

**OBTENCIÓN POR DIFERENTES TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE
LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES DE LA *Swinglea*
glutinosa (Fam. Rutácea) Y SU ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA
DE GASES.**

JOSÉ DOMINGO MEDINA SARMIENTO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2004**

**OBTENCIÓN POR DIFERENTES TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE
LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES DE LA *Swinglea*
glutinosa (Fam. Rutáceae) Y SU ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA
DE GASES.**

JOSÉ DOMINGO MEDINA SARMIENTO

Trabajo de grado presentado como
requisito parcial para optar al título
de Químico

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

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2004**

DEDICATORIA

Quiero dedicarles este triunfo a las tres mujeres que más quiero en el mundo:

A mi hija María Alejandra, que es el motor y la inspiración de mi vida;

A mi compañera Luz Dary, que tanto amo, porque en aquellas circunstancias de dolor, alegría y tristeza siempre estuvo conmigo. Porque fue mi confidente, mi paño de lágrimas y mi refugio durante todo mi paso por la universidad;

A mi madre Leticia Sarmiento, que con tanto sacrificio me crió y me sacó adelante junto con sus demás hijos. Porque me apoyó y me dio toda su confianza de una manera incondicional.

A todos mis hermanos, Orlando, Martha, Sandra, y especialmente a Gustavo, que me apoyó, tanto económica como anímicamente, en los momentos más críticos de mi carrera universitaria.

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar mis más sinceros agradecimientos a todas aquellas personas que de una u otra forma estuvieron conmigo en este capítulo de mi vida, especialmente a la Doctora Elena Stashenko, por su paciencia, su entrega, sus consejos, sus regaños y muchas otras cosas más que me llevaron a formarme como científico.

También quiero darle mis agradecimientos al Dr. Jairo Rene Martínez, por los aportes hechos en pro de mejorar mis conocimientos.

Quiero además agradecer a mi querido pueblo colombiano, porque con una muy pequeña parte de los impuestos tan injustos que pagan (conseguidos con el sudor de sus frentes), pude llevar a cabo mis estudios universitarios.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Cromatografía, quiero decirles que estoy muy agradecido por haberme acogido el tiempo que duré realizando este trabajo, muy especialmente a Fabio Alexander Muñoz que me acompañó en las buenas y en las malas.

ACRÓNIMOS

AE	Aceite(s) esencial(es)
FID	<i>Flame Ionization Detector</i> (Detector de ionización en llama)
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases, cromatógrafo de gases, según el contexto)
GC/FID	<i>Gas Chromatography/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)
HD-MW	<i>Microwave-assisted Hydrodistillation</i> (Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia)
HP	<i>Hewlett-Packard</i> (actualmente, <i>Agilent Technologies</i>)
HP-5	5%-Fenil-poli (metilsiloxano)
HRGC	<i>High Resolution Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases de alta resolución)
HRGC/FID	<i>High Resolution Gas Chromatography/Flame Ionization Detector</i> (Cromatografía de gases de alta resolución con detector de ionización en llama)

HRGC/MS	<i>High Resolution Gas Chromatography/Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases de alta resolución acoplada a espectrometría de masas)
HS-SPME	<i>Headspace - Solid-Phase Micro-Extraction</i> (Microextracción en fase sólida en el modo <i>headspace</i>)
I_k	Índice de retención de Kováts
Istd	<i>Internal Standard</i> (Estándar interno)
m/z	Relación masa/carga
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas, espectrómetro de masas, espectro de masas, según el contexto)
MSD	<i>Mass Selective Detector</i> (Detector selectivo de masas)
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Resonancia magnética nuclear)
PDMS	<i>Poly(dimethylsiloxane)</i> [Poli(dimetilsiloxano)]
PAH's	<i>Polyaromatics Hydrocarbons</i> (Hidrocarburos poliaromáticos)
PCB's	<i>Polychlorinated Biphenyls</i> (Bifenilos policlorados)
P&T	<i>Purge and Trap</i> (Purga y trampa)
RDA	<i>Retro Diels-Alder</i> (Reacción tipo <i>retro-Diels-Alder</i>)
S-HS	<i>Static Headspace</i> (<i>Headspace</i> estático)
SFE	<i>Supercritical Fluid Extraction</i> (Extracción con fluido supercrítico)

SDE	<i>Simultaneous Distillation-Extraction</i> (Destilación con vapor / extracción con solvente simultánea)
SPME	<i>Solid-Phase Micro-Extraction</i> (Microextracción en fase sólida)
TIC	<i>Total Ion Current</i> (Corriente iónica total)
t_R	Tiempo de retención
VOC's	<i>Volatile Organic Compounds</i> (Compuestos orgánicos volátiles)

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	19
1. MARCO TEÓRICO	23
1.1. EXTRACCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES	23
1.1.1. Técnicas de obtención de aceites esenciales	25
1.1.1.1. Aceite esencial	25
1.1.1.2. Obtención del aceite	26
1.1.2. Técnicas de obtención de extractos	31
1.1.2.1. Destilación con vapor / extracción con solvente simultánea (SDE)	31
1.1.2.2. Extracción con fluido supercrítico (SFE)	33
1.1.3. Técnicas de obtención de fracciones volátiles	35
1.1.3.1. <i>Headspace</i> estático	35
1.1.3.2. Microextracción en fase sólida en el modo <i>headspace</i> (HS-SPME).	37
1.2. ANÁLISIS INSTRUMENTAL	42
1.2.1. Cromatografía de gases (GC)	42
1.2.2. Espectrometría de masas (MS)	43
1.2.3. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS)	44
1.3. <i>Swinglea glutinosa</i>	45
2. PARTE EXPERIMENTAL	47
2.1. Recolección del material vegetal	48
2.2. Identificación taxonómica de la planta	48
2.3. Obtención del AE, utilizando HD-MW	49
2.4. Obtención de extractos	50

2.4.1.	Extracción con fluido supercrítico (SFE)	50
2.4.2.	Destilación con vapor-extracción con solvente simultánea (SDE)	52
2.5.	Obtención de fracciones volátiles	53
2.5.1	HS-SPME	53
2.5.2	<i>Headspace</i> estático (S-HS)	54
2.6.	Análisis instrumental	55
2.6.1.	Técnica GC/FID	55
2.6.2.	Técnica GC/MS	57
2.6.3.	Espectros de masas	58
3.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	59
3.1.	Análisis del AE de la <i>Swinglea glutinosa</i>	59
3.1.1.	Comparación de los perfiles cromatográficos del AE de la cáscara del fruto, utilizando diferente modos de inyección.	59
3.2	Análisis de los extractos	68
3.2.1	Análisis comparativo de la composición de los extractos de la cáscara del fruto del “Limón Africano”, obtenidos por diferentes métodos de extracción.	68
3.2.2.	Análisis comparativo de la composición de los extractos de la hoja de la <i>Swinglea glutinosa</i> , obtenidos por diferentes métodos de extracción.	72
3.3.	Análisis de la fracción volátil	76
3.4.	Análisis por MS	84
4.	CONCLUSIONES	98
5.	RECOMENDACIONES	101
6.	BIBLIOGRAFÍA	102

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Análisis comparativo de diferentes técnicas de extracción y de *headspace*, empleadas en el desarrollo del presente trabajo.

Tabla 2. Rendimiento del AE, obtenido por HD-MW, de la cáscara del fruto de la *Swinglea glutinosa*.

Tabla 3. Composición química de los metabolitos secundarios volátiles, obtenidos de la cáscara de la fruta de la *Swinglea glutinosa*, por diferentes técnicas de extracción.

Tabla 4. Distribución por familias de los constituyentes presentes en los extractos de SDE, SFE y HD-MW, obtenidos de la cáscara del fruto de la *Swinglea glutinosa*.

Tabla 5. Composición química de los metabolitos secundarios volátiles de la hoja de la *Swinglea glutinosa*, aislados por diferentes técnicas de extracción.

Tabla 6. Distribución por familias de los constituyentes presentes en los extractos, obtenidos por SDE y SFE, de la hoja de la *Swinglea glutinosa*.

Tabla 7. Composición química de los metabolitos secundarios volátiles de la *Swinglea glutinosa*, aislados por métodos *headspace*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. *Swinglea glutinosa*.

Figura 2. Fruta de la *Swinglea glutinosa*.

Figura 3. Esquema general de las rutas biosintéticas de los metabolitos secundarios de las plantas.

Figura 4. Equipo de arrastre con vapor utilizado a escala industrial. Producción de aceite de lima (Guadalajara, México).

Figura 5. Esquema del equipo SDE a micro-escala.

Figura 6. Extractor Soxhlet de alta presión (J&W Scientific, Folsom, CA, USA).

Figura 7. Equipo para análisis de la fase vapor *Headspace Sampler* HP 7694E.

Figura 8. Esquema general del dispositivo utilizado para el muestreo HS-SPME.

Figura 9. Alcaloides acridínicos extraídos del tallo de la *Swinglea glutinosa*.

Figura 10. Perfiles cromatográficos, del AE de la cáscara del fruto de la *Swinglea glutinosa*, obtenidos por tres modos de inyección. Columna HP-5 (60m). MSD.

Figura 11. Formulas estructurales de los metabolitos secundarios volátiles identificados en la *Swinglea glutinosa*.

Figura 12. Perfiles cromatográficos típicos de los extractos de la cáscara del fruto de la *Swinglea glutinosa*, obtenidos por SFE, SDE y HD-MW, respectivamente. Columna HP-5 (60 m). *Split* 1:30. MSD. La identificación de los componentes aparece en la **Tabla 3**.

Figura 13. Perfiles cromatográficos típicos de los extractos de las hojas de la *Swinglea glutinosa*, obtenidos por SDE y SFE, respectivamente. Columna HP-5 (60 m). *Split* 1:30. MSD. La identificación de los componentes aparece en la **Tabla 5**.

Figura 14. Perfiles cromatográficos típicos, de los volátiles de la hoja de la *Swinglea glutinosa*, obtenidos por diferentes métodos *headspace*. Columna HP-5. *Split* 1:30. Detectores FID y MSD, respectivamente. La identificación de los componentes aparece en la **Tabla 7**.

Figura 15. Perfiles cromatográficos típicos, de los volátiles de la cáscara del fruto de la *Swinglea glutinosa*, obtenidos por diferentes métodos *headspace*. Columna HP-5. *Split* 1:30. Detectores FID y MSD, respectivamente. La identificación de los componentes aparece en la **Tabla 7**.

Figura 16. Perfiles cromatográficos típicos, de los volátiles de la fase vapor del aceite esencial de la cáscara del fruto de la *Swinglea glutinosa*, obtenidos por métodos *headspace*. Columna HP-5. *Split* 1:30. Detectores FID y MSD, respectivamente. La identificación de los componentes aparece en la **Tabla 7**.

Figura 17. Distribución de las principales familias de compuestos, en el *headspace* del aceite esencial de la cáscara del fruto de la *Swinglea glutinosa*, aisladas por HS-SPME, en función del tiempo de exposición de la fibra (PDMS, 100 μm).

Figura 18. Espectro de masas del α -pineno.

Figura 19. Espectro de masas del α -terpineol.

Figura 20. Espectro de masas del biciclosesquifelandreno.

Figura 21. Espectro de masas del nerolidol.

Figura 22. Picos cromatográficos no resueltos en el cromatograma del AE de la cáscara del fruto de la *Swinglea glutinosa*, obtenido por HD-MW, que corresponden a los compuestos **A.** Limoneno, **B.** β -Felandreno y **C.** 1,8-Cineol. Columna HP-5 (60 m). *Split* 1:30. MSD.

Figura 23. Espectros de masas tomados en los puntos A, B, C del pico cromatográfico que eluye a $t_R=18.9-19.5$ min en el cromatograma del AE de la cáscara del fruto de la *Swinglea glutinosa*, obtenido por HD-MW, que corresponden a los compuestos **A.** Limoneno, **B.** β -Felandreno y **C.** 1,8-Cineol. Columna HP-5 (60 m). *Split* 1:30. MSD.

Figura 24. Fragmentogramas de masas correspondiente a los iones m/z 68, 93, 139 y 154, en los espectros de masas del limoneno, β -felandreno y 1,8-cineol.

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Posibles rutas de fragmentación del α -pineno.

Esquema 2. Posibles rutas de fragmentación del α -terpineol.

Esquema 3. Posibles rutas de fragmentación del biciclosesquifelandreno.

Esquema 4. Posibles rutas de fragmentación del nerolidol.

TÍTULO

OBTENCIÓN POR DIFERENTES TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES DE LA *Swinglea glutinosa* (Fam. Rutáceae) Y SU ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES*

AUTOR

José Domingo Medina Sarmiento**

PALABRAS CLAVES:

Swinglea glutinosa, metabolitos secundarios.

RESUMEN

La *Swinglea glutinosa* es un arbusto nativo del Sur Oeste de Asia, introducido y cultivado en Colombia para hacer cercas vivas. Aunque esta planta no es autóctona, se ha adaptado completamente a las condiciones geobotánicas del país. Es un arbusto espinoso, de follaje brillante, compacto y de flores blancas, parecidas a los azahares. La fruta presenta un tamaño promedio de 10-12 cm de largo, y además no es comestible. En sus tallos se han encontrado alcaloides acridínicos, que presentan actividad antiplasmodial sobre *Plasmodium falciparum*.

Esta investigación se centró en la determinación de la composición química del aceite esencial (AE) y extractos del fruto y hojas de la *Swinglea glutinosa*, utilizando cromatografía de gases con detectores de ionización en llama y espectrométrico de masas. El presente trabajo forma parte de la línea de investigación relacionada con la caracterización de extractos y aceites esenciales de plantas tropicales.

Los extractos fueron obtenidos mediante diferentes técnicas, a saber: destilación con vapor / extracción con solvente simultánea, extracción con fluido supercrítico e hidrodestilación asistida por la radiación de microondas. Para el análisis de la fracción volátil se practicó microextracción en fase sólida en el modo *headspace* y *headspace* estático.

Los principales componentes presentes en el AE, extractos y fracciones volátiles de la *Swinglea glutinosa* fueron el β -pineno, el sabineno, el α -pineno, el biciclosesquifelandreno, el limoneno, el nerolidol, el germacreno B y el β -cariofileno. Las cantidades relativas de estos compuestos varían de acuerdo con la técnica de extracción utilizada.

La determinación de la composición química de los metabolitos secundarios volátiles presentes en este arbusto, se realizó con base en los índices de Kováts determinados en columnas capilares con fases estacionarias polar y apolar, espectros de masas de los componentes y, en algunos casos, usando sustancias patrón disponibles.

*Tesis

**Facultad de ciencias, Escuela de química, Elena Stashenko

TITLE

OBTAINING FOR DIFFERENT TECHNIQUES OF EXTRACTION OF THE VOLATILE SECONDARY METABOLITES OF THE *Swinglea glutinosa* (Fam. Rutaceae) AND THEIR ANALYSIS FOR GAS CHROMATOGRAPHY *

AUTHOR

José Domingo Medina Sarmiento **

KEY WORDS

Swinglea glutinosa, secondary metabolites.

ABSTRACT

The *Swinglea glutinosa* is a native shrub of the South West of Asia, introduced and cultivated in Colombia to make living fences. Although this plant is not native, has adapted completely to the geobotany conditions of the country. It is a thorny shrub, shining foliage, compact and of white flowers, seemed to the orange blossoms. The fruit presents an average of 10-12 cm in length, and in addition it is not eatable. In their stems have been acrydinic alkaloids, that they present antiparasitic activity on *Plasmodium falciparum*.

This investigation was centered in the determination of the chemical composition of the essential oil (AE) and extracts of the fruit and leaves of the *Swinglea glutinosa*, using gas chromatography with flame ionization detector and mass spectrometry. The present work forms part of the investigation line related with the characterization of extracts and essential oils of tropical plants.

The extracts were obtained by means of different techniques, that is: simultaneous distillation-extraction, supercritical fluid extraction and microwave-assisted hydro-distillation. For the analysis of the volatile fraction it was practiced headspace-solid-phase-micro-extraction and static headspace.

The main present components in the AE, extracts and volatile fractions were the β -pinene, the sabinene, the α -pinene, the bicyclosesquiphellandrene, the limonene, the nerolidol, the germacrene B and the β -caryophyllene. The relative amounts of these compounds vary of agreement with the technique of used extraction.

The determination of the chemical composition of the secondary metabolites volatile present in this shrub, was made with base in the indexes Kováts of certain in capillary columns with polar stationary phases and apolar, spectra of mass of the components and, in some cases, using available substances pattern.

*Tesis.

**Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Elena Stashenko.

INTRODUCCIÓN

La *Swinglea glutinosa* es un pequeño arbusto nativo del Sur Oeste de Asia, introducido y cultivado en Colombia para hacer cercas vivas (**Figura 1**).



Figura 1. *Swinglea glutinosa*.

Aunque esta planta no es autóctona, se ha adaptado completamente a las condiciones geobotánicas del país. Es un arbusto espinoso, de follaje brillante, compacto y de flores blancas, parecidas a los azahares. Su fruta (**Figura 2**),

llamada comúnmente “Limón Africano”, presenta un tamaño promedio de 10-12 cm de largo, y no es comestible.



Figura 2. Fruta de la *Swinglea glutinosa*.

En sus tallos se han encontrado alcaloides acridínicos, que presentan actividad antiplasmodial sobre *Plasmodium falciparum* [36].

Este trabajo es una contribución al desarrollo de una de las líneas de investigación del Laboratorio de Cromatografía, adscrito al Centro de Investigación en Biomoléculas (CIBIMOL), que tiene como objetivo caracterizar extractos y aceites esenciales (AE) de plantas tropicales, que constituyen parte de la inmensa biodiversidad de nuestro país.

El estudio se centró particularmente en la determinación de la composición química del AE de la cáscara del fruto de la *Swinglea glutinosa*, con el fin de obtener información sobre la calidad de la esencia y valor comercial, con miras a sus potenciales aplicaciones. Para ésto se utilizaron las técnicas instrumentales de cromatografía de gases de alta resolución (HRGC) con detectores de ionización en llama (FID) y espectroscópico de masas (MS).

El estudio de la composición química de los metabolitos secundarios volátiles, requiere la exploración y comparación de extractos obtenidos por diferentes técnicas extractivas, así como el análisis repetido de muestras mediante diferentes sistemas de detección, con el fin de llegar a una caracterización más completa posible. Por ello, se usaron 5 técnicas de extracción y dos sistemas de detección.

Los extractos de *Swinglea glutinosa* fueron obtenidos a partir de la cáscara de la fruta y hojas mediante técnicas de aislamiento, a saber: destilación con vapor / extracción con solvente simultánea (SDE), extracción con fluido supercrítico (SFE) e hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHHD). Para el análisis de la fracción volátil de la cáscara, hojas y el aceite esencial de la cáscara se practicó la microextracción en fase sólida en el modo *headspace* (HS-SPME) y el *headspace* estático (S-HS).

La determinación de la composición química de los metabolitos secundarios volátiles, se realizó con base en los índices de Kováts, determinados en columnas

capilares con fases estacionarias polar y apolar, espectros de masas de los componentes y, en algunos casos, usando sustancias patrón disponibles.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. EXTRACCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES

Los metabolitos secundarios volátiles son compuestos orgánicos que aparentemente no tienen una función directa en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Estos compuestos generalmente no juegan un rol directo en los procesos de fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, síntesis de proteínas, asimilación de nutrientes, o la formación de carbohidratos, proteínas y lípidos [11,13].

Los metabolitos secundarios se diferencian de los primarios (amino ácidos, nucleótidos, azúcares, etc.) en que tienen una restricción en la distribución en el reino de las plantas. Este grupo de metabolitos a menudo se encuentra solamente en una especie de plantas o en un grupo de especies relacionadas, mientras que los metabolitos primarios se encuentran en todo el reino vegetal [34, 10].

Estos compuestos pueden ser divididos en tres diferentes grupos: Compuestos que tienen nitrógeno, terpenos y sustancias fenólicas. En la **Figura 3** se muestra un esquema general de las rutas biosintéticas de los metabolitos secundarios.

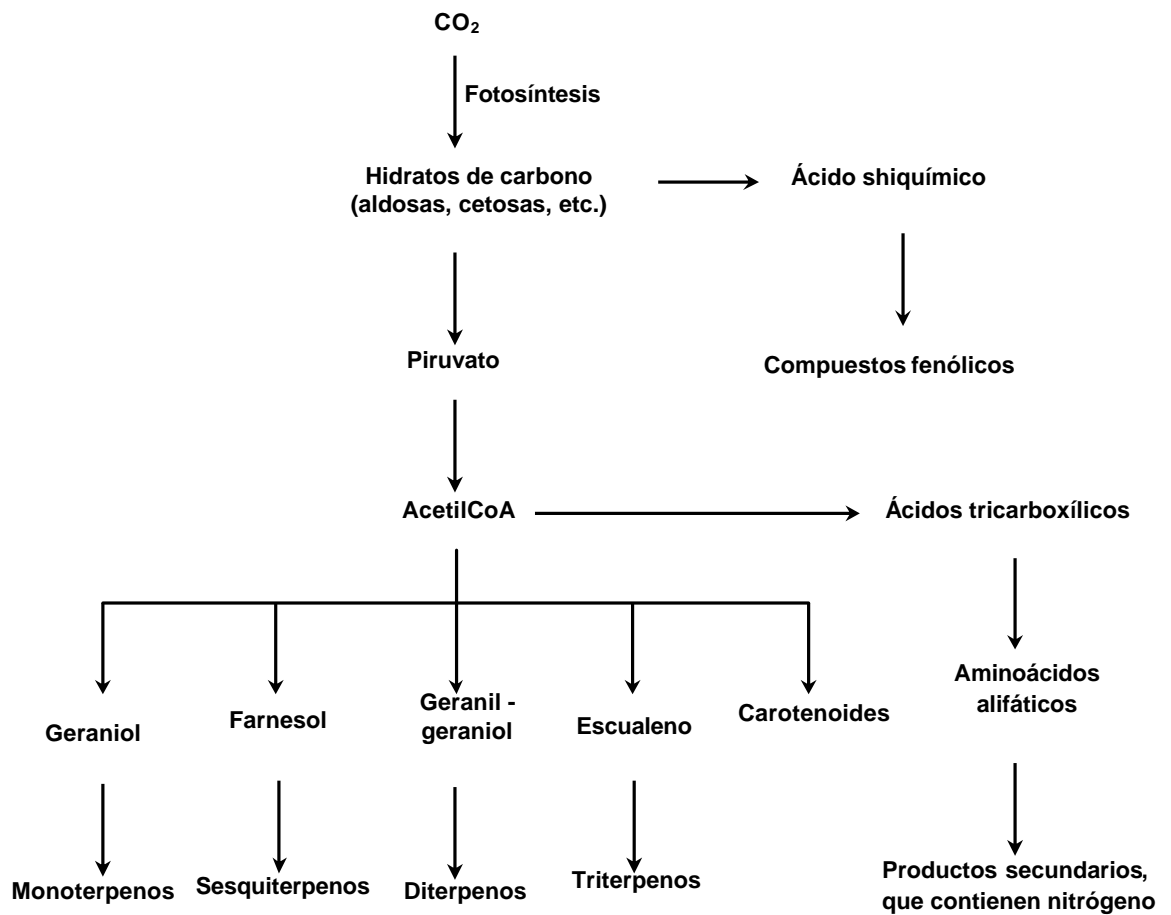


Figura 3. Esquema general de las rutas biosintéticas de los metabolitos secundarios de las plantas.

Los componentes (en este caso metabolitos secundarios volátiles), obtenidos por técnicas extractivas y de *headspace*, se les llaman extractos y “fracciones volátiles”, respectivamente. Sin embargo, a la mezcla de sustancias obtenida por hidrodestilación, raspado y prensado en el caso de cítricos, se le da el nombre de “aceite esencial” (AE). A continuación, se describen algunas de las técnicas utilizadas en la obtención de aceites esenciales, extractos y fracciones volátiles.

1.1.1. Técnicas de obtención de aceites esenciales

1.1.1.1. Aceite esencial Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles obtenidas de plantas por destilación por arrastre con vapor de agua o hidrodestilación, que contienen las sustancias responsables de la fragancia (olor) de las plantas.

La mayoría de estos aceites se usan en cosméticos, para masajes, en aromaterapia, artesanías o en productos de limpieza; otros son empleados como repelentes de insectos, tanto para el hombre como para el ganado; en medicina se utilizan para el tratamiento de una amplia diversidad de afecciones [4-8, 22].

Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes, que pueden tener compuestos de la siguiente naturaleza química:

- * Compuestos alifáticos, hidrocarburos y sus análogos oxigenados de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos);
- * Monoterpenos, $C_{10} H_{16}$;
- * Monoterpenoides, $C_{10} H_{16}O$;
- * Sesquiterpenos, $C_{15} H_{24}$;
- * Sesquiterpenoides, $C_{15} H_{26}O$;
- * Fenilpropanos, entre otros.

Los aceites esenciales pueden encontrarse en cualquier parte de la planta, por ejemplo, en las flores (rosa, ylang-ylang, geranio), en la cáscara del fruto (naranja, limón), en las hojas (eucalipto, limonaria, ciprés), en la corteza (canela, cebra), en las semillas (cardamomo, anís, eneldo) y/o en las raíces (sándalo, valeriana) [2, 22].

El valor comercial de los aceites esenciales y su uso dependen básicamente de su composición química. Las variables que más notoriamente inciden sobre la composición de los aceites esenciales en la planta, son: condiciones geobotánicas, método de cultivo, época de recolección, parte de la planta y técnica de obtención del aceite, entre otras [2, 22, 33].

1.1.1.2. Obtención del aceite. En las plantas, los aceites esenciales se almacenan en glándulas aceitosas, venas, sacos de aceite, o cabellos glandulares de donde sólo pueden ser removidos utilizando el vapor de agua, el cual debe atravesar los tejidos vegetales de la superficie expuesta al mismo. Para facilitar este proceso y aumentar el rendimiento del aceite, a menudo se realiza un tratamiento físico previo a la destilación, el cual depende del tipo de material vegetal.

Las hojas, las flores y otras partes delgadas y no fibrosas de la planta se someten al proceso de destilación sin ningún tratamiento previo, mientras que las raíces, los tallos y las plantas leñosas se deben cortar en trozos pequeños, aumentando

así la superficie de contacto. En cuanto a las semillas, se aconseja molerlas antes de la extracción [2, 32, 33].

El almacenamiento del material vegetal antes del proceso de destilación no es muy recomendable, ya que está asociado con la pérdida y deterioro de la calidad y el rendimiento del aceite, por evaporación, oxidación enzimática u otros procesos de degradación. Sin embargo, hay excepciones y en algunos casos durante el proceso de almacenamiento y secado, tiene lugar una serie de reacciones bioquímicas acompañadas de la generación de compuestos aromáticos de interés, como ocurre, por ejemplo, con las flores de vainilla y rosa, o las hojas de pachulí [2, 4, 8].

- * *Métodos de obtención:* los aceites esenciales se obtienen de las plantas por diferentes procesos fisicoquímicos de acuerdo con la naturaleza y propiedades de los mismos o del material vegetal que los contiene.

Por definición, el aceite esencial es una mezcla volátil de sustancias que se obtiene del material vegetal por arrastre con vapor o por hidrodestilación. Para el caso de las cáscaras de cítricos se incluye el método de raspado o prensado [2, 32].

El procedimiento para la extracción del aceite esencial puede ser llevado a cabo de distintas formas, así:

a). Destilación con vapor seco: el vapor de agua ligeramente sobrecalentado, proveniente de un generador, se hace pasar a través del material vegetal, el cual se encuentra en otro recipiente.

El método de destilación con vapor es el más usado tanto a escala industrial, como en el laboratorio; permite obtener el aceite esencial con el rendimiento más alto y además, operar grandes cantidades de material vegetal (**Figura 4**).



Figura 4. Equipo de arrastre con vapor utilizado a escala industrial. Producción de aceite de lima (Guadalajara, México).

Esta técnica es muy sencilla, pero debe trabajarse con mucha precaución, ya que durante los procesos de destilación con vapor, el aceite se somete a

la acción de temperaturas altas, las cuales pueden ocasionar procesos colaterales indeseables, tales como polimerización y resinificación de los terpenos e hidrólisis de ésteres [2].

b). Destilación con agua (hidrodestilación): la especie a destilar se sumerge al agua a punto de ebullición. El modo de calentamiento puede realizarse de diferentes maneras.

➤ La forma común de calentar el agua y el material vegetal, en un proceso de destilación, es utilizando una manta. Este modo de calentamiento se le llama hidrodestilación convencional, y una de sus desventajas es que el sistema tarda mucho tiempo en calentarse.

➤ Otra forma de calentamiento del agua, muy utilizada actualmente, es la radiación con microondas. Esta técnica, que recibe el nombre de hidrodestilación asistida por la radiación de microondas, fue inicialmente patentada en Canadá por *Paré* y colaboradores en 1991 [24]. Tiene gran importancia y ha sido incorporada en aplicaciones biológicas y ambientales, principalmente, para reducir el tiempo de procesos y reacciones químicas. Consiste en la transformación de la energía electromagnética de las microondas en energía calórica, la cual calienta el solvente que se encuentra en contacto con muestras sólidas, en este caso, el material

vegetal, y acelera la difusión de los compuestos de interés hacia el solvente de extracción [14, 15].

Las microondas son radiaciones electromagnéticas con longitudes de onda entre 1 mm y 1 m (30 GHz a 300 MHz), localizadas en el espectro electromagnético entre el infrarrojo y las ondas de radio. Su efecto es la interacción básicamente con las moléculas de agua, produciendo un rápido aumento de temperatura en un tiempo muy corto.

Cuando la molécula de agua absorbe la radiación de microondas, pasa a un nivel de energía rotacional superior al que ocupaba inicialmente. La energía promedio del conjunto de moléculas de agua aumenta, debido a que muchas moléculas absorben energía y pasan a ocupar niveles de energía superiores. La distribución de energía del conjunto de moléculas ya no corresponde a la que indica el valor inicial de la temperatura. El nuevo valor de la energía promedio está asociado con un valor de temperatura mayor [2, 14, 15].

En estos procedimientos, el vapor después de su contacto con el material vegetal se condensa obteniéndose una mezcla de agua y aceite, de la cual el aceite esencial se separa fácilmente por una simple decantación. Las destilaciones pueden realizarse a presiones superiores o inferiores a la atmosférica [32, 33].

1.1.2. Técnicas de obtención de extractos

1.1.2.1. Destilación con vapor / extracción con solvente simultánea (SDE).

Los métodos que combinan simultáneamente la hidrodestilación y la extracción con solvente se aplican en la actualidad rutinariamente, desde que por primera vez fueron introducidos por *Likens* y *Nickerson* [19]. Este método puede aplicarse tanto a matrices fluidas, como no fluidas, estas últimas en suspensión acuosa.

Varias modificaciones al equipo original de *Likens-Nickerson* han sido reportadas en la literatura con el objetivo de aumentar la eficiencia de recuperación de los componentes volátiles y disminuir las pérdidas de solvente durante el trabajo experimental [9].

Godefroot y colaboradores [9] diseñaron un equipo original SDE a microescala (**Figura 5**), el cual reduce considerablemente la cantidad de solvente a emplear. El pequeño volumen de solvente permite eliminar la etapa de concentración, necesaria para el análisis cromatográfico posterior.

En este sistema, el material vegetal junto con una pequeña cantidad de agua se coloca en un balón (A), cuya capacidad varía entre 0.1 y 5 L, mientras que el solvente (2-10 mL) se adiciona en otro balón (B) (ver **Figura 5**), ambos están conectados por vías diferentes al condensador por donde circula una mezcla refrigerante (0-10°C). Los balones se calientan separadamente (cada uno a

temperatura de ebullición) y los vapores generados por cada uno de ellos se condensan y caen en la sección que tiene forma de “U” (C), donde ocurre la migración de los compuestos volátiles del agua hacia el solvente orgánico. Luego, cada uno de ellos, agua y solvente, regresan a sus balones respectivos por conductos separados. De esta forma se lleva a cabo continuamente la hidrodestilación y la extracción, con una cantidad mínima de solvente, que permite extraer analitos presentes en la matriz, en cantidad suficiente para el análisis GC.

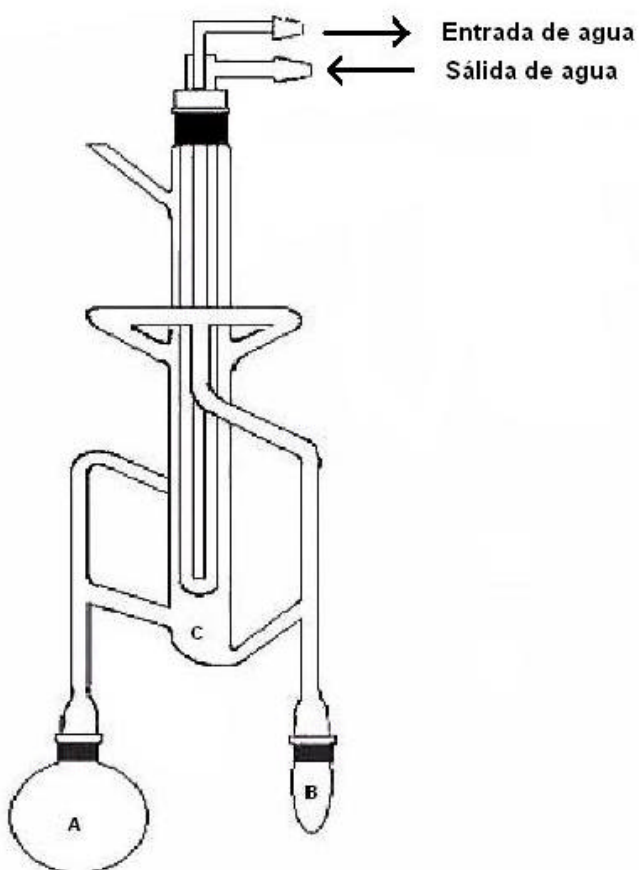


Figura 5. Esquema del equipo SDE a microescala [9].

1.1.2.2. Extracción con fluido supercrítico (SFE). Se entiende como fluido supercrítico a una sustancia o mezcla llevada, mediante operaciones mecánicas, a unas condiciones operativas de presión y temperatura por encima de su punto crítico. Un fluido supercrítico tiene un gran poder disolvente junto con una enorme capacidad de penetración (difusión) en sólidos, lo que permite el agotamiento rápido y prácticamente total de los sólidos extraíbles. Además, pueden separarse totalmente de forma sencilla de los extractos, simplemente modificando la presión o la temperatura, hasta el extremo, si es necesario que el fluido pase al estado gaseoso [3, 20, 35].

Los fluidos usados en SFE son: dióxido de carbono (CO_2), agua (H_2O), etano (C_2H_6), eteno (C_2H_4), propano (C_3H_8), xenón (Xe), óxido nitroso (N_2O). El CO_2 es de uso más frecuente e industrial.

Dentro de las aplicaciones actuales de la SFE, están la extracción de esencias y oleorresinas, aceites esenciales, aromas y fragancias, la obtención de tabaco libre de nicotina, aceites, grasas, medicinas naturales, pesticidas naturales, colorantes y preservantes, la descafeinización de café y té, la obtención de productos libres de colesterol y también el tratamiento de residuos orgánicos industriales [20, 35].

Entre las ventajas de la SFE, se encuentran las siguientes: los extractos obtenidos tienen mayor frescura y aroma natural, se usan temperaturas moderadas y se evita la degradación térmica de componentes; el extracto está libre de solvente,

hay mayor presencia de agentes activos, el rendimiento por extracción es más alto, los extractos se obtienen libres de contaminantes biológicos, el proceso es “amigable” al ambiente, las variables del proceso son flexibles y los equipos pueden ser operados automáticamente [3, 20, 35].

Otra de las ventajas de la SFE es que el fluido se puede eliminar fácilmente e inclusive reciclar; las temperaturas bajas, utilizadas para la extracción, no cambian químicamente los componentes de la esencia. Sin embargo, el equipo utilizado es relativamente costoso, ya que se requieren bombas de alta presión y sistemas de extracción también resistentes a las altas presiones [20, 35].

La SFE es una técnica relativamente sencilla: el material vegetal cortado en trozos pequeños, licuado o molido, se empaca en una cámara de acero inoxidable (**Figura 6**), a través de la cual se hace circular un fluido en estado supercrítico (por ejemplo, CO₂), que actúa como solvente de extracción y permite separar los componentes volátiles del material vegetal. El fluido luego se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y la temperatura ambiente. Finalmente, se obtiene un extracto, cuyo grado de pureza depende de las condiciones de extracción [3, 35].



Figura 6. Extractor Soxhlet de alta presión (J&W Scientific, Folsom, CA, USA).

1.1.3. Técnicas de obtención de fracciones volátiles

1.1.3.1. Headspace estático. Las características físicoquímicos de una fase condensada (líquida o sólida) se pueden determinar, analizando su fase gaseosa (vapor) donde los componentes se reparten entre las dos fases, después de haber alcanzado el equilibrio termodinámico. El análisis de la fase vapor de la muestra, que se encuentra en un recipiente sellado, en condiciones de equilibrio (temperatura y presión constante), se le conoce como “análisis de vapor en equilibrio”, “*headspace*” o “análisis de la fase vapor”. El principal objetivo de este

análisis es determinar componentes volátiles presentes en las matrices condensadas, en nuestro trabajo, en el material vegetal [7].

Esta técnica es relativamente simple y puede proveer sensibilidad similar a aquella alcanzada en el análisis por *headspace* dinámico o purga y trampa. Es un método que permite analizar compuestos orgánicos volátiles; los ejemplos de su aplicación incluyen el análisis de alcohol en sangre y la determinación de residuos de solvente en productos farmacéuticos, entre otros. Por esta técnica también se pueden analizar monómeros residuales en polímeros, compuestos saborizantes en bebidas y productos alimenticios, así como fragancias en perfumes y cosméticos [16, 30].

Diferentes matrices como sangre, plásticos y cosméticos contienen compuestos no volátiles, de alto peso molecular, que pueden contaminar el sistema cromatográfico y deteriorar la resolución y sensibilidad del equipo. Algunos procedimientos analíticos requieren técnicas de preparación de muestras extensas, largas y laboriosas para extraer y concentrar los analitos de interés de la matriz no volátil. Estas técnicas de extracción y concentración además son muy costosas [7].

El análisis por *headspace* estático (S-HS) ahorra tiempo y costos, debido a que el muestreo de los volátiles se realiza directamente en el espacio de cabeza del

contenedor, el cual contiene la muestra [16, 30], y el equipo de muestreo puede ser utilizado en forma automática (**Figura 7**).



Figura 7. Equipo para análisis de la fase vapor *Headspace Sampler* HP 7694E.

1.1.3.2. Microextracción en fase sólida en el modo *headspace* (HS-SPME).

Las técnicas más conocidas para la extracción de compuestos orgánicos volátiles y semi-volátiles de una muestra sólida o líquida son: *headspace* dinámico/purga y trampa (P&T), para concentración de volátiles, extracción líquido-líquido, extracción en fase sólida y extracción con fluido supercrítico. Sin embargo, estos métodos presentan varios inconvenientes, entre los cuales se destacan sus excesivos costos y tiempos de preparación de la muestra prolongados [7].

Una nueva técnica de preparación de muestras, que permite eliminar la mayoría de los anteriores inconvenientes, es la microextracción en fase sólida (SPME). Ésta fue desarrollada por *Pawliszyn* y *Belardi* en 1989 [26], y no requiere solventes o aparatos complicados. Permite obtener compuestos volátiles y no volátiles, a partir de muestras sólidas, líquidas o gaseosas, para su análisis por GC, GC/MS o cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

Esta técnica además se usa para el análisis de compuestos en muestras acuosas, tales como hidrocarburos aromáticos, compuestos orgánicos volátiles halogenados (VOC's), hidrocarburos poliaromáticos (PAH's), bifenilos policlorados (PCB's), pesticidas, compuestos nitrogenados, fenoles y sus derivados, entre otros.

Pawliszyn y colaboradores [26, 27] demostraron que el tiempo de extracción puede ser sustancialmente reducido cuando se utiliza SPME en el modo *headspace*, debido a que la difusión de los analitos en la fase vapor es mucho más rápida que en la fase acuosa. El equilibrio de los analitos entre la fase gaseosa y la fibra polimérica se alcanza en pocos minutos, mientras que por el método de inmersión en la solución acuosa se requieren períodos de muestreo mucho más prolongados. Cuando la fibra se introduce directamente en la matriz acuosa, la última debe agitarse intensamente, disminuyendo así el tiempo para alcanzar el equilibrio.

La técnica de microextracción en fase sólida involucra la extracción de analitos orgánicos específicos directamente desde la solución o desde su espacio de cabeza, dentro de un vial cerrado (**Figura 8**), en una fibra de sílice fundida recubierta con un material adsorbente, por ejemplo, poli(dimetilsiloxano) o poli(acrilato). Después de alcanzar el equilibrio, la fibra que contiene los analitos adsorbidos es removida del frasco de muestreo y los analitos se desorben térmicamente en el puerto de inyección de un GC o GC-MS. Además la fibra es reusable, con una vida útil de más de 50 inyecciones, por lo que la técnica no resultaría tan costosa [26, 27].

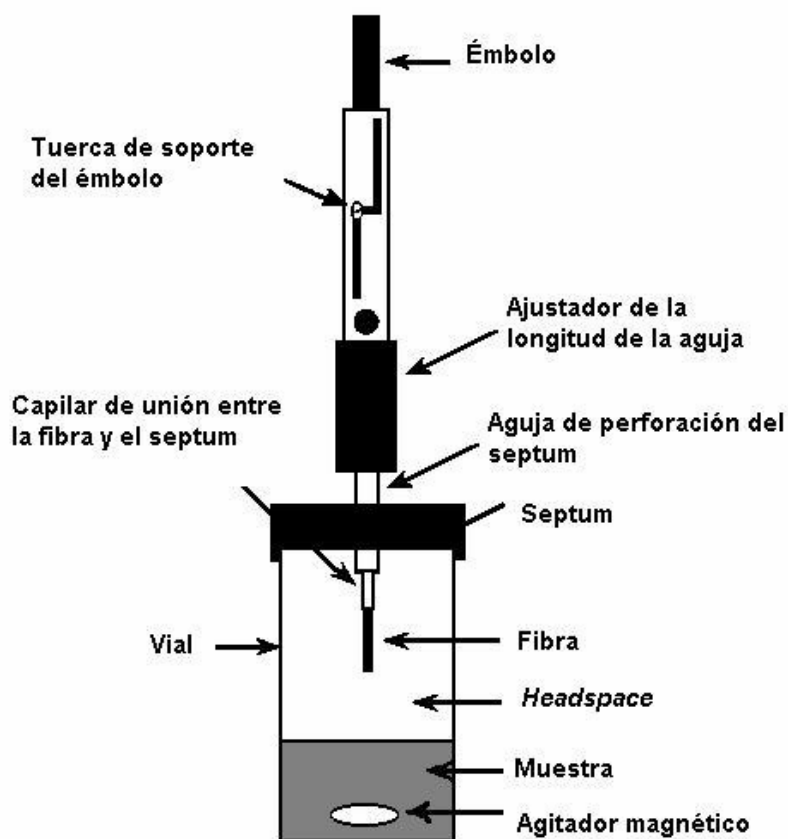


Figura 8. Esquema general del dispositivo utilizado para el muestreo HS-SPME.

En la **Tabla 1** se hace un análisis comparativo de las diferentes técnicas extractivas y de *headspace*, que se emplearon en el presente trabajo, incluyendo las ventajas y desventajas de cada una.

Tabla 1. Análisis comparativo de diferentes técnicas de extracción y de *headspace*, empleadas en el desarrollo del presente trabajo.

Técnica	Ventajas	Desventajas	Análisis e identificación
HD-MW	Método rápido (10-30 min), sencillo, tradicional. Puede usarse a escala piloto y/o industrial.	Calentamiento local alto. Posibles procesos de hidrólisis y termodegradación.	GC/FID/MS; Índices de Kováts
SDE	Excelente recuperación de volátiles. Método sencillo, con concentración de analitos, extracto obtenido listo para el análisis directo GC.	Método de extracción prolongado (2-3 hrs). Posible formación de artefactos por H ₂ O y temperatura.	GC/FID/MS; Índices de Kováts
SFE	Libre de solvente. Temperaturas bajas. Buena recuperación de analitos. La composición del extracto puede ser variada de acuerdo con la temperatura, presión y presencia de modificadores.	Posible pérdida de volátiles durante la despresurización. Co-extracción de pigmentos y grasas. Método costoso a nivel piloto o industrial.	GC/MS; Índices de Kováts
S-HS	Método sencillo. Libre de solvente. "Limpio". Recuperación y análisis de sustancias muy volátiles en matrices condensadas.	Método poco sensible, sólo para análisis de sustancias con alta presión de vapor, que se encuentran en concentraciones altas.	GC/MS; (S-HS)GC/FID
HS-SPME	Técnica sencilla, rápida, sensible, debido a la concentración de analitos, que acompaña su extracción.	En fase vapor sólo aplicable a sustancias volátiles. La composición de componentes aislada depende de la temperatura, tiempo de exposición y tipo de fibra.	GC/MS

1.2. ANÁLISIS INSTRUMENTAL

1.2.1. Cromatografía de gases (GC). La función del GC es separar una mezcla en sus componentes individuales, que después uno por uno entran en la fuente iónica del espectrómetro de masas, o en cualquier otro dispositivo de detección.

El éxito de la aplicación de la GC al estudio de los aceites esenciales ha sido posible debido al desarrollo de columnas capilares de alta resolución, que permiten separar las mezclas multicomponente de las sustancias de diversa polaridad o isómericas (monoterpenos, sesquiterpenos, etc.). Las fases estacionarias más usadas para el análisis de los aceites esenciales por el GC son CARBOWAX 20M [poli(etilenglicol), fase polar] y OV-101 (DB-1, HP-1, SP-30) [poli(dimetilsiloxano), fase apolar] [12, 17].

El tiempo de retención no constituye un parámetro totalmente confiable para el análisis cualitativo, ya que depende de muchas variables experimentales, tales como: tipo de columna, flujo de gas de arrastre, cantidad de muestra inyectada, etc. *Kováts* [18], propuso un sistema de índices de retención que sirve como base para el análisis cualitativo de los componentes de mezclas complejas (identificación tentativa). El sistema de los índices de retención de *Kováts* se basa en una comparación entre la posición del pico de un analito en el cromatograma

(compuesto “*target*”) y los picos correspondientes a hidrocarburos lineales, uno de los cuales eluye antes del componente de interés y el otro después.

1.2.2. Espectrometría de masas (MS). La espectrometría de masas es un método de análisis rápido y sensible que permite obtener la máxima cantidad de información estructural con la cantidad mínima de muestra (10^{-6} - 10^{-14} g).

El MS es una gráfica que relaciona las masas de los iones específicos (más exactamente, valores de la relación masa/carga del ion, m/z) con sus respectivas concentraciones en la corriente iónica total (TIC) producida por la ionización y la fragmentación de las moléculas del analito en la cámara de ionización.

El MS suministra información sobre la masa molecular, composición elemental de una sustancia (cuando se utiliza MS de alta resolución) y, en algunos, casos permite establecer la estructura espacial de la molécula.

Los MS de terpenos, principales constituyentes de los aceites esenciales, son en la mayoría de los casos muy parecidos. Su identificación por la MS está basada principalmente en las diferencias cuantitativas (intensidades de los iones). Sin embargo, se ha podido encontrar criterios experimentales (relación de las intensidades de los iones moleculares y característicos, MS de la colisión activada, energía cinética liberada durante las transiciones metaestables, etc.) para la

identificación de terpenos (básicamente monoterpenoides) a través de sus MS [1, 12].

En varios trabajos [17], la identificación de sesquiterpenos se realiza con base en sus índices de *Kováts*. La estructura de un sesquiterpeno se considera establecida sólo si coinciden sus espectros de masas e índices de *Kováts* para dos fases estacionarias, polar y/o apolar, con los de la sustancia patrón y con los de las bases de los espectros de masas (patrones de fragmentación) e índices *Kováts* de de estos componentes [1, 12, 17].

1.2.3. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS). El acoplamiento de un cromatógrafo de gases con un espectrómetro de masas permite hacer un análisis rápido y seguro de mezclas complejas, determinando simultáneamente cuántos y cuáles constituyentes y en qué proporción se encuentran en la mezcla. Este método es altamente sensible y con él se logra detectar componentes en cantidades del orden de picogramos.

El sistema moderno de GC/MS consta de tres bloques principales: cromatógrafo de gases, espectrómetro de masas y sistema de datos, cuyo componente más importante es una computadora. El sistema de datos computarizado realiza la conversión de las señales procedentes del espectrómetro de masas en

cromatogramas y espectros de masas normalizados, permitiendo obtener la información estructural de cada uno de los componentes de la mezcla [1, 30, 32].

1.3. *Swinglea glutinosa*

La *Swinglea glutinosa* es un cítrico de la familia Rutácea, originaria de Filipinas; fue introducida y cultivada en Colombia para hacer cercas vivas. Es un arbusto espinoso de follaje brillante (**Figura 1**), compacto y flores blancas, parecidas a los azahares. La fruta (**Figura 2**) presenta un tamaño promedio de 10-12 cm de largo y no es comestible. Es un buen arbusto para alamedas y jardines [36].

Existe sólo un (1) reporte sobre el estudio químico de este arbusto, donde se menciona la presencia de alcaloides de la acridínona en el tallo (**Figura 9**), que poseen la actividad antiplasmodial. Los compuestos fueron caracterizados, por resonancia magnética nuclear de protones (¹H NMR), como: **(1)** 1,3,5-trihidroxi-2,8-bis(3-metilbut-2-enil)-10-metil-9-acridinona, **(2)** 5-hidroxinoracronicinona, **(3)** 1,3,5-trihidroxi-4-metoxi-2-(3-metil-2-enil)-10-metil-9-acridinona, **(4)** 1,3,5-trihidroxi-4-metoxi-10-metilacridinona [36].

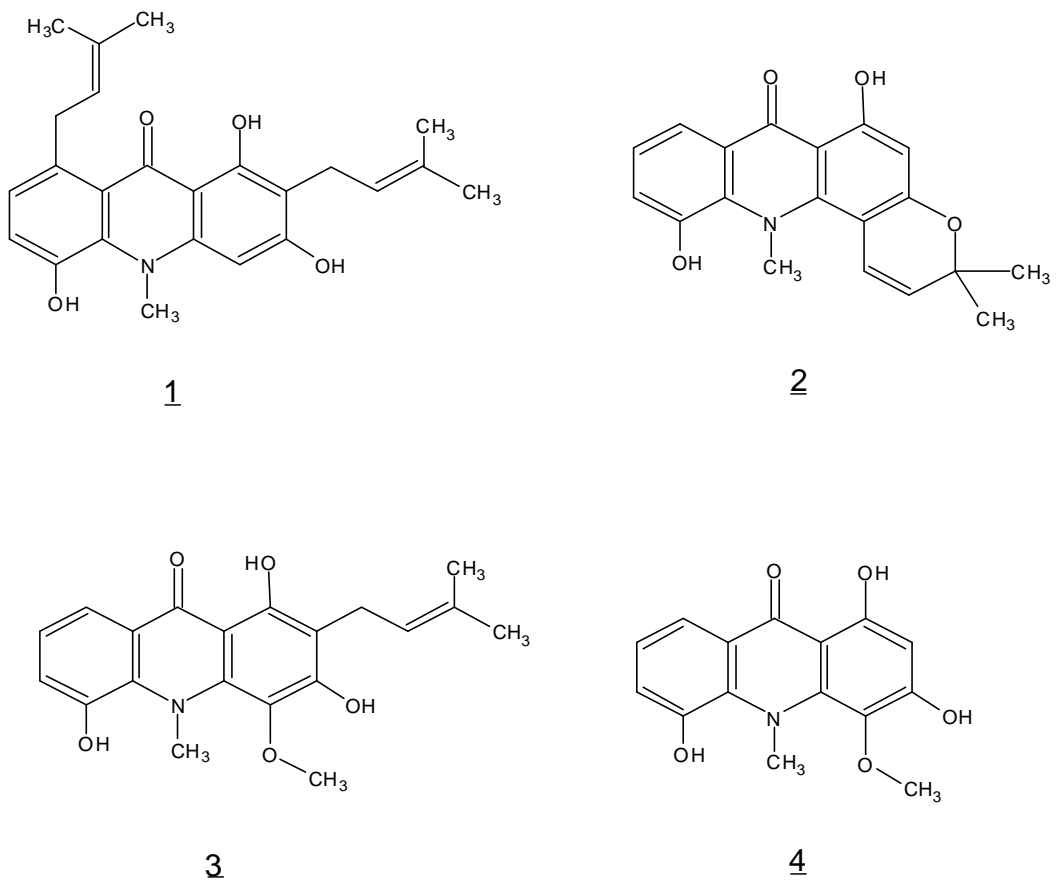


Figura 9. Alcaloides de la acridínona extraídos del tallo de la *Swinglea glutinosa* [36].

2. PARTE EXPERIMENTAL

Las siguientes fueron las actividades, que se realizaron en la parte experimental del trabajo:

- ↪ Recolección del material vegetal;
- ↪ Identificación taxonómica de la planta;
- ↪ Extracción del AE de la *Swinglea glutinosa* (“Limón Africano”) por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (HD-MW);
- ↪ Obtención de los extractos de cáscara y hojas por destilación con vapor / extracción con solvente simultánea (SDE) y extracción con fluido supercrítico (SFE);
- ↪ Obtención de las fracciones volátiles del AE, cáscara y hojas, empleando microextracción en fase en el modo *headspace* (HS-SPME) y *headspace* estático (S-HS);
- ↪ Análisis Instrumental, empleando GC/FID y GC/MS;
- ↪ Identificación de los metabolitos secundarios volátiles mediante sus MS.

2.1. Recolección del material vegetal

Las frutas (“Limón Africano”) y hojas de la *Swinglea glutinosa* utilizadas en las diferentes extracciones, realizadas en este trabajo, fueron recolectadas de los arbustos sembrados en una finca situada en el Magdalena Medio.

El proceso de obtención de los extractos y fracciones volátiles de la cáscara del fruto sucedió inmediatamente, después de su recolección, debido a que la fruta se fermenta y se deteriora muy fácilmente cuando está húmeda y mucho tiempo en contacto con otras. Esto puede alterar la calidad del aceite esencial obtenido, su composición química y el rendimiento.

2.2. Identificación taxonómica de la planta

La identificación taxonómica de la muestra botánica, que se llevó a cabo en el Herbario de la Universidad Industrial de Santander, fue así:

Reino: PLANTAE;

División: MAGNOLIOPHYTA;

Clase: MAGNOLIOPSIDA;

Subclase: ROSIDAE;

Orden: SAPINDALES;

Familia: RUTACEAE;

Genero: *Swinglea*;

Especie: *glutinosa* Merr.;

Nombre común: *Swinglea glutinosa* Merr.

La planta fue clasificada por el profesor Humberto E. García P., Docente de la escuela de Biología, UIS, a quien el autor le expresa su más sincero agradecimiento.

2.3. Obtención del AE, utilizando HD-MW

El material vegetal (cáscara y hojas) se cortó en trozos de aproximadamente 2 cm, se pesó y se sometió a extracción en un equipo de destilación tipo *Clevenger*, con calentamiento por radiación de microondas en un horno doméstico, marca *Kendo*, modelo MO-124 (frecuencia de microondas de 2.45 GHz y potencia de 800 W). El tiempo total de extracción fue de 30 minutos (3 x 10 min), a potencia aproximada de 560 W, usando 30 mL de agua.

Al final del proceso se pesó sólo el AE extraído de la cáscara de la fruta, ya que no se obtuvo suficiente cantidad del AE de las hojas; determinando su rendimiento de extracción (% p/p), tal como se muestra en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Rendimiento del AE, obtenido por HD-MW, de la cáscara del fruto de la *Swinglea glutinosa*.

Peso del material vegetal, g	Peso del extracto obtenido, g	Rendimiento, % (p/p)
200	0.345	0.173
225	0.392	0.174
250	0.440	0.176
Valor promedio		0.176 ± 0.004%*

*- Para un 95% de confianza.

2.4. Obtención de extractos

2.4.1. Extracción con fluido supercrítico (SFE)

La SFE se llevó a cabo utilizando un extractor Soxhlet de alta presión (*J&W Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.) (**Figura 6**), y empleando CO₂ sólido comercial (hielo seco) como fluido de extracción.

El procedimiento se realizó de la siguiente manera:

- ↪ Se pesaron alrededor de 10 g del material vegetal, los cuales se adicionaron en el cuerpo Soxhlet, y éste, a su vez, se conectó a un balón.

- ↪ El Soxhlet y el balón se colocaron dentro de un reactor de acero inoxidable, y se añadieron luego ca. 300 g, aproximadamente, de hielo seco comercial en el espacio entre el cuerpo Soxhlet y el reactor.

- ↪ A continuación, se conectó el refrigerante a un baño circulatorio *Fisher Scientific Model 901*, programado para una temperatura ca. 5°C, utilizando agua como líquido refrigerante.

- ↪ Posteriormente, el reactor se cerró herméticamente, asegurándose que la válvula estuviera completamente cerrada, y se introdujo en un baño termostático de agua a una temperatura de 45-50°C.

- ↪ Bajo las condiciones anteriormente descritas, la presión en el manómetro aumentó lentamente hasta 1100 psi. En este punto, el hielo seco empezó a sublimar y comportarse como fluido supercrítico, razón por la cual se tomó este momento como tiempo inicial de la extracción.

- ↪ La extracción se duró 2½ hrs, tiempo necesario para extraer la mayor cantidad de compuestos. Posteriormente, se retiró el reactor del termostato, se dejó enfriar hasta que el manómetro registró la presión mínima (500 psi), la válvula despresurizadora se abrió muy lentamente, permitiendo la evacuación del CO₂ gaseoso.

↪ Finalmente, el Soxhlet se retiró del reactor; se extrajo el balón y se lavó con diclorometano (1 mL). Este extracto se colocó en un frasco de 2 mL, que contenía sulfato de sodio anhidro, para ser inyectado luego al cromatógrafo de gases con detector selectivo de masas.

2.4.2. Destilación con vapor-extracción con solvente simultánea (SDE)

Para la obtención de los metabolitos secundarios volátiles por este método, se utilizó un extractor a micro-escala para solventes de alta densidad, diseñado por Godefroot *et al.* (1981).

El procedimiento se realizó de la siguiente manera:

↪ Alrededor de 10 g de material vegetal (cáscara y hojas) se depositaron en el balón **A** (ver **Figura 5**). A este balón se le adicionó una cantidad de agua equivalente a la tercera parte del volumen ocupado por el material vegetal. Por otro lado, se adicionaron 2 mL de diclorometano en otro balón (**B**) y 1 mL del solvente en la sección **C** del equipo.

↪ Los dos balones (**A** y **B**) se conectaron al cuerpo del equipo SDE, que estaba conectado, a un dedo refrigerante y a un condensador. Para el enfriamiento se utilizó un baño circulatorio *Fisher Scientific* (Isotemp, *Refrigerated Circulator* Model 901).

- ↪ El balón **A**, que contenía material vegetal finamente picado y una pequeña cantidad de agua, se calentó en un baño de aceite a 120°C y el balón **B** en un baño de agua a 60°C.

- ↪ La extracción se dejó durante 2 horas, tomando como tiempo inicial la condensación de la primera gota de agua sobre el dedo frío. Después de este tiempo, se detuvo la destilación con vapor, mientras que el solvente se dejó continuar su circulación por 15 minutos más.

- ↪ Finalmente, se tomó el balón **B**, que contenía el extracto en diclorometano, que se almacenó en un frasco de 2 mL, al cual se adicionó sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4); el extracto luego fue inyectado al cromatógrafo de gases con detector selectivo de masas.

2.5. Obtención de fracciones volátiles

2.5.1 HS-SPME

La extracción HS-SPME se realizó tanto para cáscara, hoja, como para aceite esencial de la cáscara, obtenido por HD-MW, de la siguiente manera:

- ↪ Aproximadamente 6 g de material vegetal (cáscara y hojas) se llevaron a un frasco de 25 mL, que fue sellado; se dejó un tiempo (ca. 10 min) para que los volátiles pasaran a la fase vapor. Luego, la fibra de poli(dimetilsiloxano) (PDMS, 100 μm de espesor), obtenida de *Supelco* Inc. (Bellefonte, PA, EE.UU.) se expuso a diferentes tiempos al espacio de cabeza del material vegetal. Los tiempos de exposición fueron de 5, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 min.

- ↪ Los analitos extraídos se dejaron desorber térmicamente a 250°C en un puerto de inyección del GC, usando un *liner* especial de diámetro reducido (0.75 mm) para SPME. A los 5 min, se procedió a retraer la fibra del puerto de inyección.

- ↪ Para el caso del aceite esencial, se adicionaron 10 μL de éste a un frasco de 25 mL y se realizó el mismo procedimiento, que fue utilizado para el material vegetal.

2.5.2 Headspace estático (S-HS)

Esta técnica, al igual que HS-SPME, fue usada para análisis de volátiles de cáscara, hojas y aceite esencial de la cáscara. El procedimiento se realizó de la siguiente manera:

Aproximadamente 6 g de cáscara y hojas se adicionaron a frascos de 25 mL, los cuales fueron sellados. Estos dos recipientes, junto con otro frasco que contenía una alícuota del AE de la cáscara, se colocaron en el equipo *Headspace Sampler* HP 7694 (*Hewlett-Packard*, Palo Alto, Ca, EE.UU.) (**Figura 7**). En cada uno de los casos, se inyectó 1 mL de la fase vapor a la columna cromatográfica.

Las siguientes fueron las condiciones del sistema: Temperatura del horno 70°C; temperatura del *loop* 100°C; temperatura de línea de transferencia 110°C y un tiempo de equilibrio de 15 min. El automuestreador fue conectado a un cromatógrafo de gases con detector de ionización en llama.

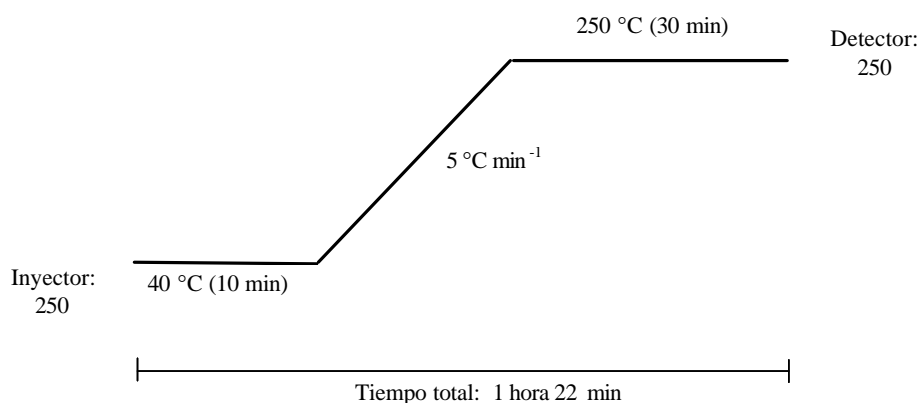
2.6. Análisis instrumental

2.6.1. Técnica GC/FID

El análisis de la mezcla de sustancias (metabolitos secundarios volátiles) se realizó en un cromatógrafo de gases (GC) *Hewlett-Packard* (HP) 5890A-Series II, equipado con un detector de ionización en llama (FID) (250°C) y un inyector *split/splitless* (250°C, relación 1:10). Los datos fueron adquiridos, usando un programa HP *ChemStation* HP Rev. A.06.03 [509].

Para la separación de las sustancias se utilizó una columna capilar apolar, HP-5 (*Hewlett-Packard*) 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 (10 min) hasta 250° C (30 min), con velocidad de calentamiento de 5°C min⁻¹, así:



El gas de arrastre empleado fue helio (99,9995%, *Aga-Fano S.A*), con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 78 kPa y una velocidad lineal de 26 cm/s⁻¹. El gas auxiliar fue nitrógeno (99,995%, *Aga-Fano S.A*), con una velocidad de flujo de 30 mL min⁻¹. Para el FID, los gases de combustión fueron aire (300 mL/min) e hidrógeno (30 mL/min).

Para cada análisis se inyectó 1 μL de cada uno de los extractos obtenidos en las extracciones antes mencionadas. Para la inyección de las muestras se utilizaron jeringas de 10 μL (*Hamilton*). La inyección se llevó a cabo en el modo *split* (1:30).

2.6.2. Técnica GC/MS

El análisis por CG/MS se realizó en un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Plus* equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (1:30) (250°C), un inyector automático *Agilent 7863*, un sistema de datos HP MS *ChemStation* (Versión 1.05), y acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5973*. Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia se mantuvieron a 230 y 285°C, respectivamente. Para la separación de los componentes presentes en la mezcla se utilizó una columna capilar HP-5MS (60 m x 0.25 mm x 0.25 µm) de 5%-fenil-poli (metilsiloxano).

La programación de la temperatura del horno fueron las mismas descritas en el *Numeral 2.5.1* para el análisis cromatográfico. Como gas de arrastre se utilizó He (AGA-FANO S.A., 99,995% de pureza) con una presión de entrada en la columna de 200 kPa y velocidad lineal de 26 cms⁻¹.

El análisis se llevó a cabo obteniendo los cromatogramas (corrientes iónicas totales, TIC) y los espectros de masas de los componentes individuales. Las bases de datos de espectros utilizadas fueron WILEY 138K, NBS 75K y NIST 98.

2.6.3. Espectros de masas

Los espectros de masas fueron obtenidos por impacto de electrones con energía de 70 eV. Los compuestos volátiles se identificaron tanto por comparación automática de sus MS con los espectros de las bases de datos del equipo, WILEY138 (138.000 compuestos) y NBS75K (75.000 espectros), como por medio del análisis "manual" de las respectivas rutas de fragmentación. Además, para los extractos obtenidos por SDE, SFE y HD-MW se utilizaron los índices de Kováts (I_k), que se determinaron con respecto a una mezcla patrón de hidrocarburos lineales, C₉-C₂₈, analizada bajo a las mismas condiciones operacionales, que se usaron para los extractos.

3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1. Análisis del AE de la *Swinglea glutinosa*

La identificación de los componentes del AE de la cáscara (desafortunadamente, no se logró obtener suficiente cantidad del AE de la hoja) del fruto (“Limón Africano”), obtenido por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (HD-MW), se hizo con base en los criterios cromatográfico (tiempos de retención, Índices de Kováts) y espectrométrico (MS), y permitió la identificación del 90% del total de los compuestos presentes en el aceite.

3.1.1. Comparación de los perfiles cromatográficos del AE de la cáscara del fruto, utilizando diferente modos de inyección.

El análisis del AE de la cáscara del “Limón Africano”, obtenido por HD-MW, se realizó, usando tres modos de inyección, a saber: *split* (relación 1:30); *splitless* y *on-column*. En la **Figuras 10** se pueden observar los perfiles cromatográficos del AE, obtenidos en columna HP-5 (60 m), usando diferentes modos de inyección. Además, en la **Figura 11**, se ilustran las fórmulas estructurales de los metabolitos identificados en el AE.

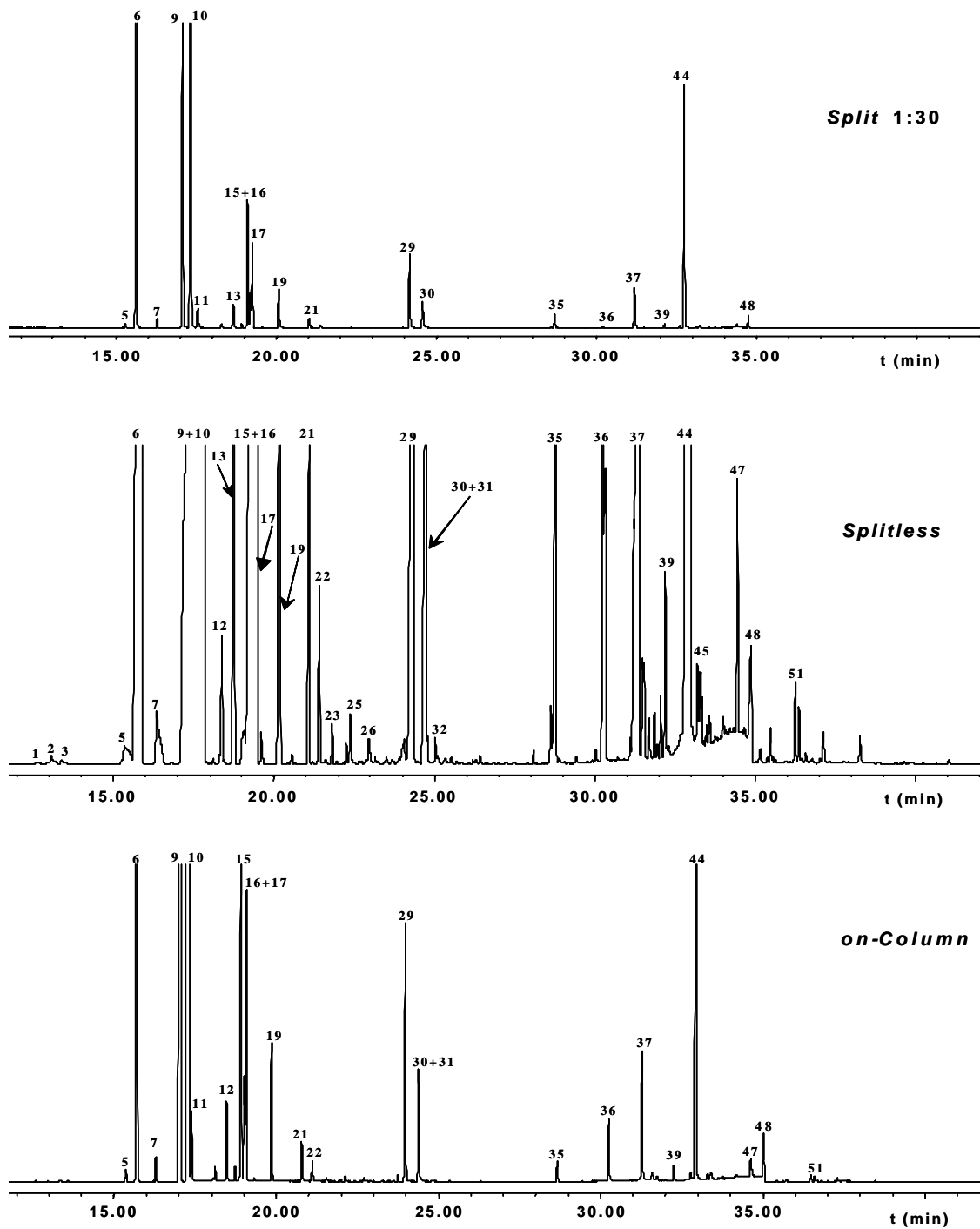


Figura 10. Perfiles cromatográficos, del AE de la cáscara del fruto de la *Swinglea glutinosa*, obtenidos por tres modos de inyección. Columna HP-5 (60m). MSD.

➤ **Inyección *split* 1:30**

Cuando se empleó este tipo de inyección, se logró identificar 20 componentes en cantidades >0.01%, usando sus Índices de Kováts experimentales (los cuales se compararon con los de literatura [1, 17]) y los espectros de masas.

Los compuestos mayoritarios fueron: β -pineno (49.4%), sabineno (11.0%), α -pineno (12.0%), biciclosesquifelandreno (8.1%), limoneno (4.4%), 1,8-cineol (3.0%), terpinen-4-ol (2.7%), β -cariofileno (1.5%), γ -terpineno (1.4%), β -felandreno (1.2%), α -terpineol + *cis*-piperitol (1.0%), α -terpineno (0.8%) y β -mirceno (0.6%).

Al utilizar el modo de inyección *split* ocurre un “efecto de dilución” del extracto, registrándose en el cromatograma sólo aquellos componentes cuya concentración en el extracto es alta, y “desaparecen” los picos correspondientes a los compuestos que se encuentran en concentración baja, puesto que quedan por debajo del nivel mínimo de detección; por ello, el cromatograma obtenido en el modo de inyección *split* presenta menor número de componentes en comparación con los registrados, cuando se usan otros modos de inyección (**Figura 10**).

➤ **Inyección *splitless***

Para este modo de inyección, en el cromatograma se registraron 51 componentes en cantidades >0.01%. Su identificación se realizó con base en los Índices de Kováts experimentales (los cuales se compararon con los de literatura [1, 17]) y los espectros de masas.

Los compuestos mayoritarios, registrados en el AE de la cáscara de la fruta de la *Swinglea glutinosa*, cuando se usó el sistema de inyección *splitless*, fueron: sabineno (14.4%), β -pineno (10.9%), α -pineno (8.8%), α -terpineno (2.0%), limoneno (7.1%), β -felandreno (1.4%), 1,8-cineol (3.5%), γ -terpineno (1.8%), α -terpinoleno (0.7%), terpinen-4-ol (5.0%), α -terpineol + *cis* piperitol (3.1%), γ -elemeno (3.4%), β -elemeno (1.5%), β -cariofileno (1.7%), β -gurjuneno (4.7%), biciclosesquifelandreno (10.5%), nerolidol (1.5%) y germacreno B (0.9%).

En este modo de inyección, los componentes, que se encuentran tanto en alta, como en baja concentración en el extracto, entran, sin pérdida, a la columna cromatográfica, generándose un perfil con mayor número de compuestos, en comparación con los presentes en el cromatograma, obtenido en el modo *split*.

Uno de los problemas de este modo de inyección, es que los analitos en concentraciones altas saturaran el detector, además sus picos son anchos y parcialmente se solapan.

➤ **Inyección *on-column***

Usando este modo de inyección, en el cromatograma se identificaron 25 componentes, en cantidades >0.01%. Igualmente, se utilizaron índices de Kováts y los espectros de masas, para su identificación.

Los siguientes fueron compuestos mayoritarios identificados: β -pineno (30.8%), α -pineno (13.1%), sabineno (12.9%), biciclosesquifelandreno (11.3%), limoneno (5.5%), terpinen-4-ol (3.7%), 1,8-cineol (3.5%), γ -terpineno (1.8%), α -terpineol + *cis*-piperitol (1.5%), β -cariofileno (1.5%), α -felandreno, (1.4%), β -felandreno (1.4%), β -mirceno (ca. 1.0%) y β -elemeno (ca. 1.0%).

Este modo de inyección permitió obtener un perfil cromatográfico con los picos bien resueltos, que puede verse en la **Figura 10**. En este modo de inyección la introducción del extracto es directa sobre la columna, evitando así la pérdida o discriminación de los analitos por su volátilidad.

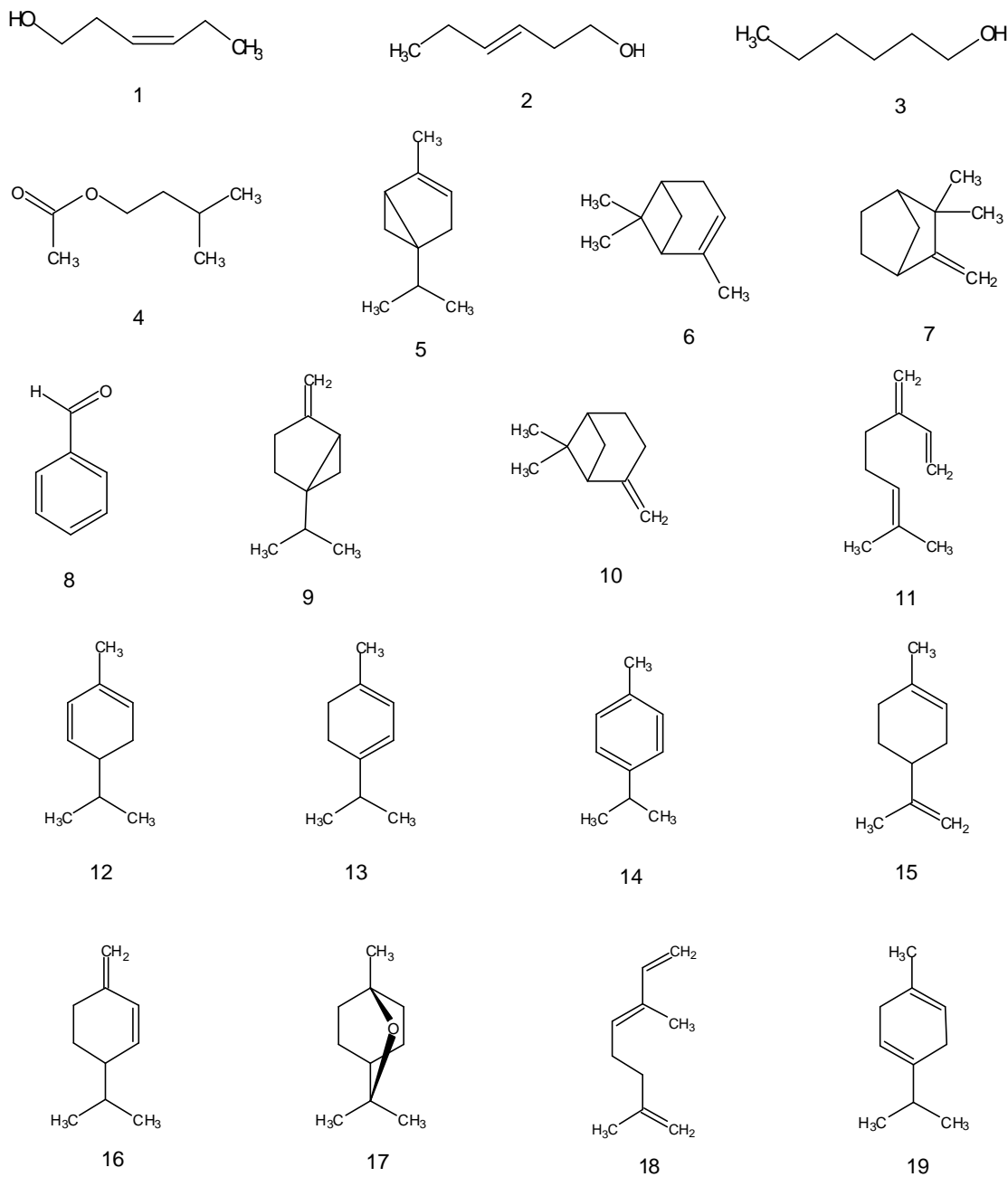
Uno de los inconvenientes, que se presenta con este modo de inyección, consiste en la posible contaminación y el deterioro de la columna analítica, puesto que la jeringa especial ingresa directamente en la columna cromatográfica, y las partículas no volátiles e interferencias puedan quedarse en ella. Para evitar esto, se hace el uso de una precolumna. Además, la inyección *on-column* se lleva a

cabo únicamente en el modo automático (muestrador automático, con un a jeringa y guía especiales), lo que eleva el costo de la operación.

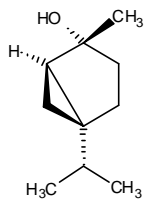
Es de resaltar, que cuando se trate de realizar una caracterización exhaustiva de una mezcla compleja, como es el caso de un aceite esencial, logrando la mejor separación y detección de componentes a nivel de trazas, se deben trabajar diferentes modos de inyección, con el fin de poder identificar, todos los constituyentes, tanto aquellos que se encuentran en concentraciones bajas, como aquellos en concentraciones altas que, pueden co-eluir. El primer modo de inyección que se debe realizar cuando no se conoce la concentración de los compuestos en la mezcla, es *split*, si el perfil cromatográfico contiene picos de baja intensidad, difíciles de identificar por espectrometría de masas, se hace una inyección *splitless*, y/o *on-column*.

Figura 11. Formulas estructurales de los metabolitos secundarios volátiles, identificados en la *Swinglea glutinosa*.

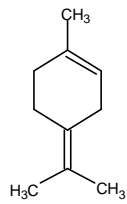
Según el orden de aparición en los cromatogramas (Figuras 10, 12-16).
Ver nombre de las sustancias en las Tablas 3, 5 y 7.



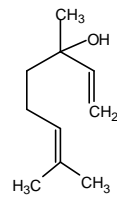
Continuación **Figura 11.**



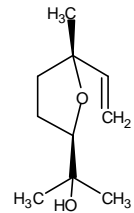
20



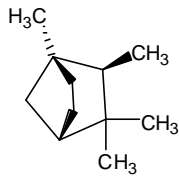
21



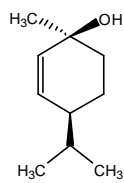
22



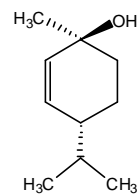
23



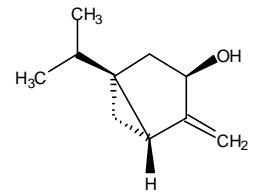
24



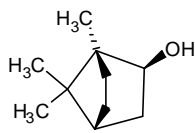
25



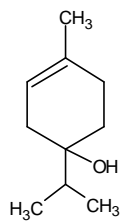
26



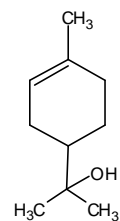
27



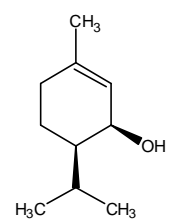
28



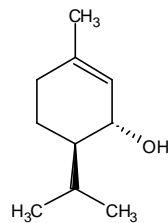
29



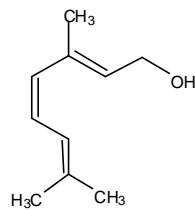
30



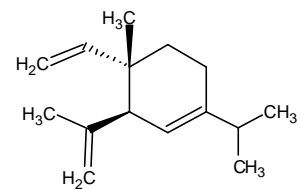
31



32

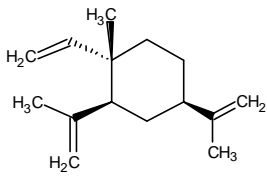


33

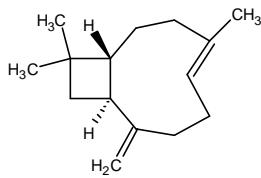


35

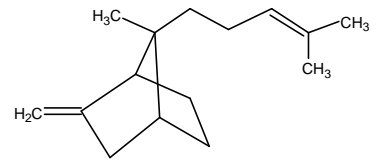
Continuación **Figura 11.**



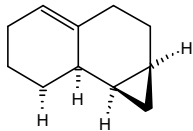
36



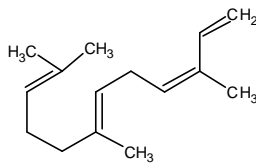
37



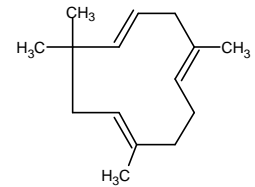
38



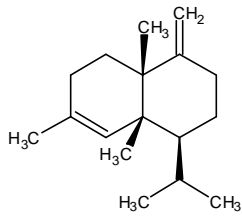
39



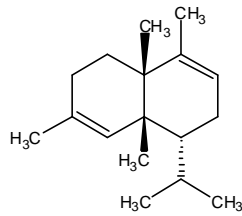
40



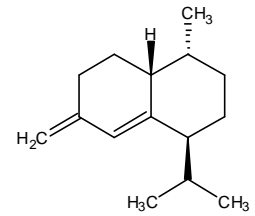
41



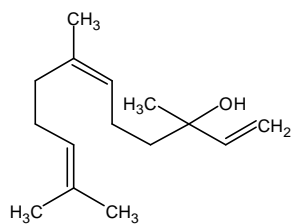
42



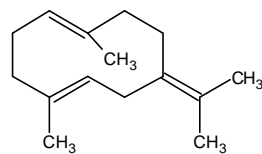
43



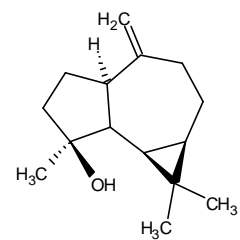
44



47



48



51

3.2 Análisis de los extractos

3.2.1 Análisis comparativo de la composición de los extractos de la cáscara del fruto del “Limón Africano”, obtenidos por diferentes métodos de extracción.

En la **Figura 12** aparecen los perfiles cromatográficos típicos, empleando una columna HP-5 (60 m) y utilizando un detector selectivo de masas (MSD), de los metabolitos secundarios volátiles, aislados por HD-MW, SDE y SFE, de la cáscara del fruto de la *Swinglea glutinosa*.

Más de 20 componentes, en concentraciones relativas >0.01 %, se encontraron en el aceite esencial y el extracto SFE de la cáscara del fruto, tal como se observa en la **Tabla 3**. Las fórmulas estructurales de estos metabolitos secundarios aparecen en la **Figura 11**.

El componente mayoritario, presente en el aceite esencial, obtenido por HD-MW, y en el extracto, aislado por SDE, de la cáscara del fruto del “Limón Africano” fue el β -pineno (49-52%). A éste, lo siguieron el sabineno (11-12%), el α -pineno (10-12%), el biciclosesquifelandreno (8-9%), el limoneno (3-5%) y el β -cariofileno (1-3%).

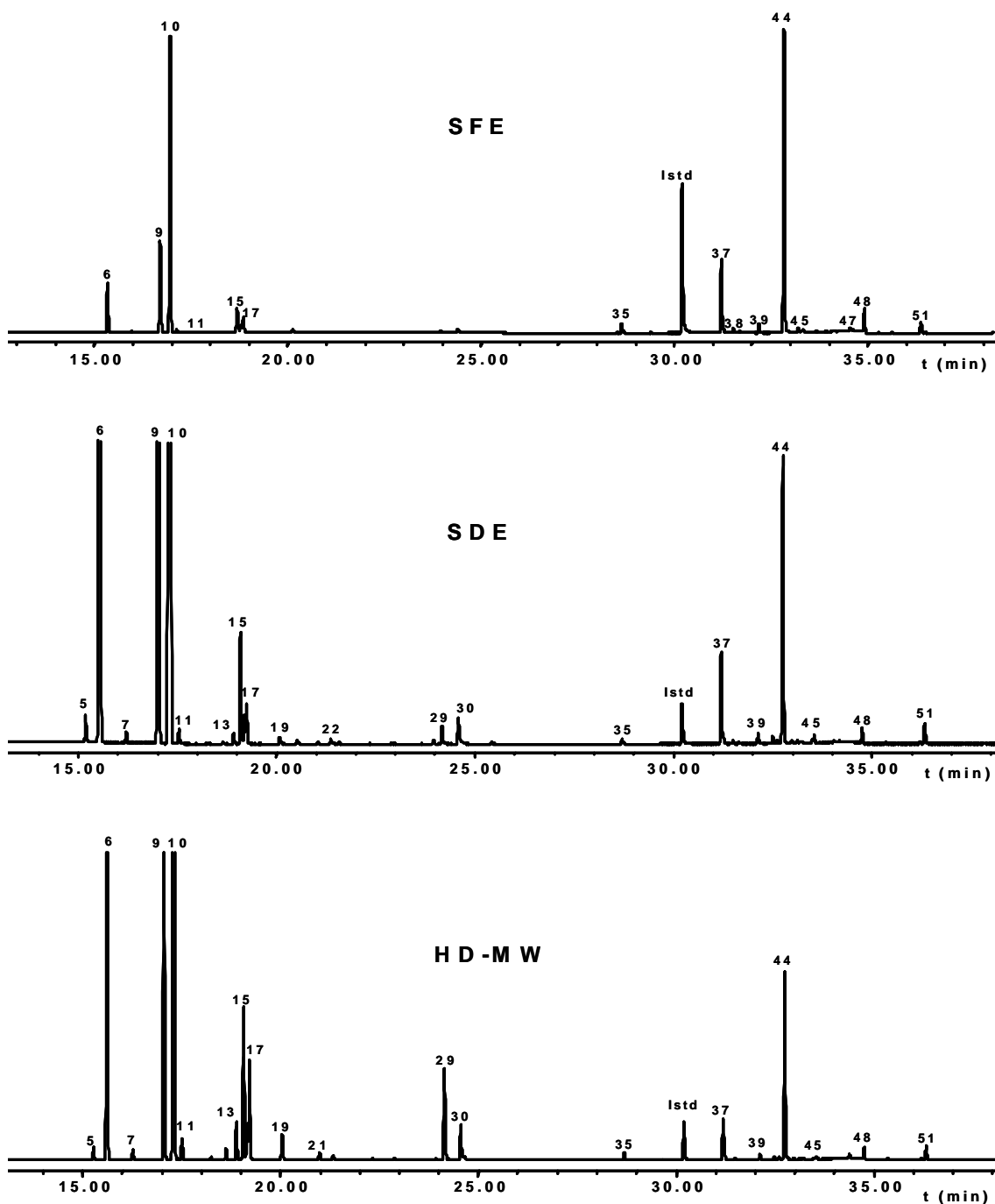


Figura 12. Perfiles cromatográficos típicos de los extractos de la cáscara del fruto de la *Swinglea glutinosa*, obtenidos por SFE, SDE y HD-MW, respectivamente. Columna HP-5 (60 m). *Split* 1:30. MSD. La identificación de los componentes aparece en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Composición química de los metabolitos secundarios volátiles, obtenidos de la cáscara de la fruta de la *Swinglea glutinosa*, por diferentes técnicas de extracción.

Pico N° (Figura 12)	I _k teórico	I _k HP-5	Compuesto	Cantidad relativa, %		
				SDE	SFE	HD-MW
5	931	931	α-Tujeno	0.8	-	0.1
6	939	940	a-Pineno	10.4	5.0	12.0
7	953	954	Canfeno	0.30	-	0.3
9	976	977	Sabineno	11.5	9.3	11.0
10	980	980	b-Pineno	51.9	30.4	49.6
11	991	990	β-Mirceno	0.4	-	0.7
13	1018	1020	α-Terpineno	-	-	0.1
14	1026	1026	p-Ocimeno	0.3	-	-
15	1031	1031	Limoneno	3.4	2.9	4.4
16	1031	1032	β-Felandreno	0.9	0.9	1.2
17	1033	1033	1.8-Cineol	1.2	1.6	3.0
19	1062	1060	γ-Terpineno	0.2	-	1.4
20	1068	1068	<i>trans</i> -Tujenol	0.1	-	-
21	1088	1086	α-Terpinoleno	0.1	-	0.4
22	1098	1099	Linalol	0.2	-	-
28	1165	1167	Borneol	0.1	-	-
29	1177	1177	Terpinen-4-ol	0.6	-	2.7
30	1189	1190	α-Terpineol	1.0	-	1.2
35	1340	1340	δ-Elemeno	0.2	1.2	0.5
37	1418	1419	b-Cariofileno	2.9	8.1	1.5
38	1434	1437	β-Sesquifencheno	0.1	0.3	-
39	1437	1439	β-Gurjuneno	0.3	0.4	0.2
44	1487	1487	Biciclosesquifelandreno	8.4	32.8	8.1
45	-	1525	N.I., C ₁₅ H ₂₄	-	0.4	-
47	1534	1534	Nerolidol	-	0.3	-
48	1556	1554	Germacreno B	0.5	2.7	0.4
51	1576	1576	Espatuleno	-	1.3	-
52	-	1643	N.I., C ₁₅ H ₂₄	0.7	-	-

N.I. – No identificado;

* – Índices de Kováts, determinados experimentalmente.

Para el caso del extracto, obtenido por SFE, el biciclosesquifelandreno (32.8%) fue el componente mayoritario, seguido del β -pineno (30.4%), el sabineno (9.3%), el β -cariofileno (8.1%), el α -pineno (5.0%) y el limoneno (2.9%).

Los extractos, obtenidos por HD-MW y SDE, tuvieron una composición similar, destacándose la recuperación de la fracción altamente volátil por estas dos técnicas; por SFE, se extrajo una mayor cantidad de compuestos menos volátiles, *i.e.* sesquiterpenos y sus análogos oxigenados, tal como se puede apreciar en la

Tabla 4.

Tabla 4. Distribución por familias de los constituyentes presentes en los extractos de SDE, SFE y HD-MW, obtenidos de la cáscara del fruto de la *Swinglea glutinosa*.

Familias de compuestos	Cantidad relativa, %		
	SDE	HD-MW	SFE
Monoterpenos hidrocarbonados	80.2	80.8	48.4
Monoterpenos oxigenados	3.1	3.9	1.6
Sesquiterpenos	11.8	10.2	43.2
Sesquiterpenos oxigenados	1.2	0.4	4.3

3.2.2. Análisis comparativo de la composición de los extractos de la hoja de la *Swinglea glutinosa*, obtenidos por diferentes métodos de extracción.

En la **Figura 13** aparecen los perfiles cromatográficos típicos, utilizando una columna HP-5 (60 m) y empleando un detector selectivo de masas (MSD), de los metabolitos secundarios volátiles, aislados por SDE y SFE, de las hojas de la *Swinglea glutinosa*.

Más de 20 componentes, en concentraciones relativas >0.05 %, se encontraron en los extractos de la hoja del “Limón Africano”, obtenidos por SDE y SFE. En la **Tabla 5**, se registran los compuestos identificados y sus cantidades relativas (%). Las fórmulas estructurales de los constituyentes aparecen en la **Figura 11**.

El nerolidol (35.5%) fue el componente mayoritario en el extracto obtenido de las hojas, por SDE, seguido del α -pineno (25.8%), el biciclosesquifelandreno (17.9%), el β -cariofileno (3.7%), el germacreno B (2.8%) y el limoneno (2.3%).

En el extracto de la hoja, aislado por SFE, el componente principal fue el nerolidol (42.9%), seguido del biciclosesquifelandreno (26.1%), el espatulenol (6.7%), el germacreno B (4.6%), el β -cariofileno (3.6%) y el α -pineno (2.6%).

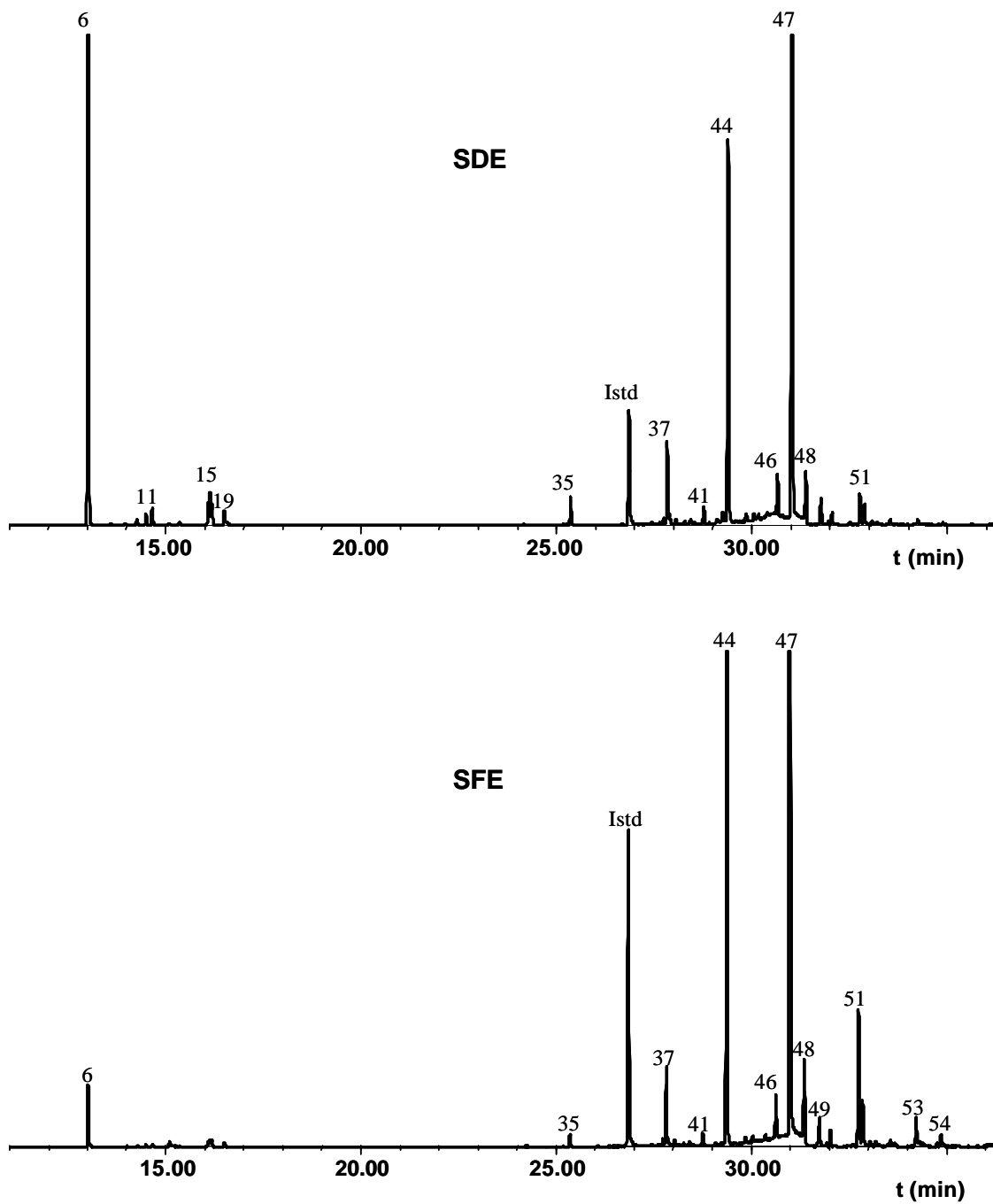


Figura 13. Perfiles cromatográficos típicos de los extractos de las hojas de la *Swinglea glutinosa*, obtenidos por SDE y SFE, respectivamente. Columna HP-5 (60 m). *Split* 1:30. MSD. La identificación de los componentes aparece en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Composición química de los metabolitos secundarios volátiles de la hoja de la *Swinglea glutinosa*, aislados por diferentes técnicas de extracción.

Pico N° (Figura12)	I _k teórico	I _k [*] HP-5	Compuesto	Cantidad relativa, %	
				SDE	SFE
6	939	940	α-Pineno	25.8	2.55
9	976	977	Sabineno	0.2	-
10	980	980	β-Pineno	0.5	0.1
11	991	990	β-Mirceno	0.8	0.1
15	1031	1031	Limoneno	2.3	0.2
16	1031	1032	β-Felandreno	0.9	0.3
19	1060	1060	γ-Terpineno	0.8	0.2
35	1340	1340	δ-Elemeno	1.2	0.6
37	1418	1419	b-Cariofileno	3.7	3.6
38	1434	1437	β-Sesquifencheno	0.2	0.3
39	1434	1439	Gurjuneno	0.1	0.1
40	1443	1443	β-Farneseno	0.2	0.2
41	1440	1454	α-Humuleno	0.8	0.6
43	1479	1479	α-Amorfeno	0.6	0.2
44	1487	1487	Biciclosesquifelandreno	17.9	26.1
45	-	1525	N.I., C ₁₅ H ₂₄	-	0.6
46	-	1530	N.I., C ₁₅ H ₂₄	3.1	3.2
47	1534	1534	Nerolidol	35.5	42.9
48	1556	1554	Germacreno B	2.8	4.6
49	-	1560	N.I., C ₁₅ H ₂₄	1.3	1.6
50	-	1567	N.I., C ₁₅ H ₂₄	0.5	0.7
51	1576	1576	Espatuleno	1.4	6.7
52	-	1643	N.I., C ₁₅ H ₂₄	1.1	2.6
53	-	1703	N.I., C ₁₅ H ₂₄ O	<i>tr</i>	1.4
54	-	1732	N.I., C ₁₅ H ₂₄ O	<i>tr</i>	0.7

N.I. – No identificado;

* – Índices de Kováts determinados experimentalmente.

El método SDE permite recuperar más eficientemente la fracción altamente volátil (monoterpenos hidrocarbonados), mientras que el extracto, obtenido por SFE, presentó mayor cantidad de sesquiterpenos y sus análogos oxigenados, tal como se puede apreciar en la **Tabla 6**.

Es de resaltar, que el número de componentes volátiles, presentes en el extracto de la hoja del “Limón Africano”, obtenido por SDE, no es tan alto como podría ser concluído de la **Tabla 6**. La fracción de hidrocarburos monoterpénicos está básicamente representada por el α -pineno (25.8%), cuyo pico cromatográfico intenso se puede apreciar en la **Figura 13**.

Tabla 6. Distribución por familias de los constituyentes presentes en los extractos, obtenidos por SDE y SFE, de la hoja de la *Swinglea glutinosa*.

Familias de compuestos	Cantidad relativa, %	
	SDE	SFE
Monoterpenos hidrocarbonados	31.3	3.4
Sesquiterpenos	33.5	44.8
Sesquiterpenos oxigenados	37.0	51.8

3.3. Análisis de la fracción volátil

Durante el proceso de extracción por las técnicas de HD-MW, SDE o SFE, la composición química de los extractos puede alterarse debido a que estos métodos utilizan agua y calor, que pueden inducir la formación de artefactos a través de la hidrólisis y/o termo-descomposición. Por esta razón, para el estudio de la fragancia “natural” de la fruta se emplea técnicas de *headspace* (HS), *i.e.* estático (S-HS) y HS-SPME, las cuales permiten evaluar de una manera no “invasiva”, más natural, la fragancia de la *Swinglea glutinosa* (fruta y hoja).

Es importante aclarar, que la composición química de las fracciones volátiles de la *Swinglea glutinosa* va a depender del método *headspace* empleado. S-HS es, tal vez, la técnica que mejor refleja la fragancia natural de la planta; la técnica de HS-SPME incluye una etapa de concentración, por lo tanto, la composición de las fracciones volátiles obtenidas va a depender del tiempo de exposición de estos componentes a la fibra, del tipo de recubrimiento de la fibra y de la temperatura.

Más de 50 componentes, en concentraciones relativas > 0.01%, se encontraron en las fracciones volátiles de hoja, cáscara de fruto y del AE de la cáscara del fruto del “Limón Africano”, obtenidas por S-HS y HS-SPME. En la **Tabla 7** se registran los compuestos identificados y sus cantidades relativas (%). Las fórmulas estructurales de estas sustancias aparecen en la **Figura 11**.

Tabla 7. Composición química de los metabolitos secundarios volátiles de la *Swinglea glutinosa*, aislados por métodos *headspace*.

Pico N° (Figuras14-16)	I _k teórico	Compuestos	Cantidad relativa, %					
			Hoja		Cáscara		AE de la cáscara	
			S-HS	HS-SPME	S-HS	HS-SPME	S-HS	HS-SPME
1	851	(Z)-3-Hexen-1-ol	-	0.2	-	-	-	<0.01
2	859	(Z)-2-Hexen-1-ol	-	-	-	-	-	<0.01
3	867	1-Hexanol	-	-	-	-	-	0.1
4	880	Acetato de isoamilo	-	-	-	-	-	<0.01
5	931	α-Tujeno	-	-	0.3	0.3	0.2	0.3
6	939	α-Pineno	92.7	14.1	18.3	19.1	19.1	13.5
7	953	Canfeno	-	-	0.55	0.4	0.57	0.6
8	961	Benzaldehído	-	-	-	-	-	<0.01
9	976	Sabineno	0.8	0.1	23.3	18.5	30.0	20.7
10	980	β-Pineno	1.6	0.3	51.2	40.8	38.6	26.7
11	991	β-Mirceno	-	0.4	0.33	0.9	0.9	<0.01
12	1005	α-Felandreno	-	-	-	0.1	0.7	0.4
13	1018	α-Terpineno	-	-	-	<0.01	-	2.1
14	1026	p-Ocimeno	-	-	-	<0.01	-	0.2
15	1031	Limoneno	1.0	0.4	4.2	5.1	7.3	9.0
16*	1031	β-Felandreno	-	1.1	0.1	1.5	0.9*	7.1*
17*	1033	1,8-Cineol	-	-	<0.01	0.5	-	-
18	1050	<i>trans</i> -β-Ocimeno	-	-	-	0.2	-	0.1
19	1062	γ-Terpineno	-	0.3	-	0.1	0.2	3.3
20	1068	<i>trans</i> -Tujanol	-	-	-	<0.01	-	<0.01
21	1088	α-Terpinoleno	-	-	-	0.1	-	1.0
22	1098	Linalol	-	-	-	<0.01	-	0.4
23	1098	Oxido de linalol	-	-	-	<0.01	-	0.1
24	1117	Alcohol fenchílico	-	-	-	-	-	<0.01

25	1121	<i>cis</i> -p-2-Meten-1-ol	-	-	-	-	-	0.1
26	1140	<i>trans</i> -p-2-Meten-1-ol	-	-	-	-	-	0.1
27	1140	Sabinol	-	-	-	-	-	<0.01
28	1165	Borneol	-	-	-	-	-	0.1
29	1177	Terpinen-4-ol	-	-	-	<0.01	0.6	4.8
30	1189	α -Terpineol	-	-	-	<0.01	-	1.9
31	1193	<i>cis</i> -Piperitol	-	-	-	-	-	0.1
32	1205	<i>trans</i> -Piperitol	-	-	-	-	-	<0.01
33	1255	Geraniol	-	-	-	-	-	<0.01
34	-	N.I., C ₁₅ H ₂₄	-	-	-	-	-	<0.01
35	1340	δ -Elemeno	0.4	5.1	0.2	0.6	0.1	0.4
36	1391	β -Elemeno	-	-	-	0.1	-	0.1
37	1418	b-Cariofileno	0.7	14.2	0.4	3.1	0.1	1.0
38	1434	β -Sesquifencheno	0.4	1.1	0.1	0.1	0.1	0.1
39	1437	β -Gurjuneno	-	0.5	-	0.2	-	<0.01
40	1443	β -Farneseno	-	0.6	-	-	-	<0.01
41	1440	α -Humuleno	-	1.5	-	-	-	0.1
42	1477	γ -Muuroleno	-	0.8	-	-	-	0.1
43	1479	α -Amorfeno	-	0.7	-	-	-	0.1
44	1487	Biciclosesquifelandreno	1.8	52.7	0.8	6.9	0.3	3.8
45	-	N.I., C ₁₅ H ₂₄	-	0.6	-	-	-	0.1
46	-	N.I., C ₁₅ H ₂₄	-	-	-	-	-	0.1
47	1534	Nerolidol	-	3.8	-	0.3	-	0.1
48	1556	Germacreno B	-	2.6	-	0.2	-	0.1
49	-	N.I., C ₁₅ H ₂₄	-	-	-	-	-	<0.01
50	-	N.I., C ₁₅ H ₂₄	-	-	-	-	-	<0.01
51	1576	Espatulenol	-	-	-	-	-	<0.01
52	-	N.I., C ₁₅ H ₂₄	-	-	-	-	-	<0.01

* - Co-elución parcial de (β -felandreno y 1,8-cineol);

N.I. – No identificado.

Como se puede observar en la **Tabla 7** y en las **Figuras 14-16**, correspondientes a los perfiles cromatográficos de los volátiles, obtenidos por HS-SPME (tiempo de exposición de 60 min), el número de componentes extraídos de la fase vapor de las hojas, cáscara del fruto y del AE de la cáscara del fruto de la *Swinglea glutinosa*, es más alto, que en el cromatograma de volátiles, obtenido por S-HS.

En las fracciones volátiles del AE y cáscara del fruto, el componente que se extrajo en mayor proporción, por ambos métodos *headspace* empleados, fue el β -pineno (26-52%), seguido del sabineno (18-30%), el α -pineno (13-20%), el limoneno (4-10%), el biciclosesquifelandreno (0.2-0.7%) y el β -cariofileno (0.1-4%).

Para los volátiles de la hoja, la técnica HS-SPME permitió concentrar los sesquiterpenos oxigenados en mayor proporción, que los obtenidos por S-HS, por lo que las cantidades relativas de cada uno de los componentes varió sustancialmente, según la técnica. Para el S-HS, el componente mayoritario fue el α -pineno (92.7%), mientras que para HS-SPME, a los 60 min de exposición de la fibra, el compuesto principal aislado fue el biciclosesquifelandreno (52.7%).

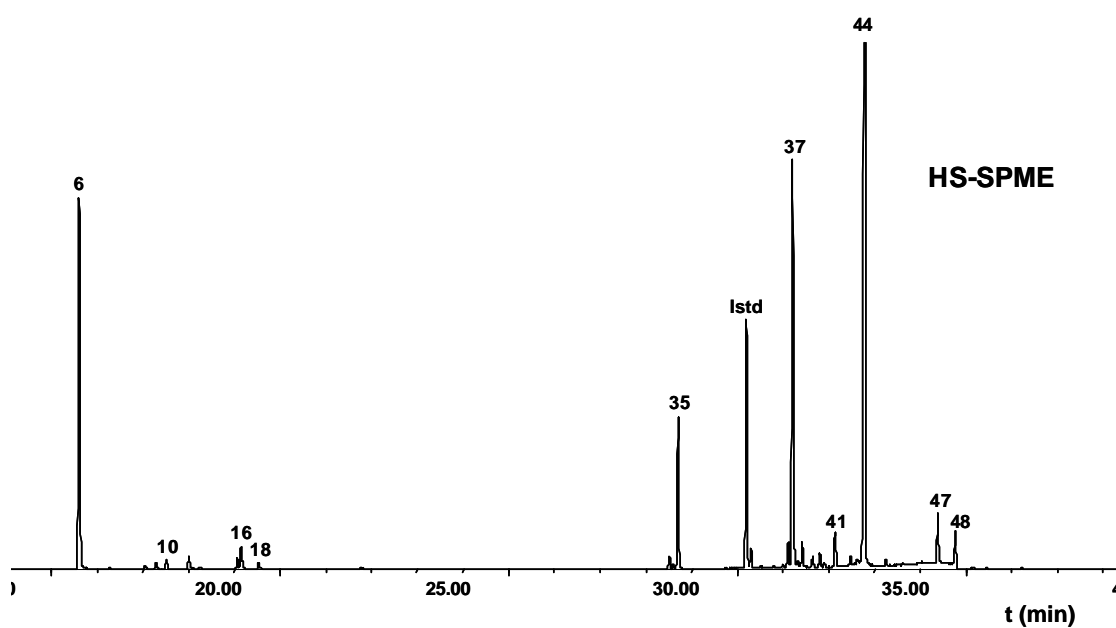
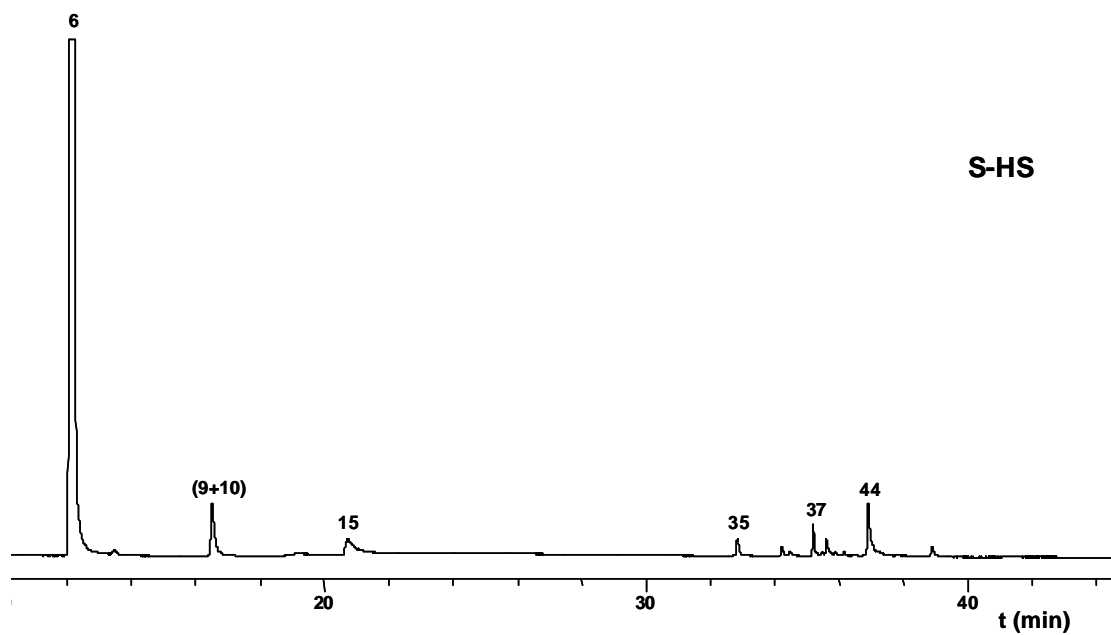


Figura 14. Perfiles cromatográficos típicos, de los volátiles de la hoja de la *Swinglea glutinosa*, obtenidos por diferentes métodos *headspace*. Columna HP-5. *Split* 1:30. Detectores FID y MSD, respectivamente. La identificación de los componentes aparece en la **Tabla 7**.

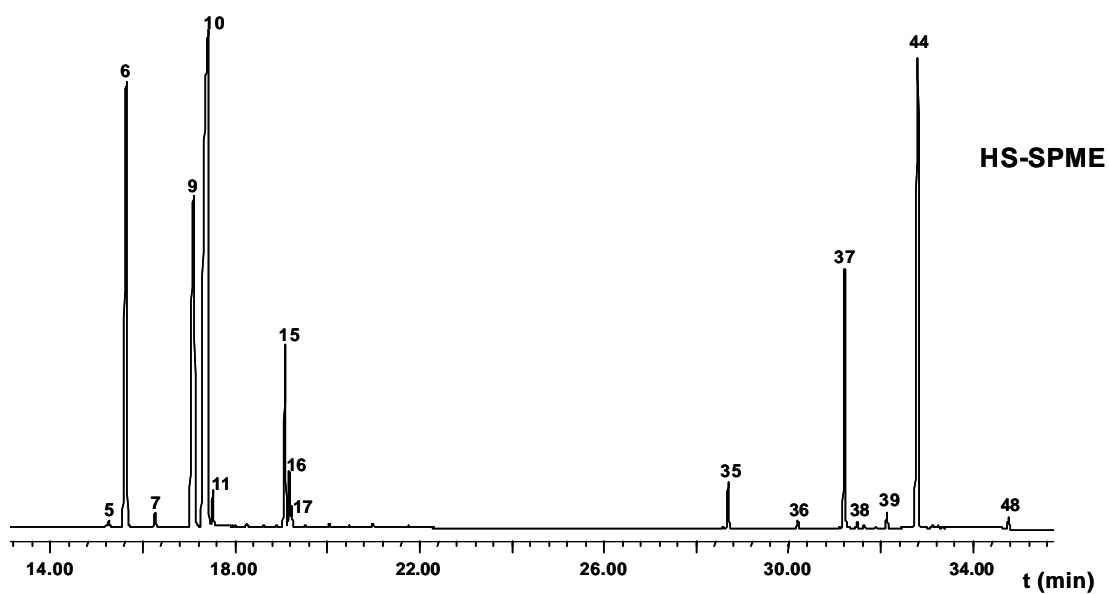
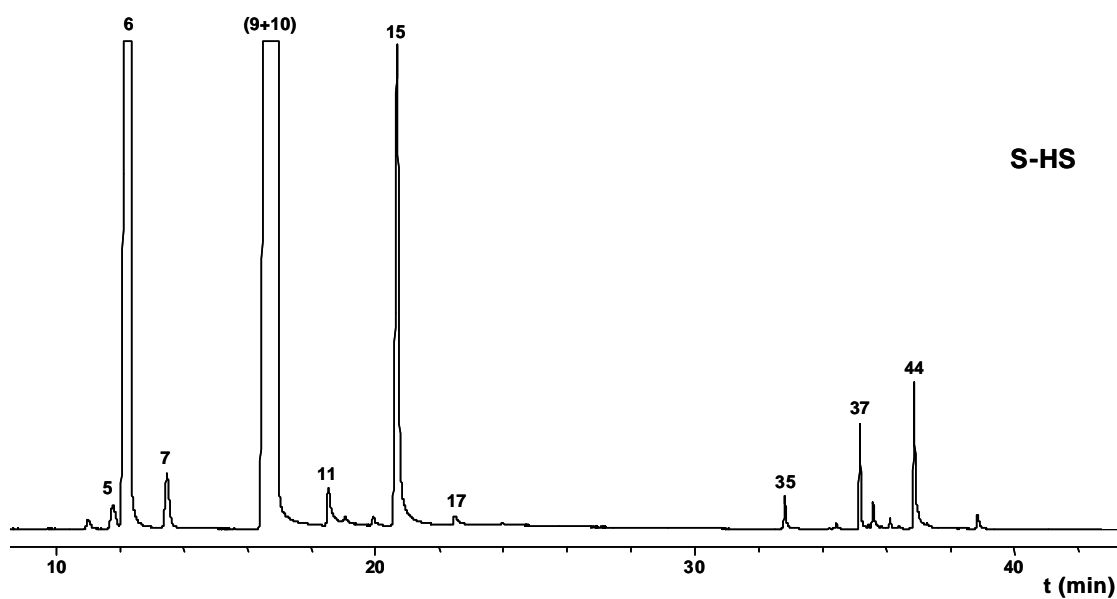


Figura 15. Perfiles cromatográficos típicos, de los volátiles de la cáscara del fruto de la *Swinglea glutinosa*, obtenidos por diferentes métodos *headspace*. Columna HP-5. *Split* 1:30. Detectores FID y MSD, respectivamente. La identificación de los componentes aparece en la **Tabla 7**.

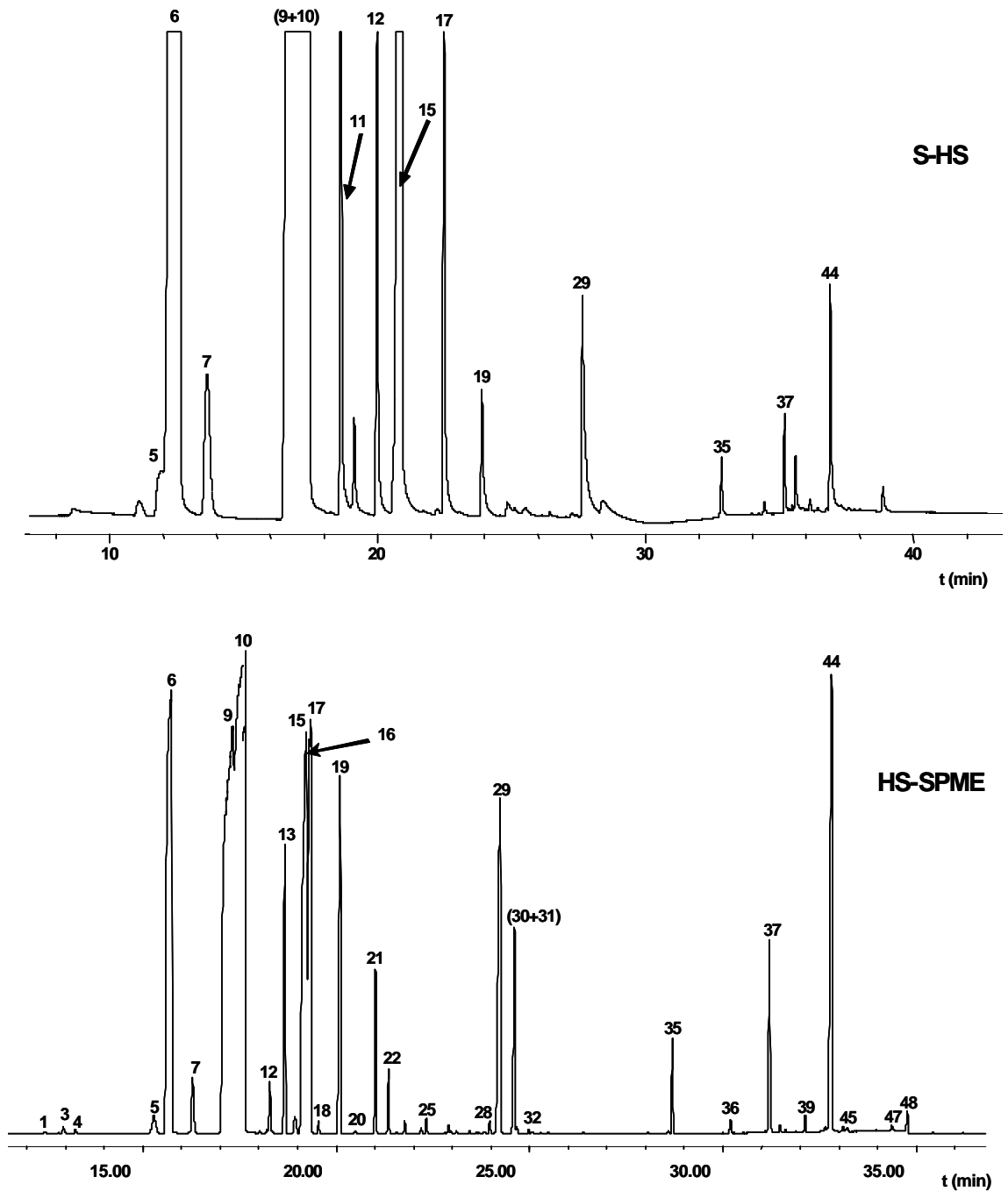


Figura 16. Perfiles cromatográficos típicos, de los volátiles de la fase vapor del aceite esencial de la cáscara del fruto de la *Swinglea glutinosa*, obtenidos por métodos *headspace*. Columna HP-5. *Split* 1:30. Detectores FID y MSD, respectivamente. La identificación de los componentes aparece en la **Tabla 7**.

Los componentes, extraídos por S-HS, fueron básicamente monoterpenos hidrocarbonados y algunos monoterpenos oxigenados. Para la técnica HS-SPME, la composición de las sustancias aisladas depende mucho del tiempo de exposición de la fibra, así como se puede observar en la **Figura 17**. Durante el proceso de extracción por HS-SPME, inicialmente, los componentes que tienen mayor velocidad de difusión, *i.e.* monoterpenos, llegan a la fibra y son absorbidos, luego, el recubrimiento de la fibra se satura progresivamente con aquellos analitos, que tienen menor volatilidad y velocidad de difusión, pero mayor coeficiente de distribución (K_D), que los monoterpenos, *i.e.* sesquiterpenos. A mayor tiempo de exposición de la fibra se extrae un mayor número de componentes menos volátiles, en este caso, sesquiterpenoides.

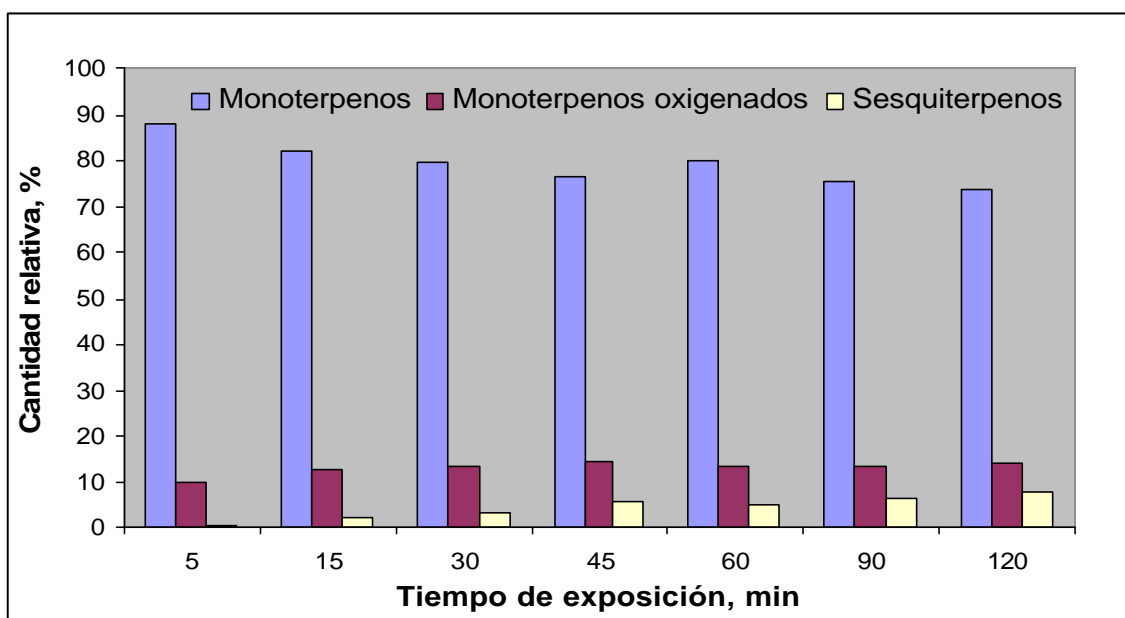


Figura 17. Distribución de las principales familias de compuestos, en el *headspace* del aceite esencial de la cáscara del fruto de la *Swinglea glutinosa*, aisladas por HS-SPME, en función del tiempo de exposición de la fibra (PDMS, 100 μm).

3.4. Análisis por MS

La identificación de los componentes presentes en el aceite esencial y los extractos de la *Swinglea glutinosa*, se realizó empleando simultáneamente los valores de índices de retención de Kováts, para ello se utilizaron sustancias patrón de hidrocarburos lineales (C₉-C₂₈), y sus espectros de masas (MS), obtenidos por el impacto de electrones (70 eV).

Los espectros de masas experimentales de cada uno de los componentes de la mezcla se compararon con los de las bases de datos del equipo, a saber: WILEY138 (138.000 compuestos) y NBS75K (75.000 compuestos). También se llevó a cabo el estudio de sus posibles rutas de fragmentación. Durante la búsqueda automática, se consideró la confirmación confiable de la estructura, cuando el grado de coincidencia de su espectro experimental con el de la base de datos, superaba el 85 %.

A continuación, se presenta el análisis de los espectros de masas experimentales de algunas sustancias representativas, encontradas en cantidades relativas altas, que pertenecen a los diferentes grupos de metabolitos secundarios volátiles, aislados de la cáscara del fruto y de las hojas de la *Swinglea glutinosa*. En este caso, se tomó una sustancia de cada familia de compuestos, para realizar el estudio de las rutas típicas de fragmentación, observadas en el espectro de masas.

MS de monoterpenos hidrocarbonados

Los espectros de masas de los monoterpenos presentan señales características comunes (m/z 136, 121, 93, 79 y 77), cuya aparición se atribuye a la rápida isomerización de los iones moleculares debido a la migración de los enlaces dobles bajo el impacto de electrones, que conduce a la formación de iones moleculares isomerizados, de estructura común [32]. Cuando se analizan isómeros monoterpénicos bajo las mismas condiciones, los espectros son a menudo similares cualitativamente, pero presentan diferencias significativas en las intensidades relativas de algunos picos, debido a que las energías conformacionales iniciales de los monoterpenos no son iguales y esto permite su diferenciación por espectro de masas [21, 31].

α -Pino

En el MS del α -pino (**Figura 18**) se observan los picos característicos de los monoterpenos, destacándose la presencia del ión molecular, M^+ , en m/z 136 de intensidad media (8%), que debido a la presencia del enlace doble experimenta una ruptura alílica, generando el ion $[M-CH(CH_2)_3]^+$ en m/z 93 (100%), pico de base. En el **Esquema 1** se observan las posibles rutas fragmentación del α -pino.

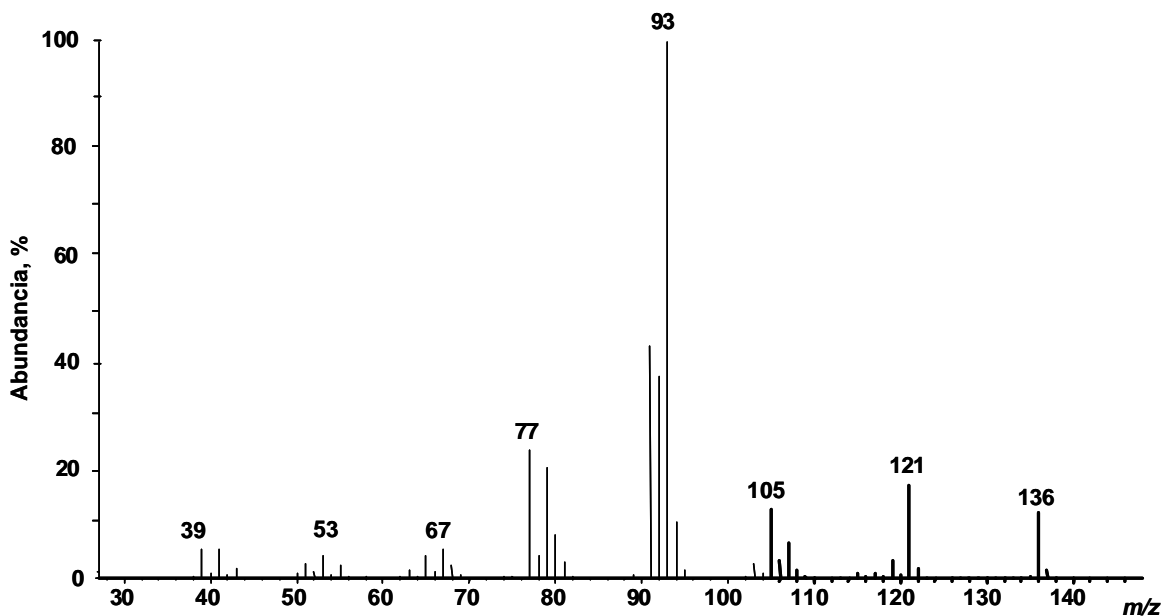
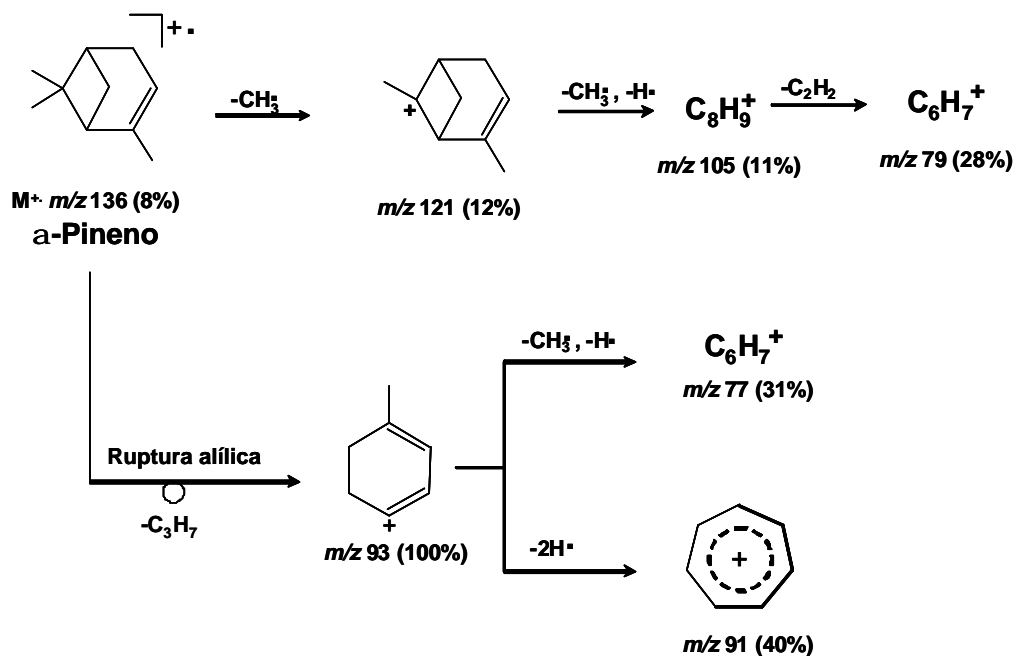


Figura 18. Espectro de masas del α -pineno.



Esquema 1. Posibles rutas de fragmentación del α -pineno.

MS de monoterpenoles

La fragmentación de los monoterpenoles está “marcada” por la presencia del grupo –OH. Sus espectros de masas son más complejos, que los de monoterpenos hidrocarbonados correspondientes. Típicamente, los iones moleculares de los alcoholes presentan intensidad baja o no son detectados. En el caso de los monoterpenoles, la presencia del grupo hidroxilo se puede confirmar en el espectro de masas por la aparición de los iones $(M-H_2O)^+$ en m/z 136 y $(M-H_2O-CH_3)^+$ en m/z 121 [21, 31].

α -Terpineol

En el espectro de masas (MS) del α -terpineol (**Figura 19**) no aparece la señal del ión molecular M^+ en m/z 154; sin embargo, la aparición de los iones $(M-CH_3)^+$ en 139 (15%), $(M-H_2O)^+$ en m/z 136 (88%) y el $(M-H_2O-CH_3)^+$ en m/z 139 (121%), indica su formación inicial y permite elucidar el respectivo peso molecular. El pico de base en el espectro del α -terpineol corresponde al fragmento oxigenado $C_3H_7O^+$ en m/z 59 (100%), que se produce por una ruptura α del enlace exocíclico del ión molecular M^+ . En el **Esquema 2** se observan las posibles rutas de fragmentación del α -terpineol.

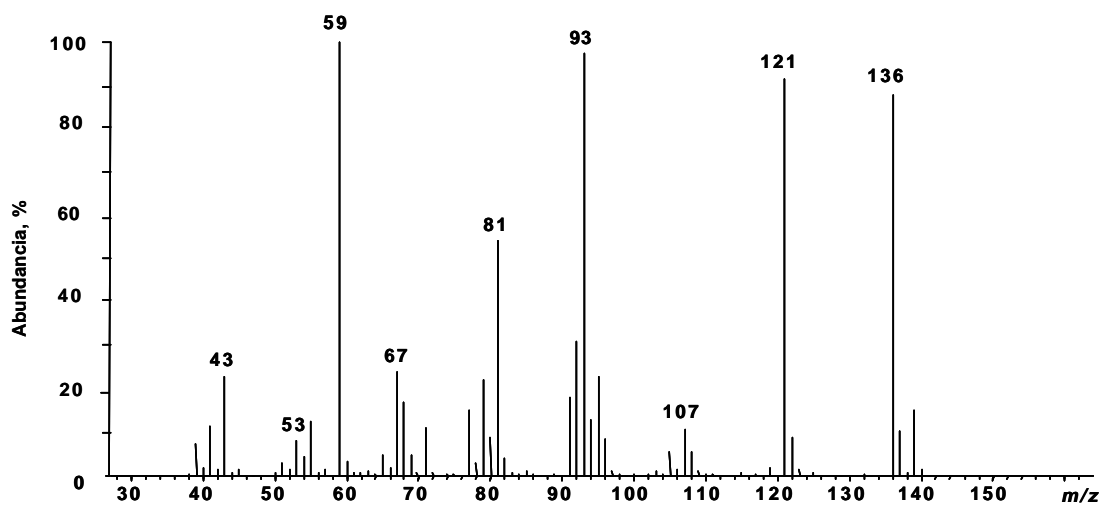
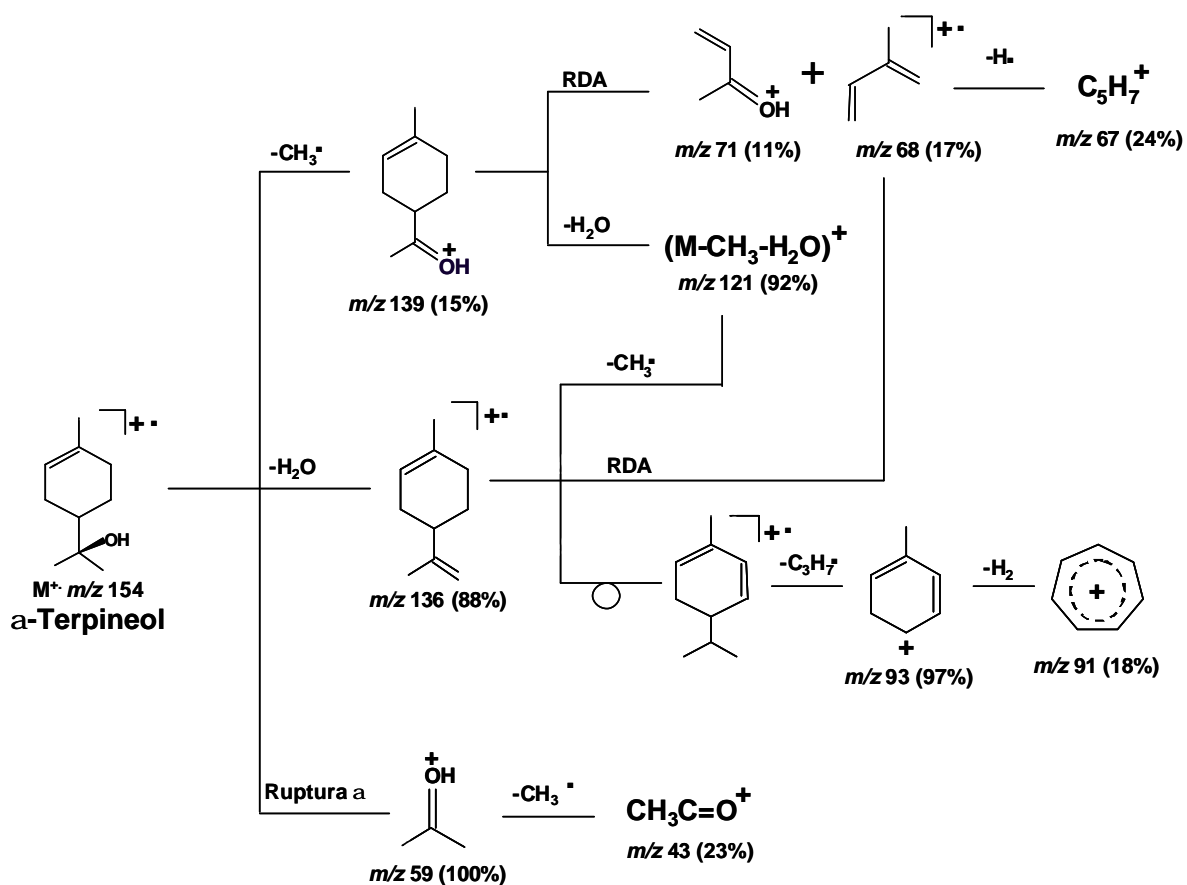


Figura 19. Espectro de masas del α -terpineol.



Esquema 2. Posibles rutas de fragmentación del α -terpineol.

MS de sesquiterpenos

Los espectros de masas (MS) de estos compuestos se caracterizan, en muchos casos, por la señal intensa en m/z 161, que corresponde al ión $(M-C_3H_7)^+$. La presencia de estructuras cíclicas de sesquiterpenos imparte cierta estabilidad al ión molecular [21, 31]; casi para todos los sesquiterpenos se puede observar la formación del ion M^+ en el espectro.

Biciclosesquifelandreno

En el espectro de masas del biciclosesquifelandreno (**Figura 20**) se observa el ión molecular (M^+) en m/z 204 de intensidad media (17%), que decae por la pérdida del radical isopropílico, de la molécula ionizada, con formación del ión, pico de base, $(M-C_3H_7)^+$ en m/z 161. Éste genera los iones-fragmento en m/z 133 y 105 (15 y 42%, respectivamente), productos de dos reacciones monomeleculares consecutivas de tipo *retro Diels-Alder* (RDA), tal como se puede observar en el **Esquema 3**.

El pico de base $(M-C_3H_7)^+$, además, sufre un reordenamiento, por deslocalización de la carga positiva, y reacciones RDA consecutivas, para generar los iones $C_9H_{11}^+$ en m/z 119 (27%), $C_7H_7^+$ en m/z 91 (34%) y $C_6H_7^+$ en m/z 79 (20%), que son fragmentos “diagnostico” en el espectro de masas del biciclosesquifelandreno.

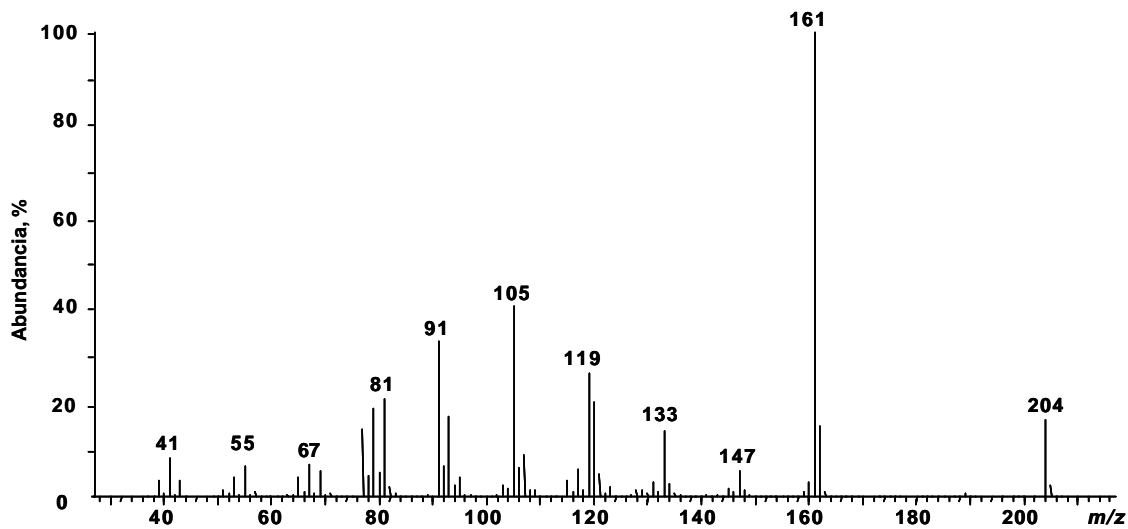
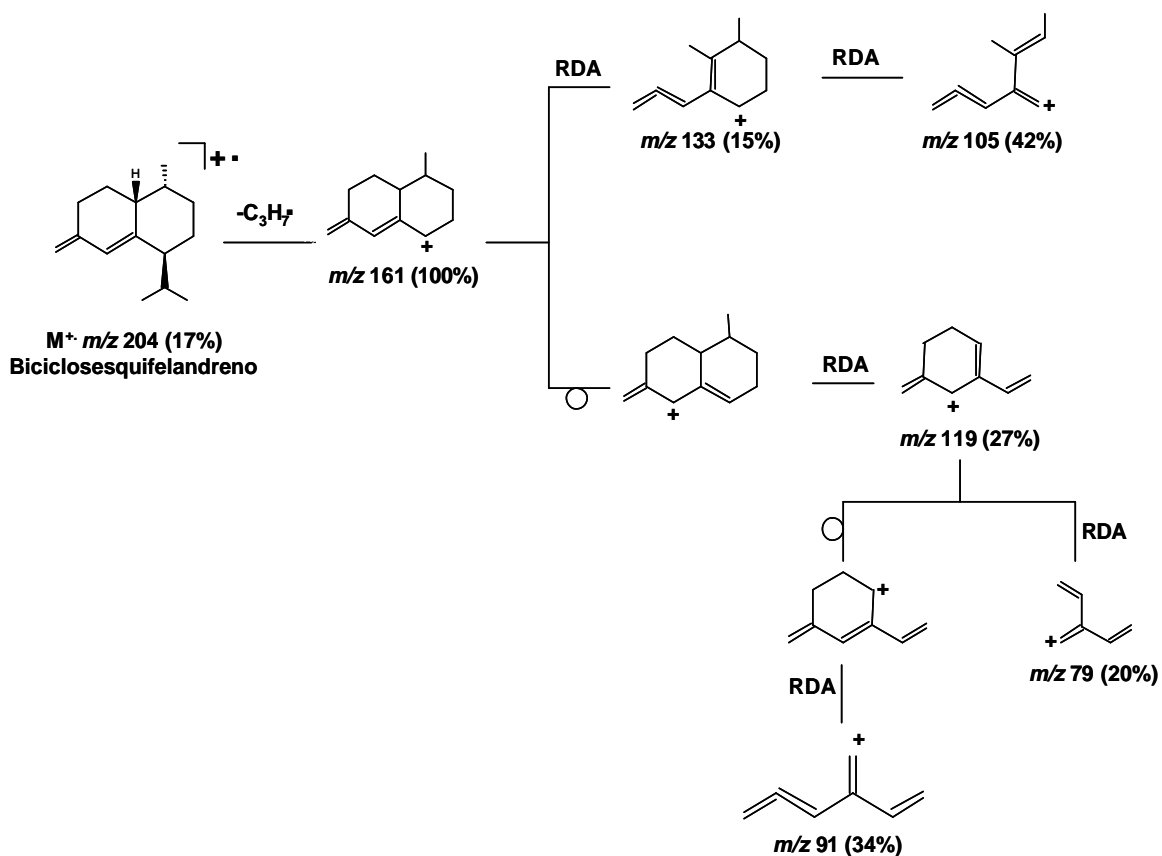


Figura 20. Espectro de masas del bicyclosesquifelandreno.



Esquema 3. Posibles rutas de fragmentación del bicyclosesquifelandreno.

MS de sesquiterpenoles

La fragmentación de los sesquiterpenoles, al igual que la de los monoterpenoles, es afectada por la presencia del grupo –OH. Los MS de los sesquiterpenoles, son mucho más complejos que los de los sesquiterpenos correspondientes. La intensidad del ión molecular (m/z 222) es generalmente baja, o a menudo esta señal no se observa [21, 31].

Nerolidol

En el MS del nerolidol (**Figura 21**) no se registra el ión molecular M^+ en m/z 222, característica que se mencionó anteriormente para este tipo de compuestos. El pico de base, en m/z 69, presente en el MS del nerolidol, se produce por la eliminación de una molécula de agua, con la formación del ión $(M-H_2O)^+$ en m/z 204 (2%), acompañada luego de una ruptura alílica (b). El pico de base decae por pérdida de una molécula neutra (C_2H_4), generándose el ión $C_3H_5^+$ en m/z 41 (40%). En el **Esquema 4** se observan las posibles rutas de fragmentación del nerolidol.

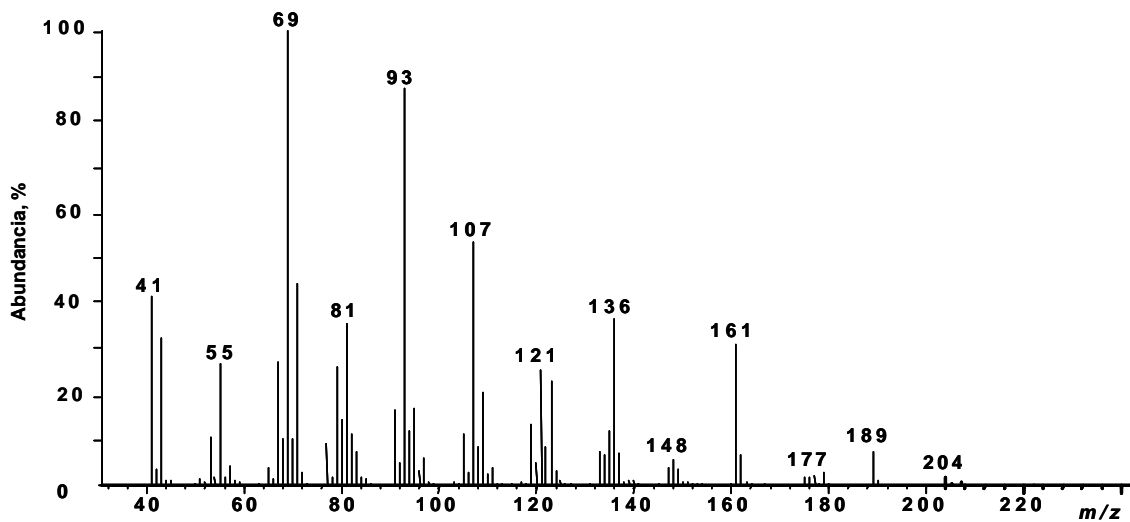
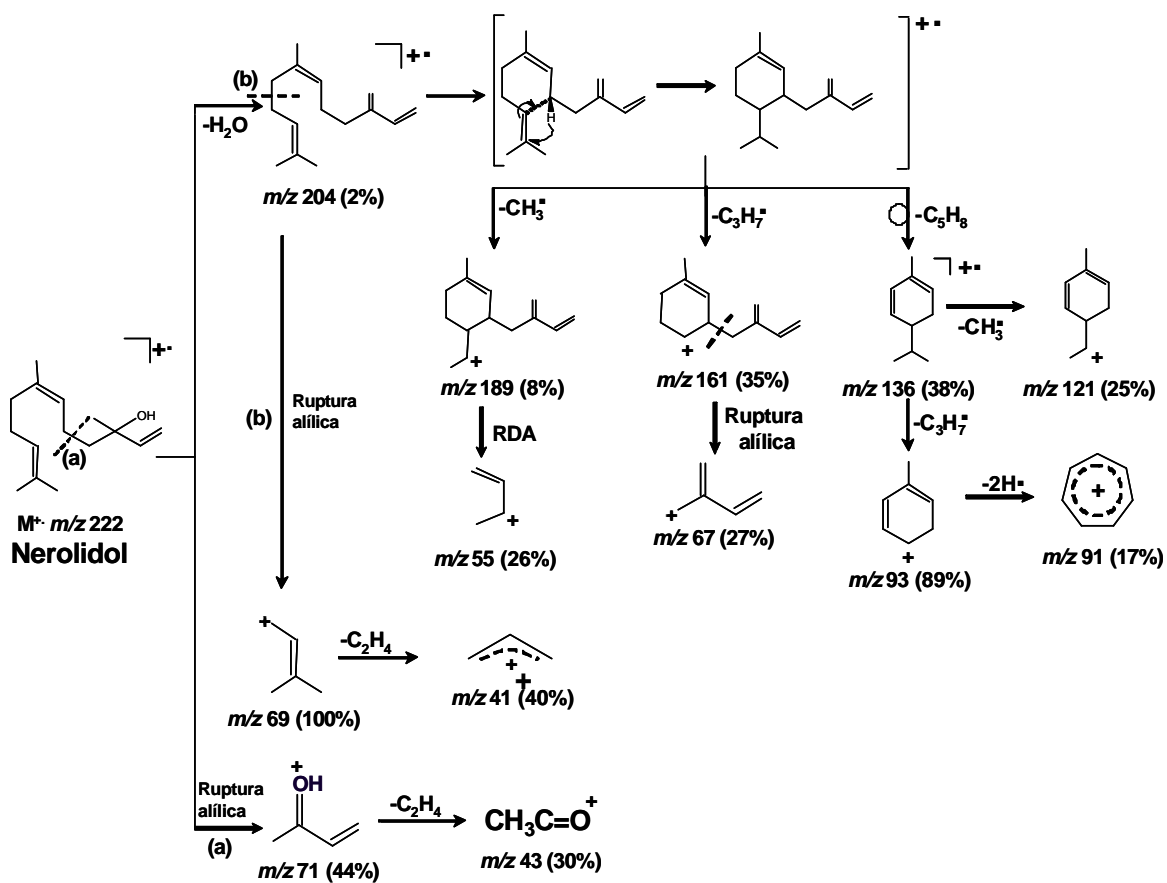


Figura 21. Espectro de masas del nerolidol.



Esquema 4. Posibles rutas de fragmentación del nerolidol.

Casos especiales de co-elución de picos cromatográficos

Un problema, bastante frecuente, en la caracterización y cuantificación de componentes en los extractos, que contienen una gran cantidad de sustancias, es la co-elución de dos o más compuestos.

Cuando co-eluyen varias sustancias, el área bajo la curva cromatográfica registrada equivale a la suma de las áreas generadas por cada uno de estos componentes. Ésto produce una dificultad al cuantificar cada uno de los compuestos.

Tal es el caso de los picos cromatográficos no resueltos, en el cromatograma del aceite esencial de la cáscara del fruto de la *Swinglea glutinosa*, obtenido por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas. Se presenta la elusión del limoneno (**A**), β -felandreno (**B**) y del 1,8-cineol (**C**) a tiempos de retención muy cercanos (18.5-19.5 min), generando un perfil cromatográfico típico, que se muestra en la **Figura 22**.

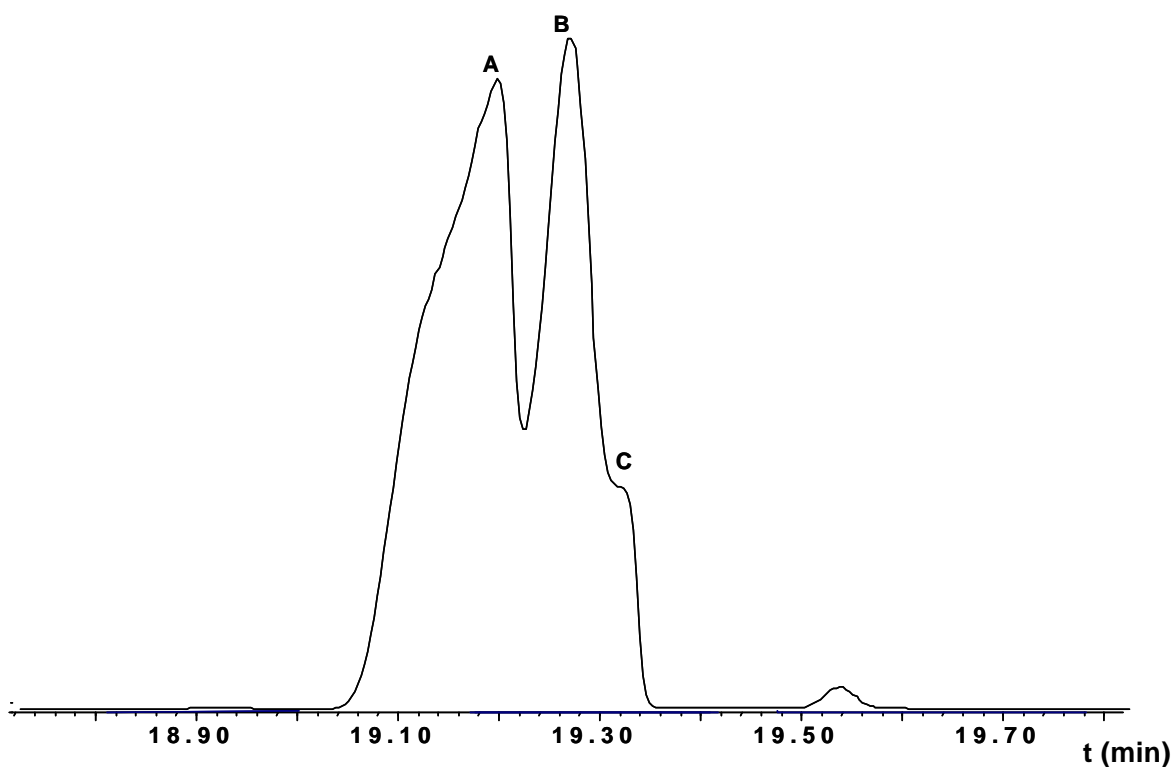


Figura 22. Picos cromatográficos no resueltos en el cromatograma del AE de la cáscara del fruto de la *Swinglea glutinosa*, obtenido por HD-MW, que corresponden a los compuestos A. Limoneno, B. β -Felandreno y C. 1,8-Cineol. Columna HP-5 (60 m). Split 1:30. MSD.

Para verificar que hay varios componentes que están co-eluyendo, se toma el espectro de masas al inicio, en el centro y al final de la banda cromatográfica, para observar si los espectros de masas en cada uno de estos puntos, son idénticos o no. Por ejemplo, se tomaron los espectros de masas en los puntos A, B y C, del pico cromatográfico, que se puede observar en la **Figura 22**. Los tres espectros de masas eran diferentes (ver **Figura 23**), confirmando que sí se presentó co-elución parcial de tres componentes.

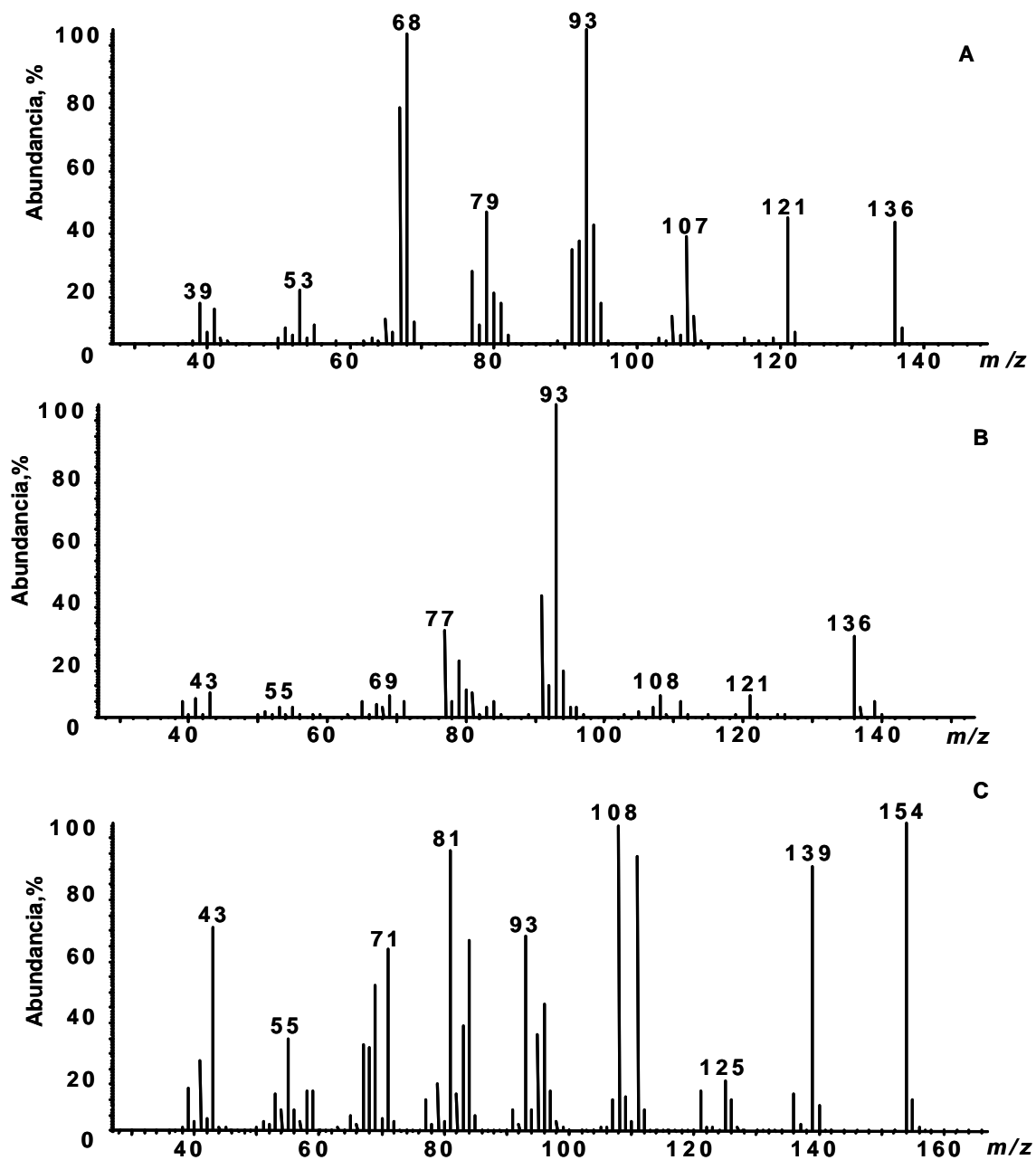


Figura 23. Espectros de masas tomados en los puntos A, B, C del pico cromatográfico que eluye a $t_R=18.9-19.5$ min en el cromatograma del AE de la cáscara del fruto de la *Swinglea glutinosa*, obtenido por HD-MW, que corresponden a los compuestos **A**. Limoneno, **B**. β -Felandreno y **C**. 1,8-Cineol. Columna HP-5 (60 m). Split 1:30. MSD.

Para solucionar el inconveniente en la cuantificación, el sistema de datos tiene una herramienta llamada “extracción del ión seleccionado”, que permite “separar” e integrar individualmente cada uno de los componentes que co-eluyen. Para esto, se necesita conocer los iones característicos presentes en los espectros de masas de cada una de las sustancias y buscar aquellos, que los diferencien, y además, presentan abundancias más altas.

En la **Figura 23** se puede observar los iones en el ión en m/z 139 y 154 aparecen únicamente en el espectro de masas del compuesto **C**, por lo que pueden ser utilizados para la operación de extracción del ion seleccionado, típico para la sustancia **C**. Para la sustancia **B** el ion a utilizar es m/z 93 y para **A** es el ion m/z 68.

Después de haber seleccionado los iones, el software muestra fragmentogramas de masas, que aparecen en la **Figura 24**. Se puede observar individualmente, cada uno de los picos co-eluyentes, con t_R diferentes. Después de obtener los fragmentogramas, se puede integrar las áreas y encontrar la relación entre estos tres compuestos y, finalmente, cuantificarlos.

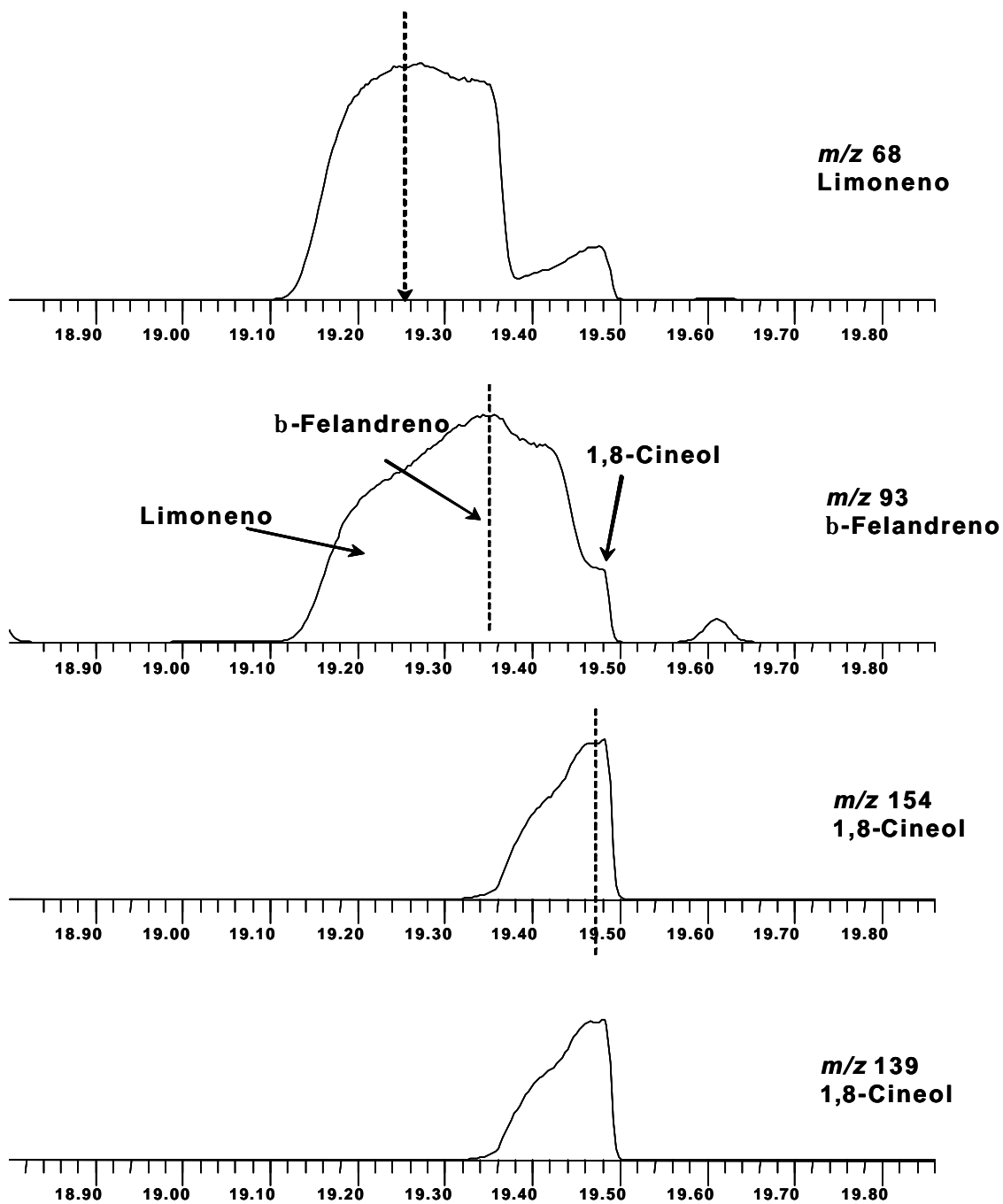


Figura 24. Fragmentogramas de masas correspondiente a los iones m/z 68, 93, 139 y 154, en los espectros de masas del limoneno, β -felandreno y 1,8-cineol.

4. CONCLUSIONES

Por primera vez, se realizó un estudio de los metabolitos secundarios volátiles de las hojas y cáscara del fruto de la *Swinglea glutinosa*, empleando cinco técnicas de extracción, a saber: hidrodestilación asistida por la radiación de microondas, destilación extracción con solvente simultánea, extracción con fluido supercrítico, *headspace* estático y microextracción en fase sólida en el modo *headspace*.

Se detectaron 51 componentes en concentraciones >0.01%, de los cuales el 90% han sido identificados. Para su identificación se usaron dos criterios, cromatográfico (índices de Kováts) y espectrométrico (espectros de masas, EI, 70 eV).

El rendimiento del aceite esencial, obtenido de la cáscara del fruto de la *Swinglea glutinosa*, por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas, fue de $0.176 \pm 0.004\%$ (p/p).

Se llevó a cabo el estudio comparativo de tres técnicas de inyección, a saber: *split* relación 1:30, *splitless* y *on-column* en frío. En la misma columna, bajo las mismas condiciones operacionales, se obtuvo mejor separación y se registró mayor número de picos, cuando el aceite esencial (0.03%, CH₂Cl₂, volumen de inyección

1 μL), fue inyectado en el modo *cold on-column*.

α -Pinoeno, sabineno, β -pinoeno, limoneno, β -cariofileno, biciclosesquifelandreno, espatulenol, germacreno B y nerolidol fueron los compuestos mayoritarios, extraídos de las hojas y cáscara del fruto de la *Swinglea glutinosa*. Su cantidad relativa en los extractos dependió de la técnica de extracción y de la parte de la planta, así como aparece a continuación:

Compuestos mayoritarios	Cantidad relativa, %				
	Hoja		Cáscara del fruto		
	SFE	SDE	HD-MW	SDE	SFE
α -Pinoeno	2.6	25.8	12.0	10.4	5.0
Sabineno	-	0.2	11.0	11.5	9.3
β -Pinoeno	0.1	0.5	49.6	51.9	30.4
Limoneno	0.2	2.3	4.4	3.4	2.9
β -Cariofileno	3.6	3.7	1.5	2.9	8.1
Biciclosesquifelandreno	26.1	17.9	8.1	8.4	32.8
Nerolidol	42.9	35.5	<0.01	<0.01	0.3
Germacreno B	4.6	2.8	0.4	0.5	2.7
Espatulenol	6.7	1.4	<0.01	<0.01	1.3

Para el estudio de la fragancia de la planta, en su forma natural, fue mejor la técnica S-HS, mientras que para analizar sustancias volátiles y semi-volátiles, el método más adecuado fue la hidrodestilación asistida por la radiación de

microondas y destilación-extracción con solvente simultánea. Para obtener mayor cantidad de sesquiterpenos, se requiere emplear la extracción con fluido supercrítico.

El aceite esencial de la *Swinglea glutinosa* estudiado por primera vez, por su composición tan interesante (porcentaje de compuestos oxigenados alto) y su fragancia agradable, tenue, floral-frutal puede ser de interés para la industria de sabores, fragancias, perfumes, etc., conduciendo a la posible explotación industrial de este arbusto tropical.

5. RECOMENDACIONES

Estudiar organolépticamente el aceite esencial de la cáscara del fruto de la *Swinglea glutinosa*, por parte de los expertos-catadores, con el fin de disponer de su opinión, importante para la aplicación y el uso del aceite en la industria de perfumes.

Estudiar la posible propiedad antioxidante del aceite esencial de la cáscara del fruto de la *Swinglea glutinosa*, usando diferentes métodos de evaluación, e.g. atrapamiento de radicales y/o por reacciones tipo Fenton.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. ADAMS, Robert, Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy, Ed. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 1995, 469 p.
2. BANDONI, Arnaldo (Ed.), Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica: Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores, Ed. Universidad Nacional de La Plata, Argentina, 2000, p.p. 13-58, 103-242.
3. CASTRO, M. D. Luque de, VALCARCEL, M. & TENA, M. T., Analytical Supercritical Fluid Extraction, Ed. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1994, 321 p.
4. CORREA, J.E y BERNAL, H.Y., Especies Vegetales Promisorias de los Países del Convenio Andrés Bello, Santafé de Bogotá, 1989, 10 v.
5. CRONQUIST, A., An Integrated System of Classification of Flowering Plants, Ed. Columbia University Press, New York, 1981, 1262 p.
6. EKUNDAYO. O., A Review of the Volatiles of the *Annonaceae*, *J. Ess. Oil Res.*, 1989, 1, 223-245.

7. FENNEMA, O. R., KAREL, M., SANDERSON, G. W., WASTRA, P. and WHITAKER, J. R., Flavor Fragrance and Odor Analysis, Ed. Ray Marsili, New York, 2002, p.p. 25-31.
8. GARCÍA BARRIGA, H., Flora Medicinal de Colombia, Ed. Tercer Mundo, Bogotá, 1992, 3 v.
9. GODEFROOT, M., SANDRA, P. and VERSALE, M., New Method for Quantitative Essential Oil Analysis, *J. Chromatogr.*, 1981, 203, 225-335.
10. GROS, E. G., POMILIO, A. B., SELDES, A. M., y BURTON, G., INTRODUCCIÓN AL ESTUDIO DE LOS PRODUCTOS NATURALES, Ed. O.E.A., Buenos Aires, 1985, p.p. 3-12.
11. IKAN, Raphael, NATURAL PRODUCTS. A Laboratory Guide, Ed. Academic Press, San Diego, 1991, p.p. 168-185.
12. JENNINGS, W. and SHIBAMOTO, T., Qualitative Analysis of Flavor and Fragrance Volatiles by Glass Capillary Gas Chromatography, Ed. Academic Press, London, 1980, 472 p.
13. KAUFMAN, P. B., CSEKE, L. J., WARBER, S., DUKE, J. A. and BRIELMANN, H. L., Natural Products from Plants, Ed. CRC Press, Boca Raton, 1999, p.p. 9-18.
14. KINGTON, H. & HASWELL, S., Microwave-Enhanced Chemistry: Fundamentals, Sample Preparation and Applications, Ed. American Chemical Society, Washington, 1997, p.p. 3-20.

15. KINGSTON, H. & JASSIE L., Introduction to Microwave Sample Preparation, Theory and Practice, Ed. ACS Professional Reference Book, Washington, 1988, p.p. 7-31.
16. KOLB, Bruno., Applied Headspace Gas Chromatography, Ed. Heyder, London, 1982, 185 p.
17. KÖNIG, W. A. and Joulain, D., The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons, Ed. Verlag, Hamburg, 1998, 658 p.
18. KOVÁTS, E., *Helv. Chim. Acta*, 1958, 41, 1915.
19. LIKENS, S. T. and NICKERSON, G. B., Detection of Certain Hop Oil Constituents in Brewing Products, *Am. Soc. Brew. Chem. Proc.*, 1964, 5-13.
20. McHUGH, M. A. and KRUKONIS, V. J., Supercritical Fluid Extraction, Principles and Practice, Ed. Butterworths, Boston, p.p. 1-12.
21. McLAFFERTY, F. W. and TUREK, F., Interpretation of Mass Spectra, California: University Science Books, 1993, 374 p.
22. MUÑOZ, F., Plantas medicinales y aromáticas: Estudio, Cultivo y Procesado, Ed. Mundi-Prensa, Madrid, 1987, 365 p.
23. NUÑEZ, A., Aislamiento y concentración de trazas orgánicas volátiles en cromatografía gaseosa capilar, CENIC, Ciudad de la Habana, 1986, p.p. 20-26.

24. PARÉ, J.R.J., SIGAMIN, M. and LAPOINTE, J., 1991. "Microwave-Assisted Natural Products Extraction". US patent 5.002.784.
25. PARÉ, J.R.J., 1992, "Microwave Extraction of Volatile Oil and Apparatus Thereof". European Patent Application 0485668 A1.
26. PAWLISZYN, J., Solid Phase Microextraction, Theory and Practice, Ed. Wiley – VCH, New York, 1997, 247 p.
27. PAWLISZYN, J., Application of Solid-Phase Microextraction, RSC Chromatography Monographs, Cambridge, 1999, 655 p.
28. PIPKIN, W., The HP Supercritical Fluid Chromatography, Hewlett-Packard, 1992.
29. RIZVI, S. H., Supercritical Fluid Processing of Food and Biomaterials, Ed. Blackie Academic & Professional, Londres, 1994, 255 p.
30. SCHREIER, P., Analysis of Volatiles, Methods and Applications, Ed. Walter de Gruyter, New York, 1984, 1463 p.
31. SILVERSTEIN, R. M. and WEBSTER, F. X., Spectrometric Identification of Organic Compounds, Ed. John Wiley & Sons, New York, 1997, p.p. 1-70.
32. STASHENKO, E.E.; COMBARIZA, M. Y. y PUERTAS, M. A., Aceites esenciales: Técnicas de extracción y análisis. Laboratorio de Fitoquímica & Cromatografía, Escuela de Química, Facultad de Ciencias, UIS, Bucaramanga, 1998.

33. 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 (6), 359-362.
34. TOIZ, L. and ZEIGER, E., Plant Physiology, Ed. Sinaver Associates, Sunderland, 2002, p.p. 283-307.
35. WENCLAWIAK, B., Analysis with Supercritical Fluid: Extraction and Chromatography, Ed. Springer-Verlag, Berlín, 1992, 213 p.
36. WENIGER, B., VALENTIN A., BYUNG-HUN UM, ESTRADA A., LOBSTEIN A., ANTON R., MAILLE M. & SAUVAIN M., Bioactive Acridone Alkaloids from *Swinglea glutinosa*, *J. Nat. Prod.*, 2001, 64 (9), 1221-1223.