

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS  
VOLÁTILES DEL *Cymbopogon martinii* (Palmarrosa) OBTENIDOS POR  
DIFERENTES TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN**

**MARVIN RAFAEL GARCÍA MOLINA**

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

**2010**

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS  
VOLÁTILES DEL *Cymbopogon martinii* (Palmarrosa) OBTENIDOS POR  
DIFERENTES TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN**

**MARVIN RAFAEL GARCÍA MOLINA**

**Trabajo de grado presentado como requisito  
parcial para obtener el título de químico**

**Directores:**

**ELENA STASHENKO, Química, Ph. D.**

**JAIRO RENE MARTÍNEZ, Químico, Ph. D.**

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

**2010**

## **DEDICATORIA**

A Dios, por la salud y sus infinitas bendiciones.

A mis padres, porque sin su infinita paciencia y apoyo, nada de esto habría sido posible.

A mis amigos, Gustavo Celis, José Olivar, Néstor Marín, Freys Julio, Saúl Pinto, porque a pesar del tiempo nuestra amistad sigue intacta.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Elena Stashenko, por todas sus enseñanzas y consejos. Por ayudarme a culminar esta meta y formarme como persona e investigador.

Al Dr. Jairo Martínez, gracias por sus aportes y recomendaciones durante el desarrollo de esta investigación.

A mis padres, gracias por el apoyo incondicional y por todo el cariño brindado, sin ustedes este sueño no se habría realizado.

A mis amigos y compañeros del laboratorio quienes me colaboraron y ayudaron para que este sueño se realizara. En especial a Freys Julio y Néstor Marín por su infinita colaboración

## CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	17
1. ESTADO DEL ARTE	19
1.1. <i>CYMBOPOGON MARTINII</i> (PALMARROSA)	19
1.1.1. Clasificación botánica de <i>Cymbopogon martinii</i>	20
1.1.2. Usos etnobotánicos	20
1.2. CIENCIOMETRÍA	21
1.2.1. Publicaciones por años	21
1.2.2. Publicaciones por países	22
1.2.3. Publicaciones en revistas de investigación	23
1.3. ACEITES ESENCIALES	25
1.3.1. Métodos de extracción	25
1.3.2. Destilación–extracción simultánea con solvente	26
1.3.3. Extracción con fluido supercrítico	27
1.3.4. Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas	28
1.4. ANÁLISIS INSTRUMENTAL	29
1.4.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	29
1.4.2. Cromatografía de gases con detector de ionización en llama	29
2. PARTE EXPERIMENTAL	30
2.1 RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	31
2.2. DETERMINACIÓN DEL MEJOR TIEMPO DE EXTRACCIÓN DEL AE DE <i>CYMBOPOGON MARTINII</i>	31
2.3. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL SECADO SOBRE LA EXTRACCIÓN POR MWH D DEL AE DE TALLOS Y HOJAS DEL <i>CYMBOPOGON MARTINII</i>	32
2.4. OBTENCIÓN POR SDE DEL EXTRACTO DE HOJAS, TALLOS, Y	33

HOJAS CON TALLOS DE <i>CYMBOPOGON MARTINII</i>	
2.5. OBTENCIÓN POR SFE DEL EXTRACTO DE HOJAS CON TALLOS DEL <i>CYMBOPOGON MARTINII</i>	34
2.6. ANÁLISIS INSTRUMENTAL DEL AE DE PALMARROSA POR GC-MS Y GC-FID	35
3. ANÁLISIS DE RESULTADOS	37
3.1. ESTUDIO DEL MEJOR TIEMPO DE EXTRACCIÓN DEL AE DE PALMARROSA	37
3.2. ESTUDIO DEL EFECTO DE SECADO DEL <i>CYMBOPOGON MARTINII</i> SOBRE LA EXTRACCIÓN POR MWHF DEL AE DE TALLOS Y HOJAS	39
3.3. ESTUDIO DE LOS EXTRACTOS DEL <i>CYMBOPOGON MARTINII</i> OBTENIDOS POR SFE DE HOJAS, TALLOS Y DE HOJAS CON TALLOS	46
3.4. ESTUDIO DEL EXTRACTO DEL <i>CYMBOPOGON MARTINII</i> OBTENIDO POR SFE DE HOJAS CON TALLOS	51
3.5. CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES MAYORITARIOS DEL AE DEL <i>CYMBOPOGON MARTINII</i> , UTILIZANDO GC-FID	52
3.6. COMPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AE DE <i>CYMBOPOGON MARTINII</i> CULTIVADA EN COLOMBIA CON LOS AE REPORTADOS EN LA INDIA	54
4. CONCLUSIONES	57
BIBLIOGRAFÍA	58

## LISTADO DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Clasificación botánica de <i>Cymbopogon martinii</i> .	20
<b>Tabla 2.</b> Efecto del tiempo de extracción por MWHD sobre la cantidad aislada de AE de palmarrosa.	37
<b>Tabla 3.</b> Cantidad relativa (%) e identificación de compuestos mayoritarios de los AE de <i>Cymbopogon martinii</i> . Obtenidos por MWHD durante diferentes tiempos de extracción.	39
<b>Tabla 4.</b> Cantidades de aceite extraído por medio de la MWHD.	40
<b>Tabla 5.</b> Determinación de la composición del aceite de <i>Cymbopogon martinii</i> en fresco, utilizando patrón interno ( <i>n</i> -tetradecano; $t_R= 35.2$ min)	41
<b>Tabla 6.</b> Determinación de la composición del aceite de <i>Cymbopogon martinii</i> , 5 días de secado, utilizando patrón interno ( <i>n</i> -tetradecano; $t_R= 35.2$ min)	43
<b>Tabla 7.</b> Determinación de la composición del aceite de <i>Cymbopogon martinii</i> , 10 días de secado, utilizando patrón interno ( <i>n</i> -tetradecano; $t_R= 35.2$ min)	44
<b>Tabla 8.</b> Determinación de la composición del aceite de <i>Cymbopogon martinii</i> , 15 días de secado, utilizando patrón interno ( <i>n</i> -tetradecano; $t_R= 35.2$ min)	45
<b>Tabla 9.</b> Composición del extracto (SDE) de las hojas de <i>Cymbopogon</i>	48

*martinii*, utilizando patrón interno (*n*-tetradecano;  $t_R=35.2$  min)

**Tabla 10.** Composición del extracto (SDE) de los tallos de *Cymbopogon martinii*, utilizando patrón interno (*n*-tetradecano;  $t_R=35.2$  min) 49

**Tabla 11.** Composición del extracto (SDE) de los tallos con hojas del *Cymbopogon martinii*, utilizando patrón interno (*n*-tetradecano;  $t_R=35.2$  min) 50

**Tabla 12.** Comparación por medio de la técnica SDE de los productos mayoritarios del extracto de *Cymbopogon martinii*, de las hojas, de las hojas con tallos y de los tallos. 50

**Tabla 13.** Composición del extracto SFE de los tallos con hojas del *Cymbopogon martinii*, utilizando patrón interno (*n*-tetradecano;  $t_R=35.2$  min) 52

**Tabla 14.** Concentraciones de las soluciones patrón de geraniol y de acetato de geraniol utilizadas en la curva de calibración. 53

**Tabla 15.** Concentraciones del geraniol y del acetato de geraniol presentes en los AE del *Cymbopogon martinii* 53

**Tabla 16.** Comparación del AE de *Cymbopogon martinii* de Colombia contra lo reportado en el artículo de Rao Rajeswara, en su investigación en el año 2001. 55

## LISTADO DE FIGURAS

	<b>pág.</b>
<b>Figura 1.</b> <i>Cymbopogon martinii</i> . Planta cultivada en el Complejo Agroindustrial Piloto, CENIVAM, UIS, Bucaramanga.	<b>19</b>
<b>Figura 2.</b> Número de publicaciones sobre el género <i>Cymbopogon</i> según los años (2000-2010).	<b>21</b>
<b>Figura 3.</b> Número de publicaciones sobre la especie <i>Cymbopogon martinii</i> según los años (2000-2010).	<b>22</b>
<b>Figura 4.</b> Numero de publicaciones sobre el genero <i>Cymbopogon</i> , por países.	<b>22</b>
<b>Figura 5.</b> Número de publicaciones sobre la especie <i>Cymbopogon martinii</i> , por países.	<b>23</b>
<b>Figura 6.</b> Comparación de áreas de investigación sobre el género <i>Cymbopogon</i> .	<b>23</b>
<b>Figura 7.</b> Comparación de áreas de investigación sobre la especie <i>Cymbopogon martinii</i> .	<b>24</b>
<b>Figura 8.</b> Aparato utilizado para la destilación-extracción simultánea con solventes.	<b>26</b>
<b>Figura 9.</b> Aparato utilizado para la extracción de palmarrosa, con fluido supercrítico.	<b>27</b>

- Figura 10.** Equipo utilizado para la hidrodestilación asistida por la radiación de microondas. **28**
- Figura 11.** Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Plus series GC System* acoplado a un detector selectivo de masas (*MSD Agilent Technologies 5973 Network*) y un inyector automático *Agilent Technologies 7683 Series*, utilizados en el presente estudio. **29**
- Figura 12.** Perfiles cromatográficos, obtenidos por GC-MS del aceite de *Cymbopogon Martinii* .Aislados por ....!HD a diferentes tiempos de extracción. A. 30 min. B. 40 min. C. 50 min. Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30, *MSD* (EI, 70 eV). **38**
- Figura 13.** Perfil cromatográficos del aceite obtenido por MWHD de material fresco de *Cymbopogon martinii*. Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30, *MSD* (EI, 70 eV). **40**
- Figura 14.** Gráfica de la tendencia que tiene el secado del *Cymbopogon martinii* a través del tiempo (15 días). **42**
- Figura 15.** Perfil cromatográfico del aceite obtenido por MWHD, después de 5 días de secado de *Cymbopogon martinii*. Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30, *MSD* (EI, 70 eV). **42**
- Figura 16.** Perfil cromatográfico del aceite obtenido por MWHD, después de 10 días de secado de *Cymbopogon martinii*. Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30, *MSD* (EI, 70 eV). **44**
- Figura 17.** Perfil cromatográfico del aceite obtenido por MWHD, después de 15 días de secado de *Cymbopogon martinii*. Columna DB-5 (60 m), *split* **45**

1:30, MSD (EI, 70 eV).

**Figura 18.** Gráfica de la tendencia del efecto de secado de la extracción del AE de *Cymbopogon martinii* para sus compuestos mayoritarios. **46**

**Figura 19.** Perfil cromatográfico del extracto de las hojas de *Cymbopogon martinii* utilizando como método de extracción SDE. Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV). **47**

**Figura 20.** Perfil cromatográfico del extracto de los tallos de *Cymbopogon martinii* utilizando como método de extracción SDE. Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV). **48**

**Figura 21.** Perfil cromatográfico del extracto de las hojas con tallos de *Cymbopogon martinii*, utilizando como método de extracción SDE. Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV). **49**

**Figura 22.** Perfil cromatográfico del extracto de las hojas con tallos de *Cymbopogon martinii*, utilizando como método de extracción SFE. Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV). **51**

**Figura 23.** Curva de calibración del geraniol (A), y del acetato de geraniol (B). **54**

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AE	Aceite esencial
SDE	Destilación-extracción simultanea con solventes
HD	Hidrodestilación
MWHD	Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas
SFE	Extracción con fluido supercrítico
GC/MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
MV	Material vegetal
CENIVAM:	Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales
$t_R$	Tiempo de retención, min
$I_R$	Índices de retención lineal
Istd	Estándar interno

## RESUMEN

### TITULO: ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES DEL *Cymbopogon martinii* (Palmarrosa) OBTENIDOS POR DIFERENTES TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN

**Autor: MARVIN RAFAEL GARCÍA MOLINA**

**Palabras claves: palmarrosa; MWHD; SDE; SFE; aceite esencial**

---

La especie *Cymbopogon martinii*, familia *poacea* o *graminea*, es un hierba nativa de la India, conocido por su agradable olor a rosas. Además de sus usos etnobotánicos como un efectivo repelente de insectos, acaricida, antimicrobiana entre otros, su aceite esencial es muy utilizado en las tabacaleras para mejorar su sabor

En la presente investigación se realizó el estudio de los metabolitos secundarios volátiles y semivolátiles presentes en hojas y tallos de la planta *Cymbopogon martinii* (palmarrosa) cultivada en Santander. La obtención de los metabolitos secundarios se realizó usando diferentes técnicas de extracción: hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD), extracción con fluido supercrítico (SFE), y destilación-extracción simultánea con solvente (SDE). La composición química de los extractos y aceites fue establecida por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

Se determinaron (GC-MS) entre 15-16 compuestos volátiles y semivolátiles en concentraciones por encima de 1 ppm de AE y extractos de hojas y tallos de *C. martinii*. Los principales constituyentes de los AE y extractos, fueron: geraniol, acetato de geraniol y linalool. La composición química (geraniol 61-71%, acetato de geraniol 12-13%) y los rendimientos de extracción (0.97-1.02) de los aceites esenciales (AE) de hojas y tallos de *C. martinii* no presentaron variaciones significativas en función del tiempo de secado. La cantidad de geraniol (17000 ppm) extraído por SDE, fue mayor en las hojas que en los tallos. La composición química de los extractos aislados por SFE, se caracterizó por presentar diferentes hidrocarburos no detectados por las otras técnicas extracción (SDE y MWHD); siendo sin embargo el geraniol el compuesto mayoritario.

---

\*Proyecto de grado

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

## ABSTRACT

**TITLE: STUDY COMPARATIVE OF THE VOLATILE SECONDARY METABOLITES OF THE *Cymbopogon martinii* (Palmarrosa) OBTAINED FOR DIFFERENT EXTRACTION TECHNIQUES**

**Author: MARVIN RAFAEL GARCÍA MOLINA**

**Key words: palmarrosa; MWHD; SDE; SFE; essential oil**

---

The *Cymbopogon martinii* specie, poaceae or gramineae family, is a grass native of the India, Known by his agreeable aroma to roses. It is used in ethnobotany like an effective insect repellent, acaricides, antimicrobial, among others.

Volatile and semi-volatile secondary metabolites, present in *Cymbopogon martini* leaves and stems, cultivated in Santander, were studied. Secondary metabolites were isolated by means of different extraction techniques: microwave assisted hydrodistillation (MWHD), supercritical fluid extraction (SFE), and simultaneous distillation-extraction (SDE). The chemical composition of the extracts and oils was established by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS).

15-16 Volatile and semi-volatile compounds were determined (GC-MS) at concentrations above 1 ppm in essential oil (EO) and extracts of *C. martini* leaves and stem. The main (EO) and extract constituents were: geraniol, geranyl acetate and linalool. The chemical composition (geraniol 61-71%, geranyl acetate 12-13%) and extraction yields (0.97-1.02) of *C. martinii* leaves and stems EO didn't show significant variations with drying time. The amount of geraniol (17000 ppm) extracted by SDE was higher in leaves than in stems. The chemical composition of SFE extracts was dominated by geraniol, which was accompanied by hydrocarbons different from those isolated with the other extraction techniques such as (SDE and MWHD).

---

\*Degree project

\*\*Universidad Industrial de Santander, Sciences Faculty, Chemistry Department,

Directors Elena E. Stashenko y Jairo R. Martínez

## INTRODUCCIÓN

Colombia presenta una abundancia de flora nativa y cada año que pasa se introducen nuevas especies nativas de otros países, lo cual hace al país potencialmente interesante en el creciente mercado de los aceites esenciales.

Actualmente el mercado de los aceites esenciales está en constante crecimiento por lo que es necesario el estudio de nuevas especies de plantas aromáticas; En el mundo se producen cerca de 110000 toneladas métricas de aceites esenciales, cuyo precio es de 1300 millones de dólares anuales [1].

De las plantas aromáticas se pueden obtener aceites esenciales (AE), los cuales son una mezcla de componentes volátiles producto del metabolismo secundario de estas plantas, que les confieren características odoríficas; éstos se han utilizado desde la antigüedad para tratar enfermedades, para la adoración a dioses, en procesos de momificación y en productos de belleza, debido a que los aceites poseen muchas propiedades beneficiosas; cada aceite tiene una identidad, un aroma y unas características propias. En consecuencia, los AE han alcanzado un papel importante hoy en día, siendo utilizados como materias primas para perfumes, licores, bebidas, etc [2].

Para analizar los metabolitos secundarios de palmarrosa se utilizaron varias técnicas de extracción, seguidas de un análisis cromatográfico, de modo que se pudo hacer comparación de los diferentes métodos de extracción. Las siguientes fueron las técnicas de aislamiento que se usaron en este trabajo:

Destilación-extracción simultánea con solventes (SDE), hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHHD) y extracción con fluido supercrítico (SFE).

Una vez obtenido y analizado el AE del *Cymbopogon martinii*, se hicieron comparaciones de los metabolitos secundarios encontrados con los que han sido reportado por varios autores de la India [3-5].

Con el desarrollo de este proyecto se obtuvo información útil para incentivar la agroindustria de esta planta en Colombia, y así suplir la demanda interna del AE de palmarrosa generando una alternativa agrícola.

Esta investigación pretende dar conocimiento hacia nuevas fuentes de empleo para el campo, presentándose como opción para la sustitución de cultivos ilícitos y cambios en las políticas de monocultivo.

Además ofrecer a nivel internacional un AE de palmarrosa con factibilidad económica.

## 1. ESTADO DEL ARTE

### 1.1 CYMBOPOGON MARTINII (PALMARROSA)

La India es el principal productor y exportador del AE de palmarrosa y su producción es de 40-60 toneladas al año; la palmarrosa tiene un alto contenido de geraniol (65-85%). Por este motivo, el aceite de palmarrosa se utiliza principalmente en la perfumería y en cosméticos, entre otros muchos usos [3, 6, 7].

El *Cymbopogon martinii* (**Figura 1**) es una especie vegetal originaria de la India; crece en áreas tropicales, se cultiva, por ejemplo, en la granja experimental del Instituto Central de Medicina y Plantas Aromáticas en Bangalore [*Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Bangalore (India)*], que tiene una altitud de 920 m sobre el nivel del mar, similar a la de Bucaramanga.



**Figura 1.** *Cymbopogon martinii*. Planta cultivada en el Complejo Agroindustrial Piloto, CENIVAM, UIS, Bucaramanga.

### 1.1.1 Clasificación botánica de *Cymbopogon martinii*

En la **Tabla 1** aparece la clasificación botánica de la planta bajo estudio.

**Tabla1.** Clasificación botánica de *Cymbopogon martinii*.

---

Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Viridaeplantae</i>
División	<i>Angiospermas</i>
Clase	<i>Liliopsida</i>
Subclase	<i>Commelinidae</i>
Superorden	<i>Poanae</i>
Orden	<i>Poales</i>
Familia	<i>Poaceae</i>
Género	<i>Cymbopogon</i>
Especie	<i>martinii</i>

---

Los siguientes son los principales metabolitos secundarios volátiles presentes en el aceite esencial (AE) del *Cymbopogon martinii*: el geraniol (aproximadamente 65-80%), seguido del acetato de geraniol (aproximadamente 5-20%) y otros compuestos en menor proporción (<3%), entre los cuales figuran mirceno, linalool, limoneno, farnesol, etc [3, 4, 6-9].

### 1.1.2 Usos etnobotánicos

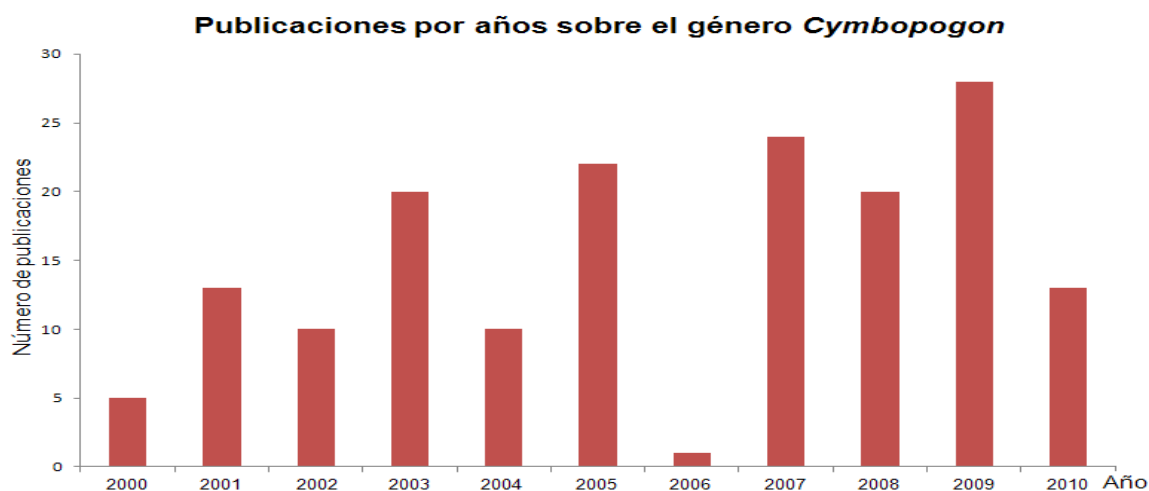
El AE de palmarrosa se utiliza como repelente de insectos y entre algunos de sus usos cosméticos figuran los siguientes: Ayuda al fortalecimiento del cabello, revitaliza las manos, las uñas, vigoriza la piel madura y arrugada [5, 10-14].

## 1.2 CIENCIOMETRÍA

La cienciometría es una herramienta que permite cuantificar la actividad científica y además permite situar a un país, a una institución o a un área temática mundial en determinado campo de actividad científica. El estudio cienciométrico cuantifica a la ciencia como una disciplina o actividad económica. El objeto de estudiar y analizar las investigaciones actuales sobre el *Cymbopogon martinii* es para ver si los estudios realizados sirven para aumentar el conocimiento en el tema de los aceites esenciales. Para realizar el estudio cienciométrico se utilizó como instrumento de información la *Web of Science (ISI Web of Knowledge)*.

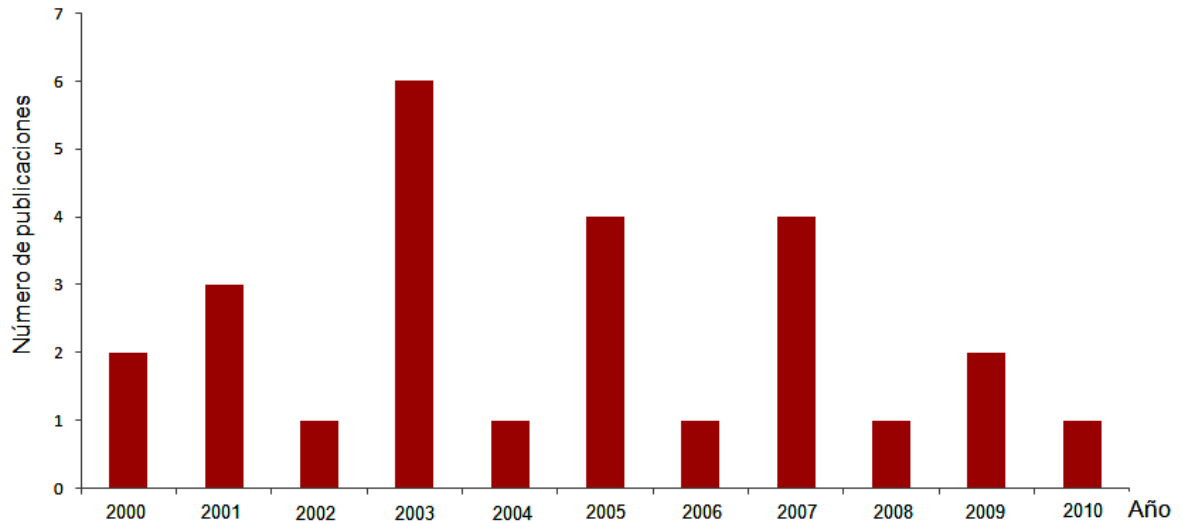
### 1.2.1 Publicaciones por años

En las **Figuras 2 y 3** se hacen las comparaciones entre los años en que se han realizado publicaciones sobre el género de *Cymbopogon* y la especie *Cymbopogon martinii*. Estas figuras revelan que las publicaciones (2000-2010) sobre el género *Cymbopogon* han fluctuado pero han tenido una tendencia al aumento, aunque no constante; en cambio, con respecto a las publicaciones sobre el *Cymbopogon martinii* no se observa una tendencia clara.



**Figura 2.** Número de publicaciones sobre el género *Cymbopogon*, según los años (2000-2010). Fuente: *ISI Web of Science*. Fecha de consulta: 15/07/2010. Ecuación de búsqueda: t= (essential oil\*) refined by: t= (*Cymbopogon*).

### Publicaciones por años sobre la especie *Cymbopogon martinii*

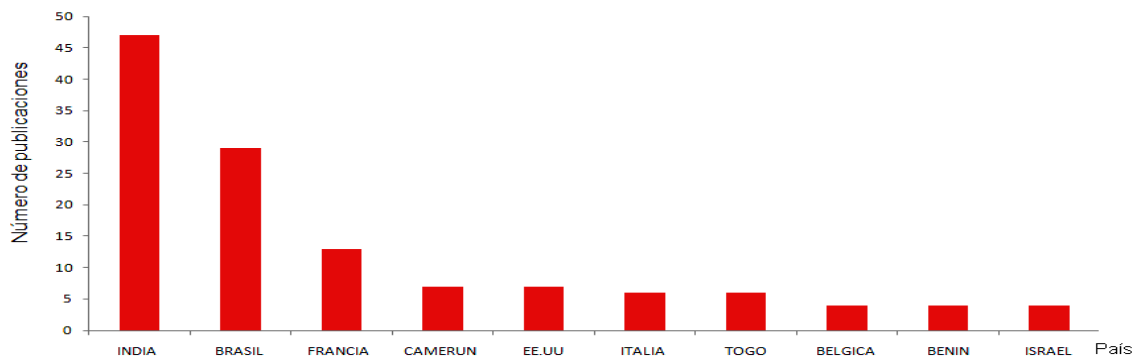


**Figura 3.** Número de publicaciones sobre la especie *Cymbopogon martinii*, según los años (2000-2010). Fuente: *ISI Web of Science*. Fecha de consulta: 15/07/2010. Ecuación de búsqueda: t= (essential oil\*) refined by: t= (*Cymbopogon*) and t= (*martinii*).

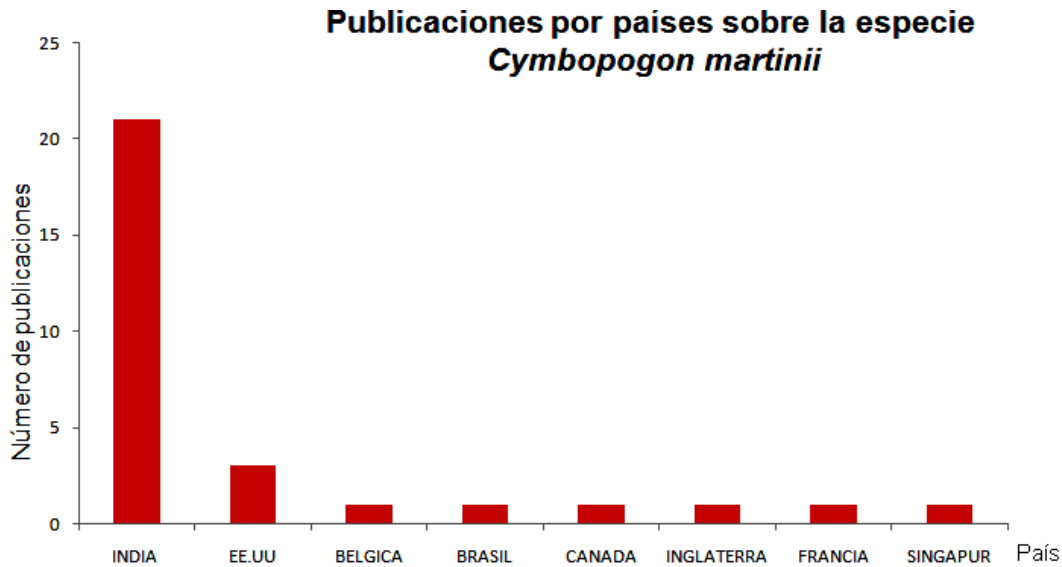
### 1.2.2 Publicaciones por países

Las **Figuras 4 y 5** muestran los países que han demostrado mayor interés por el estudio del *Cymbopogon martinii*. La India es el país que posee mayor número de artículos publicados sobre el género *Cymbopogon* y especie *Cymbopogon martinii*, seguido de Brasil y los Estados Unidos.

### Publicaciones por países sobre el género *Cymbopogon*



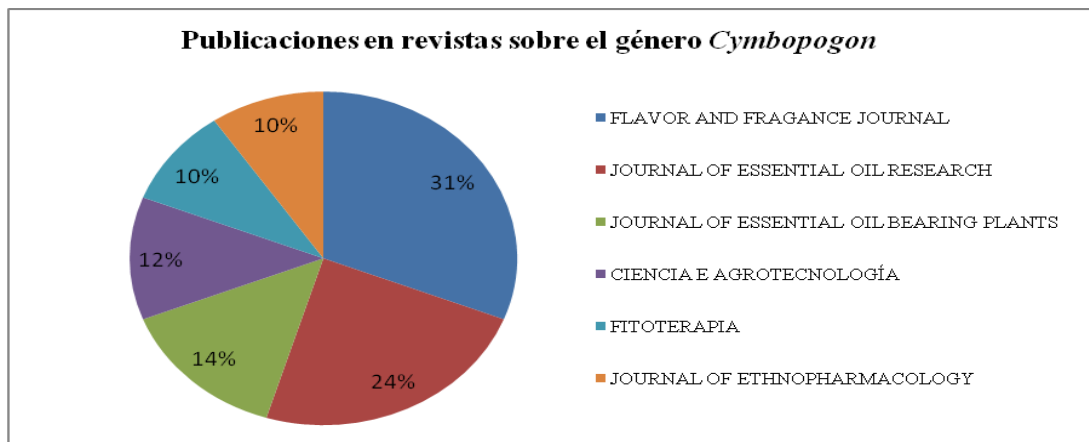
**Figura 4.** Numero de publicaciones sobre el género *Cymbopogon*, por países (2000-2010). Fuente: *ISI Web of Science*. Fecha de consulta: 15/07/2010. Ecuación de búsqueda: t= (essential oil\*) refined by: t= (*Cymbopogon*).



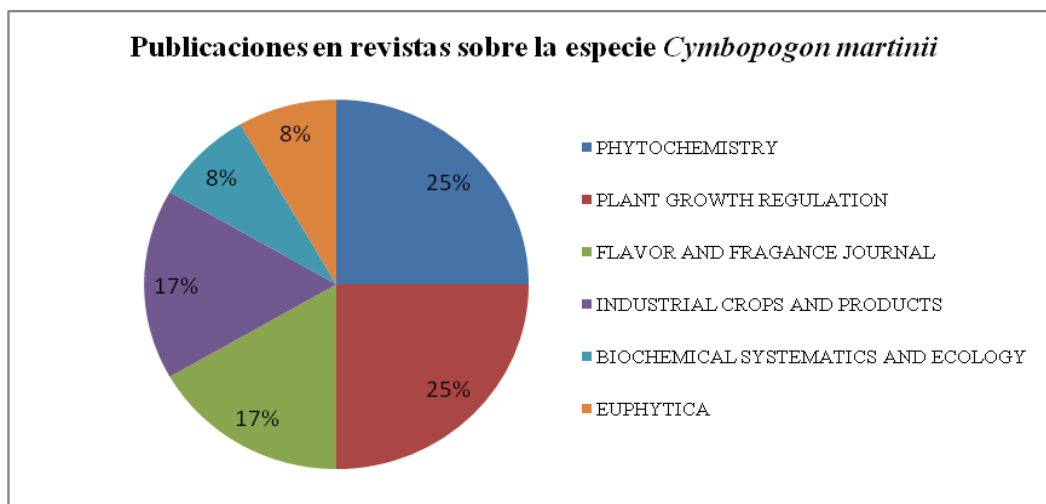
**Figura 5.** Número de publicaciones sobre la especie *Cymbopogon martinii* por países (2000-2010). Fuente: *ISI Web of Science*. Fecha de consulta: 15/07/2010. Ecuación de búsqueda: t= (essential oil\*) refined by: t= (*Cymbopogon*) and t= (*martinii*).

### 1.2.3 Publicaciones en revistas de investigación

Las **Figuras 6 y 7** se muestran las revistas científicas con mayor número de publicaciones sobre el *Cymbopogon martinii*. La revista científica indexada que tiene mayor número de publicaciones es la *Phytochemistry*, seguida de *Plant Growth Regulation*.



**Figura 6.** Comparación por áreas de investigación sobre el género *Cymbopogon* (2000-2010). Fuente: *ISI Web of Science*. Fecha de consulta: 15/07/2010. Ecuación de búsqueda: t= (essential oil\*) refined by: t= (*Cymbopogon*).



**Figura 7.** Comparación por áreas de investigación sobre la especie *Cymbopogon martinii* (2000-2010). Fuente: ISI Web of Science. Fecha de consulta: 15/07/2010. Ecuación de búsqueda: t= (essential oil\*) refined by: t= (*Cymbopogon*) and t= (*martinii*).

Entre los artículos científicos encontrados, se destacan los siguientes:

- Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae* [5].
- Biotransformation of geranyl acetate to geraniol during palmarosa (*Cymbopogon martinii*, Roxb. wats. var. *motia*) inflorescence development [6].
- Repellency and toxicity of troponoid compounds against the adzuki bean beetle, *Callosobruchus chinensis* (L.) (Coleoptera: Bruchidae) [10].

Por estar orientados a lograr una adición de valor a la producción del aceite esencial de *Cymbopogon martinii*:

En el año 2000, se realizó un estudio sobre la biotransformación del acetato de geranilo (presente en el AE *Cymbopogon martinii*) a geraniol (*Phytochemistry*); en el año 2003, se estudió la acción antimicrobial del aceite de palmarrosa sobre *Saccharomyces cerevisiae* (*Phytochemistry*); y en el año 2009, se estudió la actividad biológica de esta especie como repelente de insectos [5-7, 10].

### **1.3 ACEITES ESENCIALES**

Los aceites esenciales son mezclas de muchas sustancias, líquidas, aromáticas y muy volátiles, que se encuentran en la estructura vegetal de una planta, producto de su metabolismo secundario.

Los AE son muy volátiles, frágiles, y pueden ser alterados por la luz, la humedad y el calor, por lo que se recomienda a la hora de almacenarlos tener mucho cuidado con los factores que alteran su composición química fácilmente.

Los AE son mezclas de varias sustancias sintetizadas por las plantas, están formados principalmente por terpenos volátiles; éstos se fundamentan en el número de unidades isoprénicas ( $C_5H_8$ ), combinadas entre sí por condensación. La siguiente es la clasificación de los terpenos: monoterpenos ( $C_{10}H_{16}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}H_{24}$ ), y diterpenos ( $C_{20}H_{32}$ ).

Los extractos son mezclas de metabolitos secundarios de las plantas que se obtienen por métodos extractivos que disminuyen las pérdidas de compuestos volátiles, pero a la vez pueden contener sustancias semi-volátiles.

Por otro lado, las sustancias que son más significativas y causantes del olor característico de los AE son las que poseen grupos funcionales tales como aldehídos, cetonas, ésteres, alcoholes, etc [10, 15-17].

#### **1.3.1 Métodos de extracción**

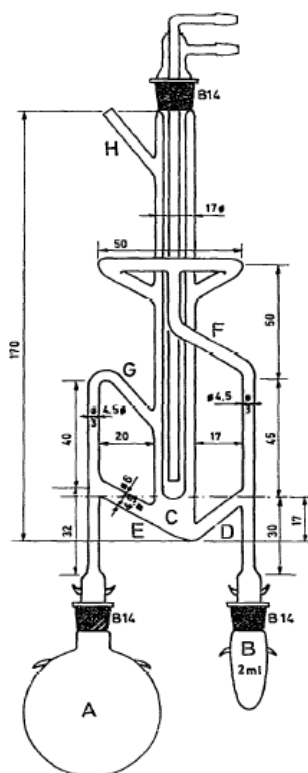
Los métodos de extracción utilizados en este proyecto son los siguientes:

Destilación-extracción simultánea con solventes (SDE), extracción con fluido supercrítico (SFE) e hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD).

### 1.3.2 Destilación-extracción simultánea con solvente

La SDE es un método para análisis cuantitativo, de los AE a micro-escala como lo reportan Godefroot et al. [18].

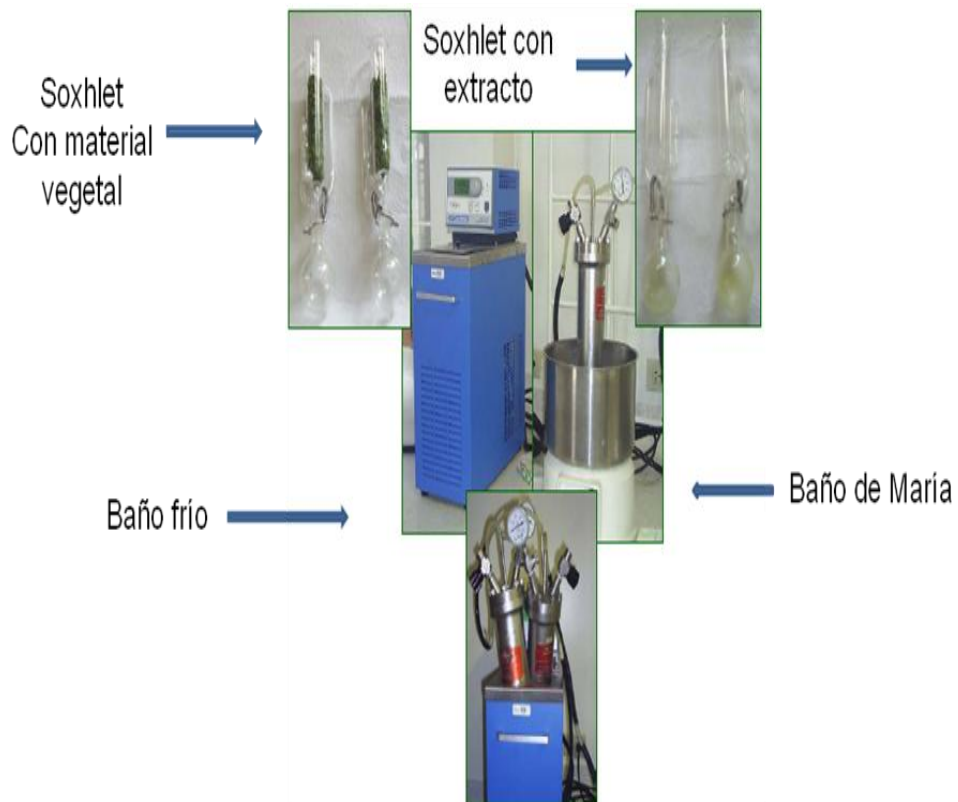
Todo el material volátil es recolectado en 1 mL de diclorometano que contiene un estándar interno (*n*-tetradecano, usado en este estudio). El material vegetal (MV) fue finamente picado, para tener mayor área de contacto, la extracción duró aproximadamente dos horas para obtener la mayor cantidad de extracto en el diclorometano. Después, se tomó una cantidad del extracto (50  $\mu$ L) y se analizó por cromatografía de gases acoplada a masas [16-20]. El equipo que se utilizó en esta técnica se muestra en la **Figura 8**.



**Figura 8.** Aparato utilizado para la destilación-extracción simultánea con solventes [18].

### 1.3.3 Extracción con fluido supercrítico

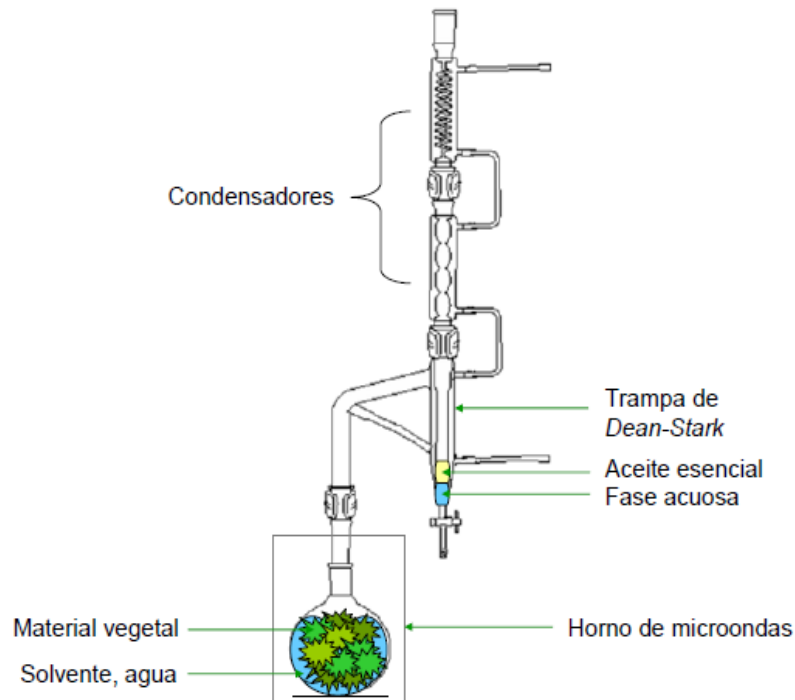
Un fluido supercrítico a menudo se denomina como un híbrido entre un líquido y un gas, lo que hace que tenga ventaja en los procesos de extracción, ya que al comportarse como un líquido facilita la disolución de los solutos y, a la vez, se comporta como gas y permite una separación fácil de la matriz. La importancia de utilizar este método es porque el fluido supercrítico, que se usó en este trabajo, es CO<sub>2</sub>, que es un gas químicamente estable, no es inflamable y es económico. Por otro lado, la velocidad de extracción es alta (duración de la extracción es aproximadamente dos horas) y la posterior eliminación de CO<sub>2</sub> del extracto es muy sencilla, ya que sólo se requiere disminuir la presión y el fluido supercrítico se convierte a gas, que se escapa espontáneamente [16,17, 21-27].



**Figura 9.** Aparato utilizado para la extracción de palmarrosa con fluido supercrítico.

### 1.3.4 Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas

En este método para la extracción de AE, el primer requisito es que el material vegetal esté en contacto con el agua, de modo que el agua será la generadora del vapor. La extracción del aceite se realizó 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 de uso doméstico. Se pesaron y se depositaron 100 g de material vegetal en un balón de vidrio de 1 L, posteriormente, se adicionaron 300 mL de agua destilada. La extracción se realizó a diferentes tiempos (30, 40 y 60 min), con el fin de analizar la influencia del tiempo de extracción sobre la calidad y el rendimiento del aceite. Al finalizar la extracción, se adicionó sulfato de sodio anhidro al aceite extraído, para retirar el agua residual [17, 20, 28-31].



**Figura 10.** Equipo utilizado para la hidrodestilación asistida por la radiación de microondas.

## 1.4 ANÁLISIS INSTRUMENTAL

### 1.4.1 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

El análisis cualitativo y cuantitativo realizado por GC-MS, permite dilucidar los compuestos presentes en los AE y extractos, así como la cantidad de cada uno de estos, obtenidos por los diferentes métodos de extracción; los compuestos se pueden identificar debido a su separación por el cromatógrafo de gases, estudiando los patrones de fragmentación obtenidos por la espectrometría de masas.



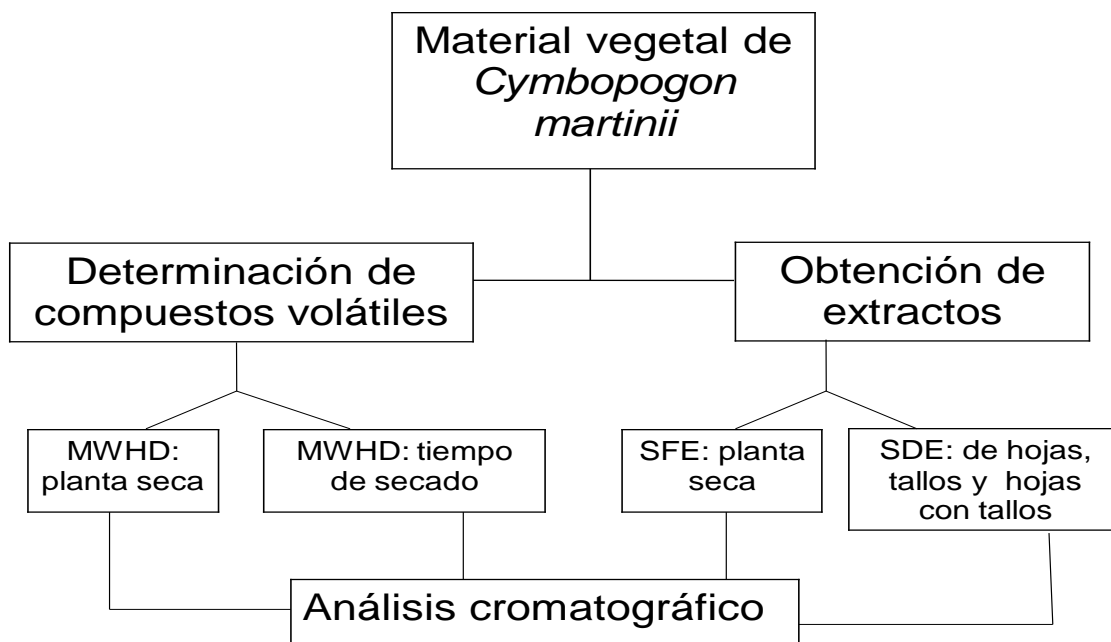
**Figura 11.** Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Plus series*, GC System acoplado a un detector selectivo de masas (MSD) *Agilent Technologies 5973 Network* y un inyector automático *Agilent Technologies 7683 Series*, utilizados en el presente estudio.

### 1.4.2 Cromatografía de gases con detector de ionización en llama

El análisis realizado por GC-FID, permite cuantificar compuestos presentes en los AE, utilizando criterios de identificación tentativa. Entre éstos, se tiene la comparación de los tiempos de retención ( $t_R$ ) de las sustancias de referencias con los tiempos de retención de los analitos en la muestra y la determinación de los índices de retención (IR).

## 2 PARTE EXPERIMENTAL

El esquema general del trabajo aparece a continuación:



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

- Recolección del material vegetal;
- Extracción por MWHD del AE del *Cymbopogon martinii*, de tallos y hojas, y determinación del rendimiento de la extracción;

- Extracción del AE del *Cymbopogon martinii*, de tallos y hojas, obtenidos por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas y determinación del mejor tiempo de extracción;
- Obtención del extracto del *Cymbopogon martinii* por SDE de las hojas, tallos y las hojas con tallos;
- Obtención del extracto del *Cymbopogon martinii* por SFE de hojas con tallos;
- Análisis instrumental de aceites y extractos empleando GC-MS y GC-FID;
- Identificación de los metabolitos secundarios con base en sus espectros de masas y usando patrones certificados de éstos;

## **2.1 RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL**

Las hojas y los tallos del *Cymbopogon martinii* utilizados en las diferentes extracciones realizadas en este trabajo, fueron recolectadas en el mes de noviembre del 2009 en el Complejo Agroindustrial Piloto, CENIVAM. UIS.

## **2.2 DETERMINACIÓN DEL MEJOR TIEMPO DE EXTRACCIÓN DEL AE DE CYMBOPOGON MARTINII.**

Para determinar el mejor tiempo de funcionamiento del MWHD, se prosiguió de la siguiente manera:

1. Se pesó material vegetal (MV) seco, aproximadamente 100 g (hojas y tallos), y se transfirió a un balón de fondo redondo de 2000 mL.

2. Se adicionó agua (ca. 300 mL), la cual cubrió aproximadamente una tercera parte del MV.
3. Se hizo el montaje requerido, el cual constó de un horno microondas, una trampa *Dean-Stark* y dos condensadores.
4. Después se colocó a funcionar el horno en ciclos de 10 min, con potencia de salida de 1200 W, empleando experimentalmente al 60% de la potencia del horno (720W).
5. Se determinó el tiempo requerido para el mayor rendimiento de la extracción; los tiempos que se evaluaron fueron los siguientes: 30, 40 y 50 min, de funcionamiento del microondas.
6. Para cada tiempo, la extracción se repitió por triplicado, es decir, se hicieron 9 extracciones, de las cuales se concluyó, cuál fue el mejor tiempo para la extracción.
7. Después de obtener el AE, se prosiguió a secarlo con sulfato de sodio anhidro, para su posterior análisis por GC/MS.

### **2.3 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL SECADO SOBRE EL RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN POR MWHF DEL AE DE TALLOS Y HOJAS DEL *CYMBOPOGON MARTINII***

Para determinar el rendimiento más alto del AE, se prosiguió de la siguiente manera:

1. Se pesó MV fresco (ca. 300 g), se prosiguió a extraer el AE, este procedimiento se hizo por triplicado, así como se realizó para el MV seco, y después se analizó por GC/MS.
2. Se pesó MV fresco (ca. 300 g) y se colocó a secar durante 5, 10, y 15 días y se realizó el mismo tratamiento, como para el MV fresco.
3. Se llevó a cabo una comparación de los rendimientos de los AE obtenidos del MV fresco y seco; éstos se analizaron luego por GC/MS.

#### **2.4 OBTENCIÓN POR SDE DEL EXTRACTO DE HOJAS Y TALLOS Y DE HOJAS CON TALLOS DE *CYMBOPOGON MARTINII***

Con esta técnica, el MV se picó finamente (hojas y tallos) y las extracciones duraban aproximadamente dos horas; el procedimiento se realizó de la siguiente manera:

1. El tamaño de la partícula del MV era aproximadamente de “3 x 3 mm”.
2. Se pesó MV seco (ca. 6 g) y se llevó a un balón de fondo redondo que contenía 30 mL de agua y en el segundo balón se colocaron 2 mL de diclorometano.
3. Al balón con el MV se calentó en un baño de aceite aproximadamente a una temperatura de 120°C durante dos horas, y el balón que contenía el diclorometano se calentó en un baño de María a 70°C, durante dos horas y media.
4. Una vez obtenido el extracto (por triplicado), se prosiguió a agregarle un patrón interno (*n*-tetradecano) y analizarlo por GC/MS.

## **2.5 OBTENCIÓN POR SFE DEL EXTRACTO DE HOJAS CON TALLOS DEL *CYMBOPOGON MARTINII***

Con esta técnica se tuvo mucho cuidado cuando se terminó la extracción, ya que se debía disminuir la presión lentamente, para evitar pérdidas de componentes volátiles; el fluido supercrítico durante su despresurización se volvía gas y se separaba espontáneamente; el procedimiento se realizó de la siguiente manera:

1. Se pesó el MV seco (ca. 10 g).
2. Se realizó el montaje para la extracción con fluido supercrítico.
3. Se adicionó al cuerpo del extractor hielo seco (aproximadamente 300 g) como fuente de fluido supercrítico.
4. Se aumentó la temperatura hasta 50°C, lo que elevó la presión del gas a 1100 psi.
5. La extracción duró por lo menos 2 hrs, luego el equipo se despresurizó lentamente.
6. Al extracto se le adicionó diclorometano (1 mL).
7. Al extracto obtenido se agregó un patrón interno (*n*-tetradecano) y, luego, se prosiguió a analizarlo por GC/MS.

## 2.6 ANÁLISIS INSTRUMENTAL DEL AE DE PALMARROSA POR GC/MS Y GC-FID

La preparación de las muestras de los AE para su respectivo análisis cromatográfico se llevó a cabo disolviendo 50 µL de AE y 1.0 µL de patrón interno (*n*-tetradecano) en diclorometano, hasta un volumen final de 1.0 mL.

Este análisis se realizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en el equipo *Agilent Technologies 6890 Plus Series* acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5973 Network*, (con analizador de cuadrupolo) equipado con un puerto de inyección *Split/Splitless* (250 °C, relación de Split 30:1) e inyector automático *Agilent 7863*.

La separación de los analitos se realizó en una columna capilar de sílice fundida DB-5MS (*J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.*), de 60 m y 0.25 mm (D.I.), recubierta con una fase estacionaria de 5% fenil-poli(metilsiloxano) de 0.25 µm de espesor. Como gas de arrastre se empleó helio (99.995% Aga Fano S.A).

Para la identificación de los analitos se recurrió a la siguiente fórmula:

$$IR = 100n + \frac{100[t_{Rx} - t_{Rn}]}{t_{RN} - t_{Rn}} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

IR = 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 después y antes del compuesto  $x$ , respectivamente.

Para la cuantificación de los analitos se utilizó la siguiente ecuación:

$$C_x = \frac{C_{Istd} * A_x}{A_{Istd}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

$C_x$  = Concentración (g/L) del analito en la muestra.

$C_{Istd}$  = Concentración (g/L) del *istd*

$A_x$  = Área del pico cromatográfico del analito

$A_{Istd}$  = Área del pico cromatográfico del *istd*.

Para la cuantificación por GC-FID, se utilizó la técnica de estandarización externa. Para ello, se prepararon soluciones *stock* de patrones certificados de geraniol y de acetato de geraniol.

Posteriormente, se prepararon diluciones de las soluciones *stock* y se prosiguió a analizarlas por GC-FID. Además, con los correspondientes valores de áreas y concentraciones, se prosiguió a construir las curvas de calibración, las cuales se ajustaron por regresión lineal.

### 3 ANÁLISIS DE RESULTADOS

#### 3.1 ESTUDIO DEL MEJOR TIEMPO DE EXTRACCIÓN DEL AE DE PALMARROSA

En la **Tabla 2** se registran los experimentos, realizados por triplicado, para cada uno de los tiempos de calentamiento. Se concluye, que el mejor tiempo para proseguir los demás experimentos fue de 40 min de calentamiento, ya que cuando se aumentaba el calentamiento no había un cambio en el rendimiento del AE.

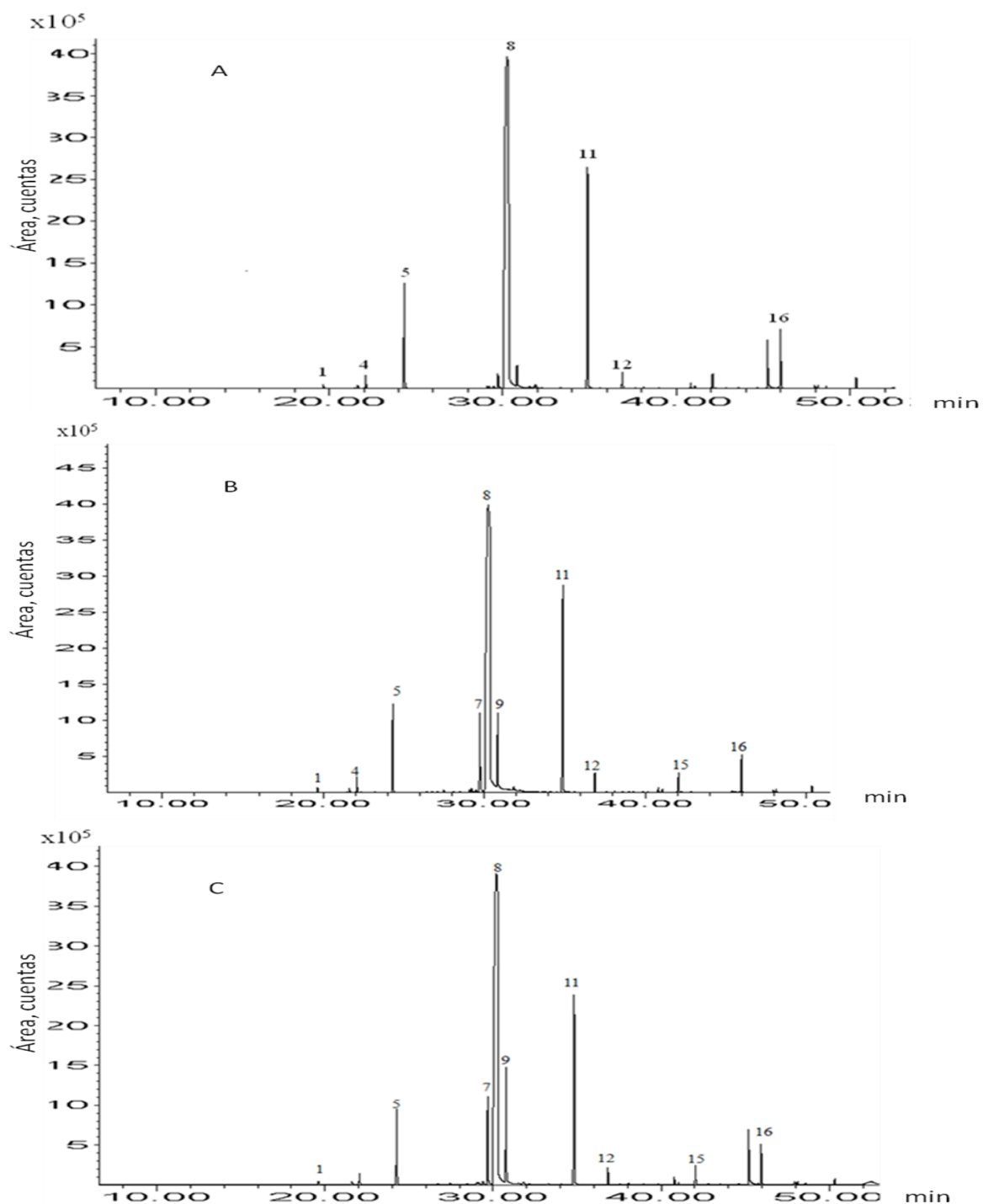
Para cada uno de los tiempos de calentamiento, se realizó un estudio de la composición del AE por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (**Figura 12, Tabla 3**).

Los tres compuestos mayoritarios del AE de *Cymbopogon martinii*, aislado por MWHD, fueron el geraniol (60-70%), seguido del acetato de geranilo (11,2-11,4%), a su vez, seguido del linalool (2,5-5,2%). Cabe destacar, que de los tres compuestos, el geraniol ha sido reportado como el principal compuesto para esta planta [3,4].

**Tabla 2.** Efecto del tiempo de extracción por MWHD sobre el porcentaje aislado de aceite esencial de palmarrosa.

Tiempo de extracción por MWHD (min)	Extracción del MV seco, AE (%) (n=3)			
	1	2	3	Promedio ± S
30	0.65	0.69	0.70	0.68 ± 0.02
40	0.80	0.84	0.80	0.81 ± 0.02
50	0.81	0.79	0.83	0.81 ± 0.02

Resultados cromatográficos del AE de *Cymbopogon martinii* aislado por MWHD a diferentes tiempos de extracción.



**Figura 12.** Perfiles cromatográficos, obtenidos por GC-MS, del aceite de *Cymbopogon martinii*, aislado por MWHD a diferentes tiempos de extracción. A. 30 min. B. 40 min. C. 50 min. Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV).

**Tabla 3.** Cantidad relativa (%) e identificación de compuestos mayoritarios de los AE de *Cymbopogon martinii*, obtenidos por MWHd durante diferentes tiempos de extracción.

Nº Pico Figura12	COMPUESTOS	IR		CANTIDAD RELATIVA %		
		DB-5	DB-WAX	30 min	40 min	50 min
1	$\beta$ -Mirceno	990	1119	0.3 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1
2	Limoneno	1031	1201	0.03 $\pm$ 0.003	0.02 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.01
3	<i>cis</i> - $\beta$ -Ocimeno	1037	1236	0.2 $\pm$ 0.03	0.1 $\pm$ 0.05	0.2 $\pm$ 0.04
4	<i>trans</i> - $\beta$ -Ocimeno	1048	1252	0.6 $\pm$ 0.03	0.3 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.17
5	Linalool	1101	1515	3 $\pm$ 0.7	4 $\pm$ 1.3	4.4 $\pm$ 0.8
6	Nerol	1218	1767	0.3 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.02	0.2 $\pm$ 0.04
7	Neral	1230	1655	4 $\pm$ 2.0	2 $\pm$ 2.1	2.0 $\pm$ 1.8
8	Geraniol	1243	1821	62 $\pm$ 1.3	68 $\pm$ 3.3	70 $\pm$ 4.7
9	Geranial	1257	1720	5. $\pm$ 2.1	4 $\pm$ 2.0	3 $\pm$ 1.9
10	formiato de nerilo	1280	1665	0.2 $\pm$ 0.11	0.1 $\pm$ 0.05	0.1 $\pm$ 0.06
11	Acetato de geranilo	1353	1729	11 $\pm$ 2.0	11 $\pm$ 1.5	11 $\pm$ 1.2
12	<i>trans</i> - $\beta$ -Cariofileno	1401	1588	0.9 $\pm$ 0.2	1 $\pm$ 0.2	0.7 $\pm$ 0.02
13	<i>n</i> -Butanoato de geranilo	1495	1875	0.3 $\pm$ 0.14	0.4 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.02
14	Nerolidol	1501	2040	0.1 $\pm$ 0.03	0.1 $\pm$ 0.05	0.1 $\pm$ 0.01
15	Óxido de cariofileno	1525	1982	1 $\pm$ 0.07	1 $\pm$ 0.04	0.6 $\pm$ 0.10
16	Isovalerato de geranilo	1618	1925	2 $\pm$ 1.1	2.3 $\pm$ 0.84	1.7 $\pm$ 0.5

### 3.2 ESTUDIO DEL EFECTO DEL SECADO DEL *CYMBOPOGON MARTINII* SOBRE LA EXTRACCIÓN POR MWHd DEL AE DE TALLOS Y HOJAS

Todos los experimentos se hicieron por triplicado, teniendo en cuenta que para poner a secar el material vegetal se tomaron 12 lotes, que cada uno pesaba 300 g

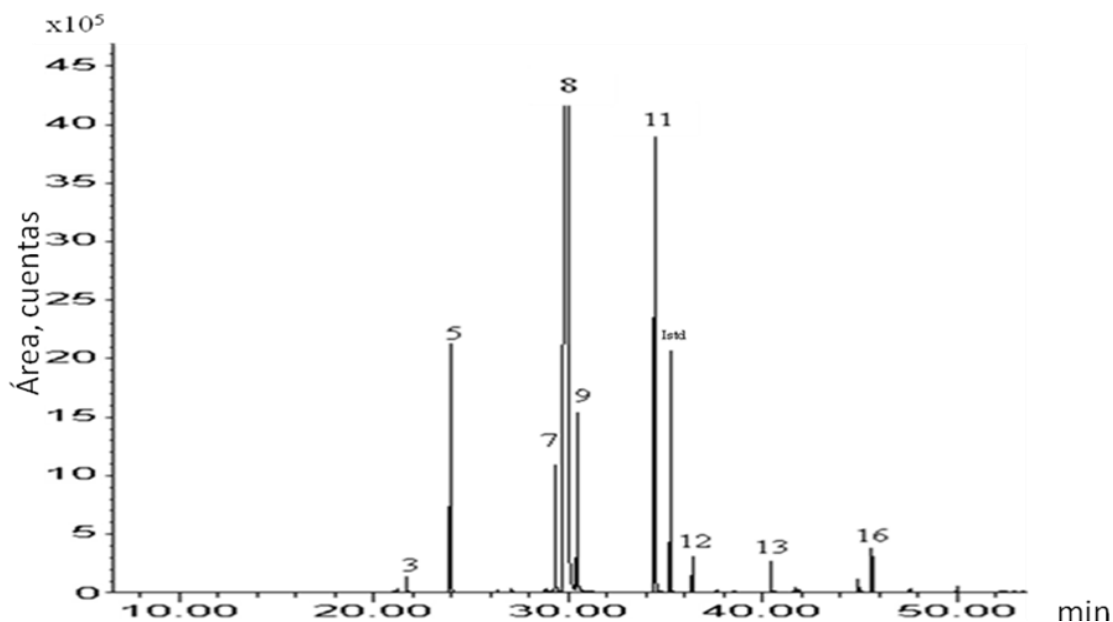
y se le realizó un seguimiento diario a todos los lotes (el seguimiento diario consistió en ver como cambiaba la masa en función del tiempo **Figura 14**).

En la **Tabla 4** se muestran las cantidades de aceite obtenidas en cada extracción para cada uno de los tiempos de secado.

**Tabla 4.** Cantidades de aceite extraído por medio de la MWHD.

Tiempo de secado (días)	Cantidad del aceite (g) (n=3)			
	1	2	3	Promedio $\pm$ S
0	0,93	0,97	1,03	0,97 $\pm$ 0.05
5	1,01	0,99	1,05	1,01 $\pm$ 0.03
10	0,98	0,99	1,05	1,00 $\pm$ 0.03
15	1,05	1,05	0,96	1,02 $\pm$ 0.05

Resultados cromatográficos para el material vegetal fresco.



**Figura 13.** Perfil cromatográfico del aceite obtenido por MWHD de material fresco de *Cymbopogon martinii*. Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV).

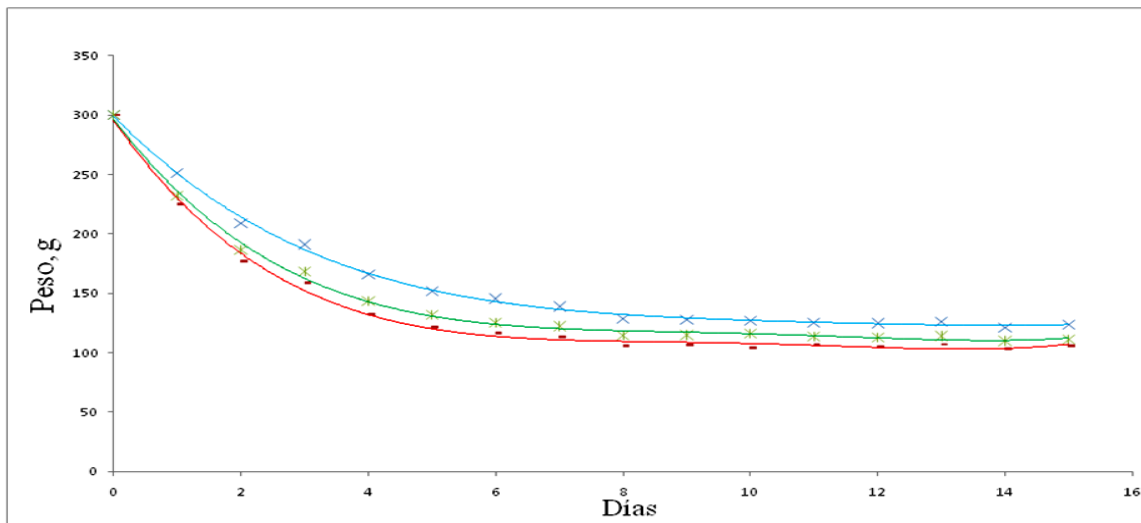
**Tabla 5.** Determinación de la composición del aceite de *Cymbopogon martinii* en fresco, utilizando patrón interno (*n*-tetradecano;  $t_R = 35.2$  min)

Nº	Pico	COMPUESTOS	IR		Concentración [mg/L] $\pm$ S (n=3)
			DB-5	DB-WAX	
	<b>Figura 13</b>				
1		$\beta$ -Mirceno	990	1119	2,1 $\pm$ 2,2
2		Limoneno	1031	1201	4 $\pm$ 1,2
3		<i>cis</i> - $\beta$ -Ocimeno	1037	1236	15 $\pm$ 1,5
4		<i>trans</i> - $\beta$ -Ocimeno	1048	1252	55 $\pm$ 2,8
5		Linalool	1101	1515	870 $\pm$ 64
6		Nerol	1218	1767	10 $\pm$ 1,3
7		Neral	1230	1655	420 $\pm$ 223
8		Geraniol	1243	1821	13000 $\pm$ 588
9		Geranial	1257	1720	700 $\pm$ 312
10		Formiato de Nerilo	1280	1665	5 $\pm$ 0.6
11		Acetato de geranilo	1353	1729	3300 $\pm$ 144
12		<i>trans</i> - $\beta$ -Cariofileno	1401	1588	110 $\pm$ 33
13		<i>n</i> -Butanoato de geranilo	1495	1875	91 $\pm$ 7,5
14		Nerolidol	1501	2040	7 $\pm$ 0,2
15		Óxido de cariofileno	1525	1982	16 $\pm$ 5,2
16		Isovalerato de geranilo	1618	1925	120 $\pm$ 13.0

Resultados del tiempo de secado de *Cymbopogon martinii* (15 días)

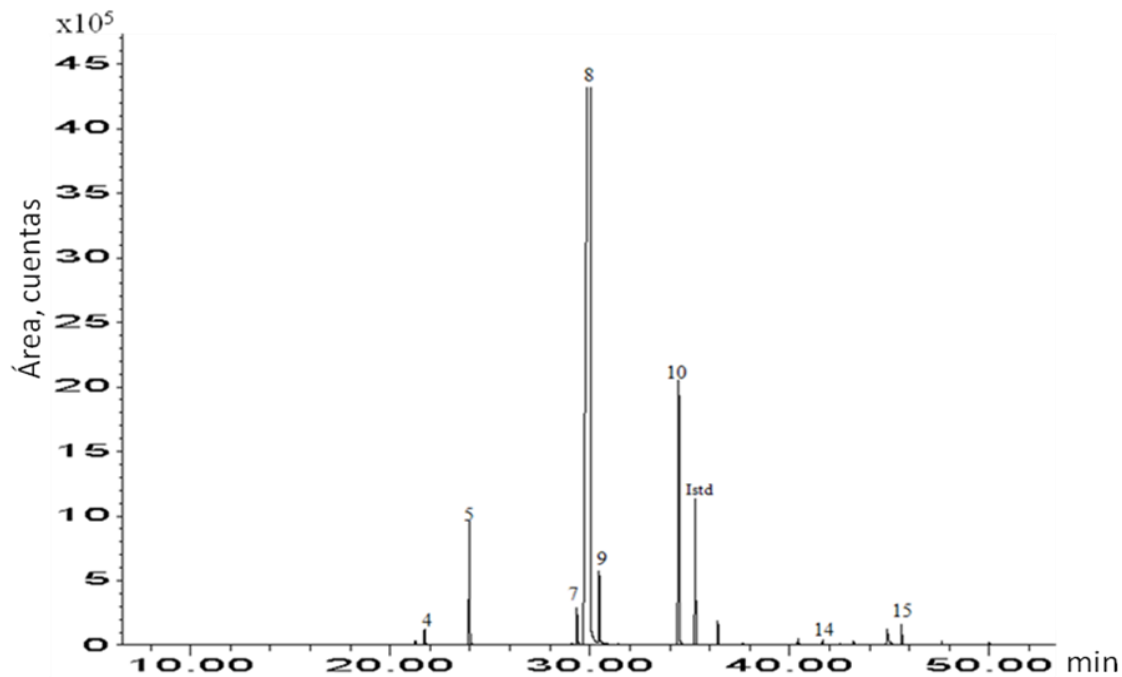
Como se puede observar en la **Figura 14**, la tendencia a los 8-15 días de secado es absorber un poco la humedad del ambiente, por eso la perdida de agua en esos días no es notoria.

## Cambio de la masa en función del tiempo de secado



**Figura 14.** Gráfica que muestra la tendencia que tiene el secado del *Cymbopogon martinii* a través del tiempo (15 días).

### Resultados cromatográficos para el material vegetal, 5 días de secado.

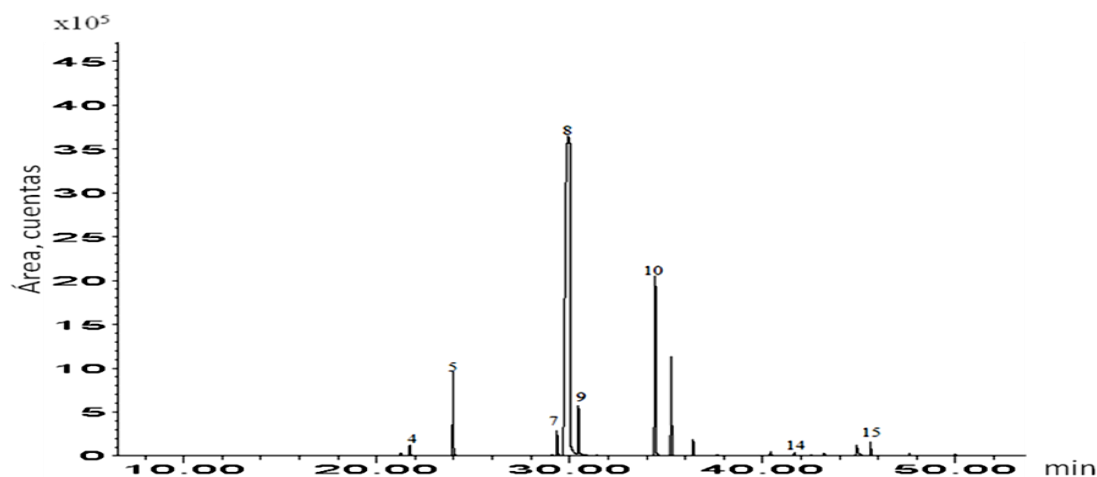


**Figura 15.** Perfil cromatográfico del aceite obtenido por MWHD, después de 5 días de secado de *Cymbopogon martinii*. Columna DB-5 (60 m), split 1:30, MSD (EI, 70 eV).

**Tabla 6.** Determinación de la composición del aceite de *Cymbopogon martinii*, 5 días de secado, utilizando patrón interno (*n*-tetradecano;  $t_R= 35.2$  min).

Nº	Pico	COMPUESTOS	IR		Concentración [mg/L] ± S (n=3)
			DB-5	DB-WAX	
	<b>Figura 15</b>				
1		β-Mirceno	<b>990</b>	1119	3 ± 2.0
2		Limoneno	1031	1201	8 ± 0,9
3		<i>cis</i> - β-Ocimeno	1037	1236	28 ± 3,3
4		<i>trans</i> -β-Ocimeno	1048	1252	94 ± 12,95
5		Linalool	1101	1515	1100 ± 131
6		Nerol	1218	1767	6 ± 0,6
7		Neral	1230	1655	20 ± 4,0
8		Geraniol	1243	1821	15000 ± 1377
9		Geranial	1257	1720	140 ± 31,3
10		Acetato de geranilo	1353	1729	3800 ± 808
11		<i>trans</i> -β-Cariofileno	1401	1588	110 ± 8,4
12		<i>n</i> -Butanoato de geranilo	1495	1875	110 ± 29
13		Nerolidol	1501	2040	7 ± 2,4
14		Óxido de cariofileno	1525	1982	14 ± 5,4
15		Isovalerato de geranilo	1618	1925	140 ± 49,4

Resultados cromatográficos para el material vegetal, 10 días de secado.

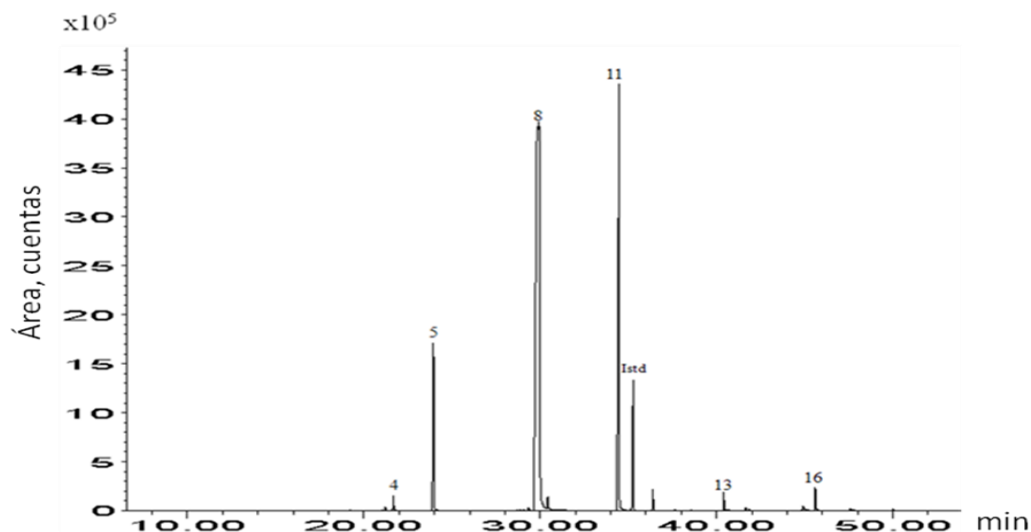


**Figura 16.** Perfil cromatográfico del aceite obtenido por MWHD, después de 10 días de secado de *Cymbopogon martinii*. Columna DB-5 (60 m), split 1:30, MSD (EI, 70 eV).

**Tabla 7.** Determinación de la composición del aceite de *Cymbopogon martinii*, 10 días de secado, utilizando patrón interno (*n*-tetradecano;  $t_r = 35.2$  min)

Nº Pico <b>Figura 16</b>	COMPUESTOS	IR		Concentración [mg/L] $\pm$ S (n=3)
		DB-5	DB-WAX	
1	$\beta$ -Mirceno	990	1119	2,3 $\pm$ 0,5
2	Limoneno	1031	1201	5.0 $\pm$ 0,2
3	<i>cis</i> - $\beta$ -Ocimeno	1037	1236	28.0 $\pm$ 0,7
4	<i>trans</i> - $\beta$ -Ocimeno	1048	1252	90 $\pm$ 5,1
5	Linalool	1101	1515	630 $\pm$ 90
6	Nerol	1218	1767	8 $\pm$ 3,6
7	Neral	1230	1655	200 $\pm$ 19,2
8	Geraniol	1243	1821	17000 $\pm$ 1978
9	Geranial	1257	1720	420 $\pm$ 44,6
10	Acetato de geranilo	1353	1729	3800 $\pm$ 166
11	<i>trans</i> - $\beta$ -Cariofileno	1401	1588	120 $\pm$ 11,4
12	<i>n</i> -Butanoato de geranilo	1495	1875	40 $\pm$ 4,9
13	Nerolidol	1501	2040	3 $\pm$ 1,4
14	Óxido de cariofileno	1525	1982	24 $\pm$ 3,7
15	Isovalerato de geranilo	1618	1925	90 $\pm$ 19,7

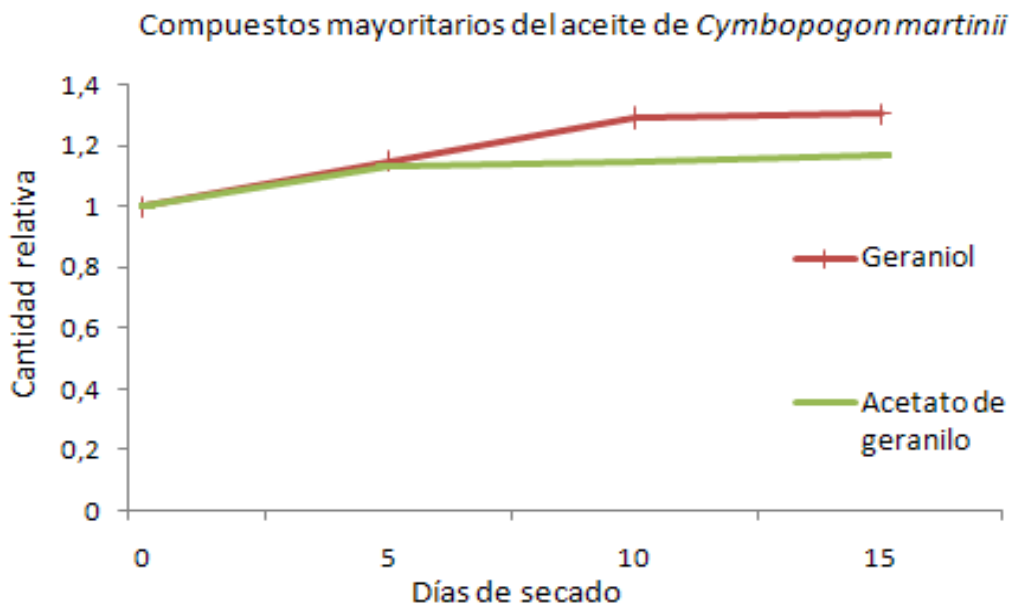
Resultados cromatográficos para el material vegetal, 15 días de secado.



**Figura 17.** Perfil cromatográfico del aceite obtenido por MWHD, después de 15 días de secado de *Cymbopogon martinii*. Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV).

**Tabla 8.** Determinación de la composición del aceite de *Cymbopogon martinii*, 15 días de secado, utilizando patrón interno (*n*-tetradecano;  $t_r = 35.2$  min)

Nº Pico Figura 17	COMPUESTOS	IR		Concentración [mg/L] $\pm$ S (n=3)
		DB-5	DB-WAX	
1	$\beta$ -Mirceno	990	1119	2,2 $\pm$ 1,0
2	Limoneno	1031	1201	5,1 $\pm$ 1,6
3	<i>cis</i> - $\beta$ -Ocimeno	1037	1236	21 $\pm$ 4,1
4	<i>trans</i> - $\beta$ -Ocimeno	1048	1252	84 $\pm$ 10,9
5	Linalool	1101	1515	1100 $\pm$ 226
6	Nerol	1218	1767	5 $\pm$ 1,04
7	Neral	1230	1655	16 $\pm$ 3,9
8	Geraniol	1243	1821	17000 $\pm$ 3588
9	Geranial	1257	1720	100 $\pm$ 20,4
10	Formiato de nerilo	1280	1665	3 $\pm$ 0,09
11	Acetato de geranilo	1353	1729	3900 $\pm$ 693
12	<i>trans</i> - $\beta$ -Cariofileno	1401	1588	140 $\pm$ 19,4
13	<i>n</i> -Butanoato de geranilo	1495	1875	140 $\pm$ 26,2
14	Nerolidol	1501	2040	9 $\pm$ 1,4
15	Óxido de cariofileno	1525	1982	15 $\pm$ 4,1
16	Isovalerato de geranilo	1618	1925	160 $\pm$ 32,6



**Figura 18.** Gráfica que muestra la tendencia del efecto del secado de la extracción del AE de *Cymbopogon martinii* para los compuestos mayoritarios.

Esta figura se construyó tomando como valores de referencia la concentración de los compuestos mayoritarios en el día cero es decir en fresco, (concentración en función del tiempo/concentración día cero).

Como se puede observar en la **Figura 18**, el geraniol aumenta en concentración, y a su vez la concentración del acetato de geraniol tiende a permanecer constante.

En conclusion, se recomienda secar entre 10-15 días, ya que se obtiene un aumento en la concentración de los compuestos mayoritarios

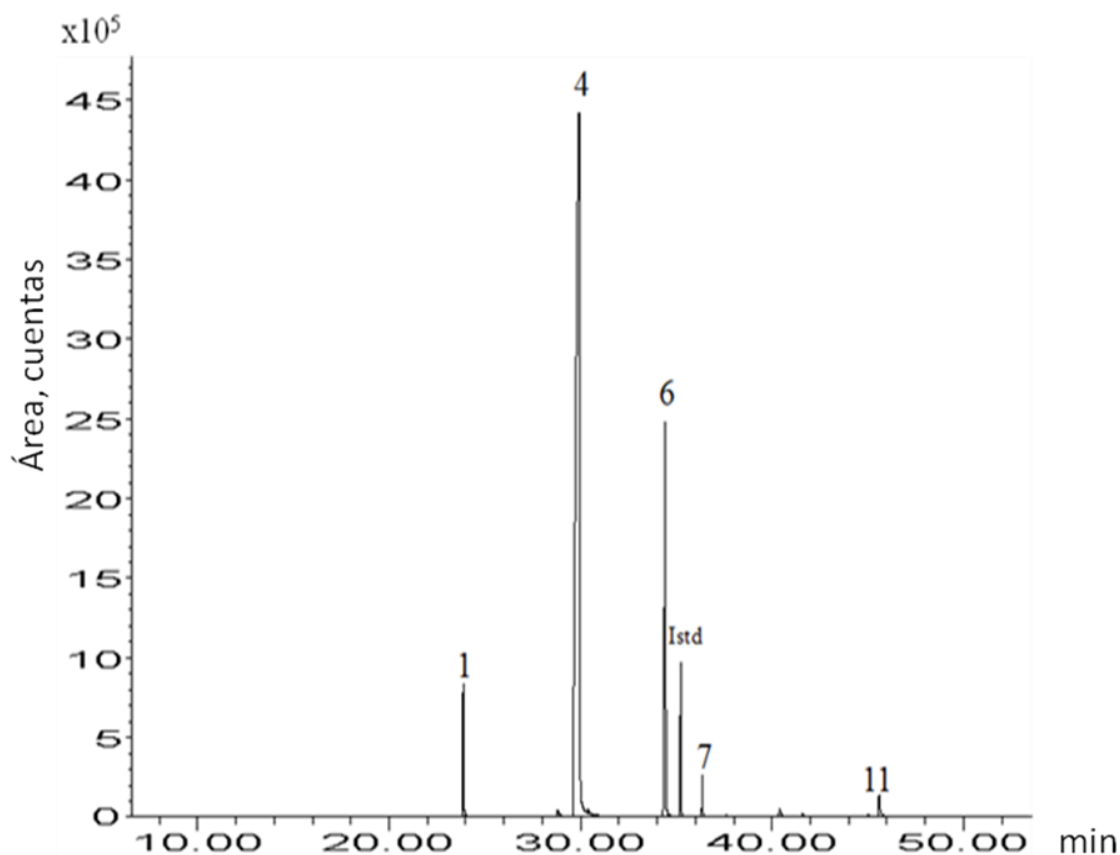
### **3.3 ESTUDIO DE LOS EXTRACTOS DEL *CYMBOPOGON MARTINII* OBTENIDOS POR SDE, DE HOJAS, TALLOS Y DE HOJAS CON TALLOS**

En este estudio los experimentos se realizaron por triplicado y se determinó que la extracción por este método, arroja en los perfiles cromatográficos una menor cantidad de picos.

En los extractos de las tallos se ve en los perfiles cromatográficos una disminución en la concentración (en ppm) de los compuestos mayoritarios, dando a entender que la contribución de los tallos al AE de *Cymbopogon martinii* es ínfima.

En la **Tabla 9-11** se presenta la identificación de los extractos realizados por SDE; además en las **Figuras 20-22** se muestran los perfiles cromatográficos de cada una de las extracciones pertinentes.

Resultados cromatográficos para el extracto de las hojas obtenido por SDE.

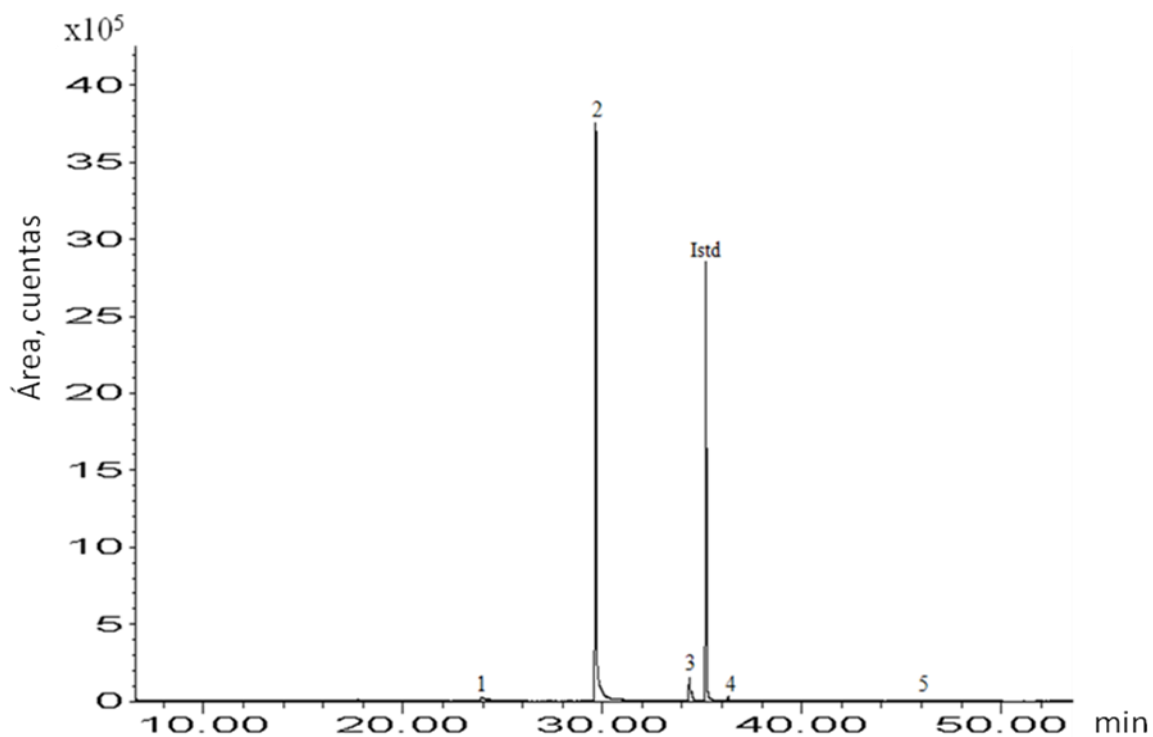


**Figura 19.** Perfil cromatográfico del extracto de las hojas de *Cymbopogon martinii*, utilizando como método de extracción SDE. Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV).

**Tabla 9.** Composición del extracto, obtenidos por SDE de las hojas del *Cymbopogon martinii*, utilizando patrón interno (*n*-tetradecano;  $t_R = 35.2$  min)

Nº Pico Figura 19	COMPUESTOS	IR		Concentración [mg/L] ± S (n=3)
		DB-5	DB-WAX	
1	Linalool	1101	1515	760 ± 92,5
2	Nerol	1218	1767	86 ± 2,8
3	Neral	1230	1655	9 ± 4,7
4	Geraniol	1243	1821	17100 ± 1257,6
5	Geranial	1257	1720	80 ± 3,8
6	Acetato de geranilo	1353	1729	2600 ± 164
7	<i>trans</i> -β-Cariofileno	1401	1588	190 ± 11,2
8	<i>n</i> -Butanoato de geranilo	1495	1875	70 ± 16,1
9	Nerolidol	1501	2040	13 ± 8,6
10	Óxido de cariofileno	1525	1982	19 ± 10,3
11	Isovalerato de geranilo	1618	1925	190 ± 20,1

Resultados cromatográficos para el extracto de los tallos obtenido por SDE.

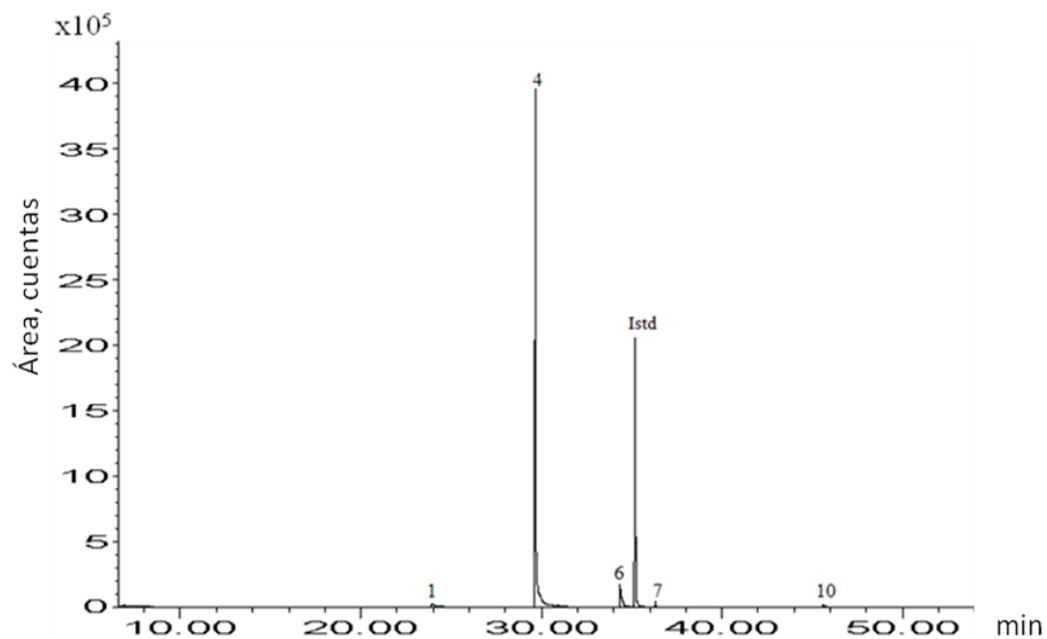


**Figura 20.** Perfil cromatográfico del extracto de los tallos de *Cymbopogon martinii*, utilizando como método de extracción SDE. Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV).

**Tabla 10.** Composición del extracto (SDE) de los tallos del *Cymbopogon martinii*, utilizando patrón interno (*n*-tetradecano;  $t_R= 35.2$  min)

Nº	Pico	COMPUESTOS	IR		Concentración [mg/L] $\pm$ S (n=3)
			DB-5	DB-WAX	
<b>Figura 20</b>					
1		Linalool	1101	1515	30 $\pm$ 13,8
2		Geraniol	1243	1821	1400 $\pm$ 351
3		Acetato de geranilo	1353	1729	92 $\pm$ 26,8
4		<i>trans</i> - $\beta$ -Cariofileno	1401	1588	9 $\pm$ 2,4
5		Isovalerato de geranilo	1618	1925	7 $\pm$ 3,9

Resultados cromatográficos para el extracto de las hojas con tallos obtenido por SDE.



**Figura 21.** Perfil cromatográfico del extracto de las hojas con tallos de *Cymbopogon martinii*, utilizando como método de extracción SDE. Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV).

**Tabla 11.** Composición del extracto (SDE) de los tallos con hojas de *Cymbopogon martinii*, utilizando patrón interno (*n*-tetradecano;  $t_R=35.2$  min)

Nº	Pico	COMPUESTOS	IR		Concentración [mg/L] ± S (n=3)
			DB-5	DB-WAX	
	<b>Figura 21</b>				
1		Linalool	1101	1515	330 ± 96,6
2		Nerol	1218	1767	31 ± 2.4
3		Neral	1230	1655	2 ± 0,8
4		Geraniol	1243	1821	5500 ± 341,2
5		Geranial	1257	1720	23 ± 1,9
6		Acetato de geranilo	1353	1729	800 ± 58,1
7		<i>trans</i> -β-Cariofileno	1401	1588	63 ± 5,7
8		<i>n</i> -Butanoato de geranilo	1495	1875	21 ± 6,9
9		Óxido de cariofileno	1525	1982	8 ± 0,2
10		Isovalerato de geranilo	1618	1925	30 ± 5,2

**Tabla 12.** Comparación por medio de la técnica SDE de los productos mayoritarios del extracto de *Cymbopogon martinii* de las hojas, de las hojas con tallos y de los tallos

Compuestos	SDE, [mg/L] ± S (n=3)		
	Hojas	Hojas y tallos	Tallos
Linalool	760 ± 93	330 ± 97	30 ± 14
Geraniol	17000 ± 1300	5500 ± 340	1400 ± 350
Acetato de geranilo	2600 ± 160	800 ± 58	90 ± 27

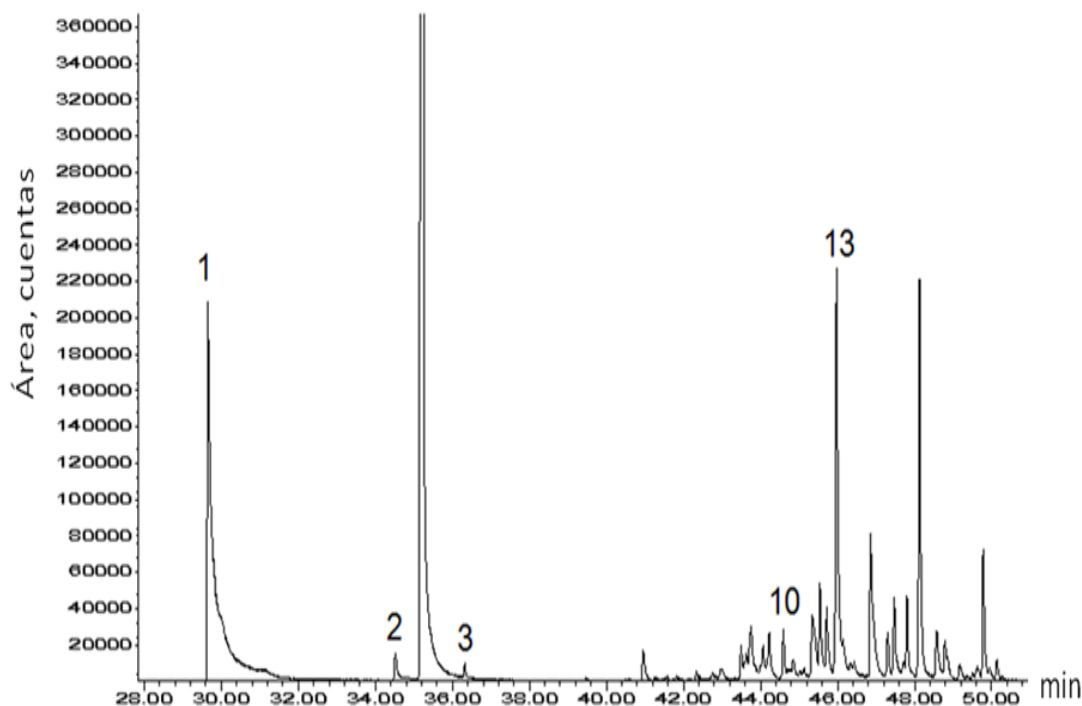
Se concluye, que por este método extractivo (SDE) los tallos tienen una contribución ínfima al AE y que además las hojas poseen la mayor cantidad de los metabolitos de interés.

### 3.4 ESTUDIO DEL EXTRACTO DEL *CYBOPOGON MARTINII*, OBTENIDOS POR SFE DE HOJAS CON TALLOS.

Este estudio se realizó, por triplicado, a las hojas con tallos y se observó que por este método el extracto estaba conformado por hidrocarburos de alto peso molecular, que no se observaron en la extracción con MWHD o SDE. Por este método la extracción del compuesto mayoritario (geraniol) es baja con respecto a los compuestos extraídos por las otras técnicas de extracción.

Por otro lado, el rendimiento de la extracción fue de  $2 \pm 0.3 \%$  ( $n=3$ ).

Resultados cromatográficos para el extracto de las hojas con tallos obtenido por SFE.



**Figura 22.** Perfil cromatográfico del extracto de las hojas con tallos del *Cymbopogon martinii*, utilizando como método de extracción SFE. Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV).

**Tabla 13.** Composición del extracto (SFE) de los tallos con hojas del *Cymbopogon martinii*, utilizando patrón interno (*n*-tetradecano; *tr*= 35.2 min).

Nº	COMPUESTOS	Ik	Concentración [mg/L] ± S
Pico		DB-5	(n=3)
<b>Figura 22</b>			
1	Geraniol	1243	199 ± 92,1
2	Acetato de geranilo	1353	5,2 ± 1,9
3	<i>trans</i> -β-Cariofileno	1401	2,0 ± 0,8
4	Rosifoliol	1577	6,0 ± 0,9
5	α-epi-Muurolol	1669	5,0 ± 0,5
6	Nootkatol	1711	7 ± 1,3
7	Oplopanona	1750	16 ± 4,2
8	γ-Costol	1757	11 ± 2,0
9	Khusimol	1768	66 ± 13,7
10	<i>trans</i> -Isovalencenol	1805	36 ± 8,2
11	Nootkatona	1825	9 ± 3,4
12	β-Vetivona	1832	13 ± 1,6
13	α-Vetivona	1862	54 ± 6,0

### 3.5 CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES MAYORITARIOS DEL AE DEL *CYMBOPOGON MARTINII*, UTILIZANDO GC-FID

Esta determinación se llevó a cabo en el equipo de análisis cuantitativo GC-FID; sabiendo que los metabolitos secundarios mayoritarios en el AE del *Cymbopogon martinii* son el geraniol y el acetato de geranilo.

Esta cuantificación se llevó a cabo utilizando la técnica cromatográfica de estandarización externa, explicada en la **Sección 2.6**.

En la **Tabla 14** se registran las concentraciones utilizadas para la curva de calibración.

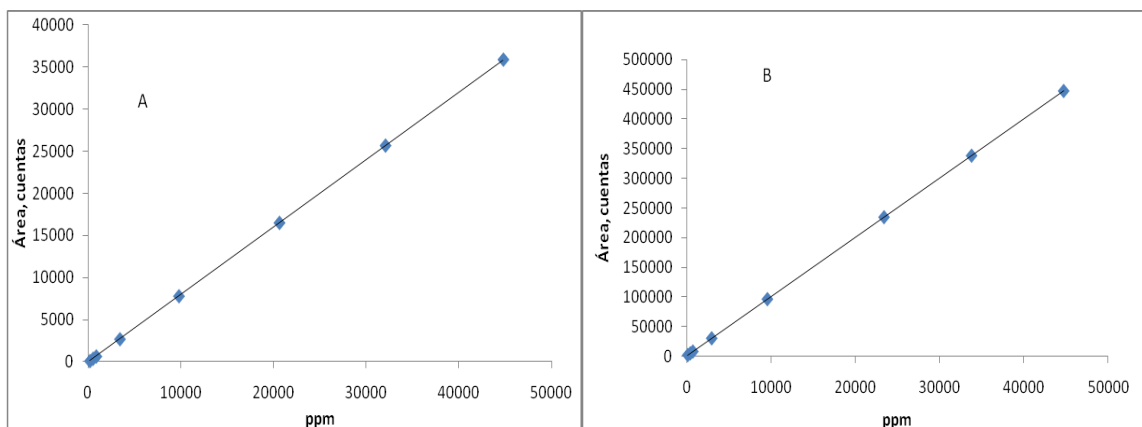
En la **Tabla 15** se registran los valores de la concentración de los compuestos mayoritarios del AE del *Cymbopogon martinii*; los aceites que se utilizaron para esta determinación son los que se extrajeron para cada uno de los tiempos de secado y además estas concentraciones se registraron con unidades de mg/L (ppm).

**Tabla 14.** Concentraciones de las soluciones patrón de geraniol y de acetato de geraniolo utilizadas en la curva de calibración.

Patrón	Concentración [mg/L]							
Geraniol	170	510	850	3400	9770	20620	32620	44780
Acetato de geraniolo	149	447	745	2980	9590	23820	33820	44750

**Tabla 15.** Concentraciones del geraniol y del acetato de geraniolo presentes en los AE del *Cymbopogon martinii*.

Tiempo de secado (Días)	Concentración [mg/L] $\pm$ S (n=3)	
	Geraniol	Acetato de geraniolo
0	9700 $\pm$ 1330	1100 $\pm$ 860
5	8600 $\pm$ 3115	1400 $\pm$ 880
10	11100 $\pm$ 3399	2200 $\pm$ 820
15	8900 $\pm$ 2780	120 $\pm$ 40



**Figura 23.** Curvas de calibración del geraniol (A) y del acetato de geraniol (B).

### 3.6 COMPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AE DE *CYMOPOGON MARTINII* CULTIVADO EN COLOMBIA CON LOS AE REPORTADOS EN LA INDIA

Según Rao Rajeswara en su investigación en el año 2001, titulada (*Biomass and Essential Oil Yields of Rainfed Palmarosa (Cymbopogon martinii (Roxb.) Wats. var. motia Burk. supplied with different levels of organic manure and fertilizer nitrogen in semi-arid tropical climate*), la composición del AE de palmarrosa de secano, es muy parecida a la colombiana, ya que sus compuestos mayoritarios son los mismos [3].

En otra investigación de Rao Rajeswara *et al* en el año 2004, titulada (*Chemical profiles of primary and secondary essential oils of palmarosa (Cymbopogon martinii (Roxb.) Wats var. motia Burk)*), presenta una composición química del AE de palmarrosa muy similar al del AE de palmarrosa de Colombia [4].

La diferencia radica en los demás metabolitos; a continuación, se muestra la **Tabla 16** con sus respectivas diferencias.

**Tabla 16.** Comparación del AE de *Cymbopogon martinii* de Colombia contra lo reportado en los artículos de Rao Rajeswara, en sus investigaciones en los años 2001 y 2004 [3,4].

Compuesto	I <sub>K</sub>	Colombia	India
Sabineno	967	----	*
β-Mirceno	990	0.2	1.0
α- Felandreno	995	----	*
α- Terpineno	1008	----	*
p- Cimeno	1012	----	0.1
Limoneno	1031	0.02	0.5
cis-β-Ocimeno	1037	0.1	----
trans-β-Ocimeno	1048	0.3	1.7
<b>Linalool</b>	<b>1101</b>	<b>4.0</b>	<b>2.5</b>
β-Terpineol	1130	----	0.3
Citronelol	1212	----	0.1
Nerol	1218	0.2	----
Neral	1230	2	----
<b>Geraniol</b>	<b>1243</b>	<b>68</b>	<b>73.1</b>
Geranial	1257	4.0	----
Formiato de nerilo	1280	0.1	----
<b>Acetato de geranilo</b>	<b>1353</b>	<b>11.0</b>	<b>15.8</b>
trans-β-Cariofileno	1401	0.1	2.0
Propionato de geranilo	1447	----	0.2
β-Selineno	1476	----	0.1
n-Butanoato de geranilo	1495	0.4	----
Nerolidol	1501	0.1	----
β-Bisaboleno	1508	----	0.1
Óxido de cariofileno	1525	1.0	0.1
Butirato de geranilo	1531	----	0.2
Isovalerato de geranilo	1618	2.3	----
Pentanoato de geranilo	1633	----	0.1
Hexanoato de geranilo	1718	----	0.3
Heptanoato de geranilo	1820	----	0.1

\*Trazas; ---- compuesto no detectado por los autores.

En el libro “*Essential Oil-Bearing Grasses. The genus Cymbopogon,*” se hace una comparación de los compuestos mayoritarios y minoritarios reportados del AE de *Cymbopogon martinii*, cultivados en la India, oeste de bengala, Lucknow e Hyderabad.

Este libro reporta que los compuestos mayoritarios son el geraniol (65–85%) seguido del acetato de geranilo (6-12%) y otros tres compuestos más, que no superan el 12 %, los cuales son el citral, el citronelol y linalool. Para nuestro caso los compuestos mayoritarios fueron el geraniol (62–70%), seguido del acetato de geranilo (11–12%) y el linalool (3–4,5%).

Los compuestos minoritarios para el libro son  $\alpha$ -amorfeno,  $\beta$ -betulenol,  $\alpha$ -betulenol, biciclogermacreno,  $\beta$ -bisaboleno,  $\gamma$ -bisaboleno,  $\alpha$ -cadineno,  $\gamma$ -cadineno, *cis*-calameno,  $\gamma$ -calameno, calacoreno,  $\beta$ -curcumeno, *o*-cimeno, *p*-cimeno, *m*-cimeno, dipenteno,  $\beta$ -elemeno,  $\gamma$ -elemeno,  $\beta$ -farneseno, farnesol, acetato de farnesilo, formaldehído, *n*-butirato de geranilo, germacreno-B, germacreno-D,  $\beta$ -helmiscapeno,  $\alpha$ -humuleno,  $\beta$ -humuleno, isovaleraldehído, heptenona de metilo,  $\gamma$ -muuroleno, nerolidol, 2-nonanol,  $\alpha$ -felandreno,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, dieno-4,7 selina,  $\alpha$ -selineno,  $\beta$ -selineno, *d*-selineno,  $\alpha$ -terpineno,  $\gamma$ -terpineno,  $\alpha$ -terpineol,  $\beta$ -terpineol, y terpinoleno; para el aceite esencial de palmarrosa colombiano fueron *cis*-  $\beta$ -ocimeno, *trans*- $\beta$ -ocimeno, nerol, *trans*- $\beta$ -cariofileno, *n*-butanoato de geranilo, nerolidol E, óxido de cariofileno e isovalerato de geranilo.

#### 4 CONCLUSIONES

1. La composición química y los rendimientos de extracción (0.97-1.02) de los AE de *C. martinii*, aislados por MWHD, no presentaron variaciones significativas en función del tiempo de secado.
2. Mediante la GC/MS se determinaron entre 15-16 compuestos volátiles y semivolátiles en concentraciones > de 1 ppm de hojas y tallos de palmarrosa que se aislaron utilizando técnicas destilativas (MWHD) y extractivas (SDE y SFE).
3. La composición química de los extractos aislados por SFE se caracterizó por presentar diferentes hidrocarburos no detectados por las otras técnicas de extracción; siendo sin embargo el geraniol el compuesto mayoritario.
4. Los compuestos mayoritarios del AE de *Cymbopogon martinii* colombiano presentan una gran similitud con el AE reportado en la India, la diferencia radica en los compuestos minoritarios, tales como *cis*- $\beta$ -ocimeno, *trans*- $\beta$ -ocimeno, nerol, *trans*- $\beta$ -cariofileno, *n*-butanoato de geraniol entre otros

## 5 BIBLIOGRAFÍA

1. AVELLANEDA, G; ROA, G; VÁSQUEZ, R; STASHENKO, E, Estudio de la estructura de mercado para la comercialización de aceites esenciales en Colombia. Bucaramanga: Tesis de Pregrado en Economía, Universidad Industrial de Santander (**2008**).
2. BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review, *Food Chem. Toxicol*, **2008**, 46, 446–475.
3. RAJESWARA, Rao, B.R. Biomass and essential oil yields of rainfed palmarosa (*Cymbopogon martinii* (Roxb. Wats. var. *motia* Burk.) supplied with different levels of organic manure and fertilizer nitrogen in semi-arid tropical climate. *Ind. Crops Prod*, **2001**, 14, 171-178.
4. RAJESWARA Rao, B, R.; KAUL, P, N.; SYAMASUNDAR, K, V.; RAMESH, S. Chemical profiles of primary and secondary essential oils of palmarosa (*Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats var. *motia* Burk.). *Ind. Crops Prod*, **2004**, 21 121–127.
5. PRASHAR, A.; HILI, P.; VENESS, R, G.; EVANS, C, S. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry*, **2003**, 63, 569–575.
6. DUBEY, V, S.; LUTHRA, R. Biotransformation of geranyl acetate to geraniol during palmarosa (*Cymbopogon martinii*, Roxb. wats. var. *motia*) inflorescence development. *Phytochemistry*, **2001**, 57, 675–680.

7. GEORGE, D, R.; SPARAGANO, O, A, E.; PORT, G.; OKELLO, E.; SHIEL, R, S.; GUY, J, H. Repellence of plant essential oils to *Dermanyssus gallinae* and toxicity to the non-target invertebrate *Tenebrio molitor*. *Vet. Parasitol.* **2009**, 729, 1-6.
8. MURAMATSU, M.; OHTO, C.; OBATA, S.; SAKURADANI, E.; SHIMIZU, S. Various oils and detergents enhance the microbial production of farnesol and related prenyl alcohols, *J. Biosci. Bioeng*, **2008**, 106, 263-267.
9. TEIXEIRA M, C, D.; FIGUEIRA, G, M.; SARTORATTO, A.; GARCIA, V, L, R.; DELARMELENA, C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants, *J. Ethnopharmacol*, **2005**, 97, 305–311.
10. SHIMIZU, C.; HORI, M. Repellency and toxicity of troponoid compounds against the adzuki bean beetle, *Callosobruchus chinensis* (L.) (Coleoptera: Bruchidae). *J. Stor. Prod. Res*, **2009**, 45, 49-53.
11. SINGH, M.; SHARMA, S. Influence of irrigation and nitrogen on herbage and oil yield of palmarosa (*Cymbopogon martinii* ) under semi-arid tropical conditions, *Eur. J. Agronom*, **2001**, 14, 157–159.
12. PRAKASA, Rao, E.V.S.; GANESHA, Rao, R.S.; PUTTANNA, K. Studies on in situ soil moisture conservation and additions of phosphorus and potassium in rainfed palmarosa (*Cymbopogon martinii* var. *motia*) in a semi-arid tropical region of India. *Eur. J. Agronom*, **2001**, 14, 167–172.
13. PRASAD, A.; KUMAR, D.; SINGH, D, V. effect of residual sodium carbonate in irrigation water on the soil sodication and yield of palmarosa (*Cymbopogon martinii*) and lemograss (*Cymbopogon flexuosus*), *Agric. Water Manag*, **2001**, 50, 161-172.

14. FATIMA, S.; FAROOQI, A.; SHARMA, S. Physiological and metabolic responses of different genotypes of *Cymbopogon martinii* and *C. winterianus* to water stress. *Plant Growth Regul*, **2002**, 37, 143–14.
15. COMBARIZA, M, Y.; TIRADO, C, B; STASHENKO, E, E. Estudio comparativo de los aceites esenciales de hojas y frutos cítricos Colombianos. Bucaramanga: Tesis de Pregrado en Química. Universidad Industrial de Santander, (1995).
16. QUIRÓZ, N.; STASHENKO, E, E. Obtención y análisis de los metabolitos secundarios volátiles de Ylang-Ylang (*Cananga odorata*, Hook fill et Thomson, forma genuina). Bucaramanga: Tesis de Pregrado en Química. Universidad Industrial de Santander, (1995).
17. CERVANTES, M.; STASHENKO, E, E. 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*. Bucaramanga: Tesis de Pregrado en Química. Universidad Industrial de Santander, (1999).
18. GODEFROOT, M.; SANDRA, P.; VERZELE, M. New method for quantitative essential oil analysis. *J. Chromatogr.*, **1981**, 203, 325-335.
19. STASHENKO, E, E.; PUERTAS, M, A.; COMBARIZA, M, Y; Volatile by secondary metabolites from *Spilanthes americana* obtained simultaneous steam distillation-solvent extraction and supercritical fluid extraction. *J. Chromatogr. A*, **1996**, 752, 223-232.

20. BARTLEY, J. P. Volatile constituents of custard apple. *Chromatographia*, 1987, 23, 129-131.
21. FERNÁNDEZ, R. B.; SANTOS, N. F. Aislamiento y caracterización del tilirosido a partir de las semillas de *Heliocarpus terebinthinaceus* (cuetla). TESIS **2006**. Universidad Tecnológica de la Mixteca.
22. STASHENKO, E. E.; ACOSTA, R.; MARTÍNEZ, J. R. High-resolution gas-chromatographic analysis of the secondary metabolites obtained by subcritical-fluid extraction from Colombian rue (*Ruta graveolens* L.). *J. Biochem. Biophys. Met.*, **2000**, 43, 379–390.
23. ESQUIVEL, F. A.; VARGAS P. Uso de aceites esenciales extraídos por medio de fluidos supercríticos para la elaboración de alimentos funcionales. *Tecnología en marcha.*, **2007**, 20, 41-50.
24. WONG, V.; WYLLIE, S. G.; CORNWELL, C. P.; TRONSON, D. Supercritical Fluid Extraction (SFE) of Monoterpenes from the Leaves of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree), *Molecules*, **2001**, 6, 92-103.
25. BRAGA, M. E.; EHLERT, P. A.; MING, L. C.; MEIRELES, A. A. Supercritical fluid extraction from *Lippia alba*: global yields, kinetic data, and extract chemical composition, *J. Supercrit. Fluids*, **2005**, 34, 149–156.
26. KHAJEH, M.; YAMINI, Y.; BAHRAMIFAR, N.; SEFIDKON, F.; PIRMORADEI, M. R. Comparison of essential oils compositions of *Ferula assa-foetida* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods, *Food Chem.*, **2005**, 91, 639–644.

27. BRAGA, M, E.; Leal, P, F.; CARVALHO, J, E.; MEIRELES, M. A. Comparison of Yield, Composition, and Antioxidant Activity of Turmeric (*Curcuma longa L.*) Extracts Obtained Using Various Techniques. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 6604-6611.
28. PARÉ, J, R, J.; SIGOUIN, M.; LAPOINTE, J.; Microwave-assisted natural product extraction, U.S. PATENT., **1991**, 5,002,784.
29. PARÉ, J, R, J.; Microwave extraction of volatile oils, U.S. PATENT, **1994**, 5,338,557.
30. PARÉ, J, R, J.; Microwave-assisted generation of volatiles, of supercritical fluid, and apparatus therefor. U.S. PATENT, **1995**, 5,377,426.
31. STASHENKO, E, E.; JARAMILLO, B, E.; MARTÍNEZ, J, R, Analysis of volatile secondary metabolites from Colombian *Xylopi*a aromatica (Lamarck) by different extraction and headspace methods and gas chromatography. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1025, 105–113.
32. AKHILA, A. Essential Oil-Bearing Grasses. The genus *Cymbopogon*. CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010, p.p. 29-30.