

**ESTUDIO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES EN
HOJAS FRESCAS Y SECAS DE *Pelargonium graveolens* (geranio), EN
FUNCIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y SU ESTADO DE
DESARROLLO VEGETATIVO**

**DEYNY LETICIA MENDIVELSO PÉREZ
MARTHA CECILIA OLIVARES SANTOYO**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2007**

**ESTUDIO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES EN
HOJAS FRESCAS Y SECAS DE *Pelargonium graveolens* (geranio), EN
FUNCIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y SU ESTADO DE
DESARROLLO VEGETATIVO**

**DEYNY LETICIA MENDIVELSO PÉREZ
MARTHA CECILIA OLIVARES SANTOYO**

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

Directora: Elena E. Stashenko, Química, Ph. D.
Co-director: Jairo René Martínez, Químico, Ph. D.

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2007**

AGRADECIMIENTOS

Las autoras expresan sus agradecimientos a:

A Dios, por iluminar nuestros caminos.

A la doctora Elena Stashenko, por sus valiosas enseñanzas, lecciones de vida, y por demostrarnos que las mujeres estamos preparadas para aportar a nuestra sociedad y para realizar hazañas grandiosas...

Al doctor Jairo René Martínez, por su dedicación, enseñanzas, ejemplo de rectitud y por alegrarnos con su humor pensante.

A nuestros calificadores, Claude Ewert y Hernando Moncaleano, por el tiempo y sus valiosos aportes.

Especialmente, agradecemos de todo corazón a nuestros amigos del laboratorio, al profe Amner, Gio, Agri, Elkin, Edwincito, Olga Li, Carrol, Sayde, Lucy, Adrianita, Andrea, Martha C. y Angela, por su amistad y compañía durante este largo camino, sus alegrías, apoyo incondicional, y por permitirnos crecer a su lado como seres humanos y profesionales. Y demás compañeros, por sus enseñanzas basadas en el cariño, conocimiento y experiencia.

A todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron con el desarrollo de nuestro proyecto.

Dedicatoria....

A Dios por ser la fuerza y la luz que guía mi caminar.

A mi mamá, Luz Marina por educarme con su ejemplo, enseñándome con amor que no hay obstáculo que impida alcanzar mis sueños, ni meta que no se pueda alcanzar con base en el trabajo y la perseverancia.

A Julián, Angélica, Sebastián y María José, mis hermanitos, fuente de mi vida, de alegría y compañía incondicional.

A mi abuelita, a mi familia, a coquito, por su fe en mí, su apoyo, amor, compañía y ejemplo.

A mis niños de Beerpool, mis amigos, mis hermanos, mis niños, mis ángeles, por enseñarme el valor de la amistad, el estudio y el deporte, por estar siempre dispuestos a robarme una sonrisa y por ser mi compañía en momentos de alegría, tristeza y apoyo en las dificultades.

A la familia Bautista Reyes, a Fredito, por su apoyo, cariño, amistad y por brindarme un lugar en su corazón.

A Marco, por su apoyo, compañía y amor en una de las etapas más importante de mi vida, por demostrarme el valor de las nuevas oportunidades, enseñarme que vale la pena dejar los miedos atrás y mirar nuevos horizontes.

Deyny Leticia

Dedicatoria....

A DIOS por su bondad, por iluminar mi vida
y por darme lo necesario para lograr mis sueños.

Especialmente dedicó este triunfo a mi familia quienes siempre me han apoyado incondicionalmente, a mis padres DIMAS y ANA a quienes les debo todo, gracias por regalarme la vida por llenarla de fe y comprensión, y ser mi ejemplo de lucha y amor.

A mis hermanas CLAUDIA y SANDRA por su incondicionalidad y apoyo constante, por el regalo más grande mis sobrinos NICOLAS Y JUANITA que llegaron en el mejor momento llenando mi vida de amor y esperanza.
A mi tía YOLANDA por su cariño y siempre querer lo mejor para mí.

A mis profesores quienes día a día aportaron a mi formación con sus enseñanzas y experiencias.

Gracias a todos mis amigos quienes siempre fueron una voz de aliento para continuar este camino. A Adrianita, Ericsson y Aldo por confiar en mí y siempre robarme una sonrisa. A todos los que hoy siguen conmigo, y a quienes ya no están, gracias por hacer parte de mi vida y por dejar huellas hermosas en mi corazón.

De corazón, muchas gracias a todos.

Martha la O.

TABLA DE CONTENIDO

| | Pag. |
|---|-------------|
| INTRODUCCIÓN | 24 |
| 1. ESTADO DEL ARTE | 28 |
| 1.1 GENERALIDADES DE LA PLANTA | 28 |
| 1.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA | 30 |
| 1.3 PROPIEDADES BIOLÓGICAS | 39 |
| 1.4 USOS | 40 |
| 1.5 GENERALIDADES DE LOS ACEITES ESENCIALES | 41 |
| 1.5.1 Definición | 41 |
| 1.5.2 Composición química | 41 |
| 1.5.3 Metabolitos secundarios | 43 |
| 1.5.4 Localización de los AEs en la planta | 45 |
| 1.5.5 Tratamiento postcosecha del material vegetal | 46 |
| 1.6 MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE AEs Y EXTRACTOS A ESCALA DE LABORATORIO | 47 |
| 1.6.1 Destilación-extracción con solvente simultánea | 48 |
| 1.6.2 Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas | 48 |
| 1.6.3 Extracción con fluido supercrítico | 49 |
| 1.7 ANÁLISIS Y CONTROL DE CALIDAD DE LOS AEs | 50 |
| 1.7.1 Cromatografía de gases | 51 |
| 1.7.2 Cromatografía de gases – espectrometría de masas | 53 |
| 1.7.3 Control de calidad de aceites esenciales | 53 |
| 2. ANÁLISIS DE MERCADO | 55 |
| 2.1 MERCADO MUNDIAL DE Aes | 55 |
| 2.2 MERCADO MUNDIAL DE AE DE GERANIO | 57 |
| 2.3 MERCADO NACIONAL DE Aes | 59 |

| | | |
|-------|--|----|
| 2.4 | MERCADO NACIONAL DE AE DE GERANIO | 61 |
| 2.5 | PRECIOS EN EL MERCADO DE AE DE GERANIO | 62 |
| 3. | CIENCIOMETRÍA | 63 |
| 3.1 | BASE DE DATOS <i>Elservier (SCOPUS)</i> | 64 |
| 3.2 | BASE DE DATOS <i>Web of Science (ISI Web of Knowledge, Thomson)</i> | 68 |
| 4. | ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES | 73 |
| 5. | DESARROLLO EXPERIMENTAL. | 74 |
| 5.1 | OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL | 75 |
| 5.2 | IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA | 76 |
| 5.3 | SELECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL | 76 |
| 5.4 | OBTENCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES | 78 |
| 5.4.1 | Extracción por hidrodestilación asistida por radiación de microondas | 78 |
| 5.4.2 | Destilación-extracción simultánea con solvente | 79 |
| 5.4.3 | Extracción con fluido supercrítico | 80 |
| 5.5 | CARACTERIZACIÓN DE AEs y EXTRACTOS | 82 |
| 5.5.1 | Análisis cromatográfico | 82 |
| 5.6 | IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS PRESENTES EN AEs Y EXTRACTOS | 85 |
| 5.7 | ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LOS AEs Y EXTRACTOS DE <i>P. graveolens</i> | 87 |
| 5.7.1 | Estandarización interna | 87 |
| 5.7.2 | Estandarización externa | 88 |
| 6. | ANÁLISIS DE RESULTADOS | 90 |
| 6.1 | IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA PLANTA | 90 |
| 6.2 | ANÁLISIS DE SUELOS | 90 |
| 6.3 | RENDIMIENTO DE LOS Aes | 91 |
| 6.4 | PORCENTAJE DE AGUA PRESENTE EN LAS PLANTAS DE GERANIO | 93 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 6.5 | CARACTERIZACIÓN DE Aes Y EXTRACTOS POR GC-MS | 96 |
| 6.5.1 | Reproducibilidad de los tiempos de retención y de las áreas de los picos cromatográficos | 96 |
| 6.5.2 | Reproducibilidad de los índices de retención Kovàts determinados experimentalmente | 99 |
| 6.5.3 | Determinación de la composición de Aes y extractos de <i>P. graveolens</i> | 101 |
| 6.5.4 | Incidencia del estado de desarrollo vegetativo de la planta sobre la composición de AEs y extractos obtenidos de hojas frescas y secas de <i>P. graveolens</i> | 110 |
| 6.5.5 | Incidencia de la técnica de extracción sobre la composición de AEs y extractos obtenidos de hojas frescas y secas de <i>P. graveolens</i> | 114 |
| 6.5.6 | Incidencia del tiempo de extracción sobre la composición de AEs y extractos obtenidos de hojas frescas y secas de <i>P. graveolens</i> | 120 |
| 6.6 | ANÁLISIS CUANTITATIVO DE CITRONELOL Y GERANIOL PRESENTES EN AEs DE <i>P. graveolens</i> . | 125 |
| 6.7 | ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE LOS AEs Y EXTRACTOS DE <i>P. graveolens</i> , OBTENIDOS EN DIFERENTES ESTADOS VEGETATIVOS, BAJO DIFERENTES TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN Y LA DURACIÓN DE EXTRACCIÓN POR MWHD. | 127 |
| 6.8 | ANÁLISIS POR GC-MS DE LOS AEs Y EXTRACTOS DE <i>P. graveolens</i> | 132 |
| 7. | CONCLUSIONES | 144 |
| 8. | RECOMENDACIONES | 147 |
| 9. | BIBLIOGRAFÍA | 148 |
| | ANEXOS | 168 |

LISTA DE TABLAS

| | Pag. |
|---|-------------|
| Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del aceite esencial de geranio. | 30 |
| Tabla 2. Usos y propiedades fisicoquímicas del geraniol. | 32 |
| Tabla 3. Usos y propiedades fisicoquímicas del citronelol. | 33 |
| Tabla 4. Comparación de la composición química de aceite de geranio, cultivado en diferentes países. | 36 |
| Tabla 5. Autores, con mayor número de publicaciones sobre <i>P. graveolens</i> en el periodo de 1972 a 2006 [Fuente: Base de datos <i>Elsevier (Scopus)</i> ; Consultado: 22-02-2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH (" <i>Pelargonium graveolens</i> ")]. | 67 |
| Tabla 6. Patrones de hidrocarburos lineales y patrones de terpenos certificados utilizados para la determinación de los índices de Kováts. | 87 |
| Tabla 7. Soluciones preparadas de citronelol y geraniol. | 89 |
| Tabla 8. Rendimientos de los AEs de <i>Pelargonium graveolens</i> , obtenidos por MWHD, de hojas frescas, recolectadas en diferentes etapas de desarrollo vegetativo. | 91 |
| Tabla 9. Porcentaje de agua presente en las hojas de <i>P. graveolens</i> . | 94 |
| Tabla 10. Estudio de la reproducibilidad de las áreas cromatográficas de algunos compuestos presentes en el AE de geranio (<i>P. graveolens</i>). | 97 |
| Tabla 11. Reproducibilidad de los tiempos de retención de algunos compuestos presentes en el AE de geranio. | 98 |

| | | |
|------------------|--|-----|
| Tabla 12. | Reproducibilidad de los índices de retención de Kovàts, I_K , calculados experimentalmente, sobre columnas de fase estacionaria polar y apolar. | 100 |
| Tabla 13. | Composición química de los metabolitos secundarios de <i>P. graveolens</i> , obtenidos por diferentes técnicas de extracción. | 103 |
| Tabla 14. | Principales compuestos encontrados en los AEs de <i>P. graveolens</i> de diferentes orígenes geográficos. | 109 |
| Tabla 15. | Composición química de AEs y extractos de hojas frescas y secas de geranio (<i>P. graveolens</i>) en función del estado de desarrollo vegetativo de la planta. | 111 |
| Tabla 16. | Compuestos aislados por SFE de hojas frescas y secas de <i>P. graveolens</i> en diferentes etapas de desarrollo vegetativo. | 117 |
| Tabla 17. | Compuestos principales en los AEs aislados por MWHD, de hojas frescas y secas de <i>P. graveolens</i> , a diferentes tiempos de extracción. | 121 |
| Tabla 18. | Concentración de citronelol y geraniol presentes en los AEs de hojas frescas y secas de geranio (<i>P. graveolens</i>), aislados por MWHD. | 125 |

LISTA DE FIGURAS

| | pag. |
|--|-------------|
| Figura 1. Planta de <i>Pelargonium graveolens</i> . | 28 |
| Figura 2. Principales rutas en la biosíntesis de metabolitos secundarios de plantas y su relación con el metabolismo primario. | 44 |
| Figura 3. Bloques principales de un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas. | 52 |
| Figura 4. Principales países proveedores de aceites esenciales en 2002. | 55 |
| Figura 5. Participación porcentual de los principales países importadores de aceites esenciales en el año 2002. | 56 |
| Figura 6. Producción anual de países cultivadores de aceite de geranio. | 58 |
| Figura 7. Principales países importadores de AE de geranio en el año 2002. | 59 |
| Figura 8. Importaciones de AEs, mezclas odoríferas, oleorresinas y resinoides realizadas en Colombia (1997-2001). | 60 |
| Figura 9. Importaciones de AEs con mayor demanda en Colombia durante el período 2002 a 2004 (valor en US\$ millones). | 60 |
| Figura 10. Importaciones nacionales de AE de geranio durante los años 2002-2004. | 61 |
| Figura 11. Relación entre las revistas científicas y el número de publicaciones sobre <i>P. graveolens</i> en el periodo de 1972 a 2006 [Fuente: Base de datos <i>Elservier (Scopus)</i> ; Consultado: 22-02-2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH (" <i>Pelargonium graveolens</i> ")]. | 64 |
| Figura 12. Publicaciones realizadas sobre geranio durante el período de 1972 a 2006 [Fuente: Base de datos <i>Elservier (Scopus)</i> ; Consultado: 22-02- 2007. Ecuación de búsqueda: TITLE- | 65 |

- ABS-KEY-AUTH (“*Pelargonium graveolens*”)].
- Figura 13.** Relación entre publicaciones realizadas sobre geranio y los diferentes campos de investigación en el periodo de 1972 a 2006 [Fuente: Base de datos *Elservier (Scopus)*; Consultado: 22-02-2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH (“*Pelargonium graveolens*”)]. 66
- Figura 14.** Número de patentes registradas sobre *P. graveolens* en el periodo de 1972 a 2006 [Fuente: Base de datos *Elservier (Scopus)*; consultado: 22-02-2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH (“*Pelargonium graveolens*”)]. 67
- Figura 15.** Publicaciones sobre la especie *P. graveolens* en el período de 2001 a 2006 [Fuente: Base de datos *WEB of SCIENCE (ISI Web of Knowledge, Thomson)*; Consultado: 27 de febrero de 2007. Ecuación de búsqueda: TS=(“*Pelargonium graveolens*”)]. 69
- Figura 16.** Relación entre países que reportan estudios sobre la especie *P. graveolens* y número de publicaciones en el período de 2001 a 2006 [Fuente: Base de datos *WEB of SCIENCE (ISI Web of Knowledge, Thomson)*; Consultado: 27 de febrero de 2007. Ecuación de búsqueda: TS=(“*Pelargonium graveolens*”)]. 69
- Figura 17.** Publicaciones realizadas sobre geranio, según las diferentes áreas de investigación en el periodo de 2001 a 2006 [Fuente: Base de datos *WEB of SCIENCE (ISI Web of Knowledge, Thomson)*; Consultado: 27 de febrero de 2007. Ecuación de búsqueda: TS=(“*Pelargonium graveolens*”)]. 70
- Figura 18.** Revistas científicas que reportan mayor número de publicaciones sobre *P. graveolens* en el periodo de 2001 a 2006 [Fuente: Base de datos *WEB of SCIENCE (ISI Web of Knowledge, Thomson)*; Consultado: 27-02-2007. Ecuación de búsqueda: TS=(“*Pelargonium graveolens*”)]. 71

| | | |
|-------------------|---|-----|
| Figura 19. | Diagrama de flujo del desarrollo experimental. | 74 |
| Figura 20. | Propagación y transplante del material vegetal. | 75 |
| Figura 21. | Cultivo de <i>P. graveolens</i> , 6 meses de desarrollo vegetativo. | 76 |
| Figura 22. | Proceso de secado del material vegetal. | 77 |
| Figura 23. | Montaje para hidrodestilación asistida por la radiación de microondas. | 79 |
| Figura 24. | Equipo modificado de extracción para solventes de alta densidad para la SDE a microescala. | 80 |
| Figura 25. | Equipo Soxhlet de alta presión (J & W Scientific) para la SFE con CO ₂ . | 81 |
| Figura 26. | Cromatógrafo de gases <i>Agilent Technologies 6890 Plus Series GC System</i> acoplado a un detector selectivo de masas <i>Agilent Technologies 5973 Network</i> . | 83 |
| Figura 27. | Cromatógrafo <i>Agilent Technologies 6890 Network Series GC</i> acoplado a un detector de masas <i>Agilent Technologies 5975</i> . | 85 |
| Figura 28. | Rendimientos de los AEs de <i>Pelargonium graveolens</i> , extraídos por MWHD, de hojas frescas y secas, de plantas recolectadas en diferentes etapas de desarrollo vegetativo. | 92 |
| Figura 29. | Pérdida de agua en hojas de <i>P. graveolens</i> en función del tiempo de secado, en diferentes etapas de desarrollo vegetativo. | 95 |
| Figura 30. | Perfiles cromatográficos típicos de los AEs y extractos de hojas frescas de <i>Pelargonium graveolens</i> , obtenidos por: A. MWHD, B. SDE, C. SFE. Columna DB-5 (60 m), <i>split</i> 1:30, detector selectivo de masas (EI, 70 eV). | 102 |
| Figura 31. | Variación de los principales constituyentes de los AEs de geranio, en función del desarrollo vegetativo de la planta. | 112 |
| Figura 32. | Relación citronelol:geraniol en hojas frescas y secas en diferentes estados de desarrollo vegetativo. | 113 |
| Figura 33. | Distribución por grupos funcionales de los compuestos presentes en AEs y extractos de <i>P. graveolens</i> , obtenidos por | 115 |

los diferentes métodos de extracción.

- Figura 34.** Perfiles cromatográficos típicos de los extractos obtenidos por SFE de: A. Hojas frescas y B. Hojas secas. Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30, detector selectivo de masas (EI, 70 eV). 116
- Figura 35.** Distribución por grupos funcionales de los compuestos presentes en AEs y extractos de *P. graveolens*, obtenidos por MWHD, a diferentes tiempos de extracción. 122
- Figura 36.** Rendimientos de los AEs de *P. graveolens* obtenidos por MWHD de hojas frescas, para diferentes tiempos de extracción. 123
- Figura 37.** Rendimientos de los AEs de *P. graveolens*, obtenidos por MWHD de hojas secas, a diferentes tiempos de extracción. 124
- Figura 38.** Concentración de citronelol, determinada por GC-MS mediante estandarización externa, en los AEs de hojas frescas de *P. graveolens* aislados por MWHD, usando diferentes tiempos de extracción y en distintos estados de desarrollo vegetativo. 126
- Figura 39.** Concentración de geraniol, determinada por GC-MS mediante estandarización externa, en los AEs de hojas frescas de *P. graveolens* aislados por MWHD, usando diferentes tiempos de extracción y en distintos estados de desarrollo vegetativo. 127
- Figura 40.** Nomenclatura empleada para análisis de PCA. 128
- Figura 41.** Análisis de componentes principales (PCA) de los compuestos presentes en los AEs y extractos de *Pelargonium graveolens*, según su relación “Área de compuesto / Área del estándar interno”, aislados por MWHD, SDE y SFE de plantas en tres estados de desarrollo vegetativo, variando los tiempos de extracción por MWHD. 129
- Figura 42.** Dendograma de *clusters* de las familias de compuestos por grupo funcional presentes en los AEs y extractos aislados por MWHD, SDE y SFE, de *P. graveolens*, de plantas en 131

diferentes etapas de desarrollo vegetativo.

| | | |
|-------------------|--|-----|
| Figura 43. | Espectro de masas del citronelol (EI, 70 eV). | 133 |
| Figura 44. | Espectro de masas del geraniol (EI, 70 eV). | 134 |
| Figura 45. | Espectro de masas del formiato de citronelilo (EI, 70 eV). | 136 |
| Figura 46. | Espectro de masas del tiglató de geraniolo (EI, 70 eV). | 138 |
| Figura 47. | Espectro de masas del 6,9-guaiadieno (EI, 70 eV). | 140 |
| Figura 48. | Espectro de masas del <i>cis</i> -óxido de rosa (EI, 70 eV). | 142 |

LISTA DE ESQUEMAS

| | pag. |
|---|-------------|
| Esquema 1. Rutas de fragmentación del citronelol. | 133 |
| Esquema 2. Rutas de fragmentación del geraniol. | 135 |
| Esquema 3. Rutas de fragmentación del formiato de citronelilo. | 137 |
| Esquema 4. Rutas de fragmentación del tiglato de geranilo. | 139 |
| Esquema 5. Rutas de fragmentación del 6,9-guaiadieno. | 141 |
| Esquema 6. Rutas de fragmentación del <i>cis</i> -óxido de rosa. | 143 |

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

| | |
|----------------------|--|
| Aes | Aceite(s) esencial(es). |
| ACM | Ácidos monoterpénicos. |
| ADM | Aldehídos monoterpénicos. |
| ALM | Alcoholes monoterpénicos. |
| ALS | Alcoholes sesquiterpénicos. |
| °C | Grado(s) <i>Celsius</i> . |
| Ca. | Aproximadamente. |
| CENIVAM | Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Tropicales Aromáticas y Medicinales |
| CIBIMOL | Centro de Investigación en Biomoléculas. |
| Cm | Centímetro(s). |
| CM | Cetonas monoterpénicas. |
| CS | Cetonas sesquiterpénicas. |
| CV | Coefficiente de variación. |
| d_f | Espesor de la fase estacionaria, μm . |
| DB-5MS | <i>5%-Phenyl-poly(dimethylsiloxane)</i> [Fase estacionaria de 5%-Fenil-poli(dimetilsiloxano)]. |
| DB-WAX | <i>Poly(ethyleneglycol)</i> [Fase estacionaria de poli(etilenglicol)]. |
| D.I. | Diámetro interno, mm. |
| DPPH | 1,1-Difenil-2-picril hidracilo. |
| € | Euro(s). |
| EE.UU. | <i>United Status of America</i> (Estados Unidos). |
| e.g. | <i>Exempli gratia</i> (Por ejemplo). |
| EI | <i>Electron Impact</i> (Impacto de electrones). |
| Etc. | <i>Et cetera</i> . |
| ETM | Éteres monoterpénicos. |
| ETS | Éteres sesquiterpénicos. |
| ESA | Ésteres aromáticos. |

| | |
|----------------------|---|
| ESM | Éteres monoterpénicos. |
| EU | <i>European Union</i> (Unión Europea). |
| eV | Electrón-voltio(s). |
| FAO | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. |
| f.e. | Fase estacionaria. |
| FID | <i>Flame Ionization Detector</i> (Detector de ionización en llama). |
| GC | <i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases). |
| GC-MS | <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas). |
| GC-FID | <i>Gas Chromatography-Flame Ionization Detector</i> (Cromatografía de gases con detector de ionización en llama). |
| GHz | Giga-Hertz. |
| GLP | <i>Good Laboratory Practice</i> (Buenas Practices de Laboratorio). |
| h | Hora(s) |
| H | Hidrocarburos. |
| Ha | Hectárea(s). |
| HD | <i>Hydrodistillation</i> (Hidrodestilación). |
| HA | Hidrocarburos aromáticos. |
| HM | Hidrocarburos monoterpénicos. |
| HS | Hidrocarburos sesquiterpénicos. |
| I_k | Índices de Kováts. |
| i.e. | <i>id ets.</i> (es decir) |
| ISO | <i>Internacional Organization for Standardization</i> (Organización Internacional para la Estandarización). |
| Kg | Kilogramo(s). |
| L | Litro(s). |
| M | Metro(s). |
| MEP | <i>Methylerythritol phosphate.</i> (Metileritriol fosfato) |
| mL | Mililitro(s). |
| m.s.m.n. | Metros sobre el nivel del mar. |

| | |
|-----------------------------|---|
| Min | Minuto(s). |
| Mm | Milímetro(s). |
| MPa | MegaPascales. |
| MS | <i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas) |
| MSD | <i>Mass Selective Detector</i> (Detector selectivo de masas). |
| MWHD | <i>Microwave-Assisted Hydrodistillation</i> (Hidrodestilación asistida por radiación de microondas). |
| η_D | Índice de refracción. |
| O | Otros compuestos oxigenados. |
| PCA | <i>Principal Component</i> (Componente principal). |
| PCA | <i>Principal Component Analysis</i> (Análisis de componentes principales). |
| P.M. | Peso molecular. |
| <i>P. graveolens</i> | <i>Pelargonium graveolens</i> (geranio). |
| PFNM | Productos forestales no maderables. |
| R_f | Factor de respuesta. |
| SD | <i>Steam Distillation</i> (Destilación por arrastre con vapor). |
| SDE | <i>Simultaneous Distillation-Solvent Extraction</i> (Destilación-extracción con solvente simultánea). |
| SF | <i>Supercritical Fluid</i> (Fluido supercrítico). |
| SFE | <i>Supercritical Fluid Extraction</i> (Extracción con fluido supercrítico). |
| TIC | <i>Total Ion Current</i> (corriente iónica total) |
| Ton | Tonelada(s). |
| t_R | Tiempo de retención, min. |
| μm | Micrometro(s). |
| μL | Microlitro(s). |
| UIS | Universidad Industrial de Santander. |
| US\$ | Dólar(es) estadounidenses. |
| W | Vatio(s). |

RESUMEN:

TÍTULO: ESTUDIO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES EN HOJAS FRESCAS Y SECAS DE *Pelargonium graveolens* (GERANIO), EN FUNCIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y SU ESTADO DE DESARROLLO VEGETATIVO*

Autores: Deyny Leticia Mendivelso Pérez**

Martha Cecilia Olivares Santoyo**

Palabras Claves: *Pelargonium graveolens*; geranio; aceite esencial; citronelol; geraniol.

La especie *Pelargonium graveolens*, es una planta aromática cuyo aceite esencial es muy apetecido en el mercado internacional por sus múltiples aplicaciones en las industrias perfumística y farmacéutica y por su potencial como agente antiinflamatorio, antioxidante, antimicrobiano e insecticida.

En la presente investigación se determinó la composición química de los metabolitos secundarios presentes en hojas frescas y secas de geranio, *Pelargonium graveolens*, cultivado en el terreno experimental de CENIVAM; y se realizó un estudio comparativo de los cambios que ésta puede presentar, teniendo en cuenta las siguientes variables: etapa de desarrollo vegetativo de la planta (6, 9 y 12 meses), métodos de extracción, e.g. hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD), destilación-extracción con solvente simultánea (SDE) y extracción con fluido supercrítico (SFE) y tiempo de extracción por MWHD (30, 60 y 90 min). La composición química del aceite y de los extractos fue establecida por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

El rendimiento de los AEs en las diferentes etapas de desarrollo fue de 0,10–0,20% (base fresca) y 0,47–0,62% (base seca). Los monoterpenos oxigenados (30–40%) fueron los compuestos predominantes en AEs y extractos, dentro de éstos los alcoholes citronelol (11–24%) y geraniol (4–8%), característicos de la esencia. Seguidos de los hidrocarburos sesquiterpénicos (21–29%), en mayor proporción, el 6,9-guaiadieno (6–8%). Se encontraron presentes los respectivos ésteres de citronelilo (14–17%) y de geranilo (9–14%) y los óxidos de rosa (ca. 1,5%). En los extractos aislados por SFE se encontró mayor cantidad de hidrocarburos (Cn>23). La composición química de los AEs de geranio fue poco afectada por el estado de desarrollo de la planta y tiempo de extracción del material vegetal de MWHD.

* Trabajo de grado.

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

ABSTRACT:

TITLE: STUDY OF VOLATILE SECONDARY METABOLITES IN FRESH AND DRY LEAVES OF *Pelargonium graveolens* (GERANIUM), AS A FUNCTION OF EXTRACTION METHOD AND VEGETATIVE DEVELOPMENT STATE *

Authors: Deyny Leticia Mendivelso Perez**
Martha Cecilia Olivares Santoyo**

KEYWORDS: *Pelargonium graveolens*; geranium; essential oil; citronellol; geraniol.

Pelargonium graveolens, is a plant whose aromatic essential oil is highly desired on the international market for its multiple applications in the perfume and pharmaceutical industries, for its potential as anti-inflammatory agent, and for its antioxidant, antimicrobial and insecticidal properties.

Vegetative stage of plant development (6, 9 and 12 months), extraction methods, e.g. microwave assisted hydro-distillation (MWHD) simultaneous distillation-extraction solvent (SDE) and supercritical fluid extraction (SFE) and MWHD extraction time (30, 60 and 90 min) were used as variables in the study of secondary metabolites from fresh and dried *Pelargonium graveolens* leaves collected at the CENIVAM experimental garden. The chemical composition of the oil and extracts were determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS).

The essential oil yield at different stages of development was 0,10–0,20% (dry basis) and 0,47–0,62% (wet basis). Oxygenated monoterpenes (30-40%) were the predominant compounds in essential oils and extracts. Within these, alcohols citronelol (11-24%) and geraniol (4-8%), are characteristic of the essence. Sesquiterpene hydrocarbons (21-29%) followed, formed largely by 6,9-guaiadiene (6-8%). Citronelyl (14–17%) and geranyl (9–14%) esters and rose oxides (ca. 1.5%) were found. SFE extracts contained a higher proportion of hydrocarbons (C_n> 23). The chemical composition of geranium essential oils was little affected by the state of development of the plant and MWHD extraction time.

* College tesis.

** Industrial University of Santander, Science Faculty, School of Chemistry. Directors, Elena E. Stashenko and Jairo René Martínez.

INTRODUCCIÓN

La historia y aún la prehistoria del hombre discurre en una íntima relación con las plantas aromáticas y sus componentes olorosos. Desde que el ser humano comenzó a familiarizarse con gustos y olores que determinaron su hábitat, su comportamiento, sus costumbres, sus medicinas, sus placeres, hasta sus recuerdos, sus deseos y su memoria, desde entonces se enriquecieron con sabores y olores, que fueron formando parte de su cultura y de su idiosincrasia.

Plantas aromáticas son aquellas que pueden generar por algún proceso físico-químico un producto, que tiene un olor o un sabor determinado [1]. De las plantas aromáticas se pueden obtener aceites esenciales (AEs), los cuales son una mezcla de componentes volátiles, producto del metabolismo secundario de estas plantas [2,3], con características odoríficas; éstos se han usado desde la antigüedad para tratar enfermedades y en productos de belleza, debido a que los AEs poseen muchas propiedades beneficiosas, y se presentan cada uno con su identidad, un aroma y unas características propias [3].

La cantidad y la composición del aceite esencial (AE) varían de una especie a otra, y dentro de los mismos géneros de la planta [3]. Además de factores taxonómicos, la composición del AE está influenciada por factores agrícolas, topográficos y climáticos que pueden afectar de alguna manera el metabolismo de las plantas. La composición del AE puede variar significativamente [3].

Los AEs crudos se utilizan como materia prima para velas, artículos de aseo y como biocidas [1, 4, 5]. Los AEs purificados o de alta calidad se usan en la industria alimenticia, farmacéutica, cosmética y de perfumes [3, 5-8].

La flora Colombiana presenta una diversidad tan grande que se justifica su estudio sistemático, con el objeto de detectar la presencia de productos que puedan ser interesantes como materias primas de valor en diversos campos industriales o de aplicación farmacéutica. Particularmente, una de las plantas aromáticas, cuyo AE es muy apetecido en el mercado internacional, es geranio, *Pelargonium graveolens*, encontrado en nuestro territorio como planta introducida, y cuyo aceite es de gran interés por el contenido alto de citronelol y geraniol [3]. El citronelol es un alcohol terpénico con intenso olor a rosas. El geraniol se utiliza como componente aromatizante de productos de perfumería; en la industria química se usa para la síntesis de citronelol, citral, acetato de geranilo y otros compuestos de interés perfumístico [2].

En la actualidad, el mercado mundial de los AEs ha experimentado un aumento, como consecuencia del cambio de patrones en el consumo debido a la tendencia de la utilización de productos naturales. Por otra parte, a pesar de que Colombia cuenta con una gran riqueza en cuanto a número de especies vegetales capaces de servir como fuente de los AEs, la industria nacional importa el 100% de estas materias primas, alcanzándose importaciones de US\$ 54 millones en el periodo 1997-2001 [1, 9]. En el periodo 2002-2004 las importaciones alcanzaron un valor de US\$ 824 millones. Además, las importaciones colombianas presentan un comportamiento continuo y estable, observándose pequeñas variaciones entre algunos periodos, pero con una tendencia general al aumento. Dentro de los AEs utilizados como materia prima en muchas industrias colombianas se encuentran los siguientes: mentas, naranja, limón, eucalipto, lavanda, anís, bergamota, vetíver, jazmín y geranio [1].

Analizando las cifras anteriores, se observa la viabilidad de producción de AEs en Colombia, en primera instancia, para la satisfacción del mercado local y, posteriormente, mercado internacional, porque éste va en aumento. Particularmente, el AE de geranio, cobra importancia en el mercado mundial,

ya que se encuentra dentro de los diez aceites más importantes en cuanto a su valor comercial [10, 11], porque es uno de los aceites con mayor demanda en la industria perfumística y farmacéutica, y alcanza exportaciones anuales de 600 toneladas [1, 7-11].

En Colombia, las exportaciones de aceite de geranio en el periodo 1998-2004 fueron nulas [1,9], mientras que en el periodo 2002-2004 sus importaciones en el país alcanzaron los US\$ 5,4 millones [9], con un precio del aceite en el mercado de 47,50 €/kg [5]. Las principales industrias que demandan este AE son las de alimentos y bebidas, industria cosmética y de perfumes [1].

En términos generales, Colombia ha sido un país importador de AE de geranio. La manera de revertir este hecho es sustituir su importación por producción nacional, siendo éste un renglón del mercado que no ha sido aprovechado económicamente debido a que no se han realizado en nuestro país estudios que identifiquen las condiciones bajo las cuales se obtiene el mejor rendimiento de este aceite, estudio, que puede servir como base para incentivar a las comunidades campesinas para cultivar, extraer y comercializar el AE de esta planta aromática, permitiendo adelantar programas y proyectos productivos para el aprovechamiento sostenible y rentable del sector agrícola del país.

En la presente investigación se determinó la composición química de los metabolitos secundarios presentes en hojas frescas y secas de geranio, *Pelargonium graveolens*, y se realizó un estudio comparativo de los cambios que ésta puede presentar, teniendo en cuenta las siguientes variables: etapa de desarrollo vegetativo de la planta (6, 9 y 12 meses) y métodos de extracción, e.g. hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHd), destilación-extracción con solvente simultánea (SDE) y extracción con fluido supercrítico (SFE). La composición química del aceite y de los

extractos fue establecida por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), determinando también índices de Kovàts en columnas capilares de fases apolar y polar. La cuantificación de compuestos presentes en el AE de geranio se realizó utilizando los métodos cromatográficos de patrón interno y calibración externa.

Este trabajo hace parte de la línea de investigación sobre AEs del Laboratorio de Cromatografía del Centro de Investigación en Biomoléculas, CIBIMOL, de la Universidad Industrial de Santander, UIS, y del Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales, CENIVAM. Con el desarrollo de este trabajo se buscó la obtención de información necesaria para incentivar la agroindustria de *Pelargonium graveolens* en Colombia, y así suplir en futuro su demanda interna, generando una alternativa agrícola y, por ende, una nueva fuente de empleo para el campo, así como una de las opciones para la sustitución de cultivos ilícitos, cambio en las políticas de monocultivo y la posibilidad de ofrecer a nivel internacional un AE de geranio, con factibilidad económica.

Resultados parciales de este Proyecto fueron presentados bajo la modalidad de póster en el IX Congreso Colombiano de Fitoquímica, realizado en Pereira (Risaralda), en mayo del 2007, al cual se le otorgó el Primer Puesto en esta modalidad (**Anexo 1**).

El trabajo de investigación consta de 9 capítulos, contiene 48 figuras, 18 tablas, 141 referencias bibliográficas y 5 anexos.

1. ESTADO DEL ARTE

1.1 GENERALIDADES DE LA PLANTA

La planta *Pelargonium graveolens*, conocida popularmente como geranio, pertenece a la familia *Geraniaceae*, procede casi exclusivamente de la región sudafricana del Cabo. Desde allí llegó hasta Europa el primer geranio en el año 1710. El *Pelargonium* debe su nombre a la forma de sus frutos, llamado pico de cigüeña (pelargos=cigüeña) [11-14].

Es un arbusto perenne (**Figura 1**), aproximadamente de 60–90 cm de altura, con tallo ramificado, cilíndrico y leñoso en la base, pubescente, verde, cuando joven, volviéndose castaño con la edad. De hojas alternadas, de olor, a rosas y altamente aromáticas, de flores con diámetro entre 2,5 y 4 cm, son rosas con jaspeaduras violáceas [12, 15].



Figura 1. Planta de *Pelargonium graveolens*.

El geranio crece bien en tierras ricas en materia orgánica con pH 5,8–6,6. Las tierras fuertemente arcillosas y anegadas no son convenientes. La planta crece mejor en climas subtropical y tropical, y en una amplia variedad de altitudes, con una temperatura media entre 30-35 °C, con humedad baja y lluvia moderada [11, 16].

El geranio se propaga vegetativamente por esquejes de aproximadamente 15 cm de largo. Según recientes estudios realizados en el Sur de la India se encontró que el período óptimo en el que se deben plantar los esquejes es de noviembre a enero, sin embargo, éstos pueden plantarse a lo largo del año [16].

A las seis semanas de plantados los esquejes, éstos se transplantan a campo a una distancia de 60x60 cm entre surcos y entre plantas, respectivamente [17]. El campo se debe irrigar inmediatamente después de plantar. La irrigación frecuente se requiere en las fases iniciales de crecimiento [16].

La primera cosecha se obtiene 4-6 meses después de plantar, cuando se presenta un cambio en el olor de las hojas de limón a rosa, se hace el primer corte del material sobre las hojas verdes y frondosas. El siguiente corte se puede realizar a los 4 meses de haber realizado el primer corte, obteniéndose así 3 cosechas en el año aproximadamente.

Es recomendado como fertilizante aplicar 4 kg/ha de nitrógeno, 40 kg/ha de fósforo y 40 kg/ha de potasio en el momento de plantar. El fertilizante orgánico preparado se debe utilizar en el momento de plantar [12, 15].

1.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA

El AE de geranio cobra importancia en el mercado mundial, ya que se encuentra dentro de los diez aceites más importantes en cuanto a su producción y valor comercial [10, 11], siendo uno de los aceites con mayor demanda en la industria perfumística y farmacéutica, debido a su nota floral muy similar a la de la esencia de rosas. Las propiedades fisicoquímicas de este aceite se citan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del aceite esencial de geranio [18, 19].

| Propiedad | Valor |
|---|-----------------------|
| Índice de acidez | máx. 12 |
| Contenido de ésteres (como tiglato de geranilo) | 21–32% |
| Contenido de cetonas (como mentona) | 6–13% |
| Rotación óptica | -7° a -14° |
| Índice de refracción (20°C) | 1,461-1,468 a 20° |
| Solubilidad | 1:1 en alcohol al 70% |
| Gravedad específica (20 °C) | 0,884-0,893 |
| Contenido de alcoholes (como geraniol) | 65-73% |

Los constituyentes mayoritarios del aceite de geranio son citronelol (20–40%) y geraniol (7-18%) [2, 11], cuyas propiedades se resumen en las **Tablas 2 y 3**.

Otros constituyentes reportados son α -pineno (0,3-1%), β -pineno (0,04-0,06%), α -terpineno (0,1-0,4%), linalool (4-13%), nerol (ca. 2%) [11]. Compuestos minoritarios, pero importantes ingredientes del olor del AE de geranio, son los óxidos de rosa los cuales contribuyen a una nota olfativa a rosas [20].

Los óxidos de rosa se obtienen sintéticamente por oxigenación fotoinducida del (-)-citronelol, con rendimientos superiores al 70%, actualmente, se obtienen por biotransformación del (R)-(+)- y (S)-(-)-citronelol por *Aspergillus niger*, cuando el sustrato se convierte en *cis*- y *trans*-óxidos de rosa, con rendimientos superiores al 54% [20].

Nishimura [21] en 1995, utilizó un inyector con desorción térmica, seguido de un *cold-trap*, como parte de un sistema de GC multidimensional para el análisis del aceite de geranio, identificando algunos de los componentes minoritarios, a saber: terpinen-4-ol, piperitona, geranial, formiato de citronelilo, *trans*- β -cariofileno, propionato de citronelilo, isobutirato de citronelilo, (E,E)- α -farneseno y δ -cadineno. Sin embargo, los constituyentes mayoritarios y en trazas pueden variar considerablemente dependiendo de las condiciones climáticas de crecimiento de la planta [22, 23].

Benveniste y Azzo [24] en 1992, reportaron la composición de aceite de geranio cultivado en Egipto, en el cual los componentes mayoritarios eran el citronelol (ca. 24%) y el geraniol (ca. 15%). Estos mismos autores compararon la composición química del AE producido en la isla Reunión (Bourbon), China (Yunnan) y Egipto; encontrando que el citronelol fue el componente mayoritario en todos los AE analizados, seguido del geraniol; sin embargo, el AE producido en China contenía mayor cantidad relativa de citronelol (ca. 39%), mientras que el contenido más alto de geraniol (ca. 21%) se encontró en el AE producido en la isla Reunión.

Kaul y otros [25] en 1995, evaluaron la composición química del AE obtenido de tres tipos de *Pelargonium graveolens* de diferentes orígenes y cultivados en la India, utilizando hidrodestilación y destilación por arrastre con vapor, encontraron como componente mayoritario citronelol en el AE de Bourbon, geraniol en el AE de Kelkar, mientras en el AE de Argeria se encontró en mayor proporción una mezcla de citronelol y nerol.

Tabla 2. Usos y propiedades fisicoquímicas del geraniol [18,26].

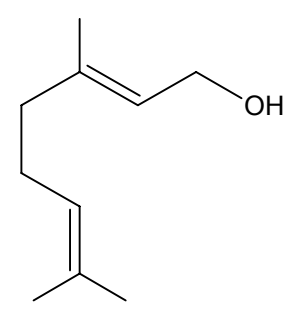
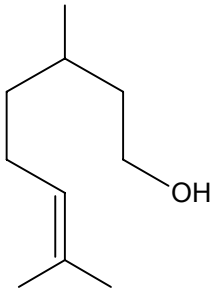
| GERANIOL | | |
|-------------------------|--|---|
| Fórmula: | C ₁₀ H ₁₈ O | Consumo anual: ca. 1000 kg |
| P.M.: | 154,24 | Descripción: Líquido transparente e incoloro. De olor suave y floral similar al de la esencia de rosas. |
| CAS#: | 106-24-1 | |
| Pto. Ebullición: | 230 °C | |
| η_D^{20} : | 1,469 – 1,478 | |
| δ (20/4): | 0,870 – 0,885 g/cm ³ | |
| Sinónimos: | <i>trans</i> -Geraniol; <i>trans</i> -3,7-Dimetil-2,6-octadien-1-ol; Guaniol; Lemonol; Geraniol extra; 3,7-Dimetil- <i>trans</i> -2,6-octadien-1-ol; (E)-3,7-Dimetil-2,6-octadien-1-ol; Meranol; (2E)-3,7-Dimetil-2,6-octadien-1-ol; (E)-Geraniol. |  |
| Estereoisómeros: | (Z)-3,7-Dimetil-2,6-octadien-1-ol. (E) -3,7-Dimetil-2,6-octadien-1-ol. | |
| Solubilidad: | Soluble en alcohol al 70%, en una proporción 1:3. | |
| Fuente natural: | Presente en más de 160 AEs. Se obtiene por destilación fraccionada de AEs ricos en geraniol, como: AE de palmarrosa (95%); AE de rosa (40-50%); AE citronela (30-40%); | Usos: Industria perfumística, cosmética, jabones, alimentos y bebidas. Se usa en pequeñas cantidades para acentuar la nota cítrica de algunos productos perfumísticos. Materia prima para la fabricación de ésteres de geraniol, citronelilo y citrilo, utilizados en la industria de perfumes. |
| Síntesis: | Se obtiene por : ✓ Oxidación del mircenol. ✓ Isomerización del linalool, obteniéndose geraniol con un 96% de pureza. | Actividad biológica: Antiséptico. |

Tabla 3. Usos y propiedades fisicoquímicas del citronelol [18, 26-28].

| CITRONELOL | | |
|--------------------------|--|--|
| Fórmula: | C ₁₀ H ₂₀ O | Consumo anual: ca. 19000 kg |
| P.M.: | 156,27 | Descripción: Líquido transparente e incoloro. De olor floral, herbáceo, con un matiz cítrico frutal, similar al de la esencia de rosas. El isómero (-) posee un olor más delicado, que el isómero (+). |
| CAS#: | 106-22-9 | |
| Pto. Ebullición: | 224,4 °C | |
| η_D^{20} = | 1,4558 | |
| δ^{20} : | 0,8590 g/cm ³ | |
| Sinónimos: | β -Citronello; 3,7-Dimetil-6-octen-1-ol; Cefron; Citronelol; 2,6-Dimetil-2-octen-8-ol; 2,3-Dihidrogeraniol; R-(+)- β -Citronelol; R-(+)-3,7-Dimetil-6-octen-1-ol. |  |
| Isómeros ópticos: | (R)-3,7-Dimetil-6-octen-1-ol. (S)-3,7-Dimetil-6-octen-1-ol. | |
| Solubilidad: | Soluble en alcohol al 70%, en una proporción 1:2 y muy poco soluble en agua. | |
| Fuente natural: | <p>Presente en más de 70 AEs. Las dos formas enantioméricas del citronelol, se pueden encontrar abundantemente en diferentes esencias, e.g. AE de rosa Búlgara. En el AE de <i>Rosa bourbonia</i> se encuentra hasta un 50% de (-)-citronelol, mientras que el AE de geranio del Este de África contiene hasta un 80% de (+)-citronelol.</p> <ul style="list-style-type: none"> ✓ (-)-Citronelol se encuentra en plantas de la familia <i>Rosaceae</i>. ✓ (+)-Citronelol está presente en las especies <i>Boronia citriodora</i> (80%) y <i>Eucaliptus citriodora</i>. ✓ (-)-Citronelol es el enantiómero predominante en el AE de geranio y en el AE de rosas. <p>También está presente en AE de citronela y <i>Eucaliptus citriodora</i>.</p> | <p>Usos:</p> <p>Ampliamente utilizado en las industrias de perfumes, cosmética, farmacéutica, alimentos y en bebidas.</p> <p>Utilizado para acentuar la nota floral de productos perfumísticos y en la industria de sabores para acentuar el sabor cítrico.</p> |

Continuación **Tabla 3**

| | | |
|-------------------------|--|---|
| <p>Síntesis:</p> | <ul style="list-style-type: none"> ✓ (±)-Citronelol puede ser preparado por hidrogenación catalítica del geraniol o por oxidación del <i>allo</i>-cimeno; ✓ (-)-Citronelol es preparado a partir del (+)-pineno vía (+)- <i>cis</i>-pineno a (+)-2,6-dimetil-2,7-octadieno y, finalmente, se separa el (-)-citronelol por hidrólisis con catalizadores orgánicos de aluminio. ✓ El citronelol se puede obtener además por hidrogenación del citronelal, usando estabilizantes poliméricos de metales nobles coloidales; por hidrogenación en fase líquida de citral, utilizando catálisis química, así como por la biotransformación del citronelal con células de <i>Rhodotorula minuta</i>, libres o inmovilizadas. | <p>Actividad biológica:</p> <p>Antiséptico, anticonvulsinante, antioxidante.</p> |
|-------------------------|--|---|

En 1995, Lutra y sus colaboradores [29] examinaron la composición del AE obtenido de las hojas de geranio en diferentes etapas de maduración, encontrando que a medida que crece la planta, el contenido de citronelol es mayor, observándose una tendencia inversa con el geraniol. Por lo cual, el AE que presenta las mejores características es aquel que se extrae de las hojas totalmente expandidas, debido a que el contenido de citronelol y geraniol es similar. En conclusión, la variación de los componentes mayoritarios depende de la edad de la planta.

En 1993, Mallavarapu [30], comparó los resultados obtenidos del análisis realizado por GC-MS del aceite de geranio comercial con una muestra del aceite proveniente de un cultivo local de India, en el cual encontró como componentes mayoritarios geraniol (ca. 43%) y linalool (ca. 17%), mientras que en la muestra comercial predominaron citronelol+nerol (ca. 29%) y neral (ca. 17%).

Reis y sus colaboradores [31], compararon la composición química de los extractos obtenidos por *headspace*, con los aislados con CO₂-SF y por arrastre con vapor, de las plantas frescas y secas de geranio cultivadas en Portugal, observando un alto nivel de *cis*- y *trans*-óxidos de rosa (ca. 11-25%), lo cual es extremadamente inusual, por lo que se podría considerar llegar a tener una fuente natural de estos compuestos. Otros componentes mayoritarios encontrados fueron citronelol (ca. 13-20%), formiato de citronelilo (ca. 10-23%), *iso*-mentona (ca. 12-23%) y geraniol (ca. 1-7%).

Kreis y Mosandl [32] en 1993, usaron GC multidimensional para determinar simultáneamente las relaciones enantioméricas de más de un par quiral de constituyentes oxigenados, estableciendo la distribución enantiomérica de siete compuestos oxigenados característicos de un aceite de geranio auténtico de isla Reunión; convirtiéndose este procedimiento en una herramienta útil para examinar la autenticidad de aceites comerciales.

En 1990, Koenig y sus colaboradores [33] usaron análisis GC enantioselectivo que mostró que el citronelol presente en el AE de geranio comercial estaba parcialmente racemizado. En 1994, Ravid y otros [34] usaron una columna de quiralidad diferente a la utilizada por Kreis y Mosandl, y comprobaron, que la mentona y la *iso*-mentona existían en el AE de geranio en las formas (+)-(1S, 4R)- y (-)-(1S, 4S)-, respectivamente.

Southwell y colaboradores [35, 36] en 1995, compararon la composición del AE de geranio producido en la isla Reunión (tipo Bourbon), Marruecos, Egipto y China con un AE producido en Australia; los componentes mayoritarios identificados se muestran en la **Tabla 4**; la composición química del aceite de Australia fue similar a la del aceite de China, que se usa comúnmente en la perfumería; la relación de los compuestos mayoritarios en los AEs de la isla Reunión, Marruecos y Egipto fue muy parecida.

Tabla 4. Comparación de la composición química de aceite de geranio, cultivado en diferentes países [35, 36].

| Compuesto | Cantidad relativa, % | | | | |
|-------------------------|----------------------|-----------|--------|-------|-----------|
| | Reunión | Marruecos | Egipto | China | Australia |
| Linalool | 9,9 | 9,9 | 0,5 | 3,9 | 4,6 |
| <i>iso</i> -Mentona | 9,5 | 4,2 | 5,7 | 5,4 | 7,6 |
| Citronelol | 20,6 | 28,6 | 27,7 | 36,5 | 31,7 |
| Geraniol | 18,1 | 20,6 | 18,0 | 8,7 | 9,8 |
| Formiato de citronelilo | 7,4 | 6,5 | 6,5 | 10,1 | 12,8 |
| Formiato de geranilo | 5,6 | 4,1 | 3,7 | 2,1 | 3,4 |
| 6,9-Guaiadieno | 5,8 | 0,5 | 0,3 | 6,5 | 4,6 |

En el año 2002, Rana V. y colaboradores [22] analizaron por GC y GC-MS el aceite de *P. graveolens*, obtenido por hidrodestilación durante 4 h, de plantas cultivadas al norte de India, logrando identificar aproximadamente un 99% de los componentes presentes en el aceite; los constituyentes mayoritarios fueron citronelol (ca. 33%), geraniol (ca. 26%), linalool (ca. 10%) y formiato de citronelilo (ca. 6%).

En 2003, Ram y otros [37] estudiaron la influencia de cuatro niveles de fertilización (0, 80, 160 y 240 kg N/ha) en la composición y el rendimiento del AE de geranio, cultivado en la India, observándose que el uso de un nivel de fertilización de 160 kg N/ha provee las mejores condiciones de producción, aumento en la masa vegetal y en el rendimiento del AE. Además, se concluyó que la calidad del AE en cuanto a sus constituyentes mayoritarios, citronelol y geraniol, no fue influenciado por la cantidad de nitrógeno suministrado al suelo [37].

Robert Shellie y Philip Marriot [38], en el año 2003, analizaron el AE de *P. graveolens* usando cromatografía total (exhaustiva), GCxGC, identificando 65 componentes por comparación de sus índices de retención y los espectros de masas con los datos de la literatura.

En 2004, Paula Gomes y colaboradores [39] examinaron la composición del AE de un híbrido obtenido entre diferentes especies de *Pelargonium sp.* de cultivos de Portugal, encontrando que este aceite tenía características intermediarias entre el tipo Bourbon y el tipo China, con buena calidad olfativa. Los AEs de hojas verdes y amarillas tanto frescas como secas fueron comparados, además se emplearon diferentes métodos de extracción con solvente, determinando y comparando la composición de los extractos con la del AE. Los autores concluyeron que usar hojas amarillas y secas mejora la calidad del AE. Por otra parte, el absoluto obtenido con dietil éter presentó las mejores características organolépticas.

En este mismo año, Penny Horsey [40] determinó la composición química del AE de geranio de Kenia, obtenido por destilación, encontrando como componentes mayoritarios citronelol (ca. 36%), geraniol (ca. 14%) y formiato de citronelilo (ca. 10%); un problema práctico que se presentó fue la ausencia de floración en las plantas, posiblemente, debido a la altitud a la que fueron cultivadas (1650-1900 m.s.n.m).

Rodolfo Juliani y colaboradores [41] en 2006, evaluaron la calidad del aceite de *Pelargonium sp.* de diferentes países del Sur y Este de África, basada en la determinación de propiedades organolépticas, fisicoquímicas y químicas. Los resultados claramente demostraron que la selección de un quimiotipo específico de *Pelargonium* con características organolépticas y químicas aceptables, es uno de los factores clave para la obtención de un AE de alta calidad; además, factores ambientales (bióticos y abióticos) pueden alterar la composición y el rendimiento del AE. Factores bióticos como la presencia de maleza, pueden afectar la producción de biomasa, así como también la composición del aceite y su rendimiento. Además las actividades post-cosecha, el método de destilación y la co-destilación de la biomasa con maleza, afectan también la calidad del aceite.

Este estudio demuestra la importancia de establecer programas de control de calidad, para que los AEs cumplan con las normas internacionales, requisito previo para el establecimiento y posicionamiento de un AE en el mercado.

Peterson, Machmudah y otros [42] en 2006, obtuvieron por CO₂-SFE extractos de geranio. Se encontró, que a presiones bajas (10 MPa) y temperaturas relativamente altas (70 °C), se extrae una apreciable cantidad de ceras, pero a presiones más altas (30 MPa) y temperaturas más bajas (40 °C), su cantidad disminuye; bajo estas condiciones, se alcanzó un rendimiento máximo de extracción del 2,53%. Las muestras fueron analizadas por GC-MS, encontrando que las cantidades relativas (%) de hidrocarburos terpénicos, terpenoles, geraniol y ésteres de geranilo dependen significativamente de la presión y el tiempo de extracción. Las muestras obtenidas por CO₂-SFE se compararon con un aceite comercial, obtenido por arrastre con vapor; los componentes mayoritarios del aceite comercial de geranio fueron los mismos presentes en el extracto obtenido por SFE, sin embargo, en cantidades relativas (%) diferentes.

Paula Gomes y otros [43] en 2006, diseñaron un equipo de SFE (utilizando CO₂ como solvente de extracción), con el fin de obtener extractos naturales de geranio cultivado en Portugal. En esta investigación estudiaron el efecto de los parámetros de operación del equipo sobre el rendimiento y la composición de los extractos, a saber: tiempo de extracción, presión, temperatura, tratamiento previo del material vegetal y modo de operación (estático/dinámico). Se encontraron las mejores condiciones de extracción, a saber: tiempo de extracción 15-30 min, temperatura 40 °C, presión 9-10 MPa, material vegetal picado y operación del equipo en modo dinámico.

El extracto obtenido por SFE presentó calidad organoléptica superior a los obtenidos con solventes orgánicos y AEs aislados por HD, con un carácter

floral/frutal y un color amarillo pálido, adecuado para el uso en perfumería. El rendimiento de la extracción varió entre 0,019 y 0,22% [43].

1.3 PROPIEDADES BIOLÓGICAS

En el estudio realizado por Chandravadana y Nidry [44] en 1994, se reportó que la actividad antifúngica del AE de geranio contra el *Colletotrichum gloesporoides* se debía al citronelol y al geraniol presentes en el AE, en cambio, el linalool no mostró actividad antifúngica. En 2003, Frank Greenway y colaboradores [45], observaron que la aplicación tópica del aceite de geranio obtenido por arrastre con vapor ayuda a aliviar los dolores de la neuralgia.

En un estudio realizado en 2005, por Sun y colaboradores [46], se evaluó el efecto antioxidante del aceite obtenido por destilación, de brotes, tallos y hojas de *P. graveolens*, utilizando el método de atrapamiento del radical DPPH[•] (1,1-difenil-2-picril hidracilo); se observó, que el aceite obtenido de las hojas recolectadas al medio día presentó efecto antioxidante muy fuerte, así como el hidrolato de la destilación.

Abo y sus colaboradores [4] en 2005, utilizaron AEs, entre ellos, el de geranio, en la formulación de biocidas, debido a que estos aceites presentaron actividad bactericida pronunciada contra algunos microorganismos patógenos de las plantas; por la efectividad observada, estos biocidas naturales podrían reemplazar pesticidas sintéticos usados contra diferentes patógenos de las plantas.

En 1997, Lis-Balchin y sus colaboradores [47] encontraron que el AE de geranio obtenido por arrastre con vapor presenta propiedades antiespasmolíticas.

En general, el AE de geranio exhibe potencial como agente antiinflamatorio, antimicrobiano, antifúngico, antioxidante, antibacterial e insecticida [48-52].

1.4 USOS

El AE de geranio se usa ampliamente como nota aromática de “corazón” en perfumes, debido a su carácter exótico y floral, similar al de la esencia de rosas; así como en fragancias, en cosmética (cremas y jabones), en aromaterapia y para la extracción de rodinol comercial (mezcla de linalool, citronelol y geraniol) [23]. También, se utiliza como agente saborizante en comidas y bebidas alcohólicas [50, 53].

En medicina popular, el zumo de las hojas de geranio se emplea como hemostático local y la decocción de las hojas, contra disenterías, diarreas, para tratamiento de heridas, reducción de la fiebre, hemorroides y gonorrea [54, 55].

Entre los diferentes AEs, el de geranio, se conoce como “Aceite de las mujeres”, porque es benéfico durante la menstruación y la menopausia. También ayuda a combatir enfermedades de la piel, como eczemas y pie de atleta, aliviar el dolor y enfermedades de las vías respiratorias [51].

En el caso particular, el AE de geranio (*Pelargonium graveolens*) tiene grandes ventajas económicas debido a su alto contenido en citronelol y geraniol usados ampliamente en la perfumería e industria cosmética. La demanda internacional actual del AE de geranio está alrededor de 600 toneladas anuales, mercado representado por India, China, Marruecos, Egipto, isla Reunión y Sudáfrica [12].

1.5 GENERALIDADES DE LOS ACEITES ESENCIALES.

1.5.1 Definición. El AE es una mezcla de componentes volátiles, producto del metabolismo secundario de las plantas [2]. La biosíntesis de estos metabolitos secundarios suele hallarse restringida a fases específicas del desarrollo, tanto del organismo como de las células especializadas, y a períodos de estrés, por ejemplo, por la deficiencia de nutrientes, factores ambientales, o el ataque de microorganismos, entre otros [56, 57].

Se le llama “aceite” por su apariencia física y consistencia, que es bastante parecida a la de los aceites grasos, pero los AEs se distinguen de ellos, porque al dejar caer unas gotas sobre el papel, éstas se volatilizan fácilmente sin dejar ninguna huella, ni mancha grasosa [2].

1.5.2 Composición química. Como parte del intrincado metabolismo de las plantas, las esencias abarcan una gama muy variada de constituyentes [58], que pueden ser agrupados básicamente en dos fracciones, una fracción volátil que constituye aproximadamente del 90-95 % del total del aceite y contiene hidrocarburos monoterpénicos, sesquiterpénicos y sus derivados oxigenados (aldehídos alifáticos, alcoholes y ésteres), que son los que transmiten a los AEs el aroma que los caracteriza; y una fracción no volátil que constituye del 5-10% del aceite y contiene hidrocarburos lineales, ácidos grasos, esteroides, carotenoides, ceras, flavonoides [6], y, cada vez más, a medida que se avanza en el conocimiento de su composición se conocen una heterogénea y variada cantidad de compuestos heterocíclicos [3, 56, 59, 60].

Una planta puede generar una gran variedad de mezclas de sustancias aromáticas, dependiendo de diversos factores, algunos intrínsecos de la especie vegetal, y otros dependientes del medio ambiente o de los procesos extractivos empleados, que en definitiva son los que le dan la unicidad a la

composición química [3]. Por tanto, siendo los AEs parte del metabolismo de una planta, su composición química está constantemente en cambio, modificándose las proporciones de sus constituyentes o transformándose unos constituyentes en otros, según la parte de la planta empleada (hojas, tallos, raíces, flores y frutos), el momento de su desarrollo o el momento del día [3, 56, 59].

El valor comercial y el uso del AE dependen básicamente de su composición química [2], la cual está condicionada por diversos factores, tales como la edad de la planta y su estado fenológico, las condiciones geobotánicas (tipo de suelo, clima, altitud, latitud, intensidad lumínica, pluviosidad) y agrícolas de su cultivo (abonos, fertilizantes y pesticidas), la época de recolección y parte de la planta (raíz, tallos, hojas, semillas), el método de extracción (e.g. hidrodestilación, arrastre con vapor, etc.), su duración y la temperatura empleada, el estado y procedencia de la planta (material fresco, seco, fermentado, tipo de tratamiento postcosecha) [3, 61, 69]. Más aún, debe tenerse en cuenta que dada su normalmente compleja composición, presentan una significativa probabilidad de sufrir modificaciones, ya sea por reacciones entre sus propios constituyentes, o, entre éstos y el medio (e.g. la luz, la temperatura, presencia de enzimas, los componentes del material en el cual se almacenan, etc.) [3].

Actualmente se han analizado más de tres mil AEs de un gran número de especies botánicas [2]. Más de doscientos aceites tienen un valor comercial y se utilizan ampliamente en diferentes ramas de la industria (alimentos, jabones, ambientadores, perfumes, cosméticos, licores, insecticidas, fármacos, etc.) [2, 6]. Es evidente que un AE está en permanente cambio, no solamente mientras forma parte del metabolismo de la planta, sino también después de extraído, lo cual permite la obtención de distintos productos aromáticos [3], y con grandes diferencias en cuanto a sus características físico-químicas y organolépticas.

1.5.3 Metabolitos secundarios. Consisten en una amplia y variada selección de compuestos orgánicos producidos por las plantas, los cuales aparentemente no tienen una función directa en el crecimiento y desarrollo de éstas, pues no se ha encontrado una relación entre los metabolitos secundarios y los diferentes procesos de fotosíntesis, transporte de solutos, respiración, síntesis de proteínas, asimilación de nutrientes, y la diferenciación de carbohidratos, lípidos y proteínas [3, 60]. Sin embargo, los metabolitos secundarios han demostrado tener un papel vital en las relaciones ecológicas de las plantas, tales como: servir de atrayentes para polinizadores y animales dispersores de semillas, así como mecanismos de defensa (aleloquímicos) contra herbívoros, microbios patógenos, por sus actividades antifúngica y antibacterial, y la relación con otros vegetales (alelopatía), proveer protección contra radiación UV [62, 63].

Esta defensa, sin lugar a dudas, ha hecho parte de cambios evolutivos en las rutas metabólicas, creando compuestos que no fueran excesivamente tóxicas para éstas y que no implicaran un costo energético lo suficientemente elevado para su desarrollo, permitiendo así que las plantas con estas características y mediante mecanismos de selección natural continuaran existiendo. Desde el punto de vista fisiológico, y gracias a su alta volatilidad, los AEs pueden actuar como reguladores del potencial hídrico evitando la deshidratación. Esta función podría explicar lo diverso de su localización y su posible variación durante un ciclo fenológico [3, 60, 64].

Los metabolitos secundarios, a diferencia de los primarios, tienen una restringida distribución y no se encuentran en todo el reino vegetal, sino en un género, o en grupo de especies determinado, y en ocasiones en una especie en particular, manifestando la individualidad de la misma [60,62].

La biosíntesis y la acumulación de aceite esencial ocurren, por norma general, en células epidérmicas modificadas, aunque dependiendo de la familia o género, también pueden acumularse en otras estructuras como tallos, raíces, flores y frutos.

Los metabolitos secundarios pueden clasificarse según su estructura química en tres grupos, a saber: (1) terpenos o terpenoides; (2) fenoles y sus derivados, y (3) alcaloides [56, 57, 60, 64]. La relación entre los metabolitos primarios y secundarios se ilustra en la **Figura 2**.

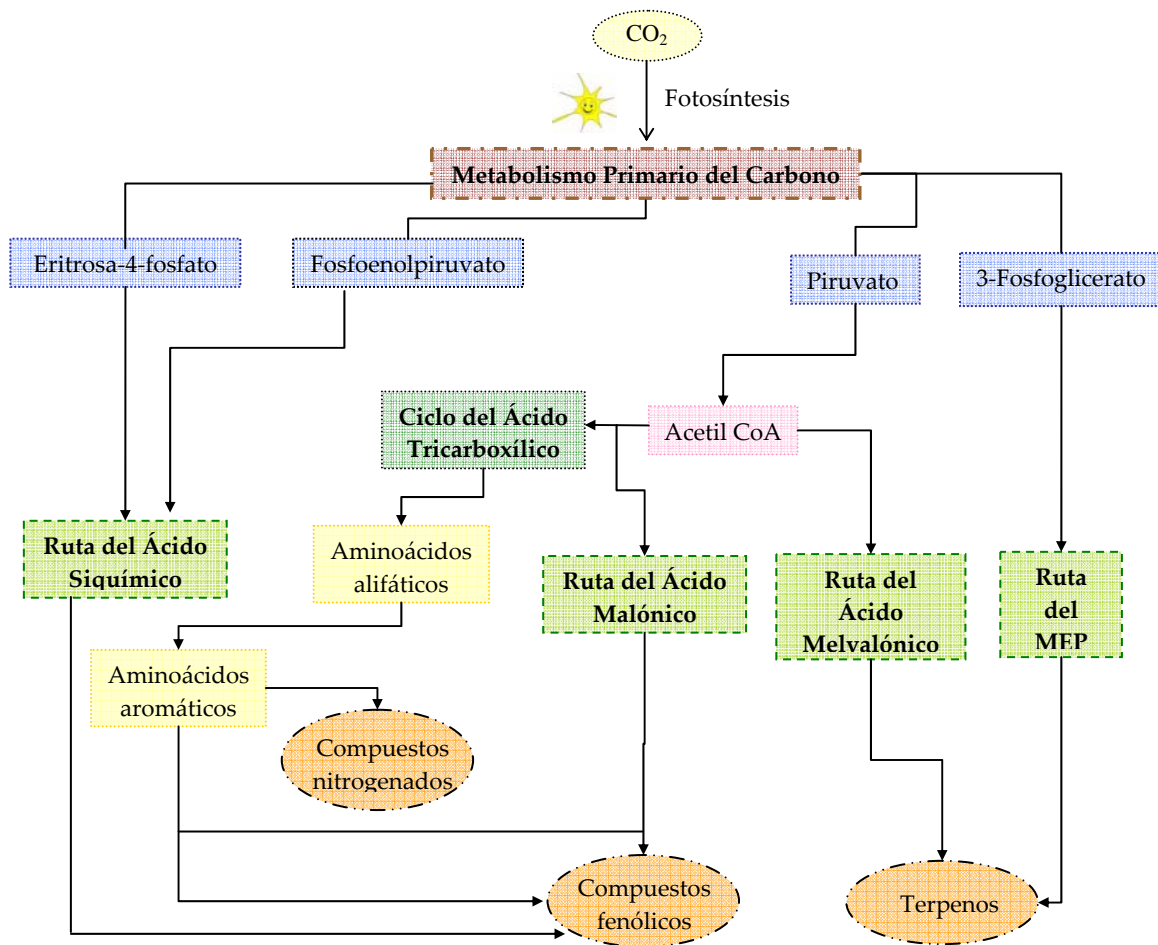


Figura 2. Principales rutas en la biosíntesis de metabolitos secundarios de plantas y su relación con el metabolismo primario [60].

Los terpenos o terpenoides constituyen una clase amplia de compuestos, que generalmente son insolubles en agua y pueden ser sintetizados por intermediarios de la acetil-CoA, o, glicolíticos, bajo dos rutas metabólicas ampliamente estudiadas, *i.e.* la ruta del ácido mevalónico y/o la ruta del metileritriol fosfato (MEP, por sus siglas en Inglés, *methylerythritol phosphate*) [57,60]. Con base en el número de átomos de carbono, los terpenos se pueden clasificar en monoterpenos, C₁₀, sesquiterpenos, C₁₅, diterpenos, C₂₀ [56, 64], estos últimos presentan un peso molecular más alto y menor volatilidad, en comparación con los monoterpenos y sesquiterpenos. Sus características moleculares y estructurales dificultan la extracción de los mismos. Por este motivo, los diterpenos no suelen considerarse componentes del aceite volátil, porque no todos los diterpenos se logran extraer, y los extraídos no lo son al 100% [2, 60,64].

Los compuestos fenólicos y sus derivados desempeñan un papel importante en la protección de la planta, *e.g.* los flavonoides pueden actuar como antioxidantes. Por la ruta del ácido shiquímico son sintetizados aminoácidos aromáticos y ciertos polifenoles. Los aminoácidos son precursores de los alcaloides y antibióticos naturales, los flavonoides son formados por síntesis mixta de la ruta del ácido shiquímico y del acetato-malonato [56].

1.5.4 Localización de los AEs en la planta. Los AEs se pueden encontrar en diferentes partes de la planta, por ejemplo, en las hojas, en las raíces, en las flores, en la cáscara del fruto, en los frutos [2, 65]. En ocasiones las diferentes partes de la misma planta suministran esencias distintas en su composición como, por ejemplo, los aceites extraídos de la raíz, el tallo y las hojas del hinojo. La cantidad y composición del aceite varía de una especie a otra, y dentro de los mismos géneros de la planta.

1.5.5 Tratamiento postcosecha del material vegetal. Las plantas aromáticas pueden ser comercializadas frescas, enteras o cortadas; pero en la mayoría de los casos se las somete a un proceso de secado, dado que esta operación representa una de las mejores alternativas de estabilización y conservación del material vegetal [3, 66, 67].

El material cosechado con destino a la extracción de AEs, puede sufrir distinto tratamiento según la especie y el método de extracción utilizado. Cuando se cosecha material herbáceo o fresco, en general, se recomienda un proceso de oreado o deshidratado parcial, debido a que el proceso de secado permite reducir el volumen y el peso del material vegetal; lo que facilita su almacenamiento, transporte y manipulación durante la extracción, y por tanto permite reducir fletes, costos de embalaje y almacenamiento [3, 65].

El proceso de secado tiene por objeto eliminar la humedad, y con ello, la posibilidad de que las enzimas actúen y se produzcan las oxidaciones u otros procesos destructivos. De ahí la importancia de un secado rápido [3], que también permite estabilizar el olor, color, textura, sabor, y/o la composición química. Ha de notarse que uno de los procesos más críticos es el amarronamiento de las partes verdes, provocado por la destrucción de la clorofila y numerosas reacciones de oxidación generadas por las fenol-oxidasas presentes en las plantas. En algunas especies se observa una pérdida de AE durante el secado, si éste es muy intenso o se lleva a cabo en malas condiciones; esta pérdida es causada por evaporación, oxidación y resinificación, *etc.* [3].

Los principales métodos de secado son [3]:

- **Secado a campo:** el material cortado se deja en el lugar de cultivo por un tiempo, permitiendo que gran parte del agua contenida en sus tejidos se evapore.

- **Secado al aire libre:** el material se deja expuesto a la radiación solar durante un tiempo determinado, siendo éste un proceso económico pero poco adecuado debido al deterioro que puede sufrir el material vegetal debido a la irradiación solar.
- **Secado a la sombra:** se realiza a temperatura ambiente pero bajo sombra o en lugares cubiertos, el cual es un sistema que actúa por convección del aire, lo ideal en este proceso es aprovechar las corrientes naturales del viento en la región. Éste es un proceso más lento que el anterior, pero el resultado generalmente es superior, por no tener la influencia de la descomposición de los productos debido a temperaturas no controladas o exceso de luminosidad.

No obstante, el principal inconveniente del secado natural y a la sombra es la imposibilidad de controlar las condiciones climáticas; es así, si el momento de la cosecha ocurre en días de alta humedad, lluvia, baja temperatura, *etc.*, no se obtendrá un buen secado y, por ende, se tendrá una conservación deficiente del material vegetal [3, 68, 69].

Otros sistemas de secado más tecnificados son secado con aire caliente, por liofilización, con microondas, con luz infrarroja, entre otros [3].

1.6 MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE AEs Y EXTRACTOS A ESCALA DE LABORATORIO

El objetivo principal de la obtención de AEs y extractos a escala de laboratorio, es lograr que las esencias representen en alto grado la composición original de los metabolitos secundarios volátiles presentes en la planta. Los siguientes métodos se utilizan en el laboratorio y se acercan más a la mezcla de metabolitos secundarios en la planta:

1.6.1 Destilación-extracción con solvente simultánea. Este sistema combinado de destilación – extracción con solvente simultánea (SDE), fue descrito por primera vez en 1964 por Likens y Nickerson [70], y permite operar con solventes tanto de mayor, como de menor densidad que el agua; siendo el de mayor densidad, por ejemplo, el diclorometano, el más aplicado para la obtención de los extractos [71].

Godefroot y colaboradores [71], reportaron un método de análisis cuantitativo basado en el sistema modificado de SDE a microescala. El equipo, que se utiliza en la aplicación de esta técnica, está diseñado de tal manera que todas las sustancias volátiles se colectan en solo 2 mL de solvente orgánico, diclorometano, al cual previamente se le adiciona un patrón interno adecuado [71, 72].

La mayor ventaja de este método consiste en que el extracto no requiere una concentración adicional, por evaporación del solvente. Simplemente, se recoge una pequeña fracción y se inyecta al cromatógrafo, donde se logra hacer una medición cuantitativa de las sustancias presentes, incluyendo aquellas, que se encuentran en muy baja concentración. Debido al uso de pequeñas cantidades de solvente en esta técnica de extracción, se logra minimizar la contaminación y reducir los costos [71]. Este método es ampliamente utilizado en la extracción de metabolitos secundarios volátiles de plantas [73–75] y compuestos aromáticos presentes en diferentes matrices [76, 77].

1.6.2 Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas. La extracción asistida por la radiación de microondas (MWHM) se llevó a cabo por primera vez en 1986 por Ganzler y sus colaboradores [78], como una novedosa técnica de preparación de muestras para análisis cromatográfico. Durante la aplicación de esta técnica se llegaron a tener en cuenta los

factores de gran importancia para la eficiencia de la extracción, *i.e.* el tipo de solvente y el tiempo de extracción [79–82].

La extracción asistida por la radiación de microondas, técnica patentada por J. Paré [83, 84], emplea solventes orgánicos transparentes a la radiación, en los cuales el material vegetal se sumerge al agua y se somete a la acción muy corta de la radiación. Debido al aumento de la temperatura, el agua presente en el material vegetal, rompe las estructuras celulares internas que contienen la esencia, la cual, al ser liberada, se disuelve en el solvente usado, generalmente agua. [83–87].

Este método de extracción, presenta muchas ventajas con respecto a las técnicas tradicionales de destilación, debido a que es un método rápido y económico, utiliza cantidades pequeñas de material vegetal (*ca.* 200g) y los aceites obtenidos se aíslan libres de los productos de descomposición térmica y de contaminantes [72,86–90].

1.6.3 Extracción con fluido supercrítico. Un fluido supercrítico (SF) es la sustancia en el estado fisicoquímico que se encuentra por encima de su temperatura y presión crítica, siendo imposible de licuarla bajo estas condiciones. El SF se expande como un gas hasta llenar el recipiente, pero al igual que un líquido, puede actuar como disolvente de sólidos y líquidos con muy alto poder de solubilización. En el punto crítico triple, la densidad de un gas y de un líquido son idénticas y mediante un cuidadoso control de la temperatura y la presión se pueden alterar las propiedades disolventes de un SF, haciéndolo más selectivo para un componente en particular en una mezcla de sustancias [81, 91, 92].

En la industria alimenticia, se utiliza como SF el CO₂ para eliminar las sustancias responsables de olores desagradables, *e.g.* en los aceites de pescado y vegetales. El SF como medio acarreador ha demostrado ser

eficiente para la extracción de sustancias que son inestables a altas temperaturas, por ejemplo, moléculas biológicas como los antibióticos, las hormonas y los esteroides [91–94].

Una de las principales desventajas del SF en la obtención de esencias naturales, es la extracción de sustancias no deseadas, *e.g.* ácidos grasos, carotenoides y ceras, entre otras, lo cual se puede evitar realizando las extracciones en condiciones que permitan alterar la selectividad del gas, por ejemplo a 24–30 MPa y 40–60°C (dependiendo del fluido), sin que exista la posibilidad de separar impurezas por precipitación fraccionada, o agregando al SF algunas sustancias químicas (modificadores), que también puedan cambiar la solubilidad de ciertas sustancias en éste [92, 95]. La extracción con SF a nivel comercial encuentra aplicación en los procesos de descafeinación, producción de extractos de lúpulo solubles y ciertos productos del petróleo [96]. Más específicas son las aplicaciones de SF en la obtención de extractos vegetales [97], *e.g.* de manzanilla [98, 99], lavanda [100], guayaba [101], hinojo [102], ruda [103]. Aunque varios gases pueden ser usados para SFE, el CO₂ es el más conveniente, debido a sus propiedades físicas y químicas, a saber: no es explosivo, ni inflamable, químicamente inerte, económico, de fácil manejo, su temperatura y presión críticas no son altas (31,1°C, 6,4 MPa), además de las características expuestas anteriormente, CO₂ puede ser reciclado durante el proceso de extracción [92, 95, 98, 100, 104, 105].

1.7 ANÁLISIS Y CONTROL DE CALIDAD DE LOS AEs

Para un AE resulta necesario conocer su composición detallada. Esta información, sumada a los análisis fisicoquímico y organoléptico del aceite, es imprescindible para establecer su calidad. Por ello, es importante estudiar las variables que afectan la composición del AE, tales como forma de cultivo, condiciones geobotánicas, métodos de extracción, época de recolección,

parte de la planta, métodos de almacenamiento, manejo del material vegetal, edad, actividad biológica, entre otras. El establecimiento de la composición y los parámetros de calidad, se realizan por diferentes métodos de separación, identificación y cuantificación [3, 11], entre los cuales se encuentran:

- Métodos químicos de separación;
- Destilación fraccionada;
- Cromatografía de capa fina;
- Cromatografía preparativa;
- Cromatografía en columna;
- Cromatografía líquida de alta eficiencia (obtención de fracciones);
- Cromatografía de gases (separación de la mezcla, cuantificación de los constituyentes).

En la actualidad, los métodos modernos de análisis de AEs están fundamentados básicamente en la cromatografía de gases capilar usando detectores convencionales, principalmente, de ionización en llama (FID) y selectivo de masas (MSD) [106].

1.7.1 Cromatografía de gases. La aparición en los años ochenta de las columnas capilares de alta eficiencia de vidrio, y luego, de sílice fundida con fases estacionarias entrecruzadas e inmovilizadas abrió una nueva etapa en el análisis de los AEs, puesto que estas columnas permitían separar la mayoría de los constituyentes de esencias, incluyendo isómeros y componentes presentes en trazas. La identificación cromatográfica de los componentes del aceite se realiza a través de comparación de los índices de Kovàts, obtenidos para dos fases estacionarias, polar y apolar, de las sustancias patrón, con los índices de Kovàts experimentales [2, 107, 108].

La cromatografía es un método analítico empleado ampliamente en la separación y cuantificación de los componentes químicos de mezclas

complejas con base en las velocidades a las cuales éstos “pasan” por la columna, repartiéndose entre las dos fases, estacionaria y móvil [91]. Un sistema cromatográfico consta de los siguientes bloques principales: suministro de gases y controladores de flujo, inyector, horno, columna, detector y sistema de datos (**Figura 3**).

El proceso cromatográfico se realiza de la siguiente manera: la muestra en fase vapor o disuelta en un solvente se introduce al inyector (200 - 300 °C), por medio de una válvula o jeringa. Los componentes de la muestra se transforman inmediatamente a vapor y entran a la columna guiados por el flujo de gas de arrastre a través de un *liner* del inyector. Cada componente de la muestra interactúa con la fase estacionaria (f.e.) de la columna de manera diferente y viaja a lo largo de ella con una velocidad que depende del grado de su interacción con la f.e., de la velocidad del gas de arrastre y de la temperatura del horno.

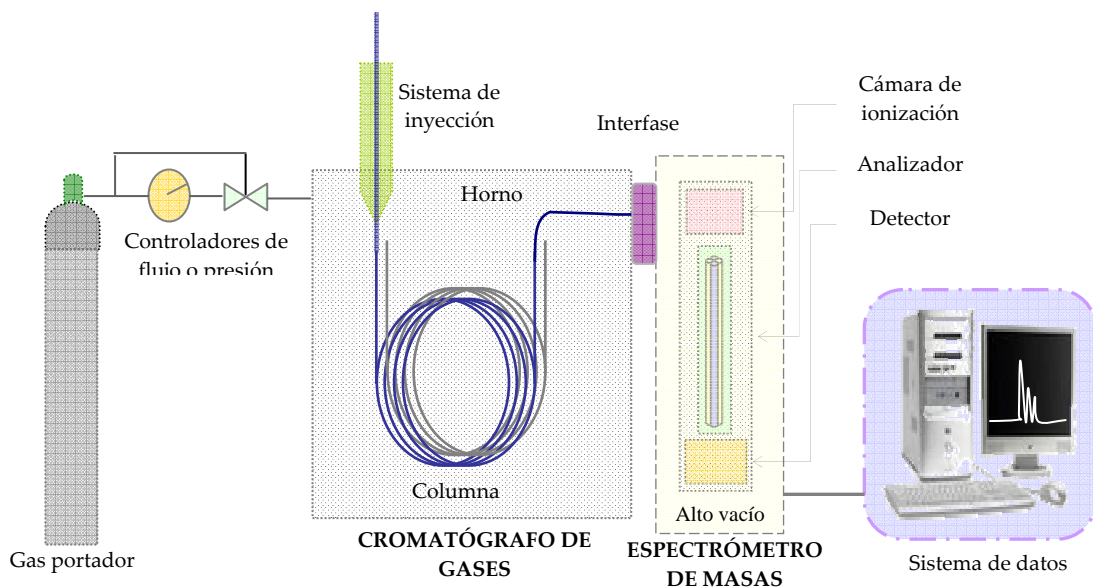


Figura 3. Bloques principales de un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas.

Cada vez que un componente eluye de la columna, el detector genera una señal eléctrica la cual se amplifica y se registra en función del tiempo transcurrido, desde la inyección de la muestra hasta su detección, para dar origen al respectivo registro gráfico (cromatograma) [91, 109].

1.7.2 Cromatografía de gases – espectrometría de masas. Éste es uno de los métodos más eficaces para el estudio de la composición de los AEs. Es una técnica adecuada para la identificación debido a que los componentes del aceite son compuestos volátiles y de bajo peso molecular [73, 110–112]. La esencia se inyecta directamente al cromatógrafo sin ningún tratamiento previo, lo cual elimina posibles modificaciones en su composición o en la estructura de sus constituyentes. En el cromatógrafo, los componentes de la esencia se separan, entran al espectrómetro de masas, que permite registrar el espectro de cada una de las sustancias separadas. Los constituyentes del aceite se identifican con base en patrones de fragmentación, que se observan en sus espectros de masas [2, 91, 113].

La GC-MS permite realizar en una sola operación, para muestras del orden de 1 μ L, un análisis cualitativo junto con una indicación de las proporciones en las que se encuentran los componentes. Cuando se disponen de sustancias patrón, la calibración del equipo permite un análisis cuantitativo exacto de la muestra [91, 114, 115].

La cromatografía multidimensional se ha convertido en una nueva, pero infortunadamente aún costosa, posibilidad para el análisis de los AEs [38]; en columnas cromatográficas con fases estacionarias quirales se pueden distinguir de isómeros ópticos [32, 34].

1.7.3 Control de calidad de aceites esenciales. El control de calidad de un AE tiene por objeto garantizar que éste posee unas características físico-químicas y de olor determinadas, que se mantengan de un lote de

producción a otro. A través del análisis se puede evaluar el cumplimiento de normas de calidad, detectar adulteraciones, diferenciar las calidades, normalizarlas, y confirmar la autenticidad del producto natural.

Las características estudiadas deben ser suficientemente descriptivas del producto para que permitan detectar aquellas desviaciones que se consideren suficientes para rechazar el lote. Por ello, se utilizan diferentes parámetros analíticos y los valores obtenidos para la muestra se comparan con los establecidos en la correspondiente norma, que habrá sido dictada por algún organismo de normalización o, en su defecto, por el propio interesado. Los principales parámetros utilizados son: características organolépticas, determinaciones físicas, índices químicos, características cromatográficas y espectroscópicas y otras determinaciones como residuos de pesticidas y presencia de metales pesados [3].

2. ANÁLISIS DE MERCADO

2.1 MERCADO MUNDIAL DE AEs

De acuerdo con la FAO, la producción mundial de AEs se estimó en 28,2 millones de toneladas en 2003, representando cerca de US\$ 1.300 millones anuales. En este mismo año los países pertenecientes a la UE exportaron un total de € 373 millones en AEs [10], siendo EE.UU. el principal país exportador de AEs, seguido de Francia, Reino Unido, Brasil, China y Argentina (Ver **Figura 4**) [116].

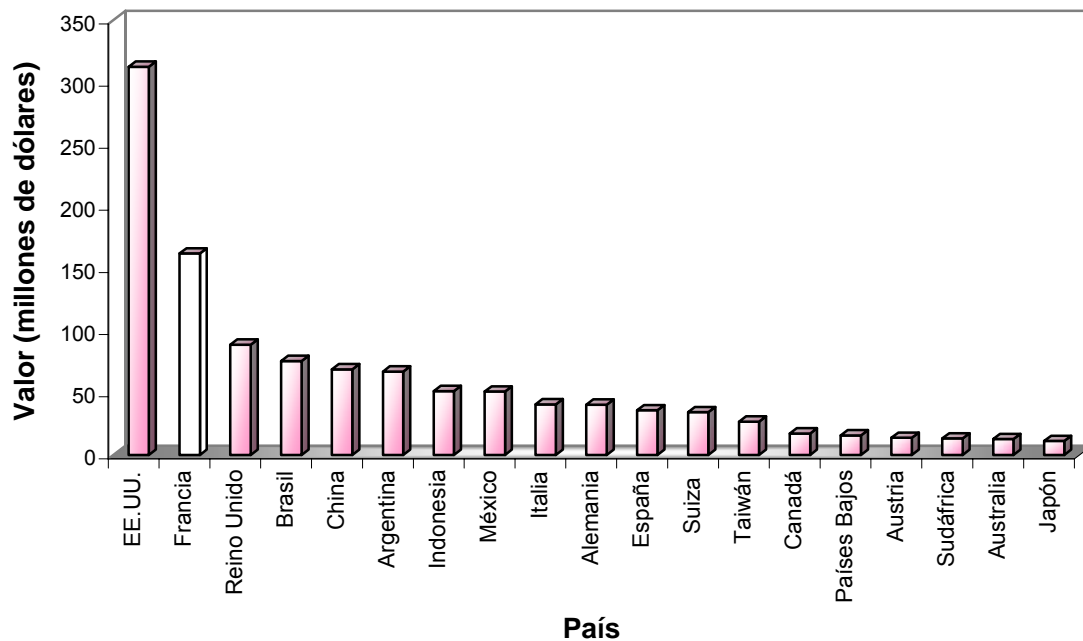


Figura 4. Principales países proveedores de aceites esenciales en 2002 [116].

Existe actualmente un gran potencial para la comercialización de los AEs no cítricos, que resultan atractivos por su relación precio-volumen. Dentro de las especies más importantes en cuanto a su volumen y valor comercializado – se producen más de 10 millones de US\$/año de cada una –, figuran aceites

de mentas, limón, rosa, jazmín, especies con citral, sándalos, vetíver, patchouli, geranio, cedros, lavandinas, citronela y cítricos [1, 7].

Sólo la industria perfumística mundial manejó en el año 2003 ventas por US\$ 3.000 millones, 2003 [7]. En Europa, en 1994, esta industria representó US\$ 1.630 millones y 108.000 toneladas de AEs producidos. Francia es líder en esta región, con US\$ 334 millones, seguido de Alemania, con US\$ 312 millones, y el Reino Unido con US\$ 274 millones. Estos tres países manejan el 57% del mercado europeo [1].

El flujo de importaciones mundiales de AEs en el periodo de 1998 a 2002 se ha mantenido estable. Los principales cinco países importadores de AEs concentran el 62% de las importaciones mundiales (Ver **Figura 5**).

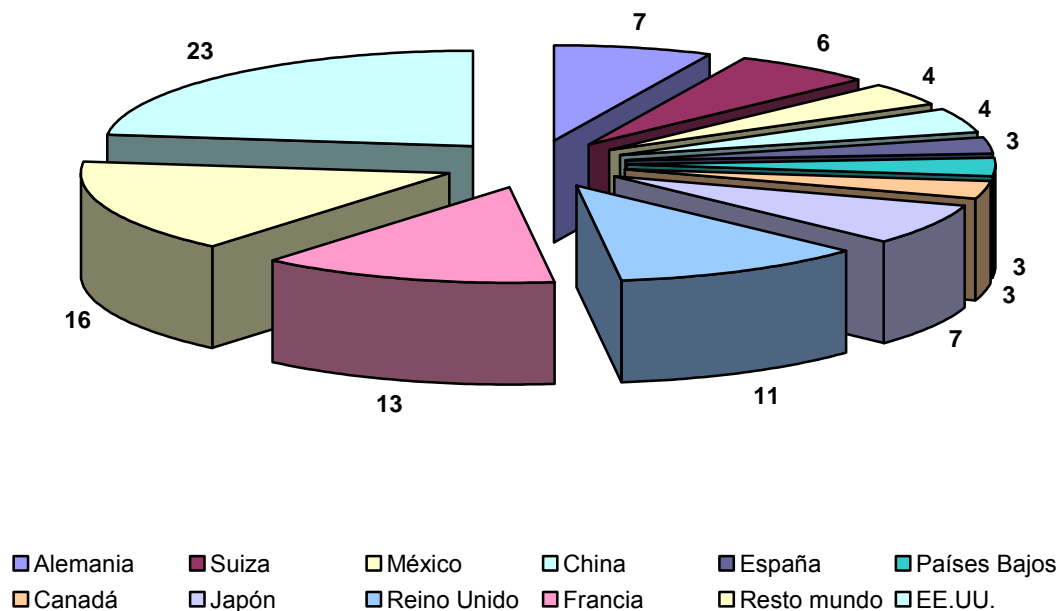


Figura 5. Participación porcentual de los principales países importadores de aceites esenciales en el año 2002 [116].

El principal país importador a nivel mundial son los EE.UU., que ostenta el mismo liderazgo en las exportaciones del sector, concentrando en el año 2002 el 23% de las importaciones mundiales de AEs, seguido de Francia y Reino Unido, que, a su vez, son grandes exportadores de AEs [116].

Cabe resaltar, que la tendencia de las importaciones en la EU cambió y cada vez se importa menos de países desarrollados, lo que genera una mayor oportunidad a otros países de entrar a competir en el mercado. Esto se observa al revisar las importaciones provenientes de los EE.UU.: durante el periodo de 1998 a 2002, ya que se encontró una tasa anual decreciente del 6%. En cambio, países como Argentina y Brasil ganaron participación en el mercado y sus importaciones de esos orígenes crecieron a tasas de 10 y 5%, respectivamente.

La EU demanda amplia gama de AEs; sin embargo, esta demanda no es uniforme, ya que países como Francia, Reino Unido y Alemania invierten más recursos para adquirir AEs en comparación con los demás países. Una posible explicación es que las principales industrias de perfumería, cosméticos y fabricación de insecticidas, entre otras, están concentradas en estos países, siendo estas industrias las que registran una mayor demanda de AEs [7, 116, 117].

2.2 MERCADO MUNDIAL DE AE DE GERANIO

El AE de geranio es uno de los de mayor venta en el mundo. Tomando en cuenta todas las marcas y orígenes, la producción mundial de AE de geranio es de ca. 400 toneladas/año, con un valor que varía entre los 20 – 30 millones de US\$ [117].

El AE producido en la isla Reunión es de calidad superior y es, por consiguiente, el más costoso y más usado en la fabricación de perfumes

finos [43], pero su producción anual es baja; el segundo aceite en cuanto a calidad se produce en los países del Norte de África, Marruecos, Argelia y Egipto [1].

China es el mayor productor de aceite de geranio, representando el 61% del suministro [118], pero la calidad de aceite es inferior al producido en la isla Reunión. La producción de los países de Europa Oriental, incluyendo Rusia, es totalmente absorbida por el mercado interno. En la **Figura 6**, se muestra la producción anual de los principales países cultivadores de AE de geranio [117].

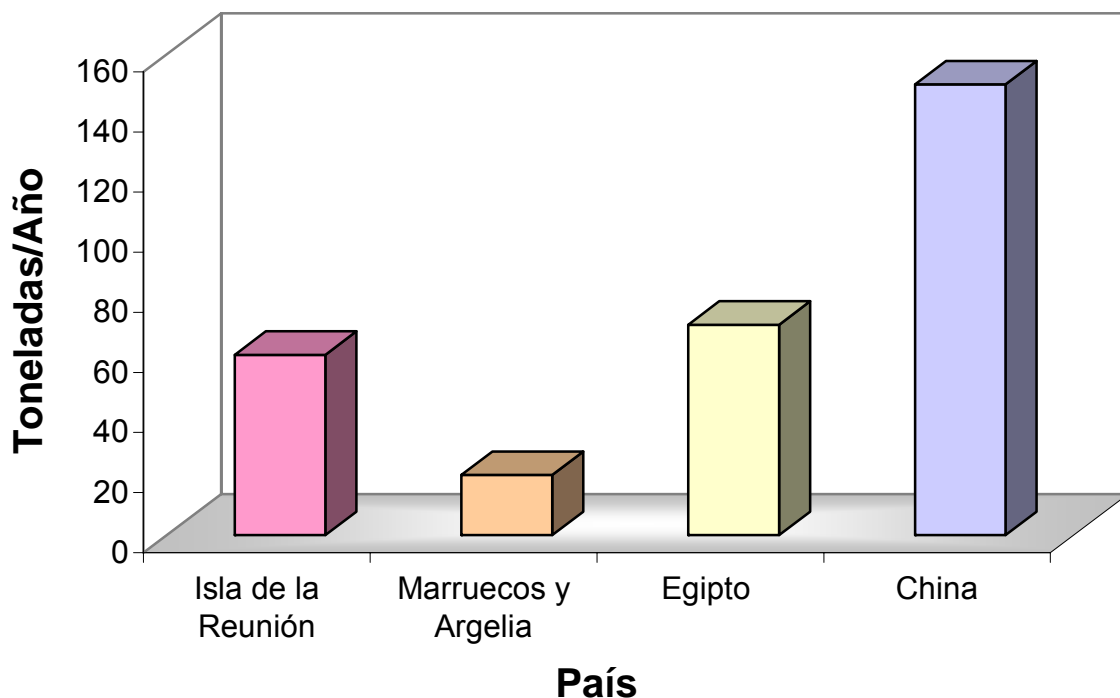


Figura 6. Producción anual de países cultivadores de aceite de geranio [117].

Los principales importadores de aceite de geranio son Francia y EE.UU., seguidos por la EU y Japón, comercializando un total de 200 toneladas/año (Ver **Figura 7**) [117].

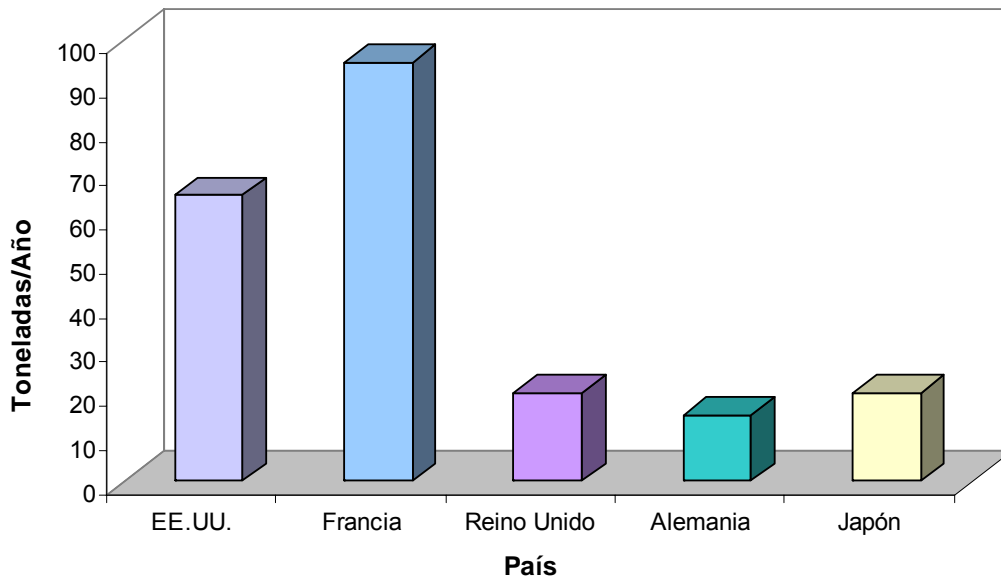


Figura 7. Principales países importadores de AE de geranio en el año 2002 [117].

2.3 MERCADO NACIONAL DE AEs

Si bien las exportaciones colombianas de AEs son poco significativas dentro de la totalidad de las exportaciones nacionales, un análisis de las importaciones de AEs del país, muestra que durante el período de 1997 a 2001 se alcanzó un monto en las mismas por un valor aproximado de US\$ 500 millones, que incluyen AEs, mezclas odoríferas, oleorresinas y resinoides (Ver **Figura 8**), de los cuales US\$ 54 millones corresponden a AEs, mientras que en el periodo 2002-2004 se registraron importaciones en AEs por un valor de US\$ 824 millones observándose una tendencia significativa al aumento, por lo cual se evidencia que Colombia es un país netamente importador de AEs, entre los cuales se encuentran mentas, naranja, limón, eucalipto, lavanda, anís, bergamota, vetiver, jazmín y geranio (ver **Figura 9**) [1].

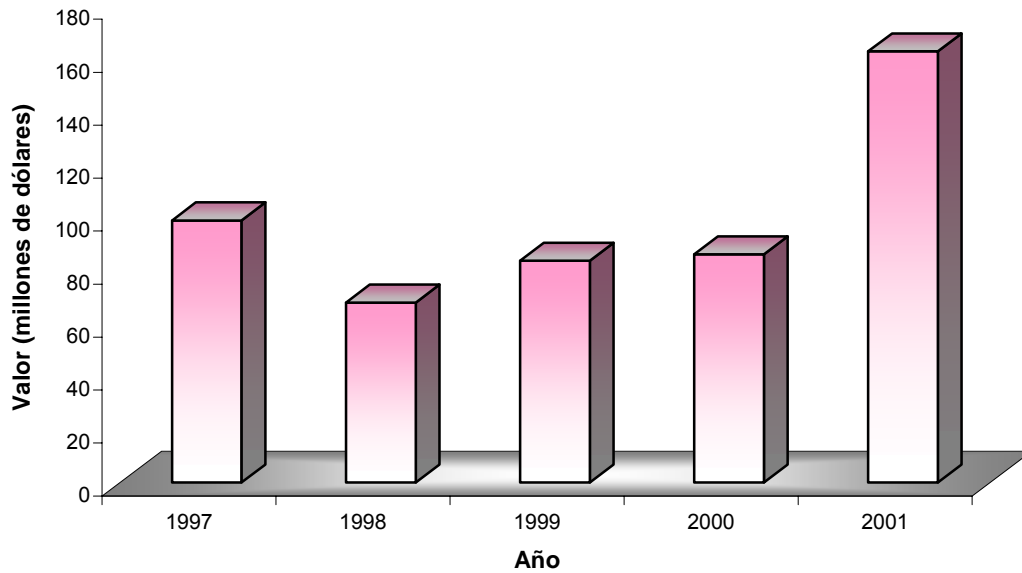


Figura 8. Importaciones de AEs, mezclas odoríferas, oleorresinas y resinoides realizadas en Colombia (1997-2001) [1].

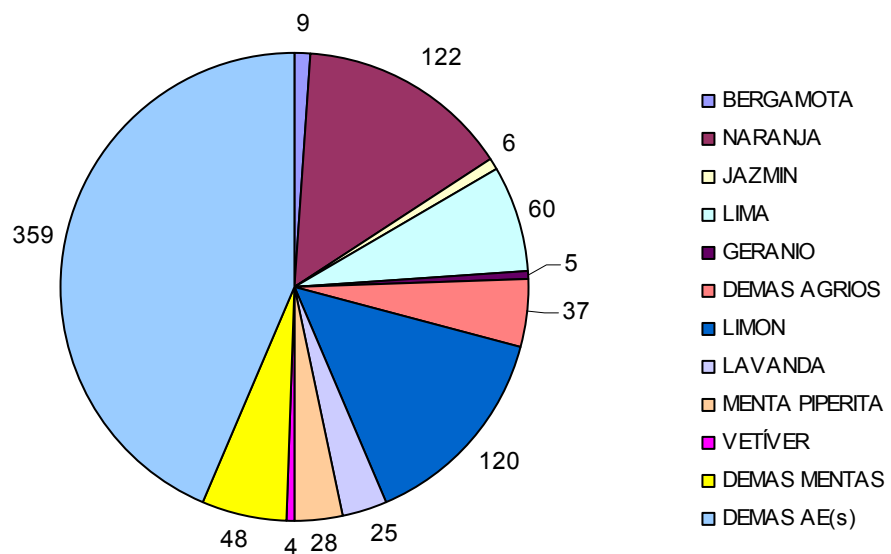


Figura 9. Importaciones de AEs con mayor demanda en Colombia durante el período de 2002 a 2004 (valor en US\$ millones) [9].

2.4 MERCADO NACIONAL DE AE DE GERANIO

Particularmente, las importaciones nacionales de este aceite provienen de los EE.UU., bajo la subpartida arancelaria 330121, evidenciándose una leve tendencia al aumento durante el periodo 2002-2004 (ver **Figura 10**). Las principales industrias que demandan este AE son de alimentos y bebidas, industrias cosméticas, y de perfumes [9].

Por otra parte, en el período de 1998-2004 las re-exportaciones en AE de geranio fueron nulas, observándose un leve aumento durante el periodo 2005-2006 por un valor de US\$ 2048 [9].

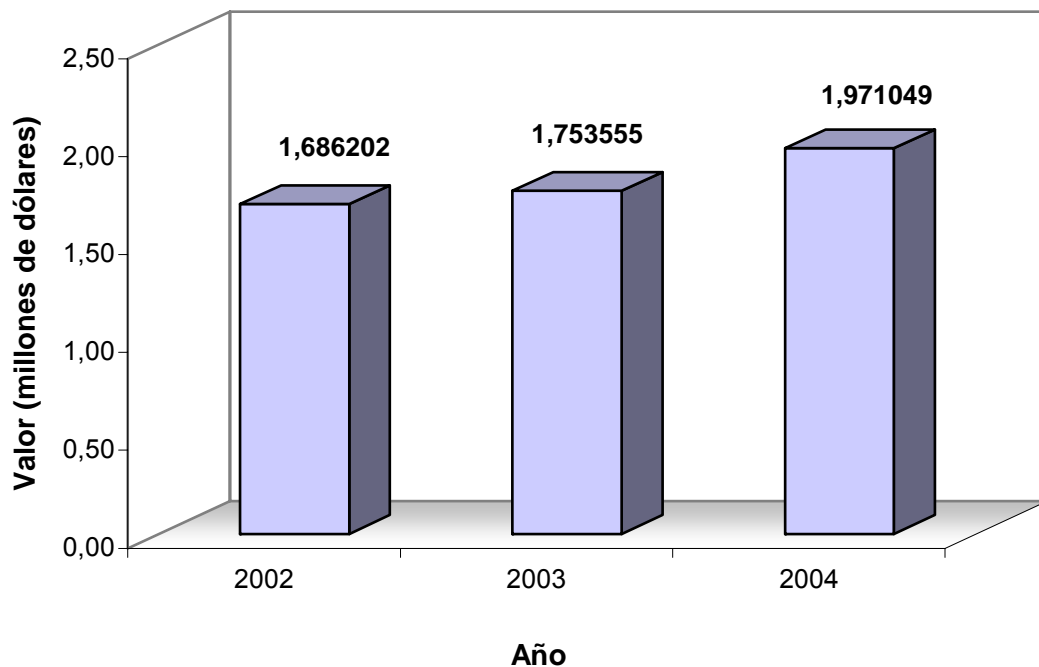


Figura 10. Importaciones nacionales de AE de geranio durante los años 2002-2004 [9].

2.5 PRECIOS EN EL MERCADO DE AE DE GERANIO.

El AE de geranio de calidad superior, proveniente de la isla Reunión, se cotizó en el año 2002 a unos 90 US\$/kg, el de origen Egipcio a 65 US\$/kg, el de la China a 50-55 US\$/kg [119, 120]. Los precios varían de acuerdo con los niveles de producción en China, la demanda y las ventas en el mercado internacional. La baja producción de AE en la isla Reunión y Egipto, combinada con el creciente consumo interno de China hacen ventajoso entrar al mercado internacional como productor de aceite de geranio [7, 117,120].

Del análisis de mercado, se puede concluir, que hay una demanda constante de AEs a nivel mundial, particularmente, del AE de geranio. Ésto como consecuencia del cambio de patrones en el consumo debido a la tendencia por adquirir productos de origen natural [119]. Además, resulta viable incursionar en este mercado debido a que los países productores absorben la totalidad de su producción, favoreciendo que nuevos países puedan entrar a satisfacer la creciente demanda.

3. CIENCIOMETRÍA

La permanente necesidad de conocer los últimos avances de la ciencia y las tendencias tecnológicas requieren de la aplicación de herramientas modernas y técnicas especiales para la generación de conocimiento, una de estas herramientas es la cienciometría que presenta un interesante campo de acción para la gestión del conocimiento [121, 122].

La cienciometría es el estudio de los aspectos cuantitativos de la actividad científica y técnica, principalmente mediante el análisis de documentos como artículos y patentes, entre otros [122, 123]. Existen cerca de 30 indicadores que miden cada una de las diversas facetas de la investigación y publicación científica, entre ellos:

- Indicadores de actividad.
 - ✓ Número y distribución de publicaciones (artículos, libros, patentes) a escala internacional.
 - ✓ Publicaciones producidas por centros de investigación por países.
 - ✓ Productividad de los autores.

- Indicadores de impacto.
 - ✓ Número de citas recibidas.
 - ✓ Medición del factor de impacto de trabajos de investigación.

- Indicadores relacionales.
 - ✓ Co-citaciones.
 - ✓ Co-ocurrencia.

La especie *Pelargonium graveolens* ha sido objeto de diversos estudios debido a múltiples usos de su AE en la industria y gracias a sus propiedades medicinales para el tratamiento de diversas enfermedades; los resultados de estos estudios se reportan en artículos de revistas científicas reconocidas internacionalmente.

Con el fin de revisar las principales áreas de estudio sobre geranio en los últimos años, durante el desarrollo del Proyecto se consultaron las siguientes bases de datos: *Web of Science (ISI Web of Knowledge, Thomson)* [124] y *Elsevier (Scopus)* [125]; a continuación, se muestran los resultados de la revisión realizada en febrero de 2007.

3.1 BASE DE DATOS Elsevier (SCOPUS). En varias revistas científicas aparecen publicaciones relacionadas con investigaciones sobre *P. graveolens*, el AE y sus potencialidades; en la **Figura 11**, se muestra el número de publicaciones en revistas científicas en el periodo de 1972 a 2006.

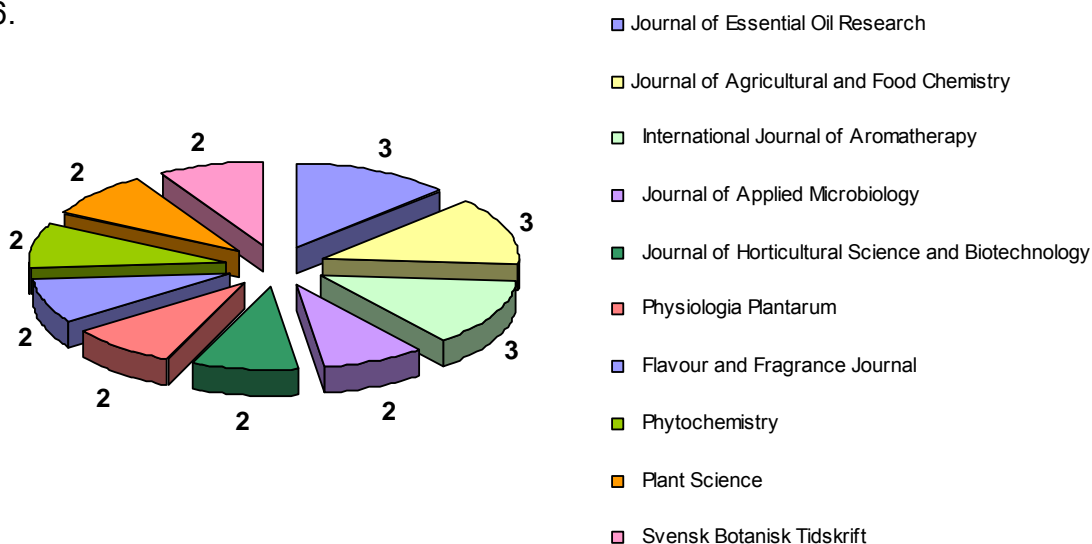


Figura 11. Relación entre las revistas científicas y el número de publicaciones sobre *P. graveolens* en el periodo de 1972 a 2006 [Fuente: Base de datos *Elsevier (Scopus)*; Consultado: 22-02-2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH (“*Pelargonium graveolens*”).

En la **Figura 12**, se muestra el número de estudios realizados sobre *Pelargonium graveolens*, entre 1972 y 2006; se observa una tendencia general, caracterizada por el aumento de publicaciones sobre esta planta en los últimos años.

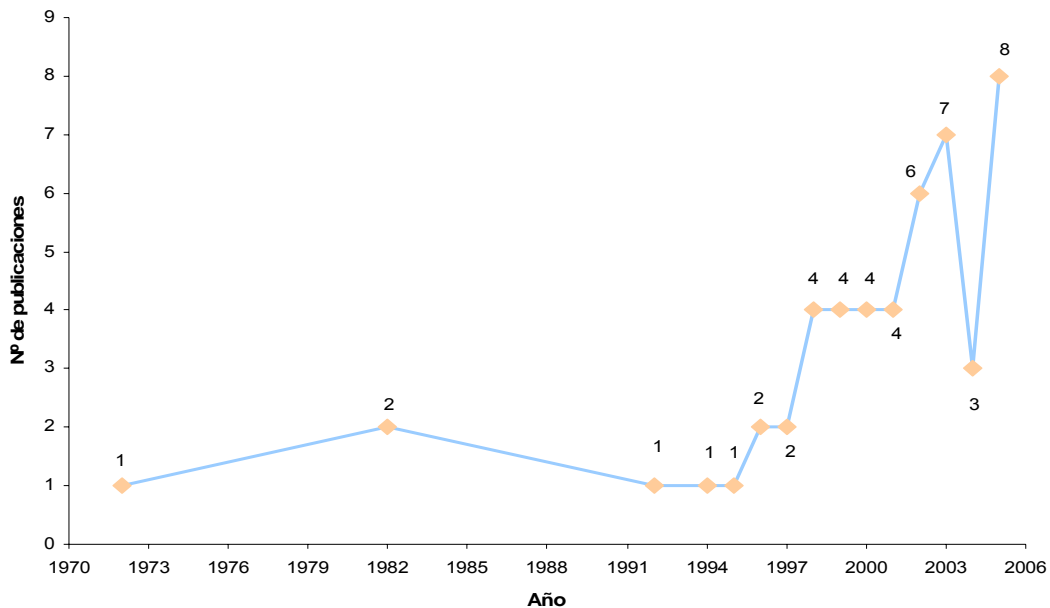


Figura 12. Publicaciones realizadas sobre geranio durante el período de 1972 a 2006 [Fuente: Base de datos *Elservier (Scopus)*; Consultado: 22-02-2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH (“*Pelargonium graveolens*”)].

Las áreas de investigación, en la cuales se ha realizado mayor número de publicaciones, han sido agricultura y ciencias biológicas, bioquímica, genética, biología molecular y química, entre otras. En la **Figura 13**, aparece la relación entre el número de publicaciones sobre geranio y las diferentes áreas de investigación relacionadas con esta especie.

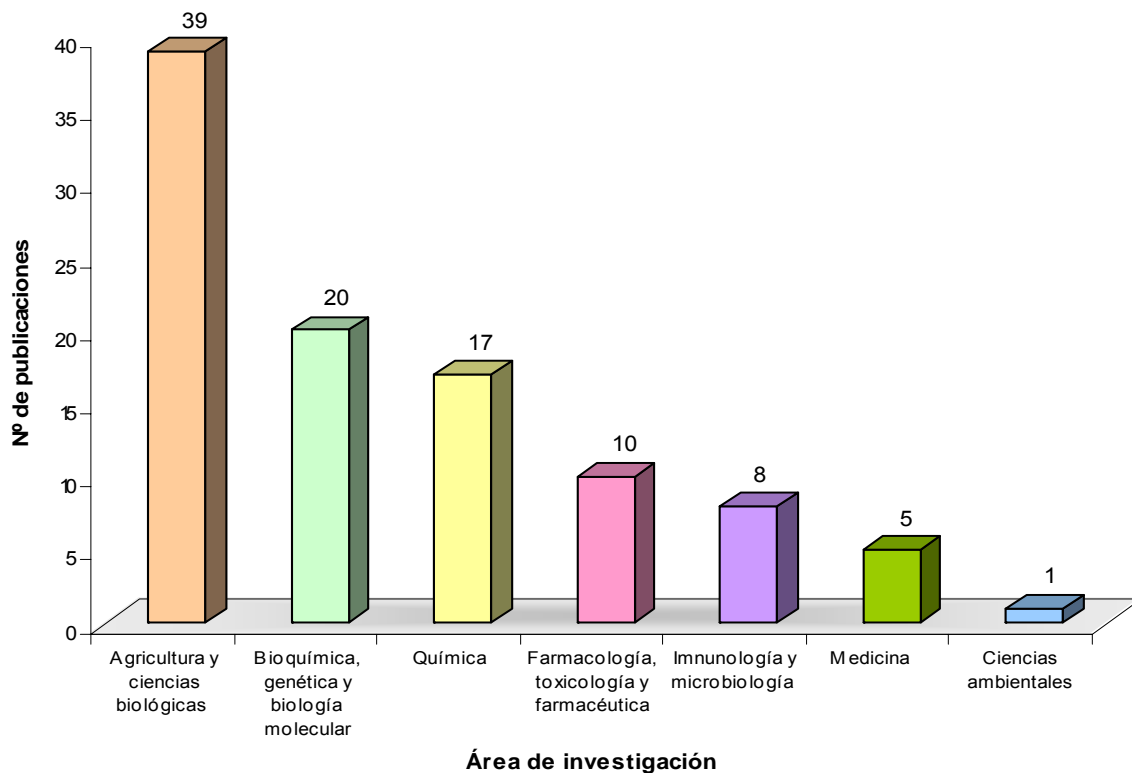


Figura 13. Relación entre publicaciones realizadas sobre geranio y los diferentes campos de investigación en el periodo de 1972 a 2006 [Fuente: Base de datos *Elsevier (Scopus)*; Consultado: 22-02-2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH (“*Pelargonium graveolens*”).].

Varios autores publicaron sus resultados sobre las diversas investigaciones realizadas acerca de esta planta, particularmente, han sido estudiados los diversos híbridos existentes de *Pelargonium*; en la **Tabla 5**, se reportan aquellos autores, quienes han publicado más artículos sobre esta planta.

Tabla 5. Autores, con mayor número de publicaciones sobre *P. graveolens* en el periodo de 1972 a 2006 [Fuente: Base de datos *Elsevier (Scopus)*; Consultado: 22-02-2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH (“*Pelargonium graveolens*”)].

| Autor | No. de artículos |
|--------------------|------------------|
| Mosandl, A. | 5 |
| Banerjee, S. | 5 |
| Mallavarapu, G.R. | 5 |
| Beck, T. | 5 |
| Wüst, M. | 5 |
| Kalra, A. | 3 |
| Kumar, S. | 3 |
| Ravindra, N.S. | 3 |
| Naqvi, A.A. | 2 |
| Ram, M. | 2 |
| Parameswaran, T.N. | 2 |
| Shin, S. | 2 |
| Rexroth, A. | 1 |
| Reindl, J. | 1 |
| Rao, P.V.L. | 1 |
| Rana, V.S. | 1 |
| Ramesh, S. | 1 |
| Roy, S.K. | 1 |
| Sangwan, N.S. | 1 |

El objetivo de una patente consiste en brindar protección a los adelantos tecnológicos. Las patentes se destinan a las invenciones en todos los ámbitos de la tecnología. En muchos casos, las patentes proveen información que no ha sido publicada en otros medios [122, 126].

Existen varias patentes sobre *P. graveolens*, en la **Figura 14**, se muestra el número de patentes registradas sobre esta planta en diferentes oficinas.

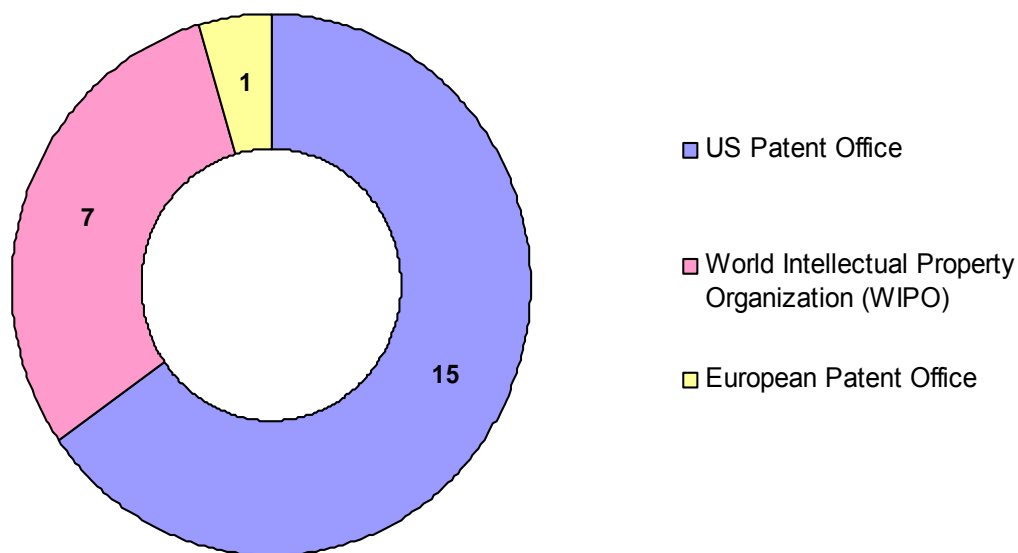


Figura 14. Número de patentes registradas sobre *P. graveolens* en el periodo de 1972 a 2006 [Fuente: Base de datos *Elsevier (Scopus)*; Consultado: 22-02-2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH (“*Pelargonium graveolens*”)].

3.2 BASE DE DATOS *WEB of SCIENCE (ISI Web of Knowledge, Thomson)*

Los artículos publicados desde 2001 hasta 2006 en las revistas científicas de mayor impacto, se consultaron en esta base de datos, lo cual permitió obtener una visión actualizada y complementaria sobre los últimos avances y estudios sobre geranio (**Figura 15**).

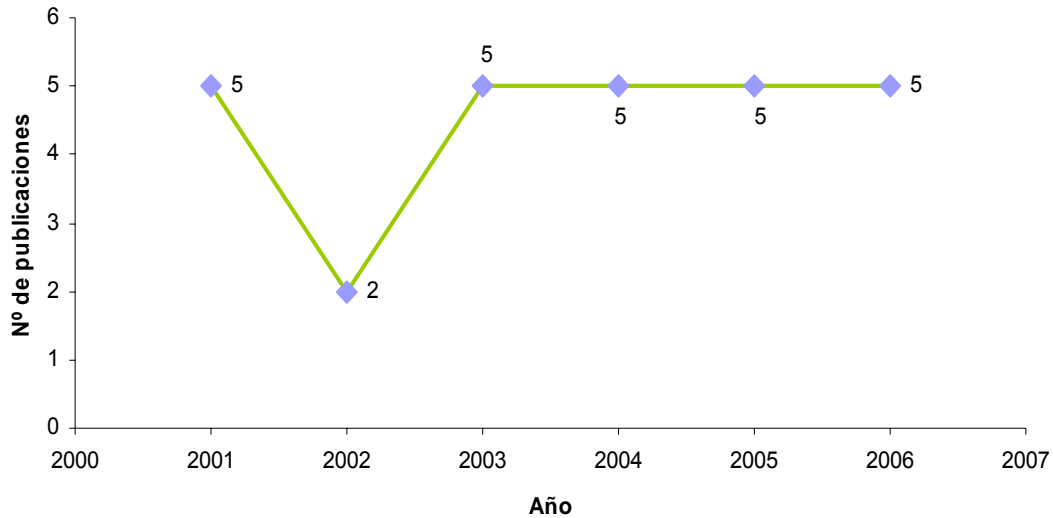


Figura 15. Publicaciones sobre la especie *P. graveolens* en el período de 2001 a 2006 [Fuente: Base de datos *WEB of SCIENCE (ISI Web of Knowledge, Thomson)*; Consultado: 27-02-2007. Ecuación de búsqueda: TS=(“*Pelargonium graveolens*”).

La India es el país, donde más se publicó sobre geranio, seguido de Corea del Sur, así como se observa en la **Figura 16**.

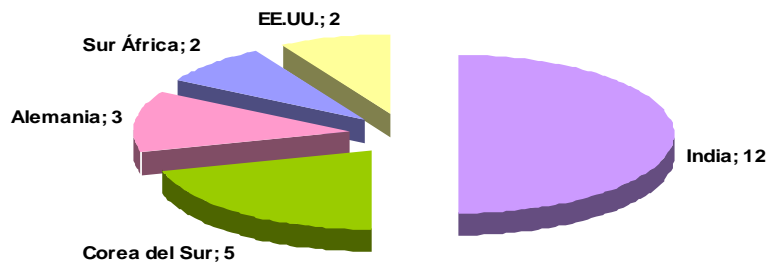


Figura 16. Relación entre países que reportan estudios sobre la especie *P. graveolens* y número de publicaciones en el período de 2001 a 2006 [Fuente: Base de datos *WEB of SCIENCE (ISI Web of Knowledge, Thomson)*; Consultado: 27-02-2007. Ecuación de búsqueda: TS=(“*Pelargonium graveolens*”).

En la **Figura 17**, se registra el número de publicaciones sobre geranio, según las diferentes áreas de investigación, relacionadas con esta planta.

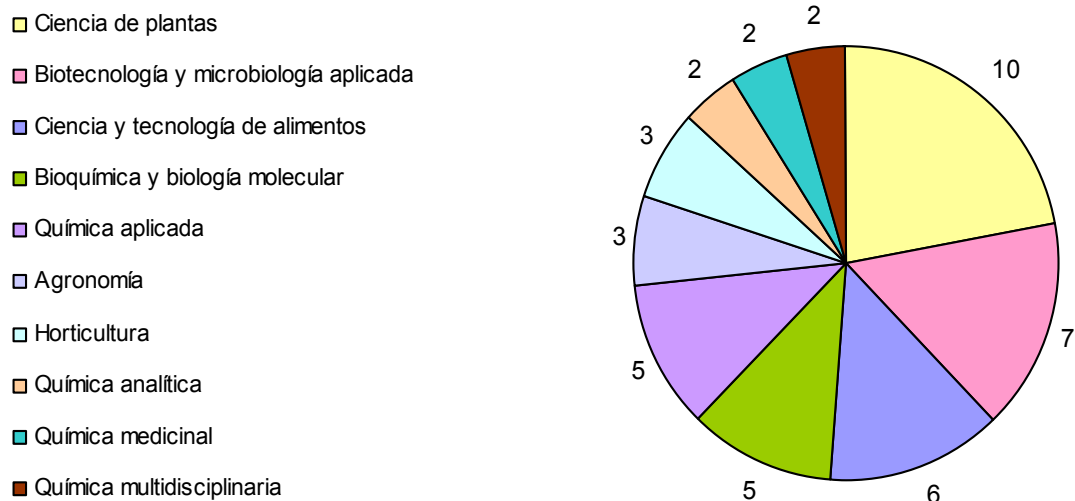


Figura 17. Publicaciones realizadas sobre geranio, según las diferentes áreas de investigación en el periodo de 2001 a 2006 [Fuente: Base de datos *WEB of SCIENCE (ISI Web of Knowledge, Thomson)*; Consultado: 27-02-2007. Ecuación de búsqueda: $TS=(\text{"Pelargonium graveolens"})$].

Las revistas en las cuales se ha publicado mayor número de artículos sobre *P. graveolens*, se muestran en la **Figura 18**.

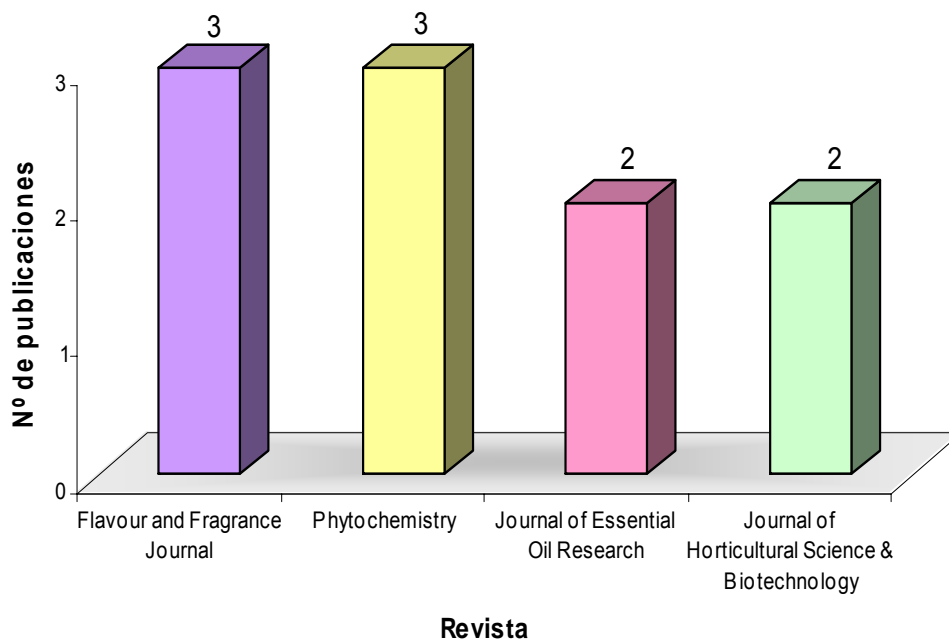


Figura 18. Revistas científicas que reportan mayor número de publicaciones sobre *P. graveolens* en el periodo de 2001 a 2006 [Fuente: Base de datos *WEB of SCIENCE (ISI Web of Knowledge, Thomson)*; Consultado: 27-02-2007. Ecuación de búsqueda: TS=(*"Pelargonium graveolens"*)].

El análisis cuantitativo muestra la actualidad del tema de investigación, permite descubrir un aumento en las publicaciones sobre la especie *P. graveolens* en las diferentes áreas de investigación en los últimos años, 2000 a 2006.

Los principales campos de estudio son agricultura y ciencias biológicas, bioquímica genética y biología molecular, debido a que se busca crear nuevos clones de esta especie, con el fin de obtener variedades de esta planta que tengan mayor rendimiento del AE y un aumento en la producción de los compuestos de interés, característicos del aceite; adicionalmente, se estudian las condiciones agrícolas que favorezcan el crecimiento de esta planta, para la obtención de AE de alta calidad que se ajuste a las exigencias del mercado internacional.

Hasta la fecha, la mayoría de los estudios realizados se ha centrado en plantas de *P. graveolens* cultivadas en Asia y África, utilizando arrastre con vapor y SFE como técnicas de extracción, y posterior análisis de aceites y extractos por GC y GC-MS. Resulta interesante analizar esta especie introducida y cultivada en Colombia, y realizar un estudio comparativo de los cambios de la composición química que ésta puede presentar, teniendo en cuenta las siguientes variables: etapas de desarrollo vegetativo (6, 9 y 12 meses) y métodos de extracción (MWHD, SDE y SFE), con el fin de analizar la calidad (en términos del contenido y el tipo de componentes mayoritarios) y el rendimiento del AE obtenido. Este estudio brindaría la información necesaria para escoger las mejores condiciones de obtención del AE de geranio.

4. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

El análisis de componentes principales (PCA) es un método matemático para reducir la cantidad de datos cuando está presente la correlación; la idea es encontrar componentes principales que sean combinaciones lineales de las variables originales que describen cada muestra. Los componentes principales (PC) se eligen de manera que la primera componente principal recoja la mayor parte de la variación que hay en el conjunto de datos, que la segunda recoja la siguiente mayor parte de la variación y así sucesivamente. Por consiguiente, cuando haya correlación significativa, el número de PC útiles sea mucho menor que el número de variables originales [127].

Los objetivos más importantes de todo análisis por PCA son [128]:

- Generar nuevas variables que puedan expresar la información contenida en el conjunto original de datos.
- Reducir la dimensionalidad del problema que se está estudiando, como paso previo para futuros análisis.
- Eliminar, cuando sea posible, algunas de las variables originales si ellas aportan poca información.

Aunque el PCA puede revelar grupos de objetos similares, no siempre resulta eficiente al hacerlo. El análisis de conglomerados (“análisis *cluster*”) es un método para dividir un grupo de objetos en una serie de clases de manera que los objetos similares se encuentren en la misma clase [127, 129].

En el presente trabajo se realizó análisis de componentes principales (PCA) y análisis *cluster*, con el fin de observar la posible influencia del estado de desarrollo vegetativo, el método de extracción y tiempo de extracción sobre la composición química de los metabolitos secundarios volátiles de la especie *P. graveolens*.

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Esta investigación se desarrolló en varias etapas, las cuales se muestran en el esquema de la **Figura 19**.

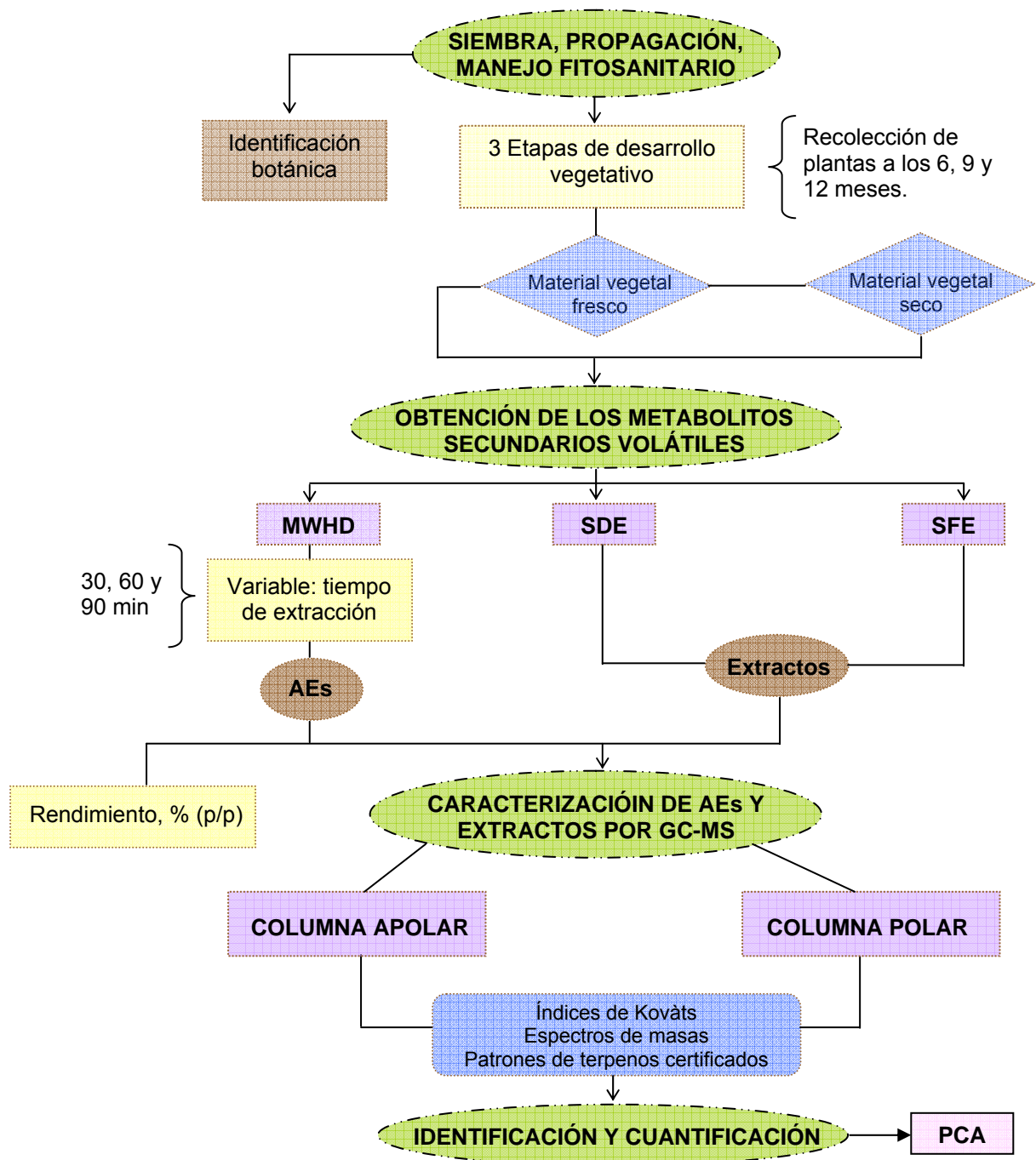


Figura 19. Diagrama de flujo del desarrollo experimental.

5.1 OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Las plantas de *P. graveolens* fueron cultivadas en la parcela experimental de CENIVAM en el campus universitario de la UIS; se propagaron plantando segmentos nodales jóvenes aproximadamente de 15 cm de largo en una mezcla de materia orgánica, cascajo y arcilla, con pH entre 5,8 y 7,0.

Los esquejes enraizados (edad 45 días), del vivero se transplantaron a campo a una distancia de 60 cm entre surcos y 60 cm entre plantas (**Figura 20**). Para garantizar el establecimiento y el desarrollo de la plantación, permanentemente se mantuvieron un riego, fertilización y control fitosanitario adecuado y constante.



Figura 20. Propagación y transplante del material vegetal.

5.2 IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA

La identificación taxonómica de la planta se realizó en el Herbario Nacional Colombiano (Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá), los pliegos testigo de cada planta quedaron almacenados de la siguiente manera: *Pelargonium graveolens* L'Her (Nº COL 517186). La identificación fue realizada por el Dr. J.A. Infante B.

5.3 SELECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

La recolección del material vegetal se realizó durante tres estados de desarrollo vegetativo: 6, 9 y 12 meses, de plantas al azar y seleccionando las hojas frescas y sanas (**Figura 21**).



Figura 21. Cultivo de *P. graveolens*, 6 meses de desarrollo vegetativo.

Simultáneamente, una parte de las hojas frescas recolectadas se pesó y se colocó sobre mallas (**Figura 22**) en la sombra, evitando la caída de agua y asegurando la circulación de flujo normal de aire para evitar que el material vegetal fuera invadido por hongos.

El control del contenido de agua en las hojas se realizó pesando diariamente las mismas, hasta que el peso del material fue constante: este proceso tomó aproximadamente 11 días.



Figura 22. Proceso de secado del material vegetal.

El porcentaje de agua en las plantas, se determinó con base en la diferencia de peso entre el material vegetal fresco y el seco.

5.4 OBTENCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES

Las extracciones del material vegetal seleccionado se hicieron por triplicado. La obtención de los metabolitos secundarios de la especie *P. graveolens* se realizó de hojas frescas y secas recolectadas de plantas en diferentes etapas de desarrollo vegetativo y utilizando tres métodos de extracción, descritos a continuación. Esto con el fin de analizar la influencia de la etapa de desarrollo vegetativo de la planta y método de extracción sobre la composición química de los metabolitos secundarios volátiles de esta planta.

5.4.1 Extracción por hidrodestilación asistida por radiación de microondas. Se emplearon hojas frescas, previamente seleccionadas y pesadas (ca. 200 g). Todas las determinaciones másicas realizadas en el desarrollo del estudio se llevaron a cabo en una balanza analítica METTLER TOLEDO AG 285 (Suiza). La extracción se realizó a diferentes tiempos, 30, 60 y 90 min con el fin de analizar la influencia del tiempo de extracción sobre la calidad y el rendimiento del AE.

La metodología desarrollada fue descrita por Stashenko y colaboradores [115, 130, 131], utilizando un equipo de destilación tipo Clevenger con reservorio de destilación *Dean-Stark* y adaptación para calentamiento por radiación de microondas a través de un horno microondas convencional LG, modelo MS-1242ZK, con potencia de salida de 800 W y frecuencia de radiación de 2,5 GHz (**Figura 23**). Se utilizaron 250 mL de agua destilada para la extracción. Finalmente, el AE se separó por decantación, y se secó adicionando a la mezcla Na_2SO_4 anhidro.

El AE aislado se pesó y el rendimiento de la extracción se determinó con base en el peso inicial del material vegetal, los valores determinados para cada extracción se promediaron, y la variación en el contenido de aceite se presentó como la desviación estándar.

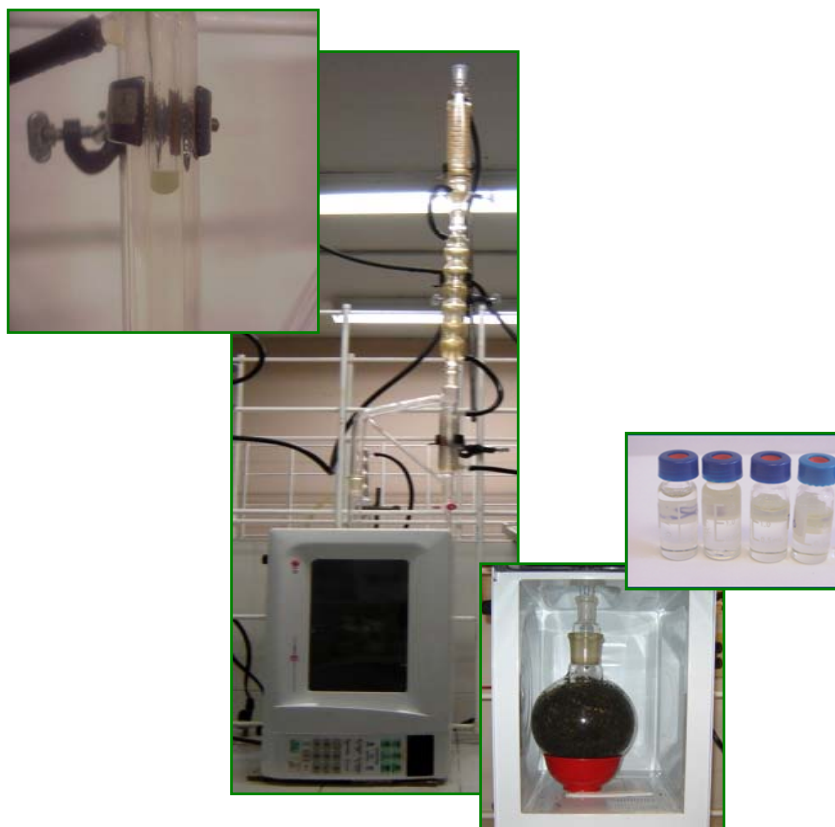


Figura 23. Montaje para hidrodestilación asistida por la radiación de microondas.

El mismo procedimiento se realizó para el material seco seleccionado (ca. 60 g), utilizando 350 mL de agua destilada.

5.4.2 Destilación-extracción simultánea con solvente. Se utilizó un equipo SDE a microescala para solventes de alta densidad [71], conectado a un baño refrigerante PHABER (Chiller 28L20K). En el balón A (**Figura 24**) se depositó el material vegetal finamente picado; al balón B se adicionó diclorometano (3 mL) y perlas de vidrio para “homogeneizar” el proceso de ebullición. Antes de iniciar el proceso de extracción se depositaron diclorometano (1,5 mL) y agua destilada (1,5 mL) en la parte C del equipo. El balón A se calentó en un baño de aceite a 140 °C y el balón B en un baño de agua a 70 °C. Por el dedo frío, ubicado dentro del cuerpo de extracción, circuló agua a una temperatura de 5 °C.

Después de 1 h se detuvo la destilación, mientras que la extracción con solvente se dejó continuar por 20 min más. El proceso de extracción, anteriormente descrito, se realizó para hojas frescas (ca. 10 g) y secas (ca. 6 g). El extracto obtenido se concentró a 1 mL con una corriente de nitrógeno.

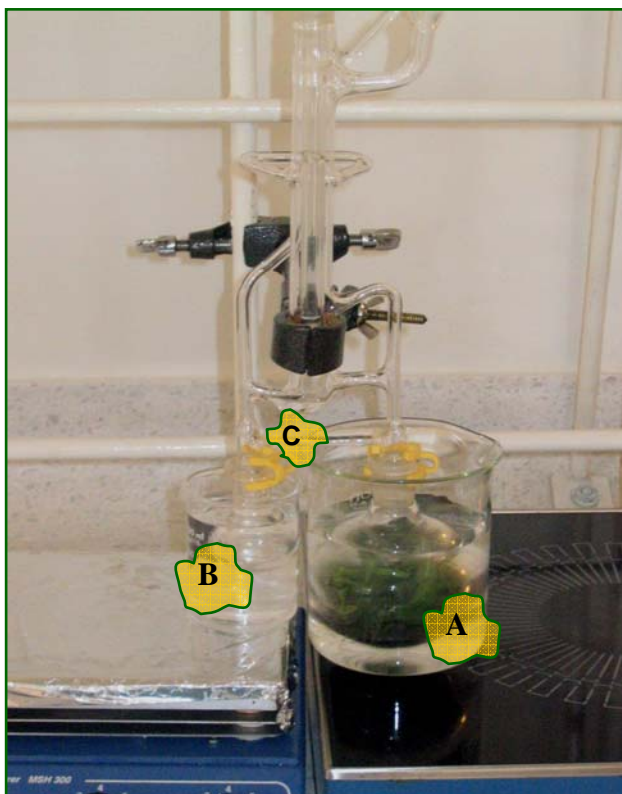


Figura 24. Equipo modificado de extracción para solventes de alta densidad para la SDE a microescala.

5.4.3 Extracción con fluido supercrítico. Para la obtención de los componentes volátiles se utilizó un Soxhlet de alta presión (J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.), en el cual se colocó el material vegetal finamente picado, para asegurar mayor área de contacto con el $\text{CO}_2\text{-SF}$. El Soxhlet y el balón se colocaron dentro de un reactor metálico en el cual se depositó CO_2 (hielo seco, ca. 300 g) entre las paredes del Soxhlet y el reactor, el sistema se cerró inmediatamente, para evitar pérdidas de CO_2 .

La parte inferior del reactor se calentó hasta 50 °C, utilizando un baño termostático Büchi tipo W 240, mientras que la parte superior se mantuvo a una temperatura de 5 °C, haciendo circular agua a través del condensador empleando un sistema de baño refrigerante circulatorio (PHABER Chiller 28L20K). Después de 2 h de extracción con CO₂, a una presión de 7,6 MPa, el baño termostático se retiró y se enfrió hasta lograr una presión de 0,3 MPa (**Figura 25**).



Figura 25. Equipo Soxhlet de alta presión (J & W *Scientific*) para la SFE con CO₂.

Posteriormente, se abrió la válvula de seguridad hasta que el manómetro registró el descenso total de la presión; luego, se retiró el Soxhlet del reactor y se adicionó diclorometano al extracto obtenido, éste se concentró a 1mL.

El proceso de extracción, anteriormente descrito, se realizó para hojas frescas (ca. 10 g) y secas (ca. 6 g).

5.5 CARACTERIZACIÓN DE AEs Y EXTRACTOS

5.5.1 Análisis cromatográfico. El análisis cualitativo y cuantitativo de AEs y extractos, se realizó por GC-MS, se utilizaron dos columnas capilares de polaridad diferente: apolar y polar, para dilucidar los compuestos presentes en los AEs y extractos, la cantidad de cada uno de éstos en las mezclas obtenidas por los diferentes métodos de extracción.

- **Preparación de la muestra.** Se tomó una alícuota (50 μL) del AE obtenido por MWHD, se disolvió en diclorometano junto con el patrón interno (*n*-tetradecano 1,0 μL) hasta un volumen final de 1 mL. A los extractos obtenidos por SDE y SFE, previamente concentrados, se les adicionó patrón interno *n*-tetradecano (1,0 y 0,4 μL , respectivamente) y se aforó con diclorometano a 1 mL. Posteriormente, se inyectó 1 μL de cada una de las soluciones al equipo GC-MS, para su análisis cromatográfico.
- **Análisis cualitativo.**

Columna apolar. El análisis se llevó a cabo por GC-MS en un equipo *Agilent Technologies 6890 Plus* (HP, Palo Alto, California, EE.UU.), acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5973 Network* (**Figura 26**), equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (250 °C, relación de *split* 1:30), un inyector automático *Agilent 7863*.

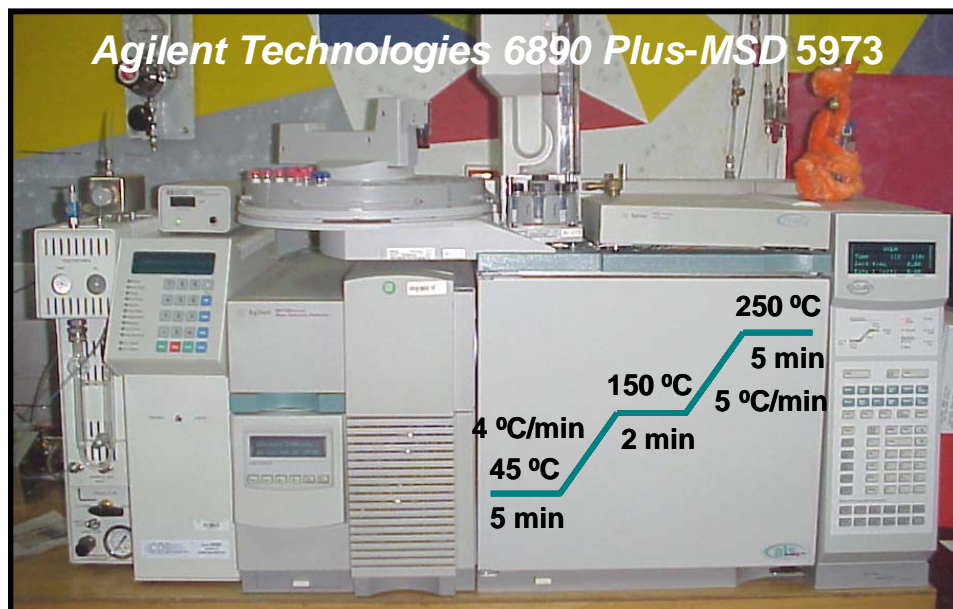


Figura 26. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Plus Series GC System* acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 5973 Network*.

Se utilizó una columna capilar de sílice fundida, DB-5MS (J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.) de 60 m x 0,25 mm (d.i.) x 0,25 μ m (d_f), con fase estacionaria 5%-fenil-poli(metilsiloxano). La programación de temperatura del horno fue de 45 °C (5 min) @ 5 °C/min, hasta 150 °C (2 min) @ 4 °C/min, luego, se incrementó hasta 250 °C (5 min) @ 5 °C/min, finalmente, la temperatura aumentó @ 10 °C/min hasta alcanzar 275 °C (15 min).

Los espectros de masas se obtuvieron por impacto de electrones (EI) de energía de 70 eV. Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia fueron de 230 y 285 °C, respectivamente. El gas de arrastre utilizado fue helio (99,995%, Aga Fano, S.A), con flujo constante de 1 mL/min.

Los espectros de masas y corrientes iónicas reconstruidas (TIC) fueron adquiridos usando un analizador cuadrupolar, por medio de barrido automático de frecuencia (*full scan*), a $4,75 \text{ scan s}^{-1}$, en el rango de masas m/z 40-350.

El reconocimiento de los componentes presentes en los aceites y extractos se realizó con base en los índices de retención de Kovàts, comparándolos con los valores reportados en la literatura [132] y sus espectros de masas, que se confrontaron con los reportados en las bases de datos Willey, NIST y Adams. Además, se realizó la confirmación de algunos componentes presentes en las muestras, usando los tiempos de retención y espectros de masas de patrones de terpenos certificados, analizados bajo las mismas condiciones operacionales.

Columna polar. En este análisis, se empleó un cromatógrafo *Agilent Technologies 6890N Network Series GC* acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 5975* (**Figura 27**). Los espectros se obtuvieron por impacto de electrones; el cromatógrafo fue equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (250 °C, relación *split* 50:1) y un inyector automático *Agilent Technologies 7683B Series Injector*. Los datos fueron adquiridos y procesados por el sistema de datos *HP-MS ChemStation G17001A* (Versión .00.01.27, 2002).

El proceso de separación de los metabolitos se llevó a cabo en una columna capilar polar DB-WAX (*J & W Scientific, Folsom, CA. EE.UU.*), con fase estacionaria entrecruzada e inmovilizada de poli(etilenglicol), de 60 m x 0,25 mm, (d.i.) x 0,25 μm (d_f).

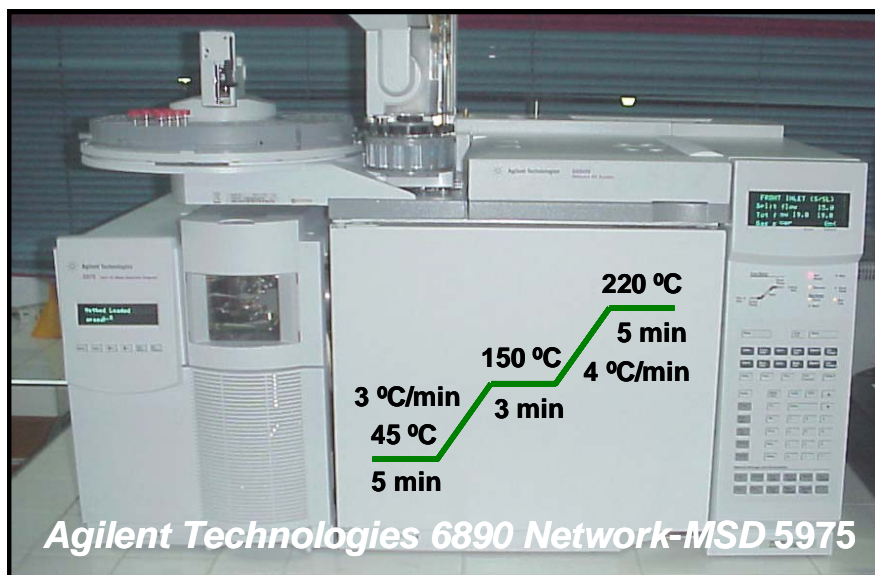


Figura 27. Cromatógrafo *Agilent Technologies 6890 Network Series GC* acoplado a un detector de masas *Agilent Technologies 5975*.

El gas de arrastre utilizado fue helio (99,995%, Aga Fano, S.A), con flujo constante de 1 mL/min. Se empleó una programación de temperatura, así: desde 45 °C (5 min) hasta 150 °C (3 min) @ 3 °C/min, y hasta 220 °C (5 min) @ 4 °C/min. Las temperaturas de la cámara de ionización y la línea de transferencia se mantuvieron a 230 y 285 °C, respectivamente.

Los espectros de masas y corrientes iónicas reconstruidas (TIC) fueron adquiridos en un cuadrupolo, por medio de barrido automático de frecuencia (*full scan*), a $4,75 \text{ scan s}^{-1}$, en el rango de masas m/z 40-350.

5.6 IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS PRESENTES EN AES Y EXTRACTOS

El reconocimiento de los compuestos se basó en los índices de retención de Kovàts, I_k , determinados experimentalmente para las fases estacionarias polar y apolar, y por su comparación con los reportados en la literatura [132].

Los índices se calcularon teniendo en cuenta los tiempos de retención de una serie homóloga de patrones de hidrocarburos desde C₁₀ hasta C₂₅, corridos en el GC-MS bajo las mismas condiciones operacionales, que los AEs y extractos, en dos fases estacionarias.

Los valores fueron calculados aplicando la siguiente fórmula:

$$I_k = 100n + 100 \left[\frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \right]$$

Donde:

I_k : Índice de retención del compuesto de interés x;

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

N: Número de átomos de carbono del *n*-alcano que eluye después del compuesto de interés x;

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

t_{RN} y t_{Rn} : Tiempos de retención de *n*-alcanos que eluyen antes y después del compuesto x.

Adicionalmente, se compararon los espectros de masas de cada componente con los reportados en las bases de datos Willey, NIST y Adams.

Para la identificación de algunos compuestos presentes en AEs y extractos, los valores de I_k calculados experimentalmente se compararon con los obtenidos (bajo las mismas condiciones) para patrones de terpenos certificados. Las características de los patrones certificados empleados se registran en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Patrones de hidrocarburos lineales y patrones de terpenos certificados utilizados para la determinación de los índices de Kováts.

| Compuesto | Casa Productora | Pureza |
|--|----------------------|--------|
| Óxido de cariofileno | <i>Sigma Aldrich</i> | 99% |
| (R)-(+)-Limoneno | <i>Sigma Aldrich</i> | 98% |
| (S)-(-)-Citronelal | <i>Sigma Aldrich</i> | 96% |
| Linalool | <i>Sigma Aldrich</i> | 97% |
| 6-Metil-5-hepten-2-ona | <i>Sigma Aldrich</i> | 99% |
| α -Pino | <i>Sigma Aldrich</i> | 98% |
| Acetato de geraniol | <i>Sigma Aldrich</i> | 98% |
| <i>p</i> -Cimeno | <i>Sigma Aldrich</i> | 98% |
| Mezcla de <i>cis</i> - y <i>trans</i> - citrales | <i>Sigma Aldrich</i> | 95% |
| β -Citronelol | <i>Sigma Aldrich</i> | 95% |
| Geraniol | <i>Sigma Aldrich</i> | 98% |
| <i>n</i> -Tetradecano | <i>AccuStandard</i> | 99,5% |
| Serie homóloga de hidrocarburos C ₁₀ -C ₂₅ | <i>AccuStandard</i> | |

5.7 ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LOS AEs Y EXTRACTOS DE *P. graveolens*

Los metabolitos secundarios identificados en los AEs y extractos de *Pelargonium graveolens*, se cuantificaron aplicando los métodos de estandarización interna y externa, para los compuestos mayoritarios, citronelol y geraniol.

5.7.1 Estandarización interna. Se empleó *n*-tetradecano (*Merck, Reference Substance for Gas-Chromatography*), como estándar interno, el cual se adicionó a AEs y extractos en la etapa previa de preparación de las muestras para análisis cromatográfico.

Las áreas de los picos cromatográficos de cada uno de los componentes de las muestras se compararon con el área reportada para el estándar interno. Las características del estándar interno utilizado se citan en la **Tabla 6**.

Las concentraciones de cada uno de los compuestos se calcularon mediante la siguiente fórmula:

$$C_x = C_A \times \frac{A_x}{A_A}$$

Donde:

C_x: Concentración del compuesto de interés x (ppm);

C_A: Concentración del estándar interno, *n*-tetradecano (ppm);

A_x: Área del compuesto de interés x (cuentas);

A_A: Área del estándar interno, *n*-tetradecano (cuentas).

5.7.2 Estandarización externa. Con el fin de determinar la concentración más exacta de los compuestos mayoritarios, citronelol y geraniol, en AEs y extractos de *P. graveolens*, las muestras fueron sometidas a análisis cromatográfico aplicando el método de patrón externo. Las características de los patrones certificados, utilizados para tal fin, se muestran en la **Tabla 6**.

- **Preparación de las soluciones.** Se prepararon soluciones *Stock* de citronelol (42850 ppm) y geraniol (43950 ppm). A partir de estas soluciones, se prepararon diluciones, en diferentes concentraciones. La **Tabla 7**, muestra los volúmenes empleados de las soluciones *Stock* para la preparación de las soluciones de calibración.

Tabla 7. Soluciones preparadas de citronelol y geraniol.

| Volumen solución stock, μL | Concentración de citronelol, ppm | Concentración de geraniol, ppm |
|-------------------------------|--|--------------------------------------|
| 0,5 | 21 | 22 |
| 1 | 43 | 44 |
| 2 | 86 | 88 |
| 5 | 214 | 220 |
| 10 | 429 | 440 |
| 15 | 643 | 659 |
| 20 | 857 | 879 |
| 50 | 2143 | 2198 |
| 100 | 4285 | 4395 |
| 150 | 6428 | 6593 |
| 200 | 8570 | 8790 |
| 300 | 12855 | 13185 |
| 400 | 17140 | 17580 |
| 600 | 25710 | 26370 |
| | 42850 | 43950 |

Una vez preparados las diferentes soluciones de patrones, se procedió a analizarlas bajo las mismas condiciones cromatográficas que las muestras de los AEs y extractos. Posteriormente, con los valores de concentración y las correspondientes áreas, se construyeron las curvas de calibración, para cada una de las sustancias de referencia, las cuales se ajustaron por regresión lineal. Los factores de respuesta del equipo, R_f , para cada una de las sustancias analizadas se determinaron con base en la pendiente obtenida para cada recta, la cual está asociada con la siguiente relación:

$$R_f = \frac{\text{Concentración}(\mu\text{g} / \text{mL})}{\text{Área}(\text{cuentas})}$$

Con los valores de R_f de los patrones certificados, se calcularon las concentraciones de estas sustancias en las muestras de AEs.

6. ANÁLISIS DE RESULTADOS

6.1 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA PLANTA

La identificación taxonómica se realizó en el Herbario Nacional Colombiano (COL, Bogotá), del Instituto de Ciencias Naturales, de la Universidad Nacional de Colombia. Los pliegos testigo de la planta fueron depositados como muestra permanente en el Herbario Nacional Colombiano de la siguiente manera: *Pelargonium graveolens* L'Her (Nº COL 517186). La planta fue clasificada por el Dr. J.A. Infante B.

6.2 ANÁLISIS DE SUELOS

La caracterización y el análisis de elementos menores del terreno utilizado para el cultivo experimental de *P. graveolens* fueron realizados en el Laboratorio Químico de Suelos de la Universidad Industrial de Santander, bajo la dirección del doctor Jaime Camargo. Los resultados del análisis se encuentran en el **Anexo 2**.

El análisis del suelo mostró que el terreno experimental utilizado presentó las siguientes propiedades: Textura-Franco–Arcilloso-Arenoso, caracterizada por proporciones adecuadas de arena, limo y arcilla; pH entre 6,4–7,0; contenido de materia orgánica-medio y contenido de nitrógeno total-medio.

Con este análisis se pudo observar que el suelo presentó características similares a las reportadas en la literatura [11, 15], que se utiliza para el buen desarrollo vegetativo de la especie bajo estudio.

6.3 RENDIMIENTO DE LOS AEs

El rendimiento de los AEs en las diferentes etapas de desarrollo vegetativo fue de 0,10–0,20% (base fresca) y 0,47–0,62% (base seca). Estos valores fueron determinados con base en el peso del material vegetal. Rendimientos de 0,1–0,2% (base fresca) fueron obtenidos por HD de *P. graveolens* en la India [22, 133, 134] e Irán [53], rendimientos en base seca no han sido reportados en la literatura. Por otra parte, la producción de AE en plantas de geranio, se puede ver influenciada por la temperatura (atmosférica y del suelo) y la humedad [133]. Cuando las condiciones climáticas no favorecen el desarrollo vegetativo de la planta, se provoca un estado de “estrés”, que podría conducir a una variación en la producción de AEs.

En la **Tabla 8**, se registran los rendimientos de los AEs de *P. graveolens*, obtenidos por MWHD, para hojas frescas, recolectadas en las tres etapas de desarrollo vegetativo bajo estudio.

Tabla 8. Rendimientos de los AEs de *Pelargonium graveolens*, obtenidos por MWHD, de hojas frescas, recolectadas en diferentes etapas de desarrollo vegetativo.

| Etapa de crecimiento, meses | Biomasa por planta*, g | Altura de la planta, m | Biomasa/ha, ton | Rendimiento, % (p/p)** | kg AE/ha |
|-----------------------------|------------------------|------------------------|-----------------|------------------------|----------|
| 6 | 519 | 0,65 | 14 | 0,12±0,01 | 16,8 |
| 9 | 724 | 0,78 | 19 | 0,15±0,01 | 28,5 |
| 12 | 836 | 0,90 | 23 | 0,24±0,02 | 55,2 |

*Determinada para 3 plantas.

**Extracciones por triplicado.

En la **Figura 28**, se ilustran los rendimientos de los AEs extraídos por MWHD, de hojas frescas y secas, respectivamente, de plantas recolectadas en diferentes etapas de desarrollo vegetativo.

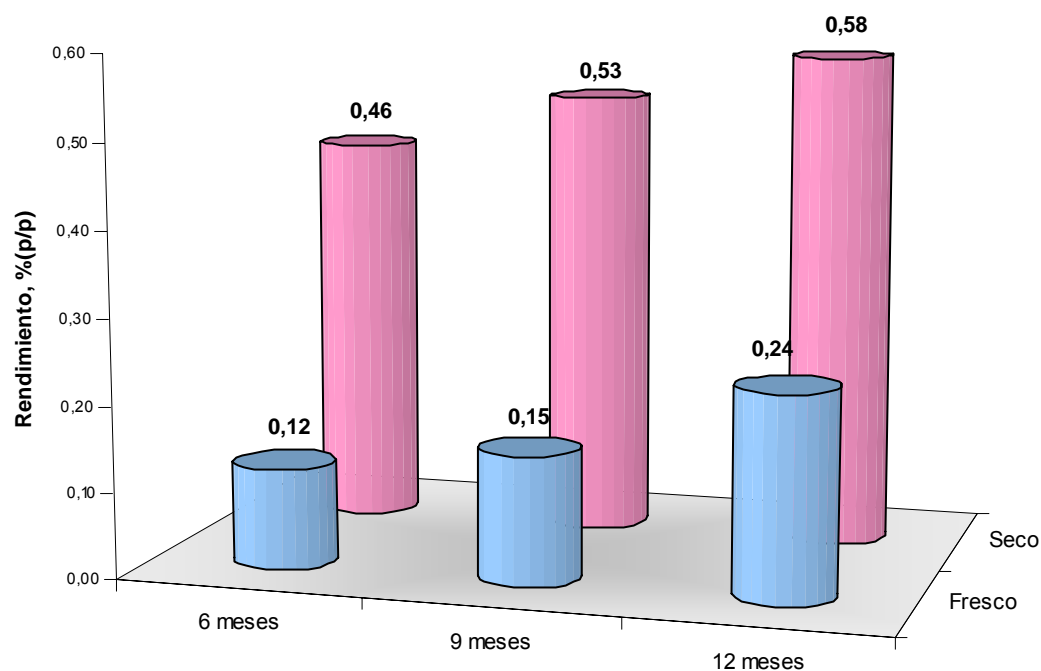


Figura 28. Rendimientos de los AEs de *Pelargonium graveolens*, extraídos por MWHD, de hojas frescas y secas, de plantas recolectadas en diferentes etapas de desarrollo vegetativo.

Para el material vegetal fresco, el rendimiento más alto de AE se obtuvo de las plantas recolectadas a los 12 meses de crecimiento (0,24%), observándose un incremento considerable en el rendimiento a medida que la planta se desarrolla vegetativamente; además se presenta una mayor producción de AE/ha, como consecuencia del aumento de la biomasa por planta.

Por otra parte, para el material vegetal sometido al proceso de secado (11 días), el rendimiento más alto se presentó igualmente a los 12 meses de

crecimiento de la planta (0,58%), pero la variación de éste en las diferentes etapas de desarrollo vegetativo no fue significativa en comparación con la observada para el material vegetal fresco.

6.4 PORCENTAJE DE AGUA PRESENTE EN LAS PLANTAS DE GERANIO

El tratamiento de secado de las plantas aromáticas, tiene por objetivo retirar el contenido de agua presente en células y tejidos frescos, manteniendo la calidad del material vegetal por un periodo de tiempo mayor. Este tratamiento evita la proliferación de microorganismos y permite mantener las características físico-químicas por estabilización de los metabolitos secundarios sensibles a la degradación por enzimas presentes en los tejidos vegetales. Por otra parte, las glándulas aceitosas estarán más disponibles y los volátiles serán arrastrados fácilmente por el vapor de agua, obteniéndose mayor rendimiento del aceite.

El proceso de secado utilizado en esta investigación consistió en un secado a la sombra. La humedad relativa promedio durante los procesos de secado realizados fue de 63% y la temperatura promedio de 27 °C.

Para determinar el porcentaje de agua, se emplearon plantas de *P. graveolens*, obtenidas bajo las condiciones descritas en la Parte Experimental (**Sección 5.3**). El porcentaje de agua presente en el material vegetal se calculó con base en las diferencias de peso entre el material vegetal fresco y el seco. En la **Tabla 9**, se registra la cantidad de agua perdida con el tiempo de secado.

Tabla 9. Porcentaje de agua presente en las hojas de *P. graveolens*.

| Etapa de crecimiento, meses | MV Fresco | Tiempo de secado, días | | | | | | |
|-----------------------------|------------|------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | |
| 6 | PMV, g | 2252,57 | 1508,08 | 1195,47 | 910,18 | 829,91 | 670,45 | 576,49 |
| | PP, g | | 744,49 | 1057,10 | 1342,39 | 1422,66 | 1582,12 | 1676,08 |
| | Agua, %p/p | | 33,05 | 46,93 | 59,59 | 63,17 | 70,24 | 74,41 |
| 9 | PMV, g | 1655,23 | 1138,35 | 850,02 | 639,76 | 534,78 | 453,97 | 420,10 |
| | PP, g | | 516,88 | 805,21 | 1015,47 | 1120,45 | 1201,03 | 1235,13 |
| | Agua, %p/p | | 31,23 | 48,65 | 61,35 | 67,69 | 72,56 | 74,62 |
| 12 | PMV, g | 75,44 | 50,92 | 35,37 | 27,58 | 23,42 | 19,95 | 18,14 |
| | PP, g | | 24,49 | 40,07 | 47,86 | 52,02 | 55,49 | 57,30 |
| | Agua, %p/p | | 32,46 | 53,12 | 63,44 | 68,96 | 73,56 | 75,95 |

MV: Material vegetal.

PMV: Peso del material vegetal.

PP: Peso perdido durante el secado.

Continuación de la Tabla 9.

| Etapa de crecimiento, meses | MV Fresco | Tiempo de secado, días | | | | | |
|-----------------------------|------------|------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | |
| 6 | PMV, g | 2252,57 | 504,20 | 444,92 | 428,65 | 411,65 | 410,92 |
| | PP, g | | 1748,37 | 1807,65 | 1823,92 | 1840,92 | 1841,65 |
| | Agua, %p/p | | 77,62 | 80,24 | 80,97 | 81,72 | 81,76 |
| 9 | PMV, g | 1655,23 | 408,41 | 392,67 | 386,03 | 381,64 | 380,33 |
| | PP, g | | 1246,56 | 1262,56 | 1269,20 | 1273,62 | 1274,90 |
| | Agua, %p/p | | 76,28 | 76,68 | 76,68 | 76,94 | 77,02 |
| 12 | PMV, g | 75,44 | 17,27 | 16,99 | 16,79 | 16,73 | 16,69 |
| | PP, g | | 58,17 | 58,45 | 58,65 | 58,71 | 58,75 |
| | Agua, %p/p | | 77,11 | 77,48 | 77,74 | 77,82 | 77,88 |

MV: Material vegetal.

PMV: Peso del material vegetal.

PP: Peso perdido durante el secado.

En la **Tabla 9**, se observa, que las hojas de *P. graveolens* poseen un volumen de agua que varía de 76 a 81% de su peso, durante los 11 días de secado, y la cantidad presente de agua no cambia considerablemente a partir del séptimo día, por lo que se podría detener en este punto el proceso de secado. En la **Figura 29**, se ilustra el proceso de secado para las tres etapas de crecimiento bajo estudio, observándose un comportamiento similar en cuanto al contenido de agua presente en el material vegetal.

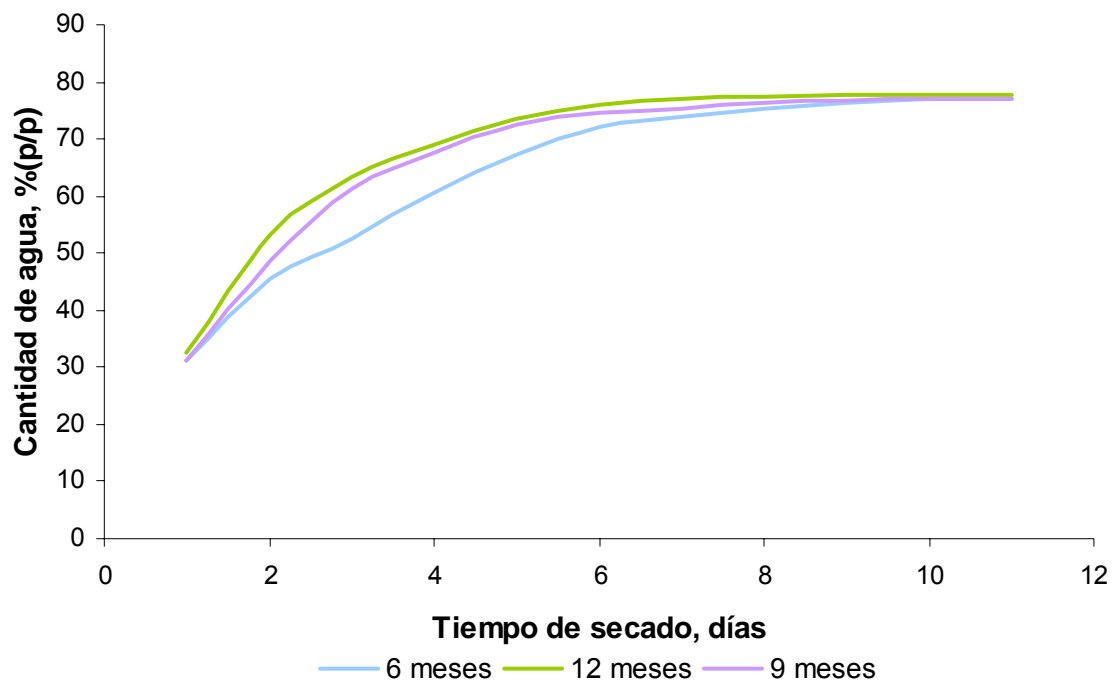


Figura 29. Pérdida de agua en hojas de *P. graveolens* en función del tiempo de secado, en diferentes etapas de desarrollo vegetativo.

6.5 CARACTERIZACIÓN DE AEs Y EXTRACTOS POR CG-MS

Los metabolitos secundarios aislados de hojas frescas y secas de geranio se analizaron mediante la técnica CG-MS, siguiendo los parámetros operacionales descritos en la **Sección 5.5** de la Parte Experimental.

6.5.1 Reproducibilidad de los tiempos de retención y de las áreas de los picos cromatográficos. La cromatografía es una técnica muy sensible que responde a cualquier tipo de interferencia presente en las muestras analizadas. Esto puede ocasionar alteraciones en la línea base y, en algunas ocasiones, solapamiento de picos cromatográficos de interés, brindando valores erróneos de áreas. Por tanto, es de gran importancia realizar un buen tratamiento de las muestras desde su extracción y almacenamiento, hasta la inyección al cromatógrafo de gases; así como verificar el correcto funcionamiento del equipo, estableciendo las mejores condiciones operacionales.

Según las normas GLP, los coeficientes de variación para áreas de picos cromatográficos no deben superar el 10% [135]. En este estudio, una muestra de AE de geranio se inyectó al cromatógrafo tres veces, bajo las mismas condiciones cromatográficas.

En la **Tabla 10**, se presentan los resultados de este análisis, donde se puede observar que los coeficientes de variación (CV) para las áreas medidas en cuentas, no superan el 5%, y para los porcentajes relativos de áreas estuvieron entre 1 y 3%. Esto se refleja en una alta reproducibilidad de los análisis mediante CG-MS, garantizando una correcta caracterización, cualitativa y cuantitativa, de AEs y extractos de geranio.

Tabla 10. Estudio de la reproducibilidad de las áreas cromatográficas de algunos compuestos presentes en el AE de geranio (*P. graveolens*).

| COMPUESTO | ÁREAS | | ÁREAS PROMEDIO | | σ | | CV (%) | |
|---------------------------|------------|--------------|----------------|--------------|----------|--------------|---------|--------------|
| | Cuentas | Relativa (%) | Cuentas | Relativa (%) | Cuentas | Relativa (%) | Cuentas | Relativa (%) |
| Linalool | 63504159 | 0,61 | 63834221 | 0,65 | 395093 | 0,03 | 1 | 5 |
| | 63726501 | 0,65 | | | | | | |
| | 64272002 | 0,67 | | | | | | |
| <i>cis</i> -Óxido de rosa | 85232949 | 0,82 | 86227257 | 0,87 | 863897 | 0,04 | 1 | 5 |
| | 86654908 | 0,89 | | | | | | |
| | 86793915 | 0,91 | | | | | | |
| <i>cis</i> -Óxido de rosa | 47674916 | 0,46 | 48040875 | 0,49 | 320940 | 0,02 | 1 | 5 |
| | 48173280 | 0,49 | | | | | | |
| | 48274429 | 0,51 | | | | | | |
| <i>iso</i> -Mentona | 454598530 | 4,40 | 450674009 | 4,57 | 3420612 | 0,15 | 1 | 3 |
| | 449098002 | 4,61 | | | | | | |
| | 448325496 | 4,69 | | | | | | |
| Citronelol | 1549565133 | 15,00 | 1514943098 | 15,35 | 31259104 | 0,31 | 2 | 2 |
| | 1506470496 | 15,48 | | | | | | |
| | 1488793664 | 15,58 | | | | | | |
| Geraniol | 653512587 | 6,32 | 634135922 | 6,42 | 19211822 | 0,09 | 3 | 1 |
| | 633801881 | 6,51 | | | | | | |
| | 615093299 | 6,44 | | | | | | |
| Formiato de citronelilo | 930743902 | 9,01 | 907243932 | 9,19 | 20567779 | 0,17 | 2 | 2 |
| | 898468356 | 9,23 | | | | | | |
| | 892519538 | 9,34 | | | | | | |
| Formiato de geraniol | 392693602 | 3,80 | 380087517 | 3,85 | 11234148 | 0,04 | 3 | 1 |
| | 376434201 | 3,87 | | | | | | |
| | 371134749 | 3,88 | | | | | | |
| 6,9-Guaiadieno | 700803006 | 6,78 | 669967857 | 6,79 | 27095103 | 0,02 | 4 | 0,3 |
| | 659137194 | 6,77 | | | | | | |
| | 649963370 | 6,80 | | | | | | |

σ : Desviación estándar.

CV: Coeficiente de variación.

Por otra parte, los tiempos de retención para los componentes presentes en una muestra, pueden variar de una corrida a otra. Cambios en parámetros operacionales del cromatógrafo tales como velocidad del gas de arrastre, modo de inyección, temperatura del horno, entre otros, inciden directamente sobre la velocidad de elusión de los compuestos, afectando sus tiempos de retención.

Según las normas GLP, los coeficientes de variación para los tiempos de retención de los constituyentes presentes en las muestras, cuando se trabaja en inyección automática, no deben exceder el 2% [135]. En la **Tabla 11**, se presentan los CV de los t_R de algunos de los compuestos presentes en las esencias de geranio, para tres muestras diferentes. Como se puede observar, estos valores variaron entre 0,02 y 0,09%, lo que garantizó la alta reproducibilidad y la buena calidad de los análisis cromatográficos realizados.

Tabla 11. Reproducibilidad de los tiempos de retención de algunos compuestos presentes en el AE de geranio.

| Compuesto | Tiempos de retención, min (n=3) | | | t_R promedio | σ | CV (%) |
|---------------------------------------|------------------------------------|--------|--------|----------------|----------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | | | |
| α -Pino | 17,372 | 17,359 | 17,389 | 17,37 | 0,02 | 0,09 |
| 6-Metil-5-hepten-2-ona | 19,55 | 19,54 | 19,56 | 19,60 | 0,01 | 0,06 |
| <i>p</i> -Cimeno | 21,40 | 21,40 | 21,42 | 21,40 | 0,01 | 0,03 |
| Limoneno | 21,60 | 21,60 | 21,62 | 21,60 | 0,01 | 0,03 |
| <i>cis</i> -Óxido de rosa | 24,93 | 24,94 | 24,94 | 24,90 | 0,01 | 0,02 |
| <i>trans</i> -Óxido de rosa | 25,61 | 25,62 | 25,61 | 25,612 | 0,005 | 0,02 |
| Citronelal | 26,59 | 26,60 | 26,59 | 26,594 | 0,004 | 0,02 |
| Mentona | 26,91 | 26,92 | 26,91 | 26,912 | 0,003 | 0,01 |
| <i>iso</i> -Mentona | 27,37 | 27,38 | 27,37 | 27,375 | 0,003 | 0,01 |
| Citronelol | 29,77 | 29,77 | 29,76 | 29,77 | 0,01 | 0,03 |
| Geraniol | 30,61 | 30,61 | 30,60 | 30,61 | 0,01 | 0,03 |
| Formiato de geraniol | 32,11 | 32,12 | 32,11 | 32,11 | 0,01 | 0,02 |
| α -Copaeno | 35,34 | 35,35 | 35,34 | 35,34 | 0,01 | 0,02 |
| <i>trans</i> - β -Cariofileno | 37,05 | 37,06 | 37,05 | 37,060 | 0,005 | 0,01 |
| 6,9-Guaiadieno | 37,75 | 37,76 | 37,75 | 37,755 | 0,004 | 0,01 |
| Germacreno D | 39,12 | 39,12 | 39,12 | 39,118 | 0,003 | 0,01 |
| Viridifloreno | 39,39 | 39,39 | 39,38 | 39,386 | 0,003 | 0,01 |
| δ -Amorfenol | 40,11 | 40,11 | 40,11 | 40,111 | 0,003 | 0,01 |
| <i>trans</i> -Tiglatol de citronelilo | 43,97 | 43,97 | 43,96 | 43,96 | 0,01 | 0,02 |
| Tiglatol de geraniol | 44,88 | 44,88 | 44,87 | 44,88 | 0,01 | 0,02 |

σ : Desviación estándar

CV: Coeficiente de variación

6.5.2 Reproducibilidad de los índices de retención de Kovàts determinados experimentalmente. Debido a que, el análisis cualitativo de las esencias de geranio se realizó con base en los índices de retención de Kovàts (I_K), calculados experimentalmente para cada componente, se hizo un estudio de reproducibilidad de los respectivos valores, a fin de evitar errores en la caracterización de las muestras.

En la **Tabla 12**, se indican los I_K , calculados para fases estacionarias apolar y polar, para algunos constituyentes del AE de geranio. Los valores fueron comparados entre cinco muestras diferentes, corridas bajo las mismas condiciones operacionales. Este análisis mostró un alto grado de reproducibilidad en los I_K calculados experimentalmente, garantizando la utilización inequívoca de sus valores para la identificación de los respectivos constituyentes en las esencias. Los valores de desviación estándar se encontraron entre 0,18 y 0,19%, y los CV variaron entre 0,013 y 0,052%.

Los I_K , en la fase apolar, presentaron diferencias de 3-12 unidades con respecto a los reportados en la literatura; mientras que los de la fase polar presentaron diferencias más grandes, entre 2 y 34 unidades. Esto se debe a varios factores, entre los cuales se cuentan la programación de la temperatura del horno, la longitud de las columnas empleadas y el estado de la columna sobre la cual se corre la muestra, entre otras.

Tabla 12. Reproducibilidad de los índices de retención de Kovàts, I_K , calculados experimentalmente, sobre columnas de fase estacionaria polar y apolar.

| Compuesto | I_K experimental (n=3) | | | | | I_K promedio | I_K^* | σ | CV,% |
|---|--------------------------|------|------|------|------|-------------------|---------|----------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | |
| COLUMNA DB-5 (Fase estacionaria apolar) | | | | | | | | | |
| α -Felandreno | 1011 | 1009 | 1010 | 1010 | 1010 | 1010 | 1002 | 0,53 | 0,052 |
| Limoneno | 1034 | 1033 | 1034 | 1033 | 1033 | 1033 | 1029 | 0,44 | 0,042 |
| Linalool | 1102 | 1101 | 1102 | 1101 | 1102 | 1102 | 1096 | 0,44 | 0,040 |
| <i>cis</i> -Óxido de rosa | 1113 | 1112 | 1113 | 1113 | 1114 | 1113 | 1108 | 0,43 | 0,039 |
| <i>trans</i> -Óxido de rosa | 1130 | 1130 | 1130 | 1130 | 1131 | 1130 | 1125 | 0,41 | 0,036 |
| Mentona | 1163 | 1163 | 1163 | 1163 | 1164 | 1163 | 1152 | 0,31 | 0,027 |
| <i>iso</i> -Mentona | 1175 | 1174 | 1175 | 1174 | 1175 | 1174 | 1162 | 0,52 | 0,044 |
| Citronelol | 1236 | 1236 | 1236 | 1235 | 1235 | 1236 | 1225 | 0,56 | 0,045 |
| Geraniol | 1254 | 1253 | 1254 | 1254 | 1254 | 1254 | 1252 | 0,52 | 0,042 |
| Formiato de geraniol | 1301 | 1301 | 1301 | 1301 | 1302 | 1301 | 1298 | 0,63 | 0,049 |
| COLUMNA DB-WAX (Fase estacionaria polar) | | | | | | | | | |
| α -Felandreno | 1157 | 1157 | 1158 | 1158 | 1158 | 1158 | 1177 | 0,29 | 0,025 |
| Limoneno | 1191 | 1191 | 1191 | 1190 | 1190 | 1191 | 1206 | 0,50 | 0,042 |
| Linalool | 1540 | 1540 | 1541 | 1540 | 1540 | 1540 | 1506 | 0,56 | 0,037 |
| <i>cis</i> -Óxido de rosa | 1349 | 1349 | 1351 | 1350 | 1350 | 1350 | 1354 | 0,49 | 0,036 |
| <i>trans</i> -Óxido de rosa | 1365 | 1365 | 1366 | 1365 | 1365 | 1365 | 1370 | 0,48 | 0,035 |
| Mentona | 1462 | 1462 | 1464 | 1463 | 1463 | 1463 | 1478 | 0,59 | 0,041 |
| <i>iso</i> -Mentona | 1493 | 1494 | 1495 | 1494 | 1494 | 1494 | | 0,59 | 0,040 |
| Citronelol | 1766 | 1767 | 1767 | 1767 | 1767 | 1767 | 1765 | 0,60 | 0,034 |
| Geraniol | 1844 | 1845 | 1845 | 1845 | 1845 | 1845 | 1842 | 0,31 | 0,017 |
| Formiato de geraniol | 1700 | 1701 | 1701 | 1701 | 1701 | 1701 | 1684 | 0,31 | 0,018 |

σ : Desviación estándar.

CV: Coeficiente de variación.

I_K^* : Índices de retención de Kovàts reportados en la literatura [132, 136].

6.5.3 Determinación de la composición de AEs y extractos de *P. graveolens*. Con el fin de obtener una caracterización química completa de los metabolitos secundarios volátiles y semivolátiles de la planta *P. graveolens*, se utilizaron técnicas destilativas (MWHD) y extractivas (SDE y SFE). Las condiciones de extracción se citan en la **Sección 5.4** de la Parte Experimental.

En las fracciones volátiles aisladas por MWHD y SDE se detectaron, por GC-MS, 141 compuestos en cantidades relativas >0,03%; de ellos, se identificaron positivamente, usando I_K (en columnas polar y apolar) y espectros de masas (EI, 70 eV) 113 compuestos (80%), bajo los parámetros de integración aplicados (umbral de integración, $Thshd=17$ y área de rechazo del pico en la base= 0,1). Por otra parte, en los extractos aislados por SFE se detectaron alrededor de 74 compuestos, y se identificaron positivamente 65 compuestos (88 %).

En la **Figura 30**, se ilustran los perfiles cromatográficos típicos de los metabolitos secundarios volátiles de *P. graveolens*, aislados por MWHD, SDE y SFE. Se encontraron perfiles cromatográficos similares para los AEs, obtenidos por MWHD, y los extractos aislados por SDE.

En la **Tabla 13**, se registran la identificación y la cantidad relativa (%) de los compuestos presentes en AEs y extractos de *P. graveolens*. Para la identificación de algunos compuestos presentes en AEs y extractos, los valores de t_R e I_K calculados experimentalmente se compararon con los obtenidos para patrones de terpenos certificados (**Anexo 3**).

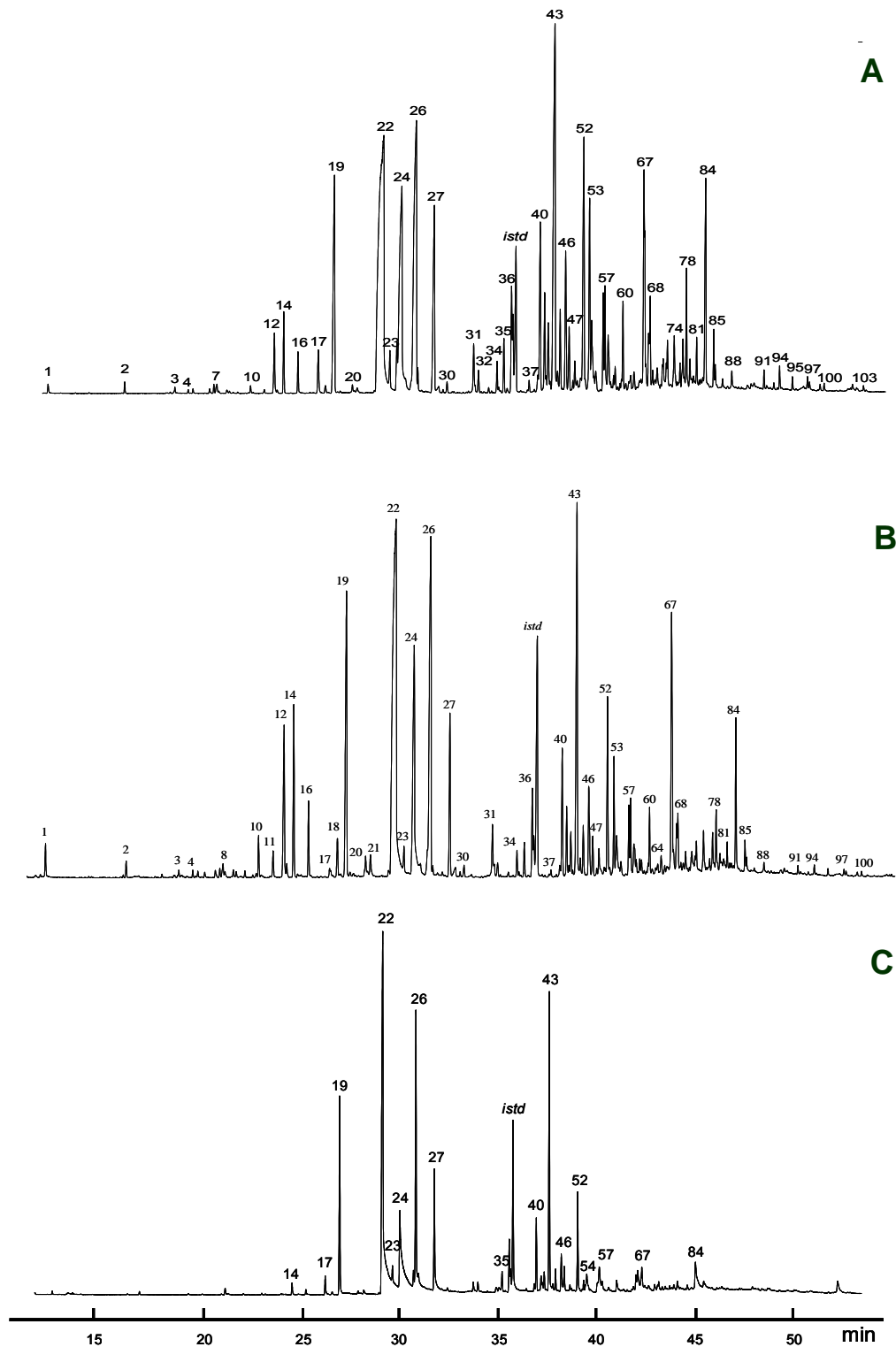


Figura 30. Perfiles cromatográficos típicos de los AEs y extractos de hojas frescas de *Pelargonium graveolens*, obtenidos por: **A.** MWHD, **B.** SDE, **C.** SFE. Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV). La identificación de los compuestos se reporta en la **Tabla 13.**

Tabla 13. Composición química de los metabolitos secundarios de *P. graveolens*, aislados por diferentes técnicas de extracción.

| No. Pico ^a | Compuesto | Tipo | I _K ^b | | Cantidad relativa, % ^c | | | Nota odorífera [137, 138] |
|-----------------------|---|-------------------|-----------------------------|--------------|-----------------------------------|-------------|-----------|-----------------------------|
| | | | DB-5 | DB- WAX | MWHD | SDE | SFE | |
| 1 | <i>trans</i> -2-Hexenal + <i>trans</i> -3-Hexenol | O | 846 | 1379 | 0,08±0,02 | 0,67±0,05 | – | Herbáceo |
| 2 | α -Pinoeno ** | HM | 933 | 1014 | 0,11±0,01 | 0,24±0,07 | – | A pino, herbáceo |
| 3 | β -Mirceno | HM | 990 | | 0,071±0,004 | 0,11±0,02 | – | Cítrico, a lima |
| 4 | Acetato de <i>trans</i> -3-hexenilo | O | 1005 | 1310 | 0,032±0,004 | 0,14±0,08 | – | |
| 5 | α -Felandreno | HM | 1009 | 1158 | 0,043±0,002 | 0,09±0,01 | – | Cítrico |
| 6 | <i>p</i> -Cimeno ** | HA | 1029 | | 0,0530±0,0006 | 0,12±0,01 | – | Cítrico |
| 7 | Limoneno ** | HM | 1034 | 1191 | 0,074±0,008 | 0,12±0,01 | – | A limón |
| 8 | β -Felandreno + <i>cis</i> - β -Ocimeno + Compuesto oxigenado, C ₁₀ H ₁₈ O (N.I.) | HM HM O | 1037 1229 | 1200 | 0,162±0,005 | 0,24±0,01 | – | Cítrico, mentolado |
| 9 | Fenilacetaldehido + <i>trans</i> - β -Ocimeno | HM | 1047 | | 0,032±0,001 | 0,10±0,02 | – | Dulce Herbáceo |
| 10 | <i>trans</i> -Óxido de linalilo-(furanóide) | ETM | 1075 | 1440 | 0,069±0,006 | 0,47±0,03 | – | |
| 11 | <i>cis</i> -Óxido de linalilo-(furanóide) | ETM | 1091 | | 0,044±0,002 | 0,37±0,03 | – | |
| 12 | Linalool | ALM | 1103 | 1540 | 0,9±0,3 | 2,3±0,5 | – | Floral, dulce, fresco |
| 13 | <i>trans</i> -6-metil-3,5-heptadien-2-ona | O | 1106 | | 0,04±0,03 | 0,18±0,02 | – | |
| 14 | <i>cis</i> -Óxido de rosa | ETM | 1114 | 1350 | 0,76±0,01 | 2,1±0,2 | 0,5±0,3 | Floral (como a rosa) |
| 15 | Alcohol de 2-Feniletilo | | | | <i>tr</i> | 0,05±0,01 | – | |
| 16 | <i>trans</i> -Óxido de rosa | ETM | 1131 | 1365 | 0,3882±0,0003 | 0,88±0,05 | <i>tr</i> | Floral (como a rosa) |
| 17 | Citronelal ** | ADM | 1155 | 1475 | 0,55±0,02 | 0,29±0,04 | 0,8±0,5 | Floral, fuerte nota cítrica |
| 18 | Mentona | CM | 1164 | 1463 | 0,127±0,007 | 0,62±0,03 | <i>tr</i> | |
| 19 | <i>iso</i> -Mentona ** | CM | 1175 | 1494 | 3,7± 0,1 | 5,36±0,04 | 6,5±0,7 | |
| 20 | <i>neo-iso</i> -Mentol | ALM | 1196 | | 0,133±0,004 | 0,42±0,09 | – | |
| 21 | α -Terpineol | ALM | 1202 | | 0,11±0,04 | 0,39±0,09 | – | Dulce, floral |
| 22 | Citronelol ** | ALM | 1236 | 1767 | 14,9±0,2 | 19,1±0,6 | 19±1 | Floral, intensa nota a rosa |
| 23 | Neral ** | ADM | 1244 | 1679 | 0,67±0,04 | 0,60±0,03 | 2±1 | Floral |
| 24 | Geraniol ** | ALM | 1257 | 1845 | 7,5±0,6 | 6±1 | 8±1 | Floral, dulce-frutal |
| 25 | Piperitona | CM | 1278 | | <i>tr</i> | 0,38±0,05 | – | |
| 26 | Geraniol** + Formiato de citronelilo + Formiato de nerilo | ADM ESM ESM | 1280 | 1729 1619 | 8,4±0,3 | 9,3±0,2 | 14±1 | Floral, frutal |
| 27 | Formiato de geraniol | ESM | 1301 | 1701 | 3,2±0,1 | 2,41±0,04 | 6,5±0,2 | Floral |
| 28 | Ácido citrónico | ACM | 1306 | | 0,135±0,002 | 0,27±0,02 | – | |
| 29 | Compuesto oxigenado, C ₁₁ H ₁₈ O ₂ (N.I.) | O | 1311 | | 0,030±0,002 | 0,084±0,004 | – | |

Continuación de la **Tabla 13.**

| | | | | | | | | |
|----|---|-----------------|------|--------------|---------------|-------------|-----------|---------------------------------|
| 30 | Ácido nerólico + Compuesto oxigenado, C ₁₂ H ₂₀ O ₂ (N.I.) | ACM O | 1316 | | 0,121±0,005 | 0,170±0,004 | – | |
| 31 | Ácido geránico + Acetato de citronelilo | ACM ESM | 1349 | 2337 1656 | 0,613±0,004 | 1,0±0,1 | <i>tr</i> | Floral, cítrico |
| 32 | Propanoato de fenetilo + α -Cubebeno | ESA HS | 1355 | 1458 | 0,254±0,007 | 0,25±0,01 | <i>tr</i> | |
| 33 | Sesquiterpeno, C ₁₅ H ₂₄ (N.I.) | HS | 1367 | | 0,053±0,002 | 0,09±0,01 | – | A madera, picante |
| 34 | Acetato de geranilo ** + α -Ylangeno | ESM HS | 1377 | 1750 | 0,42±0,01 | 0,336±0,004 | <i>tr</i> | Floral, dulce-frutal |
| 35 | α -Copaeno | HS | 1386 | | 0,54±0,01 | 0,47±0,03 | 0,9±0,6 | A madera, herbáceo |
| 36 | β -Bourbuneno + β -Elemeno + Butanoato de fenetilo | HS HS O | 1395 | 1521 1591 | 1,5±0,5 | 1,8±0,1 | 4,6±0,8 | Herbáceo A madera Picante |
| 37 | <i>cis</i> - β -Cariofileno + α -Gurjuneno | HS HS | 1419 | 1533 | 0,1401±0,0007 | 0,15±0,01 | – | |
| 38 | Compuesto oxigenado, C ₁₆ H ₂₄ O ₂ (N.I.) + Sesquiterpeno, C ₁₅ H ₂₄ (N.I.) | O HS | 1426 | | 0,04±0,03 | 0,19±0,02 | – | |
| 39 | β -Ylangeno | HS | 1430 | | <i>tr</i> | <i>tr</i> | – | |
| 40 | <i>trans</i> - β -Cariofileno | HS | 1434 | 1603 | 2,19±0,06 | 1,8±0,1 | 3,2±0,7 | Picante, a madera |
| 41 | Propionato de citronelilo + α -Bergamoteno + β -Copaeno | ESM HS HS | 1441 | 1721 | 1,18±0,02 | 0,96±0,05 | 1,0±0,7 | Floral, frutal |
| 42 | α -Guaieno | HS | 1445 | 1594 | 0,94±0,02 | 0,7±0,1 | 0,8±0,5 | A madera |
| 43 | 6,9-Guaiadieno | HS | 1454 | | 7,4±0,2 | 6,7±0,3 | 8,5±0,4 | |
| 44 | 4 α ,10 α -Guaia-1(5),6-dieno | HS | 1458 | | 0,303±0,005 | 0,317±0,004 | – | |
| 45 | 4 β ,10 β -Guaia-1(5),6-dieno | HS | 1461 | 1640 | 0,883±0,008 | 0,75±0,03 | 0,9±0,6 | |
| 46 | Propanoato de nerilo + α -Humuleno | ESM HS | 1469 | 1676 | 1,793±0,006 | 1,58±0,04 | 1,8±0,2 | Floral, frutal A madera |
| 47 | <i>allo</i> -Aromadendreno | HS | 1474 | 1655 | 0,70±0,02 | 0,61±0,02 | 1,4±0,5 | A madera, herbáceo, picante |
| 48 | Isobutanoato de citronelilo | ESM | 1479 | | 0,125±0,002 | 0,12±0,05 | <i>tr</i> | Floral, frutal |
| 49 | <i>trans</i> -Cadina-1(6),4-dieno* | HS | 1482 | 1788 | 0,375±0,004 | 0,56±0,01 | <i>tr</i> | |
| 50 | γ -Muuroleno | HS | 1485 | 1693 | 0,160±0,002 | <i>tr</i> | – | |
| 51 | α -Amorfeno | HS | | | 0,273±0,003 | 0,26±0,01 | – | |
| 52 | Germacreno D | HS | 1494 | 1717 | 3,7±0,2 | 2,86±0,02 | 4±1 | A madera, picante |
| 53 | Viridifloreño | HS | 1502 | 1701 | 2,22±0,06 | 1,64±0,07 | <i>tr</i> | |
| 54 | Isobutanoato de geranilo + α -Muuroleno + Bicyclgermacreno | ESM HS HS | 1506 | 1806 1741 | 1,26±0,04 | 1,06±0,04 | 2±1 | Floral, frutal |
| 55 | β -Bisaboleno | HS | 1512 | | 0,305±0,004 | 0,27±0,01 | – | Dulce |
| 56 | γ -Cadineno + Butanoato de citronelilo | HS ESM | 1524 | 1796 | 0,99±0,02 | 0,91±0,04 | <i>tr</i> | A madera Floral, frutal |
| 57 | δ -Amorfeno | HS | 1527 | | 1,07±0,03 | 0,963±0,003 | 3,3±0,1 | |
| 58 | <i>trans</i> -Calameneno + Zonareno + Furopelargona A | HS HS O | 1532 | 2093 | 0,96±0,01 | 0,95±0,05 | <i>tr</i> | |
| 59 | Sesquiterpeno ,C ₁₅ H ₂₄ (N.I.) | HS | 1543 | | 0,25±0,01 | 0,24±0,01 | – | |

Continuación de la **Tabla 13.**

| | | | | | | | | |
|----|--|-----|------|------|-------------|-------------|---------|--------------------------|
| 60 | α -Calacoreno | HS | 1555 | 1923 | 0,93±0,02 | 0,973±0,004 | tr | Floral, frutal |
| | + Butanoato de geranilo | ESM | 1555 | 1888 | | | | |
| 61 | Compuesto oxigenado (N.I.) | O | 1560 | | 0,10±0,01 | 0,11±0,01 | – | |
| 62 | Compuesto oxigenado, C ₁₅ H ₂₄ O (N.I.) | O | 1565 | | tr | tr | – | |
| 63 | Isovalerato de citronelilo | ESM | 1567 | | 0,31±0,03 | 0,32±0,02 | tr | Floral, frutal |
| 64 | β -Calacoreno | HS | 1573 | | 0,26±0,02 | 0,28±0,03 | tr | |
| | + 1- <i>nor</i> -Bourbonanona | O | 1573 | | | | | |
| 65 | Benzoato de 3- <i>cis</i> -hexenilo | O | 1578 | | 0,18±0,03 | 0,09±0,05 | – | |
| 66 | Compuesto oxigenado, C ₁₅ H ₂₄ O (N.I.) | O | 1584 | | 0,14±0,02 | 0,238±0,003 | – | |
| 67 | Tiglato de 2-feniletilo | ESA | | 2196 | | | | |
| | + Compuesto oxigenado, C ₁₅ H ₂₄ O (N.I.) | O | 1589 | | 3,6±0,1 | 4,7±0,3 | 3±1 | |
| | + Espatuleno | ALS | | 2130 | | | | |
| 68 | Isovalerato de geranilo | ESM | 1598 | 2035 | 1,5±0,1 | 1,46±0,02 | 3,2±0,2 | Floral, frutal |
| | + Óxido de cariofileno ** | ETS | | 1999 | | | | A madera, picante |
| 69 | Compuesto oxigenado, C ₁₅ H ₂₄ O (N.I.) | O | 1603 | | 0,23±0,02 | 0,20±0,04 | – | |
| 70 | Compuesto oxigenado, C ₁₅ H ₂₄ O (N.I.) | O | 1607 | | 0,16±0,02 | 0,18±0,02 | – | |
| 71 | Compuesto oxigenado, C ₁₅ H ₂₂ O (N.I.) | O | 1611 | | 0,36±0,04 | 0,42±0,02 | – | |
| 72 | Valerato de citronelilo | ESM | 1621 | | 0,60±0,06 | 0,59±0,03 | tr | Floral, frutal |
| | + Compuesto oxigenado, C ₁₅ H ₂₆ O (N.I.) | O | | | | | | |
| 73 | Compuesto oxigenado, C ₁₅ H ₂₄ O (N.I.) | O | 1629 | 2067 | 0,72±0,06 | 0,73±0,03 | tr | |
| | + 1,10- <i>di-epi</i> -Cubenol | ALS | | 2075 | | | | |
| 74 | 1- <i>epi</i> -Cubenol | ALS | 1641 | | 0,75±0,05 | 0,71±0,02 | tr | |
| | + Compuesto oxigenado, C ₁₅ H ₂₄ O ₂ (N.I.) | O | 1641 | | | | | |
| 75 | γ -Eudesmol | ALS | 1646 | | 0,07±0,02 | 0,077±0,003 | – | |
| 76 | Valerato de geranilo | ESM | 1652 | | 0,29±0,04 | 0,27±0,02 | tr | Floral, frutal |
| | + Compuesto oxigenado, C ₁₅ H ₂₆ O (N.I.) | O | 1652 | | | | | |
| 77 | Cubenol | ALS | 1657 | | 0,68±0,06 | 0,67±0,02 | – | |
| | + <i>epi</i> - α -Cadinol | ALS | 1657 | | | | | |
| 78 | <i>trans</i> -Tiglato de citronelilo | ESM | 1663 | 2006 | 1,18±0,07 | 0,87±0,02 | tr | Floral, frutal |
| 79 | α -Cadinol | ALS | 1669 | 2237 | 0,45±0,05 | 0,477±0,005 | – | |
| 80 | <i>neo</i> -Intermedeol * | ALS | 1676 | 2262 | 0,24±0,03 | 0,32±0,01 | – | |
| 81 | <i>iso</i> -Caproato de citronelilo * | ESM | 1681 | | 0,47±0,05 | 0,41±0,01 | tr | |
| 82 | Cadaleno | HA | 1689 | | 0,10±0,04 | 0,15±0,01 | – | |
| 83 | Compuesto oxigenado, C ₁₅ H ₂₆ O ₂ (N.I.) | O | 1692 | | 0,13±0,03 | tr | – | |
| 84 | Tiglato de geranilo | ESM | 1697 | 2109 | 2,7±0,1 | 1,94±0,05 | 3,2±0,9 | Floral, frutal, herbáceo |
| 85 | <i>iso</i> -Caproato de geranilo * | ESM | 1713 | | 0,61±0,08 | 0,5±0,2 | tr | |
| 86 | 10- <i>nor</i> -Calamenen-10-ona * | CS | 1716 | | 0,3±0,2 | 0,2±0,1 | – | |
| | + Caproato de citronelilo* | ESM | 1716 | | | | | |
| 87 | Compuesto oxigenado, C ₁₅ H ₂₄ O ₂ (N.I.) | O | 1730 | | 0,14±0,04 | 0,06±0,02 | – | |
| 88 | Caproato de geranilo * | ESM | 1749 | | 0,196±0,009 | 0,22±0,02 | tr | |
| 89 | Benzoato de bencilo | ESA | 1781 | | 0,075±0,007 | 0,06±0,01 | – | |
| | + Compuesto oxigenado, C ₁₅ H ₂₂ O (N.I.) | O | 1781 | | | | | |
| 90 | <i>iso</i> -Heptanoato de citronelilo * | ESM | 1787 | | 0,07±0,02 | 0,07±0,01 | tr | |
| | + Guiazuleno | HS | 1787 | | | | | |
| 91 | Heptanoato de citronelilo* | ESM | 1813 | | 0,16±0,03 | 0,12±0,02 | – | |
| 92 | Compuesto oxigenado, C ₁₇ H ₃₀ O (N.I.) | O | 1819 | | 0,07±0,05 | 0,07±0,05 | – | |
| 93 | Alcohol ramificado, C ₁₆ (N.I.) | O | 1834 | | 0,06±0,01 | 0,05±0,03 | – | |

Continuación de la **Tabla 13**.

| | | | | | | |
|------------|--|-----|------|-------------|-------------|-----------|
| 94 | <i>iso</i> -Heptanoato de geranilo* | ESM | 1847 | 0,21±0,02 | 0,13±0,01 | – |
| 95 | <i>iso</i> -Octanoato de citronelilo* | ESM | 1874 | 0,11±0,02 | <i>tr</i> | <i>tr</i> |
| 96 | Hexadecanol* | O | 1891 | <i>tr</i> | 0,08±0,02 | <i>tr</i> |
| 97 | <i>iso</i> -Octanoato de geranilo* | ESM | 1906 | 0,14±0,01 | 0,094±0,003 | <i>tr</i> |
| 98 | Octanoato de citronelilo* | ESM | 1911 | 0,089±0,008 | 0,077±0,002 | <i>tr</i> |
| 99 | Alcohol ramificado, C ₁₇ (N.I.) | O | 1935 | 0,07±0,02 | 0,07±0,01 | – |
| 100 | Octanoato de geranilo* | ESM | 1944 | 0,078±0,007 | 0,07±0,01 | – |
| 101 | Ester alquílico de citronelilo (N.I.) | ESM | 1999 | <i>tr</i> | 0,07±0,05 | <i>tr</i> |
| 102 | Compuesto oxigenado, C ₁₆ H ₂₆ O ₂ (N.I.) | O | 2010 | 0,110±0,008 | 0,04±0,03 | <i>tr</i> |
| 103 | Alcohol ramificado, C ₁₈ (N.I.) | O | 2037 | 0,059±0,009 | 0,043±0,001 | – |
| 107 | Heptacosano | H | 2693 | – | – | – |
| 109 | Nonacosano | H | 2987 | – | – | – |
| HM | Hidrocarburos monoterpénicos. | | | 0,48 | 0,86 | – |
| HS | Hidrocarburos sesquiterpénicos. | | | 27,85 | 23,00 | 19,40 |
| HA | Hidrocarburos aromáticos. | | | 0,68 | 0,54 | 0,00 |
| H | Hidrocarburos. | | | 0,10 | 0,00 | 0,00 |
| ALM | Alcoholes monoterpénicos. | | | 19,04 | 21,23 | 16,04 |
| ALS | Alcoholes sesquiterpénicos. | | | 7,70 | 3,41 | 0,40 |
| ADM | Aldehídos monoterpénicos. | | | 1,12 | 0,87 | 0,86 |
| CM | Cetonas monoterpénicas. | | | 3,48 | 4,95 | 3,01 |
| CS | Cetonas sesquiterpénicas. | | | 0,59 | 0,35 | – |
| ETM | Éteres monoterpénicos. | | | 1,49 | 2,85 | – |
| ETS | Éteres sesquiterpénicos. | | | 2,35 | 2,18 | 1,41 |
| ESM | Ésteres monoterpénicos. | | | 22,21 | 18,88 | 16,46 |
| ESA | Ésteres aromáticos. | | | 4,52 | 5,27 | 2,33 |
| ACM | Ácidos monoterpénicos. | | | 0,59 | 0,98 | 0,33 |
| O | Otros compuestos oxigenados. | | | 2,82 | 2,67 | 1,05 |

a Número del pico en la **Figura 30**.

b Índices de Kováts determinados experimentalmente en las columnas DB-5 y DB-WAX.

c Porcentajes calculados con base en las áreas de los picos determinados en columna DB-5, promedio de tres extracciones.

tr Trazas.

** Identificado por espectrometría de masas usando patrones de terpenos certificados.

* Identificado tentativamente.

N.I. No identificado.

La composición química de aceites esenciales de *P. graveolens* y de extractos, obtenidos por MWHD y SDE, respectivamente, fue bastante similar. En cambio, en los extractos aislados por SFE, se encontraron, en mayor proporción, hidrocarburos de alto peso molecular ($C_n > 23$). La fracción volátil, *i.e.* monoterpenos, se recuperó mejor por el método SDE, mientras que la técnica SFE permitió aislar más eficientemente los compuestos menos volátiles, *i.e.* sesquiterpenoides.

Los compuestos predominantes en los aceites y extractos, obtenidos por MWHD y SDE, respectivamente, fueron los monoterpenos oxigenados (30-40%), de importancia en la industria perfumística, seguidos de los hidrocarburos sesquiterpénicos (21-29%). Dentro de los monoterpenos oxigenados se observó la presencia de los alcoholes citronelol (13-24%) y geraniol (4-9%), característicos de la esencia, cuya relación determina su valor en el mercado. Además, se encontraron presentes los respectivos ésteres de citronelilo (14-17%) y de geranilo (9-14%), los cuales aportan la nota odorífica típica del aceite de geranio. Además, se observó la presencia de los óxidos de rosa (*ca.* 1,5%), importantes para acentuar en el bouquet la nota odorífera a rosas. Dentro de los hidrocarburos sesquiterpénicos se encontró, en mayor proporción, el 6,9-guaiadieno (6-8%). La presencia de este compuesto en proporciones elevadas (5-7%) y la ausencia o baja proporción de 10-*epi*- γ -eudesmol (0,5%), es una característica química típica de los aceites esenciales de *Pelargonium graveolens*, variedad Bourbon [134] por lo se podría suponer que la planta bajo estudio pertenece a esta variedad.

Al comparar la composición química de los AEs de *P. graveolens*, estudiado en esta investigación, con la de los AEs de otros orígenes, *e.g.* de Egipto, China, Reunión y los AEs comerciales, tipo Bourbon y Egipto, se puede observar, que la composición química coincide cualitativamente, pero se presentaron variaciones cuantitativas [22].

En la **Tabla 14**, se comparan los principales compuestos del AE de *P. graveolens* de esta investigación, con los encontrados en AEs obtenidos de plantas cultivadas en otras regiones geográficas.

El AE de geranio, tipo Bourbon, es típicamente de color verde oscuro, mientras que el del tipo China es medianamente verde y el de Egipto es amarillo claro [41]; particularmente, el AE obtenido por MWHD, en esta investigación presentó un color verde oscuro. El perfil químico del aceite de Bourbon [134] se caracteriza por cantidades muy similares de citronelol (ca. 22%) y geraniol (ca. 18%), con cantidades menores de linalool (ca. 10%), formiato de citronelilo (ca. 7%), formiato de geranilo (ca. 6%) y 6,9-guaiadieno (ca. 5%), mientras que el AE de geranio aislado en esta investigación presentó niveles más bajos de citronelol (ca. 15%) y geraniol (ca. 7%), comparados con los aceites de otros orígenes, pero su relación en el AE fue 2:1, mientras que en el aceite tipo Bourbon es 1:1. Además, el aceite estudiado tiene alto contenido de ésteres de citronelilo (ca. 17%) y geranilo (ca. 13%) que favorecen las características organolépticas del AE. La cantidad de 6,9-guaiadieno (ca. 7%) fue relativamente alta, y se observó la ausencia de 10-*epi*- γ -eudesmol, que está presente en aceites tipo China y Egipto [134]. Además, la cantidad de linalool (ca. 1%) fue relativamente baja.

El contenido de compuestos característicos del AE de geranio, obtenido en esta investigación, está dentro de los rangos de calidad aceptados por la industria perfumística, lo que podría ser una oportunidad para el establecimiento del cultivo de geranio, producción y comercialización del AE de esta planta esenciara en Colombia.

Tabla 14. Principales compuestos encontrados en los AEs de *P. graveolens* de diferentes orígenes geográficos.

| Compuesto | Cantidad relativa, % | | | | | | |
|--|----------------------|---------|----------|----------|------------|-----------|--------|
| | Bourbon* | Egipto* | China* | Reunión* | Colombia** | Comercial | |
| | [134] | [134] | [35, 36] | [134] | | Bourbon | Egipto |
| Linalool | 10,3 | 6,0 | 3,9 | 7,8 | 0,9 | 6,4 | 5,0 |
| <i>cis</i> -Óxido de rosa | 0,6 | 1,1 | - | 1,2 | 0,8 | 1,7 | 2,1 |
| <i>trans</i> -Óxido de rosa | - | - | - | - | 0,4 | 0,8 | 1,0 |
| Mentona | - | - | - | - | 0,1 | 2,7 | 3,2 |
| <i>iso</i> -Mentona | 6,1 | 5,2 | 5,4 | 5,4 | 3,7 | 5,8 | 5,5 |
| Citronelol | 22,6 | 29,2 | 36,5 | 21,7 | 14,9 | 20,3 | 18,1 |
| Geraniol | 18,9 | 19,3 | 8,7 | 17,5 | 7,5 | 11,0 | 8,7 |
| Formiato de citronelilo | 7,5 | 5,8 | 10,1 | 8,2 | 8,4 | 8,4 | 6,9 |
| Formiato de geranilo | 5,8 | 3,5 | 2,1 | 6,1 | 3,2 | 3,5 | 2,6 |
| <i>trans</i> - β -Cariofileno | 0,9 | 1,0 | - | 0,9 | 2,2 | 1,1 | 1,7 |
| 6,9- Guaiadieno | 5,5 | 0,2 | 6,5 | 5,8 | 7,4 | 0,5 | 2,8 |
| Tiglato de 2-feniletilo | 0,5 | 1,0 | 0,7 | 0,6 | 3,6 | 1,6 | 1,3 |
| Isovalerato de geranilo | - | - | - | - | 1,5 | 0,9 | 0,5 |
| 10- <i>epi</i> - γ -Eudesmol | - | 5,8 | - | - | - | 5,7 | 4,4 |
| <i>trans</i> -Tiglato de citronelilo | - | 1,1 | - | 0,1 | 1,2 | 0,5 | 0,6 |
| Tiglato de geranilo | 1,1 | 1,5 | - | 1,4 | 2,7 | 1,4 | 1,4 |
| Relación aproximada de Citronelol/Geraniol | 1:1 | 1,5:1 | 4:1 | 1:1 | 2:1 | 2:1 | 2:1 |

* AEs obtenidos por HD.

** AEs obtenidos por MWHD.

6.5.4 Incidencia del estado de desarrollo vegetativo de la planta sobre la composición de AEs y extractos, obtenidos de hojas frescas y secas de *P. graveolens*.

La composición de los AEs puede variar con la época de recolección del material vegetal, el estado de desarrollo vegetativo, el lugar geográfico, el tipo de suelo o pequeños cambios genéticos ocurridos en la planta durante su propagación y crecimiento.

La especie *P. graveolens* es una planta perenne, que crece en una amplia variedad de altitudes, con temperaturas medias entre 30 y 35 °C, con humedad baja y lluvia moderada. El AE de esta especie se caracteriza por la presencia de determinados compuestos clave, que aportan a la fragancia total, a saber [42]:

- Citronelol y geraniol: carácter floral.
- Ésteres de citronelilo y geranilo: carácter frutal.
- *iso*-Mentona: carácter fresco.

Otros compuestos de interés, que aportan a la nota odorífica son los óxidos de rosa. Además, se encuentran el 6,9-guaiadieno, que caracteriza el aceite de geranio variedad Bourbon [134], y los tiglato de citronelilo y geranilo presentes en otras especies de *Pelargonium sp.*

Por tal razón, se estudiaron tres estados de desarrollo vegetativo de la planta, a saber: 6, 9 y 12 meses, con el fin de observar su influencia sobre la cantidad y la calidad de los AEs y extractos obtenidos de hojas frescas y secas mediante diferentes técnicas de extracción (Ver **Tabla15**).

En la **Figura 31**, se ilustra la variación de los principales constituyentes del AE de geranio, en función del estado de desarrollo vegetativo de la planta.

Tabla 15. Composición química de AEs y extractos de hojas frescas y secas de geranio (*P. graveolens*) en función del estado de desarrollo vegetativo de la planta.

| Compuesto | EDV, meses | MWH ^D * | | SDE* | | SFE* | |
|---|---------------|--------------------|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | Fresco | Seco | Fresco | Seco | Fresco | Seco |
| <i>cis</i> -Óxido de rosa | 6 | 0,97±0,03 | 0,66±0,02 | 2,1±0,2 | 2,5±0,5 | <i>tr</i> | <i>tr</i> |
| | 9 | 0,80±0,09 | 0,8±0,1 | 2,62±0,04 | 1,8±0,3 | 1,0±0,5 | <i>tr</i> |
| | 12 | 0,76±0,01 | 0,8±0,2 | 2,05±0,2 | 1,40±0,11 | 0,5±0,3 | <i>tr</i> |
| <i>trans</i> -Óxido de rosa | 6 | 0,52±0,03 | 0,35±0,01 | 0,87±0,08 | 1,3±0,2 | <i>tr</i> | <i>tr</i> |
| | 9 | 0,38±0,03 | 0,47±0,06 | 1,01±0,04 | 0,9±0,1 | <i>tr</i> | <i>tr</i> |
| | 12 | 0,3882±0,0003 | 0,50±0,08 | 0,88±0,05 | 0,77±0,06 | <i>tr</i> | <i>tr</i> |
| <i>iso</i> -Mentona | 6 | 4,542±0,005 | 4,2±0,5 | 5,3±0,1 | 5,3±0,9 | 4,0±0,5 | 3±1 |
| | 9 | 4,4±0,2 | 4,39±0,05 | 7,6±0,7 | 6,6±0,8 | 4,1±0,1 | 5±1 |
| | 12 | 3,74±0,1 | 3,3±0,7 | 5,36±0,04 | 4,11±0,21 | 6,5±0,7 | 3,0±0,9 |
| Citronelol | 6 | 18,1±0,4 | 15,7±0,9 | 20,9±0,5 | 17±2 | <i>tr</i> | 13±7 |
| | 9 | 14,1±0,7 | 15,6±0,6 | 19±2 | 21±2 | <i>tr</i> | 11±1 |
| | 12 | 14,9±0,2 | 13±1 | 19,1±0,6 | 14,8±0,7 | 19±1 | 13±6 |
| Geraniol | 6 | 8,4±0,3 | 8,4±0,7 | 4,3±0,7 | 4,0±0,1 | <i>tr</i> | 1,1±0,4 |
| | 9 | 8±2 | 6,7±0,4 | 5,3±0,6 | 8,2±0,3 | <i>tr</i> | 4±1 |
| | 12 | 7,5±0,6 | 5,3±0,2 | 6±1 | 4,74±0,06 | 8±1 | 4±2 |
| Geranial + Formiato de citronelilo + Formiato de nerilo | 6 | 9,73(0,53) | 11,5(0,8) | 9,8(0,1) | 8,7±0,7 | <i>tr</i> | 6±2 |
| | 9 | 10(2) | 9,4(0,3) | 14(2) | 12,3±0,3 | <i>tr</i> | 7,2±0,9 |
| | 12 | 8,4(0,3) | 7±1 | 9,3±0,2 | 8,9±0,3 | 14±1 | 8±1 |
| Formiato de geranilo | 6 | 4,05±0,2 | 4,4±0,5 | 2,8±0,4 | 2,33±0,02 | <i>tr</i> | 1,4±0,7 |
| | 9 | 3,7±0,2 | 3,8±0,1 | 4±1 | 3,8±0,3 | <i>tr</i> | 2,63±0,08 |
| | 12 | 3,2±0,1 | 2,8±0,2 | 2,41±0,04 | 2,35±0,01 | 6,5±0,2 | 2±1 |
| 6,9-Guaiadieno | 6 | 6,74±0,004 | 7,833±0,009 | 6,7±0,2 | 4,2±0,4 | <i>tr</i> | 1,9±0,7 |
| | 9 | 7,7±0,5 | 7,2±0,5 | 7,62±0,05 | 6,7±0,5 | 1,07±0,02 | 0,9±0,8 |
| | 12 | 7,4±0,2 | 6,4±0,6 | 6,7±0,3 | 5,57±0,21 | 8,5±0,4 | 6±1 |
| <i>trans</i> -Tiglato de citronelilo | 6 | 1,31±0,01 | 1,5±0,1 | 1,3±0,1 | 1,1±0,1 | <i>tr</i> | 0,5±0,1 |
| | 9 | 1,5±0,1 | 1,32±0,04 | 0,69±0,02 | 0,6±0,2 | <i>tr</i> | 0,8±0,2 |
| | 12 | 1,18±0,07 | 1,3±0,3 | 0,87±0,02 | 1,01±0,07 | <i>tr</i> | 0,7±0,1 |
| Tiglato de geranilo | 6 | 2,75±0,08 | 2,77±0,04 | 2,2±0,1 | 2,0±0,2 | <i>tr</i> | 2,5±0,7 |
| | 9 | 3,03±0,09 | 2,9±0,1 | 2,1±0,3 | 1,7±0,3 | 0,9±0,2 | 2,2±0,8 |
| | 12 | 2,7±0,1 | 2,32±0,08 | 1,94±0,05 | 2,1±0,1 | 3,2±0,9 | <i>tr</i> |

EDV : Estado de desarrollo vegetativo

* n=3; Cantidad relativa (%) ± σ

En los AEs y extractos (SDE) aislados de hojas frescas de plantas, recolectadas en los tres estados de desarrollo vegetativo, prevalecen los alcoholes monoterpénicos, citronelol y geraniol, observándose un leve aumento en la cantidad de citronelol (ca. 18%) a los 6 meses de desarrollo vegetativo de la planta, en comparación con 9 (ca. 14%) y 12 meses (ca. 15%), mientras que los AEs y extractos (SDE) obtenidos del material vegetal seco presentaron menor contenido de citronelol, a los 12 meses de desarrollo. En el caso del geraniol no se observaron variaciones estadísticamente significativas para los tres estados de desarrollo analizados, tanto para AEs y como para extractos (SDE) obtenidos de material vegetal fresco y seco.

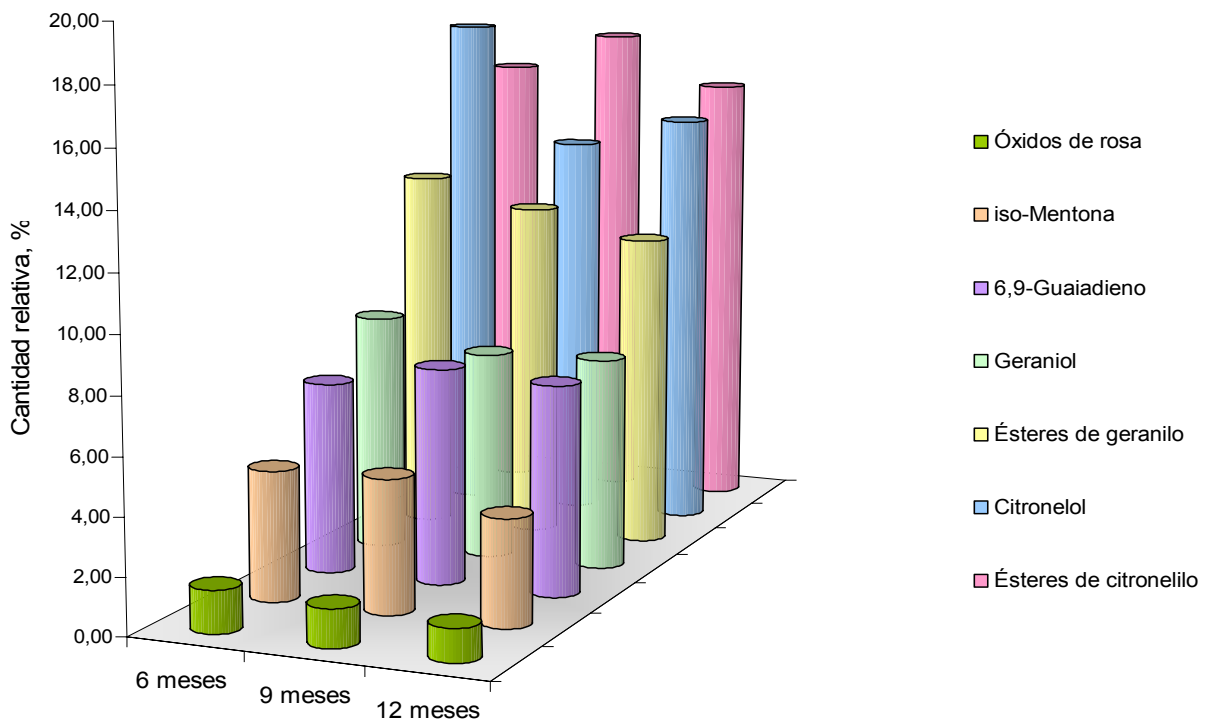


Figura 31. Variación de los principales constituyentes de los AEs de geranio, en función del desarrollo vegetativo de la

Por otra parte, las cantidades relativas de 6,9-guaiadieno (ca.7%), hidrocarburo sesquiterpénico, óxidos de rosa e *iso*-mentona, fueron similares para los tres estados de desarrollo. Sin embargo, se observó una ligera disminución de los ésteres de geraniol, con el crecimiento de la planta, y un aumento de los ésteres de citronelilo a los 9 meses de desarrollo vegetativo de la planta.

La composición cualitativa de los metabolitos secundarios volátiles obtenidos para los aceites (MWHD) y extractos (SDE) fue bastante similar a los 6, 9 y 12 meses de desarrollo vegetativo de la planta. Además, no se observaron cambios estadísticamente significativos en la relación citronelol:geraniol (**Figura 32**), presentándose una proporción 2:1 en hojas frescas y secas en los tres estados de desarrollo vegetativo.

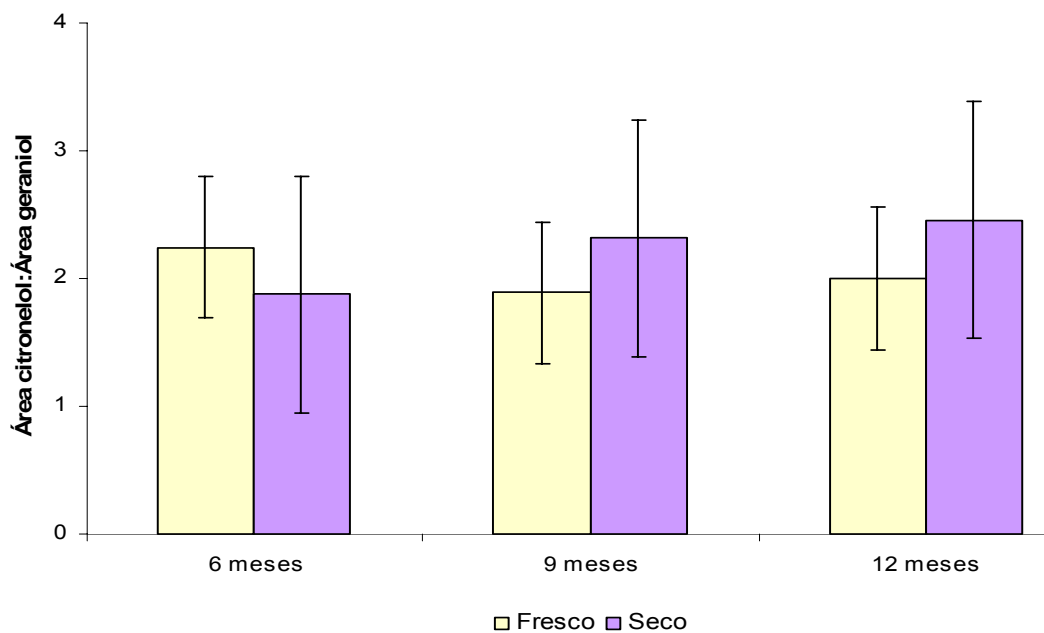


Figura 32. Relación de citronelol:geraniol en hojas frescas y secas en diferentes estados de desarrollo vegetativo.

La calidad del AE de geranio (*Pelargonium graveolens*), estudiado en este trabajo, en términos de la proporción de citronelol:geraniol y la cantidad de los compuestos mayoritarios no fue “afectada” durante el desarrollo vegetativo. Sin embargo, como se mostró en la **Sección 6.3**, se obtuvo el rendimiento más alto de AE de geranio a los 12 meses de crecimiento.

6.5.5 Incidencia de la técnica de extracción sobre la composición de AEs y extractos obtenidos de hojas frescas y secas de *P. graveolens*.

Los AEs obtenidos por MWHD de hojas frescas y secas fueron líquidos transparentes de color verde oscuro y se caracterizaron por un fuerte olor a rosas, con notas floral, frutal y fresca. Los extractos obtenidos por SFE presentaron un color amarillo verdoso y el olor similar al de los AEs.

Una caracterización completa de los metabolitos secundarios volátiles requiere el uso de varias técnicas de extracción. Por tal razón, para obtener el perfil aromático característico del *P. graveolens*, se utilizaron métodos destilativos (MWHD) y extractivos (SDE y SFE) (**Tabla 15**).

Los metabolitos secundarios volátiles aislados por las diferentes técnicas de extracción, como se observa en la **Figura 33**, se dividieron principalmente en 8 grupos de acuerdo con los diferentes grupos funcionales encontrados, a saber: hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, éteres, ácidos, ésteres y otros compuestos oxigenados. Predominaron en el perfil aromático de aceites y extractos, aislados por MWHD y SDE, respectivamente, los alcoholes monoterpénicos, *i.e.* citronelol (*ca.* 13–24%) y geraniol (*ca.* 4–9%); ésteres de citronelilo (*ca.* 14–17%) y de geranilo (*ca.* 9–14%), principalmente, sus tiglatos y ésteres alquílicos entre C₃–C₈; e hidrocarburos sesquiterpénicos (*ca.* 21–29%), dentro de estos hidrocarburos se encuentran principalmente el 6,9–guaiadieno, viridifloreno, germacreno D y *trans*-β–cariofileno.

La técnica SDE mostró mayor eficiencia para la extracción de alcoholes, cetonas y éteres monoterpénicos, mientras que la MWHD fue más eficiente para extraer hidrocarburos y aldehídos sesquiterpénicos, junto con ésteres monoterpénicos.

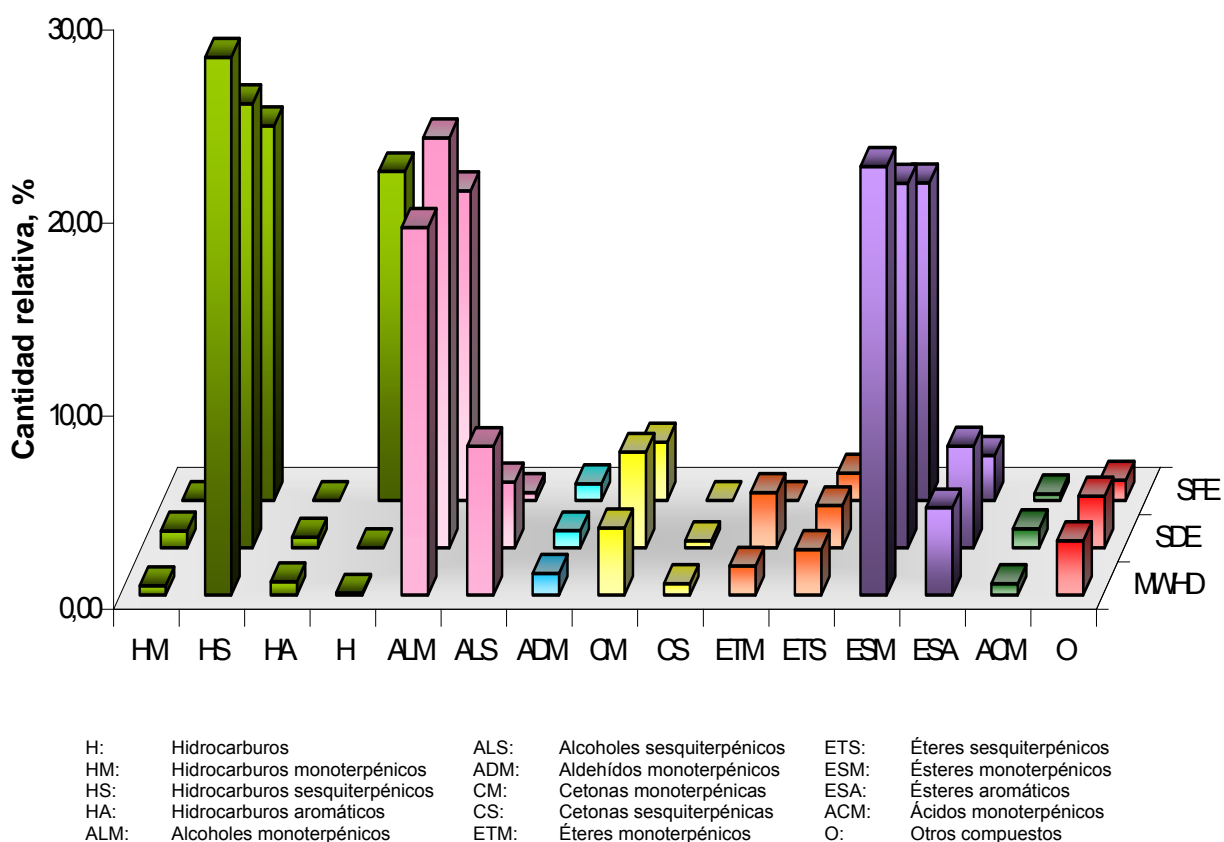
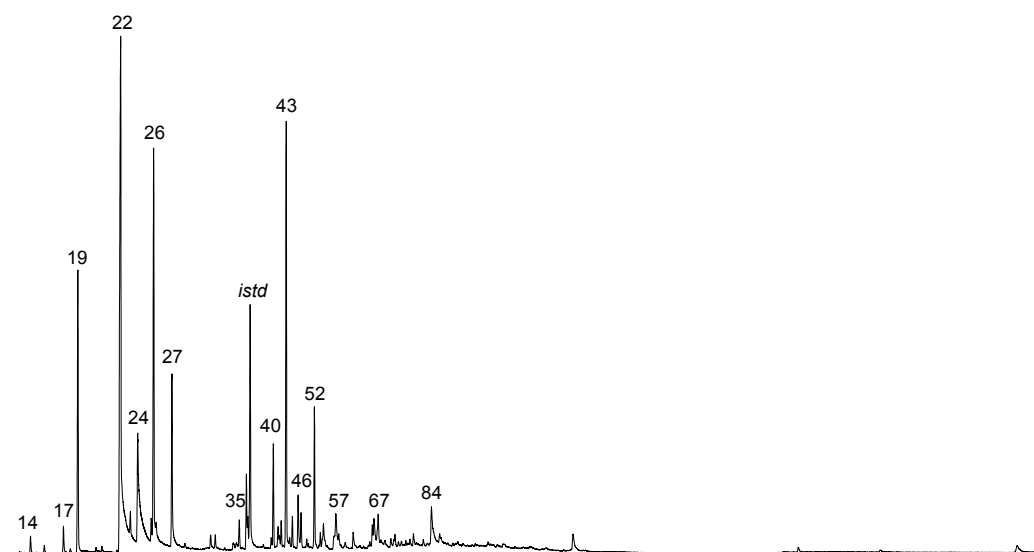
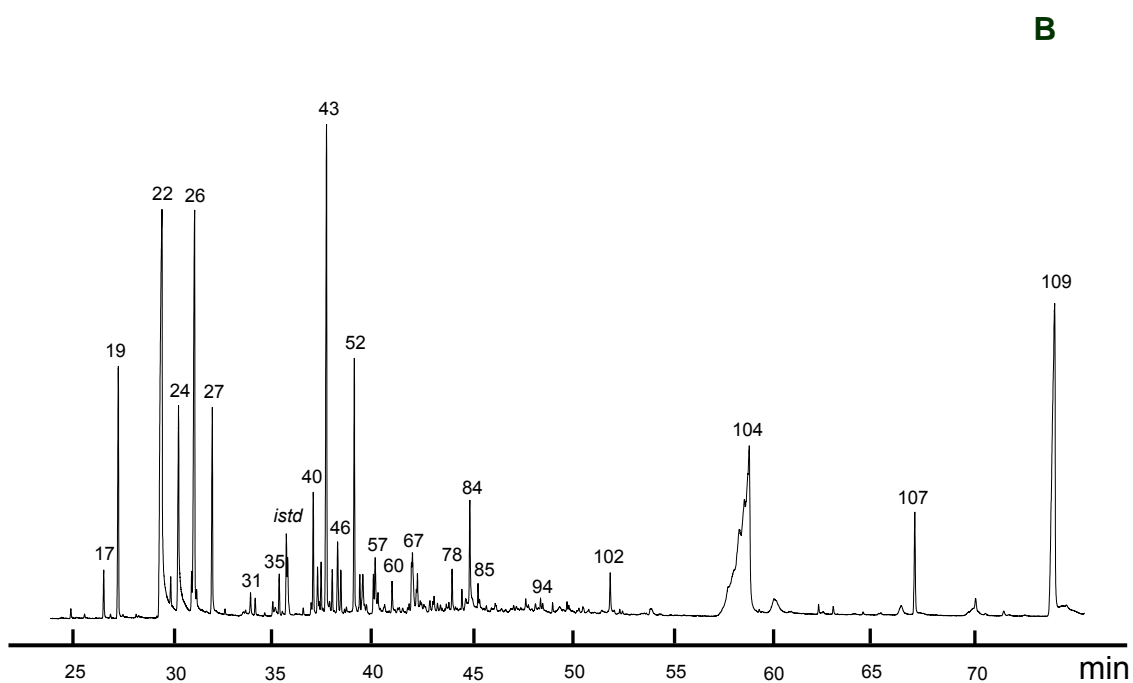


Figura 33. Distribución por grupos funcionales de los compuestos presentes en AEs y extractos de *P. graveolens*, obtenidos por los diferentes métodos de extracción.

Por otra parte, en los extractos aislados por SFE, se detectaron menor número de compuestos. En la **Figura 34**, se muestran los perfiles cromatográficos de extractos obtenidos por SFE de



A



B

Figura 34. Perfiles cromatográficos típicos de los extractos obtenidos por SFE de: **A.** Hojas frescas y **B.** Hojas secas. Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30, detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los compuestos se reporta en la **Tabla 16.**

Tabla 16. Compuestos aislados por SFE de hojas frescas y secas de *P. graveolens* en diferentes etapas de desarrollo vegetativo.

| No. Pico ^a | Compuesto | I _k ^b DB-5 | Cantidad relativa, % (meses) ^c | | | | | |
|-----------------------|--|-------------------------------------|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-------------|
| | | | 6 | | 9 | | 12 | |
| | | | Fresco | Seco | Fresco | Seco | Fresco | Seco |
| 14 | <i>cis</i> -Óxido de rosa | 1114 | <i>tr</i> | <i>tr</i> | 1,0±0,1 | <i>tr</i> | 0,5±0,3 | <i>tr</i> |
| 16 | <i>trans</i> -Óxido de rosa | 1131 | <i>tr</i> | <i>tr</i> | | <i>tr</i> | <i>tr</i> | <i>tr</i> |
| 17 | Citronelal | 1155 | <i>tr</i> | <i>tr</i> | 0,9±0,1 | <i>tr</i> | 0,8±0,5 | 0,4±0,2 |
| 19 | <i>iso</i> -Mentona | 1175 | 4,0±0,5 | 3±1 | 4,1±0,1 | 5±1 | 6,5±0,7 | 3,0±0,9 |
| 22 | Citronelol | 1236 | <i>tr</i> | 13±1 | <i>tr</i> | 11±1 | 19±1 | 13±1 |
| 23 | Neral | 1244 | - | - | <i>tr</i> | 1,20±0,01 | 2±1 | 0,4±0,4 |
| 24 | Geraniol | 1257 | <i>tr</i> | 1,1±0,4 | <i>tr</i> | 4±1 | 8±1 | 4±2 |
| 26 | Geranial | | | | | | | |
| | + Formiato de citronelilo | 1280 | <i>tr</i> | 6±1 | <i>tr</i> | 7,2±0,9 | 14±1 | 8±1 |
| | + Formiato de nerilo | | | | | | | |
| 27 | Formiato de geranilo | 1301 | <i>tr</i> | 1,4±0,7 | <i>tr</i> | 2,63±0,08 | 6,5±0,2 | 2±1 |
| 31 | Acetato de citronelilo | 1339 | - | - | - | - | <i>tr</i> | 0,3±0,2 |
| | α -Cubebeno | 1345 | - | - | - | - | <i>tr</i> | 0,2±0,2 |
| 34 | Acetato de geranilo | | | | | | | |
| | + α -Ylangeno | 1377 | 2,0±0,3 | <i>tr</i> | 1,68±0,02 | 1,5±0,4 | <i>tr</i> | <i>tr</i> |
| 35 | α -Copaeno | 1386 | 3,1±0,4 | | 2,8±0,4 | 1,1±0,2 | 0,9±0,6 | 0,5±0,2 |
| 36 | β -Bourbuneno | | | | | | | |
| | + β -Elemeno | 1395 | 2,2±0,3 | <i>tr</i> | 2,0±0,1 | 3,3±0,3 | 4,6±0,8 | 2,0±0,3 |
| | + Butanoato de fenetilo | | | | | | | |
| 40 | <i>trans</i> - β -Cariofileno | 1434 | 1,8±0,3 | 0,6±0,2 | 1,9±0,7 | 2,2±0,9 | 3,2±0,7 | 1,5±0,5 |
| 41 | Propionato de citronelilo | | | | | | | |
| | + α -Bergamoteno | 1441 | <i>tr</i> | <i>tr</i> | <i>tr</i> | 0,4±0,2 | 1,0±0,7 | 0,7±0,3 |
| | + β -Copaeno | | | | | | | |
| 42 | α -Guaieno | 1445 | - | - | - | - | 0,8±0,5 | 0,9±0,6 |
| 43 | 6,9- Guaiadieno | 1454 | <i>tr</i> | 1,9±0,7 | 1,07±0,02 | 0,9±0,8 | 8,5±0,4 | 6,0±0,9 |
| 44 | 4 α ,10 α -Guaia-1(5),6-dieno | | | | | 0,61±0,04 | - | - |
| 45 | 4 β ,10 β -Guaia-1(5),6-dieno | 1461 | - | - | - | - | 0,9±0,6 | 0,6±0,2 |
| 46 | Propanoato de nerilo | | | | | | | |
| | + α -Humuleno | 1469 | <i>tr</i> | 0,36±0,01 | <i>tr</i> | 0,76±0,07 | 1,8±0,2 | 0,41±0,01 |
| 47 | <i>allo</i> -Aromadendreno | 1474 | 1,3±0,3 | <i>tr</i> | <i>tr</i> | 1,2±0,1 | 1,4±0,5 | 0,5±0,2 |
| 52 | Germacreno D | 1494 | - | - | - | - | 4±1 | 3±2 |
| 53 | Viridifloreno | 1502 | 1,6±0,5 | <i>tr</i> | <i>tr</i> | <i>tr</i> | <i>tr</i> | 0,5±0,4 |
| 54 | Isobutanoato de geranilo | | | | | | | |
| | + α -Muuroleño | 1506 | <i>tr</i> | <i>tr</i> | <i>tr</i> | 0,9±0,3 | 2±1 | 0,8±0,2 |
| | + Bicclogermacreño | | | | | | | |
| 56 | γ -Cadineno | | | | | | | |
| | + Butanoato de citronelilo | 1524 | <i>tr</i> | 1,6±0,7 | <i>tr</i> | 1,05±0,03 | <i>tr</i> | 0,5±0,1 |
| 57 | δ -Amorfenó | 1527 | 1,4±0,3 | <i>tr</i> | <i>tr</i> | 2,7±0,5 | 3,3±0,1 | 1,2±0,2 |
| 58 | <i>trans</i> -Calameno | | | | | | | |
| | + Zonareno | 1532 | 1,2±0,4 | <i>tr</i> | 1,1±0,4 | 2±1 | <i>tr</i> | 0,4±0,1 |
| | + Furopelargona A | | | | | | | |
| 60 | α -Calacoreno | | | | | | | |
| | + Butanoato de geranilo | 1555 | <i>tr</i> | <i>tr</i> | <i>tr</i> | 0,8±0,2 | <i>tr</i> | 0,6±0,1 |
| 67 | Tiglató de 2-feniletilo | | | | | | | |
| | + Compuestó oxigenado, C ₁₅ H ₂₄ O (N.I.) | 1589 | 4,1±0,9 | 2,9±0,7 | 3,2±0,9 | 4±1 | 3,1±0,2 | 2,1±0,1 |
| | + Espatuleno | | | | | | | |
| 68 | Isovalerato de geranilo | | | | | | | |
| | + Óxido de cariofileno | 1598 | 2,0±0,9 | 2,9±0,8 | 1,20±0,02 | 2,3±0,5 | 3,2±0,9 | 1,4±0,8 |
| 72 | Valerato de citronelilo | | | | | | | |
| | + Compuestó oxigenado, C ₁₅ H ₂₆ O ₂ (N.I.) | 1621 | 1,1±0,3 | <i>tr</i> | 0,37±0,03 | 0,6±0,2 | <i>tr</i> | 0,278±0,004 |
| 74 | 1- <i>epi</i> -Cubeno | | | | | | | |
| | + Compuestó oxigenado, C ₁₅ H ₂₄ O ₂ (N.I.) | 1641 | 1,6±0,3 | <i>tr</i> | <i>tr</i> | 1,0±0,4 | <i>tr</i> | 0,4±0,1 |
| 75 | γ -Eudesmol | 1646 | 0,6±0,1 | 0,6±0,7 | - | - | - | - |

| | | | | | | | | |
|-----|---|------|---------------|-----------------|----------------|-----------------|---------------|-----------------|
| 77 | Cubenol + <i>epi</i> - α -Cadinol | 1657 | 2,3 \pm 0,3 | - | - | - | - | - |
| 78 | <i>trans</i> -Tiglato de citronelilo | 1663 | <i>tr</i> | 0,5 \pm 0,1 | <i>tr</i> | 0,8 \pm 0,9 | <i>tr</i> | 0,7 \pm 0,1 |
| 81 | <i>iso</i> -Caproato de citronelilo* | 1681 | 1,8 \pm 0,2 | 3,2 \pm 0,8 | <i>tr</i> | <i>tr</i> | <i>tr</i> | 0,8 \pm 0,5 |
| 83 | Compuesto oxigenado, C ₁₅ H ₂₆ O ₂ (N.I.) | 1692 | 2,2 \pm 0,3 | - | - | - | - | - |
| 84 | Tiglato de geranilo | 1697 | <i>tr</i> | 2,5 \pm 0,7 | 0,9 \pm 0,5 | 2,2 \pm 0,8 | 3,2 \pm 0,9 | <i>tr</i> |
| 85 | <i>iso</i> -Caproato de geranilo* | 1713 | - | - | <i>tr</i> | 0,9 \pm 0,3 | <i>tr</i> | 0,4 \pm 0,4 |
| 91 | Heptanoato de citronelilo | - | - | - | - | - | - | 0,1 \pm 0,1 |
| 94 | <i>iso</i> -Heptanoato de geranilo* | 1847 | - | - | - | 0,6 \pm 0,9 | - | 0,23 \pm 0,01 |
| 98 | Octanoato de citronelilo* | 1911 | - | 0,4 \pm 0,1 | - | - | - | - |
| 100 | Octanoato de geranilo* | 1944 | <i>tr</i> | 2,8 \pm 0,2 | - | - | - | - |
| 102 | Compuesto oxigenado, C ₁₆ H ₂₆ O ₂ (N.I.) | 2010 | <i>tr</i> | 2,1 \pm 0,9 | <i>tr</i> | 2,31 \pm 0,09 | <i>tr</i> | 1,1 \pm 0,1 |
| 104 | Tricosano | 2333 | 48 \pm 10 | 21,5 \pm 0,5 | 32,8 \pm 0,9 | 21 \pm 3 | - | 28 \pm 1 |
| 105 | α -Tocoferol | 2385 | - | - | - | - | - | 0,8 \pm 0,1 |
| 106 | Hidrocarburo ramificado, C ₂₅ (N.I.) | 2482 | - | 0,36 \pm 0,02 | - | - | - | 0,6 \pm 0,2 |
| 107 | Heptacosano | 2693 | 1,1 \pm 0,3 | 2,6 \pm 0,4 | 2,5 \pm 0,5 | 1,2 \pm 0,4 | - | 1,2 \pm 0,5 |
| 108 | Octacosano | 2825 | 4,7 \pm 0,9 | 0,5 \pm 0,1 | - | - | - | - |
| 109 | Nonacosano | 2987 | 5,1 \pm 0,9 | 12 \pm 2 | 30 \pm 3 | 10 \pm 2 | - | 14 \pm 1 |

a Número del pico en la **Figura 34**.

b Índices de Kováts determinados experimentalmente en las columnas DB-5 y DB-WAX.

c Porcentajes calculados con base en las áreas de los picos determinados en columna DB-5, promedio de tres extracciones.

tr Trazas.

** Identificado por espectrometría de masas, usando patrones de terpenos certificados.

* Identificado tentativamente.

N.I. No identificado

En la **Tabla 16**, se observa que los extractos obtenidos de material fresco de 12 meses de desarrollo vegetativo, presentaron un mayor contenido en cuanto a grupo de compuestos característicos de la especie bajo estudio, a saber: citronelol (*ca.* 19%), geraniol (*ca.* 8%), hidrocarburos sesquiterpénicos (*ca.* 28%), ésteres de citronelilo (*ca.* 14%) y de geranilo (*ca.* 12%). Además, estos extractos presentaron alto contenido de *iso*-mentona (*ca.* 6%), comparado con el obtenido por las otras técnicas utilizadas. Pero esta tendencia no se observó para los extractos obtenidos para 6 y 9 meses de desarrollo vegetativo de la planta, donde no se detectaron los alcoholes monoterpénicos, citronelol y geraniol, y se aisló una baja cantidad de ésteres monoterpénicos, junto con la presencia en proporciones considerables de ceras cuticulares, que fueron reportadas por TAM *et al.* [139] y Hattab *et al.* [140]. Dentro de los compuestos de las ceras cuticulares extraídas de *P. graveolens*, por SFE, se encontraron tricosano, heptacosano, octacosano y nonacosano.

La composición de los extractos obtenidos por SFE del material vegetal seco presentó un mayor contenido de ceras cuticulares a los 12 meses (ca. 45%), en comparación con 9 meses (ca. 32%) y 6 meses (ca. 37%). Por otra parte, se observó un aumento en el contenido de hidrocarburos sesquiterpénicos con el desarrollo de la planta (5, 15, y 19%, a los 6, 9 y 12 meses, respectivamente); las proporciones de alcoholes monoterpénicos (13, 10, y 16% a los 6, 9 y 12 meses, respectivamente) y ésteres monoterpénicos (17, 12 y 16% a los 6, 9 y 12 meses, respectivamente) fueron similares en las tres etapas de crecimiento.

Así, las tres técnicas de extracción utilizadas en el estudio permitieron obtener información sobre la composición química de los metabolitos secundarios volátiles de hojas frescas y secas de la especie *P. graveolens*, y observar que los perfiles cromatográficos de las fracciones volátiles obtenidas por MWHD y SDE, fueron muy similares, mientras que los extractos, obtenidos por SFE, presentaron alto contenido de hidrocarburos de alto peso molecular ($C_n > 23$), y bajo contenido de monoterpenos volátiles, que fueron extraídos, con mayor eficiencia, por las técnicas de MWHD y SDE. Pero la técnica SDE fue más eficiente para aislar monoterpenos oxigenados, a excepción del geraniol.

Estudios reportan la alta solubilidad de los monoterpenos en el CO_2 -SF, por lo tanto, posiblemente, la ausencia o baja concentración de éstos en los extractos obtenidos por SFE no se deben a la separación incompleta de estos compuestos volátiles de la matriz herbácea, sino a la pérdida de éstos con el CO_2 durante el proceso de despresurización [141].

6.5.6 Incidencia del tiempo de extracción sobre la composición de AEs obtenidos por MWHD de hojas frescas y secas de *P. graveolens*.

Existe amplio interés por la aplicación de la radiación de microondas para inducir el calentamiento en procesos de hidrodestilación para la obtención de aceites esenciales. En diversas aplicaciones se utiliza MWHD como una alternativa a las técnicas convencionales, e.g. HD, destilación agua/vapor. Los principales beneficios de MWHD son la reducción del tiempo de extracción [52, 82, 90], es un método relativamente económico, el único solvente utilizado es agua y se obtienen rendimientos altos en tiempos muy cortos (5-30 min).

Se debe tener en cuenta que el tiempo de hidrodestilación influye tanto sobre la cantidad del AE producido, como sobre su composición química. Además, las muestras que alcanzan temperaturas cercanas a los 100°C, pueden presentar cambios químicos en sus componentes termolábiles, así como procesos colaterales indeseables, tales como la hidrólisis de ésteres, polimerización de aldehídos o descomposición de otros compuestos [3, 82, 90]. Por lo tanto, es importante determinar el tiempo de extracción adecuado, a fin de obtener AE de buena calidad en el menor tiempo posible y a un precio de producción más bajo.

En esta investigación se evaluaron la calidad, en términos de los compuestos característicos del AE de geranio, y el rendimiento de los AEs obtenidos por MWHD durante 30, 60 y 90 min de hojas frescas y secas de *P. graveolens*, recolectadas en los tres estados de desarrollo vegetativo. Los compuestos identificados en la **Tabla 17**, se registraron en todos los AEs obtenidos sin presentar marcado incremento ni disminución en sus cantidades relativas, para los tres tiempos de extracción, y para plantas en cada uno de los estados su desarrollo.

Tabla 17. Compuestos principales en los AEs aislados por MWHD, de hojas frescas y secas de *P. graveolens*, a diferentes tiempos de extracción.

| Compuesto | Etapa de desarrollo, meses | Cantidad relativa *, % (minutos) | | | | | |
|---------------------------------------|----------------------------|----------------------------------|-----------|-------------|-------------|-----------|-----------|
| | | 30 | | 60 | | 90 | |
| | | FRESCO | SECO | FRESCO | SECO | FRESCO | SECO |
| <i>cis</i> -Óxido de rosa | 6 | 0,8±0,1 | <i>tr</i> | 0,97±0,03 | 0,66±0,02 | 0,86±0,08 | 0,65±0,04 |
| | 9 | 1,11±0,02 | 1,0±0,2 | 0,9±0,1 | 0,8±0,1 | 0,80±0,09 | 0,77±0,06 |
| | 12 | 0,9±0,1 | 0,9±0,2 | 0,76±0,01 | 0,8±0,2 | 0,69±0,03 | 1,2±0,2 |
| <i>trans</i> -Óxido de rosa | 6 | 0,45±0,06 | 0,33±0,04 | 0,52±0,03 | 0,35±0,001 | 0,43±0,04 | 0,34±0,03 |
| | 9 | 0,52±0,03 | 0,54±0,09 | 0,43±0,04 | 0,47±0,06 | 0,38±0,03 | 0,42±0,04 |
| | 12 | 0,47±0,05 | 0,50±0,08 | 0,388±0,003 | 0,50±0,08 | 0,36±0,01 | 0,63±0,08 |
| <i>iso</i> -Mentona | 6 | 4,9±0,2 | 4,6±0,3 | 4,542±0,005 | 4,2±0,5 | 4,1±0,1 | 4,1±0,4 |
| | 9 | 4,94±0,04 | 5,5±0,2 | 4,7±0,1 | 4,39±0,05 | 4,4±0,2 | 4,60±0,07 |
| | 12 | 4,2±0,3 | 3,5±0,7 | 3,7±0,1 | 3,3±0,7 | 3,5±0,1 | 4,6±0,7 |
| Citronelol | 6 | 20,26±0,03 | 16,5±0,1 | 18,1±0,4 | 16±1 | 16,7±0,4 | 14,8±0,6 |
| | 9 | 16,8±0,3 | 18,1±0,7 | 13,9±0,3 | 15,6±0,6 | 14,1±0,7 | 15,7±0,3 |
| | 12 | 17±1 | 15±1 | 14,9±0,2 | 13±1 | 13,8±0,6 | 15±1 |
| Geraniol | 6 | 9,0±0,5 | 9,4±0,6 | 8,3±0,4 | 8,4±0,7 | 6,96±0,07 | 8,6±0,7 |
| | 9 | 8±1 | 7,4±0,3 | 7,3±0,3 | 7,1±0,4 | 8,1±2 | 6,7±0,4 |
| | 12 | 7,4±0,8 | 5,7±0,2 | 7,5±0,6 | 5,3±0,2 | 5,9±0,1 | 5,6±0,2 |
| Formiato de citronelilo | 6 | 10,92±0,05 | 12,7±0,2 | 9,8±0,7 | 11,5±0,8 | 9,2±0,3 | 12,2±0,5 |
| | 9 | 10,6±0,4 | 10,6±0,4 | 9,6±0,9 | 9,4±0,3 | 10±2 | 9,3±0,2 |
| | 12 | 9,05±0,05 | 8±1 | 8,4±0,3 | 7±1 | 9±2 | 9±1 |
| Formiato de geraniol | 6 | 4,65±0,07 | 4,8±0,1 | 4,0±0,2 | 4,4±0,5 | 3,8±0,2 | 4,4±0,3 |
| | 9 | 4,03±0,06 | 4,36±0,05 | 3,8±0,2 | 3,8±0,1 | 3,7±0,2 | 4,0±0,2 |
| | 12 | 3,37±0,09 | 3,0±0,2 | 3,2±0,1 | 2,8±0,2 | 2,89±0,06 | 3,2±0,2 |
| 6,9-Guaiadieno | 6 | 6,37±0,06 | 8,0±0,6 | 6,736±0,004 | 7,833±0,009 | 7,2±0,1 | 8,1±0,3 |
| | 9 | 7,37±0,06 | 7,2±0,2 | 7,6±0,2 | 7,2±0,5 | 7,7±0,5 | 8,1±0,3 |
| | 12 | 7,0±0,6 | 5,8±0,6 | 7,4±0,2 | 6,4±0,6 | 7,6±0,5 | 6,9±0,6 |
| 2-Tiglatol de fenil etilo | 6 | 3,6±0,1 | 3,08±0,06 | 3,79±0,08 | 3,27±0,06 | 3,80±0,06 | 3,25±0,06 |
| | 9 | 3,5±0,2 | 3,7±0,1 | 3,2±0,2 | 4,0±0,2 | 3,8±0,1 | 3,5±0,2 |
| | 12 | 3,6±0,2 | 4,31±0,6 | 3,6±0,1 | 3,91±0,6 | 3,2±0,2 | 3,19±0,6 |
| Óxido de cariofileno | 6 | 1,68±0,04 | 1,0±0,4 | 1,73±0,04 | 1,2±0,5 | 1,76±0,08 | 0,8±0,5 |
| | 9 | 1,30±0,09 | 1,60±0,08 | 1,0±0,4 | 1,8±0,2 | 0,71±0,08 | 1,48±0,09 |
| | 12 | 1,6±0,2 | 2,6±0,7 | 1,5±0,1 | 2,4±0,7 | 1,3±0,1 | 1,3±0,7 |
| <i>trans</i> -Tiglatol de citronelilo | 6 | 1,17±0,004 | 1,27±0,08 | 1,31±0,01 | 1,5±0,1 | 1,51±0,04 | 1,54±0,09 |
| | 9 | 1,23±0,04 | 1,02±0,05 | 1,5±0,1 | 1,32±0,04 | 1,5±0,1 | 1,19±0,06 |
| | 12 | 1,08±0,06 | 1,2±0,3 | 1,18±0,07 | 1,3±0,3 | 1,08±0,09 | 0,8±0,3 |
| Tiglatol de geraniol | 6 | 2,5±0,1 | 2,6±0,1 | 2,75±0,08 | 2,77±0,04 | 2,90±0,03 | 2,80±0,07 |
| | 9 | 2,8±0,2 | 2,6±0,2 | 2,9±0,2 | 2,9±0,1 | 3,03±0,09 | 3,0±0,1 |
| | 12 | 2,44±0,07 | 2,37±0,08 | 2,66±0,09 | 2,32±0,08 | 2,47±0,04 | 2,22±0,08 |

* Promedio de tres extracciones (n=3, ± σ)

Si bien, no se presentó una diferencia significativa en la composición química de los AEs de geranio, obtenidos de hojas frescas y secas, usando diferentes tiempos de extracción (**Figura 35**), se observó una ligera disminución en la cantidad de alcoholes monoterpénicos (35, 28 y 25%, a los 30, 60 y 90 min de extracción, respectivamente), particularmente, de la cantidad relativa de los alcoholes, citronelol y geraniol, que se disminuyó levemente con el aumento del tiempo de extracción, siendo éstos los compuestos que imparten principalmente el olor característico al AE de geranio. Se observó aumento en la cantidad relativa (%) de hidrocarburos sesquiterpénicos (22, 24 y 25%, a los 30, 60 y 90 min de extracción, respectivamente). Sin embargo, los ésteres monoterpénicos y demás compuestos del AE no presentaron variación notable a medida que aumentaba el tiempo de extracción.

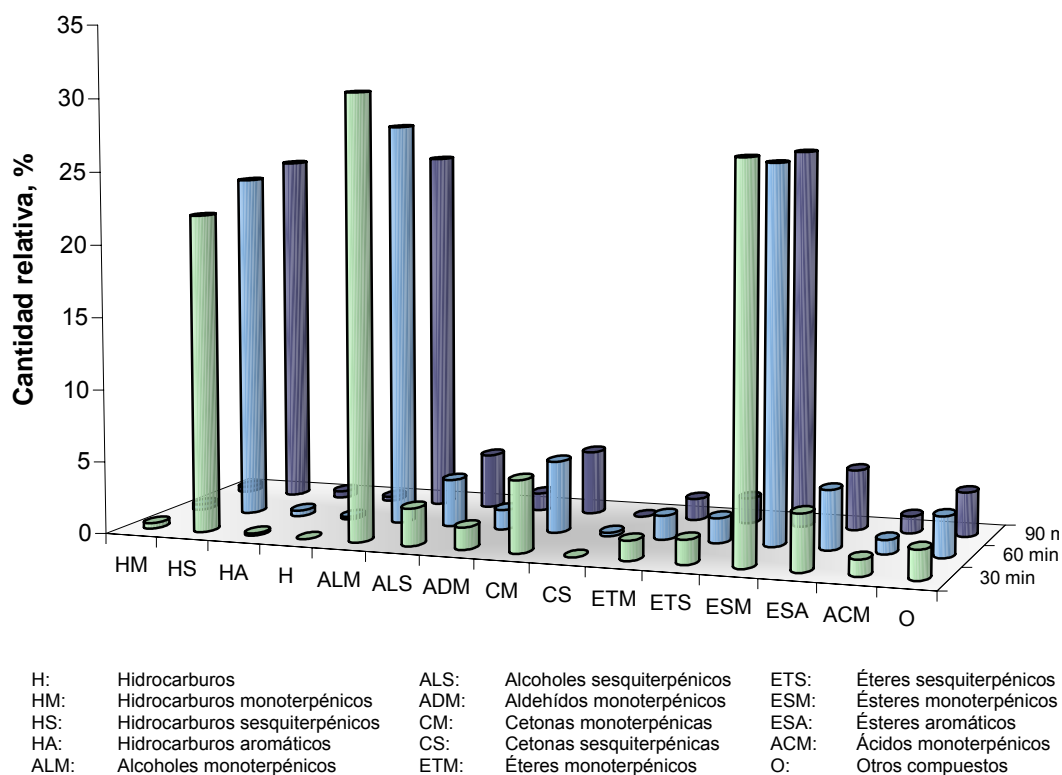


Figura 35. Distribución por grupos funcionales de los compuestos presentes en AEs y extractos de *P. graveolens*, obtenidos por MWHD, a diferentes tiempos de extracción.

Por otra parte, en las **Figuras 36** y **37**, se muestran los rendimientos de los AEs, obtenidos de hojas frescas y secas respectivamente, para los tres tiempos de extracción bajo estudio.

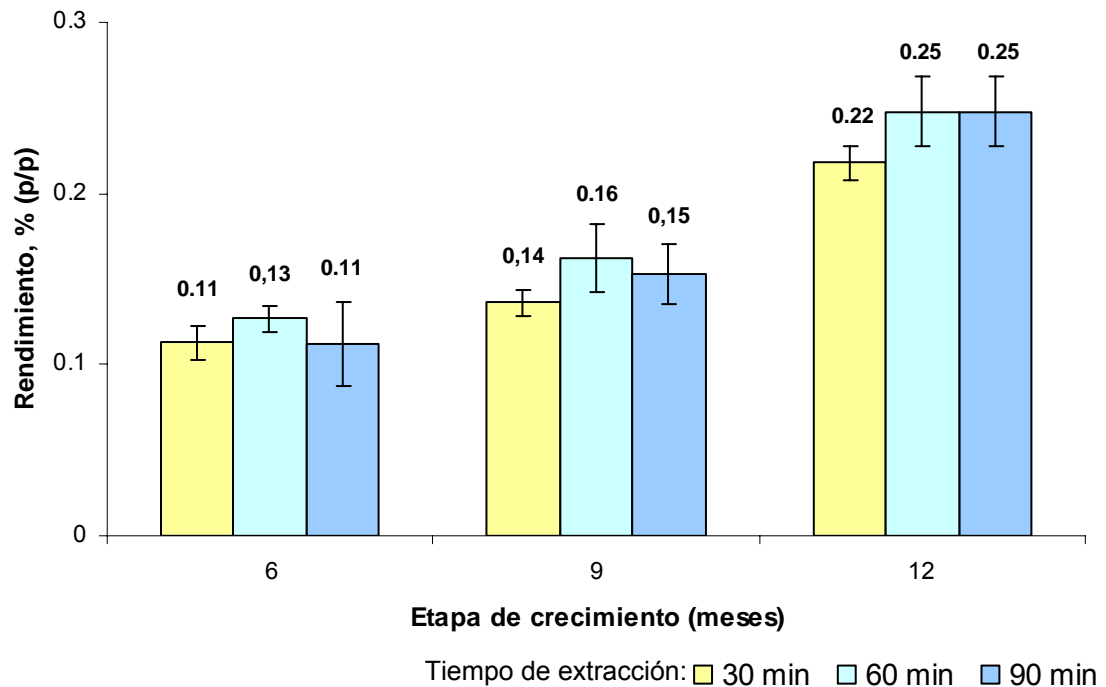


Figura 36. Rendimiento de los AEs de *P. graveolens* obtenidos por MWHD de hojas frescas, a diferentes tiempos de extracción.

En la **Figura 36**, se evidencia que para las tres etapas de desarrollo vegetativo analizadas no se presentó un cambio estadísticamente significativo en el rendimiento del AE, obtenido de hojas frescas, con el tiempo de extracción. Tendencia similar se observó para el rendimiento del AE de hojas secas, lo que se ilustra en la **Figura 37**.

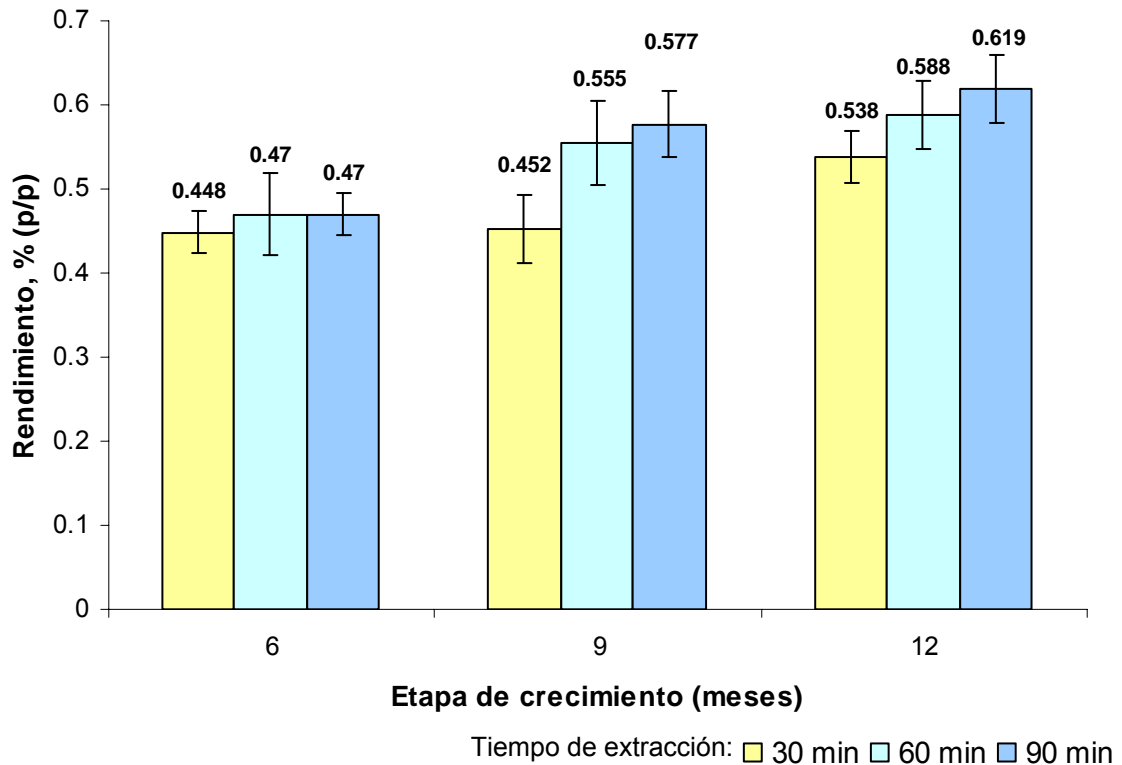


Figura 37. Rendimientos de los AEs de *P. graveolens*, obtenidos por MWHD de hojas secas, a diferentes tiempos de extracción.

En términos generales, la composición química y el rendimiento de los AEs, obtenidos de hojas frescas y secas, no fueron influenciados por el tiempo de extracción por MWHD. Por tal razón, se puede obtener AE de buena calidad, en cuanto al contenido de sus componentes principales, a un tiempo de extracción de 30 min, ya que los tiempos más largos implican costos adicionales en el proceso de extracción, e.g. costos en energía eléctrica

6.6 ANÁLISIS CUANTITATIVO DE CITRONELOL Y GERANIOL, PRESENTES EN AEs DE *P. graveolens*.

Los alcoholes monoterpénicos, citronelol y geraniol, presentes en AEs obtenidos por MWHD, se cuantificaron mediante la técnica cromatográfica de estandarización externa, siguiendo el procedimiento descrito en la **Sección 5.7.2** de la Parte Experimental.

En la **Tabla 18**, se registran las concentraciones (g compuesto/kg de MV y kg compuesto/ha MV) de citronelol y geraniol presentes en los AEs obtenidos por MWHD, a diferentes tiempos de extracción y en los diferentes estados de desarrollo vegetativo, y se ilustran en las **Figuras 38** y **39**, respectivamente. Las concentraciones se calcularon con base en los factores de respuesta para cada uno de los alcoholes monoterpénicos según el procedimiento descrito en la **Sección 5.7.2** de la Parte Experimental. Las curvas de calibración y los factores de respuesta para cada componente cuantificado se citan en el **Anexo 4**.

Tabla 18. Concentración de citronelol y geraniol presentes en los AEs de hojas frescas de geranio (*P. graveolens*), aislados por MWHD.

| Compuesto | EDV, meses | Concentración (tiempo de extracción) | | | | | |
|------------|------------|--------------------------------------|----------|-----------|-------|-----------|----------|
| | | 30 min | | 60 min | | 90 min | |
| | | g/kg | kg/ha | g/kg | kg/ha | g/kg | kg/ha |
| Citronelol | 6 | 1,29±0,02 | 18,0±0,3 | 1,1±0,2 | 18±3 | 1,1±0,2 | 17±3 |
| | 9 | 1,4±0,3 | 23±1 | 1,4±0,2 | 23±1 | 1,15±0,07 | 22±1 |
| | 12 | 1,2±0,3 | 27±2 | 1,00±0,04 | 26±1 | 0,8±0,5 | 26±1 |
| Geraniol | 6 | 0,89±0,08 | 12±4 | 0,84±0,07 | 12±1 | 0,75±0,02 | 10,5±0,7 |
| | 9 | 0,9±0,1 | 17±3 | 1,1±0,1 | 21±3 | 1,1±0,3 | 21±5 |
| | 12 | 0,8±0,1 | 18±4 | 0,8±0,4 | 18±3 | 0,8±0,6 | 18±3 |

EDV: Estado de desarrollo vegetativo.

Como se observa, los compuestos no exhibieron diferencias notorias en sus concentraciones, al ser aislados con diferentes tiempos de extracción y en diferentes etapas de desarrollo vegetativo. Sin embargo, al estimar la cantidad de compuesto presente por hectárea de geranio cultivado, se encuentra que se alcanza la mayor producción de citronelol y geraniol a los 12 meses de desarrollo de la planta, esto debido a que en esta etapa se alcanza el rendimiento más alto y la planta presenta mayor cantidad de biomasa, como se registra en la **Tabla 8**.

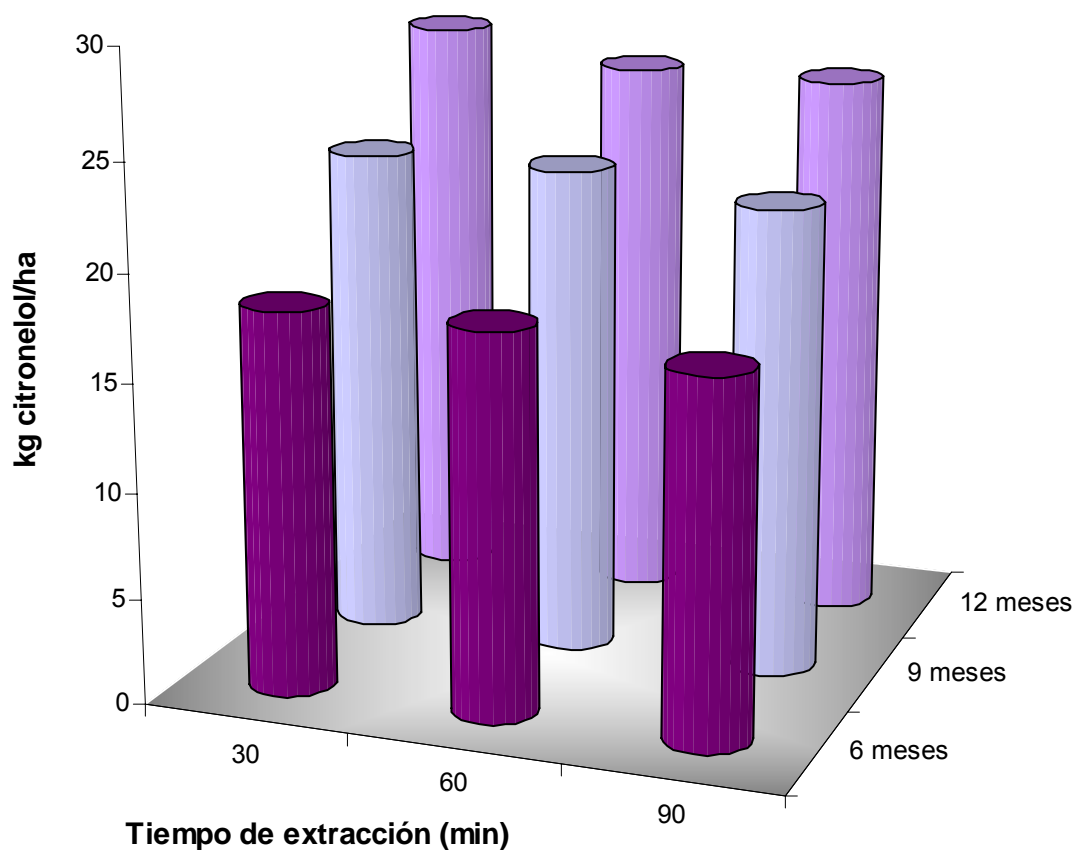


Figura 38. Concentración de citronelol, determinada por GC-MS mediante estandarización externa, en los AEs de hojas frescas de *P. graveolens* aislados por MWHD, usando diferentes tiempos de extracción y en distintos estados de desarrollo vegetativo.

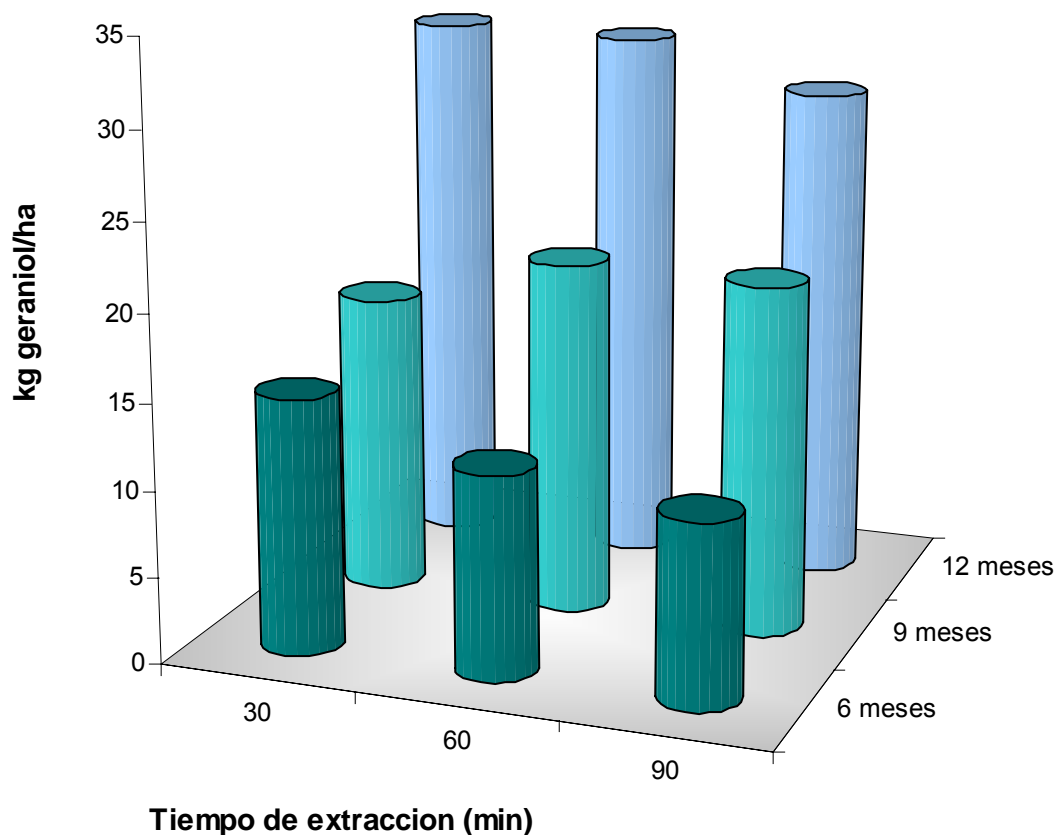


Figura 39. Concentración de geraniol, determinada por GC-MS mediante estandarización externa, en los AEs de hojas frescas de *P. graveolens* aislados por MWHD, usando diferentes tiempos de extracción y en distintos estados de desarrollo vegetativo.

6.7 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE LOS AEs Y EXTRACTOS DE *P. graveolens*, OBTENIDOS EN DIFERENTES ESTADOS VEGETATIVOS, USANDO DISTINTAS TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN Y LA DURACIÓN DE MWHD.

Con el fin de presentar en una forma más clara la influencia tanto del estado de desarrollo vegetativo de la especie *P. graveolens*, como del método de extracción y tiempo de extracción por MWHD, sobre la composición química de los AEs y extractos de geranio obtenidos, se llevó a cabo el análisis estadístico de componentes principales (PCA, STATISTICA Versión 6.0, StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA).

Se empleó una nomenclatura, para facilitar el manejo de la información en el análisis estadístico que aparece a continuación el la **Figura 40**.

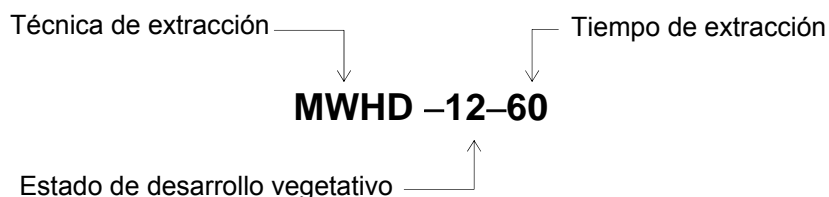


Figura 40. Nomenclatura empleada para análisis de PCA.

El resultado del análisis estadístico PCA, aplicado a las fracciones volátiles de la especie *P. graveolens* obtenidas por MWHD, SDE y SFE, mostró que aproximadamente el 80% de la información de los compuestos aislados en las tres etapas de desarrollo vegetativo, puede ser representada por un subespacio de dos coordenadas (componentes principales), construido con base en la combinaciones lineales de las concentraciones relativas (Área compuesto/Área estándar interno) de las familias de compuestos clasificadas por grupo funcional en los diferentes AEs y extractos (**Figura 33**). En el **Anexo 5 (Tabla 1)** aparecen las contribuciones de cada familia de compuestos por grupo funcional a los *Factores* 1 y 2.

El *Factor* 1 involucra el 71% de la información y está representado principalmente por los hidrocarburos (>C₂₃) y el *Factor* 2 involucra el 11% de la información y está representado por las cetonas sesquiterpénicas (CS), los alcoholes sesquiterpénicos (ALS), los hidrocarburos aromáticos (HA), los éteres sesquiterpénicos (ETS) y otros compuestos oxigenados (O).

De acuerdo con la **Figura 41**, se observa la existencia de 2 grupos, a saber; el grupo **1** está conformado por los subgrupos A, que corresponde a los AEs obtenidos a los 6 y 12 meses de desarrollo vegetativo de la planta y extraídos a 30, 60 y 90 min, junto con los extractos obtenidos por SDE a los 12 meses de desarrollo vegetativo; el subgrupo **B**, que corresponde a los AEs

obtenidos por MWHD a los 9 meses de desarrollo de vegetativo y usando los tres tiempos de extracción; en el subgrupo **C**, en el cual se relacionan los extractos obtenidos por SDE a los 6 y 9 meses; por último, en el grupo **2**, en el que entran los extractos obtenidos por SFE, de plantas de geranio en las tres etapas de desarrollo vegetativo.

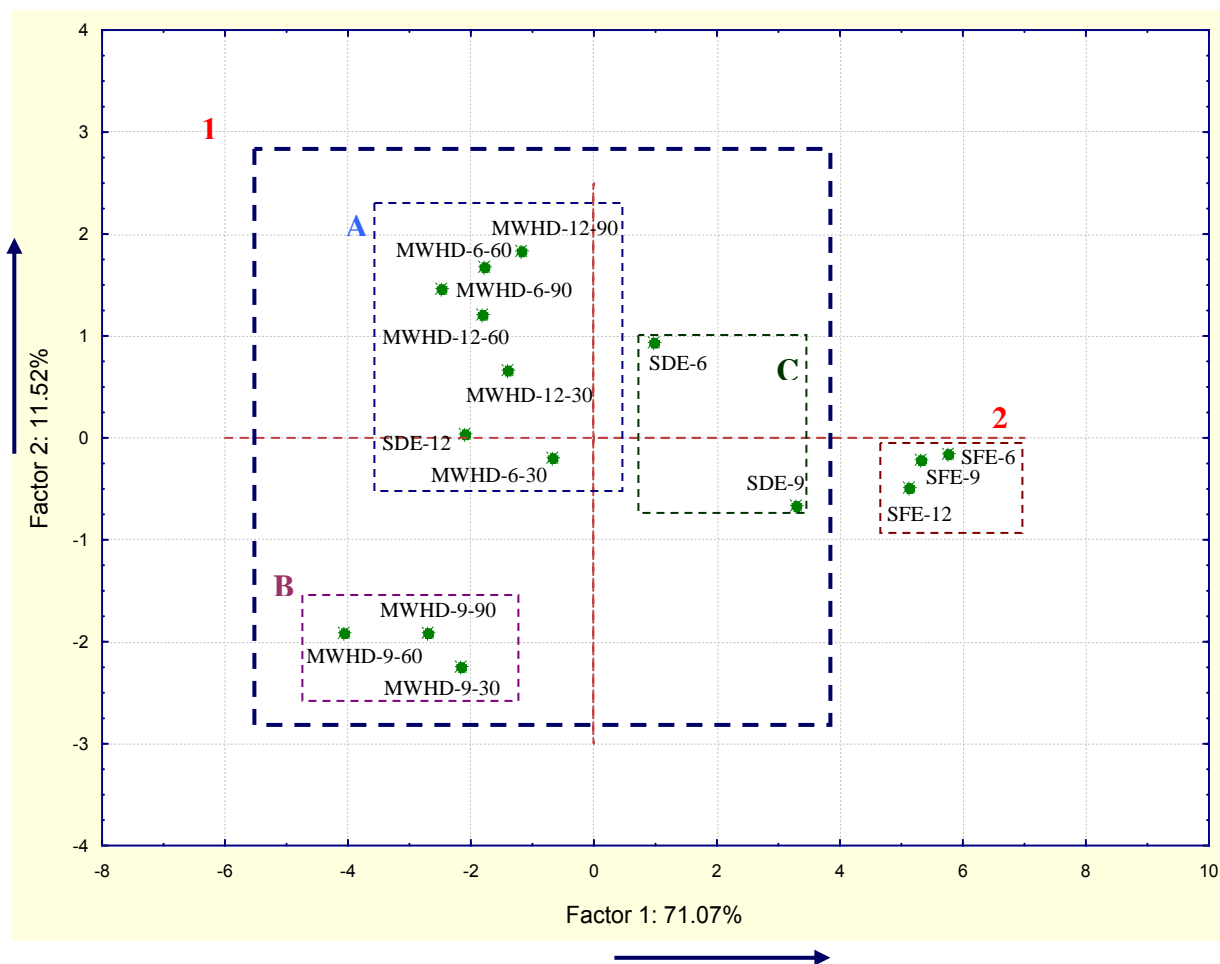


Figura 41. Análisis de componentes principales (PCA) de los compuestos presentes en los AEs y extractos de *Pelargonium graveolens*, según su relación “Área de compuesto/Área del estándar interno”, aislados por MWHD, SDE y SFE, de plantas recolectadas en tres estados de desarrollo vegetativo, variando los tiempos de extracción por MWHD.

En la **Figura 41**, el desplazamiento hacia la derecha corresponde a aquellas muestras que presentan mayor contenido de hidrocarburos ($>C_{23}$). Mientras que altas concentraciones ésteres aromáticos, alcoholes monoterpénicos y ésteres monoterpénicos generan un desplazamiento a la izquierda en el gráfico. Como era de esperarse, se observa un desplazamiento hacia la derecha de los extractos obtenidos por SFE, ya que por el análisis de su composición, son los que presentaron hidrocarburos (ceras cuticulares). Los desplazamientos hacia arriba en el *Factor 2* están relacionados con aquellas muestras que tienen mayor contenido de cetonas sesquiterpénicas y los desplazamientos hacia abajo con aquellas, que presentan el contenido de aldehídos monoterpénicos más alto.

Con el fin de apreciar de una forma más clara la influencia tanto del estado de desarrollo vegetativo de la especie *P. graveolens*, como del método de extracción y tiempo de extracción por MWHD, sobre la composición química de los AEs y extractos de geranio, se realizó el estudio mediante la técnica de análisis de *clusters*, utilizando distancias euclidianas completas (*Software STATISTICA Versión 6.0, StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA*).

En el dendograma de *cluster* (**Figura 42**) se observa una relación entre las técnicas MWHD y SDE más cercana, que la obtenida con la técnica SFE. El *cluster 1* representa la relación entre los AEs obtenidos a los 6 y 12 meses de desarrollo vegetativo, mientras que el *cluster 2* muestra la relación entre AEs obtenidos a los 9 meses. Por otra parte, los *clusters 3* y *4* relacionan los extractos obtenidos por SFE y SDE, respectivamente.

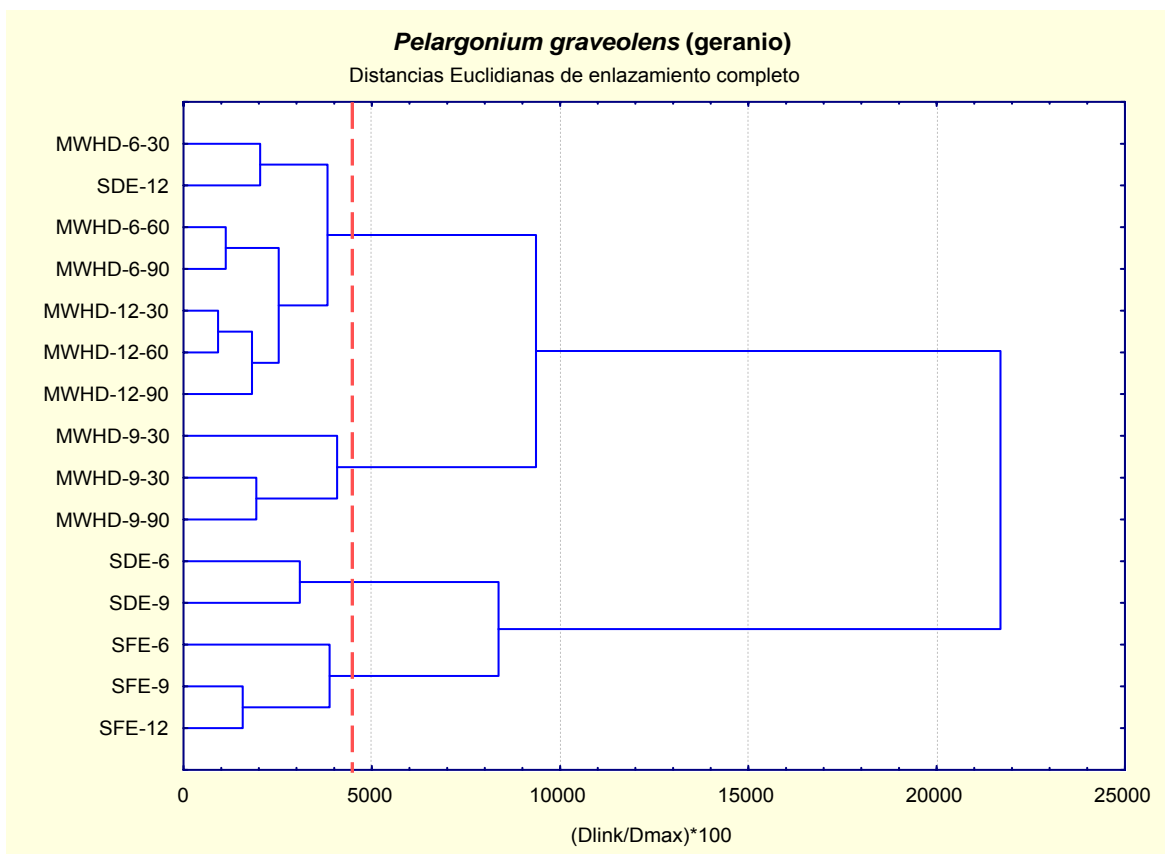


Figura 42. Dendrograma de *clusters* de las familias de compuestos por grupo funcional presentes en los AEs y extractos aislados por MWHD, SDE y SFE, de *P. graveolens*, de plantas recolectadas en diferentes etapas de desarrollo vegetativo.

En general, el análisis de componentes principales y *clusters* ha mostrado similitud entre las técnicas de extracción MWHD y SDE, de plantas recolectadas en las tres etapas de desarrollo vegetativo y para los diferentes tiempos de extracción, mientras que se observaron diferencias entre éstos y los extractos obtenidos por SFE, debido principalmente al alto contenido de hidrocarburos presentes en los extractos, aislados por SFE.

6.8 ANÁLISIS POR GC-MS DE LOS AEs Y EXTRACTOS DE *P. graveolens*

Los metabolitos secundarios aislados de las hojas frescas y secas de *P. graveolens* en diferentes estados de desarrollo vegetativo, fueron identificados empleando índices de retención de Kováts, calculados en columnas polar y apolar, para lo cual se utilizaron patrones de hidrocarburos lineales (C₁₀-C₂₅), y los espectros de masas (MS) obtenidos por impacto de electrones (70 eV), los cuales fueron comparados con los reportados en la literatura [132], y analizados “manualmente” con base en su patrón de fragmentación. Los espectros de masas, obtenidos experimentalmente de los componentes presentes en los AEs y extractos, fueron comparados con los de las bibliotecas, a saber: NBS75K, WILEY7n, NIST 2002, ADAMS. A continuación, se presentan algunos espectros de masas típicos de compuestos característicos de la especie *P. graveolens*.

☞ **Citronelol.** El espectro de masas del citronelol, componente mayoritario identificado en los AEs y extractos, de hojas de *P. graveolens*, se presenta en la **Figura 43**. Las rutas de ionización disociativa de este alcohol monoterpénico, según el espectro de masas (70 eV, EI), se muestran en el **Esquema 1**. La ruptura alílica a partir del ion molecular en m/z 156 (12%), conduce a la formación del fragmento, pico de base, en m/z 69 (100%), el cual tras la pérdida de una molécula de eteno, da origen al catión alilo en m/z 41 (66%). La pérdida de agua, a partir del ion molecular, origina el ion en m/z 138 (22%), el cual produce los fragmentos en m/z 55 (45%) y m/z 82 (62%), tras sufrir la ruptura alílica. El fragmento en m/z 138, sufre un reordenamiento de hidrógeno para generar los iones en m/z 123 (46%), m/z 109 (30%) y m/z 95 (66%), por eliminación sucesiva de los radicales metilo, etilo e isopropilo, respectivamente. El catión-radical en m/z 82, por pérdida de hidrógeno, da origen al fragmento en m/z 81 (67%).

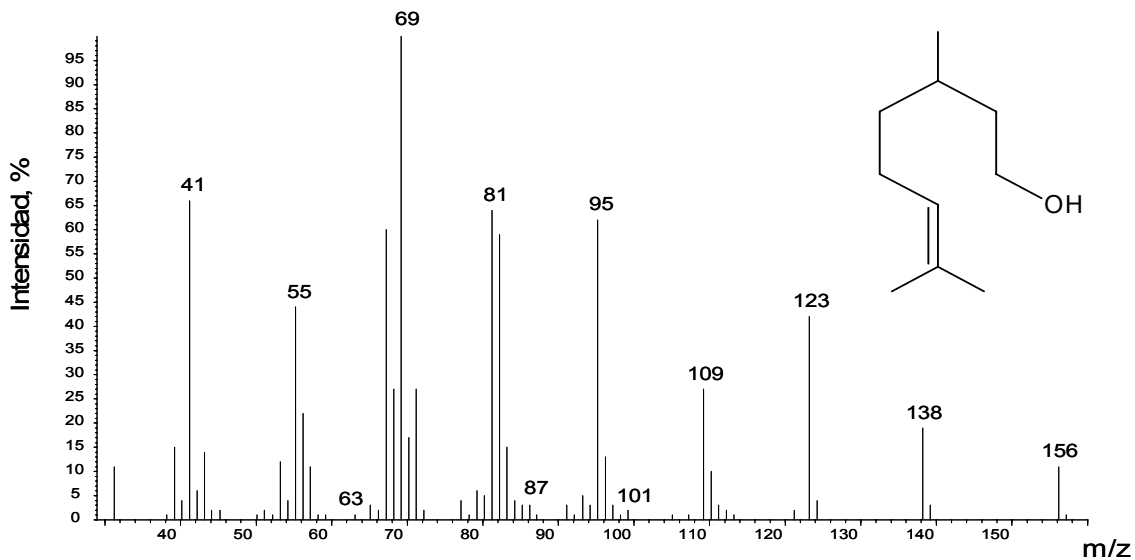
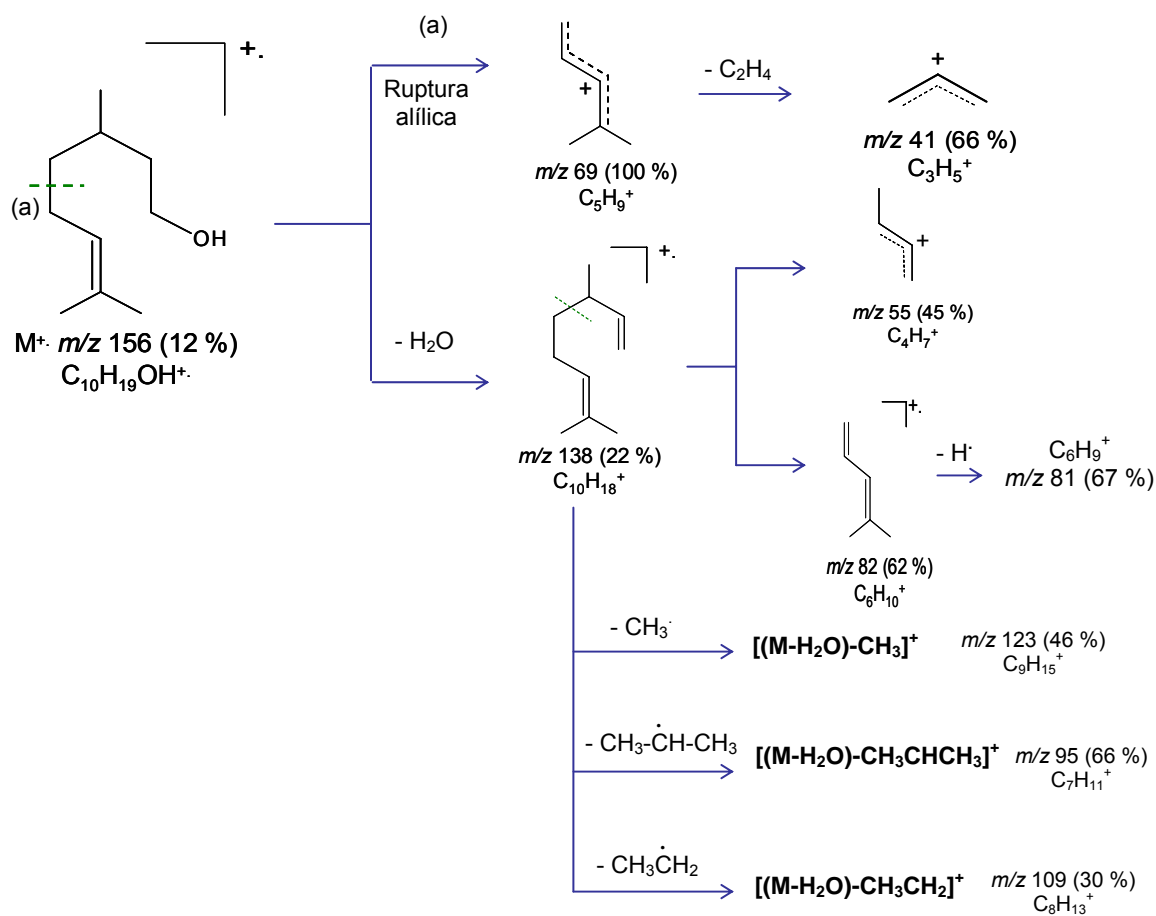


Figura 43. Espectro de masas del citronelol (EI, 70 eV).



Esquema 1. Rutas de fragmentación del citronelol.

☞ **Geraniol.** Este alcohol monoterpénico, isómero del nerol, y precursor del geranial, presenta en su espectro de masas ion molecular en m/z 154, de intensidad muy baja (2%), como se observa en la **Figura 44**. Las rutas de ionización disociativa del geraniol se ilustran en el **Esquema 2**. El ion molecular por eliminación del radical metilo, conduce a la formación del ion en m/z 139 (5%), el cual da origen al fragmento en m/z 111 (10%), igualmente, éste, por pérdida de agua, origina el catión-radical en m/z 136 (4%), el cual, por sucesiva eliminación de los radicales isopropilo y metilo, genera los fragmentos en m/z 93 (16%) y m/z 121 (9%), respectivamente. El ion m/z 69 (100%), pico de base, se forma por ruptura alílica a partir del ion molecular, que por subsiguiente eliminación de una molécula de eteno, da origen al catión alilo en m/z 41 (47%), como se muestra en el **Esquema 2**.

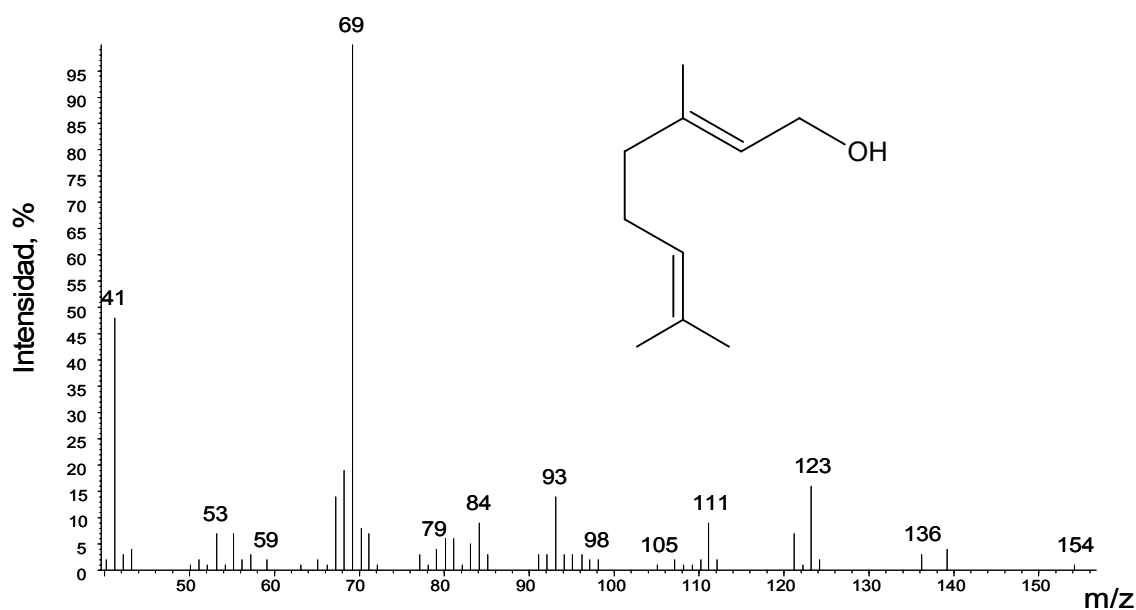
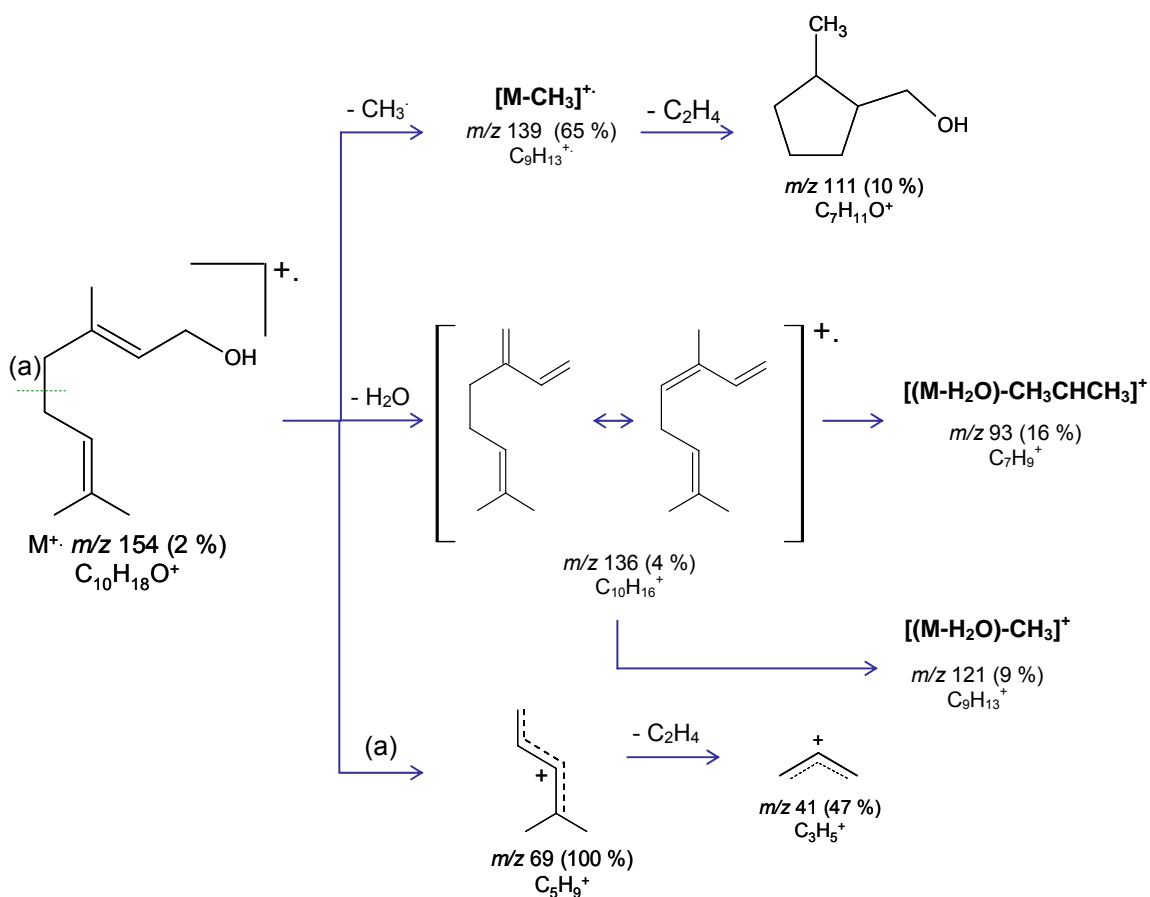


Figura 44. Espectro de masas del geraniol (EI, 70 eV).



Esquema 2. Rutas de fragmentación del geraniol.

Formiato de citronelilo. Uno de los ésteres de citronelilo, presente en AEs y extractos de *P. graveolens* es el formiato de citronelilo, que tiene un espectro de masas (**Figura 45**), con el ion molecular en $m/z 184$ (2%), el cual por pérdida de una molécula de HCOOH, después de un reordenamiento de hidrógeno, tipo McLafferty intramolecular, da origen al ion en $m/z 138$ (47%), y éste, a su vez, por eliminación del radical metilo, genera el fragmento en $m/z 123$ (63%).

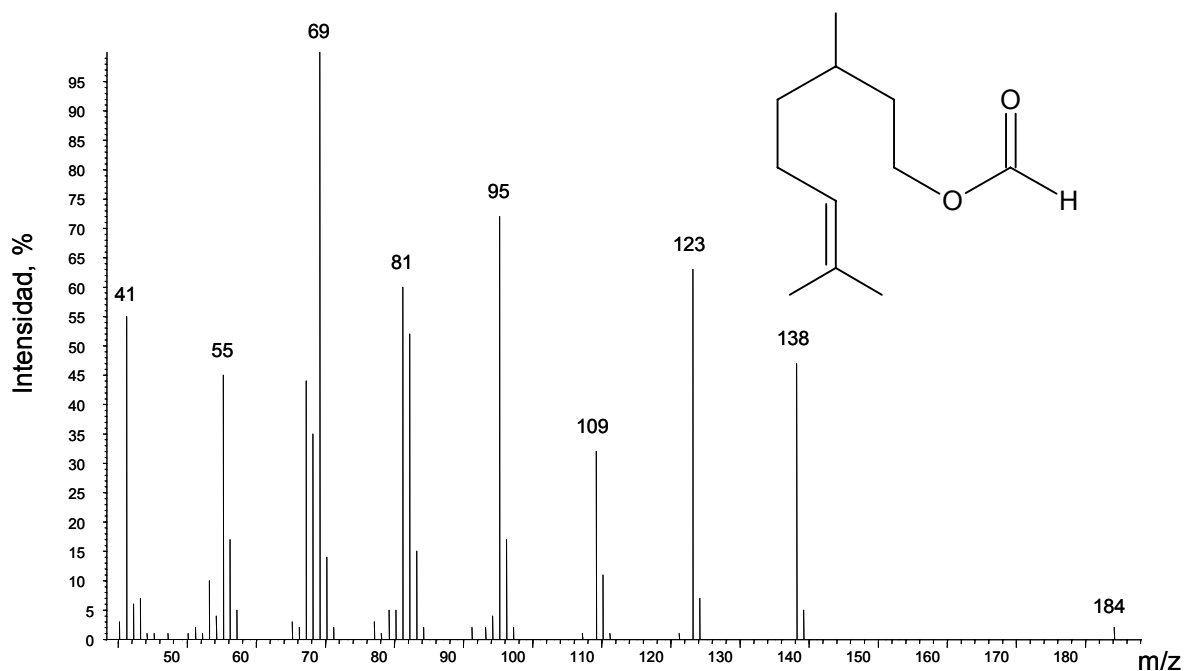
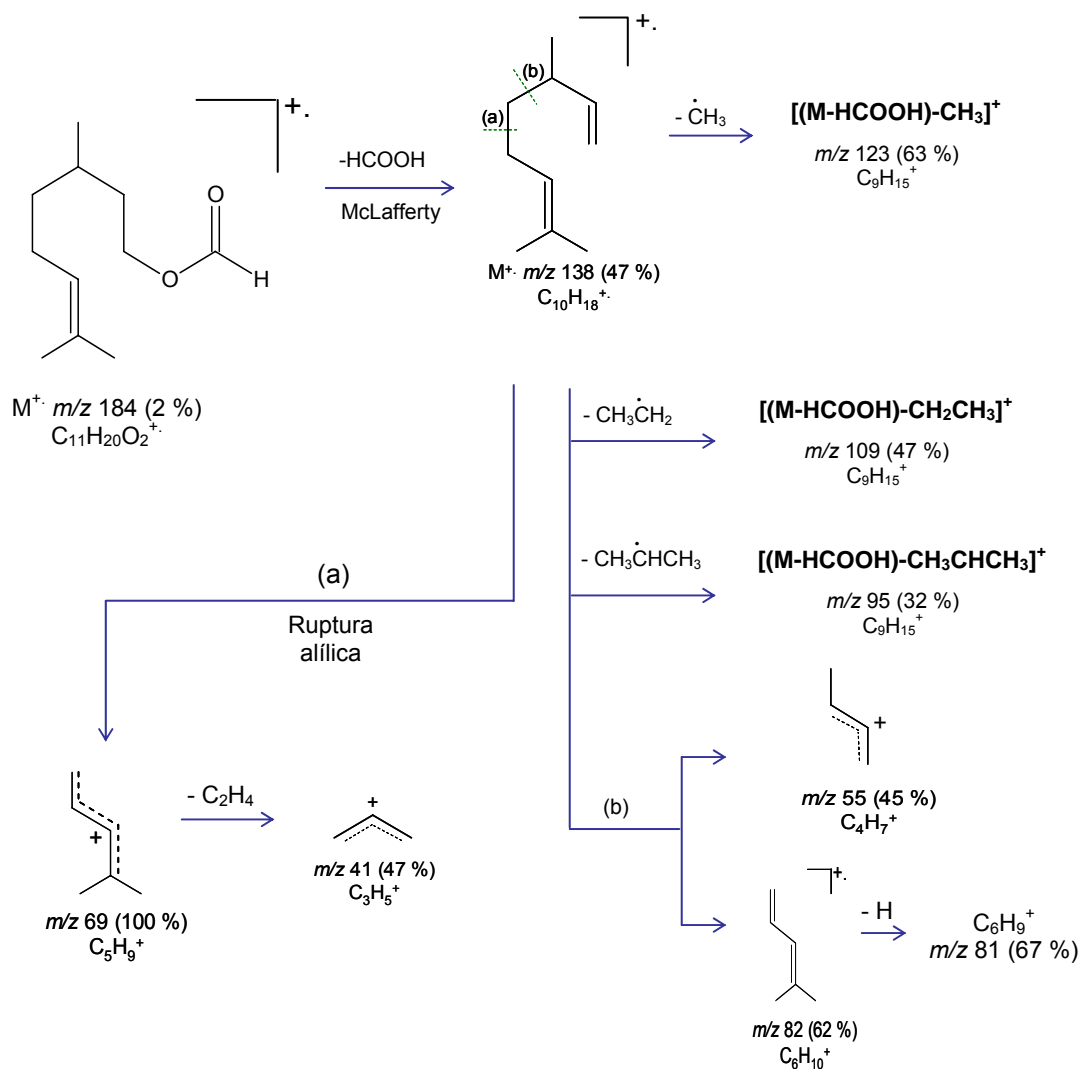


Figura 45. Espectro de masas del formiato de citronelilo (EI, 70 eV).

Las rutas de ionización disociativa del formiato de citronelilo, se presentan en el **Esquema 3**. La ruptura alílica del catión-radical en m/z 138, origina el ion, pico de base, en m/z 69 (100%), que al eliminar una molécula de eteno, forma el catión alilo en m/z 41 (55%).

Otros iones importantes se originan en m/z 95 (32%) y en m/z 109 (47%), a partir del fragmento en m/z 138, por eliminación de los radicales isopropilo y etilo, respectivamente, después de un reordenamiento de hidrógeno. Los fragmentos en m/z 82 (52%) y en m/z 55 (45%), se forman por ruptura alílica a partir del ion en m/z 138.



Esquema 3. Rutas de fragmentación del formiato de citronelilo.

☞ **Tiglato de geranilo.** El espectro de masas del tiglato de geranilo, otro de los ésteres característicos de la especie *P. graveolens*, se muestra en la **Figura 46**, y sus rutas de fragmentación se ilustran en el **Esquema 4**. El ion, pico de base, en $m/z 83$ (100%) se genera por ruptura α , a partir del ion molecular en $m/z 236$, de muy baja intensidad (1%). Por eliminación de una molécula de CO, el pico de base, origina el fragmento en $m/z 55$ (33%).

El ion molecular en m/z 236, después de un reordenamiento de hidrógeno, tipo McLafferty intramolecular, conduce a la formación del fragmento en m/z 136 (28%), el cual sufre la ruptura alílica, dando origen al catión en m/z 69 (81%) y, por sucesiva eliminación de una molécula de eteno, se forma el catión aliilo en m/z 41 (31%). La eliminación de moléculas neutras a partir del fragmento en m/z 136, produce los iones en m/z 93 (59%), m/z 68 (51%), m/z 121 (38%) y m/z 80 (27%), así como se ilustra en el **Esquema 4**.

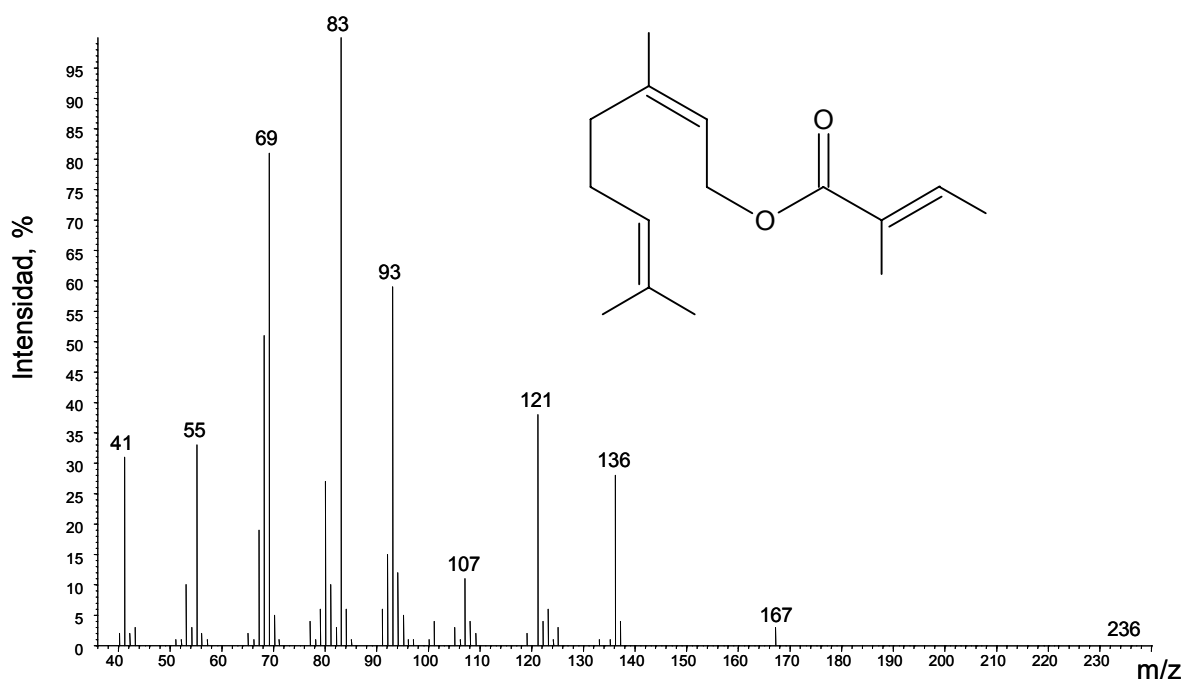
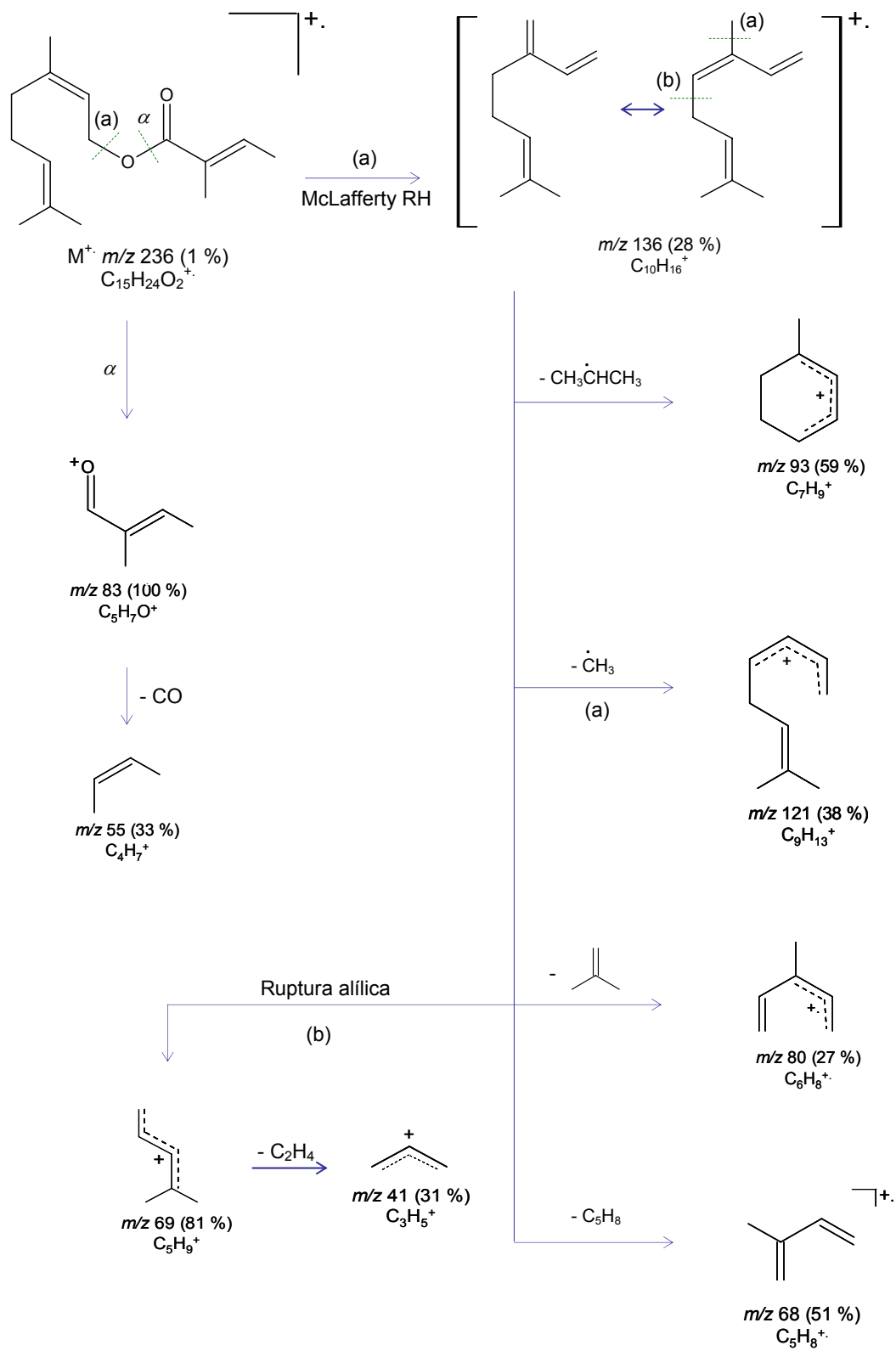


Figura 46. Espectro de masas del tiglato de geranilo (EI, 70 eV).



Esquema 4. Rutas de fragmentación del tiglato de geranilo.

6, **9-Guaiadieno**. El principal representante de los hidrocarburos sesquiterpénicos en los AEs y extractos obtenidos de *P. graveolens*, es el 6, 9-guaiadieno, cuyo espectro de masas se ilustra en la **Figura 47**. Las rutas de ionización disociativa para este sesquiterpeno se muestran en el **Esquema 5**. Este metabolito presenta en su espectro de masas un ion molecular de intensidad media en m/z 204 (41%), el cual por eliminación del radical metilo, conduce a la formación del ion en m/z 189 (22%), que por sucesiva eliminación de una molécula de propeno, origina el fragmento en m/z 147 (31%), éste, tras sufrir ruptura β , después de un reordenamiento de hidrógeno, produce el ion, pico de base, en m/z 105 (100%).

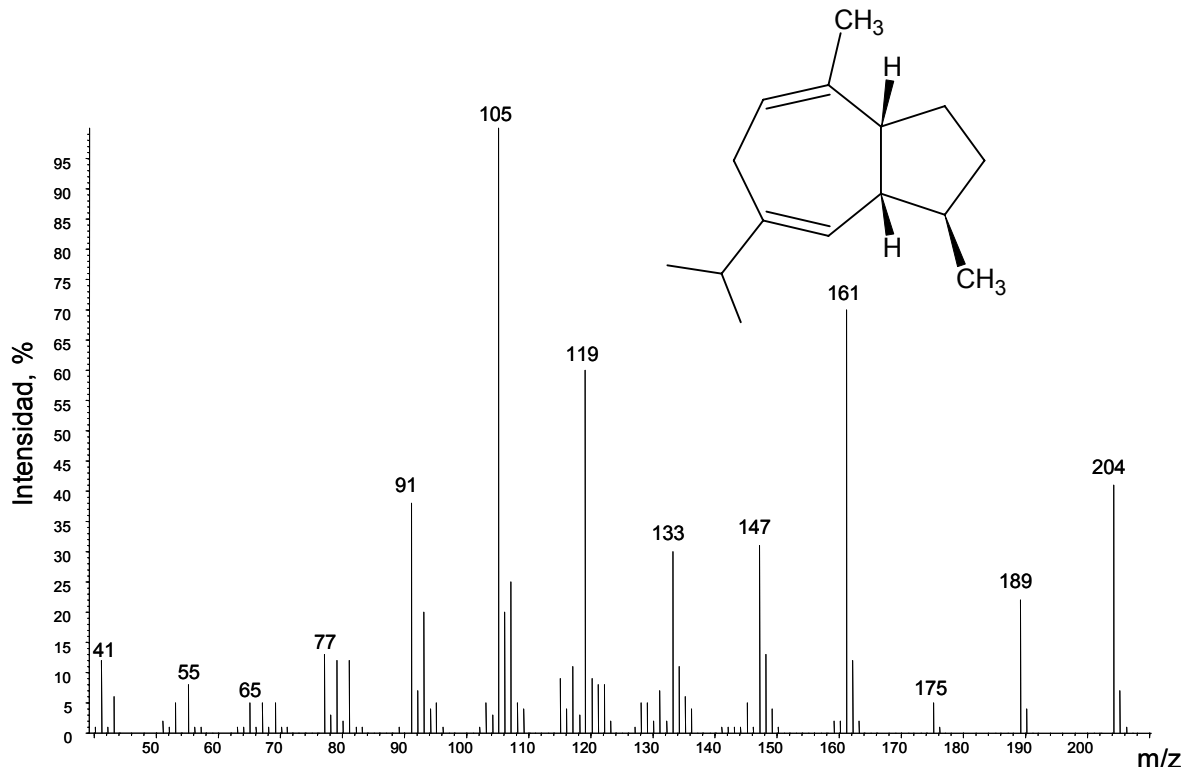
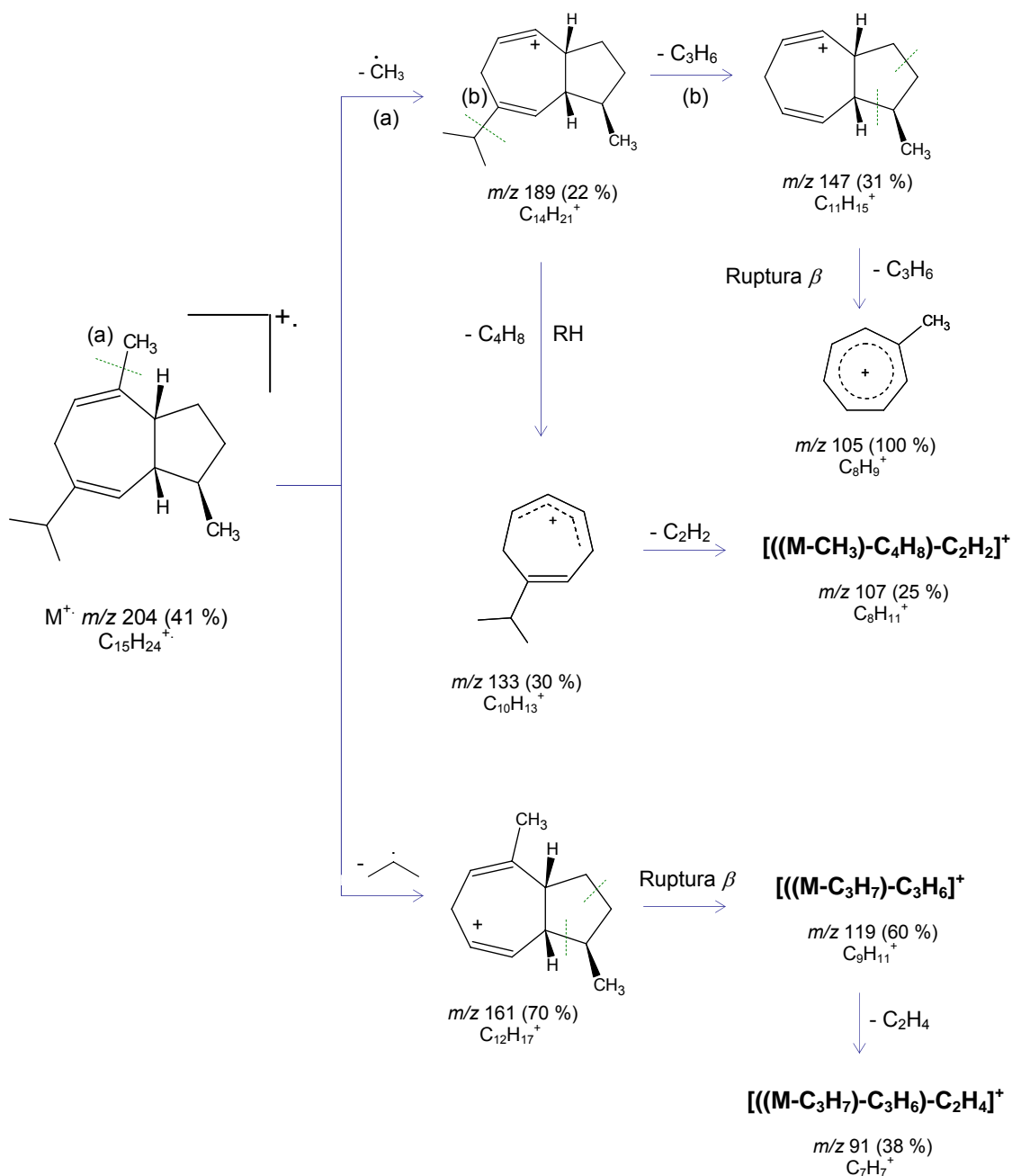


Figura 47. Espectro de masas del 6,9-guaiadieno (EI, 70 eV).

La disociación del ion en m/z 189, con pérdida de una molécula C_4H_8 , después de un reordenamiento de hidrógeno, da origen al fragmento en m/z 133 (30%), con subsiguiente pérdida de una molécula C_2H_2 , se forma el ion en m/z 107 (25%). El fragmento en m/z 161 (70%), surge de la

eliminación del radical propilo ($M-C_3H_7$)⁺, por sucesiva eliminación de una molécula de propeno, después de un reordenamiento de hidrógeno, se origina el fragmento en m/z 119 (60%), el cual conduce a la formación del ion en m/z 91 (38%), por pérdida de una molécula C_2H_4 .



Esquema 5. Rutas de fragmentación del 6,9-guaiadieno.

☞ **cis-Óxido de rosa.** Éter monoterpénico cíclico, al cual se le atribuye una nota olfativa a rosas del AE de geranio, presenta en su espectro de masas, un ion molecular en m/z 154, de intensidad media (12%), el cual, por eliminación del radical metilo, forma el ion, pico de base, en m/z 139 (100%), que por sucesiva pérdida de la molécula C_4H_8 , da origen al fragmento en m/z 83 (20%). La ruptura α del ion molecular, produce el ion en m/z 69 (39%), y el fragmento en m/z 85 (10%). El espectro de masas del *cis*-óxido de rosa, se presenta en la **Figura 48**. Las rutas de ionización disociativa de este éter monoterpénico se muestran en el **Esquema 5**.

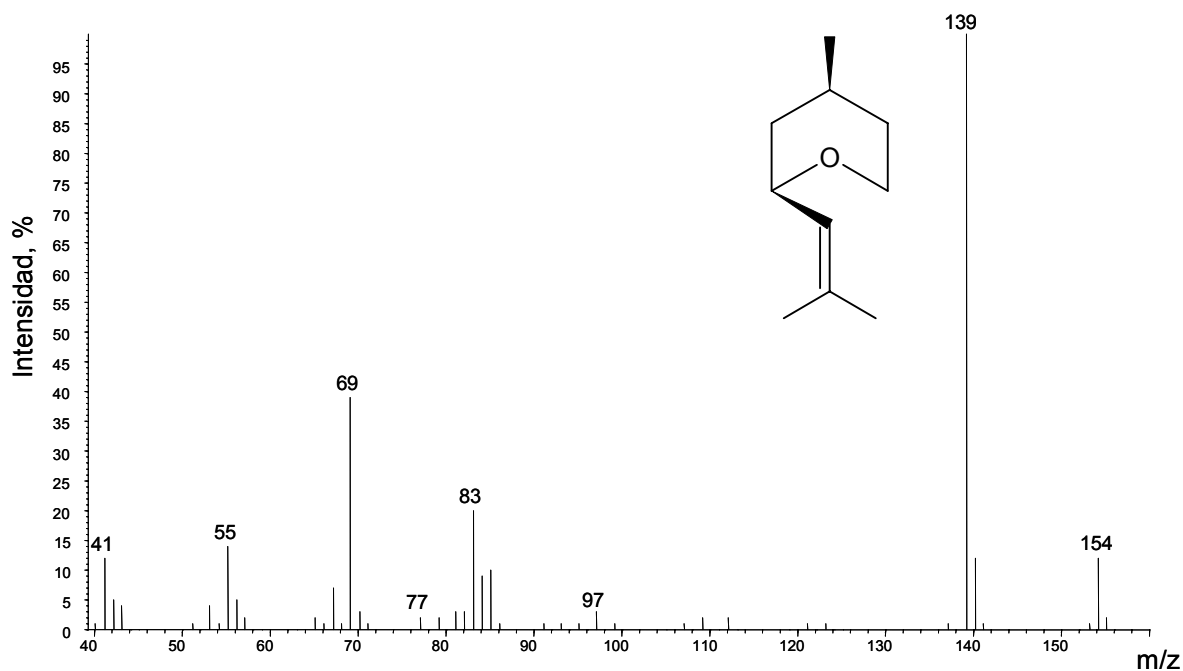
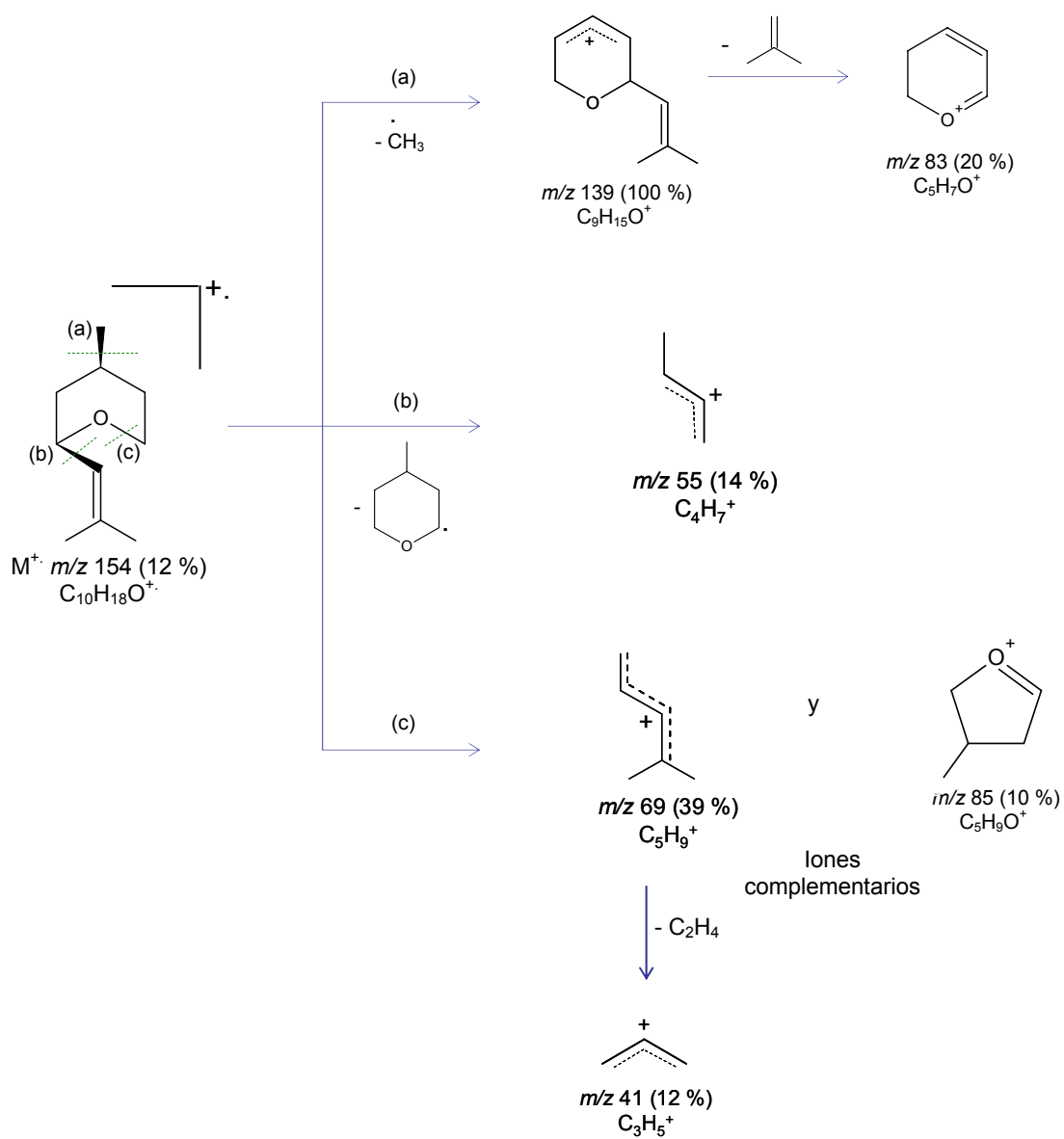


Figura 48. Espectro de masas del *cis*-óxido de rosa (EI, 70 eV).



Esquema 6. Rutas de fragmentación del *cis*-óxido de rosa.

7. CONCLUSIONES

1. El rendimiento del AE de *P. graveolens*, depende del estado de desarrollo vegetativo de la planta. Se encontró, que a los 12 meses de crecimiento de la planta, se obtuvo la cantidad de AE más alto (0,24%). Rendimientos más bajos se alcanzaron para 6 y 9 meses, 0,12 y 0,15%, respectivamente. Se alcanza mayor producción de AE por hectárea a los 12 meses (55,2 kg/ha), que corresponde también a la mayor cantidad de biomasa producida (23 ton/ha).
2. Los metabolitos secundarios volátiles y semivolátiles de la planta de *Pelargonium graveolens*, se aislaron utilizando técnicas destilativas (MWHD) y extractivas (SDE y SFE). La caracterización e identificación química de los AEs y extractos de *P. graveolens* se realizaron usando criterios cromatográfico (I_K , t_R de sustancias patrón) y espectroscópico (EI, 70 eV).

Se identificaron positivamente 113 compuestos (>0,03%) en las fracciones volátiles, aisladas por MWHD y SDE. Para ambos métodos de extracción, los oxigenados constituyeron la mayor fracción (30-40%), seguida de la de los hidrocarburos sesquiterpénicos (21-29%). Dentro de los monoterpenos oxigenados, los mayoritarios fueron los alcoholes citronelol (11-24%) y geraniol (4-8%). 6,9-Guaiadieno fue el compuesto mayoritario (6-8%), en el grupo de los hidrocarburos sesquiterpénicos. Se detectaron ésteres de citronelilo (14–17%), de geranilo (9–14%) y óxidos de rosa (ca. 1,5%). Los extractos aislados por SFE, en los cuales se determinaron alrededor de 74 compuestos (>0,2%), se caracterizaron principalmente por el alto contenido de hidrocarburos ($C_n > 23$). En la **Tabla**, que aparece a continuación, se reportan los grupos de

compuestos principales presentes en los AEs de la especie bajo estudio, en función del estado de desarrollo vegetativo de la planta:

| Compuestos mayoritarios | Cantidad relativa (%), estado de desarrollo vegetativo (meses) | | |
|-------------------------------------|--|-----------|-----------|
| | 6 | 9 | 12 |
| Óxidos de rosas | 1,49 | 1,33 | 1,15 |
| iso-Mentona | 4,54 | 4,67 | 3,74 |
| Citronelol | 18,14 | 13,88 | 14,92 |
| Geraniol | 8,35 | 7,34 | 7,45 |
| Ésteres de citronelilo | 16,24 | 17,59 | 15,82 |
| Ésteres de geranilo | 12,89 | 11,97 | 11,07 |
| 6,9-Guaiadieno | 6,74 | 7,59 | 7,35 |
| Relación citronelol:geraniol | 2,2:1 | 1,9:1 | 2:1 |
| Rendimiento (% p/p) | 0,12±0,01 | 0,15±0,01 | 0,24±0,02 |
| Biomasa por planta (g) | 519 | 724 | 836 |
| kg AE/ha | 16,8 | 28,5 | 55,2 |

3. La composición química de los AEs de geranio fue poco afectada por el estado de desarrollo de la planta y tiempo de extracción del material vegetal de MWHD. El número de componentes permaneció constante en los AEs aislados de material vegetal de 6, 9 y 12 meses de desarrollo; se presentan sólo pequeñas variaciones en sus concentraciones.

Se observó un ligero aumento del citronelol (ca.18%) a los 6 meses de desarrollo del geranio, en comparación con su contenido en plantas de 9 y 12 meses, *i.e.* 14 y 15%, respectivamente. Para geraniol, no se observan variaciones estadísticamente significativas para los tres estados vegetativos analizados, tanto para material vegetal fresco y como para seco. Se obtuvieron 18, 22 y 26 kg de citronelol por hectárea, a los 6, 9 y 12 meses de desarrollo vegetativo de la planta, respectivamente; 12, 21 y 18 kg de geraniol por hectárea, a los 6, 9 y 12 meses de desarrollo de la planta. La calidad del AE de geranio (*Pelargonium graveolens*) de este

estudio, en términos de la proporción de citronelol:geraniol y la cantidad de los compuestos mayoritarios, no fue “afectada” por el estado de desarrollo vegetativo de la planta y tampoco fue influenciada por el tiempo de extracción de MWHD.

4. El proceso de secado del material vegetal permite su mejor manipulación y no afecta la composición de los AEs y extractos. Esto es favorable para los cultivadores ya que, si el cultivo se encuentra alejado de la destilería, se puede recoger la cosecha, almacenarla bajo condiciones adecuadas y extraer el AE posteriormente, sin que la calidad de éste se vea afectada.

8. RECOMENDACIONES

Teniendo en cuenta la variabilidad de la composición de los AEs de geranio reportada en la literatura, en cuanto a diferentes orígenes geográficos, se sugiere continuar el estudio de la especie, modificando las localidades su cultivo en Colombia (altitud, suelo, temperatura, *etc.*), con el fin de encontrar las mejores condiciones de adaptabilidad de la especie, analizando la calidad del AE obtenido y la producción de biomasa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Estudio del mercado colombiano de aceites esenciales. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Biocomercio sostenible, **2003**, 85 p, [On-line]: www.humboldt.org.co/biocomercio, [Consultado: 27-02-2006].
2. STASHENKO, E.E.; COMBARIZA, Y., Aceites esenciales, Técnicas de extracción y análisis, Editorial UIS, Bucaramanga, **1998**.
3. BANDONI, A (Ed)., Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores, Editorial U.N.L.P., La Plata, **2000**, 360 p.
4. ABO, M.; SARHAN, M.; OMAR, A.; and HELAL, M., Biocides formulation of essential oils having antimicrobial activity, *Arch. Phytopathol. Plant Protec.*, **2005**, 38(3), pp. 175-184.
5. The United Nations Conference on Trade and Development. Market Brief in the European Union for selected natural ingredients derived from native species. ProFound, **2005**, [On-line]: www.biotrade.org/docs/biotradebrief-crescentiacujete.pdf, [Consultado: 10-03-2006].
6. LUQUE DE CASTRO, M.; JIMENEZ, M.; and FERNANDEZ, V., Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants, *TrAC*, **1999**, 8(11), pp. 708-716.
7. Centre for the promotion of imports from developing countries. Natural ingredients for cosmetic. ProFound, **2005**, pp. 45-62, [On-line]:

www.ugandaexportsonline.com/biotrade/Natural%20Ingredients%20Sector%20, [Consultado: 10-03-2006].

8. Centre for the promotion of imports from developing countries. Natural ingredients for pharmaceuticals. ProFound, **2005**, [On-line]: <http://www.biotrade.org/BTFP/Publications.htm>, [Consultado: 10-03-2006].
9. [On line]: www.exportar.com, [Consultado: 15-07-2007].
10. [On-line]: [www.fao.org.co](http://www.fao.org/co), [Consultado: 3-10-2006].
11. GUENTHER, E., The essential Oils, Vol IV, Ed. Van Nostrand, New York, **1953**, pp.671-728.
12. WEISS, E. A., Essential Oil Crops, Cambridge Cab international, New York, **1997**, pp. 24-59.
13. MUÑOZ, F., Plantas medicinales y aromáticas. Estudio, cultivo y procesado, Editorial Mundi Prensa, Madrid, **1987**, 365 p.
14. LAWRENCE, B., Essential oils 1976-1978, Allured Publishing Corporation, Wheaton, **1978**, pp. 8, 33.
15. HUSAIN, A., Essential oil plants and their cultivation, Central Institute of medicinal and Aromatic plants, Lucknow, **1994**, pp. 29-33.
16. KENNETH, A. B., Hierbas aromáticas, Ed. Folio, Barcelona, **1988**, pp. 69-71.
17. RAJESWARA, B.R., Biomass yield, essential oil yield and essential oil composition of rose-scented geranium (*Pelargonium* species) as

- influenced by row spacings and intercropping with cornmint (*Mentha arvensis* L.f. *piperascens* Malinv. ex Holmes), *Ind. Crops Prod*, **2002**, 16, pp. 133-144.
18. BURDOCK, G.A., Fenaroli's handbook of flavor ingredients, CRS Press, 5^a Ed., Boca Ratón, **2005**, 507 p.
19. TISSERAND, R.; and BALACS, T., Essential oil safety, **1999**, Churchill Livingstone, London, 279 p.
20. DEMYTTENAERE, J.; VANOVERSCHELDE, J.; and KIMPE, N., Biotransformation of (*R*)-(+)- and (*S*)-(-)-citronellol by *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp., and the use of solid-phase microextraction for screening, *J. Chromatogr. A.*, **2004**, 1027, pp. 137-146.
21. NISHIMURA, O., Application of thermal desorption cold-trap injector to multidimensional GC and GC-MS, *J. High Resol. Chromatogr.*, **1995**, 18, pp. 699-704, in: LAWRENCE, B., Essential Oils 1995-2000, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, **2003**, pp. 100-104.
22. RANA, V.; JUYAL, J.; and BLÁZQUEZ, A., Chemical constituents of essential oil of *Pelargonium graveolens* leaves, *Inter. J. Aromather.*, **2002**, 12(4), pp. 216-218.
23. RAJESWARA, B.; KAUL, P.; MALLAVARAPU, G.; and RAMESH, S., Effect of seasonal climatic changes on biomass yield and terpenoid composition of rose-scented geranium (*Pelargonium* species), *Biochem. System. Ecol.*, **1996**, 24(7), pp. 627-635.

24. BENVENISTE, B. and AZZO, N., Geranium Oil. Technical Bulletin, Vol II, Kato Worldwide, **1992**, in: LAWRENCE, B., Essential Oils 1995-2000, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, **2003**, pp. 100-104.
25. KAUL, P.N.; RAJESWARA, B. R.; BHATTACHARYA, A. K.; SHIGH, C. P.; and SHIGH, K., Volatile constituents of three cultivars of rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.), *PAFAI*, **1995**, 17(4), pp. 1-26, in: LAWRENCE, B., Essential Oils 1995-2000, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, **2003**, pp. 100-104.
26. BAUER, K.; GARBE, D.; and SURBURG, H., Common fragrance and flavours materials, preparation, properties and uses, Wiley-VCH, 4^a Ed., Weinheim, **2001**, 239 p.
27. AQUAIR, C.; MOREIRA, M.; and DE CASTRO, H., Alcoholises of citronellyl butyrate catalized by lipase produce citronellol, *Cienc. Tecnol. Aliment.*, **2001**, 3(3), pp. 134-139.
28. PERGENTINO, D.; RAMOS, J.; QUINTANS-JÚNIOR, L.; SANTOS, J.; MACHADO, D.; and NÓBREGA, R., Study of anticonvulsant effect of citronellol, a monoterpene alcohol, in rodents, *Neurosci. Lett.*, **2006**, 401(3), pp. 231- 235.
29. LUTHRA, R.; BAHL, J. R.; and TYAGI, B. R., Yield and quality of essential oil in the growing and aging leaves of geranium (*Pelargonium graveolens*), *Current Res. Med. Arom. Plants*, **1995**, 17, pp. 21-23, in: LAWRENCE, B., Essential Oils 1995-2000, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, **2003**, pp. 100-104.
30. MALLAVARAPU, G. R.; PRAKASA, E. V.; RAMESH, S.; and NARAYANA, M. R., Chemical and agronomical investigations of a new chemotype of

- geranium, *J. Essent. Oil Res.*, **1993**, 5, pp. 433-438, in: LAWRENCE, B., Essential Oils 1995-2000, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, **2003**, pp. 100-104.
31. REIS, A. S.; GOMES DE ACEVEDO, E.; SARDIHNNA, R. M.; and NUNES DA PONTE, M., High pressure CO₂ extraction from geranium plants, *J. Essent. Oil Res.*, **1993**, 5, pp. 185-189, in: LAWRENCE, B., Essential Oils 1995-2000, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, **2003**, pp. 100-104.
32. KREIS, P. and MOSANDL, A., Chiral compounds of essential oils. Part XIII. Simultaneous chirality evaluation of geranium oil constituents, *Flavour Fragr. J.*, **1993**, 8, pp. 161-168, in: LAWRENCE, B., Essential Oils 1995-2000, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, **2003**, pp. 100-104.
33. KOENIG, W. A.; KREBBER, R.; EVERS, P.; and BRUHN, G., Stereochemical analysis of constituents of essential oils and flavor compounds by enantioselective capillary gas chromatography, *J. High Resol. Chromatogr.*, **1990**, 13, pp. 328-332, in: LAWRENCE, B., Essential Oils 1995-2000, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, **2003**, pp. 100-104.
34. RAVID, U.; PUTIEVSKY, E.; and KATZIR, I., Chiral GC analysis of menthone and isomenthone with high enantiomeric purities in laboratory-made and commercial essential oils, *Flav. Fragr. J.*, **1994**, 9, pp. 139-142, in: LAWRENCE, B., Essential Oils 1995-2000, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, **2003**, pp. 100-104.
35. SOUTHWELL, I. A.; STIFF, I. A.; CURTIS, A.; and STOLARSKI, G. Z., An Australian geranium oil, *Perfumer. Flav. J.*, **1995**, 20(4), pp. 11-14, in:

- LAWRENCE, B., *Essential Oils 1995-2000*, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, **2003**, pp. 100-104.
36. SOUTHWELL, I. A. and STIFF, I. A., Chemical composition of an Australian geranium oil, *J. Essent. Oil Res.*, **1995**, 7, pp. 545-547, in: LAWRENCE, B., *Essential Oils 1995-2000*, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, **2003**, pp. 100-104.
37. RAM, M.; RAM, D; and ROY, S.K., Influence of an organic mulching on fertilizer nitrogen use efficiency and essential oil yields in geranium (*Pelargonium graveolens*), *Biores. Technol.*, **2003**, 87, pp. 273-278.
38. SHELLIE, R. A. and MARRIOT, P. J., Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry analysis of *Pelargonium graveolens* essential oil using quadrupole mass spectrometry, *The Analyst*, **2003**, 128, pp. 879-883.
39. GOMES, P.; MATA, V.; and RODRIGUES, A., Characterization of Portuguese-grown geranium oil (*Pelargonium* sp.), *J. Essent. Oil Res.*, **2004**, 16, pp. 490-495.
40. HORSEY, P., The return of Kenyan essential oils, *Inter. J. Aromather.*, **2005**, 15(4), pp.159-162.
41. JULIANI, R.; KOROCH, A.; and SIMON, J., Quality of geranium oils (*Pelargonium* species): case studies in Southern and Eastern Africa, *J. Essent. Oil Res.*, **2006**, 18, pp. 116-121.
42. PETERSON, A.; MACHMUDAH, S.; ROY, B. C.; GOTO, M.; SASAKI, M.; and HIROSE, T., Extraction of essential oil geranium (*Pelargonium*

- graveolens*) with supercritical carbon dioxide, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **2006**, 81(2), pp. 167-172.
43. GOMES, P.; MATA, V.; and RODRIGUES, A., Production of rose geranium oil using supercritical fluid extraction, *J. Supercrit. Fluids*, **2007**, 41, pp. 50-60.
44. CHANDRAVADANA, M. V. and NODRY, E. S., Antifungal activity of essential oil of *Pelargonium graveolens* and its constituents against *Colletotrichum gloeosporoides*, *Indian J. Experiment. Biol.*, **1994**, 32, pp. 908-909, in: LAWRENCE, B., Essential Oils 1995-2000, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, **2003**, pp. 100-104.
45. GREENWAY, F. L.; FROME, B. M.; ENGELS, T. M.; and McLELLAN, A., Temporary of postherpetic neuralgia pain with topical geranium oil, *Am. J. Med.*, **2003**, 115(7), pp. 586-587.
46. SUN, W.; XU, Z.; WANG, C.; QU, W.; and LIN, C., Study on antioxidant activity of essential oils and its monomer from *Pelargonium graveolens*, *J. Chinese Med. Mater.*, **2005**, 28(2), pp. 87-89.
47. LIS-BALCHIN, M.; HART, S.; and ROTH, G., *Phytoteraphy Research*, John Wiley & Sons, London, **1997**, pp. 583-584.
48. LIS-BALCHIN, M.; BUCHBAUER, G.; HIRTENLEHNER, T.; and RESCH, M., Antimicrobial activity of *Pelargonium graveolens* essential oils added to quiche fillin as a model food system, *Let. Appl. Microbiol.*, **1998**, 27, pp. 207-210.

49. DORMAN, H. and DEANS, S., Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plants volatile oils, *J. Appl. Microbiol.*, **2000**, 88, pp. 308-310.
50. LEUNG, M. and FOSTER, S., Encyclopedia of Common Natural Ingredients, Used in Food, Drugs and Cosmetics, John Willey & Sons, 2nd Ed, New Jersey, **2003**, 688 p.
51. LIS-BALCHIN, M.; BUCHBAUER, G.; RIBISCH, K.; and WENGER, M., Comparative antibacterial effects of novel *Pelargonium* essential oils and solvent extracts, *Let. Appl. Microbiol.*, **1998**, 27, pp. 135-141.
52. JIROVETZ, L.; ELLER, G.; BUCHBAUER, G.; SCHMIDT, E.; DENKOVA, Z.; STOYANOVA, A.; NIKOLOVA, R.; and GEISLER, M., Chemical composition, antimicrobial activities and odor descriptions of some essential oils with characteristic floral-rosy scent and of their principal aroma compounds, *Res. Devel. Agron. Horticul.*, **2006**, 2, pp. 1-12.
53. JALALI, M.; ZEKAVAT, B.; and SERESHTI, H., Characterization of essential oil components of Iranian *Geranium* Oil using gas chromatography-mass spectrometry combined with chemometric techniques, *J. Chromatogr. A.*, **2006**, 1114, pp. 154-163.
54. GARCÍA, H., Flora Medicinal de Colombia Tomo II, Tercer Mundo Ediciones, 2^a Ed, Bogotá, **1992**, pp. 9-10.
55. GUPTA, M. P., 270 Plantas medicinales Iberoamericanas, CYTED – SECAB, Bogotá, **1995**, 617 p.
56. AZCÓN, J. y TALÓN, M., Fundamentos de fisiología vegetal, McGraw Hill interamericana, 1^a Ed, Barcelona, **2000**, pp. 261-283.

57. SALISBURY, F. y ROSS, C., Fisiología vegetal, Grupo Editorial Iberoamérica, **1994**, México D.F., pp. 71-98, 515-535.
58. KIRCHNER, J. G. and MILLER, J., Preparation of terpeneless essential oils, *Ind. Eng. Chem*, **1952**, 44(2), pp. 318-321.
59. GUENTHER, E., The essential Oils, Vol I, Ed. Van Nostrand, New York, **1948**, pp.241-244.
60. TAIZ, L. and ZEIGER, E., Plant Physiology, 3^a ed., Sinauer Associates, Inc., Sunderland, **2002**, p.p.283-307.
61. GUZMÁN, S.; CARDOZO, R.; y GARCÍA, V., Desarrollo agrotecnológico de *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown ex Britton & Wilson. *Revista Científica Guillermo de Ockham.*, **2004**, 7, pp. 201-205.
62. TOLONEN, A., Analysis of secondary metabolites in plant and cell culture tissue of *Hypericum perforatum* L. and *Rhodiola rosea* L., Oulu University Press, Oulu, **2003**, pp. 1-67.
63. DEWICK, P., Medicinal Natural Products. A biosynthetic approach, second edition, John Wiley & Sons, Ltd., Baffins Lane, **2002**, pp. 7-34.
64. DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; and GERSHENZON, J., Biochemistry of plant volatiles, *Plant Physiol.*, **2004**, 135, pp. 1893-1902.
65. COMBARIZA, Y. y BLANCO, C., Estudio comparativo de los aceites esenciales de hojas y frutos cítricos colombianos, Tesis de Grado, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, **1995**, pp. 15-20.

66. Boletín de plantas medicinales y aromáticas. Gobierno de Chile-Fundación para la innovación agraria, Santiago de Chile, **2003**, Boletín Trimestral N° 7.
67. JIROVETZ, L. and BUCHBAVER, G (Ed)., Processing, analysis and application of essential oils, Ed. Har Krishan Bhala & Sons, Dehradun, **2005**, pp. 21-28.
68. BARBOSA, F.; BARBOSA, L.; MELO, E.; MENDES, F.; and SANTOS, R., Influência da temperatura do ar de secagem sobre o teor e a composição química do óleo essencial de *Lippia alba* (MILL) N. E, Brown, *Quim. Nova*, **2006**, 29(6), pp. 1221-1225.
69. Métodos de secado de hierbas aromáticas y medicinales, [On line]: www.herbotecnia.com.ar/poscosecha-secadoMetodos.htm, [Consultado: 12-4-2007].
70. LIKENS, S. T. and NICKERSON, G .B., *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.* **1964**, 5, in: GODEFROOT, M.; SANDRA, P.; and VERZELE, M., New method for quantitative essential oil analysis, *J. Chromatogr. A.*, **1981**, 203, pp. 325-335.
71. GODEFROOT, M.; SANDRA, P.; and VERZELE, M., New method for quantitative essential oil analysis, *J. Chromatogr.*, **1981**, 203, pp. 325-335.
72. MORA, A. L., Composición química del aceite de *Cymbopogon citratus* en función del método de extracción, época de cosecha y tiempo de secado de la planta, Tesis de Maestría, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, **1997**, pp. 4-93.

73. STASHENKO, E.; JARAMILLO, B.; and MARTÍNEZ, J., Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its *in vitro* antioxidant activity, *J. Chromatogr. A.*, **2004**, 1025, pp. 93-103.
74. TEIXEIRA, S.; MENDES, A.; ALVES, A.; and SANTOS, L., Simultaneous distillation–extraction of high-value volatile compounds from *Cistus ladanifer* L, *Anal. Chim. Acta*, **2007**, 584, pp. 439–446.
75. CHYAU, C.; TSAI, S.; YANG, J.; WENG, C.; HAN, C.; SHIH, C.; and MAU, J., The essential oil of *Glossogyne tenuifolia*, *Food Chem.*, **2007**, 100, pp. 808–812.
76. ESCRICHE, I.; SERRA, J.; GUARDIOLA, V.; and MULET, A., Composition of Medium Volatility (Simultaneous Distillation Extraction–SDE) Aromatic Fraction of Pressed, Uncooked Paste Cheese (Mahon Cheese), *J. Comp. Anal.*, **1999**, 12(1), pp. 63–69.
77. BLANCH G.; REGLERO, G.; and HERRAIZ, M., Rapid extraction of wine aroma compounds using a new simultaneous distillation-solvent extraction device, *Food Chem.*, **1996**, 56(4), pp. 439-444.
78. GANZLER, K.; SALGO, A.; and VALLO, K., A novel simple preparation method for chromatography, *J. Chromatogr. A.*, **1986**, 371, pp. 299-300.
79. CERVANTES, M., Estudio de los metabolitos secundarios de Salvia negra (*Lepechinia schiedeana*), obtenidos por diferentes métodos de extracción y determinación de su posible actividad antioxidante *in Vitro*, Tesis de Grado, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, **1999**, pp. 7-64.

80. DENNY, E., Hidro-distillation of oils from aromatic herbs, *Perf. Flav. J.*, **1989**, 14, p. 57.
81. HANDLEY, A., Extraction Methods in Organic Analysis, Sheffield Academic Press, Sheffield, **1999**, 308 p.
82. LUCHESSI, M.; CHEMAT, F.; and SMADJA, J., Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herb: comparison with conventional hydro-distillation, *J. Chromatogr. A.*, **2004**, 1043, pp. 322-327.
83. PARÉ, J. R., European Patent Application 0485668A1, **1992**.
84. PARÉ, J. R., SIGAMIN, M. and LAPOINTE, J. US Patent. 5.002.784, **1991**.
85. KINGSTON, H. M. and JASSIE, L. B., Introduction to microwave sample preparation, theory and practice, ACS, Washington, **1998**, pp. 7-31.
86. SOMENATH, M., Sample preparation techniques in analytical chemistry, John Wiley & Sons, New Jersey, **2003**. 522 p.
87. TSARKOVA, T., Desarrollo de la técnica de extracción de metabolitos secundarios de plantas aromáticas utilizando la radiación de microondas, Tesis de Maestría (Química), Facultad de Ciencias, Universidad industrial de Santander, Bucaramanga, **1997**, pp. 27-31.
88. FERHAT, M.A.; MEKLATI, B.Y.; SMADJA, J.; and CHEMAT, F., An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel, *J. Chromatogr. A.*, **2006**, 1112, pp. 121-126.

89. GALLETI, G. C. and BONAGA, G., Analytical methods in the study of essential oils extraction, separation and identification techniques, *Chim. Acta Turcia*, **1988**, 16, pp. 291-296.
90. GÓMEZ, N.E. and WITTE, L., A simple method to extract essential oils from tissue samples by using microwave radiation, *J. Chem. Ecol.*, **2001**, 27(11), pp. 2351-2359.
91. SKOOG, D. A., Principios de análisis instrumental, McGraw-Hill, 5ª Ed., Barcelona, **2000**, pp. 490-528.
92. POURMORTAZAVI, S. and HAJIMIRSADEGHI, S., Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis: Review, *J. Chromatogr. A.*, **2007**, 1163, pp. 2–24.
93. CASTRO, M. D.; LUQUE, M.; and TENA, M., Analytical Supercritical Fluid Extraction, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlín, **1994**, 331 p.
94. DÍAZ, C.; PÉREZ, S.; and CABEZUDO, D., Supercritical carbon dioxide extraction of volatiles from spices. Comparison with simultaneous distillation–extraction, *J. Chromatogr. A.*, **2002**, 947, pp. 23–29.
95. LANGENFELD, J.; HAWTHORNE, S.; MILLER, D.; and PAWLISZYN, J., Role of modifiers for analytical-scale supercritical fluid extraction of environmental samples, *Anal. Chem.*, **1994**, 66(6), pp. 909-916.
96. REVERCHON, E.; DONSI, G.; and SESTI, L., Modeling of supercritical fluid extraction from herbaceous matrices, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **1993**, 32, pp. 2721-2726.

97. MENAKER, A.; KRAVETS, M.; KOEL, M.; and ORAV, A., Identification and characterization of supercritical fluid extracts from herbs: communication, *C. R. Chim.*, **2004**, 7, pp. 629–633.
98. REVERCHON, E. and SENATORE, F., Supercritical carbon dioxide of chamomile essential oil and its analysis by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.*, **1994**, 42, pp. 154-158.
99. KOTNIK, P.; SKERGET, M.; and KNEZ, Z., Supercritical fluid extraction of chamomile flower heads: Comparison with conventional extraction, kinetics and scale-up, *J. Supercrit. Fluids*, **2007**, doi:10.1016/j.supflu.2007.02.005. *article in press*.
100. REVERCHON, E. and DELLA, G., Supercritical CO₂ extraction and fractionation of lavender essential oil and waxes, *J. Agric. Food Chem*, **1995**, 43, pp. 1654-1658.
101. BARTLY, J.; NIEVES, L.; and SCHWEDE, A., Supercritical fluid extraction of the volatile components from the leaves of *Psidium guajava* L. (guava), *Flavour Fragr. J.*, **2004**, 9(3), pp.135–137.
102. DAMJANOVIC, B.; LEPOJEVIC, Z.; IVKOVIC, V.; and TOLIC, A., Extraction of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds with supercritical CO₂: Comparison with hydrodistillation, *Food Chem.*, **2005**, 92, pp. 143–149.
103. STASHENKO, E.; ACOSTA, R.; and MARTÍNEZ, J., High-resolution gas-chromatographic analysis of the secondary metabolites obtained by subcritical-fluid extraction from Colombian rue (*Ruta graveolens* L.), *J. Biochem. Biophys. Methods*, **2000**, 43, pp. 379–390.

104. CHESTER, T.; PINKSTON, J.; and RAYNIE, D., Supercritical fluid chromatography and extraction, *Anal. Chem*, **1994**, 66(12), pp. 106R-130R.
105. ERKEY, C.; MADRAS, G.; OREJUELA, M.; and AKGERMAN, A., Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Organics from Soil, *Environ. Sci. Technol.*, **1993**, 27(6), pp. 1225-1231.
106. SANDRA, P., Capillary gas chromatography in essential oil analysis, Huethig Verlag, New York, **1987**, 435 p.
107. JENNINGS, W., Analytical Gas Chromatography, Academic Press: San Diego, **1987**, 259 p.
108. KOVÀTS, E., Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system, *Advan. Chromatogr*, **1695**, pp. 229-247.
109. GROB L., Modern Practice of Gas Chromatography, Ed. John Wiley & Sons, New York, **1985**, pp. 267-288, 895-897.
110. STASHENKO, E.E.; BLANCO, C.; COMBARIZA, M.Y.; and MARTÍNEZ, J.R., Comparative study of Colombian citrus oil by high-resolution gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.*, **1995**, 697, pp. 501-513.
111. STASHENKO, E.; QUIROZ, N.; and MARTÍNEZ, J. R., HRGC/FID/NPD and HRGC/MSD study of Colombian ylang-ylang (*Cananga odorata*) oils obtained by different extraction techniques, *J. High Resol. Chromatogr.*, **1996**, 19, pp.353-358.

112. STASHENKO, E.E.; CERVANTES, M.; COMBARIZA, M.Y.; FUENTES, H.; and MARTÍNEZ, J.R.; HRGC/FID and HRGC/MSD analysis of the secondary metabolites obtained by different extraction methods from *Lepechinia schiedeana*, and *in vitro* evaluation of its antioxidant activity, *J. High Resol. Chromatogr.*, **1999**, 22, pp. 343-349.
113. McLAFFERTY, F. W. and TURECEK, F., Interpretation of mass spectra, University Science Books, San Diego, **1993**. 374 p.
114. MESSAGE, G. M., Practical aspects of gas chromatography / mass spectrometry, John Wiley & Sons, New York, **1984**. 351 p.
115. DURÁN, C., Estudio del aceite esencial de *Lippia alba* (FAM *Verbenaceae*) y de los aspectos fisiológicos en diferentes etapas de su crecimiento bajo tres niveles de luz, Tesis de Grado (Química), Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, **2005**, pp. 25-40.
116. Análisis de la tendencia del mercado internacional de aceites esenciales, [On-line:] www.exportar.org.ar/publicaciones/aceiteseenciales.pdf, [Consultado: 15-11-2006].
117. Aportes para el desarrollo del sector de plantas medicinales y aromáticas en el Uruguay, [On-line:] www.fundasol.org.uy/rincon_empresario/libros_docs.asp, [Consultado: 20-01-2007].
118. DEMARNE, F.E., Rose-scented geranium a *Pelargonium* grown for the perfume industry, in: M, Lis-Balchin (Ed.), *Geranium and Pelargonium*, Taylor & Francis, London and New York, 2002, pp. 193-211.

119. Aportes para el desarrollo del sector de plantas medicinales y aromáticas en el Uruguay, Fundaquim, Montevideo, **2004**, pp. 23–24, [On–line]: www.fundasol.org.uy/rincon_empresario/docs/libro_fitos.pdf, [Consultado 21–02–2006].
120. Geranium oil, ADC commercialization, **1998**, Boletín 14, [On line]: <http://www.foodnet.cgiar.org/inform/Idea/Geranium.PDF>, [Consultado 7–10–2006].
121. VARGAS, P.; ORTIZ, I.; and ROJAS, V., Vigilancia Tecnológica Aplicada a Nanociencia y Nanotecnología en Países de Latinoamérica, *J. Technol. Manag. Innov.*, **2006**, *1*(4), pp. 83-94.
122. Indicadores cientímetricos de patentes: aplicaciones y limitaciones, [On line]: http://www.ricyt.edu.ar/interior/normalizacion/III_bib/Spinak.pdf, [Consultado: 13-07-2007].
123. SPINAK, E., Indicadores cientímetricos, [On line]: <http://eprints.rclis.org/archive/00001875/01/sci07100.pdf>, [Consultado: 13-07-2007].
124. Base de datos *Web of Science (ISI Web of Knowledge, Thomson)*. [On line]: <http://portal.isiknowledge.com/portal.cgi?DestApp=WOS&Func=Fra>, [Consultado: 27-02-2007].
125. Base de datos *Elsevier (Scopus)*, [On line]: <http://try.scopus.com/campaign/index.cfm?CFID=23256589&CFTOKEN=54550422>, [Consultado: 22-02-2007].
126. GARCÍA-ESCUADERO, P., Análisis bibliométrico y literatura de patentes, *Rev. Gen. de Inform. Docum.*, **1997**, *7*(2), pp. 181-199.

127. MILLER, J. N. y MILLER, J.C., Estadística y quimiometría para química analítica, 4 Ed, Prentice Hall, Madrid, **2002**, pp. 221– 245.
128. PLA, L., Análisis multivariado: método de componentes principales. Secretaria general de la organización de los Estados Americanos, Programa regional de desarrollo científico y tecnológico, Washington D.C., **1986**, 90 p.
129. JOHNSON, D., Métodos multivariados aplicados al análisis de datos, Internacional Thomson Editores, Kansas, **2000**, pp. 93–142.
130. JARAMILLO, B., Estudio de la actividad antioxidante *in vitro* de aceites esenciales de plantas tropicales y compuestos nitrogenados sintéticos, Tesis de Doctorado, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, **2004**, pp. 55-58, 86-88.
131. STASHENKO, E.E.; JARAMILLO, B.; and MARTÍNEZ, J.R., Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its *in vitro* antioxidant activity, *J. Chromatogr. A.*, **2004**, 1025, pp. 93-103.
132. ADAMS, R.P., Identification of essential oil components by gas chromatography/quadropole mass spectroscopy, Allured Publishing, Carol Stream, IL, **2007**, 804 p.
133. BHAN, M. K.; DHAR, A. K.; CHOUDHARY, D. K.; REKHA, K.; BALYAN, S. S.; KHAN, S.; AGARWAL, S. G.; and SHAWL, A. S., Geranium (*Pelargonium* sp. 'hybrid') essential oil in subtropical and

- temperature regions of Jammu and Kashmir, *Flavour Fragr. J.*, **2005**, 21, pp. 527-530.
134. JAIN, N.; AGGARWAL, K. K.; SYAMASUNDAR, K. V.; SRIVASTAVA, S. K.; and KUMAR, S., Essential oil composition of geranium (*Pelargonium* sp.) from the plains of Northern India, *Flavour Fragr. J.*, **2000**, 16, pp. 44-46.
135. GARNER, W. Y.; BARGE, M. S.; and USSARY, J. P. (Eds), Good Laboratory Practice Standards, ACS, Washington, **1992**, 571 p.
136. DAVIES, N. W., Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicones and Carbowax 20M phases, *J. Chromatogr.*, **1990**, 503, pp. 1-24.
137. JIROVETZ, L.; ELLER, G.; BUCHBAUER, G.; SCHMIDT, E.; DENKOVA, Z.; STOYANOVA, A.; NIKOLOVA, R.; and GEISLER, M., Chemical composition, antimicrobial activities and odor descriptions of some essential oils with characteristic floral-rosy scent and of their principal aroma compounds, *Recent Res. Devel. Agron. Hortic.*, **2006**, 2, pp. 1-12.
138. STOYANOVA, A.; DENKOVA, Z.; NEVOV, N.; SLAVCHEV, A.; JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; LIEN, H.; SCHMIDT, E.; and GEISLER, M., C₂H₂F₄-SCFE-Oleoresins of black pepper (*Piper nigrum* L.) and ginger (*Zingiber officinale* (L.) Rosc.) from Vietnam: antimicrobial testings, gas chromatographic analysis and olfatoric evaluation, *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.*, **2006**, 5(5), pp. 1615-1623.
139. TAM, C.U.; YANG, F.Q.; ZHANG, Q.W.; GUAN, J.; and LI, S. P., Optimization and comparison of three methods for extraction of volatile

compounds from *Cyperus rotundus* evaluated by gas chromatography–mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed.*, **2007**, 44, pp. 444-449.

140. HATTAB, M.; CULIOLI, G.; PIOVETTI, L.; and CHITOUR, S.; and VALLS, R., Comparison of various extraction methods for identification and determination of volatile metabolites from the brown alga *Dictyopteris membranacea*, *J. Chromatogr. A.*, **2007**, 1143, pp. 1-7.

141. ALEKSOVSKI, S. A. and SOVOVÁ, H., Supercritical CO₂ extraction of *Salvia officinalis* L., *J. Supercrit. Fluids*, **2007**, 40, pp. 239-245.

ANEXOS

ANEXO 1. IX Congreso Colombiano de Fitoquímica, Pereira del 8 al 11 de mayo de 2007.

**INFLUENCIA DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y ÉPOCA DE
RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL SOBRE LA COMPOSICIÓN Y
RENDIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL Y EXTRACTOS DE LA ESPECIE
*Pelargonium graveolens***

D. L. Mendivelso, M. C. Olivares, J. R. Martínez & E. E. Stashenko*

Laboratorio de Cromatografía, CIBIMOL, Centro de Excelencia CENIVAM,
Universidad Industrial de Santander, Carrera 27 calle 9. Bucaramanga,
Colombia.

Tel: 57(7)6456737, Fax: 57(7)6358210. e-mail: elena@tucan.uis.edu.co

Resumen

El propósito de la presente investigación fue la determinación de la composición química de los metabolitos secundarios presentes en el geranio, *Pelargonium graveolens*, aislados en diferentes épocas de recolección del material vegetal mediante tres métodos de extracción: hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD), destilación-extracción con solvente simultánea (DES) y extracción con fluido supercrítico (SFE), de hojas frescas y secas de la planta y posterior análisis de los aceites y extractos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Los componentes mayoritarios encontrados fueron Citronelol, Geraniol, Mentona, Formiato de citronelil y además se presenta *cis* y *trans* - Óxido de rosa.



Scientia Et Technica
Universidad Tecnológica de Pereira
scientia@utp.edu.co
ISSN (Versión impresa): 0122-1701
COLOMBIA

2007

Deyny Leticia Mendivelso Pérez / Martha Cecilia Olivares Santoyo / Jairo René
Martínez / Elena E. Stashenko

COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES DE
PELARGONIUM GRAVEOLENS, EN FUNCIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y
ÉPOCA DE RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Scientia Et Technica, abril, año/vol. XIII, número 033

Universidad Tecnológica de Pereira

Pereira, Colombia

pp. 183-184

Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal

Universidad Autónoma del Estado de México



COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES DE *Pelargonium graveolens*, EN FUNCIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y ÉPOCA DE RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

RESUMEN

En la presente investigación se estudió la composición química de los metabolitos secundarios volátiles aislados del geranio, *Pelargonium graveolens*, en diferentes épocas de recolección del material vegetal mediante dos técnicas de extracción: hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWH) y destilación-extracción con solvente simultánea (SDE). Las fracciones volátiles se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Los componentes mayoritarios encontrados fueron citronelol, geraniol, isomentona, formiato de citronelilo, además, se detectaron *cis*- y *trans*- óxidos de rosa.

PALABRAS CLAVES: *Pelargonium graveolens*; geranio; aceite esencial; citronelol; geraniol.

ABSTRACT

Secondary volatile metabolites from geranium (Pelargonium graveolens), at different harvesting times, were isolated using two extraction techniques: simultaneous distillation-solvent extraction (SDE) and microwave-assisted hydrodistillation (MWH). The chemical composition of volatile fractions was determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS, EI, 70 eV). The main components identified were citronellol, geraniol, isomenthone, citronellyl formate and cis- and trans-rose oxide.

KEYWORDS: *Pelargonium graveolens*; Geranium; Essential oil; Citronellol; Geraniol.

1. INTRODUCCIÓN

La especie *Pelargonium graveolens* pertenece a la familia Geraniaceae. Es un arbusto perenne, aproximadamente de 60-90 cm de altura. Sus hojas son altamente aromáticas y con olor intenso y concentrado a rosas. Se cultiva bien en climas tropicales y subtropicales y en una amplia variedad de altitudes [1, 2]. Diversos estudios han mostrado que el aceite de geranio contiene como constituyentes mayoritarios citronelol (19.3-40.2%) y geraniol (6.5-18.4%) [2-4]. Industrialmente es ampliamente utilizado en perfumería y cosmética como sustituto de la esencia de rosas [3]. El aceite presenta propiedades antiespasmolíticas [5] y antioxidantes [6].

En el presente estudio, se analizó la influencia del método de extracción y tiempo de crecimiento de la planta sobre el rendimiento y la composición de los metabolitos secundarios volátiles de la especie *P. graveolens*.

2. CONTENIDO

2.1 Material vegetal

Las hojas de *P. graveolens* fueron recolectadas en dos etapas de crecimiento de la planta (6 meses y 12 meses) de un cultivo experimental ubicado en la Universidad Industrial de Santander (Santander, Colombia). La identificación taxonómica se realizó en Herbario

Fecha de Recepción: 15 Febrero de 2007

Fecha de Aceptación: 12 Marzo de 2007

DEYNY LETICIA MENDIVELSO PÉREZ

Estudiante de Química
Universidad Industrial de Santander

MARTHA CECILIA OLIVARES SANTOYO

Estudiante de Química
Universidad Industrial de Santander

JAIRO RENÉ MARTÍNEZ

Químico, Ph. D.
Profesor Titular
Escuela de Química
Universidad Industrial de Santander

ELENA E. STASHENKO

Química, Ph. D.,
Profesora Titular
Escuela de Química
Universidad Industrial de Santander
Directora CENVAM
elena@tucan.uis.edu.co

Nacional Colombiano (COL, Bogotá). Los pliegos testigo de cada planta quedaron almacenados de la siguiente manera: *Pelargonium graveolens* (Nº COL 517186).

2.2 Extracción

Los aceites esenciales (AEs) se aislaron por MWH, según procedimiento descrito en [7], de hojas frescas (200g) finamente picadas. La extracción se llevó a cabo por un periodo de 60 min (3x20min) empleando un equipo de destilación tipo *Clevenger* con reservorio de destilación *Dean-Stark* y adaptación para calentamiento por radiación de microondas, a través de un horno de microondas convencional LG, modelo MS-1242ZK, con una potencia de salida de 800 Vatios y frecuencia de radiación de 2.5 GHz.

Los extractos fueron obtenidos por SDE, la cual se llevó a cabo en un equipo Likens-Nickerson modificado a microescala [8]. Se utilizaron 10 g de material vegetal finamente picado y diclorometano (grado analítico) como solvente de extracción. El periodo de extracción fue de 90 min.

Los AEs y extractos se secaron con sulfato de sodio anhidro. A una alícuota de cada AE (50 µL) y a los extractos previamente concentrados se adicionó patrón interno (*n*-tetradecano, 1 µL); éstos se aforaron con diclorometano hasta un volumen final de 1 mL, para su posterior análisis cromatográfico.

2.3 Análisis cromatográfico

El análisis se llevó a cabo por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) en un equipo *Agilent Technologies 6890 Plus* (HP, Palo Alto, California, EE.UU), acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5973* (EI, 70 eV). Se utilizaron columnas capilares de sílice fundida, DB-5MS: 5%-fenil-poli(dimetilsiloxano), 60 m x 0.25 mm (d.i.) x 0.25 µm (d.Ø) y DB-WAX: poli(etilenglicol), 60 m x 0.25 mm (d.i.) x 0.25 µm (d.Ø), con programación de temperatura inicial del horno de 45°C (5 min) hasta 250°C (5 min), con rata de calentamiento de 5°C/min. Los índices de retención fueron obtenidos usando datos de GC de una serie homóloga de hidrocarburos alifáticos saturados entre C10 y C25, analizados en la misma columna y bajo las mismas condiciones usadas en el análisis GC para las muestras. La identificación de los compuestos presentes fue realizada por comparación de los espectros de masas con las bases de datos NBS 75K, WILEY 138K, ADAMS 2004 y NIST 2002 y por comparación de los índices de retención de Kováts reportados en la literatura [9].

2.4 Resultados y discusión

Los AEs presentaron color verde oscuro traslúcido y se caracterizaron por un pronunciado olor a rosas y un carácter dulce. El rendimiento del aceite esencial fue de 0.11% (6 meses de crecimiento) y de 0,25% (12 meses de crecimiento). En la Tabla 1. se registran los compuestos mayoritarios presentes en las fracciones volátiles de *P. graveolens* y sus cantidades relativas (%), observándose que predominan los monoterpenos oxigenados, seguido de los sesquiterpenos oxigenados. En los AEs obtenidos en las dos etapas de crecimiento de la planta, 6 y 12 meses, el compuesto presente en mayor cantidad es el citronelol, 17,89% y 15,92%, respectivamente; al igual que en los extractos (21,46% y 19,06%).

| Compuesto | I _R | 6 meses | | 12 meses | |
|-----------------------------|----------------|---------|-------|----------|-------|
| | | MWHD | DES | MWHD | DES |
| linalol | 1101-1103 | 1,16 | 1,51 | 0,74 | 2,90 |
| cis-óxido de rosa | 1113-1114 | 0,99 | 2,02 | 0,81 | 2,27 |
| trans-óxido de rosa | 1130-1132 | 0,54 | 0,97 | 0,42 | 0,97 |
| isomentona | 1174-1176 | 4,54 | 5,26 | 3,92 | 5,45 |
| citronelol | 1233-1236 | 17,89 | 21,46 | 15,92 | 19,06 |
| geraniol | 1254-1260 | 7,42 | 4,87 | 6,91 | 6,60 |
| formiato de citronelilo | 1275-1278 | 9,17 | 10,59 | 8,82 | 8,81 |
| formiato de geraniol | 1299-1301 | 3,91 | 3,15 | 3,34 | 2,39 |
| 3,9-guaiadieno | 1453-1455 | 6,74 | 6,54 | 8,03 | 6,92 |
| germacreno-D | 1494-1495 | 2,82 | 2,15 | 4,04 | 2,88 |
| 2-fenil-etil | 1589-1590 | 3,84 | 4,28 | 4,02 | 4,91 |
| tiglatol | | | | | |
| <E> tiglatol de citronelilo | 1663-1664 | 1,32 | 1,18 | 1,32 | 0,90 |
| tiglatol de geraniol | 1697-1698 | 2,69 | 2,13 | 2,93 | 2,01 |

I_R= índices de retención de Kováts determinados experimentalmente en una columna DB-5MS: 5%-fenil-poli (dimetilsiloxano).

Tabla 1. Composición química de los metabolitos secundarios volátiles obtenidos de *Pelargonium graveolens* obtenidos por diferentes técnicas de extracción y en diferentes etapas de crecimiento de la planta.

3. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las fracciones volátiles obtenidas por las diferentes técnicas de extracción fueron ricas en citronelol el cual es un alcohol terpénico con intenso olor a rosas de gran interés en la industria perfumística y cosmética, además esta presente el geraniol utilizado en la industria química para la síntesis de citronelol, citral, acetato de geraniol y otros compuestos de interés perfumístico.

La composición química relativa de aceites y extractos obtenidos por MWHD y por SDE fue similar en las dos etapas de crecimiento, el SDE fue el método más efectivo para aislar monoterpenos oxigenados, a excepción del geraniol.

La proporción citronelol:geraniol es un parámetro a tener en cuenta para determinar la calidad del AE de geraniol, para los AEs obtenidos a los 6 y 12 meses de crecimiento de la planta fueron (2,4:1) y (2,3:1) respectivamente, por lo cual se podría decir que tiene características similares al producido en China.

4. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander, a CENIVAM y a Colciencias, contrato RC-432-2004, por la infraestructura, equipos, recursos humanos y financieros suministrados. Se agradece al Herbario Nacional la identificación taxonómica de la planta.


5. BIBLIOGRAFÍA


- [1] WEISS, E. A. *Essential Oil Grops*. Cambridge Cab international, 1997, pp. 24-59.
- [2] GUENTHER, E. *The essential Oil Vol IV*, Ed. Van Nostrand, New York, 1953, pp.671-728.
- [3] RANA, V.; JUYAL, J.; and BLÁZQUEZ, A., *Inter. J. Aromather.*, 2002, **12**(4), pp. 216-218.
- [4] GOMES, P.; MATA, V.; and RODRIGUES, A., *J. Supercrit. Fluid.* 2006, doi:10.1016/j.supflu.2006.08.018. Article in press.
- [5] LIS-BALCHIN, M., HART, S. and ROTH, G. *Phytoteraphy Research*, John Wiley & Sons, London 1997, pp. 583-584.
- [6] SUN, W.; XU, Z.; WANG, C.; QU, W. and LIN, C., *J. Chinese Med. Mat.*, 2005, **28**(2), pp. 87-89.
- [7] STASHENKO, E., JARAMILLO, B., MARTÍNEZ, J., *J. Chromatogr. A* 2004, **1025**, pp. 93-103.
- [8] GODEFROOT, M.; SANDRA, P.; and VERZELE, M., *J. Chromatogr. A.*, 1981, **203**, pp. 325-335.
- [9] Adams, R.P. *Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy*. 4th Ed. Allured, Carol Stream, 2007, 804p.

Anexo 2. Resultados análisis de suelos.

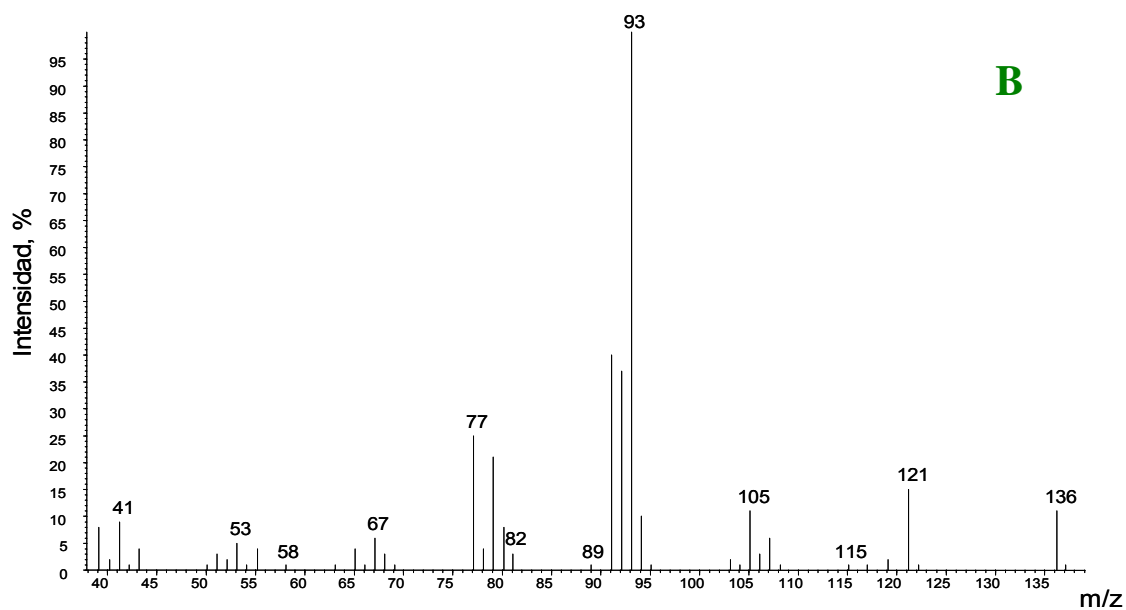
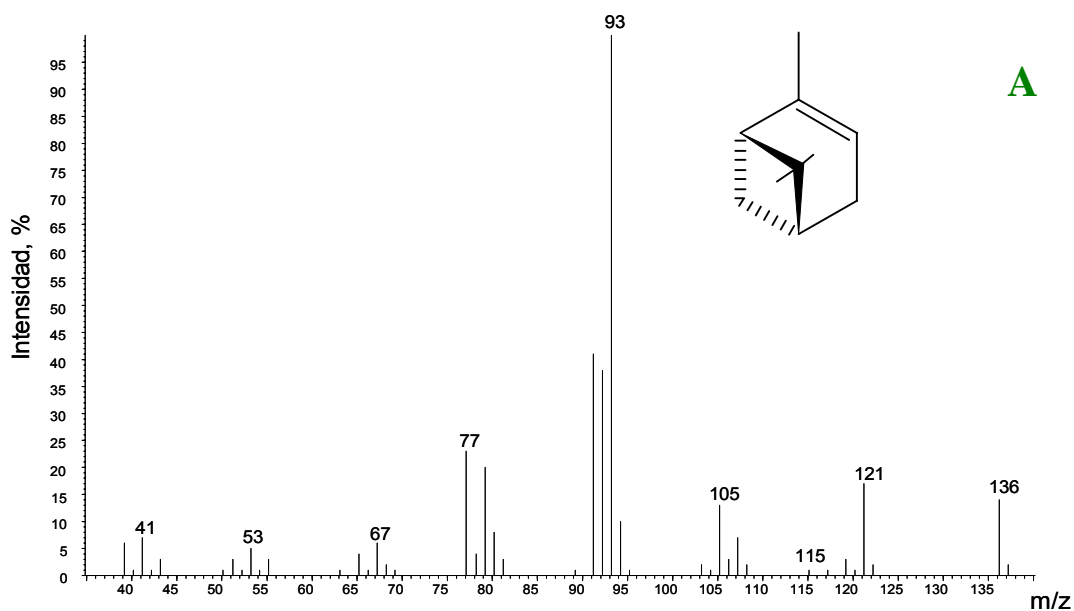
| LABORATORIO QUÍMICO DE SUELOS PROGRAMA DE SUELOS DIRECCIÓN: Carrera 27 Calle 9 Ciudad Universitaria Teléfono: 6344000 Ext. 2499 Bucaramanga - Santander del Sur | | CONVENIO GOBERNACIÓN DE SANTANDER - UIS SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL ESCUELA DE QUÍMICA - UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER Telefax: (7)6324861 - Correo Electrónico: laboratorioquimicosuelos_uis | | | | ANÁLISIS DE SUELOS: UN BENEFICIO MAYOR Y PRIORITARIO PARA EL CAMPO DIA: 9 MES: Marzo AÑO: 2007 | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-----------|--|-----------------|--------------------------------|------|--|------|------------|---------|--------------|-------------|---|-----|------|------|------|------|------|------|--|
| CLIENTE: CENIVAN Bucaramanga - Santander del Sur | | MUNICIPIO: Bucaramanga VEREDA: | | Finca: | | Cultivo: Geranio | | CE | | | | | | | | | | | | |
| DIRECCIÓN: | | TELÉFONOS: | | DEPARTAMENTO: Santander | | AZUFRE X | | CIC | | | | | | | | | | | | |
| TOPOGRAFÍA: Plano | | EXTENSIÓN: | | ANÁLISIS SOLICITADOS | | ELEMENTOS MENORES X | | CE | | | | | | | | | | | | |
| RESULTADO DEL ANÁLISIS DE SUELOS | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| No. Orden | pH Unidad | % C | P (ppm) Bray II | meq/100g suelo | | | | % Arcilla | TEXTURA | CIC meq/100g | CE mmhos/cm | (ppm) | | | | | | | | |
| | | | | Ca | Mg | Na | K | | | | | Al | S | B | Fe | Mn | Cu | Zn | | |
| 2159 | 7.0 | 1.35 | 28 | 10.2 | 1.45 | 0.11 | 0.32 | --- | 60 | 16 | 24 | Frango-ArcilloArenoso | --- | 6.00 | 0.12 | 27.2 | 1.28 | 0.80 | 3.36 | |
| 2160 | 6.4 | 1.67 | 26 | 10.3 | 1.12 | 0.11 | 0.77 | --- | 60 | 20 | 20 | Frango-ArcilloArenoso | --- | 22.2 | 0.26 | 42.4 | 0.92 | 0.28 | 1.20 | |
| 2161 | 7.0 | 1.43 | 31 | 9.93 | 0.87 | 0.07 | 0.47 | --- | 76 | 4 | 20 | Frango-Arenoso | --- | 12.0 | 0.37 | 19.8 | 2.48 | 14.7 | 9.20 | |
| 7 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PARAMETROS | | MÉTODO ANALÍTICO | | | | | | | | | | OBSERVACIONES | | | | | | | | |
| pH: Potencial de Hidrógeno | | Electrométrico: Relación 1:1 Agua destilada | | | | | | | | | | N.D. No detectable a la mínima concentración detectada para el método | | | | | | | | |
| C: Carbono | | Colorimétrico: Walkley Black K2C2O7-H2SO4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| P: Fósforo disponible | | Colorimétrico: Bray II. HCl 0.1 N-NH4F 0.03 N | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ca, Mg, Na, K | | Absorción Atómica: Extracción: Acetato de Amonio | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A: Aluminio intercambiable | | Valoración: Extracción KCi | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| % Textura | | Bouyoucos: Agua destilada | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B: Boro | | Colorimétrico: Extracción Fosfato Monocalcico | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Fe, Mn, Cu, Zn | | Absorción Atómica: Extracción con DTPA | | | | | | | | | | Muestra: 2159 Parcela 6 | | | | | | | | |
| S: Azufre | | Turbidimétrico: Extracción Fosfato Monocalcico | | | | | | | | | | Muestra: 2160 Parcela 47 | | | | | | | | |
| C/C Capacidad Intercambio Cationico | | Electrométrico: Extracción Acetato de Amonio | | | | | | | | | | Muestra: 2161 Parcela 52 | | | | | | | | |
| CE: Conductividad Eléctrica | | Agua destilada | | | | | | | | | | | | | | | | | | |


JAIMÉ CAMARGO HERNÁNDEZ
 Químico
 Mat. Prof. 0047

| | | |
|--|--|---|
|  <p>LABORATORIO QUÍMICO DE SUELOS PROGRAMA DE SUELOS DIRECCIÓN: Carrera 27 Calle 9 Ciudad Universitaria Teléfono: 6344000 Ext. 2499 Bucaramanga – Santander del Sur</p> | <p>CONVENIO GOBERNACIÓN DE SANTANDER – UIS Teléfono: 6324861 ESCUELA DE QUÍMICA – UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER Correo Electrónico: laboratorioquimicodesuelos_uis@yahoo.com</p> | <p>ANÁLISIS DE SUELOS: UN BENEFICIO MAYOR Y PRIORITARIO PARA EL CAMPO</p> |
| <p>CLIENTE: CENIVAN</p> | <p>MUNICIPIO: Bucaramanga VEREDA:</p> | <p>20 Marzo 2007</p> |
| <p>DIRECCIÓN:</p> | <p>DEPARTAMENTO: Santander</p> | <p>Finca: Cultivo: Geranio</p> |
| <p>TOPOGRAFÍA: Plano</p> | <p>EXTENSIÓN:</p> | |
| <p>No. Laboratorio: 2159</p> | | |
| <p>Lote:</p> | | |
| <p>Edad: 6 meses</p> | | |
| <p>Análisis de Resultados: La reacción del suelo es neutra (pH=7,0) El contenido de materia orgánica es medio. El contenido de Nitrógeno total es medio. El nivel de Calcio es alto. El nivel de Hierro, Zinc es adecuado. El nivel de Fósforo, Potasio es medio. El nivel de Magnesio, Azufre, Boro, Manganeseo, Cobre es bajo. El nivel de Sodio es Normal. La textura es adecuada.</p> | | |
| <p>Recomendaciones: APLICAR POR HECTÁREA-AÑO, LOS SIGUIENTES NUTRIENTES. *Nitrógeno: 110 kilos. *FÓSFORO: 50 kilos. *MAGNESIO: 30 kilos. *POTASIO: 50 kilos. *AZUFRE: 32 kilos. *BORO: 1.8 kilos. *MANGANESO: 3.0 kilos. *COBRE: 3.0 kilos. NOTA: La dosis total recomendada, la aplica dividida en dos ó tres aplicaciones durante el año. LOS ABONOS SE APLICAN SOBRE EL SUELO HÚMEDO.</p> | | |
| | | <p><i>Hernan Castellanos</i> Ingeniero Agrónomo U. Nal. T. P. 45050</p> |

| | | |
|--|--|---|
|  <p>LABORATORIO QUÍMICO DE SUELOS PROGRAMA DE SUELOS DIRECCIÓN: Carrera 27 Calle 9 Ciudad Universitaria Teléfono: 6344000 Ext. 2459 Bucaramanga – Santander del Sur</p> | <p>CONVENIO GOBERNACIÓN DE SANTANDER – UIS Teléfono: 6324861 ESCUELA DE QUÍMICA – UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER Correo Electrónico: laboratorioquimicosuelos_uis@yahoo.com</p> | <p>ANÁLISIS DE SUELOS: UN BENEFICIO MAYOR Y PRIORITARIO PARA EL CAMPO</p> |
| <p>CLIENTE: CENIVAN</p> | <p>MUNICIPIO: Bucaramanga</p> | <p>20 Marzo 2007</p> |
| <p>DIRECCIÓN:</p> | <p>VEREDA:</p> | <p>Finca:</p> |
| <p>TOPOGRAFÍA: Plano</p> | <p>DEPARTAMENTO: Santander</p> | <p>Cultivo: Geranio</p> |
| <p>No. Laboratorio: 2160</p> | | |
| <p>Lote:</p> | | |
| <p>Edad: 8 meses</p> | | |
| <p>Análisis de Resultados: La reacción del suelo es ligeramente Ácida (pH=6,4) El contenido de materia orgánica es medio. El contenido de Nitrógeno total es medio. El nivel de Calcio, Potasio, Azufre, Hierro es alto. El nivel de Fósforo es medio. El nivel de Magnesio, Boro, Manganeso, Cobre, Zinc es bajo. El nivel de Sodio es Normal. La textura es adecuada.</p> | | |
| <p>Recomendaciones: APLICAR POR HECTÁREA-AÑO, LOS SIGUIENTES NUTRIENTES: *Nitrógeno: 105 kilos. *FÓSFORO: 50 kilos. *MAGNESIO: 32 kilos. *BORO: 1.7 kilos. *MANGANESO: 3.0 kilos. *COBRE: 3.0 kilos. *ZINC: 3.0 kilos. NOTA: La dosis total recomendada, la aplica dividida en dos ó tres aplicaciones durante el año. LOS</p> | | |
| <p>ABONOS SE APLICAN SOBRE EL SUELO HÚMEDO.</p> | | |
| <p><i>Hernan Castellanos</i> Hernan Castellanos P. Ingeniero Agrónomo U. Nal. T.P. 11090</p> | | <p></p> |

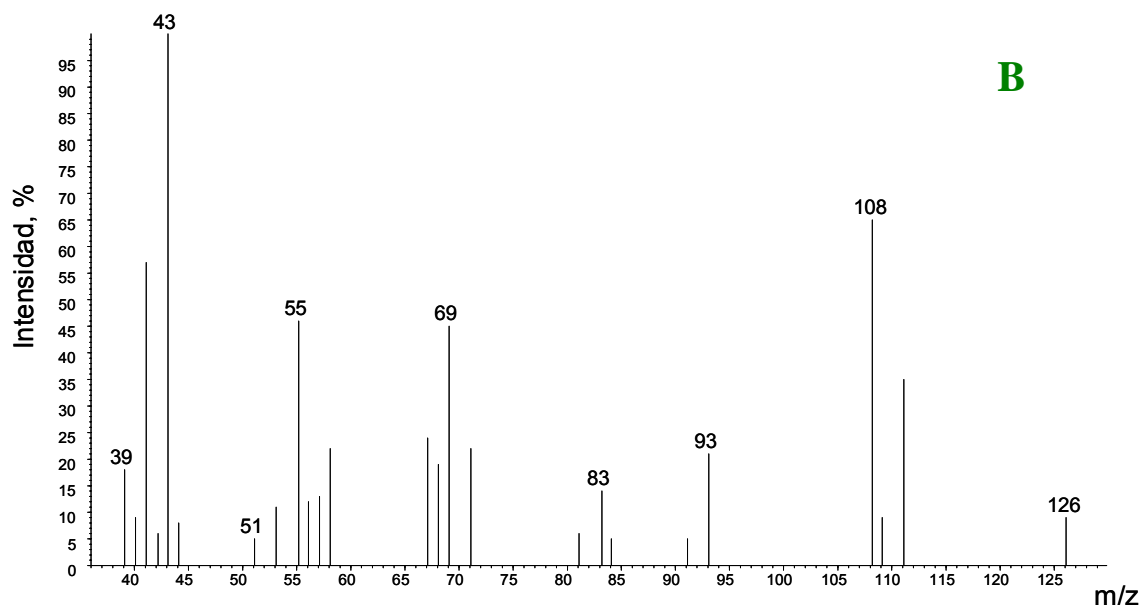
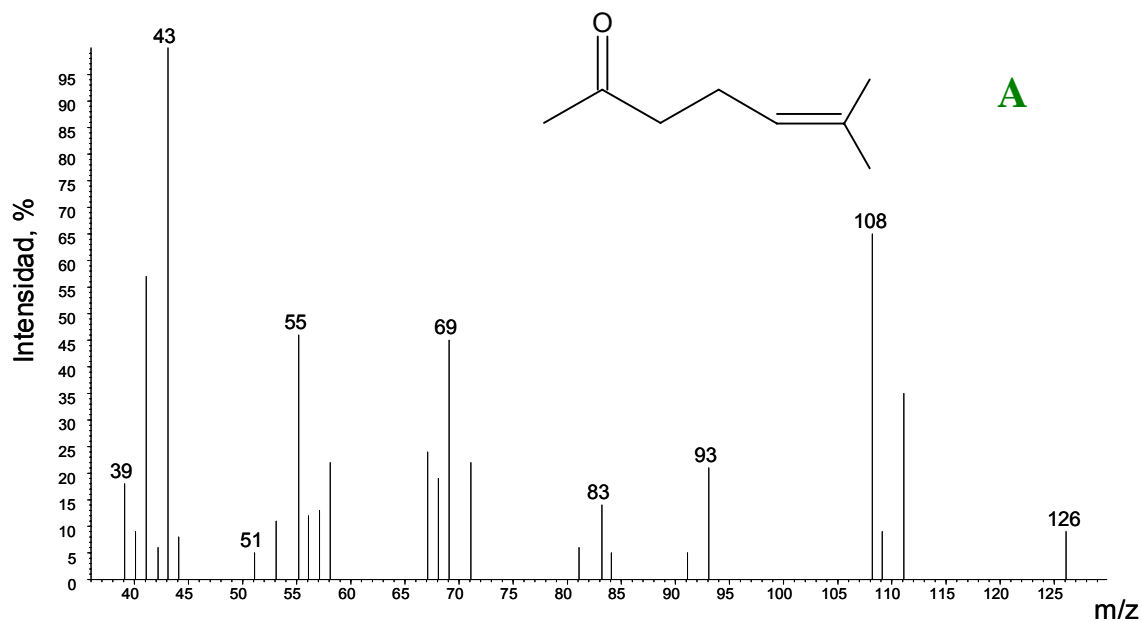
Anexo 3. MS, I_K y t_R de patrones de terpenos certificados.



Anexo 3–Figura 1. Espectro de masas del α -pineno obtenido por EI (70 eV): **A.** Patrón certificado de α -pineno; **B.** MS del α -pineno presente en el AE de *P. graveolens*.

Anexo 3–Tabla 1. Tiempo de retención e índices de Kováts del α -pineno.

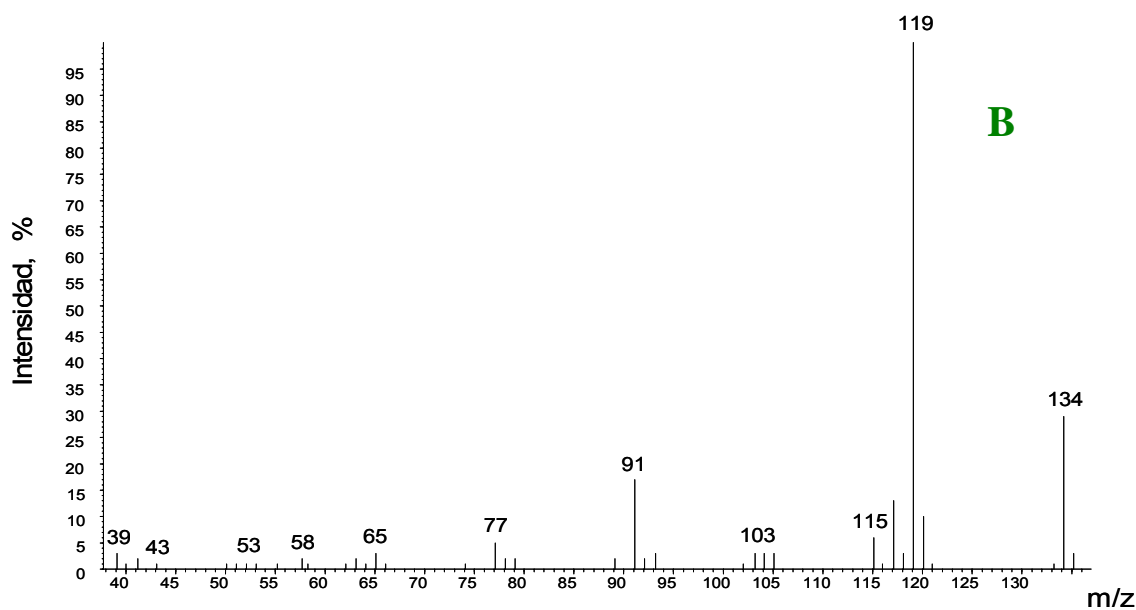
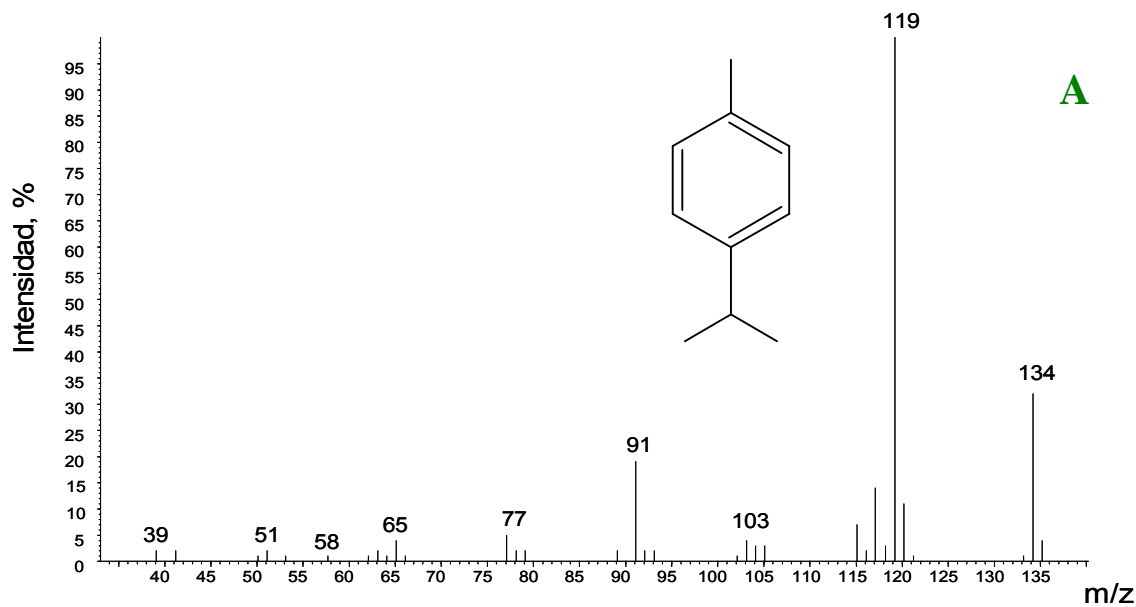
| Compuesto | t_R (DB-5, 60 m) | | I_k (t° program.) | | |
|------------------|--------------------|-----------------|---------------------|--------------------|-----------------|
| | Patrón certificado | Aceite esencial | Literatura [132] | Patrón certificado | Aceite esencial |
| α -Pineno | 17,37 | 17,34 | 939 | 935 | 933 |



Anexo 3–Figura 2. Espectro de masas de la 6-metil-5-hepten-2-ona obtenido por EI (70 eV): **A.** Patrón certificado de la 6-metil-5-hepten-2-ona; **B.** MS de la 6-metil-5-hepten-2-ona presente en el AE de *P. graveolens*.

Anexo 3–Tabla 2. Tiempo de retención e índices de Kovàts de la 6-metil-5-hepten-2-ona.

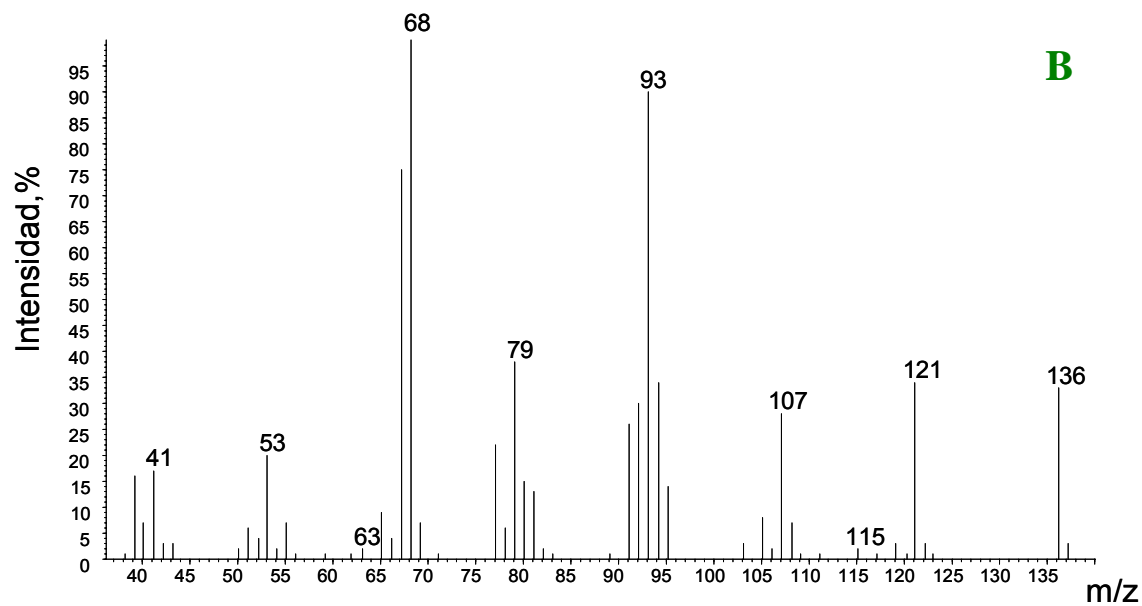
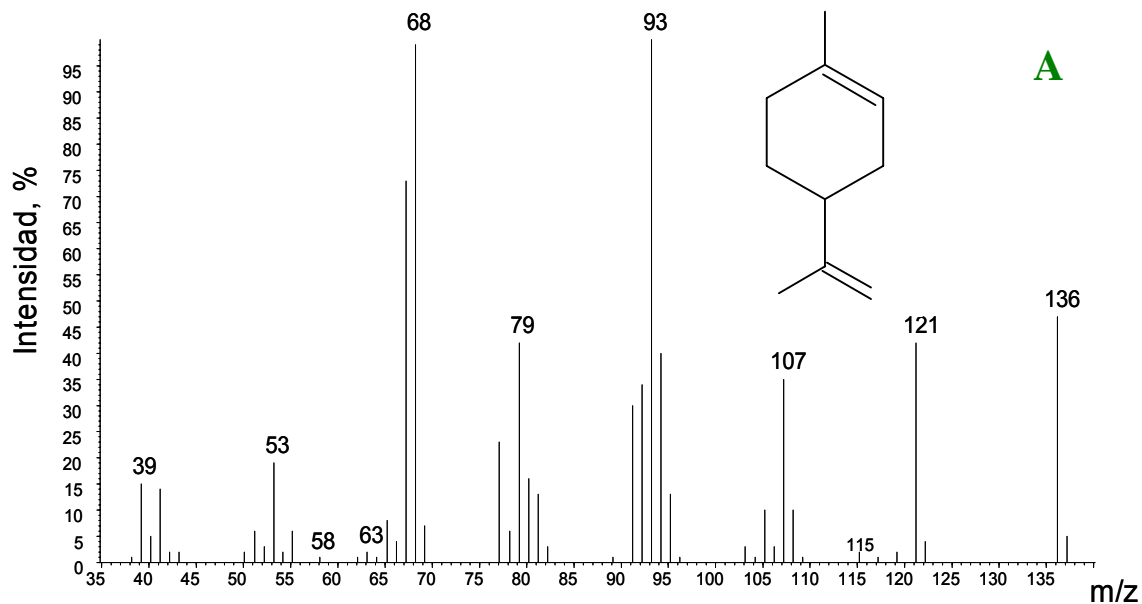
| Compuesto | t_R (DB-5, 60 m) | | I_k (t° program.) | | |
|------------------------|--------------------|-----------------|---------------------|--------------------|-----------------|
| | Patrón certificado | Aceite esencial | Literatura [132] | Patrón certificado | Aceite esencial |
| 6-Metil-5-hepten-2-ona | 19,64 | 19,62 | 986 | 989 | 986 |



Anexo 3–Figura 3. Espectro de masas del *p*-cimeno obtenido por EI (70 eV): **A.** Patrón certificado del *p*-cimeno; **B.** MS del *p*-cimeno presente en el AE de *P. graveolens*.

Anexo 3–Tabla 3. Tiempo de retención e índices de Kovàts del *p*-cimeno.

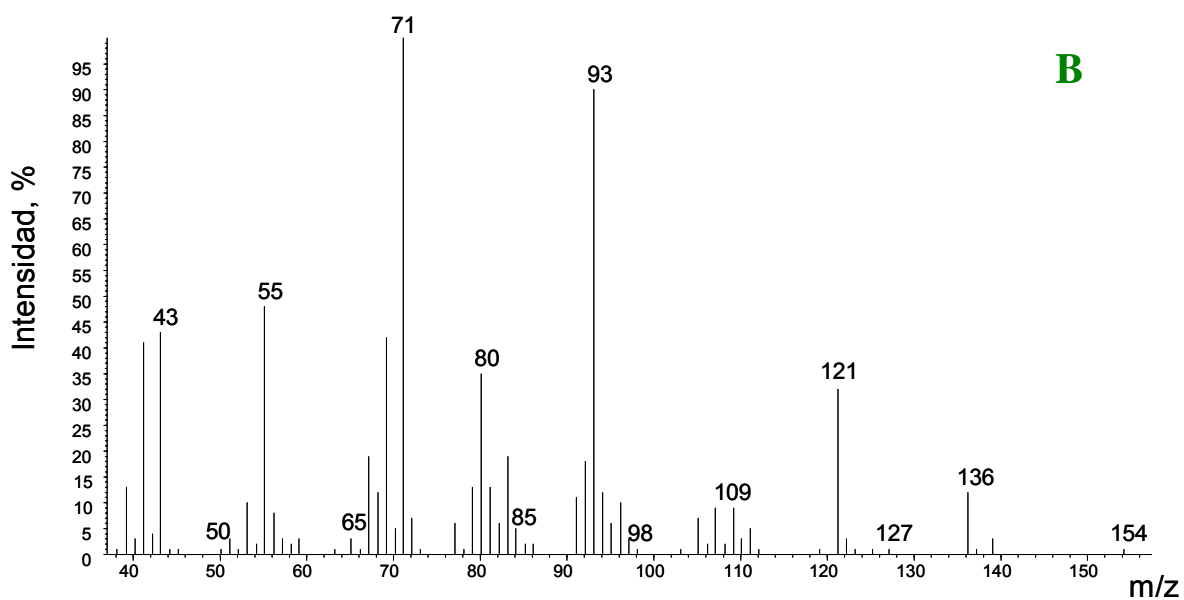
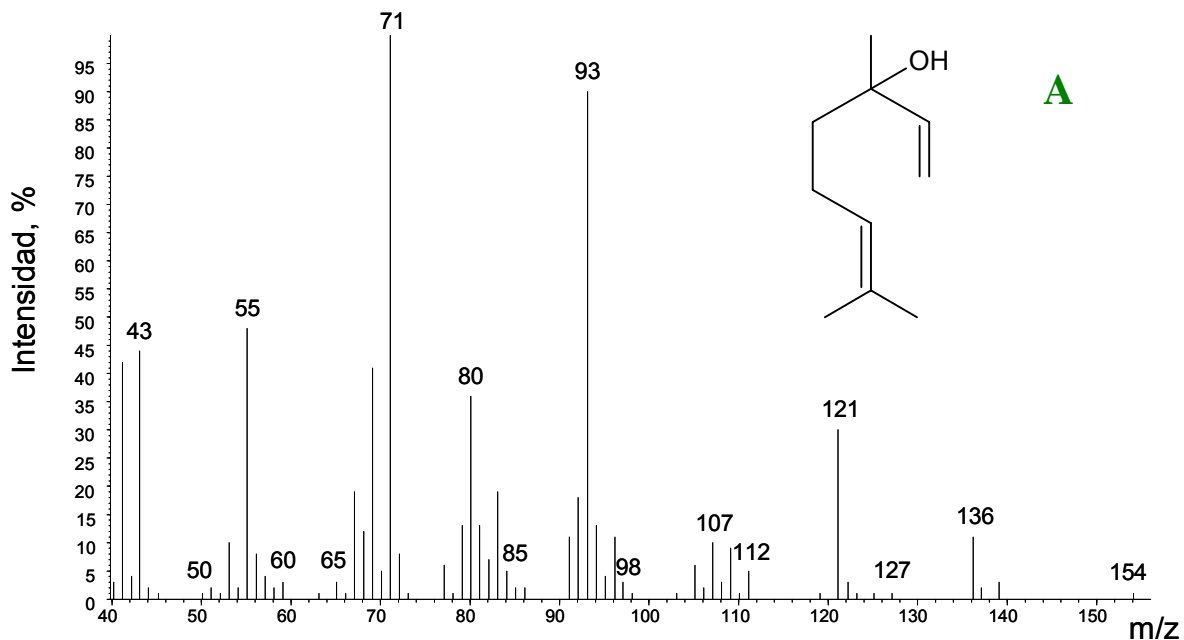
| Compuesto | t_R (DB-5, 60 m) | | I_k (t° program.) | | |
|------------------|--------------------|-----------------|---------------------|--------------------|-----------------|
| | Patrón certificado | Aceite esencial | Literatura [132] | Patrón certificado | Aceite esencial |
| <i>p</i> -Cimeno | 21,46 | 21,43 | 1025 | 1030 | 1029 |



Anexo 3–Figura 4. Espectro de masas del limoneno obtenido por EI (70 eV): **A.** Patrón certificado de limoneno; **B.** MS del limoneno presente en el AE de *P. graveolens*.

Anexo 3–Tabla 4. Tiempo de retención e índices de Kovàts del limoneno.

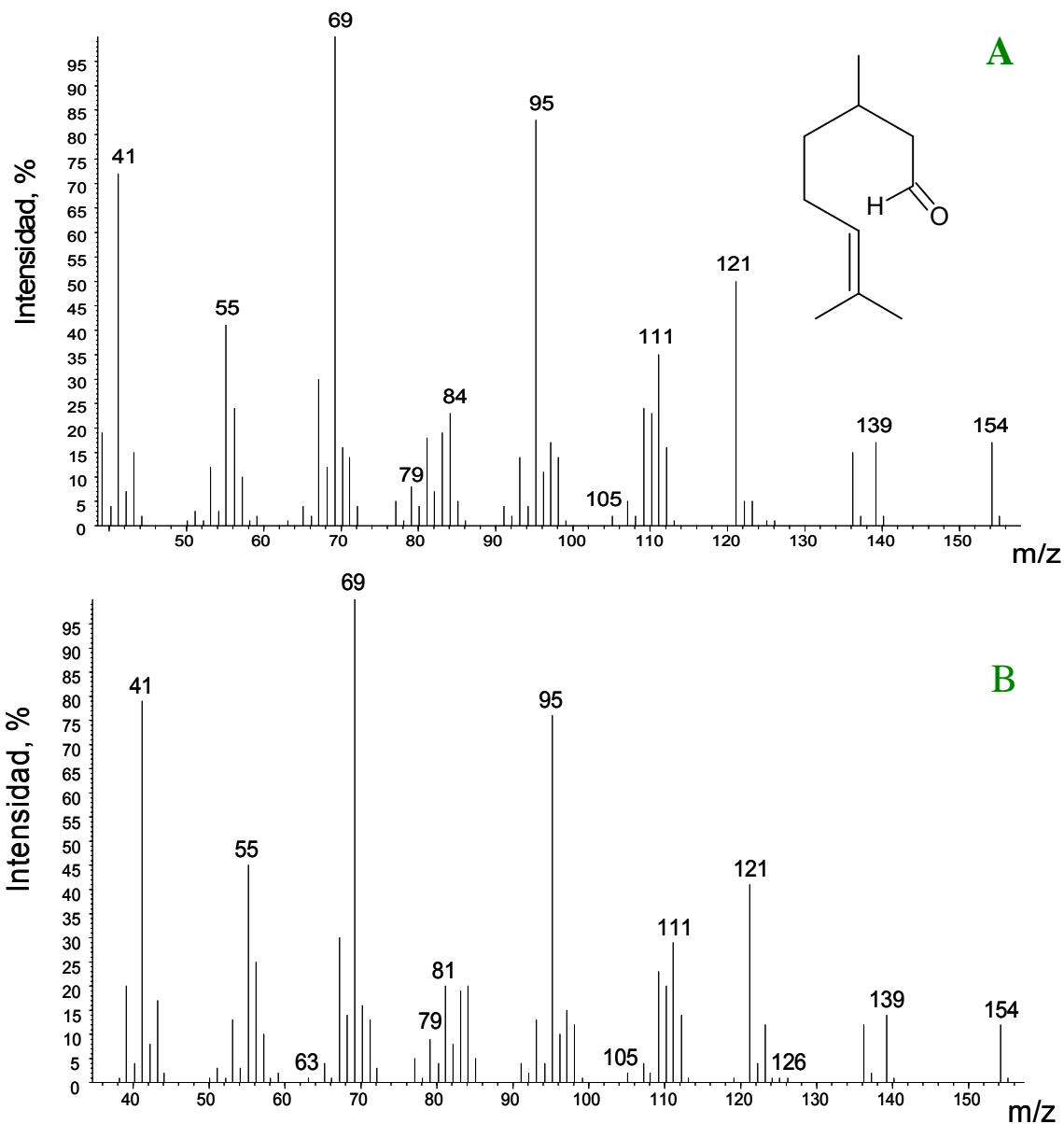
| Compuesto | t_R (DB-5, 60 m) | | I_k (t ^o program.) | | |
|-----------|--------------------|-----------------|---------------------------------|--------------------|-----------------|
| | Patrón certificado | Aceite esencial | Literatura [132] | Patrón certificado | Aceite esencial |
| Limoneno | 21,63 | 21,63 | 1029 | 1034 | 1034 |



Anexo 3–Figura 5. Espectro de masas del linalool obtenido por EI (70 eV):
A. Patrón certificado de linalool; **B.** MS del linalool presente en el AE de *P. graveolens*.

Anexo 3–Tabla 5. Tiempo de retención e índices de Kovàts del linalool.

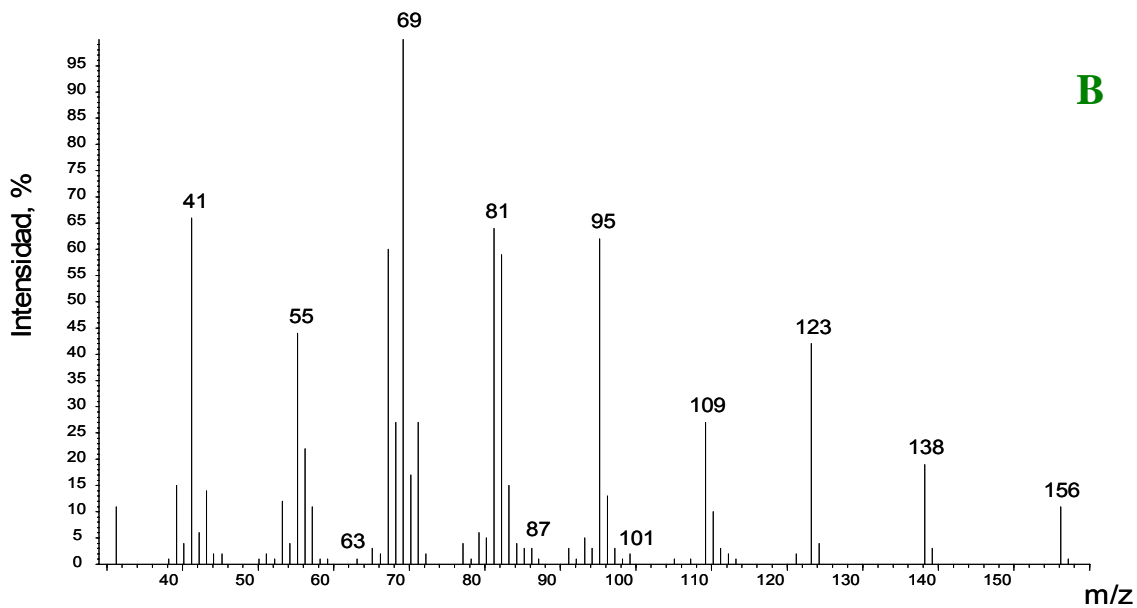
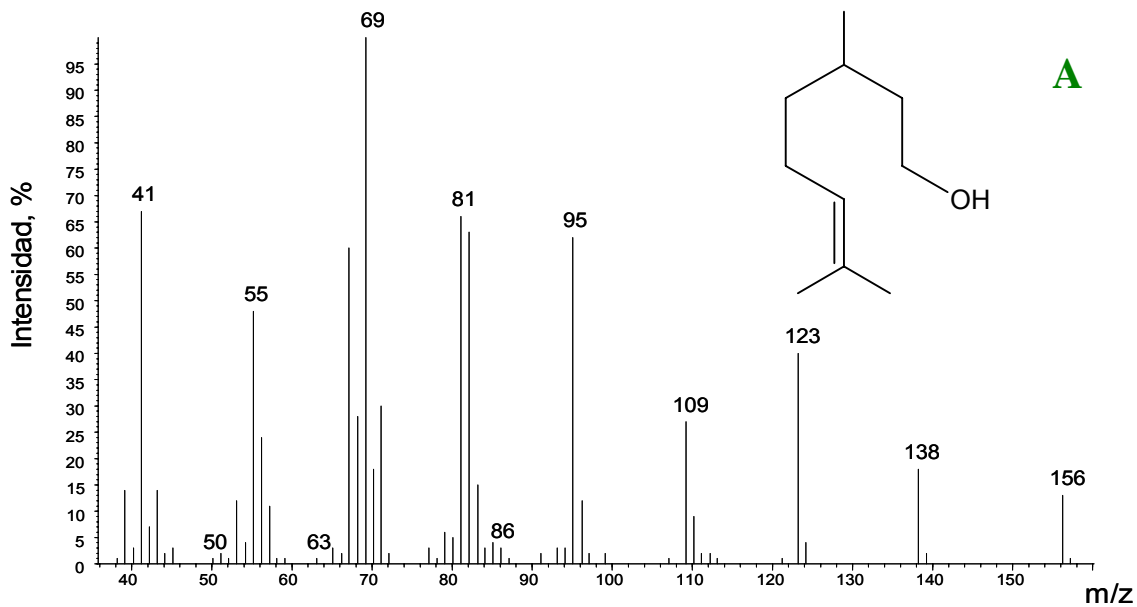
| Compuesto | t_R (DB-5, 60 m) | | I_k (t° program.) | | |
|-----------|--------------------|-----------------|-----------------------------|--------------------|-----------------|
| | Patrón certificado | Aceite esencial | Literatura [132] | Patrón certificado | Aceite esencial |
| Linalool | 24,53 | 24,50 | 1097 | 1103 | 1102 |



Anexo 3–Figura 6. Espectro de masas del citronelal obtenido por EI (70 eV): **A.** Patrón certificado de citronelal; **B.** MS del citronelal presente en el AE de *P. graveolens*.

Anexo 3–Tabla 6. Tiempo de retención e índices de Kovàts del citronelal.

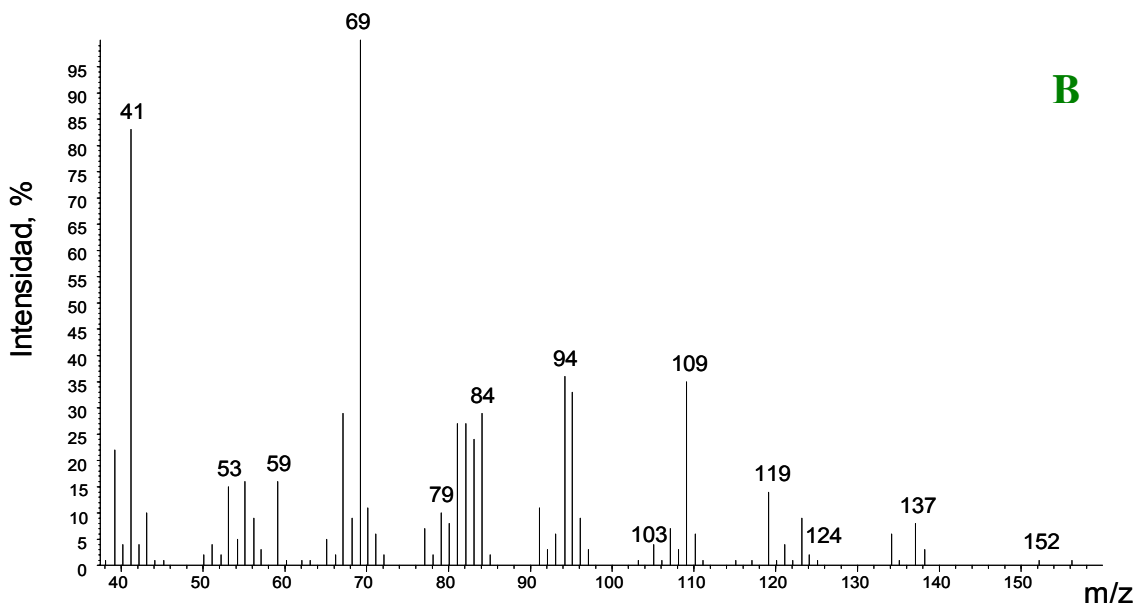
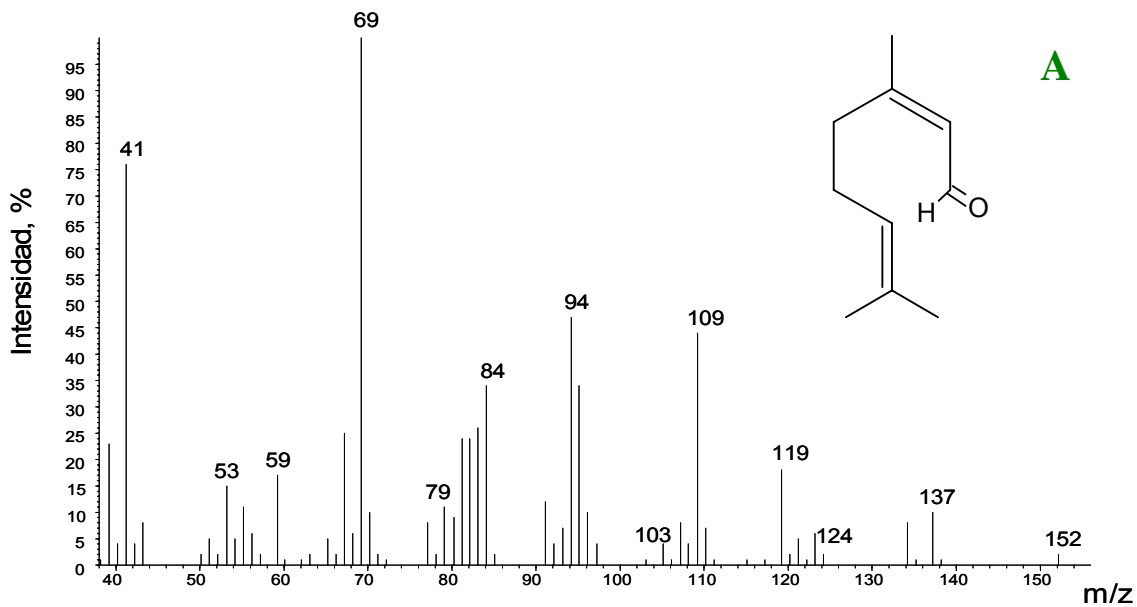
| Compuesto | t_R (DB-5, 60 m) | | I_k (t° program.) | | |
|------------|--------------------|-----------------|-----------------------------|--------------------|-----------------|
| | Patrón certificado | Aceite esencial | Literatura [132] | Patrón certificado | Aceite esencial |
| Citronelal | 26,56 | 26,59 | 1153 | 1154 | 1155 |



Anexo 3–Figura 7. Espectro de masas del citronelol obtenido por EI (70 eV):
A. Patrón certificado de citronelol; **B.** MS del citronelol presente en el AE de *P. graveolens*.

Anexo 3–Tabla 7. Tiempo de retención e índices de Kovàts del citronelol.

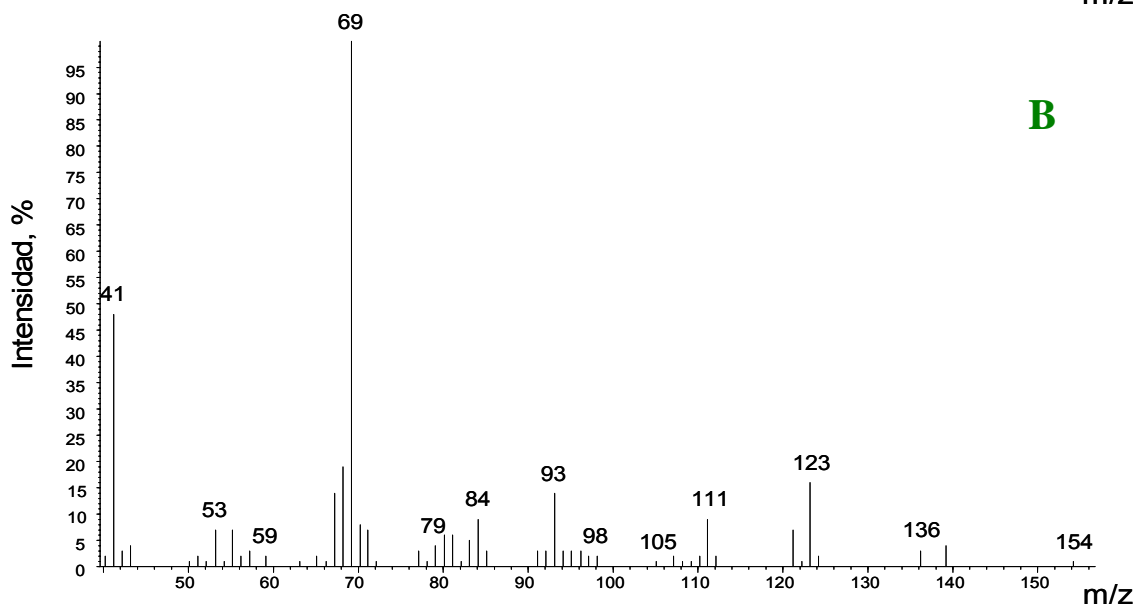
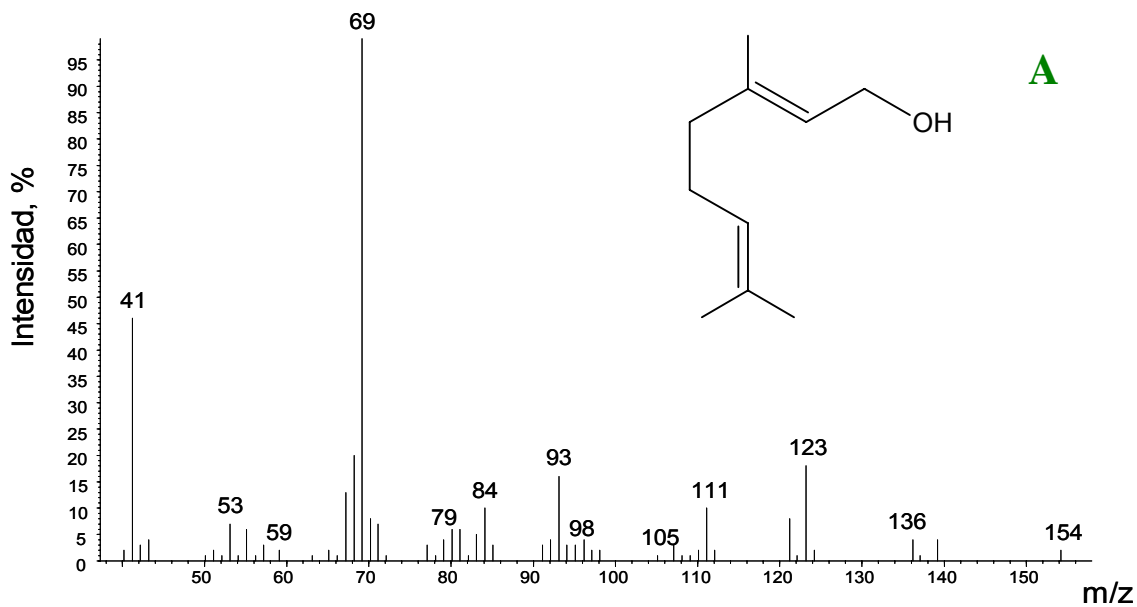
| Compuesto | t_R (DB-5, 60 m) | | I_k (tº program.) | | |
|------------|--------------------|-----------------|---------------------|--------------------|-----------------|
| | Patrón certificado | Aceite esencial | Literatura [132] | Patrón certificado | Aceite esencial |
| Citronelol | 29,56 | 29,64 | 1223 | 1231 | 1235 |



Anexo 3–Figura 8. Espectro de masas del neral obtenido por EI (70 eV): **A.** Patrón certificado de neral; **B.** MS del neral presente en el AE de *P. graveolens*.

Anexo 3–Tabla 8. Tiempo de retención e índices de Kovàts del neral.

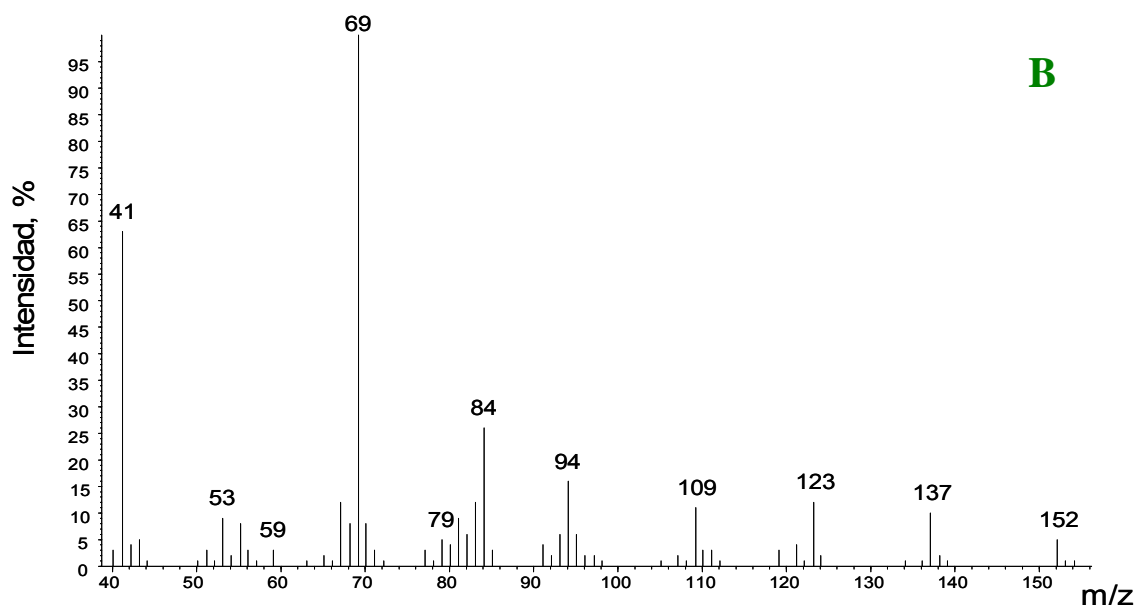
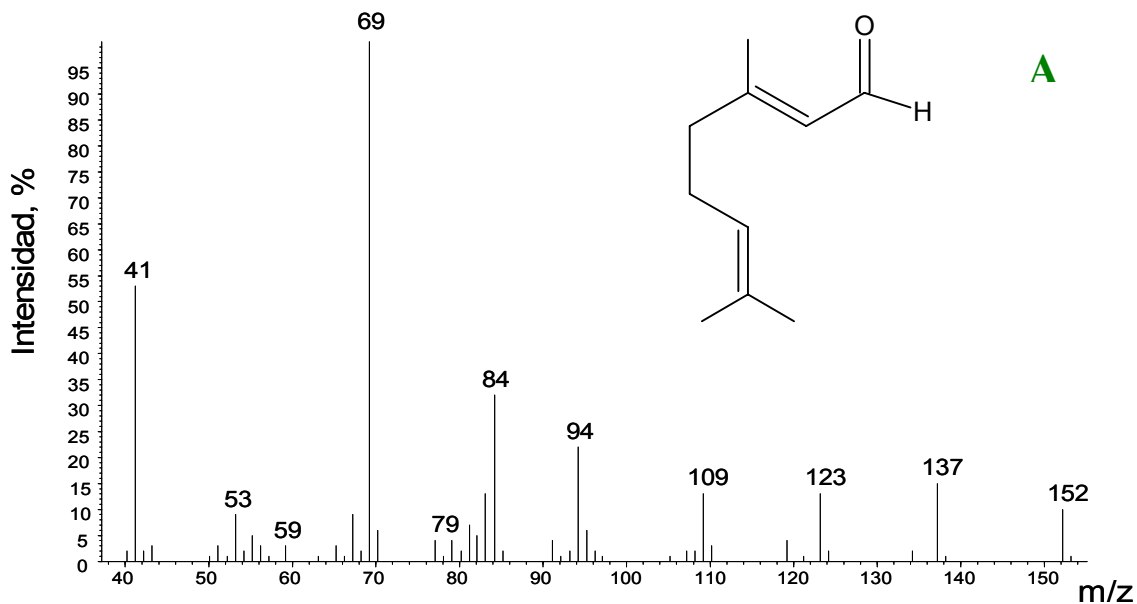
| Compuesto | t_R (DB-5, 60 m) | | I_k (t° program.) | | |
|-----------|--------------------|-----------------|---------------------|--------------------|-----------------|
| | Patrón certificado | Aceite esencial | Literatura [132] | Patrón certificado | Aceite esencial |
| Neral | 29,91 | 29,95 | 1235 | 1241 | 1245 |



Anexo 3–Figura 9. Espectro de masas del geraniol obtenido por EI (70 eV): **A.** Patrón certificado de geraniol; **B.** MS del geraniol presente en el AE de *P. graveolens*.

Anexo 3–Tabla 9. Tiempo de retención e índices de Kovàts del geraniol.

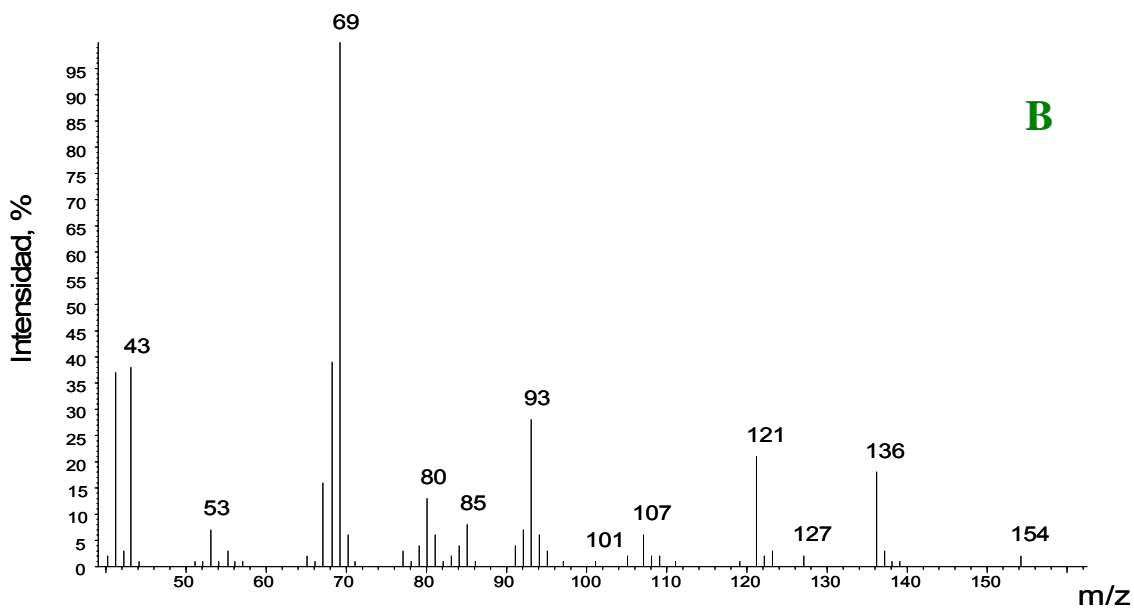
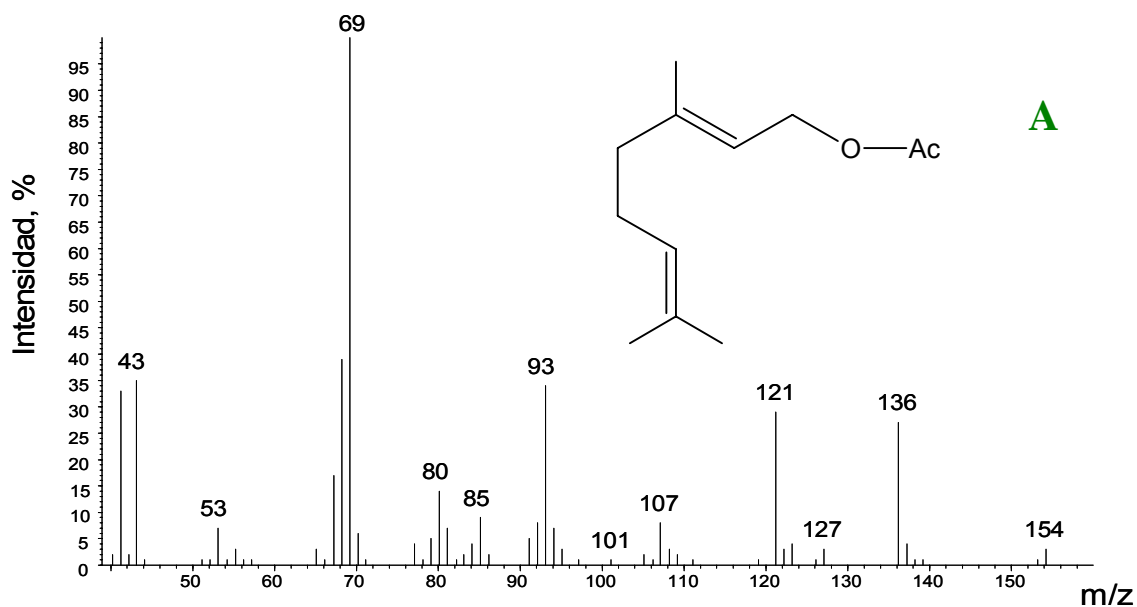
| Compuesto | t_R (DB-5, 60 m) | | I_k (t° program.) | | |
|-----------|--------------------|-----------------|---------------------|--------------------|-----------------|
| | Patrón certificado | Aceite esencial | Literatura [132] | Patrón certificado | Aceite esencial |
| Geraniol | 30,31 | 30,34 | 1253 | 1253 | 1254 |



Anexo 3–Figura 10. Espectro de masas del geranial obtenido por EI (70 eV):
A. Patrón certificado de geranial; **B.** MS del geranial presente en el AE de *P. graveolens*.

Anexo 3–Tabla 10. Tiempo de retención e índices de Kovàts del geranial.

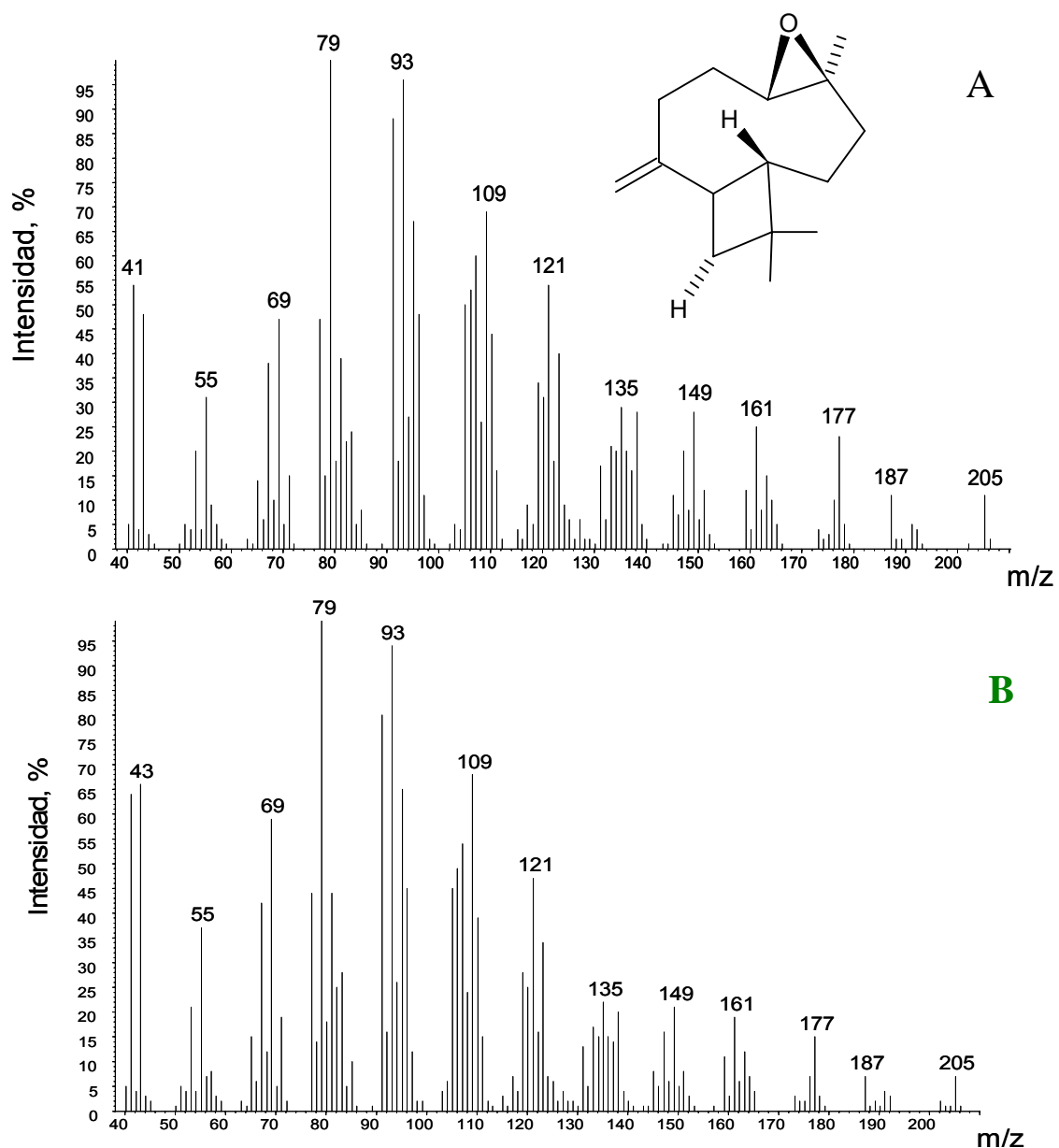
| Compuesto | t_R (DB-5, 60 m) | | I_k (t° program.) | | |
|-----------|--------------------|-----------------|-----------------------------|--------------------|-----------------|
| | Patrón certificado | Aceite esencial | Literatura [132] | Patrón certificado | Aceite esencial |
| Geranial | 30,94 | 30,96 | 1267 | 1270 | 1275 |



Anexo 3–Figura 11. Espectro de masas del acetato de geranilo obtenido por EI (70 eV): **A.** Patrón certificado de acetato de geranilo; **B.** MS del acetato de geranilo presente en el AE de *P. graveolens*.

Anexo 3–Tabla 11. Tiempo de retención e índices de Kovàts del acetato de geranilo.

| Compuesto | t_R (DB-5, 60 m) | | I_k (t° program.) | | |
|---------------------|--------------------|-----------------|---------------------|--------------------|-----------------|
| | Patrón certificado | Aceite esencial | Literatura [132] | Patrón certificado | Aceite esencial |
| Acetato de geranilo | 35,09 | 35,05 | 1381 | 1379 | 1377 |



Anexo 3–Figura 12. Espectro de masas del óxido de cariofileno obtenido por EI (70 eV): **A.** Patrón certificado de óxido de cariofileno; **B.** MS del óxido de cariofileno presente en el AE de *P. graveolens*.

Anexo 3–Tabla 12. Tiempo de retención e índices de Kováts del óxido de cariofileno.

| Compuesto | t_R (DB-5, 60 m) | | I_k (t° program.) | | |
|----------------------|--------------------|-----------------|---------------------|--------------------|-----------------|
| | Patrón certificado | Aceite esencial | Literatura [132] | Patrón certificado | Aceite esencial |
| Óxido de cariofileno | 42,27 | 42,24 | 1583 | 1601 | 1598 |

Anexo 4. Curvas de calibración

Curva de calibración citronelol

=====
 Calibration Table
 =====

Calibración b-Citronelol - Nivel bajo

Calib. Data Modified : 19/10/2007 11:12:46 a.m.

Calculate : Area Percent

Rel. Reference Window : 0.000 %

Abs. Reference Window : 0.080 min

Rel. Non-ref. Window : 0.000 %

Abs. Non-ref. Window : 0.080 min

Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Uncalibrated Peaks : not reported

Partial Calibration : Yes, identified peaks are recalibrated

Correct All Ret. Times: No, only for identified peaks

Curve Type : Linear

Origin : Forced

Weight : Equal

Recalibration Settings:

Average Response : Average all calibrations

Average Retention Time: Floating Average New 75%

Calibration Report Options :

Printout of recalibrations within a sequence:

Calibration Table after Recalibration

Normal Report after Recalibration

If the sequence is done with bracketing:

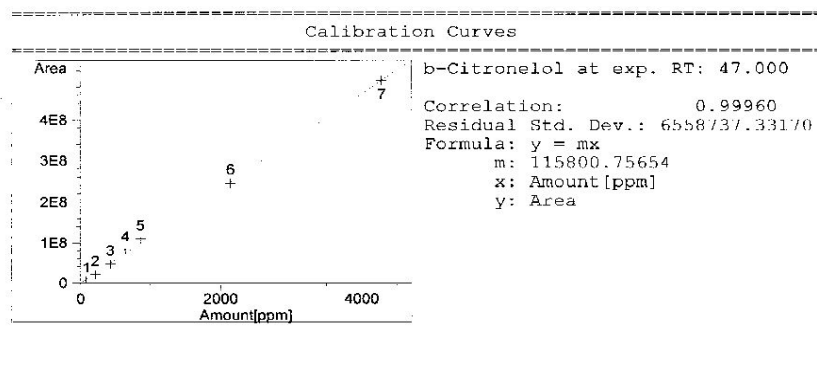
Results of first cycle (ending previous bracket)

Signal 1:

| RetTime [min] | Lvl Sig | Amount [ppm] | Area | Amt/Area | Ref Grp Name |
|------------------|------------|-----------------|-----------|------------|--------------|
| 47.000 | 1 | 1 86.00000 | 5.10216e6 | 1.68556e-5 | b-Citronelol |
| | | 2 214.00000 | 2.14172e7 | 9.99195e-6 | |
| | | 3 429.00000 | 4.75394e7 | 9.02410e-6 | |
| | | 4 643.00000 | 8.30452e7 | 7.74277e-6 | |
| | | 5 857.00000 | 1.10632e8 | 7.74642e-6 | |
| | | 6 2143.00000 | 2.44469e8 | 8.76594e-6 | |
| | | 7 4285.00000 | 4.94966e8 | 8.65716e-6 | |

=====
 Peak Sum Table
 =====

No Entries in table
 =====



=====
 Calibration Table
 =====

Calibración b-Citronelol - Nivel alto

Calib. Data Modified : Friday, 19 19e October 19e 2007 11:37:28 a.m.

Calculate : Area Percent

Rel. Reference Window : 0.000 %
 Abs. Reference Window : 0.080 min
 Rel. Non-ref. Window : 0.000 %
 Abs. Non-ref. Window : 0.080 min
 Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
 Uncalibrated Peaks : not reported
 Partial Calibration : Yes, identified peaks are recalibrated
 Correct All Ret. Times: No, only for identified peaks

Curve Type : Linear
 Origin : Ignored
 Weight : Equal

Recalibration Settings:
 Average Response : Average all calibrations
 Average Retention Time: Floating Average New 75%

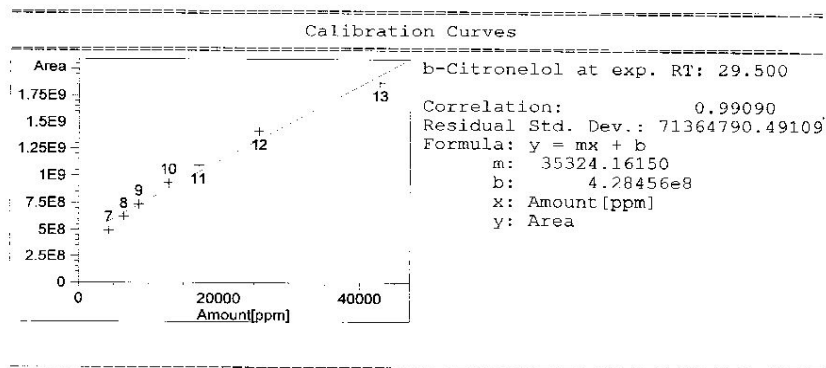
Calibration Report Options :
 Printout of recalibrations within a sequence:
 Calibration Table after Recalibration
 Normal Report after Recalibration
 If the sequence is done with bracketing:
 Results of first cycle (ending previous bracket)

Signal 1:

| RetTime [min] | Lvl Sig | Amount [ppm] | Area | Amt/Area | Ref Grp Name |
|------------------|------------|-----------------|-----------|------------|--------------|
| 29.500 | 1 7 | 4285.00000 | 4.94966e8 | 8.65716e-6 | b-Citronelol |
| | 8 | 6428.00000 | 6.20545e8 | 1.03586e-5 | |
| | 9 | 8570.00000 | 7.36966e8 | 1.16288e-5 | |
| | 10 | 1.28550e4 | 9.32554e8 | 1.37847e-5 | |
| | 11 | 1.71400e4 | 1.09445e9 | 1.56609e-5 | |
| | 12 | 2.57100e4 | 1.41200e9 | 1.82082e-5 | |
| | 13 | 4.28500e4 | 1.87024e9 | 2.29115e-5 | |

=====
 Peak Sum Table
 =====

No Entries in table
 =====



Curva de calibración geraniol

=====
 Calibration Table
 =====

Calibración Geraniol - Nivel bajo

Calib. Data Modified : 11/10/2007 04:48:24 p.m.

Calculate : Area Percent

Rel. Reference Window : 0.000 %
 Abs. Reference Window : 0.080 min
 Rel. Non-ref. Window : 0.000 %
 Abs. Non-ref. Window : 0.080 min
 Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
 Uncalibrated Peaks : not reported
 Partial Calibration : Yes, identified peaks are recalibrated
 Correct All Ret. Times: No, only for identified peaks

Curve Type : Linear
 Origin : Forced
 Weight : Equal

Recalibration Settings:
 Average Response : Average all calibrations
 Average Retention Time: Floating Average New 75%

Calibration Report Options :
 Printout of recalibrations within a sequence:
 Calibration Table after Recalibration
 Normal Report after Recalibration
 If the sequence is done with bracketing:
 Results of first cycle (ending previous bracket)

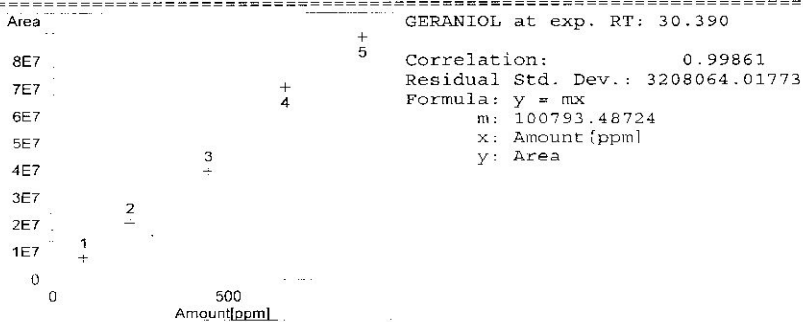
Signal 1:

| RetTime [min] | Lvl Sig | Amount [ppm] | Area | Amt/Area | Ref Grp Name |
|------------------|------------|-----------------|-----------|------------|--------------|
| 30.390 | 1 | 88.00000 | 7.77481e6 | 1.13186e-5 | GERANIOL |
| | 2 | 220.00000 | 2.06420e7 | 1.06579e-5 | |
| | 3 | 440.00000 | 3.97570e7 | 1.10672e-5 | |
| | 4 | 659.00000 | 7.04811e7 | 9.35003e-6 | |
| | 5 | 879.00000 | 8.83468e7 | 9.94942e-6 | |

=====
 Peak Sum Table
 =====

No Entries in table

=====
 Calibration Curves
 =====



Method G:\GERANIOL\GERANIOLALTO.M

=====
Calibration Table
=====

Calibración Geraniol - Nivel alto

Calib. Data Modified : 11/10/2007 04:51:50 p.m.

Calculate : Area Percent

Rel. Reference Window : 0.000 %
Abs. Reference Window : 0.080 min
Rel. Non-ref. Window : 0.000 %
Abs. Non-ref. Window : 0.080 min
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
Uncalibrated Peaks : not reported
Partial Calibration : Yes, identified peaks are recalibrated
Correct All Ret. Times: No, only for identified peaks

Curve Type : Linear
Origin : Ignored
Weight : Equal

Recalibration Settings:
Average Response : Average all calibrations
Average Retention Time: Floating Average New 75%

Calibration Report Options :
Printout of recalibrations within a sequence:
Calibration Table after Recalibration
Normal Report after Recalibration
If the sequence is done with bracketing:
Results of first cycle (ending previous bracket)

Signal 1:

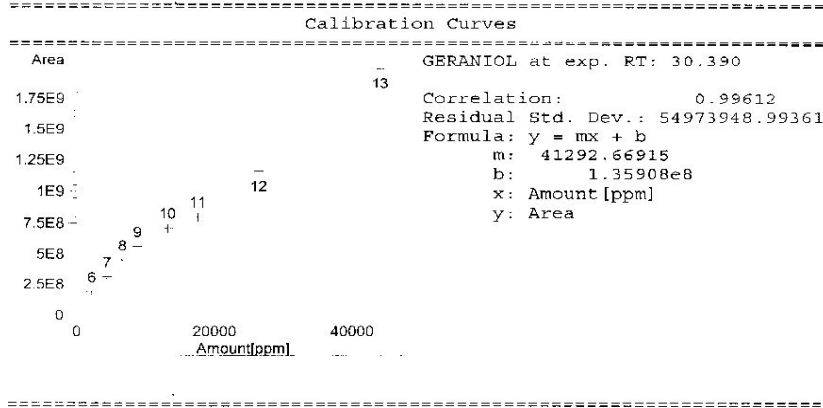
| RetTime [min] | Lvl Sig | Amount [ppm] | Area | Amt/Area | Ref Grp Name |
|------------------|------------|-----------------|-----------|------------|--------------|
| 30.390 | 1 | 6 2198.00000 | 1.88629e8 | 1.16525e-5 | GERANIOL |
| | | 7 4395.00000 | 3.12306e8 | 1.40728e-5 | |
| | | 8 6593.00000 | 4.49604e8 | 1.46640e-5 | |
| | | 9 8790.00000 | 5.62042e8 | 1.56394e-5 | |
| | | 10 1.31850e4 | 7.08642e8 | 1.86060e-5 | |
| | | 11 1.75800e4 | 7.98271e8 | 2.20226e-5 | |
| | | 12 2.63700e4 | 1.15799e9 | 2.27723e-5 | |
| | | 13 4.39500e4 | 1.99130e9 | 2.20710e-5 | |

1 Warnings or Errors :

Warning : Cal. table open and changed while report was generated.

=====
Peak Sum Table
=====

No Entries in table
=====



Anexo 5. Contribución a los factores en el análisis PCA.

Anexo 5-Tabla1. Contribuciones a los componentes principales de las familias de compuestos por grupo funcional presentes en los AEs y extractos aislados por MWHD, SDE y SFE, de *P. graveolens* en diferentes etapas de desarrollo vegetativo.

| Familia de compuestos | Factor 1 | Familia de compuestos | Factor 2 |
|-----------------------|-----------|-----------------------|-----------|
| H | 0,634021 | CS | 0,733495 |
| CS | -0,248801 | ALS | 0,492402 |
| HA | -0,736677 | HA | 0,402600 |
| ETM | -0,767363 | ETS | 0,298139 |
| ADM | -0,815580 | O | 0,291758 |
| ALS | -0,833886 | ESA | 0,026445 |
| HM | -0,878375 | ALM | -0,039886 |
| ETS | -0,888249 | ETM | -0,041433 |
| CM | -0,892637 | H | -0,086195 |
| O | -0,904575 | HS | -0,136753 |
| HS | -0,951426 | ACM | -0,154426 |
| ACM | -0,963167 | ESM | -0,160033 |
| ESM | -0,963813 | HM | -0,253470 |
| ALM | -0,981500 | CM | -0,432504 |
| ESA | -0,986658 | ADM | -0,473804 |

HM: Hidrocarburos monoterpénicos, **HS:** Hidrocarburos sesquiterpénicos, **HA:** Hidrocarburos aromáticos, **H:** Hidrocarburos, **ALM:** Alcoholes monoterpénicos, **ALS:** alcoholes sesquiterpénicos, **ADM:** aldehídos monoterpénicos, **CM:** cetonas monoterpénicas, **CS:** cetonas sesquiterpénicas, **ETM:** Éteres monoterpénicos, **ETS:** Éteres sesquiterpénicos, **ESM:** Ésteres monoterpénicos, **ESA:** Ésteres aromáticos, **ACM:** Ácidos monoterpénicos, **O:** Otros compuestos oxigenados.