

**DETERMINACIÓN DE LOS COEFICIENTES DE PARTICIÓN DE MONOTERPENOS Y SESQUITERPENOS
Y SUS ANÁLOGOS OXIGENADOS, USANDO MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y
CROMATOGRAFÍA DE GASES**

AMNER MUÑOZ ACEVEDO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2005**

**DETERMINACIÓN DE LOS COEFICIENTES DE PARTICIÓN DE MONOTERPENOS Y SESQUITERPENOS
Y SUS ANÁLOGOS OXIGENADOS, USANDO MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y
CROMATOGRFÍA DE GASES**

AMNER MUÑOZ ACEVEDO

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

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

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2005**

“Siempre intenta aprender todo lo que
puedas, pues el conocimiento es una
llave que abre muchas puertas.”

Anónimo

DEDICATORIA

A Dios por permitirme tener salud y vitalidad para enfrentar los retos diarios que la vida cruzó en mi camino.

A mi familia por entender que es necesario hacer sacrificios para alcanzar los sueños deseados.

A mi bebé, por ser mi inspiración y ejemplo de constancia.

Los amo.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de una manera especial y particular a cada una de las personas que contribuyeron de alguna manera a la culminación de esta etapa de mi vida.

A la doctora Elena E. Stashenko por creer en mí, por ser maestra y darme la oportunidad de tener una excelente formación profesional. Por sus consejos que siempre buscan hacer de uno una mejor persona.

Al doctor Jairo René Martínez, por sus apuntes certeros y adecuados sobre el tema trabajado y su contribución a mi desarrollo como docente universitario.

A mi amigo Juan Pablo, por compartir conmigo mis alegrías y mis tristezas, siendo su apoyo en todo momento incondicional.

A la gorda Caludia, eres lo máximo. Siempre ahí, a mi lado. Te quiero mucho.

A Yinne Josabeth, por ser mi escucha y siempre diciendo los pro- y los contra-.

A los amigos y compañeros de trasnochos, Mónica, Amanda, José Luis (Barichara), Alberto y Camilo, sin los cuales las quedadas en el laboratorio hubiesen sido muy duras

A Mónis, Amandis, Marthis, Geovis, Ciriús, Albert... porque con ustedes, en algún momento, se ríe uno de la vida. Gracias por su alegría.

A todos los integrantes del Laboratorio de Cromatografía.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ESTADO DEL ARTE	5
2.1 COEFICIENTE DE PARTICIÓN, K_D	5
2.1.1 Fondo histórico	5
2.1.2 Ley de Henry	7
2.1.3 Termodinámica de sistemas que se reparten	7
2.1.4 K_D en cromatografía	8
2.1.5 Tiempos de retención observado, ajustado y muerto	10
2.1.6 Factor de capacidad, k	10
2.1.7 Relación de fases, β	10
2.1.8 Relación entre k , β y K_D	11
2.2 ACEITES ESENCIALES	12
2.2.1 Composición	13
2.2.1.1 Terpenos y terpenoides	13
2.3 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN	14
2.3.1 Extracción asistida por la radiación de microondas	15
2.3.1.1 Principios básicos	16
2.3.1.2 Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas	17
2.3.2 Microextracción en fase sólida	17
2.3.2.1 Modos de extracción	18
2.3.2.1.1 Modo <i>headspace</i>	18
2.3.2.2 Termodinámica de la SPME	18
2.3.2.3 Recubrimientos para SPME	19
2.3.2.3.1 Teoría de extracción de analitos para sólidos porosos de las fibras para SPME	21
2.4 CROMATOGRAFÍA DE GASES	23
2.4.1 Sistemas de detección	24

	Pág.
2.4.1.1 Detector de ionización en llama	24
2.4.1.2 Detector selectivo de masas	24
3. PARTE EXPERIMENTAL	25
3.1 OBTENCIÓN Y ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS DE LOS ACEITES ESENCIALES DE NARANJA Y DE YLANG-YLANG	25
3.1.1 Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas	25
3.1.2 HRGC-MSD	25
3.2 MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA EN EL MODO <i>HEADSPACE</i>	26
3.2.1 Tipos de recubrimientos empleados	26
3.2.2 Patrones de terpenoides empleados	26
3.2.2.1 Preparación de las soluciones de patrones	27
3.2.3 HRGC/FID	27
3.2.4 Selección del tiempo y temperatura de extracción	27
3.3 DETERMINACIÓN DE K_b POR GC PARA COMPUESTOS PATRÓN DE TERPENOIDES	27
3.4 DETERMINACIÓN DE K_b POR HS-SPME/HRGC/FID DE COMPUESTOS PATRÓN DE TERPENOIDES Y DE ACEITES ESENCIALES DE NARANJA Y DE YLANG-YLANG	28
3.4.1 Inyección directa de los patrones de terpenoides y aceites esenciales	28
3.4.2 <i>Headspace</i> estático de los patrones de terpenoides y aceites esenciales	28
3.4.2.1 Análisis por S-HS	28
3.4.3 Microextracción en fase sólida en el modo <i>headspace</i> de los patrones de terpenoides y de los aceites esenciales	29
3.4.4 Cálculos de K_{AE-HS} , $K_{PDMS-HS}$ y $K_{AE-PDMS}$	29
3.5 DETERMINACIÓN DEL FENÓMENO DE COMPETENCIA EN EL RECUBRIMIENTO DE PDMS, EMPLEANDO LOS PATRONES DE TERPENOIDES	30
4. ANÁLISIS DE RESULTADOS	31
4.1 DETERMINACIÓN DE COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE NARANJA Y DE YLANG-YLANG	31
4.2 PERFILES DE SATURACIÓN POR HS-SPME	38
4.2.1 PDMS-100 μm	39

	Pág.
4.2.2 PDMS/DVB-65 μm	45
4.3 DETERMINACIÓN DE K_0 POR GC	51
4.4 DETERMINACIÓN DE K_0 POR HS-SPME/HRGC/FID DE LOS CONSTITUYENTES DE LA MEZCLA PATRÓN DE TERPENOS Y ACEITES ESENCIALES DE NARANJA Y DE YLANG-YLANG	59
4.5 COMPETENCIA DE TERPENOS POR RECUBRIMIENTO: COMPARACIÓN PDMS Vs. PDMS/DVB	73
5. CONCLUSIONES	83
6. RECOMENDACIONES	85
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
ANEXO 1	
ANEXO 2	

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Hidrocarburos de serie isoprénica. A. Monoterpenos (C_5H_8) ₂ ; B. Sesquiterpenos (C_5H_8) ₃ .	13
Figura 2. Terpenos, derivados oxigenados y sesquiterpenos. A. Limoneno; B. Neral (Citral B); C. Geranial (Citral A); D. Linalol y E. <i>trans</i> - β -Cariofileno.	14
Figura 3. Esquema del método convencional para la obtención de aceites esenciales: arrastre con vapor.	15
Figura 4. Montaje para SPME.	17
Figura 5. Modos de extracción por SPME: a. Directo; b. <i>Headspace</i> ; y, c. Con protección de membrana.	18
Figura 6. Comparación de los mecanismos de extracción de <u>absorción</u> y <u>adsorción</u> .	20
Figura 7. Corriente iónica total reconstruida (cromatograma) obtenida por HRGC-MSD, del aceite esencial de cáscara de naranja. Columna HP-5 [60 m x 0.25 mm (d.i.) x 0.25 μ m (f.e)]. Relación <i>split</i> 1:30.	32
Figura 8. Corriente iónica total reconstruida (cromatograma) obtenida por HRGC-MSD, del aceite esencial de flores de ylang-ylang. Columna HP-5 [60 m x 0.25 mm (d.i.) x 0.25 μ m (f.e)]. Relación <i>split</i> 1:30.	32
Figura 9. Espectro de masas obtenido por HRGC-MSD (EI, 70 eV) del limoneno, componente mayoritario del aceite esencial de cáscara de naranja.	35
Figura 10. Rutas de formación de los principales iones fragmento del limoneno (EI, 70eV).	36
Figura 11. Espectro de masas obtenido por HRGC-MSD (EI, 70 eV) del linalol, componente más abundante en el aceite esencial de flores de ylang-ylang.	37
Figura 12. Rutas de formación de los principales iones fragmento característicos del linalol, a 70eV.	38
Figura 13. Estructuras de los diez patrones de terpenoides empleados en el presente trabajo. A. α -Pineno; B. α -Terpineno; C. Limoneno; D. 1,8-Cineol (eucaliptol); E. Linalol; F. Terpinen-4-ol; G. Neral; H. Geraniol; I. Geranial y J. <i>trans</i> - β -Cariofileno.	39

Figura 14. Efecto del tiempo (min) sobre la eficiencia de extracción por HS-SPME (PDMS, 100 μm) de la mezcla de terpenos, a 22°C.	40
Figura 15. Efecto del tiempo (min) sobre la eficiencia de extracción por HS-SPME (PDMS, 100 μm) de la mezcla de patrones de terpenos, a 40°C.	42
Figura 16. Efecto del tiempo (min) sobre la eficiencia de extracción por HS-SPME (PDMS, 100 μm), de la mezcla de patrones de terpenos, a 60°C.	43
Figura 17. Efecto de la temperatura (°C) sobre la eficiencia de extracción por HS-SPME (PDMS, 100 μm) de la mezcla de patrones de terpenos, durante 30 min de exposición del recubrimiento.	44
Figura 18. Efecto del tiempo (min) sobre la eficiencia de extracción por HS-SPME (PDMS/DVB, 65 μm) de la mezcla de patrones de terpenos, a 22°C.	46
Figura 19. Efecto del tiempo (min) sobre la eficiencia de extracción por HS-SPME (PDMS/DVB, 65 μm) de la mezcla de patrones de terpenos, a 40°C.	47
Figura 20. Efecto del tiempo (min) sobre la eficiencia de extracción por HS-SPME (PDMS/DVB, 65 μm) de la mezcla de patrones de terpenos, a 60°C.	48
Figura 21. Efecto de la temperatura (°C) sobre la eficiencia de extracción por HS-SPME (PDMS/DVB, 65 μm) de la mezcla de patrones de terpenos, durante 30 min de exposición del recubrimiento.	49
Figura 22. Curva de <i>van't Hoff</i> para el α -pineno, rango de temperaturas 50-90°C.	53
Figura 23. Curva de <i>van't Hoff</i> para el β -terpineno, rango de temperaturas 50-90°C.	53
Figura 24. Curva de <i>van't Hoff</i> para el limoneno, rango de temperaturas 50-90°C.	54
Figura 25. Curva de <i>van't Hoff</i> para el eucaliptol, rango de temperaturas 50-90°C.	54
Figura 26. Curva de <i>van't Hoff</i> para el linalol, rango de temperaturas 50-90°C.	55
Figura 27. Curva de <i>van't Hoff</i> para el terpinen-4-ol, rango de temperaturas 100-140°C.	55
Figura 28. Curva de <i>van't Hoff</i> para el neral, rango de temperaturas 100-140°C.	56
Figura 29. Curva de <i>van't Hoff</i> para el geraniol, rango de temperaturas 100-140°C.	56
Figura 30. Curva de <i>van't Hoff</i> para el geranial, rango de temperaturas 100-140°C.	57
Figura 31. Curva de <i>van't Hoff</i> para el <i>trans</i> - β -cariofileno, rango de temperaturas 100-140°C.	57
Figura 32. Desplazamiento del limoneno (previa saturación de la fibra, durante 30 min) por el α -pineno en el recubrimiento de PDMS, en función del tiempo de extracción.	73

Figura 33.	Desplazamiento del limoneno (previa saturación de la fibra, durante 30 min) por el linalol en el recubrimiento de PDMS, en función del tiempo de extracción.	74
Figura 34	Desplazamiento del limoneno (previa saturación de la fibra, durante 30 min) por el <i>trans</i> - β -cariofileno en el recubrimiento de PDMS, en función del tiempo de extracción.	74
Figura 35	Desplazamiento del limoneno (previa saturación de la fibra, durante 30 min) por el α -pineno y linalol en el recubrimiento de PDMS, en función del tiempo de extracción.	75
Figura 36	Desplazamiento del limoneno (previa saturación de la fibra, durante 30 min) por el <i>trans</i> - β -cariofileno y linalol en el recubrimiento de PDMS, en función del tiempo de extracción.	75
Figura 37	Desplazamiento del limoneno (previa saturación de la fibra, durante 30 min) por el <i>trans</i> - β -cariofileno y α -pineno en el recubrimiento de PDMS, en función del tiempo de extracción.	76
Figura 38	Desplazamiento del limoneno (previa saturación de la fibra, durante 30 min) por el <i>trans</i> - β -cariofileno, α -pineno y linalol en el recubrimiento de PDMS, en función del tiempo de extracción.	76
Figura 39	Desplazamiento del limoneno (previa saturación de la fibra, durante 30 min) por el α -pineno en el recubrimiento de PDMS/DVB, en función del tiempo de extracción.	77
Figura 40	Desplazamiento del limoneno (previa saturación de la fibra, durante 30 min) por el linalol en el recubrimiento de PDMS/DVB, en función del tiempo de extracción.	77
Figura 41	Desplazamiento del limoneno (previa saturación de la fibra, durante 30 min) por el <i>trans</i> - β -cariofileno en el recubrimiento de PDMS/DVB, en función del tiempo de extracción.	78
Figura 42	Desplazamiento del limoneno (previa saturación de la fibra, durante 30 min) por el α -pineno y linalol en el recubrimiento de PDMS/DVB, en función del tiempo de extracción.	78
Figura 43	Desplazamiento del limoneno (previa saturación de la fibra, durante 30 min) por el <i>trans</i> - β -cariofileno y linalol en el recubrimiento de PDMS/DVB, en función del tiempo de extracción.	79

Figura 44	Desplazamiento del limoneno (previa saturación de la fibra, durante 30 min) por el <i>trans</i> - β -cariofileno y α -pineno en el recubrimiento de PDMS/DVB, en función del tiempo de extracción.	79
Figura 45	Desplazamiento del limoneno (previa saturación de la fibra, durante 30 min) por el <i>trans</i> - β -cariofileno, α -pineno y linalol en el recubrimiento de PDMS/DVB, en función del tiempo de extracción.	80
Figura 46	Celda <i>headspace</i> : combinación del muestreo S-HS y trampa D-HS.	85

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Recubrimientos disponibles comercialmente para fibras de SPME.	20
Tabla 2. Pureza de patrones certificados de monoterpenos, terpenos oxigenados y sesquiterpenos.	26
Tabla 3. Identificación por HRGC-MSD y cantidad relativa (%) de los componentes principales (>0.01%), presentes en el aceite esencial de cáscara de naranja.	33
Tabla 4. Identificación por HRGC-MSD y cantidad relativa (%) de los componentes mayoritarios encontrados en el aceite esencial de las flores de ylang-ylang.	34
Tabla 5. Valores obtenidos de entalpía (ΔH°) y entropía (ΔS°) estándar por GC (temperaturas entre 40-90°C), para cada uno de los patrones de terpenos, con base en las curvas de <i>van't Hoff</i> .	58
Tabla 6. Valores obtenidos de entalpía (ΔH°) y entropía (ΔS°) estándar por GC (temperaturas entre 100-140°C), para cada uno de los patrones de terpenos, con base en las curvas de <i>van't Hoff</i> .	58
Tabla 7. $K_{PT-PDMS}$ calculados para los componentes de la mezcla de patrones de terpenoides.	60
Tabla 8. K_{AEHS} calculados para los componentes mayoritarios del aceite esencial de cáscara de naranja.	61
Tabla 9. $K_{PDMS-HS}$ calculados para los componentes mayoritarios del aceite esencial de cáscara de naranja.	62
Tabla 10. K_{AEPDMS} calculados para los componentes mayoritarios del aceite esencial de cáscara de naranja.	63
Tabla 11. K_{AEHS} calculados para los componentes principales del aceite esencial de flores de ylang-ylang.	64
Tabla 12. $K_{PDMS-HS}$ calculados para los componentes principales del aceite esencial de flores de ylang-ylang.	65
Tabla 13. K_{AEPDMS} calculados para los componentes principales del aceite esencial de flores de ylang-ylang.	66

ACRÓNIMOS

AE's	Aceite(s) esencial(es)
AT_{AE}	Área cromatográfica total del analito (obtenida de la sustancia pura)
A_{HS}^{∞}	Área cromatográfica del analito, obtenida por S-HS/HRGC/FID
A_{PDMS}	Área cromatográfica del analito (obtenida por HS-SPME/HRGC/FID)
β	Relación de fases
BTEX's	Benceno, tolueno, etilbenceno e isómeros del xileno
C_{AE}^{∞}	Concentración del analito contenido en la fase condensada, en el equilibrio
C_f^{∞}	Concentración del analito en la fibra, en el equilibrio
C_h^{∞}	Concentración del analito en el <i>headspace</i> , en el equilibrio
C_{HS}^{∞}	Concentración del analito presente en la mezcla de AE que se encuentra en el HS, en el equilibrio
$C_{HS_2}^{\infty}$	Concentración del analito (mezcla de AE's) que se encuentra en el HS, en el equilibrio
C_m	Concentración del analito en la fase móvil
cm	Centímetros
C_o	Concentración inicial del analito en la matriz
C_{PDMS}^{∞}	Concentración del analito (mezcla de AE's) atrapado por el recubrimiento PDMS en el <i>headspace</i> , en el equilibrio
C_s^{∞}	Concentración del analito remanente en la matriz de la muestra, en el equilibrio
C_s	Concentración del analito en la fase estacionaria
CV	Coficiente de variación o desviación estándar relativa
CW/DVB	Carbowax/divinilbenceno
CX/PDMS	Carboxen/poli(dimetilsiloxano)
D	Constante de distribución
DES	Destilación-extracción simultánea con solvente
d_f	Espesor de la fase estacionaria
d_i	Diámetro interno – D.I.

d_{int}	Grado de interacción del aroma
D-HS	<i>Dynamic headspace</i> (<i>headspace</i> dinámico)
ϵ''	Pérdida dieléctrica
ϵ'	Constante dieléctrica
EI	<i>Electron Impact</i> (impacto de electrones)
eV	Electrón-voltios
f.e.	Espesor de la fase estacionaria (f.e)
FID	<i>Flame Ionization Detector</i> (Detector de ionización en llama)
γ	Coefficiente de actividad
ΔG	Cambio de la energía libre
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases)
GC-MS	<i>Gas Chromatography – Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases – Espectrometría de masas)
HP-5	Columna de <i>Hewlett-Packard</i> , 5%-fenil-poli(dimetilsiloxano)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia)
HRGC/FID-MSD	<i>High Resolution Gas Chromatography / Flame Ionization Detector – Mass Selective Detector</i> (Cromatografía de gases de capilar con detectores de ionización en llama y selectivo de masas)
ΔH	Cambio de entalpía
HS	<i>Headspace</i> (espacio de cabeza, fase gaseosa o vapor)
HS-SPME	<i>Headspace Solid-Phase Microextraction</i> (Microextracción en fase sólida en el modo <i>headspace</i>)
K	Factor de capacidad
K	Coefficiente de partición
K_{AE-HS}	Coefficiente de partición AE - <i>headspace</i>
$K_{AE-PDMS}$	Coefficiente de partición AE-poli(dimetilsiloxano)
K_D	Coefficiente de partición o constante de distribución
K_{fh}	Coefficiente de partición entre la fibra y el HS
K_{FC-HS}	Coefficiente de fase condensada - <i>headspace</i>
K_{hs}	Coefficiente de partición entre el HS y la muestra
kPa	Kilopascal
$K_{PDMS-HS}$	Coefficiente de partición poli(dimetilsiloxano)- <i>headspace</i>

L	Longitud de la columna
LLE	<i>Liquid-Liquid Extraction</i> (Extracción líquido-líquido)
μ°_s	Potencial químico de una sustancia pura
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
m	Masa
MAE	<i>Microwave-Assisted Extraction</i> (Extracción asistida por la radiación de microondas)
MHz	Mega-Hertz
min	Minutos
mL	Mililitros
M_s	Masa molecular
MWHD	<i>Microwave-assisted hydro-distillation</i> (Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas)
m/z	Relación masa-carga
n	Masa del analito absorbida por la fibra
p	Presión
p°	Presión de vapor saturado
P	Coefficiente de partición
PA	Poli(acrilato)
PDMS	Poli(dimetilsiloxano)
PDMS/DVB	Poli(dimetilsiloxano)/divinilbenceno
ppm	Partes por millón
QSAR	<i>Quantitative Structure-Activity Relationship</i> (Estudios de relación cuantitativa actividad–estructura)
ρ	Densidad
R	Constante de los gases
r_c	Radio de la columna
S	Segundo
S	Desviación estándar muestral
ΔS	Cambio en la entropía
SFE	<i>Supercritical Fluid Extraction</i> (Extracción con fluido supercrítico)
S-HS	<i>Static Headspace</i> (Headspace estático)

SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (Extracción en fase sólida)
SPME	<i>Solid Phase Micro-Extraction</i> (Microextracción en fase sólida)
T	Temperatura
$\tan \delta$	Factor de disipación
T_c	Temperatura de la columna
TIC	<i>Total Ion Current</i> (Corriente iónica total reconstruida – cromatograma)
t_M	Tiempo de un soluto no retenido o tiempo muerto
t_R	Tiempo de retención
t_R'	Tiempo de retención ajustado
$\bar{u}$	Velocidad lineal promedio
$\bar{n}$	Velocidad de migración
V_s°	Volumen molar del solvente
V_f	Volumen de la fibra
V_h	Volumen del <i>headspace</i>
V_{HS}	Volumen del HS
V_m	Volumen de la fase móvil
V_{PDMS}	Volumen del recubrimiento de PDMS-100 μm
V_s	Volumen de la muestra
V_s	Volumen de la fase estacionaria
V_V	Volumen total del vial HS
W	Vatios
$\bar{X}$	Promedio
X_i	Fracción molar del compuesto “i”

RESUMEN:

TITULO: DETERMINACIÓN DE LOS COEFICIENTES DE PARTICIÓN DE MONOTERPENOS Y SESQUITERPENOS Y SUS ANÁLOGOS OXIGENADOS, USANDO MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y CROMATOGRAFÍA DE GASES*

Autor: Amner Muñoz Acevedo **.

Palabras claves: Coeficientes de partición, aceites esenciales, SPME, GC, efectos competitivos.

Los AE's son sustancias fragantes que se usan como ingredientes base en perfumería, cosmética, alimentos, etc. Son mezclas con más de 200 componentes, agrupados en dos fracciones: una volátil (90-95% de aceite total) y un residuo no volátil (5-10% del total del aceite).

K_D se usa para describir la distribución de una sustancia entre medios diferentes y expresa el reparto de una población de moléculas entre dos fases, en el equilibrio.

SPME es un método de preparación de muestra para análisis de compuestos orgánicos presentes en distintas matrices (agua, aire y suelo). El comportamiento de partición de analitos en el recubrimiento de SPME se describe con la teoría de distribución cromatográfica. Por lo tanto, los datos de retención cromatográficos se utilizan para predecir los K_D de analitos en el recubrimiento de SPME, suponiendo que se ha logrado el equilibrio.

Para el estudio se obtuvieron los AE's de naranja y de ylang-ylang por MWHD. Para las determinaciones de K_{AE-HS} y $K_{PDMS-HS}$ se emplearon inyección directa, SHS y HS-SPME (PDMS-100 μm). El análisis de las muestras se realizó por HRGC-FID. Los parámetros de extracción establecidos para SHS y HS-SPME fueron 30 min de extracción a 40°C.

Los $K_{AE-PDMS}$ que se calcularon para cada AE variaron entre componentes dentro del mismo aceite y de componentes comunes presente en ambos AE's. Una de las hipótesis propuestas es la influencia de otros volátiles sobre la composición en el HS de una mezcla y las posibles interacciones de los componentes del AE con el solvente.

Se demostró el efecto competitivo de terpenos sobre PDMS. Las explicaciones fueron: traspasar el límite superior del rango lineal de la fibra y la limitada capacidad de PDMS para albergar grandes cantidades de una sustancia, cuando se encuentra en altas concentraciones en el HS.

* Trabajo de investigación.

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

ABSTRACT:

TITLE: DETERMINATION OF PARTITION COEFFICIENTS OF MONOTERPENES AND SESQUITERPENES AND THEIR OXYGENATED ANALOGS, USING SOLID PHASE MICROEXTRACTION AND GAS CHROMATOGRAPHY

Author: Amner Muñoz Acevedo **.

Key words: Partition coefficients, essential oils, SPME, GC, competition effects.

The EO's are fragrant substances that are used as ingredients base on perfumery, cosmetic, foods, etc. They are mixture with than 200 components, grouped more in two fractions: volatile (90-95% total oil) and a nonvolatile remainder (5-10% total oil).

K_D are used to describe the distribution of a substance among different media and it express the distribution of a population molecules between two phases, at the equilibrium.

SPME is a technique of sample preparation for organic compound analysis present in different matrices (water, air and soil). The behavior of partition of analytes in the fiber coating of SPME is described by the theory of chromatographic distribution. Therefore, the chromatographic data of retention are used to predict the K_D of analytes in the fiber coating of SPME, supposing that the equilibrium has been reached.

For this study was obtained the EO's of orange and ylang-ylang by MWHD. For the determination of K_{AE-HS} and K_{PDMSHS} were used direct injection, S-HS and HS-SPME (PDMS-100 μm). The analysis of the samples was carry out by HRGC-FID. The extraction parameters established by S-HS and HS-SPME were 30 min at 40°C.

The $K_{AE-PDMS}$ that were calculated for each EO varied between components within the same oil and of components common present in both EO's. One of the propose hypotheses is the influence of other volatile on the composition in the HS of a mixture and possible interactions of the components of the EO with the solvent.

The competitive effect of terpenes was demonstrated on PDMS fiber. The explanations were: to exceeds the upper limit of the linear range of concentration and the limited concentration capability of PDMS to trap great amounts of a substance, when it is in high concentrations in the HS.

* Work of investigation.

** Faculty of Sciences, School of Chemistry, Elena E. Stashenko.

1. INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales (AE's) son sustancias fragantes extensamente usadas como ingredientes base en perfumería tradicional [1], en los sectores farmacéutico, cosmético, en el campo de alimentos [2] y nutrición humana. Son mezclas con más de 200 componentes [3] agrupados básicamente en dos fracciones, una volátil que constituye el 90-95% de aceite total (contiene terpenos, sesquiterpenos y sus derivados oxigenados junto con aldehídos alifáticos, alcoholes y ésteres) y un residuo no volátil que constituye del 5-10% del total del aceite y contiene hidrocarburos más pesados, ácidos grasos, esteroides, carotenoides, ceras, cumarinas, psoralenos y flavonoides.

La fracción terpénica con un rango aproximado del 60% (e.g. aceite de bergamota) al 99% (e.g. aceite de pomelo) de la fracción volátil hace poca contribución al *flavour* o fragancia del aceite. Además, puesto que los terpenos son en su mayoría compuestos insaturados pueden descomponerse térmicamente, por fotólisis y oxidación [1,4], produciendo compuestos indeseables los cuales generan *off-flavour* [4] (defecto del aroma que se produce por sustancias foráneas, que no están presentes normalmente en ella, con pérdida de compuestos de impacto, dándole una nota desagradable [5]).

La distribución de un soluto entre dos fases, en las cuales es soluble, ha sido un tema importante para experimentación y estudio por muchos años. En una forma u otra este parámetro fisicoquímico se ha utilizado para aislar productos naturales tales como esencia de flores [6].

El coeficiente de partición o constante de distribución (K_D) se usa para describir la distribución de una sustancia entre diferentes fases y expresa el reparto de una población de moléculas entre dos fases inmiscibles, en el equilibrio. Se calcula como la relación de actividades de un compuesto en una y otra fase. Se considera independiente de la concentración, sí y sólo sí, el coeficiente de actividad (g_i) del compuesto i en la fase considerada no cambia sustancialmente. Así, K_D depende de las propiedades fisicoquímicas del analito, las fases involucradas y la temperatura [7].

La determinación de K_D ha sido de gran ayuda en todas las áreas y aplicaciones fisicoquímicas en la naturaleza. La importancia de medir o calcular esta constante para compuestos orgánicos en estudios

ambientales, se debe a la biodisponibilidad y concentración residual en la atmósfera, agua y suelo, las cuales dependen estrictamente de las propiedades de distribución [8]. Por ende, se puede predecir el destino de los contaminantes orgánicos en el ambiente [9].

En las ciencias biomédicas K_D se ha utilizado como uno de los parámetros más efectivos para evaluar la toxicidad de una sustancia química [10,11]; uno de los principales factores que regula el intercambio gaseoso en los pulmones; y en el estudio de la cinética y el comportamiento de los gases en los seres vivos [12].

Pero su aplicación más interesante ha sido en estudios de relación cuantitativa actividad-estructura (QSAR) donde se correlacionan la actividad biológica de una sustancia con otras propiedades físicas tales como factores electrónicos y estéricos [13] en áreas de la medicina, bioquímica, farmacéutica [7,8], química médica y diseño de drogas. K_D y, en particular, aquellos valores obtenidos para el sistema octanol-agua, refleja la hidrofobicidad de la molécula de soluto [14].

Otra área de aplicación ha sido la geoquímica; K_D se usa para ayudar a evaluar la masa de contaminante que existe en una fuente, y es muy importante porque estima el potencial de adsorción de dicho contaminante en contacto con el suelo [15].

Las propiedades de las moléculas en fase líquida se han examinado ampliamente por métodos experimentales, estáticos y dinámicos [16]. Una solución con dilución infinita es el estado ideal para moléculas de soluto y las propiedades de la solución se combinan fácilmente con la teoría convencional de soluciones de moléculas. La cromatografía de gases (GC) provee las propiedades para la dilución infinita con base en las condiciones de GC, siendo un método rápido y confiable para la determinación de propiedades termodinámicas exactas [17,18].

La microextracción en fase sólida (SPME) es una técnica de preparación de muestra para la extracción de compuestos volátiles, semivolátiles y no volátiles, polares y no polares presentes en distintas matrices [19], incluyendo agua, suelo y aire [20]. El método implica dos pasos: (1) reparto de los analitos entre la muestra y la fibra de sílice fundida recubierta con una fase estacionaria disponible y (2) desorción de analitos concentrados en el inyector del sistema de separación [9].

SPME ha ganado gran aceptación en múltiples aplicaciones por ser de fácil uso, bajo costo comparado con las técnicas convencionales (LLE, Soxhlet, ultrasonido, etc), y que no involucra la utilización de solventes

orgánicos [21,22]. Se ha utilizado como método para calcular el coeficiente de partición octanol-agua [9], para la determinación de coeficientes de la Ley de Henry [23] y la estimación del coeficiente de distribución recubrimiento/aire usando índices de retención de GC capilar con programación lineal de la temperatura [20].

El comportamiento del reparto de analitos entre la fase estacionaria de la fibra de SPME y la fase vapor o el líquido, en el cual está inmersa, se describe con la teoría de partición cromatográfica. Los datos de retención cromatográficos se pueden usar para calcular los K_D de analitos en fases estacionarias de SPME, suponiendo que se han alcanzado las condiciones de equilibrio [20,24]. K_D para SPME (recubrimiento de fibra-fase condensada) es el producto de dos constantes: la constante de reparto fase condensada-*headspace* (K_{FCHS}) y la constante de reparto (poli(dimetilsiloxano)-*headspace* ($K_{PDMS-HS}$) [25].

Para este estudio se escogieron los AE's de naranja y de ylang-ylang, los cuales fueron obtenidos a través de hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD). Para las determinaciones de los coeficientes K_{AEHS} y $K_{PDMS-HS}$ se emplearon inyección directa de la muestra, *headspace* estático (S-HS) y microextracción en fase sólida en el modo *headspace* (HS-SPME, PDMS-100 μ m). El análisis de las muestras se realizó por cromatografía de gases capilar con detectores de ionización en llama (GC-FID) y selectivo de masas, este último operado en el modo *full scan* (GC-MS).

Después de determinar las mejores condiciones para HS-SPME, éstas aplicaron para el análisis por SHS. Los parámetros de extracción establecidos fueron el tiempo (30 min), temperatura (40°C), cantidad de solución (50 μ L de AE en 1 mL de solvente) y volumen del *headspace* (19 mL).

Los coeficientes de partición que se calcularon para cada AE variaron entre componentes dentro del mismo aceite (tendencia esperada) y de un AE a otro (no esperado). Así mismo, existieron diferencias de un mismo componente presente en ambos AE's (no esperado). Una de las hipótesis propuestas es la influencia de otros volátiles sobre la composición en el *headspace* de una mezcla (distribución competitiva en fase vapor de los componentes de aromas) [26].

Por otro lado, se demostró experimentalmente el efecto competitivo de patrones de terpenos sobre el recubrimiento de PDMS. Una de las explicaciones que se puede dar a este fenómeno es la capacidad limitada de PDMS para albergar grandes cantidades de una sustancia, cuando ésta se encuentra en altas concentraciones en el *headspace*. Lo cual es atribuible probablemente a las restricciones dimensionales del recubrimiento (pequeño volumen o espesor), conllevando al fenómeno de desplazamiento [27, 28].

Con esta investigación se contribuye de manera muy particular a la industria de los productos naturales y su aplicación en la industria cosmética, farmacéutica y alimentos, puesto que el conocimiento del coeficiente de partición de componentes principales y comunes para muchos aceites esenciales en el *headspace* suministra información sobre su volatilidad e hidrofobicidad.

Durante esta investigación se participó con el trabajo titulado "*Determinación de los coeficientes de partición de los constituyentes de los aceites esenciales de ylang-ylang y naranja empleando HS-SPME*" en el XIII Congreso Colombiano de Química, realizado en octubre del presente año, en modalidad de *poster*. Además, se realizó la publicación de este proyecto, en el respectivo libro de memorias del evento mencionado, con el título "*Determinación de los coeficientes de partición de los constituyentes de los aceites esenciales de ylang-ylang y naranja empleando HS-SPME*".

2. ESTADO DEL ARTE

2.1 COEFICIENTE DE PARTICIÓN, K_D

2.1.1 Fondo histórico. El primer estudio sistemático de distribución entre dos líquidos inmiscibles fue llevado a cabo por M. Berthelot y E. Jungfleisch, el cual condujo a una teoría con capacidad predictiva [29]. Los autores midieron exactamente las cantidades presentes de I_2 y Br_2 repartidas entre CS_2 y agua durante el equilibrio. Además, calcularon las cantidades de algunos ácidos orgánicos, H_2SO_4 , HCl y NH_3 repartidos entre éter etílico y agua. De esta última investigación, surgió la primera apreciación del hecho base, que la relación de concentraciones de un soluto distribuido entre dos solventes inmiscibles fue una constante, la cual no dependía de los volúmenes relativos de las soluciones usadas [6,30].

En 1891, Nernst hizo su aporte significativo al tema. Recalcó el hecho que el coeficiente de partición sería constante sólo si una especie molecular individual se consideraba como repartida entre dos fases. Considerada en esta dirección, la partición sería tratada por la termodinámica clásica como un proceso de equilibrio donde la tendencia de cualquier especie molecular individual de soluto sería dejar un solvente y entrar al otro, siendo una medida de su actividad en el solvente. El problema que encontró Nernst en el estudio de coeficientes de partición fue la asociación y disociación de solutos en diferentes fases (cuando el soluto formaba dímeros en la fase extractora), lo cual se pudo corregir por ionización, siempre y cuando, la concentración del soluto en fase acuosa fuera muy baja. Para un coeficiente de partición verdadero, se debe considerar la misma especie en cada fase [6,31].

Durante algunos años del siglo XX un gran número de experimentos meticulosos sobre partición de analitos se reportó en la literatura; la mayoría se realizaron con el objetivo de determinar constantes de ionización en un medio acuoso de ácidos y bases moderadamente ionizados. Como punto del hecho histórico, el método no sobrevivió por la asociación inesperada de los solutos en los solventes orgánicos escogidos.

Después que se determinaron las constantes de ionización con confiabilidad a través de otros medios, la medición de partición se empleó para calcular la constante de asociación de ácidos orgánicos en fase no acuosa en función de la temperatura. Esto produjo valores de ΔH , ΔS y ΔG para la reacción de asociación.

En 1909, Herz publicó fórmulas las cuales relacionaron el coeficiente de partición (P) con el número de extracciones necesarias para remover un peso dado de soluto desde una solución. Si W (mL) de solución que contiene x_0 (g) de soluto, son sometidos a extracciones repetidas con L (mL) de solvente, y x_1 (g) de soluto quedan después de la primera extracción, entonces $(x_0 - x_1)/L$ = concentración del soluto en la fase extractora y x_1/W = concentración remanente en la solución original:

$$P = \frac{x_1/W}{(x_0 - x_1)/L} \quad x_1 = x_0 \frac{PW}{PW + L} \quad \text{Ecuación 1}$$

Durante los años 40's, la técnica mecánica de extracción múltiple fue mejorada notoriamente y la distribución contracorriente llegó a ser una herramienta establecida tanto para la separación y caracterización de mezclas complejas. El coeficiente de partición se pudo obtener desde estudios de distribución en contracorriente y la ecuación usada para esto fue:

$$T_{n,r} = \frac{n!}{r!(n-r)!} \left(\frac{1}{P+1} \right)^n (P)^r \quad \text{Ecuación 2}$$

donde $T_{n,r}$ representa la fracción del material total en el tubo r distribuido a través de n tubos [6].

Durante las dos décadas que agrupan el cambio de siglo, en el que el coeficiente de partición fue investigado por los fisicoquímicos como un todo en sí mismo, los farmacólogos llegaron a estar muy interesados en él, por medio del trabajo de Meyer y Overton, quienes mostraron que la actividad narcótica relativa de medicamentos a menudo era el paralelo del coeficiente de partición aceite/agua [32]. Sin embargo, la correlación renombrada de la actividad narcótica no específica con el coeficiente de partición no condujo a una generalización realmente útil en la comprensión del mecanismo de acción del medicamento. Consecuentemente, el interés de ambos grupos por el coeficiente de partición declinó grandemente. Sólo el reciente uso del coeficiente de partición como un parámetro de referencia extratermodinámico para el "enlazamiento hidrofóbico" en sistemas biológicos y farmacológicos generó un nuevo interés de su medición.

Los símbolos y nomenclatura asociados con el proceso de partición, han variado considerablemente. En el siglo XIX, el término "relación de distribución" se usó muy a menudo. Gradualmente, el coeficiente de partición ha llegado a ser más usado desde que *Chemical Abstracts* lo indexó más frecuentemente bajo este encabezado, que como relación de distribución. Se usa "coeficiente de partición" cuando se refiere a datos los cuales han sido corregidos por ionización, dimerización, etc., lo que se relaciona a la distribución de especies individuales entre dos fases. La expresión "relación de partición" se reserva para referirse a la

distribución no corregida de solutos entre dos fases. Varios símbolos tales como K , K_D , K_P , D y P han sido usados para representar el coeficiente de partición.

2.1.2 Ley de Henry. La aproximación más general al fenómeno de distribución es el tratamiento de la ley de partición como una extensión de la Ley de Henry. Para un gas en equilibrio con su solución en el mismo solvente, tenemos:

$$K = \frac{m}{p} \quad \text{Ecuación 3}$$

donde m es la masa del gas disuelto por unidad de volumen y p es la presión a temperatura constante. Puesto que la concentración de moléculas en la fase gaseosa es proporcional a la presión, p se puede reemplazar por C_1 y la masa/unidad de volumen de gas en solución, por C_2 . La **Ecuación 3** se puede describir como:

$$K = \frac{C_2}{C_1} \quad \text{Ecuación 4}$$

En términos generales, la concentración de cualquier especie molecular individual entre dos fases, las cuales están en equilibrio, llevará una relación constante respecto una de la otra tan grande como el coeficiente de actividad permanezca relativamente constante. La limitación de la definición anterior es que se presume que no hay ninguna interacción significativa soluto-soluto como tampoco ninguna interacción fuerte específica soluto-solvente.

2.1.3 Termodinámica de sistemas que se reparten. Cabe anotar que, el coeficiente de partición termodinámico es una relación de fracciones molares ($P' = X_o/X_w$), y no se debe confundir con la expresión de P el cual es una relación de concentraciones. Para cada componente "i" que contiene una solución ideal, la siguiente ecuación se debe mantener:

$$m_i(T, P, X) = m_i^q(T, P) + RT \ln X_i \quad \text{Ecuación 5}$$

donde m_i^q es el potencial químico del componente "i" puro en la solución bajo condiciones específicas y X_i es su fracción molar. m_i^q no es el potencial químico real del componente "i" puro, pero el valor se aproximaría si la solución se mantiene ideal hasta $X_i = 1$. Se puede mostrar que para soluciones diluidas, el potencial químico basado en fracción molar es mayor que el de concentración molar por un factor de $RT \ln V_s^o$, donde V_s^o es el volumen molar del solvente y, por lo tanto:

$$m_i(T, P, X) = m_i^q(T, P) + RT \ln \bar{V}_s^o + RT \ln C_i \quad \text{Ecuación 6}$$

Una interesante aproximación al estudio de las fuerzas intermoleculares implicadas en la partición es suponer, que la energía libre de transferencia de una molécula se puede dividir en las contribuciones de diferentes partes [6].

2.1.4 K_D en cromatografía. Un soluto sometido a un proceso cromatográfico al entrar en la columna, inmediatamente se reparte entre la fase móvil y la fase estacionaria. Esta distribución entre las dos fases se refleja por su *constante de distribución* (K_D), definida como la relación de los pesos del analito en volúmenes iguales de las fases móvil y estacionaria (**Ecuación 7**):

$$K_D = \frac{C_S}{C_M} \quad \text{Ecuación 7}$$

donde C_S es la concentración del analito en la fase estacionaria y C_M es la concentración del analito en la fase móvil.

K_D es una constante de equilibrio real y su magnitud está gobernada sólo por la naturaleza química del analito (estructura), de las dos fases (estacionaria y móvil) y la temperatura [33-36], además, expresa la afinidad de una sustancia por la fase estacionaria relativa a la fase móvil [37].

En cromatografía, el potencial químico de un analito en el equilibrio, entre las fases móvil y estacionaria, se expresa por la **Ecuación 8**, donde $m_s = m_s^0 + RT \ln g' C_s$ y $m_m = m_m^0 + RT \ln g'' C_m$:

$$m_s = m_m \quad \text{Ecuación 8}$$

Si $g' = 1$ y $g'' = 1$, entonces, se puede escribir la **Ecuación 9**, así:

$$m_s^0 + RT \ln g' C_s = m_m^0 + RT \ln g'' C_m \quad \text{Ecuación 9}$$

donde R es la constante de los gases, T es la temperatura en K y C_s y C_m son las concentraciones del analito entre las dos fases, estacionaria y móvil, respectivamente. La **Ecuación 9**, después de reordenarla, produce la **Ecuación 10**.

$$K = \frac{C_S}{C_m} = e^{\left(\frac{m_m^0 - m_s^0}{RT}\right)} = e^{\left(\frac{\Delta m^0}{RT}\right)} \quad \text{Ecuación 10}$$

El tiempo que gasta un soluto en recorrer completamente la columna (tiempo de retención del soluto, t_R) es función del tiempo que pasa entre las fases móvil y estacionaria. La **Ecuación 11** describe la velocidad de

migración a través de la columna, donde $\bar{n}$ es la velocidad de migración, $\bar{u}$ es la velocidad lineal promedio de la fase móvil en la columna y V_m y V_s son los volúmenes de fase móvil y estacionaria.

$$\bar{n} = \bar{u} \left(\frac{C_m V_m}{C_m V_m + C_s V_s} \right) = \bar{u} \left(1 + \frac{C_s V_s}{C_m V_m} \right)^{-1} = \bar{u} \left(1 + K \frac{V_s}{V_m} \right)^{-1} \quad \text{Ecuación 11}$$

K del lado derecho de la **Ecuación 11** se definió en la **Ecuación 10**. $\bar{n}$ se expresa como la relación entre la longitud de la columna L y el tiempo de retención t_R (L/t_R) y, si se sustituye en la **Ecuación 11**, producirá la **Ecuación 12**, donde t_R es el tiempo de retención del pico y t_M es el tiempo muerto, en la columna.

$$t_R = \frac{L}{\bar{u}} \left(1 + K \frac{V_s}{V_m} \right) = t_M \left(1 + K \frac{V_s}{V_m} \right) \quad \text{Ecuación 12}$$

Reordenando la **Ecuación 13**, es claro, que el tiempo de retención ajustado ($t_{R'}$) es directamente proporcional al valor de K [20].

$$t_{R'} = t_R - t_M = K \frac{V_s}{V_m} \quad \text{Ecuación 13}$$

Puesto que K_D , como cualquier constante de equilibrio termodinámico es un cociente de actividades real del analito en sistemas cromatográficos, normalmente, se encuentran soluciones que tienden hacia dilución infinita y, por lo tanto, el coeficiente de actividad es uno. La **Ecuación 10** supone que el analito está presente como sólo una estructura molecular o ión, el cual no interactúa con otras moléculas de analito, cuando la dilución es infinita [34].

El equilibrio es dinámico. Por supuesto, la transferencia de masa en la columna toma lugar sólo en la fase móvil, vía gas de arrastre. Así, un valor alto de K_D implica un tiempo de residencia largo en la fase estacionaria y por ende, una salida posterior del sistema de separación. Esto envuelve un número de simplificaciones, tales como: los procesos de difusión se han menospreciado, la velocidad de la fase móvil se supone constante de principio a fin, se ha supuesto un rápido equilibrio infinito independiente de la concentración y no se han considerado diferencias a lo largo de la trayectoria debido a la estructura de la fase polimérica de la columna [37-42].

2.1.5 Tiempos de retención observado, ajustado y muerto. Durante el recorrido del soluto a través de la columna, éste pasa una parte de su tiempo repartiéndose entre la fase estacionaria y la fase móvil. Al emerger el soluto a la fase móvil es transportado hacia el detector con la misma velocidad del gas de arrastre. El tiempo de residencia en la fase móvil se determina cronometrando la elución de un soluto no retenido [33].

El tiempo de residencia del analito no retenido se designa con el símbolo t_M . El tiempo de retención total es igual al tiempo de residencia del soluto en la fase móvil (t_M) más el tiempo de residencia en la fase estacionaria. Por lo tanto, el tiempo de residencia en la fase estacionaria o el “tiempo de retención ajustado” t_R' se expresa según la **Ecuación 13**, donde t_R es el tiempo de retención observado, t_M es el tiempo de retención de l soluto no retenido y t_R' es el tiempo de retención ajustado.

2.1.6 Factor de capacidad, k. La relación de partición¹, k' , se define como la cantidad (no concentración) de un soluto en la fase estacionaria comparada con la cantidad del soluto en la fase móvil, y es proporcional al tiempo relativo que el soluto pasa entre las dos fases (estacionaria y móvil) (**Ecuaciones 14 y 15**).

$$k = \frac{t_R'}{t_M} \quad \text{Ecuación 14}$$

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad \text{Ecuación 15}$$

donde k es el factor de capacidad [33].

El factor de capacidad es independiente de la velocidad lineal del gas de arrastre, lo que significa que las altas o bajas velocidades de flujo no afectan el tiempo relativo que pasa el analito entre las fases, sólo su valor absoluto [39].

2.1.7 Relación de fases, b. La relación de fase en una columna es la relación de volúmenes de las fases móvil y estacionaria y está dada por el símbolo β (**Ecuación 16**).

$$\beta = \frac{V_M}{V_S} \quad \text{Ecuación 16}$$

donde V_M es el volumen de la fase móvil y V_S es el volumen de la fase estacionaria.

¹ El término “relación de partición” es preferida por la IUPAC, mientras que el término “factor de capacidad” se recomienda por ASTM.

El área superficial interna de la columna capilar (donde el espesor de la película polimérica es constante y gobierna V_s) varía directamente con el diámetro de la columna; mientras que, el volumen de la columna (la cual gobierna V_M) varía directamente con el cuadrado del radio interno. Para las columnas comúnmente usadas, el rango de espesor (d_f) va desde 0.1 a 1.0 μm y el diámetro de la columna está en el rango 200 - 530 μm . En el caso de las columnas capilares, V_M y V_s se pueden establecer desde las dimensiones de la columna y el espesor de la fase líquida. Para columnas con espesor delgado donde r_c (radio de la columna) es mucho mayor que d_f (espesor de la fase estacionaria) la relación de fase se puede expresar según la **Ecuación 17**:

$$b = \frac{(r_c^2 p) \cdot L}{(2r_c p) \cdot L \cdot d_f} = \frac{r_c}{2d_f} \quad \text{Ecuación 17}$$

siendo L , la longitud de la columna [33,37].

2.1.8 Relación entre k , b y K_D . En cromatografía de partición, la concentración está expresada como cantidad por volumen de las fases [37]. Tomando como referencia la **Ecuación 7**, se puede observar que la constante de distribución K_D se puede definir así:

$$K_D = \frac{\text{Cantidad en fase estacionaria} / \text{Volumen de la fase estacionaria}}{\text{Cantidad en fase móvil} / \text{Volumen de la fase móvil}}$$

o

$$K_D = \frac{\text{Cantidad en fase estacionaria}}{\text{Cantidad en fase móvil}} \times \frac{\text{Volumen de la fase móvil}}{\text{Volumen de la fase estacionaria}}$$

La última fracción ha sido definida como la relación de fases, β , y la primera fracción es el mismo factor de capacidad k . De esto surge una relación (**Ecuación 18**), que se ha utilizado en la comprensión de la interrelación de muchos parámetros en las características de retención y separación [33,40,41]:

$$K_D = k\beta \quad \text{Ecuación 18}$$

K_D es un parámetro específico para cada sustancia, para una fase estacionaria y temperatura dadas, y es independiente de otros parámetros de operación, tales como la cantidad de las dos fases en la columna.

Termodinámicamente, la constante de distribución puede ser expresada como una función de la presión de vapor saturado (p^0) y el coeficiente de actividad (g^0) del analito, la densidad (r_s) y la masa molecular (M_s) de la fase estacionaria y la temperatura absoluta de la columna (T_c) (**Ecuación 19**):

$$K_D = \frac{p_s^o RT_C}{p_g^o M_s} \quad \text{Ecuación 19}$$

donde R es la constante de los gases. La dependencia de la temperatura del coeficiente de partición se puede expresar por la **Ecuación 20**:

$$\log K_D = \frac{A}{T_C} + B \quad \text{Ecuación 20}$$

donde T_C es la temperatura absoluta de la columna y A y B son constantes.

En otras palabras, a altas temperaturas el valor de K_D será menor y el analito eluirá más pronto. De la discusión anterior, se puede concluir que el proceso de separación cromatográfico es controlado por la afinidad selectiva de los componentes de la muestra por las fases estacionaria y móvil, así como por la temperatura del proceso [37,42].

2.2 ACEITES ESENCIALES

El aceite esencial es una mezcla de componentes volátiles, producto del metabolismo secundario de las plantas [43] y comprende las esencias y las resinas. A menudo la planta los vierte al exterior por medio de los canales excretores. Las esencias, que son volátiles, se difunden a través de la epidermis de las hojas y de las flores expandiendo un olor muy pronunciado y son los compuestos que dan perfume a éstos [44,45]. Se les llama aceites por su apariencia física y consistencia similar a los aceites vegetales (e.g. comestibles), pero se distinguen de ellos porque al dejar caer unas gotas de esencia sobre el papel éstas se volatilizan fácilmente sin dejar ninguna huella, ni mancha grasosa [43,44].

Las esencias son mezclas más o menos complejas en cuya composición entra una porción de hidrocarburos de la serie isoprenica del grupo de los terpenos que responden a la fórmula $(C_5H_8)_n$ (hemiterpenos, $n=1$; monoterpenos, $n=2$; sesquiterpenos, $n=3$; diterpenos, $n=4$; etc.) (ver **Figura 1**), junto con otros compuestos casi siempre oxigenados, que son los que transmiten a los AE's el olor o la fragancia que los caracteriza [43,45,46].

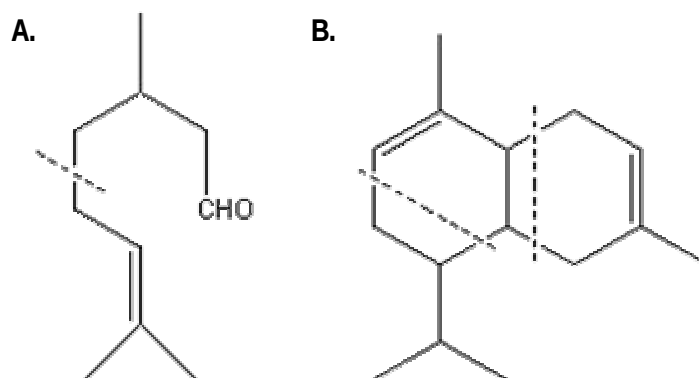


Figura 1. Hidrocarburos de serie isoprénica. **A.** Monoterpenos (C_5H_8)₂; **B.** Sesquiterpenos (C_5H_8)₃

Los AE's se clasifican en tres grandes grupos. El primer grupo son los monoterpenos, los cuales han sido conocidos por cientos de años como componentes de AE's. El segundo grupo está constituido por sesquiterpenos, diterpenos y un grupo residual que contiene ácidos grasos, polímeros, etc. El tercer grupo es el de más interés y consiste en una variedad de compuestos oxigenados que van desde alcoholes, cetonas, aldehídos, ésteres y éteres hasta complicadas lactonas macrocíclicas. Estos compuestos poseen características odorantes y son los que más a menudo se utilizan como ingredientes de sabor y fragancias [3].

Los AE's se encuentran muy difundidos en el reino vegetal, especialmente, en las Fanerógamas, las cuales se hallan repartidas en unas sesenta familias (*Labiadas*, *Mirtáceas*, *Rutáceas*, *Umbellíferas*, etc.). Se pueden encontrar localizados en diferentes partes de la planta, por ejemplo: hojas (albahaca, menta, romero, etc.), raíces (valeriana, cálamo, etc.), corteza (canela, cedro, sándalo, etc.), flores (jazmín, ylang-ylang, rosa, etc.), cáscara del fruto (limón, mandarina, naranja, etc.) y frutos (anís, cardamomo, eneldo, etc.). La cantidad y composición del aceite varían de una especie a otra, y dentro de los mismos géneros de la planta.

2.2.1 Composición. Se conocen en la actualidad, más de doscientos aceites esenciales de alto valor comercial en los cuales se han identificado más de quinientos componentes. Entre los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales figuran los terpenoides. Estos compuestos son las sustancias más abundantes en el mundo de los productos naturales y están formados por varias unidades isoprénicas, cuyo número sirve como criterio para la clasificación de los terpenos [43].

2.2.1.1 Terpenos y terpenoides. Los terpenos están entre los más extensos grupos de productos naturales de interés químico. Sin embargo, debido a su diversidad estructural tienen una simple característica unificada, la cual se usará para su definición. Compuestos terpenoides se puede definir como un grupo de

productos naturales cuya estructura puede dividirse en unidades isoprénicas: hemiterpenos, C_5 ; monoterpenos, C_{10} ; sesquiterpenos, C_{15} ; diterpenos, C_{20} ; sesterterpenos, C_{25} ; triterpenos, C_{30} ; carotenoides, C_{40} ; resinas $(C_5)_n$ [46-49]. En la **Figura 2**, se presentan terpenos y algunos derivados oxigenados, encontrados frecuentemente en la naturaleza.

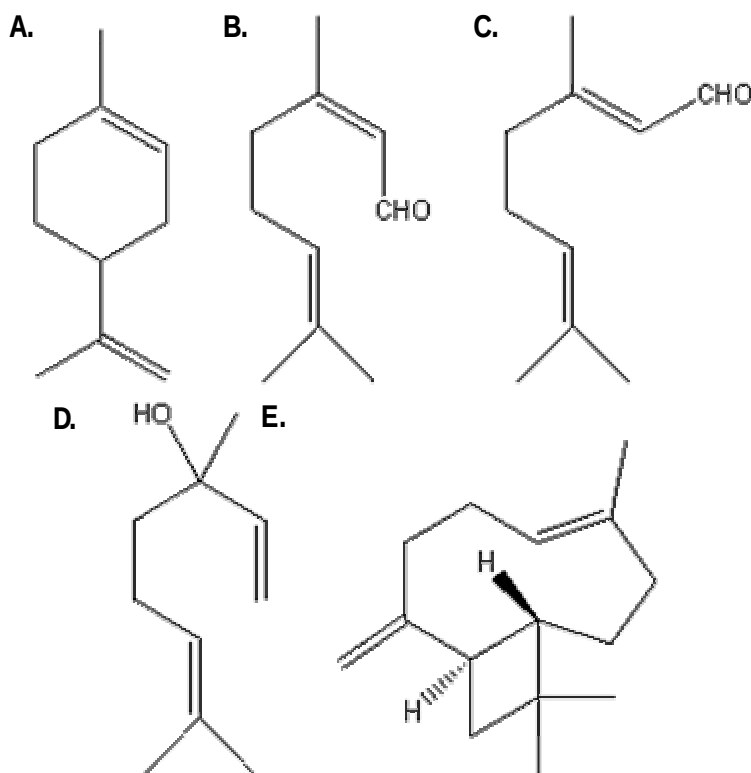


Figura 2. Terpenos, derivados oxigenados y sesquiterpenos. **A.** Limoneno; **B.** Neral (Citral B); **C.** Geranial (Citral A); **D.** Linalol y **E.** *trans*- β -Cariofileno

2.3 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN

El aislamiento, la concentración y la purificación de los AE's han sido procesos importantes por muchos años como consecuencia de su extenso uso. Los métodos "clásicos" empleados se basan en técnicas destilativas y extractivas [50] junto con otras aproximaciones discontinuas, continuas e híbridos [4]. Entre las técnicas destilativas se encuentran hidrodestilación [51-53] y arrastre con vapor [48] (**Figura 3**), los cuales son los procedimientos más tradicionales para el aislamiento de AE's. Así mismo, existen otras técnicas para la obtención de extractos de compuestos volátiles de la fase condensada (líquido y sólido) como extracción con solvente y destilación simultánea (DES) [53,54]; destilación al vacío [55]; métodos de extracción directa:

extracciones líquido-líquido (LLE), en fase sólida (SPE) y con fluido supercrítico (SFE) [56] y métodos para el análisis de la fase vapor (fracción volátil) de fases condensada y/o gaseosa conocidas como técnicas *headspace*: *headspace* estático (S-HS) [57], *headspace* dinámico (D-HS) [53,58], microextracción en fase sólida en el modo *headspace* (HS-SPME) [1,59-61]. La extracción asistida por la radiación de microondas [52], se considera como alternativa reciente para el aislamiento de AE's de alto valor [4].



Figura 3. Esquema del método convencional para la obtención de aceites esenciales: arrastre con vapor [51].

2.3.1 Extracción asistida por la radiación de microondas. La extracción asistida por la radiación de microondas (MAE) es un proceso que usa la energía de microondas para calentar solventes en contacto con una muestra, permitiendo el reparto de los analitos desde la matriz al solvente. Una de sus ventajas es la reducción del tiempo de extracción atribuido principalmente a las diferencias en la eficiencia del calentamiento, comparado con el calentamiento convencional. En el calentamiento convencional se necesita un período de tiempo finito para calentar el recipiente antes que el calor se transfiera a la solución, mientras que el calor, impartido por la radiación de microondas, se transfiere directamente a la solución, manteniendo el gradiente de temperatura al mínimo y acelerando la velocidad de calentamiento [4,61].

2.3.1.1 Principios básicos. La radiación de microondas es energía electromagnética no ionizante, que causa incremento en el movimiento molecular por conducción o migración de iones y rotación de dipolos, pero no genera ningún cambio en la estructura molecular. La energía de microondas tiene un rango de frecuencias entre 300 y 300.000 MHz. La frecuencia de 2450 MHz es la más utilizada en todas las unidades de hornos microondas caseros, siendo la energía típica de salida en el sistema, 600-700W. Así, en 5 min. aproximadamente 43000 cal se suministran a la cavidad del microondas para el calentamiento de la muestra [62].

En muchas aplicaciones estos dos mecanismos, *i.e.* conducción iónica y rotación de dipolo, suceden simultáneamente. La conducción iónica es la migración electroforética de iones cuando se aplica un campo electromagnético. La resistencia de la solución a este flujo de iones resultará en fricción y así, en el calentamiento de la solución. La rotación del dipolo significa la alineación de los dipolos con el campo aplicado. A 2450 MHz, el alineamiento de las moléculas seguido por su retorno al desorden, ocurre 4.9×10^9 veces por segundo y este movimiento molecular forzado resulta en un calentamiento muy rápido [61,62].

La habilidad de un solvente para absorber energía de microondas y transmitirla en forma de calor a otras moléculas, parcialmente dependerá del factor de disipación ($\tan \delta$). El factor de disipación está dado por la

Ecuación 21:

$$\tan \delta = \epsilon''/\epsilon'$$

Ecuación 21

donde ϵ'' es la pérdida dieléctrica (una medida de la eficiencia de conversión de la energía de microondas en calor) y ϵ' es la constante dieléctrica (una medida de la polarizabilidad de una molécula en el campo eléctrico). Moléculas polares y soluciones iónicas (usualmente ácidas) absorberán fuertemente energía de microondas porque tienen un momento dipolar permanente que será afectado por las microondas. Sin embargo, un solvente apolar, tal como el hexano, no se calentará cuando se exponga a las microondas [62].

El proceso de extracción por calentamiento puede ocurrir por varios mecanismos: la muestra se sumerge en un solvente o mezcla de solventes que absorben intensamente la energía de microondas (Mecanismo I); la muestra se sumerge en una combinación de solventes que contienen tanto alta como baja pérdida dieléctrica, mezclada en varias proporciones (Mecanismo II) y las muestras que tienen una alta pérdida dieléctrica pueden ser extraídas con un solvente transparente a la energía de microondas (Mecanismo III) [61,62].

2.3.1.2 Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas. Esta técnica utiliza el mismo montaje para hidrodestilación convencional [49], con la diferencia que la fuente de calor es un horno de microondas. Es una técnica poco compleja, fácil de implementar, que provee una nueva ruta para extraer productos solubles en un fluido, ayudada por la radiación de microondas [4]. La matriz a extraer se mezcla con agua en un recipiente disponible acoplado a un condensador y mientras ebulle la mezcla, se recoge una fase condensada. Después del proceso, una fracción orgánica insoluble en agua (para material vegetal, AE) se puede separar de ésta [1]. La extracción de AE's asistida por la radiación de microondas ha evolucionado de manera gradual [52,63].

2.3.2 Microextracción en fase sólida. Es una técnica de preparación de muestra que extrae, concentra e introduce los analitos al sistema de separación en un sólo paso [23,64,65]. Es un método sensible, rápido, relativamente económico, libre de solvente y fácilmente automatizado. La técnica emplea una pequeña fibra de sílice fundida, recubierta con una fase polimérica (fase extractora) y los analitos se ab(ad)sorben en la fibra (dependiendo de la naturaleza del recubrimiento) hasta que el sistema alcanza el equilibrio termodinámico [21] (**Figura 4**).

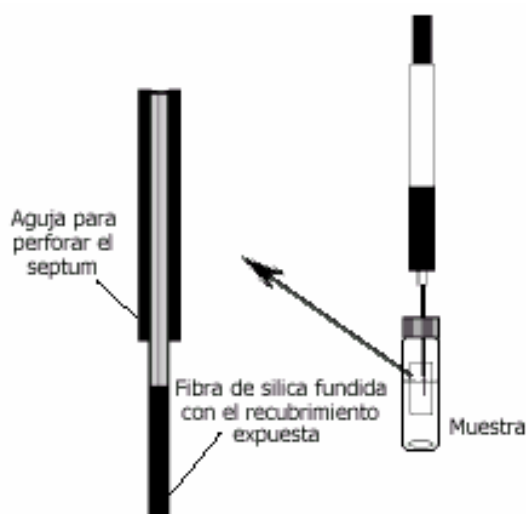


Figura 4. Montaje para SPME

La eficiencia de la extracción depende del reparto del analito entre la matriz de la muestra y el recubrimiento y, la partición obedece a las propiedades fisicoquímicas del analito, la matriz de la muestra y la fase extractora [66]. El dispositivo se introduce al puerto de inyección del instrumento analítico (GC) donde se efectúa la desorción térmica de los compuestos. El recubrimiento “trabaja” como una trampa de analitos, resultando en una acumulación de masa sobre la fibra [64,65,67,68].

2.3.2.1 Modos de extracción. El muestreo por SPME se lleva a cabo en tres modos básicos, a saber: extracción directa, indirecta (*headspace*) y usando protección con membrana. La **Figura 5** muestra las diferencias entre estos modos.

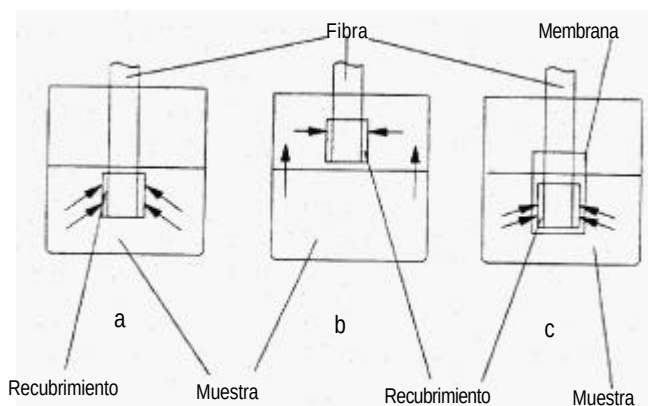


Figura 5. Modos de extracción por SPME: **a.** Directo; **b.** *Headspace*; y, **c.** Con protección de membrana

2.3.2.1.1 Modo *headspace*. Cuando la fibra está en el HS, los analitos se remueven primero desde éste dando lugar a una extracción indirecta desde la matriz. Los analitos volátiles se extraen más rápidamente que los semivolátiles [67,69]. Esta modificación sirve principalmente para proteger el recubrimiento de daños causados por sustancias de alto peso molecular y otras interferencias no volátiles presentes en la matriz de la muestra (e.g. ácidos húmicos o proteínas), reduciendo el efecto de matriz [70].

2.3.2.2 Termodinámica de la SPME. SPME es un proceso de equilibrio donde sólo se consideran 3 fases: el recubrimiento de la fibra, la fase gaseosa o HS, y una fase condensada estimada homogénea [66,67,71]. Durante la extracción los analitos migran entre todas las tres fases hasta que se alcanza el equilibrio. Puesto que la masa total del analito debe permanecer constante durante la extracción, se tiene:

$$C_0 V_s = C_f^\infty V_f + C_h^\infty V_h + C_s^\infty V_s \quad \text{Ecuación 22}$$

$$K_{fh} = \frac{C_f^\infty}{C_h^\infty} \quad \text{Ecuación 23}$$

$$K_{hs} = \frac{C_h^\infty}{C_s^\infty} \quad \text{Ecuación 24}$$

donde C_0 , es la concentración inicial del analito en la fase condensada; C_f^∞ , C_h^∞ , C_s^∞ , son las concentraciones en el equilibrio del analito en el recubrimiento de la fibra, en el *headspace* y en la matriz,

respectivamente. V_f , V_h , V_s son los volúmenes del recubrimiento de la fibra, del *headspace* y de la matriz, respectivamente. K_{fs} y K_{hs} son los coeficientes de partición entre la fibra y el HS y entre el HS y la muestra, respectivamente.

La masa del analito absorbido por el recubrimiento, $n = C_f^\infty V_f$, se expresa:

$$n = \frac{K_{fs} V_f C_o V_s}{K_{fs} V_f + K_{hs} V_h + V_s} \quad \text{Ecuación 25}$$

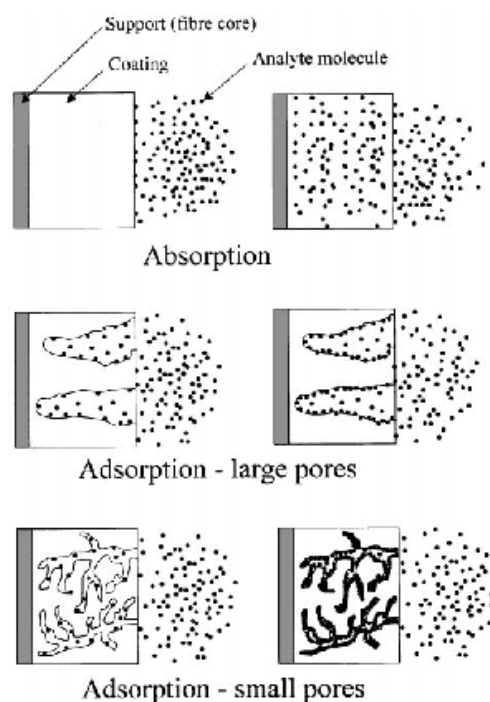
Como se observa de la **Ecuación 25**, en el equilibrio la concentración (o la cantidad) de analito en el recubrimiento de la fibra es directamente proporcional a la concentración en el HS y la constante depende del analito, tipo de recubrimiento y temperatura [72,73]. Por otro lado, el proceso de partición en GC es análogo al proceso de partición en SPME y hay una relación bien definida entre la constante de distribución y el tiempo de retención [56,67]. Se ha demostrado que la actividad del soluto en PDMS es ostensiblemente idéntica a la actividad del soluto en la fase estacionaria PDMS de cromatografía, proveyendo un componente de verificación al concepto que los parámetros usados en cromatografía, se pueden usar para describir propiedades de SPME (PDMS) [20].

2.3.2.3 Recubrimientos para SPME La naturaleza química (polaridad y volatilidad) de los analitos determina el tipo de recubrimiento a emplear y, la sensibilidad del método, junto con el tiempo de extracción, están determinados por el espesor del recubrimiento y K . En la **Tabla 1**, se encuentran registradas las características básicas de los diferentes recubrimientos disponibles para SPME [67].

Los recubrimientos para SPME presentan dos tipos de mecanismos de extracción-concentración: ab- y adsorción. PDMS y PA extraen los analitos vía absorción; mientras que, PDMS/DVB, Carbowax/DVB (CW/DVB) y Carboxen/PDMS (CX/PDMS), siendo mezclas de recubrimientos (donde la principal fase extractora es un sólido poroso), extraen los analitos vía adsorción [74]. En el proceso de absorción, los analitos se disuelven en el recubrimiento y difunden dentro del volumen durante la extracción; mientras que, en la adsorción ellos se quedan en la superficie del sólido hasta que se encuentren en equilibrio [67]. La **Figura 6**, ilustra el proceso de extracción para las fibras para SPME tipo absorción y adsorción.

Tabla 1. Recubrimientos disponibles comercialmente para fibras de SPME.

Tipo de fase	Espesor, μm	Polaridad	Tipo de extracción	Color de identificación	Aplicaciones
PDMS	100	Apolar	Absorción	Rojo	Volátiles
PDMS	30	Apolar	Absorción	Amarillo	Semivolátiles apolares
PDMS	7	Apolar	Absorción	Verde	Volátiles, semivolátiles de peso molecular más alto
PA	85	Polar	Absorción	Blanco	Volátiles, semivolátiles polares
PDMS/DVB	65	Bipolar	Adsorción	Azul	Volátiles, aminas y compuestos nitroaromáticos
CX/PDMS	75	Bipolar	Adsorción	Negro	Gases y compuestos de bajo peso molecular.
CW/DVB	65	Polar	Adsorción	Naranja	Alcoholes y compuestos polares

**Figura 6.** Comparación de los mecanismos de extracción: absorción Vs. adsorción [74].

Independientemente de la naturaleza del recubrimiento, las moléculas de analito inicialmente se adhieren a la superficie [67,68,74]. Si ellas migran al volumen del recubrimiento o permanecen en su superficie dependerá de la magnitud del coeficiente de difusión del analito en el recubrimiento. Los coeficientes de difusión de las moléculas orgánicas en PDMS y PA son grandes (cerca de los solventes orgánicos) comparados con

los coeficientes de difusión (pequeños) de las moléculas orgánicas en los sólidos porosos, que conducen a que dentro del tiempo de muestreo de análisis SPME esencialmente todas las moléculas permanezcan sobre la superficie del recubrimiento [74].

2.3.2.3.1 Teoría de extracción de analitos para sólidos porosos de las fibras para SPME. La teoría de equilibrio desarrollada para el recubrimiento líquido PDMS, descrita en el **Numeral 2.3.2.2**, no se aplica a estos tipos de recubrimientos. El número de sitios de la superficie de adsorción es limitado y cuando están ocupados, ningún analito puede ser atrapado; lo que significa que la dependencia entre la concentración de analito en la muestra y la cantidad de analito extraído por el recubrimiento no será lineal sobre un amplio rango de concentraciones. Entonces, mientras que la absorción es un proceso no competitivo, la adsorción es por definición competitiva y una molécula con mayor afinidad por la superficie puede reemplazar a una molécula con menor afinidad [74,75].

La dependencia entre la concentración en el equilibrio de un compuesto asociado con el sorbente y su concentración en la solución, comúnmente está referida a una isoterma de adsorción. La isoterma de adsorción de *Langmuir* [74,75] describe la extracción del analito en equilibrio para PDMS/DVB y se ha empleado para desarrollar la descripción teórica del proceso. En este modelo, la superficie tiene un número limitado de sitios de adsorción que pueden ser ocupados por el sorbato. Se tiene en cuenta que: (a) la molécula es adsorbida en un estado inmóvil; (b) todos los sitios son equivalentes; (c) cada sitio puede mantener al menos una molécula de adsorbato y, (d) no hay interacciones entre las moléculas de adsorbato sobre los sitios adyacentes así que, la constante de equilibrio es independiente del alcance de las especies adsorbidas [74,76,77]. La adsorción es tratada como una reacción donde la molécula A reacciona con el sitio vacío S para producir un complejo adsorbido A_{ad} .



En el equilibrio, la concentración de A (mol/cm²) en la superficie $[A_{ad}]$ está descrita por:

$$[A_{ad}] = [S_o] \frac{K_A [A]}{1 + K_A [A]} \quad \text{Ecuación 27}$$

donde $[S_o]$ es la concentración total de sitios activos sobre la superficie (concentración máxima de analito en la superficie, mol/cm²), K_A es la constante de adsorción en equilibrio y $[A]$ es la concentración de A en la matriz. Se define la concentración del analito sobre la fibra C_{fA} . Se puede calcular la concentración máxima de sitios activos C_{fmax} si se reemplaza la concentración en la superficie por la concentración en el volumen,

multiplicando ambos lados de la **Ecuación 27** por el término Φ/V_f , donde Φ es el área de la superficie (en cm^2):

$$C_{fA} = [A_{ad}] \frac{\Phi}{V_f} \quad \text{Ecuación 28}$$

$$C_{f \max} = [S_o] \frac{\Phi}{V_f} \quad \text{Ecuación 29}$$

Se usa el símbolo C_{sA}^8 y no $[A]$ para denotar la concentración del analito en la muestra, en el equilibrio. Se define la concentración del analito sobre la fibra C_{fA}^8 según la **Ecuación 30**:

$$C_{fA}^{\infty} = \frac{C_{f \max} K_A C_{sA}^{\infty}}{1 + K_A C_{sA}^{\infty}} \quad \text{Ecuación 30}$$

C_{fA}^8 no es proporcional a C_{sA}^8 excepto cuando $K_A C_{sA}^8$ sea mucho menor que uno. Esto sucede cuando la afinidad de un analito hacia la fibra es baja o su concentración en la muestra es muy baja. La **Ecuación** anterior es difícil de utilizar en la práctica, puesto que es necesario conocer la concentración del analito en el equilibrio. Es más práctico determinar la dependencia entre la concentración inicial del analito en la muestra (C_{oA}) y la cantidad extraída.

$$C_{oA} V_s = C_{sA}^{\infty} V_s + C_{hA}^{\infty} V_h + C_{fA}^{\infty} V_f \quad \text{Ecuación 31}$$

La descripción matemática del proceso de extracción HS es más compleja que la de la extracción directa. Con base en el modelo de *Langmuir*, la concentración del analito en el equilibrio sobre el recubrimiento de la fibra se puede definir como:

$$C_{fA}^{\infty} = \frac{C_{f \max} K_{Ah} C_{hA}^{\infty}}{1 + K_{Ah} C_{hA}^{\infty}} \quad \text{Ecuación 32}$$

donde el subíndice h en K_{Ah} denota que es la constante de equilibrio para adsorción del analito desde la fase gaseosa. La concentración de analitos en el HS, en el equilibrio, está determinada por la constante de la ley de Henry, K_{HA} :

$$C_{hA}^{\infty} = K_{HA} C_{sA}^{\infty} \quad \text{Ecuación 33}$$

el producto K_{HA} y K_{Ah} se denota como K'_A . Sustituyendo las **Ecuaciones 32 y 33** en la **31**, se obtiene:

$$n = C_{fA}^{\infty} V_f = \frac{K'_A C_{oA} V_s V_f (C_{f \max} - C_{fA}^{\infty})}{V_s + V_h K_{HA} + K'_A V_f (C_{f \max} - C_{fA}^{\infty})} \quad \text{Ecuación 34}$$

La solución analítica de la **Ecuación 34** produce:

$$n = \frac{C_{f \max} K'_A V_f + C_{oA} V_s K'_A + V_s + V_h K_{HA}}{2K'_A} + \frac{-\sqrt{K_A'^2 (C_{f \max} V_f - C_{oA} V_s)^2 + 2K'_A V_s \left(C_{f \max} V_f + C_{oA} V_s + V_h K_{HA} \frac{V_f}{V_s} C_{f \max} + V_h K_{HA} C_{oA} \right) + (V_s + V_h K_{HA})^2}}{2K'_A} \quad \text{Ecuación 35}$$

Usualmente el volumen del recipiente de muestra es constante. Se define $a=V_h/V_s$, y elimina V_h sustituyéndolo por aV_s :

$$n = \frac{C_{f \max} K'_A V_f + C_{oA} V_s K'_A + V_s (1 + aK_{HA})}{2K'_A} + \frac{-\sqrt{K_A'^2 (C_{f \max} V_f - C_{oA} V_s)^2 + 2K'_A V_s (C_{f \max} V_f + C_{oA} V_s + aK_{HA} V_f C_{f \max} + aV_s K_{HA} C_{oA}) + V_s^2 (1 + aK_{HA})^2}}{2K'_A} \quad \text{Ecuación 36}$$

La dependencia n Vs. C_{oA} y $C_{f \max}$ es muy complicada, y cuando se mira la **Ecuación 36**, no es muy claro inmediatamente cómo los términos relevantes (C_{oA} , $C_{f \max}$, etc.) afectan la cantidad extraída. Sin embargo, se puede usar relativamente fácil para modelar condiciones de extracción en el equilibrio para varios conjuntos de variables de entrada [74].

2.4 CROMATOGRAFÍA DE GASES

GC es un método dinámico de separación y detección de compuestos orgánicos en mezclas [34,78] y es una técnica multiuso, que se emplea en las industrias ambiental, farmacéutica, de productos naturales, petroquímica, así como para monitorear procesos químicos y para el análisis en química clínica, forense, de alimentos, etc. [78]. GC involucra el reparto de solutos gaseosos entre la fase móvil y una fase estacionaria líquida o sólida, donde la separación sucede principalmente debido a las diferencias en la solubilidad o adsorción de los componentes de la muestra en la fase estacionaria [38,42]. La distribución en el equilibrio está controlada por la presión de vapor de los componentes y su absorción en la fase estacionaria líquida [36,79]. Los componentes principales de un GC incluyen: (1) suministro de gases; (2) puerto de inyección; (3)

columna analítica; (4) detector y (5) sistema de adquisición de datos compuesto por una interfase, un PC y el *software* [36,42].

2.4.1 Sistemas de detección. El detector es un dispositivo que localiza, en dimensiones de espacio y tiempo, la posición de los componentes de una mezcla, después que éstos han sufrido un proceso cromatográfico y permite apreciar la naturaleza de la separación que ha sido obtenida. La función básica de un detector en GC es responder a la presencia de cantidades muy pequeñas de vapor de un analito en un gas permanente [80]; los detectores pueden clasificarse como universales, selectivos o específicos [42,80]. La selectividad es la capacidad del detector para reconocer y responder a los componentes de interés pero es importante resaltar que no todos los detectores responden a todos los compuestos. La sensibilidad formalmente se define como el cambio en la respuesta con el cambio en la cantidad detectada [78].

2.4.1.1 Detector de ionización en llama. La respuesta del FID resulta de la combustión de compuestos orgánicos en una pequeña llama (hidrógeno/aire) localizada en un mechero capilar [40], la cual genera especies eléctricamente cargadas o iones [42]. Un electrodo colector cilíndrico se instala a pocos milímetros por encima de la llama y la corriente de los iones se mide al establecer un potencial entre la punta del mechero y el electrodo colector [40,42]. La corriente es aproximadamente proporcional a la cantidad total de carbono e hidrógeno en el analito [34,79]. La pequeña señal de corriente es amplificada por un electrómetro. El FID es un detector casi universal para compuestos orgánicos, excepto agua y gases permanentes, sensible, estable, de fácil operación, volumen muerto bajo y amplio rango lineal de respuesta (hasta 10^7) [40,80].

2.4.1.2 Detector selectivo de masas. La cromatografía de gases – espectrometría de masas (GC-MS) es una de las técnicas más poderosas disponibles actualmente para análisis de sustancias volátiles térmicamente estables, se destaca por su alta especificidad y sensibilidad; además, suministra información cualitativa y cuantitativa [36,42]. Al acoplar el GC al espectrómetro de masas, éste actúa como detector. En el detector, *i.e.* cámara de ionización, la sustancia en fase vapor entra a la fuente de iones donde es ionizada por electrones de alta energía o por otros métodos que induzcan ionización. Dependiendo de la energía suministrada, la sustancia experimentará fragmentación parcial. Los iones son acelerados por un campo electrostático y se separan de acuerdo con su relación masa-carga, m/z [38]. La relación de abundancia de ión y las especies específicas m/z presentes, son únicas para cada compuesto. Con esta información se puede establecer el peso molecular y la estructura química de la sustancia [6]. GC-MS es una técnica fundamental para el análisis de mezclas complejas y ha conservado una posición principal en química analítica debido a su combinación de sensibilidad y amplio rango de aplicaciones [81].

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 OBTENCIÓN Y ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS DE LOS ACEITES ESENCIALES DE NARANJA Y DE YLANG-YLANG

3.1.1 Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas. Se seleccionaron dos aceites esenciales de diferente composición química (monoterpenos, terpenos oxigenados y sesquiterpenos), los cuales fueron aislados de material vegetal de ylang-ylang (flores) y de naranja (cáscaras). Para la obtención de los AE's se llevó a cabo MWHD de las flores maduras de ylang-ylang (*Cananga odorata*) y de las cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*). Las flores de ylang-ylang (200 g) se introdujeron directamente a un balón de 1 L; mientras que a las de naranja, antes de su extracción, se les retiró la cáscara manualmente. La cáscara se cortó en partes pequeñas rectangulares de aproximadamente 50 mm², tomándose 600-700 g, los cuales se colocaron dentro del balón de 1 L. Inmediatamente, se realizó el montaje respectivo de hidrodestilación.

Las flores y cáscaras (200-700 g con 300 mL agua) se sometieron a MWHD en un equipo de destilación tipo *Clevenger* con reservorio de destilación *Dean-Stark*. El calentamiento se efectuó por medio de la radiación de microondas en un horno, marca Kendo, modelo MO-124 (potencia de consumo: 1200 W; potencia de salida: 700 W y frecuencia de radiación: 2450 MHz). Se ejecutaron 3 extracciones consecutivas por cada lote de muestra con un tiempo de extracción de 20 min, un pulso de 8 y volumen de agua de 300 mL.

3.1.2 HRGC-MSD. El análisis de los constituyentes de los AE's se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases modelo HP-5890A *Series II* (*Hewlett-Packard*, Palo Alto, CA, EE.UU.), equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (relación *split* 30:1), con inyector automático HP 7683 *Series*. Para la separación de los analitos de interés se utilizó una columna capilar de sílice fundida HP-5, de fase estacionaria 5%-fenilpoli(dimetilsiloxano) [60 m x 0.25 mm (d.i.) x 0.25 µm (f.e.)] (*Hewlett-Packard*, Little Falls, PA, EE.UU.). La programación de temperatura para la columna fue desde 50°C mantenidos 5 min., con una rampa de calentamiento de 5°C/min hasta 250°C, mantenidos durante 10 min. El GC fue acoplado a un detector selectivo de masas *Hewlett-Packard* modelo HP 5972 con sistema de ionización por impacto de electrones (70 eV), temperatura de la cámara de ionización de 180 °C y un analizador másico cuadrupolar, operado en el modo de barrido completo de radiofrecuencia (*full scan*) desde 40 hasta 400 *Daltons* (*m/z*).

Para la identificación, se recurrió al sistema de datos *HP Enhanced ChemStation G1701BA* (versión B.01.00), con bases de datos NBS75K & Wiley 138.

3.2 MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA EN EL MODO HEADSPACE

Para determinar las mejores condiciones de extracción para SPME de los compuestos volátiles presentes en los AE's se emplearon dos recubrimientos, patrones certificados de monoterpenos, terpenos oxigenados y sesquiterpenos y se llevó a cabo análisis por HRGC/FID.

3.2.1 Tipos de recubrimientos empleados. El dispositivo de SPME se adquirió de Supelco, Inc. (Bellefonte, PA, EE.UU.) y se utilizaron dos recubrimiento para fibras: (1) PDMS de 100 μm y (2) PDMS/DVB de 65 μm . Las variables evaluadas fueron el tiempo y la temperatura de exposición de la fibra. Para la determinación del tiempo, se expuso la fibra a los vapores de la muestra durante 5, 10, 20, 30, 40, 60 y 90 min, manteniendo constante la temperatura (22°C); la temperatura se varió así: 22 (temperatura ambiente), 40 y 60°C. Cada experimento se repitió tres veces. Las fracciones volátiles aisladas por HS-SPME se analizaron por GC/FID.

3.2.2 Patrones de terpenoides empleados. Los patrones certificados empleados fueron de compuestos presentes en los AE's estudiados, tales como el limoneno, α -pineno, α -terpineno, eucaliptol, *trans*- β -cariofileno, linalol, citral (neral y geranial), terpinen-4-ol y geraniol. En la **Tabla 2** se registran su pureza y las casas comerciales distribuidoras.

Tabla 2. Pureza de patrones certificados de monoterpenos, terpenos oxigenados y sesquiterpenos.

Compuesto	Pureza, %	Casa distribuidora
Limoneno	97	Aldrich Chemical
α -Pineno	97	Merck
α -Terpineno	89	Sigma
Eucaliptol (1,8-Cineol)	99	Aldrich Chemical
Linalol	95-97	Sigma
Citral	<i>cis</i> – 64; <i>trans</i> – 32	Sigma
Terpinen-4-ol	96	Aldrich Chemical
Geraniol	98	Sigma
<i>trans</i> - β -Cariofileno	98	Sigma

3.2.2.1 Preparación de las soluciones de patrones. Para inyección directa de las soluciones, se tomaron 50 μL de cada patrón certificado de terpenos y se diluyó hasta 1 mL con metanol grado HPLC (*J.T. Baker*). 1 μL de estas soluciones se inyectó al equipo GC/FID, para su análisis cromatográfico.

3.2.3 HRGC/FID. Se utilizaron dos cromatógrafos de gases: *Agilent Technologies 6890N* y *Hewlett-Packard HP 5890 Series II* (Palo Alto, CA, EE.UU.) equipados con puertos de inyección *split/splitless* (*split* 15:1) [inyección manual para SPME e inyección automática para soluciones, *HP 7683 Series Injector*], con detectores de ionización en llama operados a 250°C y con flujos de aire e hidrógeno de 300 y 30 mL/min, respectivamente. Para los dos equipos se utilizó la columna capilar de sílice fundida HP-5 de fase estacionaria 5%-fenil-poli(dimetilsiloxano), 30 m x 0.32 mm (d.i.) x 0.25 μm (f.e.). Como gas de arrastre se usó helio (AGA Fano S.A., 99.995%) con presión de entrada de 152 kPa y velocidad lineal de 35.7 cm/s. Los datos obtenidos en los análisis se procesaron usando el software *ChemStation Rev. A.10.02 [1757]* (*Agilent Techn.*) y *HP ChemStation Rev. A.03.06 [509]* (*Hewlett-Packard*). La programación de temperatura empleada en los equipos fue la misma descrita en el **Numeral 3.1.2** de este capítulo.

3.2.4 Selección del tiempo y temperatura de extracción. Para la inyección por SPME se prepararon soluciones patrón de la misma forma como se describió para inyección directa. Sin embargo, para el muestreo, 50 μL de cada solución se transfirieron a un vial ámbar estándar de 4 mL para SPME. El vial se selló herméticamente con el *septum* blanco de silicona recubierto con Teflón blanco. Posteriormente, el recipiente se colocó en un baño de agua a la temperatura de prueba (22, 40 y 60°C), manteniendo constante el tiempo (30 min). Cada recubrimiento de la fibra para SPME, se expuso a los vapores de la muestra durante el tiempo estipulado (5, 10, 20, 30, 40, 60 y 90 min). La desorción de los analitos de la fibra se realizó luego en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases, a una temperatura de 250°C durante 5 minutos.

3.3 DETERMINACIÓN DE K_D POR GC PARA COMPUESTOS PATRÓN DE TERPENOIDES

Para la determinación de K_D se emplearon condiciones isotérmicas para el horno cromatográfico. Los tiempos de retención de los terpenos y los tiempos del soluto no retenido (t_M) se hallaron a las diferentes temperaturas trabajadas: 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130 y 140°C. Después de obtener los t_R , t_M y con base en las **Ecuaciones 15, 17 y 18** se calcularon los valores de K_D para cada uno de los compuestos bajo estudio. Cada una de las mediciones se realizó por triplicado y los datos obtenidos se tabularon.

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad \text{Ecuación 15}$$

$$\beta = \frac{r_c}{2d_f} \quad \text{Ecuación 17}$$

$$K_D = k\beta \quad \text{Ecuación 18}$$

3.4 DETERMINACIÓN DE K_D POR HS-SPME/HRGC/FID DE COMPUESTOS PATRÓN DE TERPENOIDES Y DE ACEITES ESENCIALES DE NARANJA Y DE YLANG-YLANG

La constante de distribución, la cual determina la sensibilidad del método SPME para una sustancia dada, se puede estimar desde datos fisicoquímicos y parámetros cromatográficos. Como se mencionó anteriormente la constante de distribución AE-PDMS ($K_{AE-PDMS}$) es el producto de dos constantes: la constante de reparto fase condensada (AE)-*headspace* (K_{AE-HS}) y la constante de reparto PDMS-*headspace* ($K_{PDMS-HS}$). Para las determinaciones de los coeficientes K_{AE-HS} y $K_{PDMS-HS}$ se emplearon los siguientes métodos: inyección directa de la muestra, *headspace* estático (S-HS) y HS-SPME (PDMS-100 μm).

3.4.1 Inyección directa de los patrones de terpenoides y aceites esenciales. Una alícuota (50 μL) de la mezcla de patrones de terpenoides (21156 ppm) y de los aceites esenciales se transfirieron a viales cónicos de poli(propileno) (1.5 mL) y se diluyeron con metanol (1 mL). La solución se transfirió a viales estándar (2 mL) para cromatografía. 1 μL de cada solución se introdujo al sistema cromatográfico para su análisis.

3.4.2 Headspace estático de los patrones de terpenoides y aceites esenciales. Las soluciones (1 mL) con los patrones de terpenoides y los AE's se transfirieron a viales estándar (20 mL) para *headspace*. Los viales se sellaron herméticamente con *septum* de butilo recubiertos con Teflón y agrafe metálico. Posteriormente, se realizó el análisis por S-HS/HRGC/FID.

3.4.2.1 Análisis por S-HS. El equipo empleado fue un *headspace sampler* HP 7694E (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, EE.UU.) equipado con un carrusel portamuestra de 12 unidades y un *loop* presurizado de 1 mL. Las temperaturas empleadas para el horno, *loop* y línea de transferencia fueron 40, 60 y 80°C, respectivamente. Los tiempos requeridos para el ciclo GC, equilibrio del vial, presurización, llenado del *loop* e inyección fueron de 65 y 30 min y de 2, 6 y 30 s, respectivamente. Las fases vapor extraídas se analizaron por HRGC/FID, bajo las condiciones operacionales descritas en el **Numeral 3.2.3**.

Las condiciones de temperatura de equilibrio del vial y tiempo de extracción se escogieron con base en las mejores condiciones de extracción, determinadas para SPME.

3.4.3 Microextracción en fase sólida en el modo *headspace* de los patrones de terpenoides y de los aceites esenciales. Con base en las mejores condiciones de extracción determinadas previamente, según el **Numeral 3.2.4**, se realizaron las extracciones de los patrones de terpenoides y de los dos aceites esenciales bajo estudio. Las soluciones (1 mL) con la mezcla de patrones de terpenoides y de los aceites esenciales de ylang-ylang y naranja se transfirieron a frascos de vidrio estándar de 20 mL, para *headspace*. Los viales se sellaron herméticamente con *septum* de butilo recubierto con Teflón y agrafe metálico. Posteriormente, cada recipiente se colocó en un baño de agua a 40°C. Una fibra de sílice fundida recubierta con poli(dimetilsiloxano) de 100 µm de espesor (PDMS-100 µm), se expuso a los vapores de la muestra durante 30 minutos. La desorción de los analitos de la fibra se realizó luego en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases, a una temperatura de 250°C durante 5 minutos.

3.4.4 Cálculos de K_{AE-HS} , $K_{PDMS-HS}$ y $K_{AE-PDMS}$. Con base en las áreas cromatográficas obtenidas de cada uno de los analitos presentes en la mezcla de terpenoides y de los aceites esenciales, junto con los valores de los volúmenes del recubrimiento PDMS y del HS, se calcularon las respectivas constantes de distribución. Se utilizaron las **Ecuaciones 37, 38 y 39** para la realización de estas determinaciones:

$$K_{AE-HS} = \frac{C_{AE}^{\infty}}{C_{HS}^{\infty}} = \frac{(AT_{AE}V_V - A_{HS}^{\infty}V_{HS})}{A_{HS}^{\infty}V_S} \quad \text{Ecuación 37}$$

$$K_{PDMSHS} = \frac{C_{PDMS}^{\infty}}{C_{HS_2}^{\infty}} = \frac{A_{PDMS}V_{HS}}{A_{HS}V_{PDMS}} \quad \text{Ecuación 38}$$

$$K_{AE-PDMS} = K_{AE-HS} \times K_{PDMSHS} \quad \text{Ecuación 39}$$

donde:

C_{AE}^{∞} es la concentración en el equilibrio, del analito contenido en la fase condensada (mezcla de terpenoides y/o aceite esencial) y se calcula como la diferencia entre los productos del área cromatográfica total del analito (obtenida de la sustancia pura) por el volumen total de vial HS y del área cromatográfica de la misma especie, obtenida por S-HS/HRGC/FID, por el volumen del HS ($AT_{AE}V_V - A_{HS}^{\infty}V_{HS}$);

C_{HS}^{∞} es la concentración en el equilibrio, del analito presente en la mezcla de terpenoides y/o aceite esencial, que se encuentra en el HS y se obtiene del producto del área cromatográfica del analito, obtenida por S-HS/HRGC/FID, por el volumen de la fase condensada ($A_{HS}^{\infty} V_S$) [82,83];

C_{PDMS}^{∞} es la concentración en el equilibrio, del analito (mezcla de terpenoides y/o aceite esencial) atrapado por el recubrimiento PDMS en el *headspace* y se calcula como el producto del área cromatográfica del analito (obtenida por HS-SPME/HRGC/FID) por el volumen inyectado del HS de la muestra y,

$C_{HS_2}^{\infty}$ es la concentración en el equilibrio, del analito (mezcla de terpenoides y/o aceite esencial) que se encuentra en el HS y se calcula como el producto del área cromatográfica del analito (obtenida por S-HS/HRGC/FID) por el volumen del recubrimiento de PDMS-100 μm [25,84,85].

3.5 DETERMINACIÓN DEL FENÓMENO DE COMPETENCIA EN EL RECUBRIMIENTO DE PDMS, EMPLEANDO LOS PATRONES DE TERPENOIDES

Para determinar el fenómeno de competencia (que no es característico para el mecanismo de extracción-concentración, absorción) en el recubrimiento de PDMS, se prepararon y utilizaron soluciones individuales de cuatro patrones de terpenos (limoneno, α -pineno, linalol y *trans*- β -cariofileno), de concentración conocida. Para la realización de esta parte de la investigación, se seleccionó la solución de limoneno (50 μL) y se expuso a la fibra de PDMS durante 30 min a 20°C. Seguidamente, la fibra saturada con los vapores del limoneno se expuso a otro vial, el cual contenía solución de α -pineno (50 μL), en un intervalo de tiempo comprendido entre 5 y 30 min. Los datos obtenidos se graficaron [tiempo de exposición al α -pineno, previa saturación de la fibra con limoneno, Vs. respuesta del detector], para observar la tendencia encontrada. Adicionalmente, este procedimiento se realizó para las soluciones individuales restantes (linalol y *trans*- β -cariofileno) y para mezclas binarias y ternarias elaboradas con las soluciones individuales de terpenos (α -pineno, linalol y *trans*- β -cariofileno), previa saturación de la fibra con limoneno. Para comprobar el fenómeno de competencia, el anterior procedimiento se llevó a cabo empleando el recubrimiento de PDMS/DVB de 65 μm de espesor (el cual presenta el fenómeno de adsorción), obteniéndose sus respectivas gráficas. Las gráficas de los dos estudios se compararon para vislumbrar sus diferencias o similitudes.

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos se discutirán basados en: la identificación de los componentes principales de los aceites esenciales de ylang-ylang y de naranja; la obtención de los perfiles de saturación para SPME de mezcla de terpenoides, empleando las dos fibras, *i.e.* PDMS (100 μm) y PDMS/DVB (65 μm), en función del tiempo y la temperatura; la determinación de K_0 empleando el método tradicional por GC, descrito en el **Numeral 3.3**; determinación de K_0 para los componentes de la mezcla de terpenoides y aceites esenciales bajo estudio y, comportamiento de una mezcla de analitos en el mecanismo competitivo de extracción, usando fases de recubrimiento de PDMS y PDMS/DVB.

4.1 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE NARANJA Y DE YLANG-YLANG

Los aceites esenciales de las flores de ylang-ylang y de las cáscaras de naranja fueron obtenidos por MWHD y analizados por HRGC-MSD, así como se describió en el **Numeral 3.1** de la Parte Experimental.

Al efectuar el análisis por HRGC-MSD se obtuvieron las corrientes iónicas totales reconstruidas (TIC's $\equiv$ cromatogramas) de los AE's de naranja y de ylang-ylang, las cuales se ilustran en las **Figuras 7 y 8**. En cada una de estas **Figuras** se señalan los componentes mayoritarios del respectivo aceite esencial, de acuerdo con la identificación registrada en las **Tablas 3 y 4**. La identificación de las sustancias aisladas se realizó con base en sus espectros de masas, comparándolos con los de las bases de datos (Wiley 138 y NBS 75K) del equipo HRGC-MSD y con los espectros, reportados en el "Estudio comparativo de los aceites esenciales de hojas y frutos de cítricos colombianos" [86], "Obtención y análisis de los metabolitos secundarios volátiles de ylang-ylang (*Cananga odorata*, Hook. f. et Thomson, forma genuina)" [87] y "Variación composicional del aceite esencial de ylang-ylang, con la maduración de la flor y el pH de extracción" [88], desarrollados en el Laboratorio de Cromatografía en 1995 y 1999, respectivamente.

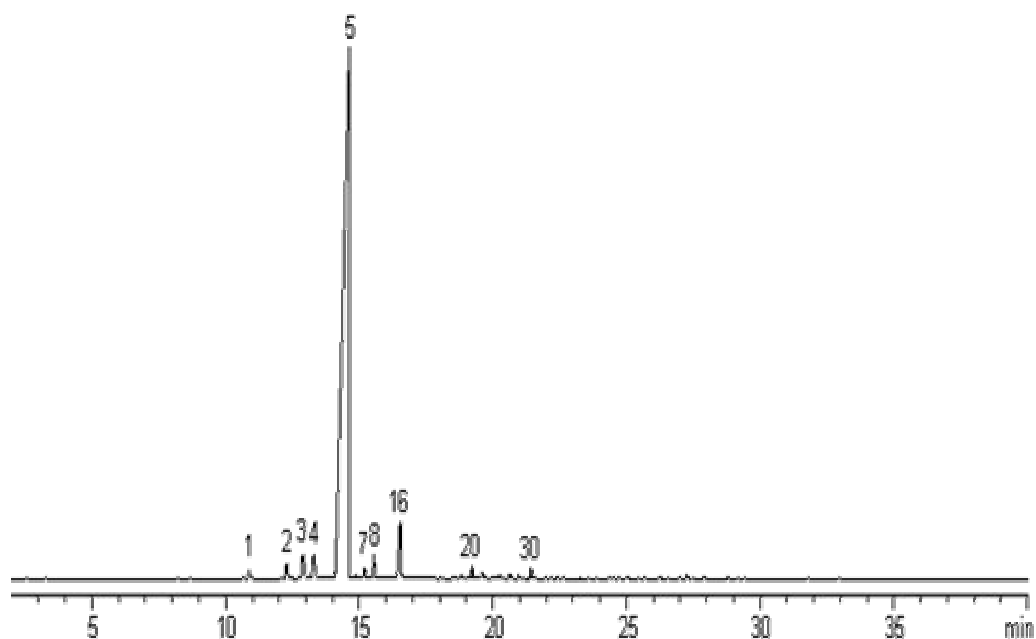


Figura 7. Corriente iónica total reconstruida (cromatograma) obtenida por HRGC-MSD, del aceite esencial de cáscara de naranja. Columna HP-5 [60 m x 0.25 mm (d.i.) x 0.25 μ m (f.e)]. Relación *split* 1:30.

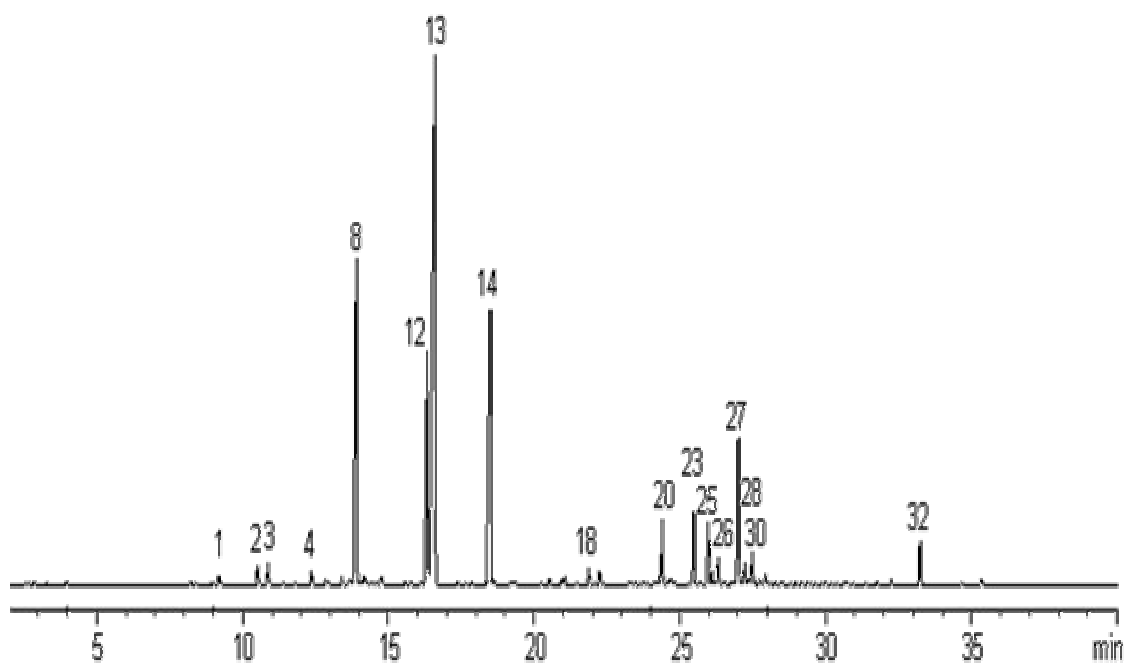


Figura 8. Corriente iónica total reconstruida (cromatograma) obtenida por HRGC-MSD, del aceite esencial de flores de ylang-ylang. Columna HP-5 [60 m x 0.25 mm (d.i.) x 0.25 μ m (f.e)]. Relación *split* 1:30.

Tabla 3. Identificación por HRGC-MSD y cantidad relativa (%) de los componentes principales (>0.01%), presentes en el aceite esencial de cáscara de naranja.

No. Pico*	Compuesto	I _{R-Exp}	I _{R-Teor} ²	Cantidad relativa, %
1	α -Pineno (C ₁₀ H ₁₆ , M ⁺ . 136)	937	939	0.4
2	Sabineno (C ₁₀ H ₁₆ , M ⁺ . 136)	976	976	0.7
3	β -Mirceno (C ₁₀ H ₁₆ , M ⁺ . 136)	990	991	1.4
4	Octanal (C ₈ H ₁₆ O, M ⁺ . 128)	1004	1001	1.0
5	Limoneno (C ₁₀ H ₁₆ , M ⁺ . 136)	1043	1031	88.3
6	β -Ocimeno (C ₁₀ H ₁₆ , M ⁺ . 136)	1049	1040	0.1
7	γ -Terpineno (C ₁₀ H ₁₆ , M ⁺ . 136)	1063	1062	0.4
8	Octanol (C ₈ H ₁₈ O, M ⁺ . 130)	1071	1070	0.6
9	α -Terpinoleno (C ₁₀ H ₁₆ , M ⁺ . 136)	1089	1088	0.1
10	Linalol (C ₁₀ H ₁₈ O, M ⁺ . 154)	1102	1098	3.5
11	Nonanal (C ₉ H ₁₈ O, M ⁺ . 142)	1105	1102	0.1
12	Verbenol ¹ (C ₁₀ H ₁₆ O, M ⁺ . 152)	1127	1140	0.1
13	β -Terpineol (C ₁₀ H ₁₈ O, M ⁺ . 154)	1142	1144	0.1
14	Citronelal (C ₁₀ H ₁₈ O, M ⁺ . 154)	1153	1153	0.1
15	Terpinen-4-ol (C ₁₀ H ₁₈ O, M ⁺ . 154)	1187	1177	0.2
16	α -Terpineol (C ₁₀ H ₁₈ O, M ⁺ . 154)	1201	1189	0.7
17	Decanal (C ₁₀ H ₂₀ O, M ⁺ . 156)	1206	1204	0.5
18	Carveol (C ₁₀ H ₁₆ O, M ⁺ . 152)	1227	1229	0.2
19	Metil-timol-éter (C ₁₁ H ₁₆ O, M ⁺ . 164)	1231	1235	< 0.1
20	Neral (C ₁₀ H ₁₆ O, M ⁺ . 152)	1240	1240	0.2
21	Carvona (C ₁₀ H ₁₄ O, M ⁺ . 150)	1251	1242	0.1
22	Geranial (C ₁₀ H ₁₆ O, M ⁺ . 152)	1269	1270	0.2
23	Decanol (C ₁₀ H ₂₂ O, M ⁺ . 158)	1272	1272	0.1
24	N.I.	1276	----	0.1
25	Terpinen-4-al ¹ (C ₁₀ H ₁₄ O, M ⁺ . 150)	1284	1287	0.1
26	Butanoato de octilo ¹ (C ₁₂ H ₂₄ O ₂ , M ⁺ . 200)	1386	----	0.1
27	Cubebeno (C ₁₅ H ₂₄ , M ⁺ . 204)	1397	1390	< 0.1
28	Dodecanal (C ₁₂ H ₂₄ O, M ⁺ . 184)	1410	1407	< 0.1
29	<i>trans</i> - β -Cariofileno (C ₁₅ H ₂₄ , M ⁺ . 204)	1435	1418	0.1
30	β -Bisaboleno ¹ (C ₁₅ H ₂₄ , M ⁺ . 204)	1508	1509	0.2

* **Figura 7** ¹ Identificado tentativamente ² Índice de retención (en columna HP-5) reportados en la literatura [89]

Los componentes mayoritarios identificados en el aceite esencial de naranja fueron el limoneno (88.3%), linalol (3.5), β -mirceno (3.4%), octanal (1%), sabineno (0.7%), α -terpineol (0.7%) y octanol (0.6%), los mismos encontrados en la publicación de Blanco, Stashenko *et al.* [90].

Tabla 4. Identificación por HRGC-MSD y cantidad relativa (%) de los componentes mayoritarios encontrados en el aceite esencial de las flores de ylang-ylang.

No. Pico*	Compuesto	I _{R-Exp}	I _{R-Teor} ²	Cantidad relativa, %
1	Acetato de pent-4-en-1-ilo (C ₇ H ₁₂ O ₂ , M ⁺ . 128)	884	----	0.1
2	Acetato de 3-metil-2-buten-1-ilo (C ₇ H ₁₂ O ₂ , M ⁺ . 128)	921	----	0.3
3	α-Pineno (C ₁₀ H ₁₆ , M ⁺ . 136)	937	939	0.5
4	β-Pineno (C ₁₀ H ₁₆ , M ⁺ . 136)	982	980	0.3
5	β-Mirceno (C ₁₀ H ₁₆ , M ⁺ . 136)	990	991	0.1
6	Acetato de hex-3-en-1-ilo (C ₈ H ₁₄ O ₂ , M ⁺ . 142)	1004	1004	0.2
7	Acetato de hexilo (C ₈ H ₁₆ O ₂ , M ⁺ . 144)	1011	1008	0.1
8	p-Metilanisol (C ₈ H ₁₀ O, M ⁺ . 122)	1025	1019	11.6
9	Limoneno (C ₁₀ H ₁₆ , M ⁺ . 136) + Felandreno (C ₁₀ H ₁₆ , M ⁺ . 136)	1033	1031	0.2
10	Eucaliptol [1,8-Cineol] (C ₁₀ H ₁₈ O, M ⁺ . 154)	1037	1033	0.2
11	β-Ocimeno (C ₁₀ H ₁₆ , M ⁺ . 136)	1047	1040	0.2
12	Benzoato de metilo (C ₈ H ₈ O ₂ , M ⁺ . 136)	1099	1091	9.2
13	Linalol (C ₁₀ H ₁₈ O, M ⁺ . 154)	1104	1098	27.9
14	Acetato de bencilo (C ₉ H ₁₀ O ₂ , M ⁺ . 150)	1167	1163	13.9
15	Salicilato de metilo (C ₈ H ₈ O ₃ , M ⁺ . 152)	1200	1190	0.2
16	Dimetoxitolueno (C ₉ H ₁₂ O ₂ , M ⁺ . 152)	1236	----	0.2
17	Acetato de β-feniletilo (C ₁₀ H ₁₂ O ₂ , M ⁺ . 164)	1257	1256	0.3
18	Anetol (C ₁₀ H ₁₂ O, M ⁺ . 148)	1292	1283	0.8
19	N.I.	1306	----	0.5
20	Acetato de geranilo (C ₁₂ H ₂₀ O ₂ , M ⁺ . 196)+ Benzoato de butilo (C ₁₁ H ₁₄ O ₂ , M ⁺ . 178)	1376	1383	3.2
21	Copaeno (C ₁₅ H ₂₄ , M ⁺ . 204)	1387	1376	0.5
22	β-Burbuneno (C ₁₅ H ₂₄ , M ⁺ . 204) + Calareno (C ₁₅ H ₂₄ , M ⁺ . 204)	1397	1384	0.5
23	trans-β-Cariofileno (C ₁₅ H ₂₄ , M ⁺ . 204)	1436	1418	4.0
24	β-Gurgujeno (C ₁₅ H ₂₄ , M ⁺ . 204)	1444	1432	0.1
25	Acetato de cinamilo (C ₁₁ H ₁₂ O ₂ , M ⁺ . 176)	1450	1443	3.9
26	α-Humuleno (C ₁₅ H ₂₄ , M ⁺ . 204)	1472	1454	1.7
27	Germacreno-D (C ₁₅ H ₂₄ , M ⁺ . 204)	1498	1480	10.6
28	α-Farneseno (C ₁₅ H ₂₄ , M ⁺ . 204)	1506	1508	1.9
29	γ-Cadineno (C ₁₅ H ₂₄ , M ⁺ . 204) + γ-Bisaboleno (C ₁₅ H ₂₄ , M ⁺ . 204)	1512	1515	0.8
30	δ-Cadineno (C ₁₅ H ₂₄ , M ⁺ . 204)	1530	1524	0.8
31	Germacrenol ¹ (C ₁₅ H ₂₆ O, M ⁺ . 222)	1594	1574	0.3
32	Benzoato de bencilo (C ₁₄ H ₁₂ O ₂ , M ⁺ . 212)	1786	1762	3.3
33	Salicilato de bencilo (C ₁₄ H ₁₂ O ₃ , M ⁺ . 228)	1894	1863	0.2

* Figura 8 ¹ Identificado tentativamente ² Índice de retención (en columna HP-5) reportados en la literatura [89]

Como componentes principales en el aceite esencial de ylang-ylang se encontraron el linalol (27.9%), acetato de bencilo (13.9%), *p*-metilanol (11.6), germacreno-D (10.6%), benzoato de metilo (9.2%), *trans*- β -cariofileno (4.0%), acetato de cinamilo (3.9%), benzoato de bencilo (3.3%), acetato de geranilo + benzoato de butilo (3.2%), α -farneseno (1.9%), α -humuleno (1.7%). Estos mismos compuestos fueron los componentes mayoritarios del aceite esencial de ylang-ylang reportados en las publicaciones de Gaydou *et al.* [91] y Stashenko *et al.* [92].

En las **Figuras 9-12**, se presentan los espectros de masas característicos (EI, 70eV), del componente más abundante en los aceites esenciales de naranja (limoneno) e ylang-ylang (linalol), junto con las posibles rutas de su fragmentación.

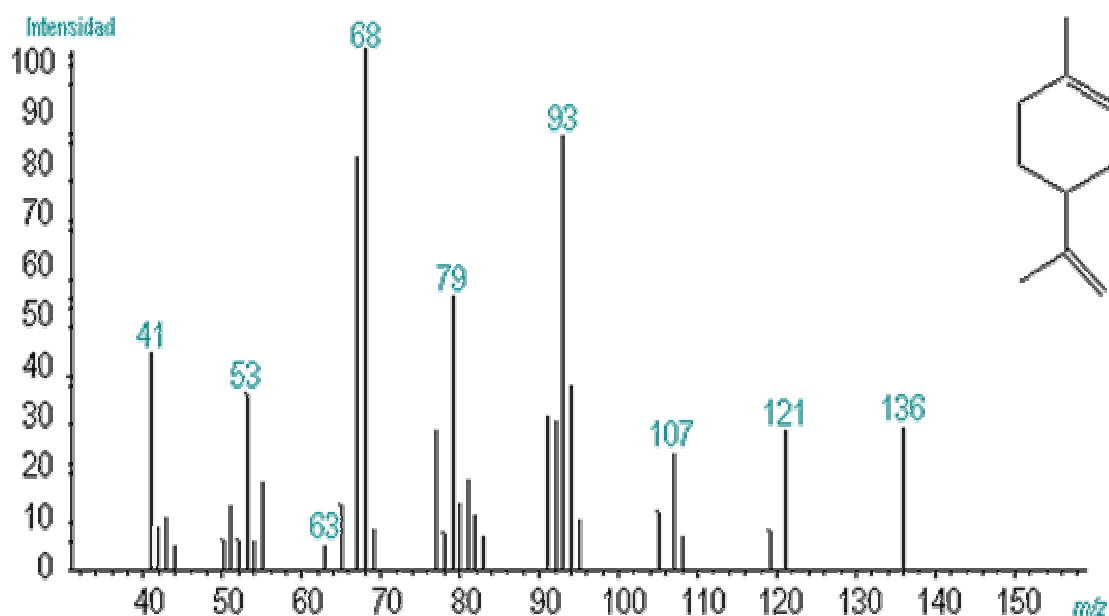


Figura 9. Espectro de masas obtenido por HRGC-MSD (EI, 70 eV) del limoneno, componente mayoritario del aceite esencial de cáscara de naranja.

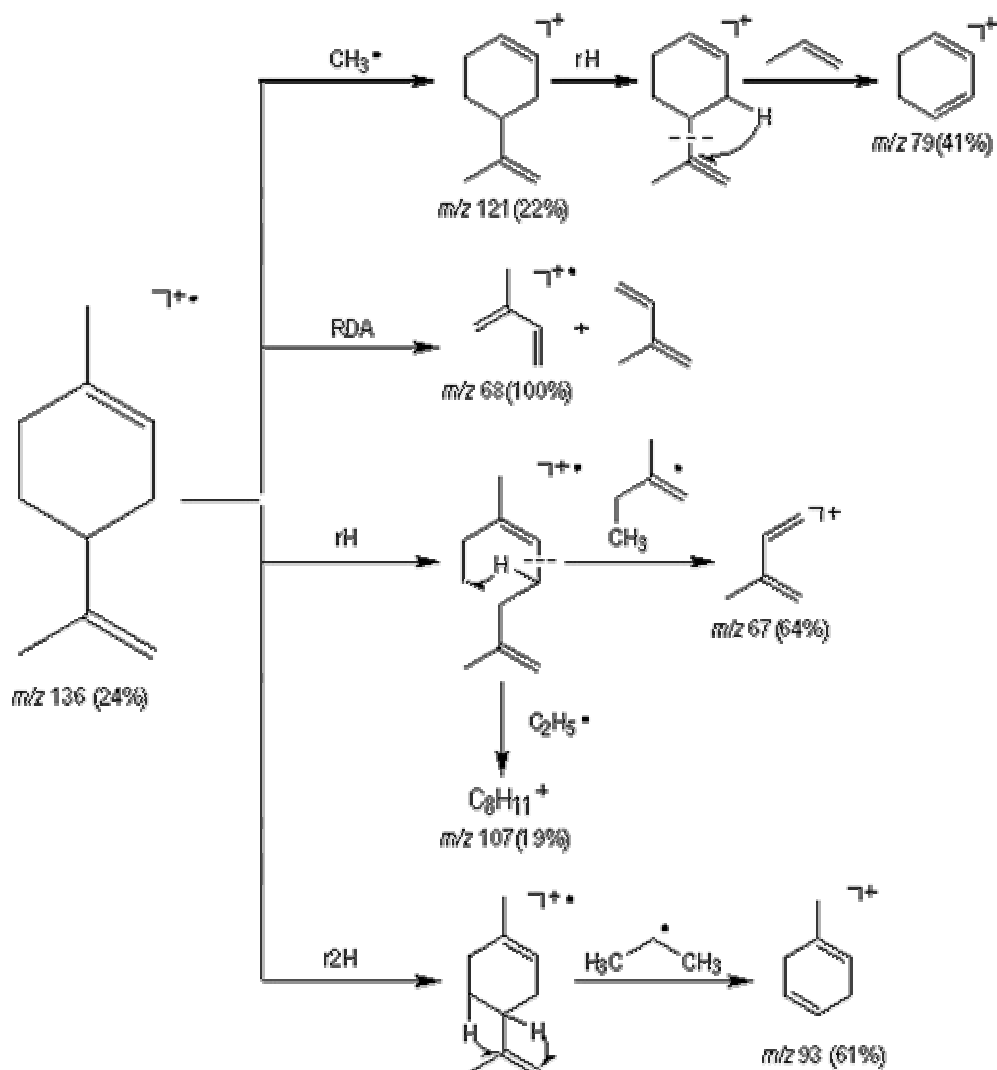


Figura 10. Rutas de formación de los principales iones fragmento del limoneno (EI, 70eV).

En el espectro de masas del limoneno (**Figura 9**), se observa el ión molecular (m/z 136) con una intensidad de 24%. El ión en m/z 68 (100%) es el pico de base y es el producto de una ruptura tipo *retro Diels-Alder*, a partir del ión molecular (ver **Figura 10**). El fragmento m/z 121 se genera por la pérdida del radical $\text{CH}_3^\bullet$ proveniente de la ruptura simple del ión molecular. La eliminación de los radicales $\text{CH}_3\text{CH}_2^\bullet$ y $(\text{CH}_3)_2\text{CH}^\bullet$, desde el ión molecular, produce los cationes en m/z 93 (61%) y m/z 107 (19%) a través de reordenamiento de uno y dos hidrógenos, respectivamente. Finalmente, la salida de una molécula de propeno (C_3H_6) desde el catión m/z 121 conduce a la generación del fragmento m/z 79.

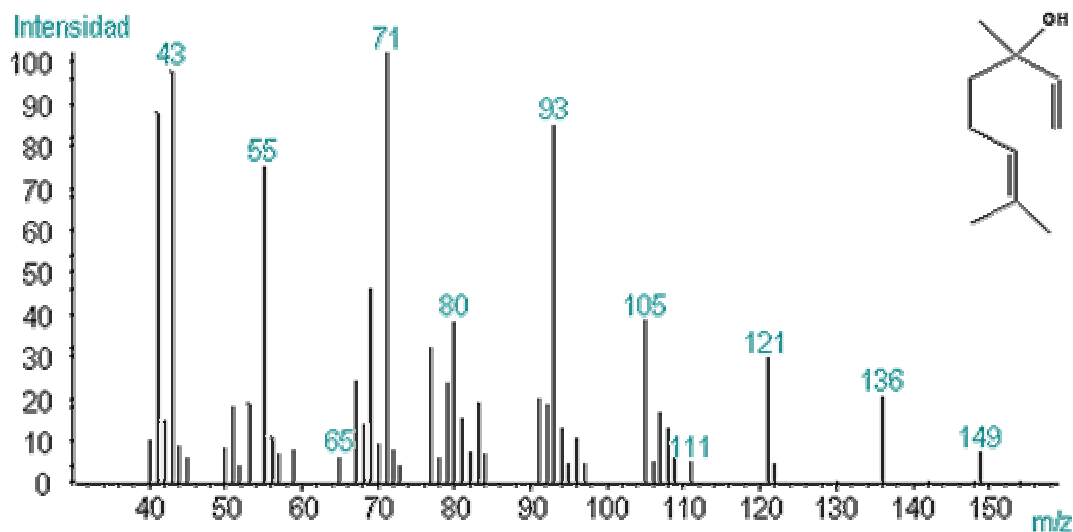


Figura 11. Espectro de masas obtenido por HRGC-MSD (EI, 70 eV) del linalol, componente más abundante en el aceite esencial de flores de ylang-ylang.

En el espectro de masas del linalol (**Figura 11**) la señal correspondiente al ión molecular (M^+ , m/z 154) no se registra debido a su gran inestabilidad y una rápida fragmentación acompañada de la formación de iones en m/z 139 (1%), 136 (6%), 71 (100%) y 69 (40%). Los fragmentos ($M-CH_3$) $^+$, ($M-H_2O$) $^+$ y ($M-CH_3-H_2O$) $^+$ en m/z 139, 136, 121 (20%), respectivamente, confirman la presencia de los grupos CH_3 y OH en la molécula. El catión m/z 93 (69%), típico para la gran mayoría de monoterpenoides, posiblemente tiene una estructura cíclica y se puede originar del fragmento m/z 136 por pérdida del radical $C_3H_7\cdot$. La presencia de dos enlaces dobles en la molécula se confirma por las respectivas rupturas alílicas, que conducen a la formación de los fragmentos m/z 71 (100%) y m/z 69 (40%), así como aparece en la **Figura 12**.

El ion, correspondiente al pico de base, en m/z 71 decae por la eliminación de una molécula de etileno, generando el fragmento CH_3CO^+ en m/z 43 de alta intensidad (87%). El ión en m/z 69, a través del proceso de reordenamiento, produce señal en m/z 41, $C_3H_5^+$, también de intensidad alta (78%).

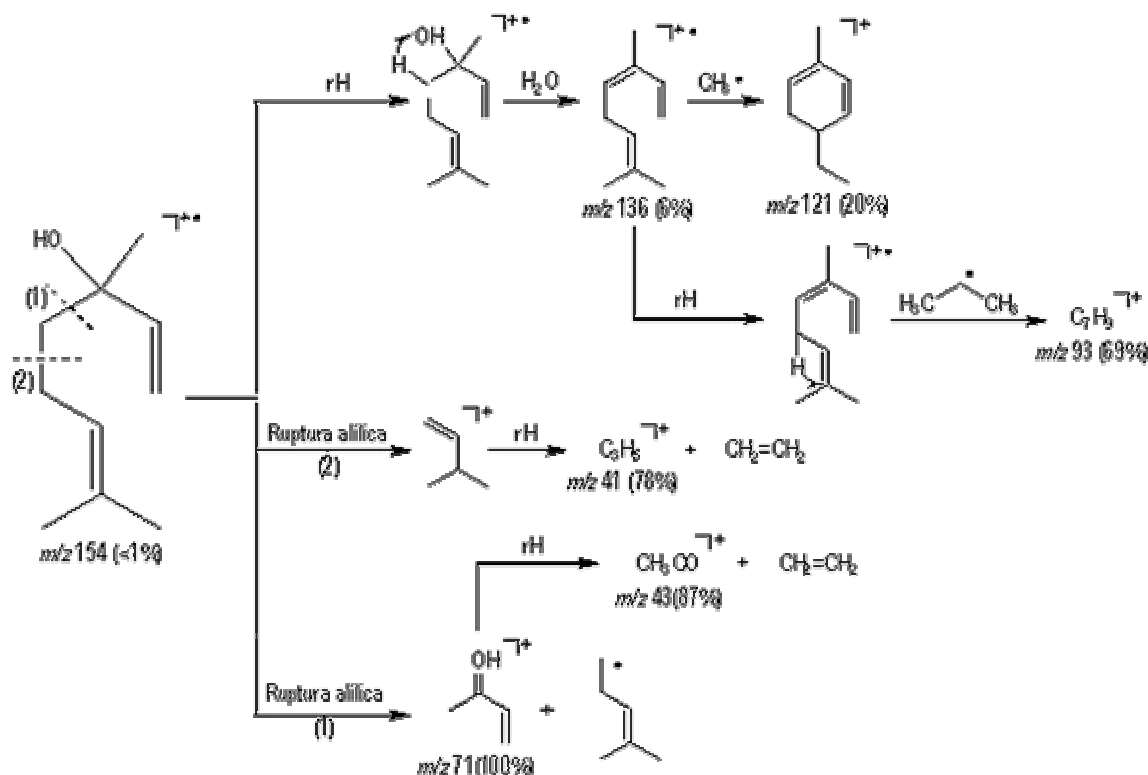


Figura 12. Rutas de formación de los principales iones fragmento característicos del linalol, a 70 eV.

4.2 PERFILES DE SATURACIÓN POR HS-SPME

Las condiciones experimentales de esta sección se describieron detalladamente en el **Numeral 3.2** de la Parte Experimental. La eficiencia de extracción de los diferentes tipos de recubrimientos estudiados (PDMS, 100 μm y PDMS/DVB, 65 μm) se relaciona a continuación. Además, se presentan las estructuras químicas de los diez terpenos bajo estudio (**Figura 13**).

4.2.1 PDMS-100 μm . Para la obtención de los diferentes perfiles de saturación se realizó un diseño experimental (63 mediciones) teniendo como parámetros diferentes tiempos (5, 10, 20, 30, 40, 60 y 90 min) y temperaturas (20, 40 y 60°C) de extracción. Los datos obtenidos aparecen en el **Anexo 1**. Las **Figuras 14-17** presentan las tendencias encontradas en los perfiles de saturación logrados para la mezcla de terpenoides extraídos por el recubrimiento de PDMS-100 μm .

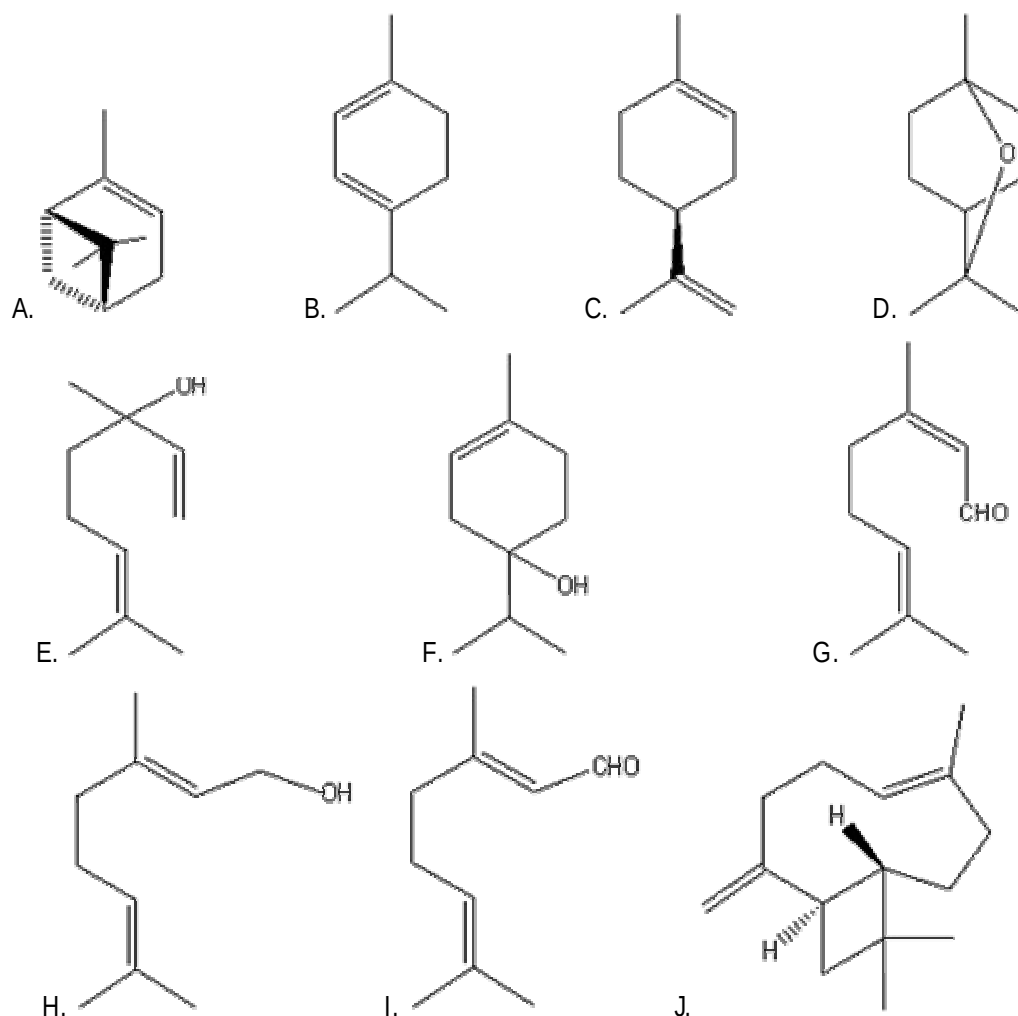


Figura 13. Estructuras de los diez patrones de terpenoides empleados en el presente trabajo. A. α -Pineno; B. α -Terpineno; C. Limoneno; D. 1,8-Cineol (eucaliptol); E. Linalol; F. Terpinen-4-ol; G. Neral; H. Geraniol; I. Geranial y J. *trans*- β -Cariofileno.

La **Figura 14** presenta el efecto del tiempo, medido desde 5 hasta 90 min, sobre la recuperación por HS-SPME de los 10 terpenoides (α -pineno, α -terpineno, limoneno, eucaliptol, linalol, terpinen-4-ol, neral, geraniol, geranial y *trans*- β -cariofileno) a temperatura ambiente (22°C). Se observa que, para la mayoría de los patrones de terpenoides, existió un tiempo de extracción en el cual hubo un máximo de absorción sobre el recubrimiento con un decaimiento posterior de la cantidad atrapada por la fibra. Excepto para el linalol, terpinen-4-ol, geranial y *trans*- β -cariofileno, que presentaron incremento de la absorción con el aumento del tiempo de exposición.

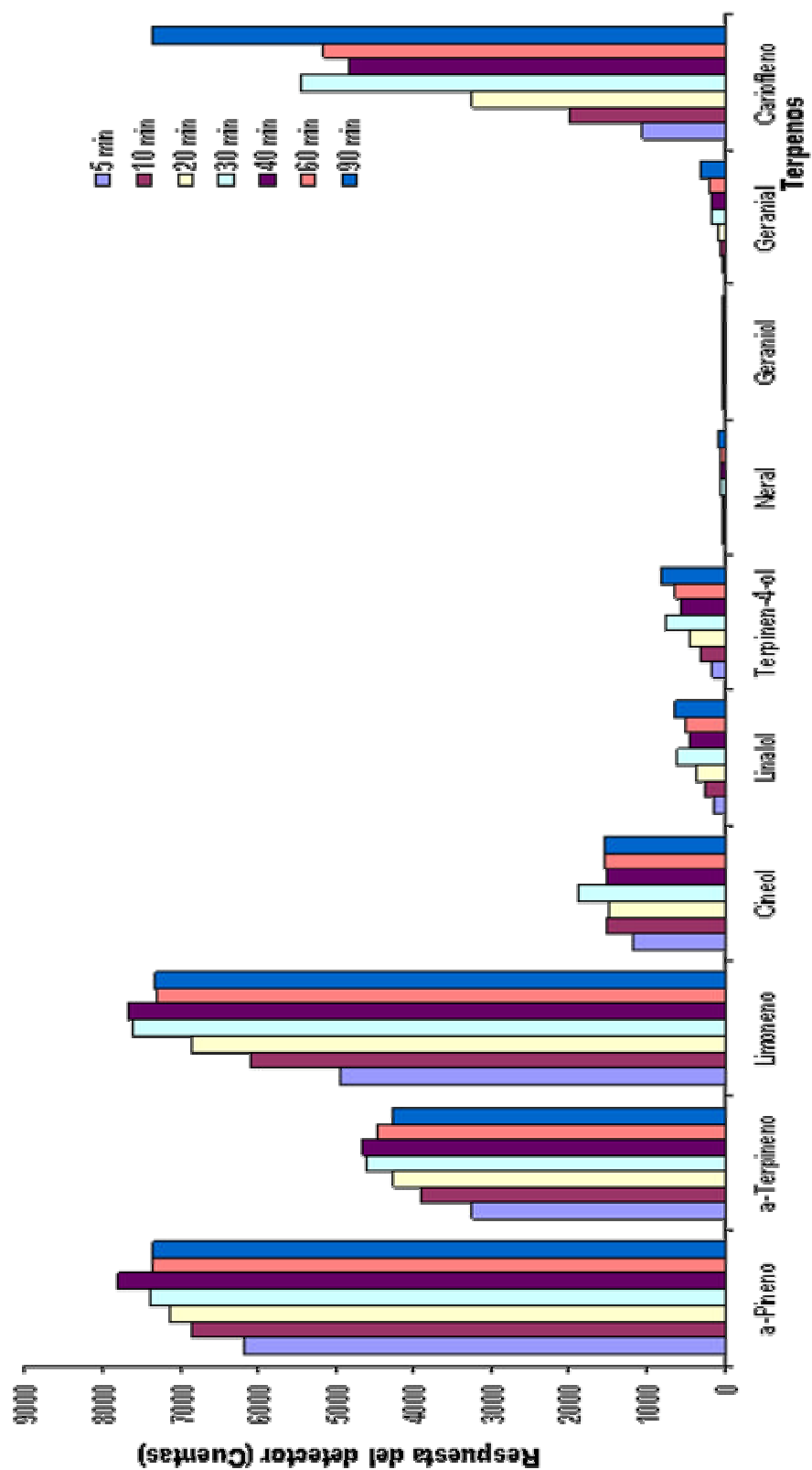


Figura 14. Efecto del tiempo (min) sobre la eficiencia de extracción por HS-SPME (PDMS, 100 µm) de la mezcla de terpenos, a 22 °C.

Así mismo, se encontró que al comparar las áreas cromatográficas de terpenos polares con los no polares, los valores fueron muy bajos para los terpenos polares. Lo cual indica la baja afinidad del recubrimiento de PDMS por sustancias de naturaleza química polar

El efecto del tiempo de exposición sobre la eficiencia de extracción por HS-SPME de los terpenoides a 40°C se ilustra en la **Figura 15**. Se ve que, para la mayoría de los terpenoides no se obtuvo un tiempo de extracción en el cual existiera saturación, sino que la absorción sobre el recubrimiento, en el intervalo de tiempos estudiados, siempre incrementó. Sin embargo, el linalol, terpinen-4-ol y geranial presentaron un máximo (30 min) con posterior decaimiento de la cantidad atrapada por la fibra.

En la **Figura 16** se exhibe el efecto del tiempo de exposición sobre la extracción por HS-SPME de los terpenoides a 60°C. En esta **Figura** se vislumbra que, para todos los patrones de terpenoides no se encontró un tiempo de saturación en el intervalo de tiempos estudiados.

Con base en el análisis realizado a las **Figuras 14 y 15**, se encontró que durante 30 min de exposición de la fibra, se logró un máximo de saturación para tres compuestos terpénicos (α -terpineno, limoneno y eucaliptol) a 22°C y para cinco compuestos (linalol, terpinen-4-ol, neral, geraniol y geranial) a 40°C. Por lo cual, se escogió como tiempo de exposición de la fibra, 30 min.

La **Figura 17** presenta el efecto de la temperatura (°C) de extracción por HS-SPME, de los 10 patrones de terpenos, durante 30 min de exposición del recubrimiento. Como se observa en esta **Figura**, la temperatura a la cual, la mayoría de los terpenoides estudiados presentó un máximo de absorción durante 30 min de exposición, fue 40°C. De acuerdo con estos resultados se escogieron como temperatura y tiempo de extracción 40°C y 30 min, respectivamente.

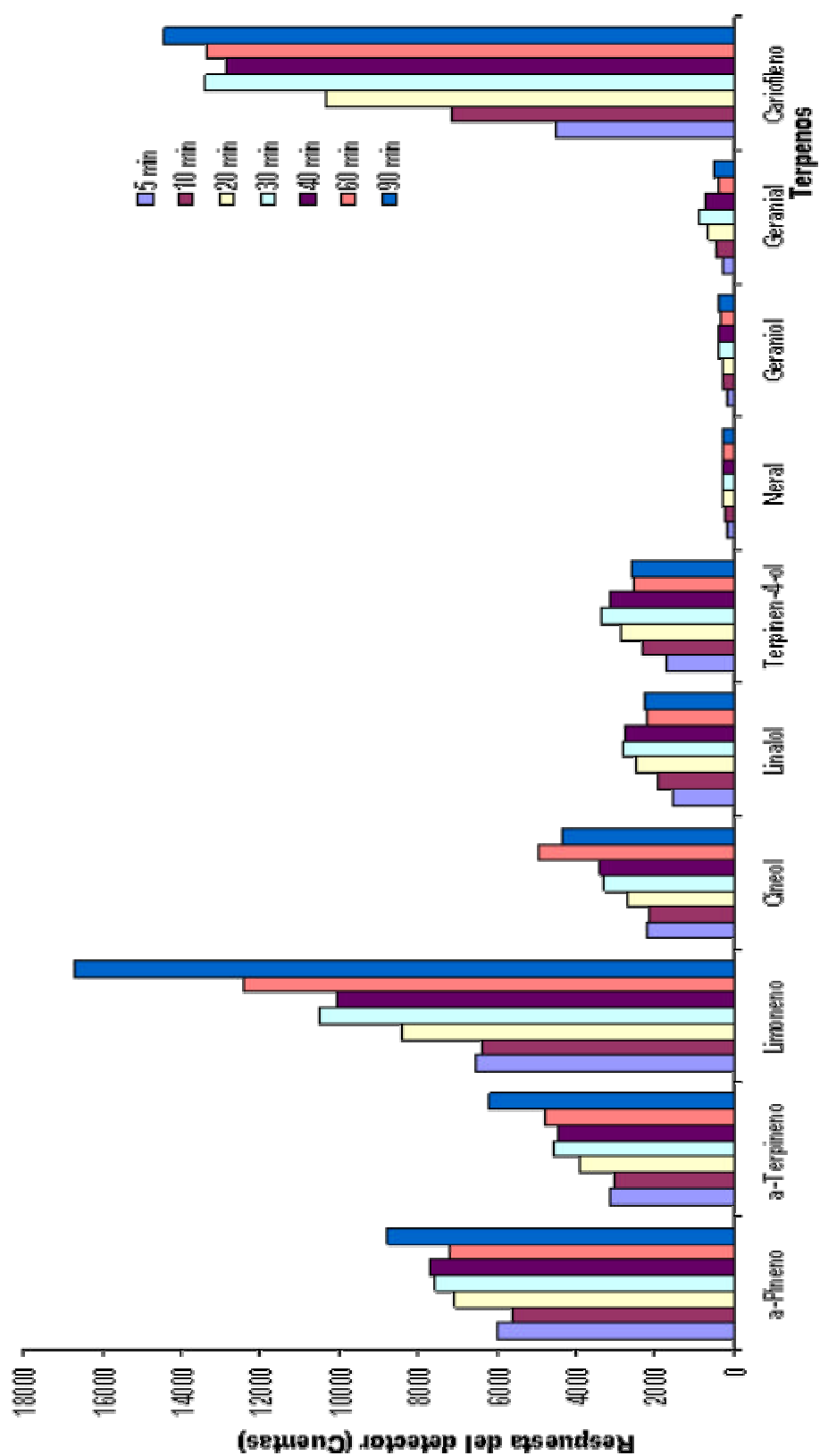


Figura 15. Efecto del tiempo (min) sobre la eficiencia de extracción por HS-SPME (PDMS, 100 μ m) de la mezcla de patrones de terpenos, a 40°C.

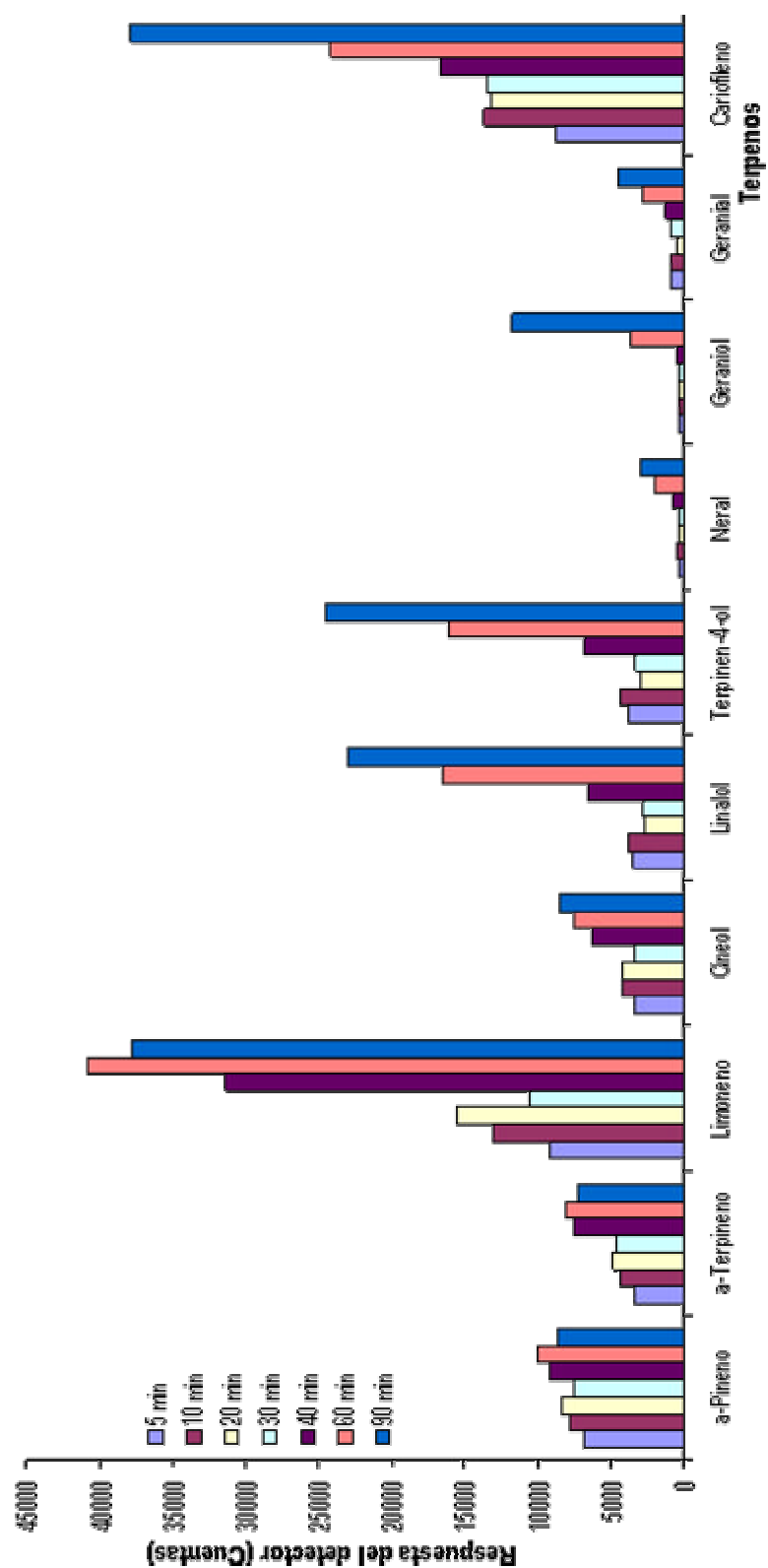


Figura 16. Efecto del tiempo (min) sobre la eficiencia de extracción por HS-SPME (PDMS, 100 μ m) de la mezcla de patrones de terpenos, a 60°C.

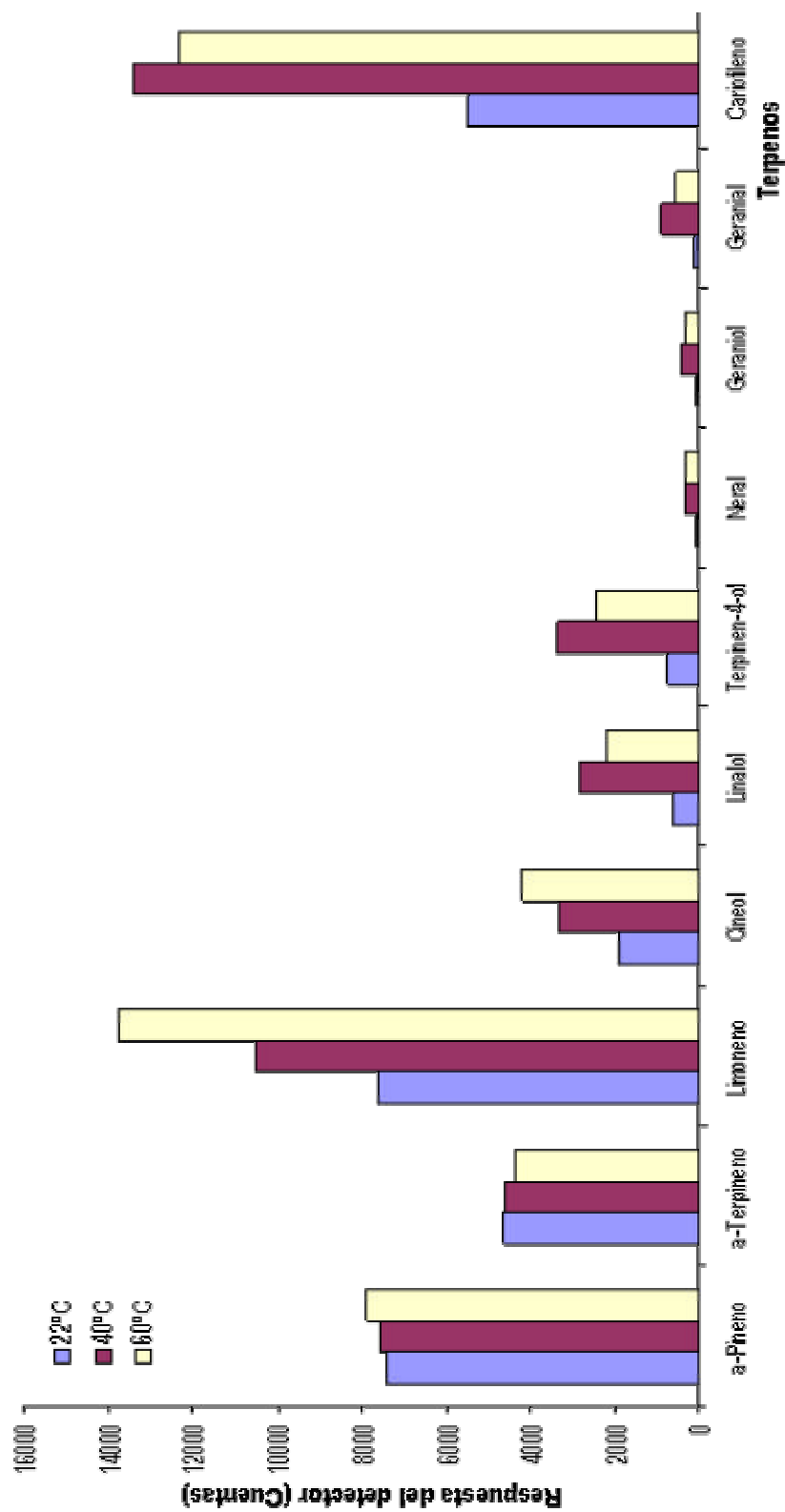


Figura 17. Efecto de la temperatura (°C) sobre la eficiencia de extracción por HS-SPME (PDMS, 100 µm), de la mezcla de patrones de terpenos, durante 30 min de exposición del recubrimiento.

Para efectuar el tratamiento estadístico de los datos obtenidos, se evaluó la reproducibilidad de las áreas cromatográficas. Para ello, se calcularon el promedio ($\bar{X}$), la desviación estándar (s) y el coeficiente de variación (CV) (**Anexo 1**), a partir de las mediciones realizadas por duplicado. Para la medición efectuada a 22°C, los coeficientes de variación obtenidos para las áreas cromatográficas de los terpenoides, estuvieron en su mayoría, entre 0.6-11%. Para la medición realizada a 40°C, los CV's se encontraron entre 0.002-11% y para la medición hecha a 60°C, los CV's variaron entre 0.4-11%. Sin embargo, se presentaron algunas desviaciones de los valores de CV's, anteriormente mencionados. Las variaciones encontradas en las mediciones se deben a las fluctuaciones de la temperatura de muestreo HS-SPME, puesto que sólo se podía controlar $\pm 1^\circ\text{C}$. Estas fluctuaciones repercutieron de alguna forma, aunque no significativamente, sobre la reproducibilidad de la técnica.

4.2.2 PDMS/DVB-65 μm . Para este recubrimiento se realizó el mismo diseño experimental empleado para el recubrimiento de PDMS. Los datos obtenidos se consignaron en el **Anexo 1**. Las **Figuras 18-21** presentan las tendencias encontradas en los perfiles de saturación logrados para la mezcla de terpenoides extraídos por el recubrimiento de PDMS/DVB, 65 μm .

La **Figura 18** presenta el efecto del tiempo (min) sobre la recuperación por HS-SPME, de los 10 terpenoides, a temperatura ambiente (22°C). En ella se observa que, para los tres primeros patrones de terpenoides existió un tiempo de exposición donde se alcanzó un máximo de adsorción sobre la fibra, seguido de una leve disminución de la cantidad atrapada por el recubrimiento en función del tiempo transcurrido. El resto de los compuestos terpénicos presentaron un aumento en la adsorción sobre la fibra a medida que transcurrieron los tiempos de muestreo.

Cabe resaltar que, a diferencia de la baja afinidad que presentó PDMS por los componentes polares de la mezcla de terpenoides, en PDMS/DVB, esta afinidad se incrementó notoriamente (aumento en áreas cromatográficas) debido a que este recubrimiento es de naturaleza dual (apolar y polar), gracias a las moléculas de divinilbenceno embebidas en PDMS.

El efecto del tiempo (min) sobre la eficiencia de extracción por HS-SPME de los patrones de terpenos a 40°C, se expone en la **Figura 19**. En esta **Figura** se distingue que todos los patrones de terpenos estudiados no obtuvieron un tiempo de saturación en el rango de 5 a 90 min. Sin embargo, el geraniol presentó un máximo de absorción a los 30 min de exposición de la fibra, con posterior decaimiento de la cantidad atrapada por la fibra al transcurrir el tiempo de exposición.

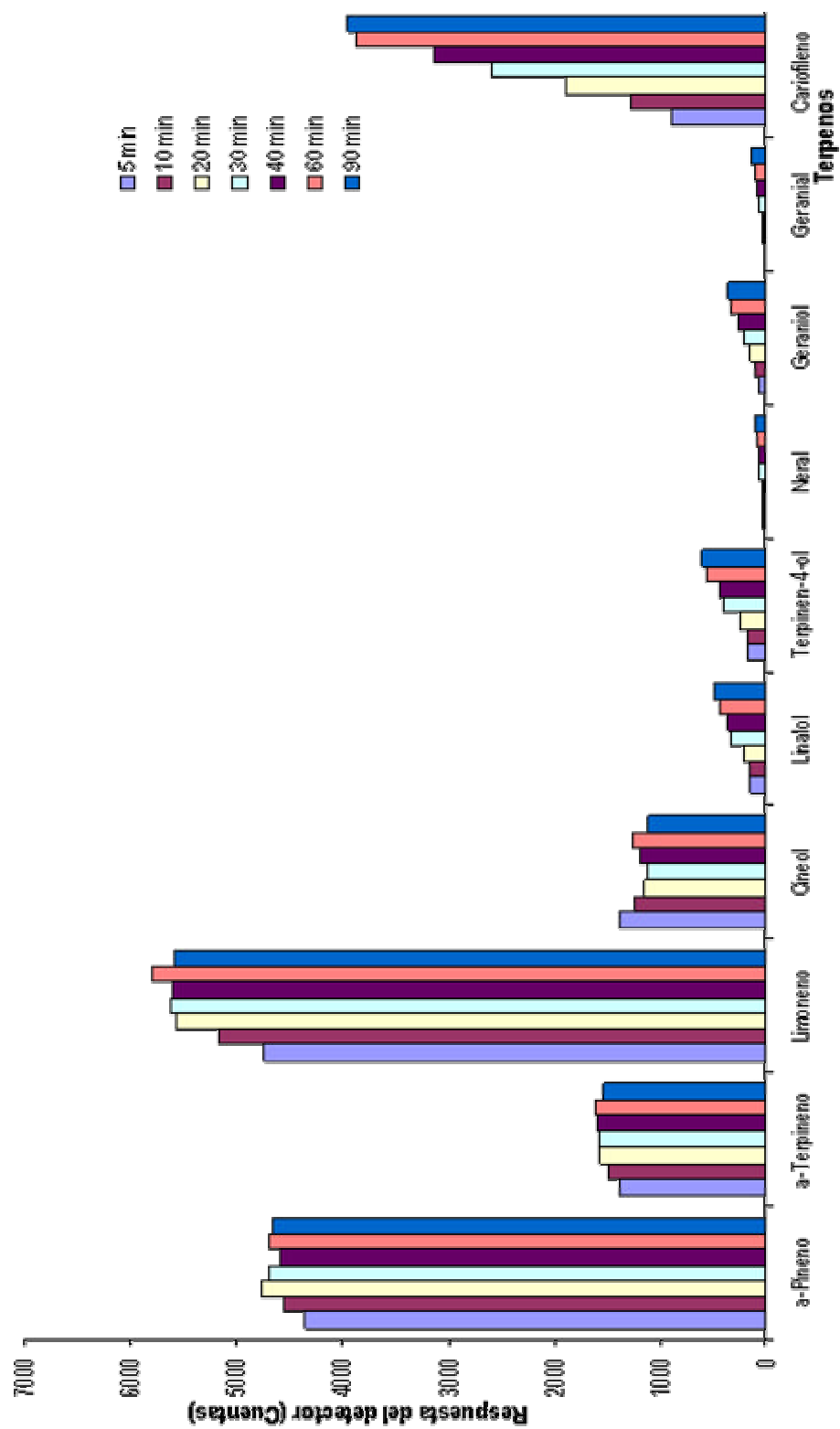


Figura 18. Efecto del tiempo (min) sobre la eficiencia de extracción por HS-SPME (PDMS/DVB, 65 µm) de la mezcla de patrones de terpenos, a 22°C.

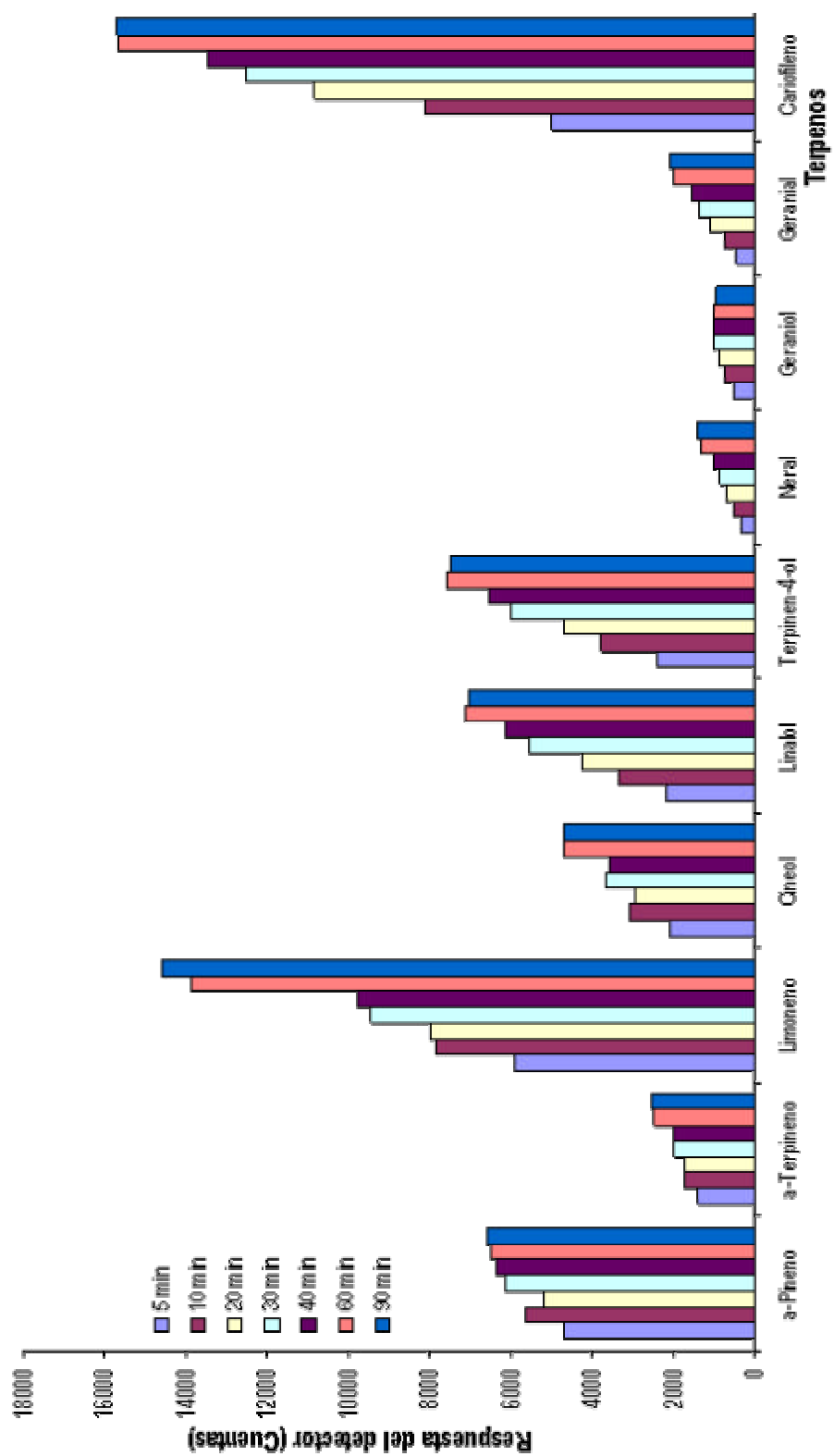


Figura 19. Efecto del tiempo (min) sobre la eficiencia de extracción por HS-SPME (PDMS/DVB, 65 μ m) de la mezcla de patrones de terpenos, a 40°C.

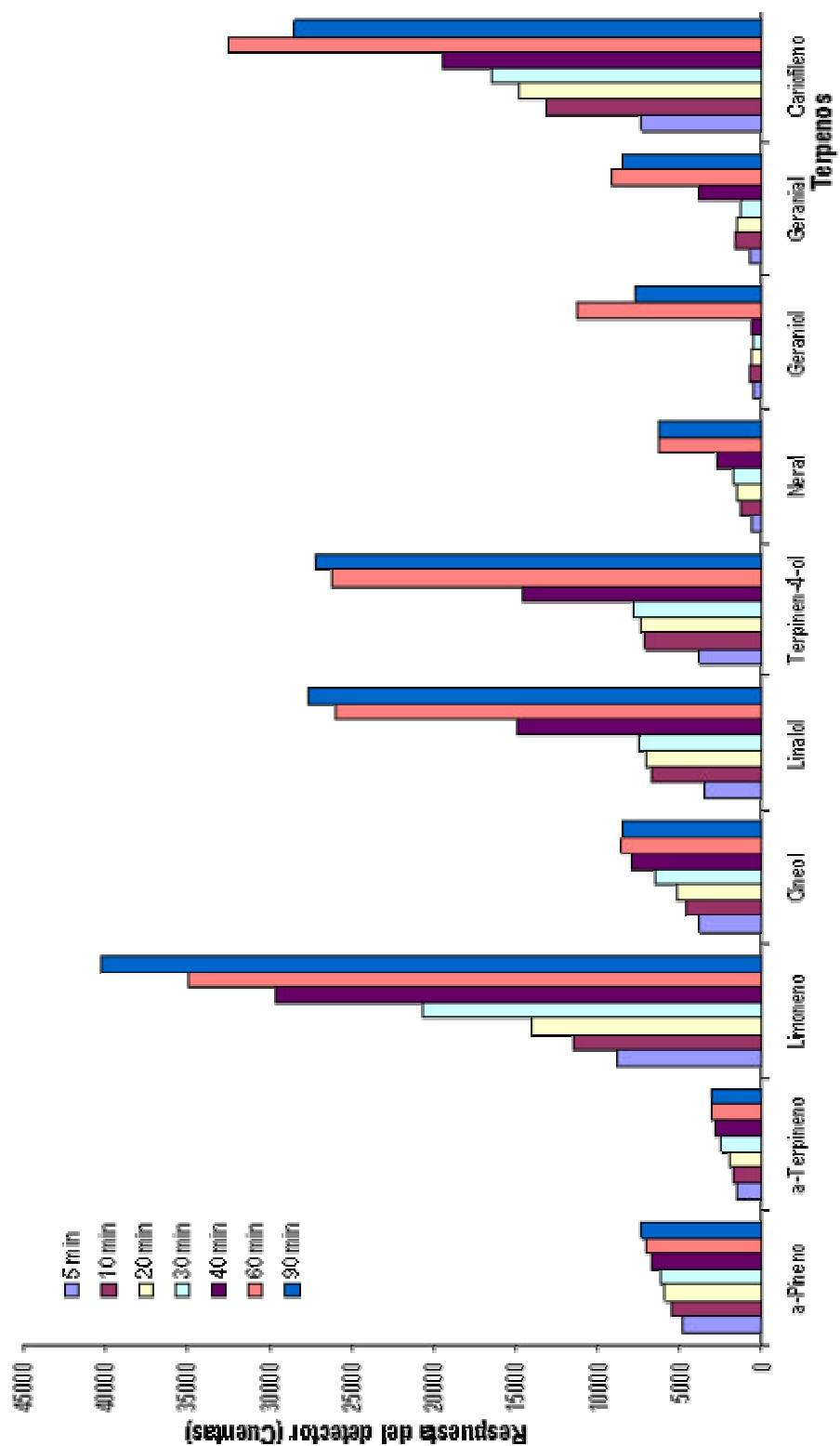


Figura 20. Efecto del tiempo (min) sobre la eficiencia de extracción por HS-SPME (PDMS/DVB, 65 μ m) de la mezcla de patrones de terpenos, a 60°C.

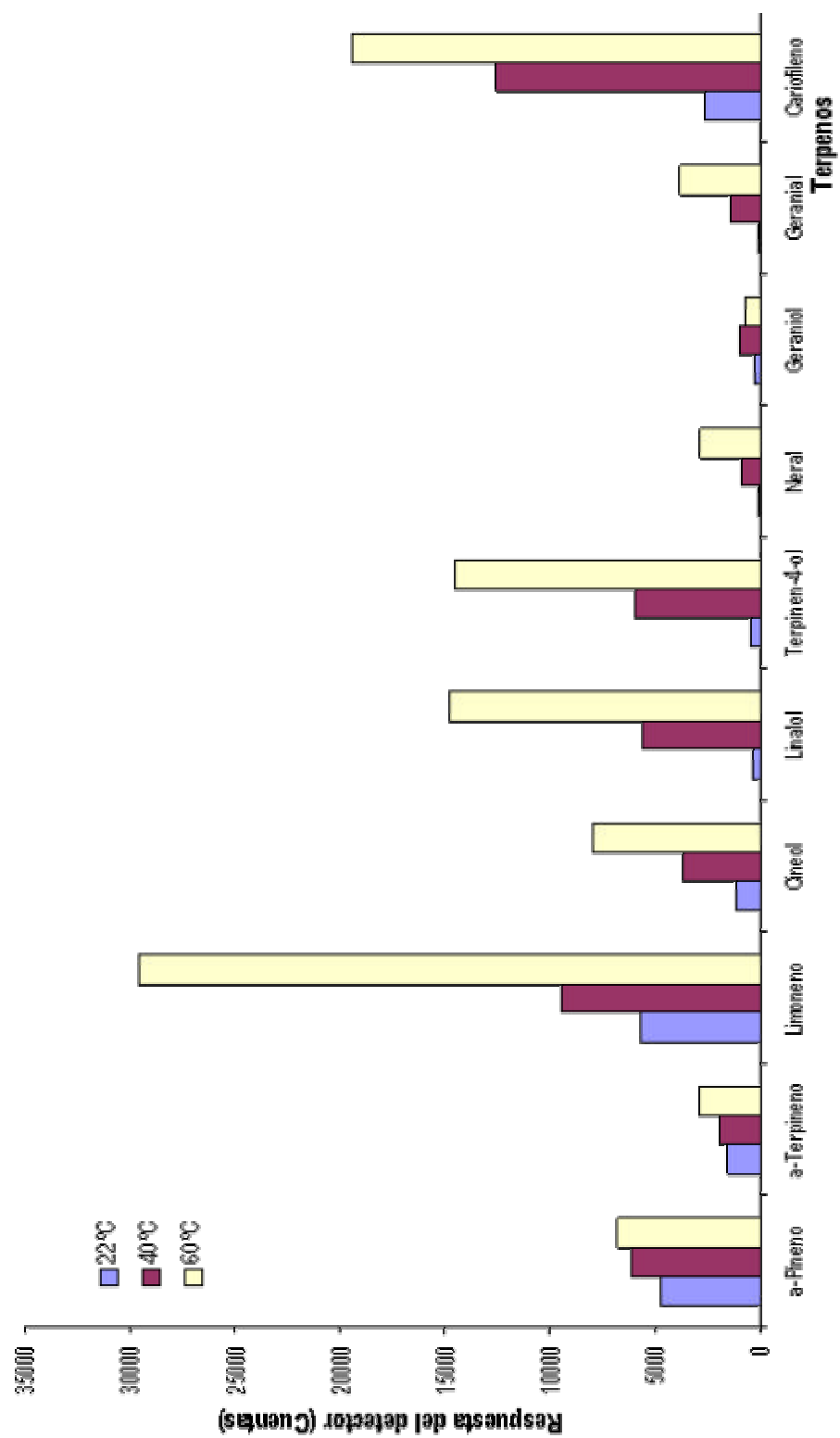


Figura 21. Efecto de la temperatura (°C) sobre la eficiencia de extracción por HS-SPME (PDMS/DVB, 65 µm) de la mezcla de patrones de terpenos, durante 30 min de exposición del recubrimiento.

En la **Figura 20** se exhibe el efecto del tiempo (min) sobre la recuperación por HS-SPME de los patrones de terpenos, a 60°C. Se observa que para todos los patrones de terpenoides no se encontró un tiempo de equilibrio en el intervalo de tiempos estudiados.

Con base en el análisis de las **Figuras** anteriores se encontró que a 22°C el α -terpineno, limoneno, eucaliptol, encontraron su máximo de saturación a 30 min. A 40°C, sólo el geraniol presentó un tiempo máximo de adsorción a los 30 min. Y finalmente a 60°C, ninguna de las sustancias bajo estudio en el rango de tiempos ensayados, encontró una adsorción máxima. Al graficar las áreas cromatográficas obtenidas a 30 min (puesto que, cuatro de los terpenos presentaron un máximo en este tiempo) de los 10 terpenoides, no se encontró un máximo de adsorción.

La **Figura 21** ilustra el efecto de la temperatura (°C) de extracción por HS-SPME de los terpenoides, durante 30 min de exposición del recubrimiento. Como se aprecia en esta **Figura** no se encontró una temperatura donde se presentara una saturación completa del recubrimiento empleado, para la mezcla de terpenos durante los 30 min de extracción. Puesto que con el recubrimiento de PDMS/DVB, no se alcanzó un máximo de adsorción en el estudio de tiempo y temperatura de extracción, no se determinaron coeficientes de partición con este recubrimiento, a pesar que su sensibilidad fue mayor que la del recubrimiento de PDMS.

El desempeño del recubrimiento de PDMS/DVB de 65 μ m de espesor en la recuperación de los patrones de terpenoides fue superior al recubrimiento de PDMS. La fibra de PDMS/DVB realizó una más efectiva extracción por presentar un doble recubrimiento: uno que contiene PDMS (la fase líquida altamente viscosa que favorece la absorción de sustancias no-polares) y otra que contiene DVB (sólido poroso que favorece la adsorción de analitos más polares). Al comparar las **Figuras 14 y 18** se puede apreciar que existió poca diferencia en la cantidad extraída de analitos no-polares (terpenos, aunque PDMS fue superior que PDMS/DVB) entre los dos recubrimientos de PDMS y de PDMS/DVB. Sin embargo, los análogos oxigenados de los terpenos, como aldehídos y alcoholes, fueron extraídos en promedio, 2 veces más por PDMS/DVB que por PDMS, con base en la medida del área cromatográfica. Estos resultados fueron similares a lo encontrado por *Miller et al.* [93] al comparar recubrimientos de diferente naturaleza química en la determinación de componentes volátiles de aromas.

Con base en los datos obtenidos para determinar las mejores condiciones de extracción para SPME, se puede suponer que el efecto de la temperatura sobre la cantidad de volátiles absorbidos parece ser el resultado de un compromiso entre la solubilidad y volatilidad de los compuestos. Los compuestos

relativamente solubles (monoterpenos) y los compuestos solubles en el solvente (alcoholes y aldehídos usados) mostraron un ligero incremento en la cantidad ab(ad)sorbida por los recubrimientos con el aumento de la temperatura. Para estos compuestos el efecto de incrementar la temperatura fue más efectivo sobre la volatilidad que sobre su solubilidad. En general, el incremento de la cantidad de un compuesto en el *headspace* resultó en la disminución de la ab(ad)sorción de otros compuestos, lo cual está en concordancia con lo publicado por Rocha *et al.* [94].

La reproducibilidad de las áreas cromatográficas obtenidas para los patrones de terpenos extraídos por este recubrimiento se encuentra registrada en el **Anexo 1**. De la misma forma que para PDMS de 100 μm , los patrones de terpenoides se extrajeron por duplicado. Las mediciones realizadas a 22°C, presentaron coeficientes de variación para la mayoría de los compuestos entre 0.1-10%, para los patrones de terpenoides. Para la temperatura de extracción de 40°C, los CV's se encontraron entre 0.05-11% y para la extracción llevada a cabo a 60°C, los CV's estuvieron entre 0.1-11%. En estas mediciones también se presentaron algunas desviaciones de los CV's para algunos compuestos. Los valores que se desviaron del rango permitido de los CV's, son consecuencia de las fluctuaciones de la temperatura de muestreo para HS-SPME.

4.3 DETERMINACIÓN DE K_D POR GC

Con base en las **Ecuaciones 15, 17 y 18** detalladas en el **Numeral 3.3** de la Parte Experimental se obtuvieron los K_D para cada uno de los terpenoides, empleando GC.

Como el coeficiente de partición es una constante de equilibrio es usual someterla al tratamiento termodinámico de los sistemas en equilibrio. Si se expresa K_D en términos de la energía libre estándar (ΔG°), del intercambio de soluto entre las dos fases (móvil y estacionaria), se puede entender la naturaleza de la distribución y la influencia de la temperatura. Sin embargo, el reparto de un soluto entre las dos fases se puede considerar a nivel molecular. Es evidente que, si un soluto se distribuye preferentemente en una de las fases, entonces las fuerzas interactivas que se presentan entre las moléculas del soluto y en la de la fase preferida, serán mayores que las fuerzas complementarias entre las moléculas de soluto y la de la otra fase. Así, la distribución se puede considerar como el resultado de las diferencias entre las fuerzas moleculares y, la magnitud y naturaleza de estas fuerzas determinará la magnitud del respectivo coeficiente de distribución [95].

La termodinámica clásica da una expresión que relaciona K_D con el cambio de la energía libre de un soluto que se transfiere desde una fase a otra (**Ecuación 40**).

$$RT \ln K = -\Delta G^\circ \quad \text{Ecuación 40}$$

donde, R, es la constante de los gases; T, es la temperatura absoluta (K) y ΔG° , es el cambio de energía libre estándar.

A su vez, la termodinámica clásica descompone la energía libre estándar en dos términos: la entalpía libre estándar (ΔH°) y la entropía libre estándar (ΔS°) (**Ecuación 41**).

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ \quad \text{Ecuación 41}$$

Reordenando las **Ecuaciones 40 y 41**, tenemos la **Ecuación 42**:

$$\ln K = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad \text{Ecuación 42}$$

Es claro de la **Ecuación** anterior que al graficar $\ln K$ Vs. $1/T$ se obtendrá una línea recta. Esta línea recta proporciona valores reales para la entalpía estándar (ΔH°) y la entropía estándar (ΔS°), las cuales se obtienen desde la pendiente e intercepto de la gráfica, respectivamente [77,95]. Este tipo de curva se llama Curva de *van't Hoff* y dentro de sus características importantes está la relación lineal entre $\ln K$ y $1/T$, y da sólo para sistemas establecidos y con distribución invariable, donde la naturaleza de ambas fases no cambia con la temperatura.

Los datos obtenidos para t_R , t_M , k' y K_D se relacionan en el **Anexo 2** y con base en estos datos se construyeron las gráficas de $\ln K_D$ Vs. $1/T$ (**Figuras 22-31**). La reproducibilidad determinada para t_R , t_M , k' y K_D de los patrones de terpenos analizados por HRGC/FID se registraron en el **Anexo 2**. Las mediciones fueron llevadas a cabo por triplicado. Los coeficientes de variación calculados se estimaron entre 0.02- 0.5%, para t_M ; 0-0.7%, para t_R ; 0.006-0.8%, para k' y 0.006-0.8%, para K_D . Estos valores se encuentran dentro de las variaciones recomendadas (máximo 2%, para inyección automática) por las Buenas Prácticas de Laboratorio.

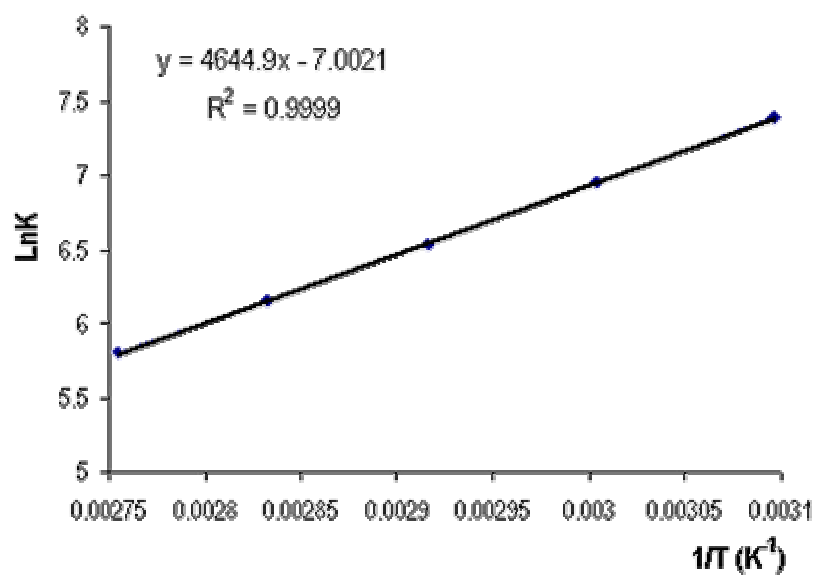


Figura 22. Curva de *van't Hoff* para el α -pineno, rango de temperaturas 50-90°C.

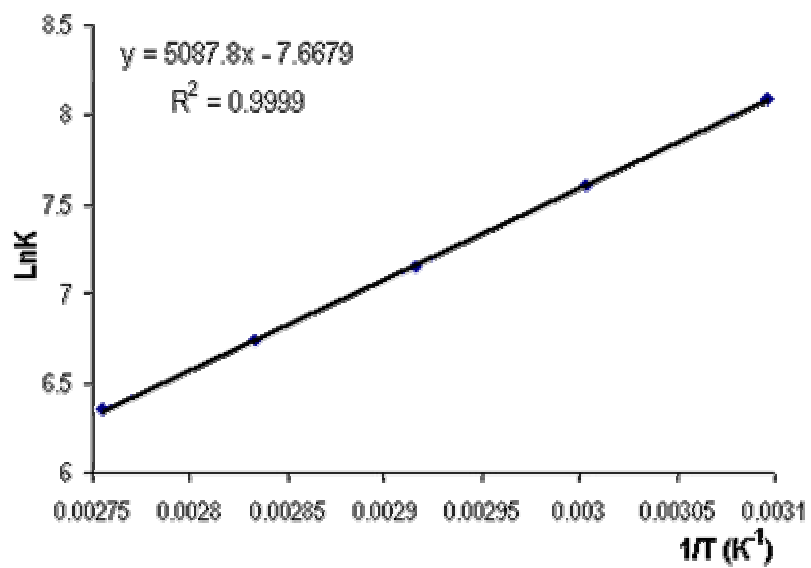


Figura 23. Curva de *van't Hoff* para el α -terpineno, rango de temperaturas 50-90°C.

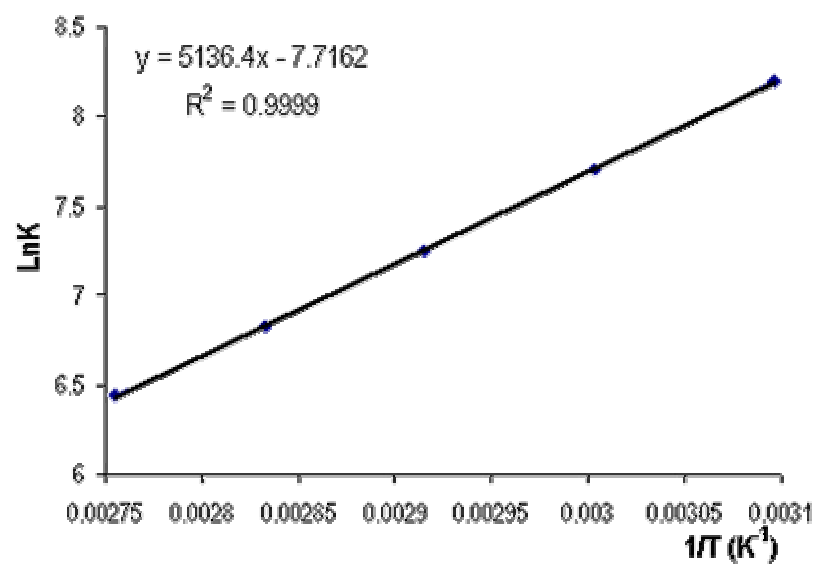


Figura 24. Curva de *van't Hoff* para el limoneno, rango de temperaturas 50-90°C.

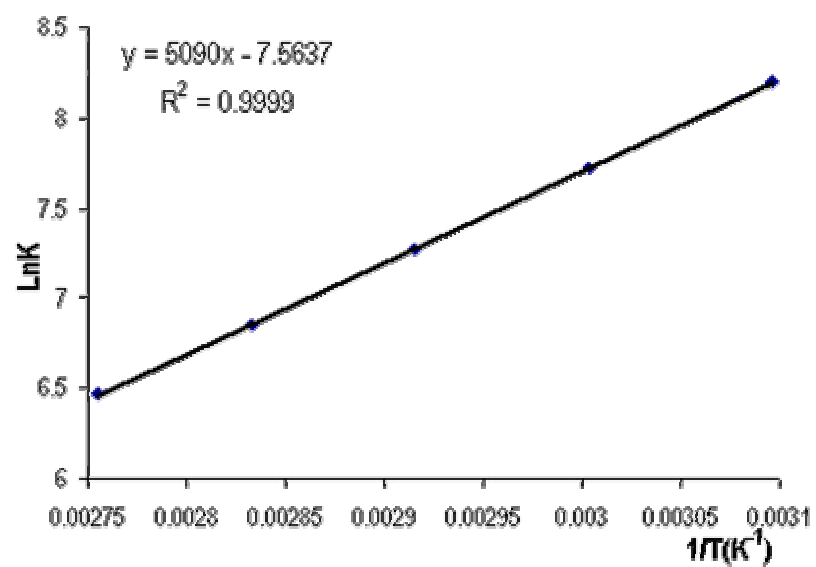


Figura 25. Curva de *van't Hoff* para el eucaliptol, rango de temperaturas 50-90°C.

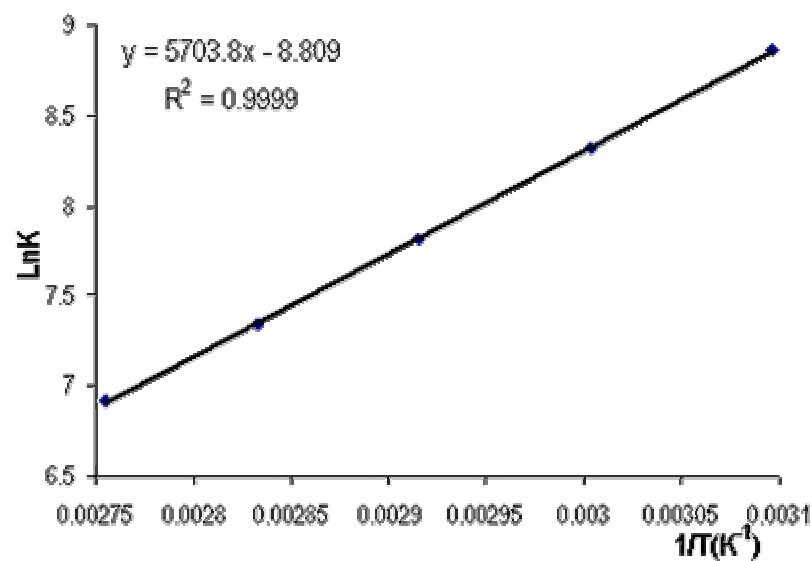


Figura 26. Curva de *van't Hoff* para el linalol, rango de temperaturas 50-90°C.

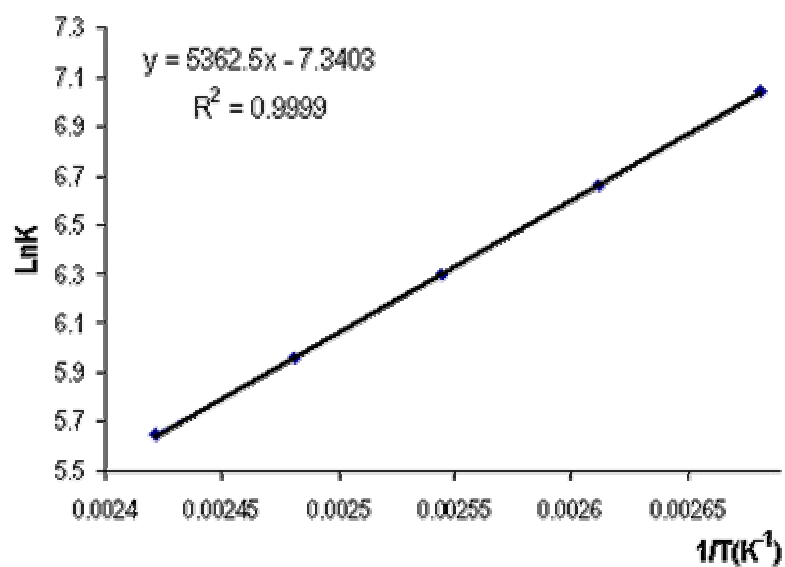


Figura 27. Curva de *van't Hoff* para el terpinen-4-ol, rango de temperaturas 100-140°C.

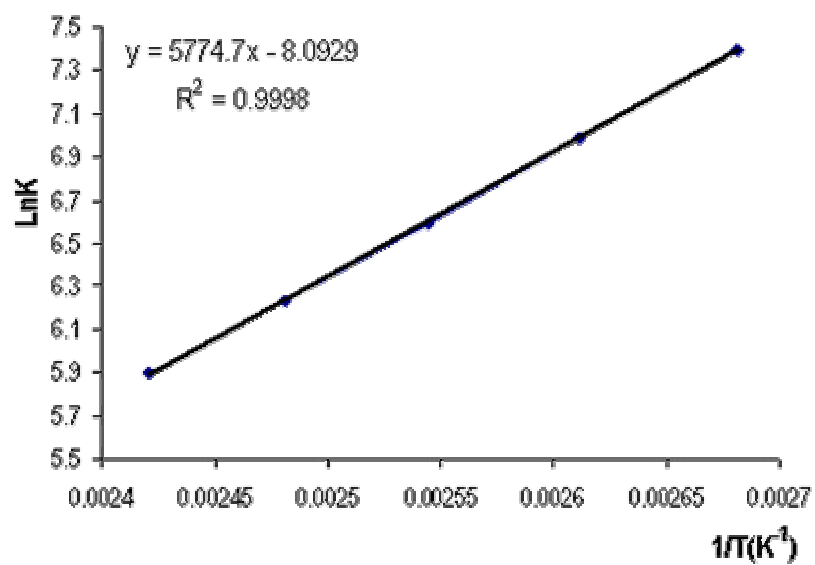


Figura 28. Curva de *van't Hoff* para el neral, rango de temperaturas 100-140°C.

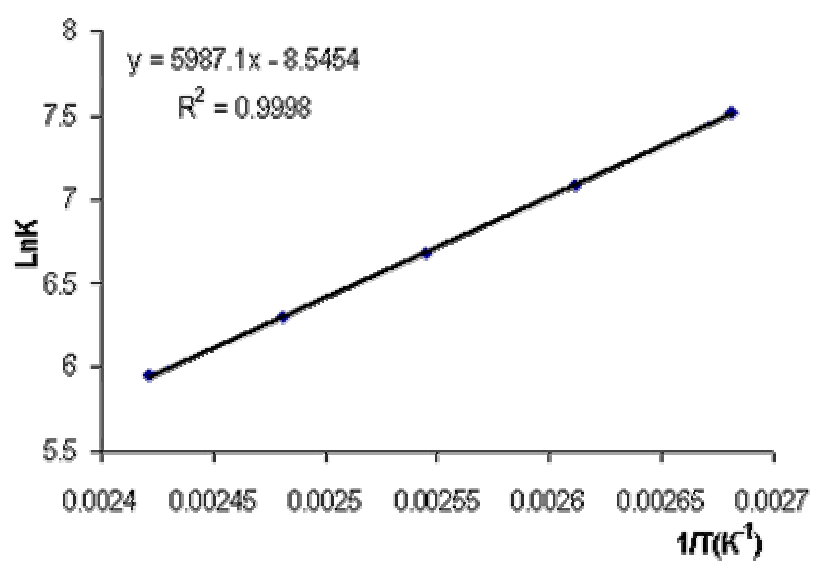


Figura 29. Curva de *van't Hoff* para el geraniol, rango de temperaturas 100-140°C.

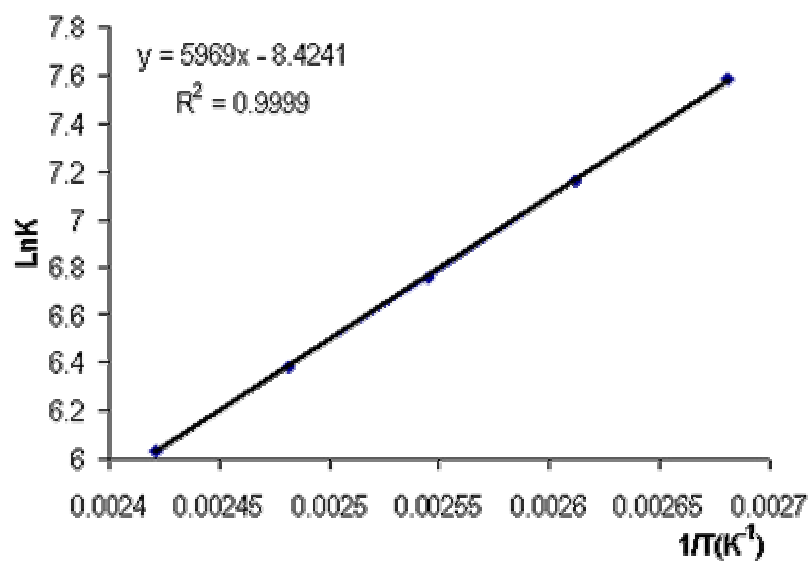


Figura 30. Curva de *van't Hoff* para el geranial, rango de temperaturas 100-140°C.

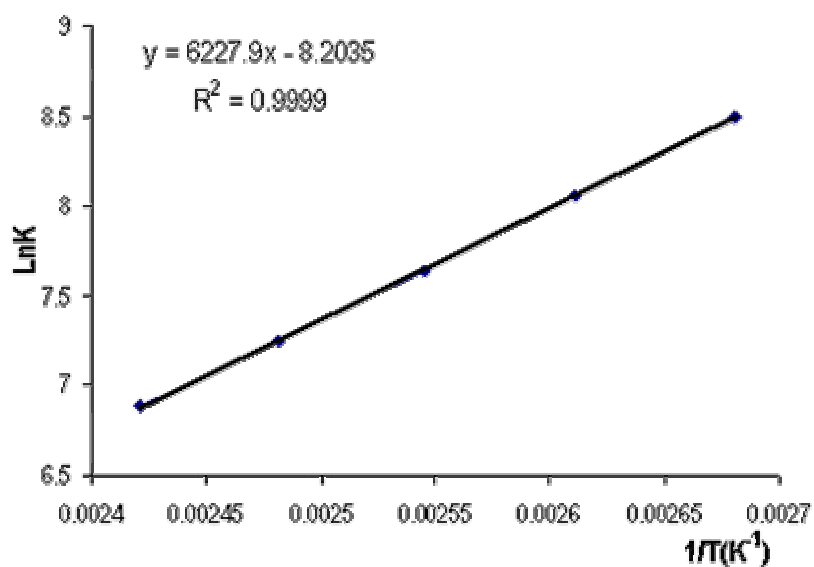


Figura 31. Curva de *van't Hoff* para el *trans*-β-cariofileno, rango de temperaturas 100-140°C.

Las **Tablas 5** y **6** presentan los valores de entalpía (ΔH°) y entropía (ΔS°) estándar obtenidos de las curvas de *van't Hoff* logradas por GC, en el rango de temperaturas 50-140°C.

Tabla 5. Valores obtenidos de entalpía (ΔH°) y entropía (ΔS°) estándar por GC (temperaturas entre 40-90°C), para cada uno de los patrones de terpenos, con base en las curvas de *van't Hoff*.

No. Terpeno	Compuesto	ΔH° (kcal/mol)	ΔS° (kcal/mol)
1	α -Pino	-9.2	-0.014
2	α -Terpino	-10.1	-0.015
3	Limoneno	-10.2	-0.015
4	Eucaliptol (1,8-Cineol)	-10.1	-0.015
5	Linalol	-11.3	-0.018

Tabla 6. Valores obtenidos de entalpía (ΔH°) y entropía (ΔS°) estándar por GC (temperaturas entre 100-140°C), para cada uno de los patrones de terpenos, con base en las curvas de *van't Hoff*.

No. Terpeno	Compuesto	ΔH° (kcal/mol)	ΔS° (kcal/mol)
6	Terpino-4-ol	-10.7	-0.015
7	Neral	-11.5	-0.016
8	Geraniol	-11.9	-0.017
9	Geraniol	-11.9	-0.017
10	<i>trans</i> - β -Cariofileno	-12.4	-0.016

El término entalpía representa la energía involucrada cuando la molécula de soluto interactúa, por fuerzas electrostáticas, con la fase estacionaria. Así, cuando el soluto interactúa con la fase estacionaria sufre un cambio en la libertad de movimiento y éste ya no puede moverse de la misma forma (aleatoriamente). Este cambio en la entropía es más visible a escala molecular cuando el reparto de un soluto entre un gas y un líquido se considera, como en GC. En el gas, las moléculas de soluto tienen altas velocidades y pueden viajar en cualquier dirección. Sin embargo, cuando se encuentran dentro de la fase líquida se enlazan por fuerzas intermoleculares a las moléculas de la fase estacionaria y no pueden viajar a través de la fase a grandes velocidades o con la misma libertad direccional del movimiento inicial. Esta nueva restricción de movimiento es la medida del cambio de entropía. Así, el cambio en la energía libre está constituido por un cambio en la energía real resultante de las interacciones (fuerzas intermoleculares) entre el soluto y la fase estacionaria y por el cambio en la entropía que refleja el movimiento restringido resultante (pérdida de la aleatoriedad) del soluto mientras preferencialmente interactúa con la fase estacionaria.

Los datos de las entalpías y entropías estándar reportados en las dos **Tablas** anteriores, se presentan de acuerdo con el orden de elución de cada uno de los patrones de terpenos, bajo condiciones isotérmicas. Al observar estos valores se encuentra una tendencia generalizada: a medida que el compuesto presentó mayor retención, su entalpía disminuyó y su entropía permaneció casi constante. El alto valor (valor absoluto)

de la entalpía ($\Delta H^\circ/R$ – pendiente de la curva) significa que la distribución está dominada por fuerzas intermoleculares, a favor de la fase estacionaria. El soluto está distribuido preferencialmente en la fase estacionaria puesto que las interacciones de las moléculas del soluto con las de la fase estacionaria son mayores que las fuerzas interactivas entre las moléculas del soluto y las de la fase móvil. Este cambio en la entalpía estándar es la mayor contribución al cambio en la energía libre estándar y así, *“la distribución en términos termodinámicos, se dice que está gobernada por la energía”*.

Los valores positivos de $\Delta H^\circ/R$ (pendiente) y valores negativos de $\Delta S^\circ/R$ (intercepto) de las curvas de *van't Hoff* de los patrones de terpenos, concuerda con las características de la mayoría de los sistemas de distribución hallados por GC. El valor negativo del intercepto indica que el cambio en la entropía estándar del soluto resulta de la producción de un sistema menos aleatorio a uno más ordenado durante el proceso de distribución.

En resumen, se considera que a mayor las fuerzas interactivas entre las moléculas (soluto-fase estacionaria), mayor será la contribución de la energía (entalpía), mayor el coeficiente de partición y mayor la retención. Por el contrario, cualquier reducción en la naturaleza aleatoria de las moléculas o cualquier incremento en la cantidad de orden en el sistema reducen el coeficiente de distribución y atenúa la retención [95].

4.4 DETERMINACIÓN DE K_D POR HS-SPME/HRGC/FID DE LOS CONSTITUYENTES DE LA MEZCLA PATRÓN DE TERPENOS Y ACEITES ESENCIALES DE NARANJA Y DE YLANG-YLANG

Con base en las **Ecuaciones 37, 38 y 39** y la descripción detallada del **Numeral 3.4** de la Parte Experimental, se obtuvieron los K_D experimental para cada uno de los patrones de terpenos y componentes mayoritarios de los aceites esenciales de cáscara de naranja y de las flores de ylang-ylang. Los datos obtenidos de K_{PT-HS} , $K_{PDMS-HS}$, $K_{PT-PDMS}$ se encuentran en la **Tabla 7**, los cuales serán los coeficientes de referencia para este estudio. Para la comparación de los datos, las condiciones de muestreo usados para S-HS (temperatura y tiempo de extracción, volumen del vial, cantidad de muestra empleados) fueron las mismas determinadas para HS-SPME.

Tabla 7. $K_{PT-PDMS}$ calculados para los componentes de la mezcla de patrones de terpenoides.

Compuesto	K_{PT-HS}	$K_{PDMS-HS}$	$K_{PT-PDMS}$
α -Pino	52	9938	515398
α -Terpino	151	868	130953
Limoneno	106	22962	2443092
Eucalipto	527	3030	1597910
Linalol	444	14638	6496554
Terpino-4-ol	492	15054	7406282
Neral	16464	853532	14052179982
Geraniol	13546	37101	502554423
Geraniol	3028	125615	380351364
<i>trans</i> - β -Cariofileno	534	40014	21383550

Según lo publicado por Pawliszyn *et al.* [25] la cantidad de analito concentrado en la fibra a través HS-SPME es el resultado de dos equilibrios distintos pero estrictamente relacionados: $K_{MATRIZ-HS}$, la responsable de la composición del *headspace*, la cual depende de la volatilidad de cada analito y de las características físicas de la matriz; y $K_{PDMS-HS}$, la cual está relacionada con la difusión de los analitos desde la fase vapor al recubrimiento y de la interacción del analito con el recubrimiento polimérico [25,84].

Si se revisan los coeficientes de partición patrones de terpenoides-HS (K_{PT-HS}), la tendencia requerida en los valores obtenidos se presenta (entre mayor la volatilidad de la sustancia menor será su K_{PT-HS}), con excepción del K_{PT-HS} para el geraniol, donde su valor es muy pequeño comparado con su isómero, neral. Se menciona nuevamente que estos patrones se encuentran disueltos en metanol, donde es posible que las interacciones soluto-solvente puedan estar presentes. Así, moléculas de naturaleza polar y polarizable tendrán mayor afinidad por la fase condensada que por la fase vapor y por lo tanto, su K_{PT-HS} será alto.

Los coeficientes de partición obtenidos para los patrones de terpenos-recubrimiento de PDMS, presentaron una discrepancia inesperada, la cual consistió en que los valores no fueron crecientes a medida que aumentaron las temperaturas de ebullición, los pesos moleculares y existieron cambios en la funcionalidad química de los compuestos. Las concentraciones preparadas para cada uno de ellos, como se reportó en la Parte Experimental (**Numeral 3.4.1**), en promedio fueron las mismas. Las sustancias que presentaron valores no lógicos fueron el α -terpino, eucalipto, neral y geraniol. Como se observa de la **Tabla** anterior, para α -terpino y el eucalipto el valor es menor si se compara con los del limoneno y linalol. Por otro lado, el valor del neral fue extremadamente grande; mientras que, los valores entre los compuestos como geraniol, geraniol y *trans*- β -cariofileno, estuvieron cercanos.

En las **Tablas 8-13**, se presentan los datos obtenidos para los K_{AE-HS} , $K_{PDMS-HS}$, $K_{AE-PDMS}$ de los AE's de cáscara de naranja y de las flores de ylang-ylang. Cada una de las **Tablas**, contiene el tratamiento estadístico (promedio, desviación estándar muestral y el coeficiente de variación) realizado a cada uno de los coeficientes de partición obtenidos.

Tabla 8. K_{AE-HS} calculados para los componentes mayoritarios del aceite esencial de cáscara de naranja.

Compuesto	K_{AE-HS}		Promedio	s	CV, %
	Réplica 1	Réplica 2			
α-Pino	46	46	46.0	0.3	0.6
Sabineno	111	110	110	1	0.7
β -Mirceno	166	158	160	6	3.6
Octanal	1657	1531	1600	89	5.6
Limoneno	158	153	160	4	2.4
β -Ocimeno	81	71	80	7	8.9
γ -Terpineno	157	134	150	16	11.3
Octanol	5949	5670	5800	197	3.4
α -Terpinoleno	332	348	340	11	3.4
Linalol	29378	25362	27000	2840	10.4
Nonanal	65	41	50	17	31.3
Verbenol	54	40	50	10	20.3
β -Terpineol	110	100	100	7	6.7
Citronelal	7259	----	7259	----	----
Terpinen-4-ol	12764	18677	16000	4181	26.6
α -Terpineol	42885	43779	43000	633	1.5
Decanal	22766	21681	22000	767	3.5
Carveol	1430	1887	1700	323	19.5
Metil-timol-éter	7824	8885	8000	750	9.0
Neral	12318	11494	12000	583	4.9
Carvona	21192	21120	21200	51	0.2
Geranial	22907	20194	22000	1918	8.9
Decanol	----	12112	12112	----	----
N.I.	6076	6588	6000	362	5.7
Terpinen-4-al	5544	----	5544	----	----
Butanoato de octilo	1353	1312	1300	29	2.2
Cubebeno	5900	5256	5600	455	8.2
Dodecanal	----	11493	11493	----	----
trans-b-Cariofileno	602	587	600	10	1.8
β -Bisaboleno	1530	1448	1490	58	3.9

Tabla 9. $K_{PDMS-HS}$ calculados para los componentes mayoritarios del aceite esencial de cáscara de naranja.

Compuesto	$K_{PDMS-HS}$		Promedio	s	CV, %
	Réplica 1	Réplica 2			
α-Pineno	5438	4835	5000	426	8
Sabineno	5471	5519	5500	34	0.6
β -Mirceno	6264	5513	5900	531	9
Octanal	26163	18665	22000	5302	24
Limoneno	6741	6420	6600	227	3
β -Ocimeno	6571	6974	6800	285	4
γ -Terpineno	7200	5564	6000	1157	18
Octanol	129008	128515	128800	349	0.3
α -Terpinoleno	10173	11497	10900	936	9
Linalol	608956	531657	570000	54658	10
Nonanal	3351	2716	3000	449	15
Verbenol	1661	1360	1500	213	14
β -Terpineol	2395	2464	2400	48	2
Citronelal	137286	----	137286	----	----
Terpinen-4-ol	302005	423936	400000	86218	24
α -Terpineol	719936	846341	800000	89382	11
Decanal	504617	516314	510000	8271	2
Carveol	30441	41969	40000	8152	23
Metil-timol-éter	164119	188143	200000	16987	10
Neral	267794	223914	200000	31028	13
Carvona	192951	177831	200000	10691	6
Geranial	561382	427945	500000	94355	19
Decanol	----	218357	218357	----	----
N.I.	144283	126881	140000	12305	9
Terpinen-4-al	110056	----	110056	----	----
Butanoato de octilo	48501	46057	50000	1728	4
Cubebeno	256436	155254	200000	71546	35
Dodecanal	----	203555	203555	----	----
<i>trans</i>-β-Cariofileno	28099	27525	28000	406	1
β -Bisaboleno	90975	102642	100000	8250	9

Tabla 10. $K_{AE-PDMS}$ calculados para los componentes mayoritarios del aceite esencial de cáscara de naranja.

Compuesto	$K_{AE-PDMS}$		Promedio	s	CV, %
	Réplica 1	Réplica 2			
α-Pineno	251066	221444	240000	20946	9
Sabineno	609480	608517	609000	681	0.1
β -Mirceno	1041967	871538	1000000	120512	13
Octanal	43352356	28582873	40000000	10443602	29
Limoneno	1068241	983805	1030000	59705	6
β -Ocimeno	529171	495292	500000	23956	5
γ -Terpineno	1132189	745740	1000000	273261	29
Octanol	767494170	728698863	750000000	27432425	4
α -Terpinoleno	3373007	3997538	3700000	441610	12
Linalol	17889956827	13483938911	16000000000	3115525147	20
Nonanal	217846	112539	170000	74463	45
Verbenol	89714	55017	80000	24534	34
β -Terpineol	262885	245830	300000	12060	5
Citronelal	996584723	----	996584723	----	----
Terpinen-4-ol	3854851493	7917809020	6000000000	2872944818	49
α -Terpineol	30874216237	37052177591	34000000000	4368478367	13
Decanal	11487913080	11194098169	12000000000	207758516	2
Carveol	43542439	79216169	100000000	25225136	41
Metil-timol-éter	1284046110	1671556412	1500000000	274011162	19
Neral	3298716486	2573686558	3000000000	512673578	17
Carvona	4089011341	3755857445	4000000000	235575379	6
Geranial	12859462826	8641815298	11000000000	2982327167	28
Decanol	----	2644804473	2644804473	----	----
N.I.	876670092	835903195	860000000	28826550	3
Terpinen-4-al	610146655	----	610146655	----	----
Butanoato de octilo	65622606	60448851	64000000	3658397	6
Cubebeno	1512926741	815983520	1200000000	492813277	42
Dodecanal	----	2339543761	2339543761	----	----
<i>trans</i>-β-Cariofileno	16920033	16168074	16600000	531716	3
β -Bisaboleno	139178853	148618385	144000000	6674757	5

Tabla 11. K_{AE-HS} calculados para los componentes principales del aceite esencial de flores de ylang-ylang.

Compuesto	K_{AE-HS}		Promedio	s	CV, %
	Réplica 1	Réplica 2			
Acetato de pent-4-en-1-ilo	226	189	210	26	13
Acetato de 3-metil-2-buten-1-ilo	290	285	290	4	1
α-Pineno	467	450	460	12	3
β -Pineno	----	----	----	----	----
β -Mirceno	79	77	80	1	2
Acetato de hex-3-en-1-ilo	145	133	140	9	6
Acetato de etilo	810	761	790	34	4
<i>p</i> -Metilanol	457	436	450	15	3
Limoneno + Felandreno	89	80	90	6	8
Eucaliptol	----	----	----	----	----
β -Ocimeno	240	228	240	8	4
Benzoato de metilo	1498	1453	1480	32	2
Linalol	1451	1456	1450	4	0.2
Acetato de bencilo	1984	1652	2000	235	13
Salicilato de metilo	543	586	600	30	5
Dimetoxitolueno	----	2777	2777	----	----
Acetato de β -feniletilo	3717	3753	3735	26	1
Anetol	2971	2564	2800	288	10
N.I.	----	----	----	----	----
Acetato de geranilo + Benzoato de butilo	----	18589	----	----	----
Copaeno	688	669	680	13	2
β -Burbuneno + Calareno	----	----	----	----	----
<i>trans</i>-β-Cariofileno	780	834	810	38	5
β -Gurgujeno	----	----	----	----	----
Acetato de cinamilo	36269	64194	60000	19746	39
α -Humuleno	2511	2605	2560	67	3
Germacreno-D	1768	1680	1730	62	4
α -Farneseno	----	----	----	----	----
γ -Cadineno + γ -Bisabolenol	14227	15087	15000	608	4
δ -Cadineno	----	9411	9411	----	----
Germacrenol	----	----	----	----	----
Benzoato de bencilo	61665	54380	58000	5151	9
Salicilato de bencilo	----	----	----	----	----

Tabla 12. K_{PDMS-HS} calculados para los componentes principales del aceite esencial de flores de ylang-ylang.

Compuesto	K _{PDMS-HS}		Promedio	s	CV, %
	Réplica 1	Réplica 2			
Acetato de pent-4-en-1-ilo	740	721	730	13	2
Acetato de 3-metil-2-buten-1-ilo	3898	3829	3900	49	1
α-Pineno	8990	8454	9000	379	4
β -Pineno	----	----	----	----	----
β -Mirceno	4975	4385	5000	417	9
Acetato de hex-3-en-1-ilo	10979	8681	10000	1625	17
Acetato de etilo	12365	9735	12000	1860	17
<i>p</i> -Metilanisol	7214	6875	7100	240	3
Limoneno + Felandreno	3359	4761	4100	991	24
Eucaliptol	----	----	----	----	----
β -Ocimeno	9705	6804	9000	2051	25
Benzoato de metilo	18881	18316	18600	399	2
Linalol	23324	23624	23500	212	1
Acetato de bencilo	29806	25210	28000	3250	12
Salicilato de metilo	8939	7008	8000	1366	17
Dimetoxitolueno	----	47358	47358	----	----
Acetato de β -feniletilo	89191	84349	87000	3423	4
Anetol	57626	47431	53000	7209	14
N.I.	----	----	----	----	----
Acetato de geranilo + Benzoato de butilo	----	242710	242710	----	----
Copaeno	23619	21241	23000	1681	7
β -Burbuneno + Calareno	----	----	----	----	----
<i>trans</i>-β-Cariofileno	26528	28494	28000	1390	5
β -Gurgujeno	----	----	----	----	----
Acetato de cinamilo	187214	324965	260000	97405	38
α -Humuleno	34225	35394	34900	827	2
Germacreno-D	49259	46816	49000	1727	4
α -Farneseno	----	----	----	----	----
γ -Cadineno + γ -Bisabolenol	63408	56437	60000	4929	8
δ -Cadineno	----	182684	182684	----	----
Germacrenol	----	----	----	----	----
Benzoato de bencilo	25451	21996	24000	2443	10
Salicilato de bencilo	----	----	----	----	----

Tabla 13. $K_{AE-PDMS}$ calculados para los componentes principales del aceite esencial de flores de ylang-ylang.

Compuesto	$K_{AE-PDMS}$		Promedio	s	CV, %
	Réplica 1	Réplica 2			
Acetato de pent-4-en-1-ilo	167134	136019	200000	22002	15
Acetato de 3-metil-2-buten-1-ilo	1130113	1090042	1120000	28334	3
a-Pineno	4197561	3805495	4100000	277233	7
β -Pineno	----	----	----	----	----
β -Mirceno	392830	338884	400000	38146	10
Acetato de hex-3-en-1-ilo	1593759	1153336	1400000	311426	23
Acetato de etilo	10016397	7412813	10000000	1841012	21
p-Metilanisol	3299544	3000130	3200000	211718	7
Limoneno + Felandreno	298927	379997	340000	57325	17
Eucaliptol	----	----	----	----	----
β -Ocimeno	2330171	1553420	2000000	549246	28
Benzoato de metilo	28285704	26608774	30000000	1185768	4
Linalol	33833115	34388360	34200000	392618	1
Acetato de bencilo	59139082	41652759	50000000	12364698	25
Salicilato de metilo	4855101	4103433	4500000	531510	12
Dimetoxitolueno	----	131521280	131521280	----	----
Acetato de β -feniletilo	331489613	316585067	330000000	10539105	3
Anetol	171181369	121601640	150000000	35058163	24
N.I.	----	----	----	----	----
Acetato de geranilo + Benzoato de butilo	----	4511711440	4511711440	----	----
Copaeno	16247429	14213820	20000000	1437979	9
β -Burbuneno + Calareno	----	----	----	----	----
trans-β-Cariofileno	20702727	23752019	23000000	2156175	10
β -Gurgujeno	----	----	----	----	----
Acetato de cinamilo	6789968558	20860828414	14000000000	9949600421	72
α -Humuleno	85933913	92215825	90000000	4441983	5
Germacreno-D	87086864	78653708	83000000	5963142	7
α -Farneseno	----	----	----	----	----
γ -Cadineno + γ -Bisaboleno	902094342	851471110	900000000	35796030	4
δ -Cadineno	----	1719287563	1719287563	----	----
Germacrenol	----	----	----	----	----
Benzoato de bencilo	1569453775	1196161167	1400000000	263957734	19
Salicilato de bencilo	----	----	----	----	----

En cada una de las **Tablas** anteriores, se resaltan los compuestos encontrados en los AE's bajo estudio, que fueron utilizados como patrones de referencia. Se hace esta diferenciación para poder comparar los valores de los K_{AEHS} , $K_{PDMS-HS}$, $K_{AE-PDMS}$ de estos compuestos en la mezcla de terpenos y en los dos aceites esenciales.

Las reproducibilidades de los valores de K_{AE-HS} , $K_{PDMS-HS}$, $K_{AE-PDMS}$ calculados para los componentes principales de los aceites esenciales, analizados por HRGC/FID, se registran en las **Tablas** anteriores, teniendo en cuenta que las mediciones se efectuaron por duplicado. Los coeficientes de variación determinados para los K_{AE-HS} , $K_{PDMS-HS}$, $K_{AE-PDMS}$, de los componentes mayoritarios del aceite esencial de cáscara de naranja, se estimaron en su mayoría entre 0.2-10, 0.3-11 y 0.1-12%, respectivamente. Además, se encontraron algunos valores por fuera del intervalo de variación mencionado. Así mismo los coeficientes de variación obtenidos para los K_{AE-HS} , $K_{PDMS-HS}$, $K_{AE-PDMS}$, de los componentes principales del aceite esencial de flores de ylang-ylang, se encontraron principalmente en el rango 0.2-13, 1-12 y 1-12%, respectivamente, con algunas desviaciones del rango indicado. Las variaciones más altas se encontraron sólo en algunos componentes.

Al observar las **Tablas**, se encuentra que los K_{AE-HS} , $K_{PDMS-HS}$, $K_{AE-PDMS}$ calculados presentaron variaciones entre componentes dentro del mismo AE y de un AE a otro. A su vez, existieron diferencias al comparar los valores de K_{AE-HS} , $K_{PDMS-HS}$, $K_{AE-PDMS}$ de componentes presentes en ambos AE's.

Se debe tener claro que K_D es una constante fisicoquímica y su valor no puede variar bajo ciertas condiciones establecidas. Esta constante depende de la naturaleza química [peso molecular, polaridad, presión de vapor (representa la volatilidad del compuesto puro) y temperatura de ebullición] de la sustancia y de las fases implicadas, de la presión y de la temperatura. K_D es independiente de la concentración siempre y cuando la solución se considere dilución infinita (constante) [7,26,82]. La limitación del alcance anterior (dilución infinita) es que se cree que no hay ninguna interacción significativa soluto-soluto como tampoco ninguna interacción fuerte específica soluto-solvente [6].

Con base en la premisa anterior, se encuentra reportado en la literatura (Guitart *et al.* [12] y Chaintreau *et al.* [96]) que si se llegan a presentar cambios en la determinación de coeficientes de partición para sustancias volátiles, éstos no serían significativos. El trabajo de Guitart *et al.* [12] indicó que la composición de la mezcla volátil tiene muy poca influencia sobre la partición de sus constituyentes. Así mismo, Chaintreau *et al.* [96] demostraron que la influencia de otros volátiles en la mezcla modelo de aromas sobre la concentración de los componentes individuales en la fase gaseosa no fue perceptible. Sin embargo, Baltes *et al.* [26] investigaron la influencia de las interacciones entre sustancias sobre el HS-GC y encontraron que aún pequeños cambios en la composición de la muestra puede causar cambios en la composición resultante del *headspace*.

Por otro lado, los resultados obtenidos para K_{AE-HS} en este trabajo, fueron similares a los resultados publicados en el trabajo de Keymeulen *et al.* [7], en el cual determinaron coeficientes de partición para hidrocarburos monocíclicos aromáticos entre el aceite esencial de hojas y aire, empleando HS-GC. El parecido encontrado entre los trabajos, radica en que existieron diferencias entre los valores de K_D para un mismo componente, en función del tipo de AE y en el incremento moderado del valor de K_{AE-HS} , a medida que disminuía la volatilidad entre aquellos compuestos que presentaban funcionalidad química similar e incremento en la longitud de la cadena carbonada [7,97].

En el trabajo de Keymeulen *et al.* se determinaron los K_D para los BTEX's [Benceno, tolueno, etilbenceno y los tres isómeros del xileno (*o*-, *m*- y *p*-)] entre el AE de material vegetal (hojas) de 9 especies de planta y su *headspace*. Los valores de K_D determinados para BTEX's variaron entre las plantas estudiadas. A pesar de la existencia de publicaciones que coinciden con los resultados logrados en este trabajo, no es acertado que los coeficientes de partición K_{AE-HS} , $K_{PDMS-HS}$, $K_{AE-PDMS}$ cambien tan drásticamente, si las soluciones con AE se llevaron bajo condiciones de dilución infinita.

Las alteraciones en los valores de $K_{AE-PDMS}$ posiblemente se centran en la determinación del K_{AE-HS} . Las causas probables que con llevaron a los valores no esperados de este coeficiente de partición pueden estar relacionados en primer lugar, por las "interacciones del aroma" (interacciones presentes entre componentes de aromas o entre componentes del aroma y su matriz y su ambiente [98]): interacción soluto-soluto (sinergismo o realce, aditividad y antagonismo) entre los componentes de los AE's y baja cantidad de componentes en el *headspace* (interacciones soluto-solvente, generando disminución en la presión de vapor de los analitos); en segundo lugar, por la fluctuación de la temperatura de muestreo para SPME y en tercer lugar, por la influencia de la naturaleza química de los componentes y el recubrimiento de SPME.

El argumento de la interacción soluto-soluto (sinergismo o realce, aditividad y antagonismo) entre los diferentes componentes dentro del mismo aceite esencial se basa en los trabajos realizados por Baltes *et al.* [26], Franzen *et al.* [99], Jelen *et al.* [100], van Ruth *et al.* [101] y Meilgaard [102]. El propósito del trabajo de Baltes *et al.* estuvo centrado en determinar cómo la composición final en el *headspace* de una solución modelo era influida por la interacción de los compuestos volátiles con otros componentes y con la matriz de la muestra. Encontró que al adicionar un componente volátil a una mezcla volátil inicial condujo a la disminución drástica de dichos componentes (disminución de las áreas de los picos cromatográficos), en especial, de los compuestos menos volátiles. Algunas de las sustancias fueron detectadas sólo a nivel de trazas, y si un gran

exceso de un nuevo compuesto se adicionaba, desaparecían. Este comportamiento fue atribuido a las posibles interacciones entre los compuestos en el *headspace*.

Por el contrario, la adición de compuestos menos volátiles influyó muy poco en la composición del *headspace*. Este resultado indicó que hay una fuerte interacción entre los componentes en el *headspace* de una matriz compleja. Además, pequeños cambios en la composición de la muestra pueden causar cambios drásticos en la composición resultante en el *headspace*, pero los efectos varían dependiendo de las cantidades y característica del compuesto investigado. Por lo tanto, no se pueden dar reglas generales para las interacciones de diferentes componentes en la fase vapor de muestras complejas puesto que factores diversos y desconocidos influyen en su composición.

Baltes *et al.* además, evaluaron el efecto de la matriz sobre el enriquecimiento del *headspace*. Fue evidente que, dependiendo de la naturaleza química de la matriz se presentaron desplazamientos de algunos componentes, conduciendo a la disminución o el incremento en las áreas cromatográficas obtenidas. Por ejemplo, al adicionar terpenos no polares en modelo de matrices polares, se presentaron débiles interacciones soluto-matriz permitiendo un incremento de la cantidad de estos analitos en el *headspace*. Por el contrario, si la matriz era no polar, la interacción entre el terpeno y la matriz era fuerte (mejor solubilidad del terpeno en la matriz) y resultaba en una disminución o ausencia de la cantidad de dicha sustancia en la fase vapor. Así mismo, sustancias polares fueron menos influida por la matriz no polar.

Las posibles interacciones (efectos de sinergismo o realce, aditividad, enmascaramiento (antagonismo) y compensación independiente [100]) presentes entre compuestos del aroma, se han estudiado desde otro punto de vista por Meilgaard [102]. En su experimento, 250 compuestos fueron purificados y adicionados a la cerveza como componentes individuales y grupales para la determinación de valores umbrales del aroma. Los resultados se usaron para proponer un conjunto de hipótesis y fórmulas para determinar cuáles compuestos son ingredientes activos y cómo interactúan para producir la totalidad del aroma de la cerveza y cómo se puede predecir diferencias entre cervezas.

Para comprender el efecto de las interacciones, Meilgaard utilizó una relación denominada “grado de interacción del aroma (d_{int})”, que consistió en la medición de la intensidad observada del componente del olor de la mezcla dividida por la suma de las intensidades de los componentes. Entonces, si $d_{int} = 1$, la interacción fue aditiva; si $d_{int} > 1$, la interacción fue de sinergismo; si $d_{int} < 1$, la interacción fue independiente

(compensación) o de antagonismo (supresión, enmascaramiento). Finalmente, si $d_{int} = 0$, los compuestos del aroma producirían una mezcla “*flavorless*” (cancelación, extinción).

Meilgaard encontró que compuestos de notas similares son aproximadamente aditivas, mientras que compuestos de diferentes notas muestran independencia parcial. Por ejemplo, encontró efecto sinergista en dos compuestos de serie homóloga (ésteres) con diferencia en un carbono (acetato de isobutilo y acetato de isoamilo) los cuales tienen notas similares. Un caso muy parecido fue el de otros dos compuestos de serie homóloga (también ésteres) pero con diferencia en dos carbonos (hexanoato de etilo y octanoato de etilo), los cuales presentaron sólo un pequeño grado de aparente sinergismo. Si la interacción es entre dos compuestos con notas diferentes (ácido octanoico y acetato de etilo) estos fueron casi independientes. Estos resultados se pueden explicar si se supone que la similitud de la nota en el olor es el factor predominante sobre la similitud en la estructura química. Otros ejemplos a considerar son el ácido butanoico y el 2,3-butanodiona, un ácido carboxílico volátil y un compuesto carbonílico, son aditivos porque tienen notas similares; en contraste, los ácidos acético y octanoico son independiente debido a su aroma diferente [102].

Con base en todas las observaciones propuestas por Baltes *et al.* y Meilgaard, quienes sugieren con su resultados la explicación del “sinergismo” entre aromas (lo cual es afirmado por los *flavoristas*), se extiende este argumento a lo obtenido en este trabajo: las fuertes interacciones entre los componentes de los AE’s en el *headspace* y entre estos mismos componentes y la matriz de la muestra causaron cambios drásticos en la composición resultante en el *headspace*.

No se investigó el comportamiento de los patrones individuales debido a que estos datos sólo serían de interés teórico, puesto que no tienen relevancia para la interpretación del comportamiento de mezclas complejas, siendo el caso que concierne. En tales sistemas (mezclas complejas – AE) hay fuertes interacciones entre los compuestos en fase gaseosa, como lo demostró el experimento realizado por Baltes *et al.* [26]. Por lo tanto, los datos individuales no son de utilidad para la interpretación de estos resultados.

Por otro lado, existen otros factores que influyen los resultados obtenidos por HS-GC. Estos factores son presión de vapor y temperatura, tipo de medio, grado de solubilidad (interacciones de los compuestos volátiles con la matriz), concentración, miscibilidad con otros compuestos orgánicos, etc. [26,100,103]. Estas propiedades específicas están correlacionadas con el coeficiente de actividad (γ), el cual depende de la presión parcial de la sustancia [26]. Puesto que los AE’s usados son mezclas complejas, debido a la diversidad de su composición (diferente naturaleza química de los componentes), diferentes tipos de

interacciones (dipolo-dipolo inducido, puente de hidrógeno, enlace hidrofóbico, etc.) posiblemente se producirán con la matriz (solvente). Estas interacciones conducirán a diferentes grados de retención de los componentes (afinidad por las diferentes fases), repercutiendo sobre su volatilidad (aumento o disminución de la presión de vapor) y con llevando a favorecer o no, a la liberación del componente en la fase gaseosa [24,104]. Así, la partición de los componentes de los AE's depende principalmente de su hidrofobicidad [104]. La comprensión de las interacciones entre componentes de AE's es muy complicado por el número de compuestos disponibles para participar en ellos [98].

Para entender mejor lo complejo de las interacciones entre componentes de AE, se presenta el ejemplo de las posibles interacciones (dipolo-dipolo inducido) entre el geraniol y el eucaliptol en una matriz polar (solvente). El geraniol es más hidrofílico que el eucaliptol; por lo tanto, las interacciones entre los dos compuestos aumentarán la solubilidad del eucaliptol en un ambiente hidrofílico. La influencia de la posible interacción de compuestos sobre la solubilidad se puede ilustrar como sigue. Un compuesto hidrofóbico si se adiciona directamente a una solución acuosa de etanol al 5% es insoluble; sin embargo, si este compuesto se adiciona primero a una solución acuosa de mayor concentración de etanol (50%) y posteriormente, se diluye a una concentración de etanol al 5%, dicho compuesto permanecerá en la solución. El incremento de las interacciones con el etanol en altas concentraciones facilita la formación de estructuras coloide y altera las propiedades termodinámicas de la solución. Este tipo de interacción molecular sería esperado para reducir la volatilidad (liberación) de ambos compuestos según lo expuesto por Peterson *et al.* [105].

La segunda posible causa para que el valor de $K_{AE-PDMS}$ no fuera el esperado, se atribuye a la fluctuación de la temperatura de muestreo para HS-SPME. El control preciso de la temperatura del baño de agua estático, durante el muestreo SPME, no fue eficiente puesto que sólo se pudo mantener la temperatura $\pm 1^{\circ}\text{C}$. El gradiente de temperatura es significativo al momento de efectuarse la medición, debido a que la variación de la temperatura de muestreo afecta la masa del soluto extraído por el recubrimiento.

La absorción (PDMS) es un proceso exotérmico: con el incremento de la temperatura más moléculas se absorben sobre la fase estacionaria de la fibra por su difusión a la fase gaseosa desde la matriz, lo cual disminuye inversamente el coeficiente de partición [94].

La cantidad de un analito absorbido por la fibra y la sensibilidad resultante, está determinada tanto por la cinética de absorción y por el coeficiente de distribución del compuesto entre la superficie de la fibra y la matriz. Cualquier cambio en la temperatura o en cualquiera de los parámetros experimentales, afectará la

distribución, la velocidad de absorción, la cantidad absorbida por la fibra y la correspondiente reproducibilidad [106].

Finalmente, la tercera causa es la influencia de la naturaleza química de los componentes y el recubrimiento de SPME. La naturaleza química de PDMS es no polar, los analitos de esta misma naturaleza tendrán mayor afinidad por esta fase, siendo absorbidos eficientemente y presentando bajos valores de K_D . Así mismo, los compuestos de naturaleza química diferente a la del recubrimiento tienen menos afinidad y altos valores de K_D .

El fenómeno de absorción PDMS-analito, se puede explicar a través de las interacciones soluto-solvente. Cuando un vapor de soluto se disuelve en un solvente, el calor molar de solución (ΔH^s) generado se puede relacionar con el calor molar de evaporación (ΔH^v) del soluto a través de $\Delta H^s + \Delta H^v = \Delta H^e$, donde ΔH^e es la entalpía molar en exceso de la mezcla en el proceso de disolución. Si la solución final es una solución ideal, obedecerá estrictamente la ley de Raoult, $\Delta H^e=0$ [107,108].

Así que, ΔH^e puede ser positivo o negativo dependiendo de la naturaleza de la solución. Si es negativo, sugiere que la disolución del vapor del soluto en un solvente genera más calor que su condensación a líquido puro. Esto implica que la interacción soluto-solvente es más fuerte que la interacción soluto-soluto cuando el soluto está en estado líquido. La solución tiene una energía interna total menor que la del soluto puro y el solvente adicionado. Por otro parte, si ΔH^e es positivo, significa que la interacción soluto-solvente no es favorable comparado con la interacción soluto-soluto. Si la solución se forma desde la mezcla del soluto líquido puro y el solvente, la solución necesita absorber calor desde el ambiente y la estabilidad de la solución es principalmente atribuida a la entropía incrementada.

La dependencia de la temperatura se puede explicar considerando las interacciones intermoleculares entre los solutos y la fase polimérica. La naturaleza no polar de PDMS con sus grupos metilo ricos en electrones sugiere que la interacción con algún componente que no presente ningún momento dipolar no sería muy atractiva. Por otro lado, si los compuestos tienen estructuras con cadenas lineales con grupos alquílicos ricos en electrones por un lado y al otro lado átomos electronegativos, tales como oxígeno, se pueden involucrar en una interacción dipolo-dipolo inducido con los grupos metilos electrodonantes del recubrimiento. Sin embargo, los electrones π en $C=O$ están localizados. Como un resultado la interacción polímero-soluto es poco probable que disminuya la energía total del sistema [107].

4.5 COMPETENCIA DE TERPENOS POR RECUBRIMIENTO: COMPARACIÓN PDMS Vs. PDMS/DVB

El fenómeno de competencia o de desplazamiento en los materiales poliméricos es característico para sólidos porosos donde el mecanismo de extracción-concentración es a través de la adsorción y está relacionado directamente con el número de sitios activos disponibles para el atrapamiento. Para la obtención de los perfiles competitivos por PDMS y PDMS/DVB se ejecutaron las condiciones experimentales registradas en el **Numeral 3.5** de la Parte Experimental. En las **Figuras 32-45** se dan a conocer las tendencias obtenidas para los dos recubrimientos.

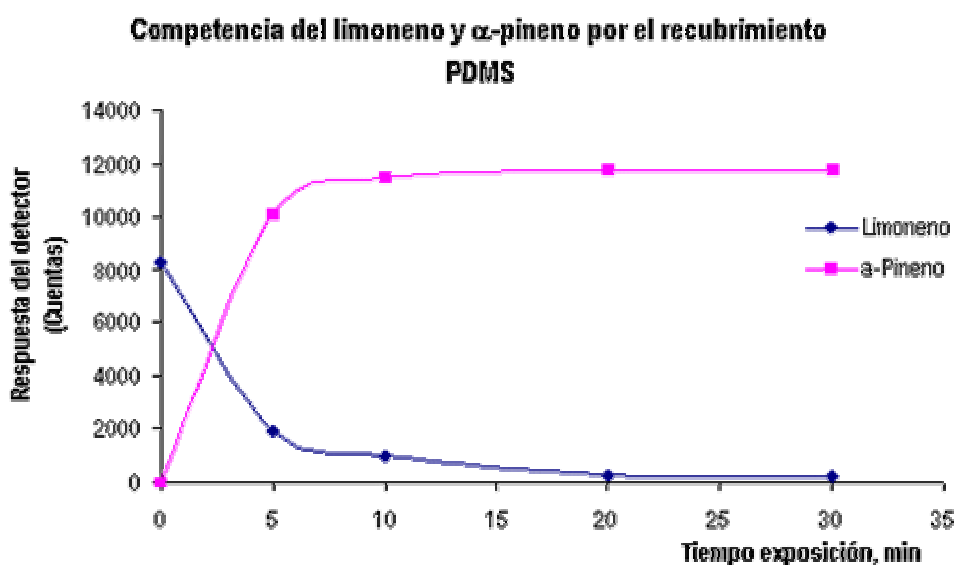


Figura 32. Desplazamiento del limoneno (previa saturación de la fibra, durante 30 min) por el α -pineno en el recubrimiento de PDMS, en función del tiempo de extracción.

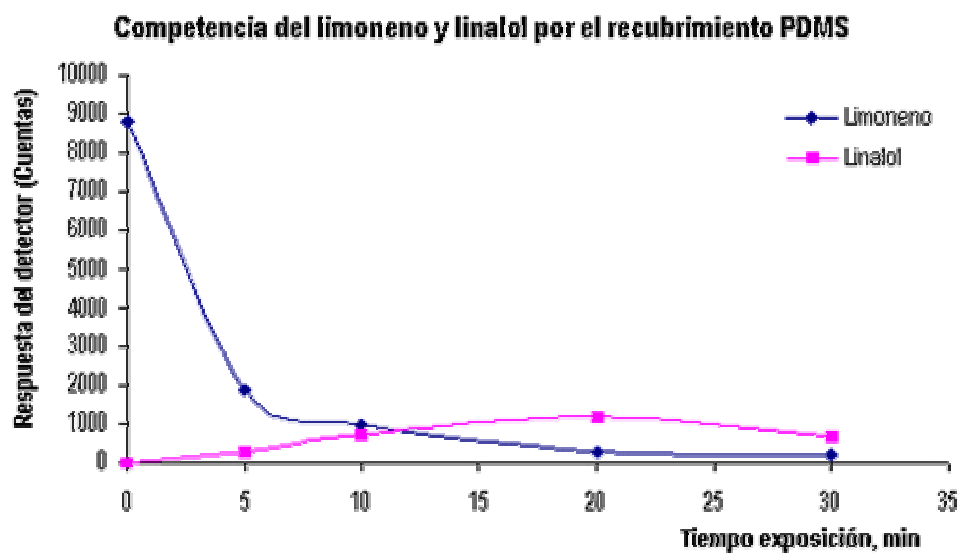


Figura 33. Desplazamiento del limoneno (previa saturación de la fibra, durante 30 min) por el linalol en el recubrimiento de PDMS, en función del tiempo de extracción.

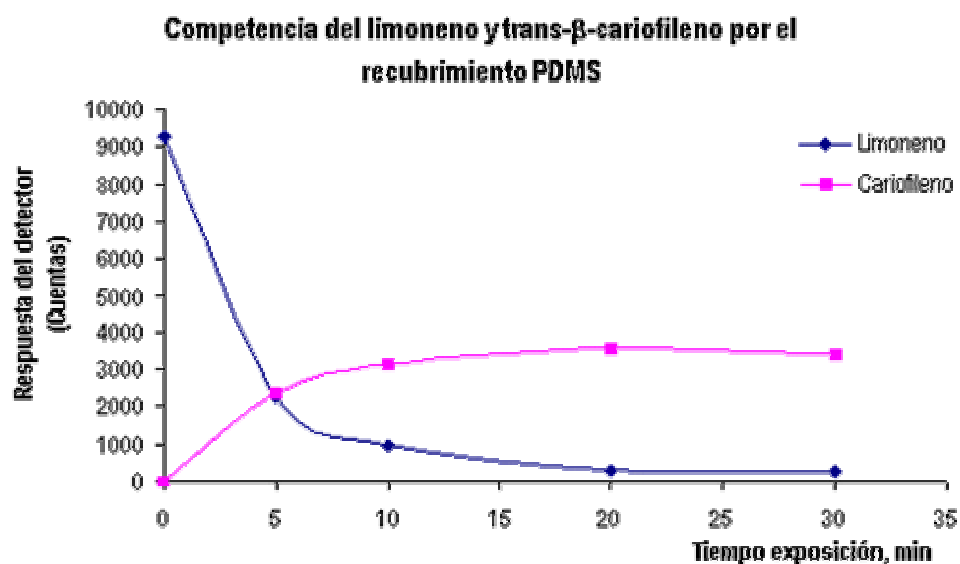


Figura 34. Desplazamiento del limoneno (previa saturación de la fibra, durante 30 min) por el $\text{trans-}\beta$ -cariofileno en el recubrimiento de PDMS, en función del tiempo de extracción.

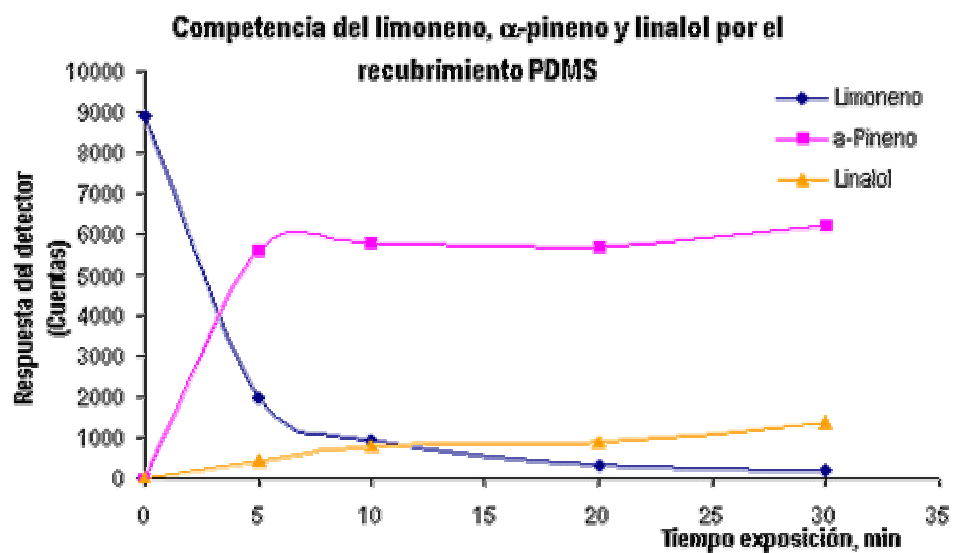


Figura 35. Desplazamiento del limoneno (previa saturación de la fibra, durante 30 min) por el α -pineno y linalol en el recubrimiento de PDMS, en función del tiempo de extracción.

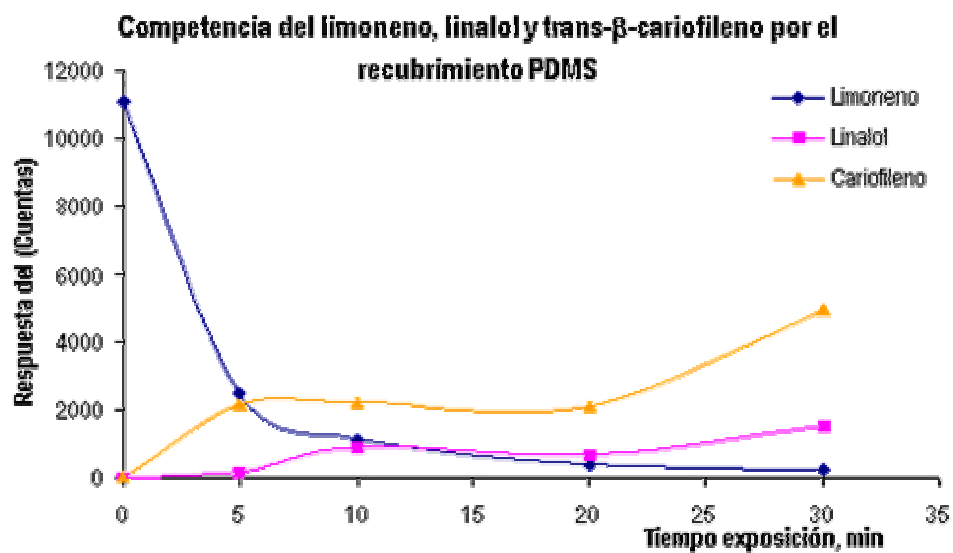


Figura 36. Desplazamiento del limoneno (previa saturación de la fibra, durante 30 min) por el *trans*- β -cariofileno y linalol en el recubrimiento de PDMS, en función del tiempo de extracción.

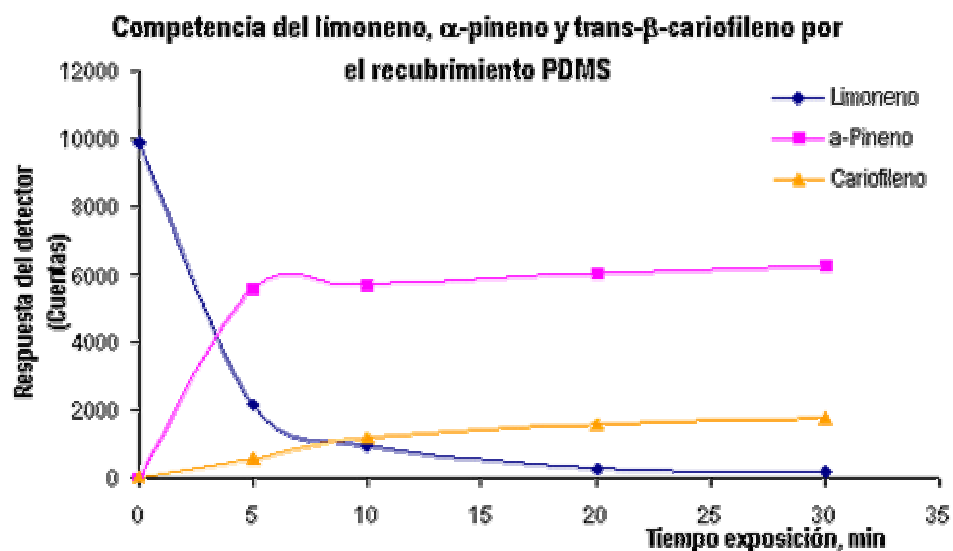


Figura 37. Desplazamiento del limoneno (previa saturación de la fibra, durante 30 min) por el *trans*- β -cariofileno y α -pineno en el recubrimiento de PDMS, en función del tiempo de extracción.

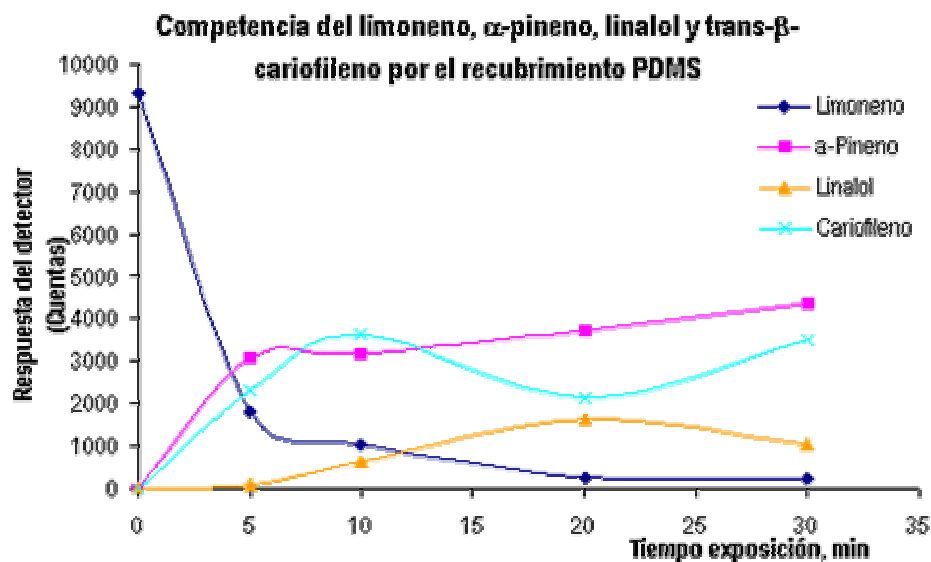


Figura 38. Desplazamiento del limoneno (previa saturación de la fibra, durante 30 min) por el *trans*- β -cariofileno, α -pineno y linalol en el recubrimiento de PDMS, en función del tiempo de extracción.

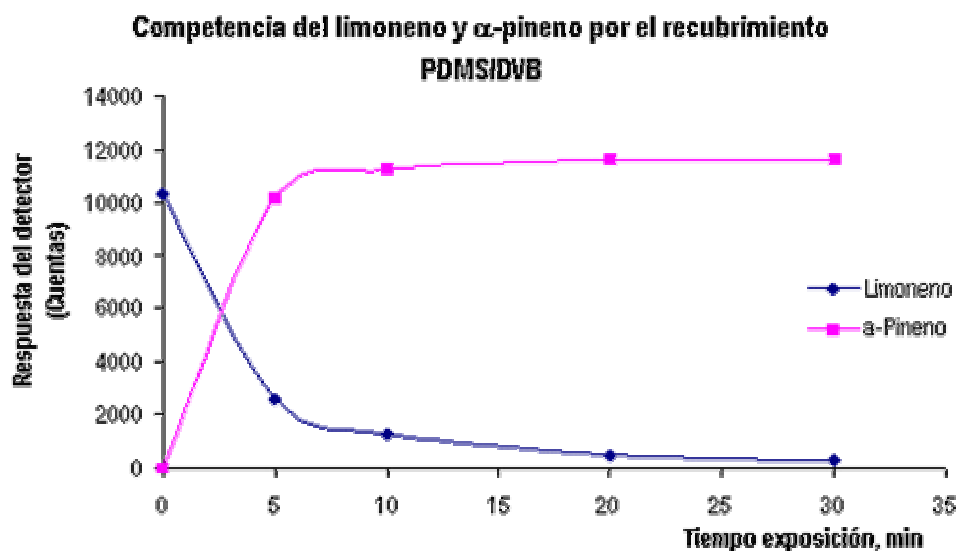


Figura 39. Desplazamiento del limoneno (previa saturación de la fibra, durante 30 min) por el α -pineno en el recubrimiento de PDMS/DVB, en función del tiempo de extracción.

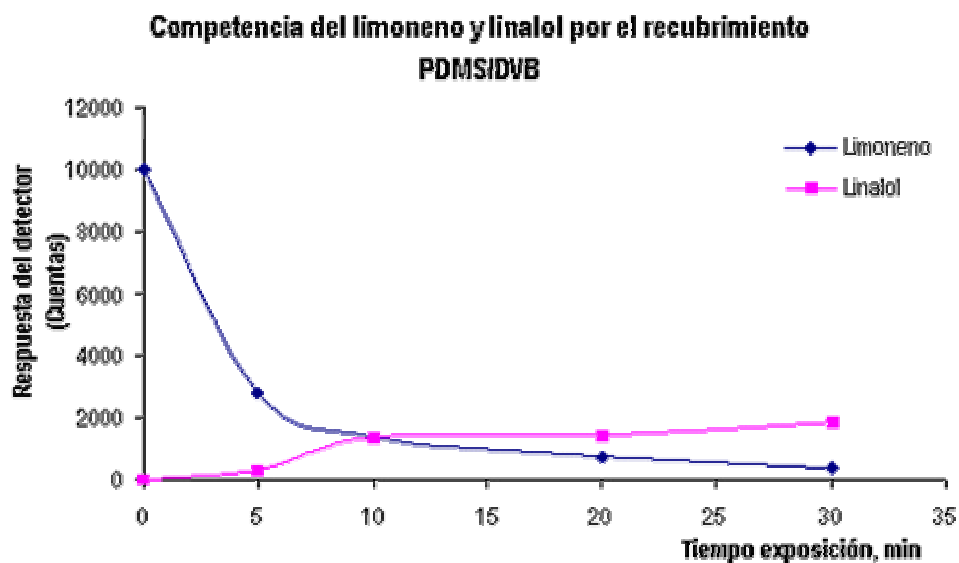


Figura 40. Desplazamiento del limoneno (previa saturación de la fibra, durante 30 min) por el linalol en el recubrimiento de PDMS/DVB, en función del tiempo de extracción.

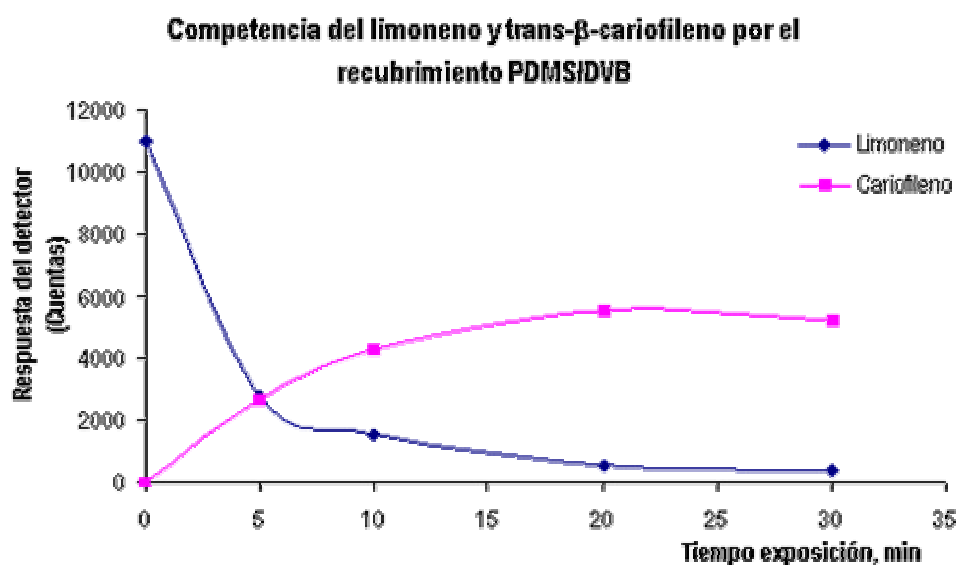


Figura 41. Desplazamiento del limoneno (previa saturación de la fibra, durante 30 min) por el $\text{trans-}\beta$ -cariofileno en el recubrimiento de PDMS/DVB, en función del tiempo de extracción.

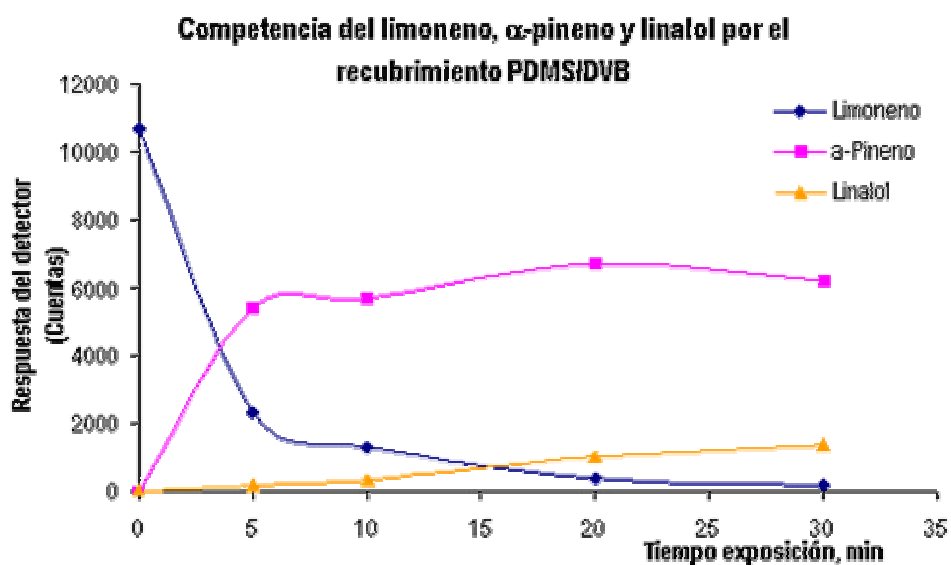


Figura 42. Desplazamiento del limoneno (previa saturación de la fibra, durante 30 min) por el α -pineno y linalol en el recubrimiento de PDMS/DVB, en función del tiempo de extracción.

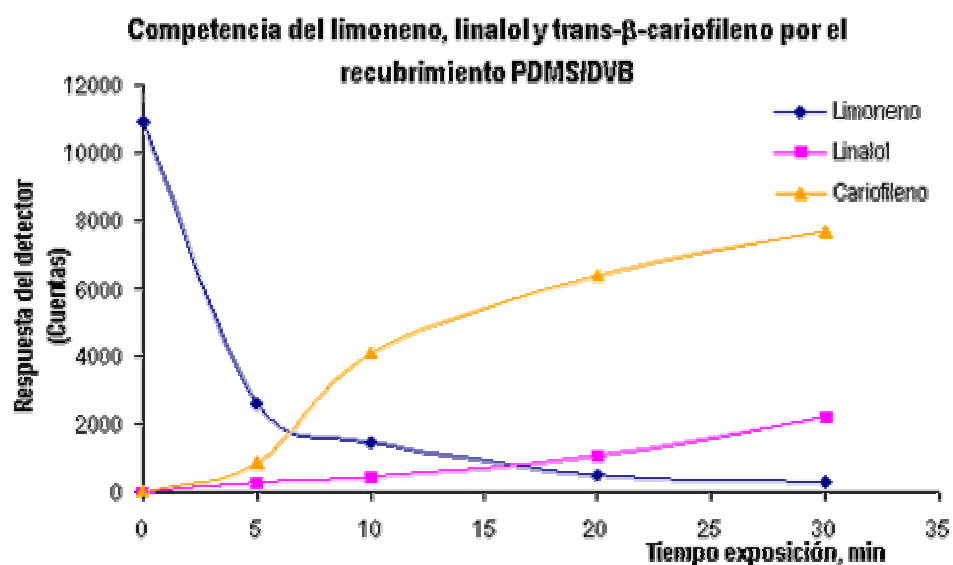


Figura 43. Desplazamiento del limoneno (previa saturación de la fibra, durante 30 min) por el *trans*- β -cariofileno y linalol en el recubrimiento de PDMS/DVB, en función del tiempo de extracción.

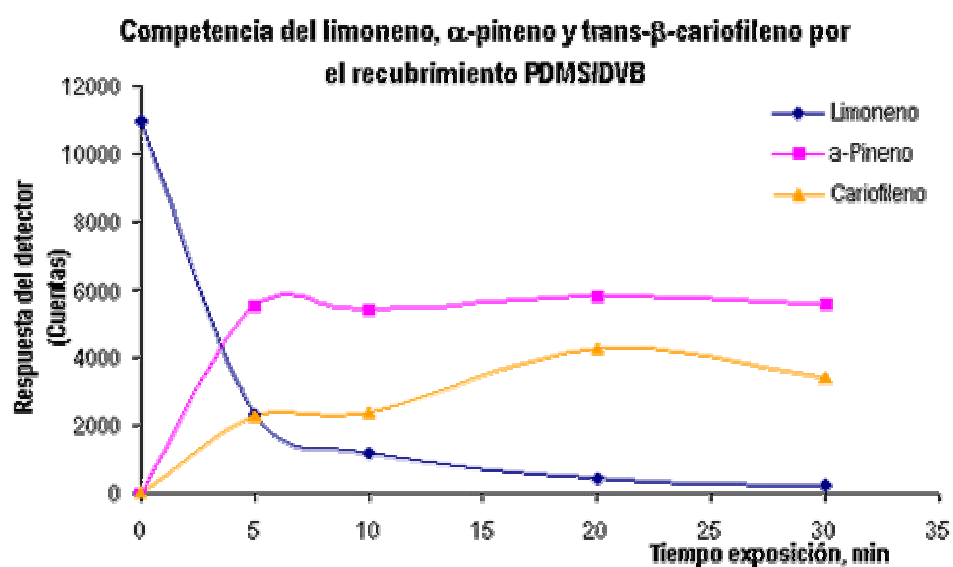


Figura 44. Desplazamiento del limoneno (previa saturación de la fibra, durante 30 min) por el *trans*- β -cariofileno y α -pineno en el recubrimiento de PDMS/DVB, en función del tiempo de extracción.

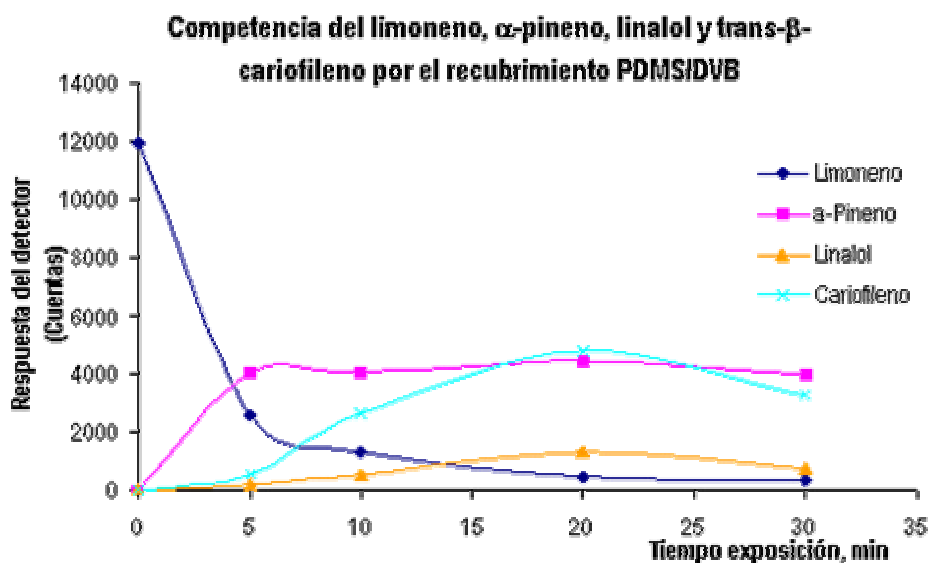


Figura 45. Desplazamiento del limoneno (previa saturación de la fibra, durante 30 min) por el *trans*-β-cariofileno, α-pineno y linalol en el recubrimiento de PDMS/DVB, en función del tiempo de extracción.

Las concentraciones preparadas para el limoneno, α-pineno, linalol y *trans*-β-cariofileno, las cuatro sustancias evaluadas en esta parte del trabajo, fueron 12600, 12467, 11800 y 11333 ppm, respectivamente. Sin embargo, de cada solución se tomó una alícuota de 50 μL, la cual se expuso a HS-SPME.

De acuerdo con las **Figuras 32-38**, obtenidas para PDMS-100 μm, existió una tendencia generalizada: el componente con máxima saturación en el recubrimiento (en este caso el limoneno, saturado previamente durante 30 min) al exponerse a otra sustancia con características y propiedades similares (isómeros - monoterpenos) o diferentes (terpeno oxigenado y sesquiterpeno) a ella, presentó una disminución en la cantidad absorbida por la fibra, en función del tiempo de exposición al otro componente.

Además de presentarse el desplazamiento de la sustancia con máxima absorción, el otro compuesto que compite logró la saturación en un corto período de tiempo (aproximadamente, 10 min); sin embargo, al extenderse el tiempo de extracción para el segundo componente, las cantidades absorbidas del primer compuesto se minimizó al máximo.

Al saturar la fibra con el limoneno y exponerla a un componente individual (α-pineno, linalol o *trans*-β-cariofileno) la tendencia fue la misma descrita en los párrafos anteriores. Sólo que la fibra de PDMS presentó

una baja absorción por el linalol, comparado con el α -pineno y *trans*- β -cariofileno. Así mismo, al exponer la fibra, previa saturación con limoneno a mezclas binarias (α -pineno-linalol; linalol- *trans*- β -cariofileno y α -pineno-*trans*- β -cariofileno), el comportamiento en el desplazamiento fue el mismo. La absorción de los componentes fue superior para la sustancia menos polar (α -pineno y *trans*- β -cariofileno) en el caso de las dos primeras mezclas binarias; pero en la mezcla binaria, α -pineno-*trans*- β -cariofileno, predominó la volatilidad de la sustancia, siendo absorbido en mayor proporción el α -pineno. Finalmente, se realizó el mismo experimento pero esta vez, exponiendo la fibra pre-saturada a una mezcla ternaria (α -pineno, linalol y *trans*- β -cariofileno). El desplazamiento del limoneno siguió efectuándose hasta su mínimo, como en los casos anteriores pero el linalol encontró su absorción máxima en 20 minutos con posterior desplazamiento. Nuevamente, para el α -pineno y *trans*- β -cariofileno, predominó la volatilidad de la sustancia en la cantidad absorbida.

Para comprobar si realmente el fenómeno que se presenta en el recubrimiento de PDMS es de competencia o desplazamiento, en una mezcla heterogénea donde uno de sus componentes alcanza la absorción máxima primero que los otros compuestos presentes, se llevó a cabo nuevamente cada uno de los experimentos anteriores pero utilizando un recubrimiento que debido a sus características físicas presentara el fenómeno de adsorción (sólido poroso). Por esta razón, se empleó el recubrimiento de PDMS/DVB. Las tendencias encontradas en estos experimentos se presentan en las **Figuras 39-45**.

El comportamiento encontrado en los experimentos con el recubrimiento de PDMS/DVB fue muy similar a los realizados con el recubrimiento de PDMS. Con lo cual se ratifica que seguida a la absorción máxima del primer componente de una mezcla heterogénea, se presentará el desplazamiento de dicho compuesto por las otras sustancias, en función del tiempo de extracción. Posiblemente, existe una relación en el desplazamiento con el valor de $K_{PDMS-HS}$. Si los componentes de la mezcla presentan un alto valor de $K_{PDMS-HS}$, estos desplazarán a aquellos con bajos valores de $K_{PDMS-HS}$.

Algunos investigadores sobre este tema, tienen varios argumentos del por qué el fenómeno de competencia se presenta en el tipo de recubrimiento PDMS, donde el fenómeno de extracción-concentración es la absorción. Pawliszyn *et al.* [109] argumentan que el fenómeno de competencia aparece cuando la concentración de un analito excede el límite superior del rango lineal del recubrimiento. Una de las formas de reducir la posibilidad de sobrecarga de la fibra y desviaciones resultantes, especialmente cuando se analizan compuestos con baja y alta afinidad por la fibra, es empleando tiempos cortos de muestreo.

De acuerdo con Roberts *et al.* [110] efectos de competencia resultarán en desviaciones si un compuesto con un alto $K_{\text{PDMS-HS}}$ está presente en grandes cantidades. Si los valores relativos se miden, la concentración de los compuestos debe estar dentro del rango lineal. La alta sensibilidad de la fibra de SPME, para la mayoría de compuestos, conduce a un rango lineal que usualmente está por debajo de 1 ppm. Lo que significa que para el análisis de productos naturales, donde los compuestos tienen diferente afinidad por la fibra y están presentes en varias concentraciones, no todos los compuestos pueden estar dentro del rango lineal.

Pawliszyn *et al.* y Roberts *et al.* atribuyen el fenómeno de competencia a las grandes cantidades de un analito, que exceden el límite superior del rango lineal de la fibra de SPME. Por otro lado, Bicchi *et al.* [85] citaron que la principal desventaja que presenta SPME para el análisis de compuestos volátiles es su limitada capacidad para albergar grandes cantidades de sustancia, cuando ésta se encuentra en altas concentraciones en el *headspace*, casi atribuible probablemente al pequeño volumen del recubrimiento polimérico de la fibra, el cual se encuentra entre 0.4 y 0.6 μL .

5. CONCLUSIONES

1. Se determinaron las mejores condiciones de extracción para HS-SPME, empleando los dos recubrimientos, PDMS-100 μm y PDMS/DVB-65 μm . Debido a que con PDMS se lograron máximos de saturación, tanto en función del tiempo como de la temperatura de exposición, éste se seleccionó como recubrimiento de trabajo. Para PDMS/DVB-65 μm , a pesar que extrajo una mayor cantidad de componentes no se logró un máximo de adsorción al evaluar el efecto de la temperatura. Las reproducibilidades (CV, %) obtenidas en las áreas de la mayoría de los patrones de terpenos estuvieron dentro de las variaciones aceptadas (máx. 10%), al efectuar las mediciones con los dos recubrimientos. Los valores calculados se encontraron en el rango de 0.002-12%; sin embargo, se presentaron algunos valores de CV's que se desviaron de los intervalos obtenidos. Las mejores condiciones obtenidas para PDMS-100 μm fueron: tiempo de equilibrio 30 min a 40°C.

2. La utilización de la cromatografía de gases como una herramienta adecuada para establecer parámetros fisicoquímicos, se evidenció al obtener los K_D del α -pineno, α -terpineno, limoneno, eucaliptol, linalol, terpinen-4-ol, neral, geraniol, geranial y *trans*- β -cariofileno, por el método clásico. Los K_D se determinaron en el rango de temperaturas entre 40 y 140°C, bajo condiciones isotérmicas para el GC. Con los valores obtenidos se construyeron las curvas de *van't Hoff*, las cuales alcanzaron valores de R^2 entre 0.99980 y 0.9999, logrando la proporcionalidad adecuada entre $\ln K$ y $1/T$. Con base en estas curvas se adquirieron los valores de ΔH° y ΔS° , las cuales aportan información sobre la energía involucrada y el cambio en la libertad de movimiento (pérdida de aleatoriedad) en las interacciones soluto-fase estacionaria, respectivamente. La reproducibilidad obtenida en las determinaciones de K_D , medida con los coeficientes de variación, se encontraron dentro de las variaciones aceptadas por las Buenas Prácticas de Laboratorio. Los CV variaron entre 0.006-0.8%.

3. Se obtuvieron los K_{AE-HS} , $K_{PDMS-HS}$, $K_{AE-PDMS}$ para cada uno de los componentes de los patrones de terpenos y aceites esenciales de cáscara de naranja y de las flores de ylang-ylang, empleando inyección convencional (relación *split* 15:1), SHS y HS-SPME. Las condiciones de muestreo usados para SHS [T (40°C) y t (30 min) de extracción, v/n del vial (20 mL), cantidad de muestra (1 mL)] fueron las mismas que se usaron para HS-SPME, para poder comparar los datos. Los coeficientes de variación determinados para K_{AE-HS} , $K_{PDMS-HS}$,

$K_{AE-PDMS}$, en los componentes principales del aceite esencial de cáscara de naranja se estimaron entre 0.2-10, 0.3-11 y 0.1-12%, respectivamente. Así mismo los CV's obtenidos para los mismos coeficientes, pero de los componentes mayoritarios del aceite esencial de las flores de ylang-ylang, se encontraron en el rango 0.2-13, 1-12 y 1-12%, respectivamente. Se encontró en general, que las variaciones más marcadas de los CV's sólo estuvieron presentes en algunos componentes.

4. Al hacer las determinaciones de K_{AE-HS} , $K_{PDMS-HS}$, $K_{AE-PDMS}$ para los componentes de los AE's se hallaron variaciones de estos valores entre los compuestos presentes en un mismo AE y entre los compuestos comunes de un AE a otro. Con base en los trabajos y argumentos de varios investigadores [26, 93-96] se postuló que la variación de los valores obtenidos (no esperados) se originaron en la determinación de K_{AE-HS} como consecuencia de: las posibles interacciones (sinergismo o realce, aditividad, enmascaramiento, etc.) muy fuertes que pueden aparecer entre los componentes de una mezcla compleja (AE) en el *headspace* y la baja cantidad de componentes en el *headspace* debido a posibles interacciones soluto-matriz (dipolo-dipolo inducido, puente de hidrógeno, enlace hidrofóbico, etc...), lo cual repercutió significativamente sobre su volatilidad (disminución de su presión de vapor) y en la no liberación del componente en la fase gaseosa. La comprensión de las interacciones entre componentes de AE's es muy complejo debido al número de compuestos disponibles para participar en ellas.

5. La fluctuación de la temperatura de muestreo ($\pm 1^\circ\text{C}$) fue, probablemente, otro factor que incidió drásticamente en los valores de $K_{AE-PDMS}$. El control de la temperatura durante la determinación de $K_{PDMS-HS}$ sólo se pudo mantener $\pm 1^\circ\text{C}$ por defecto del montaje utilizado. Este gradiente fue significativo porque varió la masa del soluto atrapado por la fibra.

6. Se encontró y demostró el efecto de desplazamiento (disminución de cantidad retenida en la fibra) en el recubrimiento de PDMS al realizar experimentos de saturación del limoneno (previamente) en mezclas con el α -pineno, linalol y *trans*- β -cariofileno. La verificación de este fenómeno se llevó a cabo utilizando el recubrimiento de PDMS/DVB (el cual presenta una fase con un sólido poroso y donde el mecanismo de extracción-concentración es la adsorción). Los resultados obtenidos fueron muy similares para los dos recubrimientos empleados y se ha argüido que las causas de este efecto para PDMS se centran en las altas concentraciones de los compuestos, que superan el rango lineal de la fibra y la limitada capacidad de albergue de grandes cantidades de analito, del recubrimiento de PDMS, atribuible a su pequeño volumen (0.6 μL).

6. RECOMENDACIONES

Puesto que se encontraron diferencias marcadas en los K_{AE-HS} , $K_{PDMS-HS}$, $K_{AE-PDMS}$ calculados para las mezclas de los aceites esenciales y considerando que las alteraciones presentes en dichos valores están centradas, posiblemente en la determinación de K_{AE-HS} , se propone la utilización de un nuevo método basado en la combinación del muestreo *headspace* y trampas de *headspace* dinámico desarrollado por Chaintreau *et al.* [96]. El dispositivo (**Figura 46**) consta de una celda para muestreo formada por un tubo de vidrio de 5 cm x 15 cm (d); las piezas al final del fondo (e) y de la parte final del pistón (f) están hechas con sello de Teflón y Vitón. Un receptor de vidrio removible (g), que puede albergar hasta 2 mL de la solución ha equilibrar con el *headspace*, se inserta en (e).

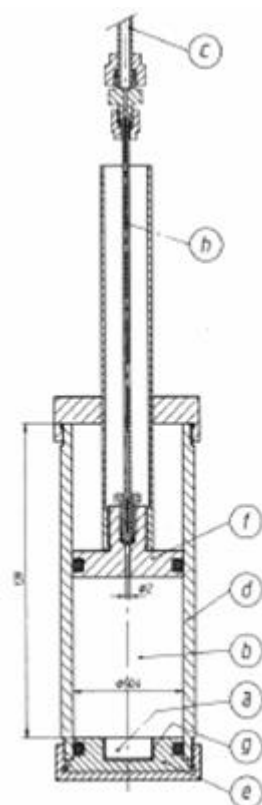


Figura 46. Celda *headspace*: combinación del muestreo S-HS y trampa D-HS [96].

Todas las piezas de vidrio de la jeringa modificada deben ser silanizadas para evitar cualquier efecto de adsorción sobre las paredes de vidrio. Los volátiles se equilibran entre la celda de la muestra (a) y la cámara *headspace* (b). Presionando el pistón se empuja el gas a través del tubo (h) hasta llegar al cartucho Tenax (c) donde los volátiles son atrapados. La trampa cargada se desorbe en una unidad de desorción térmica y se analiza por cromatografía de gases.

Chaintreau *et al.* encontraron las siguientes ventajas en la utilización de este dispositivo: la determinación de los coeficientes de partición no requiere calibración; la cuantificación se logra sin adición de patrón interno; el método es exacto, de acuerdo con la estimación de la varianza; la combinación de S-HS con trampas permite que componentes con baja concentración en fase vapor sean analizados y que pequeños cambios en el perfil del aroma, debido a constituyentes no volátiles, se puedan investigar. Además, reportaron que la cantidad de uno de los componentes de la mezcla del aroma no influyó el coeficiente de partición de los otros componentes presentes. Como consecuencia, el empleo de este método posibilita medir coeficientes de partición individual en una mezcla de aromas [96], siendo de gran utilidad en mezclas complejas como lo son los aceites esenciales.

Por causa de la fluctuación presentada de $\pm 1^{\circ}\text{C}$ en la temperatura de muestreo para HS-SPME, la cual influyó en la masa de soluto extraído por la fibra (reflejándose en la reproducibilidad), la precisión de los datos se puede mejorar en el futuro si se utiliza un termostato en vez de un baño de agua estático. Con el termostato se puede reducir la variación de la temperatura hasta $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. AUGUSTO, Fabio; LEITE E LOPES, Alexandre and ALCARAZ ZINI, Cláudia. Sampling and sample preparation for analysis of aromas and fragrances. En: *Trends Anal .Chem.* Vol. 22, No. 3 (2003); p. 160-169.
- [2]. GALLETI, Guido C and BONAGA Giorgio. Analytical methods in the study of essential oils. Extraction, separation and identification techniques. En: *Chim. Acta Turc.* 16 (1988); p. 291-304.
- [3]. SHIBAMOTO, Takayuki. Analysis of essential oils. p. 455-509.
- [4]. LUQUE DE CASTRO, M.D.; JIMÉNEZ-CARMONA, M.M. y FERNÁNDEZ PÉREZ, V. Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants. En: *Trends Anal. Chem.* Vol. 18, No. 11 (1999); p. 708-716.
- [5]. BELITZ, H.-D. and GROSCH W. Food chemistry. Second edition. Berlin: Springer – Verlag Berlin Heidelberg, 1999. 322 p.
- [6]. LEO, Albert; HANSCH, Corwin and ELKINS, David. Partition coefficients and their uses. En: *Chem. Rev.* Vol. 71, No. 6 (1971); p. 525-554.
- [7]. KEYMEULEN, Regine; PAREWIJCK, Bart; GÓRNA-BINKUL, Anna and VAN LANGENHOVE, Herman. Determination of partition coefficients of monocyclic aromatic hydrocarbons between leaf essential oil and air by headspace gas chromatography. En: *J. Chromatogr., A* 765 (1997); p. 247-253.
- [8]. NARDI, Luigi. Determination of siloxane-water partition coefficients by capillary extraction-high-resolution gas chromatography. Study of aromatic solvents. En: *J. Chromatogr., A* 985 (2003); p. 39-45.

- [9]. DEAN, John R.; TOMLINSON, William R.; MAKOVSKAYA, Valeriya; CUMMING, Robert; HETHERIDGE, Malcolm and COMBER, Michael. Solid-phase microextraction as a method for estimating the octanol-water partition coefficient. En: *Anal. Chem.* Vol. 68, No. 1 (january-1996); p. 130-133.
- [10]. LIN, Zhifen; SHI, Ping; GAO, Shixiang; WANG, Liansheng and YU, Hongxia. Use of partition coefficients to predict mixture toxicity. En: *Water Res.* 37 (2003); p. 2223-2227.
- [11]. RYU, Seon-Ah and PARK So-Jin. A rapid determination method of the air/water partition coefficient and its application. En: *Fluid Phase Equilib.* 161 (1999); p. 295-304.
- [12]. GUITART, Raimon; PUIGDEMONT, Anna and ARBOIX, Margarita. Rapid headspace gas chromatography method for the determination of liquid/gas partition coefficients. En: *J. Chromatogr., A.* 491 (1989); p. 271-280.
- [13]. ESSEX, Jonathan W.; REYNOLDS, Chistopher A. and RICHARDS, W. Graham. Theoretical determination of partition coefficients. En: *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992); p. 3634-3639.
- [14]. LI, Jianjun and CARR, Peter W. Measurement of water-hexadecane partition coefficients by headspace gas chromatography and calculation of limiting activity coefficients in water. En: *Anal. Chem.* Vol. 65, No. 10 (may-1993); p. 1443-1450.
- [15]. <http://www.epa.gov/radiation/docs/kdreport/vol1/chapter2.pdf>
- [16]. KOONCE, K. Terry and KOBAYASHI, Riki. Vapor-liquid equilibrium coefficients determined by gas-liquid partition chromatography. En: *J. Chem. Eng. Data.* Vol. 9, No. 4 (1964); p. 494-501.
- [17]. SUGIYAMA, Toshiaki; TAKEUCHI, Tsugio and SUZUKI, Yoshihito. Vapor-liquid equilibrium constants of alkylbenzenes in n-alkane solvents at infinite dilution by gas-liquid chromatography. En: *J. Chem. Eng. Data.* Vol. 22, No. 22 (1997); p. 153-156.
- [18]. TEWARI, Y.B.; MARTIRE, D.E. and SERIDAN, J.P. Gas-liquid partition chromatographic determination and theoretical interpretation of activity coefficients for hydrocarbons solutes in alkane solvents. En: *J. Phys. Chem.* Vol. 74, No. 11 (1970); p. 2345-2356.

- [19]. MATISOVÁ, Eva; MEDVED'OVÁ, Monika; VRANIAKOVÁ, Janka and SIMON, Peter. Optimisation of solid-phase microextraction of volatiles. En: *J. Chromatogr., A.* 960 (2002); p. 159-164.
- [20]. MARTOS, Perry A.; SARAULLO, Angela and PAWLISZYN, Janusz. Estimation of air/coating distribution coefficients for solid phase microextraction using retention indexes from linear temperature-programmed capillary gas chromatography. Application to the sampling and analysis of total petroleum hydrocarbons in air. En: *Anal. Chem.* Vol. 69, No. 3 (february-1997); p. 402-408.
- [21]. HOLT, R.U. Mechanisms effecting analysis of volatile flavour components by solid-phase microextraction and gas chromatography. En: *J. Chromatogr., A.* 937 (2001); p. 107-114.
- [22]. PROSEN, Helena and ZUPANCIC-KRALJ, Lucija. Solid-phase microextraction. En: *Trends Anal. Chem.* Vol. 18, No. 4 (1999); p. 272-281.
- [23]. DEWULF, Jo; VAN LANGENHOVE and EVERAERT, Philip. Determination of Henry's law coefficients by combination of the equilibrium partitioning in closed systems and solid-phase microextraction techniques. En: *J. Chromatogr., A.* 830 (1999); p. 353-363.
- [24]. LIU, Z. and WENE, M.J. Measurement of gas-liquid partition coefficient and headspace concentration profiles of perfume materials by solid-phase microextraction and capillary gas chromatography-mass spectrometry. En: *J. Chromatogr. Sci.* Vol. 38, (september-2000); p. 377-382.
- [25]. ZHANG, Zhouyao and PAWLISZYN, Janusz. Headspace solid-phase microextraction. En: *Anal. Chem.* Vol. 65, No. 14 (july-1993); p. 1843-1852.
- [26]. BOHNENSTENGEL, Frank; SOLTANI, Nasrollah and BALTES, Werner. Headspace analysis with large sample volumes. Influence of sampling device volume, analyte concentration and sample matrix. En: *J. Chromatogr., A.* 655 (1993); p. 249-255.
- [27]. BALTUSEN, Erik; DAVID, Frank; SANDRA, Pat; JANSSEN; Hans-Gerd and CRAMERS, Carel. Equilibrium sorptive enrichment on poly(dimethylsiloxane) particles for trace analysis of volatile compounds in gaseous samples. En: *Anal. Chem.* Vol. 71, No. 22 (november-1999); p. 5193-5198.

- [28]. BALTUSEN, Erik; SANDRA, Pat; DAVID, Frank; JANSSEN; Hans-Gerd and CRAMERS, Carel. Study into the equilibrium mechanism between water and poly(dimethylsiloxane) for very apolar solutes: adsorption or sorption?. En: *Anal. Chem.* Vol. 71, No. 22 (november-1999); p. 5213-5219.
- [29]. KAUFMAN, RD. Biophysical mechanisms of anesthetic action: historical perspective and review of current concepts. En: *Anesthesiology*. Vol. 46, No. 1 (1977); p. 49-62.
- [30]. http://hdelboy.club.fr/chimie_anciens.html
- [31]. http://www-biol.paisley.ac.uk/marco/Enzyme_Electrode/Chapter2/Nernst.htm
- [32]. <http://histoirechimie.free.fr/Lien/BERTHELOT.htm>
- [33]. JENNINGS, Walter. Analytical gas chromatography. San Diego: Academic Press, Inc. 1987. p. 7-9.
- [34] ROBARDS, K.; HADDAD, P.R. and JACKSON, P.E. Principles and practice of modern chromatographic methods. San Diego: Academic Press, Inc. 1994. p. 9, 36-40.
- [35]. BRUNER, Fabrizio. Gas chromatographic environmental analysis – Principles, techniques, instrumentation. New York: VCH Publishers, Inc. 1993. p. 7, 11.
- [36]. McNAIR, Harold M. and MILLER, James M. Basic gas chromatography. New York: John Wiley & Sons, Inc. 1998. 200 p.
- [37]. ETTRE, Leslie S. and HINSHAW, John V. Basic relationships of gas chromatography. Cleveland: ADVANSTAR Communications, Inc. 1993. p.5-34.
- [38] RÖDEL, Wolfgang and WÖLM, Gerhard. A guide to gas chromatography. Berlín: VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften. 1987. p. 15-17.
- [39]. ETTRE, Leslie S. and HINSHAW, John V. Introduction to open-tubular column gas chromatography. Cleveland: ADVANSTAR Communications, Inc. 1994. p.25-32.

- [40]. POOLE, Colin F. and POOLE, Salwa K. Chromatography today. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, B.V. 1991. p. 4-8.
- [41]. FREEMAN, Robert. R. High resolution gas chromatography. Palo Alto: Hewlett-Packard Co. 1981. p. 7-9.
- [42]. GROB, Robert. L. Modern practice of gas chromatography. Second edition. New York: John Wiley and Sons, Inc. 1985. 896 p.
- [43]. STASHENKO, Elena E.; COMBARIZA, Yajaira y PUERTAS, Miguel A. Aceites esenciales: Técnicas de extracción y análisis. Bucaramanga: Ediciones UIS. 1998. p. 1
- [44]. MEKEM SOMWA, Mesmin. Isolation and structure elucidation of essential oil constituents. Comparative study of the oils of *Cyperus alopecuroides*, *Cyperus papyrus* and *Cyperus rotundus*. Hamburg, 2000, 158 p. Dissertation for the fulfillment of the requirements for the degree of Dr. rer. nat. University of Hamburg. Faculty of Chemistry.
- [45]. MUÑOZ, Fernando. Plantas medicinales y aromáticas. Estudio, cultivo y procesado. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa. 1987. p. 17.
- [46]. PRIYA, Thaunoo and BAHORUN, T. Terpenes and their derivatives. University of Mauritius [Online]. Jan. 2003. Available from internet: <http://vcampus.uom.ac.mu/upload/public/2003122103128.pdf>
- [47]. NEWMAN, A.A. Chemistry of terpenes and terpenoids. London: Academic Press Inc. 1972. p. 17
- [48]. BOWMAN, Jeremy M. *et al.* Extraction method for the isolation of terpenes from plant tissue and subsequent determination by gas chromatography. En: *Microchem. J.* Article No. MJ961422, 56 (1997); p. 10-18.
- [49]. HARBORNER, Jeffrey B. and BAXTER, Herbert. Phytochemical dictionary. A handbook of bioactive compounds from plants. London: Taylor & Francis Ltd. 1993. p. 552-568, 579-598

- [50]. NUÑEZ SELLES, Alberto J. Aislamiento y concentración de trazas orgánicas volátiles en cromatografía gaseosa capilar. La Habana: Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CENIC). 1986. 112 p.
- [51]. <http://perso.wanadoo.fr/james.lumpkins/distillation.htm>
- [52]. BALASUNDARAM, R. and MEDA, Venkatesh. Utilization of microwaves in applied natural product chemistry. En: CSAE/ASAE Annual Intersectional Meeting Sponsored by the Red River Section of ASAE Quality Inn & Suites (2003 : Saskatoon). Saskatoon: ASAE, 2003. p. 1-6.
- [53] SANDRA, Pat. and BICCHI, Carlo. Capillary gas chromatography in essential oil analysis. Achern: Typoservice GmbH. 1987. p. 13-27, 85-154.
- [54]. GODEFROOT, M; SANDRA, P and VERZELE M. New method for quantitative essential oils analysis. En: *J. Chromatogr., A.* 203 (1981); p. 325-335.
- [55]. BOUCHILLOX, Patricia *et al.* Identification of volatile and powerful odorous thiols in Bordeaux red wine varieties. En: *J. Agric. Food Chem.* Vol. 46, No. 8 (1998); p. 3095-3099.
- [56]. HANDLEY, Alan J. Extraction methods in organic analysis. Sheffield: Sheffield Academic Press Ltd. 1999. 308 p.
- [57]. IOFFE, B.V. and VITENBERG, A.G. Headspace analysis and related methods in gas chromatography. New York: Ed. John Wiley. 1984. 263 p.
- [58]. McNALLY, M.E. and GROB, R.L. A review: current applications of static and dynamic headspace analysis: part one: environmental application. En: *American Lab.* 1985 (january); p. 20-33.
- [59]. SCHREIER, Peter. Analysis of volatiles: Method and applications. Proceedings International Workshop Würzburg, Federal Republic of Germany - September 28-30,1983. Berlin: Walter de Gruyter & Co. 1984. 467 p.
- [60]. MARSILI, Ray. Techniques for analyzing food aroma. New York: Marcel Dekker, Inc. 1997. 383 p.

- [61]. ESKILSON, Cecilia Sparr and BJÖRKLUND, Erland. Review: Analytical-scale microwave-assisted extraction. En: *J. Chromatogr., A.* 902 (2000); p. 227-250.
- [62]. KINGSTON, H.M. and JASSIE, L.B. Introduction to microwave sample preparation. Theory and practice. ACS Professional Reference Book. American Chemical Society. 1988. 263 p.
- [63]. JEAN, F.I.; COLLIN, G.J. and LORD, D. Essential oils and microwave extracts of cultivated plants. En: *Perfumer & Flavorist*. Vol. 17, may/june (1992); p. 35-41.
- [64]. ZHANG, Z.; YANG, M. and PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction. A new solvent-free alternative for sample preparation. En: *Anal. Chem.* Vol. 66, No. 17 (1994); p. 844A-854A.
- [65]. ZHANG, Zhouyao and PAWLISZYN, Janusz. Analysis of organic compounds in environmental samples by headspace solid phase microextraction. En: *J. High Res. Chrom.* Vol. 16, (december-1999); p. 689-624.
- [66]. LORD, Heather and PAWLISZYN, Janusz. Microextraction of drugs - Review. En: *J. Chromatogr., A.* 902 (2000); p. 17-63.
- [67]. PAWLISZYN, Janusz. Applications of solid phase microextraction. Cornwall: RSC Chromatography Monographs. 1999. 653 p.
- [68]. PAWLISZYN, Janusz. Solid phase microextraction: theory and practice. New York: John Wiley and Son's, Inc. 1997. 241 p.
- [69]. LORD, Heather and PAWLISZYN, Janusz. Evolution of solid-phase microextraction technology. En: *J. Chromatogr., A.* 885 (2000); p. 153-193.
- [70]. STEFFEN, Alexandra and PAWLISZYN, Janusz. Analysis of flavor volatiles using headspace solid-phase microextraction. En: *J. Agric. Food Chem.* Vol. 44, No. 8 (1996); p. 2187-2193.
- [71]. JIU, Ai. Headspace solid phase microextraction. Dynamics and quantitative analysis before reaching a partition equilibrium. En: *Anal. Chem.* Vol. 69, No. 16 (august-1997); p. 3260-3266.

- [72]. BARTELT, Robert J. Calibration of a commercial solid-phase microextraction device for measuring headspace concentrations of organic volatiles. En: *Anal. Chem.* Vol. 69, No. 3 (february-1997); p 364-372.
- [73]. BARTELT, Robert J. and ZILKOWSKI Bruce W. Nonequilibrium quantitation of volatiles in air streams by solid-phase microextraction. En: *Anal. Chem.* Vol. 71, No. 1 (january-1999); p. 92-101.
- [74]. GÓRECKI, Tadeusz; YU, Xiaomei and PAWLISZYN, Janusz. Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME. En: *Analist.* 124 (1999); p. 643-649.
- [75]. FORGÁCS, Esther and CSERHÁTI, Tibor. Molecular basis of chromatographic separation. Boca Raton: CRC Press. 1997. p. 3-13.
- [76]. MASEL, Richard I. Principles of adsorption and reaction on solid surfaces. New York: John Wiley & Sons. Inc. 1996. 824 p.
- [77]. GUERASIMOV, Ya; DREVIN, V.; ERIOMIN, E.; KISELIOV, A.; LEBEDEV, V.; PANCHENKOV, G. and SHLIGUIN, A. Curso de química física. Tomo I. Cuarta edición. Moscú: Editorial Mir. 1986. p. 441-551.
- [78]. SETTLE, Frank A. Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry. New Jersey: Prentice Hall, Inc. 1997. 994 p.
- [79]. WILLET, John. Gas chromatography - Analytical chemistry by open learning. Ed. David Kealey. London: Published on behalf of ACOL by John Wiley & Sons. 1987. 253 p.
- [80]. SCOTT, Raymond Peter William. Chromatographic detectors: Design, function, and operation. New York: Marcel Dekker, Inc. 1996. 514 p.
- [81]. JOHNSTONE, Robert A. W. and ROSE, Malcolm E. Mass spectrometry for chemists and biochemists. Second edition. Cambridge: Cambridge University Press. 1996. p. 144-158.
- [82]. KOLB, B.; WELTER, C. and BICHLER, C. Determination of partition coefficients by automatic equilibrium headspace gas chromatography by vapor phase calibration. En: *Chromatographia.* Vol. 30, No. 6 (1982); p. 1009-1017.

- [83]. MARSILI, Ray. Flavor, fragrance, and odor analysis. New York: Marcel Dekker, Inc. 2002. p. 26-29.
- [84]. BICCHI, Carlo; DRIGO, Stefania and RUBIOLO, Patrizia. Influence of fibre coating in headspace solid-phase microextraction-gas chromatographic analysis of aromatic and medicinal plants. En: *J. Chromatogr., A*. 892 (2000); p. 469-485.
- [85]. BICCHI, Carlo; CORDERO, Chiara and RUBIOLO, Patrizia. A survey on high-concentration-capability headspace sampling techniques in the analysis of flavors and fragrances. En: *J. Chromatogr. Sci.* Vol. 42, (september-2004); p. 402-409.
- [86]. COMBARIZA, Marianny Yajaira y BLANCO TIRADO, Cristian. Estudio comparativo de los aceites esenciales de hojas y frutos cítricos colombianos. Bucaramanga, 1995, 156 p. Trabajo de grado (Químicos). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química.
- [87]. QUIROZ PRADA, Nubia. Obtención y análisis de los metabolitos secundarios volátiles de ylang-ylang (*Cananga odorata*, Hook fill et Thomson, forma genuina). Bucaramanga, 1995, 165 p. Trabajo de grado (Química). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química.
- [88]. TORRES D. William. Variación composicional del aceite esencial de ilang-ilang, con la maduración de la flor y el pH de extracción. Bucaramanga, 1999, 100 p. Trabajo de grado (Químico). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química.
- [89]. ADAMS, Robert P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Illinois: Allured Publishing Corporation. 1995. 469 p.
- [90]. BLANCO TIRADO, C; STASHENKO, E.E.; COMBARIZA, M.Y. and MARTÍNEZ, J.R. Comparative study of colombian citrus oils by high resolution gas chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. En: *J. Chromatogr., A*. 697 (1995); p. 501-513.
- [91]. GAYDOU, Emile M.; RANDRIAMIHARISOA, Robert and BIANCHINE, Jean-Pierre. Composition of the essential oil of ylang-ylang (*Cananga odorata* Hook Fil. et Thomson *forma genuina*) from Madagascar. En: *J. Agric. Food Chem.* Vol. 34, No. 3 (1986); p. 481-487.

- [92]. STASHENKO, Elena; MARTÍNEZ, Jairo René; MACKU, Carlos and SHIBAMOTO, Takayuki. HRGC and GC-MS analysis of essential oil from colombian ylang-ylang (*Cananga odorata* Hook Fil. et Thomson *forma genuine*). En: *J. High Res. Chrom.* Vol. 16, (july-1993); p. 441-444.
- [93]. MILLER, M. E. and STUART, J. D. Comparison of gas-sampled and SPME-sampled static headspace for the determination of volatile flavor components. En: *Anal. Chem.* Vol. 71, No. 1 (january-1999); p. 23-27.
- [94]. ROCHA, Silvia; RAMALHEIRA, Victor; BARROS, António; DELGADILLO, Ivonne and COIMBRA, Manuel A. Headspace solid phase microextraction (SPME) analysis of flavor compounds in wines. Effect of the matrix volatile composition in the relative response factors in a wine model. En: *J. Agric. Food Chem.* Vol. 49, No. 11 (2001); p. 5142-5151.
- [95]. CAZES, Jack. Chromatography theory. New York: Marcel Dekker Incorporated. 2002. p. 47-85
- [96] CHAINTREAU, Alain; GRADE Andrea and MUÑOZ-BOX, Rafael. Determination of partition coefficients and quantitation of headspace volatile compounds. En: *Anal. Chem.* Vol. 67, No.18 (september-1995); p. 3300-3304.
- [97]. NAHON, Denise F.; HARRISON, Marcus and ROOZEN, Jacques P. Modeling flavor release from aqueous sucrose solutions, using mass transfer and partition coefficients. En: *J. Agric. Food Chem.* Vol. 48, No. 4 (2000); p. 1278-1284.
- [98]. KLAHORST, Suanne J. Getting a reaction. Weeks Publishing Co. [Online]. August, 1997. Available from internet: <http://www.foodproductdesign.com/archive/1997/0897CS.html>
- [99]. FRANZEN, Kay L and KINSELLA, John E. Parameters affecting the binding of volatile flavor compounds in model food systems. I. Proteins. En: *J. Agric. Food Chem.* Vol. 22, No. 4 (1974); p. 675-678.
- [100]. JELEN, Henryk H.; WLAZLY, Krystian; WASOWICZ, Erwin and KAMINSKI, Edward. Solid-phase microextraction for the analysis of some alcohols and ester in beer: comparison static headspace method. En: *J. Agric. Food Chem.* Vol. 46, No. 4 (1998); p. 1469-1473.

- [101]. VAN RUTH, Saskia M. and VILLENUEVE, Elise. Influence of β -lactoglobulin, pH and presence of other aroma compounds on the air/liquid partition coefficients of 20 aroma compounds varying in functional group and chain length. En: *Food Chem.* 79 (2002); p. 157-164.
- [102]. MEILGAARD, Morten C. Prediction of flavor differences between beers from their chemical composition. En: *J. Agric. Food Chem.* Vol. 46, No. 4 (1982); p. 1469-1473.
- [103]. NAWAR, Wassef W. Some variables affecting composition of headspace aroma. En: *J. Agric. Food Chem.* Vol. 19, No. 6 (1971); p. 1057-1059.
- [104]. PHILIPPE, Ellen; SEUVRE, Anne-Marie; COLAS, Bernard; LANGENDORFF, Virginie; SCHIPPA, Christine and VOILLEY, Andrée. Behavior of flavor compounds in model food systems: a thermodynamic study. En: *J. Agric. Food Chem.* Vol. 51, No. 5 (2003); p. 1393-1398.
- [105]. SCHOBER, Amanda L. And PETERSON, Devin G. Flavor release and perception in hard candy: influence of flavor compounds – compounds interactions. En: *J. Agric. Food Chem.* Vol. 52, No. 9 (2004); p. 2623-2627.
- [106]. YANG, Xiaogen and PEPPARD, Terry. Solid-phase microextraction for flavor analysis. En: *J. Agric. Food Chem.* Vol. 42, No. 9 (1994); p. 1925-1930.
- [107]. ZHANG, Zhoudiao and PAWLISZYN, Janusz. Studying activity coefficients of probe solutes in selected liquid polymer coatings using solid phase microextraction. En: *J. Phys. Chem.* Vol. 100, No. 44 (1996); p. 17648-17654.
- [108]. CONDER, J.R. and YOUNG, C.L. Physicochemical measurement by gas chromatography. New York: John Wiley & Sons Ltd. 1979. 632 p.
- [109]. GÓRECKI, Tadeusz; MARTOS, Perry and PAWLISZYN, Janusz. Strategies for the analysis of polar solvents in liquid matrixes. En: *Anal. Chem.* Vol. 70, No. 1 (january-1998); p. 19-27.

[110]. ROBERTS, D.D.; POLLIEN, P. and MILO, C. Solid-phase microextraction method development for headspace analysis of volatile flavor compounds. En: *J. Agric. Food Chem.* Vol. 48, No. 6 (2000); p. 2430-2437.

ANEXO 1

Datos obtenidos para la determinación de las mejores condiciones de extracción (tiempo y temperatura) para los dos recubrimientos de PDMS-100 μ m y PDMS/DVB-65 μ m

DATOS OBTENIDOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE EXTRACCIÓN, DE LOS 10 TERPENOS, POR EL RECUBRIMIENTO DE PDM S-100 μ m

Tabla 1A. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS-100 μ m, durante 5 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a temperatura ambiente (22°C).

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV, %
		Medición 1	Medición 2			
11.11	α -Pino	6433	5976	6000	323	5
13.94	α -Terpino	3428	2919	3200	360	11
14.37	Limoneno	4907	4637	4800	191	4
14.44	Eucaliptol	1088	858	1000	163	17
16.57	Linalol	89	97	90	6	6
18.98	Terpino-4-ol	104	113	110	7	6
20.78	Neral	8	10	10	1	11
20.90	Geraniol	50	20	40	21	61
21.11	Geraniol	11	13	10	1	9
25.66	<i>trans</i> - β -Cariofileno	822	725	780	69	9

Tabla 1B. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS-100 μ m, durante 10 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a temperatura ambiente (22°C).

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV, %
		Medición 1	Medición 2			
11.12	α -Pino	6743	6394	6600	247	4
13.95	α -Terpino	3727	3506	3600	157	4
14.39	Limoneno	5848	5710	5780	97	2
14.46	Eucaliptol	1378	1336	1360	30	2
16.58	Linalol	273	278	280	3	1
18.98	Terpino-4-ol	330	337	330	5	2
20.78	Neral	25	30	30	4	14
20.90	Geraniol	9	8	8.5	0.7	6
21.11	Geraniol	64	48	60	12	21
25.67	<i>trans</i> - β -Cariofileno	2119	2243	2180	88	4

Tabla 1C. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS-100 μ m, durante 20 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a temperatura ambiente (22°C).

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV, %
		Medición 1	Medición 2			
11.12	α -Pino	6954	6864	6910	64	0.9
13.95	α -Terpino	4053	4019	4040	24	0.6
14.39	Limoneno	6521	6905	6700	271	4
14.45	Eucaliptol	1328	1519	1400	135	10
16.58	Linalol	295	388	340	65	19
18.99	Terpino-4-ol	381	488	440	76	18
20.78	Neral	28	45	40	11	31
20.90	Geraniol	12	14	10	1	11
21.11	Geraniol	75	93	80	13	15
25.69	<i>trans</i> - β -Cariofileno	3179	3483	3300	215	6

Tabla 1D. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS-100 μm , durante 30 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a temperatura ambiente (22°C).

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV,%
		Medición 1	Medición 2			
11.12	α -Pino	7540	7008	7300	376	5
13.96	α -Terpino	4905	3942	4400	681	15
14.40	Limoneno	7509	6798	7200	503	7
14.46	Eucaliptol	1810	1449	1600	255	16
16.59	Linalol	517	301	400	153	37
19.00	Terpino-4-ol	635	386	500	176	34
20.78	Neral	44	36	40	6	16
20.90	Geraniol	49	23	40	19	52
21.12	Geraniol	96	93	100	2	2
25.71	<i>trans</i> - β -Cariofileno	4359	3770	4100	416	10

Tabla 1E. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS-100 μm , durante 40 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a temperatura ambiente (22°C).

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV,%
		Medición 1	Medición 2			
11.12	α -Pino	7358	7030	7200	231	3
13.96	α -Terpino	4766	4217	4500	388	9
14.40	Limoneno	74145	6897	7200	365	5
14.46	Eucaliptol	1686	1457	1600	162	10
16.58	Linalol	433	398	420	25	6
18.99	Terpino-4-ol	516	512	510	3	0.6
20.78	Neral	31	39	40	5	15
20.90	Geraniol	15	15	15.0	0.4	2
21.11	Geraniol	143	136	140	5	4
25.69	<i>trans</i> - β -Cariofileno	3034	4703	4000	1180	30

Tabla 1F. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS-100 μm , durante 60 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a temperatura ambiente (22°C).

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV,%
		Medición 1	Medición 2			
11.11	α -Pino	7748	7118	7400	446	6
13.95	α -Terpino	4806	4312	4600	349	8
14.39	Limoneno	7452	7122	7300	233	3
14.45	Eucaliptol	1453	1605	1500	108	7
16.58	Linalol	478	485	480	5	1
18.99	Terpino-4-ol	613	619	620	4	0.6
20.78	Neral	41	49	50	6	12
20.89	Geraniol	22	20	20	1	6
21.11	Geraniol	128	160	140	23	16
25.71	<i>trans</i> - β -Cariofileno	4100	5734	5000	1155	23

Tabla 1G. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS-100 μm , durante 90 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a temperatura ambiente (22°C).

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV,%
		Medición 1	Medición 2			
11.11	α -Pino	7433	7269	7400	116	2
13.95	α -Terpineno	4659	3639	4200	722	17
14.39	Limoneno	7290	7152	7220	97	1
14.45	Eucaliptol	1564	1313	1400	178	12
16.58	Linalol	491	493	490	2	0.3
18.99	Terpinen-4-ol	626	650	640	17	3
20.78	Neral	43	59	50	11	22
20.90	Geraniol	21	34	30	9	32
21.12	Geranial	252	205	230	33	14
25.72	<i>trans</i> - β -Cariofileno	5572	6913	6200	948	15

Tabla 2A. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS-100 μm , durante 5 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a 40°C.

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV,%
		Medición 1	Medición 2			
11.11	α -Pino	6062	5850	6000	150	2
13.94	α -Terpineno	3267	3360	3300	66	2
14.37	Limoneno	6553	7158	6900	428	6
14.44	Eucaliptol	2089	2603	2300	363	16
16.57	Linalol	1750	1878	1800	90	5
18.98	Terpinen-4-ol	1982	2116	2100	95	5
20.78	Neral	141	165	150	17	11
20.90	Geraniol	164	191	180	19	11
21.11	Geranial	336	336	336.25	0.01	0.002
25.66	<i>trans</i> - β -Cariofileno	4600	5439	5000	593	12

Tabla 2B. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS-100 μm , durante 10 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a 40°C.

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV,%
		Medición 1	Medición 2			
11.12	α -Pino	6356	5995	6200	255	4
13.95	α -Terpineno	3576	3320	3500	181	5
14.39	Limoneno	7388	6984	7200	286	4
14.46	Eucaliptol	2344	2379	2400	25	1
16.58	Linalol	2575	2013	2300	397	17
18.98	Terpinen-4-ol	2970	2402	2700	402	15
20.78	Neral	232	204	220	20	9
20.90	Geraniol	2608	223	240	26	10
21.11	Geranial	599	512	560	62	11
25.67	<i>trans</i> - β -Cariofileno	7745	7681	7700	45	0.6

Tabla 2C. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS-100 μm , durante 20 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a 40°C.

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV, %
		Medición 1	Medición 2			
11.12	α -Pino	7824	6832	7300	701	10
13.95	α -Terpino	4653	3368	4000	909	23
14.39	Limoneno	9927	7627	9000	1627	18
14.45	Eucaliptol	2910	2672	2800	168	6
16.58	Linalol	2090	1926	2000	116	6
18.99	Terpino-4-ol	2530	2228	2400	213	9
20.78	Neral	205	198	200	5	2
20.90	Geraniol	275	294	280	14	5
21.11	Geraniol	587	368	500	154	32
25.69	<i>trans</i> - β -Cariofileno	10100	9878	10000	157	2

Tabla 2D. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS-100 μm , durante 30 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a 40°C.

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV, %
		Medición 1	Medición 2			
11.12	α -Pino	6944	8017	7500	759	10
13.96	α -Terpino	4534	4155	4300	268	6
14.40	Limoneno	10147	10171	10160	17	0.2
14.46	Eucaliptol	3335	3291	3300	31	0.9
16.59	Linalol	2676	2590	2600	60	2
19.00	Terpino-4-ol	3194	3035	3100	112	4
20.78	Neral	273	282	280	6	2
20.90	Geraniol	382	406	400	17	4
21.12	Geraniol	807	567	700	170	25
25.71	<i>trans</i> - β -Cariofileno	12914	13020	12970	76	0.6

Tabla 2E. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS-100 μm , durante 40 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a 40°C.

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV, %
		Medición 1	Medición 2			
11.12	α -Pino	7845	7748	7800	69	0.9
13.96	α -Terpino	4811	4743	4780	48	1
14.40	Limoneno	10482	10638	10600	110	1
14.46	Eucaliptol	3244	3945	3600	496	14
16.58	Linalol	2732	3096	3000	257	9
18.99	Terpino-4-ol	3220	3436	3400	153	5
20.78	Neral	280	298	290	13	4
20.90	Geraniol	342	396	370	38	10
21.11	Geraniol	848	755	800	66	8
25.69	<i>trans</i> - β -Cariofileno	13001	11471	1200	1082	9

Tabla 2F. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS-100 μm , durante 60 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a 40°C.

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV,%
		Medición 1	Medición 2			
11.11	α -Pino	8709	8732	8720	16	0.2
13.95	α -Terpino	4236	4400	4300	116	3
14.39	Limoneno	12929	13367	13200	310	2
14.45	Eucaliptol	3320	3619	3500	211	6
16.58	Linalol	3234	2102	2700	800	30
18.99	Terpino-4-ol	1541	2360	2000	579	30
20.78	Neral	158	224	200	47	24
20.89	Geraniol	354	371	400	12	3
21.11	Geraniol	250	299	300	34	12
25.70	<i>trans</i> - β -Cariofileno	15701	14157	15000	1092	7

Tabla 2G. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS-100 μm , durante 90 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a 40°C.

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV,%
		Medición 1	Medición 2			
11.11	α -Pino	8523	8746	9000	157	2
13.95	α -Terpino	6631	7128	7000	352	5
14.39	Limoneno	15845	11287	14000	3223	24
14.45	Eucaliptol	4312	5463	5000	814	17
16.58	Linalol	1904	1552	2000	2495	14
18.99	Terpino-4-ol	2102	1818	2000	201	10
20.78	Neral	199	166	200	24	13
20.90	Geraniol	411	420	420	6	2
21.12	Geraniol	320	197	260	87	34
25.72	<i>trans</i> - β -Cariofileno	15607	16028	16000	298	2

Tabla 3A. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS-100 μm , durante 5 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a 60°C.

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV,%
		Medición 1	Medición 2			
11.11	α -Pino	6547	6318	6400	162	2
13.94	α -Terpino	3319	3749	3500	304	9
14.37	Limoneno	8739	7914	8300	583	7
14.44	Eucaliptol	3374	3010	3200	258	8
16.57	Linalol	3288	2889	3100	282	9
18.98	Terpino-4-ol	3697	3203	3500	350	10
20.78	Neral	278	293	290	11	4
20.90	Geraniol	289	306	300	12	4
21.11	Geraniol	698	695	700	3	0.4
25.66	<i>trans</i> - β -Cariofileno	9157	9684	9400	373	4

Tabla 3B. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS-100 μm , durante 10 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a 60°C.

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV, %
		Medición 1	Medición 2			
11.12	α -Pino	7602	7311	7500	206	3
13.95	α -Terpino	3800	3607	3700	136	4
14.39	Limoneno	11193	11283	11240	63	0.6
14.46	Eucaliptol	3779	4039	4000	184	5
16.58	Linalol	4263	4054	4200	148	4
18.99	Terpino-4-ol	4704	4576	4600	90	2
20.78	Neral	405	388	400	12	3
20.90	Geraniol	422	403	410	14	3
21.11	Geraniol	951	1002	1000	36	4
25.67	<i>trans</i> - β -Cariofileno	12269	13531	13000	892	7

Tabla 3C. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS-100 μm , durante 20 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a 60°C.

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV, %
		Medición 1	Medición 2			
11.12	α -Pino	8639	8691	8670	36	0.4
13.95	α -Terpino	4125	4769	4500	456	10
14.39	Limoneno	15161	19921	18000	3366	19
14.45	Eucaliptol	3954	4012	4000	41	1
16.58	Linalol	2178	1932	2100	175	8
18.99	Terpino-4-ol	2295	2192	2250	73	3
20.78	Neral	192	296	240	74	30
20.90	Geraniol	248	277	300	20	8
21.11	Geraniol	290	292	290	1	0.4
25.69	<i>trans</i> - β -Cariofileno	16783	12851	15000	2780	19

Tabla 3D. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS-100 μm , durante 30 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a 60°C.

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV, %
		Medición 1	Medición 2			
11.12	α -Pino	7518	7892	7800	264	3
13.96	α -Terpino	4467	4756	5000	205	4
14.40	Limoneno	14114	16683	16000	1817	12
14.46	Eucaliptol	3244	3821	3600	408	12
16.59	Linalol	1023	1639	1300	436	33
19.00	Terpino-4-ol	1147	1851	1500	498	33
20.78	Neral	126	276	200	107	53
20.90	Geraniol	186	237	210	36	17
21.12	Geraniol	115	235	180	85	48
25.71	<i>trans</i> - β -Cariofileno	12522	15511	14000	2113	15

Tabla 3E. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS-100 μm , durante 40 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a 60°C.

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV, %
		Medición 1	Medición 2			
11.12	α -Pino	9139	9884	10000	527	6
13.96	α -Terpino	9293	8016	9000	903	10
14.40	Limoneno	37327	39581	40000	1593	4
14.46	Eucaliptol	6091	9043	8000	2088	28
16.58	Linalol	5843	12090	9000	4418	49
18.99	Terpino-4-ol	5399	12754	9000	5201	57
20.78	Neral	504	263	400	170	44
20.90	Geraniol	302	262	300	29	10
21.11	Geraniol	762	248	500	364	72
25.69	<i>trans</i> - β -Cariofileno	8870	13465	11000	3249	29

Tabla 3F. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS-100 μm , durante 60 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a 60°C.

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV, %
		Medición 1	Medición 2			
11.11	α -Pino	9158	8379	9000	551	6
13.95	α -Terpino	5740	6579	6200	593	10
14.39	Limoneno	19039	32147	26000	9268	36
14.45	Eucaliptol	10312	7497	9000	1991	22
16.58	Linalol	36495	10662	23000	18267	78
18.99	Terpino-4-ol	34928	11153	23000	16811	73
20.78	Neral	4210	1420	3000	1973	70
20.89	Geraniol	7991	2455	5200	3914	75
21.11	Geraniol	6217	2228	4200	2821	67
25.70	<i>trans</i> - β -Cariofileno	40072	22583	31000	12366	40

Tabla 3G. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS-100 μm , durante 90 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a 60°C.

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV, %
		Medición 1	Medición 2			
11.11	α -Pino	10241	11242	11000	708	7
13.95	α -Terpino	8791	9462	9100	475	5
14.39	Limoneno	47457	52604	50000	3639	7
14.45	Eucaliptol	9872	8490	9200	977	11
16.58	Linalol	11699	11384	11600	223	2
18.99	Terpino-4-ol	12651	11368	12000	907	8
20.78	Neral	1604	1261	1400	242	17
20.90	Geraniol	9612	23538	20000	9847	59
21.11	Geraniol	3083	1960	2500	794	32
25.72	<i>trans</i> - β -Cariofileno	21532	24496	23000	2096	9

Tabla 4. Selección de la temperatura máxima de absorción de los 10 terpenoides, durante 30 minutos de exposición de la fibra de PDMS-100 μm al *headspace* (los datos tabulados son el promedio de dos réplicas).

t_R , min	Compuesto	Temperaturas de muestreo, °C		
		22	40	60
11.12	α -Pino	7300	7500	7800
13.96	α -Terpino	4400	4300	5000
14.40	Limoneno	7200	10160	16000
14.46	Eucalipto	1600	3300	3600
16.58	Linalol	400	2600	1300
18.99	Terpino-4-ol	500	3100	1500
20.78	Neral	40	280	200
20.90	Geraniol	40	400	210
21.11	Geranial	100	700	180
25.69	<i>trans</i> - β -Cariofileno	4100	12970	14000

DATOS OBTENIDOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE EXTRACCIÓN, DE LOS 10 TERPENOS, POR EL RECUBRIMIENTO DE PDMS/DVB-65µm

Tabla 5A. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS/DVB-65 µm, durante 5 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a temperatura ambiente (22°C).

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV, %
		Medición 1	Medición 2			
10.92	α -Pino	4394	4439	1400	11	0.8
13.74	α -Terpino	1382	1398	4830	6	0.1
14.20	Limoneno	4824	4833	1340	41	3
14.26	Eucaliptol	1311	1368	60	10	17
16.42	Linalol	64	50	70	11	16
18.82	Terpino-4-ol	74	59	9	1	8
20.61	Neral	10	9	40	6	17
20.74	Geraniol	41	33	10	3	31
20.95	Geraniol	12	7	610	18	3
25.50	<i>trans</i> - β -Cariofileno	627	602	1400	11	0.8

Tabla 5B. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS/DVB-65 µm, durante 10 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a temperatura ambiente (22°C).

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV, %
		Medición 1	Medición 2			
10.92	α -Pino	4526	4605	4570	56	1
13.74	α -Terpino	1540	1405	1500	96	6
14.20	Limoneno	5574	5065	5500	360	7
14.26	Eucaliptol	1004	1050	1030	33	3
16.42	Linalol	126	124	130	2	1
18.82	Terpino-4-ol	150	148	150	2	1
20.61	Neral	21	22	20	1	4
20.74	Geraniol	87	83	90	3	3
20.95	Geraniol	17	18	17.6	0.3	1
25.50	<i>trans</i> - β -Cariofileno	1291	1182	1240	77	6

Tabla 5C. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS/DVB-65 µm, durante 20 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a temperatura ambiente (22°C).

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV, %
		Medición 1	Medición 2			
10.92	α -Pino	4625	4576	4600	35	0.8
13.74	α -Terpino	1516	1500	1510	11	0.7
14.20	Limoneno	5605	5595	5600	7	0.1
14.26	Eucaliptol	1246	1196	1200	35	3
16.42	Linalol	232	280	260	34	13
18.82	Terpino-4-ol	284	335	310	36	12
20.61	Neral	44	51	50	5	10
20.74	Geraniol	176	185	180	6	4
20.95	Geraniol	55	41	50	10	21
25.50	<i>trans</i> - β -Cariofileno	2117	2362	2300	173	8

Tabla 5D. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS/DVB-65 μm , durante 30 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a temperatura ambiente (22°C).

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV,%
		Medición 1	Medición 2			
10.92	α -Pino	4589	4574	4600	11	0.2
13.74	α -Terpino	1532	1548	1500	11	0.7
14.20	Limoneno	5361	5476	5400	81	2
14.26	Eucaliptol	1148	1236	1200	62	5
16.42	Linalol	369	351	360	13	4
18.82	Terpino-4-ol	451	416	430	24	6
20.61	Neral	65	63	60	2	3
20.74	Geranid	159	190	180	22	12
20.95	Geranial	85	60	70	17	24
25.50	<i>trans</i> - β -Cariofileno	2985	2716	3000	190	7

Tabla 5E. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS/DVB-65 μm , durante 40 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a temperatura ambiente (22°C).

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV,%
		Medición 1	Medición 2			
10.92	α -Pino	4597	4587	4600	7	0.2
13.74	α -Terpino	1642	1664	1700	15	0.9
14.20	Limoneno	5585	5769	6000	130	2
14.26	Eucaliptol	1165	1258	1200	66	5
16.42	Linalol	368	359	360	6	2
18.82	Terpino-4-ol	459	442	450	12	3
20.61	Neral	62	67	70	4	6
20.74	Geraniol	295	274	290	15	6
20.95	Geranial	89	92	90	2	2
25.50	<i>trans</i> - β -Cariofileno	3014	3093	3100	56	2

Tabla 5F. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS/DVB-65 μm , durante 60 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a temperatura ambiente (22°C).

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV,%
		Medición 1	Medición 2			
10.92	α -Pino	4604	4593	4600	8	0.2
13.74	α -Terpino	1634	1628	1630	4	0.3
14.20	Limoneno	5590	5647	5600	40	0.7
14.26	Eucaliptol	1193	1269	1200	54	4
16.42	Linalol	458	484	500	18	4
18.82	Terpino-4-ol	581	586	580	4	0.7
20.61	Neral	88	95	90	5	5
20.74	Geraniol	295	297	300	1	0.4
20.95	Geranial	74	93	80	14	17
25.50	<i>trans</i> - β -Cariofileno	3363	3811	3600	317	9

Tabla 5G. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS/DVB-65 μm , durante 90 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a temperatura ambiente (22°C).

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV,%
		Medición 1	Medición 2			
10.92	α -Pino	4608	4615	4610	5	0.1
13.74	α -Terpineno	1478	1468	1480	8	0.5
14.20	Limoneno	5626	5786	5800	113	2
14.26	Eucaliptol	1248	1194	1200	38	3
16.42	Linalol	471	456	470	10	2
18.82	Terpinen-4-ol	594	558	580	25	4
20.61	Neral	89	83	90	4	5
20.74	Geraniol	318	363	340	32	10
20.95	Geranial	136	156	150	14	10
25.50	<i>trans</i> - β -Cariofileno	4298	4257	4280	29	0.7

Tabla 6A. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS/DVB-65 μm , durante 5 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a 40°C.

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV,%
		Medición 1	Medición 2			
11.11	α -Pino	4596	3954	4300	454	11
13.94	α -Terpineno	1327	1112	1200	152	12
14.37	Limoneno	5463	4991	5200	334	6
14.44	Eucaliptol	1974	1652	1900	228	13
16.57	Linalol	1918	2150	2100	164	8
18.98	Terpinen-4-ol	2113	2383	2300	191	8
20.78	Neral	252	284	270	22	8
20.90	Geraniol	550	523	540	19	4
21.11	Geranial	349	401	380	37	10
25.66	<i>trans</i> - β -Cariofileno	4740	4844	4800	73	1

Tabla 6B. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS/DVB-65 μm , durante 10 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a 40°C.

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV,%
		Medición 1	Medición 2			
11.12	α -Pino	7291	5597	7000	1198	19
13.95	α -Terpineno	1634	1142	1400	348	25
14.39	Limoneno	7246	5242	6500	1417	23
14.46	Eucaliptol	2504	2019	2300	343	15
16.58	Linalol	2909	3185	3100	196	6
18.98	Terpinen-4-ol	3243	3554	3400	220	6
20.78	Neral	508	510	510	1	0.2
20.90	Geraniol	677	678	680	1	0.2
21.11	Geranial	677	647	700	21	3
25.67	<i>trans</i> - β -Cariofileno	7484	7226	7400	182	2

Tabla 6C. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS/DVB-65 μm , durante 20 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a 40°C.

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV, %
		Medición 1	Medición 2			
11.12	α -Pino	5012	4186	5000	584	13
13.95	α -Terpino	1624	1344	1500	198	13
14.39	Limoneno	7551	6533	7000	720	10
14.45	Eucaliptol	2691	2385	3000	216	9
16.58	Linalol	4366	4686	5000	226	5
18.99	Terpino-4-ol	4698	5167	5000	332	7
20.78	Neral	729	664	700	46	7
20.90	Geraniol	895	835	900	42	5
21.11	Geraniol	1360	1095	1200	188	15
25.69	<i>trans</i> - β -Cariofileno	10705	10329	11000	266	2

Tabla 6D. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS/DVB-65 μm , durante 30 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a 40°C.

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV, %
		Medición 1	Medición 2			
11.12	α -Pino	5578	5584	5580	5	0.1
13.96	α -Terpino	1907	1702	2000	146	8
14.40	Limoneno	8646	8612	8630	24	0.3
14.46	Eucaliptol	3067	3269	3200	143	4
16.59	Linalol	4488	5418	5000	658	13
19.00	Terpino-4-ol	4870	5902	5400	730	14
20.78	Neral	946	916	930	21	2
20.90	Geraniol	888	887	890	1	0.1
21.12	Geraniol	1557	1422	1500	95	6
25.71	<i>trans</i> - β -Cariofileno	13798	12992	14000	570	4

Tabla 6E. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS/DVB-65 μm , durante 40 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a 40°C.

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV, %
		Medición 1	Medición 2			
11.12	α -Pino	6667	6637	6700	21	0.3
13.96	α -Terpino	2053	2178	2100	88	4
14.40	Limoneno	9510	8864	9200	457	5
14.46	Eucaliptol	3614	3843	4000	162	4
16.58	Linalol	6247	6806	7000	395	6
18.99	Terpino-4-ol	6685	7158	7000	334	5
20.78	Neral	901	946	920	31	3
20.90	Geraniol	1073	1005	1040	48	5
21.11	Geraniol	1716	1778	1800	43	2
25.69	<i>trans</i> - β -Cariofileno	13327	13056	13200	192	2

Tabla 6F. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS/DVB-65 μm , durante 60 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a 40°C.

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV, %
		Medición 1	Medición 2			
11.11	α -Pino	6632	6636	6630	3	0.05
13.95	α -Terpino	2660	2643	2700	12	0.5
14.39	Limoneno	15145	17073	16000	1363	8
14.45	Eucaliptol	4967	5860	5400	632	12
16.58	Linalol	9144	8329	9000	577	7
18.99	Terpino-4-ol	9623	8871	9200	531	6
20.78	Neral	1611	1567	1600	31	2
20.89	Geraniol	970	994	1000	17	2
21.11	Geranial	2874	2493	2700	269	10
25.70	<i>trans</i> - β -Cariofileno	17620	18418	18000	564	3

Tabla 6G. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS/DVB-65 μm , durante 90 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a 40°C.

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV, %
		Medición 1	Medición 2			
11.11	α -Pino	6561	6876	7000	223	3
13.95	α -Terpino	2695	2641	2700	38	1
14.39	Limoneno	16506	16593	16600	62	0.4
14.45	Eucaliptol	5123	5153	5140	21	0.4
16.58	Linalol	7965	7233	7600	518	7
18.99	Terpino-4-ol	8496	7581	8100	647	8
20.78	Neral	1650	1362	1500	204	14
20.90	Geraniol	924	945	940	15	2
21.12	Geranial	2799	2290	2600	360	14
25.72	<i>trans</i> - β -Cariofileno	17714	16269	17000	1021	6

Tabla 7A. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS/DVB-65 μm , durante 5 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a 60°C.

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV, %
		Medición 1	Medición 2			
11.11	α -Pino	4769	4689	4700	56	1
13.94	α -Terpino	1527	1659	1600	93	6
14.37	Limoneno	8715	10777	10000	1458	15
14.44	Eucaliptol	3607	3105	3400	355	11
16.57	Linalol	3131	3166	3150	25	0.8
18.98	Terpino-4-ol	3537	3268	3400	191	6
20.78	Neral	743	646	700	68	10
20.90	Geraniol	471	418	450	38	8
21.11	Geranial	845	762	800	58	7
25.66	<i>trans</i> - β -Cariofileno	6958	6266	7000	489	7

Tabla 7B. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS/DVB-65 μm , durante 10 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a 60°C.

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV, %
		Medición 1	Medición 2			
11.12	α -Pino	5057	5275	5200	154	3
13.95	α -Terpino	1895	1843	1900	37	2
14.39	Limoneno	12037	11879	11958	112	0.9
14.46	Eucaliptol	4408	4583	4500	123	3
16.58	Linalol	8093	6754	7400	947	13
18.98	Terpino-4-ol	8600	7068	8000	1084	14
20.78	Neral	1390	1305	1400	60	4
20.90	Geraniol	672	602	640	50	8
21.11	Geraniol	2168	1621	1900	387	20
25.67	<i>trans</i> - β -Cariofileno	12781	11449	12100	942	8

Tabla 7C. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS/DVB-65 μm , durante 20 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a 60°C.

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV, %
		Medición 1	Medición 2			
11.12	α -Pino	5749	5509	6000	170	3
13.95	α -Terpino	2082	2115	2100	24	1
14.39	Limoneno	14302	15539	15000	875	6
14.45	Eucaliptol	5231	5300	5300	49	0.9
16.58	Linalol	7213	7025	7100	133	2
18.99	Terpino-4-ol	7533	7370	7500	115	2
20.78	Neral	1502	1474	1500	20	1
20.90	Geraniol	580	626	600	33	6
21.11	Geraniol	1120	1170	1200	35	3
25.69	<i>trans</i> - β -Cariofileno	14862	16126	15500	893	6

Tabla 7D. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS/DVB-65 μm , durante 30 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a 60°C.

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV, %
		Medición 1	Medición 2			
11.12	α -Pino	5801	4973	5400	586	11
13.96	α -Terpino	2003	2106	2100	73	4
14.40	Limoneno	13977	19285	17000	3753	23
14.46	Eucaliptol	8101	6563	10000	1087	15
16.59	Linalol	5995	7149	6600	817	12
19.00	Terpino-4-ol	6369	7413	7000	738	11
20.78	Neral	1407	1680	2000	193	12
20.90	Geraniol	619	547	600	51	9
21.12	Geraniol	1004	982	1000	15	2
25.71	<i>trans</i> - β -Cariofileno	14832	15171	15000	240	2

Tabla 7E. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS/DVB-65 μm , durante 40 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a 60°C.

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV,%
		Medición 1	Medición 2			
11.12	α -Pino	6586	6246	6500	241	4
13.96	α -Terpino	2431	2316	2400	81	3
14.40	Limoneno	19658	21220	21000	1105	5
14.46	Eucaliptol	9419	7950	10000	1039	12
16.58	Linalol	8746	10640	10000	1340	14
18.99	Terpino-4-ol	9058	10950	10000	1338	13
20.78	Neral	1749	2366	2100	436	21
20.90	Geraniol	663	691	680	20	3
21.11	Geranial	6256	3491	5000	1955	40
25.69	<i>trans</i> - β -Cariofileno	16072	17685	17000	1141	7

Tabla 7F. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS/DVB-65 μm , durante 60 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a 60°C.

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV,%
		Medición 1	Medición 2			
11.12	α -Pino	7593	7435	7500	112	2
13.95	α -Terpino	3004	2391	3000	434	16
14.39	Limoneno	45958	33544	40000	8778	22
14.45	Eucaliptol	9070	9056	9100	10	0.1
16.58	Linalol	36293	31648	34000	3285	10
18.99	Terpino-4-ol	36118	33003	35000	2203	6
20.78	Neral	8405	8627	9000	157	2
20.89	Geraniol	10753	22690	20000	8441	50
21.11	Geranial	11592	14192	13000	1838	14
25.70	<i>trans</i> - β -Cariofileno	37388	44002	41000	4677	12

Tabla 7G. Eficiencia de extracción del recubrimiento de PDMS/DVB-65 μm , durante 90 minutos de exposición a la fase vapor de los 10 terpenoides, a 60°C.

t_R , min	Compuesto	Áreas		Promedio	s	CV,%
		Medición 1	Medición 2			
11.11	α -Pino	8887	7351	9000	1086	13
13.95	α -Terpino	4659	2875	4000	1261	34
14.39	Limoneno	64703	43290	60000	15141	28
14.45	Eucaliptol	10995	9769	11000	867	8
16.58	Linalol	31857	48125	40000	11503	29
18.99	Terpino-4-ol	29127	49216	40000	14205	36
20.78	Neral	6112	11723	10000	3968	44
20.90	Geraniol	843	239	600	427	79
21.12	Geranial	7317	17650	13000	7307	58
25.72	<i>trans</i> - β -Cariofileno	26840	49930	40000	16327	42

Tabla 8. Determinación de la temperatura de saturación máxima de los 10 terpenoides, durante 30 minutos de exposición de la fibra de PDMS/DVB 65 μm al *headspace* (los datos tabulados son el promedio de dos réplicas).

t_R , min	Compuesto	Temperaturas de muestreo, °C		
		22	40	60
11.12	α -Pineno	4600	5580	5400
13.96	α -Terpineno	1500	2000	2100
14.40	Limoneno	5400	8630	17000
14.46	Eucaliptol	1200	3200	10000
16.58	Linalol	360	5000	6600
18.99	Terpinen-4-ol	430	5400	7000
20.78	Neral	60	930	2000
20.90	Geraniol	180	890	600
21.11	Geranial	70	1500	1000
25.69	<i>trans</i> - β -Cariofileno	3000	14000	15000

ANEXO 2

Datos obtenidos para t_M , t_R , k' y K_D de los 10 patrones de terpenoides, por el método convencional de GC

TABLA A. Tiempos del soluto no retenido (t_M) determinado para el rango de temperaturas de 50-140°C.

Temperatura, °C	t_M min.			Promedio	s	CV, %
	Medición 1	Medición 2	Medición 3			
50	2.660	2.661	2.660	2.660	0.001	0.02
60	2.587	2.579	2.577	2.581	0.005	0.2
70	2.524	2.516	2.517	2.519	0.004	0.2
80	2.458	2.450	2.451	2.453	0.004	0.2
90	2.385	2.415	2.386	2.40	0.02	0.7
100	2.326	2.326	2.325	2.326	0.001	0.02
110	2.279	2.284	2.279	2.281	0.003	0.1
120	2.251	2.229	2.237	2.24	0.01	0.50
130	2.194	2.194	2.190	2.193	0.002	0.1
140	2.155	2.153	2.154	2.154	0.001	0.05

TABLA 1A. Tiempos de retención obtenidos para el α -pineno, en el rango de temperaturas de 50-90°C

Temperatura, °C	t_R min.			Promedio	s	CV, %
	Medición 1	Medición 2	Medición 3			
50	16.046	16.046	16.059	16.050	0.008	0.05
60	10.946	10.949	10.947	10.947	0.002	0.01
70	7.929	7.926	7.924	7.926	0.003	0.03
80	6.058	6.054	6.054	6.055	0.002	0.04
90	4.861	4.86	4.86	4.860	0.001	0.01

TABLA 1B. Factor de capacidad (k') obtenidos para el α -pineno, en el rango de temperaturas de 50-90°C

Temperatura, °C	k'			Promedio	s	CV, %
	Medición 1	Medición 2	Medición 3			
50	5.032	5.032	5.035	5.033	0.002	0.03
60	3.248	3.245	3.232	3.242	0.009	0.3
70	2.150	2.141	2.150	2.147	0.005	0.3
80	1.472	1.463	1.471	1.469	0.005	0.3
90	1.037	1.038	1.025	1.033	0.007	0.7

TABLA 1C. Constante de distribución (K) obtenidas para el α -pineno, en el rango de temperaturas de 50-90°C

Temperatura, °C	K			Promedio	s	CV, %
	Medición 1	Medición 2	Medición 3			
50	1610.3	1610.3	1611.2	1610.6	0.5	0.03
60	1039.2	1038.5	1034.1	1040	3	0.3
70	688.1	685.3	688.1	690	2	0.2
80	470.9	468.2	470.7	470	2	0.3
90	331.9	332.1	328.1	330	2	0.7

TABLA 2A. Tiempos de retención obtenidos para el α -terpineno, en el rango de temperaturas de 50-90°C

Temperatura, °C	t_R min.			Promedio	s	CV, %
	Medición 1	Medición 2	Medición 3			
50	29.803	29.786	29.807	29.80	0.01	0.04
60	18.825	18.832	18.814	18.82	0.01	0.05
70	12.61	12.61	12.61	12.610	0.000	0.0
80	8.942	8.943	8.944	8.943	0.001	0.01
90	6.69	6.69	6.69	6.690	0.000	0.0

TABLA 2B. Factor de capacidad (k') obtenidos para el α -terpineno, en el rango de temperaturas de 50-90°C

Temperatura, °C	k'			Promedio	s	CV, %
	Medición 1	Medición 2	Medición 3			
50	10.204	10.198	10.201	10.201	0.003	0.03
60	6.305	6.302	6.273	6.29	0.02	0.3
70	4.010	3.996	4.012	4.006	0.009	0.2
80	2.648	2.638	2.651	2.646	0.007	0.247
90	1.804	1.805	1.792	1.800	0.007	0.4

TABLA 2C. Constante de distribución (K) obtenidas para el α -terpineno, en el rango de temperaturas de 50-90°C

Temperatura, °C	K			Promedio	s	CV, %
	Medición 1	Medición 2	Medición 3			
50	3265.32	3263.28	3264.46	3260	1	0.03
60	2017.6	2016.7	2007.2	2010	6	0.3
70	1283.2	1278.7	1283.8	1280	3	0.2
80	847.5	844.3	848.2	850	2	0.2
90	577.2	577.6	573.6	580	2	0.4

TABLA 3A. Tiempos de retención obtenidos para el limoneno, en el rango de temperaturas de 50-90°C

Temperatura, °C	t_R min.			Promedio	s	CV, %
	Medición 1	Medición 2	Medición 3			
50	32.721	32.725	32.716	32.721	0.005	0.01
60	20.481	20.481	20.485	20.482	0.002	0.01
70	13.603	13.597	13.601	13.600	0.003	0.02
80	9.55	9.551	9.553	9.551	0.002	0.02
90	7.071	7.073	7.074	7.073	0.002	0.02

TABLA 3B. Factor de capacidad (k') obtenidos para el limoneno, en el rango de temperaturas de 50-90°C

Temperatura, °C	k'			Promedio	s	CV, %
	Medición 1	Medición 2	Medición 3			
50	11.301	11.303	11.295	11.299	0.004	0.04
60	6.948	6.941	6.918	6.94	0.02	0.2
70	4.404	4.389	4.404	4.399	0.009	0.2
80	2.896	2.886	2.899	2.894	0.007	0.2
90	1.964	1.966	1.953	1.961	0.007	0.3

TABLA 3C. Constante de distribución (K) obtenidas para el limoneno, en el rango de temperaturas de 50-90°C

Temperatura, °C	K			Promedio	s	CV, %
	Medición 1	Medición 2	Medición 3			
50	3616.36	3616.84	3614.28	3620	1	0.04
60	2223.2	2221.3	2213.9	2220	5	0.2
70	1409.4	1404.6	1409.3	1410	3	0.2
80	926.8	923.4	927.7	930	2	0.2
90	628.3	629.0	625.1	630	2	0.3

TABLA 4A. Tiempos de retención obtenidos para el eucaliptol, en el rango de temperaturas de 50-90°C

Temperatura, °C	t _R min.			Promedio	s	CV, %
	Medición 1	Medición 2	Medición 3			
50	33.011	32.993	33.008	33.004	0.01	0.03
60	20.72	20.717	20.721	20.719	0.002	0.01
70	13.788	13.795	13.794	13.792	0.004	0.03
80	9.702	9.702	9.702	9.702	0.000	0.0
90	7.192	7.192	7.193	7.192	0.001	0.01

TABLA 4B. Factor de capacidad (k') obtenidos para el eucaliptol, en el rango de temperaturas de 50-90°C

Temperatura, °C	k'			Promedio	s	CV, %
	Medición 1	Medición 2	Medición 3			
50	11.410	11.403	11.404	11.406	0.004	0.03
60	7.040	7.033	7.010	7.03	0.02	0.2
70	4.478	4.463	4.483	4.48	0.01	0.2
80	2.958	2.947	2.960	2.955	0.007	0.2
90	2.014	2.016	2.003	2.011	0.007	0.3

TABLA 4C. Constante de distribución (K) obtenidas para el eucaliptol, en el rango de temperaturas de 50-90°C

Temperatura, °C	K			Promedio	s	CV, %
	Medición 1	Medición 2	Medición 3			
50	3651.2	3649.1	3649.4	3650	1	0.03
60	2252.9	2250.5	2243.1	2250	5	0.2
70	1432.9	1428.1	1434.5	1430	3	0.2
80	946.7	943.1	947.2	950	2	0.2
90	644.6	645.0	641.1	640	2	0.3

TABLA 5A. Tiempos de retención obtenidos para el linalol, en el rango de temperaturas de 50-90°C

Temperatura, °C	t _R min.			Promedio	s	CV, %
	Medición 1	Medición 2	Medición 3			
50	61.111	61.126	61.12	61.119	0.008	0.01
60	35.551	35.573	35.555	35.560	0.01	0.03
70	21.922	21.915	21.914	21.917	0.004	0.02
80	14.325	14.317	14.314	14.319	0.006	0.04
90	9.897	9.894	9.891	9.894	0.003	0.03

TABLA 5B. Factor de capacidad (k') obtenidos para el linalol, en el rango de temperaturas de 50-90°C

Temperatura, °C	k'			Promedio	s	CV, %
	Medición 1	Medición 2	Medición 3			
50	21.974	21.980	21.969	21.974	0.005	0.025
60	12.795	12.793	12.744	12.78	0.03	0.2
70	7.710	7.685	7.710	7.70	0.01	0.2
80	4.845	4.825	4.842	4.84	0.01	0.2
90	3.148	3.148	3.135	3.144	0.008	0.2

TABLA 5C. Constante de distribución (K) obtenidas para el linalol, en el rango de temperaturas de 50-90°C

Temperatura, °C	K			Promedio	s	CV, %
	Medición 1	Medición 2	Medición 3			
50	7031.70	7033.50	7030.02	7030	2	0.02
60	4094.6	4093.9	4078.0	4090	9	0.2
70	2467.1	2459.3	2467.3	2470	4	0.2
80	1550.3	1543.9	1549.6	1550	5	0.2
90	1007.3	1007.5	1003.1	1010	2	0.2

TABLA 6A. Tiempos de retención obtenidos para el terpinen-4-ol, en el rango de temperaturas de 100-140°C

Temperatura, °C	t_R min.			Promedio	s	CV, %
	Medición 1	Medición 2	Medición 3			
100	10.644	10.647	10.645	10.645	0.002	0.01
110	7.833	7.834	7.834	7.8337	0.0006	0.007
120	6.038	6.036	6.038	6.037	0.001	0.02
130	4.858	4.857	4.856	4.857	0.001	0.02
140	4.07	4.07	4.07	4.07	0.00	0.0

TABLA 6B. Factor de capacidad (k') obtenidos para el terpinen-4-ol, en el rango de temperaturas de 100-140°C

Temperatura, °C	k'			Promedio	s	CV, %
	Medición 1	Medición 2	Medición 3			
100	3.578	3.577	3.576	3.5773	0.0008	0.02
110	2.437	2.437	2.430	2.435	0.004	0.2
120	1.699	1.682	1.708	1.70	0.01	0.8
130	1.218	1.214	1.213	1.215	0.003	0.2
140	0.890	0.889	0.890	0.8895	0.0009	0.1

TABLA 6C. Constante de distribución (K) obtenidas para el terpinen-4-ol, en el rango de temperaturas de 100-140°C

Temperatura, °C	K			Promedio	s	CV, %
	Medición 1	Medición 2	Medición 3			
100	1145.0	1144.8	1144.5	1144.7	0.2	0.02
110	779.9	780.0	777.6	780	1	0.2
120	543.7	538.4	546.5	540	4	0.8
130	389.8	388.4	388.3	388.8	0.9	0.2
140	284.6	284.4	284.9	284.6	0.3	0.1

TABLA 7A. Tiempos de retención obtenidos para el neral, en el rango de temperaturas de 100-140°C

Temperatura, °C	t_R min.			Promedio	s	CV, %
	Medición 1	Medición 2	Medición 3			
100	14.175	14.175	14.176	14.175	0.001	0.004
110	9.946	9.946	9.947	9.9463	0.0006	0.006
120	7.341	7.341	7.34	7.341	0.001	0.01
130	5.682	5.683	5.681	5.682	0.001	0.02
140	4.609	4.603	4.604	4.605	0.003	0.07

TABLA 7B. Factor de capacidad (k') obtenidos para el neral, en el rango de temperaturas de 100-140°C

Temperatura, °C	k'			Promedio	s	CV, %
	Medición 1	Medición 2	Medición 3			
100	5.097	5.094	5.095	5.095	0.001	0.03
110	3.364	3.364	3.355	3.361	0.005	0.2
120	2.282	2.261	2.293	2.28	0.02	0.7
130	1.595	1.590	1.589	1.591	0.003	0.2
140	1.140	1.136	1.138	1.138	0.002	0.2

TABLA 7C. Constante de distribución (K) obtenidas para el neral, en el rango de temperaturas de 100-140°C

Temperatura, °C	K			Promedio	s	CV, %
	Medición 1	Medición 2	Medición 3			
100	1631.0	1630.1	1630.3	1630.4	0.4	0.03
110	1076.5	1076.5	1073.6	1080	2	0.2
120	730.1	723.6	733.9	730	5	0.7
130	510.2	508.9	508.6	509.2	0.9	0.2
140	364.7	363.5	364.3	364.2	0.6	0.2

TABLA 8A. Tiempos de retención obtenidos para el geraniol, en el rango de temperaturas de 100-140°C

Temperatura, °C	t_R min.			Promedio	s	CV, %
	Medición 1	Medición 2	Medición 3			
100	15.638	15.654	15.647	15.646	0.008	0.05
110	10.769	10.774	10.770	10.771	0.003	0.02
120	7.808	7.805	7.805	7.806	0.002	0.02
130	5.954	5.955	5.955	5.955	0.001	0.01
140	4.762	4.761	4.76	4.761	0.001	0.02

TABLA 8B. Factor de capacidad (k') obtenidos para el geraniol, en el rango de temperaturas de 100-140°C

Temperatura, °C	k'			Promedio	s	CV, %
	Medición 1	Medición 2	Medición 3			
100	5.726	5.730	5.727	5.728	0.002	0.04
110	3.725	3.728	3.715	3.723	0.006	0.2
120	2.490	2.469	2.502	2.49	0.02	0.7
130	1.719	1.714	1.714	1.716	0.003	0.2
140	1.211	1.209	1.211	1.2103	0.0009	0.07

TABLA 8C. Constante de distribución (K) obtenidas para el geraniol, en el rango de temperaturas de 100-140°C

Temperatura, °C	K			Promedio	s	CV, %
	Medición 1	Medición 2	Medición 3			
100	1832.3	1833.6	1832.6	1832.9	0.7	0.04
110	1192.1	1192.8	1188.9	1190	2	0.2
120	796.9	790.0	800.5	800	5	0.7
130	550.0	548.6	548.6	549.0	0.8	0.2
140	387.4	387.0	387.5	387.3	0.3	0.07

TABLA 9A. Tiempos de retención obtenidos para el geraniol, en el rango de temperaturas de 100-140°C

Temperatura, °C	t _R min.			Promedio	s	CV, %
	Medición 1	Medición 2	Medición 3			
100	16.644	16.64	16.642	16.642	0.002	0.01
110	11.413	11.413	11.414	11.4133	0.0006	0.005
120	8.241	8.241	8.24	8.241	0.001	0.01
130	6.247	6.248	6.247	6.247	0.001	0.01
140	4.969	4.968	4.97	4.969	0.001	0.02

TABLA 9B. Factor de capacidad (k') obtenidos para el geraniol, en el rango de temperaturas de 100-140°C

Temperatura, °C	k'			Promedio	s	CV, %
	Medición 1	Medición 2	Medición 3			
100	6.159	6.157	6.158	6.1578	0.0009	0.01
110	4.008	4.008	4.008	4.0080	0.0003	0.006
120	2.684	2.684	2.684	2.6838	0.0003	0.01
130	1.852	1.853	1.852	1.8527	0.0003	0.01
140	1.307	1.306	1.307	1.3069	0.0005	0.04

TABLA 9C. Constante de distribución (K) obtenidas para el geraniol, en el rango de temperaturas de 100-140°C

Temperatura, °C	K			Promedio	s	CV, %
	Medición 1	Medición 2	Medición 3			
100	1970.8	1970.2	1970.5	1970.5	0.3	0.01
110	1282.5	1282.5	1282.7	1282.57	0.08	0.006
120	858.9	858.9	858.7	858.82	0.08	0.01
130	592.8	593.0	592.8	592.85	0.08	0.01
140	418.2	418.0	418.4	418.2	0.2	0.04

TABLA 10A. Tiempos de retención obtenidos para el *trans*- β -cariofileno, en el rango de temperaturas de 100-140°C

Temperatura, °C	t_R min.			Promedio	s	CV, %
	Medición 1	Medición 2	Medición 3			
100	38.016	38.016	38.018	38.017	0.001	0.003
110	24.716	24.717	24.719	24.717	0.002	0.006
120	16.742	16.742	16.741	16.7417	0.0006	0.003
130	11.827	11.827	11.832	11.829	0.003	0.02
140	8.715	8.714	8.714	8.714	0.001	0.01

TABLA 10B. Factor de capacidad (k') obtenidos para el *trans*- β -cariofileno, en el rango de temperaturas de 100-140°C

Temperatura, °C	k'			Promedio	s	CV, %
	Medición 1	Medición 2	Medición 3			
100	15.351	15.344	15.345	15.347	0.004	0.02
110	9.845	9.846	9.823	9.84	0.01	0.1
120	6.484	6.438	6.511	6.48	0.04	0.6
130	4.400	4.391	4.393	4.395	0.005	0.1
140	3.046	3.044	3.047	3.046	0.002	0.06

TABLA 10C. Constante de distribución (K) obtenidas para el *trans*- β -cariofileno, en el rango de temperaturas de 100-140°C

Temperatura, °C	K			Promedio	s	CV, %
	Medición 1	Medición 2	Medición 3			
100	4912.3	4910.1	4910.3	4910	1	0.02
110	3150.4	3150.6	3143.3	3150	4	0.1
120	2074.9	2060.0	2083.5	2100	12	0.6
130	1408.1	1405.0	1405.7	1410	2	0.1
140	974.7	974.0	975.2	974.6	0.6	0.06