perfil cromatográfico del AE de palmarrosa analizado por GC-MS

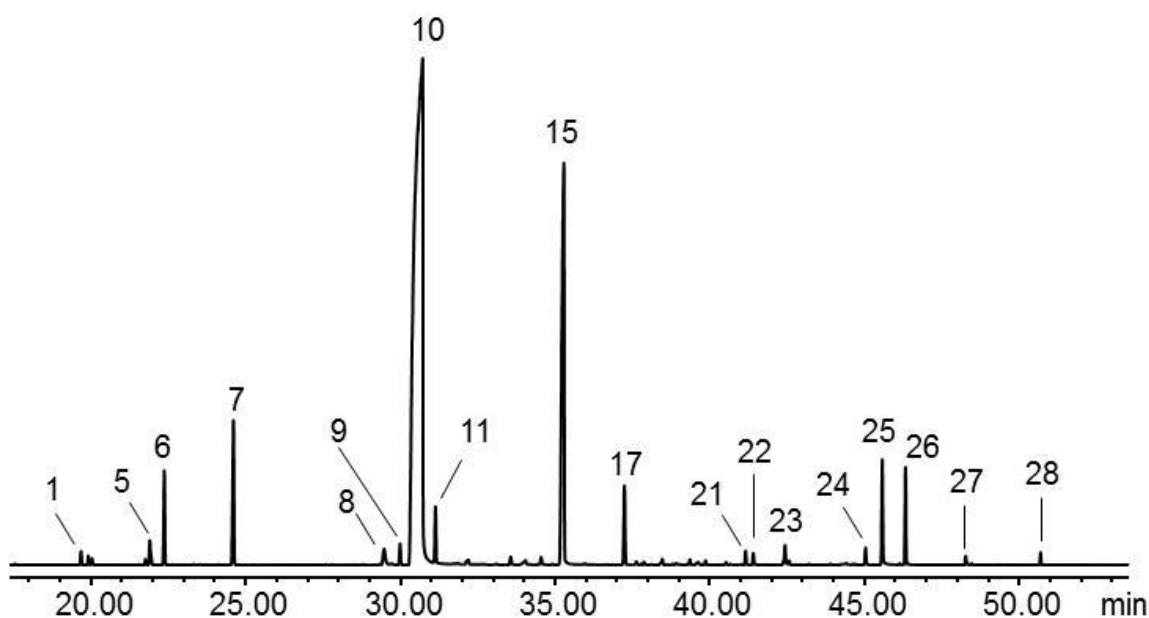


Figura 14. Perfil cromatográfico típico del AE de *C. martinii* obtenido por GC-MS. La identificación de los compuestos se reporta en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**

En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se registran los componentes típicos mayoritarios en el AE de *C. martinii* (palmarrosa). Se identificaron positivamente 25 compuestos (90 %) con cantidades relativas mayores del 0,03 %, de los cuales el linalol, geraniol y acetato de geranilo representan cerca del 95 % del AE de *C. martinii*.

Tabla 6. Identificación de los metabolitos secundarios volátiles de *Cymbopogon martinii* y sus correspondientes cantidades relativas (%).

| N° Pico ^a | Compuesto | I _k ^b | | Cantidad relativa, % ± s (n=2) ^c |
|----------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------|---|
| | | DB-5 | DB-WAX | |
| 1 | 6-Metil-5-hepten-2-ona | 984 | | 0,19 ± 0,07 |
| 2 | β-Mirceno | 989 | 1152 | 0,25 ± 0,07 |
| 3 | 2-Metil-6-heptenol | 992 | | 0,17 ± 0,01 |
| 4 | Limoneno | 1034 | 1183 | 0,08 ± 0,05 |
| 5 | <i>cis</i> -β-Ocimeno | 1037 | | 0,5 ± 0,1 |
| 6 | <i>trans</i> -β-Ocimeno | 1048 | 1256 | 1,6 ± 0,2 |
| 7 | Linalol | 1101 | 1540 | 3,2 ± 0,1 |
| 8 | Nerol | 1227 | | 0,723 ± 0,009 |
| 9 | Neral | 1241 | 1665 | 0,408 ± 0,005 |
| 10 | Geraniol | 1260 | 1840 | 70 ± 3 |
| 11 | Geranial | 1272 | 1720 | 1,20 ± 0,06 |
| 12 | Timol | 1300 | | 0,8 ± 0,9 |
| 13 | Carvacrol | 1336 | | 0,14 ± 0,06 |
| 14 | Ácido geránico | 1348 | | 0,21 ± 0,02 |
| 15 | Acetato de geranilo | 1361 | 1753 | 0,18 ± 0,01 |
| 16 | N.I. | 1379 | | 13 ± 4 |
| 17 | <i>trans</i> -β-Cariofileno | 1434 | 1595 | 1,67 ± 0,07 |

| | | | |
|----|-------------------------|------|-------------------|
| 18 | α -Guaieno | 1446 | 0,03 \pm 0,03 |
| 19 | α -Humuleno | 1470 | 0,18 \pm 0,02 |
| 20 | α -Selineno | 1496 | 0,13 \pm 0,01 |
| 21 | Butanoato de geranilo | 1556 | 0,27 \pm 0,01 |
| 22 | <i>trans</i> -Nerolidol | 1564 | 0,215 \pm 0,009 |
| 23 | Óxido de cariofileno | 1599 | 0,52 \pm 0,02 |
| 24 | N.I. | 1696 | 0,31 \pm 0,02 |

Continuación ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..

| | | | |
|----|---|------|-------------------|
| 25 | <i>cis,cis</i> -Farnesol | 1719 | 2,0 \pm 0,2 |
| 26 | <i>cis</i> -3,7-Dimetil propanoato-2,6-octadien-1-ol | 1750 | 1,58 \pm 0,02 |
| 27 | <i>cis,cis</i> -3,7,11-Trimetil acetato-2,6,10-dodecatrien-1-ol | 1833 | 0,187 \pm 0,008 |
| 28 | N.I. | 1945 | 0,23 \pm 0,04 |

^a Número de pico en la ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..

^b Índices de retención de Kováts determinados experimentalmente.

^c Promedio de dos extracciones independientes

La cuantificación del linalol, geraniol y acetato de geranilo identificados en el AE de palmarrosa se realizó por medio de curva de calibración interna (ver **ANEXO B: Tablas 22, 23, 24**). Las **Ecuaciones 4, 5 y 6** fueron obtenidas de las curvas de calibración para linalol, geraniol y acetato de geranilo respectivamente.

$$\text{Conc. linalool} = 1,08154 * \frac{\text{Área linalool} * \text{Conc. ISTD}}{\text{Área ISTD}} - 0,005115 \quad \text{Ecuación 4}$$

$$\text{Conc. geraniol} = 1,30262 * \frac{\text{Área geraniol} * \text{Conc. ISTD}}{\text{Área ISTD}} + 0,068904 \quad \text{Ecuación 5}$$

$$\text{Conc. acetato} = 1,44816 * \frac{\text{Área de acetato} * \text{Conc. ISTD}}{\text{Área ISTD}} + 0,0462073 \quad \text{Ecuación 6}$$

En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se reporta la cuantificación del linalol, geraniol y acetato de geranilo presentes en el AE de palmarrosa extraído de dos cosechas diferentes. Se puede ver que el geraniol (compuesto mayoritario) presenta un 83 % m/m. Estudios realizados en la India muestran que el AE extraído de la palmarrosa sembrada en ese país (linalol 1.5–3.2%, geraniol 79.7–85.8% y acetato de geranilo 4.5–10.3%) presenta una composición muy similar al nuestro (Rajeswara, 2005; Rajeswara y Rajput, 2011). Lo cual nos muestra que el AE de palmarrosa sembrado en Colombia es competitivo en el mercado internacional.

Tabla 7. Cuantificación del linalol, geraniol y acetato de geranilo contenidos en el AE de palmarrosa de las cosechas 1 y 2.

| AE palmarrosa | Geraniol, % m/m | A. geranilo, % m/m | Linalol, % m/m |
|---------------|-----------------|--------------------|----------------|
| Cosecha 1 | 81 ± 2,3 | 10,6 ± 0,5 | 1,5 ± 0,1 |
| Cosecha 2 | 83,5 ± 0,1 | 6,54 ± 0,01 | 1,4 ± 0,1 |

3.3 RECTIFICACIÓN DEL AE DE PALMARROSA

3.3.1 Estudios preliminares para la determinación de las temperaturas de trabajo (T1 y T2)

Con el fin de conocer todo el perfil de fraccionamiento del AE de *C. martinii*, es decir, determinar las temperaturas donde se presentan equilibrios térmicos y el número total de fracciones que se pueden obtener, se planteó la destilación fraccionada de acuerdo con el procedimiento descrito en la **Sección 2.3.2**. Las

condiciones de la destilación fraccionada (4, 6, 8, 10, 12 y 14 mmHg) del AE de palmarrosa se presentan en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..** Donde, se exponen el número de fracciones obtenidas y sus correspondientes temperaturas (T1 y T2) para cada presión. Los datos de composición relativa (GC-FID) de linalol, geraniol y acetato de geranilo presentes en cada una de las fracciones se pueden observar en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

El resultado de estas destilaciones proporcionó al menos 4 fracciones. Las fracciones caracterizadas por la presencia de compuestos terpénicos muy volátiles como *cis*- β -ocimeno, *trans*- β -ocimeno, linalol, entre otros, se rotularon como fracciones F1 y F2, las cuales correspondieron aproximadamente al 3 % de la masa de AE inicial. Las fracciones siguientes, donde se observó la presencia de compuestos mayoritarios como geraniol y acetato de geranilo se rotularon como fracciones F3 y F4 (fracción mayoritaria); éstas sumaron aproximadamente el 80% y las fracciones de fondo rotuladas como FF también ricas en geraniol, acetato de geranilo y otros compuestos más pesados como *trans*- β -cariofileno, nerolidol, óxido de cariofileno y farnesol, representaron el 15% del total de la masa del AE empleado. La pérdida de AE en todas las destilaciones fue alrededor de un 6 %.

En cada una de las destilaciones se observó que las fracciones F1, F2 y F3 (donde se obtuvo) presentaron equilibrios de temperatura marcados de al menos 15 minutos, razón por la cual se hacía necesario abrir la VR para separar cada fracción, a pesar de que sus masas no superaran el 2% del total del AE. De esta manera se podía continuar con la destilación, al separar una fracción y continuar con la separación de la siguiente. Esto se evidenciaba cuando había agotamiento del destilado en la zona de reflujo y se presentaba inmediatamente un aumento en la T2. El geraniol estuvo presente en casi todas las fracciones junto con el acetato de geranilo (excepto la F1), a su vez, se puede notar que la concentración de los compuestos en las fracciones (F1, F2, F3 y F4) superan los valores de la

composición del AE de partida. La composición química de la fracción F4 muestra un enriquecimiento del geraniol (86 - 92%). La composición de la FF presenta un contenido en geraniol mayor del 50%.

Las temperaturas de equilibrio (T2) observadas para obtener las fracciones F4 alcanzaron los valores predichos por la ecuación de Antoine a las presiones de 6, 8, 10, 12 y 14 mmHg para geraniol y a 4 mmHg para acetato de geraniol, de acuerdo con lo reportado en la literatura (Yaws *et al*, 2009). Las temperaturas T1 a 4, 6, 8, 10, 12 mmHg estuvieron dentro de las temperaturas de trabajo aceptadas, mientras que la T1 a 14 mmHg fue mayor de 130 °C, motivo por el cual dicha presión se descartó para los siguientes estudios, ya que se podría tener descomposición del AE.

Tabla 8. Condiciones experimentales de las destilaciones fraccionadas a 4, 6, 8, 10, 12 y 14 mmHg para determinar las temperaturas de trabajo.

| Fracción | Masa de fracción (g) | Fracción, % | Temperatura de fondo T1 (°C) | Temperatura en columna T2 (°C) | Masa AE inicial (g) | Pérdida de AE (g) |
|----------------|----------------------|-------------|------------------------------|--------------------------------|---------------------|-------------------|
| Presión 4 mmHg | | | | | | |
| 1 | 0,13 | 0,8 | 112 ± 1 | 53 ± 2 | 15,8 ± 0,4 | 1,29 ± 0,02 |
| | 0,08 | 0,5 | | | | |
| 2 | 0,31 | 2,0 | 112 ± 3 | 63 ± 3 | | |
| | 0,22 | 1,4 | | | | |
| 3 | 6,41 | 41,4 | 115 ± 2 | 99 ± 1 | | |
| | 3,40 | 21,1 | | | | |
| 4 | 6,57 | 42,4 | 116,5 ± 0,7 | 105 ± 1 | | |
| | 9,90 | 61,5 | | | | |
| Fondo | 0,80 | 5,2 | - | - | | |
| | 1,20 | 7,5 | | | | |
| Presión 6 mmHg | | | | | | |
| 1 | 0,34 | 2,2 | 113,5 ± 0,7 | 56 ± 6 | 16 ± 1 | 1 ± 1 |
| | 0,05 | 0,3 | | | | |

| | | | | | | |
|-----------------|----------------|--------------|-------------|-------------|--------------|-------------|
| 2 | 0,39 0,16 | 2,6 0,9 | 114 | 65 ± 3 | | |
| 3 | 0,14 0,22 | 0,9 1,3 | 115,3 ± 0,6 | 87 ± 5 | | |
| 4 | 11,50 12,73 | 76,1 75,3 | 115,7 ± 0,6 | 100 ± 1 | | |
| Fondo | 2,18 2,36 | 14,4 14,0 | - | - | | |
| Presión 8 mmHg | | | | | | |
| 1 | 0,34 0,43 | 2,2 2,8 | 119,5 ± 0,7 | 64 ± 4 | | |
| 2 | 0,96 1,26 | 6,3 8,2 | 120 | 85 ± 2 | | |
| 3 | 8,96 10,41 | 58,7 67,7 | 120,5 ± 0,7 | 106 ± 1 | 15,32 ± 0,08 | 1,1 ± 0,9 |
| 4 | No se obtuvo | | | | | |
| Fondo | 3,26 2,81 | 21,4 18,3 | - | - | | |
| Presión 10 mmHg | | | | | | |
| 1 | 0,06 0,16 | 0,4 1,1 | 120,5 ± 0,7 | 55,5 ± 0,7 | | |
| 2 | 0,23 0,41 | 1,4 2,7 | 123 | 81 ± 4 | | |
| 3 | 7,37 12,57 | 46,1 83,3 | 124 ± 1 | 109 ± 1 | 15,5 ± 0,6 | 0,7 ± 0,3 |
| 4 | No se obtuvo | | | | | |
| Fondo | 7,42 1,53 | 46,5 10,1 | - | - | | |
| Presión 12 mmHg | | | | | | |
| 1 | 0,23 0,14 | 1,5 0,9 | 130,5 ± 0,7 | 70 ± 2 | | |
| 2 | 0,51 0,43 | 3,4 2,8 | 129 ± 1 | 87 ± 4 | | |
| 3 | 12,56 12,64 | 83,6 81,7 | 129,5 ± 0,7 | 114,8 ± 0,9 | 15,3 ± 0,3 | 0,44 ± 0,06 |
| 4 | No se obtuvo | | | | | |
| Fondo | 1,25 1,86 | 8,3 12,0 | - | - | | |
| Presión 14 mmHg | | | | | | |

| | | | | | | |
|-------|----------------|--------------|--------------|---------|------------|-----------|
| 1 | 0,22 0,11 | 1,4 0,7 | 131,5 ± 0,7 | 76 ± 3 | | |
| 2 | 0,37 0,45 | 2,3 2,9 | 132,7 ± 0,6 | 94 ± 3 | | |
| 3 | 12,55 11,89 | 77,3 75,4 | 134 | 116 ± 1 | 16,0 ± 0,3 | 0,7 ± 0,3 |
| 4 | | | No se obtuvo | | | |
| Fondo | 2,14 2,78 | 13,2 17,6 | - | - | | |

Tabla 9. Porcentajes de áreas relativas de linalol, geraniol y acetato de geranilo presentes en las fracciones obtenidas en los estudios preliminares en el rango de presiones de 4, a 14 mmHg halladas por GC-FID.

| Compuesto | I _R | Cantidad relativa (%) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|----------------|-----------------------|----------------|-----|-----|-----|-----|----------------|-----|-----|-----|-----|----------------|-----|-----|-----|-----------------|-----|-----|------|-----------------|-----|-----|-----|-----------------|-----|-----|-----|--|
| | | AE | Presión 4 mmHg | | | | | Presión 6 mmHg | | | | | Presión 8 mmHg | | | | Presión 10 mmHg | | | | Presión 12 mmHg | | | | Presión 14 mmHg | | | | |
| | | | F1 | F2 | F3 | F4 | FF | F1 | F2 | F3 | F4 | FF | F1 | F2 | F3 | FF | F1 | F2 | F3 | FF | F1 | F2 | F3 | FF | F1 | F2 | F3 | FF | |
| 6-metil,5-hepten -2-ona | 984 | 0,2 | 4,1 | 0,9 | - | - | - | 1,6 | 2,2 | 0,7 | - | - | 0,9 | - | - | - | 8,4 | 1,2 | - | - | 1,6 | 1,9 | - | - | 0,8 | 0,8 | - | - | |
| mirceno | 989 | 0,4 | 5,6 | 1,2 | 0,3 | 0,2 | - | 1,8 | 2,2 | 1,0 | 0,2 | 0,3 | 1,0 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 8,9 | 1,5 | 0,2 | 0,2 | 2,3 | 1,9 | 0,2 | 0,1 | 1,8 | 1,5 | 0,2 | 0,2 | |
| limoneno | 1033 | 0,1 | 1,0 | 0,2 | - | - | - | 0,6 | 0,8 | 0,3 | - | - | 0,2 | - | - | - | 3,2 | 0,4 | - | - | 0,3 | 0,4 | - | - | 0,2 | 0,2 | 0,1 | - | |
| cis-β-ocimeno | 1036 | 0,5 | 9,4 | 1,8 | - | - | - | 3,7 | 1,4 | 1,9 | - | - | 1,7 | 0,1 | 0,1 | - | 5,8 | 2,7 | 0,1 | - | 0,9 | 1,3 | 0,1 | - | 0,5 | 0,6 | - | - | |
| trans-β-ocimeno | 1047 | 1,6 | 32 | 5,9 | 0,3 | 0,1 | - | 11 | 13 | 5,8 | 0,2 | 0,1 | 5,5 | 0,4 | 0,2 | - | 43 | 10 | 0,4 | - | 6,7 | 5,9 | 0,2 | - | 3,3 | 3,6 | 0,2 | - | |
| linalol | 1100 | 2,3 | 43 | 52 | 1,6 | - | - | 24 | 14 | 23 | 1,5 | - | 37 | 4,2 | 0,3 | - | 0,7 | 71 | 1,8 | - | 65 | 39 | 0,5 | - | 34 | 38 | 0,9 | - | |
| nerol | 1228 | 0,3 | 0,5 | 0,6 | 0,5 | - | - | 0,3 | 0,2 | 0,6 | 0,3 | - | 0,6 | 0,4 | 0,3 | - | 0,2 | 0,1 | 0,5 | - | 0,2 | 0,7 | 0,3 | - | 0,2 | 0,4 | 0,4 | - | |
| neral | 1240 | 0,2 | 0,4 | 4,5 | 0,5 | - | 0,4 | 0,7 | 0,3 | 1,2 | 0,1 | 0,1 | 2,8 | 0,4 | 0,1 | - | - | 0,3 | 0,3 | - | 1,0 | 1,8 | 0,1 | 0,3 | 0,2 | 1,5 | 0,1 | 0,3 | |
| geraniol | 1253 | 83 | - | 18 | 86 | 92 | 52 | 50 | 57 | 56 | 88 | 77 | 39 | 83 | 88 | 87 | 15 | 9,0 | 86 | 90 | 13 | 33 | 88 | 56 | 51 | 44 | 88 | 62 | |
| geranial | 1269 | 0,2 | - | 3,9 | - | - | 0,8 | 0,6 | 0,5 | 0,8 | 0,1 | 0,2 | 1,8 | 0,4 | 0,1 | - | - | 0,3 | 0,2 | - | 0,9 | 2,1 | 0,2 | 0,9 | 0,9 | 1,2 | 0,2 | 0,6 | |
| acetato de geranilo | 1378 | 9,6 | - | 1,2 | 9,7 | 7,8 | 3,2 | 3,8 | 4,9 | 4,8 | 8,8 | 8,1 | 3,1 | 8,4 | 9,5 | 10 | 1,0 | 0,6 | 8,5 | 9,0 | 0,9 | 2,8 | 9,4 | 0,1 | 5,3 | 4,0 | 9,0 | 12 | |
| trans-β-cariofileno | 1434 | 0,8 | - | 6,0 | 1,5 | - | 0,4 | 1,4 | 0,7 | 3,1 | 0,9 | 0,1 | 4,8 | 1,7 | 0,8 | 0,2 | 0,2 | 0,7 | 1,5 | 0,1 | 1,7 | 3,4 | 0,8 | 0,1 | 0,4 | 1,5 | 0,9 | - | |
| butanoato de geranilo | 1555 | 0,04 | - | - | - | - | 2,1 | - | - | - | - | 0,6 | - | - | - | 0,3 | - | - | - | 0,04 | - | 0,1 | - | 1,1 | - | - | - | 0,8 | |
| óxido de cariofileno | 1598 | 0,1 | - | - | - | - | 3,6 | - | - | - | - | 1,0 | - | - | - | 0,3 | - | - | - | 0,05 | - | - | - | 0,1 | - | - | - | 0,1 | |

3.3.2 Determinación de la presión de trabajo

De acuerdo con los resultados obtenidos en la **Sección 4.2.1** se procedió a determinar una presión de trabajo con el objetivo de obtener un AE de palmarrosa de composición química reproducible, con el mayor contenido de geraniol posible. Para ello, se trabajó a las presiones de 4,8 y 12 mmHg. Las condiciones de la destilación fraccionada de esta sección se presentan en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..** Los datos de composición porcentual en masa halladas por GC-FID de linalol, geraniol y acetato de geraniol presentes en cada una de las fracciones se pueden observar en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..** Las curvas de calibración se pueden observar en el **ANEXO B**. La cuantificación se realizó con las **Ecuaciones 4, 5 y 6**.

Se separaron las fracciones más volátiles (F1, F2, F3) del AE, pese a que no tuvieron una composición química reproducible. Esto permitió una fracción FF sin la presencia de compuestos como *trans*- β -ocimeno y linalol, con el mayor contenido de geraniol posible de composición química reproducible. Como resultado de estas destilaciones se obtuvieron 4 fracciones a 4 y 8 mmHg, mientras que a 12 mmHg se obtuvieron 5 fracciones incluyendo las fracciones FF. Las fracciones F1, F2 y F3 presentaron una composición química similar a la descrita en la **Sección 4.2.1**.

De los resultados de cuantificación (ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) se puede observar que las fracciones FF mantienen una composición química reproducible. Así mismo, los mejores resultados con base en el contenido de geraniol (88-86%), se consiguieron cuando se trabajó a una presión de 12 mmHg

Tabla 10. Condiciones experimentales de la destilación fraccionada a 4, 8, 12 mmHg para determinar la presión de trabajo.

| Fracción | Masa de fracción (g) | Fracción (%) | Temperatura de fondo T1 (°C) | Temperatura en columna T2 (°C) | Masa AE inicial (g) | Pérdida de AE (g) |
|-----------------|----------------------|--------------|------------------------------|--------------------------------|---------------------|-------------------|
| Presión 4 mmHg | | | | | | |
| 1 | 0,03 ± 0,01 | 0,2 ± 0,1 | 115 ± 4 | 48 ± 2 | 16,03 ± 0,00 | 1,03 ± 0,01 |
| 2 | 0,18 ± 0,06 | 1,0 ± 0,3 | 116,5 ± 0,7 | 62 ± 2 | | |
| 3 | 0,3 | 2,06 | 117 | 74 | | |
| 4 | No se obtuvo | | | | | |
| Fondo | 14,0 ± 0,3 | 91 ± 2 | - | - | | |
| Presión 8 mmHg | | | | | | |
| 1 | 0,19 ± 0,06 | 1,2 ± 0,4 | 124,5 ± 0,7 | 64 ± 3 | 16,03 ± 0,00 | 0,8 ± 0,3 |
| 2 | 0,4 ± 0,11 | 2,5 ± 0,7 | 124,5 ± 0,7 | 74 ± 3 | | |
| 3 | 0,66 ± 0,014 | 4,1 ± 0,1 | 123 ± 2 | 85 ± 2 | | |
| 4 | No se obtuvo | | | | | |
| Fondo | 13,9 ± 0,37 | 87 ± 2,3 | - | - | | |
| Presión 12 mmHg | | | | | | |
| 1 | 0,09 ± 0,01 | 0,59 ± 0,04 | 130,5 ± 0,7 | 67 ± 3 | 16,03 ± 0,01 | 0,8 ± 0,4 |
| 2 | 0,18 ± 0,02 | 1,1 ± 0,1 | 130,5 ± 0,7 | 76 ± 2 | | |
| 3 | 0,4 ± 0,2 | 3 ± 1,1 | 130 ± 0,0 | 87,5 ± 0,7 | | |
| 4 | 0,3 ± 0,1 | 2,1 ± 0,7 | 130 ± 0,0 | 97 ± 2 | | |
| Fondo | 14,2 ± 0,1 | 88,7 ± 0,6 | - | - | | |

Tabla 11. Composición porcentual (% m/m) del linalol, geraniol y acetato de geraniol presentes en cada una de las fracciones obtenidas a 4, 8, 12 mmHg halladas por GC-FID.

| Fracción | Linalol, % | Geraniol, % | Acetato de geraniol, % |
|------------------------|------------|-------------|------------------------|
| Presión 4 mmHg | | | |
| 1 | 78,7 | 13,9 | - |
| | 15,7 | 10,5 | - |
| 2 | 25,6 | 19 | - |
| | 41,7 | 30 | - |
| 3 | 21,5 | 62,2 | - |
| Fondo | < 1,2 | 83,4 | 10,8 |
| | < 1,2 | 84,7 | 10,9 |
| Presión 8 mmHg | | | |
| 1 | 12,6 | 6,6 | - |
| | 51,1 | 26,3 | - |
| 2 | 23,9 | 66,9 | - |
| | 18,2 | 66,6 | - |
| 3 | 5,2 | 66,5 | - |
| | 8,2 | 66,9 | - |
| Fondo | < 1,2 | 85,1 | 11,2 |
| | < 1,2 | 84,4 | 11,1 |
| Presión 12 mmHg | | | |
| 1 | 15,8 | 1,1 | - |
| | 25,6 | 6,1 | - |
| 2 | 52,2 | 3 | - |
| | 46,3 | 2,5 | - |
| 3 | 21,8 | 51,6 | - |
| | 27,8 | 58,5 | - |
| 4 | 12,8 | 70,5 | - |
| | 13,7 | 69,2 | - |
| Fondo | < 1,2 | 86,5 | 11,4 |
| | < 1,2 | 88,1 | 11,5 |

3.3.3 Estudios de precisión intermedia de la destilación fraccionada del AE de palmarrosa

Una vez obtenidos los resultados de la **Sección 3.3.2**, se destilaron los AE de palmarrosa extraídos de las cosechas 1 y 2 a la presión de 12 mmHg en días y con operadores diferentes. En estos estudios sólo se tuvieron en cuenta las fracciones FF ya que fueron estas las que presentaron una composición química reproducible (ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). De esta manera se presenta una fracción con un contenido de geraniol del 86-88 % cuya composición química es reproducible. Por tal razón, se cumple el objetivo de obtener una fracción rectificada enriquecida en geraniol (un 6 % más que el AE de partida) por medio del procedimiento propuesto en este estudio

Tabla 12. Cuantificación de las fracciones FF obtenidas a 12 mmHg del AE de palmarrosa de las cosechas 1 y 2.

| AE palmarrosa | Geraniol, % | A. geraniol, % | Linalol, % |
|---------------|-------------|----------------|------------|
| Cosecha 2 | 87,2 ± 0,7 | 6,9 ± 0,1 | < 1,2 |
| Cosecha 1 | 86,1 ± 0,3 | 10,4 ± 0,1 | < 1,2 |

3.4 ANÁLISIS DE LA HIDRÓLISIS BÁSICA DEL ACETATO DE GERANILO

Se realizaron varias reacciones de prueba siguiendo el procedimiento descrito en la **Sección 2.4**, para hallar los niveles de los factores a usar en el diseño experimental, obteniéndose concentraciones de acetato de geraniol entre 100 y 900 ppm.

3.4.1 Determinación del tiempo de reacción

Como últimas pruebas preliminares se determinó el tiempo de reacción siguiendo el procedimiento descrito en la **Sección 2.4**. En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se puede observar la transformación del acetato de geranilo al transcurrir el tiempo. En ella se puede ver que la mayor transformación ocurrió a los 90 minutos. Por lo cual, fue el tiempo que se midió para todos los experimentos del diseño experimental.

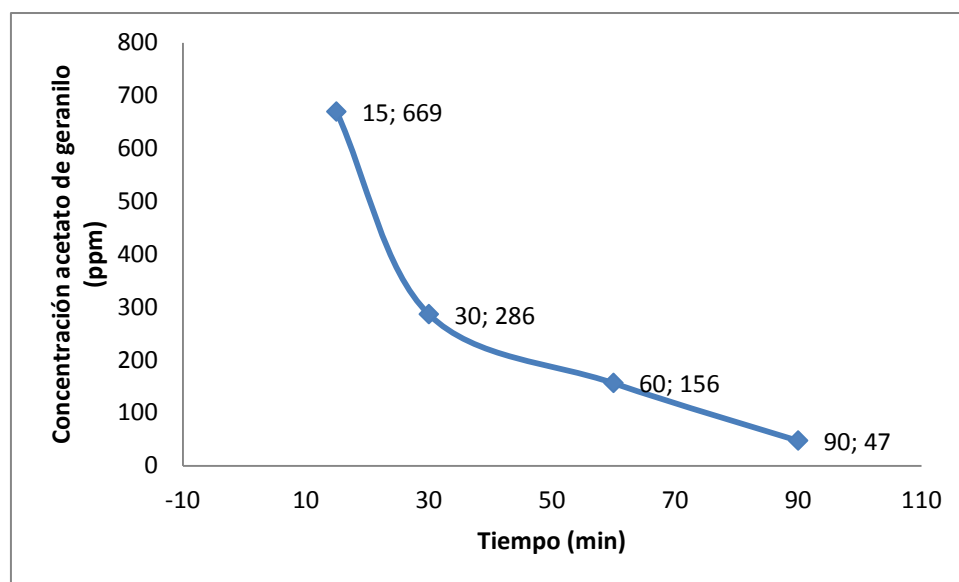


Figura 15. Transformación del acetato de geranilo presente en el AE de palmarrosa a través del tiempo

3.4.2 Diseño experimental

Se realizaron las reacciones correspondientes a los experimentos propuestos en la **Sección 2.4.2** de acuerdo con el procedimiento descrito en la **Sección 2.4**. En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se presenta la

concentración del acetato de geranilo presente en el AE de palmarrosa para cada uno de los experimentos, dicha cuantificación se realizó llevando a cabo el proceso descrito en la **Sección 2.4.3**.

Tabla 13. Concentraciones del acetato de geranilo (g AG/mL AE), obtenidas en los diferentes experimentos correspondientes al diseño central compuesto.

| # Exp | Relación BASE (mL) : AE (g) | Concentración base (M) | Respuesta (g AG / mL AE) |
|-------|--------------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| 1 | 1,50 | 0,0625 | 0,051 |
| 2 | 1,50 | 0,250 | 0,035 |
| 3 | 5,50 | 0,0625 | 0,031 |
| 4 | 5,50 | 0,250 | 0,009 |
| 5 | 3,50 | 0,0312 | 0,038 |
| 6 | 3,50 | 0,500 | 0,006 |
| 7 | 0,50 | 0,125 | 0,044 |
| 8 | 6,50 | 0,125 | 0,026 |
| 9 | 3,50 | 0,125 | 0,028 |
| 10 | 3,50 | 0,125 | 0,031 |
| 11 | 3,50 | 0,125 | 0,029 |

3.4.3 Análisis estadístico y encaje de modelos polinómicos

El análisis de varianza ANOVA (ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) para el observable calculado, permitió evaluar estadísticamente la significancia de las variables bajo estudio. El valor crítico del parámetro F para 1 y 2 grados de libertad con un nivel de probabilidad $P = 0,05$, fue de 18,5.

Tabla 14. Anova del diseño experimental central compuesto implementado en el estudio de hidrólisis básica del acetato de geranilo presente en el AE de palmarrosa.

| Fuente de variación | Sumas de cuadrados | Grados de libertad | Cuadrados medios | F _o | Efecto |
|------------------------|--------------------|--------------------|------------------|----------------|--------|
| BASE (mL) : AE (g) | 0,1730 | 1 | 0,1730 | 205,8 | SI |
| Concentración Base (M) | 0,2742 | 1 | 0,2742 | 326,3 | SI |
| Interacción | 0,0060 | 1 | 0,0060 | 7,2 | NO |
| Error | 0,0017 | 2 | 0,0008 | | |
| Total | 0,4549 | 5 | | | |

De la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se concluye que solamente la relación entre el volumen de la base y la masa del AE y la concentración de la base resultaron significativas.

Tabla 15. Ecuaciones obtenidas en el proceso de optimización del proceso de la hidrólisis básica de acetato de geranilo.

| Nº | Ecuación | R | R ² | LOF | RMSEC |
|----|---|------|----------------|------|-------|
| 1 | $Y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2$ | 0,91 | 0,89 | 0,08 | 0,10 |
| 2 | $Y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_1^2 + \beta_4X_2^2$ | 0,95 | 0,91 | 0,05 | 0,090 |
| 3 | $Y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_1^2 + \beta_4X_2^2 + \beta_5X_1^3 + \beta_6X_2^3$ | 0,98 | 0,96 | 0,01 | 0,063 |
| 4 | $Y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_1^2 + \beta_4X_2^2 + \beta_5X_1^3$ | 0,98 | 0,96 | 0,01 | 0,056 |

$$5 \quad Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_1^2 + \beta_4 X_2^2 + \beta_5 X_2^3 \quad 0,95 \quad 0,89 \quad 0,05 \quad 0,098$$

$\beta_0 =$ intercepto; $X_1 =$ Base (mL) : AE (g); $X_2 =$ Concentración Base (M)

En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se presentan las ecuaciones evaluadas en la optimización del proceso de la hidrólisis básica del acetato de geranilo presente en el AE de palmarrosa, así como los valores de R^2 estadístico ajustado, el error propio del modelo LOF (*Lack of fit*, falta de ajuste) y RMSEC (*Root mean square of error calibration*, error medio de calibración) calculados.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la evaluación del modelo polinómico para la optimización del proceso de la hidrólisis básica de acetato de geranilo, la **ecuación N° 4** presentó los valores estadísticos más ajustados, es decir, el mayor valor para el término R^2 , y los valores más pequeños tanto para el término LOF como para el RMSEC. La **ecuación N° 4** se validó con valores diferentes a los descritos en el diseño experimental, con la finalidad de corroborar el modelo obtenido. En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se presentan los niveles evaluados, las respuestas experimentales y calculadas por el modelo matemático planteado.

Tabla 16. Datos de validación del modelo matemático obtenido para la hidrólisis básica del acetato de geranilo.

| $Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_1^2 + \beta_4 X_2^2 + \beta_5 X_1^3$ | | | | |
|---|------------------------------------|--|---|-----------|
| X_1 Base : AE (mL/g) | X_2 Concentración Base (M) | Respuesta experimental (g acetato/mL AE) | Respuesta calculada (g acetato/mL AE) | Error (%) |
| 2,5 | 0,3 | 0,02328 | 0,02423 | 4 |
| 2,5 | 0,3 | 0,02285 | 0,02423 | 6 |
| 5,3 | 0,3 | 0,00568 | 0,00555 | 2 |
| 5,3 | 0,3 | 0,00589 | 0,00555 | 6 |

| | | | | |
|-----|------|---------|---------|---|
| 3,5 | 0,45 | 0,00782 | 0,00755 | 4 |
| 3,5 | 0,45 | 0,00809 | 0,00755 | 7 |

En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se presentan los coeficientes obtenidos para las variables descritas en la **Ecuación N° 4**, necesarios para encontrar las condiciones óptimas de la hidrólisis básica del acetato de geranilo.

Tabla 17. Coeficientes de la ecuación polinómica ajustada al modelo matemático para las variables relación de Base (mL) : AE (g) y concentración de la base (M), en el proceso de la hidrólisis básica del acetato de geranilo.

| Variable | Coeficiente |
|-----------------------------------|-------------|
| Intercepto | 1,1008 |
| $X_1 = \text{Base : AE}$ | 0,3415 |
| $X_2 = \text{Concentración Base}$ | -1,2028 |
| X_1^2 | -3,4325 |
| X_2^2 | 0,4569 |
| X_1^3 | 2,6773 |

Los valores óptimos encontrados para cada variable se pueden observar en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

Tabla 18. Valores óptimos de las variables empleadas en el proceso de la hidrólisis básica del acetato de geranilo presente en el AE de palmarrosa.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_1^2 + \beta_4 X_2^2 + \beta_5 X_1^3$$

| Base : AE (mL/g) | Concentración Base (M) | Respuesta experimental, (% g acetato/mL AE) | Respuesta calculada, (% g acetato/mL AE) | Error, % |
|---------------------|---------------------------|---|--|----------|
| 5,9 | 0,45 | 0,22 | 0,20 | 10 |

En la **Figura 16** se comparan los perfiles cromatográficos del AE de palmarrosa antes y después de la transformación del acetato de geranilo. El Cromatograma A corresponde al AE hidrolizado en el experimento N° 6 del diseño experimental.

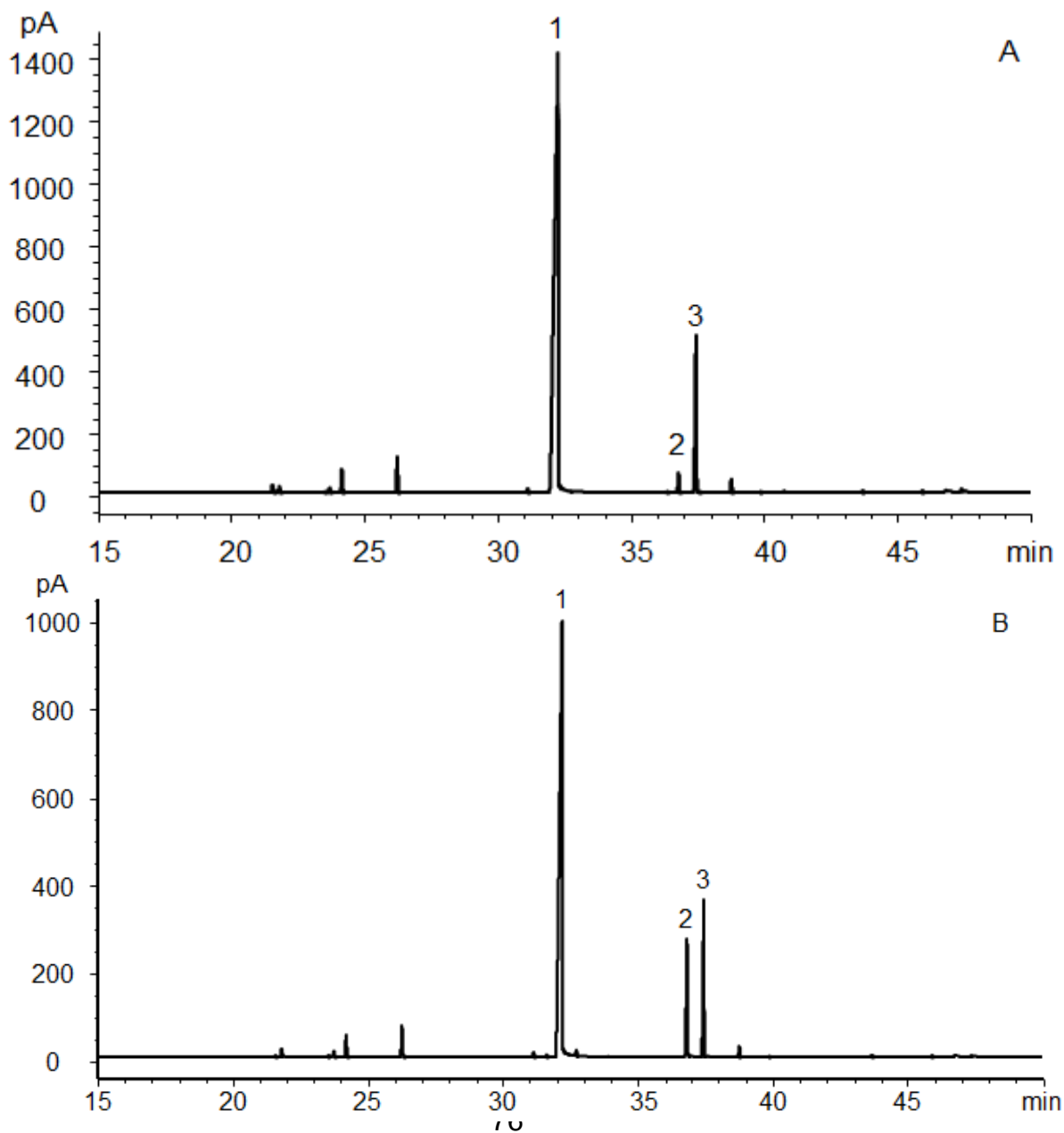


Figura 16. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC-FID de: (A) AE de palmarrosa transformado del experimento N° 6 y (B) AE de palmarrosa crudo; 1 Geraniol, 2 acetato de geranilo, 3 ISTD.

El procedimiento de la hidrólisis básica del acetato de geranilo presente en el aceite esencial de palmarrosa permite reducir a dicho éster hasta un 0,2%, en el punto de máxima transformación realizado en la validación del diseño experimental. De esta manera, se produce un aumento en la concentración del geraniol presente en el aceite esencial hasta de un 91%.

4 CONCLUSIONES

- Se determinaron los rendimientos de los AE en cada una de las cosechas los cuales fueron 0,42 para la cosecha 1 y 0,43 para la cosecha 2.
- Se caracterizaron los dos AE de *C. martinii* empleados en este trabajo, en los cuales se identificaron positivamente 25 compuestos (90%) por GC-MS. Los componentes principales fueron *cis*- β -ocimeno (ca. 0,5%), *trans*- β -ocimeno (ca. 1,6%), linalol (ca. 2,3%), geraniol (ca. 83%) y acetato de geranilo (ca. 9,6%). Estos compuestos constituyen el 96 % del AE. La variación en la concentración de estos componentes no fue significativa, exceptuando al acetato de geranilo, debido probablemente a la diferencia de madurez de las plantas en cada cosecha.
- La destilación fraccionada del AE de *C. martinii* se realizó en un equipo *B/R Instrument 800 – High Efficiency Micro Distillation* el cual posee una columna de destilación (*spinning band column*) al vacío con 30 etapas, lo que permitió la obtención de cuatro fracciones principales y el residuo o fondo. La primera (67 °C) se caracterizó por *cis*- β -ocimeno (ca. 13%), *trans*- β -ocimeno (ca. 44%) y linalol (ca. 21%), el segundo grupo (76 °C) estuvo dominado por *trans*- β -ocimeno (ca. 24%), linalol (ca. 49%), el tercer grupo (87 °C) se caracterizó por linalol (ca. 25%) y geraniol (ca. 55%), la cuarta fracción (97 °C) constituida por linalol (ca. 13%), geraniol (ca. 70%) y la presencia de compuestos un poco más pesados como acetato de geranilo (ca. 9%) y *trans*- β -cariofileno (ca. 6%). La fracción de fondo presenta principalmente los compuestos geraniol (ca. 87%) y

acetato de geranilo (ca. 11%). La fracción de fondo rectificada que presentó el mayor contenido de geraniol (86-87%) de composición química reproducible fue obtenida a la presión de 12 mmHg y a una temperatura de calentamiento (T1) de 130 °C.

- El desarrollo del diseño experimental planteado para la hidrólisis básica mostró que la variable $X_1 = \text{Base (mL)} / \text{AE (g)}$ y la variable $X_2 = [\text{Base}] \text{ (M)}$ fueron significativas en la disminución de la concentración del acetato de geranilo para su transformación a geraniol. Los valores óptimos para la variable X_1 y X_2 fueron respectivamente 5,9 mL base/g AE y 0,45 M. El punto de mayor transformación se determinó a partir de la ecuación $Y = 1,10 + 0,34X_1 - 1,20X_2 - 3,43X_1^2 + 0,46X_2^2 + 2,68X_1^3$. El porcentaje de conversión para este compuesto varía entre 96-98%.
- Se puede concluir que aplicar solamente el procedimiento de rectificación al aceite esencial no es rentable si se desea llevar el procedimiento a escala piloto e industrial, debido a que la concentración máxima posible para el geraniol, hallada por medio de este procedimiento, es tan solo de un 5%. Sin embargo, aplicar el proceso de hidrólisis básica y luego rectificar el AE de palmarrosa aumentaría la concentración del geraniol entre un 96 a un 98%, procedimiento que es más viable desde el punto de vista económico.

5 RECOMENDACIONES

- Continuar con los estudios de destilación fraccionada del AE de palmarrosa a escala piloto, para separar los compuestos acetato de geranilo y geraniol que permitan aumentar la pureza de este último
- Realizar estudios experimentales de la destilación fraccionada del AE de palmarrosa donde se compare la cantidad de masa destilada Vs. composición a través del tiempo.
- Proseguir con el estudio de la hidrólisis básica del acetato de geranilo, empleando reactivos y catalizadores de bajo impacto ambiental, que permita a su vez hacer el proceso económicamente viable y sostenible.

6 BIBLIOGRAFÍA

AGGARWAL, K.K., NAQVI, A.A. and KAHOL, A.P. Production of geraniol from palmarosa oil of *Cymbopogon martinii* stapf. var. motia. Res. Ind., **1986**, 31, pp. 132-135.

ANSARI, M. and RAZDAN, R. Relative efficacy of various oils in repelling mosquitoes. *Indian J. Malariol*, **1995**, 32, pp. 104–111.

BAKER, R. H., BARKENBUS, C., and ROSWELL, C. A. A large spinning-band fractionating column. For use with small quantities of liquids. *Ind. Eng. Chem.*, **1940**, 12, pp. 468-471.

BANDONI, A. (Ed.). Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Red de Editoriales Universitarias: La Plata, **2000**, pp. 29-30.

BARATTA, M., DORMAN, H., DEANS, S., FIGUEIREDO, A., BARROSO, J. and RUBERTO, G. Antimicrobial and antioxidant properties of some comercial essential oils. *Flavour Fragr. J.*, **1998**, 13, pp. 235-244.

BARD, M. A., ALBRECHT, M. R., GUPTA, N., GUYNN, C. J. and STILLWELL, W. Geraniol interferes with membrane functions in strains of *Candida* and *Saccharomyces*. *Lipids*, **1988**, 23, pp. 534–538.

BAUER, K., GARBE, D. and SURBURG, H. Common Fragrance and Flavour Materials: Preparation, Properties and Uses. 2nd ed. VHC Verlagsgesellschaft: New York, USA, **1990**, pp. 2-35.

BAXTER, R. L., LAURIE, W. A. and McHALE, D. Transformations of monoterpenoids in aqueous acids. The reactions of linalool, geraniol, nerol and their acetates in aqueous citric acid. *Tetrahedron*, **1978**, 34, pp. 2195-2199.

BENETI, S. C., ROSSET, E., CORAZZA, M. L., FRIZZO, C. D., DI LUCCIO, M. and OLIVEIRA, J. V. Fractionation of citronella (*Cymbopogon winterianus*) essential oil and concentrated orange oil phase by batch vacuum distillation. *J. Food Eng.*, **2011**, 102, pp. 348–354.

BULLETIN ESSENTIAL OILS AND OLEORESINS. Market news service. Fecha de consulta: agosto 08 de 2011. Versión en línea disponible en: http://www.fantastic-flavour.com/yahoo_site_admin/assets/docs/oleoresinandessentialoils.240184438.pdf.

CASABIANCA, H., GRAFF, J.B., FAUGIER, V., FLEIG, F. and GRENIER, C. Enantiomeric distribution studies of linalool and linalyl acetate. A powerful tool for authenticity control of essential oils. *J. High. Res. Chrom.*, **1997**, 21, pp. 107-112.

CASTILLO H., G. A., GARCÍA F., J. A. and ESTARRÓN E., M. Extraction method that enriches phenolic content in oregano (*Lippia graveolens* H.B.K.) essential oil. *J. Food Process. Eng.*, **2007**, 30, pp. 661–669.

CHEN, W. V. and VILJOEN, A.M. Geraniol - A review of a commercially important fragrance material. *South African. J. Bot.*, **2010**, 76, pp. 643-651.

DASS., C. Fundamentals of contemporary mass spectrometry. John Wiley & Sons, Inc.: New Jersey, USA, **2007**, pp. 3-19.

DE HOFFMANN, E. and STROOBANT, V. Mass Spectrometry: Principles and Applications. John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester,UK, **2007**, pp.1-10.

DELESPAUL, Q., DE BILLERBECK, V., and ROQUES, C. A. The antifungal activity of essential oils as determined by different screening methods. *J. Essent. Oil Res.*, **2000**, 12, pp. 256–266.

DUBEY, V. L. and LUTHRA, R. Identification of an esterase as the key enzyme involved in geraniol formation in palmarosa inflorescence. Abstract in National Conference on Plant Biotechnology: Towards Strategic Agriculture and Drug Development held at CIMAP, **1999**, pp. 112-113.

DUBEY, V. L. and LUTHRA, R. Biotransformation of geranyl acetate to geraniol during palmarosa (*Cymbopogon martinii*, Roxb. wats. var. motia) inflorescence development. *Phytochem.*, **2001**, 57, pp. 675–680.

DYKYJ, J., SVOBODA, J., WILHOIT, R.C., FRENKEL, M. and HALL, K.R. Vapor pressure of chemicals. Vapor pressure and Antoine constants for hydrocarbons, and sulfur, selenium, tellurium, and halogen containing organic compounds. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Berlin, Germany, **1999**, pp. 1-19.

FAIR, J. Distillation. En ALBRIGHT, L. F. Albright's Chemical Engineering Handbook. Taylor & Francis Group, LLC: Indiana, USA, **2009**, pp. 972-987.

FARAH, A. A., AFIFI, A., FECHTA, M. L., CHHEN, A., SATRANI, B., TALBI, M. and CHAOUCH, A. Fractional distillation effect on the chemical composition of Moroccan myrtle (*Myrtus communis* L.) essential oils. *Flavour Fragr. J.*, **2006**, 21, pp. 351–354.

FERRÉ, J. y RIUS, X. Diseño factorial completo 2k. Técnicas de Laboratorio, **2003**, 287, pp. 999-1004.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Food chemical codex. 2nd ed. Government Printing Office: Washington, DC, USA, **1975**, 735p.

FREE, J. B., FERGUSON, A. W., SIMPKINS, J. R. and AL-SA'AD, B. N. Effect of honeybee nasanov and alarm pheromone components on behaviour at the nest entrance. *J. Apicult. Res.*, **1983**, 22, pp. 214-223.

GAYDOU, E. R. and RANDRIAMIHARISOA, R. P. Hydrocarbons from the essential oil of *Cymbopogon martinii*. *Phytochem.*, **1986**, 26, pp. 183–185.

GUTIÉRREZ, M.C. y DROGUET, M. La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín Intexter (U.P.C.)*, **2002**, 122, pp. 35-41.

JENTOFT, R. E., DOTY, W. R. and GOUW, T. H. Spinning band distillation column still heads. *Anal. Chem.*, **1969**, 41, pp. 223-224.

KITSON, F. G., LARSEN, B. S. and MCEWEN, C. N. Gas chromatography and mass spectrometry: A practical guide. Academic Press: San Diego, CA, USA, **1996**, pp. 3-35.

KUMAR, R., and SRIVASTAVA, M. A. Evaluation of *Cymbopogon martinii* oil extract for control of postharvest insect deterioration in cereals and legumes. *J. Food Prot.*, **2007**, 70, pp. 172-78.

KUMARAN, A. M., D'SOUZA, P., AGARWAL, A., BOKKOLLA R.M. and BALASUBRAMANIAM, M. Geraniol, the putative anthelmintic principle of *Cymbopogon martinii*. *Phytother. Res.*, **2003**, 17, pp. 957-958.

LEWINSOHN, E., SCHALECHET, F., WILKINSON, J., MATSUI, K. TADMOR, A., NAM, K., AMAR, O., LASTOCHKIN, E., LARKOV, O., RAVID, U., HIATT, W., GEPSTEIN, S. and PICHERSKY, E. Enhanced levels of the aroma and flavor compound s-linalool by metabolic engineering of the terpenoid pathway in tomato fruits. *Plant Physiol.*, **2001**, 127, pp. 1256–1265.

MAHESHWARI, S. C., CHAUHAN, G.S. and TRIVEDI, K.C. Response of palmarosa oil grass to irrigated and unirrigated sward and harvesting stage. *Indian Perfumer*, **1992**, 36, pp. 54–56.

MALLAVARAPU, G. R., RAJESWARA R., B. R., KAUL, P. N., RAMESH, S. and BHATTACHARYA, A. K. Volatile constituents of the essential oils of the seeds and herb of palmarosa (*Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats. var. *motia* Burk.). *Flavour Fragr. J.*, **1998**, 13, pp. 167–169.

McCABE, W. S. Operaciones unitarias en ingeniería química. McGraw-Hill: Madrid, España, **2004**, pp. 521-615.

MILOJEVIĆ, S., GLIŠIĆ, S., and SKALA, D. The batch fractionation of *Juniperus communis* L. Essential oil: experimental study, mathematical simulation and process economy. *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.*, **2010**, 16, pp. 183–191.

MORETTI, M., SANNA-PASSINO, G., and DEMONTIS, S. A. Essential oil formulations useful as a new tool for insect pest control. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, **2002**, 3(2), pp. 13-14.

MUJTABA, I. Batch Distillation. Design and Operation. Series on Chemical Engineering. Imperial College Press.: London, UK, **2004**, pp. 3-16.

MUÑOZ, F. Plantas medicinales y aromáticas: Estudio, cultivo y procesado. 4^a ed. Ediciones Mundi-Prensa: Madrid, España, **2002**, pp. 7-30.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. Food Chemicals Codex. 3rd ed. , National Academy Press: Washington, D.C., U.S.A., **1981**, pp. 381.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. Carcinogenesis studies of food grade geranyl acetate (71% geranyl acetate, 29% citronellyl acetate) (CAS No. 105-87-3) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage study). *Natl. Toxicol. Program. Tech. Rep. Ser.*, **1987**; 252, pp. 7-15.

NIESSEN, W. M. A. Current practice of gas chromatography-mass spectrometry. Marcel Dekker, Inc.: New York, USA, **2001**, pp. 10-18.

OUSSALAH, M. C., CAILLETA, S., SAUCIERC, L. and LACROIX, M. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Sci.*, **2006**, 73, pp. 236–244.

PETER, K. Handbook of Herbs and Spices. Woodhead Publishing Limited: London, UK, **2004**, pp, 23-120.

PLAZAS T., L., WOLF M., M. R., FERREIRA P., G. M., MACIEL F., R. and RAMALHO G., D. Factorial design applied to concentrate bioactive component of *Cymbopogon citratus* essential oil using short path distillation. *Chem. Eng. Res. Des.*, **2010**, 88, pp. 239-244.

PRASHAR, A. H., HILIB, P., VENESSA, R. G. and EVANS, C. S. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochem.*, **2003**, 63, pp. 569–575.

RAGUSO, R.A. and PICHERSKY, E. A day in the life of a linalool molecule: chemical communication in a plant-pollinator system. Part 1: linalool biosynthesis in flowering plants. *Plant Species Biol.*, **1999**, 14, pp. 95-120.

RAJESWARA, B. R., KAUL, P.N., SYAMASUNDAR, K.V. and RAMESHB, S. Chemical profiles of primary and secondary essential oils of palmarosa (*Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats var. motia Burk.). *Indust. Crops Prod.*, **2005**, 21, pp. 121–127.

RAJESWARA R., B. K and RAJPUT, D. K. Response of palmarosa {*Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats. var. motia Burk.} to foliar application of magnesium and micronutrients. *Indust. Crops. Prod.*, **2011**, 33, pp. 277-281.

RAO, B. Biomass and essential oil yields of rainfed palmarosa (*Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats. var. *motia* Burk.) supplied with different levels of organic manure and fertilizer nitrogen in semi-arid tropical climate. *Indust. Crops Prod.*, **2001**, 14, pp. 171-178.

REINHARD, M. and DREFAHL, A. Handbook for estimating physicochemical properties of organic compounds. John Wiley & Sons., **1999**, pp. 94-107. Versión en línea disponible en: http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=1199&VerticalID=0.

SANDRA, P. and BICCHI, C. Capillary gas chromatography in essential oil analysis. Alfred Huethig-Verlag: Heidelberg, Germany, **1987**, pp. 259-274.

SAHU, S. and DEBATA, B. Palmarosa and its improvement for geraniol production. *J. Med. Arom. Plant Sci.*, **2000**, 22, pp. 253–262.

SHAW, A. C. The Essential Oil of *Tsuga canadensis* (L.) Carr. *J. Am. Chem. Soc.*, **1951**, 73, pp. 2859–2861.

SINGH, A. and KUMAR, S. India's competitive edge in international essential oil trade: opportunities and challenges. *J. Med. Arom. Plant Sci.*, **2000**, 22, pp. 404–410.

SINGH, A. and SINGH, M. Productivity and economic viability of a Palmarosa–Pigeonpea intercropping system in the subtropical climate of north India. *J. Agric. Sci.*, **1998**, 130, pp. 149–154.

SINGH, S. R., RAM, M., RAM, D., SHARMA, S. and SINGH, D. V. Water requirement and productivity of palmarosa on sandy loam soil under a subtropical climate. *Agric. Water. Manag.*, **1997**, 35, pp. 1–10.

SKOOG, D., HOLLER, F. and NIEMAN, T. Principios de análisis instrumental. 5a ed. McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U.: Madrid, España, **2001**, pp. 730-740.

SMITH, R. L., COHEN, S. M., DOULL, J., FERON, V. J., GOODMAN, J. I., MARNETT, L. J., PORTOGHESE, P. S., WADDELL, W. J., WAGNER, B. M., and ADAMS, T. B. GRAS flavoring substances 21. *Food Technol.*, **2003**, 57, pp. 46-59.

STUART, G. R., LOPES, D. and OLIVEIRA, J. V. Deterpenation of brazilian orange peel oil by vacuum distillation. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **2001**, 78, pp. 1041-1044.

TEIXEIRA, M. L., LEME, E.E., DELARMELENA, C., SOARES, A.A., FIGUEIRA, G. and SARTORATTO, A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *J. Ethnopharmacol.*, **2007**, 111, pp. 197–201.

TIWARI, R. The Trade in Commercially Important *Cymbopogon* Oils. En AKHILA, A., Essential oil - Bearing grasses. The genus *Cymbopogon*. Taylor and Francis Group: Boca Raton, USA, **2010**, pp. 151-165.

VAN RUTH, S. M. Aroma measurement: Recent developments in isolation and characterisation. In DE CUYPER, M. and BULTE, J.W.M. Physics and Chemistry Basis of Biotechnology. Kluwer Academic Publishers: Netherlands, **2001**, pp. 305-328.

VIOLLON, C. C. and CHAUMONT, J.P. Antifungal properties of essential oils and their main components upon *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathol.*, **1994**, 128, pp. 151-153

YAWS, C. L., NARASIMHAN, P. K. AND GABBULA, C. Yaws' handbook of Antoine coefficients for vapor pressure. 2nd Electronic Ed. Knovel, **2009**.
Versión en línea disponible en:
http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=1183&VerticalID=0.

7 ANEXOS

ANEXO A: ECUACIONES DE ANTOINE Y SUS COEFICIENTES

Tabla 19. Datos calculados usando la **Ecuación 1** para hallar las presiones de vapor (mmHg) a diferentes temperaturas (°C) para el geraniol (Yaws *et al.*, 2009).

| Temperatura (°C) | Presión de vapor (mm Hg) | Temperatura (°C) | Presión de vapor (mm Hg) | Temperatura (°C) | Presión de vapor (mm Hg) | Temperatura (°C) | Presión de vapor (mm Hg) | Temperatura (°C) | Presión de vapor (mm Hg) |
|------------------|--------------------------|------------------|--------------------------|------------------|--------------------------|------------------|--------------------------|------------------|--------------------------|
| 45,79 | 0,2336 | 122,1 | 17,39 | 180,3 | 168,4 | 208,9 | 416,8 | 224,9 | 661,3 |
| 49,29 | 0,2987 | 124,5 | 19,38 | 182,2 | 179,5 | 210 | 430,4 | 225,8 | 676,6 |
| 52,54 | 0,3731 | 127,2 | 21,84 | 183,3 | 186,1 | 211 | 444,1 | 226,6 | 692,2 |
| 56,03 | 0,4712 | 129,1 | 23,71 | 184,9 | 196,4 | 211,8 | 455 | 227,4 | 707,6 |
| 59,28 | 0,583 | 132,1 | 26,94 | 186,2 | 205,3 | 212,6 | 465,8 | 227,8 | 715,9 |
| 62,78 | 0,7302 | 134,8 | 30,19 | 187,6 | 214,5 | 213,2 | 473,2 | 228,2 | 723,8 |
| 66,01 | 0,8941 | 137,7 | 34,18 | 189,2 | 226,2 | 214 | 484,4 | 228,6 | 731,8 |
| 69,26 | 1,092 | 140,7 | 38,62 | 190,5 | 236,2 | 214,5 | 492,1 | 229 | 740,3 |
| 74,11 | 1,461 | 144,2 | 44,53 | 191,9 | 246,6 | 215,1 | 499,9 | 229,4 | 748,4 |
| 77,61 | 1,794 | 148 | 51,73 | 193,3 | 257,6 | 215,6 | 507,8 | 229,9 | 757,1 |
| 81,64 | 2,259 | 151,5 | 59,33 | 194,9 | 271 | 216,2 | 515,8 | | |
| 86,23 | 2,918 | 155 | 67,89 | 196,5 | 285,3 | 217 | 527,8 | | |
| 92,42 | 4,077 | 157,9 | 75,95 | 197,3 | 292,5 | 217,8 | 540,4 | | |
| 94,33 | 4,509 | 160,1 | 82,28 | 198,9 | 307,7 | 218,3 | 548,8 | | |
| 98,36 | 5,557 | 162 | 88,22 | 200 | 318,2 | 219,1 | 561,5 | | |
| 99,96 | 6,030 | 164,4 | 96,41 | 201,3 | 331,7 | 219,7 | 570,2 | | |
| 102,1 | 6,727 | 167,4 | 107,3 | 202,7 | 345,6 | 220,5 | 583,3 | | |
| 105,6 | 8,010 | 169 | 113,7 | 203,5 | 354,4 | 221,3 | 596,7 | | |
| 108,1 | 9,029 | 170,3 | 119,3 | 204,8 | 369,1 | 221,7 | 603,4 | | |
| 110,2 | 10,01 | 171,7 | 125,1 | 205,4 | 375,2 | 222,5 | 617,6 | | |
| 111,8 | 10,82 | 173,6 | 133,7 | 205,9 | 381,4 | 222,9 | 624,5 | | |
| 114,2 | 12,12 | 175,2 | 141,3 | 206,7 | 390,7 | 223,3 | 632 | | |
| 117,5 | 14,1 | 177,1 | 150,9 | 207,5 | 400,4 | 223,7 | 639,1 | | |
| 119,1 | 15,2 | 178,4 | 158 | 208,3 | 410,1 | 224,5 | 654 | | |

Tabla 20. Datos calculados usando la **Ecuación 1** para hallar las presiones de vapor (mmHg) a diferentes temperaturas (°C) para el acetato de geranilo (Yaws *et al.*, 2009).

| Temperatura (°C) | Presión de vapor (mm Hg) | Temperatura (°C) | Presión de vapor (mm Hg) | Temperatura (°C) | Presión de vapor (mm Hg) | Temperatura (°C) | Presión de vapor (mm Hg) | Temperatura (°C) | Presión de vapor (mm Hg) |
|------------------|--------------------------|------------------|--------------------------|------------------|--------------------------|------------------|--------------------------|------------------|--------------------------|
| 79,01 | 1,452 | 118,7 | 10,82 | 161,3 | 61,26 | 192,1 | 175,2 | 211,1 | 312,9 |
| 80,32 | 1,563 | 120,9 | 11,95 | 162,6 | 64,27 | 193,2 | 181,4 | 211,5 | 317 |
| 81,64 | 1,682 | 122,7 | 12,91 | 164,1 | 67,93 | 194,1 | 186,5 | 212 | 321,1 |
| 83,17 | 1,831 | 124,2 | 13,82 | 165,9 | 72,35 | 194,7 | 190,3 | 212,8 | 329,4 |
| 84,9 | 2,013 | 126,4 | 15,2 | 167 | 75,22 | 195,6 | 195,6 | 213,5 | 335,6 |
| 86,86 | 2,240 | 128,1 | 16,39 | 168,5 | 79,41 | 196,2 | 199,6 | 213,7 | 337,9 |
| 88,41 | 2,433 | 129,9 | 17,66 | 169,8 | 83,18 | 196,9 | 203,8 | 214,6 | 346,4 |
| 89,7 | 2,607 | 132,1 | 19,39 | 171,6 | 88,46 | 198 | 210,8 | 215,4 | 355,2 |
| 91,23 | 2,826 | 134 | 21,06 | 173,5 | 94,7 | 198,9 | 216,6 | 216,3 | 364,3 |
| 92,98 | 3,098 | 135,8 | 22,65 | 174,8 | 99,03 | 199,5 | 221 | 217,2 | 373,6 |
| 94,51 | 3,353 | 137,7 | 24,56 | 175,9 | 102,9 | 200,6 | 228,7 | 217,8 | 380,5 |
| 96,03 | 3,627 | 139,3 | 26,15 | 177,2 | 107,5 | 201,3 | 233,2 | 218,7 | 390,1 |
| 98 | 4,008 | 140,8 | 27,82 | 178,3 | 111,6 | 201,9 | 237,9 | 219,2 | 395 |
| 99,54 | 4,333 | 142,3 | 29,58 | 179,6 | 116,6 | 202,8 | 244,3 | 219,6 | 399,9 |
| 101,1 | 4,676 | 143,8 | 31,44 | 181,2 | 122,7 | 203,4 | 249,2 | 220 | 404,9 |
| 102,8 | 5,096 | 146 | 34,29 | 182,3 | 127,3 | 204,5 | 257,7 | 220,5 | 410 |
| 104,8 | 5,611 | 148 | 37,04 | 183,4 | 132 | 205,4 | 264,4 | 221,1 | 417,5 |
| 106,3 | 6,049 | 149,5 | 39,3 | 184 | 134,9 | 206,1 | 269,7 | 221,6 | 422,7 |
| 108,3 | 6,648 | 151,3 | 42,06 | 184,9 | 138,8 | 206,9 | 276,9 | 222,4 | 433,2 |
| 110 | 7,221 | 152,8 | 44,58 | 186,4 | 145,9 | 207,8 | 284,1 | 223,1 | 441,1 |
| 111,3 | 7,685 | 154,5 | 47,62 | 187,3 | 150,1 | 208,2 | 287,8 | 223,5 | 446,5 |
| 113,3 | 8,425 | 156,1 | 50,47 | 188,4 | 155,5 | 208,9 | 293,5 | 224,2 | 454,6 |
| 115,2 | 9,228 | 157,6 | 53,44 | 189,7 | 162,3 | 209,3 | 297,4 | 224,8 | 463,1 |
| 117 | 10,000 | 159,8 | 57,92 | 191 | 169,3 | 210,2 | 305 | 225,7 | 474,2 |

Tabla 21. Coeficientes de la **Ecuación 1** para geraniol y acetato de geraniol (Yaws *et al.*, 2009).

| Nombre del compuesto | trans-geraniol | acetato de geraniol |
|----------------------|----------------|---------------------|
| Registro CAS No. | 106-24-1 | 105-87-3 |
| Formula molecular | C 10 H 18 O | C 12 H 20 O 2 |
| Constante A | 8,60515 | 8,51142 |
| Constante B | 2773,11 | 2842,78 |
| Constante C | 254,443 | 261,464 |

ANEXO B. CURVAS DE CALIBRACIÓN

Tabla 22. Datos de la curva de calibración interna para cuantificar el geraniol presente en el AE de palmarrosa y en las fracciones F1, F2, F3, F4 y FF que fueron obtenidas en los estudios de destilación fraccionada (**Secciones 3.3.2.** y **3.3.3**).

| Geraniol (ppm) | Área | Factor de respuesta | ISTD (ppm) | Área | Factor de respuesta |
|----------------|--------|---------------------|------------|--------|---------------------|
| 1311,7 | 692,4 | 1,89 | 1504,8 | 1139,4 | 1,32 |
| 2623,5 | 1398,4 | 1,88 | 1504,8 | 1148,6 | 1,31 |
| 3935,2 | 2176,1 | 1,81 | 1504,8 | 1125,5 | 1,34 |
| 5247 | 3064,8 | 1,71 | 1504,8 | 1160,7 | 1,30 |
| 6558,7 | 3837,6 | 1,71 | 1504,8 | 1155,4 | 1,30 |
| S | | 0,088 | | | 0,016 |
| \bar{X} | | 1,8 | | | 1,3 |
| CV, % | | 4,9 | | | 1,2 |

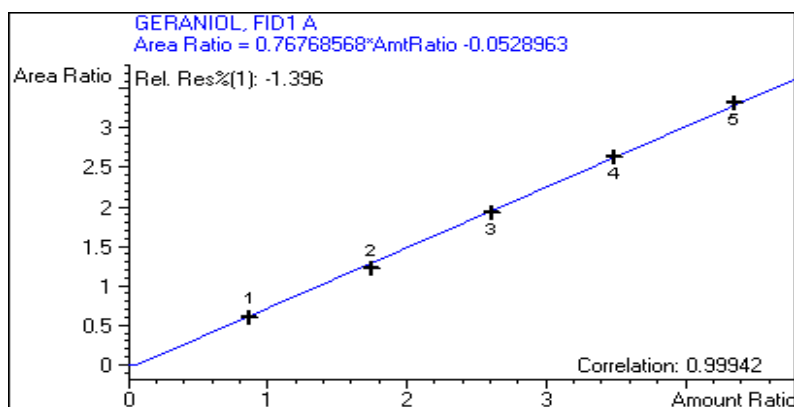


Figura 17. Curva de calibración interna para cuantificar el geraniol presente en el AE de palmarrosa y en las fracciones FF que fueron obtenidas en los estudios de destilación fraccionada (**Secciones 3.3.2.** y **3.3.3**).

Tabla 23. Datos de la curva de calibración interna para cuantificar el linalol presente en el AE de palmarrosa y en las fracciones F1, F2, F3, F4 y FF que fueron obtenidas en los estudios de destilación fraccionada (**Secciones 3.3.2.** y **3.3.3**).

| Linalol (ppm) | Área | Factor de respuesta | ISTD ppm | Área | Factor de respuesta |
|---------------|--------|---------------------|----------|--------|---------------------|
| 61,6 | 49,9 | 1,23 | 1504,8 | 910,1 | 1,65 |
| 184,7 | 113,1 | 1,63 | 1504,8 | 904,1 | 1,66 |
| 461,7 | 245,5 | 1,88 | 1504,8 | 1013,0 | 1,49 |
| 923,4 | 504,5 | 1,83 | 1504,8 | 1004,5 | 1,50 |
| 1846,9 | 1163,1 | 1,59 | 1504,8 | 969,3 | 1,55 |
| 2770,3 | 1728,2 | 1,60 | 1504,8 | 960,2 | 1,55 |
| 3693,7 | 2234,7 | 1,65 | 1504,8 | 960,0 | 1,57 |
| 4617,2 | 2722,8 | 1,70 | 1504,8 | 904,7 | 1,66 |
| S | | 0,20 | | | 0,072 |
| \bar{X} | | 1,6 | | | 1,6 |
| CV, % | | 11,9 | | | 4,6 |

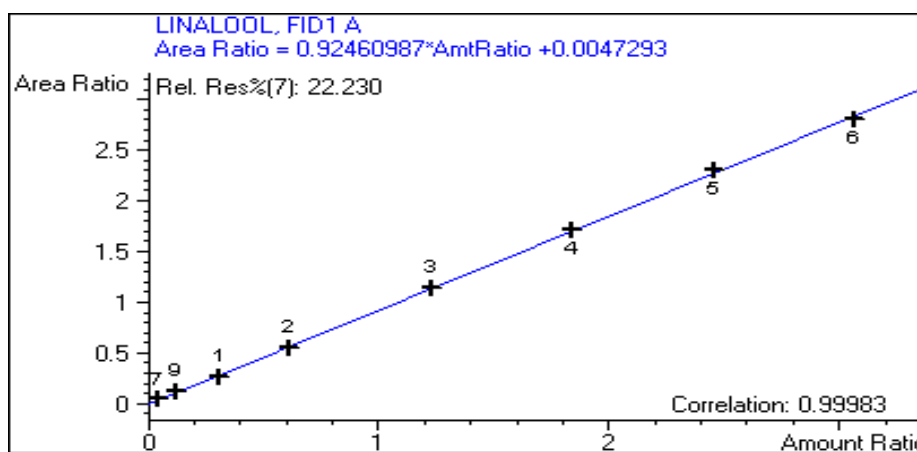


Figura 18. Curva de calibración interna para cuantificar el linalol presente en el AE de palmarrosa y las fracciones FF que fueron obtenidas en los estudios de destilación fraccionada (**Secciones 3.3.2.** y **3.3.3**).

Tabla 24. Datos de la curva de calibración interna para cuantificar el acetato de geranilo presente en el AE de palmarrosa y las fracciones F1, F2, F3, F4 y FF que fueron obtenidas en los estudios de destilación fraccionada (**Secciones 3.3.2.** y **3.3.3**).

| Acetato de geranilo (ppm) | Área | Factor de respuesta | ISTD ppm | Área | Factor de respuesta |
|---------------------------|--------|---------------------|----------|--------|---------------------|
| 1261,8 | 591,14 | 2,134 | 1504,8 | 1139,4 | 1,32 |
| 2523,5 | 1215 | 2,077 | 1504,8 | 1148,6 | 1,31 |
| 3785,3 | 1885,8 | 2,007 | 1504,8 | 1125,5 | 1,34 |
| 5047 | 2654,9 | 1,901 | 1504,8 | 1160,7 | 1,30 |
| 6308,8 | 3313,9 | 1,904 | 1504,8 | 1155,4 | 1,30 |
| S | | 0,103 | | | 0,016 |
| \bar{X} | | 2,005 | | | 1,3 |
| % CV | | 5,2 | | | 1,2 |

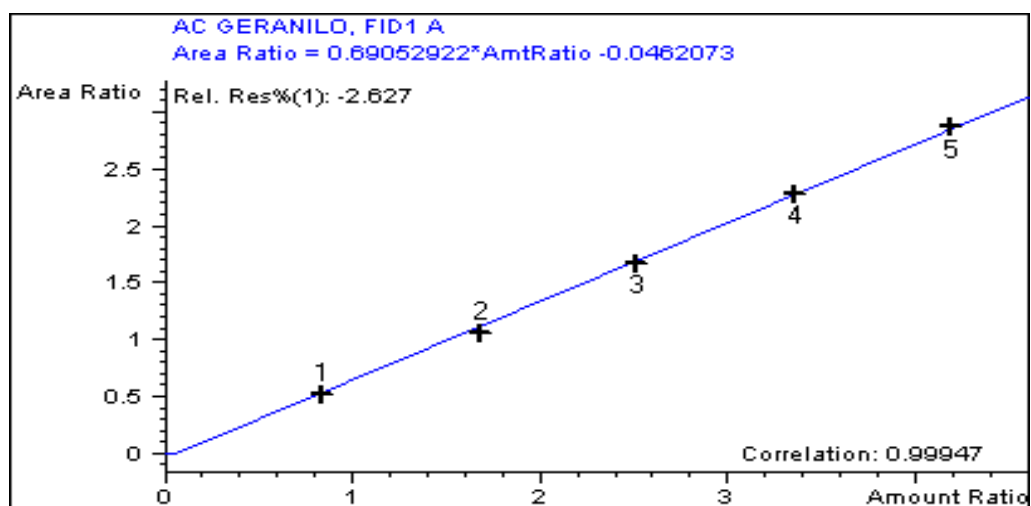


Figura 19. Curva de calibración interna para cuantificar el acetato de geranilo presente en el AE de palmarrosa y las fracciones FF que fueron obtenidas en los estudios de destilación fraccionada (**Secciones 3.3.2.** y **3.3.3**).

ANEXO C: CROMATOGRAMAS

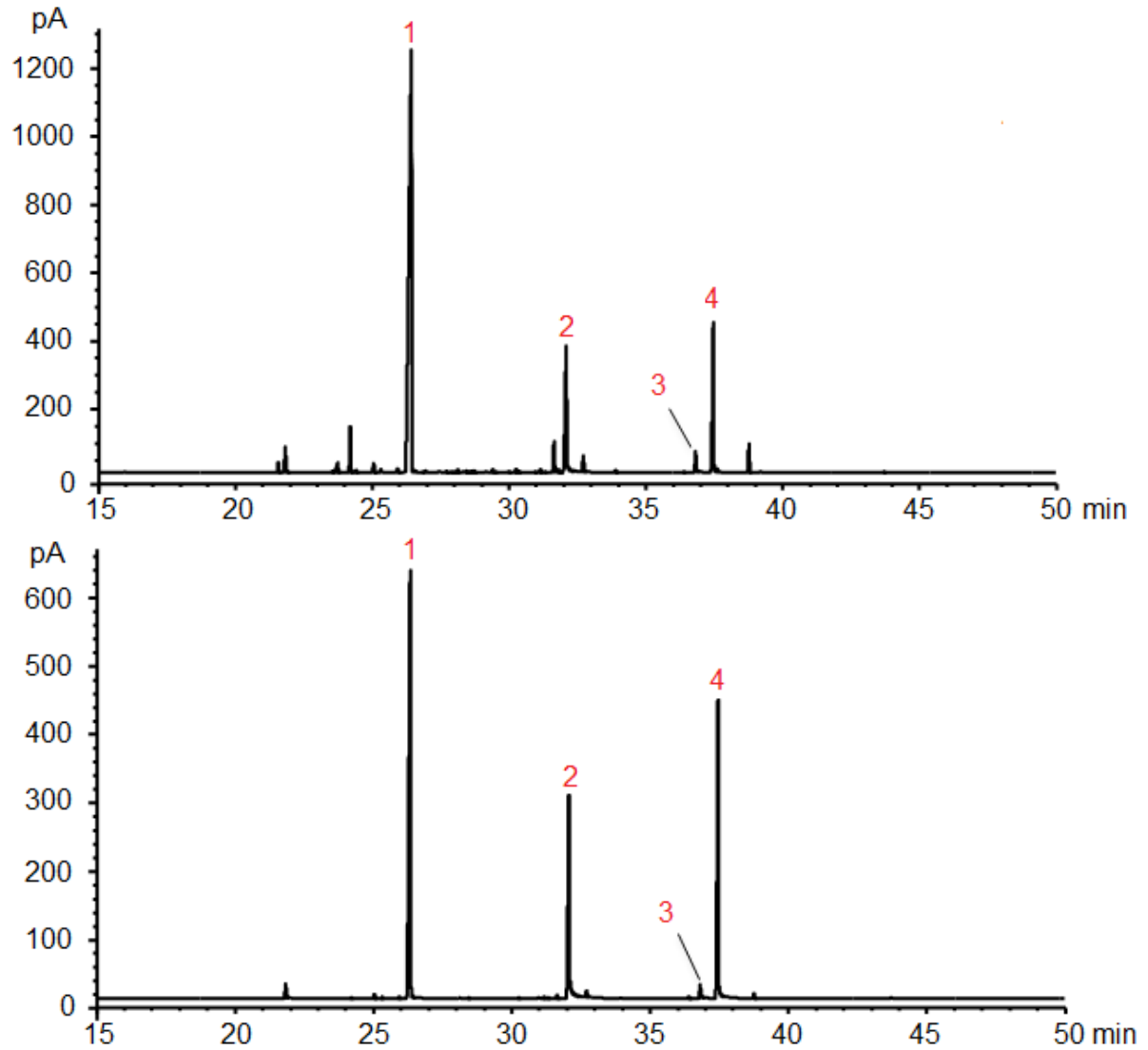


Figura 20. Cromatogramas de las fracciones F1 obtenidas en las destilaciones del AE de palmarrosa a presión de 4 mmHg (**Sección 3.3.2.**). 1 linalol, 2 geraniol, 3 acetato de geranilo, 4 ISTD.

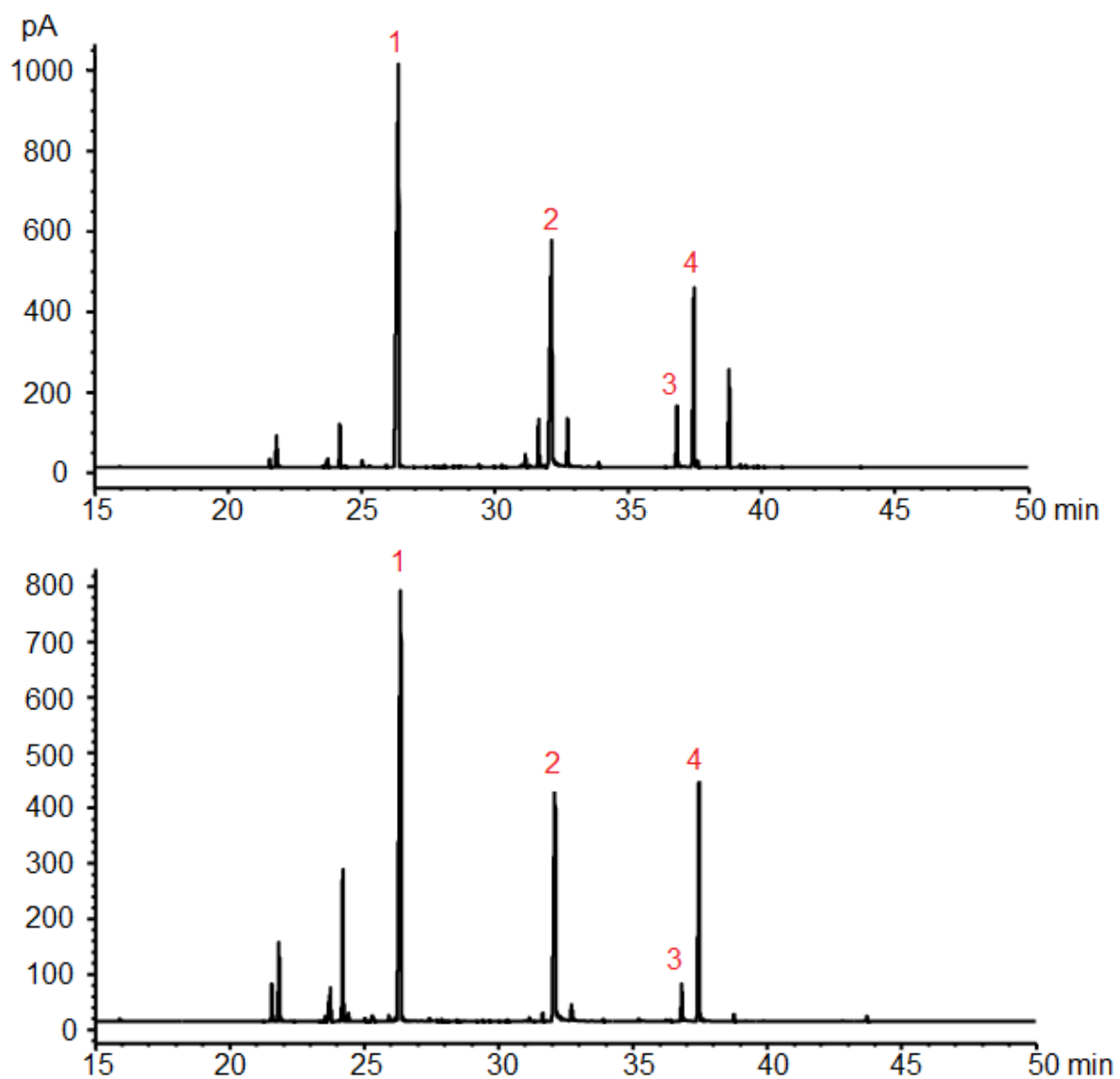


Figura 21. Cromatogramas de las fracciones F2 obtenidas en las destilaciones del AE de palmarrosa a presión de 4 mmHg (**Sección 3.3.2.**). 1 linalol, 2 geraniol, 3 acetato de geranilo, 4 ISTD.

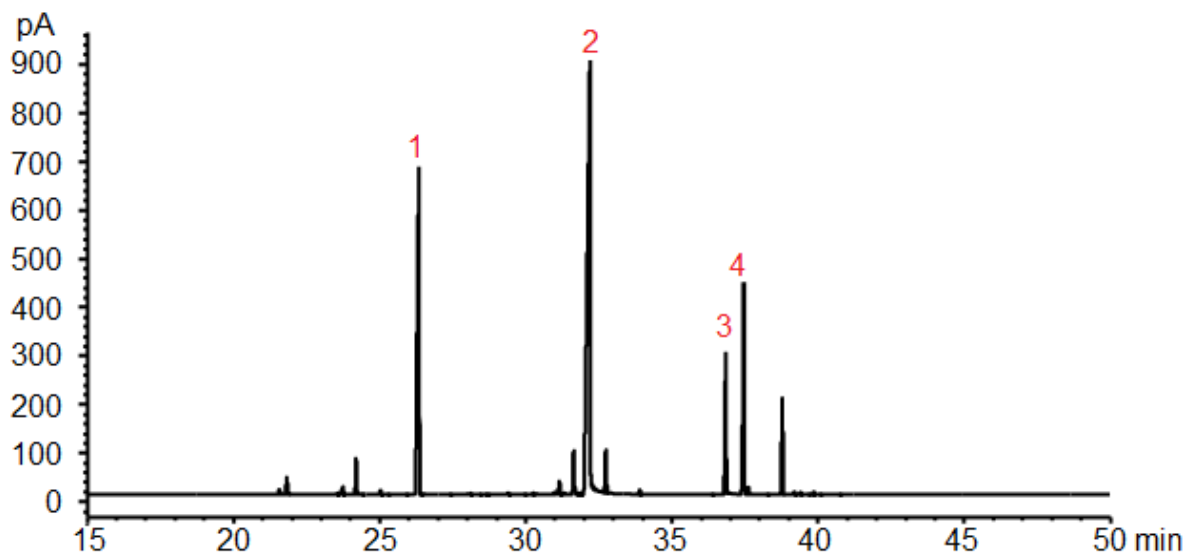


Figura 22. Cromatograma de la fracción F3 obtenida en la destilación del AE de palmarrosa a presión de 4 mmHg (**Sección 3.3.2.**). 1 linalol, 2 geraniol, 3 acetato de geranilo, 4 ISTD.

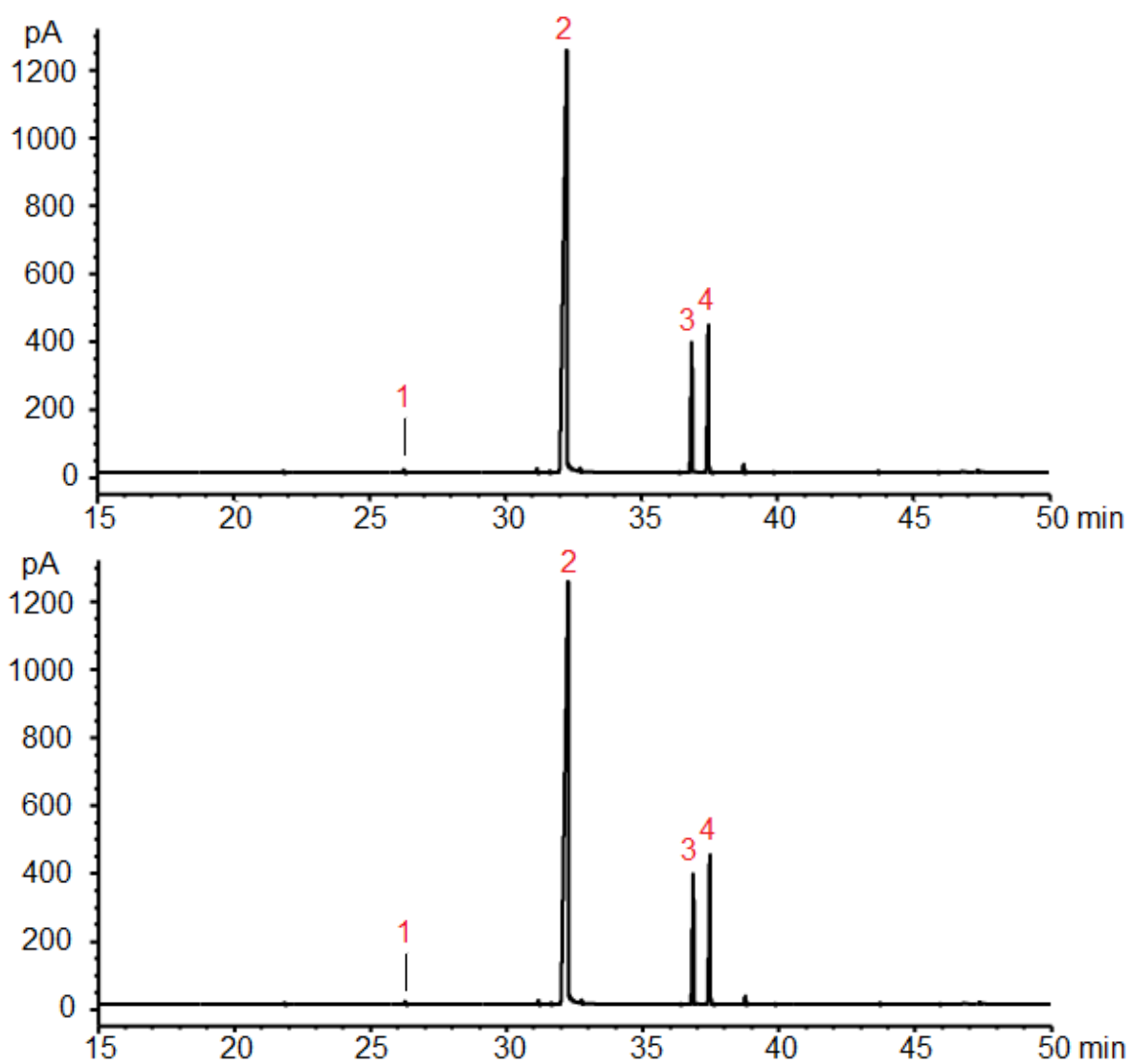


Figura 23. Cromatogramas de las fracciones FF obtenidas en la destilación del AE de palmarrosa a presión de 4 mmHg (**Sección 3.3.2.**). 1 linalol, 2 geraniol, 3 acetato de geranilo, 4 ISTD.

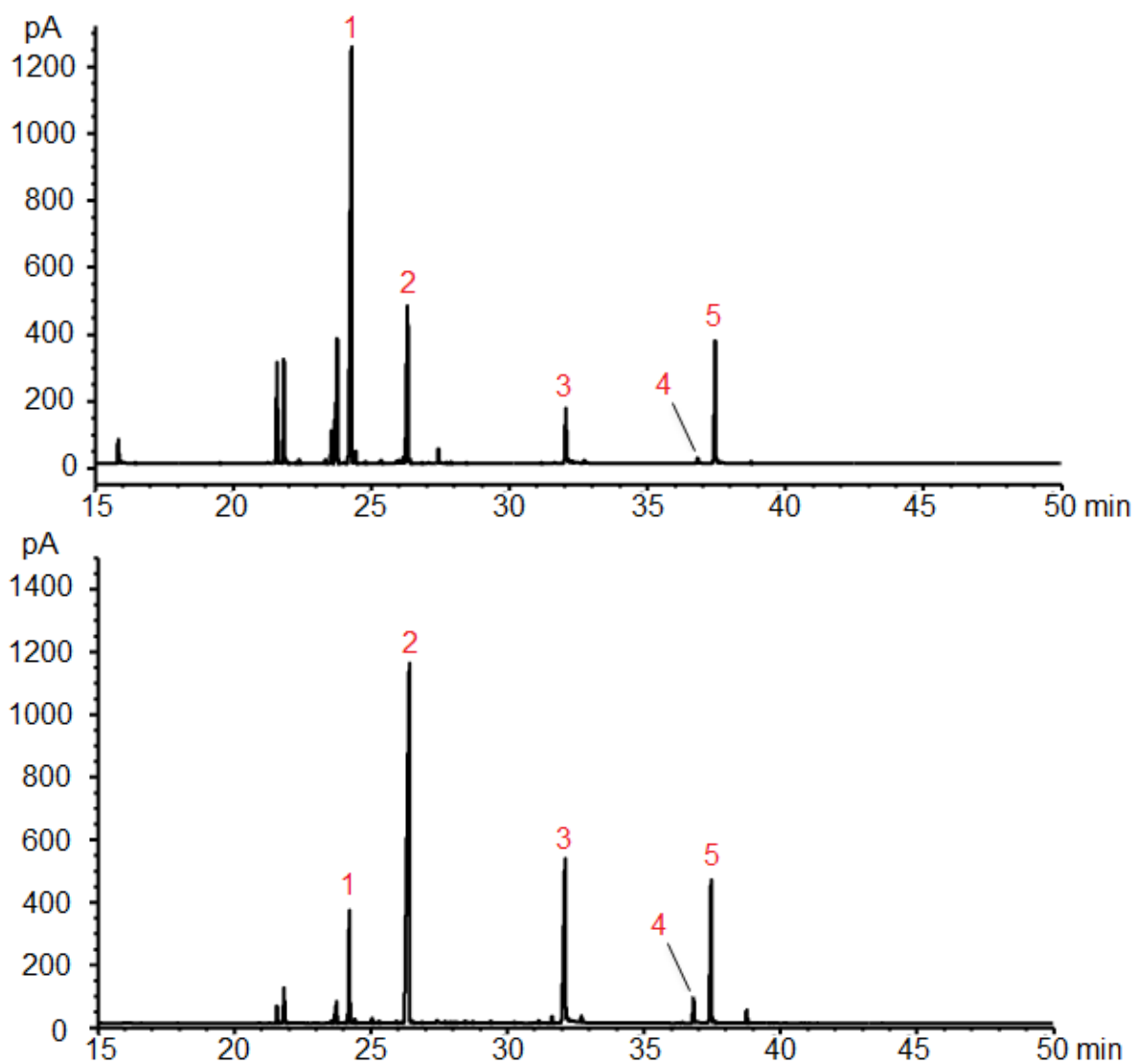


Figura 24. Cromatogramas de las fracciones F1 obtenidas en la destilación del AE de palmarrosa a presión de 8 mmHg (**Sección 3.3.2.**). 1 *trans*- β -ocimeno, 2 linalol, 3 geraniol, 4 acetato de geranilo, 5 ISTD.

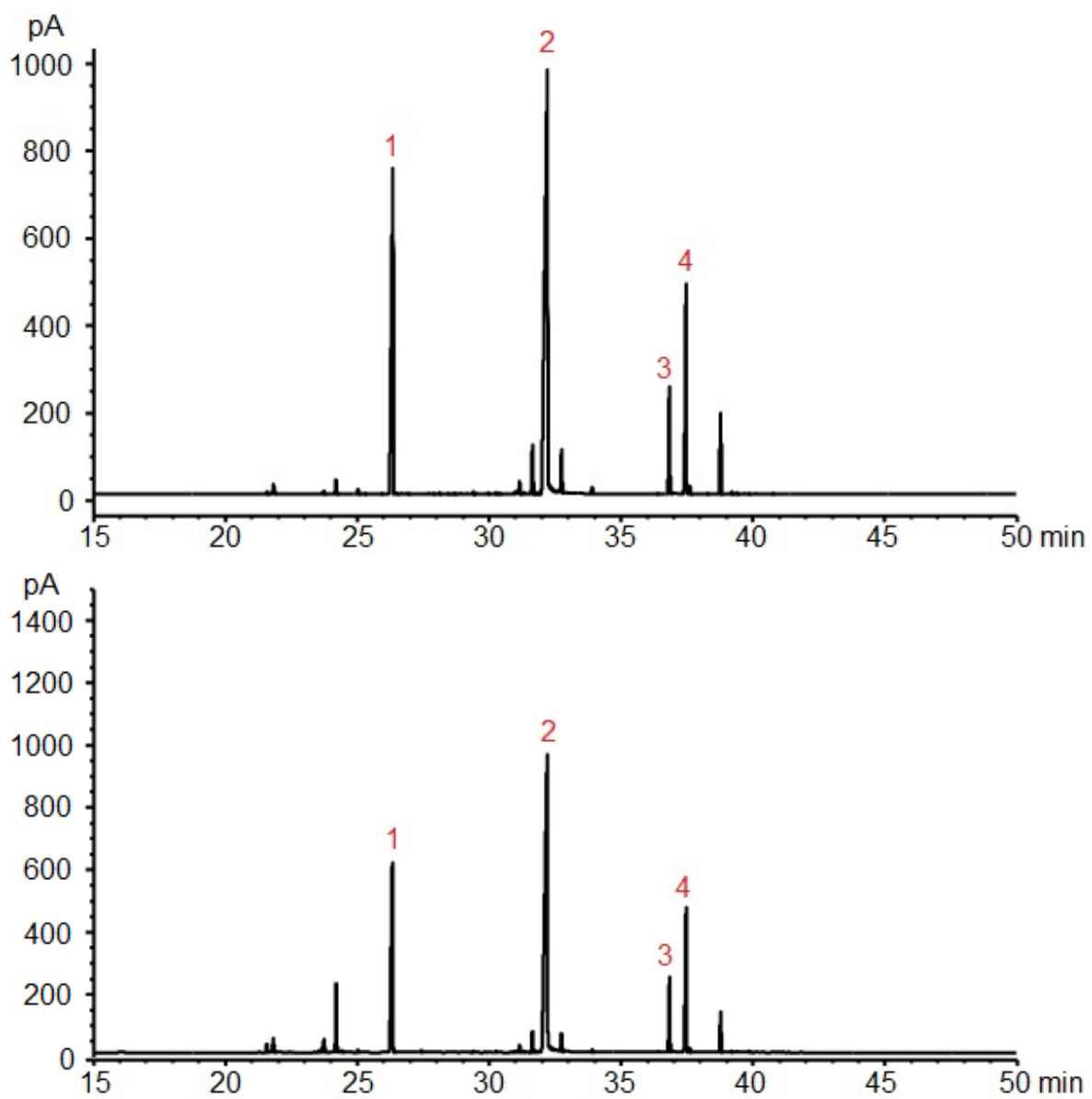


Figura 25. Cromatogramas de las fracciones F2 obtenidas en la destilación del AE de palmarrosa a presión de 8 mmHg (**Sección 3.3.2.**). 1 linalol, 2 geraniol, 3 acetato de geranilo, 4 ISTD.

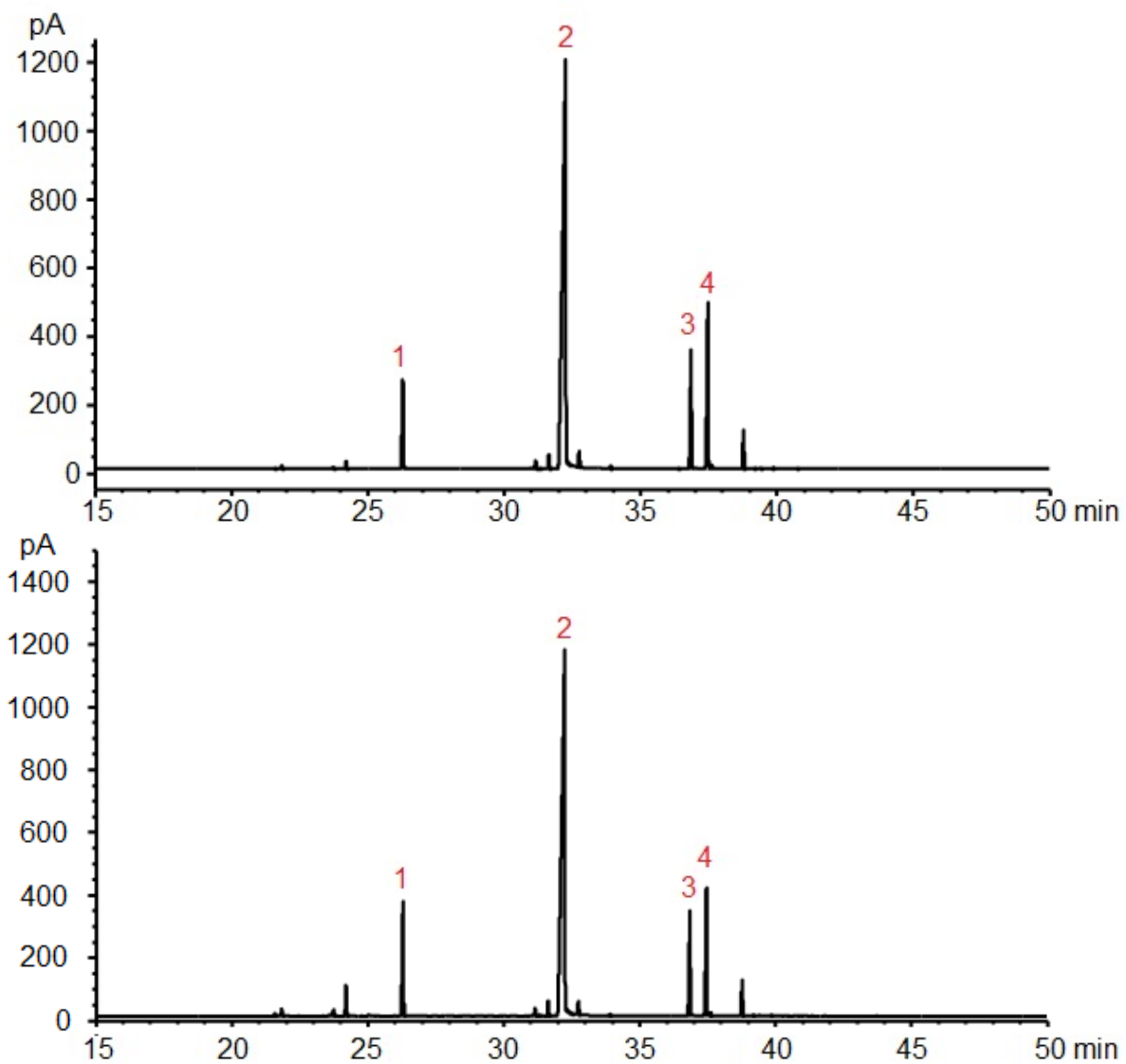


Figura 26. Cromatogramas de las fracciones F3 obtenidas en la destilación del AE de palmarrosa a presión de 8 mmHg (**Sección 3.3.2.**). 1 linalol, 2 geraniol, 3 acetato de geranilo, 4 ISTD.

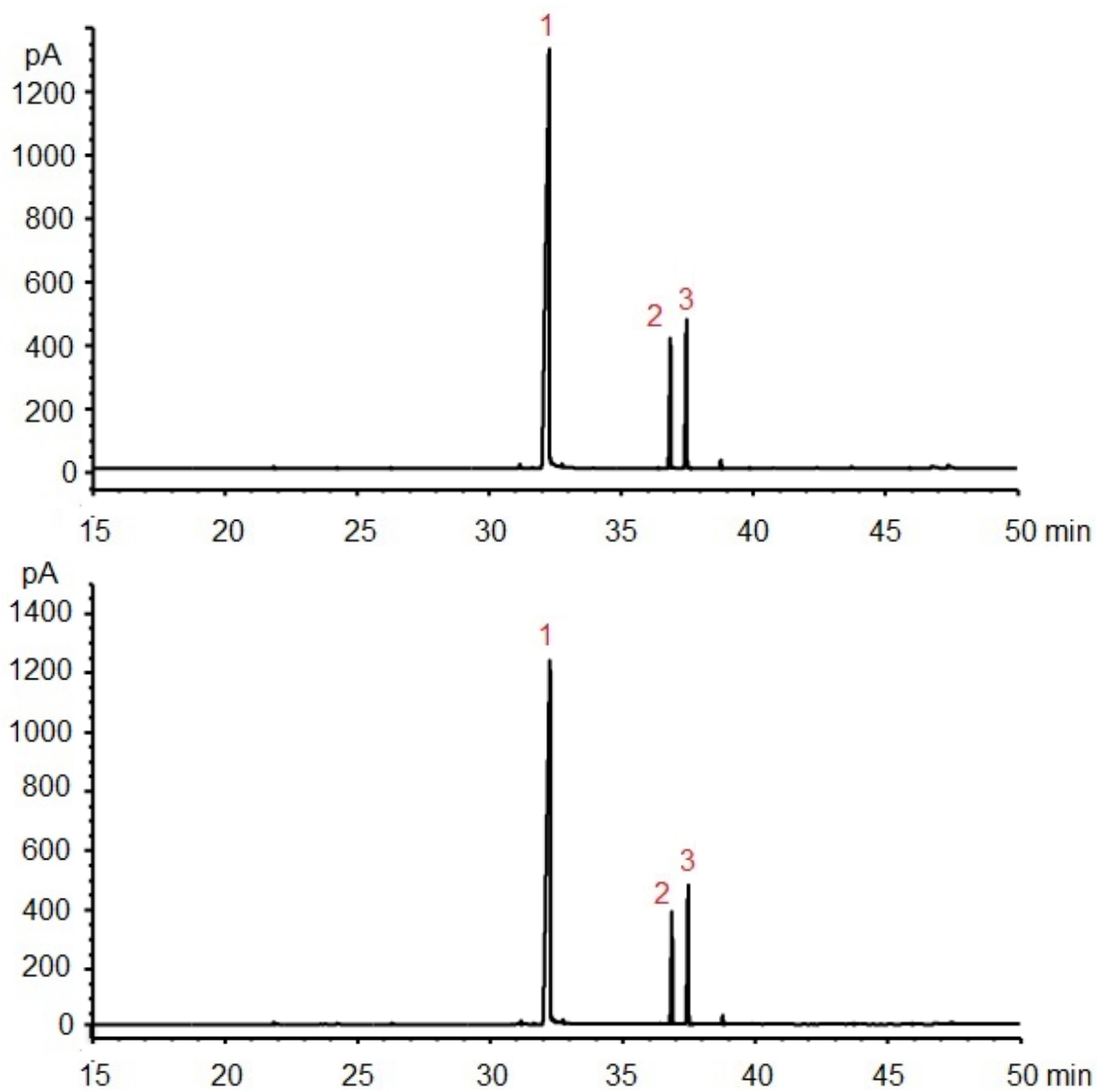


Figura 27. Cromatogramas de las fracciones FF obtenidas en la destilación del AE de palmarrosa a presión de 8 mmHg (**Sección 3.3.2.**). 1 geraniol, 2 acetato de geraniol, 3 ISTD.

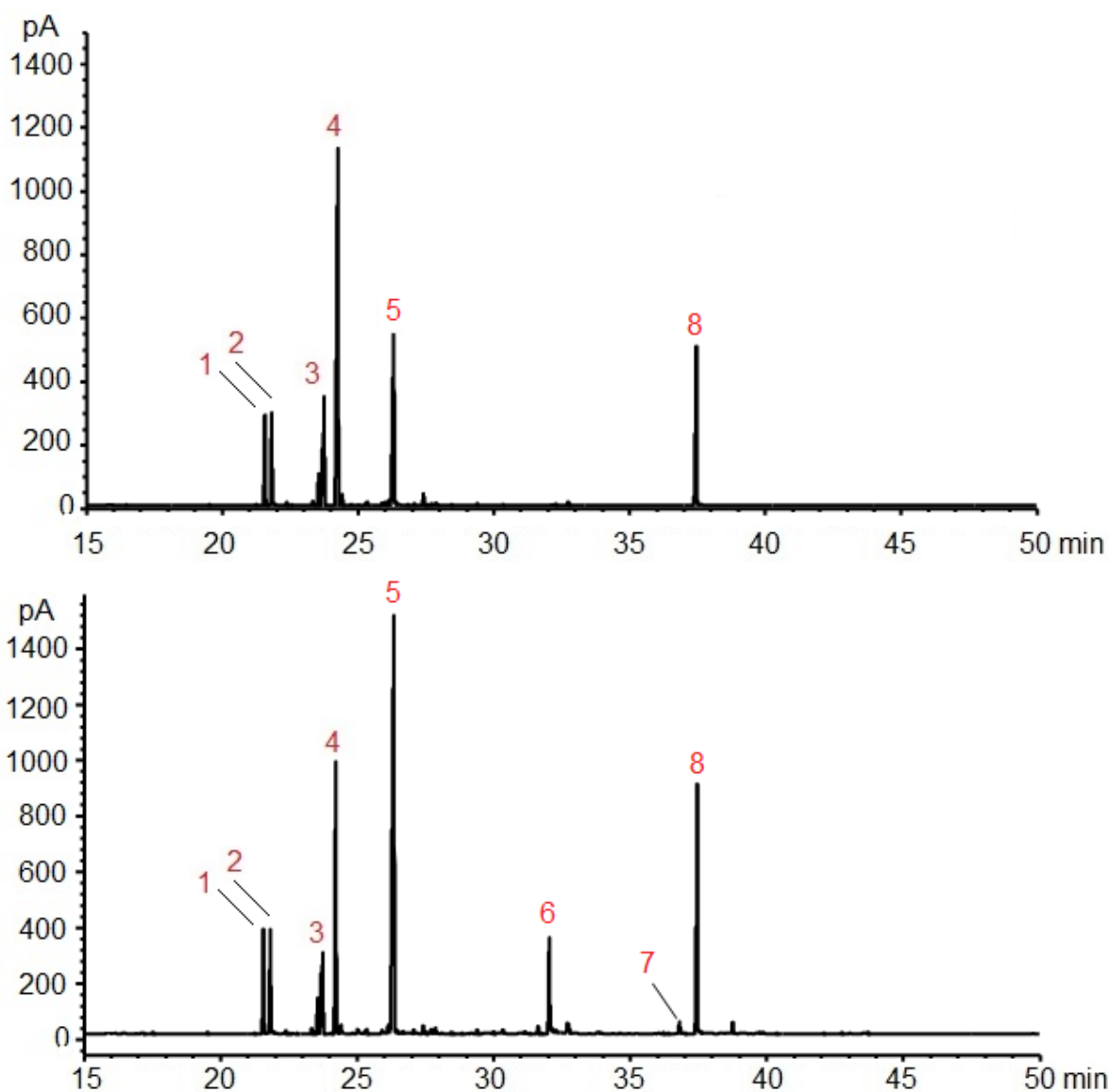


Figura 28. Cromatogramas de las fracciones F1 obtenidas en la destilación del AE de palmarrosa a presión de 12 mmHg (**Sección 3.3.2.**). 1. 6-Metil-5-hepten-2-ona, 2. β -Mirceno, 3. *cis*- β -ocimeno, 4. *trans*- β -ocimeno, 5. linalol, 6. geraniol, 7. acetato de geranilo, 8. ISTD.

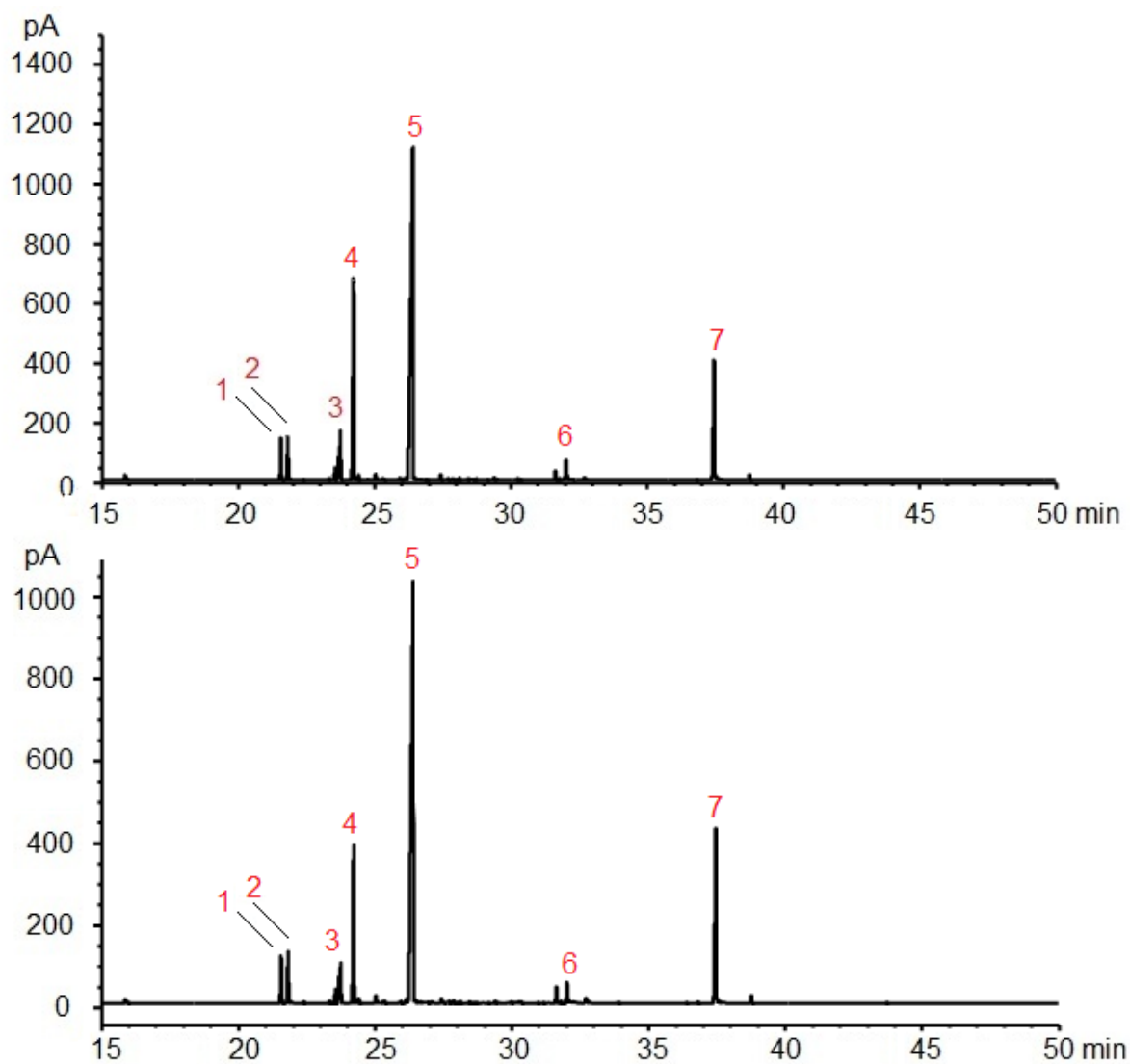


Figura 29. Cromatogramas de las fracciones F2 obtenidas en la destilación del AE de palmarrosa a presión de 12 mmHg (**Sección 3.3.2.**). 1. 6-Metil-5-hepten-2-ona, 2. β -Mirceno, 3. *cis*- β -ocimeno, 4. *trans*- β -ocimeno, 5. linalol, 6. geraniol, 7. ISTD.

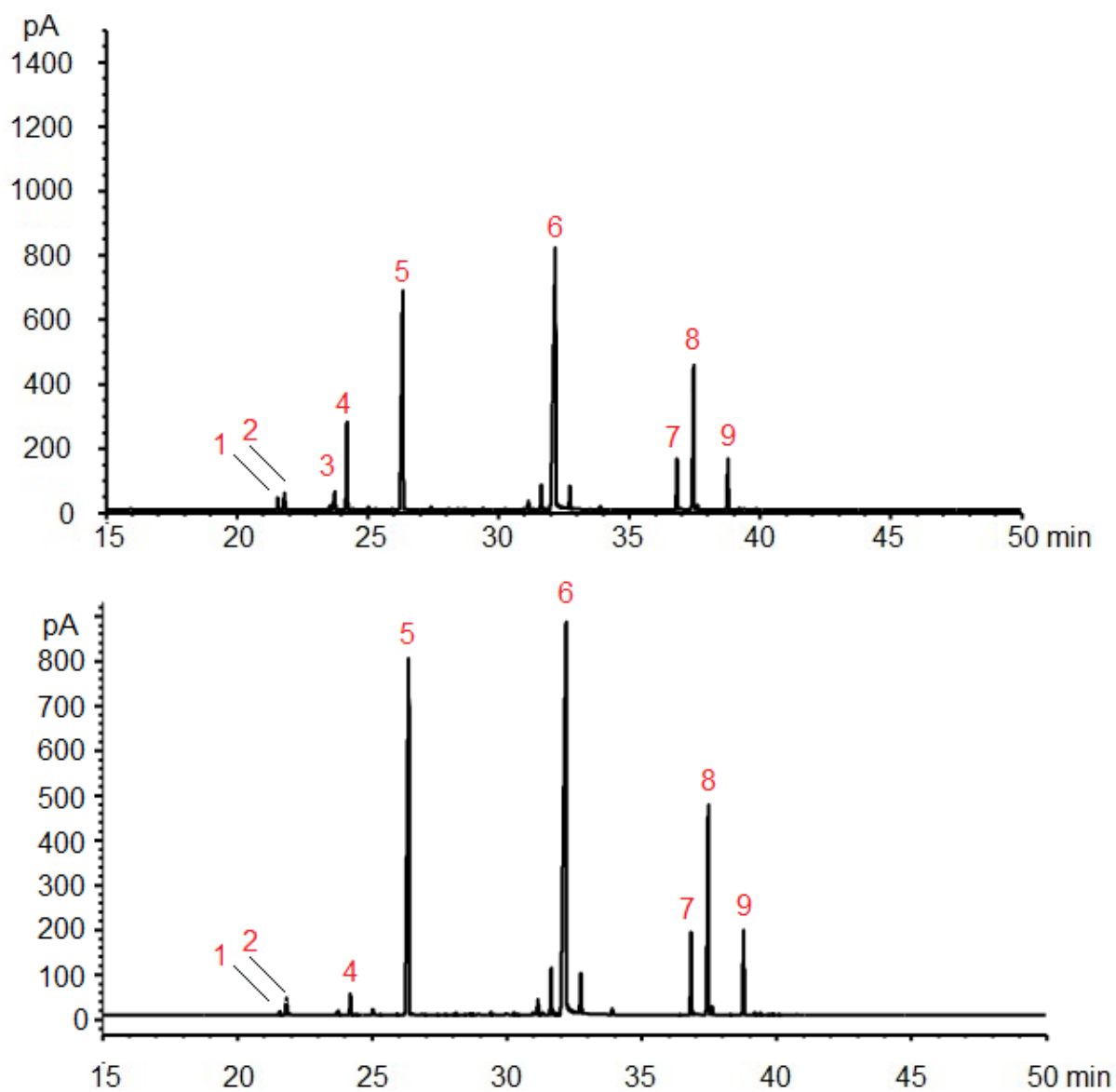


Figura 30. Cromatogramas de las fracciones F3 obtenidas en la destilación del AE de palmarrosa a presión de 12 mmHg (**Sección 3.3.2.**). 1. 6-Metil-5-hepten-2-ona, 2. β -Mirceno, 3. *cis*- β -ocimeno, 4. *trans*- β -ocimeno, 5. linalol, 6. geraniol, 7. Acetato de geranilo, 8. ISTD, 9. *trans*- β -Cariofileno.

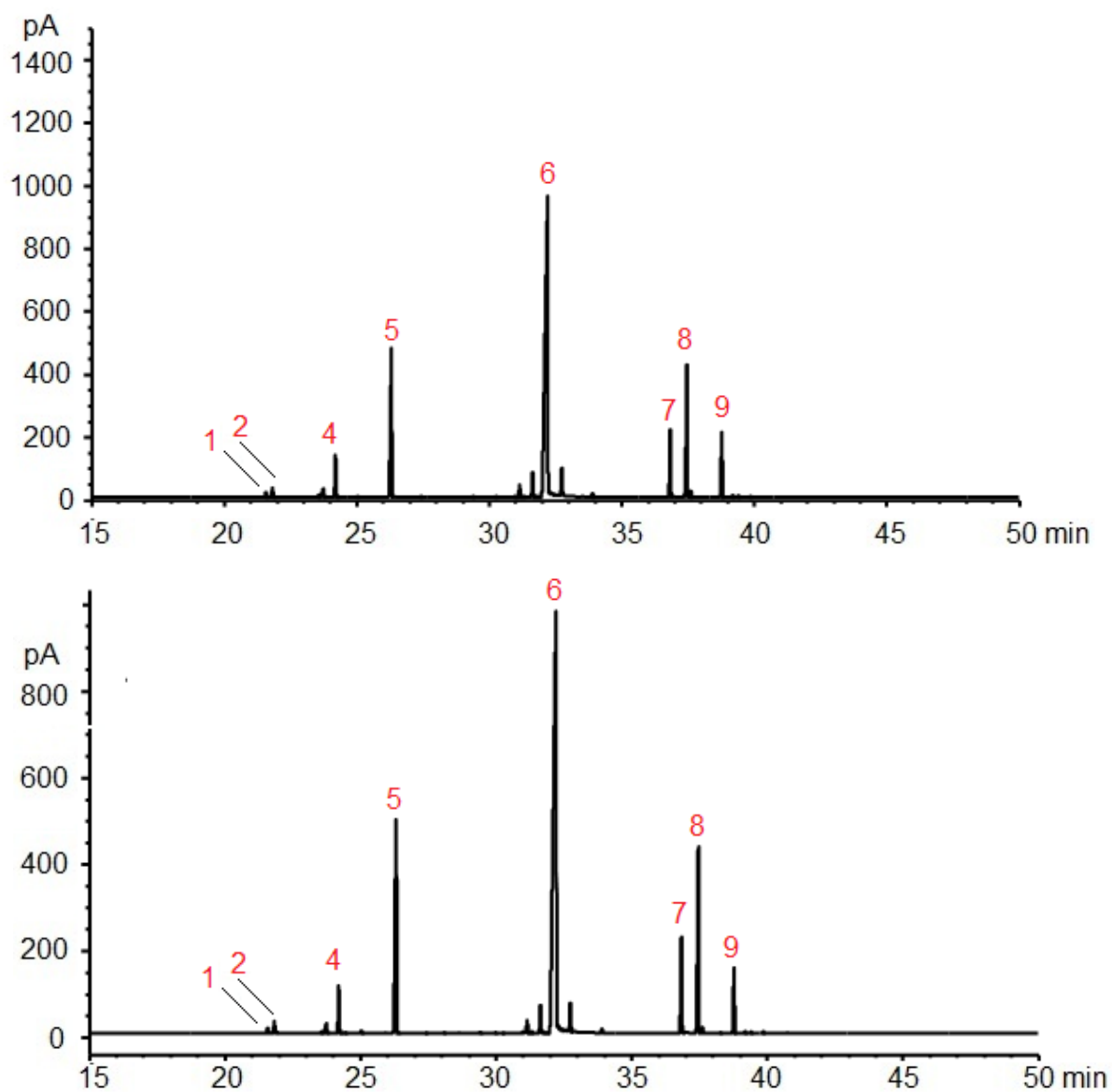


Figura 31. Cromatogramas de las fracciones F4 obtenidas en la destilación del AE de palmarrosa a presión de 12 mmHg (**Sección 3.3.2.**). 1. 6-Metil-5-hepten-2-ona, 2. β -Mirceno, 3. *cis*- β -ocimeno, 4. *trans*- β -ocimeno, 5. linalol, 6. geraniol, 7. Acetato de geranilo, 8. ISTD, 9. *trans*- β -Cariofileno.

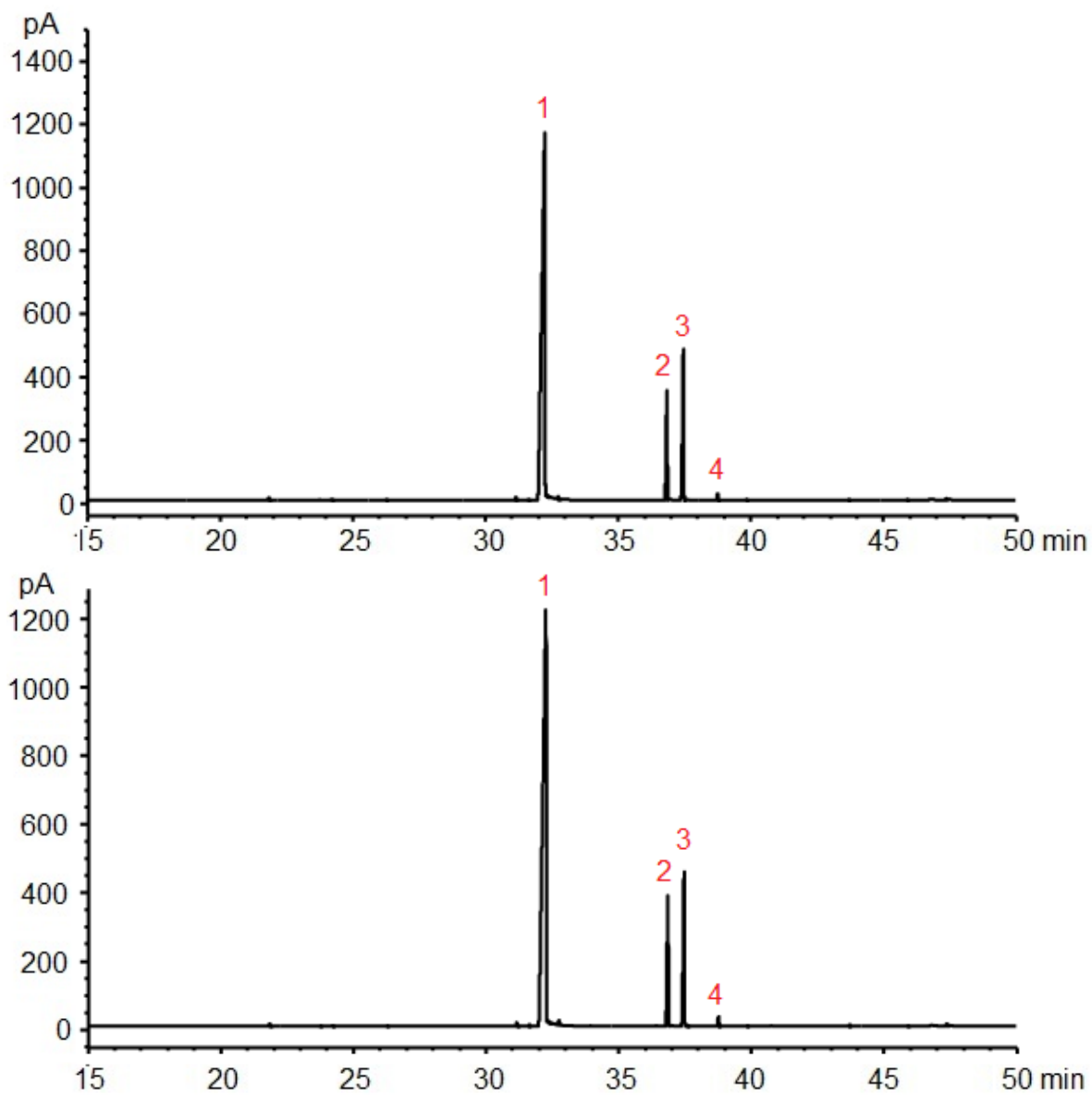


Figura 32. Cromatogramas de las fracciones FF obtenidas en la destilación del AE de palmarrosa a presión de 12 mmHg (**Sección 3.3.2.**). 1 geraniol, 2 acetato de geraniol, 3 ISTD, 4 *trans*- β -Cariofileno.