

**ANÁLISIS DE EXTRACTOS Y FRACCIONES VOLÁTILES OBTENIDOS DE
FLORES Y RIZOMAS DE *Hedychium coronarium* Köern (FAMILIA
ZINGIBERACEA).**

ALEJANDRO GARCÍA RÍOS, Químico.

**DIRECTORES: Elena E. Stashenko, Química, Ph. D.
Jairo R. Martínez, Químico, Ph. D.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
POSTGRADO EN QUÍMICA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE EXCELENCIA CENIVAM
BUCARAMANGA, 2008**

**ANÁLISIS DE EXTRACTOS Y FRACCIONES VOLÁTILES OBTENIDOS DE
FLORES Y RIZOMAS DE *Hedychium coronarium* Köern (FAMILIA
ZINGIBERACEA)**

ALEJANDRO GARCÍA RÍOS, Químico.

**Trabajo de investigación presentado
como requisito parcial para optar al
título de Magíster en Química.**

DIRECTORA: Elena E. Stashenko, Química, Ph. D.

Jairo R. Martínez, Químico, Ph. D.

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
POSGRADO EN QUÍMICA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE EXCELENCIA CENIVAM
BUCARAMANGA, 2008**

**A mis padres,
Al libertador,
Al pueblo.**

AGRADECIMIENTOS

A Dios.

A la Dra. Elena E. Stashenko por su acompañamiento, tenacidad, dedicación y sabiduría.

Al Dr. Jairo R. Martínez, por sus enseñanzas y recomendaciones en el desarrollo de esta investigación.

A mis padres y mis hermanos, ejemplos de vida. Por sus orientaciones y por depositar su confianza en mi.

A mis amigos y compañeros, por su colaboración y por los gratos momentos compartidos.

Al Laboratorio de Cromatografía y el Centro de Excelencia CENIAM, por brindar todos los recursos necesarios para realizar este trabajo de grado.

A COLCIENCIAS (contrato RC-432-2004) por su apoyo económico para la realización de esta investigación.

A todas las personas que de una u otra forma contribuyeron en el desarrollo de este proyecto.

Alejandro García

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN.	1
1 CIENCIOMETRÍA	3
1.1 Base de datos <i>Elsevier (Scopus)</i> y <i>Web of Science</i> .	3
1.1.1 <i>Hedychium coronarium</i> .	3
1.1.2 Recolección de compuestos volátiles de flores por HS-SPME.	8
2. ESTADO DEL ARTE	13
2.1 FLORES Y SUS ESTRUCTURAS.	13
2.1.1 Regulación temporal.	14
2.1.2 Regulación espacial.	15
2.2 CONSIDERACIONES SOBRE FRAGANCIAS FLORALES.	16
2.2.1 Biosíntesis de metabolitos secundarios volátiles.	19
2.3 <i>Hedychium coronarium</i> Köern.	22
2.4 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN, MUESTREO Y ANÁLISIS.	26
2.4.1 Técnicas de extracción.	27
2.4.2 Técnicas de <i>headspace</i> (HS) para el muestreo de compuestos volátiles.	31
2.4.3 Análisis cromatográficos.	35
3. PARTE EXPERIMENTAL	36
3.1 REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS.	36
3.2 CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA DE <i>H. coronarium</i> .	38
3.3 CULTIVO DE <i>H. coronarium</i> .	39
3.4 ANÁLISIS POR HS-SPME <i>IN VIVO</i> .	40
3.5 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE FLORES Y RIZOMAS DE <i>Hedychium coronarium</i> K.	41
3.5.1 Extracción con solventes.	42
3.5.2 Destilación-extracción simultánea con solvente.	43

3.5.3	Extracción con fluido supercrítico.	44
3.5.4	Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas.	45
3.6	MÉTODO RÁPIDO PARA EL ANÁLISIS <i>IN VITRO</i> DE VOLÁTILES EN FLORES DE <i>Hedychium coronarium</i>.	45
3.6.1	Método convencional para el análisis <i>in vitro</i> con HS-SPME.	45
3.6.2	Selección del dispositivo de muestreo.	47
3.6.3	Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas acoplada a microextracción en fase sólida en modo <i>headspace</i> .	48
3.6.4	Determinación de las figuras analíticas de mérito.	49
3.7	MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS DE ANÁLISIS.	50
3.7.1	Análisis de HS-SPME por GC-MS.	50
3.7.2	Cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo de masas (columna apolar).	51
3.7.3	Cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo de masas (columna polar).	52
3.7.4	Cromatografía de gases acoplada a detector de ionización en llama.	53
4.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	54
4.1	CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA DE <i>Hedychium coronarium</i>.	54
4.2	ANÁLISIS POR HS-SPME.	54
4.2.1	Análisis de flores <i>in vivo</i> .	54
4.2.2	Análisis por HS-SPME <i>in vitro</i> .	57
4.3	OBTENCIÓN DE EXTRACTOS Y ACEITES ESENCIALES DE FLORES DE <i>Hedychium coronarium</i>.	59
4.3.1	Análisis por GC-MS de concretos elaborados a partir de flores de <i>Hedychium coronarium</i> .	59
4.3.2	Análisis por GC-MS del extracto de las flores de	71

	<i>Hedychium coronarium</i> , obtenido por SDE.	
4.3.3	Análisis por GC-MS del extracto de las flores de <i>Hedychium coronarium</i> , obtenido por SFE.	76
4.4	OBTENCIÓN DE EXTRACTOS Y ACEITES ESENCIALES DE RIZOMAS DE <i>Hedychium coronarium</i>.	80
4.4.1	Análisis por GC-MS del aceite esencial de los rizomas de <i>Hedychium coronarium</i> , obtenido por MWHD.	80
4.4.2	Análisis por GC-MS del extracto de los rizomas de <i>Hedychium coronarium</i> , obtenido por SDE.	83
4.4.3	Análisis por GC-MS del extracto de los rizomas de <i>Hedychium coronarium</i> , obtenido por SFE.	87
4.4.4	Análisis de componentes principales para extractos y AE obtenidos de rizomas de <i>Hedychium coronarium</i> .	92
4.5	MÉTODO RÁPIDO PARA EL ANÁLISIS <i>IN VITRO</i> DE VOLÁTILES EN FLORES DE <i>Hedychium coronarium</i>.	93
4.5.1	Muestreo <i>in vitro</i> de flores de <i>Hedychium coronarium</i> .	93
4.5.2	Selección del dispositivo de muestreo.	95
4.5.3	Microextracción en fase sólida en modo <i>headspeace</i> asistida por la radiación de microondas (MWHD-HS-SPME).	98
4.5.4	Selección del tipo de fibra.	104
4.5.5	Selección del tiempo de radiación y potencia del horno microondas.	105
4.5.6	Selección del tiempo de exposición de la fibra y cantidad de muestra.	106
4.5.7	Determinación de las figuras analíticas de mérito.	110
5.	CONCLUSIONES	114
6.	RECOMENDACIONES	116
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117
	ANEXOS.	135

LISTADO DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Observables del estudio cuantitativo sobre <i>Hedychium coronarium</i> y volátiles en flores, aislados por HS-SPME.	12
Tabla 2. Clasificación de compuestos encontrados en fragancias florales.	18
Tabla 3. Generalidades de la biosíntesis de terpenos.	21
Tabla 4. Principales compuestos presentes en néctar y flores de <i>Hedychium coronarium</i> .	25
Tabla 5. Reactivos, materiales y equipos empleados.	36
Tabla 6. Composición de la fracción volátil, obtenida por HS-SPME <i>in vivo</i> de las flores de <i>H. coronarium</i> .	56
Tabla 7. Composición química, obtenida por GC-MS, de concretos aislados de <i>Hedychium coronarium</i> , por maceración y extracción con ultrasonido, usando tres diferentes solventes.	58
Tabla 8. Composición química, obtenida por GC-MS, del extracto aislado por SDE de las flores de <i>Hedychium coronarium</i> .	72
Tabla 9. Composición química, obtenida por GC-MS, del extracto aislado por SFE de las flores de <i>Hedychium coronarium</i> .	77
Tabla 10. Composición química, obtenida por GC-MS, del aceite esencial aislado por MWHD de los rizomas de <i>Hedychium coronarium</i> .	81
Tabla 11. Composición química, obtenida por GC-MS, del extracto aislado por SDE de los rizomas de <i>Hedychium coronarium</i> .	84
Tabla 12. Composición química, obtenida por GC-MS, del extracto aislado por SFE de los rizomas de <i>Hedychium coronarium</i> .	88
Tabla 13. Resultados del diseño experimental factorial multinivel 3 ² para tiempo de radiación y potencia de trabajo del MW.	105
Tabla 14. Coeficientes de la ecuación de regresión del modelo para	105

	tiempo de radiación y potencia de trabajo del MW.	
Tabla 15.	Resultados del diseño experimental factorial multinivel 3 ² para tiempo de exposición y cantidad de muestra.	106
Tabla 16.	Coeficientes de la ecuación de regresión del modelo para tiempo de exposición y cantidad de muestra.	107
Tabla 17.	Parámetros de extracción propuestos para el análisis de volátiles de flores de <i>H. coronarium</i> por MWHD-HS-SPME.	107
Tabla 18.	Composición química, obtenida por GC-MS, del extracto obtenido por MWHD-HS-SPME-GC-FID de las flores de <i>Hedychium coronarium</i> .	109
Tabla 19.	Linealidad y sensibilidad del método MWHD-HS-SPME.	110
Tabla 20.	Reproducibilidad del método MWHD-HS-SPME, según las áreas de los picos cromatográficos seleccionados.	111
Tabla 21.	Reproducibilidad del método MWHD-HS-SPME, según los tiempos de retención de los picos cromatográficos seleccionados.	111
Tabla 22.	Reproducibilidad de la muestra, según el área de los picos cromatográficos seleccionados.	112
Tabla 23.	Reproducibilidad de la muestra, según el tiempo de retención de los picos cromatográficos seleccionados.	112
Tabla 24.	Límites de detección y cuantificación para 1,8-cineol, γ -terpineno y linalol.	113
Tabla 25.	Cuantificación de 1,8-cineol, γ -terpineno y linalol en las flores de <i>Hedychium coronarium</i> .	113

LISTADO DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	Relación tipo - número de publicaciones sobre <i>Hedychium coronarium</i> .	4
Figura 2.	Relación año – número de publicaciones sobre <i>Hedychium coronarium</i> .	4
Figura 3.	Relación país - número de publicaciones sobre <i>Hedychium coronarium</i>	5
Figura 4.	Relación entre área de investigación y número de publicaciones sobre <i>Hedychium coronarium</i> .	6
Figura 5.	Relación entre revista y número de publicaciones sobre <i>Hedychium coronarium</i> .	7
Figura 6.	Relación oficina de patentes - número de patentes relacionadas con <i>Hedychium coronarium</i> .	7
Figura 7.	Relación tipo - número de publicaciones sobre volátiles de flores, aislados por HS-SPME.	8
Figura 8.	Relación año - número de publicaciones sobre volátiles de flores, aislados por HS-SPME.	9
Figura 9.	Relación entre país y número de publicaciones sobre volátiles de flores, aislados por HS-SPME.	9
Figura 10.	Relación entre número y área de publicación sobre volátiles de flores, aislados por HS-SPME.	10
Figura 11.	Relación entre revista y número de publicaciones sobre volátiles de flores, aislados por HS-SPME.	11
Figura 12.	Partes que conforman la mariposa blanca (flor <i>H. coronarium</i>).	14
Figura 13.	Microfotografía electrónica de la epidermis de una flor.	16
Figura 14.	Representación de los tipos de osmóforos identificados.	16
Figura 15.	Sustratos comunes para la biosíntesis de algunos terpenos.	19
Figura 16.	Principales sustratos para la síntesis de terpenos.	20

Figura 17.	Flores de <i>H. Coronarium</i> .	22
Figura 18.	Estructura química de isocoronarina D (Bislabdano).	24
Figura 19.	Estructura química del linalol.	26
Figura 20.	Proceso de obtención de concretos y absolutos a partir de flores.	28
Figura 21.	Dispositivo para SPME.	33
Figura 22.	Cultivo de <i>Hedychium coronarium</i> K. en el complejo industrial de CENIVAM.	39
Figura 23.	Análisis por HS-SPME <i>in vivo</i> .	40
Figura 24.	Proceso de obtención de concretos y absolutos.	42
Figura 25.	Esquema del equipo para SDE, empleado en el trabajo.	43
Figura 26.	Montaje de extracción con fluido supercrítico (CO ₂).	44
Figura 27.	Técnicas de HS-SDME y HS-SPME, asistidas por MW.	46
Figura 28.	Dispositivos probados para la extracción de volátiles de flores.	47
Figura 29.	Cromatógrafo de gases con detector selectivo de masas usado en la presente investigación (columna apolar).	52
Figura 30.	Cromatógrafo de gases con detector selectivo de masas usado en la presente investigación (columna polar).	53
Figura 31.	Cromatogramas típicos (GC-MS, TIC) de los volátiles emitidos por las flores de <i>H. coronarium</i> , a diferentes horas del día.	55
Figura 32.	Cromatograma (GC-MS, TIC) de los volátiles extraídos por HS-SPME, de una flor de <i>H. coronarium</i> .	57
Figura 33.	Volátiles emitidos por diferentes partes de flores de <i>H. coronarium</i> .	58
Figura 34.	Perfiles cromatográficos (GC-MS, TIC) de extractos florales de <i>H. coronarium</i> , obtenidos con éter de petróleo.	66
Figura 35.	Perfiles cromatográficos (GC-MS, TIC) de extractos florales de <i>H. coronarium</i> , obtenidos con hexano.	67
Figura 36.	Perfiles cromatográficos (GC-MS, TIC) de extractos florales	68

	de <i>H. coronarium</i> , obtenidos con acetato de etilo.	
Figura 37.	Relación entre el método de extracción y solvente empleado con la clase de compuestos aislados de las flores de <i>H. coronarium</i> .	69
Figura 38.	Perfil cromatográfico, obtenido por GC-MS, del extracto obtenido por SDE de flores de <i>Hedychium coronarium</i> .	71
Figura 39.	Perfil cromatográfico, obtenido por GC-MS, del extracto aislado por SFE de las flores de <i>Hedychium coronarium</i> .	76
Figura 40.	Perfiles cromatográficos, obtenidos por GC-FID, de los extractos aislados por HS-SPME, del gas de salida del equipo para SFE.	79
Figura 41.	Perfil cromatográfico (GC-MS, TIC) del aceite esencial de rizomas de <i>Hedychium coronarium</i> , obtenido por MWHD.	80
Figura 42.	Perfil cromatográfico, obtenido por GC-MS, del extracto aislado por SDE de los rizomas de <i>Hedychium coronarium</i> ,.	84
Figura 43.	Perfil cromatográfico, obtenido por GC-MS, del extracto aislado por SFE de los rizomas de <i>Hedychium coronarium</i> .	87
Figura 44.	Cantidades relativas de clase de compuestos extraídos, según método de rizomas de <i>Hedychium coronarium</i> .	91
Figura 45.	Análisis de componentes principales para los métodos de extracción empleados en rizomas de <i>Hedychium coronarium</i> .	92
Figura 46.	Cromatograma típico, obtenido por GC-FID, de la extracción por HS-SPME <i>in vitro</i> de las flores de <i>H. coronarium</i> .	93
Figura 47.	Perfiles cromatográficos, obtenidos por GC-FID, de extractos florales obtenidos por MWHD-HS-SDME o por MWHD-HS-SPME.	94
Figura 48.	Perfiles cromatográficos, obtenidos por GC-FID, de volátiles extraídos por MWHD-HS-SPME, de las flores de	96

	<i>Hedychium coronarium</i> , empleando diferentes dispositivos de muestreo.	
Figura 49.	Perfiles cromatográficos, obtenidos por GC-FID, de volátiles extraídos por SPME, de las flores de <i>Hedychium coronarium</i> , empleando fibras con diferente recubrimiento.	98
Figura 50.	Perfiles cromatográficos, obtenidos por GC-FID, de los extractos aislados por MWHD-HS-SPME, de diferentes cantidades de flores de <i>Hedychium coronarium</i> .	99
Figura 51.	Perfiles cromatográficos, obtenidos por GC-FID, de extracciones por MWHD-HS-SPME, en diferente tiempo de exposición de la fibra.	101
Figura 52.	Perfiles cromatográficos, obtenidos con GC-FID, de la extracción por MWHD-HS-SPME, de volátiles de flores de <i>Hedychium coronarium</i> , empleando diferente volumen de agua.	102
Figura 53.	Perfiles cromatográficos, obtenidos por GC-FID, de la destilación de flores de <i>Hedychium coronarium</i> , usando diferentes porcentajes de sal.	103
Figura 54.	Extracción por MWHD-HS-SPME, empleando fibras con diferente recubrimiento.	104
Figura 55.	Perfil cromatográfico de flores frescas de <i>Hedychium coronarium</i> , obtenido por el método MWHD-HS-SPME-GC-FID en columna apolar DB-5.	108

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AE	Aceite(s) esencial(es).
A	Alifático(s).
B	Bencenoide(s).
CV	Coefficiente de variación.
D.I.	Diámetro interno, mm.
d_f	Espesor de la fase estacionaria, µm.
DTD	<i>Direct Thermal Desorption</i> (Desorción térmica directa).
e.g.	<i>Exempli gratia</i> (Por ejemplo).
eV	Electrón – Voltio.
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases o cromatógrafo de gases, según el contexto).
GC – FID	<i>Gas Chromatography with Flame Ionization Detector</i> (Cromatografía de gases con detector de ionización en llama).
GC – MS	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas).
GC – NPD	<i>Gas Chromatography-Nitrogen Phosphorus Detector</i> (Cromatografía de gases con detector de nitrógeno – fósforo).
<i>H. coronarium</i>	<i>Hedychium coronarium</i> .
HD	Hidrodestilación.
HP	<i>Hewlett-Packard</i> .
HRGC	<i>High Resolution Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases de alta resolución).
HS	<i>Headspace</i> (Espacio de cabeza).
HS-SDME	<i>Headspace Single Droop Microextraction</i> (Microextracción en fase líquida en el modo <i>headspace</i>).
HS-SPME	<i>Headspace Solid - Phase Microextraction</i> (Microextracción en fase sólida en el modo <i>headspace</i>).

<i>i.e.</i>	<i>Id ets</i> (Es decir, osea).
I_k	Índice de retención de Kováts.
<i>Istd</i>	<i>Internal standard</i> (Estándar interno).
LDO	<i>Limit of Detection</i> (Límite de detección).
LQO	<i>Limit of Quantification</i> (Límite de cuantificación).
M	Hidrocarburo(s) monoterpénico(s).
<i>m/z</i>	Relación masa carga.
MO	Monoterpeno(s) oxigenado(s).
MS	<i>Mass Spectrum, Mass Spectra, Mass Spectrometry</i> (Espectro(s) de masas o Espectrometría de masas, según el contexto).
MSD	<i>Mass spectrometric Detector</i> (Detector selectivo de masas).
MW	<i>Microwave</i> (Microondas u horno microondas), según el contexto.
MWHD	<i>Microwave - Assisted Hydro - Destillation</i> (Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas).
MWHD-HS-SPME	<i>Headspace Solid - Phase Microextraction Microwave - Assisted Hydro - Destillation</i> (Microextracción en fase sólida en el modo <i>headspace</i> asistida por la radiación de microondas).
P & T	<i>Purge and trap</i> (Purga y trampa).
PA	Poliacrilato.
PDMS	Poli(dimetilsiloxano).
PDMS/DVB	Poli(dimetilsiloxano)/Divinilbenceno.
ppm	Partes por millón.
S	Hidrocarburo(s) sesquiterpénico(s).
SDE	<i>Simultaneous Distillation- Solvent Extraction</i> (Destilación-extracción simultánea con solvente).
SDME	<i>Single Droop Microextraction</i> (Microextracción en fase líquida).
SFE	<i>Supercritical Fluid Extraction</i> (Extracción con fluido

	supercrítico).
SO	Sesquiterpeno(s) oxigenado(s).
t_R	Tiempo de retención (min).
t_{RR}	Tiempo de retención relativo (min).
TIC	<i>Total Ion Current</i> (Corriente iónica total).

RESUMEN

TÍTULO: ANÁLISIS DE EXTRACTOS Y FRACCIONES VOLÁTILES OBTENIDOS DE FLORES Y RIZOMAS DE *Hedychium coronarium* Köern (FAMILIA ZINGIBERACEA).*

Autores: Alejandro García Ríos **

Palabras clave: HS-SPME, MWHD, SDE, SFE, GC-FID/MS, volátiles, flores, *H. coronarium*.

Se estudió la composición química de los metabolitos secundarios presentes en flores y rizomas de *Hedychium coronarium* Köern, caracterizada taxonómicamente. Para aislar los compuestos volátiles de flores y rizomas se emplearon métodos de extracción, *i.e.* hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD), destilación-extracción simultánea con solvente (DES), extracción con fluidos supercríticos (SFE) y microextracción en fase sólida en modo *headspace* (HS-SPME). Para la comparación de los métodos de extracción y análisis de fracciones volátiles de *H. coronarium*, se empleó cromatografía de gases de alta resolución (HRGC), acoplada a los detectores de ionización en llama (FID) o espectrométrico de masas (MSD). Finalmente, se establecieron algunas figuras analíticas de mérito para este método, usando curvas de calibración.

La emisión de volátiles en la especie *H. coronarium*, monitoreada por HS-SPME *in vivo*, aumentó al atardecer y permaneció durante las horas de la noche. Se obtuvieron 103 metabolitos secundarios volátiles y semivolátiles de *H. coronarium*. En las flores los compuestos mayoritarios, fueron β -pineno (19%), (E)- β -cariofileno (9%), α -pineno (8%), 1,8-cineol (6%), óxido de cariofileno (6%), (E)- β -ocimeno (3%), sabineno (3%), α -humuleno (3%), linalol (3%) y (E)-isoeugenol (2%). En los rizomas los compuestos mayoritarios, fueron, 1,8-cineol (28%), β -pineno (17%), α -pineno (9%), alcanfor (8%), α -terpineol (7%), (E)-*p*-ment-2-en-1-ol (3%), terpinen-4-ol (3%), sabineno (3%) y δ -terpineol (2%).

El método de extracción por MWHD-HS-SPME acortó 60 min el tiempo de muestreo y análisis, en comparación con la extracción por HS-SPME con calentamiento convencional. Además, permitió la obtención de un perfil cromatográfico, similar al de los perfiles logrados para las extracciones por HS-SPME (*in vivo* e *in vitro*) y por SDE. Los resultados obtenidos, permitieron un conocimiento más detallado de la planta y sus metabolitos volátiles.

* Trabajo de Maestría en Química.

** Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química.
Directores: Elena E. Stashenko y Jairo R. Martínez.

ABSTRACT

TITLE: ANALYSIS EXTRACTS AND VOLATILE FRACTIONS OBTAIN FROM FLORIDA AND RHIZOMES *HEDYCHIUM CORONARIUM* KÖERN (FAMILY ZINGIBERACEA).*

Authors: Alejandro García Ríos **

Keywords: HS-SPME, MWHD, SDE, SFE, GC-FID/MS, volatile, flowers, *H. coronarium*.

Studied the chemical composition of secondary metabolites present in flowers and roots of *Hedychium coronarium* Köern characterized taxonomically. To isolate the volatile compounds from flowers and rhizomes extraction methods were used, ie. hidrodestilación assisted by microwave radiation (MWHD), distillation- extraction simultaneous solvent (DES), supercritical fluid extraction (SFE) and headspace solid phase microextracción (HS-SPME). To compare the methods of extraction and analysis of volatile fractions of *H. coronarium*, using gas chromatography high-resolution (HRGC), coupled to a flame ionization detectors (FID) or mass spectrometry (MSD). Finally, settled some analytical figures of merit for this method, using calibration curves.

The emission of volatile in *H. coronarium*, monitored by HS-SPME in vivo, increased at dusk and stayed for hours of the night. There were 103 secondary metabolites volatile and semivolatile *H. coronarium* flowers, major components were β -pinene (19%), (E)- β -cariophyllene (9%), α -pinene (8%), 1,8-cyneole (6%), óxido de cariofillene (6%), (E)- β -ocimene (3%), sabinene (3%), α -humuleno (3%), linalool (3%) y (E)-isoeugenol (2%). In rhizomes, majority compounds were, 1,8-cineole (28%), β -pinene (17%), α -pinene (9%), camphor (8%), α -terpineole (7%), (E)-*p*-ment-2-en-1-ol (3%), terpinen-4-ol (3%), sabinene (3%) y δ -terpineol (2%).

The extraction method MWHD-HS-SPME shortened 60 min time sampling and analysis, compared with extraction HS-SPME with conventional heating. In addition, allowed obtaining a chromatographic profile similar to profiles for withdrawals made by HS-SPME (in vivo and in vitro) and BDS. The results enabled a more detailed knowledge of the plant and its metabolites volatile.

* Trabajo de Maestría en Química.

** Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química.
Directores: Elena E. Stashenko y Jairo R. Martínez.

I. INTRODUCCIÓN

Las flores poseen estructuras especializadas donde se almacenan mezclas de compuestos orgánicos volátiles en concentraciones estequiométricas específicas, responsables de sus peculiares y fascinantes fragancias. Estas fragancias son de gran importancia en la industria, principalmente cosmética, donde, viene en aumento, la demanda de productos naturales de este tipo, que cumplan con los estándares de calidad y pureza. Por tal motivo, el cultivo y prospección de flores ha llegado a convertirse en región importante en la economía de algunos países. Paralelamente, las técnicas instrumentales de extracción y análisis de fragancias florales se mejoran, para facilitar el estudio de los metabolitos secundarios volátiles emanados de las flores.

Teniendo en cuenta la volatilidad y posible degradación térmica de los compuestos contenidos en las flores, es importante encontrar un método que permita conocer de manera rápida y completa los compuestos responsables de la fragancia. El método debe reproducir la clase y relación de compuestos emitidos por la planta *in vivo* y facilitar la evaluación de diferentes especies en el tiempo más corto posible. Estos resultados deben relacionarse con los obtenidos por otros métodos de extracción, e.g. los empleados para aislar concretos y absolutos de flores, a nivel industrial.

En esta investigación, se estudió la composición química de los metabolitos secundarios presentes en flores y rizomas de *Hedychium coronarium* Kœrn, caracterizada taxonómicamente, por el Dr. J. Betancur, en el Herbario Nacional Colombiano. Para aislar los compuestos volátiles de flores y rizomas se emplearon métodos de extracción, i.e. hidrodestilación asistida

por la radiación de microondas (MWHD), destilación-extracción simultánea con solvente (DES), extracción con fluidos supercríticos (SFE) y microextracción en fase sólida en modo *headspace* (HS-SPME). Para la comparación de los métodos de extracción y análisis de fracciones volátiles de *H. coronarium*, se empleó cromatografía de gases de alta resolución (HRGC), acoplada a los detectores de ionización en llama (FID) o espectrométrico de masas (MSD). Los resultados obtenidos, permitieron un conocimiento más detallado de la planta y sus metabolitos volátiles.

El presente trabajo, consta de un análisis cuantitativo, seguido de un marco teórico sobre las flores y sus estructuras, los compuestos volátiles que conforman las fragancias florales y los métodos empleados para su extracción y análisis, luego, se detallan la metodología empleada y los resultados obtenidos, por último, se hacen las conclusiones y recomendaciones pertinentes. Además, contiene 23 tablas, 55 figuras y 128 referencias bibliográficas. Los resultados parciales de este trabajo de investigación fueron presentados en el Congreso Colombiano de Fitoquímica (Pereira, mayo de 2007).

De este modo, se logró contribuir al trabajo que ha venido desarrollando el Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander y el Centro de Investigación de Excelencia – CENIVAM, que enfoca sus esfuerzos investigativos hacia el desarrollo de la agroindustria de especies aromáticas y vegetales tropicales de interés económico para el país.

1. CIENCIOMETRÍA

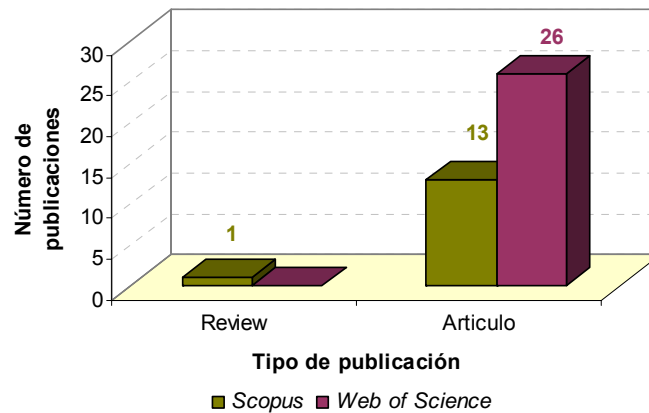
Con el fin de observar la novedad y conveniencia de la investigación a realizar, se desarrolla un análisis cuantitativo completo; en éste trabajo, se utilizaron dos bases de datos, *Elservier (Scopus)* y *Web of Science (ISI Web of Knowledge, Thomson, Versión 3.0)*. Por medio de la cuantimetría, se logró detectar los países, investigadores, áreas de investigación, tipo de publicaciones, entre otros, relacionados con el campo de desarrollo de métodos para el análisis de compuestos volátiles en flores, principalmente, empleando la técnica de microextracción en fase sólida en modo *headspace* (HS-SPME).

1.1 Base de datos *Elservier (Scopus)* y *Web of Science*.

1.1.1 *Hedychium coronarium*. Tras realizar el análisis cuantitativo sobre la especie *Hedychium coronarium*, se observó que es una planta poco estudiada en comparación con otras especies de la misma familia Zingiberaceae, ha sido estudiada principalmente en el Oriente asiático, región de la cual es originaria, y la mayoría de las publicaciones encontradas son artículos.

Se encontraron 26 artículos utilizando la base de datos *Web of Science*, en comparación con la de *Scopus* (13) (**Figura 1**), lo cual indica que aunque son pocas las investigaciones realizadas, éstas se encuentran reportadas en bases de datos más especializadas, como *Web of Science*.

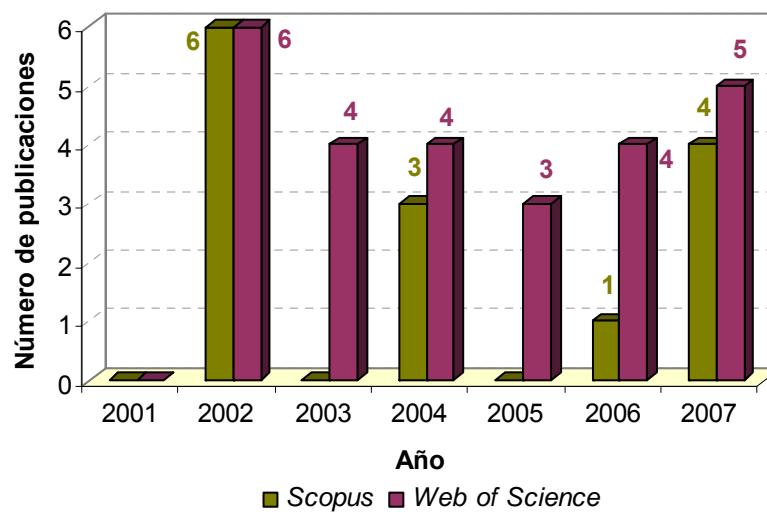
Figura 1. Relación tipo - número de publicaciones sobre *Hedychium coronarium*.



Fuente: Elsevier Scopus y Web of Science. Periodo de observación: 2001-2007.
 Fecha de consulta: 30 de noviembre de 2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY(Hedychium coronarium) AND PUBYEAR AFT 2000.

Durante los últimos siete años la tendencia investigativa sobre esta planta ha sido “estable”, con un aumento leve de publicaciones en los años 2006 y 2007 (**Figura 2**).

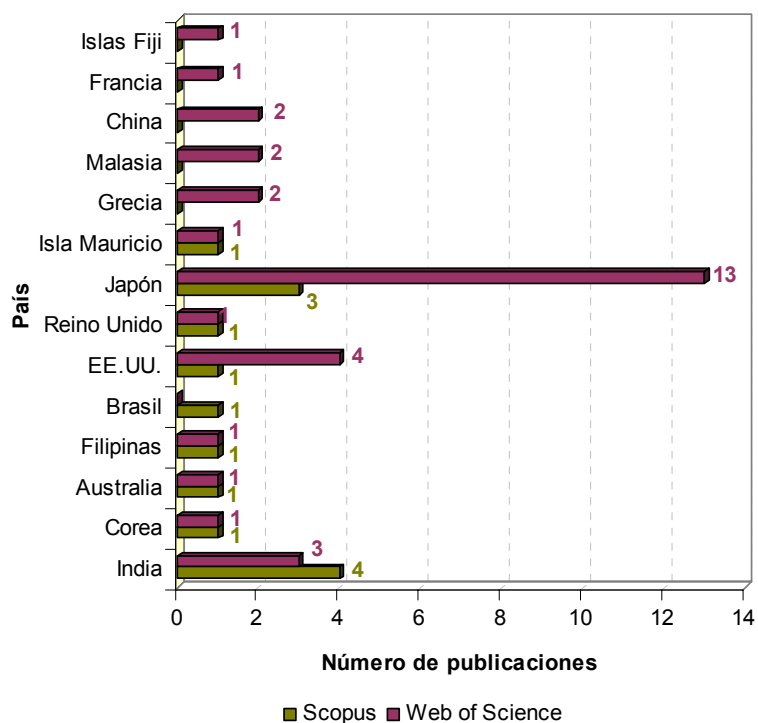
Figura 2. Relación año – número de publicaciones sobre *Hedychium coronarium*.



Fuente: Elsevier Scopus y Web of Science. Periodo de observación: 2001-2007.
 Fecha de consulta: 30 de noviembre de 2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (Hedychium coronarium) AND PUBYEAR AFT 2000.

El país con mayor número de publicaciones sobre esta planta es Japón (13), seguido de los Estados Unidos e India. Se debe anotar que, sobre esta especie, que es ampliamente distribuida en Centro y Sur América, sólo se registra una publicación proveniente de Brasil.

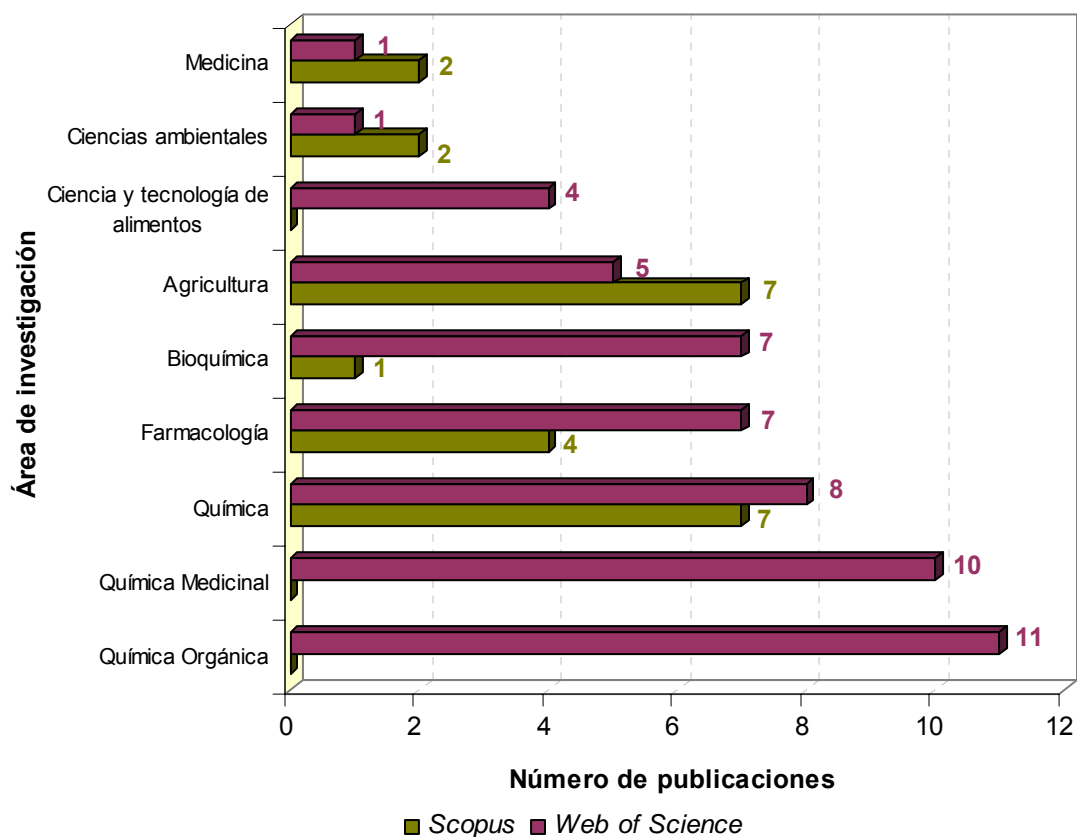
Figura 3. Relación país - número de publicaciones sobre *Hedychium coronarium*.



Fuente: Elsevier Scopus y Web of Science. Periodo de observación: 2001-2007.
 Fecha de consulta: 30 de noviembre de 2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY(Hedychium coronarium) AND PUBYEAR AFT 2000.

En general, se puede concluir, que el área con mayor número de publicaciones sobre la planta *Hedychium coronarium* es la química orgánica, seguida de las áreas de medicina, bioquímica y farmacología (Figura 4). Se atribuye este enfoque al contenido de compuestos tipo labdano, que fueron encontrados en los rizomas, los cuales han presentado actividad anticancerígena [39, 74, 113].

Figura 4. Relación entre área de investigación y número de publicaciones sobre *Hedychium coronarium*.

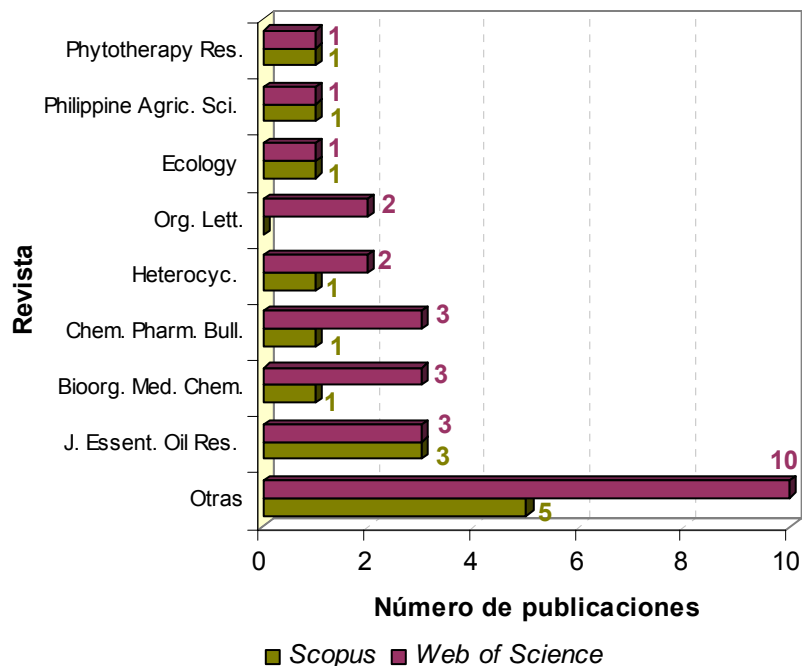


Fuente: Elsevier Scopus y Web of Science. Periodo de observación: 2001-2007.

Fecha de consulta: 30 de noviembre de 2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY(Hedychium coronarium) AND PUBYEAR AFT 2000.

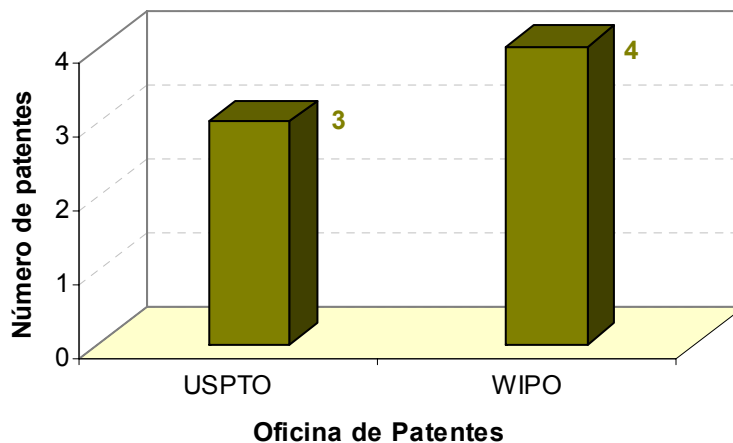
Las revistas, que publican los artículos relacionados con la planta son de áreas de química orgánica, productos naturales y medicina, destacando el *Journal of Essential Oil Research*, con 3 publicaciones (**Figura 5**). Relacionadas con *Hedychium coronarium*, se encuentran pocas patentes, siendo la *World Intellectual Property Organization* la oficina con mayor número de patentes (**Figura 6**). Estas patentes están dirigidas hacia la elaboración de extractos de *Hedychium coronarium*, los cuales se emplean en fármacos para la prevención del cáncer.

Figura 5. Relación entre revista y número de publicaciones sobre *Hedychium coronarium*.



Fuente: Elsevier Scopus y Web of Science. Periodo de observación: 2001-2007. Fecha de consulta: 30 de noviembre de 2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY(Hedychium coronarium) AND PUBYEAR AFT 2000.

Figura 6. Relación oficina de patentes - número de patentes relacionadas con *Hedychium coronarium*.

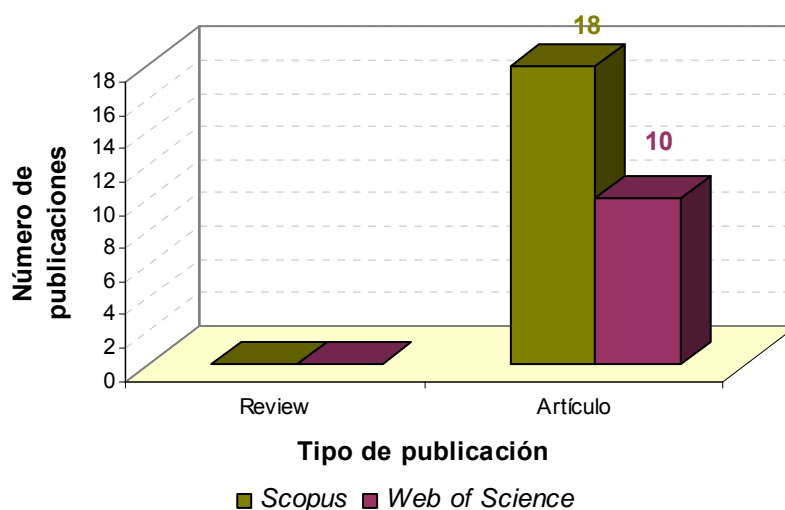


Fuente: Elsevier Scopus. Periodo de observación: 2001-2007. Fecha de consulta: 30 de noviembre de 2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY(Hedychium coronarium) AND PUBYEAR AFT 2000.

1.1.2 Recolección de compuestos volátiles de flores por HS-SPME. La ecuación de búsqueda con base en palabras clave “*Hedychium coronarium*” y “HS-SPME”, empleada inicialmente, no produjo ningún resultado. Se realizó una búsqueda exhaustiva de artículos, *reviews* y patentes, con el fin de conocer el estado actual de las investigaciones sobre compuestos volátiles de flores, que emplean técnicas de *headspace* y SPME, que permitió una visión global sobre la pertinencia de esta investigación.

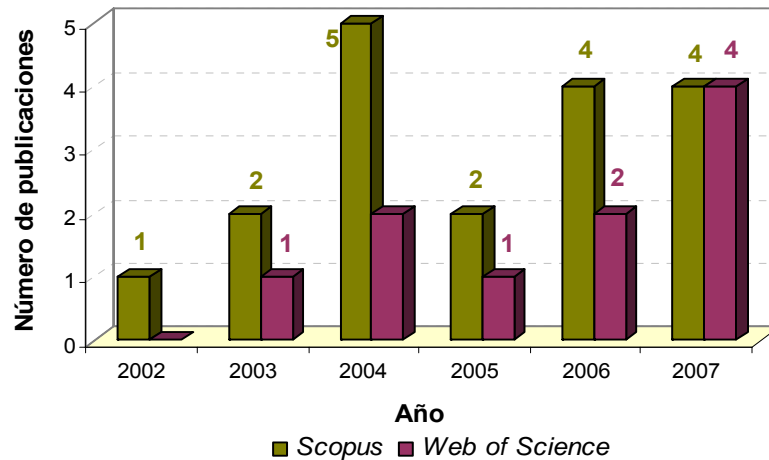
En contraste con la búsqueda realizada sobre *H. coronarium*, la base de datos que arrojó mayor cantidad de publicaciones sobre análisis de flores empleando HS-SPME, durante el periodo de observación de 2001-2007, fue *Scopus* (**Figura 7**). Cabe resaltar, que el uso de la técnica HS-SPME para el análisis de fragancias florales ha presentado tendencia creciente (**Figura 8**), siendo uno de los métodos más empleados para este fin, no obstante, aún no se reportan *reviews* sobre el tema.

Figura 7. Relación tipo - número de publicaciones sobre volátiles de flores, aislados por HS-SPME.



Fuente: *Elsevier Scopus* y *Web of Science*. Periodo de observación: 2001-2007. Fecha de consulta: 30 de noviembre de 2007. Ecuación de búsqueda: (TITLE-ABS-KEY(flower) AND TITLE-ABS-KEY(hs-spme)) AND PUBYEAR AFT 2000.

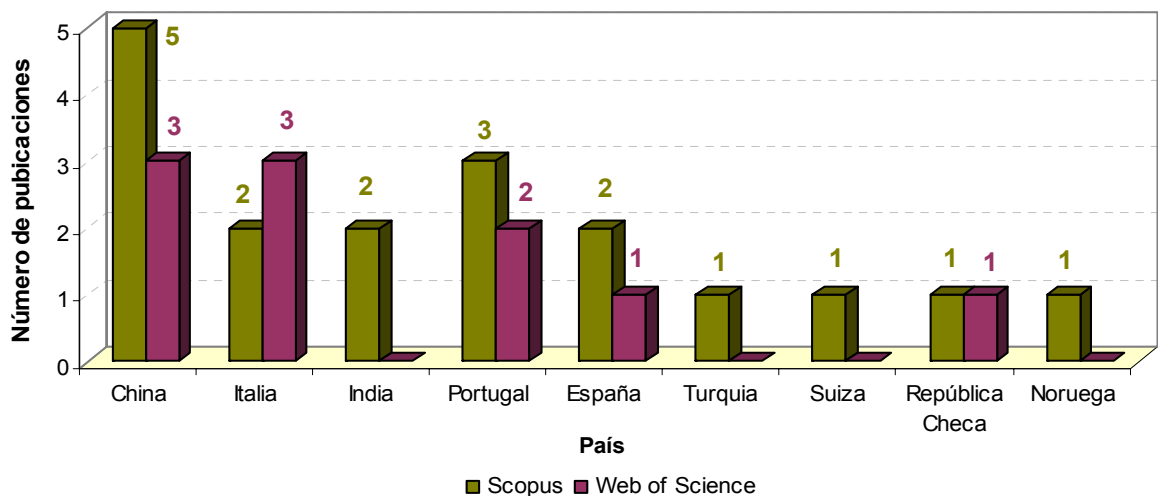
Figura 8. Relación año - número de publicaciones sobre volátiles de flores, aislados por HS-SPME.



Fuente: Elsevier Scopus y Web of Science. Periodo de observación: 2001-2007.
 Fecha de consulta: 30 de noviembre de 2007. Ecuación de búsqueda: (TITLE-ABS-KEY(flower) AND TITLE-ABS-KEY(hs-spme)) AND PUBYEAR AFT 2000.

El país con mayor número de publicaciones sobre este tema es China, seguida de Italia y Portugal (**Figura 9**).

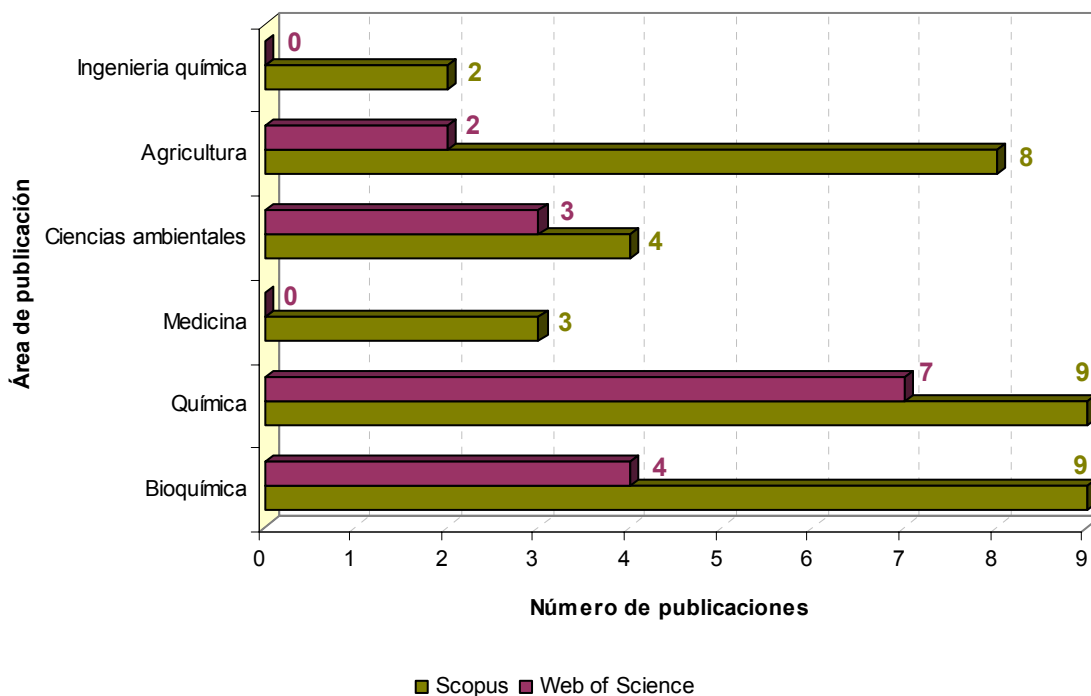
Figura 9. Relación país - número de publicaciones sobre volátiles de flores, aislados por HS-SPME.



Fuente: Elsevier Scopus y Web of Science. Periodo de observación: 2001-2007.
 Fecha de consulta: 30 de noviembre de 2007. Ecuación de búsqueda: (TITLE-ABS-KEY(flower) AND TITLE-ABS-KEY(hs-spme)) AND PUBYEAR AFT 2000.

Los estudios sobre el análisis de volátiles de flores empleando HS-SPME se encuentran en diversas áreas del conocimiento, a saber: bioquímica, química y agricultura (Figura 10).

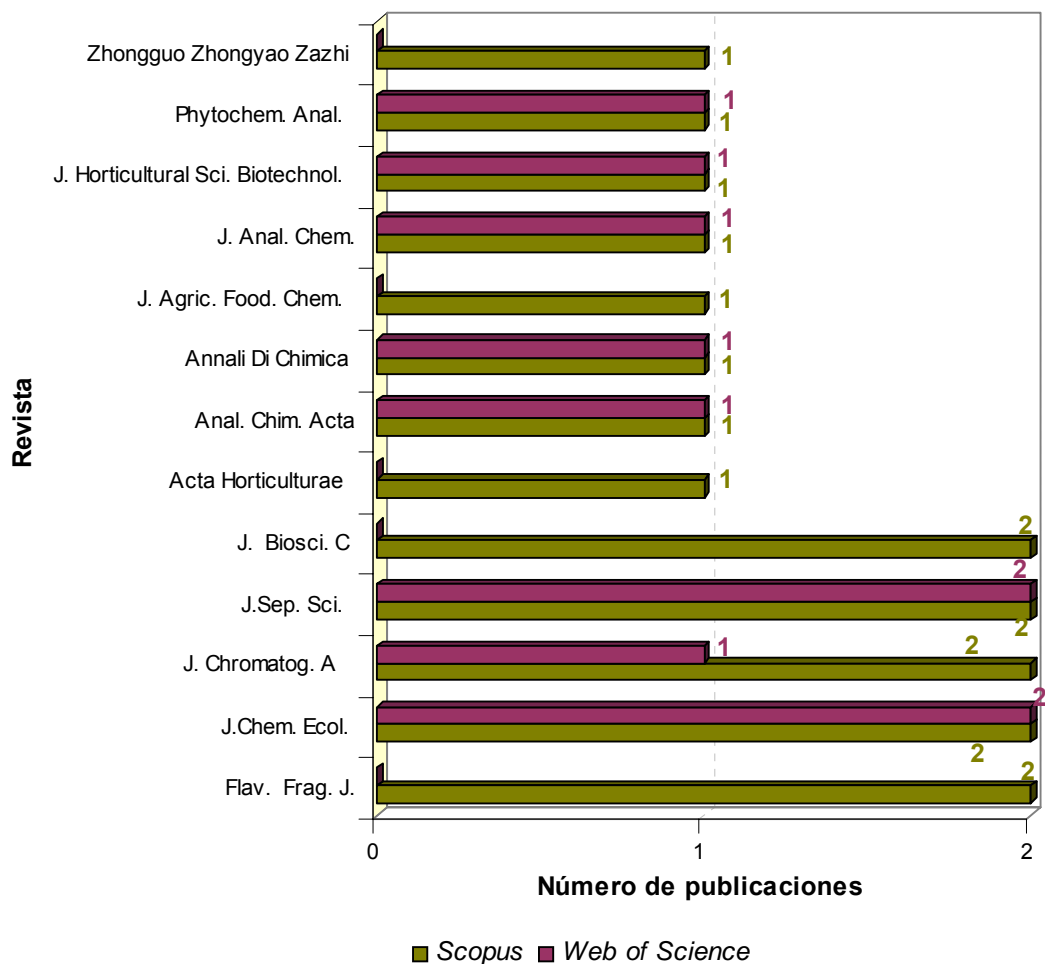
Figura 10. Relación entre número y área de publicación sobre volátiles de flores, aislados por HS-SPME.



Fuente: Elsevier Scopus y Web of Science. Periodo de observación: 2001-2007. Fecha de consulta: 30 de noviembre de 2007. Ecuación de búsqueda: (TITLE-ABS-KEY(flower) AND TITLE-ABS-KEY(hs-spme)) AND PUBYEAR AFT 2000.

La mayoría de los artículos encontrados, se enfocan en el análisis de la composición de la fragancia de flores, por tal razón, se encuentran publicados en revistas en el área de química analítica, como son: *Journal of Analytical Chemistry*, *Journal of Chromatography* y *Journal of Separation Science* (Figura 11).

Figura 11. Relación entre revista y número de publicaciones sobre volátiles de flores, aislados por HS-SPME.



Fuente: Elsevier Scopus y Web of Science. Periodo de observación: 2001-2007.
 Fecha de consulta: 30 de noviembre de 2007. Ecuación de búsqueda: (TITLE-ABS-KEY(flower) AND TITLE-ABS-KEY(hs-spme)) AND PUBYEAR AFT 2000.

A continuación, en la **Tabla 1** se muestra un cuadro-resumen con los resultados obtenidos del estudio cuantitativo sobre *Hedychium coronarium* y flores - HS-SPME.

Tabla 1. Observables del estudio cuantitativo sobre *Hedychium coronarium* y volátiles en flores, aislados por HS-SPME.

Observable	<i>Hedychium coronarium</i>		Flores - HS-SPME	
	Scopus	Web of Science	Scopus	Web of Science
Número de publicaciones	14	26	18	10
Principales áreas de conocimiento	Agricultura Química Farmacología	Química orgánica Medicina Farmacología	Bioquímica Química Agricultura	Química Bioquímica Ciencias ambientales
Revistas de mayor número de publicaciones	<i>J. Essent. Oil Res., Bioorg. Med. Chem. y Chem. Pharm. Bull.</i>		<i>Flav. Frag. J., J. Chromatog. A y J.Sep. Sci.</i>	
Países	Japón India EE.UU.	Japón EE.UU. India	China Portugal España	China Italia Portugal
Oficinas de patentes:				
- USPTO	3	-	-	-
- WIPO	4	-	-	-

2. ESTADO DEL ARTE

Las flores son las estructuras vegetales que probablemente más fascinación han despertado en el hombre, ya por su diversidad y belleza, como por su agradable fragancia. De tal gusto, el hombre ha extraído, procesado y empleado las fragancias florales y sus derivados hemisintéticos, para múltiples aplicaciones a nivel social e industrial [98]. Por tal motivo, ha sido necesario para los investigadores diseñar metodologías para el análisis y estudio completo de las fragancias y compuestos afines contenidos en las flores. Microscopios de alta resolución, nuevas estrategias de exploración genética y novedosos equipos analíticos para la investigación química, son algunas de las herramientas que contribuyen a mejorar las metodologías para estudiar la biosíntesis y la composición de las fragancias florales.

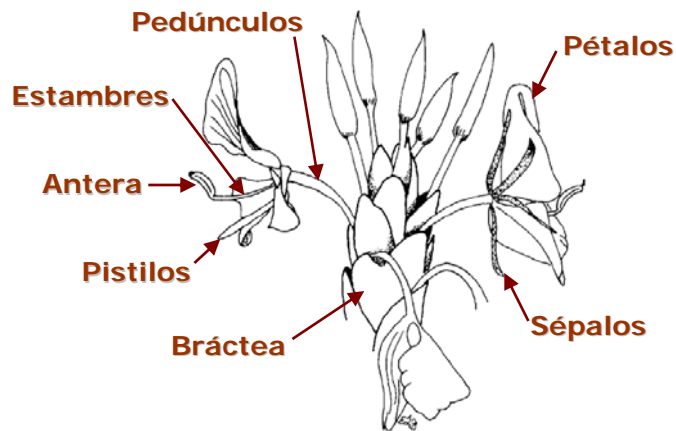
2.1. FLORES Y SUS ESTRUCTURAS.

Las flores son órganos vegetales que sólo se presentan en plantas angiospermas; éstas poseen fragancias florales denominadas aceites esenciales, concretos o absolutos, según el método empleado para su extracción. Las fragancias se caracterizan por contener *bouquets* complejos de compuestos químicos volátiles, con proporciones estequiométricas específicas, que determinan su carácter [98, 122] al mismo tiempo que aseguran la atracción de polinizadores [65, 99, 119].

Las principales estructuras florales son los pétalos, sépalos, pedúnculos, estambres, pistilos, ovarios y corona (**Figura 12**). Estas diferentes partes de la flor pueden difundir variadas mezclas de compuestos aromáticos, emitir aroma en un determinado momento del día o no presentar olor alguno, indicando que en las plantas, existe una regulación temporal y espacial sobre

la producción de fragancias dentro de la flor, entre flores de la misma planta, entre plantas y poblaciones [41, 88,90].

Figura 12. Partes que conforman la mariposa blanca (flor *H. coronarium*).



2.1.1 Regulación temporal. En muchas flores se observa el incremento del contenido de compuestos aromáticos durante los primeros estados de desarrollo de la flor, el cual llega a ser máximo y característico, durante la *anthesis* (periodo de máxima apertura y función de las flores) [99, 119, 124]. Luego, el contenido disminuye dramáticamente, porque ya la flor fue fertilizada [82] o comenzó a marchitarse. Esta regulación es principalmente dada por expresión genética, sin embargo, la carencia de una enzima (más si es sustrato-específica), la insuficiencia de sustrato [34] o la falta de herramientas celulares adecuadas [37, 85], ocasionan la nula o baja producción y emisión de fragancias.

Los niveles individuales de compuestos volátiles son independientemente regulados durante el desarrollo de la flor [80, 98]. Para Tholl *et al.* [115], la emisión de fragancias en plantas y flores puede cambiar rítmicamente durante un período de 24 h, permanecer en un rango constante, aumentar en el día un grupo de compuestos y otro diferente en la noche [72], e incluso,

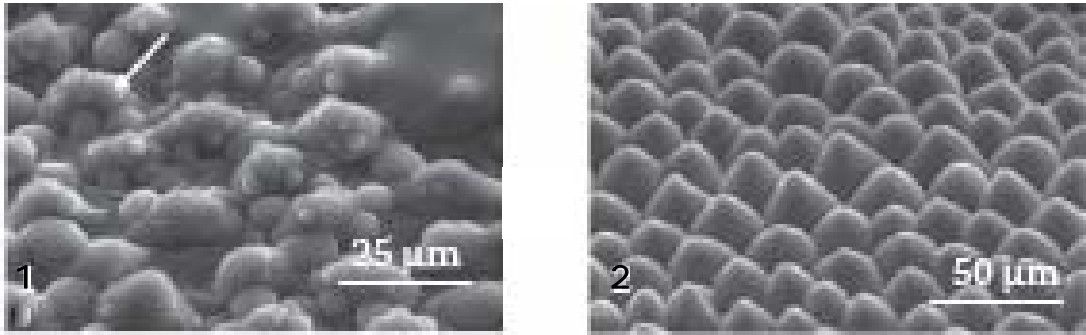
que solo algunos compuestos muestren ritmos de emisión, evidenciando la existencia de ritmos circadianos, regulados por factores físicos como luz, temperatura y estrés biótico [50, 70, 99, 126]. Estos ritmos de emisión están relacionados con la actividad temporal de los polinizadores [6, 48] y, aún, de los predadores. Por tal razón, Dudareva [35] define los aceites florales como: “Productos de selección forzada y balanceo”.

2.1.2 Regulación espacial. Las fragancias florales se sintetizan casi exclusivamente en la capa epidérmica de las partes que conforman la flor (Véase **Figura 12**). Los pétalos son los mayores responsables del *bouquet* de la flor, seguidos de estambres, pistilos, ovarios, estigma y sépalos, que sólo contribuyen con ciertos compuestos [38, 99, 119, 126]. La epidermis de la flor, está completamente cubierta por una cutícula (ácidos grasos de C₁₆ - C₁₈) o por una capa de ceras (alcanos, alcoholes, aldehídos y ácidos de C₂₀ - C₃₀), que limitan la emisión de los volátiles producidos o sellan las “heridas” generadas en la flor durante la emisión de compuestos.

Martín *et al.* [70] argumentan que la “maquina” biosintética para la formación de volátiles puede estar separada de los sitios de acumulación, pues generalmente, estos se almacenan en compartimentos membranosos y citosólicos que mantienen el terpeno en concentraciones óptimas en sitios donde la defensa es crucial [42, 114].

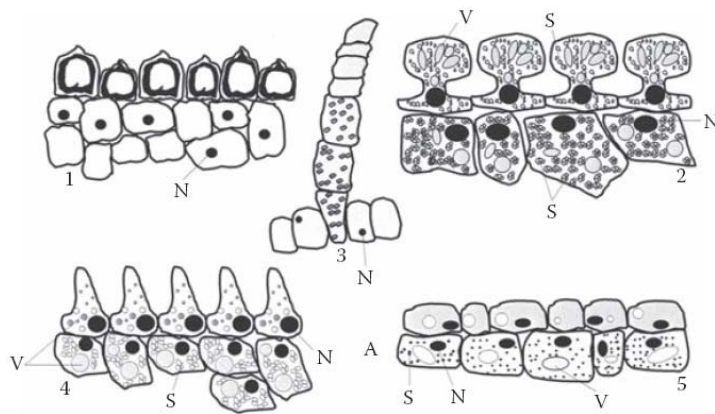
Los tejidos especializados (características glandulares particulares), generalmente responsables de la mayor producción y emisión de volátiles en las flores se conocen como el osmóforo (glándula aromática floral) (**Figura 13** y **Figura 14**).

Figura 13. Microfotografía electrónica de la epidermis de una flor.



1. Células con secreción. 2. Células sin secreción. Fotos de *Rosa hybrida*. [35].

Figura 14. Diferentes tipos de osmóforos.



Células observadas en los tejidos de emisión:

1. Tipo rugoso o cónico.
2. Tipo apilado.
3. Tricomas.
4. Tipo cónico.
5. Tipo plano.

N: Núcleos; **S:** Gránulos de almidón; **V:** Vacuola.

2.2. CONSIDERACIONES SOBRE FRAGANCIAS FLORALES.

Actualmente, se conocen en promedio 1800 volátiles [2, 59] y cerca de 1700 compuestos volátiles y semivolátiles emanados por las plantas, se han estudiado e identificado en 990 especies (90 familias) [67]. Aunque hay flores cuyo HS pueda llegar a contener más de 100 componentes, la gran mayoría fluctúa entre 20 y 60. Generalmente, estos compuestos son terpenoides, fenilpropanoides, bencenoides y derivados de ácidos grasos [42, 126], con carácter lipofílico y de bajo peso molecular. Todos estos

compuestos se caracterizan entre otros, por su presión de vapor; la cual puede calcularse usando cromatografía de gases (GC) [118].

Los compuestos aromáticos florales abarcan todo el rango de polaridades, la mayoría incluye en sus estructuras oxígeno, lo cual los hace moderadamente polares. Los constituyentes más representativos emanados de los osmóforos son monoterpenos oxigenados - MO (81%) y sesquiterpenos oxigenados - SO (38%), estos últimos, son generalmente menos volátiles que los MO y los sesquiterpenos alifáticos - SA. Para Matich *et al.* [71], las especies más evolucionadas poseen en las flores compuestos de tipo sesquiterpeno alifático y diterpenos.

Los compuestos pueden contener heteroátomos (nitrógeno, azufre y/u oxígeno), siendo probable encontrar aminas, oximas, sulfuros, furanos y piranos. Además, dada la no estereoespecificidad de todas las enzimas, suelen encontrarse isómeros geométricos y ópticos dentro de los compuestos que conforman la fragancia.

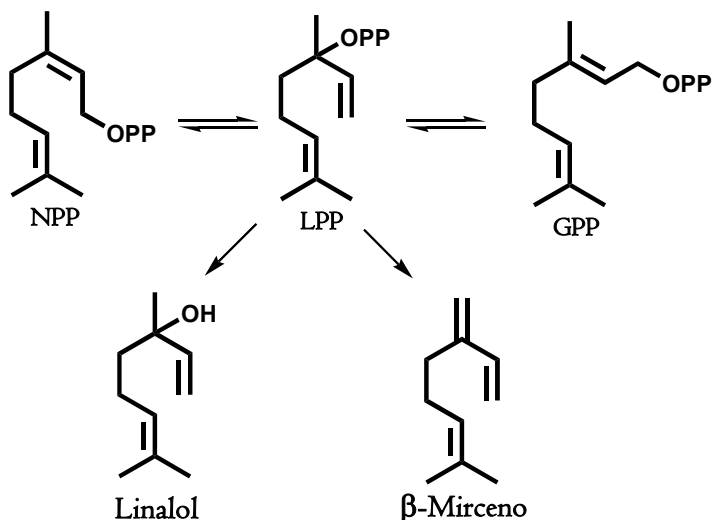
Según Verdonk *et al.* [122], las plantas con flores tubulares blancas, se caracterizan por poseer una fragancia “floral blanca”, compuesta de benzoato de metilo, alcohol bencílico, feniletanol y isoeugenol. En *Clarkia breweri* [123] los compuestos volátiles mayoritarios del aroma son α - y β -pineno, α -felandreno, limoneno, α -terpinoleno y linalol; en *Sauromatum guttatum* [35], linalol, metil eugenol e isoeugenol, óxido de linalol, benzoato de bencilo, acetato de bencilo y salicilato de metilo; en *Rosa rugosa*, citronelol, nerol, geraniol y 2-feniletanol [35]. En la **Tabla 2** se agrupan los principales compuestos encontrados en fragancias florales [58], y en el **ANEXO 1 (Figura 1-1)** se muestran los componentes mayoritarios de algunos extractos florales empleados en perfumería.

Tabla 2. Clasificación de compuestos encontrados en fragancias florales.

Sustrato	Grupo	Compuestos tipo	Número	
Mevalonato y metileritritol fosfato	Terpenoides	Monoterpenos	Cíclicos	295
			Acíclicos	136
		Sesquiterpenos	Cíclicos	114
			Acíclicos	44
		Diterpenos	Cíclicos	2
			Acíclicos	4
		Terpenos irregulares		108
Aminoácidos de cadena lateral	Compuestos ramificados de C5	Saturados	40	
		Insaturados	53	
	Con nitrógeno	Cíclicos	19	
		Acíclicos	42	
	Con azufre	Cíclicos	4	
		Acíclicos	37	
	Sin agrupar	Carbocíclicos	60	
		Heterocíclicos	51	
	Ácidos grasos	Alifáticos	$C_1 - C_{25}$	528
	Shikimato	Bencenoides/Fenilpropanoides	$C_6 - C_0$ a C_7	329

Algunos compuestos de fragancias florales, se encuentran relacionados con uno o más compuestos (**Figura 15**). Desde luego, es más común encontrar compuestos, o sus mezclas, biosintéticamente emparentados, tomando en cuenta que, una sola enzima puede catalizar más de un producto. Según Knudsen *et al.* [58], el limoneno y (E)- β -ocimeno se encuentran en 71% de familias de plantas; mirceno y linalol, en 70%; α -pineno, en 67%; β -pineno, en 59%; benzaldehído, en 64%; salicilato de metilo, en 57%; alcohol bencílico, en 56%; (E)- β -cariofileno, en 52%.

Figura 15. Sustratos comunes para la biosíntesis de algunos terpenos.



LPP: Linaloldifosfato; GPP: Geranildifosfato; NPP: Nerildifosfato.

Por otro lado, hay algunos compuestos contenidos en los aceites esenciales, que se han clasificado como alérgenos (**ANEXO 1, Tabla 1-3**), para los cuales se han diseñado metodologías para evaluarlos, como la desarrollada por el panel de expertos de RIFM (*Research Institute for Fragrance Materials, Inc.*) [16, 22].

2.2.1 Biosíntesis de metabolitos secundarios volátiles. Sobre todo, en los últimos diez años, muchos investigadores realizan estudios para elucidar los mecanismos moleculares y las rutas biosintéticas de los compuestos volátiles, producidos y emitidos por las plantas. Se han caracterizado estructural y funcionalmente algunas enzimas de importancia. La acetil-CoA: alcohol bencilacetil transferasa (BEAT) cataliza la acilación de alcoholes; ácido benzóico/ácido salicílico carboxil metil transferasa (BSMT) y ácido benzóico carboxil metil transferasa (BAMT), la metilación de ácidos; *o*-metil transferasas (OMT), la formación de metoxilos. Las enzimas que participan en la biosíntesis de compuestos volátiles, en general, centran su actividad en mejorar su volatilidad [42]. No obstante, faltan conocimientos químicos sobre las fragancias florales, y bioquímico de la expresión de los genes

involucrados en su producción, para comprender su evolución y función biológica [35].

Las rutas biosintéticas se agrupan en: a. Biosíntesis de terpenos volátiles; b. Biosíntesis de derivados de ácidos grasos volátiles y, c. Biosíntesis de fenilpropanoides/bencenoides volátiles.

a. Biosíntesis de terpenos volátiles. Los terpenoides son compuestos volátiles y metabolitos secundarios mayoritarios en plantas. Los más comunes son monoterpenos y sesquiterpenos. Todos los terpenoides se originan a través de la condensación de los bloques de construcción universal de cinco átomos de carbono, isopentenil difosfato (IPP) y dimetilalil difosfato (DMAPP). En la **Tabla 3** se muestran, de manera general, los lugares celulares de biosíntesis, el número y tipo de unidades condensadas y los compuestos precursores formados (**Figura 16**), de las tres principales clases de compuestos terpénicos encontrados en plantas [35].

Figura 16. Principales sustratos para la síntesis de terpenos.

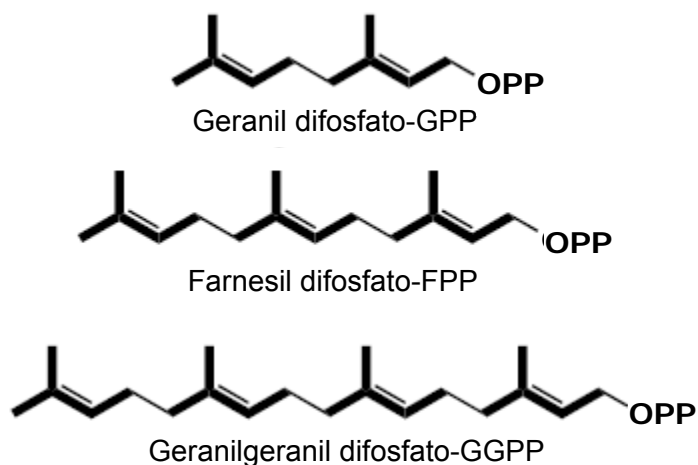


Tabla 3. Generalidades de la biosíntesis de terpenos.

Ubicación	Condensación	Compuestos formados*	Terpeno
Plastidios	1 IPP – 1 DMAPP	Geranil difosfato-GPP	Monoterpenos
Citosol	2 IPP – 1 DMAPP	Farnesil difosfato-FPP	Sesquiterpenos
Plastidios	3 IPP – 1 DMAPP	Geranilgeranil difosfato-GGPP	Diterpenos

*Por acción de enzimas tipo preniltransferasa [35].

b. Biosíntesis de derivados de ácidos grasos volátiles. Alcoholes, aldehídos y ésteres de cadena corta, son la segunda clase de volátiles florales más abundantes. En su mayoría, son compuestos originados en la membrana lipídica, derivados de ácidos grasos de C₁₈ (Véase **Tabla 2**), transformados a hidroperóxido y, luego, fragmentados a C₁₂ y C₆ por hidroxiliasas, como productos de la ruta de la lipoxigenasa. A través de esta ruta se producen 3-*cis*-hexenal y/o hexanol, comunes en los aceites florales.

c. Biosíntesis de fenilpropanoides/bencenoides volátiles. La condensación de fosfoenol piruvato y D-eritrosa-4-fosfato, en la ruta del ácido shikímico, forma la estructura base para la construcción de derivados fenilpropanoides y bencenoides (Véase **Tabla 2**), procesos catalizados por fenilalaninamonio liasa (PAL), fenilpiruvato y ácido feniláctico. La mayoría de compuestos aromáticos son no volátiles, por lo tanto, deben ser reducidos en la posición C₉ u oxidados, para hacerlos más volátiles.

2.3. *Hedychium coronarium* Köern.

Nombre científico:

Hedychium coronarium Köern.

Nombre Vulgar:

Mariposa blanca, jengibre blanco, sanjuanito, matandrea.

Familia:

Zingiberaceae.



Figura 17. Flores de *H. Coronarium*.

Las plantas que incluye la familia Zingiberaceae, son herbáceas aromáticas, distribuidas principalmente en el Sureste de Asia. *Hedychium coronarium* K. (**Figura 17**), es nativa del Himalaya, fue introducida y cultivada en diferentes regiones tropicales del mundo, donde se ha naturalizado [97]. Según Medina [75], el suelo, en el cual se desarrolla mejor la planta es de tipo andosol-mólico, caracterizado por poseer un pH variable, con alta susceptibilidad a la erosión. Estos suelos son profundos y su distribución está ligada a material volcánico y relieve montañoso. Quizás, por esta razón en Colombia los Departamentos con mayor densidad de esta especie sean Caldas, Cundinamarca, Quindío, Risaralda y Valle [23].

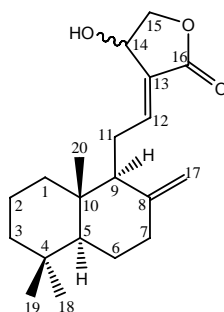
La planta se distribuye en altitudes desde el nivel del mar hasta los 1250 m.s.n.m.. Las condiciones más importantes del clima para esta especie son temperatura y precipitación anual, seguidas de la humedad y el viento [75]. Según estudios realizados en México y Brasil [97], temperaturas promedio de crecimiento, que varían entre 9 y 26 °C, con precipitaciones entre 1400 y 1600 mm de lluvias anuales, favorecen las mayores densidades de población.

Las especies pertenecientes al género *Hedychium*, crecen entre 1 y 3 m de alto, se caracterizan por poseer rizomas horizontales, tuberosos y robustos. Las flores tubulosas, blancas y olorosas, están dispuestas en panículas o en espigas terminales con brácteas [75, 87]. En un estudio sobre la fenología y la ecología de la planta, Santos [97], encontró que *H. coronarium* crece entre 117,1 y 181,4 cm de altura, dependiendo de las condiciones de humedad, radiación solar y temperatura. Así, el autor reporta las menores tasas de crecimiento para las plantas con máxima exposición solar y las mayores tasas de crecimiento las presentan las especies ubicadas en sitios sombreados húmedos. *H. coronarium* fue catalogada por Calderón [23] como: especie invasora, perjudicial para los ecosistemas y las especies nativas, y, por lo tanto, requiere atención y estudio.

La mayoría de estudios realizados sobre la especie *Hedychium coronarium*, se han encaminado hacia el análisis de componentes presentes en su rizoma. El rizoma se usa en la medicina natural china, contra el reumatismo, como vermífugo y desinfectante, y en medicina tradicional de la India, para el tratamiento de la diabetes [27, 74]. El género *Hedychium*, se caracteriza por poseer compuestos tipo bislabdano [17, 126]. Los diterpenos de este tipo, son estructuras bicíclicas de cadena lateral abierta (**Figura 18**), con terminación, de furano o γ -lactona α,β -insaturada.

Dixit [33], reportó el efecto del aceite esencial obtenido de los rizomas, sobre el sistema nervioso central, en un estudio realizado con ratones. Matsuda *et al.* [74] y Taveira *et al.* [113] reportaron en los extractos de los rizomas de *H. coronarium* terpenos tipo labdano, que incrementan la permeabilidad vascular inducida por ácido acético e inhiben la producción de óxido nítrico en ratones, al igual que las zingeronas reportadas por Shin *et al.* [102].

Figura 18. Estructura química de isocoronarina D (Bislabdano).



Pruebas fitoquímicas mostraron la presencia de proantocianidinas, saponinas y polifenoles en las flores de *H. coronarium*, así como la actividad antimicrobiana *in vitro* de la infusión y la decocción de las flores contra bacterias *gram-positivas* y *gram-negativas* [91]. Los constituyentes mayoritarios del aceite esencial, obtenido de los rizomas, determinados por Soares [105], fueron 1,8-cineol (eucaliptol), alcanfor, β -mirceno y, principalmente, curzerenona (64%).

La parte de la planta menos estudiada es la flor. Omata *et al.* [82], enseña los compuestos mayoritarios de las flores en el extracto con *n*-pentano, β -pineno (3.38%), 1,8-cineol (1.58%), (E)- β -ocimeno (2.01%), (Z)-3-hexenol (2.18%), linalol (13.17%), (E)- β -cariofileno (2.79%), (E)- β -farneseno (1.91%), eugenol (3.00%), metil (E)-isoeugenol (1.25%), jasmonato de metilo (17.16%) y benzoato de metilo (1.89%).

Raguso [87] reporta la composición química de las flores empleando la técnica SPME y GC-MS, en un estudio comparativo entre los compuestos presentes en néctar y flores de *Hedychium coronarium* y otras especies; ésto, con el fin de buscar patrones de relación de los compuestos aromáticos en las interacciones planta-insecto. En la parte experimental, Raguso empleó la fibra de poli(dimetilsiloxano)/divinilbenceno (PDMS/DVB, 65- μ m), la cual expuso hasta lograr el equilibrio, empleando el modo *headspace* por 15 min, e inyectó el extracto en un equipo *Shimadzu* QP5000 GC-MS con

columna capilar DB-5. Raguso, reveló la presencia de compuestos aromáticos en el néctar, linalol (86%), diversas aldoximas, nitrilos y nitrocompuestos, y en la flor consigue 71 compuestos diferentes. En la **Tabla 4** se describen los principales compuestos contenidos en la flor y en el néctar.

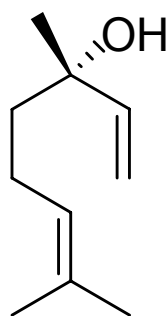
Entre las conclusiones finales, se menciona que la técnica empleada, resultó muy efectiva para el análisis de fragancia en flores tubulares [87]. No obstante, en el artículo se reporta una serie de compuestos no identificados, debido a la complejidad de la matriz de las muestras bajo análisis.

Tabla 4. Principales compuestos presentes en néctar y flores de *Hedychium coronarium*. [87]

Compuestos mayoritarios	Porcentaje relativo, %	
	Flores	Néctar
3-Metilbutilaldoxima	3,54	2,83
2-Metilbutilaldoxima	3,23	3,56
Monoterpenoides		
β -Pino	1,65	-
β -Mirceno	1,74	0,26
1,8-Cineol	6,55	3,12
(Z)- β -Ocimeno	3,25	-
(E)- β -Ocimeno	28,09	0,62
Linalol	19,02	79,8
Terpenoides irregulares		
(E)-4,8-Dimetilnona-1,3,7-trieno	1,90	-
Sesquiterpenoides		
(E)- β –Cariofileno	2,12	-
(E)- β –Farneseno	2,73	-
(E,E)- α -Farneseno	2,22	-
Compuestos aromáticos		
Benzoato de metilo	12,24	5,04

El linalol (3,7-dimethyl-1,6-octadien-3-ol) (**Figura 19**), es el compuesto mayoritario en el néctar de *H. coronarium* [87], al igual que en el aceite esencial de especies de *Lavanda* [25]. Presenta dos isómeros ópticos, el R-(-)-linalol (nota dulce, madera), cerca de 10 veces menos aromático que el enantiómero S-(+)-linalol (nota dulce, floral) [54, 62]. El linalol es catalogado como insecticida y repelente [84]. Bickers *et al.* [16] muestran que el linalol y sus ésteres no son irritantes, fototóxicos o sensibilizadores de la piel, lo que favorece su uso en perfumería.

Figura 19. Estructura química del linalol.



Según Siani *et al.* [103], el linalol es uno de los compuestos más importantes en la industria de sabores, cuya principal fuente natural (*Aniba duckei*), se encuentra en peligro de extinción, requiriendo “urgentemente” fuentes naturales alternativas.

2.4 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN, MUESTREO Y ANÁLISIS.

Por centurias, el hombre ha implementado metodologías para la extracción y análisis de aceites esenciales. Técnicas antiguas de extracción con solventes por maceración o *enflourage* (preparación de concretos); clásicas, destilación con agua o vapor; modernas, HS dinámico o estático [29, 35, 110]. Estas técnicas tienen la desventaja de requerir cantidades grandes de muestra, uso de solventes, calentamiento o largos tiempos de extracción. Dichos

requerimientos van en detrimento de la fidelidad de los resultados, dado que, es justamente durante el proceso de extracción donde ocurre, según Li [65] y Flamini [38] la mayor pérdida de analito, más aún si se han adicionado solventes. Es entonces de vital importancia, a la hora de emplear procedimientos analíticos, tener en cuenta la inestabilidad que presentan algunos componentes de la fragancia floral.

Para la toma de la muestra debemos conocer el tipo y el lugar de muestreo, las características biológicas de la planta y el propósito del análisis. Hay que considerar, si se conoce la composición y se desea su confirmación, si la fragancia es desconocida y es necesaria una identificación completa, o si tan solo se quiere saber el contenido de dos o tres compuestos. La caracterización total de una mezcla de compuestos volátiles a menudo requiere pasos analíticos adicionales y suficiente material vegetal para la identificación de los compuestos. Una de las consideraciones más importantes para el análisis de fragancias florales, es el estado de madurez de la planta, de la flor y la hora de recolección.

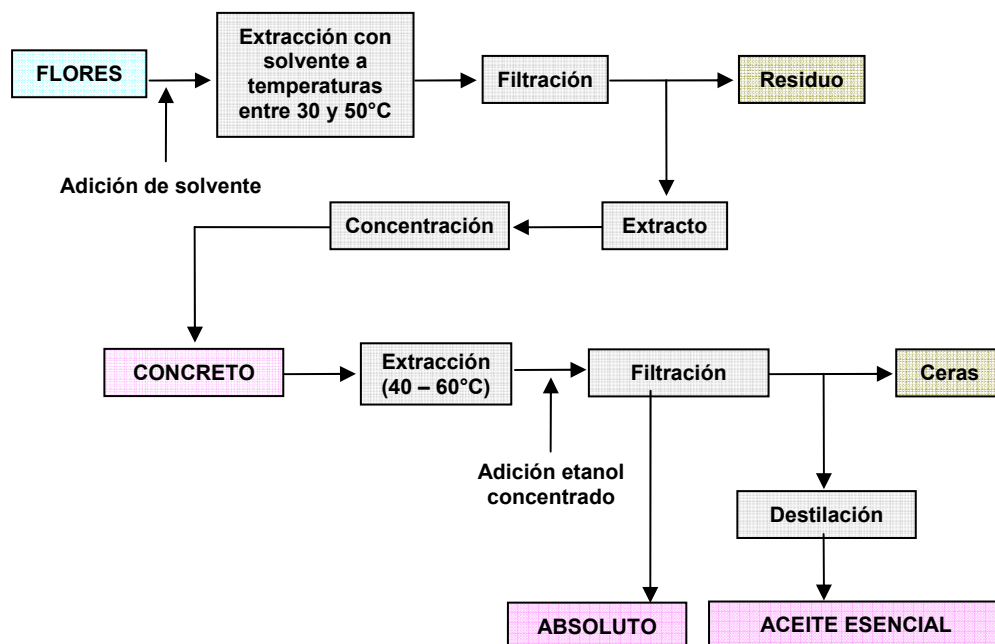
2.4.1 Técnicas de extracción.

- **Extracción con solvente.** La producción de extractos florales es una práctica antigua. La difusión en grasa o aceite ("*enfleurage*"), fue empleada por griegos y romanos para obtener materiales fragantes de las flores. Ellos, producían un líquido (*stymata*), un semisólido (*hedysmata*) y un polvo (*diapasmata*), a partir de los pétalos de rosas [125]. Actualmente, los países más destacados por su investigación e industria en este campo son Turquía, India y Francia [4,11]. El absoluto, que es una forma concentrada de una fragancia floral, es el producto mejor posicionado y con mayor valor agregado en la industria, ya sea para la preparación de perfumes o para extraer un compuesto en particular. Sí los principios activos son económicamente útiles, se puede extraerlos, fraccionar o purificar de sus fuentes naturales.

Las flores más empleadas para la elaboración de absolutos son: rosas [7, 11, 61] y jazmines [7, 121]. Sin embargo, existe una amplia gama de especies de las cuales se obtienen actualmente absolutos a nivel comercial (Ver **ANEXO 1, Tabla 1-1**). Cabe anotar, que la búsqueda de nuevas especies con fragancias florales es tema de investigación muy activo y de mucho interés a nivel mundial [4].

La producción de concreto o absoluto depende del tipo de extracción, la naturaleza del solvente y las características del material vegetal a extraer [45]. En general, el procedimiento de extracción consiste en el empleo de solventes volátiles, los cuales se evaporan luego, a bajas temperaturas, para obtener el concreto. Después de ello, el concreto se disuelve en alcohol y se remueven las ceras por refrigeración y filtración (**Figura 20**). Por último, el alcohol se evapora a baja temperatura para obtener el absoluto [9]

Figura 20. Proceso de obtención de concretos y absolutos a partir de flores.



Básicamente, la investigación sobre obtención de extractos florales, se ha enfocado en la selección del solvente para la extracción. Así, se ha logrado

acortar el tiempo de análisis, aumentar el rendimiento de la extracción y la calidad del extracto obtenido [4]. Por ejemplo, solventes derivados del petróleo, como el hexano, disminuyen la calidad de los extractos obtenidos y, por ende, su valor comercial.

Con el fin de evitar este problema se pueden emplear otros solventes (**ANEXO 1, Tabla 1-2**), que por sus propiedades físicas, *i.e.* baja temperatura de ebullición y menor calor latente de vaporización, facilitan su separación por evaporación. En este sentido, Bernard *et al.* [13], emplearon 1,1,2-tricloro-1,2,2-trifluoretano (TTE) como solvente de extracción. Wilde y Thirsk [125], con el fin de contrarrestar el impacto ambiental generado por los clorofluorocarbonados, emplearon solventes fluorocarbonados, que según ellos, permiten la obtención de extractos certificables como orgánicos. Por otro lado, Matravers *et al.* [73], patentaron la extracción de flores con acetatos de alquilo (C₃ a C₅). Afirman, que las flores son ideales para este proceso, por ser porosas, y que la extracción se logra en 10 min.

El aceite floral de *Lavandula stoechas*, muy empleado en perfumería, contiene *ca.* 65% de linalol y acetato de linaloilo [5], el de jazmín es rico en linalol, acetato de bencilo, benzoato de bencilo, jasmona, jasmonato de metilo, jasminlactona, indol y *epi*-jasmonato de metilo [121] y el de *H. coronarium* posee linalol, (E)- β -ocimeno, 1,8-cineol, benzoato de metilo y benzoato de bencilo [82]. Todos estos compuestos son muy apreciados en perfumería [3, 11, 121]. Los ésteres por ejemplo, actúan como fijadores de los componentes volátiles de los extractos [95].

- **Destilación-extracción simultánea con solvente.** Es una técnica mejorada para el análisis de compuestos orgánicos volátiles, en un equipo diseñado por Godefroot *et al.* [43], que permite hacer la destilación-extracción simultánea a micro-escala. En este método, se usa una pequeña cantidad de muestra [18], generalmente, para plantas se usan 10 g del material

vegetal, finamente picado, el cual se somete a extracción, durante 2 horas. Aunque se pueden usar solventes con mayor o menor densidad que el agua, en la mayoría de los casos, se emplea como solvente de extracción, diclorometano, el cual es de mayor densidad que el agua [79].

Georgieva *et al.* [42], emplearon el equipo de tipo *Lickens-Nickerson*, para la obtención de los volátiles de flores de *Gentiana sp.*; Ueyama *et al.* [116] e Ikeda *et al.* [49], emplearon SDE para obtener los absolutos de *Rosa davurica* y *Lonicera japonica*, respectivamente. Con SDE, Stashenko y colaboradores [111], lograron obtener cantidades de compuestos oxigenados y monoterpenos de *Spilanthes americana*, más altas en comparación con la extracción con fluidos supercríticos (SFE).

Extracción con fluido supercrítico. La extracción con fluido supercrítico, generalmente emplea, por seguridad y costo, CO₂ en estado crítico, para la extracción de aceites esenciales de plantas. La selectividad del solvente empleado en SFE, puede ajustarse para la obtención de los metabolitos de interés, reduciendo a un mínimo la co-extracción de otros compuestos [92].

Entre las variables que se deben tener en cuenta, según lo describen Reverchon [92] y Povh [86], se destacan características químicas de los compuestos específicos o familia de compuestos a extraer (peso molecular, polaridad), temperatura de extracción (35°C a 60°C), densidad del fluido supercrítico (0,15 a 1,0 g/cm³), tamaño de partícula del material vegetal (0.25 a 2.0 mm) y tiempo de extracción. Stashenko y colaboradores [112] lograron aislar algunos hidrocarburos pesados (C>20), por medio de SFE e indicaron que el método fue selectivo y altamente eficiente en el aislamiento de sesquiterpenos, hidrocarburos pesados y compuestos nitrogenados, en comparación con la técnica de SDE.

- **Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas.** Se emplea un equipo de hidrodestilación (HD) y un horno microondas (MW),

dentro del cual se coloca un balón para destilación con agua y material vegetal. La energía de la radiación del MW (2450 MHz), causa incremento en el movimiento molecular por conducción o migración y rotación de dipolos, sin generar cambios en la estructura molecular. El MW suministra en 5 min ca. 43.000 cal al interior del horno, para el calentamiento de la muestra [57]. Las microondas penetran hasta 2.5 cm al interior de la muestra, el resto es calentado por convección [63].

Algunos investigadores han empleado hidrodestilación, por más de una hora, para la obtención de extractos florales [21, 40, 51, 76, 80, 93, 120]. No obstante, en comparación con la destilación con vapor, la MWHD es mejor en términos de energía, rapidez, producto obtenido y composición aromática del aceite esencial [25, 39, 76]. Recomiendan emplear MWHD para evitar la degradación térmica, la hidrólisis y la solubilización en el agua de algunos compuestos químicos por HD.

2.4.2 Técnicas de *headspace* (HS) para el muestreo de compuestos volátiles. El análisis de los volátiles extraídos en modo HS, permite una mejor identificación de los compuestos emitidos por la planta, en comparación con la extracción por solventes [26]. En la actualidad, las técnicas de HS son las más empleadas para determinar los compuestos volátiles de plantas, ya que, con estas técnicas se busca mejorar el método de extracción [35, 69, 117].

Según Kaiser [56], en las técnicas de HS que emplean adsorbentes, se pueden presentar problemas con compuestos muy polares o con alto peso molecular, por desorción incompleta o formación de “artefactos”. Todos los métodos de HS emplean recipientes de vidrio, teflón o metal especiales para el muestreo, para minimizar el efecto de memoria (“*carry over*”) [115].

En general, las técnicas de análisis en modo *Headspace* se pueden agrupar en dinámicas (“*dynamic headspace*”) y estáticas (“*static headspace*”).

- ***Headspace* dinámico.** Entre los equipos empleados para HS dinámico, cuentan entre otros, purga y trampa y, desorción térmica directa. Sin embargo, los más empleados para analizar las fragancias florales son los sistemas donde se recircula aire, a saber: recirculación en sistema cerrado [81], sistema de succión [22] y sistema de empuje-succión [47]. Básicamente, estos sistemas consisten en un recipiente o cabina, donde se encuentra contenida la muestra, conectada por medio de bomba(s) y tuberías de acero inoxidable, a un dispositivo para la recolección de volátiles. Al final de la extracción, los volátiles son eluidos con solvente y analizados por GC.

Los largos tiempos de muestreo, la posibilidad de contaminación por el aire empleado, la necesidad de solventes, el requerimiento de temperatura o existencia de artefactos, debido al adsorbente o trampa empleada, son las principales limitaciones de esta clase de muestreo. Con el fin de atenuar la influencia negativa de estos factores en el análisis, fue desarrollada la técnica de extracción dinámica en fase sólida – SPDE [15, 81].

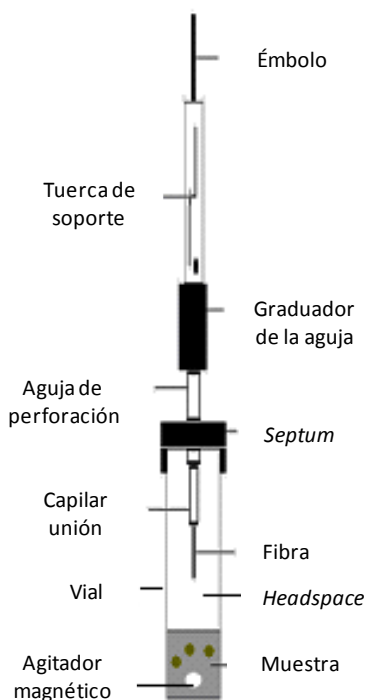
- ***Headspace* estático.** La principal ventaja de HS estático, es la rápida extracción y concentración de analitos. Entre las técnicas que se basan en HS estático [24, 56], las principales son: *headspace* estático (S-HS), microextracción en fase sólida (SPME) y microextracción en una gota de solvente (SDME). Entre todas las técnicas, el desarrollo de SPME es el más relevante para HS estático. Dada su importancia, su versatilidad y su creciente aplicación en el análisis de compuestos orgánicos volátiles.

- ***Headspace* / Microextracción en fase sólida.** La técnica de microextracción en fase sólida (SPME) fue introducida por Arthur y Pawliszyn en 1990 [10] (**Figura 21**). Es considerada una técnica rápida, sencilla y

eficiente para el análisis de plantas secas o en fresco, principalmente, por extraer y concentrar volátiles de pocas cantidades de muestra, en sólo un paso [32, 64, 76, 83, 94, 101, 112]. La extracción se basa en un proceso de adsorción – desorción, que ocurre sobre una película de fase estacionaria que reviste una fibra de sílice.

La cantidad de volátiles extraída por SPME, depende del espesor de la fibra y la constante de distribución de los analitos [115]. El valor de esta constante incrementa con el peso molecular y el punto de ebullición del compuesto [10]. Los compuestos más volátiles se extraen mejor por una fibra con recubrimiento de mayor espesor que el empleado para los semivolátiles. A mayor espesor del recubrimiento, más lenta es la desorción de los analitos, incrementando el riesgo de efectos de memoria en la fibra. Se recomienda, antes de cada análisis, realizar un tratamiento de limpieza a la fibra, exponiéndola por algunos minutos en el puerto de inyección de un GC.

Figura 21. Dispositivo para SPME [10].



La efectividad de la extracción con SPME, es fuertemente influenciada por la concentración relativa de los volátiles en la muestra y el volumen del recipiente para HS. A bajas concentraciones de analito, los cambios en el volumen del HS no afectan la respuesta del detector de ionización en llama (FID), caso contrario, ocurre cuando se analizan muestras con altas concentraciones de analito. Por lo tanto, la respuesta del FID no es lineal, en una curva de calibración para compuestos volátiles en alta concentración. La calibración con estándar externo o interno se dificulta, más cuando hay una amplia gama de compuestos en distinta concentración.

Los compuestos volátiles de la flor se adsorben al exponer la fibra al HS por minutos u horas, hasta alcanzar el equilibrio. La extracción por HS-SPME con recubrimiento de PDMS/DVB (65 μm) y análisis por GC-MS, permite el muestreo y análisis de los volátiles emitidos por flores odoríferas frescas, en diferentes estados de floración [13, 28, 65, 79, 89, 112], además, permite identificar compuestos que no se detectan por GC-FID, cuando se emplean métodos de extracción con solventes o HD.

Los principales parámetros de la extracción de compuestos volátiles con SPME son: clase de recubrimiento de la fibra, cantidad de muestra, temperatura de extracción, tiempo de extracción, volumen de espacio de cabeza y tiempo de desorción [40, 76, 109]. Según Molina [78] y Li [65], se obtiene la mayor concentración de compuestos volátiles contenidos en flores frescas de *Brugmansia* sp y *Syronga* sp, empleando el recubrimiento de PDMS/DVB.

- **Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas y microextracción en fase sólida en modo *headspace*.** Xiong y colaboradores [127] emplearon SPME para extraer los volátiles promovidos al HS por MWHD de *Eucalyptus citriodora*. Posteriormente, Deng *et al.* [29, 30] evaluaron por separado, según la suma de áreas de los picos, el

recubrimiento de la fibra, la potencia del horno y el tiempo de irradiación, empleando siempre 2 g de diferentes especies vegetales para la extracción de fragancias por éste método, que denominaron MWHD-HS-SPME. Las partes vegetales estudiadas por MWHD y HS-SPME son hojas y rizomas [29, 128]. Aún, no se han publicado estudios que analicen fragancias florales por HS-SPME, asistida por MWHD.

2.4.3. Análisis cromatográficos. La cromatografía de gases es la técnica más eficiente para la separación, identificación y cuantificación de compuestos volátiles en plantas [31, 66, 68, 77]. Los detectores más usados, son: FID y selectivo de masas (MSD) [46, 96, 100].

Aunque la mayoría de constituyentes de los aromas florales son identificables por sus t_R [44, 60, 104], t_{RR} en GC y fragmentogramas en GC-MS. Según Buchbauer [19] pueden presentarse problemas durante la caracterización de las fragancias florales, *e.g.* coelusión entre analitos o de analitos con el solvente (*i.e.* compuestos nitrogenados o azufrados) [89], mala identificación (*i.e.* estructuras con espectro de masas (MS) o tiempo de retención (t_R) similar), inexistencia de patrón del compuesto de interés en el mercado [1, 19, 55].

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS.

Para la realización de este trabajo se emplearon los reactivos, materiales y equipos, que se describen a continuación en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Reactivos, materiales y equipos empleados.

PRODUCTO	ESPECIFICACIONES
Material de referencia certificado ^a:	
Eucaliptol (1,8-Cineol)	Pureza: 99%; Lote N° 04727LD.
(E,E)-Farnesol	Pureza: 96%; Lote N° 15227MS.
Linalol	Pureza: 97%, Lote N° 02014DD.
α -Pino	Pureza: 98%, Lote N° 00110JD.
γ -Terpineno	Pureza: 97%; Lote N° 14216LU.
Dodecano	Pureza: 99%; Lote N° 02552CE.
Tetradecano	Pureza: 99%; Lote N° 14907LE.
Hexadecano ^b	Lote N° 3101349.
Hidrocarburos^c:	
C ₆ -C ₁₀	Lote N° B4120251; Certificado: AK-101.0 NAS-10X
C ₁₀ -C ₂₅	Lote N° B3010054; Certificado: AK-102.0 NAS-10X
Solventes:	
Acetato de etilo	Pureza: 99.8%; Grado ACS; <i>Riedel-de Haën, Sigma – Aldrich</i> (Buchs, Suiza).
Diclorometano	Pureza: 99.9%; Grado ACS; <i>Riedel-de Haën</i> . ^a
Etanol	Pureza: 99.8%; Grado ACS <i>J.T. Baker</i> . ^d
Éter de petróleo	Pureza: 95%; Grado ACS; <i>Riedel-de Haën</i> . ^a
Hexano	Pureza: 99.9%; Grado ACS; <i>J.T. Baker</i> . ^d
Metanol	Pureza: 99.8%; Grado ACS <i>J.T. Baker</i> . ^d

Casas productoras: a. *Sigma – Aldrich* (Milwaukee, EE.UU.); b. *Merck* (Darmstadt, Alemania); c. *AccuStandard* (125 Market Street, New Haven, CT, EE.UU.) y d. *Mallinckrodt Baker, Inc.*, (Phillipsburg, NJ, EE.UU.).

Tabla 5, continuación.

Material de laboratorio:	
Viales	Viales ámbar estándar para SPME de 4 mL; <i>Supelco</i> ; Catálogo N° 27006 y Viales para GC de 1.5 mL.
<i>Septa</i>	<i>Septa</i> de silicona blanca recubiertas con teflón blanco; Catálogo N°27369-U y <i>Septa</i> para viales de GC.
<i>Liner</i>	<i>Agilent Technologies</i> , Palo Alto, CA
Jeringas	10 µL <i>Hamilton Co.</i> (Reno, CA, EE.UU.) y de 5 µL (<i>Hewlett-Packard</i> , Palo Alto, CA, EE.UU.).
Dispositivo para SPME	Dispositivo para muestreo manual por SPME; <i>Supelco</i> (Bellafonte, EE.UU.); Catálogo N° 57330-U.
Fibras para SPME	Fibras de sílice fundida recubiertas con PDMS/DVB de 65 µm (57310-U), PDMS de 100 µm (57300-U) y PA de 85 µm (57304-U); <i>Supelco</i> (Bellafonte, EE.UU.)
Gases especiales para GC	He, aire, H ₂ , pureza: 99.995%; AGA Fano S.A. (Bucaramanga, Colombia).
Equipo de laboratorio:	
Mantas de agitación y Calentamiento	<i>Magnetic stirrer</i> MSH300 (Boeco, Alemania).
<i>Minishaker</i>	<i>Minishaker</i> , IKA JKMS (Hofheim, Alemania).
Horno microondas	<i>LG-Intelowave</i> MS-1242ZK; (Englewood, EE.UU.).
Balanzas analíticas	<i>Mettler Toledo</i> AG285; ± 0.01/0.1g (Nänicon, Suiza), y <i>Sartorius Basic</i> BA31OS; ± 0.005 g (Goetti, Alemania).
Baño refrigerante circulatorio	Baño circulatorio PHABER, Chiller 28L20K y <i>Digital polystat temperatura controller</i> (Cole-Parmer, EE.UU.).
SFE	Soxhlet de alta presión (<i>J & W Scientific</i> , Folsom, CA, EE.UU.).
SDE	Equipo SDE para solventes de alta densidad. [G]
Destilador	Montaje tipo <i>Clavenger</i> , <i>Dean-Stark</i> .
Baño con ultrasonido	<i>Elmasonic</i> E30H (Elma, Alemania).
Columnas cromatográficas:	
Apolar	Columnas DB-5MS (<i>J & W Scientific</i> , Folsom, CA, EE.UU.); de 60 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25 µm, d _f y

	de 30 m x 0.25 mm, D.I., 0.25 μ m, d_f ; con fase estacionaria de 5%-fenil-poli(metilsiloxano).
Polar	Columna DB-WAX (<i>J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.</i>), de 60 m x 0,25 mm, D.I. x 0,25 μ m, d_f ; con fase estacionaria entrecruzada e inmovilizada de poli(etilenglicol).
Análisis instrumental:	
HRGC/MSD	<ul style="list-style-type: none"> - Cromatógrafo de gases <i>Hewlett-Packard HP 5890A Series II</i> (Palo Alto, CA, EE.UU.), dotado con un inyector <i>split/splitless</i> y acoplado a un detector selectivo de masas HP5972. - Cromatógrafo de gases <i>Agilent Technologies 6890 Plus Series GC System</i> y un detector selectivo de masas (MSD) <i>Agilent Technologies 5973 Network</i>. - Cromatógrafo <i>Agilent Technologies 6890N Network Series GC System</i>, y un detector selectivo de masas (MSD) <i>Agilent Technologies 5975</i>.
HRGC/FID	Cromatógrafo de gases <i>Hewlett-Packard HP 5890 Series II</i> (Palo Alto, CA, EE.UU.); con inyector <i>split/splitless</i> y con detector de ionización en llama (FID).

Otros materiales empleados durante el análisis fueron: vasos de precipitados de 50 y 100 mL; *SCHOTT* (San José, CA, EE.UU.), balones aforados de 2, 5 y 10 mL; *KIMAX* (Elmsford, NY, EE.UU.), micropipeta de 25–250 μ L, puntas plásticas y pipetas Pasteur; *BRAND* (Radebeul, Alemania).

3.2 CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA DE *H. coronarium*.

Las muestras vegetales tomadas en los alrededores del área metropolitana de Bucaramanga, junto con las fichas de colecta, se enviaron al Herbario Nacional Colombiano, adscrito a la Facultad de Ciencias del Instituto de

Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. En el Herbario, dirigido por el botánico-taxónomo, Dr. José Luís Fernández, se realizaron la identificación taxonómica y montaje de los pliegos testigos exigidos para colección.

3.3 CULTIVO DE *Hedychium coronarium*.

Rizomas, colectados junto con las muestras vegetales enviadas para identificación taxonómica, se dejaron en germinación durante 1 mes en un sitio húmedo y obscuro. Luego, cuando las yemas brotaron en más del 80% de los rizomas, éstas se sembraron directamente en un suelo previamente acondicionado. El cultivo de 2 x 3 m se estableció en las instalaciones del Complejo Industrial Piloto de CENIVAM, Universidad Industrial de Santander (Figura 22).

Figura 22. Cultivo de *Hedychium coronarium* K. en el complejo industrial de CENIVAM.



3.4 ANÁLISIS POR HS-SPME *IN VIVO*.

Los primeros análisis realizados a las flores de la planta *H. coronarium*, se enfocaron en determinar el periodo del día de mayor emisión de compuestos volátiles. La HS-SPME fue la técnica empleada para analizar los volátiles de las flores en la planta (**Figura 23**). Además del periodo de emisión, los experimentos mostraron un primer perfil de los compuestos volátiles que conforman la fragancia de las flores.

Figura 23. Análisis por HS-SPME *in vivo*.



En el análisis por HS-SPME se empleó una fibra de PDMS/DVB (65 µm) para la extracción y concentración de volátiles; un *timer*, para el control de los tiempos de preequilibrio (15 min), muestreo (30 min) y desorción (10 min); un recipiente acrílico cilíndrico, donde se introdujeron las flores y se realizó el muestreo. El recipiente, antes y después de cada análisis, se lavó con jabón sin olor y se purgó con nitrógeno; se usaron soportes universales, para sujetar la fibra, el recipiente y la muestra. Por otra parte, para asegurar la fidelidad de los resultados, antes de cada extracción, se realizaron blancos de la fibra, previamente acondicionada y del recipiente de muestreo. Finalmente, la fibra con los volátiles adsorbidos se introdujo al puerto de inyección de un GC-MS (Ver Numeral 3.7.1), para la desorción completa de los compuestos extraídos. En todos los experimentos, se tomaron ca. 12

min, para llevar la fibra de SPME del lugar de muestreo al Laboratorio de Cromatografía para su respectivo análisis.

Después de todas las pruebas necesarias para mejorar la reproducibilidad en las áreas de los picos cromatográficos de los compuestos aislados, se hicieron las extracciones por duplicado a las 11:00 a.m., 3:00 p.m., y 7:00 p.m.

3.5. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE FLORES Y RIZOMAS DE *Hedychium coronarium* K.

Se emplearon los métodos de extracción con solventes, destilación-extracción simultánea (SDE), hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD) y extracción con fluido supercrítico (SFE), para obtener extractos ricos en compuestos orgánicos volátiles, a partir de las flores de *H. coronarium*. Para todos los experimentos, las flores abiertas, sanas y sin signos de marchitamiento, se recolectaron en las horas de la tarde (entre 5:30 y 9:30 pm), correspondientes al tiempo de mayor emisión de compuestos volátiles. Posteriormente, cada uno de los extractos obtenidos se inyectó (1 μ L) al puerto de inyección de un GC-MS para análisis, según lo indicado en los Numerales **3.7.2** y **3.7.3**. Con fines estadísticos cada experimento se realizó por duplicado.

Con excepción de la extracción con solventes, todos los procedimientos usados para la obtención de extractos florales, se aplicaron a los rizomas de la planta. Cerca de 10 kg de rizomas se lavaron y cortaron en piezas de ca. 1 cm³. Una parte de estos trozos se empleó en fresco para hidrodestilación, mientras que el grueso del material se secó hasta peso constante, para su extracción y análisis. Todas las mediciones de peso se llevaron a cabo en una balanza analítica *METTLER TOLEDO* (\pm 0,01g).

3.5.1 Extracción con solventes. Se realizaron diferentes experimentos, siguiendo el procedimiento general. Se estudió el tipo de solvente, e.g. hexano, éter de petróleo y acetato de etilo, empleado para la extracción. Para realizar la extracción, se compararon los métodos de extracción con el ultrasonido y la maceración. El procedimiento que se siguió, junto con una imagen del montaje usado para la maceración con solvente, se muestran en la **Figura 24**.

Figura 24. Proceso de obtención de concretos y absolutos.

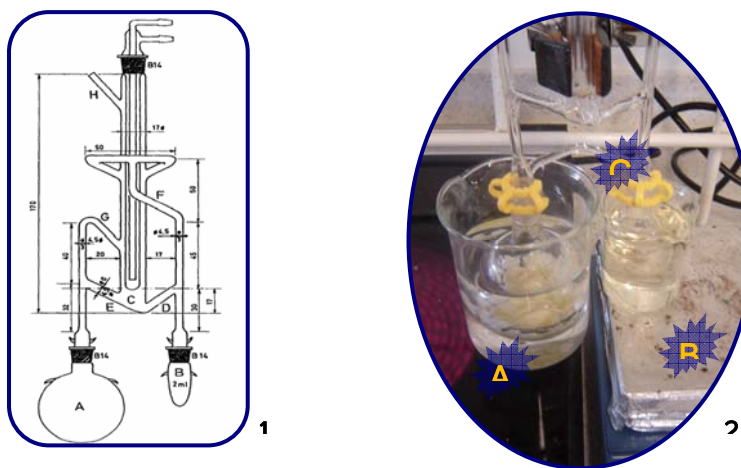


Para los análisis se pesaron flores sanas (15 g), previamente picadas, que se depositaron luego en frascos ámbar de 30 mL, junto con solvente (25 mL). Los frascos usados se lavaron previamente, se sometieron a ultrasonido, se purgaron con solventes y se secaron. Seguidamente, los frascos con la muestra de flores se taparon con aluminio, teflón y una tapa rosca.

Consecutivamente, la mitad de los viales se sometieron a un proceso de extracción asistido por ultrasonido (60 min y 40 °C), mientras que la otra mitad de frascos, se dejó en maceración por 2 h, a temperatura ambiente. Al finalizar la extracción, los extractos se filtraron, y los residuos se lavaron con 10 mL de solvente. Después, los frascos con los extractos, se almacenaron en una nevera a 5 °C. La última parte del proceso, consistió en la concentración de los extractos empleando un sistema de destilación a presión reducida, hasta un volumen aproximado de 1 mL, seguido de una segunda concentración con corriente de nitrógeno hasta 0.5 mL. Este volumen de extracto concentrado se diluyó con diclorometano hasta 1 mL.

3.5.2 Destilación-extracción simultánea con solvente. La destilación-extracción simultánea con solventes se hizo, siguiendo los procedimientos de Godefroot [43], Georgieva [42] y, principalmente, los protocolos desarrollados en el Laboratorio de Cromatografía, reportados por Stashenko y colaboradores [107, 109, 112]. Se usó un equipo SDE (**Figura 25**) a microescala para solventes de alta densidad, según la adaptación del equipo *Lickens-Nickerson*, desarrollada por Godefroot [43].

Figura 25. Esquema del equipo para SDE, empleado en el trabajo.

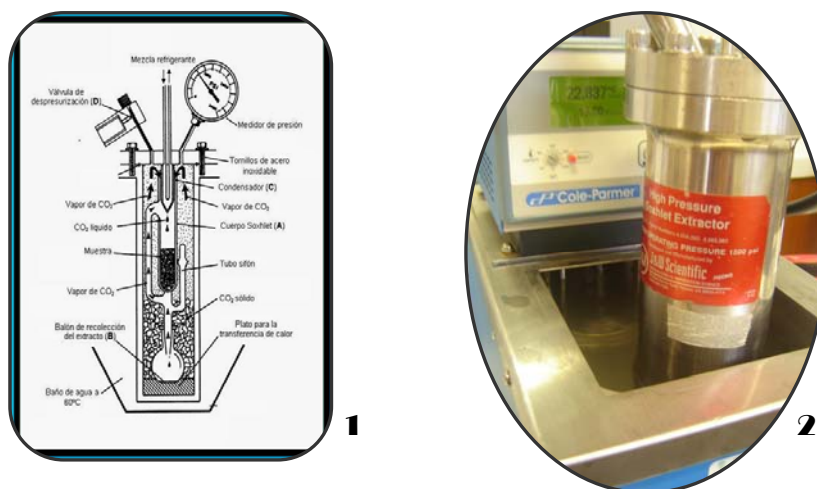


1. Equipo diseñado por Godefroot [43]; 2. Montaje empleado en el trabajo.

En un balón A (**Figura 25**) se depositaron material vegetal finamente picado (10 g) y agua (25 mL); en el balón B, diclorometano (3 mL) y perlas de ebullición; en la parte C, diclorometano (1,5 mL) y agua destilada (1,5 mL). El balón A se calentó en un baño de aceite a 125 °C, mientras que el balón B en un baño con agua a 75 °C; justo después del inicio de la destilación. Por un dedo frío, ubicado en la parte C, recirculó agua a una temperatura de 5 °C, con ayuda de un baño refrigerante de marca *PHABER*. Al transcurrir una hora la destilación se detuvo, mientras que la extracción con solvente se dejó continuar por 20 min más. Por último, el extracto obtenido se concentró a 1 mL con corriente de nitrógeno.

3.5.3 Extracción con fluido supercrítico. La SFE se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Stashenko *et al.* [106, 111]. Se empleó un extractor Soxhlet (**Figura 26**), contenido en un recipiente que soporta altas presiones [53]. Se dispusieron en el Soxhlet 10 g del material vegetal picado (*ca.* 1 cm²); en el espacio entre el Soxhlet y el contenedor de acero, se colocaron 320 g de CO₂ comercial en estado sólido (hielo seco), como fuente de fluido supercrítico.

Figura 26. Montaje de extracción con fluido supercrítico (CO₂).



1. Equipo patentado por Jennings [53]; 2. Montaje empleado.

Se empleó un baño refrigerante *COLE-PARMER*, conectado al dedo frío en la tapa del equipo, según lo recomendado por los diseñadores. Después de alcanzar una presión de 1050 a 1100 psi (ca. 7,6 MPa), la extracción se dejó por 2 h, a una temperatura entre 40-45°C. Luego, se disminuyó la presión con enfriamiento, para comenzar a descomprimir el reactor. Seguidamente, se retiró el Soxhlet y se recuperó cuidadosamente el extracto disuelto en diclorometano (1mL).

3.5.4 Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas. Además de los métodos mencionados, se usó la hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD), según lo descrito por Stashenko *et al.* [108, 109]. La técnica se llevó a cabo empleando un equipo de destilación tipo *Clevenger* con reservorio de destilación *Dean-Stark* y adaptación para calentamiento por radiación. La radiación fue suministrada en un horno de microondas convencional (modificado), con una potencia de salida de 1200 W ($\nu=2450$ MHz). Con este montaje, se realizaron cuatro extracciones sucesivas de 10 min; con el 60% de la potencia de operación del horno. Al final del proceso, el aceite se separó por decantación, se secó con Na_2SO_4 anhidro, y una alícuota de cada aceite esencial (50 μL) se disolvió en diclorometano hasta volumen final de 1 mL. Para la MWHD de las flores frescas (ca. 110 g) y rizomas (ca. 500 g), se adicionaron 150 mL y 200 mL de agua destilada, respectivamente.

3.6 MÉTODO RÁPIDO PARA EL ANÁLISIS *IN VITRO* DE VOLÁTILES EN FLORES DE *Hedychium coronarium*.

3.6.1 Método convencional para el análisis *in vitro* con HS-SPME. Para este muestreo, se empleó una manta de agitación con calentamiento, a 60 °C, un baño de María, dentro del cual se dispuso un vial ámbar con *septum* (especial para SPME), que contenía la muestra de flores picadas (1 g). El vial con la muestra se dejó a esta temperatura durante 15 min para pre-equilibrio.

Luego, la aguja de perforación del dispositivo para SPME se introdujo (1 cm), a través del *septum* al HS del vial, e inmediatamente, se expuso la fibra (PDMS/DVB, 65 μm) para extracción de volátiles, por 30 min. Al final, se retiró la fibra y se llevó al puerto de inyección de un GC (Numeral 3.7.4).

Se realizaron pruebas con dos técnicas en modo HS para el análisis rápido de los compuestos volátiles contenidos en flores de *H. coronarium*, a saber: SPME y microextracción en fase líquida (SDME) (**Figura 27**). Para éstas pruebas se usaron 5 g de flores frescas, una fibra para SPME con recubrimiento de PDMS/DVB de 65 μm de espesor, 50 % de la potencia de trabajo del MW, 10 mL de agua, 10 min de exposición de la fibra y 2 min de radiación.

Figura 27. Técnicas de HS-SDME y HS-SPME, asistidas por MW.

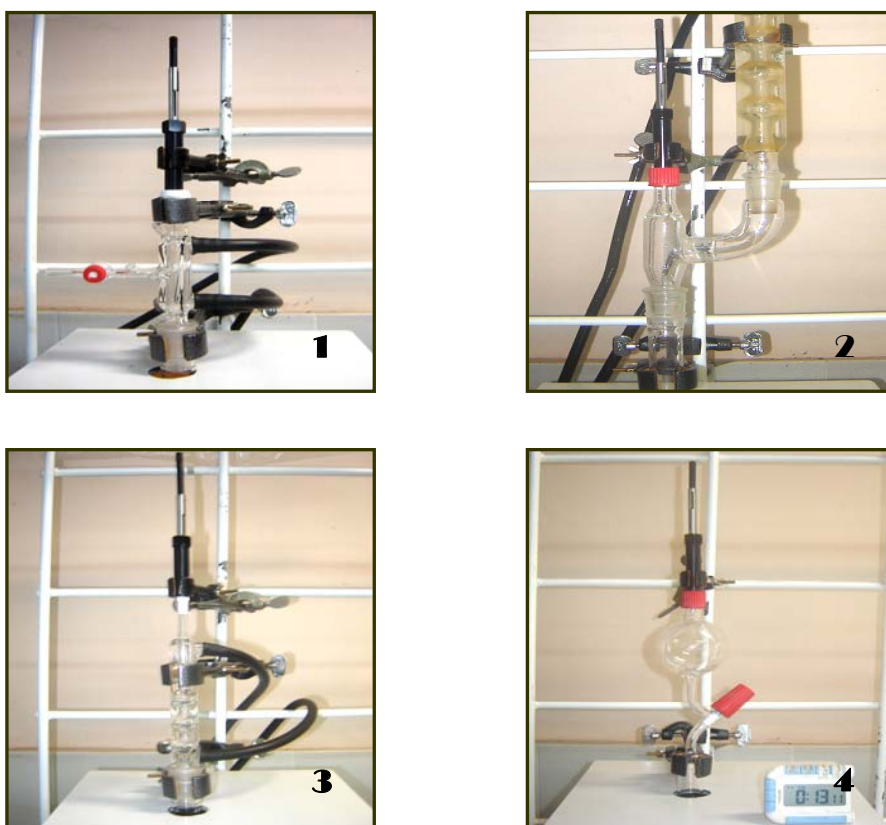


1. Horno microondas; 2. Modo de HS-SDME; 3. Modo de HS-SPME.

3.6.2 Selección del dispositivo de muestreo. Como se muestra en la **Figura 28**, se probaron 4 dispositivos para extracción por HS-SPME, asistida por MW, a saber: 1. Condensador con desprendimiento lateral; 2. Acople

para condensador y *septum*; 3. Condensador de bolas; 4. Dispositivo cerrado, con válvula de paso. Se hicieron ensayos con diferentes tipos de fibra para SPME (PDMS, 100 μm o PDMS/DVB, 65 μm); con distintas cantidades de flores frescas (1, 5, 10 ó 20 g); de la potencia de trabajo del horno (30, 60 ó 100 %); del tiempo de irradiación (30, 60, 120 ó 150 seg); del tiempo de exposición de la fibra (1, 10, 20 ó 30 min).

Figura 28. Dispositivos probados para la extracción de volátiles de flores.



1. Condensador con desprendimiento lateral; 2. Acople para condensador y *septum*;
3. Condensador de bolas; 4. Dispositivo cerrado, con válvula de paso.

3.6.3 Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas acoplada a microextracción en fase sólida en modo *headspace*. Se evaluaron, entre otras, las variables experimentales del proceso de la hidrodestilación (potencia y tiempo de radiación), y de la extracción, *i.e.* tiempo de exposición

de la fibra y cantidad de muestra, con ayuda de un diseño factorial y el *software Statgraphics® Plus Version 5.1*. En todos los casos, la selección de cada variable, se hizo, con base en el área de respuesta de cinco picos cromatográficos, a saber: 1. Propanol; 2. α -Pineno; 3. 1,8-Cineol; 4. (E)- β -Ocimeno; 5. Linaol, registrados en un GC-FID.

El método para la selección de las condiciones de análisis, consistió en:

- a. **Selección del tipo de fibra.** De acuerdo con los resultados de las pruebas para los dispositivos mostrados en la **Figura 32** y, según lo reportado por Deng *et al.* [29], se fijaron las condiciones de potencia del MW (50%), tiempo de radiación de MW (2 min), cantidad de muestra (5 g), tiempo de exposición de la fibra para SPME (5 min) y volumen de agua (10 mL). Las siguientes fueron las fases estacionarias (recubrimientos) estudiadas: poliacrilato (PA, 85 μ m), poli(dimetilsiloxano)/divinilbenceno (PDMS/DVB, 65 μ m) y poli(dimetilsiloxano) (PDMS, 100 μ m).
- b. **Pruebas preliminares.** Se realizaron pruebas con diferentes fibras (recubrimientos), cantidades de muestra, tiempos de extracción (exposición de la fibra) y radiación de MW (duración, potencia). Básicamente, estas pruebas permitieron seleccionar los niveles de las variables a estudiar.
- c. **Volumen de agua y porcentaje de sal.** Se evaluó el efecto del volumen de agua (1, 10 y 20 mL) y el porcentaje de sal (0, 10 y 20%), con las condiciones de potencia del MW (50%), tiempo de radiación de MW (2 min), cantidad de muestra (5 g) y tiempo de exposición (5 min).
- d. **Selección del tiempo de radiación y potencia del horno microondas.** Con las condiciones encontradas en los numerales **a** y **b**, se buscaron el tiempo de radiación (1, 2 y 4 min) y la potencia de trabajo (480, 600 y 720 W) para el MW, que favorezcan la destilación.

- e. **Selección del tiempo de exposición de la fibra y cantidad de muestra.** Se expuso la fibra por 2, 5 y 10 min, al espacio de cabeza de diferentes cantidades de muestra (3, 5 y 7 g), usando las condiciones establecidas en los *ítems* anteriores.

3.6.4 Determinación de las figuras analíticas de mérito. Cuando fueron establecidas estadísticamente las condiciones del método, se determinaron las figuras de mérito, a saber: límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LQO) para 1,8-cineol, linalol y γ -terpineno, linealidad, sensibilidad y reproducibilidad. Para la determinación de estos parámetros, se realizó una curva de calibración para 1,8-cineol, linalol y γ -terpineno, por el método de estándar interno.

La **curva de calibración con estándar interno**, se llevó a cabo empleando materiales de referencia certificados, a saber: 1,8-cineol, linalol y γ -terpineno. Se hizo una primera extracción de los volátiles de las flores de *H. coronarium* con HS-SPME, asistida por MW, sin adición de estándar interno, empleando las condiciones establecidas en el Numeral **3.6.3**, luego, se realizaron cuatro extracciones sucesivas, adicionando 0,2; 0,4; 0,6 y 1 μ L de cada uno de los patrones, a 10 mL de agua contenida en un balón de 500 mL, seguido de la adición de flores frescas, previamente picadas.

- **Determinación de los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LQO).** El LQO y el LOD se determinaron empleando la ecuación de la curva de calibración realizada. El LOD se estimó como la señal del blanco más tres veces su desviación estándar. El límite de cuantificación se definió como el doble de la concentración del límite de detección (LQO=2LOD).

- **Evaluación de la linealidad y la sensibilidad del método.** La linealidad se fijó como el coeficiente de determinación, obtenido con la curva

de calibración y la sensibilidad como la pendiente de la curva a un nivel de confianza del 95%.

- **Evaluación de la reproducibilidad de tiempos de retención (t_R) y de áreas.** Se determinó la reproducibilidad del método de MWHD-HS-SPME, desorbiendo los volátiles de la fibra, a través de seis extracciones sucesivas, en el puerto de inyección de un GC-FID. Se evaluó la reproducibilidad del método, en términos del coeficiente de variación (CV) de los t_R y de las áreas cromatograficas, para los compuestos mayoritarios.

3.7 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS DE ANÁLISIS.

3.7.1 Análisis de HS-SPME por GC-MS. Para la desorción de los volátiles extraídos y concentrados sobre la fibra de SPME, se emplearon *liner* y *septum*, diseñados especialmente para SPME. El análisis de volátiles aislados *in vivo* e *in vitro*, empleando el dispositivo para SPME, se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases *Hewlett-Packard* HP 5890A *Series II*, dotado con un inyector *split/splitless* y acoplado a un detector selectivo de masas HP5972. La separación se realizó en una columna apolar de 30 m x 0.25 mm, D.I., 0.25 μm , d_f ; con fase estacionaria de 5%-fenil-poli(metilsiloxano). La temperatura del horno se programó de 40°C (5 min) hasta 250°C @ 5°C min^{-1} . El gas de arrastre fue helio, con un flujo de 1 mL s^{-1} . Las temperaturas del puerto de inyección, la cámara de ionización y la línea de transferencia se mantuvieron a 250, 230 y 285°C, respectivamente. Finalmente, los espectros de masas y corrientes iónicas reconstruidas se obtuvieron por barrido automático de radio frecuencia (*full scan*), @ 4.75 *scan s*⁻¹, en el rango de masas de m/z 40-350.

3.7.2 Cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo de masas (columna apolar). Los espectros de masas se obtuvieron por impacto de electrones con energía de 70 eV, en un CG *Agilent Technologies*

6890 *Plus Series* (**Figura 29**) acoplado a un detector selectivo de masas (MSD) *Agilent Technologies 5973 Network*, y equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (250°C, relación *split* 1:30), un inyector automático *Agilent 7863*, un sistema de datos *MSChemStation* (Versión 1.05), que posee las bases de datos NBS 75K, WILEY 138K, NIST 02 y ADAMS 2004. Se usó una columna capilar de sílice fundida, DB-5MS de 60 m x 0.25 mm, D.I., con la fase estacionaria de 5%-fenil-poli(metilsiloxano) de 0.25 µm de grosor (d_f). El gas de arrastre fue el helio (99.9995%, *Aga Fano*, S.A.), con un flujo de 1 mL min⁻¹. La temperatura del horno se programó de 45°C (5 min) hasta 150°C (2 min) @ 4°C min⁻¹, luego, hasta 250°C (5 min) @ 5°C min⁻¹, finalmente, hasta 275°C (15 min) @ 10°C min⁻¹. Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia se mantuvieron a 230 y 280°C, respectivamente. Espectros de masas y corrientes iónicas reconstruidas (TIC) se obtuvieron en un cuadrupolo, por medio de barrido automático de radiofrecuencia (*full scan*), @ 4.75 scan s⁻¹, en el rango de masas de m/z 40-350. Cada pico cromatográfico se revisó, para evaluar su homogeneidad, obteniendo fragmentogramas de masas, basados en iones característicos de cada compuesto. Para la identificación de algunos compuestos se usaron patrones de referencia, analizados bajo las mismas condiciones instrumentales, espectros de masas e índices de retención de Kováts.

Figura 29. Cromatógrafo de gases con detector selectivo de masas usado en la presente investigación (columna apolar).



3.7.3 Cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo de masas (columna polar). Los espectros de masas se obtuvieron por impacto de electrones con energía de 70 eV, en un CG *Agilent Technologies 6890N Network* (**Figura 30**), acoplado a un detector selectivo de masas (MSD) *Agilent Technologies 5975*, y equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (250°C, relación *split* 1:50), un inyector automático *Agilent 7863*, un sistema de datos *HPChemStation* (Versión D.02.00.275), se usaron las bases de datos NBS 75K, WILEY 138K, NIST 02 y ADAMS 2004. Se utilizó una columna capilar de sílice fundida, DB-WAX de 60 m x 0.25 mm, D.I., con la fase estacionaria entrecruzada e inmobilizada de poli(etilenglicol) de 0.25 μm de espesor (d_f). El gas de arrastre fue el helio, con un flujo de 1 mL min^{-1} . La temperatura del horno se programó de 45°C (10 min) hasta 220°C (5 ó 50 min) @ 3°C min^{-1} . Las temperaturas de la cámara de ionización y la línea de transferencia se mantuvieron a 230 y 250°C, respectivamente. Espectros de masas y corrientes iónicas reconstruidas (TIC) se obtuvieron en un cuadrupolo, por medio de barrido automático de frecuencia (*full scan*), @ 4.75 scan s^{-1} , en el rango de masas de m/z 40-350. Cada pico cromatográfico se revisó, para evaluar su homogeneidad, obteniendo fragmentogramas de masas, basados en iones característicos de cada

compuesto. Para la identificación de los compuestos se emplearon sus espectros de masas e índices de retención de Kováts.

Figura 30. Cromatógrafo de gases con detector selectivo de masas usado en la presente investigación (columna polar).



3.7.4 Cromatografía de gases acoplada a detector de ionización en llama. Se empleó un cromatógrafo GC *Hewlett-Packard* (HP) 5890A *Series II*, equipado con un inyector *split/splitless* (250°C, relación *split* 1:30) y un detector de ionización en llama (FID) (250°C). Los datos cromatográficos se procesaron con un programa *HPChemStation* (HP Rev. A.06.03). Para la separación de analitos, se usó la columna capilar apolar, DB-5 (J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.), de 30 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25 μm , d_f , con fase estacionaria de 5%-fenil-poli(metilsiloxano). La temperatura del horno se programó de 40°C (15 min) hasta 250°C @ 5°C min^{-1} . El gas de arrastre empleado fue el helio, con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 200 kPa y una velocidad lineal de 26 cm s^{-1} . Las velocidades de flujo para gases de combustión en el FID, el aire y el hidrógeno, se mantuvieron a 300 y 30 mL min^{-1} , respectivamente.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se empleó la HS-SPME *in vivo*, para determinar si existe regulación de emisión de volátiles en las flores de *Hedychium coronarium* a diferentes horas del día. Se compararon diferentes técnicas para extraer los compuestos volátiles de las flores, a saber: extracción con solventes (SE), destilación-extracción con solventes simultánea (SDE), extracción con fluidos supercríticos (SFE) e hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD). Se analizaron los resultados obtenidos con estas técnicas, con el fin de establecer la composición de la fragancia floral. Se aplicaron las técnicas mencionadas también para determinar la composición del aceite esencial en los rizomas de la especie. Se desarrolló un método rápido para el análisis de volátiles en las flores, combinando MWHD y HS-SPME con GC-FID o GC-MS. Se establecieron algunas figuras analíticas de mérito para este método, usando curvas de calibración.

4.1 CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA DE *Hedychium coronarium*.

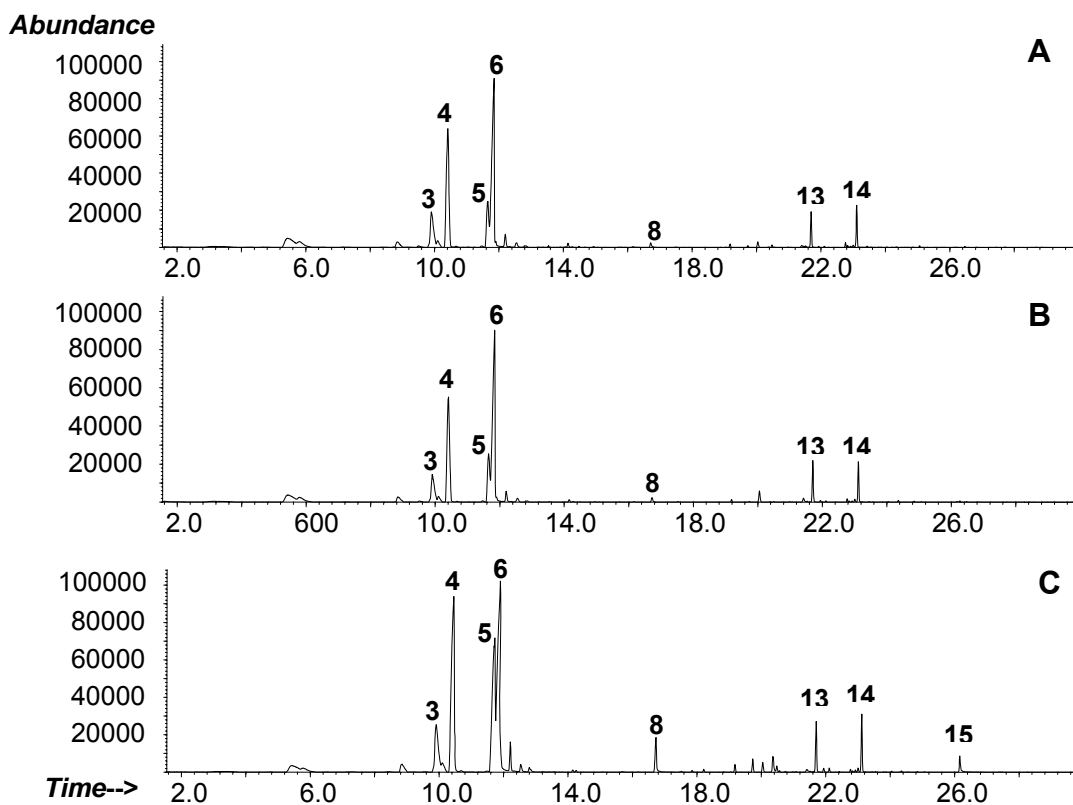
La identificación taxonómica de la planta y su posterior clasificación botánica se realizaron por el Dr. J. Betancur, quién la registró como *Hedychium coronarium* Kœern, perteneciente a la familia Zingiberacea. Los pliegos testigos de la planta se depositaron en el Herbario Nacional Colombiano con el número de *voucher* (No. COL 520465).

4.2 ANÁLISIS POR HS-SPME.

4.2.1 Análisis de flores *in vivo*. En la **Figura 31** se muestran las corrientes iónicas totales (TIC) reconstruidas, obtenidas por GC-MS, después de exposición *in vivo* de la fibra de PDMS/DVB (65 μm), al HS de flores y bráctea de *H. coronarium*, a diferentes tiempos del día. Se observó que a las 7:00 p.m. hay mayor emisión de compuestos volátiles de las flores de *H.*

coronarium. Como se muestra en los cromatogramas típicos de la **Figura 31C** y en las áreas de los compuestos identificados en la **Tabla 6**, las flores aumentaban la emisión de 1,8-cineol, (E)- β -ocimeno, linalol, benzoato de metilo, indol, benzoato de bencilo e isoeugenol, compuestos mayoritarios identificados.

Figura 31. Cromatogramas típicos (GC-MS, TIC) de los volátiles emitidos por las flores de *H. coronarium*, a diferentes horas del día.



Columna apolar DB-5MS (60 m), *split* 1:30; Detector de masas (EI, 70 eV).

Horas de muestreo: **A.** 11:30 a.m.; **B.** 3:00 p.m.; **C.** 7:00 p.m.. La identificación de los picos aparece en la **Tabla 6**.

Los compuestos mayoritarios, aunque en diferentes cantidades, coinciden con los reportados por Raguso [87], quién empleó la misma técnica en su

trabajo. Linalol, el compuesto mayoritario obtenido bajo las condiciones de análisis, junto a otros compuestos identificados se reportan en la **Tabla 6**.

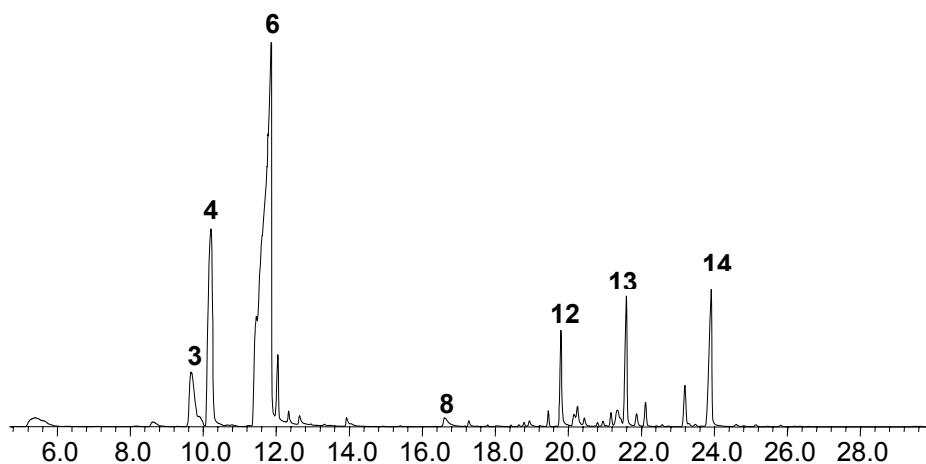
Tabla 6. Composición de la fracción volátil, obtenida por HS-SPME *in vivo* de las flores de *H. coronarium*.

N° Pico ^a	Compuesto	I _k columna, DB-5MS		Área, cuentas *10 ³		
		Exp.	Teó [2].	Hora de muestreo		
				11:30	15:00	19:00
1	3-Hexenol	661	-	8765	6571	6317
2	Nonano	895	901	2385	2222	3548
3	1,8-Cineol	1032	1031	13240	9790	19346
4	(E)-β-Ocimeno	1052	1050	35852	30312	59010
5	Benzoato de metilo	1099	1091	12220	12540	41304
6	Linalol	1108	1097	49041	47249	75516
7	(E)- <i>p</i> -Ment-2-en-1-ol	1144	1141	1175	937	1477
8	Indol	1297	1291	833	790	5639
9	(E)-Jasmona	1386	1393	407	293	921
10	(E)-β- Cariofileno	1415	1419	194	80	1682
11	Benzoato de 2-metilbutilo	1445	1441	776	1594	1356
12	(E)-Isoeugenol	1453	1451	---	---	2612
13	(E,E)-α-Farneseno	1504	1506	4309	5240	6910
14	Sesquiterpeno oxigenado	1712	-	4840	4456	6738
15	Benzoato de bencilo	1769	1760	90	---	2414

a. Número del pico en las **Figura 31** y **32**.

Para el muestreo de volátiles en flores de *H. coronarium* se incluyó la bráctea, catalogada por Raguso *et al.* [87], como la parte de la planta con mayor contenido de linalol. En la presente investigación se llevó a cabo el muestreo *in vivo* sólo a una flor, lo que permitió obtener una TIC (**Figura 32**) muy similar a la registrada para las flores aún dispuestas en la bráctea. De tal modo, se constató la presencia de 1,8-cineol, (E)-β-ocimeno, linalol, benzoato de metilo, benzoato de bencilo e isoeugenol, entre otros compuestos volátiles contenidos en las flores de *H. coronarium* (ver **Tabla 6**).

Figura 32. Cromatograma (GC-MS, TIC) de los volátiles extraídos por HS-SPME, de una flor de *H. coronarium*.



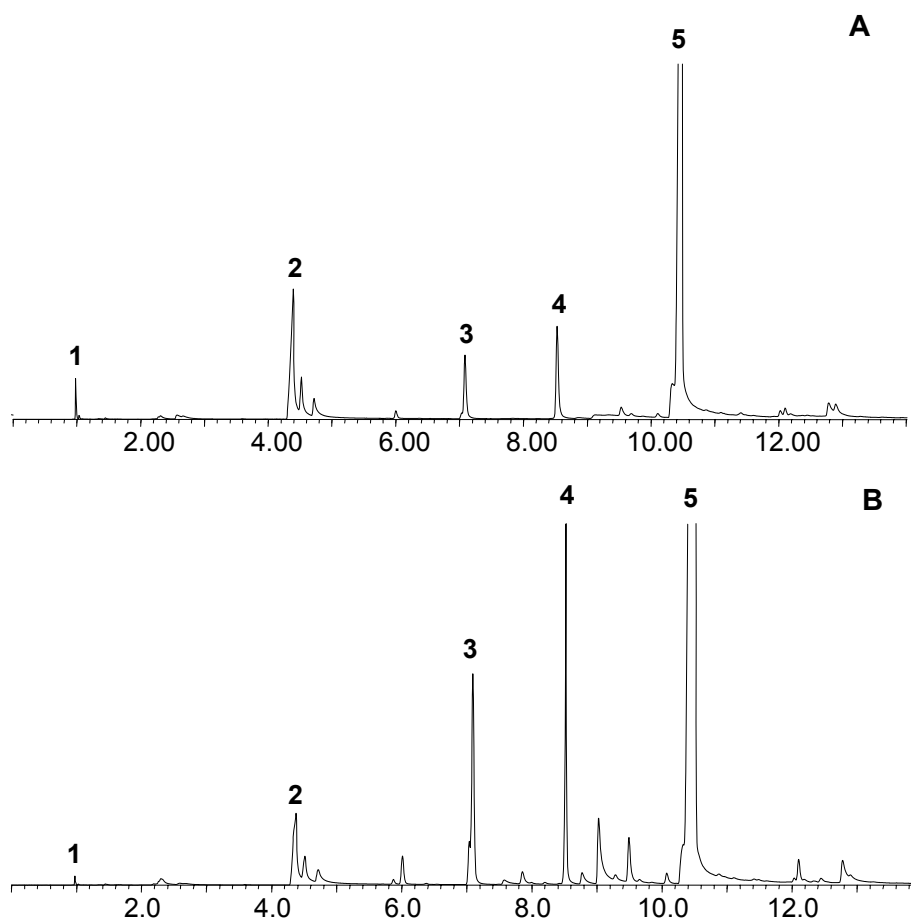
Columna apolar DB-5MS (60 m), *split* 1:30: Detector de masas (EI, 70 eV).

La identificación de los picos aparece en la **Tabla 6**.

Con base en los resultados obtenidos, se decidió recolectar las flores de *H. coronarium* después de las 6:00 p.m, periodo de mayor emisión de volátiles.

4.2.2 Análisis por HS-SPME *in vitro*. Para los análisis *in vitro* de los volátiles de las flores de *H. coronarium*, éstas se picaron; se usaron las dos partes más representativas de la flor, *i.e.* corona y corola. En la **Figura 33** se muestran segmentos de los perfiles cromatográficos, obtenidos por GC-FID, de los volátiles aislados de las dos partes de la flor por HS-SPME (PDMS/DVB, 65 μ m). Las mayores diferencias en la composición de los volátiles aislados de ambas partes de la flor, se registraron en la fracción más volátil, correspondiente a los compuestos que eluyen antes de 12 min. Los pétalos, sépalos y anteras, emiten menor cantidad de volátiles, *i.e.* propanol (**1**) y α -pineno (**2**), y mayor cantidad relativa de 1,8-cineol (**3**), (E)- β -ocimeno (**4**) y linalol (**5**) que los pedúnculos de la flor.

Figura 33. Volátiles emitidos por diferentes partes de flores de *H. coronarium*.



Corriente iónica total obtenida por GC-MS en columna apolar DB-5MS (60 m).

Partes de la flor: **A.** Pedúnculos; **B.** Pétalos, sépalos y anteras. Picos cromatográficos:

1. Propanol; **2.** α -Pinoeno; **3.** 1,8-Cineol; **4.** (E)- β -Ocimeno y **5.** Linalol.

Los resultados confirman que las flores en sus estructuras básicas, contienen diferentes tipos de compuestos en variadas cantidades, lo que corrobora la existencia de una regulación espacial de los compuestos volátiles, observación importante para la toma y manejo de muestras.

4.3 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS Y ACEITES ESENCIALES DE FLORES DE *Hedychium coronarium*.

Los extractos de flores abiertas, sanas y sin signos de marchitamiento, ricos en compuestos orgánicos volátiles, colectadas entre 5:30 y 8:30 p.m., se analizaron por GC-MS, usando tiempos de retención (t_R), índices de retención de Kovács (I_K) y espectros de masas para su identificación.

Los resultados obtenidos con estas técnicas de extracción (**ANEXO 3, Tabla 3-1**), sirvieron para calificar la conveniencia del método de análisis que se implementó.

4.3.1 Análisis por GC-MS de concretos, elaborados a partir de flores de *Hedychium coronarium*. En los extractos elaborados por maceración simple y maceración asistida con ultrasonido, con tres diferentes solventes, a saber: hexano (Hex), éter de petróleo (EP) y acetato de etilo (AcOEt), se encontraron hasta 103 componentes con cantidades relativas superiores al 0,05%. Los compuestos mayoritarios extraídos con cada uno de los tres solventes empleados y los perfiles cromatográficos característicos, obtenidos por GC-MS, aparecen en las **Figura 34, 35 y 46**, y su identificación en la **Tabla 7**.

Con la maceración simple de las flores en AcOEt, se identificaron el 81.3% de los compuestos (59); con Hex, el 86.5% de los compuestos (52); con EP, el 91,8% de los compuestos (37). Mientras que por maceración asistida con ultrasonido, en el Hex se identificaron 90,0% de los compuestos (50); con EP, el 80.4% de los compuestos (46); con AcOEt, el 86,4% de los compuestos (44).

Tabla 7. Composición química, obtenida por GC-MS, de concretos aislados de *Hedychium coronarium*, por maceración y extracción con ultrasonido, usando tres diferentes solventes.

N° Pico ^a	Compuesto	Clases de compuesto	Cantidad relativa ^b , %; ±S (n=3)					
			Maceración simple			Maceración asistida con ultrasonido		
			AcOEt	Hex	EP	AcOEt	Hex	EP
1	Propanoato de etilo	A	1,89 ± 0,09	-	-	1,19 ± 0,07	-	-
2	α-Pineno	M	0,42 ± 0,02	0,056 ± 0,002	0,14 ± 0,07	-	-	0,11 ± 0,06
3	α-Tujeno	M	-	-	-	0,048 ± 0,005	-	-
4	2,3-Dimetil-2-butanol	A	-	-	2,28 ± 0,04	-	-	1,7 ± 0,2
5	2-Metil-2-pentanol	A	-	0,27 ± 0,02	4,8 ± 0,2	-	0,45 ± 0,2	4,7 ± 0,2
6	β-Pineno	M	1,95 ± 0,02	-	<i>tr</i>	2,36 ± 0,03	-	<i>tr</i>
7	3-Metil-3-pentanol	A	-	-	1,26 ± 0,05	-	-	-
8	Limoneno	M	0,24 ± 0,01	0,13 ± 0,07	0,14 ± 0,09	0,14 ± 0,04	0,32 ± 0,03	0,38 ± 0,03
9	Alcohol isopentílico	A	-	-	0,21 ± 0,09	-	-	0,12 ± 0,03
10	1,8-Cineol	MO	0,99 ± 0,04	1,2 ± 0,2	1,00 ± 0,02	0,98 ± 0,02	1,18 ± 0,08	0,9 ± 0,1
11	(E)-β-Ocimeno	M	0,41 ± 0,04	1,4 ± 0,01	1,52 ± 0,09	0,34 ± 0,1	1,45 ± 0,5	1,4 ± 0,3
12	Pentadecano	A	-	1,19 ± 0,02	-	-	2,1 ± 0,3	-
13	Ácido acético	A	6,0 ± 0,8	-	-	37 ± 1	-	-
14	(Z)-2-Metilbutilaldoxima	A	0,30 ± 0,02	-	-	0,42 ± 0,03	0,15 ± 0,04	-
15	N.I.	-	-	-	0,90 ± 0,03	-	-	3,7 ± 0,3
16	N.I.	-	-	-	0,8 ± 0,3	-	-	3,1 ± 0,3
17	Linalol	MO	2,3 ± 0,3	4,5 ± 0,1	6,8 ± 0,2	1,91 ± 0,02	5,9 ± 0,2	7,61 ± 0,01

Tabla 7, continuación.

18	(E)-Hidrato de sabineno	MO	0,15 ± 0,02	-	-	-	-	-
19	(E)-β-Cariofileno	M	9,05 ± 0,05	0,31 ± 0,2	0,72 ± 0,03	5,3 ± 0,1	0,36 ± 0,05	0,8 ± 0,2
20	Benzoato de metilo	B	0,59 ± 0,02	1,35 ± 0,04	1,8 ± 0,1	0,68 ± 0,06	1,83 ± 0,08	1,9 ± 0,2
21	Fenilacetaldehído	B	1,34 ± 0,01	0,18 ± 0,02	-	1,1 ± 0,1	0,56 ± 0,04	-
22	Hexadecano	A	-	1,39 ± 0,01	-	-	2,29 ± 0,04	-
23	(E)-β-Farneseno	S	2,8 ± 0,1	0,13 ± 0,06	0,26 ± 0,02	2,33 ± 0,04	0,10 ± 0,03	0,30 ± 0,06
24	Metilchavicol	B	-	-	-	-	0,07 ± 0,02	-
25	α-Terpineol	MO	0,35 ± 0,04	0,09 ± 0,03	0,08 ± 0,05	0,23 ± 0,08	0,24 ± 0,04	-
26	Borneol	MO	0,21 ± 0,05	-	-	0,11 ± 0,01	-	-
27	(E,E)-α-Farneseno	S	0,17 ± 0,03	0,16 ± 0,03	-	-	0,65 ± 0,02	-
28	Octadecano	A	-	0,68 ± 0,01	-	-	1,41 ± 0,04	-
29	Alcohol bencílico	B	1,19 ± 0,03	0,60 ± 0,03	0,9 ± 0,3	0,89 ± 0,08	0,16 ± 0,03	0,4 ± 0,1
30	Fenil acetónitrilo	B	0,29 ± 0,01	0,68 ± 0,07	0,28 ± 0,02	0,18 ± 0,03	0,34 ± 0,08	0,28 ± 0,05
31	Acetato de 3-hexenilo	A	0,14 ± 0,01	-	-	0,14 ± 0,02	-	-
32	N.I.	-	0,13 ± 0,02	-	-	-	-	-
33	(Z)-Jasmona	MO	0,52 ± 0,02	0,15 ± 0,08	0,15 ± 0,07	0,61 ± 0,09	0,13 ± 0,01	0,24 ± 0,04
34	N.I	-	0,55 ± 0,01	-	-	-	-	-
35	Óxido de cariofileno	SO	8,3 ± 0,2	0,27 ± 0,05	0,37 ± 0,06	6,6 ± 0,3	0,29 ± 0,03	0,48 ± 0,2
36	N.I.	-	0,098 ± 0,005	-	-	-	-	-
37	(E)-Sesquilandulol	SO	0,35 ± 0,06	0,21 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,33 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,14 ± 0,07
38	Heptadecanol	A	-	0,69 ± 0,03	-	-	1,01 ± 0,05	-

Tabla 7, continuación.

39	Germacreno D-4-ol	SO	0,55 ± 0,03	0,05 ± 0,03	0,44 ± 0,07	0,51 ± 0,01	0,98 ± 0,03	1,3 ± 0,1
40	Mirtenol	MO	-	0,051 ± 0,003	0,086 ± 0,006	-	0,14 ± 0,02	0,48 ± 0,01
41	N.I.	-	0,11 ± 0,04	-	-	-	-	-
42	<i>epoxi-allo</i> - Aromadendreno	A	0,32 ± 0,04	-	-	0,42 ± 0,04	-	-
43	N.I.	-	0,13 ± 0,09	-	-	-	-	-
44	N.I.	-	-	0,9 ± 0,2	-	-	-	-
45	Octadecanol	A	0,17 ± 0,07	-	-	0,25 ± 0,02	-	-
46	Benzoato de 3-(Z)- hexenilo	B	0,10 ± 0,06	0,65 ± 0,02	0,25 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,29 ± 0,04	0,83 ± 0,09
47	Eugenol	B	0,44 ± 0,05	1,16 ± 0,04	1,09 ± 0,09	0,34 ± 0,05	1,14 ± 0,02	1,44 ± 0,03
48	Linaloato de etilo	SO	0,11 ± 0,01	0,16 ± 0,03	0,11 ± 0,06	0,13 ± 0,08	0,09 ± 0,03	0,11 ± 0,01
49	(E)-Metil isoeugenol	B	0,19 ± 0,03	0,69 ± 0,08	-	0,18 ± 0,02	0,61 ± 0,3	0,78 ± 0,03
50	(Z)-Metil isoeugenol	B	-	-	0,47 ± 0,06	-	-	0,67 ± 0,03
51	4-Etenil-2-metoxi-fenol	B	3,4 ± 0,1	6,1 ± 0,6	2,14 ± 0,01	3,1 ± 0,2	0,08 ± 0,02	0,06 ± 0,01
52	Cedr-8(15)-en-10-ol	A	0,57 ± 0,02	-	-	0,75 ± 0,05	-	-
53	Docosano	A	-	0,36 ± 0,03	-	-	0,13 ± 0,02	-
54	Ocimeno	M	0,27 ± 0,03	-	-	0,27 ± 0,08	-	-
55	N.I.	-	-	-	-	-	-	0,87 ± 0,09
56	α-Cadinol	SO	0,91 ± 0,05	0,55 ± 0,09	0,43 ± 0,03	1,12 ± 0,05	0,75 ± 0,2	0,66 ± 0,07
57	N.I.	-	-	-	-	-	-	0,86 ± 0,09

Tabla 7, continuación.

58	3-Alil-6-metoxifenol	B	-	-	-	-	0,67 ± 0,09	-
59	Hidrocarburo	A	-	-	-	-	0,9 ± 0,3	-
60	N.I.	-	2,40 ± 0,02	-	-	2,36 ± 0,03	-	-
61	(E)-Jasmona	MO	-	-	1,96 ± 0,04	-	-	-
62	Ionona	MO	1,75 ± 0,05	-	-	-	-	-
63	N.I.	-	-	-	-	-	-	0,85 ± 0,2
64	4-Metiltiazol	A	4,5 ± 0,2	2,32 ± 0,02	2,37 ± 0,05	2,52 ± 0,02	2,9 ± 0,3	4,2 ± 0,5
65	2,4- <i>bis</i> (1,1-Dimetiletil)-fenol	B	0,94 ± 0,02	10,3 ± 0,2	-	0,39 ± 0,02	11 ± 2	-
66	N.I.	-	-	-	-	-	-	-
67	Tricosano	A	1,12 ± 0,06	0,47 ± 0,04	0,51 ± 0,03	0,59 ± 0,05	1,1 ± 0,2	2,4 ± 0,2
68	Eicosano	A	-	-	-	-	-	0,22 ± 0,04
69	Isoeugenol	B	3,91 ± 0,02	6,39 ± 0,07	7,4 ± 0,7	2,55 ± 0,01	13,1 ± 0,9	11 ± 1
70	(E,E)-Farnesol	SO	4,62 ± 0,06	-	-	1,45 ± 0,06	-	-
71	Escualeno	A	4,12 ± 0,03	5,95 ± 0,5	3,9 ± 0,3	6,0 ± 0,5	8 ± 3	4,39 ± 0,09
72	<i>epi</i> -Jasmonato de metilo	SO	1,3 ± 0,1	1,36 ± 0,08	2,06 ± 0,01	0,98 ± 0,02	1,7 ± 0,3	3,1 ± 0,3
73	Indol	-	-	0,52 ± 0,05	0,39 ± 0,05	-	3,5 ± 0,2	2,64 ± 0,07
74	N.I.	-	2,29 ± 0,02	-	-	-	-	-
75	Pentacosano	A	0,76 ± 0,02	0,73 ± 0,01	0,80 ± 0,03	0,82 ± 0,07	1,2 ± 0,3	2,95 ± 0,04
76	Pentadecanol	A	2,2 ± 0,1	1,71 ± 0,02	1,06 ± 0,02	2,32 ± 0,06	1,3 ± 0,3	-

Tabla 7, continuación.

77	Hexadecano	A	-	0,41 ± 0,03	-	-	-	-
78	Vainillina	B	-	0,9 ± 0,4	-	-	-	-
79	N.I.	-	-	0,57 ± 0,05	-	-	-	-
80	Ácido octadecanoico	A	-	7,59 ± 0,02	2,2 ± 0,1	-	1,42 ± 0,3	-
81	Benzoato de bencilo	B	2,59 ± 0,04	3,4 ± 0,5	3,2 ± 0,1	1,97 ± 0,06	4,64 ± 0,08	4,33 ± 0,03
82	Octacosano	A	2,24 ± 0,01	1,2 ± 0,2	1,7 ± 0,1	6,1 ± 0,2	2,3 ± 0,3	3,69 ± 0,02
83	Isobutanoato de 2-feniletilo	B	-	-	1,03 ± 0,04	-	-	1,59 ± 0,02
84	N.I.	-	-	-	-	-	1,9 ± 0,2	-
85	Hidrocarburo	A	-	-	-	-	-	0,82 ± 0,09
86	Hexadecanol	A	-	-	1,8 ± 0,1	-	-	-
87	N.I.	-	1,43 ± 0,09	-	-	1,26 ± 0,04	-	-
88	N.I.	-	-	-	-	-	1,1 ± 0,1	-
89	Hidrocarburo	A	-	-	-	-	-	3,3 ± 0,4
90	N.I.	-	-	-	1,3 ± 0,1	-	-	2,69 ± 0,01
91	Nonacosano	A	-	1,2 ± 0,2	-	-	1,6 ± 0,5	-
92	N.I.	-	2,03 ± 0,08	-	-	2,12 ± 0,2	-	-
93	N.I.	-	-	-	-	-	3,3 ± 0,5	-
94	N.I.	-	-	-	-	-	-	5,9 ± 0,5
95	N.I.	-	2,7 ± 0,1	-	-	3,2 ± 0,3	-	-
96	N.I.	-	-	3,45 ± 0,2	-	-	-	-

Tabla 7, continuación.

97	N.I.	-	-	1,29 ± 0,08	14,6 ± 0,2	-	-	-
98	Ácido palmítico	A	-	6,97 ± 0,3	8,1 ± 0,7	-	1,1 ± 0,7	-
99	Tricosano	A	-	-	7,1 ± 0,2	-	-	5,78 ± 0,03
100	Dotriacontano	A	4,65 ± 0,09	8,45 ± 0,7	-	6,1 ± 0,2	4,7 ± 0,9	-
101	N.I.	-	-	-	-	-	1,6 ± 0,3	-
102	Hidrocarburo	-	-	-	1,37 ± 0,09	-	-	3,2 ± 0,2
103	N.I.	-	-	1,68 ± 0,04	-	-	-	-
104	N.I.	-	1,83 ± 0,08	-	-	1,30 ± 0,4	-	-
A: Alifáticos			28,98 ± 0,08	41,5 ± 0,3	39,5 ± 0,3	64,6 ± 0,1	27,81 ± 0,03	37,5 ± 0,4
B: Bencenoides			14,89 ± 0,04	32,4 ± 0,7	18,6 ± 0,5	8,41 ± 0,08	34,5 ± 0,4	23,4 ± 0,7
M: Hidrocarburos monoterpénicos			12,4 ± 0,06	2,16 ± 0,02	2,52 ± 0,07	8,5 ± 0,2	2,58 ± 0,08	2,69 ± 0,03
MO: Monoterpenos oxigenados			6,28 ± 0,05	5,9 ± 0,1	10,8 ± 0,2	3,84 ± 0,07	7,59 ± 0,06	9,23 ± 0,02
S: Hidrocarburos sesquiterpenos			2,92 ± 0,05	0,26 ± 0,02	0,26 ± 0,03	2,33 ± 0,03	0,75 ± 0,02	0,30 ± 0,06
SO: Sesquiterpenos oxigenados			16,1 ± 0,8	2,6 ± 0,4	4,24 ± 0,06	11,1 ± 0,4	3,94 ± 0,05	5,8 ± 0,4

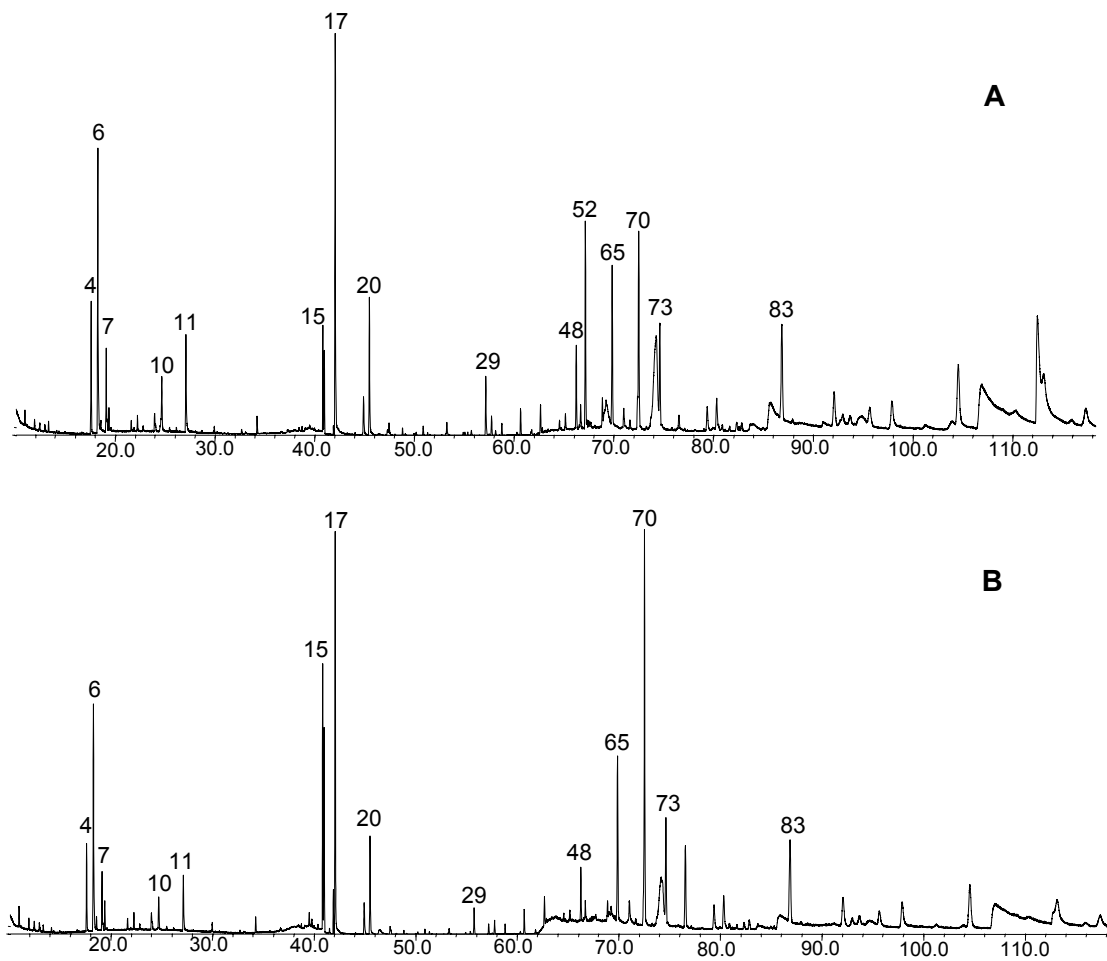
a Número del pico en la **Figura 34, 35 y 36.**

b Porcentajes calculados con base en las áreas de los picos; promedio de tres extracciones.

N.I. No identificado

tr .Trazas

Figura 34. Perfiles cromatográficos (GC-MS,TIC) de extractos florales de *H. coronarium*, obtenidos con éter de petróleo.

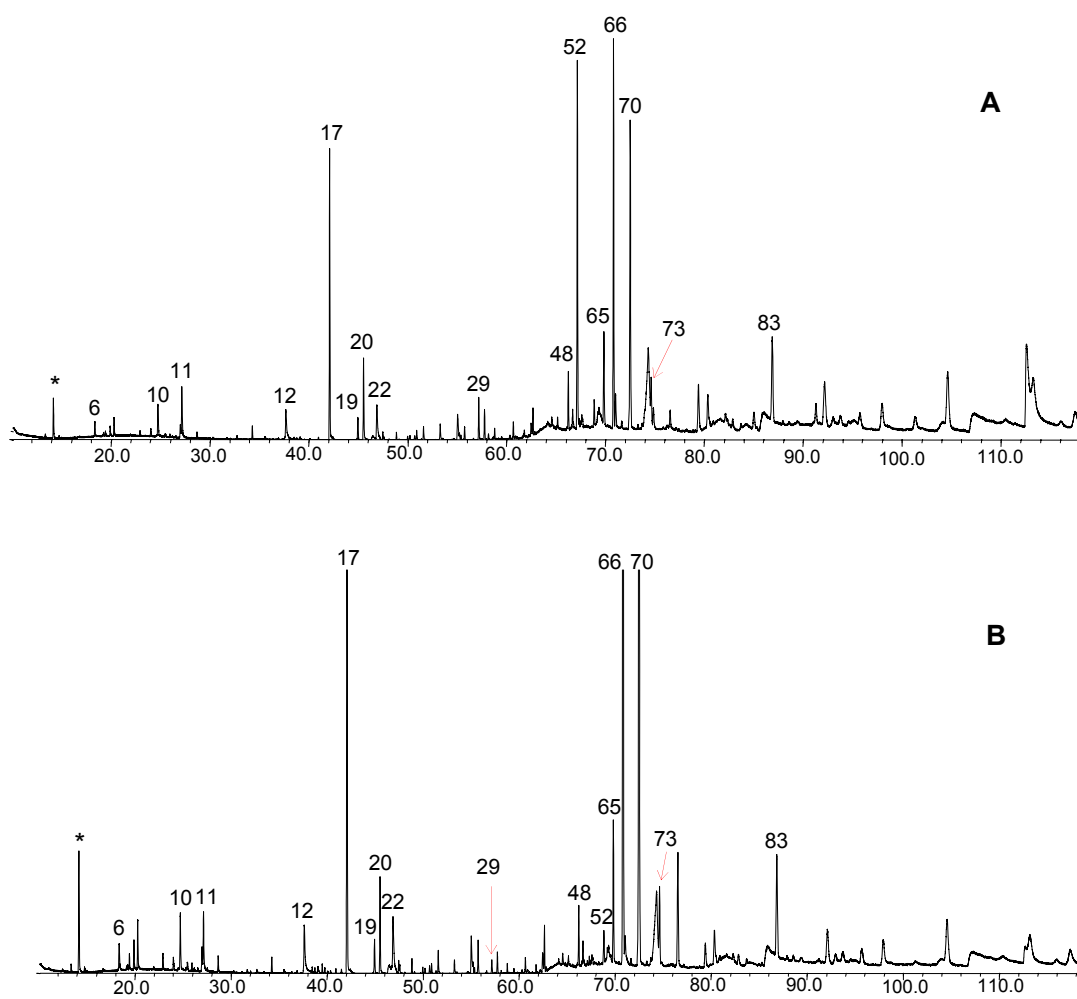


Columna apolar DB-Wax (50 m), *split* 1:50, detector selectivo de masas (EI, 70 eV).

A. Maceración simple; **B.** Maceración asistida con ultrasonido.

La identificación de los picos aparece en la **Tabla 7**.

Figura 35. Perfiles cromatográficos (GC-MS,TIC) de extractos florales de *H. coronarium*, obtenidos con hexano.

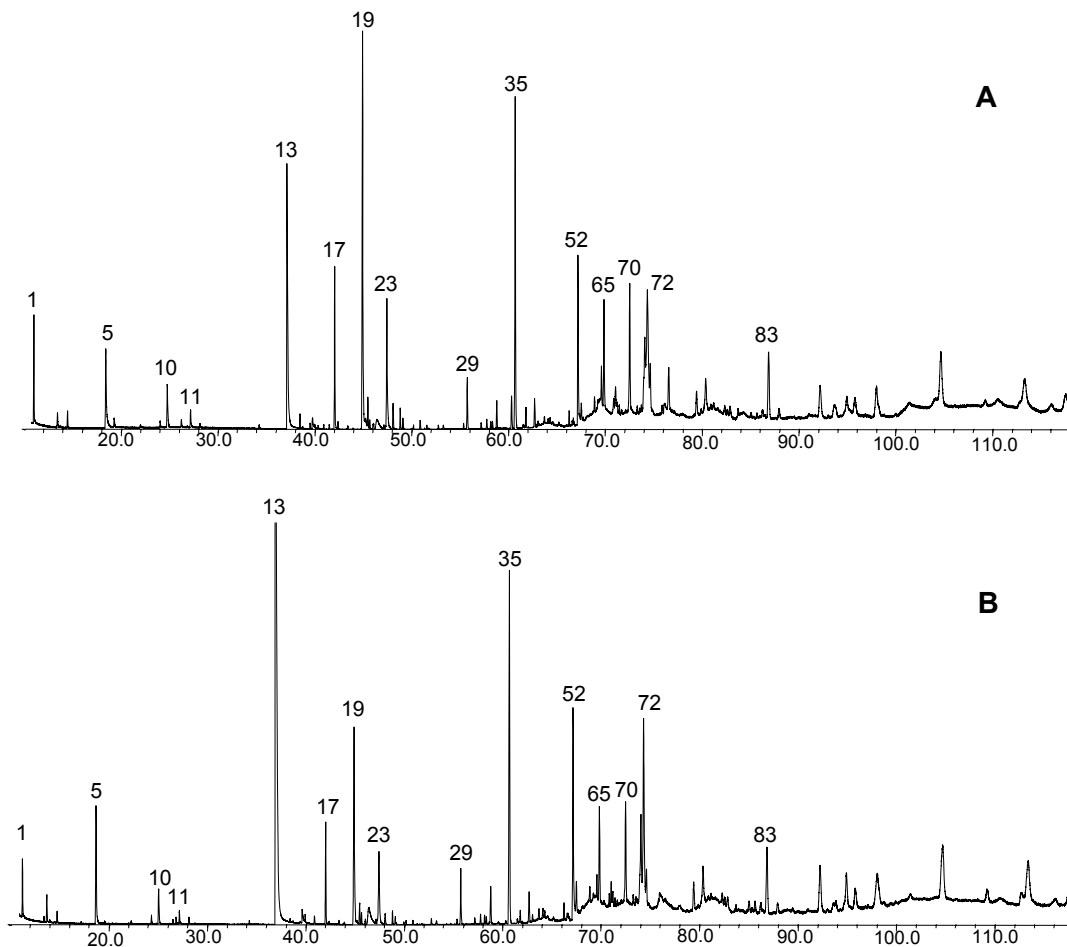


Columna apolar DB-Wax (50 m), *split* 1:50, detector selectivo de masas (EI, 70 eV).

A. Maceración simple; **B.** Maceración asistida con ultrasonido.

La identificación de los picos aparece en la **Tabla 7**.

Figura 36. Perfiles cromatográficos (GC-MS,TIC) de extractos florales de *H. coronarium*, obtenidos con acetato de etilo.



Columna apolar DB-Wax (50 m), *split* 1:50, detector selectivo de masas (EI, 70 eV).

A. Maceración simple; **B.** Maceración asistida con ultrasonido.

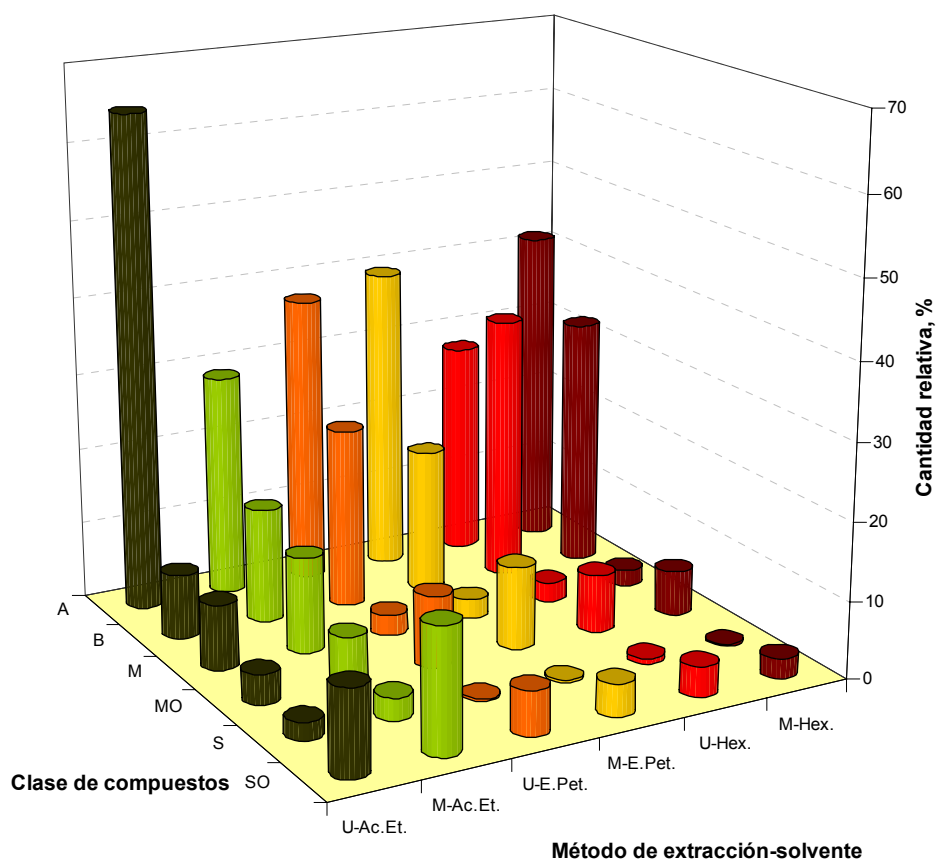
La identificación de los picos aparece en la **Tabla 7**.

Las principales clases de compuestos extraídos, en cantidades relativas (%), con Hex fueron alifáticos (por maceración, 32,4% y con ultrasonido, 27,8%) y bencenoides (por maceración, 32,4% y con ultrasonido, 34,5%); con EP, alifáticos (por maceración, 39,5% y con ultrasonido, 37,5%) y bencenoides (por maceración, 18,6% y con ultrasonido, 23,4%); con AcOEt, alifáticos (por

maceración, 29,0% y con ultrasonido, 64,6%) y sesquiterpenos oxigenados (por maceración, 16,1% y con ultrasonido, 11,1%).

En la **Figura 37**, se muestra la relación entre el método de extracción (maceración o ultrasonido), solvente empleado (Hex, AcOEt o EP) y cantidad relativa, por (%) de compuestos según su clase.

Figura 37. Relación entre el método de extracción y solvente empleado con la clase de compuestos aislados de las flores de *H. coronarium*.



A: Alifáticos, **B:** Bencenoides, **M:** Hidrocarburos monoterpénicos, **MO:** Monoterpenos oxigenados, **S:** Hidrocarburos sesquiterpénicos, **SO:** Sesquiterpenos oxigenados, **M-Hex:** Maceración simple con hexano, **U-Hex:** Extracción con ultrasonido y hexano, **M-EP:** Maceración simple con éter de petróleo, **U-EP:** Extracción con ultrasonido y éter de petróleo, **M-AcOEt:** Maceración simple con acetato de etilo y **U-AcOEt:** Extracción con ultrasonido y acetato de etilo.

Los compuestos mayoritarios volátiles encontrados en el concreto, obtenido con éter de petróleo (**Tabla 7**) fueron, 2,3-dimetil-2-butanol (1,7 - 2,3%); 2-metil-2-pentanol (4,7%); 1,8-cineol (0,9 - 1,0%); (E)- β -ocimeno (1,4– 1,5%); linalol (7,6%); benzoato de metilo (1,8 - 1,9%); eugenol (1,1 - 1,4%); (E)-jasmona (1,9%); 4-metiltiazol (2,4 - 4,2%); isoeugenol (7,4 - 11,0%); *epi*-jasmonato de metilo (2,1 - 3,1%) y benzoato de bencilo (3,2 - 4,3%). En el extracto de Hex, se encontró una composición análoga a la del concreto aislado con EP, no obstante los compuestos aislados con Hex, se encontraron en cantidades relativas menores que con EP.

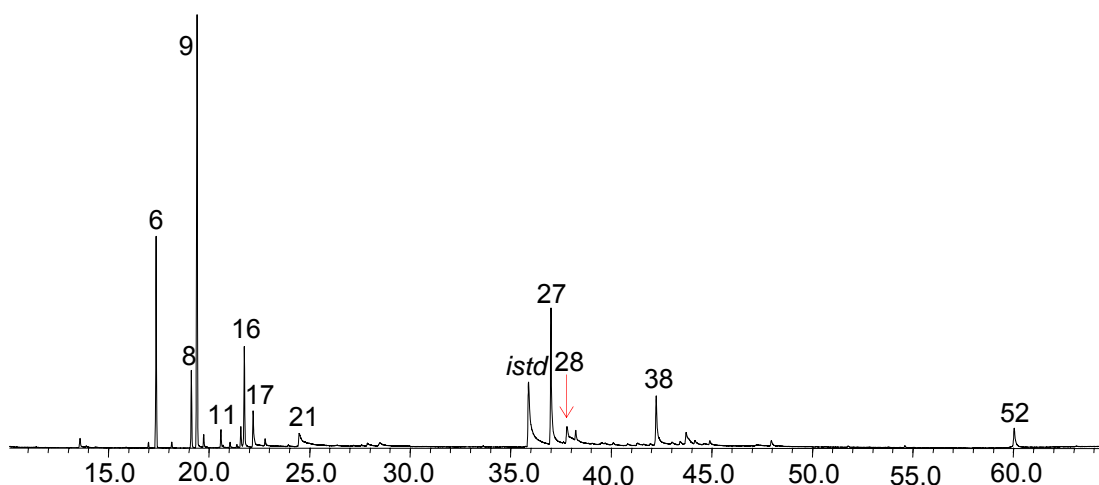
En el concreto, extraído con AcOEt, se encontraron los siguientes compuestos mayoritarios volátiles: propanoato de etilo (1,2 - 1,9%); 2-metil-2-pentanol (1,9 - 2,4%); 1,8-cineol (1,0%); ácido acético (6,0 - 37,0%); linalol (1,9 - 2,3%); (E)- β -cariofileno (5,3 - 9,0%); fenilacetaldehído (1,1 - 1,3%); (E)- β -farneseno (2,3 - 2,8%); alcohol bencílico (0,9 - 1,2%); óxido de cariofileno (6,6 - 8,3%); 4-etenil-2-metoxi-fenol (3,1 - 3,4%); ionona (1,7%); 4-metiltiazol (2,5 - 4,5%); isoeugenol (2,5 - 3,9%); (E,E)-farnesol (1,4 - 4,6%); *epi*-jasmonato de metilo (1,0 - 1,3%) y benzoato de bencilo (2,0 - 2,6%).

La extracción asistida con ultrasonido por una hora a 40°C, aumentó el número y cantidad de compuestos aislados en los concretos, obtenidos por EP (37 a 46) de las flores de *Hedychium coronarium*, en comparación con la maceración por dos horas a 25°C. La aplicación de ultrasonido a la maceración simple, disminuyó la cantidad relativa de alifáticos en los extractos de Hex (41,5 a 27,8%) y EP (39,5 a 37,5%). Con el AcOEt (59) y Hex (52), en cambio, se extrajeron más compuestos volátiles con maceración simple, que asistida con ultrasonido. En el caso de AcOEt incrementó marcadamente la cantidad relativa de ácido acético, de 6% con maceración a 37% con ultrasonido.

El análisis de componentes principales (**ANEXO 2, Figura 2-1 y 2-2**) aplicado a la composición Vs método de extracción, evidenció analogías entre los concretos obtenidos por Hex y por EP, y diferencias con el de AcOEt.

4.3.2 Análisis por GC-MS del extracto de las flores de *Hedychium coronarium*, obtenido por SDE. El análisis por GC-MS del extracto obtenido de las flores de *H. coronarium* por SDE, permitió identificar positivamente 49 de 53 picos (**Tabla 7**), en cantidades relativas mayores que 0.05%, lo cual correspondió al 98% de los compuestos contenidos en el extracto, como se puede observar en el perfil cromatográfico obtenido por GC-MS en columna apolar DB-5MS, presentado en la **Figura 38**.

Figura 38. Perfil cromatográfico, obtenido por GC-MS, del extracto obtenido por SDE de flores de *Hedychium coronarium*.



Columna apolar DB-5MS (60 m), *split* 1:30, detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los picos aparece en la **Tabla 7**.

Los componentes principales del aceite esencial, consignados en la **Tabla 8** fueron, β -pineno ($19\% \pm 1$), (E)- β -cariofileno ($8,6\% \pm 0,5$), α -pineno ($7,8\% \pm 0,3$), óxido de cariofileno ($5,8\% \pm 0,4$), 1,8-cineol ($5,56\% \pm 0,03$), (E)- β -ocimeno ($3,2\% \pm 0,3$), sabineno ($3,0\% \pm 0,3$), α -humuleno ($2,9\% \pm 0,5$), linalol ($2,6\% \pm 0,3$) y (E)-isoeugenol ($2,1 \pm 0,3$).

Tabla 8. Composición química, obtenida por GC-MS, del extracto aislado por SDE de las flores de *Hedychium coronarium*.

N° Pico ^a	Compuesto	Clase	Índices de retención de Kováts ^b				Tiempo de retención, min	CV, %	Cantidad relativa ^c , %	CV, %
			DB-5M		DB-WAX					
			Lit. [2,69]	Exp.	Lit. [33]	Exp.				
1	(Z)-2-Metilbutil aldoxima	A	-	853	-	1498	13,61 ± 0,02	0.14	1,7 ± 0,1	8.1
	3-Metilbutanamida	A	-		-					
2	3-(Z)-Hexenol	A	854	857	-	1358	13,801 ± 0,003	0.02	0,13 ± 0,01	7.3
3	(E)-2-Metilbutil aldoxima	A	-	860	-	1517	13,90 ± 0,01	0.09	0,25 ± 0,01	3.9
	3-(E)-Hexenol	A	-		-					
4	(Z)-3-Metilbutil aldoxima	A	-	870	-	1503	14,346 ± 0,005	0.04	0,08 ± 0,02	19.2
5	α-Tujeno	M	930	929	1038	1025	16,99 ± 0,01	0.08	0,180 ± 0,009	5.0
6	α-Pineno	M	939	938	1036	1020	17,37 ± 0,01	0.08	7,8 ± 0,3	3.6
7	Camfeno	M	954	955	1078	1063	18,15 ± 0,01	0.07	0,20 ± 0,01	6.0
8	Sabineno	M	975	977	1130	1120	19,12 ± 0,02	0.08	3,0 ± 0,3	11.1
9	β-Pineno	M	979	983	1120	1105	19,41 ± 0,02	0.09	19 ± 1	6.8
10	α-Mirceno	M	991	991	1166	1156	19,74 ± 0,02	0.08	0,623 ± 0,05	8.1
11	α-Felandreno	M	1003	1010	1177	1164	20,59 ± 0,02	0.07	0,80 ± 0,05	6.4
12	δ-2-Careno	M	1002	1013	1156	1148	20,69 ± 0,02	0.08	0,121 ± 0,007	5.6
	Pseudolimoneno	M	1004		-					
13	α-Terpineno	M	1017	1021	1188	1198	21,04 ± 0,02	0.07	0,20 ± 0,02	9.2
14	α-Cimeno	M	1026	1029	1275	1271	21,38 ± 0,01	0.06	0,17 ± 0,03	17.1

Tabla 8, continuación.

15	Limoneno	M	1029	1034	1206	1198	21,58 ± 0,02	0.07	1,00 ± 0,08	7.6
16	1,8-Cineol	MO	1031	1038	1223	1210	21,75 ± 0,01	0.06	5,56 ± 0,03	5.9
17	(E)-β-Ocimeno	M	1050	1048	1257	1275	21,19 ± 0,01	0.06	3,2 ± 0,3	9.2
18	γ-Terpineno	M	1060	1062	1247	1247	22,78 ± 0,01	0.05	0,480 ± 0,003	0.7
19	Terpinoleno	M	1089	1090	1287	1285	23,935 ± 0,009	0.04	0,08 ± 0,01	15.6
20	Benzoato de metilo*	B	1091	1100	1628	1633	24.381		<i>tr</i>	
21	Linalol	MO	1097	1104	1555	1542	24,51 ± 0,03	0.11	2,6 ± 0,3	10.5
22	(E)-Hidrato de sabineno	MO	1098	1109	1463	1472	24,74 ± 0,02	0.06	1,7 ± 0,2	12.5
23	Borneol	MO	1169	1181	1735	1716	27,586 ± 0,002	0.01	0,083 ± 0,003	3.9
24	Terpinen-4-ol	MO	1177	1189	-	1628	27,891 ± 0,004	0.01	0,11 ± 0,02	16.1
25	Mirtenal	MO	1196	1205	-	1644	28,53 ± 0,04	0.13	0,33 ± 0,02	5.4
26	(E)-Jasmona	MO	1391	1398	-	1965	35,749 ± 0,004	0.01	0,050 ± 0,005	10.7
27	(E)-β-Cariofileno	S	1419	1434	1618	1612	36,994 ± 0,006	0.02	8,6 ± 0,5	6.1
28	(E)-Isoeugenol	B	1451	1458	-	2338	37,795 ± 0,004	0.01	2,1 ± 0,3	14.2
29	(E)-β-Farneseno	S	1457	1463	1671	1670	37,97 ± 0,03	0.03	1,6 ± 0,2	10.3
30	α-Humuleno	S	1455	1470	1707	1686	38,22 ± 0,03	0.03	2,9 ± 0,5	16.3
31	Germacreno D	S	1485	1495	1718	1726	39,045 ± 0,007	0.01	0,84 ± 0,03	3.0
32	(E,E)-α-Farneseno	S	1506	1509	1756	1753	39,51 ± 0,01	0.03	0,30 ± 0,02	8.2
33	δ-Cadineno	S	1523	1529	1784	1772	40,10 ± 0,02	0.02	0,31 ± 0,02	6.7
34	α-Cadineno	S	1539	1553	2224	2225	40,81 ± 0,01	0.01	0,19 ± 0,02	10.6
35	(E)-Nerolidol	SO	1563	1570	-	2045	41,31 ± 0,02	0.02	0,33 ± 0,02	6.9

Tabla 8, continuación.

36	Dendrolasin	SO	1572	1580	-	1802	41,60 ± 0,02	0.02	0,14 ± 0,02	13.3
37	Germacreno D-4-ol	SO	1576	1591	-	2055	41,93 ± 0,01	0.02	0,26 ± 0,02	6.9
38	Oxido de cariofileno	SO	1583	1600	2000	2015	42,22 ± 0,01	0.02	5,8 ± 0,4	6.9
39	Epoxido de humuleno II	SO	1608	1630	-	2011	43,01 ± 0,01	0.03	0,58 ± 0,04	7.3
40	(E)-Isolongifolanona	SO	1627	1645	-	-	43,41 ± 0,01	0.03	0,59 ± 0,03	4.5
	Hydrocarburo C ₁₅ H ₂₄ O	SO	-	-	-	-	-	-	-	-
41	Hydrocarburo C ₁₅ H ₂₆ O	SO	-	1656	-	-	43,702 ± 0,009	0.02	2,4 ± 0,2	7.9
42	Hydrocarburo C ₁₅ H ₂₆ O	SO	-	1673	-	-	44,14 ± 0,01	0.03	0,79 ± 0,01	1.3
43	(Z)- <i>epi</i> -Jasmonato de metilo	SO	1679	1690	-	2394	44,59 ± 0,03	0.07	0,43 ± 0,05	10.9
44	Eudesma-4(15), 7-dien-1-β-ol	SO	1688	1701	-	2294	44,88 ± 0,01	0.03	0,54 ± 0,03	6.0
45	Benzoato de bencilo*	B	1760	1770	-	2630	46.554	-	<i>tr</i>	-
46	<2,2-Dimetil-7-isobutil-2H,5H-pirano[4,3-b]>-5-piranona	B	1810	1830	-	-	47,93 ± 0,02	0.03	0,53 ± 0,06	12.2
	3-(Z)-Antranilato de hexenilo	B	1821	-	-	-	-	-	-	-
47	N.I.	-	-	1954	-	-	50,60 ± 0,03	0.05	0,063 ± 0,008	13.2
48	N.I.	-	-	2009	-	-	51,74 ± 0,03	0.06	0,117 ± 0,007	6.2
49	N.I.	-	-	2111	-	-	53,74 ± 0,04	0.07	0,045 ± 0,004	7.8
50	N.I.	-	-	2138	-	-	54,296 ± 0,007	0.01	0,061 ± 0,008	12.4
51	Coronarín E	DO	-	2150	-	-	54,56 ± 0,03	0.05	0,128 ± 0,007	5.3
52	Labda-8(17),13E-dien-15 al	DO	0	2387	-	-	59,99 ± 0,03	0.05	2,5 ± 0,2	9.9

Tabla 8, continuación.

53	N.I.	-	-	2418	-	-	60,656 ± 0,003	0.00	0,0164 ± 0,002	13.9
54	N.I.	-	-	2480	-	-	61,90 ± 0,05	0.08	0,061 ± 0,007	11.0
55	N.I.	-	-	2492	-	-	62,2 ± 0,3	0.48	0,035 ± 0,002	7.0
56	Eicosano	H	-	2514	-	2100	62,6 ± 0,4	0.67	0,082 ± 0,002	2.1
A: Alifáticos									2,2 ± 0,2	
B: Bencenoides									2,6 ± 0,1	
M: Hidrocarburos monoterpénicos									36 ± 2	
MO: Monoterpenos oxigenados									10,4 ± 0,3	
S: Hidrocarburos sesquiterpénicos									15 ± 1	
SO: Sesquiterpenos oxigenados									12 ± 1	
DO: Diterpenos oxigenados									2,6 ± 0,2	

A Número del pico en la **Figura 38**.

B Índice de retención de Kováts determinados experimentalmente en columnas DB-5MS (60 m) y DB-WAX (50 m).

C Porcentajes calculados con base en las áreas de los picos; promedio de tres extracciones.

N.I. No identificado.

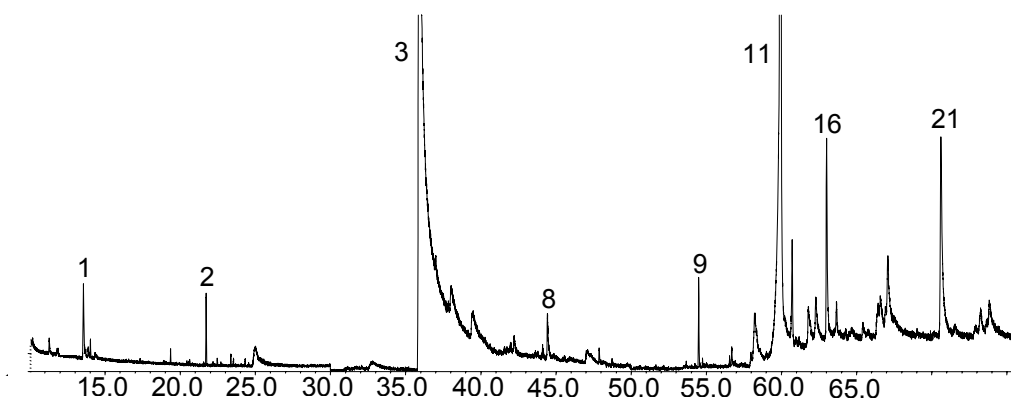
tr Trazas.

* Sólo se detectó en un SDE.

Para los extractos aislados por SDE de las flores de *H. coronarium*, los compuestos identificados se clasificaron como hidrocarburos monoterpénicos (36%), monoterpenos oxigenados (10,4%), hidrocarburos sesquiterpénicos (15%), sesquiterpenos oxigenados (12%), diterpenos oxigenados (2,6%), bencenoides (2,6%) y alifáticos (2,2%). Los coeficientes de variación de más del 85% de los compuestos identificados, fueron inferiores al 10%.

4.3.3 Análisis por GC-MS del extracto de las flores de *Hedychium coronarium*, obtenido por SFE. El análisis por GC-MS, de 0,23 g del extracto obtenido por SFE de las flores de *H. coronarium*, permitió identificar 11 de 23 picos, en cantidades relativas mayores que 0.1%, correspondientes al 85,7%. El perfil cromatográfico característico se aprecia en la **Figura 39**.

Figura 39. Perfil cromatográfico, obtenido por GC-MS, del extracto aislado por SFE de las flores de *Hedychium coronarium*.



Columna apolar DB-5MS (60 m), *split* 1:30, detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los picos aparece en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Composición química, obtenida por GC-MS, del extracto aislado por SFE de las flores de *Hedychium coronarium*.

N° Pico ^a	Compuesto	Clase	Índices de retención de Kováts ^b		Tiempo de retención, min	CV, %	Cantidad relativa ^c , %	CV, %
			Lit. [2,69]	Exp.				
1	(Z)-2-Metilbutil aldoxima	A		853	13,59 ± 0,02	0.14	0,31 ± 0,09	8.7
2	1,8-Cineol	MO	1031	1038	21,75 ± 0,02	0.07	0,12 ± 0,05	12.9
3	(E)-Jasmona	MO	1391	1404	35,93 ± 0,04	0.11	37,1 ± 0,5	0.1
4	(E)-β-Cariofileno	S	1419	1437	37,04 ± 0,03	0.09	7,2 ± 0,3	1.2
5	(E)-β-Farneseno	S	1457	1461	37,7 ± 0,3	0.80	0,96 ± 0,07	2.1
6	α-Humuleno	S	1455	1468	38,11 ± 0,06	0.16	5 ± 2	10.8
7	(E,E)-α-Farneseno	S	1506	1513	39,55 ± 0,07	0.18	1,33 ± 0,01	1.0
8	(Z)- <i>epi</i> -Jasmonato de metilo	SO	1679	1688	44,49 ± 0,05	0.11	0,50	8.1
9	Coronarín E	DO	-	2148	54,43 ± 0,08	0,10	0,49 ± 0,02	2,5
10	N.I.	-	-	2316	58,28 ± 0,05	0.08	0,90 ± 0,08	2.7
11	Labda-8(17),13-(E)-dien-15 al	DO	-	2387	59,96 ± 0,02	0.04	32 ± 1	1.5
12	N.I.	-	-	2413	60,5 ± 0,2	0.20	0,2 ± 0,1	14.7
13	N.I.	-	-	2424	60,75 ± 0,03	0.04	1,3 ± 0,2	5.7
14	Hidrocarburo	A	-	2476	61,79 ± 0,06	0.10	0,8 ± 0,5	22.2
15	Eicosano	A	-	2503	62,34 ± 0,04	0.07	1,2 ± 0,3	6.3
16	Hidrocarburo	A	-	2536	63,05 ± 0,05	0.05	2,1 ± 0,6	8.4
17	Hidrocarburo	A	-	2567	63,71 ± 0,03	0.05	0,49 ± 0,08	4.8

Tabla 9, continuación.

18	N.I.	-	-	2696	66,49 ± 0,04	0.06	0,5 ± 0,1	10.5
19	N.I.	-	-	2702	66,58 ± 0,08	0.12	0,7 ± 0,1	6.9
20	Hidrocarburo	A	-	2726	67,13 ± 0,04	0.05	1,1 ± 0,2	5.1
21	Hidrocarburo	A	-	2889	70,67 ± 0,03	0.05	4,2 ± 0,8	5.7
22	N.I.	-	-	3039	73,89 ± 0,04	0.05	0,9 ± 0,2	5.4
A: Alifáticos							10,2 ± 0,1	
MO: Monoterpenos oxigenados							37,2 ± 0,5	
S: Hidrocarburos sesquiterpénicos							14,5 ± 0,6	
SO: Sesquiterpenos oxigenados							0,5 ± 0,1	
DO: Diterpenos oxigenados							32 ± 1	

a Número del pico en la **Figura 39**.

b Índice de retención de Kováts determinados experimentalmente en columna DB-5MS.

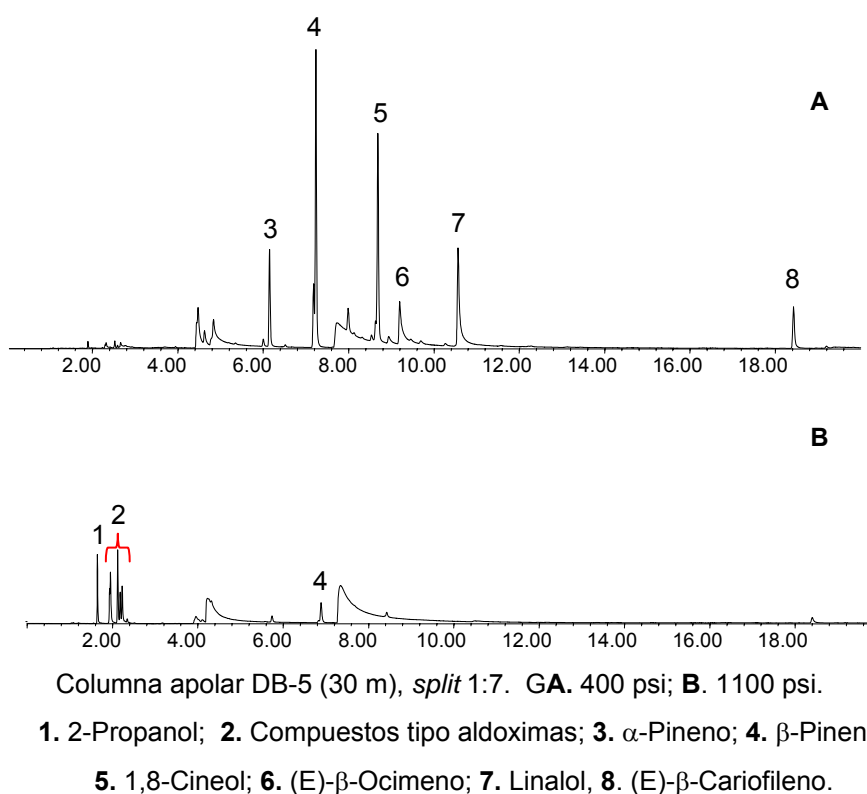
c Porcentajes calculados con base en las áreas de los picos; promedio de tres extracciones.

N.I. No identificado.

Los componentes principales del extracto obtenido por SFE, fueron, (E)-jasmona ($37,1\% \pm 0,5$), labda-8(17),13-(E)-dien-15-al ($32\% \pm 1$), (E)- β -cariofileno ($7,2\% \pm 0,3$) y α -humuleno ($5\% \pm 2$).

Los compuestos identificados se clasificaron como monoterpenos oxigenados ($37,2\%$), diterpenos oxigenados (32%), hidrocarburos sesquiterpénicos ($14,5\%$) y alifáticos ($10,2\%$). Los coeficientes de variación de la mayoría de compuestos identificados, fueron inferiores al 10% .

Figura 40. Perfiles cromatográficos, obtenidos por GC-FID, de los extractos aislados por HS-SPME, del gas de salida del equipo para SFE.



En la **Figura 40**, se observan los perfiles cromatográficos, obtenidos por GC-FID en columna apolar DB-5, aisladas por HS-SPME, del gas de salida en el equipo para SFE, durante la despresurización a 400 psi (**Figura 40 A**) y

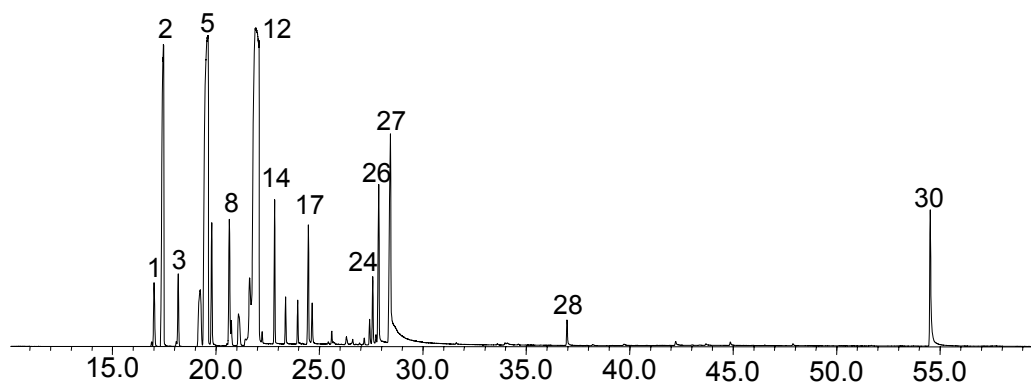
1100 psi (**Figura 40 B**). Los resultados de estos análisis evidenciaron la pérdida continua de volátiles durante el proceso de despresurización.

4.4 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS Y ACEITES ESENCIALES DE RIZOMAS DE *Hedychium coronarium*.

El aceite esencial (AE) o los extractos obtenidos por MWHD, SDE o SFE de los rizomas de *H. coronarium*, se analizaron por GC-MS en columna apolar DB-5MS (60 m) o columna polar DB-WAX (50 m) (**ANEXO 3, Tabla 3-2**).

4.4.1 Análisis por GC-MS del aceite esencial de los rizomas de *Hedychium coronarium*, obtenido por MWHD. Empleando MWHD, se obtuvo AE de los rizomas de *H. coronarium*. El rendimiento de la extracción fue 0,07%, con base en el peso seco del material vegetal. El análisis por GC-MS del aceite esencial permitió identificar 30 de 34 picos (**Tabla 10**), en cantidades relativas mayores que 0.1%, correspondientes al 95% de los compuestos. El perfil cromatográfico, obtenido por GC-MS en columna apolar DB-5MS, del AE se aprecia en la **Figura 41**.

Figura 41. Perfil cromatográfico (GC-MS, TIC) del aceite esencial de rizomas de *Hedychium coronarium*, obtenido por MWHD.



Columna apolar DB-5MS (60 m), *split* 1:30, detector selectivo de masas (EI, 70 eV).

La identificación de los picos aparece en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Composición química, obtenida por GC-MS, del aceite esencial aislado por MWHD de los rizomas de *Hedychium coronarium*.

N° Pico ^a	Compuesto	Clase	Índices de retención de Kováts ^b		Tiempo de retención, min	CV, %	Cantidad relativa ^c , %	CV, %
			Lit. [2,69]	Exp.				
1	α -Tujeno	M	930	909	17,013 \pm 0,006	0.03	1,1 \pm 0,1	11.3
2	α -Pino	M	939	922	17,469 \pm 0,007	0.04	9,4 \pm 0,4	5.0
3	Camfeno	M	954	942	18,177 \pm 0,004	0.02	1,08 \pm 0,06	6.1
4	Sabineno	M	975	973	19,25 \pm 0,01	0.07	3,31 \pm 0,04	1.4
5	β -Pino	M	979	983	19,61 \pm 0,02	0.10	18,6 \pm 0,4	3.2
6	α -Mirceno	M	991	988	19,791 \pm 0,003	0.02	2,0 \pm 0,1	6.0
7	Pseudolimoneno	M	1004	1008	20,530 \pm 0,002	0.01	0,03 \pm 0,01	3.0
8	α -Felandreno	M	1003	1010	20,639 \pm 0,002	0.01	2,2 \pm 0,2	7.6
9	α -Terpineno	M	1017	1013	20,73 \pm 0,06	0.00	0,33 \pm 0,04	13.1
10	α -Cimeno	M	1026	1029	21,418 \pm 0,003	0.01	0,084 \pm 0,007	8.2
11	Limoneno	M	1029	1034	21,64 \pm 0,02	0.09	1,82 \pm 0,09	4.2
12	1,8-Cineol	MO	1031	1041	21,93 \pm 0,02	0.11	30 \pm 2	5.4
13	(E)- β -Ocimeno	M	1050	1048	22,24 \pm 0,02	0.07	0,29 \pm 0,02	5.9
14	γ -Terpineno	M	1060	1063	22,85 \pm 0,02	0.07	1,9 \pm 0,3	16.9
15	(Z)-Hidrato de sabineno	MO	1089	1075	23,39 \pm 0,03	0.11	1,4 \pm 0,1	10.8
16	Terpinoleno	M	1091	1089	23,96 \pm 0,02	0.06	0,52 \pm 0,07	12.7
17	Linalol	MO	1097	1102	24,48 \pm 0,02	0.09	1,84 \pm 0,09	5.0
18	(E)-Hidrato de sabineno	MO	1098	1106	24,67 \pm 0,02	0.09	1,13 \pm 0,05	4.1

Tabla 10, continuación.

19	(Z)- <i>p</i> -Ment-2-en-1-ol	MO	1122	1130	25,61 ± 0,02	0.06	0,20 ± 0,02	9.5
20	(E)- <i>p</i> -Ment-2-en-1-ol	MO	1148	1148	26,32 ± 0,02	0.06	0,17 ± 0,02	10.0
21	Alcanfor	MO	1146	1156	26,62 ± 0,02	0.06	0,14 ± 0,01	7.3
22	Pinocarvona	MO	1165	1170	27,18 ± 0,02	0.06	0,101 ± 0,004	3.5
23	δ-Terpineol	MO	1166	1177	27,45 ± 0,02	0.06	0,40 ± 0,02	5.7
24	Borneol	MO	1169	1181	27,60 ± 0,02	0.06	1,1 ± 0,2	14.2
25	(Z)-Pinocamfona	MO	1175	1185	27,75 ± 0,02	0.06	0,17 ± 0,02	9.8
26	Terpinen-4-ol	MO	1177	1188	27,88 ± 0,02	0.06	2,9 ± 0,3	8.9
27	α-Terpineol	MO	1189	1203	28,46 ± 0,03	0.09	8,2 ± 0,2	1.0
28	(E)-β-Cariofileno	S	1419	1433	36,98 ± 0,01	0.03	0,431 ± 0,008	0.9
29	Hidrocarburo C ₁₅ H ₂₄ O	SO	-	1600	42,225 ± 0,008	0.02	0,106 ± 0,005	4.9
30	Coronarín E*	DO	-	2148	54,55 ± 0,02	0.03	5,3 ± 0,6	10.4
M: Hidrocarburos monoterpénicos							43 ± 2	
MO: Monoterpenos oxigenados							48 ± 1	
S: Hidrocarburos sesquiterpénicos							0,43 ± 0,01	
SO: Sesquiterpenos oxigenados							0,10 ± 0,01	
DO: Diterpenos oxigenados							5,3 ± 0,6	

a Número del pico en la **Figura 41**.

b Índice de Kováts determinados experimentalmente en columna DB-5M.

c Porcentajes calculados con base en las áreas de los picos; promedio de tres extracciones.

* Identificado tentativamente.

Los componentes principales del AE, obtenidos por MWHD, fueron 1,8-cineol ($30\% \pm 2$), β -pineno ($18,6\% \pm 0,4$), α -pineno ($9,4\% \pm 0,4$), sabineno ($3,31\% \pm 0,04$), coronarin E ($5,3 \pm 0,6$), α -felandreno ($2,2\% \pm 0,2$) y α -mirceno ($2,0\% \pm 0,1$).

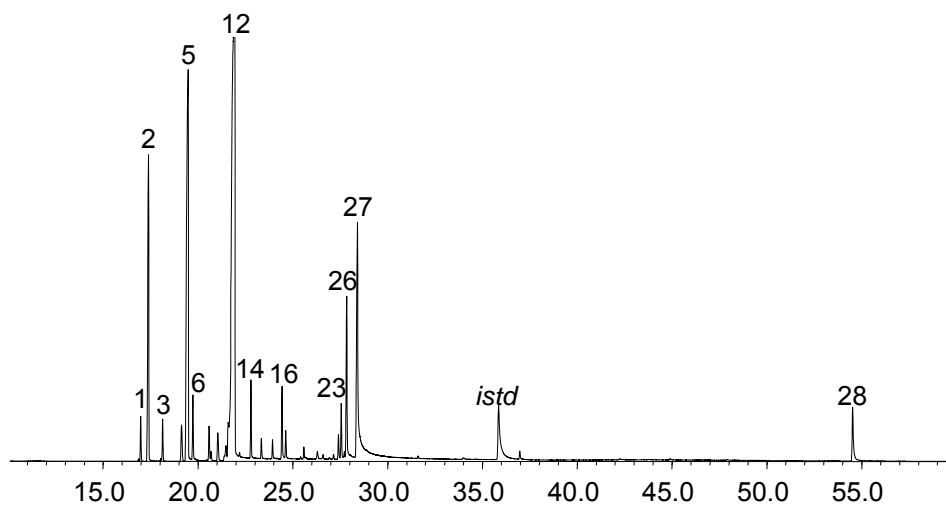
Los compuestos identificados se clasificaron como hidrocarburos monoterpénicos (43%), monoterpenos oxigenados (47,9%) y diterpenos oxigenados (5,3%), se lograron extraer hidrocarburos sesquiterpénicos y sesquiterpenos oxigenados, pero en cantidades mínimas. Cerca del 90% de los compuestos identificados, presentaron coeficientes de variación inferiores al 10%.

4.4.2 Análisis por GC-MS del extracto de los rizomas de *Hedychium coronarium*, obtenido por SDE. La cuantificación del extracto obtenido por SDE de los rizomas de *H. coronarium*, se dificulta por estar diluido en diclorometano.

El análisis por GC-MS del extracto obtenido por SDE permitió identificar 27 de 33 picos, en cantidades relativas mayores que 0.1%, lo cual correspondió al 82% de los compuestos contenidos en el extracto. Los compuestos mayoritarios identificados en éste extracto, se presentan en la **Tabla 11**, y el cromatograma característico se aprecia en la **Figura 42**.

Los componentes principales del aceite esencial, fueron, 1,8-cineol ($28\% \pm 3$), β -pineno ($16,9\% \pm 0,6$), α -pineno ($9\% \pm 2$), alcanfor ($7,6\% \pm 0,3$), α -terpineol ($7,3\% \pm 0,2$), coronarin E ($3,32\% \pm 0,04$), sabineno ($3,2\% \pm 0,1$), terpinen-4-ol ($2,8\% \pm 0,1$), (E)-*p*-ment-2-en-1-ol ($2,63\% \pm 0,02$) y δ -terpineol ($2,4\% \pm 0,1$).

Figura 42. Perfil cromatográfico, obtenido por GC-MS, del extracto aislado por SDE de los rizomas de *Hedychium coronarium*,.



Columna apolar DB-5MS (60 m), *split* 1:30, detector selectivo de masas (EI, 70 eV).

La identificación de los picos aparece en la **Tabla 11**.

Para SDE, los compuestos identificados se clasificaron como hidrocarburos monoterpénicos (43%), monoterpénos oxigenados (52%) y diterpenos oxigenados (3,3%). Los coeficientes de variación de la mayoría de compuestos identificados (98%), fueron inferiores al 10%.

Tabla 11. Composición química, obtenida por GC-MS, del extracto aislado por SDE de los rizomas de *Hedychium coronarium*.

N° Pico ^a	Compuesto	Clase	Índices de retención de Kováts ^b		Tiempo de retención, min	CV, %	Cantidad relativa ^c , %	CV, %
			Lit. [2,69]	Exp.				
1	α -Tujeno	M	930	930	16,989 \pm 0,006	0.04	1,07 \pm 0,04	3.5
2	α -Pino	M	939	939	17,40 \pm 0,01	0.06	9 \pm 2	2.2
3	Camfeno	M	954	954	18,147 \pm 0,04	0.02	1,00 \pm 0,02	2.4
4	Sabineno	M	975	975	19,14 \pm 0,01	0.05	3,2 \pm 0,1	2.9
5	β -Pino	M	979	979	19,50 \pm 0,02	0.08	16,9 \pm 0,6	3.7
6	β -Mirceno	M	991	991	19,743 \pm 0,005	0.02	1,9 \pm 0,1	5.1
7	Pseudolimoneno	M	1004	1004	20,491 \pm 0,002	0.01	1,9 \pm 0,1	6.6
8	α -Felandreno	M	1003	1003	20,595 \pm 0,002	0.01	0,372 \pm 0,006	1.6
9	α -Terpino	M	1017	1017	20,69 \pm 0,03	0.03	0,85 \pm 0,03	4.5
10	o-Cimeno	M	1026	1025	21,483 \pm 0,002	0.06	0,251 \pm 0,009	3.7
11	Limoneno	M	1029	1029	21,62 \pm 0,012	0.01	1,8 \pm 0,2	12.8
12	1,8-Cineol	MO	1031	1031	21,94 \pm 0,01	0.06	28 \pm 3	10.6
13	(E)- β -Ocimeno	M	1050	1050	22,21 \pm 0,01	0.06	1,8 \pm 0,1	6.4
14	γ -Terpino	M	1060	1060	22,80 \pm 0,02	0.07	1,39 \pm 0,07	5.3
15	(Z)-Hidrato de sabineno	MO	1089	1070	23,37 \pm 0,03	0.14	0,50 \pm 0,02	4.9
16	Terpinoleno	M	1089	1089	23,945 \pm 0,008	0.03	1,68 \pm 0,01	0.7
17	Linalol	MO	1097	1097	24,45 \pm 0,01	0.06	0,145 \pm 0,006	4.4

Tabla 11, continuación.

18	(E)-Hidrato de sabineno	MO	1098	1098	24,65 ± 0,02	0.07	0,089 ± 0,006	6.7
19	(Z)- <i>p</i> -Ment-2-en-1-ol	MO	1122	1122	25,59 ± 0,01	0.04	0,335 ± 0,009	2.8
20	(E)- <i>p</i> -Ment-2-en-1-ol	MO	1148	1141	26.304	0.04	2,63 ± 0,02	0.8
21	Alcanfor	MO	1146	1146	26,61 ± 0,01	0.04	7,6 ± 0,3	3.5
22	Pinocarvona	MO	1165	1165	27,17 ± 0,01	0.04	0,076 ± 0,007	9.2
23	δ-Terpineol	MO	1166	1166	27,43 ± 0,02	0.07	2,4 ± 0,1	3.4
24	Borneol	MO	1169	1169	27,58 ± 0,02	0.07	0,38 ± 0,02	4.7
25	(Z)-pinocamfona	MO	1175	1175	27,74 ± 0,01	0.05	0,104 ± 0,001	1.3
26	Terpinen-4-ol	MO	1177	1177	27,85 ± 0,01	0.04	2,75 ± 0,01	0.5
27	α-Terpineol	MO	1189	1189	28.42 ± 0,02	0.05	7,3 ± 0,2	2.2
28	Coronarín E*	DO	-	2145	54,54 ± 0,02	0,03	3,32 ± 0,04	2.3
M: Hidrocarburos monoterpénicos.							43 ± 4	
MO: Monoterpenos oxigenados.							52 ± 3	
DO: Diterpenos oxigenados.							3,32 ± 0,04	

a Número del pico en la **Figura 42**.

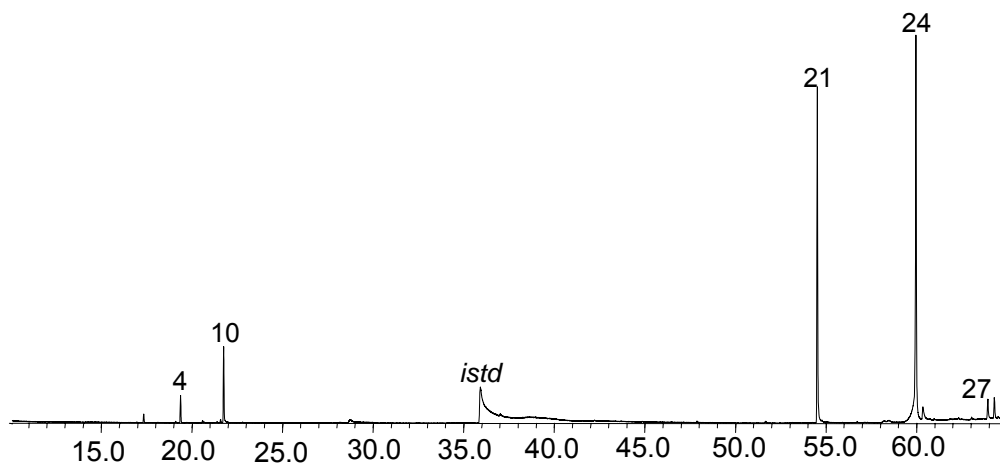
B Índice de Kováts determinados experimentalmente en columna DB-5MS.

C Porcentajes calculados con base en las áreas de los picos; promedio de tres extracciones.

* Identificado tentativamente.

4.4.3 Análisis por GC-MS del extracto de los rizomas de *Hedychium coronarium*, obtenido por SFE. El análisis por GC-MS, de 0,63 g extracto obtenido por SFE de los rizomas de *H. coronarium*, permitió identificar 25 de 32 picos (**Tabla 12**), en cantidades relativas mayores que 0.1%, lo cual correspondió al 78% de los compuestos contenidos en el extracto. El perfil cromatográfico característico se aprecia en el cromatograma de la **Figura 43**.

Figura 43. Perfil cromatográfico, obtenido por GC-MS, del extracto aislado por SFE de los rizomas de *Hedychium coronarium*.



Columna apolar DB-5MS (60 m), *split* 1:30, detector selectivo de masas (EI, 70 eV).

La identificación de los picos aparece en la **Tabla 12**.

Los componentes principales del extracto, fueron, labda-8(17),13-(E)-dien-15-al (25,3% \pm 0,2), coronarin E (22% \pm 3), α -humuleno (10,4% \pm 0,9), 1,8-cineol (6,3% \pm 0,1) y (E)- β -cariofileno (3,5 % \pm 0,2).

Tabla 12. Composición química, obtenida por GC-MS, del extracto aislado por SFE de los rizomas de *Hedychium coronarium*.

N° Pico ^a	Compuesto	Clase	Índices de retención de Kováts ^b		Tiempo de retención, min	CV, %	Cantidad relativa ^c , %	CV, %
			Lit. [2,69]	Exp.				
1	α -Tujeno	M	916	930	16,99 \pm 0,03	0.17	0,033 \pm 0,001	4.3
2	α -Pineno	M	926	939	17,36 \pm 0,03	0.17	0,44 \pm 0,03	7.9
3	Sabineno	M	971	975	19,12 \pm 0,03	0.13	0,046 \pm 0,001	3.1
4	β -Pineno	M	979	979	19,39 \pm 0,02	0.12	1,86 \pm 0,03	2.4
5	β -Mirceno	M	987	991	19,74 \pm 0,09	0.10	0,055 \pm 0,004	6.5
6	α -Felandreno	M	1009	1003	20,59 \pm 0,02	0.09	0,129 \pm 0,001	7.1
7	α -Terpineno	M	1020	1017	20,713 \pm 0,001	0.00	0,047 \pm 0,001	3.0
8	α -Cimeno	M	1027	1026	21,39 \pm 0,02	0.08	0,035 \pm 0,001	4.0
9	Limoneno	M	1032	1029	21,59 \pm 0,02	0.09	0,133 \pm 0,008	6.4
10	1,8-Cineol	MO	1037	1031	21,77 \pm 0,02	0.09	6,3 \pm 0,1	2.3
11	γ -Terpineno	M	1061	1060	22,81 \pm 0,01	0.05	0,17 \pm 0,3	8.7
12	(Z)-Hidrato de sabineno	MO	1074	1070	23,5 \pm 0,2	0.90	0,17 \pm 0,03	17.9
13	Linalol	MO	1100	1097	24 \pm 1	4.53	0,22 \pm 0,01	6.3
14	(E)-Hidrato de sabineno	MO	1105	1098	23,93 \pm 0,03	0.98	0,204 \pm 0,004	2.1
15	Terminen-4-ol	MO	1186	1177	28,12 \pm 0,07	0.23	0,191 \pm 0,006	3.3
16	α -Terpineol	MO	1199	1189	28,72 \pm 0,05	0.17	1,47 \pm 0,08	5.1

Tabla 12, continuación.

17	(E)- β -Cariofileno	S	1432	1419	37,041 \pm 0,006	0.02	3,5 \pm 0,2	7.1
18	α -Humuleno	S	1468	1455	38,9 \pm 0,4	1.05	10,4 \pm 0,9	8.5
19	Óxido de cariofileno	SO	1583	1583	42,236 \pm 0,003	0.01	1,15 \pm 0,03	3.0
20	<2,2-Dimetil-7-isobutil-2H,5H-pirano[4,3- β]-5-piranona	B	1810	1823	47,89 \pm 0,01	0.03	0,15 \pm 0,02	12.0
	3Z-Antranilato de hexenilo	B	1821					
21	Coronarín E*	DO		2154	54,55 \pm 0,05	0.08	22 \pm 3	3,4
22	N.I.	-	-	2104	57,143 \pm 0,003	0.005	0,15 \pm 0,01	7.7
23	N.I.	-	-	2313	58,3 \pm 0,2	0.36	0,49 \pm 0,03	7.0
24	Labda-8(17),13-(E)-dien-15-al	DO		2382	59,967 \pm 0,001	0.00	25,3 \pm 0,2	0.7
25	N.I.	-	-	2393	60,35 \pm 0,02	0.02	4,5 \pm 0,4	9.6
26	N.I.	-	-	2417	60,69 \pm 0,07	0.12	0,67 \pm 0,05	7.3
27	Eicosano	A	-	2496	61,22 \pm 0,03	0.05	0,43 \pm 0,04	9.9
28	N.I.	-	-	2577	63,93 \pm 0,01	0.03	1,7 \pm 0,1	3.4
29	N.I.	-	-	2594	64,29 \pm 0,02	0.02	1,61 \pm 0,09	5.1
30	N.I.	-	-	2665	65,81 \pm 0,02	0.03	1,1 \pm 0,2	6.6
31	N.I.	-	-	2706	66,68 \pm 0,02	0.02	1,60 \pm 0,08	13.4
32	N.I.	-	-	2878	70,40 \pm 0,02	0.03	0,86 \pm 0,06	6.3
A: Alifáticos							0,43 \pm 0,03	
B: Bencenoides							0,15 \pm 0,02	
M: Hidrocarburos monoterpénicos							2,9 \pm 0,3	
MO: Monoterpenos oxigenados							8,6 \pm 0,5	

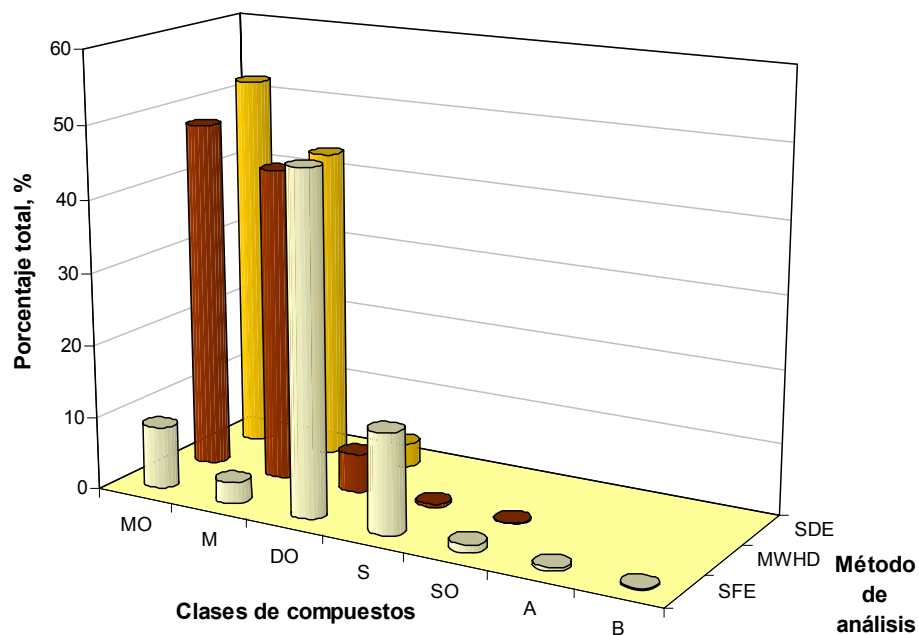
Tabla 12, continuación.

	S: Hidrocarburos sesquiterpénicos	13,9 ± 0,6
	SO: Sesquiterpenos oxigenados	1,1 ± 0,1
	DO: Diterpenos oxigenados	47 ± 3
A	Número del pico en la Figura 43 .	
B	Índices de Kováts determinados experimentalmente en columna DB-5MS.	
C	Porcentajes calculados con base en las áreas de los picos; promedio de tres extracciones.	
N.I.	No identificado.	
*	Identificado tentativamente	

Las mayores clases de compuestos identificados, se agruparon como: diterpenos oxigenados (47%), hidrocarburos sesquiterpénicos (14%), monoterpenos oxigenados (8,6%) e hidrocarburos monoterpénicos (2,9%). Los coeficientes de variación de la mayoría de compuestos identificados (88%), fueron menores al 10%.

En la **Figura 44**, se muestran las cantidades relativas de las principales clases de compuestos extraídos por tres diferentes técnicas, a saber: SFE, SDE y MWHD de los rizomas de *H. coronarium*.

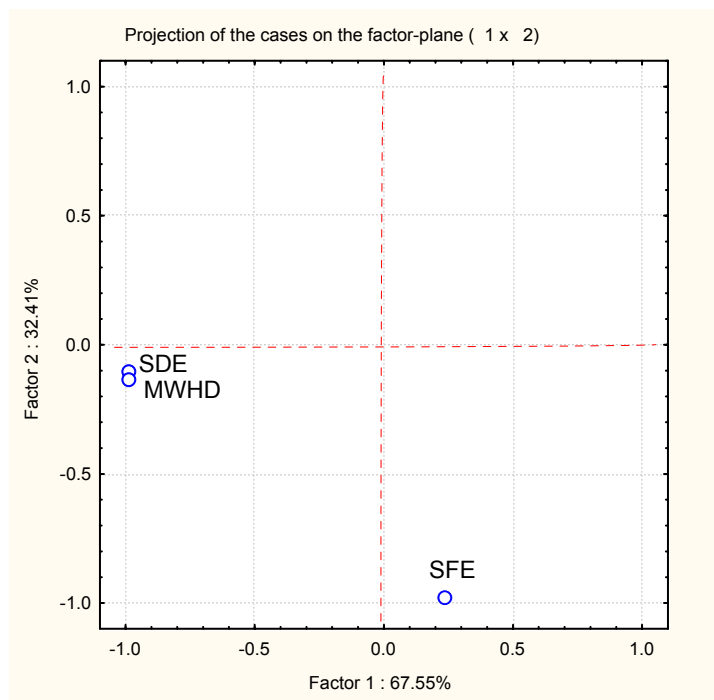
Figura 44. Cantidades relativas de clase de compuestos extraídos, según método, de rizomas de *Hedychium coronarium*.



B: Bencenoides, **SO:** Sesquiterpenos oxigenados, **MO:** Monoterpenos oxigenados, **S:** Hidrocarburos sesquiterpénicos, **A:** alifáticos, **M:** Hidrocarburos monoterpénicos

4.4.4 Análisis de componentes principales para extractos y aceites esenciales obtenidos de los rizomas de *Hedychium coronarium*. Con el fin de agrupar los métodos de extracción, según las clases de compuestos extraídos de los rizomas de *H. coronarium*, se realizó un análisis de componentes principales (**Figura 45**). De acuerdo con los resultados, el AE y los extractos, aislados de los rizomas por MWHD y por SDE, poseen clases de compuestos en cantidades relativas similares (Véase **Figura 44**).

Figura 45. Análisis de componentes principales para los métodos de extracción empleados en rizomas de *Hedychium coronarium*.



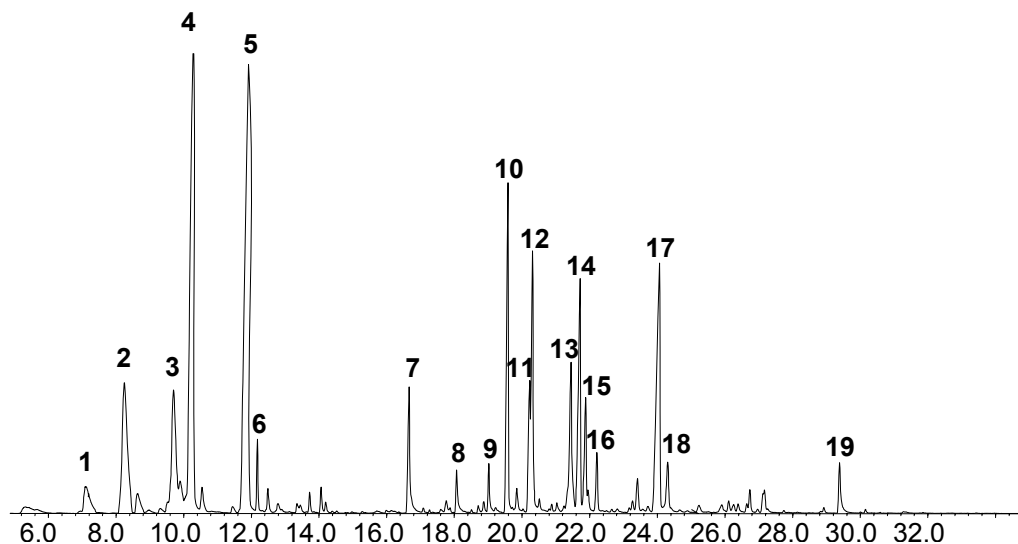
SDE: Destilación extracción simultánea, **SFE:** Extracción con fluidos supercríticos y **MWHD:** Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas.

4.5 MÉTODO RÁPIDO PARA EL ANÁLISIS *IN VITRO* DE VOLÁTILES EN FLORES DE *Hedychium coronarium*.

Aunque empleando MWHD no se aisló AE de las flores de *H. coronarium*, la fracción acuosa, adquirió el aroma característico de las flores. Arthur *et al.* [10], argumentan que la radiación de microondas ($\nu=2450\text{MHz}$) favorece el equilibrio de los compuestos volátiles en la fase vapor, facilitando su posterior extracción por técnicas de análisis en modo HS. Se decidió entonces, emplear MWHD para promover la migración de los volátiles de éstas flores al HS, y, luego extraerlos con otra técnica, como SPME o microextracción en fase líquida (SDME).

4.5.1 Muestreo por HS-SPME *in vitro* de flores de *Hedychium coronarium*. El perfil típico del muestreo *in vitro* se muestra en la **Figura 46**.

Figura 46. Cromatograma típico, obtenido por GC-FID, de la extracción por HS-SPME *in vitro* de las flores de *H. coronarium*.

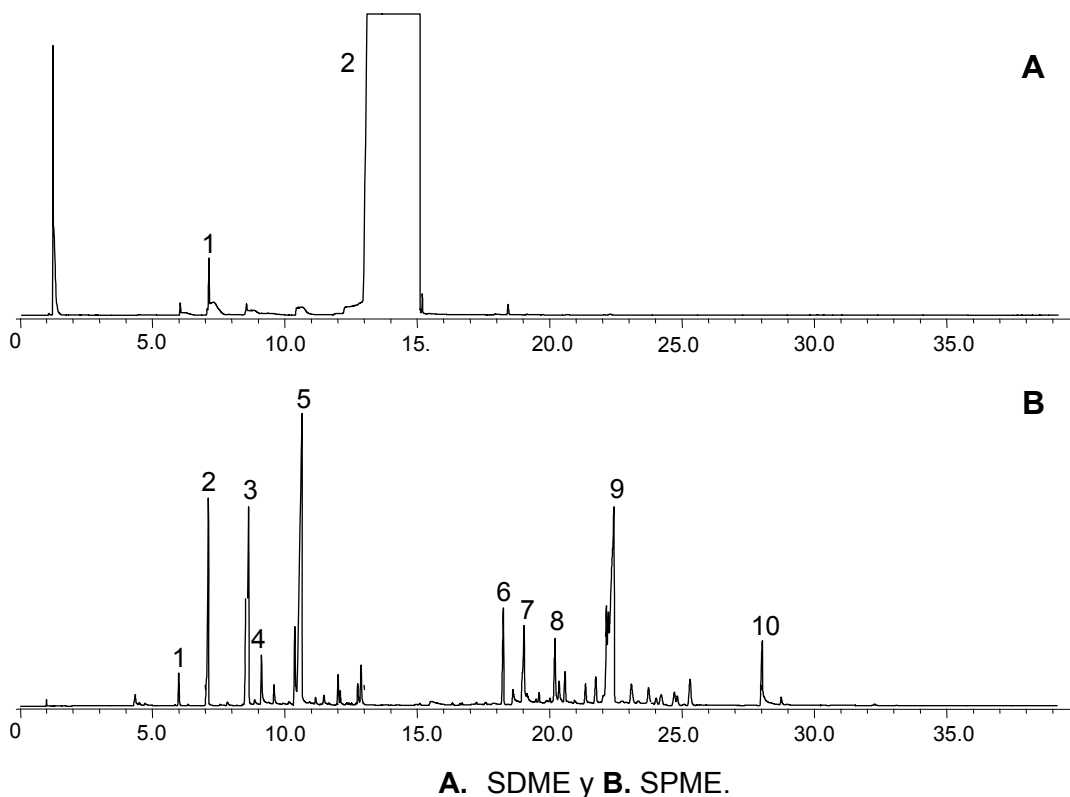


1. α -Pinenol, 2. β -Pinenol, 3. 1,8-Cineol, 4. (E)- β -Ocimeno, 5. Linalol, 6. (E)-*p*-Ment-2-en-1-ol, 7. Indol, 8. Eugenol, 9. (E)-Jasmona, 10. (E)- β -Cariofileno, 11. (E)-Isoeugenol, 12. (E)- β -Farneseno, 13. Metil-isoeugenol, 14. (E,E)- α -Farneseno, 15. Ionol, 16. δ -Cadineno, 17. Sesquiterpeno oxigenado, 18. Óxido de cariofileno, 19. Benzoato de bencilo.

Se usó HS-SPME con calentamiento convencional para extraer los compuestos volátiles de las flores de *H. coronarium*. En la **Figura 46**, se presenta el cromatograma típico de ésta extracción, producido por GC-FID, en columna apolar DB-5. En base a éste perfil cromatográfico, se seleccionó la metodología a implementar.

Las técnicas en modo HS probadas para la extracción de compuestos volátiles de las flores de *H. coronarium*, después de un proceso de destilación asistido por la radiación de un MW, fueron SDME y SPME (**Figura 47**).

Figura 47. Perfiles cromatográficos, obtenidos por GC-FID, de extractos florales obtenidos por MWHD-HS-SDME o por MWHD-HS-SPME.



1. α -Pinoeno, 2. β -Pinoeno, 3. 1,8-Cineol, 4. (E)- β -Ocimeno, 5. Linalol,
6. (E)-Cariofileno, 7. (E)-Isoeugenol, 8. Metil-isoeugenol, 9. Óxido de cariofileno,
10. Benzoato de bencilo.

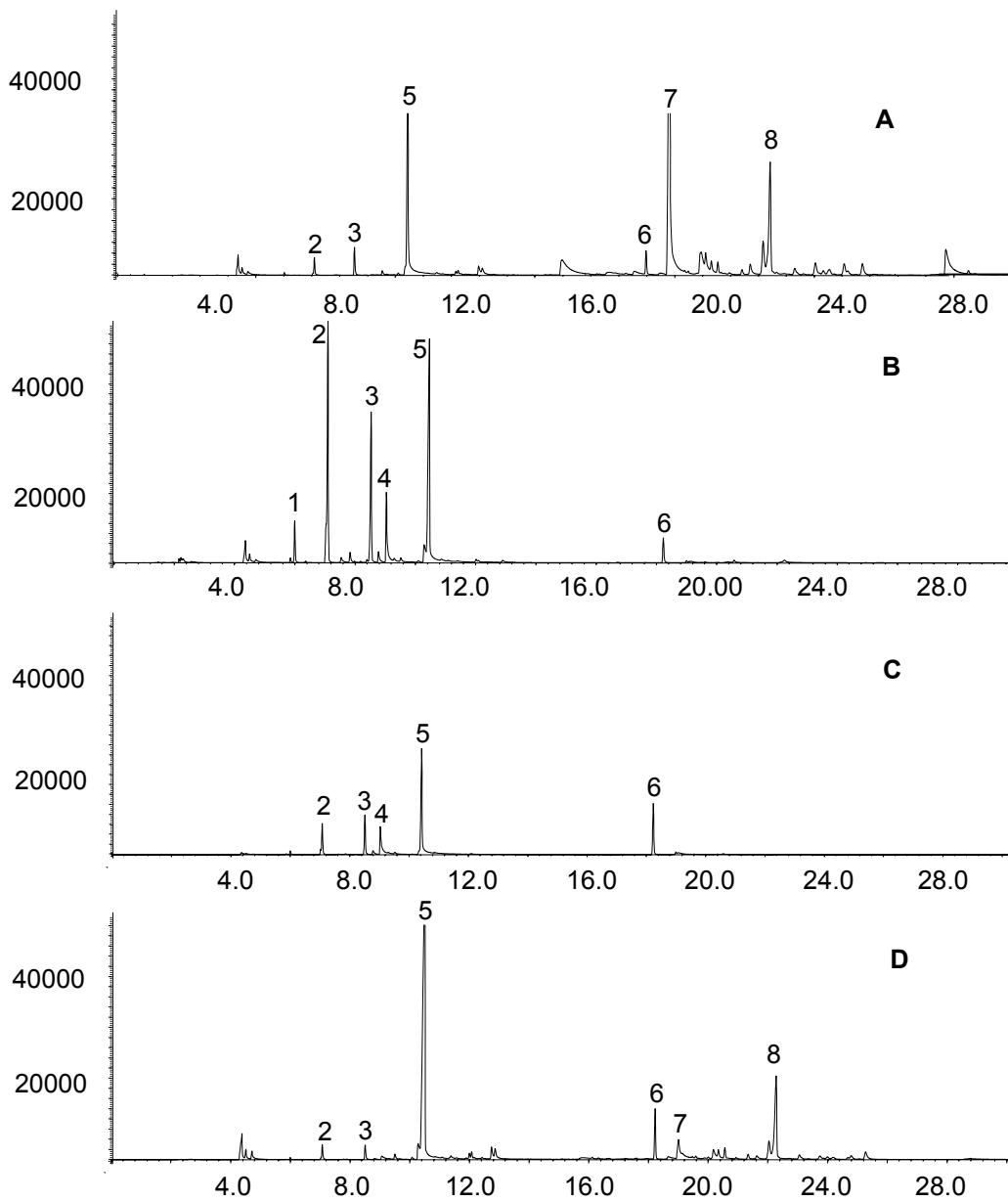
Para SDME, se requiere un solvente que no sea muy afectado por las MW, y que su tiempo de retención (t_R), no coincida con el de los analitos a extraer. Después de pruebas preliminares con otros hidrocarburos lineales, a saber, n-tetradecano ($C_{14}H_{30}$) y n-hexadecano ($C_{16}H_{34}$), se empleó como solvente de extracción, n-dodecano ($C_{12}H_{26}$). Como se observa en el perfil cromatográfico obtenido por GC-FID en columna apolar DB-5 (**Figura 47 A**), el área del pico cromatográfico generado por una microgota ($0.4 \mu\text{L}$) de n-dodecano (2), fue muy superior al de los otros compuestos volátiles extraídos de la flor, impidiendo lograr un perfil cromatográfico similar al obtenido con HS-SPME *in vitro* (Véase **Numeral 4.5.1**).

En el caso de SPME, se requiere un recubrimiento de polaridad y espesor, afín con la polaridad y volatilidad de los analitos, para favorecer su extracción y concentración. Se usó el recubrimiento de PDMS/DVB ($65 \mu\text{m}$), para comparar la extracción por SPME y por SDME. En el cromatograma típico, obtenido por GC-FID, de los compuestos extraídos de las flores de *H. coronarium* por HS-SPME, asistida con MWHD (**Figura 47B**), se aprecia claramente las ventajas de éste método sobre MWHD-HS-SDME (Véase **Figura 47A**).

De lo anterior, se seleccionó la SPME para extraer en el HS de una MWHD, los volátiles de las flores de *H. coronarium*.

4.5.2 Selección del dispositivo de muestreo. Fueron probados diferentes dispositivos de muestreo (Véase **Figura 28**), a saber: dispositivo abierto (**A**), dispositivo cerrado (**B**), condensador (**C**) y condensador con desprendimiento lateral (**D**), en la extracción por MWHD-HS-SPME de los volátiles de las flores de *H. coronarium*. Los perfiles cromatográficos de las pruebas realizadas, obtenidos por GC-FID en columna apolar DB-5, se presentan en la **Figura 48**.

Figura 48. Perfiles cromatográficos, obtenidos por GC-FID, de volátiles extraídos por MWHD-HS-SPME, de las flores de *Hedychium coronarium*, empleando diferentes dispositivos de muestreo.



Columna apolar DB-5 (30 m). *split*: 1:7. **A.** Dispositivo abierto; **B.** Dispositivo cerrado; **C.** Condensador; **D.** Condensador con desprendimiento lateral.

1. α -Pinoeno, **2.** β -Pinoeno, **3.** 1,8-Cineol, **4.** (E)- β -Ocimeno, **5.** Linalol, **6.** (E)-Cariofileno, **7.** (E)-Isoeugenol, **8.** Óxido de cariofileno.

De las pruebas con los dispositivos de muestreo, se advirtió que, empleando MWHD-HS-SPME se aislaron compuestos más volátiles ($t_R < 12$ min), cuando se emplearon, tiempo de radiación < 60 seg, tiempo de exposición < 300 seg, potencias de trabajo del MW < 720 W (60%) o cantidad de muestra < 3 g. Por el contrario, si se prolongaban los tiempos de radiación y exposición, o se aumentaban la potencia del MW o la cantidad de muestra, se aislaban compuestos menos volátiles ($14 < t_R < 30$ min).

Con MWHD-HS-SPME y el dispositivo **B**, se extrajeron principalmente, los compuestos que eluyen antes de 12 min (1, 2, 3, 4, 5), pero sólo se aisló un compuesto (6) con $t_R > 15$ min (**Figura 48B**). Usando el dispositivo **C**, se logró un perfil cromatográfico (**Figura 48C**) similar al obtenido cuando se usó en la extracción el dispositivo B, no obstante, las intensidades de los picos cromatográficos fueron mayores en la extracción por el dispositivo **B**, como se observa en la **Figura 48B y C**.

El uso de condensadores de bolas (**C y D**), con recirculación de agua a 60°C , adaptados para la extracción en el HS con SPME, de los compuestos volátiles destilados por MWHD de las flores de *H. coronarium*, sólo mejoró la extracción de compuestos con $t_R > 16$ min (6, 7, 8), cuando se empleó en la extracción el dispositivo **D** (**Figura 48D**).

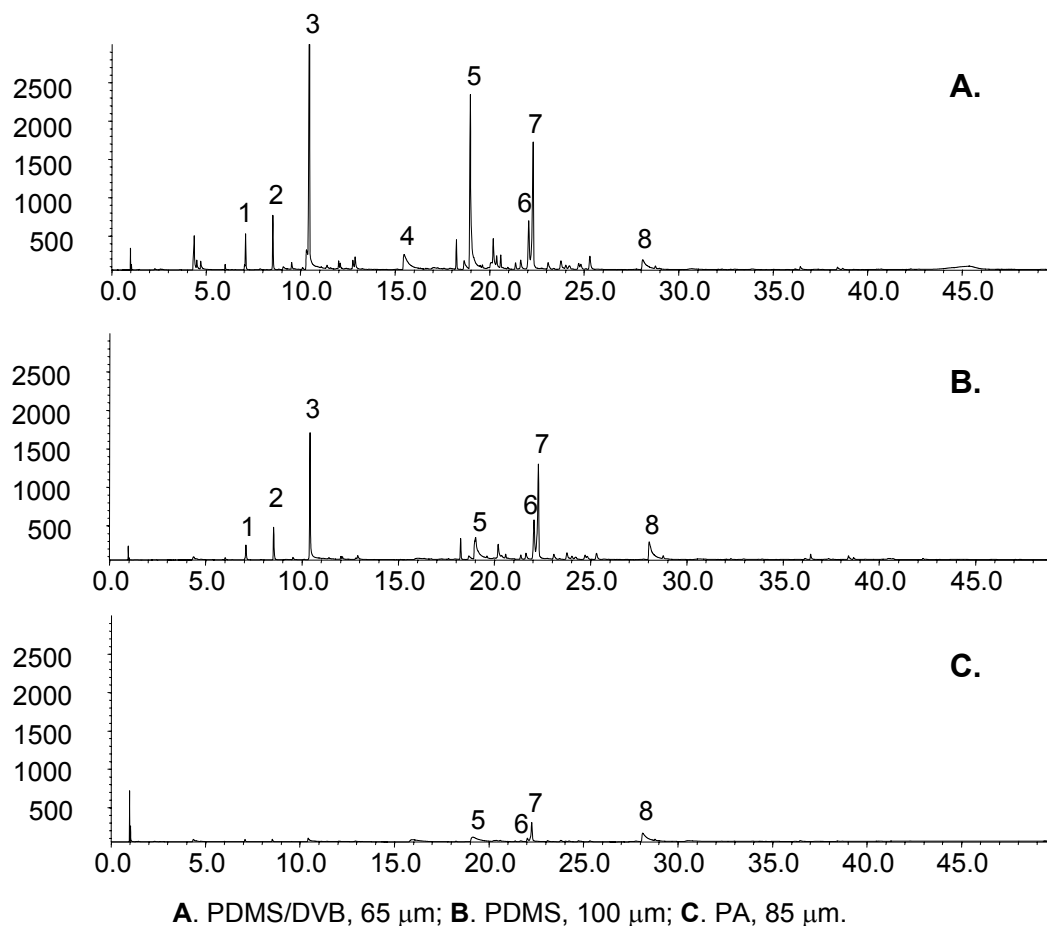
El perfil cromatográfico obtenido por GC-FID, de los extractos aislados por MWHD y HS-SPME con el dispositivo **D**, cambió entre experimentos. Se incluyó otro dispositivo de muestreo, **A**, con el cual se subsanó el problema de los cromatogramas y se incrementó la señal de los picos 7 y 8; obtenida por GC-FID, en columna apolar DB-5, como se aprecia en la **Figura 48A**.

Como en las pruebas realizadas, no fue posible reproducir el perfil cromatográfico obtenido por GC-FID, de los compuestos extraídos de flores de *H. coronarium* (Véase **Figura 46**), se mejoró el método con ayuda de dos

diseños experimentales factorial multivariado 3^2 por duplicado, tomando como variables el tiempo de exposición de la fibra, la cantidad de flor empleada, el tiempo de radiación y la potencia de trabajo del horno microondas.

4.5.3 Microextracción en fase sólida en modo *headspeace*, asistida por la radiación de microondas (MWHD-HS-SPME). En el desarrollo del método MWHD-HS-SPME para la extracción de volátiles de las flores de *H. coronarium*, se determinó el recubrimiento a emplear (**Figura 49**).

Figura 49. Perfiles cromatográficos, obtenidos por GC-FID, de volátiles extraídos por SPME, de las flores de *Hedychium coronarium*, empleando fibras con diferente recubrimiento.

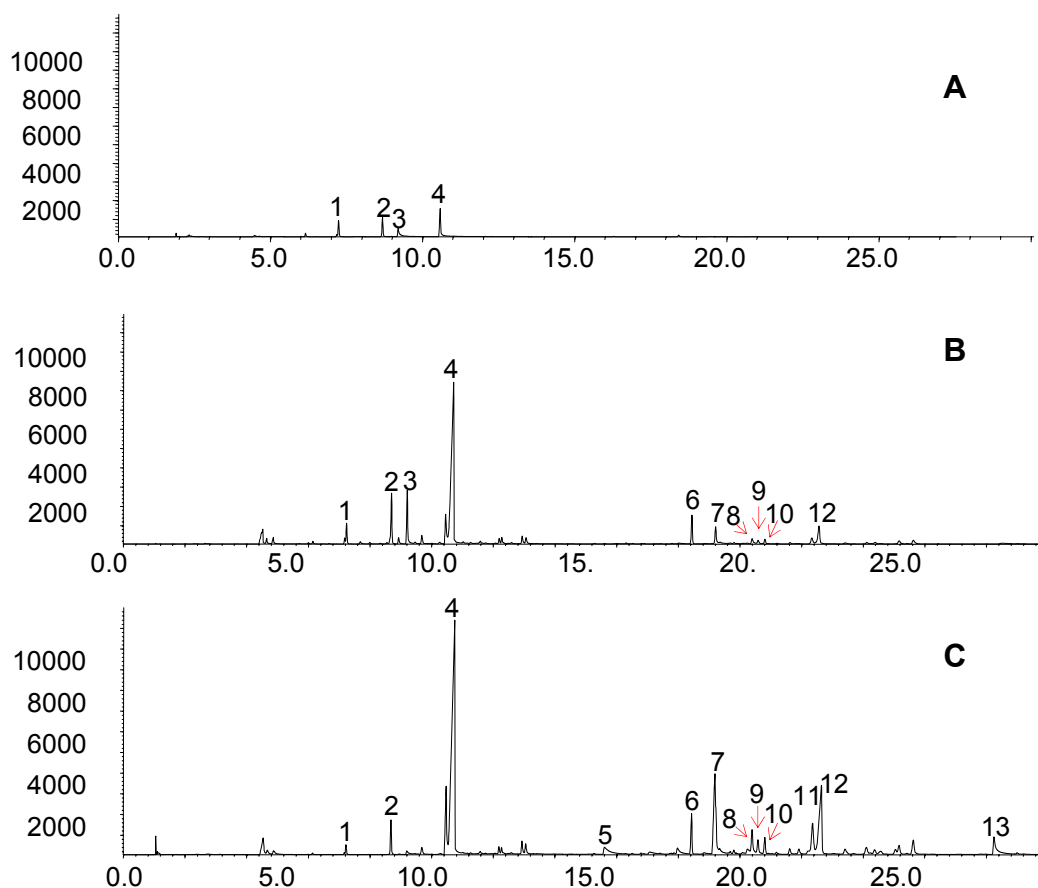


1. β -Pineno; 2. 1,8-Cineol; 3. Linalol; 4. Indol; 5. (E)- β -Cariofileno;
6. Sesquiterpeno oxigenado; 7. Óxido de cariofileno; 8. Benzoato de bencilo.

Con base en los perfiles cromatográficos de la **Figura 49**, obtenidos por GC-FID en columna apolar DB-5 (30 m), la fibra con recubrimiento de PDMS/DVB (65 μm) logró extraer más compuestos que las fibras de PDMS (100 μm) y PA (85 μm).

Se realizaron pruebas de extracción por el método MWHD-HS-SPME, usando diferentes cantidades de muestra (**Figura 50**).

Figura 50. Perfiles cromatográficos, obtenidos por GC-FID, de los extractos aislados por MWHD-HS-SPME, de diferentes cantidades de flores de *Hedychium coronarium*.



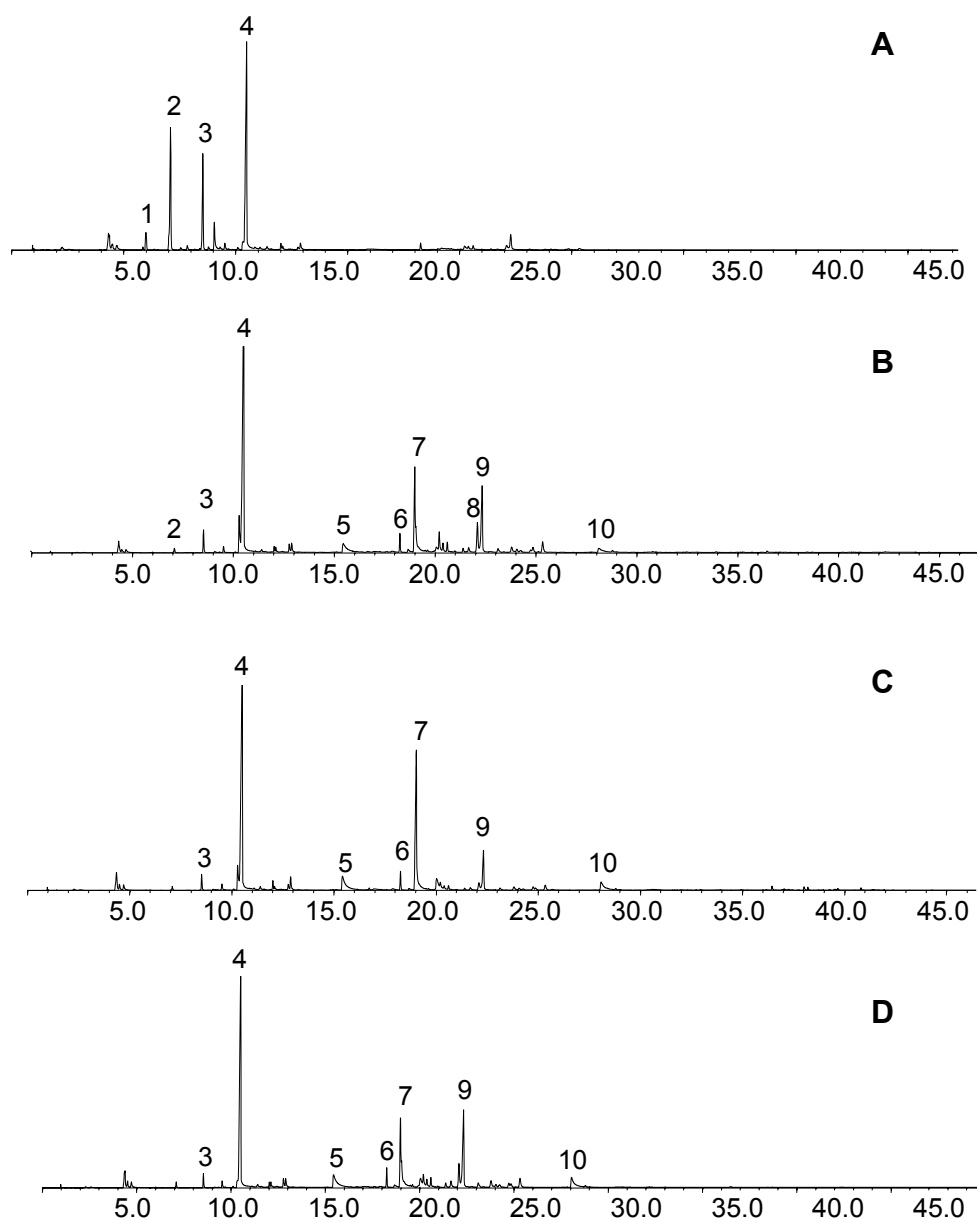
Cantidad de muestra: **A.** 2 g; **B.** 5 g; **C.** 10 g.

- 1.** β -Pinoeno; **2.** 1,8-Cineol; **3.** (E)- β -Ocimeno; **4.** Linalol; **5.** Indol; **6.** (E)-Jasmona;
7. (E)- β -Cariofileno; **8.** Metil-isoeugenol; **9.** (E,E)- α -Farneseno; **10.** Ionol;
11. Sesquiterpeno oxigenado; **12.** Óxido de cariofileno; **13.** Benzoato de bencilo.

En la **Figura 50**, se aprecian los perfiles cromatográficos, obtenidos por GC-FID, de la extracción por MWHD-HS-SPME con fibra de PDMS/DVB (65 μm), de diferentes cantidades de muestra. Cuando se emplearon 2 g de flores de *H. coronarium* en la extracción por MWHD-HS-SPME, el cromatograma presentó sólo cuatro picos de baja intensidad, con $t_R < 12$ min (**Figura 50 A**). Usando 5 g de muestra, aumentaron el número de picos y sus intensidades (**Figura 50 B**). Con 10 g de flores frescas, incrementaron los picos 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12, y disminuyeron los picos 2 y 3 (**Figura 50 C**).

Diferentes tiempos de exposición de la fibra (2 a 30 min) al HS, se probaron para definir el tiempo de exposición para la extracción en el HS. En la **Figura 51**, se exponen los cromatogramas obtenidos por GC-FID en columna apolar DB-5 empleando el 50% de la potencia de trabajo del MW y cuatro tiempos de exposición (2 min, 10 min, 20 min y 30 min). De acuerdo con estos resultados, se determinó un rango entre 2 y 10 min para la variable tiempo de exposición de la fibra.

Figura 51. Perfiles cromatográficos, obtenidos por GC-FID, de extracciones por MWHD-HS-SPME, en diferente tiempo de exposición de la fibra.



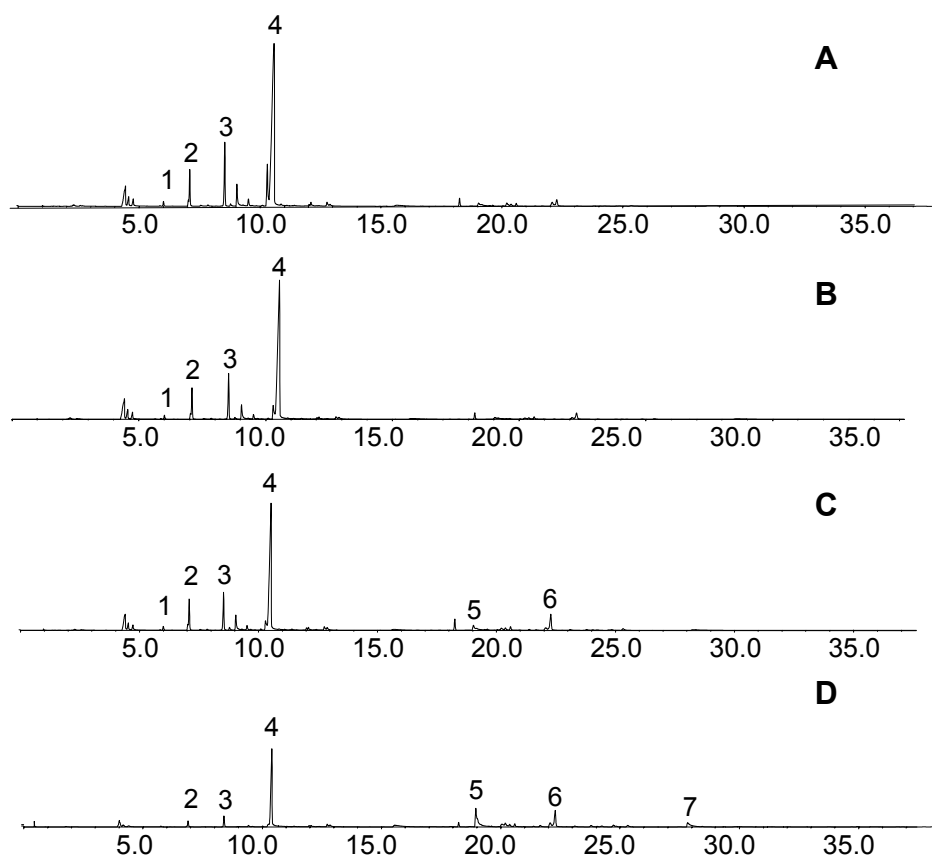
Tiempo de exposición: **A.** 2 min; **B.** 10 min; **C.** 20 min; **D.** 30 min.

- 1.** β -Pinoeno; **2.** 1,8-Cineol; **3.** (E)- β -Ocimeno; **4.** Linalol; **5.** Indol; **6.** (E)-Jasmona;
7. (E)- β -Cariofileno; **8.** Sesquiterpeno oxigenado; **9.** Óxido de cariofileno;
10. Benzoato de bencilo.

Durante las pruebas, se estableció la necesidad de exponer la fibra al HS, inmediatamente después de iniciada la extracción por MW.

Se probó la extracción por MWHD-HS-SPME con diferentes volúmenes de agua. En los perfiles cromatográficos de la **Figura 52**, obtenidos por GC-FID, se aprecia que, la adición de agua ocasionó una leve disminución de los picos 1, 2, 3 y 4, con $t_R < 11$ min, y un aumento de la señal los picos 5, 6 y 7 con $t_R > 18$ min. Se determinó 10 mL de agua para la destilación, volumen que favoreció la extracción de los compuestos que eluían después de 18 min, conservando el aspecto del perfil cromatográfico, obtenido por GC-FID, de la **Figura 52C**.

Figura 52. Perfiles cromatográficos, obtenidos con GC-FID, de la extracción por MWHD-HS-SPME, de volátiles de flores de *Hedychium coronarium*, empleando diferente volumen de agua.

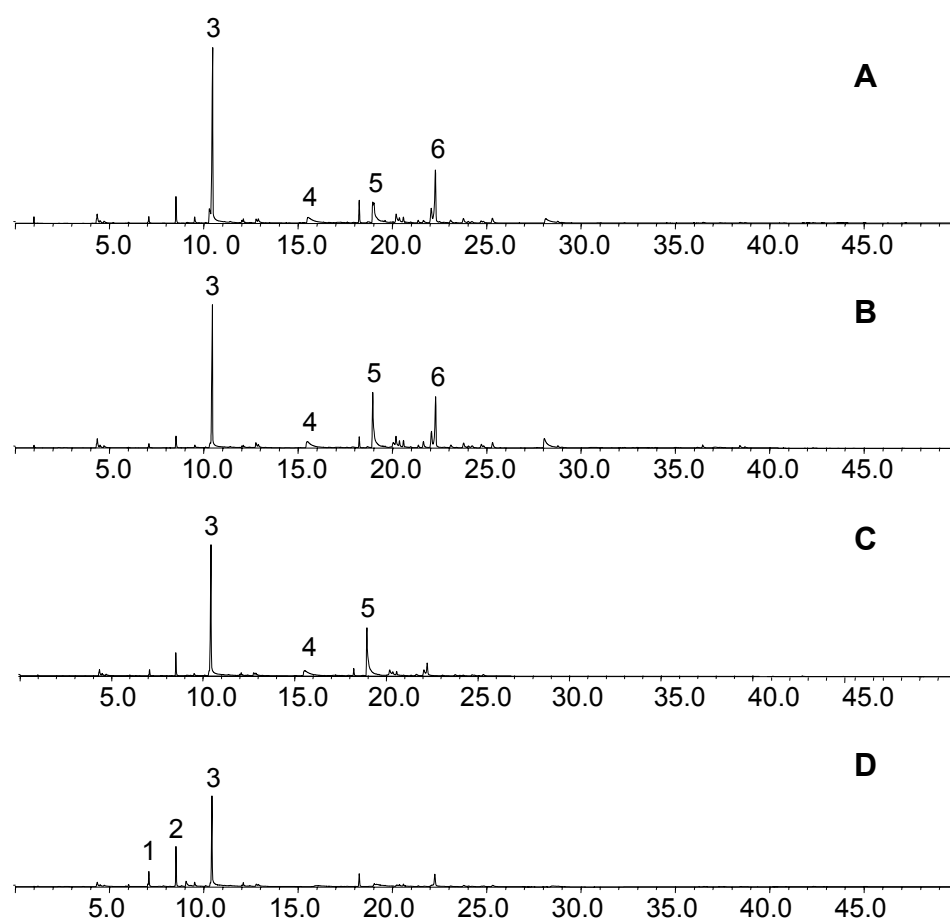


Volumen de agua: **A.** sin agua; **B.** 3 mL de agua; **C.** 5 mL de agua; **D.** 20 mL de agua.

1. (E)- β -Ocimeno; **2.** Linalol; **5.** (E)- β -Cariofileno; **6.** Óxido de cariofileno; **7.** Benzoato de bencilo.

Se adicionaron diferentes porcentajes de sal a un balón de destilación conteniendo el agua y las flores frescas de *H. coronarium*. Los perfiles cromatográficos, obtenidos por GC-FID, de las destilaciones por MWHD de las flores de *H. coronarium*, adicionando diferentes cantidades de sal, se presentan en la **Figura 53**.

Figura 53. Perfiles cromatográficos, obtenidos por GC-FID, de la destilación de flores de *Hedychium coronarium*, usando diferentes porcentajes de sal.



Cantidad de sal: **A.** sin sal; **B.** 2 % de sal; **C.** 5 % de sal; **D.** 20 % de sal.

1. β -Pineno; 2. 1,8-Cineol; 3. Linalol; 4. Indol; 5. (E)- β -Cariofileno; 6. Óxido de cariofileno.

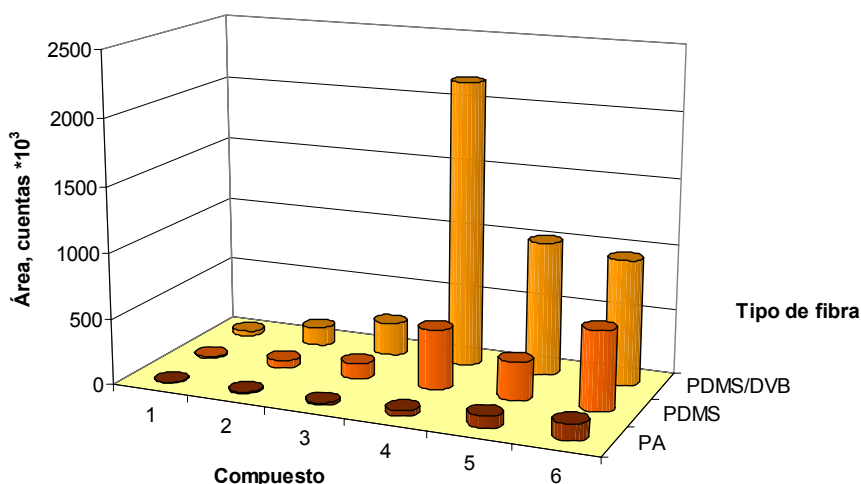
La adición de 2% de sal, mejoró la señal de los picos 5 y 6, y disminuyó la señal del pico 3 (**Figura 53B**). El posterior aumento del porcentaje de sal en la destilación, disminuyó las intensidades de los picos cromatográficos,

excepto para los picos 1, 2 y 3 (Figura 53C y D). Con base en estos resultados, se decidió no adicionar sal, para realizar la destilación.

4.5.4 Selección del tipo de fibra. Se compararon tres fibras para SPME: PDMS (100 μm), PDMS/DVB (65 μm) y PA (85 μm), de acuerdo con el promedio de las áreas de seis picos cromatográficos (Propanol, α -pineno, 1,8-cineol, linalol, (E)- β -cariofileno y benzoato de bencilo), obtenidos por GC-FID, extraídos y concentrados por MWHD-HS-SPME, de las flores frescas de *H. coronarium*.

Con la fibra de PDMS/DVB (65 μm), bajo las condiciones de análisis (4 g de muestra, 40% de potencia del MW, 1 min de radiación con MW, 5 min de exposición de la fibra al HS y 5 mL de agua), se obtuvo un promedio de áreas mayor que con las otras fibras empleadas, como se observa en la Figura 54.

Figura 54. Extracción por MWHD-HS-SPME, empleando fibras con diferente recubrimiento.



Condiciones de análisis: Muestra (4 g); potencia del horno MW (40%); tiempo de radiación (1 min); tiempo de exposición de la fibra al HS (5 min) volumen de agua (5 mL).

1. Propanol; 2. α -Pineno; 3. 1,8-Cineol; 4. Linalol; 5. (E)- β -Cariofileno; 6. Benzoato de bencilo.

4.5.5 Selección del tiempo de radiación y potencia del horno microondas. Se realizó un diseño experimental, tomando como variable de respuesta la suma de áreas de propanol, α -pineno, 1,8-cineol, linalol, (E)- β -cariofileno y benzoato de bencilo. Los resultados obtenidos en el diseño experimental factorial multinivel 3^2 , para el tiempo de radiación y la potencia del horno MW, se presentan en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Resultados del diseño experimental factorial multinivel 3^2 para tiempo de radiación y potencia de trabajo del MW.

Experimento	Tiempo, min	Potencia, % Watts	Área total, cuentas
1	2	480	1393182.1
2	1	600	563141.4
3	1	480	549029.7
4	2	600	557597.9
5	2	720	525119.2
6	1	720	873632.8
7	4	600	349014.0
8	4	720	264180.2
9	4	480	469570.4

En la **Tabla 14** se observan los coeficientes de la ecuación de regresión del modelo generado para encontrar los mejores valores, para la suma de áreas de seis picos seleccionados.

Tabla 14. Coeficientes de la ecuación de regresión del modelo para tiempo de radiación y potencia de trabajo del MW.

.Variable	Coeficiente
A: Tiempo de radiación, min	-150507
B: Potencia, W	-124808
AA	-150507
BB	189201
AB	-132498
Constante	699166

Por consiguiente, la ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Área total} = 699166 - 150507 A - 124808 B - 313872 A^2 - 132498 AB + 189201 B^2$$

Con base en los resultados del diseño experimental, 600 W (50%) de potencia de trabajo del MW y 2 min de radiación, son las mejores condiciones de extracción por MWHD-HS-SPME (**Tabla 17**).

4.5.6 Selección del tiempo de exposición de la fibra y cantidad de muestra. Los mejores valores para el tiempo de exposición de la fibra al HS y la cantidad de flor de *H. coronarium*, a emplear en la extracción de sus volátiles por MWHD-HS-SPME, se definieron con un diseño factorial multinivel 3², tomando como variable de respuesta la suma de áreas de propanol, α -pineno, 1,8-cineol, linalol, (E)- β -cariofileno y benzoato de bencilo.

Los resultados obtenidos en el diseño experimental factorial multinivel 3², para el tiempo de exposición de la fibra al HS y la cantidad de flor de *H. coronarium*, se presentan en la **Tabla 15**.

Tabla 15. Resultados del diseño experimental factorial multinivel 3² para tiempo de exposición y cantidad de muestra.

Experimentos	Tiempo de exposición, min	Cantidad de muestra, g	Área total, cuentas
1	5	3	745782
2	2	5	605090
3	2	3	260164
4	5	5	518732
5	5	7	684405
6	2	7	867360
7	10	5	120342
8	10	7	1.14E+06
9	10	3	417594

En la **Tabla 16** se observan los coeficientes de la ecuación de regresión del

modelo generado para encontrar los mejores valores, para la suma de áreas de seis picos seleccionados.

Tabla 16. Coeficientes de la ecuación de regresión del modelo para tiempo de exposición y cantidad de muestra.

Variable	Coefficiente
A: Tiempo de exposición, min	158328
B: Cantidad de muestra, g	11368.8
AA	-373936
BB	-389608
AB	81676.5
Constante	1.11E+06

Por consiguiente, la ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Área total} = 1,10572E6 + 158328 A + 11368,8 B - 373936 A^2 + 81676,5 AB - 389608 B^2$$

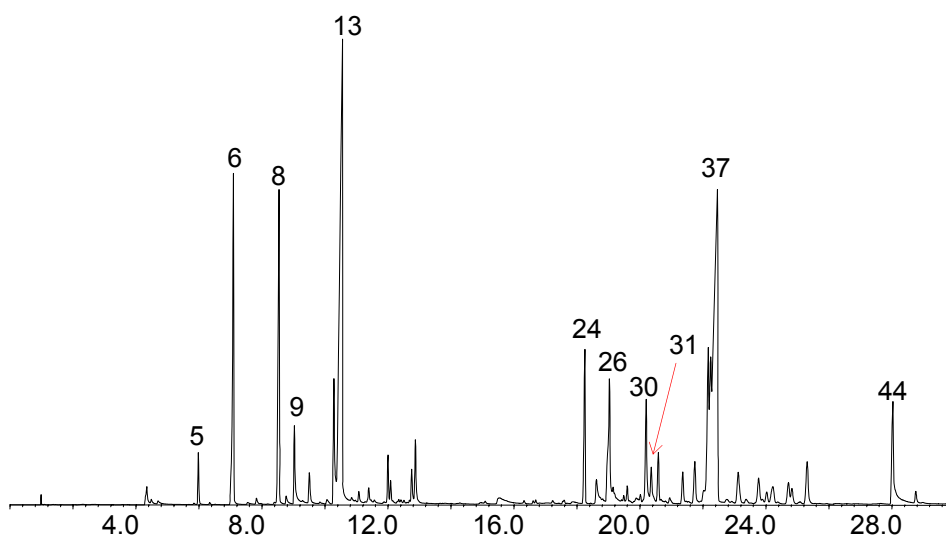
Según los resultados obtenidos con el diseño experimental, la extracción por MWHD-HS-SPME, se mejoró, dejando 5 min de exposición de la fibra al HS y empleando 5 g de flores de *H. coronarium* (**Tabla 17**).

Tabla 17. Parámetros de extracción propuestos para el análisis de volátiles de flores de *H. coronarium* por MWHD-HS-SPME.

Parámetro	Especificaciones
Fibra para SPME	PDMS/DVB (65 µm)
Potencia del horno	600 W
Tiempo de radiación	2 min
Cantidad de muestra	5 g
Tiempo de exposición	5 min
Volumen de agua	10 mL

En la **Figura 55**, se muestra un perfil cromatográfico, obtenido por GC-FID, de la extracción por MWHD-HS-SPME, de compuestos volátiles de las flores frescas de *H. coronarium*, obtenido bajo las condiciones especificadas en la **Tabla 17**.

Figura 55. Perfil cromatográfico de flores frescas de *Hedychium coronarium*, obtenido por el método MWHD-HS-SPME-GC-FID en columna apolar DB-5.



Condiciones de análisis: potencia del horno: 500 W; tiempo de radiación: 2 min; cantidad de muestra: 5 g; tiempo de exposición: 5 min y volumen de agua: 10 mL.

Empleando MWHD-HS-SPME se obtuvieron 72 compuestos volátiles y semivolátiles de las flores de *H. coronarium*, en cantidades relativas superiores al 0,1%. Se identificaron positivamente 42 compuestos (**Tabla 18**), correspondientes al 94,7% del área total registrada en el análisis por GC-FID, en columna apolar DB-5. Las cantidades relativas de los compuestos mayoritarios extraídos por éste método fueron: linalol (19,0%), óxido de cariofileno (17,0%), β -pineno (6,1%), 1,8-cineol (5,9%), (E,E)-farnesol (4,1%), (E,E)-4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno (4,1%), (E)- β -Farneseno (3,8%), benzoato de bencilo (3,7%), benzoato de metilo (2,7%), (E)- β -cariofileno (2,9%) y metil isoeugenol (2,6%).

Tabla 18. Composición química, obtenida por GC-MS, del extracto obtenido por MWHD-HS-SPME-GC-FID de las flores de *Hedychium coronarium*.

N° Pico ^a	Compuesto	t _R , min	Cantidad relativa, %
1	<i>n</i> -Propanol	0,99 ± 0,01	0,06 ± 0,01
2	(Z)-2-Metil butilaldoxima	4,35 ± 0,04	0,49 ± 0,03
3	(E)-2-Metil butilaldoxima	4,49 ± 0,02	0,18 ± 0,02
4	(Z)-3-metil butilaldoxima	4,71 ± 0,05	0,18 ± 0,01
5	α-Pineno	5,92 ± 0,03	0,74 ± 0,04
6	β-Pineno	7,10 ± 0,03	6,1 ± 0,4
7	α-Mirceno	7,81 ± 0,06	0,17 ± 0,01
8	1,8-Cineol	8,55 ± 0,02	5,9 ± 0,6
9	(E)-β-Ocimeno	9,03 ± 0,01	1,7 ± 0,5
10	γ-Terpineno	9,51 ± 0,08	0,80 ± 0,03
11	Terpinoleno	10,07 ± 0,02	0,18 ± 0,01
12	Benzoato de metilo	10,29 ± 0,04	2,6 ± 0,4
13	Linalol	10,56 ± 0,05	19 ± 3
14	(E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno	10,85 ± 0,01	0,26 ± 0,03
15	<i>allo</i> -Ocimeno	11,08 ± 0,04	0,39 ± 0,05
16	Fenil acetronitrilo	11,39 ± 0,03	0,40 ± 0,01
17	Pinocarvona	12,00 ± 0,05	0,85 ± 0,06
18	Terpinen-4-ol	12,09 ± 0,08	0,44 ± 0,06
19	α-Terpineol	12,76 ± 0,02	0,69 ± 0,02
20	Mirtenal	12,88 ± 0,01	1,5 ± 0,5
21	Indol	15,53 ± 0,02	1,0 ± 0,2
22	Eugenol	16,69 ± 0,04	0,11 ± 0,01
23	(E)-Jasmona	17,23 ± 0,01	0,16 ± 0,03
24	(E)-β-Cariofileno	18,25 ± 0,06	2,9 ± 0,4
25	Benzoato de 3-hexenilo	18,62 ± 0,07	1,00 ± 0,02
26	(E)-β-Farneseno	19,04 ± 0,09	3,8 ± 0,4
27	<i>allo</i> -Aromadendreno	19,15 ± 0,02	0,88 ± 0,03
28	γ-Cadineno	19,60 ± 0,04	0,42 ± 0,01
29	Germacreno D.	19,89 ± 0,06	0,21 ± 0,04
30	Metil isoeugenol	20,20 ± 0,03	2,6 ± 0,5
31	(E,E)-α-Farneseno	20,36 ± 0,01	1,1 ± 0,1
32	Fenil acetronitrilo	20,59 ± 0,05	1,1 ± 0,2
33	δ-Cadineno	21,74 ± 0,07	1,3 ± 0,1
34	α-Muruleno	22,03 ± 0,03	0,44 ± 0,02
35	(E,E)-Farnesol	22,17 ± 0,02	4,1 ± 0,3
36	(E,E)-4,8,12-Trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno	22,25 ± 0,05	4,1 ± 0,7
37	Óxido de cariofileno	22,46 ± 0,05	17 ± 4
38	(Z)-Metil jasmonato	23,12 ± 0,09	1,2 ± 0,2
39	<i>epi</i> -α-Muurolol	23,77 ± 0,04	0,9 ± 0,2
40	α-Cadinol	24,22 ± 0,02	0,83 ± 0,09
41	N.I.	24,72 ± 0,01	0,72 ± 0,02
42	Heptadecano	24,83 ± 0,07	0,53 ± 0,03
43	N.I.	25,31 ± 0,05	1,5 ± 0,6
44	Benzoato de bencilo	28,03 ± 0,03	3,7 ± 0,5

a Número del pico en la **Figura 55**.

4.5.7 Determinación de las figuras analíticas de mérito.

- **Evaluación de la linealidad y la sensibilidad del método.** La linealidad y la sensibilidad del método se evaluaron empleando la curva de calibración con estándar interno (**ANEXO 4, Figura 4-1**). El método MWHD-HS-SPME con separación y análisis por GC-FID, fue lineal en el rango de concentraciones evaluada de 0 a 100 ppm para γ -terpineno y linalol, como se aprecia en la **Tabla 19**. La sensibilidad del método de extracción (MWHD-HS-SPME), empleando el detector FID, fue mayor para 1,8-cineol y linalol, que para γ -terpineno.

Tabla 19. Linealidad y sensibilidad del método MWHD-HS-SPME.

Compuesto	Ecuación	R²	b
1,8-Cineol	$y = 449217 x - 408811$	0,9465	449217
γ -Terpineno	$y = 1686 x - 718,18$	0,9963	1686
Linalol	$y = 20809 x + 534135$	0,9957	20809

No obstante, el método fue lineal para 1,8-cineol, cuando se adicionó su estándar interno individualmente. Corroborando los resultados reportados por Xiong *et al.* [127], quienes consideraron conveniente cuantificar los compuestos de manera individual.

El área de la mayoría de los compuestos extraídos por el método MWHD-HS-SPME, permaneció constante después de la adición del estándar interno, corroborando las condiciones de equilibrio de la extracción. Sin embargo, el área de algunos picos cromatográficos, obtenida por GC-FID, aumentó (*e.g.* (E)- β -ocimeno) o disminuyó (*e.g.* eugenol) con la adición del estándar. Este hecho, se explicó por el fenómeno de competencia que rige la adsorción sobre la fase estacionaria o recubrimiento de la fibra para SPME, cuando ésta es expuesta al HS.

- **Evaluación de la reproducibilidad del método.** Los mayores valores del coeficiente de variación para áreas y tiempos de retención (**Tabla 20 y 21**), para los compuestos volátiles analizados (1,8-cineol, γ -terpineno y linalol), fueron 7,9 y 1,3%, respectivamente. Como el valor del coeficiente de variación calculado para cada uno de los compuestos analizados por el método, no supero el 2% para el tiempo de retención, ni el 10% para el área del pico cromatográfico, el método implementado se catalogó como reproducible, según las buenas prácticas de laboratorio.

Tabla 20. Reproducibilidad del método MWHD-HS-SPME, según las áreas de los picos cromatográficos seleccionados.

Compuesto	Área, cuentas			<X> (n = 5)	S	CV, %
1,8-Cineol	116888	123723	132644	127234	9010	7,1
	139836	123081				
γ -Terpineno	21677	23505	21529	22170	1343	6,1
	23611	20528				
Linalol	480296	562655	563664	529760	41705	7,9
	488466	553717				

Tabla 21. Reproducibilidad del método MWHD-HS-SPME, según los tiempos de retención de los picos cromatográficos seleccionados.

Compuesto	Tiempo de retención, min			<X> (n = 5)	S	CV, %
1,8-Cineol	8,4	8,7	8,4	8,5	0,1	1,3
	8,4	8,4				
γ -Terpineno	9,422	9,416	9,4	9,4	0,003	0,1
	9,416	9,421				
Linalol	10,39	10,43	10,45	10,43	0,02	0,2
	10,43	10,43				

Además, se evaluó la reproducibilidad de la muestra, colectando las flores de *H. coronarium* a diferentes horas de la noche (entre 8:00 y 12:00 p.m.). Los coeficientes de variación (CV= 18 – 59%) para las áreas de los compuestos analizados, confirmaron la necesidad de recolectar las flores de *H. coronarium* a una misma hora. Los resultados del análisis de la reproducibilidad de la muestra, se presentan en las **Tablas 22 y 23**.

Tabla 22. Reproducibilidad de la muestra, según el área de los picos cromatográficos seleccionados.

Compuesto	Área, cuentas			<X> (n = 5)	S	CV, %
1,8-Cineol	22745	16511	43657	32671	19279	59,0
	61345	19100				
γ -Terpineno	6314	6181	5061	6278	1317	21,0
	5396	8437				
Linalol	49223	48873	54081	55250	10190	18,4
	50974	73102				

Tabla 23. Reproducibilidad de la muestra, según el tiempo de retención de los picos cromatográficos seleccionados.

Compuesto	Tiempo de retención, min			<X> (n = 5)	S	CV, %
1,8-Cineol	8,452	8,442	8,441	8,446	0,005	0,1
	8,448	8,448				
γ -Terpineno	9,421	9,418	9,415	9,418	0,003	0,1
	9,416	9,421				
Linalol	10,367	10,368	10,369	10,373	0,014	0,1
	10,364	10,397				

- **Determinación del los límites de detección y cuantificación.** Los límites de detección y cuantificación para 1,8-cineol, γ -terpineno y linalol, empleando el método de MWHD-HS-SPME, se reportan en la **Tabla 24**.

Tabla 24. Límites de detección y cuantificación para 1,8-cineol, γ -terpineno y linalol.

Compuesto	LOD, ppm	LOQ, ppm
1,8-Cineol	0,36	0,72
γ -Terpineno	0,54	1,08
Linalol	0,25	0,50

Cuantificación de 1,8-cineol, γ -terpineno y linalol en las flores de *Hedychium coronarium*. La cuantificación de 1,8-cineol, γ -terpineno y linalol en flores de *H. coronarium* se llevó a cabo por el método de adición de estándar interno. Se determinó la concentración como aquella correspondiente a la señal del detector sin enriquecer la muestra de flores *H. coronarium*. Los resultados obtenidos se observan en la **Tabla 25**.

Tabla 25. Cuantificación de 1,8-cineol, γ -terpineno y linalol en las flores de *Hedychium coronarium*.

Compuesto	Concentración, ppm
1,8-Cineol	0,91 \pm 0,04
γ -Terpineno	0,63 \pm 0,02
Linalol	25,7 \pm 0,8

5. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron 103 metabolitos secundarios volátiles y semivolátiles de *H. coronarium*, usando cinco técnicas de extracción (MWHD, SDE, SFE, HS-SPME, MWHD-HS-SPME), la identificación de los compuestos se hizo con base en criterios cromatográficos (tiempos de retención, índices de Kováts) y de espectrometría de masas (EI, 70 eV), así como compuestos patrón.
- La composición de los metabolitos secundarios volátiles de los rizomas y flores de la planta bajo estudio, de acuerdo con las principales familias de compuestos, presentó diferencias. En los rizomas, predominaron monoterpenos oxigenados (>52%), hidrocarburos monoterpénicos (>43%) y diterpenos oxigenados (>3,3%), mientras en las flores, la familia de compuestos mayoritarios fue la de hidrocarburos monoterpénicos (>36%), seguida de hidrocarburos sesquiterpénicos (>15%), sesquiterpenos oxigenados (>12%) y monoterpenos oxigenados (>10%).
- En las flores los compuestos mayoritarios, fueron β -pineno (19%), (E)- β -cariofileno (9%), α -pineno (8%), 1,8-cineol (6%), óxido de cariofileno (6%), (E)- β -ocimeno (3%), sabineno (3%), α -humuleno (3%), linalol (3%) y (E)-isoeugenol (2%). En los rizomas los compuestos mayoritarios, fueron, 1,8-cineol (28%), β -pineno (17%), α -pineno (9%), alcanfor (8%), α -terpineol (7%), (E)-*p*-ment-2-en-1-ol (3%), terpinen-4-ol (3%), sabineno (3%) y δ -terpineol (2%).
- La extracción asistida con ultrasonido por una hora a 40°C, aumentó el número de compuestos aislados en los concretos obtenidos por EP

(37 a 46), de las flores de *Hedychium coronarium*, en comparación con la maceración por dos horas a 25°C. Caso contrario ocurrió en los extractos logrados por AcOEt y Hex, en los que se extrajeron más compuestos volátiles con maceración simple, 59 y 52, respectivamente. La aplicación de ultrasonido a la maceración simple, disminuyó la cantidad relativa de alifáticos en los extractos de Hex (41,5 a 27,8%) y EP (39,5 a 37,5%), e incrementó marcadamente la cantidad relativa de ácido acético, en el extracto obtenido por AcOEt (6% a 37%).

- La emisión de volátiles en la especie *H. coronarium*, monitoreada por HS-SPME *in vivo*, aumentó al atardecer y permaneció durante las horas de la noche. La cantidad relativa de la mayoría de los compuestos emanados incrementó, los más destacados fueron: indol, (E)- β -cariofileno, (E)-isoeugenol, benzoato de metilo, y benzoato de bencilo.
- El método de extracción por MWHD-HS-SPME acortó 60 min el tiempo de muestreo y análisis, en comparación con la extracción por HS-SPME con calentamiento convencional. Además, permitió la obtención de un perfil cromatográfico, similar al de los perfiles logrados para las extracciones por HS-SPME (*in vivo* e *in vitro*) y por SDE.
- La metodología de extracción por MWHD-HD-SPME, se evaluó para el análisis de 1,8-cineol, γ -terpineno y linalol, en flores de *H. coronarium*. Los resultados mostraron que, cuando se analizaron en conjunto, el método fue lineal, sensible y reproducible, sólo para linalol. No obstante, cuando se analizó el 1,8-cineol, por separado, el método también fue lineal, sensible y reproducible, según lo estipulado por las buenas prácticas de laboratorio.

6. RECOMENDACIONES

- Para la identificación completa de los compuestos volátiles en flores de *H. coronarium*, se deben emplear otros sistemas de separación, a saber: GC-GC o GC con columna quiral, y detectores más selectivos, como el detector de captura de electrones (ECD) o el detector de nitrógeno-fósforo (NPD).
- Comparar la composición química, obtenida por GC-FID/MS, de los extractos aislados por maceración simple y por maceración asistida por ultrasonido, con solventes derivados de petróleo, *i.e.* hexano y éter de petróleo, de las flores de *H. coronarium*, con el obtenido, por los mismos métodos, pero empleando solventes fluorocarbonados.
- Empleando la metodología implementada, estudiar las fragancias florales de *H. coronarium* y de otras especies de interés, que crecen en distintas regiones del país, con miras a su agroindustrialización.
- Se sugiere la construcción de un dispositivo de muestreo que, con ayuda de válvulas de paso, se confinen los volátiles promovidos por la MWHD en el HS, y, cuente con una adaptación (trampa de agua), para aliviar la presión generada al iniciar la destilación.
- Se recomienda validar el método de extracción por MWHD-HS-SPME, para el análisis rápido de alérgenos, en insumos y productos comerciales donde puedan estar contenidos, *e.g.* especies vegetales, productos cosméticos, alimenticios o medicinales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMS, R.P., Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy. Ed. Academic Press, San Diego, **1989**.
2. ADAMS, R.P., Identification of essential oil components by gas chromatography quadrupole mass spectroscopy. Ed. Allured, Illinois, **2004**, 456 p.
3. ADONIS, D.P., The application of carnation in perfumery. *Flavour Fragr. J.*, **1985**, 1, pp. 9-15.
4. ADONIS, D.P., Flower oils and floral compounds in perfumery. Ed. Perfumer & Flavorist, Allured Publishing Corp., Carol Stream, Illinois, **1993**, 257 p.
5. AKGÜN, M.; AKGÜN, N.A.; and DINÇER, S., extraction and modeling of lavender flower essential oil using supercritical carbon dioxide. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2000**, 39, pp. 473-477.
6. ALTENBURGER, R.; and MATILE, P., Further observations on rhythmic emission of fragrance in flowers. *Planta*, **1990**, 180, pp. 194-197.
7. ANAE, O., Gas chromatographic analysis of absolutes and volatile oil isolated from Turkish and foreign jasmine concretes. *Flavour Fragr. J.*, **1986**, 1, pp. 115-119.
8. ANTONELLI, A.; FABBRI, C.; GIORGIONI, M.E.; and BAZZOCCHI, R., Characterization of 24 old garden roses from their volatile compositions. *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, 45, pp. 4435-4439.

9. ARRILLAGA, N. G., Absolute from coffee flowers. *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.*, **1943**, 32, pp. 77-79.
10. ARTHUR, C.; and PAWLISZYN, J., Solid-phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.*, **1990**, 62, pp. 2145-2148.
11. ASAMITSU, Y.; NAKAMURA, Y.; UEDA, M.; KUWAHARA, S.; and KIYOTA, H., Synthesis and odor description of both enantiomers of methyl 4,5-didehydrojasmonate, a component of jasmine absolute, *Chemistry & Biodiversity*, **2006**, 3, pp. 654 -659.
12. AYCI, F.; AYDINLI, M.; BOZDEMIR, Ö.A.; and TUTAŞ, M., Gas chromatographic investigation of rose concrete, absolute and solid residue. *Flavour Fragr. J.*, **2005**, 20, pp. 481–486.
13. BERNARD, T.; PERINEAU, F.; DELMAS, M.; and GASET, A., I. Extraction of essential oils refining of plan materials. II. Processing of products in the dry state: *Illicium verum* Hooker (fruit) and *Cinnamomum zeylanicum* Nees (bark). *Flavour Fragr. J.*, **1989**, 4, pp. 85-90.
14. BERTRAND, C.; COMTE, G.; and PIOLA, F., Solid-phase microextraction of volatile compounds from flowers of two *Brunfelsia* species. *Biochem. Syst. Ecol.*, **2006**, 34, pp. 371-375.
15. BICCHI, C.; CORDERO, C.; LIBERTO, E.; RUBIOLO, P.; and SGORBINI, B., Automated headspace solid-phase dynamic extraction to analyze the volatile fraction of food matrices. *J. Chromatogr., A*, **2004**, 1024, pp. 217–226.

16. BICKERS, D.; CALOW, P.; GREIM, H.; HANIFIN, J.M.; ROGERS, A.E.; SAURAT, J.H.; SIPES, I.G.; SMITH R.L.; and TAGAMI, H., A toxicologic and dermatologic assessment of linalool and related esters when used as fragrance ingredients. *Food Chem. Toxicol.*, **2003**, 41, pp. 919–942.
17. BISHT, G.S.; AWASTHI, A.K.; and DHOLE, T.N., Antimicrobial activity of *Hedychium spicatum*. *Fitoterapia*, **2006**, 77, pp. 240–242.
18. BLANCH, G.P.; HERRAIZ, M.; REGLERO, G.; y TABERA, J., Dispositivo para la separación y concentración de componentes volátiles de muestras termosensibles por destilación y extracción simultánea mediante disolventes orgánicos. Oficina Española de Patentes y Marcas, España [Patente No ES 2043551].
19. BUCHBAUER, G.; JIROVETZ, L.; and NIKIFOROV, A., Comparative investigation of essential clover flower oils from Austria using gas chromatography-flame ionization detection, gas chromatography-mass spectrometry, and gas chromatography-olfactometry. *J. Agric. Food Chem.*, **1996**, 44, pp. 1827-1828.
20. BURGER, B.V.; MUNRO, Z.M.; and VISSER, J.H., Determination of plant volatiles 1: Analysis of the insect-attracting allomone of the parasitic plant *Hydnora africana* using Grob-Habich activated charcoal traps. *J. High Resol. Chromatogr.*, **1988**, 11, pp. 496-499.
21. BUSMAN, D.V.; ZOGHBI, M.G.B.; POTIGUARA, R.C.V.; and ANDRADE., E.H.A., Volatiles from different organs of *Unxia camphorata* L. f. growing in the Amazon. *Biochem. Syst. Ecol.*, **2005**, 33, pp. 1269-1273.

22. CADBY, P.A.; TROY, W.R.; and VEY, M.G.H., Consumer exposure to fragrance ingredients: providing estimates for safety evaluation, *Regul. Toxicol. Pharm.*, **2002**, 36, pp. 246-252.
23. CALDERÓN, E., Plantas invasoras en Colombia: Una visión preliminar, Instituto Alexander von Humboldt, Programa de Biología de la Conservación, Línea 'Especies Focales', **2003**.
24. CAVALLI, J-F.; FERNANDEZ, X.; LIZZANI-CUVELIER, L.; and LOISEAU, A.M., Comparison of static headspace, headspace solid phase microextraction, headspace sorptive extraction, and direct thermal desorption techniques on chemical composition of french olive oils. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, pp. 7709-7716.
25. CHEMAT, F.; LUCCHESI, M.E.; SMADJA, J.; FAVRETTO, L.; COLNAGHI, G.; and VISINONI, F., Microwave-accelerated steam distillation of essential oil from lavender: A rapid, clean and environmentally friendly approach. *Anal. Chim. Acta*, **2006**, 555, pp. 157-160.
26. CUEVAS-GLORY, L.F.; PINO, J.A.; SANTIAGO, L.S.; and SAURIDUCH, E., A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey. *Food Chem.*, **2007**, 103, pp. 1032–1043.
27. DAHANUKAR, S.A.; KULKARNI, R.A.; and REGE, N.N., Pharmacology of medicinal plants and natural products. *Ind. J. Pharmacol.*, **2000**, 32, pp. 81-118.
28. D'ALESSANDRO, M.; and TURLINGS, J., Advances and challenges in the identification of volatiles that mediate interactions among plants and arthropods. *Analyst.*, **2006**, 131, pp.24–32.

29. DENG, C.; JI, J.; LI, N.; YU, Y.; DUAN, G.; and ZHANG, X., Fast determination of curcumol, curdione and germacrone in three species of curcuma rhizomes by microwave-assisted extraction followed by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr., A*, **2006**, 1117, pp. 115–120. A
30. DENG, C.; XU, X.; YAO, N.; LI, N.; and ZHANG, X., Rapid determination of essential oil compounds in *Artemisia Selengensis* Turcz by gas chromatography-mass spectrometry with microwave distillation and simultaneous solid-phase microextraction. *Anal. Chim. Acta*, **2006**, 556, pp. 289–294.
31. DEWULF, J.; and VAN LANGENHOVE, H., Analysis of volatile organic compounds using gas chromatography. *Trends Anal. Chem.*, **2002**, 21, pp. 637-646.
32. DÍAZ-MAROTO, M.C.; PÉREZ-COELLO, M.S.; and CABEZUDO, M.D., Headspace solid phase micro-extraction analysis of volatile components of spices. *Chromatographia*, **2002**, 55, pp. 723–728.
33. DIXIT, V.; and VARMA, K., Effect of essential oils of rhizomes of *Hedychium coronarium* and *Hedychium spicatum* on central nervous system. *Ind. J. Pharmacol.*, **1979**, 11(2), pp. 147-149.
34. DUDAREVA, N.; MURFITT, L.M.; MANN, C.J.; GORENSTEIN, N.; KOLOSOVA, N.; KISH, C.M.; BONHAM, C.; and WOOD, K., Developmental regulation of methyl benzoate biosynthesis and emission in snapdragon flowers. *Plant Cell*, **2000**, 12, pp. 949-961.

35. DUDAREVA, N.; and PICHERSKY, E., Biology of floral scent. Ed. CRC Press. Taylor & Francis Group, Boca Raton, **2006**, 346 p.
36. DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; and GERSHENZON, J., Biochemistry of plant volatiles, *Plant Physiol.*, **2004**, 135, pp. 1893-1902.
37. EFFMERT, U.; SASCHENBRECKER, S.; ROSS, J.; NEGRE, F.; FRASER, C.M.; NOEL, J.P.; DUDAREVA, N.; and PIECHULLA, B., Floral benzenoid carboxyl methyltransferases: from *in vitro* to *in planta* function. *Phytochemistry*, **2005**, 66, pp. 1211-1230.
38. FLAMINI, G.; CIONI, P.L.; and MORELLI, I., Use of solid-phase micro-extraction as a sampling technique in the determination of volatiles emitted by flowers, isolated flower parts and pollen. *J. Chromatogr., A*, **2003**, 998(1-2), pp. 229-233.
39. FLAMINI, G.; CIONI, P.L.; and MORELLI, I., Differences in the fragrances of pollen, leaves, and floral parts of garden daisy (*Chrysanthemum coronarium*) and composition in the essential oil from flower heads and leaves. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, pp. 2267-2271.
40. FLAMINI, G.; CIONI, P.L.; and MORELLI, I., Composition of the essential oils and *in vivo* emission of volatiles of four *Lamium* species from Italy: *L. purpureum*, *L. hybridum*, *L. bifidum*, and *L. amplexicaule*. *Food Chem.*, **2005**, 91, pp. 63-68.
41. FRÁTER, G.; BAJGROWICZ, J.A.; and Kraft, P., Fragrance chemistry. *Tetrahedron*, **1998**, 54, pp. 7633-7703.

42. GEORGIEVA, E.; HANKJIEVA, N.; POPOV, S.; and EVSTATIEVA, L., Comparative analysis of volatiles from flowers and leaves of three *Gentiana* species. *Biochem. Syst. Ecol.*, **2005**, 33, pp. 938-947.
43. GODEFROOT, M.; SANDRA, P.; and VERZELE, M., New method for quantitative essential oil analysis. *J. Chromatogr.*, **1981**, 203, pp. 325-335.
44. GOEDERT, M; and GUIOCHON, G., Sources of error in measurement of retention times. *Anal. Chem.*, **1970**, 42(9), pp. 962-968.
45. GOPALAKRISHNAN, N.; and NARAYANAN, C. S., Carbon dioxide extraction of Indian jasmine concrete. *Flavour Fragr. J.*, **1991**, 6, pp. 135-138.
46. GROB, R.L., Modern practice of gas chromatography. Second edition. Ed. John Willey and Sons, Inc., **1985**, 896 p.
47. HEATH, B.; and MANUKIAN, A., Development and evaluation of systems to collect volatile semiochemicals from insects and plants using a charcoal-infused medium for air purification. *J. Chem. Ecol.*, **1992**, 18, pp. 1209-1226.
48. HELSPER, J.P.F.G.; DAVIES, J.A.; BOUWMEESTER, H.J.; KROL, A.F.; and VAN KAMPEN, M.H., Circadian rhythmicity in emission of volatile compounds by flowers of *Rosa hybrida* L. cv. Honesty. *Planta*, **1998**, 207, pp. 88-95.
49. IKEDA, N.; ISHIHARA, M.; TSUNEYA, T.; KAWAKITA, M.; YOSHIHARA, M.; SUZUKI, Y.; KOMAKI, R.; and INUI, M., Volatile

components of honeysuckle (*Lonicera japonica* Thunb.) flowers, *Flavour Fragr. J.*, **1994**, 9, pp. 325-331.

50. JAKOBSEN, H.B.; and OLSEN, C.E., Influence of climatic factors on rhythmic emission of volatiles from *Trifolium repens* L. flowers *in situ*. *Planta*, **1994**, 192, pp.365-371.
51. JAYAPRAKASHA, G.K.; JAGAN MOHAN RAO, L.; and SAKARIAH, K.K., Chemical composition of the flower oil *Cinnamum zeylanicum* blume. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, pp. 4294-4295.
52. JENNINGS, W., Analytical gas chromatography, Ed. Academic Press, San Diego, **1987**, 259 p.
53. JENNINGS, W.; WOHLER, R.H.; and WOHLERS, N., High pressure soxhlet extractor. United States Patent, 4,265,860, (05.05.1981).
54. JENSEN, B., A small guide to Nature's fragrances-aspects of the chemistry of the essential oils. Copenhagen, Denmark, [on-line]: <http://www.bojensen.net/EssentialOilsEng/EssentialOils.htm>. [Revisado el 28 de mayo 2006].
55. JOULAIN, D.; and KÖNIG, W.A., The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons, Ed. E.B.-Verlag, Hamburg, **1998**, 658 p.
56. KAISER, R., Scents from rain forests. *Chimia*, **2000**, 54, pp. 346-363.
57. KINGSTON, H.M.; and JESSIE, L.B., Introduction to microwave simple preparation. Theory and practice. Ed. ACS Professional Reference Book. American Chemical Society, **1988**, 263 p.

58. KNUDSEN, J.T.; TOLLSTEN, L.; and BERGSTRÖM, G., Floral scents: a checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques. *Phytochemistry*, **1993**, 33, pp. 253-280.
59. KÖNIG, W.A.; JOULAIN, D.; and HOCHMUTH, D.H., Terpenoids and related constituents of essential oils, version 3, **2004**, [on-line]: www.massfinder.com. [Revisado el 20 de noviembre de 2007].
60. KOVÁTS, E., Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. *Advan. Chromatogr.*, **1965**, 1, pp. 229-247.
61. KUMAR, A.; NADDA, G.; and SHANKER, A., Determination of chlorpyrifos 20% EC (Dursban 20 EC) in scented rose and its products. *J. Chromatogr., A*, **2004**, 1050, pp. 193–199.
62. LEFFINGWELL, J., Chirality and odour perception. Leffingwell & Associates [on-line]: www.leffingwell.com/chirality/linalool.htm. [Revisado el 28 de mayo de 2006].
63. LG, Microwave oven owner's manual. Model: MS-1242ZK. [on-line]: http://kitchen.manualsonline.com/manuals/mfg/lg/lg_microwave_oven_1.html [Revisado el 6 de diciembre de 2006].
64. LI, N.; DENG, C.; LI, Z.; YE, H.; and ZHANG, X., Gas chromatography–mass spectrometry following microwave distillation and headspace solid-phase microextraction for fast analysis of essential oil in dry traditional Chinese medicine. *J. Chromatogr., A*, **2006**, 1133, pp. 29–34.
65. LI, Z-G.; LEE, M-R.; and SHEN, D-L., Analysis of volatile compounds emitted from fresh *Syringa oblata* flowers in different florescence by

headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, **2006**, 576(1), pp. 43-49.

66. LOCKWOOD, G.B., Techniques for gas chromatography of volatile terpenoids from a range of matrices. *J. Chromatogr., A*, **2001**, 936, pp. 23-31.
67. MCGARVEY, D.J.; and CROTEAU, R., Terpenoid metabolism. *Plant Cell*, **1995**, 7, pp. 1015-1026.
68. MARRIOTT, P.J.; SHELLIE, R.; and CORNWELL, C., Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *J. Chromatogr., A*, **2001**, 936, pp. 1-22.
69. MARSILI, R., Flavor, fragrance, and odor analysis. Ed. Marcel Dekker Inc., New York, **2002**, 425 p.
70. MARTÍN, D.M.; GERSHENZON, J.; and BOHLMANN, J., Induction of volatile terpene biosynthesis and diurnal emission by methyl jasmonate in foliage Norway Spruce. *Plant Physiol.*, **2003**, 132, pp. 1586-1599.
71. MATICH, A.J.; BUNN, B.J.; HUNT, M.B.; and ROWAN, D.D., Lilac alcohol epoxide: A linalool derivate in *Actinidia arguta* flowers. *Phytochem.*, **2006**, 67, pp. 759-763.
72. MATILE, P.; and ALTENBURGER, R., Rhythms of fragrance emission in flowers. *Planta*, **1988**, 174, pp. 242-247.
73. MATRAVERS, P.; KAPSNER, T.; SHAATH, N.; y HASHEM, A., Solvent based plant extracts, WO 2006/002249-A1, (05.01.2006).

74. MATSUDA, H.; MORIKAWA, T.; SAKAMOTO, Y.; TOGUCHIDA, I.; and YOSHIKAWA, M., Labdane type diterpenes with inhibitory effects on increase in vascular permeability and nitric oxide production from *Hedychium coronarium*. *Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, 10, pp. 2527–2534.
75. MEDINA, M., Zingiberaceae. Instituto de Ecología. *Bioclimatología de flora de Veracruz*, **1999**, 21 pp. 235-265.
76. MEILING, J.C.; FANG, L.; ZHOU, S.; FU, R.; and ZHANG, P., Solid - phase microextraction - gas chromatographic-mass spectrometric analysis of volatile compounds from *Curcuma wenyujin*. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2005**, 40(3), pp. 552-558.
77. MERFORT, I., Review of the analytical techniques for sesquiterpenes and sesquiterpene lactones. *J. Chromatogr., A*, 2002, 967, pp.115-130.
78. MOLINA, J.L., Estudio de la variación composicional de la fragancia de las flores de *Brugmansia suaveolens* durante el día y la noche. Bucaramanga, Tesis de grado, UIS, **2005**.
79. MORA, A.L., Composición Química del aceite de *Cymbopogon citratus* en función del método de extracción, época de cosecha y tiempo de secado de la planta. Bucaramanga, Tesis de grado de maestría, UIS, **1997**.
80. MÜLLER - RIEBAU, F.J.; BERGER, B.M.; YEGEN, O.; and CAKIR, C., Seasonal variations in the chemical compositions of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, 45, pp. 4821-4825.

81. OMATA, A; NAKAMURA, S.; YOMOGIDA, K.; MORIAI, K.; ICHIKAWA, Y.; and WATANABE, I., Volatile components of TO-YO-RAN flowers (*Cymbidium faberi* and *Cymbidium virescens*). *Agric. Biol. Chem.*, **1990**, 54, pp.1029-1033.
82. OMATA, A.; YOMOGIDA, K.; TESHIMA, Y.; NAKAMURA, S.; HASHIMOTO, S.; ARAI, T.; and FURUKAWA, K., Volatile components of ginger flowers (*Hedychium coronarium* Koenig). *Flav. Fragr. J.*, **1991**, 6, pp. 217-220.
83. OUYANG, G.; CHEN, Y.; SETKOVA, L.; and PAWLISZYN, J., Calibration of solid - phase microextraction for quantitative analysis by gas chromatography. *J. Chromatogr., A*, **2005**, 1097, pp. 9-16.
84. PAN (Pesticide Action Network North America) – Chemicals, U.S.A. [online]: www.pesticideinfo.org. [Revisado el 6 de junio 2006].
85. POTT, M.; HIPPAUF, F.; SASCHENBRECKER, S.; CHEN, F.; ROSS, J.; KIEFER, I.; SLUSARENKO, A.; NOEL, J.P.; PICHERSKY, E.; EFFMERT, U.; and PIECHULLA, B., Biochemical and structural characterization of benzenoid carboxyl methyltransferases involved in floral scent production in *Stephanotis floribunda* and *Nicotiana suaveolens*. *Plant Physiol.*, **2004**, 135, pp. 1946-1955.
86. POVH, N.; MARQUES, M.; and MEIRELES, A., Supercritical CO₂ extraction of essential oil and oleoresin from chamomile (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert). *J. Supercrit. Fluids*, **2001**, 21, pp. 245-256.
87. RAGUSO, R., Why are some floral nectars scented?, *Ecology*, **2004**, 85(6), pp. 1486–1494.

88. RAGUSO, R.A.; LEVIN, R.A.; FOOSE, S.E.; Holmberg, M.W.; and McDade, L.A., Fragrance chemistry, nocturnal rhythms and pollination “syndromes” in *Nicotiana*. *Phytochemistry*, **2003**, 63, pp. 265-284.
89. RAGUSO, R.; and PELLMYR, O., Dynamic headspace analysis of floral volatiles: a comparison of methods. *Oikos*, **1998**, 81, pp. 238-254.
90. RAGUSO, R.; and PICHERSKY, E., Floral volatiles from *Clarkia breweri* and *C. concinna* (Onagraceae): recent evolution of floral scent and moth pollination. *Plant Syst. Evol.*, **1995**, 194, pp. 55-67.
91. RESENDE, M.G.; ANSALONI, I.A.; BRANDÃO, M.; PAIVA, R.L.; FERREIRA, M.D.; FERREIRA, C.A.; e BRAGA, A., Perfil fitoquímico e atividade antibacteriana in vitro de plantas invasoras. *Revista Lecta, Bragança Paulista*, **2002**, 20(2), pp. 177-182.
92. REVERCHON, E.; and DE MARCO, I., Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *J. Supercrit. Fluids*, **2006**, 38(22), pp. 146-166.
93. ROHLOFF, J., Monoterpene composition of essential oil from *Peppermint* (*Mentha x piperita* L.) with regard to leaf position using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry analysis. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, pp. 3782-3786.
94. ROHLOFF, J., Essential oil composition of Sachalinmint from Norway detected by solid-phase microextraction and gas chromatography- mass spectrometry analysis. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, pp. 1543-1547.
95. ROUT, P. K.; MISRA, R.; SAHOO, S.; SREE, A.; and RAO, Y. R., Extraction of kewda (*Pandanus fascicularis* Lam.) flowers with hexane:

- composition of concrete, absolute and wax. *Flavour Fragr. J.*, **2005**, 20, pp. 442–444.
96. SANDRA, P.; and BICCHI, C., Capillary gas chromatography in essential oil analysis. Ed. Huethig Verlag, New York, 1987, 435 p.
97. SANTOS, S.B.; PEDRALLI, G.; e MEYER, S.T., Aspectos da fenologia e ecologia de *Hedychium coronarium* (Zingiberaceae) na estação ecológica do Tripuí, Ouro Preto-MG. *Planta Daninha*, **2005**, 23(2), pp. 175 -180.
98. SCHADE, F.; LEGGE, R.L.; and THOMPSON J.E., Fragrance volatiles of developing and senescing carnation flowers. *Phytochemistry*, **2001**, 56, pp.703-710.
99. SCHUURINK, R.C.; HARING, M.A.; and CLARK, D.G., Regulation of volatile benzenoid biosynthesis in petunia flowers. *Trends Plant Sci.*, **2006**, 11(1), pp. 20-25.
100. SETTLE, F.A., Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry. Ed. Prentice Hall, Inc., New Jersey, **1997**, 994 p.
101. SHANG, C.; HU, Y.; DENG, C.; and HU, K., Rapid determination of volatile constituents of *Michelia alba* flowers by gas chromatography-mass spectrometry with solid-phase microextraction. *J. Chromatogr., A*, **2002**, 942, pp. 283-288.
102. SHIN, S-G.; KIM, J.Y.; CHUNG, H.Y.; JEONG, J-C., Zingerone as an antioxidant against peroxyxynitrite. *J. Agric. Food Chem.*; **2005**; 53(19); pp. 7617-7622.

103. SIANI, A. TAPPIN, M.; RAMOS, M.; MAZZEI, J.; RAMOS, M.C.; DE AQUINO, F.; and FRIGHETTO, N., Linalool from *Lippia alba*: study of the reproducibility of the essential oil profile and the enantiomeric purity. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50(12), pp. 3518-3521.
104. SKINNER, R.F., Simple method for accurately determining retention times, *Anal. Chem.*, **1971**, 43(10), pp. 1352-1352.
105. SOARES, L.; e ALVES, V., Estudo fitoquímico e farmacológico dos constituintes fixos e voláteis de *Hedychium coronarium* J. Köeng. (Zingiberaceae). Universidade Federal de Rondônia, Departamento de Química; Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais. 2004. [on-line]: www.unir.br/.../leandro%20Soares%20Moreira.htm [Revisado: 15 de mayo de 2006].
106. STASHENKO, E.E.; ACOSTA, R.; and MARTÍNEZ, J.R., High-resolution gas-chromatographic analysis of the secondary metabolites obtained by subcritical-fluid extraction from Colombian rue (*Ruta graveolens* L.). *J. Biochem. Biophys. Methods.* **2000**, 43, pp. 379-390.
107. STASHENKO, E.E.; CERVANTES, M.; COMBARIZA, Y.; FUENTES, H.; and MARTÍNEZ, J.R., HRGC-FID and HRGC-MSD Analysis of the secondary metabolites obtained by different extraction methods from *Lepechinia schiedeana*, and *in vitro* evaluation of its antioxidant activity. *J. High Resol. Chromatogr.*, **1999**, 22(6), pp. 343–349.
108. STASHENKO, E.E.; JARAMILLO, B.E.; and MARTÍNEZ, J.R., Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, **2003**, 27(105), pp. 579-597.

109. STASHENKO, E.E.; JARAMILLO, B.E.; and MARTÍNEZ, J.R., Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its *in vitro* antioxidant activity. *J. Chromatogr., A*, **2004**, 1025, pp. 93–103.
110. STASHENKO, E.E.; and MARTÍNEZ, J.R., Sampling volatile compounds from natural products with headspace/solid-phase micro-extraction. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **2007**, 70, pp. 235–242.
111. STASHENKO, E.E.; PUERTAS, M.; and COMBARIZA, M.Y., Volatile secondary metabolites from *Spilanthes americana* obtained by simultaneous steam distillation-solvent extraction and supercritical fluid extraction. *J. Chromatogr., A*, **1996**, 752, pp. 223-232.
112. STASHENKO, E.E.; QUIROZ, N.; and MARTÍNEZ, J.R., HRGC-FID/NPD and HRGC-MSD study of Colombian ylang-ylang (*Cananga odorata*) oils obtained by different extraction techniques, *J. High Resol. Chromatogr.* **1996**, 19, pp. 353-358.
113. TAVEIRA, F.N.; OLIVEIRA, A.B.; SOUZA FILHO, J.D.; and BRAGA F.C., Epimers of labdane diterpenes from the rhizomes of *Hedychium coronarium* J. Köeng. *Braz. J. Pharmacognosy*, **2005**, 15(1), pp. 55-59.
114. THEIS, N.; and LERDAU, M., The evolution of function in plant secondary metabolites, *Int. J. Plant Sci.*, **2003**, 164(3), pp. 93 - 102.
115. THOLL, D.; BOLAND, W.; HANSEL, A.; LORETO, F.; RÖSE, U.S.; and SCHNITZLER, J.P., Techniques for molecular analysis. Practical approaches to plant volatile analysis. *Plant J.*, **2006**, 45, pp. 540–560.

116. UHEYAMA, Y.; HASHIMOTO, S.; NII, H.; and FURUKAWA, K., The volatile constituents of shi mei (*Rosa davurica* Pall.) flower concrete from China. *Flavour Fragr. J.*, **1990**, 5, pp. 115-120.
117. UMANO, K.; and SHIBAMOTO, T., Analysis of headspace volatiles from overheated beef fat. *J. Agric. Food Chem.*, **1987**, 35(1), pp. 14-18.
118. VAN ROON, A.; PARSONS, J.R.; and GOVERS, H.A.J., Gas chromatographic determination of vapour pressure and related thermodynamic properties of monoterpenes and biogenically related compounds. *J. Chromatogr., A*, **2002**, 955, pp. 105–115.
119. VAN SCHIE, C.; HARING, M.A.; and SCHUURINK, R.C., Regulation of terpenoid and benzenoid production in flowers. *Current Opinion in Plant Biol.*, **2006**, 9, pp. 203-206.
120. VELASCO-NEGUERUELA, A.; SANZ, J.; PÉREZ-ALONSO. M.J; and PALÁ-PAÚL J., The volatile components of the aerial parts of *Melittis melissophyllum* L. subsp. *melissophyllum* gathered in Spain. *Botanica Complutensis*, **2004**, 28, pp. 133-136.
121. VERGHESE, J.; and SUNNY, T. P., Seasonal studies on the concrete and absolute of Indian *Jasminium grandiflorum* L. flowers. *Flavour Fragr. J.*, **1992**, 7, pp. 323-327.
122. VERDONK, J.; RIC DE VOS, C.H.; VERHOEVEN, H.A.; HARING, M.A.; VAN TUNEN, A.J.; and SCHUURINK, R.C., Regulation of floral scent production in petunia revealed by targeted metabolomics. *Phytochemistry*, **2003**, 62, pp. 997-1008.

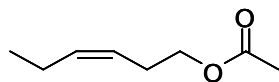
123. WANG, J.; DUDAREVA, N.; BHAKTA, S.; RAGUSO, R.A.; and PICHERSKY, E., Floral scent production in *Clarkia breweri* (Onagraceae). II. Localization and developmental modulation of the enzyme S'-adenosyl-L-methionine(iso)eugenol O-methyltransferase and phenylpropanoid emission. *Plant Physiol.*, **1994**, 106, pp. 1533-1540.
124. WATANABE, N.; WATANABE, S.; NAKAJIMA, R.; MOON, J-H.; SHIMOKIHARA, K.; INAGAKI, J.; ETOH, H.; ASAI, T.; SAKATA, K.; and INA, K., Formation of flower fragrance compounds from their precursors by enzymatic action during flower opening. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, **1993**, 57(7), pp. 1101-1116.
125. WILDE, P.F.; and THIRSK, N.Y., Fragrance extraction, EP1055439-A2, (29.11.2000), Bulletin 2000/48.
126. XIAO, P.; SUN, C.; ZAHID, M.; ISHRUD, O.; and PAN, Y., New diterpene from *Hedychium villosum*. *Fitoterapia*, **2001**, 72, pp. 837-838.
127. XIONG, G.; GOODRIDGE, C.; WANG, L.; CHEN, Y.; and PAWLISZYN, J., Microwave-assisted headspace solid-phase microextraction for the analysis of bioemissions from *Eucalyptus citriodora* leaves. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, pp. 7841-7847.
128. ZHANG, Z-M.; and LI, G-K., A preliminary study of plant aroma profile characteristics by a combination sampling method coupled with GC-MS. *Microchem. J.*, **2007**, 86, pp. 29 – 36.

ANEXOS

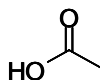
ANEXO 1. Clases de compuestos encontrados en las fragancias florales.

Figura 1-1. Algunos compuestos presentes en el aroma floral.

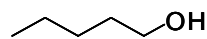
ALIFÁTICOS



Acetato de
cis-hex-3-enilo

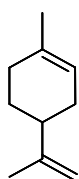


Ácido acético

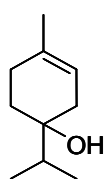


Pentanol

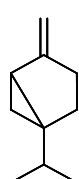
MONOTERPENOS CÍCLICOS



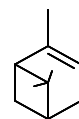
Limoneno



Terpinen-4-ol

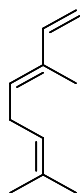


Sabineno

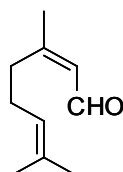


α -Pineno

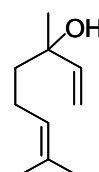
MONOTERPENOS ACÍCLICOS



E- β -Ocimeno

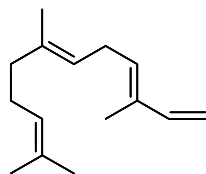


Neral

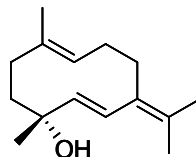


Linalool

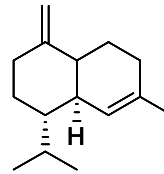
SESQUITERPENOS



E-E- α -Farneseno

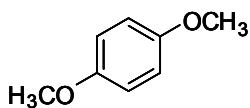


Germacreno D-4-ol

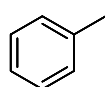


γ -Cadineno

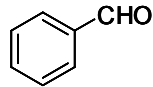
BENCENOIDES Y FENILPROPANOIDES



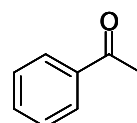
1,4-dimetoxibenceno



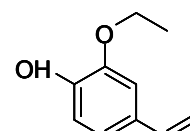
Metilbenceno



Benzaldehído
137



Acetofenona



Isoeugenol

Tabla 1-1. Extractos (concretos) de flores de interés comercial.

Nombre vulgar	Jasmin
Nombre científico	<i>Jasminum grandiflorum</i>
Rendimiento de concreto, %	0.28 - 0.34 % (EP), 0.03-0.04% (Ben) y 0.55-1.22% (Hex)*
Parte de la planta	Flores
Origen	Himalaya, España, Egipto, India, Marruecos, Algeria, Rusia e Italia (Calabria y Sicilia)
Componentes	Acetato de bencilo, linalol, acetato de linalilo, alcohol bencílico, jasmona, indol, benzoato de bencilo, α -terpineol, α -farneseno, cis-3-hexenol, eugenol, nerol, jasmonato de metilo y farnesol.
Usos	Usado en fragancias de lujo ("Aphrodisia", "Miss Dior" y "Mitsouko"), fabricación de labiales, cremas, polvos, preparaciones para el cabello y productos de baño.
Nombre vulgar	Zarzaparrilla
Nombre científico	<i>Ribes nigrum</i>
Rendimiento de concreto, %	2-4%
Parte de la planta	Flores
Origen	Inglaterra, Francia
Componentes	α -Pineno, β -pineno, sabineno, δ -3-careno, α -terpineno, mircenol, limoneno, β -felandreno, p-cimeno y γ -terpineno.
Usos	Usado en fragancias de lujo "Amazona", "First", "Missoni", "Molinard", "Mystere", "Sheherezade", "Silences", "Tenere" y "Magie Noire".
Nombre vulgar	Clavel
Nombre científico	<i>Dianthus caryophyllus</i>
Rendimiento de concreto, %	0.23-0.29 % (EP)
Parte de la planta	Flor
Origen	Mediterraneo, Egipto y Kenia
Componentes	Eugenol, linalool, cis-hex-3-enol, α -terpineol, benzoato de bencilo, jasmona, citronelol, linaloato de metilo, alcohol bencílico, tricosano, pentacosano y terpinoleno.
Usos	Nota muy picante apreciada en la perfumería, "Oillet du Roy", "Origan", "Bellodgia", "Cashmere Bouquet", "Blue Grass", "Oscar de la Renta" y "Missoni".
Nombre vulgar	Gardenia
Nombre científico	<i>Gardenia grandiflora</i>
Rendimiento de concreto, %	0.025-0.033 %
Parte de la planta	Flor
Origen	China, Japón, Africa ecuatorial.
Componentes	Acetato de bencilo, linalol, acetato de linalilo, ácido acético, β -ocimeno, α -farneseno, oxido de linalool, cis-hex-3-ilo y ácido benzoico.
Usos	Se usa como modificador. Perfumes como "Aphrodisia", "Shocking", "Vent vert" y "Detchema".

Nombre vulgar	Naranja
Nombre científico	<i>Bitter orange (Citrus aurantium) y Sweet orange (Citrus sinensis)</i>
Rendimiento de concreto, %	0.18-0.25%
Parte de la planta	Flores, hojas y peciolo
Origen	Asia, Iran, India, Siria, Palestina y Egipto.
Componentes	Acetato de metilo, linalilo, geranilo y berilo, α -terpineol, indol, farnesol, jasmona, <i>trans</i> -ocimeno, eugenol.
Usos	Es muy importante en perfumeria, "Chypre", "Origan", "Emeraude", "Je Reviens", "My Sin", "Tabu", "Shocking", "Miss Dior" y "Tweed. Caléche", "Halston Nigth" y "Oscar de la Renta".
Nombre vulgar	Gallomba, Retama de olor
Nombre científico	<i>Spartium junceum</i>
Rendimiento de concreto, %	0.09-1-18%
Parte de la planta	Flores
Origen	Francia e Italia y países del mediterráneo.
Componentes	Linalol, acetato de linalilo, β -farneseno, α -terpineno, geraniol, limoneno, α -farneseno, cariofileno, p-cimeno y mirceno.
Usos	Labiales, aceites para cabello, perfumes y polvos.
Nombre vulgar	Harlequin
Nombre científico	<i>Boronia megastigma</i> Nees
Rendimiento de concreto, %	0,70%
Parte de la planta	Flores
Origen	Sur de Australia
Componentes	Camfeno, mirceno, limoneno, ocimeno, linalol, α -pineno, β -pineno, mentona y heptadecano.
Usos	Perfume "Miss Dior"
Nombre vulgar	Champaca
Nombre científico	<i>Michelia champaca</i>
Rendimiento de concreto, %	0.16-0.2%
Parte de la planta	Flores
Origen	Himalaya, Filipinas, Islas reuñón y Madagascar.
Componentes	Oxido de <i>cis</i> -linalol, linalol, acetato de bencilo, alcohol bencilico, fenilacetoneitrilo, <i>trans</i> - β -farneseno, eugenol, benzoato de bencilo, benzoato de feniletilo, linaloato de metilo, isoeugenol y jasmona.
Usos	Empleada en el sur de Asia.

*Hex: Hexano

EP: Eter de petróleo

Ben: Benceno

Tabla 1-2. Solventes empleados para obtener concretos y absolutos.

Proceso – Solvente	Especie (flores)	Rendimiento	Referencia
Éter de petróleo a 40°C. Maceración y soxhlet	<i>Coffea arabica</i>	0,5 % de absoluto No se obtienen buenos resultados	Arrillaga, N. [9]
Extracción con etanol a 54°C y lo destilan a 35°C y 20 mmHg	<i>Jasminum grandijorum</i>	30 % a 55 % Partiendo del concreto	Gopalakrishnan, N. [45]
Extracción en frío con pentano	<i>Michelia champaca</i>	Concreto 1,5 % Absoluto 1.3 %	Rout, P. [95]
Extracción por 2 horas con 1,1,2-tricloro-1,2,2-trifluoretano	<i>Illicium verum</i>	9.5% de aceite esencial	Bernard, T. [13]
Extracción con hexano puro Evaporado 30-35°C con vacío	<i>Jasminum grandiflorum</i>	0.20 y 0.28% de concreto	Anae, O. [7]
Etanol (96% y 80%) y rota-evaporaron a 40°C y 20 mmHg	<i>Rosa damascena</i>	Absoluto, 58–64%	Ayci, F. [12]
Extracción con <i>n</i> -hexano (15 min)	<i>Jasminium grandiflorum</i>	Concreto 0.33% y absoluto 62%	Verghese, J. [121]
Extracción con 1,1,1,2-tetrafluoroetano (R134A)	Diferentes especies	No reportan	Wilde, P. [125]
Extracción con acetato de etilo a pentilo.	Diferentes especies	2 veces el de <i>n</i> -hexano	Matravers, P. [73]

Tabla 1-3. Potenciales alergenicos en fragancias.



Version 3
September 12th, 2007

INTERNATIONAL FRAGRANCE ASSOCIATION
ANALYTICAL PROCEDURE

GC/MS Quantitation of potential fragrance allergens in fragrance
compounds*

1. Amyl Cinnamal

CAS: 122-40-7
CAS name: Heptanal, 2-(phenylmethylene)-
Both the (E) and (Z) isomers. .

2. Benzyl Alcohol

CAS: 100-51-6
CAS name: Benzenemethanol
Only one substance is described by this nomenclature.

3. Cinnamyl Alcohol

CAS: 104-54-1
CAS name: 2-Propen-1-ol, 3-phenyl-
Both (E)- and (Z)- isomers are included in our analysis.

4. Citral

CAS: 5392-40-5
CAS name: 2,6-Octadienal, 3,7-dimethyl-
Both (Z)- (Neral: CAS 106-26-3) and (E)- (Geranial: CAS 141-27-5) isomers are included.

5. Hydroxycitronellal

CAS: 107-75-5
CAS name: Octanal, 7-hydroxy-3,7-dimethyl-
Both (R)- and (S)- enantiomers are included.

6. Eugenol

CAS: 97-53-0
CAS name: Phenol, 2-methoxy-4-(2-propenyl)-
Only one substance described by this nomenclature.

7. Isoeugenol

CAS: 97-54-1
CAS name: Phenol, 2-methoxy-4-(1-propenyl)-
Both (E)- and (Z)- isomers are included.

8. Amylcinnamyl Alcohol

CAS: 101-85-9
CAS name: 1-Heptanol, 2-(phenylmethylene)-
Both the (E) and (Z) isomers.

9. Benzyl Salicylate

CAS: 118-58-1

CAS name: Benzoic acid, 2-hydroxy-, phenylmethyl ester

Only one substance described by this nomenclature.

10. Cinnamal

CAS: 104-55-2

CAS name: 2-Propenal, 3-phenyl-

Both (E)- (trans- CAS 14371-10-9) and (Z)- (cis- CAS 57194-69-1) isomers are included.

11. Coumarin

CAS: 91-64-5

CAS name: 2H-1-Benzopyran-2-one

Only one substance described by this nomenclature.

12. Geraniol

CAS: 106-24-1

CAS name: 2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, (E)-

Only one substance described by this nomenclature. The (Z)- isomer (Nerol: CAS 106-25-2) is not included.

13. Hydroxyisohexyl- 3-cyclohexene carboxaldehyde

Trade name : Lyral®

CAS: 31906-04-4

CAS name: 3-Cyclohexene-1-carboxaldehyde, 4-(4-hydroxy-4-methylpentyl)-

Only this isomer is included in our analysis although some commercial qualities of this substance usually contain lesser quantities of the 3-Cyclohexene-1-carboxaldehyde, 3-(4-hydroxy-4-methylpentyl)- isomer.

14. Anise Alcohol

CAS: 105-13-5

CAS name: Benzenemethanol, 4-methoxy-

Only one substance described by this nomenclature.

15. Benzyl Cinnamate

CAS: 103-41-3

CAS name: 2-Propenoic acid, 3-phenyl-, phenylmethyl ester

Both (E)- and (Z)- cinnamate isomers are included.

16. Farnesol

CAS: 4602-84-0

CAS name: 2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-trimethyl-

Undefined mixture of four isomers (predominantly the (E,E) ("trans, trans-Farnesol": CAS 106-28-5) and (Z,E) ("trans, cis-Farnesol": CAS 3790-71-4) .

17. Butylphenyl Methylpropional

Trade name: Lilial®

CAS: 80-54-6

CAS name: Benzenepropanal, 4-(1,1-dimethylethyl)-.alpha.-methyl-

Both (R)- and (S)- enantiomers are included in our analysis. The isomeric 2-(3-tert-Butylbenzyl) propionaldehyde is not included.

18. Linalool

CAS: 78-70-6

CAS name: 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-

Both (R)- (CAS # 126-91-0) and (S)- (CAS # 126-90-9) enantiomers are included.

19. Benzyl Benzoate

CAS: 120-51-4

CAS name: Benzoic acid, phenylmethyl ester

Only one substance described by this nomenclature.

20. Citronellol

CAS: 106-22-9

CAS name: 6-Octen-1-ol, 3,7-dimethyl-

Both (R)- ((-): CAS 1117-61-9) and (S)- ((+): CAS 7540-51-4) enantiomers are included.

21. Hexyl Cinnamal

CAS: 101-86-0

CAS name: Octanal, 2-(phenylmethylene)-

Both the (E) and (Z) isomers. .

22. Limonene

CAS: 5989-27-5

CAS name: Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)-, (R)-

Both (R)- and (S)- (CAS # 5989- 54-8) enantiomers may have to be taken into account . (See special note on LIMONENE).

23. Methyl 2-Octynoate

CAS: 111-12-6

CAS name: 2-Octynoic acid, methyl ester

Only one substance described by this nomenclature.

24. Alpha-Isomethyl Ionone

CAS: 127-51-5

CAS name: 3-Buten-2-one, 3-methyl-4-(2,6,6-trimethyl-2-cyclohexen-1-yl)-

Both (E)- and (Z)- isomers of the specified structural isomer are included in the analysis. Even though other structural isomers are often present in commercial quantities of this substance, they are not included.

ANEXO 2. Análisis de componentes principales para los concretos de las flores de *Hedychium coronarium*.

Figura 2-1. Valores propios de la matriz de correlación.

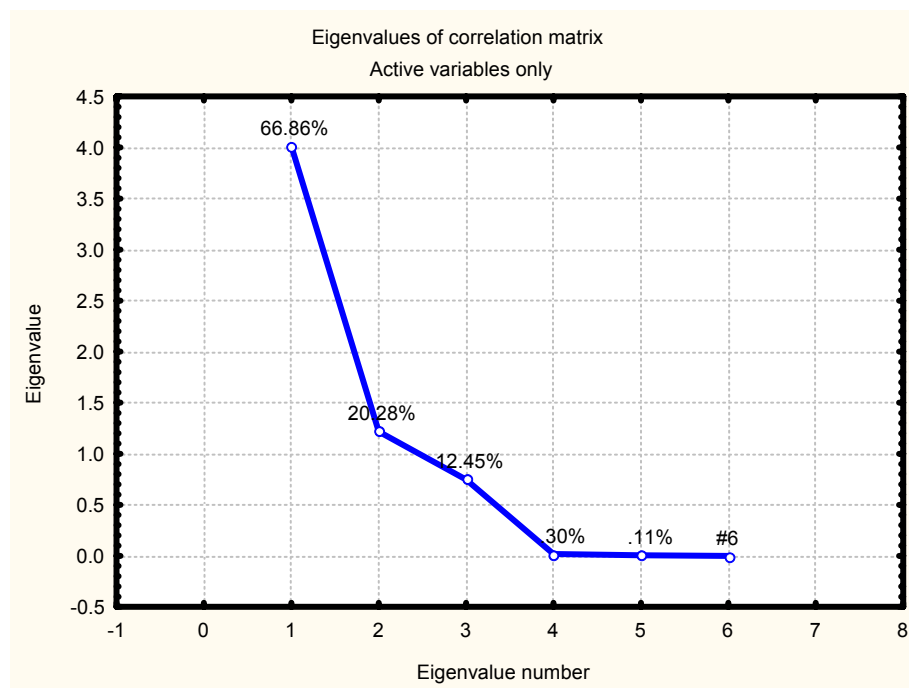
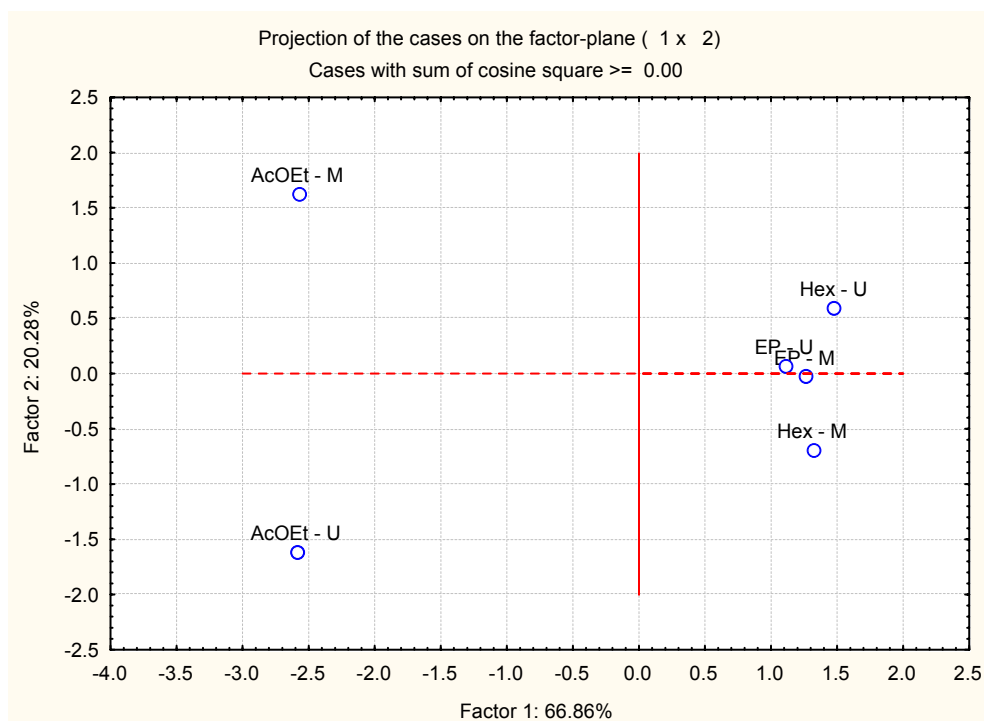


Figura 2-2. Análisis de componentes principales según sistema de extracción y clases de compuestos.



Hex-M: Hexano- maceración, Hex-U: Hexano- ultrasonido, EP-M: Éter de petróleo- maceración, EP-U: Éter de petróleo-ultrasonido, AcOEt-M: Acetato de etilo-maceración y AcOEt-U: Acetato de etilo ultrasonido.

ANEXO 3. Tablas resumen de composición en flores y rizomas de *H. coronarium*.

Tabla 3-1. Comparación de los métodos de extracción para las flores de *H. coronarium*.

Compuesto	Cantidad relativa ^c , %			
	SDE	SFE	Concreto con AE	Concreto con EP
Propanoato de etilo	-	-	1,89 ± 0,09	-
α-Pineno	7,8 ± 0,3	-	0,42 ± 0,02	0,11 ± 0,06
2,3-Dimetil-2-butanol	-	-	-	1,7 ± 0,2
2-Metil-2-pentanol	-	-	-	4,7 ± 0,2
Sabineno	3,0 ± 0,3	-	-	-
β-Pineno	19 ± 1	-	1,95 ± 0,02	<i>tr</i>
1,8-Cineol	5,56 ± 0,03	0,12 ± 0,05	0,99 ± 0,04	0,9 ± 0,1
(E)-β-Ocimeno	3,2 ± 0,3	-	0,41 ± 0,04	1,4 ± 0,3
Linalol	2,6 ± 0,3	-	2,3 ± 0,3	7,61 ± 0,01
(E)-Hidrato de sabineno	1,7 ± 0,2	-	0,15 ± 0,02	-
(E)-β-Ocimeno	3,2 ± 0,3	-	-	1,4 ± 0,3
(E)-Jasmona	0,050 ± 0,005	37,1 ± 0,5	-	-
(E)-β-Cariofileno	8,6 ± 0,5	7,2 ± 0,3	9,05 ± 0,05	0,8 ± 0,2
Ácido acético	-	-	6,0 ± 0,8	-
(E)-Isoeugenol	2,1 ± 0,3	-	3,91 ± 0,02	11 ± 1
(E)-β-Farneseno	1,6 ± 0,2	0,96 ± 0,07	2,8 ± 0,1	0,30 ± 0,06
α-Humuleno	2,9 ± 0,5	5 ± 2	-	-
(E-E)-α-Farneseno	0,30 ± 0,02	-	0,17 ± 0,03	-
N.I.	-	-	-	3,7 ± 0,3
N.I.	-	-	-	3,1 ± 0,3
Linalol	2,6 ± 0,3	1,33 ± 0,01	2,3 ± 0,3	7,61 ± 0,01
Oxido de cariofileno	5,8 ± 0,4	-	8,3 ± 0,2	0,48 ± 0,2
sesquiterpeno oxigenado	2,4 ± 0,2	-	-	-
Benzoato de metilo	<i>tr</i>	-	0,59 ± 0,02	1,9 ± 0,2
Fenilacetaldehído	-	-	1,34 ± 0,01	-
Alcohol bencílico	-	-	1,19 ± 0,03	0,4 ± 0,1
Labda-8(17),13 (E)-dien-15 al	2,5 ± 0,2	32 ± 1	-	-
N.I.	-	1,3 ± 0,2	-	-
Eicosano	0,082 ± 0,002	1,2 ± 0,3	-	0,22 ± 0,04
Germacreno D-4-ol	0,26 ± 0,02	-	0,55 ± 0,03	1,3 ± 0,1
N.I.	-	2,1 ± 0,6	-	-
Eugenol	-	-	0,44 ± 0,05	1,44 ± 0,03
N.I.	-	1,1 ± 0,2	-	-
4-Etenil-2-metoxi-fenol	-	-	3,4 ± 0,1	0,06 ± 0,01
N.I.	-	-	2,40 ± 0,02	-
Ionona	-	-	1,75 ± 0,05	-
4-Metiltiazol	-	-	4,5 ± 0,2	4,2 ± 0,5
N.I.	-	4,2 ± 0,8	-	-
Tricosano	-	-	1,12 ± 0,06	2,4 ± 0,2
(E,E)-Farnesol	-	-	4,62 ± 0,06	-
Escualeno	-	-	4,12 ± 0,03	4,39 ± 0,09
<i>epi</i> -Jasmonato de metilo	-	1,33 ± 0,01	1,3 ± 0,1	3,1 ± 0,3
Indol	-	-	-	2,64 ± 0,07
N.I.	-	-	2,29 ± 0,02	-

Tabla 3-1, continuación.

Pentacosano	-	-	0,76 ± 0,02	2,95 ± 0,04
Pentadecanol	-	-	2,2 ± 0,1	-
Benzoato de bencilo	<i>tr</i>	-	2,59 ± 0,04	4,33 ± 0,03
Octacosano	-	-	2,24 ± 0,01	3,69 ± 0,02
Isobutanoato de 2- feniletilo	-	-	-	1,59 ± 0,02
N.I.	-	-	1,43 ± 0,09	-
Hidrocarburo	-	-	-	3,3 ± 0,4
N.I.	-	-	-	2,69 ± 0,0014
N.I.	-	-	2,03 ± 0,08	-
N.I.	-	-	-	5,9 ± 0,5
N.I.	-	-	2,7 ± 0,1	-
Dotriacontano	-	-	4,65 ± 0,09	-
Hidrocarburo	-	-	-	3,2 ± 0,2
N.I.	-	-	1,83 ± 0,08	-

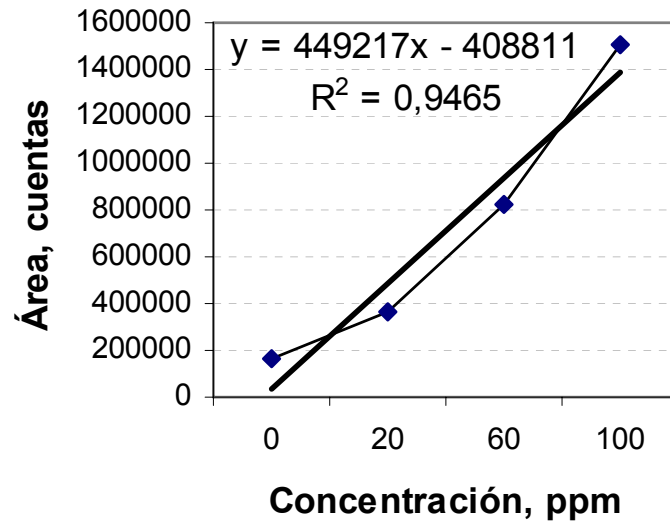
Tabla 3-2. Comparación de los métodos de extracción para los rizomas de *H. coronarium*.

Compuesto	t _R , min	Cantidad relativa, %		
		SDE	SFE	MWHD
α-Tujeno	16,989	1,07 ± 0,04	-	1,1 ± 0,1
α-Pineno	17,400	8,6 ± 2	1,86 ± 0,03	9,4 ± 0,4
Camfeno	18,147	1,00 ± 0,02	-	1,08 ± 0,06
Sabineno	19,140	3,16 ± 0,09	-	3,31 ± 0,04
β-Pineno	19,500	16,9 ± 0,6	-	18,6 ± 0,4
b-Mirceno	19,743	1,9 ± 0,1	-	2,03 ± 0,1
Pseudolimoneno	20,491	1,9 ± 0,1	-	-
α-Felandreno	20,639	-	-	2,2 ± 0,2
o-Cimeno	21,483	1,8 ± 0,2	-	-
Limoneno	21,620	28 ± 3	-	1,82 ± 0,09
1,8-Cineol	21,770	-	6,3 ± 0,1	-
β-Felendreno		-	-	-
(E)-β-Ocimeno	22,210	1,8 ± 0,1	-	-
γ-Terpineno	22,800	1,39 ± 0,07	-	1,9 ± 0,3
(Z)-Hidrato de sabineno	23,390	-	-	1,4 ± 0,1
Terpinoleno	23,945	1,68 ± 0,01	-	-
Linalol	24,480	-	-	1,84 ± 0,09
(E)-Hidrato de sabineno	24,670	-	-	1,13 ± 0,05
(E)-p-Ment-2-en-1-ol	26,304	2,63 ± 0,02	-	-
Alcanfor	26,610	0,7 ± 0,3	-	-
δ-Terpineol	27,430	0,2 ± 0,08	-	-
Borneol	27,600	-	-	1,1 ± 0,2
Terpinen-4-ol	27,850	2,75 ± 0,01	-	2,9 ± 0,3
α-Terpineol	28,419	7,3 ± 0,2	1,47 ± 0,08	8,2 ± 0,2
(E)-β-Cariofileno	37,041	-	3,5 ± 0,2	-
α-Humuleno	38,900	-	10,4 ± 0,9	-
Óxido de cariofileno	42,236	-	1,15 ± 0,03	-
Coronarín E	54,550	-	-	5,3 ± 0,6
N.I.	54,550	-	22 ± 3	-
Labda-8(17),13E-dien-15 al	59,967	-	25,3 ± 0,2	-
N.I.	60,350	-	4,4625 ± 0,4	-
N.I.	63,930	-	1,7 ± 0,1	-
N.I.	64,290	-	1,61 ± 0,09	-
N.I.	65,810	-	1,1 ± 0,2	-
N.I.	66,680	-	1,60 ± 0,08	-

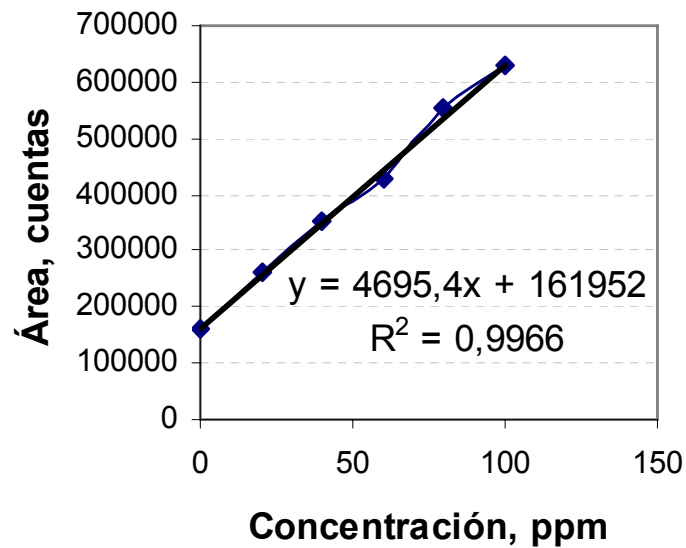
ANEXO 4. Curvas de calibración interna.

Figura 4-1. Curva de calibración interna de 1,8-cineol, γ -terpineno, E,E-farnesol y linalol.

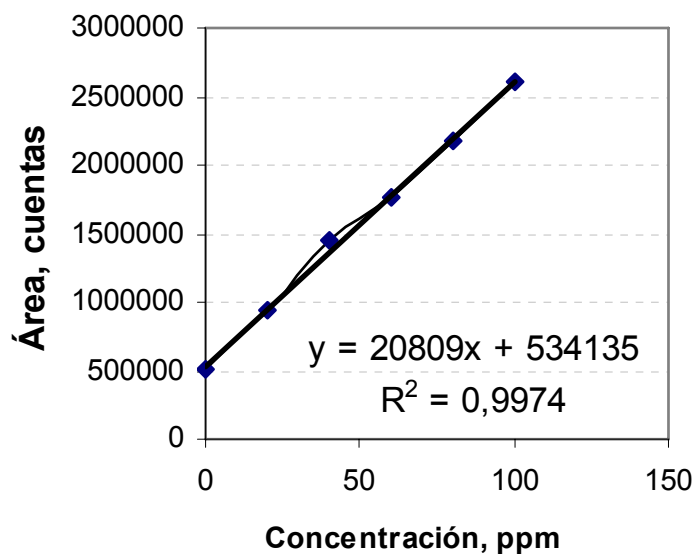
Curva de calibración de 1,8-cineol.



Curva de calibración γ -terpineno.



Curva de calibración linalol



Curva de calibración 1,8-cineol sólo.

