

**Desarrollo de un método rápido para analizar volátiles en plantas
aromáticas por microextracción en fase sólida en modo *headspace*,
asistida por la radiación de microondas**

Diego Camilo Durán García, Químico.

Directores:

Elena E. Stashenko, Química Ph.D.

Jairo R. Martínez, Químico Ph.D.

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2010

Desarrollo de un método rápido para analizar volátiles en plantas aromáticas por microextracción en fase sólida en modo *headspace*, asistida por la radiación de microondas

Diego Camilo Durán García, Químico.

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

Directores:

Elena E. Stashenko, Química Ph.D.

Jairo R. Martínez, Químico Ph.D.

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2010

A dos grandes mujeres: Mí abuela Nohemí, por todos los buenos valores que formó en su nieto, y a la memoria de la mamá Betty, por su ejemplo de tenacidad e inagotable deseo de vida.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a la doctora Elena Stashenko, auténtica Maestra Universitaria de la Química y la vida, quien con su estupendo carisma y dedicación hacia sus estudiantes, nos aporta incontables enseñanzas para la construcción de un mejor país, lleno de esperanza y grandes sueños.

Al doctor Jairo René Martínez, por todos sus aportes en el campo de la estadística y la química, fundamentales para mi formación como investigador.

A los doctores Alirio Palma y Luz Ángela Carreño por la evaluación y aportes al presente trabajo de investigación.

A todos mis amigos y compañeros del Laboratorio de Cromatografía y del Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM.

A toda mi familia por todo su apoyo durante todos estos años de trabajo y estudio, en especial y mis padres Mario y Mimy, y a mi hermanita Lucia.

A Colciencias (Contrato *RC-432-2004*) y a la Universidad Industrial de Santander por su apoyo económico para el desarrollo de la presente investigación.

Finalmente, a todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron en la realización de este trabajo de investigación.

Diego Camilo Durán García

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.	
1.	INTRODUCCIÓN	21
2.	Cienciometría	25
2.1.	Relación año – número de publicaciones	25
2.2.	Relación área de estudio – número de publicaciones	29
2.3.	Relación revista – número de publicaciones	30
3.	Estado del arte	30
3.1.	Microextracción en fase sólida	34
3.1.1.	Recubrimientos de la fibra	36
3.1.2.	Aplicación de la SPME para el análisis de compuestos volátiles en plantas aromáticas	44
3.2.	Extracción asistida por la radiación de microondas (MW)	45
3.3.	Los aceites esenciales: mercado y control de calidad	51
3.4.	Material vegetal	54
3.4.1.	<i>Lippia alba</i> (“Pronto alivio”)	54
3.4.2.	<i>Pelargonium graveolens</i> (“Geranio”)	56
4.	Parte Experimental	58
4.1.	Identificación botánica de las especies	59
4.2.	Propagación y cultivo del material vegetal	60
4.2.1.	Selección del Material vegetal	60
4.3.	Microextracción en fase sólida en modo <i>headspace</i> (HS-SPME)	61
4.3.1.	Selección de la fibra de SPME	61
4.3.2.	Estudio de las variables que afectan el proceso MW-HS-SPME	63
4.3.2.1.	Diseño y construcción del dispositivo para el análisis de la fracción volátil de plantas aromáticas por MW-HS-SPME	63
4.3.2.2.	Muestreo de la fracción volátil y obtención de aceite esencial	64

4.3.2.3.	Estudio del efecto de la potencia de las microondas, del tiempo de irradiación y de la adición de agua, sobre la eficiencia de la extracción por SPME de los compuestos volátiles de <i>Lippia alba</i> y <i>Pelargonium graveolens</i> .	65
4.4.	Análisis estadístico y encaje de modelos polinómicos a los datos experimentales	67
4.4.1.	Optimización del modelo y validación	68
4.5.	Determinación de las figuras analíticas de mérito	68
4.6.	Obtención de los aceites esenciales por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD)	69
4.7.	Análisis cromatográfico	70
4.7.1.	Análisis por GC-MS	70
4.7.2.	Cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo de masas en la columna apolar	70
4.7.3.	Cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo de masas en la columna polar	71
4.7.4.	Cromatografía de gases acoplada a detector de ionización en llama (GC-FID)	73
5.	Resultados y Discusión	74
5.1.	Selección del recubrimiento de la fibra para SPME	74
5.2.	Análisis cromatográfico	76
5.2.1.	Análisis de los aceites esenciales de <i>Lippia alba</i> y <i>Pelargonium graveolens</i>	76
5.3.	Desarrollo y validación del método rápido para el análisis de volátiles en plantas aromáticas por microextracción en fase sólida en modo <i>headspace</i> , asistido por la radiación de microondas (MW-HS-SPME).	84
5.4.	Evaluación de los parámetros de extracción en la implementación del método MW-HS-SPME	89

5.4.1.	Determinación de las condiciones óptimas para la extracción por MW-HS-SPME de las fracciones volátiles de <i>L. alba</i> y <i>P. graveolens</i>	92
5.5.	Determinación de las figuras analíticas de mérito	97
6.	Conclusiones	100
7.	Referencias bibliográficas	103

LISTADO DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Principales técnicas de extracción de metabolitos secundarios volátiles y semi-volátiles de plantas aromáticas	33
Tabla 2. Estudios publicados sobre metabolitos secundarios de plantas que involucran el uso de la radiación de microondas en combinación con la microextracción en fase sólida (SPME)	46
Tabla 3. Diseño experimental factorial 3^3 más estrella empleado para evaluar el efecto de la potencia de la radiación de microondas, el tiempo de exposición y la adición de agua, sobre la eficiencia de la extracción por SPME de los compuestos volátiles de <i>Lippia alba</i> y <i>Pelargonium graveolens</i> .	66
Tabla 4. Extracción por SPME de los componentes volátiles de <i>Lippia alba</i> y <i>Pelargonium graveolens</i> , empleando diferentes recubrimientos poliméricos de la fibra	74
Tabla 5. Cantidad relativa (%) e identificación de los principales compuestos encontrados en la fracción volátil del aceite esencial de <i>L. alba</i> , obtenido por HS-SPME	77
Tabla 6. Cantidad relativa (%) e identificación de los principales compuestos encontrados en la fracción volátil del aceite esencial de <i>P. graveolens</i> , obtenida por HS-SPME	80
Tabla 7. Componentes mayoritarios presentes en la fracción volátil y aceite esencial de <i>Lippia alba</i> extraídos por MW-HS-SPME	85
Tabla 8. Componentes mayoritarios extraídos por MW-HS-SPME, presentes en la fracción volátil de las hojas de <i>Pelargonium graveolens</i> y de su aceite esencial hidrodestilado	86
Tabla 9. Resultados obtenidos al aplicar el diseño factorial 3^3 más estrella al estudio de los metabolitos secundarios volátiles de <i>Lippia alba</i>	89

Tabla 10.	Resultados obtenidos al aplicar el diseño factorial 3 ³ más estrella al estudio de los metabolitos secundarios volátiles de <i>Pelargonium graveolens</i>	90
Tabla 11.	Análisis de varianza (ANOVA, Método de Yates) para la respuesta del diseño experimental implementado al estudio de los volátiles aislados de <i>Lippia alba</i> y <i>Pelargonium graveolens</i>	91
Tabla 12.	Ecuaciones obtenidas para el proceso de optimización	92
Tabla 13.	Datos de validación de los modelos matemáticos obtenidos para el método de extracción por MW-HS-SPME	93
Tabla 14.	Coeficientes de las ecuaciones polinómicas ajustadas a los modelos matemáticos para las variables tiempo de radiación (min), potencia de trabajo del microondas (W) y cantidad de agua (mL) adicionada, en la extracción por el método MW-HS-SPME de la fracción volátil de <i>Lippia alba</i> y <i>Pelargonium graveolens</i>	95
Tabla 15.	Valores óptimos de las variables empleadas en el proceso de extracción por MW-HS-SPME de las fracciones volátiles de <i>Lippia alba</i> y <i>Pelargonium graveolens</i>	96
Tabla 16.	Linealidad y sensibilidad del método MW-HS-SPME.	97
Tabla 17.	Reproducibilidad de las áreas de los picos cromatográficos seleccionados por el método MWHD-HS-SPME/GC-FID	98
Tabla 18.	Reproducibilidad de los tiempos de retención de los picos cromatográficos seleccionados por el método MWHD-HS-SPME/GC-FID	98
Tabla 19.	Límites de detección y cuantificación para carvona, citronelol y geraniol	99

LISTADO DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Número de publicaciones científicas sobre aceites esenciales o metabolitos secundarios de plantas aromáticas realizadas durante los años 1929-2009. Base de datos <i>Scopus</i> (<i>Elsevier</i> , B.V., 2009), palabras clave: “ <i>Essential oil</i> ”, “ <i>Volatil oil</i> ”; Ecuación de búsqueda: <i>Article, title, abstract</i> . Fecha de consulta: 31 de agosto de 2009	26
Figura 2. Número de publicaciones científicas sobre aceites esenciales o metabolitos secundarios de plantas aromáticas y microextracción en fase solida, realizadas durante los años 1996-2009. Base de datos <i>Scopus</i> (<i>Elsevier</i> , B.V., 2009), palabras clave: “ <i>Essential oil</i> ”, “ <i>Volatil oil</i> ”, “ <i>solid phase microextraction</i> ”; Ecuación de búsqueda: <i>Article, title, abstract</i> . Fecha de consulta: 31 de agosto de 2009	27
Figura 3. Número de publicaciones científicas sobre microextracción en fase solida asistida por la radiación de microondas, realizadas durante los años 1996-2009. Base de datos <i>Scopus</i> (<i>Elsevier</i> , B.V., 2009), palabras clave: “ <i>solid phase microextraction</i> ”, “ <i>microwave</i> ”; Ecuación de búsqueda: <i>Article, title, abstract</i> . Fecha de consulta: 31 de agosto de 2009	28
Figura 4. Relación entre el área de estudio y el número de publicaciones científicas sobre aceites esenciales o metabolitos secundarios de plantas aromáticas y microextracción en fase sólida, realizadas durante los años 1996-2009. Base de datos <i>Scopus</i> (<i>Elsevier</i> , B.V., 2009), palabras clave: “ <i>Essential oil</i> ”, “ <i>Volatil oil</i> ”, “ <i>solid phase microextraction</i> ”; Ecuación de búsqueda: <i>Article, title, abstract</i> . Fecha de consulta: 31 de agosto de 2009	29

Figura 5.	Relación entre revistas científicas y el número de publicaciones sobre aceites esenciales o metabolitos secundarios de plantas aromáticas y microextracción en fase sólida, realizadas durante los años 1996-2009. Base de datos Scopus (Elsevier, B.V., 2009), palabras clave: “Essential oil”, “Volatil oil”, “solid phase microextraction”, Ecuación de búsqueda: <i>Article, title, abstract</i> . Fecha de consulta: 31 de agosto de 2009	31
Figura 6.	Dispositivo para microextracción en fase sólida (SPME)	35
Figura 7.	Procedimiento de extracción (I) y desorción (II) de la SPME	37
Figura 8.	Diferentes modos de extracción por la técnica SPME	38
Figura 9.	Número de trabajos científicos publicados durante los últimos quince años, donde se ha utilizado la SPME. Base de datos Scopus (Elsevier, B.V., 2009), palabras clave: “Solid phase microextraction or SPME”, Ecuación de búsqueda: <i>Article, title, abstract</i> . Fecha de consulta: 21 de septiembre de 2009	43
Figura 10.	Cultivo de <i>Lippia alba</i> . Complejo Piloto del Centro de Investigación CENIVAM, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga	55
Figura 11.	Planta de <i>Pelargonium graveolens</i> (geranio)	56
Figura 12.	Diagrama de flujo para el desarrollo experimental del trabajo	59
Figura 13.	Cultivos experimentales: A. <i>Lippia alba</i> (4 meses de desarrollo); B. <i>Pelargonium graveolens</i> (6 meses de desarrollo vegetativo). Complejo Agroindustrial Piloto de la Cadena Productiva de Aceites Esenciales de CENIVAM. UIS. Bucaramanga.	61
Figura 14.	Montaje empleado para evaluar el tipo de fibra de SPME, para extraer componentes volátiles de los aceites esenciales de <i>Lippia alba</i> y <i>Pelargonium graveolens</i>	62

Figura 15.	Dispositivo para SPME de <i>headspace</i> estático asistido por la radiación de microondas. El balón (1 L) al interior del horno, que contiene el material vegetal, está aislado del balón superior (50 mL), y solo la fase vapor en el recipiente superior se somete al muestreo de SPME a temperatura controlada	64
Figura 16.	Cromatógrafo de gases de alta resolución <i>Agilent Technologies 6890 Plus</i> , con detector selectivo de masas <i>Agilent Technologies MSD 5973</i>	71
Figura 17.	Cromatógrafo de gases de alta resolución <i>Agilent Technologies 6890N Plus</i> , con detector selectivo de masas <i>Agilent Technologies MSD 5975 Inert XL</i>	72
Figura 18.	Cromatógrafo de gases de alta resolución <i>Agilent Technologies 7890A</i> , con detector de ionización en llama FID	73
Figura 19.	Cantidad de compuestos volátiles del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> adsorbidos sobre diferentes recubrimientos de la fibra SPME. Temperatura: 60°C; Tiempo de exposición: 30 min; GC-FID, Columna DB-5 (60 m); Desorción 250°C (10 min)	75
Figura 20.	Cantidad de compuestos volátiles del aceite esencial de <i>Pelargonium graveolens</i> adsorbidos sobre diferentes recubrimientos de la fibra SPME. Temperatura: 60°C; Tiempo de exposición: 30 min; GC-FID, Columna DB-5 (60 m); Desorción 250°C (10 min)	75
Figura 21.	Cromatograma típico obtenido por GC-MS de los volátiles aislados por HS-SPME del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> . La identificación de los picos cromatográficos aparece en la Tabla 4 . Columna DB-5MS (60 m). <i>Split</i> 1:30: MSD (EI, 70 eV).	79

Figura 22.	Cromatograma típico, obtenido por GC-MS de los volátiles aislados del aceite esencial de <i>Pelargonium graveolens</i> HS-SPME. Columna DB-5MS (60 m), <i>split</i> 1:30. MSD (EI, 70 eV).	80
Figura 23.	Perfiles cromatográficos típicos obtenidos por GC-FID, de los volátiles aislados por MW-HS-SPME de A. Hojas de <i>Lippia alba</i> ; B. Su aceite esencial hidrodestilado. Compuestos mayoritarios: 1. Limoneno; 2. Carvona; 3. Bicyclosesquifelandreno.	85
Figura 24.	Perfiles cromatográficos típicos obtenidos por GC-FID, de los volátiles aislados por MW-HS-SPME de A. Hojas de <i>Pelargonium graveolens</i> ; B. Su aceite esencial hidrodestilado. Compuestos mayoritarios: 1. iso-mentona; 2. citronelol; 3. geraniol; 4. geranial	86
Figura 25.	Principales compuestos presentes en las fracciones volátiles del aceite esencial (FV-AE), hojas (FV-Hojas) y el aceite esencial obtenido por hidrodestilación (AE) de <i>Lippia alba</i> .	87
Figura 26.	Principales compuestos presentes en las fracciones volátiles del aceite esencial (FV-AE), hojas (FV-Hojas) y el aceite esencial obtenido por hidrodestilación (AE) de <i>Pelargonium graveolens</i>	88
Figura 27.	Respuesta experimental (A_{cm}/A_T , cuentas) para la extracción por MW-HS-SPME de los volátiles de <i>Lippia alba</i> Vs los valores obtenidos según el modelo matemático, al aplicar el diseño factorial 3^3 más estrella	94
Figura 28.	Respuesta experimental (A_{cm}/A_T , cuentas) para la extracción por MW-HS-SPME de los volátiles de <i>P. graveolens</i> Vs los valores obtenidos según el modelo matemático, al aplicar el diseño factorial 3^3 más estrella	94

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AE	Aceite(s) esencial(es)
ANOVA	Análisis de la varianza
C.V.	Coefficiente de variación
d.i.	Diámetro interno, mm
d_f	Espesor de la fase estacionaria, μm
e.g.	<i>Exempli gratia</i> (Por ejemplo)
EI	Energía de ionización
eV	Electrón – Voltio
FID	<i>Flame Ionization Detector</i> (Detector de ionización en llama)
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases o cromatógrafo de gases, según el contexto)
GC – FID	<i>Gas Chromatography with Flame Ionization Detector</i> (Cromatografía de gases con detector de ionización en llama)
GC – MS	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas)
HD	Hidrodestilación
HP	<i>Hewlett-Packard</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia)
HRGC	<i>High Resolution Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases de alta resolución)
HS	<i>Headspace</i> (Espacio de cabeza)
HS-SPME	<i>Headspace Solid - Phase Microextraction</i> (Microextracción en fase sólida en el modo <i>headspace</i>).
i.e.	<i>Id ets</i> (Es decir, o sea)
I_k	Índice de retención de Kováts
IR	Índice de retención
Istd	<i>Internal Standard</i> (Estándar interno)

<i>L. alba</i>	<i>Lippia alba</i>
LDO	<i>Limit of Detection</i> (Límite de detección)
LQO	<i>Limit of Cuantification</i> (Límite de cuantificación)
<i>m/z</i>	Relación masa carga
M	Monoterpeno (s)
MO	Monoterpeno(s) oxigenado(s)
MS	<i>Mass Spectrum, Mass Spectra, Mass Spectrometry</i> (Espectro(s) de masas o Espectrometría de masas, según el contexto)
MSD	<i>Mass Spectrometric Detector</i> (Detector selectivo de masas)
MT	Monoterpenona (s)
MV	Material vegetal
MW	<i>Microwave</i> (Microondas u horno de microondas), según el contexto
MWHD	<i>Microwave - Assisted Hydro - Destillation</i> (Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas).
MWHD-HS-SPME	<i>Headspace Solid-Phase Microextraction Microwave - Assisted Hydro - Destillation</i> (Microextracción en fase sólida en el modo <i>headspace</i> asistida por la radiación de microondas)
P & T	<i>Purge-and-Trap</i> (Purga y trampa)
PA	Poli(acrilato)
PDMS	Poli(dimetilsiloxano)
PDMS/DVB	Poli(dimetilsiloxano)/Divinilbenceno
<i>P. graveolens</i>	<i>Pelargonium graveolens</i>
PIB	Producto interno bruto
ppm	Partes por millón
PTFE	Poli(tetraflúoretileno)
S	Sesquiterpeno(s)
SDE	<i>Simultaneous Distillation- Solvent Extraction</i> (Destilación-

	Extracción simultánea con solvente)
SFE	<i>Supercritical Fluid Extraction</i> (Extracción con fluido supercrítico)
SPME	Microextracción en fase sólida
SO	Sesquiterpeno(s) oxigenado(s)
t_R	Tiempo de retención (min)
t_{RR}	Tiempo de retención relativo (min)
TIC	<i>Total Ion Current</i> (Corriente iónica total)

RESUMEN

TÍTULO: DESARROLLO DE UN MÉTODO RÁPIDO PARA ANALIZAR VOLÁTILES EN PLANTAS AROMÁTICAS POR MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA EN MODO *HEADSPACE*, ASISTIDA POR LA RADIACIÓN DE MICROONDAS*.

Autores: Diego Camilo Durán García **

Palabras clave: HS-SPME-MW, GC-FID/MS, volátiles, *Lippia alba*, *Pelargonium graveolens*.

Se emplearon la microextracción en fase sólida en modo *Headspace* asistida por la radiación de microondas ((HS-SPME-MW) y la cromatografía de gases (GC) para el desarrollo de un método rápido en la determinación de compuestos volátiles presentes en plantas de *Lippia alba* y *Pelargonium graveolens*. Se estudiaron los efectos del tiempo de irradiación y exposición de la fibra, el tipo de fibra, la potencia aplicada y la adición de agua. Se empleó un diseño experimental factorial 3^3 más estrella, donde las variables de respuesta fueron los componentes mayoritarios presentes en los aceites esenciales. Se obtuvieron los valores óptimos de cada variable y se determinaron las figuras analíticas de mérito. Se compararon los perfiles cromatográficos de los aceites esenciales de *L. alba* y *P. graveolens*, con los obtenidos de las fracciones volátiles por el método desarrollado.

Las condiciones óptimas de extracción para cada especie fueron las siguientes: *L. alba*: T= 3.42 min; P= 440 W; A= 24 mL; fibra PDMS-100 μm ; *P. graveolens*: T= 2.58 min; P= 770 W; A= 74 mL; fibra PA-85 μm . El desarrollo de este método permitió disminuir en dos horas el tiempo de análisis de los compuestos volátiles de estas plantas, comparado con el procedimiento tradicional de hidrodestilación (obtención del aceite esencial).

Al comparar los cromatogramas obtenidos de las fracciones volátiles de *Lippia alba* y *Pelargonium graveolens* empleando el método de HS-SPME-MW, con los perfiles cromatográficos de sus aceites obtenidos por hidrodestilación, se encontró que fueron cualitativamente similares, lo cual permite aplicar el método desarrollado, al análisis directo de las plantas cultivadas industrialmente, y a establecer el procedimiento como una prueba diagnóstica, para el análisis de calidad de los cultivos.

La evaluación de las figuras analíticas de mérito mostraron que el método desarrollado fue lineal, sensible y reproducible, de acuerdo con las Buenas Prácticas de Laboratorio.

* Trabajo de Investigación de Maestría en Química.

** Facultad de Ciencias, Escuela de Química.

Directores: Elena E. Stashenko y Jairo R. Martínez.

ABSTRACT

TITLE: DEVELOPMENT OF A FAST METHOD FOR ANALYSIS OF VOLATILE COMPOUNDS FROM AROMATIC PLANTS BY HEADSPACE-SOLID PHASE MICRO EXTRACTION ASSISTED BY MICROWAVE RADIATION*.

Authors: Diego Camilo Durán García **

Keywords: HS-SPME-MW, GC-FID/MS, volatile, *Lippia alba*, *Pelargonium graveolens*.

Headspace-Solid Phase Micro Extraction assisted by Microwave Radiation (HS-SPME-MW) and Gas Chromatography (GC), were used to develop a new fast method to study volatile compounds from *Lippia alba* and *Pelargonium graveolens* plant species. In the experiment, were studied several factors, such as irradiation time, fiber exposure, fiber coatings, microwave oven potency, and water addition. A factorial experimental design 3³ plus star was used, and the major compounds in the essential oils were the response variables. There were obtained the optimal values for each variable and the analytical figures of merit. The chromatographic profiles of *L. alba* y *P. graveolens* essential oils were compared with those obtained from the volatile fractions extracted by the method developed.

The following are the optimal extraction conditions for each plant species: *L. alba*: T= 3.42 min; P= 440 W; A= 24 mL; fiber PDMS-100 µm; and *P. graveolens*: T= 2.58 min; P= 770 W; A= 74 mL; fiber PA-85 µm. The development of this method takes a shorter time of analysis (2 hours less) than in the traditional procedure of hydrodistillation (essential oil obtention).

The comparison between the chromatograms corresponding to the volatile fractions of *Lippia alba* and *Pelargonium graveolens* obtained by the new methodology HS-SPME-MW, and the chromatograms of the essential oils obtained by hydrodistillation, showed that both profiles for each specie were qualitatively similar. As a result, the developed method can be applied to the direct analysis of industrial cropped plants, and this methodology can be standardized as a screening test for analysis of crops quality.

The evaluation of the analytical figures of merit showed that the new method developed was lineal, sensible and reproducible, as Good Laboratory Practice states.

* Trabajo de Maestría en Química.

** Facultad de Ciencias, Escuela de Química.

Directores: Elena E. Stashenko y Jairo R. Martínez.

1. INTRODUCCIÓN

Colombia es un país con una tradición agroindustrial muy poco diversificada, que requiere con urgencia el aumento de la producción económica rural variada, para elevar los niveles de vida y disminuir los problemas sociales complejos que ha acarreado el desplazamiento masivo de los campesinos hacia las ciudades, observado en las últimas décadas. El sector agropecuario produce el 22% del PIB, el 28% de las exportaciones y genera el 28% del empleo. De las tierras arables, el 79% se emplea en pastos. El 8.7% se utiliza en agricultura y solamente el 4% (2 millones de hectáreas) se consagra a cultivos permanentes. El café ocupa el 41% de esta superficie, seguido por la caña panelera (10%), la caña de azúcar (8.5%), la palma africana (7.5%), el cacao (4%) y el banano (2.2%) [84]. Tal como lo demuestra la experiencia de otros países tropicales, la agroindustria de plantas medicinales y aromáticas permite diversificar los cultivos, aumentar el uso productivo de la tierra y estimular el desarrollo económico rural, a través de actividades relacionadas con el cultivo, la cosecha, el procesamiento y la comercialización de los productos. Las limitaciones que se han encontrado para el desarrollo de la agroindustria en diversos países se centran en medidas de política e infraestructura de apoyo inadecuadas, acceso restringido a la tecnología, falta de investigación sistemática, escasez de unidades de producción a escala científica y comercial, falta de control de calidad adecuado, evaluaciones farmacológicas y acuerdos regulatorios definidos [90]. La consolidación de una industria de aceites esenciales, capaz de competir en el mercado internacional, requiere la capacitación y la formación de recursos humanos que la respalden científica y técnicamente en áreas como análisis, control de calidad, extracción y transformación de esencias, además de asesoría en el cultivo, la recolección de materia prima, el almacenamiento y el tratamiento postcosecha [79].

Los aceites esenciales son productos agroindustriales de alto valor agregado. Son mezclas complejas de compuestos orgánicos volátiles, productos del metabolismo secundario de las plantas aromáticas. Se emplean para la elaboración de saborizantes, aromatizantes, licores, perfumes, artículos de aseo, como materias primas para productos farmacéuticos, en la síntesis orgánica fina y, principalmente, en la conformación del sabor de alimentos y bebidas [80]. El mercado de los aceites esenciales es bastante dinámico, competitivo y en continua transformación, para adaptarse a las exigencias del consumidor [80]. A raíz de las preferencias actuales por productos naturales, los materiales derivados de plantas constituyen alrededor del 25% de los ingredientes de la perfumería y esta proporción va en aumento. El mercado internacional de aceites esenciales representa unas 100.000 toneladas métricas anuales, que corresponden a más de 900 millones de dólares. El 85% del mercado de esencias está representado por las esencias de naranja, limón, citronela, menta, cedro, limonaria, lavandas y lavandinas. Las especies más importantes en cuanto a su valor comercial son las de menta, limón, rosa, jazmín, especies con citral (por ejemplo, en el aceite esencial de *Lippia citriodora* colombiana el citral representa > 50%), sándalos, vetíver, patchulí, geranios, cedros, lavandines, citronela y cítricos [80]. El 75% de los volúmenes exportados va a los EE.UU., la Unión Europea y Japón. Otros mercados importantes son Hong Kong, Brasil, Corea, Canadá, Australia e India. Hay numerosas plantas aromáticas silvestres y cultivadas (muchas introducidas) en Latinoamérica y en el Caribe, que se usan para extraer aceites esenciales. Entre ellas están: amyris (*Amyris balsamifera*), hoja de laurel (*Laurus nobilis*), cabreuva (*Myrocarpus frondosus*), cedro (*Cedrus spp.*) citronela (*Cymbopogon citratus*), eucalypto (*Eucalyptus spp.*), hierba de limón (*Cymbopogon flexuosus*), nuez moscada (*Myristica fragrans*), pimienta de Jamaica (*Pimenta officinalis*), aniba (*Aniba rosaeodora*), sazafrán (*Ocotea pretiosa*), avellano (*Gevuina avellana*) y vetíver (*Vetiveria zizanioides*), entre otras [80]. El cardamomo (*Elettaria cardamomum*) se cultiva industrialmente

en Guatemala, Honduras y Costa Rica, la nuez moscada (*Myristica fragrans*) en Grenada, donde este producto alcanzó a contribuir con cerca del 40% de las ganancias por exportación del país [90]. Uno de los principales exportadores de aceites esenciales es Guatemala, con una exportación anual de alrededor de 300 toneladas métricas [51]. Otros países, con una importante actividad en este campo, son Argentina, Brasil, Grenada, Jamaica, Haití, Perú y República Dominicana. Chile es país productor y exportador de aceites de eucalipto, de avellanas y de rosa mosqueta [91].

En el mercado internacional, el valor comercial de un aceite esencial está determinado principalmente por su composición química y la evaluación o calidad sensorial. Además de la presencia de determinados componentes de interés en ciertos niveles de concentración, el uso industrial de aceites esenciales como ingredientes naturales en productos de consumo humano, requiere que la composición del aceite presente pocas fluctuaciones composicionales entre lotes. El proveedor de aceites esenciales debe garantizar la **calidad** del aceite y la **continuidad** de su suministro, así como la **cantidad** requerida, para poder ganarse la **confianza** del comprador (Regla de las 4C) [80]. Las plantas aromáticas suelen presentar una notable variación en cuanto a sus calidades, principalmente debido a la existencia de los llamados “quimiotipos”, que son individuos de una misma especie, morfológicamente idénticos, pero diferentes en la composición química de sus aceites [9]. En la literatura científica hay reportes sobre fluctuaciones cualitativas y cuantitativas apreciables de la composición de los aceites esenciales aislados de la misma planta. Entre otras variables, estas fluctuaciones depende de su origen geográfico, la época del año, las condiciones del suelo, la densidad de plantación, la pluviosidad y la presencia de plagas [58]. No es fácil obtener una calidad normalizada o constante de un aceite esencial, si no se tiene un estudio previo de estas variables sobre la composición química y el rendimiento del aceite. Este conocimiento es una herramienta muy valiosa y su dominio permite una

competencia exitosa en el mercado. Por esta razón, la presente investigación busca aportar una información importante sobre el análisis rápido de la materia prima (plantas aromáticas), para la obtención de aceites esenciales, lo cual contribuiría significativamente a la garantía de la calidad del producto obtenido, ya que se tendría información confiable acerca del momento oportuno para realizar el corte del material vegetal y, de esta forma, garantizar la obtención de un producto de calidad máxima.

La composición de los aceites esenciales se determina por la cromatografía de gases (GC) de alta resolución con diferentes sistemas de detección [52]. El procedimiento estandarizado para el análisis de un aceite esencial requiere de su obtención mediante la técnica de hidrodestilación con equipo tipo *Clevenger* [28], posteriormente, se debe preparar la muestra, adicionando un agente secante al AE, usualmente, sulfato de sodio anhidro y, finalmente, se toma una alícuota diluida en un solvente orgánico, para su posterior análisis por GC. Este procedimiento tarda aproximadamente 3-4 o más horas. La implementación de la técnica de SPME asistida por la radiación de microondas planteada en la presente investigación, acorta el tiempo de obtención y análisis, y a la vez, que se elimina el uso de solventes en la preparación de la muestra, y permite emplear cantidades pequeñas de material vegetal.

2. CIENCIOMETRÍA

La cienciometría estudia los aspectos “cuantitativos” de la ciencia como disciplina o actividad económica, permite medir y analizar a través de las publicaciones científicas, el estado actual y la dinámica experimentada por un tema particular, en un periodo de tiempo dado, para direccionar y planificar las investigaciones, analizar tendencias y comparar resultados [4]. Particularmente, para esta investigación se empleó la base de datos *Elsevier (Scopus)*, consultada desde el año 1996 y hasta el 31 de agosto de 2009, principalmente. La búsqueda en la base de datos se enfocó a las publicaciones en donde se mencionaran los “aceites esenciales”, el uso de la microextracción en fase sólida en modo *headspace* (HS-SPME), la extracción y caracterización de metabolitos secundarios de plantas aromáticas, junto con el empleo de la radiación de microondas como fuente de calentamiento de la muestra.

2.1. Relación año – número de publicaciones.

En la **Figura 1** se presenta la dinámica de investigación desde el año 1929 hasta la actualidad, sobre el tema de los aceites esenciales o metabolitos secundarios volátiles obtenidos de plantas aromáticas. Se observa la tendencia, durante los últimos 15 años, relacionada con el incremento en la producción intelectual, sobre el tema con 2290 publicaciones registradas en el año 2008. Este aumento en el estudio de aceites esenciales y plantas aromáticas se puede explicar en el sentido de la búsqueda de nuevos metabolitos, nuevas especies, nuevos aceites esenciales y nuevas aplicaciones de ingredientes naturales para su empleo en las industrias de alimentos, perfumes, cosméticos, productos de aseo, entre otras. La tendencia en aumento durante los últimos cinco años es muy marcada, ya que al comparar el número de publicaciones registradas durante los 50 años (1929-1979), con las registradas cada año desde 2004, se aprecia que su

número es casi el mismo en una escala de tiempo mucho más corto. Otro aspecto importante se relaciona con el mejoramiento general o su marcada aspiración de la calidad de vida de la población mundial, que busca cada vez más en los productos naturales, una alternativa importante para el cuidado de su salud.

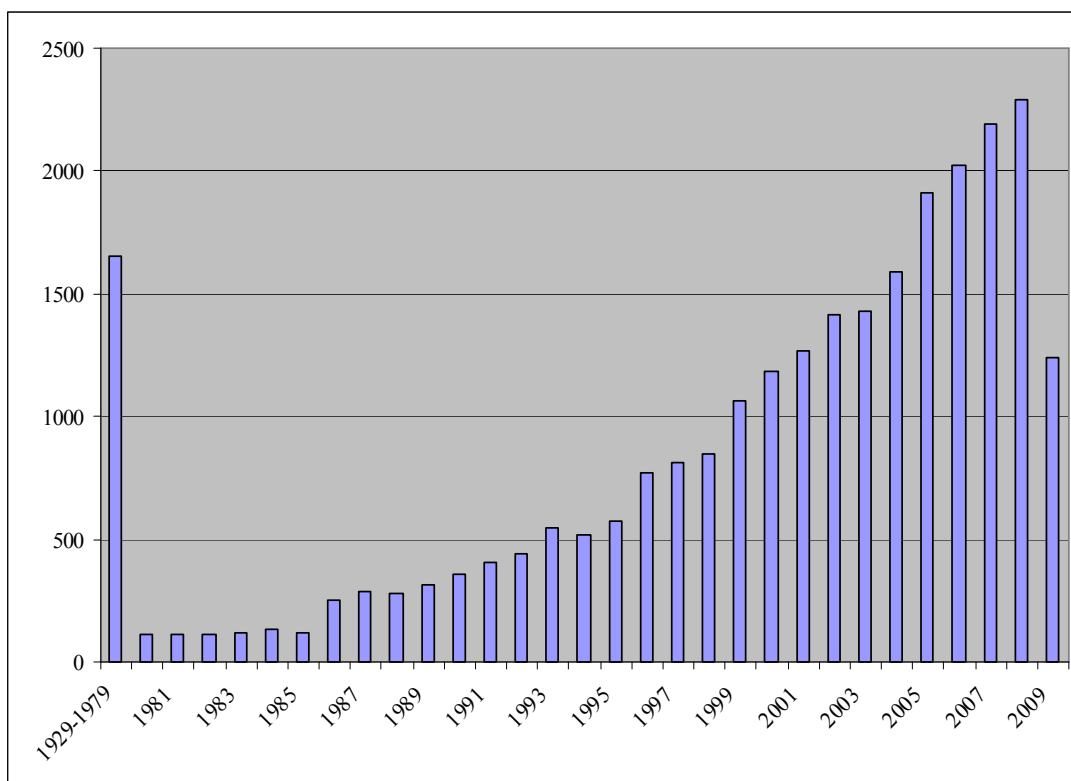


Figura 1. Número de publicaciones científicas sobre aceites esenciales o metabolitos secundarios de plantas aromáticas realizadas durante los años 1929-2009. Base de datos *Scopus* (*Elsevier*, B.V., 2009), palabras clave: “*Essential oil*”, “*Volatil oil*”, Ecuación de búsqueda: *Article, title, abstract*. Fecha de consulta: 31 de agosto de 2009.

En la **Figura 2** se presenta el número de publicaciones en donde se ha empleado la microextracción en fase sólida (SPME), para el análisis de aceites esenciales y/o metabolitos secundarios volátiles de plantas aromáticas y medicinales. Al igual que en el caso anterior, la tendencia en el empleo de la SPME es creciente durante los últimos diez años, presentando

un máximo de 40 publicaciones en el año 2008. La SPME, se emplea principalmente para el análisis de plantas aromáticas *in vitro*, para el estudio de sus aceites esenciales y la emisión *in vivo* de los componentes volátiles de plantas.

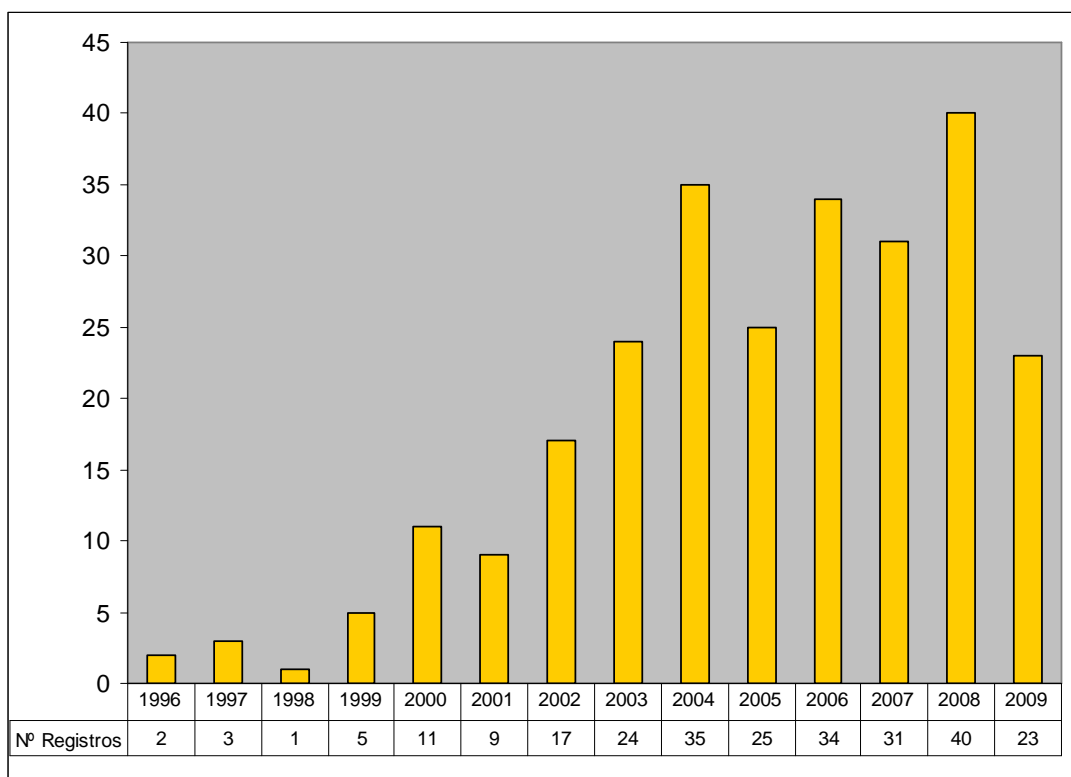


Figura 2. Número de publicaciones científicas sobre aceites esenciales o metabolitos secundarios de plantas aromáticas y microextracción en fase sólida, realizadas durante los años 1996-2009. Base de datos *Scopus* (*Elsevier*, B.V., 2009), palabras clave: “*Essential oil*”, “*Volatil oil*”, “*solid phase microextraction*”, Ecuación de búsqueda: *Article, title, abstract*. Fecha de consulta: 31 de agosto de 2009.

En la **Figura 3** se presenta el número de publicaciones en las cuales se han empleado la SPME, en combinación con la radiación de microondas como fuente de calentamiento. Según la tendencia observada, desde el año 2002, se registra un aumento general en la producción intelectual sobre este tema,

con un máximo de 26 publicaciones en el año 2007; durante los años 2005 y 2008 se presentó un descenso en el número de publicaciones, *i.e.*, año tras año los estudios que involucran SPME asistida por microondas fluctúan en número y, tal vez, será necesario tener un periodo de observación más largo, para vislumbrar la tendencia general en este campo.

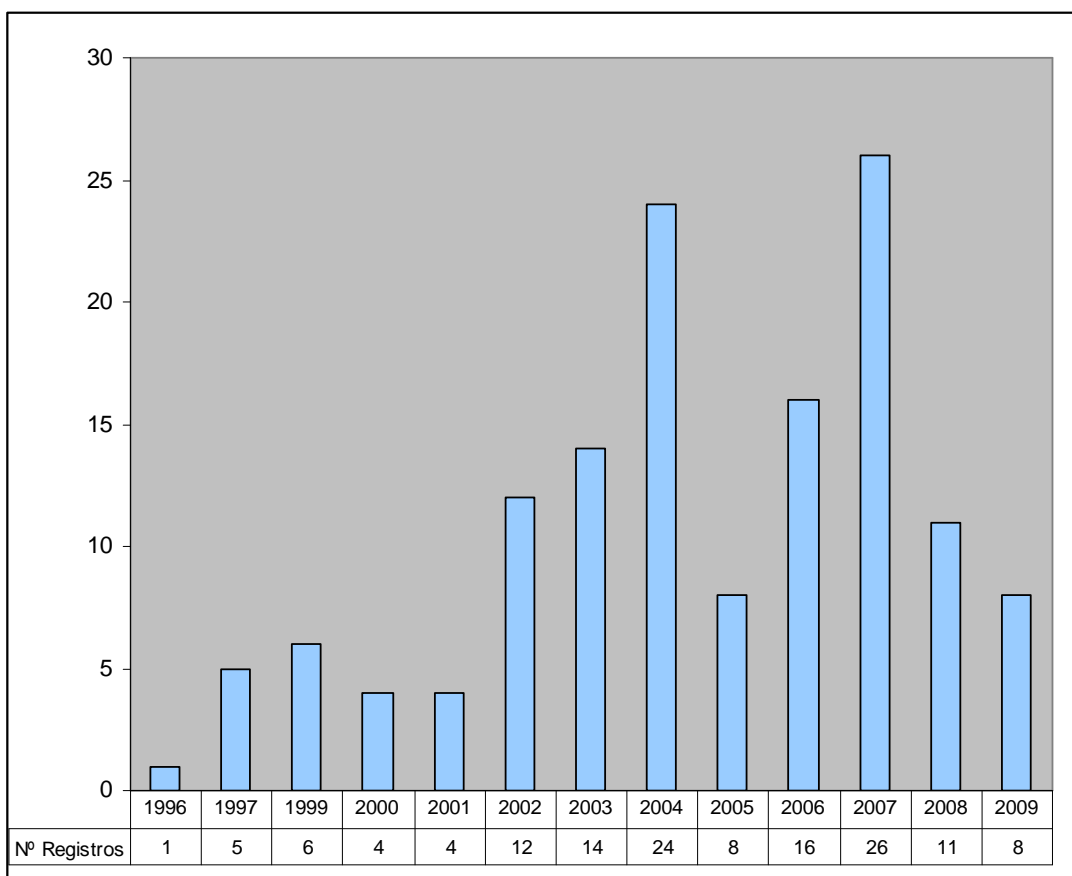


Figura 3. Número de publicaciones científicas sobre microextracción en fase solida asistida por la radiación de microondas, realizadas durante los años 1996-2009. Base de datos *Scopus* (*Elsevier*, B.V., 2009), palabras clave: “*Solid phase microextraction*”, “*Microwave*”; Ecuación de búsqueda: *Article, title, abstract*. Fecha de consulta: 31 de agosto de 2009.

2.2. Relación área de estudio – número de publicaciones

En la **Figura 4** se presentan las principales áreas de estudio, en las cuales se ha empleado la microextracción en fase sólida para el análisis de aceites esenciales y compuestos volátiles de plantas aromáticas. La principal área de aplicación es la química, en donde la SPME se emplea principalmente como método de extracción y concentración, seguida de las ciencias agrícolas y biológicas, en donde la SPME se usa para el seguimiento de la composición química de los aceites esenciales de plantas aromáticas y medicinales con posible aplicación agroindustrial y de otros aceites a partir de plantas cultivadas comercialmente. La técnica SPME también se emplea para la búsqueda de nuevas fragancias florales.

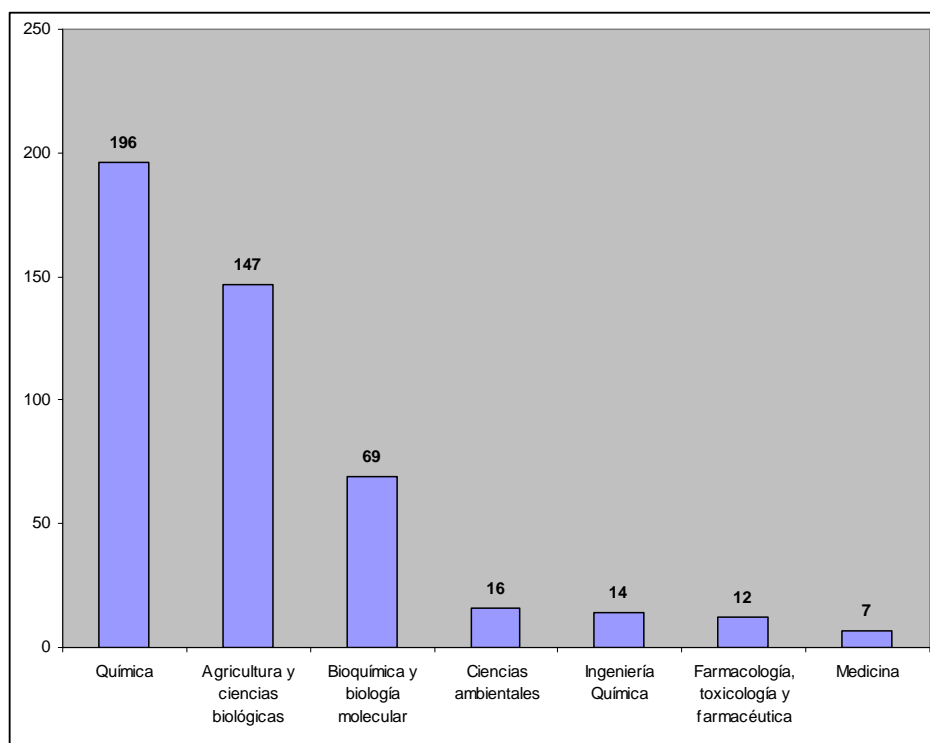


Figura 4. Relación entre el área de estudio y el número de publicaciones científicas sobre aceites esenciales o metabolitos secundarios de plantas aromáticas y microextracción en fase sólida, realizadas durante los años 1996-2009. Base de datos *Scopus* (*Elsevier*, B.V., 2009), palabras clave: “*Essential oil*”, “*Volatil oil*”, “*Solid phase microextraction*”, Ecuación de búsqueda: *Article, title, abstract*. Fecha de consulta: 31 de agosto de 2009.

La combinación de la microextracción en fase sólida con la radiación de microondas como fuente de calentamiento, es una metodología relativamente reciente, y se emplea principalmente en el área de química, para el análisis de productos naturales, pesticidas y algunos otros contaminantes presentes en suelos y sedimentos.

2.3. Relación revista – número de publicaciones

El mayor número de trabajos sobre SPME y aceites esenciales, más alto, aparece principalmente en las siguientes revistas científicas: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *Flavor and Fragrance Journal*, *Journal of Chromatography A* y *Journal of Essential Oil Research*. Ello indica que la técnica SPME, es una herramienta muy eficaz para la extracción y la concentración de compuestos volátiles en plantas aromáticas y medicinales (Véase **Figura 5**).

3. ESTADO DEL ARTE

La diversidad química grande de los metabolitos secundarios de las plantas aromáticas y medicinales, requiere en el campo del análisis fitoquímico, un “arsenal” de métodos muy completo para su extracción. Es así como se encuentran, entre otras, las técnicas destilativas, *e.g.*, la hidrodestilación (HD), la destilación por arrastre con vapor (AV) y la hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD) [53]. Las técnicas extractivas, *e.g.*, la destilación – extracción simultánea con solvente (SDE), la extracción con fluido supercrítico (SFE), la extracción líquido-líquido (LLE), también han sido utilizadas para el análisis de compuestos volátiles en plantas aromáticas [53]. Estos últimos métodos presentan, sin embargo, algunas desventajas, tales como el uso de disolventes, la posible pérdida de compuestos volátiles y la degradación de algunos de éstos, la eficiencia de la extracción es baja y los

tiempos requeridos para la extracción, la concentración y el análisis son relativamente largos. La principal ventaja del uso de la radiación de microondas en los métodos destilativos o extractivos, es la disminución en el tiempo de extracción y el uso de solventes transparentes a la radiación de microondas [28, 60].

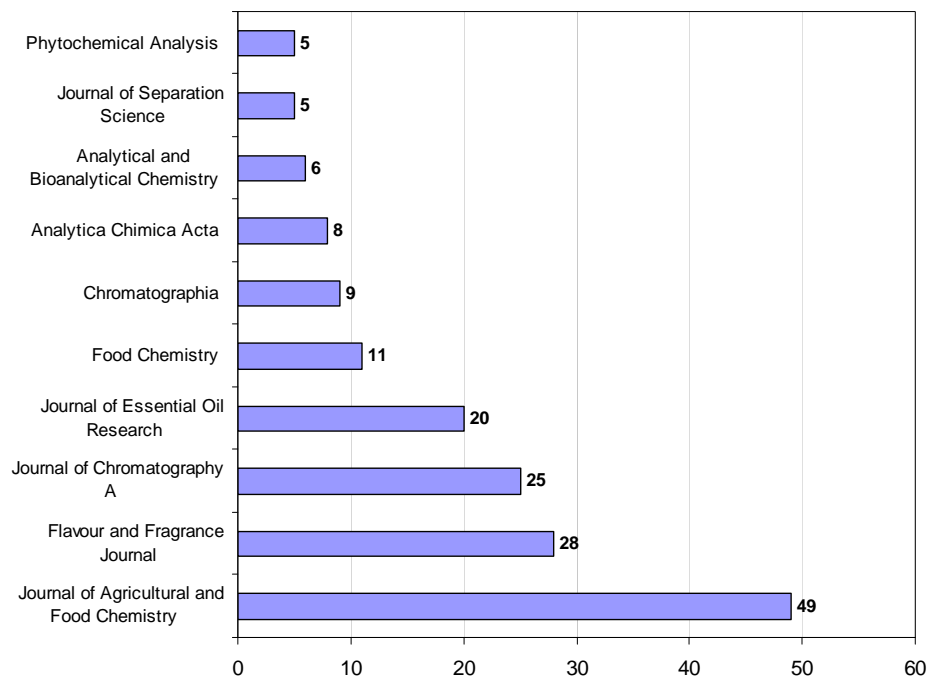


Figura 5. Relación entre revistas científicas y el número de publicaciones sobre aceites esenciales o metabolitos secundarios de plantas aromáticas y microextracción en fase sólida, realizadas durante los años 1996-2009. Base de datos *Scopus* (*Elsevier, B.V., 2009*), palabras clave: “*Essential oil*”, “*Volatil oil*”, “*solid phase microextraction*”; Ecuación de búsqueda: *Article, title, abstract*. Fecha de consulta: 31 de agosto de 2009.

Otro grupo de técnicas importantes para la extracción y el análisis de compuestos volátiles de plantas son las técnicas *headspace* (HS), entre las cuales figuran HS-dinámico o purga y trampa, HS-estático y la

microextracción en fase sólida (SPME) en el modo *headspace*. Esta última presenta ventajas importantes frente a otras técnicas, ya que en un solo paso se extraen, se concentran y se transfieren al equipo cromatográfico los analitos de interés [65].

Los métodos destilativos utilizados en la obtención de aceites esenciales (HD, AV, MWHD), usualmente requieren de grandes cantidades del material vegetal (>1-2 kg), mientras que para la determinación de la fracción volátil de una planta aromática empleando la SPME en modo *headspace*, se necesitan ca. 15-50 g, lo cual, constituye otra ventaja importante de esta novedosa técnica.

Es importante conocer la naturaleza química de los metabolitos que se van a extraer, ya que su volatilidad, el grado de complejidad de la matriz en donde se encuentran contenidos, así como su estabilidad térmica y resistencia al oxígeno presente, cambio del pH, serán aspectos importantes para escoger correctamente el método de extracción [53].

Las ventajas que presenta la radiación de microondas en los procesos extractivos, y la SPME en modo *headspace*, permitieron aprovecharlas en la presente investigación para desarrollar y aplicar un método sencillo, rápido y libre de disolventes, la extracción y la concentración de los componentes volátiles de las plantas aromáticas *Lippia alba* (pronto alivio) y *Pelargonium graveolens* (geranio) y su posterior análisis por cromatografía de gases.

En la **Tabla 1** se presenta un cuadro comparativo de las técnicas de extracción empleadas en la obtención de metabolitos secundarios volátiles y semi-volátiles de plantas.

Tabla 1. Principales técnicas de extracción de metabolitos secundarios volátiles y semi-volátiles de plantas aromáticas.

Técnica	Producto obtenido	Ventajas	Desventajas
I. Métodos destilativos			
Hidrodestilación	Aceite esencial	En el caso de la hidrodestilación asistida por microondas, el tiempo de destilación se disminuye en dos horas comparado con la hidrodestilación convencional.	Descomposición de algunos compuestos lábiles (formación de artefactos). Pérdida de compuestos volátiles. Requiere grandes cantidades de muestra. Tiempo de operación: 30 min – 4 h
Destilación agua/vapor	Aceite esencial		
Arrastre con vapor	Aceite esencial		
II. Métodos extractivos			
Extracción Soxhlet	Extracto	Este conjunto de técnicas permiten obtener metabolitos secundarios volátiles, semi-volátiles y compuestos de mayor peso molecular, dependiendo de las condiciones de la extracción (temperatura, disolvente, presión, etc).	Uso excesivo de solventes (tóxicos). Muchos pasos en la preparación de la muestra, requiere concentración de los analitos. Coextracción de otros compuestos, no volátiles (ceras, grasas). Tiempo de operación: 4-24 h
Destilación-extracción simultánea con solvente	Extracto		
Extracción con fluido supercrítico	Extracto		
III. Métodos de espacio de cabeza (<i>headspace</i>)			
HS estático	Fracción volátil	Tiempos de extracción más cortos; mayor eficiencia en la extracción de compuestos volátiles; disminución en el uso de solventes.	Posible formación de artefactos (P&T). Curva de calibración por separado para cada analito (HS-S). Saturación de la fibra (SPME). Tiempo de operación: 20 min – 4 h.
HS dinámico (P&T)	Fracción volátil		
HS-SPME	Fracción volátil y semivolátil		

3.1. MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

La SPME fue introducida como una técnica de extracción por primera vez en 1990 por Pawliszyn y sus colaboradores [64, 65]. La invención de la SPME parece ser un desarrollo lógico fundamentado en las columnas capilares usadas en cromatografía de gases. El diseño del dispositivo está basado en una jeringa modificada, la cual contiene un microtubo en acero inoxidable (aguja) donde se encuentra insertada una fibra de sílice fundida de una longitud de 1 cm, que está recubierta con un polímero orgánico (**Figura 6**). La fibra puede ser movida entre dos posiciones: dentro y fuera de la aguja (microtubo), con un émbolo parecido al de una jeringa normal [65, 85].

La microextracción en fase sólida tiene dos etapas: (I) la fibra recubierta se expone a la muestra, o a su *headspace*, donde ocurre la repartición de los analitos de interés entre la matriz de la muestra y el recubrimiento de la fibra; (II) los analitos extraídos y concentrados sobre el recubrimiento polimérico se transfieren al equipo instrumental (cromatógrafo) donde se desorben, y luego se separan y se cuantifican. El procedimiento de extracción y desorción puede observarse en la **Figura 7** [57].

Existen tres modos de operación de SPME, a saber: (1) extracción directa o por inmersión, (2) extracción en el modo *headspace* y (3) extracción con la fibra protegida por una membrana. En la extracción directa, la fibra se sumerge directamente en la muestra y los analitos se transportan de la matriz de la muestra al recubrimiento polimérico de la fibra (**Figura 8**) [57]. En el modo *headspace*, los analitos se transfieren a la fibra a través del espacio de cabeza de la muestra; este modo se recomienda cuando se requiere proteger la fibra de daños originados por interferencias con compuestos muy polares o de alto peso molecular (e.g. proteínas o ácidos húmicos), y el interés está concentrado solo en compuestos volátiles. La microextracción protegida con membrana, se emplea para la extracción de analitos presentes

en muestras muy contaminadas o con numerosas interferencias, con el propósito de proteger el recubrimiento de la fibra [3].

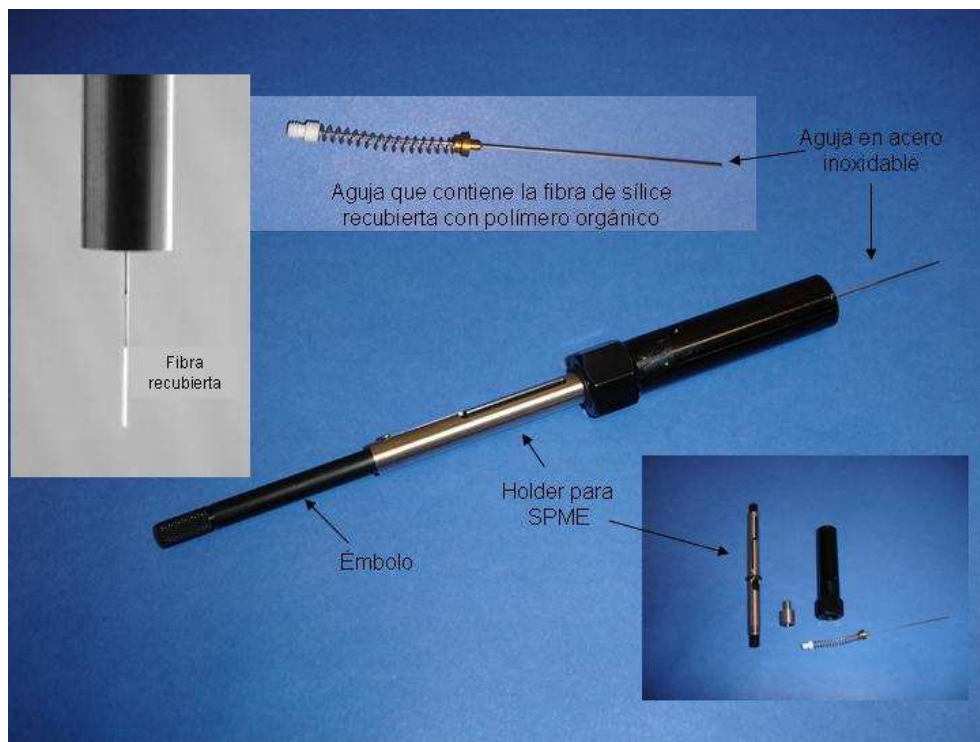


Figura 6. Dispositivo para microextracción en fase sólida (SPME).

(Fotografía Laboratorio de Cromatografía de la UIS)

Los aspectos termodinámicos de la SPME han sido ampliamente estudiados y muestran que la cantidad de analito extraído por el recubrimiento de la fibra es directamente proporcional a su concentración en la muestra, pero es independiente del modo de extracción con la fibra, *i.e.*, *headspace* o por inmersión, esto se cumple, siempre y cuando el recubrimiento, el espacio de cabeza y el volumen de la muestra se mantengan constantes [65].

Es importante estudiar los efectos de la temperatura, salino, la polaridad de la matriz de la muestra y el material del recubrimiento sobre el rendimiento y la reproducibilidad de la extracción y para establecer las condiciones óptimas con un número reducido de experimentos. La mayoría de los métodos SPME desarrollados hasta el momento, se usan en combinación con la

cromatografía de gases, con sistemas de detección adecuados para el tipo de compuestos que se analizan [3, 65].

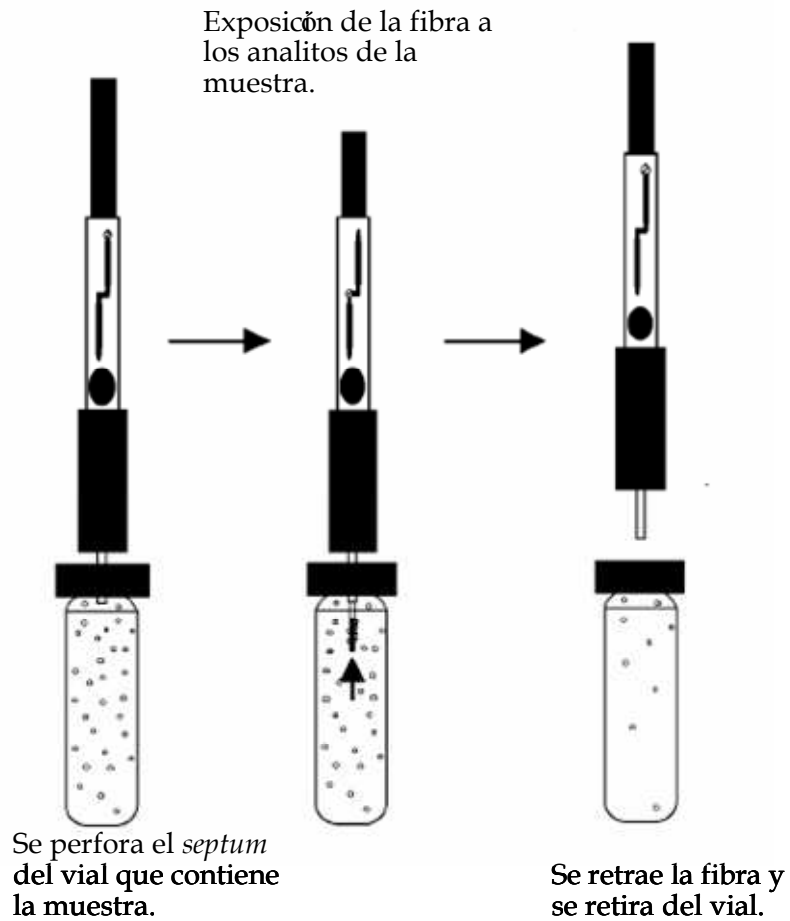
La SPME es una excelente alternativa para los métodos convencionales de extracción, su aplicación presenta muchas ventajas sobre otros métodos analíticos, dado que combina la extracción, la concentración y la transferencia directa de los analitos al sistema cromatográfico, GC o HPLC, en un solo paso [65]. La SPME permite analizar un amplio rango de sustancias, desde volátiles hasta no volátiles [3, 73], presentes en matrices gaseosas [44, 54, 65], líquidas [10, 76] o sólidas [45, 73].

3.1.1. Recubrimientos de la fibra

Los recubrimientos para las fibras usadas en la SPME, disponibles comercialmente, pueden ser clasificados en dos grupos, a saber: **I.** Recubrimientos poliméricos puros (polímeros homogéneos) y **II.** Partículas porosas embebidas en una fase polimérica (polímeros heterogéneos) [50]. El primer grupo está integrado por poli(dimetilsiloxanos), PDMS, de diferentes espesores (7, 30 y 100 μm), y poli(acrilato), PA, de 85 μm ; y el segundo grupo, por los siguientes adsorbentes [50, 86]:

- Poli(dimetilsiloxano)/Divinilbenceno (PDMS/DVB) de 60 y 65 μm ;
- Poli(dimetilsiloxano)/CarboxenTM (PDMS/Carboxen) de 75 μm ;
- Carbowax/Divinilbenceno (CW/DVB) de 65 μm ;
- Carbowax/Resina templada (CW/TPR) de 50 μm .

Extracción (1)



Desorción (2)

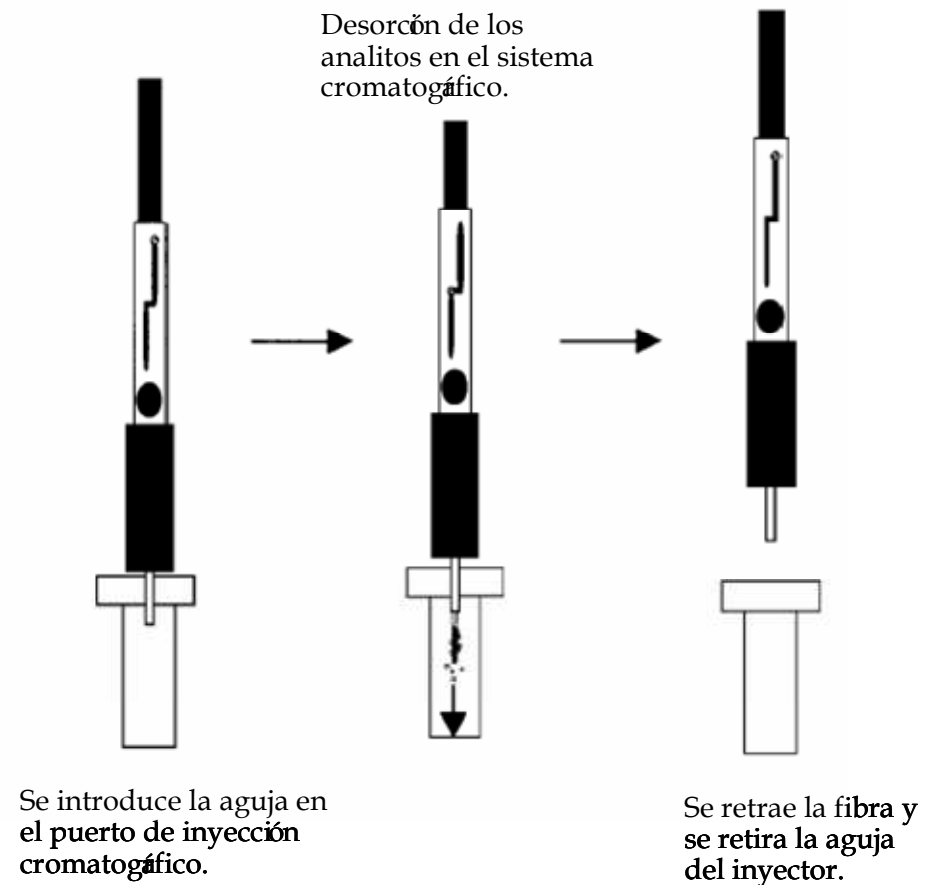


Figura 7. Procedimiento de (1) extracción y (2) desorción de la fibra de SPME [65].

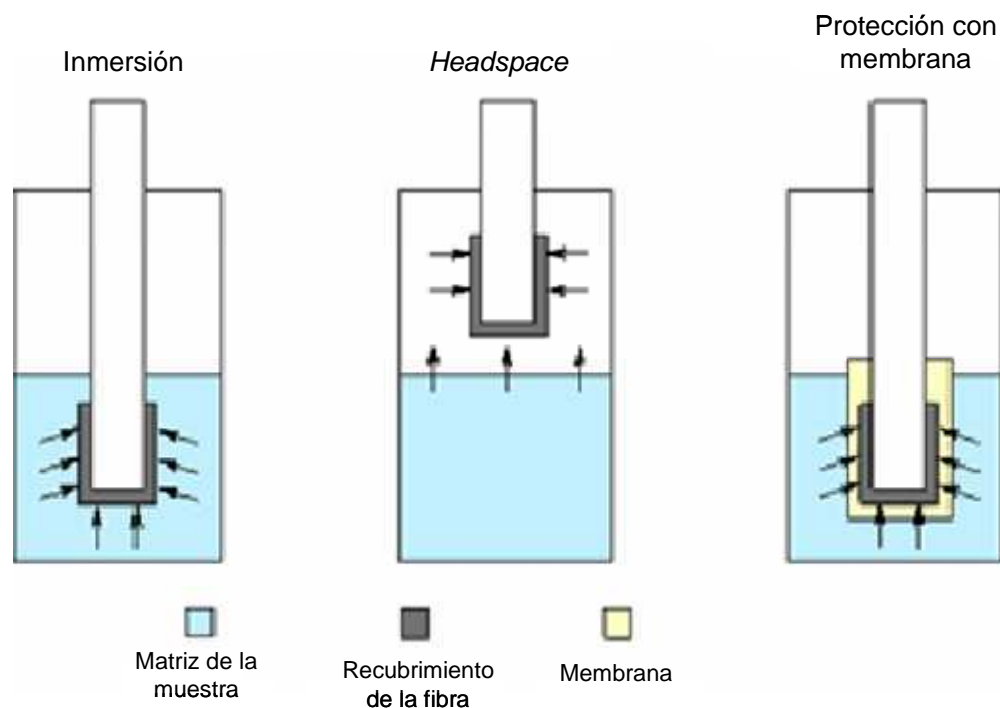


Figura 8. Diferentes modos de extracción por la técnica SPME [65].

Estos recubrimientos, a su vez, pueden clasificarse como no polares (PDMS), semipolares (PDMS/DVB y PDMS/Carboxen) y polares (PA, CW/DVB y CW/TPR) [50]. Además de las fibras comerciales, algunos autores han fabricado otros recubrimientos para aplicaciones más específicas, como, por ejemplo, los de carbón o poli(pirrol) [66, 86]. También se han desarrollado recubrimientos que permiten la extracción de compuestos organometálicos o compuestos inorgánicos que son difícilmente extraídos con las fibras disponibles comercialmente [66].

La selectividad de la fibra de extracción puede variarse cambiando el tipo de fase estacionaria (recubrimiento) o su espesor, según las características físico-químicas de los analitos a aislar [3, 65]. Por ejemplo, compuestos volátiles aromáticos y clorados de polaridad baja y constantes de distribución pequeñas, exigen el uso de una fase estacionaria apolar de espesor grueso para una ab(d)sorción eficiente; mientras que un recubrimiento delgado es

más apropiado para compuestos semivolátiles. La constante de distribución aumenta con el peso molecular y el punto de ebullición del analito [65].

La SPME es una técnica rápida y sensible, que involucra el proceso de repartición de los analitos entre la matriz y el recubrimiento de la fibra. Una vez se ha alcanzado el equilibrio de fases, la fibra es transferida al instrumento analítico (cromatógrafo) donde se llevan a cabo la desorción, la separación y la cuantificación de los componentes de la muestra. La desorción ocurre directamente en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases, o en una interfase, como es el caso de la HPLC [3]. Después de cada proceso de extracción y desorción, se incluye un paso de limpieza de la fibra.

En la microextracción en fase sólida, la cantidad de analitos retenidos por la fibra en el estado del equilibrio, depende linealmente de su concentración, según la siguiente expresión [65]:

$$n_s = KV_s C$$

Donde:

n_s : Moles adsorbidas por la fase estacionaria (*f.e.*);.

K: Constante de distribución;

V_s : Volumen del recubrimiento (*f.e.*) de la fibra;

C: Concentración de analitos en la muestra.

En condiciones de equilibrio, la cantidad de compuestos extraídos es independiente de la localización de la fibra en el sistema, es decir, ésta puede estar ubicada en el HS o inmersa en la muestra [65]; siempre y cuando los parámetros operacionales tales como el tipo del recubrimiento polimérico, los volúmenes del espacio de cabeza y de la muestra, el tiempo de muestreo y el modo de la agitación, se mantengan constantes [3, 65].

Las condiciones de extracción en SPME se ven afectadas por agitación de la muestra, ya que se permite lograr el equilibrio más rápidamente, gracias a la difusión más eficiente de los analitos hacia la fibra. Los compuestos con coeficientes de difusión muy bajos tienen tiempos de equilibrio más largos. En este caso, para disminuir el tiempo de análisis es necesario construir una curva que relacione la dependencia del tiempo de exposición de la fibra con la concentración del analito. El tiempo más corto, es escogido de acuerdo con el límite de detección para el compuesto de interés; de igual manera, se hace necesario controlar el tiempo de exposición con el fin de obtener una buena reproducibilidad. La temperatura de extracción, también debe ser considerada, ya que puede tener dos efectos sobre la SPME, a saber: su aumento favorece la difusión de los analitos hacia la fibra, además, en el modo *headspace*, la temperatura ayuda a promover la transferencia de analitos a la fase vapor de la muestra; sin embargo, como la adsorción es un proceso exotérmico, un incremento de la temperatura reduce la constante de distribución del analito. El pH de la muestra es importante para el análisis de compuestos de naturaleza ácida o básica (fenoles y aminas), puesto que se requiere que estas sustancias se mantengan en su forma no disociada. El efecto salino o “*salting out*” se logra mediante la adición de sal, por ejemplo, cloruro de sodio (NaCl) o sulfato de sodio (Na₂SO₄), con la finalidad de aumentar la fuerza iónica de la solución, para que los compuestos orgánicos sean menos solubles, incrementando así, los coeficientes de partición [3].

Las siguientes son algunas de las variables, que pueden afectar la SPME [57, 65]:

- Condiciones de agitación;
- Tiempo de muestreo (si no se logran condiciones de equilibrio);
- Temperatura;
- Volumen de la muestra;
- Volumen de *headspace*;

- Tamaño del vial;
- Tipo de fibra;
- Componentes de la matriz de la muestra (sales, materia orgánica, humedad, etc.);
- Tiempo que transcurre entre la extracción y el análisis;
- Pérdida de analitos (por adsorción en la paredes del vial, permeación a través del teflón, absorción por el *septum*);
- Modo de inyección al equipo cromatográfico.

La SPME fue diseñada inicialmente como un método de extracción para su aplicación en el análisis ambiental, por ello se encuentran numerosos trabajos de investigación en esta área, que incluyen diferentes matrices, e.g., aire, aguas superficiales y subterráneas, agua de mar, aguas de desecho y suelos [3, 85]. Actualmente, el campo de aplicación de la SPME ha sido ampliado a otras esferas, una muestra de ello, lo constituyen las numerosas publicaciones que se pueden encontrar en las siguientes áreas: artículos con información general sobre la técnica (5%), aplicaciones ambientales (40%), análisis de alimentos, productos naturales (20%), aplicaciones clínicas y forenses (20%) y reportes sobre desarrollos fundamentales de la técnica (15%) [3]. Muchos trabajos reportan la combinación de la SPME con cromatografía de gases (GC) con detectores específicos, y, sólo un pequeño porcentaje (5%) emplea la cromatografía líquida de alta eficiencia como procedimiento analítico.

Recientemente, para la extracción de productos naturales se emplea la radiación de microondas como medio de calentamiento de la muestra [18-20, 55, 60, 94-96, 98]. La tendencia actual en el empleo de esta técnica es creciente, tal como lo presenta la **Figura 9**. Particularmente, el sistema de la SPME combinado con la radiación de microondas, ha sido utilizado para el análisis de pesticidas, PCB's y otros contaminantes en suelos y sedimentos para analizar la fracción volátil de plantas aromáticas y medicinales. El

mayor número de trabajos publicados sobre SPME se encuentran principalmente en las siguientes revistas científicas: *Journal of Chromatography A*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *Analytical Chemistry* y *Analytica Chimica Acta*, lo cual indica que la técnica de SPME es una de las herramientas analíticas más eficientes en el análisis ambiental y para la extracción de compuestos volátiles en plantas aromáticas y medicinales.

La técnica de SPME presenta ventajas importantes [35, 59, 65, 74], que se pueden resumir de la siguiente manera: **1.** El tiempo de uso de las fibras es relativamente largo, comparado con el requerido por los sorbentes empacados, ca. 200 operaciones por fibra; **2.** El tiempo de muestreo es relativamente corto, usualmente menos de 1 hora; **3.** El procedimiento de extracción es más simple que el de los métodos convencionales, además la pérdida de los analitos durante la extracción es mínima; **4.** No involucra etapas adicionales de preparación y limpieza de la muestra y no requiere el uso de disolventes durante la preparación de la muestra; **5.** Se puede aplicar a un amplio espectro de analitos, en una variedad de matrices líquidas, sólidas y/o gaseosas; **6.** Es compatible con diferentes sistemas de inyección en el GC: *split*, *splitless*, *on-column* y vaporizador de temperatura programada (PTV); así como en HPLC; **7.** Fácil muestreo en campo: el equipo es liviano y compacto; **8.** Se puede automatizar el muestreo y la inyección de la muestra al cromatógrafo;

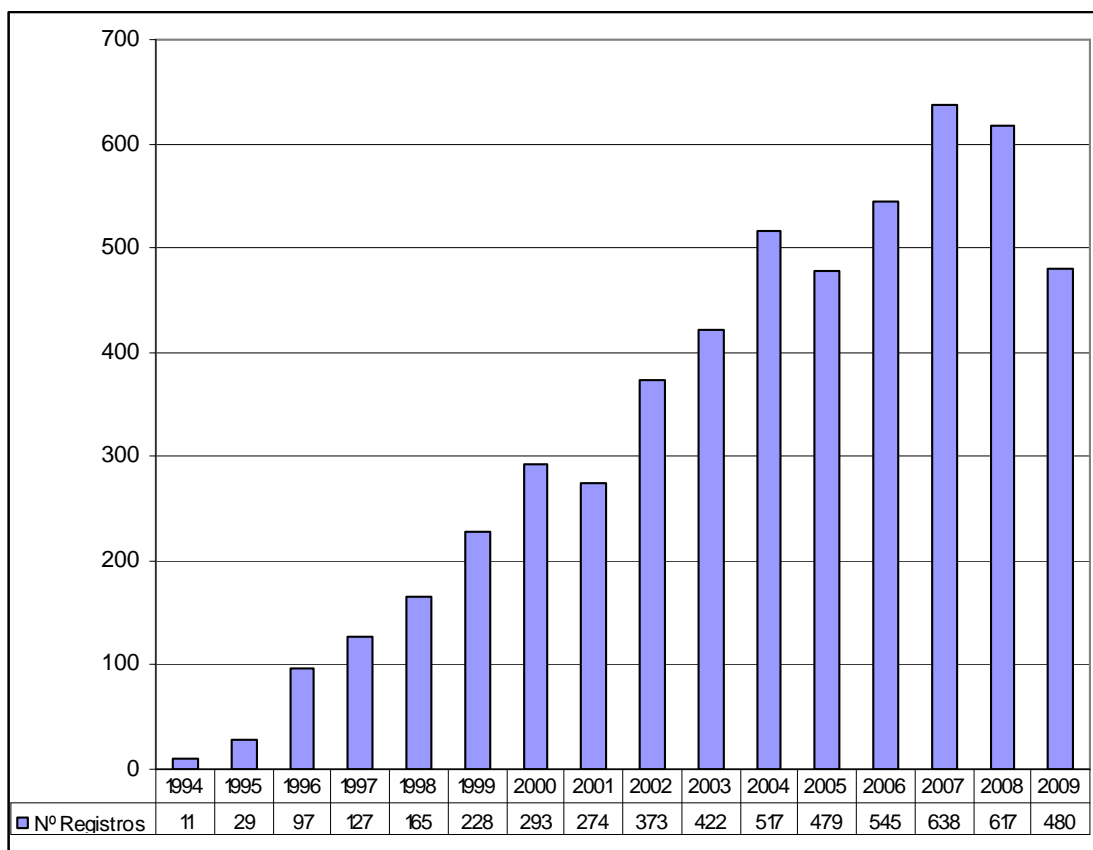


Figura 9. Número de trabajos científicos publicados durante los últimos quince años, donde se ha utilizado la SPME. Base de datos *Scopus* (Elsevier, B.V., 2009), palabras clave: “*Solid phase microextraction or SPME*”, Ecuación de búsqueda: *Article, title, abstract*. Fecha de consulta: 21 de septiembre de 2009.

Sin embargo, como cualquier método extractivo, la SPME presenta también algunas desventajas, entre las cuales figuran las siguientes: **1.** Los analitos de baja volatilidad no alcanzan el equilibrio de partición rápidamente; **2.** La estabilidad de algunos analitos, durante el almacenamiento de la fibra, una vez realizada la extracción, es mínima (menos de 1 hora, excepto bajo refrigeración); **3.** El tiempo de equilibrio varía ampliamente con la temperatura; **4.** En algunos casos se requieren estándares gaseosos para la calibración y la muestra puede consumirse completamente sin la oportunidad

de hacer réplicas; **5.** Las fibras son bastante frágiles; **6.** Si el coeficiente de partición es alto y/o la muestra es de tamaño pequeño, ésta debe ser analizada inmediatamente; **7.** En combinación con GC, la técnica no puede aplicarse a compuestos con pesos moleculares altos; **8.** En muchas situaciones se dificulta la selección del recubrimiento de la fibra, con la polaridad cercana a la de los analitos, sobre todo, cuando éstos son de volatilidad y polaridad diferentes.

3.1.2. Aplicación de la SPME para el análisis de compuestos volátiles en plantas aromáticas.

La SPME se ha utilizado recientemente en el estudio de plantas aromáticas y aceites esenciales, a saber: semillas de *Trigonella foenum-graceum* [56], hojas y tallos de tomillo [21], rizomas de *Rhodiola rosea* [39], análisis de plantas y aceites esenciales del género *Piper* en Camerún [40], composición de la fracción volátil del aceite esencial de Lavanda (*Lavandula canariensis*) en Australia [61], estudio de la composición del aceite esencial y emisión en vivo de los componentes volátiles de cuatro especies de la familia Lamiaceae [29]. En Colombia se llevó a cabo el análisis de la fracción volátil de plantas de la familia Verbenaceae [77, 78], y estudio de fragancias florales [32]. En varios trabajos se realizaron estudios comparativos del aceite esencial de *Smallanthus sonchifolius* (Yacón) utilizando diferentes recubrimientos [1], de los coeficientes de partición de compuestos presentes en los aceites esenciales de romero, albahaca, citronela y clavo [46], análisis de calidad del aceite esencial de bergamota [69], entre algunas otras aplicaciones. El uso de la SPME para el estudio de plantas aromáticas es cada vez más creciente, sin embargo, el principal problema que presenta esta técnica para el análisis de plantas, está relacionado con su reproducibilidad, debido principalmente a la necesidad de mantener la temperatura estrictamente constante y a los fenómenos de competencia que ocurren en la fibra entre los

compuestos volátiles y semivolátiles cuando el tiempo de exposición es mayor de 30 min [77].

Una innovación interesante en la aplicación de la técnica de SPME, implementada durante los últimos cuatro años, es el uso de la radiación de microondas para el calentamiento de la muestra. Con ello, se busca básicamente disminuir los tiempos de análisis, debido al calentamiento localizado del agua que contienen *e.g.*, las plantas; o por la adición del agua o solventes polares que se añaden para la extracción de los componentes de interés. En la **Tabla 2** se presenta un cuadro comparativo de los estudios, en los cuales se ha empleado el uso de la radiación de microondas, combinado con la SPME.

3.2. Extracción asistida por la radiación de microondas (MW)

El desarrollo del sistema de radar durante la Segunda Guerra Mundial estimuló también la aplicación de las microondas a otros campos de tecnología. La primera aplicación exitosa de las microondas fue para calentar diferentes matrices, incluidos los alimentos. Desde los años 40 comenzaron los estudios sobre las aplicaciones industriales del calentamiento por microondas, entre las cuales figuraron el tratamiento del carbón para eliminar el azufre y otros contaminantes orgánicos, el temple de alimentos congelados, la vulcanización del caucho y productos de pasta secos, entre otros [42]. Una muy interesante aplicación de microondas fue su uso en un sistema de secado para determinar la humedad y la grasa cruda en carne y productos avícolas [42].

Tabla 2. Estudios publicados sobre metabolitos secundarios de plantas que involucran el uso de la radiación de microondas en combinación con la microextracción en fase sólida (SPME).

Planta bajo estudio	VARIABLES EVALUADAS	Resultados	Referencias	Observaciones
<i>Artemisia selengensis</i>	Recubrimiento de la fibra Potencia de microondas Tiempo de exposición	Fibra de PDMS/DVB Potencia: 400 W Tiempo: 3 min	Chunhui Deng. <i>et al</i> , 2006 [18]	Resultados comparables con los obtenidos por arrastre con vapor
<i>Flos chrysanthemi indicii</i>	Recubrimiento de la fibra Potencia de microondas Tiempo de irradiación Temperatura Efecto "salting out" Modo de agitación	Fibra de PDMS/DVB Potencia: 400 W Tiempo: 4 min Temperatura: 40°C Sin adición de sal Agitación: 1100 rpm	Chunhui Deng. <i>et al</i> , 2006 [19]	Se cuantificaron borneol y alcanfor, compuestos que determinan la calidad de este aceite esencial.
Rizomas de cúrcuma	Recubrimiento de la fibra Potencia de microondas Tiempo de irradiación Temperatura Efecto "salting out" Modo de agitación	Fibra de PDMS-100µm Potencia: 700 W Tiempo: 4 min Temperatura: 80°C NaCl 40% (p/v) Agitación: 1100 rpm	Chunhui Deng. <i>et al</i> , 2006 [20]	La composición de volátiles se comparó con la del AE obtenido por arrastre con vapor, se cuantificaron curcumol, curdiona y germacrona.
<i>Zingiber officinalis</i> (Jengibre)	Recubrimiento de la fibra Potencia de microondas Tiempo de irradiación	Fibra de PDMS/DVB Potencia: 400 W Tiempo: 2 min	Yingjia Yu. <i>et al</i> , 2006 [95]	Se comparó con la composición de volátiles aislados por HS-MW-SPME en modo <i>headspace</i> con la obtenida por HS-SPME, sin calentamiento con MW.
Rizomas de <i>Atractylodes lancea</i>	Recubrimiento de la fibra Potencia de microonda Tiempo de irradiación Adición de polvo de hierro	Fibra de PDMS-65µm Potencia: 400 W Tiempo: 2 min	Ning Li. <i>et al.</i> , 2006 [60]	Comparado con HS-SPME, MW-HS-SPME resultó ser un método más eficiente, ya que se requiere menor tiempo para la extracción de compuestos volátiles y semivolátiles.

Debido a la necesidad de una mejor comprensión sobre cómo interactúan las microondas con diferentes muestras, y de tener un *hardware* apropiado, la aceptación más amplia de la tecnología de microondas para calentamiento rápido y secado durante la extracción y análisis de las muestras fue muy lento.

El calentamiento con la radiación de microondas involucra la absorción de la energía por parte del material que se va a calentar. La energía de microondas es no ionizante y causa movimiento molecular rotacional por migración de iones, así como por la rotación de dipolos, sin embargo, esta energía no es suficiente para provocar cambios en la estructura molecular, *i.e.*, romper un enlace químico. Las siguientes frecuencias son las más empleadas para fines industriales y científicos en el uso de la radiación de microondas, a saber: 915; 2450; 5800 y 22.125 MHz, siendo 2450 MHz, la frecuencia más utilizada, principalmente, en hornos convencionales. La energía de salida más frecuente es de 600 a 700 W, en tiempos de 5 min, lo cual genera cerca de 43.000 calorías [42].

La energía de la radiación de microondas absorbida por las diferentes matrices que se calientan, se disipa mediante dos mecanismos, *i.e.*, conducción iónica y rotación dipolar. En muchas aplicaciones, ambos mecanismos suceden simultáneamente. En el primer caso, sucede la migración por conducción de los iones disueltos en la matriz, debido a un campo electromagnético aplicado; esta migración iónica es un flujo de corriente que se traduce en pérdidas de IR^2 (producción de calor), debido a la resistencia al flujo de los iones. Todos los iones en la solución contribuyen al proceso de conducción, sin embargo, la fracción de corriente transportada por cualquier especie, está determinada por su concentración relativa, y por su movilidad inherente en el medio. Por lo tanto, las pérdidas debido a la migración iónica, dependerán del tamaño, la carga y la conductividad de los

iones disueltos, los cuales están sujetos a las interacciones con las moléculas del disolvente [42].

La rotación dipolar hace referencia a la alineación de las moléculas que exhiben momento dipolar, debido a la presencia de un campo eléctrico. En ausencia del campo, la agitación de las moléculas cesa y éstas se vuelven al estado inicial de desorden, lo que genera calentamiento. A 2450 MHz, el alineamiento de las moléculas, seguido de su estado de desorden, produce unas 4.9×10^9 veces por segundo, lo cual genera un rápido calentamiento. La eficiencia del calentamiento por rotación dipolar depende del tiempo, de la capacidad de relajación dieléctrica de las moléculas que contengan la muestra, que a su vez dependen de la temperatura y viscosidad del medio. Por lo tanto, las pérdidas debido a la migración iónica dependerán del tamaño, la carga y la conductividad de los iones disueltos, y están sujetas a los efectos de la interacción de iones con las moléculas del disolvente [42].

La técnica de extracción, asistida por microondas (MAE, por sus siglas en inglés), patentada por J. Paré [62, 63], utiliza disolventes orgánicos transparentes a la radiación de microondas, el material vegetal sumergido en el disolvente se somete a la acción muy corta de la radiación. Por el aumento local de la temperatura, debido al agua que contiene el material vegetal, se rompen las estructuras celulares que contienen metabolitos secundarios, e.g., aceites esenciales, que, al ser liberados, por efecto de su presión de vapor, se disuelven en el disolvente [42, 62, 63].

La aplicación de esta técnica a la extracción de plantas aromáticas fue introducida por primera vez en 1992 por F. I. Jean y colaboradores [39], quienes obtuvieron extractos de diferentes plantas y estudiaron su composición, a saber: eneldo, alcaravea, hinojo y perejil (Fam. *Umbelliferae*); estragón (Fam. *Compositae*); mejorana, orégano, tomillo salsero, salvia y tomillo (Fam. *Labiatae*).

Según la técnica, implementada en el Laboratorio de Cromatografía de la UIS, el material vegetal se sumerge directamente al agua (ca. 300 mL) en un equipo de destilación tipo *Clevenger* [77]. Bajo la radiación de microondas, en un horno comercial, el agua empieza a ebulir y el vapor generado comienza a penetrar las estructuras celulares de la planta, que por efecto del calentamiento se rompen y expulsan el AE contenido, que luego se difunde hacia la superficie del material vegetal y éste, a su vez, es arrastrado por el vapor de agua; finalmente, el AE se condensa y es recolectado en una trampa tipo *Dean Stark*. La destilación termina cuando todo el aceite es liberado de las estructuras oleíferas que lo contienen, normalmente, al pasar de 30 a 40 minutos.

La extracción asistida por la radiación de microondas presenta varias ventajas sobre las técnicas tradicionales de destilación: es un proceso rápido y relativamente económico, los aceites esenciales obtenidos se encuentran libres de los productos de descomposición térmica y de contaminantes [39, 42, 77]. Estudios recientes [13, 49] en donde se compararon el uso de la radiación de microondas con el calentamiento convencional para extraer aceites esenciales, demostraron que no se presentan diferencias significativas en los rendimientos de extracción y la composición química de los metabolitos secundarios extraídos; sin embargo, si representa una ventaja analítica, porque se requiere mucho menor tiempo de extracción cuando se emplea la radiación de microondas. Adicionalmente, Lucchesi y colaboradores [49], determinaron el consumo de energía y el efecto sobre el medio ambiente de los procesos de extracción de aceites esenciales de las especies *Ocimum basilicum* (albahaca), *Mentha crispera* (menta) y *Thymus vulgaris* (tomillo), con calentamiento convencional Vs asistido por la radiación de microondas. Los resultados fueron contundentes: el consumo de energía cuando se emplea la radiación de microondas como fuente de calentamiento fue de 0.25 kWh, mientras que para el calentamiento convencional se consumieron 4.5 kWh. De manera similar, en la hidrodestilación convencional

se emitieron al ambiente 3600 g de CO₂ por un gramo de aceite esencial, mientras que la extracción asistida por la radiación de microondas es acompañada de la emisión de 200 g de CO₂ por un gramo de esencia obtenida.

La fuente de radiación de microondas se ha utilizado como agente extractor de productos naturales, acoplado a técnicas tradicionales, como la hidrodestilación [77, 78], el extractor Soxhlet [31] y, más recientemente, el acople con la microextracción en fase sólida (SPME) [18-20, 60, 95]. Básicamente, se aprovecha la energía de microondas como un método más eficiente y mucho más rápido para el calentamiento de matrices, comparado con el método de calentamiento convencional, el cual necesita de un periodo finito para transferir el calor al recipiente que contiene la muestra, mientras que el calor impartido por la radiación de las microondas, se transfiere directamente a la matriz, manteniendo el gradiente de temperatura al mínimo y acelerando de esta manera la velocidad de calentamiento [15, 26]. En la **Tabla 2** se presentan algunos estudios reportados en la literatura en donde se han empleado la microextracción en fase sólida (SPME) integrada al uso de calentamiento por microondas.

Finalmente, estudios recientes, han mostrado las ventajas en el uso simultáneo de la radiación de microondas y pequeñas cantidades de polvo metálico, para aislar compuestos volátiles de plantas aromáticas [60, 87]. Básicamente, lo que se logra con el uso de polvo de hierro, es aumentar bastante la capacidad de calentamiento, ya que por ser un material con una alta capacidad de adsorción de las MW, el polvo de hierro, incrementa la eficiencia de la extracción; evidencia de ello, son los resultados de trabajos sobre la extracción de rizomas de *Atractylodes lancea* y hojas de *Cuminum cyminum* y *Zanthoxylum bungeanum*, en China, donde se logró más alto rendimiento de extracción, comparado con la realizada en ausencia de polvo metálico [60, 87].

3.3. Los aceites esenciales: mercado y control de calidad

A nivel mundial, existe una creciente exigencia de ingredientes de origen natural, tanto por parte de los consumidores de productos finales, como de los operadores de diversos mercados sectoriales. Alimentos, cosméticos, productos farmacéuticos y todos los demás artículos que tengan un impacto directo sobre la salud humana o animal, están sometidos cada vez con mayor rigor a satisfacer estos criterios. Debido a su empleo como ingredientes naturales de una gran variedad de artículos de consumo, los aceites esenciales constituyen un mercado que ha mostrado crecimientos continuos anuales, por lo menos del 10% [89]. Según la Asociación Holandesa de Productores de Sabores y Fragancias, el tamaño del mercado mundial de aceites esenciales fue de US\$13.200 millones en 2004. Los Estados Unidos de America fue el consumidor del 40% de los aceites esenciales y también fue su mayor importador (US\$321 millones). Los países de la Unión Europea importaron aceites esenciales por US\$601 millones en 2004 y comercializaron 67.8 billones de euros en el 2007, en el sector cosmético [5,83].

En comparación con los países importadores y exportadores de esencias, el papel de Colombia es ínfimo, a pesar de contar con las condiciones geobotánicas que le permitirían ventajas competitivas valiosas, para convertirse en un exportador importante, y no solo un importador neto como es ahora. En el 2007 se encontraban registradas en Colombia 95 empresas dedicadas a la importación de aceites esenciales, ubicadas principalmente en las ciudades de Bogotá, Cartagena y Medellín. Para ese mismo año, se registraron importaciones por cerca de nueve millones de dólares, para un total de 600 toneladas de aceites esenciales de bergamota, naranja, limón, mentas, eucalipto y geranio, principalmente [7]. En el campo de la exportación, las operaciones consisten principalmente en la comercialización de aceites esenciales previamente importados. La producción local y, por

tanto, la exportación de aceites esenciales producidos en Colombia aún es incipiente. En Colombia existen varios emprendimientos aislados, pero no se ha logrado implementar verdaderamente una cadena de valor que unifique y normalice las actividades desde el cultivo de plantas aromáticas hasta la comercialización nacional e internacional de los aceites esenciales y sus productos derivados. Existen casos exitosos de empresas que exportan material vegetal fresco o seco, y a finales de 2006, 6 empresas en este campo se asociaron para formar NATIVA, una entidad que busca facilitar las operaciones de exportación y la apertura de nuevos mercados [27]. Entre 1997 y 2007, la posición arancelaria correspondiente a los aceites esenciales registró importaciones por cerca de 600 millones de dólares y exportaciones por 97 millones de dólares, principalmente, a países andinos [38]. Estas exportaciones fueron hechas principalmente por empresas multinacionales, hacia sus sucursales en países vecinos y correspondieron en realidad a una redistribución o comercialización de los aceites importados [37]. La base para el desarrollo de la cadena de valor de aceites esenciales la constituyen cerca de 100 empresas pequeñas y medianas dedicadas actualmente a la producción de plantas aromáticas y medicinales con destino al mercado nacional, que generan alrededor de 8000 empleos directos e indirectos [38].

Para el uso y la comercialización de un aceite esencial, además del estudio de la factibilidad de su producción, para su aplicación específica, es absolutamente necesario conocer su composición química detallada. Este conocimiento, junto con las características fisicoquímicas y organolépticas del aceite, son parámetros imprescindibles para establecer la calidad del producto, según las exigencias del mercado mundial. Por ello, es importante estudiar las variables que afectan la composición del AE, tales como: tipo de cultivo, condiciones geobotánicas, métodos de extracción, época de recolección, parte de la planta, métodos de almacenamiento, manejo del material vegetal, edad de la planta, actividad biológica, entre otras.

El control de la calidad de un aceite esencial tiene por objeto garantizar que éste posea unas características físico-químicas y de olor determinadas, que se mantengan constantes de un lote de producción a otro. A través de un análisis químico detallado se pueden evaluar:

- El cumplimiento de normas de calidad;
- Detectar adulteraciones: por ejemplo, la adición de diluyentes;
- Diferenciar y comparar las calidades: hacer la clasificación de los aceites según su origen.
- Normalizar las calidades;
- Determinar la autenticidad del producto natural.

Las características estudiadas del producto deben ser suficientemente descriptivas, para que permitan detectar aquellas desviaciones que se consideren suficientes para rechazar un lote. Para ello, se utilizan diferentes parámetros analíticos y los valores obtenidos para una 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 [9].

El mercado de aceites esenciales exige la reproducibilidad de sus composiciones y de las propiedades físico-químicas. Esta exigencia se debe principalmente al hecho que los aceites son ingredientes para la fabricación de una gran variedad de productos de consumo y estas formulaciones tienen una tolerancia bastante baja a los cambios en la composición del aceite. Cerca del 50% de la producción mundial de aceites esenciales se usa en la industria de alimentos, para proveer aroma y sabor. Entre el 5 y el 10% de la producción se destina a aromaterapia. Entre el 20 y 25% se emplea en fragancias y del 20 al 25% se fracciona para aislar sustancias aromáticas para la industria química fina (e.g., citral, eugenol, anetol, carvona, etc.) [16, 51]. En todos estos sectores existen cada vez exigencias más estrictas sobre

la uniformidad de la composición de los aceites, especialmente, en los mercados europeos, se logra una mayor aceptación si se demuestra la utilización de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), agricultura limpia y tratamiento justo al cultivador [75]. De acuerdo con lo anterior, sin calidad alta y constante, es difícil acceder a los mercados nacionales e internacionales; muchos obstáculos se encontrarán, si no se tienen en cuenta aspectos del aseguramiento de la calidad de los aceites esenciales, entre los cuales figuran los métodos de extracción y el análisis de aceites tema del presente trabajo de investigación.

3.4. MATERIAL VEGETAL

3.4.1. *Lippia alba* (“Pronto alivio”)

La planta *Lippia alba* Mill N.E. Brown ex Britton & Wills. (**Figura 10**), un subarbusto muy aromático, es ampliamente distribuida y crece espontáneamente en las Américas Central y del Sur [34]. La planta es conocida también como *Lippia geniculata* HBK o *Lantana alba* Mill y, en Colombia, por sus nombres populares, “Pronto alivio” (Antioquia), “Curalotodo” y “Orégano de cerro” (Magdalena).

La planta se caracteriza por su intenso y penetrante olor y contiene de 0.1 a 1.2% del aceite volátil. Su composición química depende sensiblemente del origen geográfico de la planta, de las condiciones de su cultivo, la edad y la parte de la planta empleada para la extracción, y de algunos otros factores geobotánicos y fisiológicos, lo que evidencian los trabajos sobre la composición química de *L. alba*, realizados en Guatemala [81], India [8], Uruguay [48], Cuba [67], Brasil [97] y Colombia [24, 77].



Figura 10. Cultivo de *Lippia alba*. Complejo Agroindustrial Piloto del Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.

Es un arbusto ramificado, con una altura no superior a 1.5 m. Se establece en sitios con alta luminosidad, soporta épocas sin lluvia de hasta 6 semanas y crece mejor en altitudes entre 0 y 1100 m.s.n.m. [9]. Se puede reproducir por semillas, estacas o acodos. Los suelos pueden ser arcillosos, no inundados, con pH entre 5 y 6. Se siembra dejando una distancia de 0.4 a 0.6 m entre plantas y 0.9 m entre surcos dobles con 0.5 m de calle. La primera cosecha se realiza entre 4 y 6 meses después de la siembra [9]. En regiones secas puede ser necesario esperar hasta los 8 meses. En plantaciones del Caribe, se reportan rendimientos de 1 ton de material seco (hojas y flores) por ha. El rendimiento logrado en la extracción del aceite en el Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander, por el método de hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHd), fue del 0.6 al 0.8% p/p (planta fresca, hojas y tallos) [24, 77].

Zoghbi y colaboradores [97] identificaron 3 quimiotipos en los aceites esenciales de *L. alba* en 3 municipios de Brasil (Estado de Pará), en términos de los principales terpenos encontrados. El primero (Municipio Santa

María), se caracterizó por un alto contenido del 1,8-cineol (35%), el limoneno (18%) y la carvona (8.6%); el segundo quimiotipo (Municipio Belterra) se destacó por una alta proporción del limoneno (32%), la carvona (32%) y el mirceno (11%); y el tercero (Municipio Chaves), por el geranial (23%), el neral (14%) y el germacreno D (25%). El aceite esencial de *L. alba*, que crece en Santander (Colombia), es rico en dos compuestos, a saber: el limoneno (24-37%) y la carvona (40-57%); el último es un ingrediente de alto valor (US\$50/kg), que se usa en muchos artículos cosméticos, perfumes y productos de uso personal [14].

3.4.2. *Pelargonium graveolens*

La planta de *Pelargonium graveolens* (**Figura 11**) 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) [36, 88].



Figura 11. Planta de *Pelargonium graveolens* (geranio). Complejo Agroindustrial Piloto del Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.

Es un arbusto perenne, 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 y brotan generalmente en verano [41].

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. Las plantas se desarrollan mejor en clima tipo mediterráneo con inviernos suaves y verano apacible, con una temperatura media entre 30-35 °C, con humedad baja y lluvia moderada. También puede cultivarse en las áreas subtropicales con una cosecha anual [88].

Pelargonium graveolens se propaga vegetativamente por esquejes de aproximadamente 20 cm de largo. En estudios realizados en el Sur de la India, se encontró que el período más recomendable para plantar los esquejes es de noviembre a enero, sin embargo, pueden plantarse a lo largo del año [36].

A las seis semanas aproximadamente que se plantan los esquejes, éstos se transplantan a las camas a una distancia de 60 x 60 cm entre surcos y entre plantas, respectivamente. El campo se debe irrigar inmediatamente después de plantar y la irrigación frecuente se requiere en las fases iniciales del establecimiento de los cortes [36, 88].

En climas tropicales y sub-tropicales la primera cosecha se obtiene de 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 3 cosechas en el año. Se recomienda aplicar como fertilizantes 4 kg/ha de nitrógeno, 40 kg/ha de

fósforo y 40 kg/ha de potasio en el momento de plantar. En el momento de plantar se debe utilizar fertilizante orgánico preparado con estiércol [58].

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 [33, 92], 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. Los constituyentes mayoritarios de su aceite esencial son citronelol (20–40%) y geraniol (7-18%) [33, 80]. Otros constituyentes reportados son α -pineno (0,3-%), β -pineno (0,04-0,06%), α -terpineno (0,1-0,4%), linalol (4-13%), nerol (ca. 2%) [33]. 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 [22].

El citronelol y geraniol son ampliamente usados en las industrias perfumística, cosmética, de jabones, alimentos y bebidas. El geraniol se emplea particularmente para acentuar la nota cítrica de algunos productos perfumísticos. En cambio, el citronelol es utilizado para acentuar la nota floral y en la industria de sabores, para acentuar el sabor cítrico [11].

4. PARTE EXPERIMENTAL

El presente trabajo de investigación contempló la realización de dos bloques de experimentos. El primero fue relacionado con el estudio de los parámetros operacionales de la técnica HS-SPME, con calentamiento convencional y asistido por la radiación de microondas, lo cual incide sobre la eficiencia de extracción de los volátiles de una planta aromática. El segundo bloque de experimentos contempló la obtención de aceites esenciales mediante la hidrodestilación asistida por la radiación de microondas y su caracterización química mediante la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de

masas (GC-MS). En la **Figura 12** se presenta un diagrama de flujo que resume la metodología usada durante el desarrollo del presente proyecto.

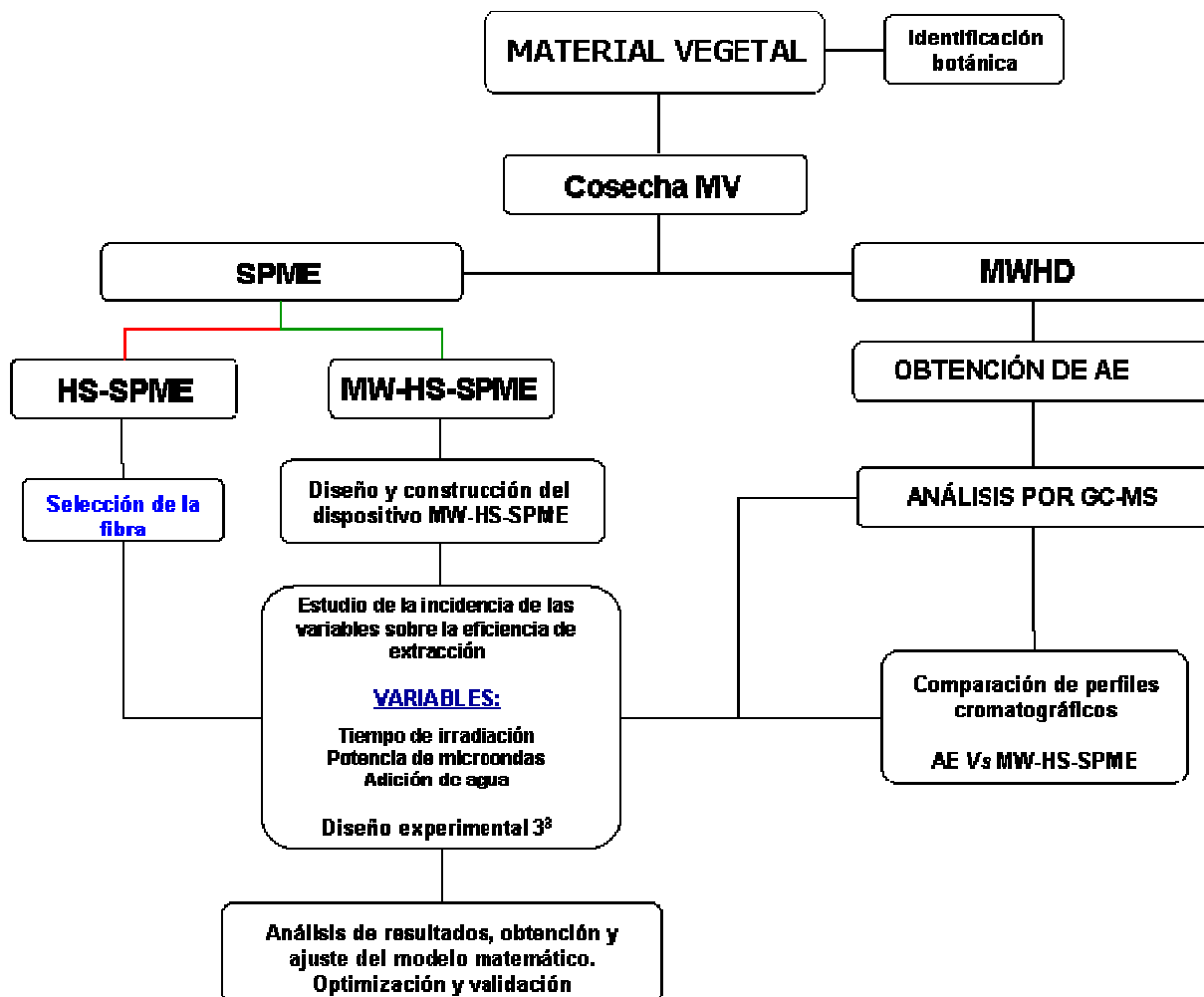


Figura 12. Diagrama de flujo para el desarrollo experimental del trabajo.

4.1. IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE LAS ESPECIES

La caracterización botánica de las especies *Lippia alba* (pronto alivio) y *Pelargonium graveolens* (geranio), se llevó a cabo en el Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia (Bogotá). Los pliegos-testigo para cada planta quedaron depositados como muestras permanentes en el Herbario Nacional Colombiano (COL, Bogotá), así: *Lippia alba* (Mill) N.E. Br. (N° COL 480749) y *Pelargonium graveolens* L' Her (N°

COL 517186). Las plantas fueron clasificadas por los doctores J. L. Fernández y J. A. Infante B., a quienes los autores expresan su más sincero agradecimiento.

4.2. PROPAGACIÓN Y CULTIVO DEL MATERIAL VEGETAL

Las plantas de *Lippia alba* y *Pelargonium graveolens* se cultivaron en el Complejo Agroindustrial Piloto de la Cadena Productiva de Aceites Esenciales del CENIVAM, ubicado en el costado nororiental del *campus* principal de la Universidad Industrial de Santander, durante el primer semestre de 2007. Las áreas de cultivo para ambas especies fueron de aproximadamente 50 m², distribuidas en tres y dos parcelas, respectivamente (Véase **Figura 13**). Para cada especie se tomaron segmentos nodales de 15 cm de longitud de plantas maduras, los cuales se plantaron en una mezcla de materia orgánica, arena y arcilla (1:2:1). Las estacas enraizadas, provenientes del vivero (edad 40 días), se trasplantaron a campo a una distancia de 90 cm entre surcos y 40 cm entre plantas, para el caso de pronto alivio, y a 60 cm entre surcos y 60 cm entre plantas para el caso del geranio. Los cuidados del cultivo consistieron en riegos, que garantizaron el establecimiento y el desarrollo de la plantación, en la eliminación de malezas, cuando fue necesario y en la aplicación de insumos orgánicos para el control de plagas y enfermedades.

4.2.1. Selección del material vegetal. La recolección del material vegetal (pronto alivio y geranio) se realizó manualmente en horas de la mañana, después de eliminado el rocío, mediante el corte del follaje con tijeras de jardín, a 30 cm del suelo, a diez plantas al azar.



Figura 13. Cultivos experimentales: **A.** *Lippia alba* (4 meses de desarrollo); **B.** *Pelargonium graveolens* (6 meses de desarrollo vegetativo). Complejo Agroindustrial Piloto de la Cadena Productiva de Aceites Esenciales de CENIVAM. UIS. Bucaramanga.

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

4.3.1. Selección de la fibra de SPME. La SPME es un proceso basado en el equilibrio termodinámico, donde los analitos se distribuyen entre el recubrimiento de la fibra y la matriz de la muestra. El coeficiente de partición depende de la afinidad del analito con la fase estacionaria, donde el factor predominante es su polaridad [65]. Por lo tanto, escogiendo correctamente el recubrimiento de la fibra de SPME, se puede aumentar la eficiencia de extracción. De acuerdo con lo anterior, se realizó el estudio comparativo sobre la capacidad de los recubrimientos de poli(dimetilsiloxano) (PDMS, 100 μm), poli(dimetilsiloxano)-divinilbenceno (PDMS, 65 μm) y de poli(acrilato) (PA, 85 μm), para adsorber los componentes presentes en los aceites esenciales de *Lippia alba* y *Pelargonium graveolens*. Para ello, se tomaron 10 μL de cada aceite esencial, por separado, en un vial ámbar de 4.5 mL, con tapa rosca y *septum* de silicona, a través del cual se insertó cada una de las fibras descritas anteriormente, con el tiempo de exposición de 30 minutos al *headspace* de la muestra. Para favorecer el proceso de volatilización de

los componentes presentes en la mezcla, el aceite esencial se calentó a 60°C, con la ayuda de un baño termostático con control de temperatura (± 0.01 °C, *Cole-Palmer*). Para homogeneizar la temperatura del baño de agua que cubrió el vial, su contenido se agitó con la ayuda de una barra magnética (1.5 cm), usando un agitador (*Jenway 1000*) a 500 rpm. (Véase **Figura 14**). En experimentos preliminares se estimó el tiempo de equilibrio entre la fase vapor y la fase condensada de los aceites esenciales, en el vial de 4.5 mL, en 12 minutos, tiempo después del cual se exponían las fibras. Al finalizar el tiempo de exposición de la fibra, ésta fue retraída y los volátiles se desorbieron durante 10 min en un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 7890 Series*.

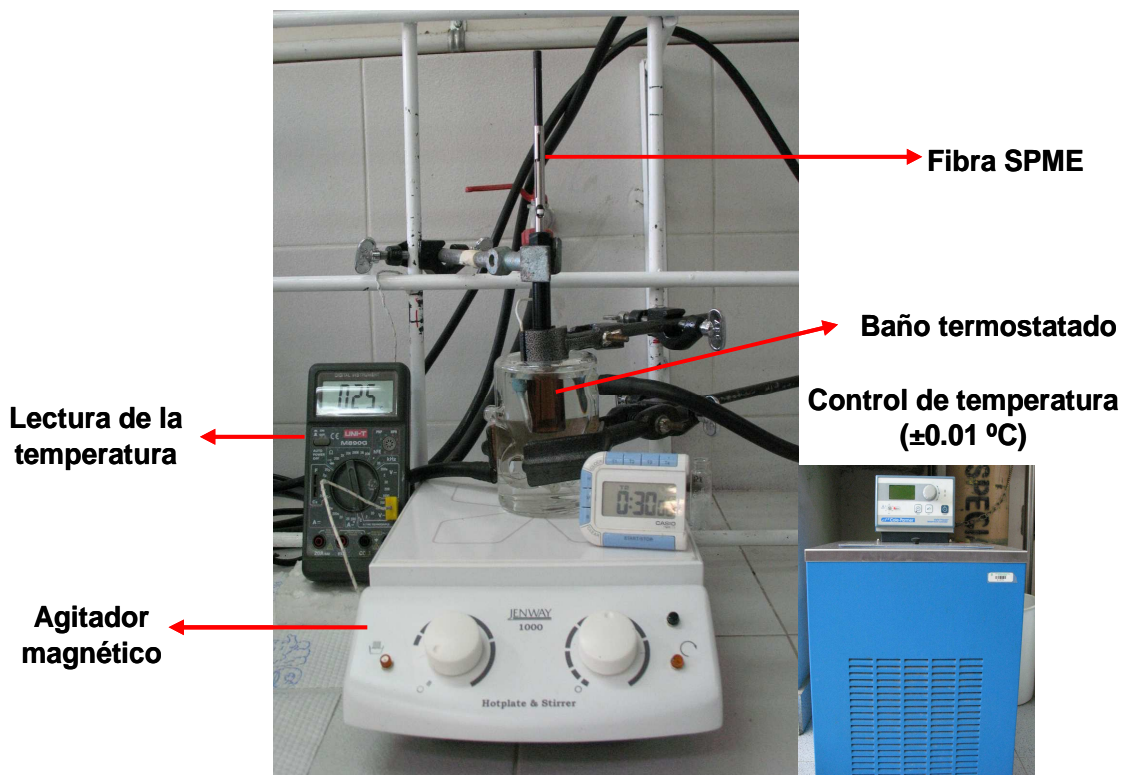


Figura 14. Montaje empleado para evaluar el tipo de fibra de SPME, para extraer componentes volátiles de los aceites esenciales de *Lippia alba* y *Pelargonium graveolens*.

4.3.2. Estudio de las variables que afectan el proceso MW-HS-SPME

4.3.2.1. Diseño y construcción del dispositivo para el análisis de la fracción volátil de plantas aromáticas por MW-HS-SPME.

En la construcción del dispositivo requerido para el análisis de la fracción volátil de plantas aromáticas por SPME asistido por la radiación de microondas, se decidió trabajar con la fase vapor aislada totalmente del *headspace* del recipiente en donde se mantuvo el material vegetal de pronto alivio y geranio. Después de diseñar y construir tres diferentes modelos, finalmente, en el trabajo se empleó el dispositivo que se presenta en la **Figura 15**. En este montaje se puede apreciar que la fase vapor que se genera por el calentamiento del material vegetal contenido en un balón de 1 L, dentro del horno microondas, está aislada de la fase condensada del material vegetal, mediante el juego de dos válvulas de Teflón (1 y 2). Adicionalmente, el montaje contó con una trampa tipo *Dean Stark* y un condensador, que permitieron aislar los aceites esenciales simultáneamente. El recipiente superior (*headspace* estático) que se empleó para el muestreo mediante SPME de los componentes volátiles del material vegetal, fue un balón fondo redondo de 50 mL, el cual se mantuvo cerrado herméticamente en la parte superior, con una tapa rosca de Teflón y un *septum* de silicona blanca recubierta con poli(tetraflúoretileno), PTFE, a una temperatura de 70° C con la ayuda de un baño termostatado *Cole-Palmer* (± 0.01 °C). Los siguientes fueron otros componentes empleados en el dispositivo construido, a saber: alargadera con esmerilado 24/40 y reducción esmerilada de 45/45 a 24/40.

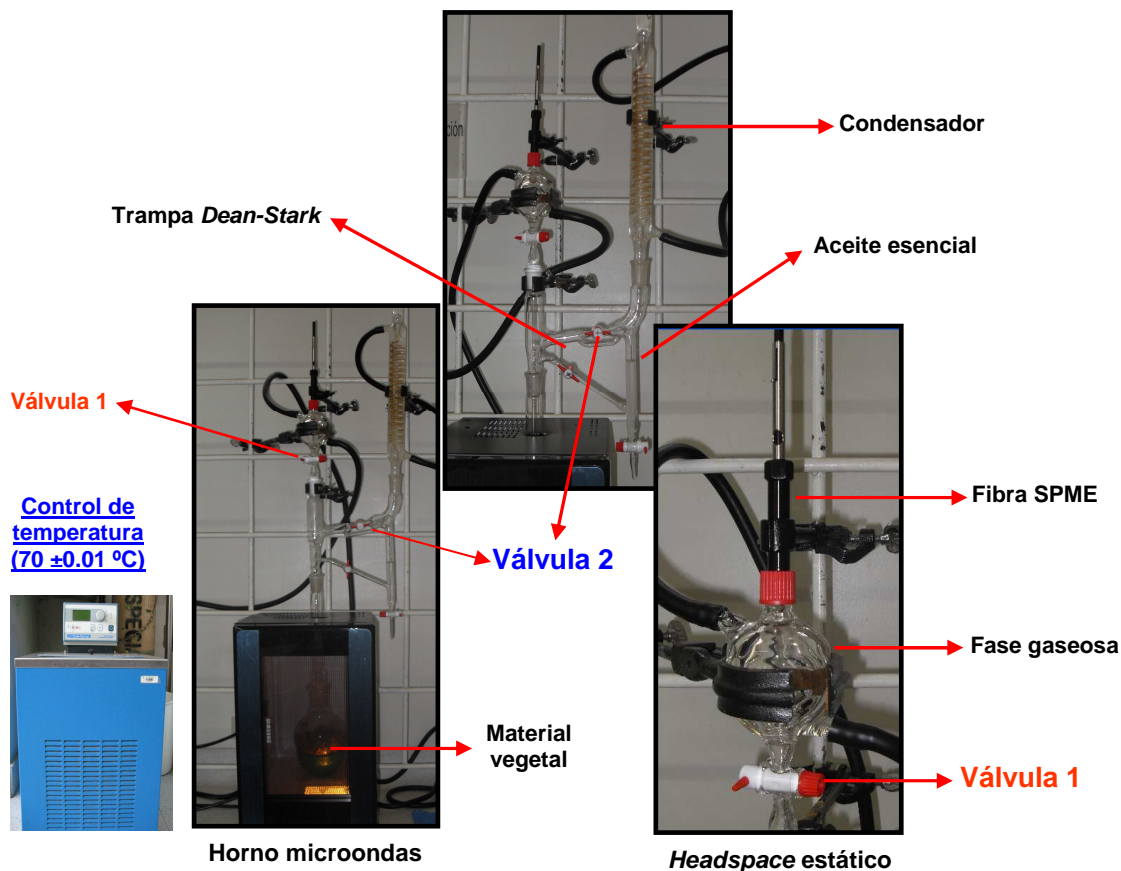


Figura 15. Dispositivo para SPME de *headspace* estático asistido por la radiación de microondas. El balón (1 L) al interior del horno, que contiene el material vegetal, está aislado del balón superior (50 mL), y solo la fase vapor en el recipiente superior se somete al muestreo de SPME a temperatura controlada.

4.3.2.2. Muestreo de la fracción volátil y obtención de aceite esencial

Para el muestreo de la fracción volátil mediante SPME asistida por la radiación de microondas, se tomaron 100 g de material vegetal, los cuales fueron previamente picados y homogeneizados. De acuerdo con el diseño experimental (**Tabla 3**), se emplearon diferentes tiempos de extracción (t_{ex}) y niveles de potencia (P) en el horno microondas, así como la adición de agua (A) o no al material vegetal. En todos los experimentos se emplearon 5 minutos de precalentamiento del material vegetal en el horno, empleando el

nivel de potencia escogido en cada caso del diseño experimental, tiempo durante el cual la válvula 1 se mantuvo cerrada. Una vez terminado el tiempo de precalentamiento, se abrió la válvula 1 para el muestreo de la fracción volátil, del material vegetal sometido a extracción bajo las condiciones de potencia, tiempo de extracción y adición de agua seleccionadas. La fracción volátil almacenada en el recipiente superior (50 mL) (*headspace* estático), fue presurizada durante los últimos 5 segundos de extracción, mediante el cierre de la válvula 2. Una vez terminado el tiempo de extracción, se dejó un tiempo de equilibrio en el *headspace* estático de 2 min. Transcurrido este tiempo, se expuso la fibra (1.2 cm) de SPME por 30 min, a la fracción volátil aislada del material vegetal. Durante todos los experimentos la temperatura del *headspace* estático se mantuvo constante en $70 \pm 0.01^\circ \text{C}$. Una vez finalizado el tiempo de exposición de la fibra, ésta se retiró y se llevó al puerto de inyección de un cromatógrafo de gases (GC-FID) para su desorción (250°C , 10 min) y análisis de los componentes volátiles del material vegetal analizado.

Simultáneamente al muestreo por SPME de la fracción volátil del material vegetal de *Lippia alba* y *Pelargonium graveolens* se obtuvieron los aceites esenciales, usando una trampa *Dean-Stark*, con la ayuda de un condensador tipo espiral (60 cm), por donde se hizo pasar agua refrigerada ($4 \pm 0.1^\circ \text{C}$) a través de un baño de circulación *Cole Palmer*. El aceite esencial obtenido se decantó y se secó con sulfato de sodio anhidro. Cada extracción duró 15 min.

4.3.2.3. Estudio del efecto de la potencia de las microondas, del tiempo de irradiación y de la adición de agua, sobre la eficiencia de la extracción por SPME de los compuestos volátiles de *Lippia alba* y *Pelargonium graveolens*.

Con el fin de establecer las condiciones de potencia (W), tiempo de irradiación (min) y adición de agua (mL), más apropiadas para la SPME de

monoterpenos, compuestos oxigenados y sesquiterpenos presentes en las plantas aromáticas de pronto alivio y geranio, se evaluaron diferentes potencias (330, 440 y 550 W) de la radiación, combinadas con distintos tiempos de exposición (2, 3 y 4 min) y la adición o no de agua destilada (0, 40 y 80 mL); para ello, se implementó un diseño experimental factorial de 3³ más estrella para cada especie, donde las variables de respuesta fueron los componentes mayoritarios de los aceites esenciales, limoneno y carvona, para la especie *Lippia alba*, y citronelol y geraniol para *Pelargonium graveolens*. El error experimental se determinó con base en las mediciones efectuadas en el punto medio de las variables estudiadas. En la **Tabla 2** aparecen el diseño experimental implementado para cada especie y los valores de las variables estudiadas.

Tabla 3. Diseño experimental factorial 3³ más estrella empleado para evaluar el efecto de la potencia de la radiación de microondas, el tiempo de exposición y la adición de agua, sobre la eficiencia de la extracción por SPME de los compuestos volátiles de *Lippia alba* y *Pelargonium graveolens*.

Nº Experimento	Niveles de las variables		
	Tiempo, min	Potencia, W	Agua, mL
1	2	330	0
2	4	330	0
3	2	550	0
4	4	550	0
5	2	330	80
6	4	330	80
7	2	550	80
8	4	550	80
9	2	440	40
10	4	440	40
11	3	330	40
12	3	550	40
13	3	440	0
14	3	440	80
15*	3	440	40

* Niveles de variables empleados para determinar el error experimental del método.

4.4. Análisis estadístico y encaje de modelos polinómicos a los datos experimentales.

Para el análisis estadístico de los resultados se empleó el programa STATISTICA (Versión 6.0, StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA), con el cual se realizó los análisis de varianza y de componentes principales de las concentraciones (ppm) de los compuestos mayoritarios presentes en las plantas de geranio y pronto alivio, extraídos por MW-HS-SPME. El propósito de este análisis, fue encontrar relaciones entre la composición química de los aceites esenciales con los perfiles cromatográficos obtenidos de las plantas aromáticas por MW-HS-SPME y analizados por GC-FID o GC-MS.

Para el encaje de los modelos polinómicos, a partir de la colección de datos obtenidos al aplicar el diseño experimental factorial 3^3 , se tomaron como observables los cocientes de la sumatoria de las áreas cromatográficas de los componentes mayoritarios de cada planta (geranio: citronelol + geraniol; pronto alivio: limoneno + carvona), sobre el área cromatográfica total obtenida de los perfiles de la fracción volátil de cada planta. En cada caso, se normalizaron los valores de las variables y el observable. Se empleó el método de Yates, en el análisis de varianza, para determinar cuáles variables eran factores a tener en cuenta en los modelos polinómicos (variables que mostraron significancia en el proceso de extracción de metabolitos secundarios mediante MW-HS-SPME). Se usó el valor crítico del parámetro F para 1 y 4 grados de libertad, con un nivel de confianza de probabilidad $P = 0.05$.

Para la obtención de los modelos matemáticos que relacionaron las áreas cromatográficas de los componentes mayoritarios presentes en las fracciones volátiles de *Lippia alba* y *Pelargonium graveolens*, con las diferentes variables bajo estudio (tiempo de extracción, potencia del horno y cantidad de agua), se estimaron en total 17 ecuaciones polinómicas, las

cuales fueron resueltas por el método de matrices. Para determinar el modelo que mejor se ajustó a las variables evaluadas, se compararon los R^2 ajustados, así como el error que el modelo no fue capaz de explicar (LOF).

4.4.1. Optimización del modelo y validación.

Para obtener los valores óptimos de la ecuación seleccionada en la **Sección 4.4.**, ésta se derivó respecto a cada variable y se igualó a cero. Los valores obtenidos se renormalizaron y aplicaron experimentalmente para corroborar el modelo obtenido. Para ello, se usó el procedimiento experimental descrito en la **Sección 4.3.2.2.**

4.5. Determinación de las figuras analíticas de mérito. Una vez establecidas las mejores condiciones para la extracción de la fracción volátil de las especies *Lippia alba* y *Pelargonium graveolens* por el método MW-HS-SPME, se determinaron las siguientes figuras analíticas de mérito [82], a saber: precisión (expresada como repetibilidad), límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LQO), linealidad y sensibilidad. Para la determinación de estos parámetros, se realizaron curvas de calibración para los componentes mayoritarios de los aceites esenciales de pronto alivio y geranio, por el método de estándar externo.

Las **curvas de calibración con estándar externo**, se llevaron a cabo empleando materiales de referencia certificados, comprados a *Sigma – Aldrich* (Milwaukee, EE.UU.), a saber: carvona (98%), limoneno (97%), geraniol (98%) y citronelol (99%). La primera extracción de los volátiles de las hojas de *Lippia alba* y *Pelargonium graveolens* se llevó a cabo por MW-HS-SPME, sin adición de estándares, empleando las condiciones establecidas en el Numeral **4.4.1**; luego, se realizaron tres extracciones sucesivas, adicionando 0,2; 0,4; 0,6 y 1 μ L de cada uno de los patrones, a 10 mL de agua contenida

en un balón de 1000 mL, seguido de la adición de hojas frescas de *Lippia alba* y *Pelargonium graveolens*, por separado, previamente picadas.

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

- **Evaluación de la linealidad y la sensibilidad del método.** La linealidad se fijó como el coeficiente de determinación, obtenido con la curva de calibración y la sensibilidad como la pendiente de la curva a un nivel de confianza del 95%.

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

4.6. Obtención de los aceites esenciales por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas

Los aceites esenciales de geranio y pronto alivio se obtuvieron a partir de las hojas y tallos del material cosechado, por el método de hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHd). El material vegetal se sometió a extracción en un equipo de destilación tipo *Clevenger* con adaptación para calentamiento por radiación de microondas, a través de un horno de microondas convencional, con una potencia de salida 1100 W y

frecuencia de radiación de 2.5 GHz. Las extracciones se efectuaron por triplicado, para cada planta.

4.7. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO.

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

4.7.2. Cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo de masas en la columna apolar. Los espectros de masas se obtuvieron por impacto de electrones con energía de 70 eV, en un CG *Agilent Technologies 6890 Plus Series* (**Figura 16**) acoplado a un detector selectivo de masas (MSD) *Agilent Technologies 5973 Network*, y equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (250°C, relación *split* 1:30), un inyector automático *Agilent 7863*, un sistema de datos *MSChemStation* (Versión D.02.00.275), que posee las bases de datos NBS 75K, WILEY 138K, NIST 02 y ADAMS 2004. Se usó una columna capilar de sílice fundida, DB-5MS de 60 m x 0.25 mm, D.I., con la fase estacionaria de 5%-fenil-poli(metilsiloxano) de 0.25 μm

de grosor (d_f). El gas de arrastre fue el helio (99.9995%, *Aga Fano*, S.A.), con un flujo de 1 mL min^{-1} . La temperatura del horno se programó de 45°C (5 min) hasta 150°C (2 min) @ 4°C min^{-1} , luego, hasta 250°C (5 min) @ 5°C min^{-1} , finalmente, hasta 275°C (15 min) @ $10^\circ\text{C min}^{-1}$. Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia se mantuvieron a 230 y 280°C , respectivamente. Espectros de masas y corrientes iónicas reconstruidas (TIC) se obtuvieron en un cuadrupolo, por medio de barrido automático de radiofrecuencia (*full scan*), @ 4.75 scan s^{-1} , en el rango de masas de m/z 40-350. Cada pico cromatográfico se revisó, para evaluar su homogeneidad, obteniendo fragmentogramas de masas, basados en iones característicos de cada compuesto. Para la identificación de algunos compuestos se usaron patrones de referencia, analizados bajo las mismas condiciones instrumentales, espectros de masas e índices de retención lineales.



Figura 16. Cromatógrafo de gases de alta resolución *Agilent Technologies 6890 Plus*, con detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5973*.

4.7.3 Cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo de masas en la columna polar. Los espectros de masas se obtuvieron por impacto de electrones con energía de 70 eV , en un CG *Agilent Technologies 6890N Network* (**Figura 17**), acoplado a un detector selectivo de masas (MSD)

Agilent Technologies 5975, y equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (250°C, relación *split* 1:50), un inyector automático *Agilent 7863*, un sistema de datos *HPChemStation* (Versión D.02.00.275), se usaron las bases de datos NBS 75K, WILEY 138K, NIST 02 y ADAMS 2004. Se utilizó una columna capilar de sílice fundida, DB-WAX de 60 m x 0.25 mm, D.I., con la fase estacionaria entrecruzada e inmobilizada de poli(etilenglicol) de 0.25 μm de espesor (d_f). El gas de arrastre fue el helio, con un flujo de 1 mL min^{-1} . La temperatura del horno se programó de 45°C (10 min) hasta 220°C @ 3°C min^{-1} . Las temperaturas de la cámara de ionización y la línea de transferencia se mantuvieron a 230 y 250°C, respectivamente. Espectros de masas y corrientes iónicas reconstruidas (TIC) se obtuvieron en un cuadrupolo, por medio de barrido automático de frecuencia (*full scan*), @ 4.51 scan s^{-1} , en el rango de masas de m/z 40-350. Cada pico cromatográfico se revisó, para evaluar su homogeneidad, a través de fragmentogramas de masas, basados en iones característicos de cada compuesto. Para la identificación de los compuestos se emplearon sus espectros de masas e índices de retención lineales.



Figura 17. Cromatógrafo de gases de alta resolución *Agilent Technologies 6890N Plus*, con detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5975 Inert XL*.

4.7.4 Cromatografía de gases acoplada a detector de ionización en llama (GC-FID). Se empleó un cromatógrafo GC *Agilent Technologies* 7890A *Series I*, equipado con un inyector *split/splitless* (250°C, relación *split* 1:30) y un detector de ionización en llama (FID) (250°C). Los datos cromatográficos se procesaron con un programa *ChemStation* (HP Rev. B.03.02). Para la separación de analitos, se usó la columna capilar apolar, DB-5 (J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.), de 60 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25 μm , d_f , con fase estacionaria de 5%-fenil-poli(metilsiloxano). La temperatura del horno se programó de 40°C (15 min) hasta 250°C @ 5°C min^{-1} . El gas de arrastre empleado fue el helio, con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 200 kPa y una velocidad lineal de 26 cm s^{-1} . Las velocidades de flujos de gases de combustión en el FID, *i.e.*, el aire y el hidrógeno, se mantuvieron a 300 y 30 mL min^{-1} , respectivamente. El gas auxiliar fue nitrógeno, a 30 mL/min .



Figura 18. Cromatógrafo de gases de alta resolución *Agilent Technologies* 7890A, con detector de ionización en llama FID.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se desarrolló y se validó un método rápido para el análisis de la fracción volátil y del aceite esencial de plantas aromáticas mediante la técnica de microextracción en fase sólida, en modo *headspace*, asistido por la radiación de microondas (MW-HS-SPME). Se establecieron figuras de mérito para el método implementado, con base en las curvas de calibración de patrones. Se optimizaron las condiciones de extracción de los componentes volátiles, usando como modelos las plantas aromáticas de *Lippia alba* y *Pelargonium graveolens*.

5.1. Selección del recubrimiento de la fibra para SPME

La eficiencia de extracción por SPME de los metabolitos secundarios volátiles de *Lippia alba* y *Pelargonium graveolens*, lograda con diferentes recubrimientos poliméricos se muestra en la **Tabla 4** y también se aprecia gráficamente en las **Figuras 19 y 20**.

Tabla 4. Extracción por SPME de los componentes volátiles de *Lippia alba* y *Pelargonium graveolens*, empleando diferentes recubrimientos poliméricos de la fibra.

Fibra		<i>Lippia alba</i>		<i>Pelargonium graveolens</i>	
Polímero	Grosor, μm	Área total GC promedio (n=3)	CV, % (n=3)	Área total GC promedio (n=3)	CV, % (n=3)
PDMS	100	5,61E+12	3,0	8900720	5,4
PDMS/DVB	65	56250000	5,4	10639050	5,9
PA	85	49043750	8,2	23195050	5,2

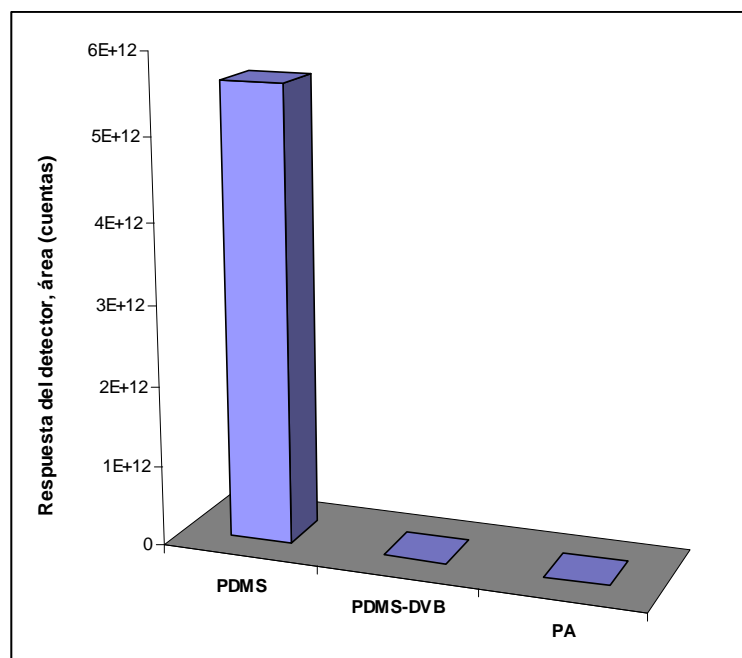


Figura 19. Cantidad de compuestos volátiles del aceite esencial de *Lippia alba* adsorbidos sobre diferentes recubrimientos de la fibra SPME. Temperatura: 60°C; Tiempo de exposición: 30 min; GC-FID, Columna DB-5 (60 m); Desorción 250°C (10 min).

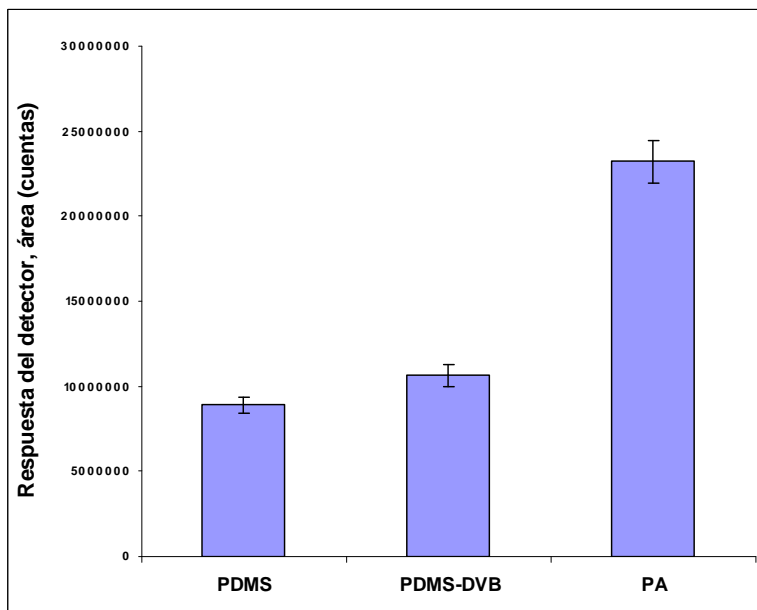


Figura 20. Cantidad de compuestos volátiles del aceite esencial de *Pelargonium graveolens* adsorbidos sobre diferentes recubrimientos de la fibra SPME. Temperatura: 60°C; Tiempo de exposición: 30 min; GC-FID, Columna DB-5 (60 m); Desorción 250°C (10 min).

Con base en los resultados mostrados en la **Tabla 4** y en las **Figuras 19 y 20**, se seleccionaron los recubrimientos de poli(dimetilsiloxano) (PDMS, 100 µm) y poli(acrilato) (PA, 85 µm), para realizar el estudio de las variables que afectan el proceso de MW-HS-SPME, para las plantas de *Lippia alba* (pronto alivio) y *Pelargonium graveolens* (geranio), respectivamente; ya que éstas fueron las fibras que presentaron una eficiencia de extracción más alta y una mejor reproducibilidad.

5.2. Análisis cromatográfico

5.2.1. Análisis de los aceites esenciales de *Lippia alba* y *Pelargonium graveolens*. En las **Figuras 21 y 22** se muestran las corrientes iónicas totales (TIC) reconstruidas, obtenidas por GC-MS, después de la exposición *in vitro* de las fibras de PDMS (100 µm) y PA (85 µm), al *headspace* de los aceites esenciales de *Lippia alba* y *Pelargonium graveolens*. Los compuestos identificados en las fracciones volátiles de *Lippia alba* y *Pelargonium graveolens*, se presentan en las **Tablas 5 y 6**, respectivamente. Para la identificación de los compuestos se usaron los espectros de masas e índices de retención de Kovàts, los cuales se calcularon con base en la **Ecuación 1** [43], y se compararon con los reportados en la literatura [2].

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

Donde $n < N$

n= Número de átomos de carbono del hidrocarburo que eluye antes del compuesto de interés.

t_{Rx}= Tiempo de retención del compuesto de interés.

t_{Rn}= Tiempo de retención del hidrocarburo que eluye antes del compuesto de interés.

t_{RN}= Tiempo de retención del hidrocarburo que eluye después del compuesto de interés.

En términos generales, en la fracción volátil del aceite esencial de *Lippia alba* se identificaron 31 compuestos, agrupados en cinco familias, así: monoterpenos (5), monoterpenos oxigenados (6), monoterpenonas (5), sesquiterpenos (13) y sesquiterpenos oxigenados (2). Los componentes mayoritarios identificados fueron el limoneno (27%), la carvona (16%) y el biciclosesquifelandreno (33%), los cuales coincidieron con los reportados en la literatura [77]. Es importante destacar que el biciclosesquifelandreno fue el componente que mayor se extrajo de la fracción volátil del aceite esencial mediante la fibra de SPME (PDMS-100 μ m), probablemente por que posee un coeficiente de distribución, K_D , más alto que los monoterpenos y monoterpenonas, presenta una mayor afinidad química por el recubrimiento de la fibra, y el tiempo de extracción (30 min) y la temperatura (70°C) empleados favorecieron este proceso.

La fracción volátil del aceite esencial de *Pelargonium graveolens* fue rica en compuestos oxigenados de tipo monoterpénico (64%), seguido de sesquiterpenos (23%), monoterpenonas (6%), sesquiterpenos oxigenados (3%) y monoterpenos (1%). En total se lograron identificar 84 compuestos, de los cuales los mayoritarios fueron: citronelol (19%), geraniol (11%), *iso*-mentona (5%) y geranial (4%). La composición química identificada, aunque en proporciones diferentes, coincidió con lo reportado en la literatura científica [12, 70, 71].

Tabla 5. Cantidad relativa (%) e identificación de los principales compuestos encontrados en la fracción volátil del aceite esencial de *L. alba*, obtenida por HS-SPME.

Pico No	Compuesto	IR		Tipo	GC área, %	Modo de identificación
		Apolar	Polar			
1	α -Pinoeno	939	921	M	<i>tr</i>	MS, IR, patrón
2	Canfeno	954	965	M	0,2	MS, IR
3	β -Mirceeno	991	1064	M	0,3	MS, IR, patrón
4	Limoneno	1034	1105	M	26,7	MS, IR, patrón

Tabla 5, Continuación.

Pico No	Compuesto	IR		Tipo	GC área, %	Modo de identificación
		Apolar	Polar			
5	<i>trans</i> -β-Ocimeno	1047	1153	M	0,28	MS, IR
6	Óxido de pineno	1052	1256	MO	<i>tr</i>	MS, IR
7	Tujona	1106	1562	MO	<i>tr</i>	MS, IR
8	Óxido de limoneno	1133	1211	MO	<i>tr</i>	MS, IR, patrón
9	<i>trans</i> -Dihidrocarvona	1211	1567	MT	0,2	MS, IR
10	Pulegona	1205	1662	MT	0,8	MS, IR, patrón
11	Carvona	1258	1653	MT	15,5	MS, IR, patrón
12	Piperitona	1264	1641	MT	0,3	MS, IR
13	Geranial*	1270	1730	MO	<i>tr</i>	MS, IR, patrón
14	<i>trans</i> -Óxido de Carvona	1284	1745	MO	<i>tr</i>	MS, IR
15	<i>trans</i> -Acetato de carveilo	1341	1777	MO	0,2	MS, IR
16	Piperitenona	1349	1842	MT	0,4	MS, IR
17	β-Bourboneno	1396	1526	S	6,5	MS, IR
18	α-Copaeno	1393	1520	S	0,7	MS, IR
19	β-Cubebeno	1396	1544	S	2,0	MS, IR
20	Elemeno	1426	1470	S	0,2	MS, IR
21	Cedreno	1436	1470	S	2,0	MS, IR
22	<i>trans</i> -β-Cariofileno	1437	1506	S	1,8	MS, IR, patrón
23	α-Humuleno	1471	1580	S	0,7	MS, IR
24	β-Farneseno	1469	1695	S	4,9	MS, IR, patrón
25	<i>allo</i> -Aromadendreno	1469	1557	S	1,4	MS, IR
26	Germacreno D	1486	1552	S	0,4	MS, IR
27	Biciclosesquifelandreno	1496	1624	S	32,7	MS, IR
28	Germacreno B	1506	1776	S	0,6	MS, IR
29	β-Bisaboleno	1508	1745	S	0,4	MS, IR
30	Cubebol	1528	1855	SO	<i>tr</i>	MS, IR
31	Óxido de cariofileno	1580	1965	SO	0,3	MS, IR
Totales						
M: Monoterpenos					27,3	
MT: Monoterpenonas					17,2	
MO: Monoterpenos oxigenados					0,2	
S: Sesquiterpenos					54,4	
SO: Sesquiterpenos oxigenados					0,3	

a. Número del pico en la **Figura 21**; **tr**: Trazas.

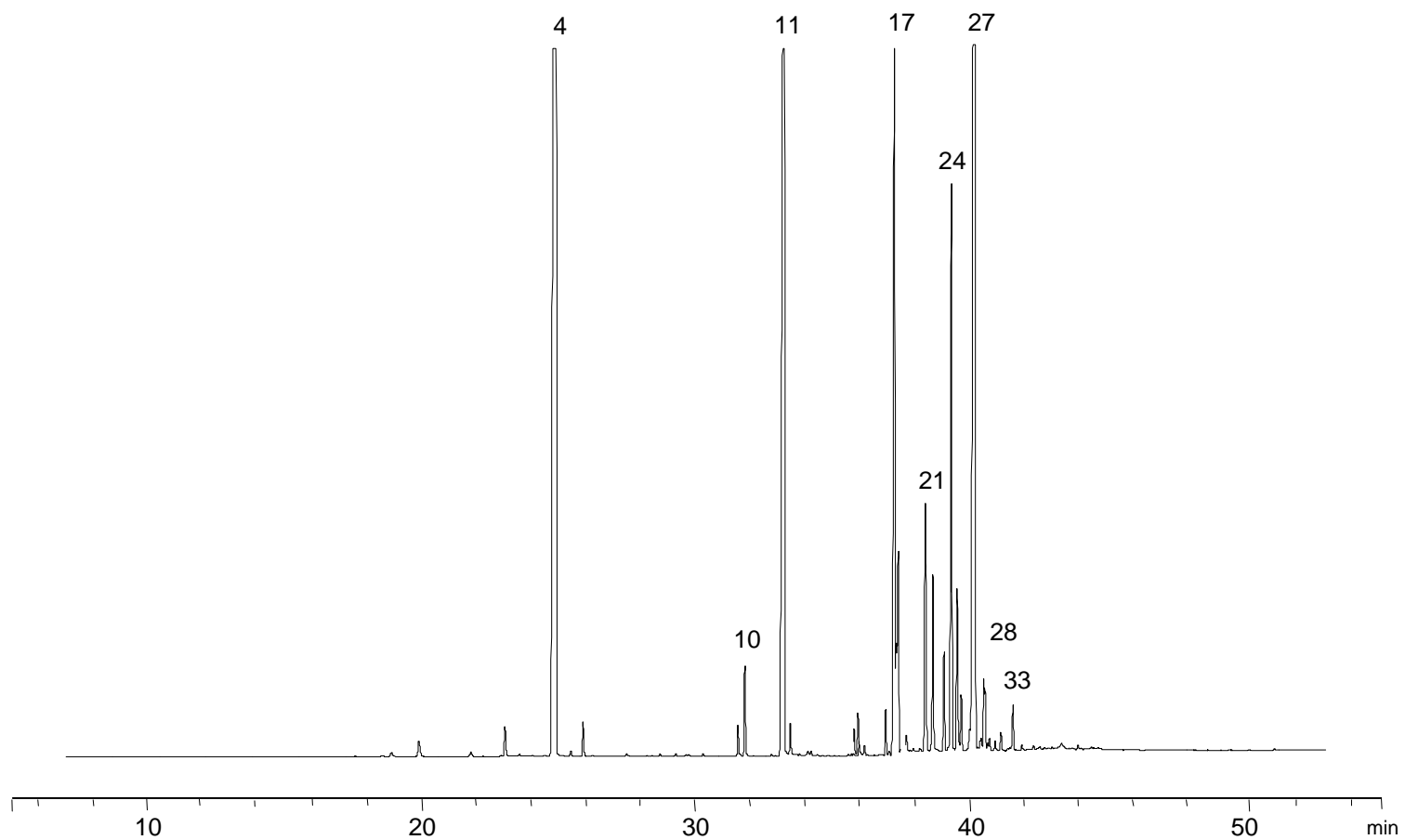


Figura 21. Cromatograma típico obtenido por GC-MS de los volátiles aislados por HS-SPME del aceite esencial de *Lippia alba*. La identificación de los picos cromatográficos aparece en la **Tabla 4**. Columna DB-5MS (60 m). *Split* 1:30: MSD (EI, 70 eV).

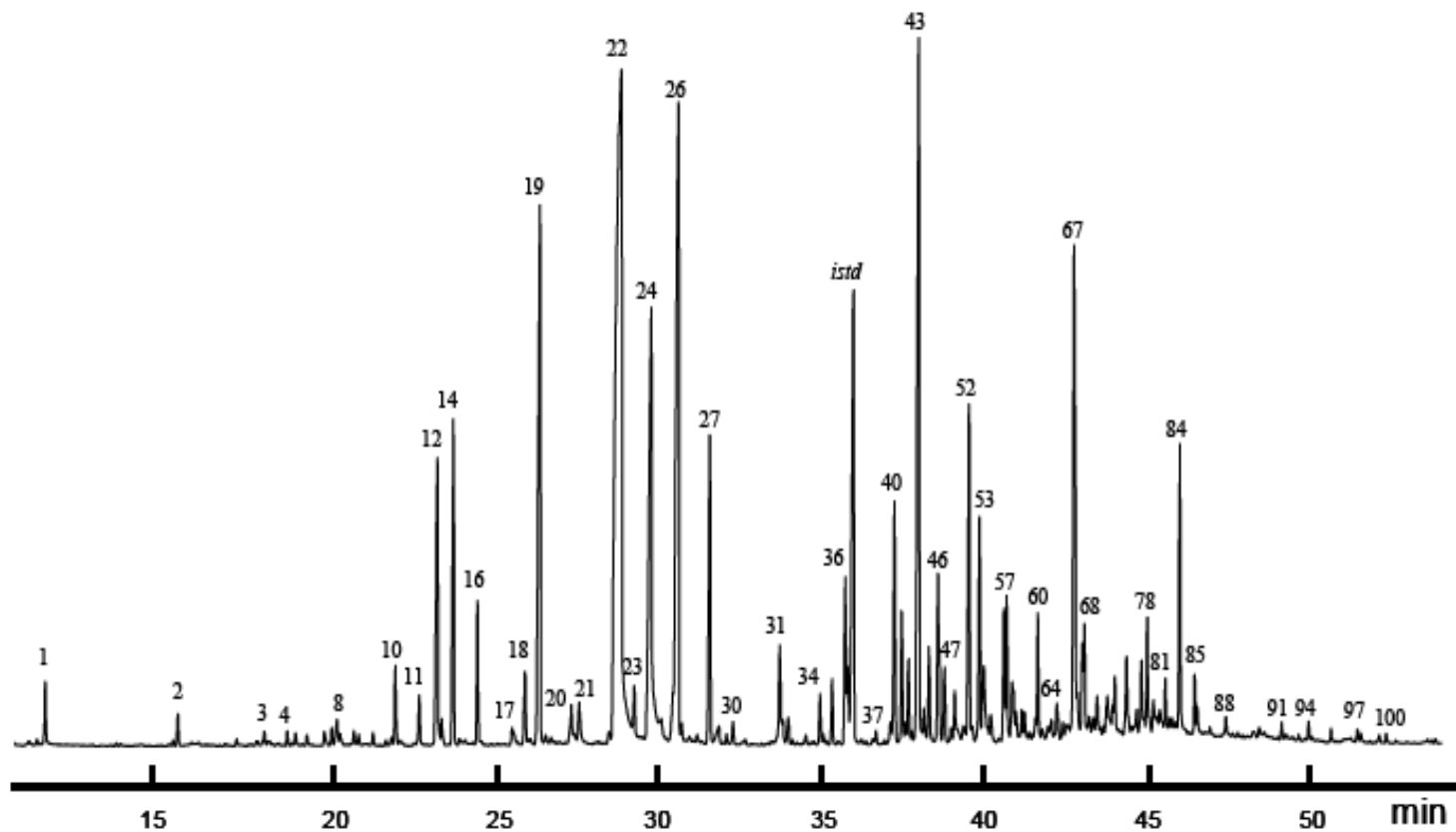


Figura 22. Cromatograma típico, obtenido por GC-MS de los volátiles aislados del aceite esencial de *Pelargonium graveolens* HS-SPME. Columna DB-5MS (60 m), *split* 1:30. MSD (EI, 70 eV).

Tabla 6. Cantidad relativa (%) e identificación de los principales compuestos encontrados en la fracción volátil del aceite esencial de *P. graveolens*, obtenida por HS-SPME.

Pico No ^a	Compuesto	IR		Tipo	GC área,	Modo de identificación
		Apolar	Polar			
1	<i>trans</i> -2-Hexenal	846	-	MO	0,7	MS, IR, patrón
2	α -Pino	933	1014	M	0,2	MS, IR, patrón
3	β -Mirce	991	1064	M	0,1	MS, IR, patrón
4	Acetato de <i>trans</i> -3-hexenilo	1005	1310	MO	0,1	MS, IR
5	α -Felandreno	1009	1066	M	tr	MS, IR
6	<i>p</i> -Cimeno	1028	1172	M	0,1	MS, IR, patrón
7	Limoneno	1034	1105	M	0,1	MS, IR, patrón
8	β -Felandreno	1036	1111	M	0,2	MS, IR
9	<i>trans</i> - β -Ocimeno	1047	1153	M	0,1	MS, IR
10	<i>trans</i> -Óxido de linalilo	1075	1440	MO	0,5	MS, IR
11	<i>cis</i> -Óxido de linalilo	1091	-	MO	0,4	MS, IR
12	Linalol	1100	1453	MO	2,3	MS, IR, patrón
13	<i>trans</i> -6-metil-3,5-heptadien-2-ona	1106	-	MO	0,2	MS, IR
14	<i>cis</i> -Óxido de rosa	1114	1350	MO	2,1	MS, IR
15	Alcohol de 2-Feniletilo	1125	-	MO	tr	MS, IR
16	<i>trans</i> -Óxido de rosa	1131	1365	MO	0,9	MS, IR
17	Citronelal	1154	1381	MO	0,3	MS, IR, patrón
18	Mentona	1164	1463	MT	0,6	MS, IR
19	<i>iso</i> -Mentona	1175	1494	MT	5,4	MS, IR
20	<i>neo-iso</i> -Mentol	1196	-	MO	0,4	MS, IR
21	α -Terpineol	1202	-	MO	0,4	MS, IR
22	Citronelol	1224	1673	MO	19,1	MS, IR, patrón
23	Neral	1248	1589	MO	0,6	MS, IR, patrón
24	Geraniol	1252	1755	MO	11,0	MS, IR, patrón
25	Piperitona	1264	1641	MT	0,4	MS, IR, patrón
26	Geranial	1275	1643	MO	4,3	MS, IR, patrón
27	Formiato de geranilo	1301	1701	MO	2,4	MS, IR
28	Ácido citronélico	1306	-	MO	0,3	MS, IR
29	Ácido neróico	1316	-	MO	0,2	MS, IR
30	Ácido geránico	1349	2337	MO	1,0	MS, IR
31	Propanoato de fenetilo	1355	1458	MO	0,3	MS, IR
32	Acetato de geranilo	1379	1662	MO	0,3	MS, IR
33	α -Copaeno	1385	1399	S	0,5	MS, IR

Tabla 6, Continuación.

Pico No ^a	Compuesto	IR		Tipo	GC área,	Modo de identificación
		Apolar	Polar			
34	β -Bourbuneno	1396	1526	S	1,8	MS, IR
35	<i>cis</i> - β -Cariofileno	1419	1533	S	0,2	MS, IR
36	β -Ylangeno	1432	1483	S	tr	MS, IR
37	<i>trans</i> - β -Cariofileno	1436	1506	S	1,8	MS, IR, patrón
38	Propionato de citronelilo	-	1721	MO	1,0	MS, IR
39	α -Guaieno	1447	1498	S	0,7	MS, IR
40	6,9-Guaiadieno	1454	-	S	6,7	MS, IR
41	4,10-Guaia-1(5),6-dieno	1458	-	S	0,3	MS, IR
42	4,10-Guaia-1(5),6-dieno	1461	1640	S	0,8	MS, IR
43	Propanoato de nerilo	1463	-	MO	1,6	MS, IR
44	<i>allo</i> -Aromadendreno	1459	1557	S	0,6	MS, IR
45	<i>iso</i> -butanoato de citronelilo	1479	-	MO	0,1	MS, IR
46	<i>trans</i> -Cadina-1(6),4-dieno	1482	1788	S	0,6	MS, IR
47	γ -Muuroloeno	1483	1599	S	tr	MS, IR
48	α -Amorfeno	1485	-	S	0,3	MS, IR
49	Germacreno D	1486	1552	S	2,9	MS, IR
50	Viridifloreno	1502	1701	S	1,6	MS, IR
51	<i>iso</i> -butanoato de geranilo	1504	-	MO	1,1	MS, IR
52	β -Bisaboleno	1512	-	S	0,3	MS, IR
53	γ -Cadineno	1526	1796	S	0,9	MS, IR
54	δ -Amorfeno	1514	-	S	1,0	MS, IR
55	<i>trans</i> -Calameneno	1528	-	S	1,0	MS, IR
56	α -Calacoreno	1555	1923	S	0,9	MS, IR
57	<i>iso</i> -valerato de citronelilo	1567	-	MO	0,3	MS, IR
58	β -Calacoreno	1573	-	S	0,3	MS, IR
59	Benzoato de 3- <i>cis</i> -hexenilo	1578	-	MO	0,2	MS, IR
60	Tiglato de 2-feniletilo	-	2196	MO	3,6	MS, IR
61	Isovalerato de geranilo	1598	2035	MO	1,5	MS, IR
62	Valerato de citronelilo	1621	-	MO	0,6	MS, IR
63	1- <i>epi</i> -Cubenol	-	2075	SO	0,8	MS, IR
64	γ -Eudesmol	1646	-	SO	0,1	MS, IR
65	Valerato de geranilo	1652	-	MO	0,3	MS, IR
66	Cubenol	1657	-	SO	0,7	MS, IR
67	<i>trans</i> -Tiglato de citronelilo	1663	2006	MO	1,2	MS, IR

Tabla 6, Continuación.

Pico No ^a	Compuesto	IR		Tipo	GC área,	Modo de identificación
		Apolar	Polar			
68	α -Cadinol	1670	2237	SO	0,5	MS, IR
69	neo-Intermedeol	1676	2262	SO	0,2	MS, IR
70	iso-Caproato de citronelilo	1681	-	MO	0,5	MS, IR
71	Cadaleno	1689	-	S	0,1	MS, IR
72	Tiglato de geranilo	1697	2109	MO	2,7	MS, IR
73	iso-Caproato de geranilo	1713	-	MO	0,6	MS, IR
74	10-nor-Calamenen-10-ona	1716	-	SO	0,3	MS, IR
75	Caproato de geranilo	1716	-	MO	0,2	MS, IR
76	Benzoato de bencilo	1749	-	MO	0,1	MS, IR
77	iso-Heptanoato de citronelilo	1781	-	MO	0,1	MS, IR
78	Heptanoato de citronelilo	1787	-	SO	0,2	MS, IR
79	iso-Heptanoato de geranilo	1847	-	MO	0,2	MS, IR
80	iso-Octanoato de citronelilo	1874	-	MO	0,1	MS, IR
81	Hexadecanol	1891	-	MO	tr	MS, IR
82	iso-Octanoato de geranilo	1906	-	MO	0,1	MS, IR
83	Octanoato de citronelilo	1911	-	MO	0,1	MS, IR
84	Octanoato de geranilo	1944	-	MO	0,1	MS, IR
Totales						
M: Monoterpenos					0,8	
MT: Monoterpenonas					6,4	
MO: Monoterpenos oxigenados					63,8	
S: Sesquiterpenos					23,3	
SO: Sesquiterpenos oxigenados					3,1	

a. Número del pico en la **Figura 21**; **tr**: Trazas.

De acuerdo con los perfiles cromatográficos obtenidos de las fracciones volátiles mediante extracción con SPME, de los aceites esenciales de *Lippia alba* y *Pelargonium graveolens*, se tomaron como compuestos principales para evaluar la calidad comercial de éstos, la carvona y el limoneno, en el primer caso, y el citronelol y geraniol para el geranio.

5.3. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO RÁPIDO PARA EL ANÁLISIS DE VOLÁTILES EN PLANTAS AROMÁTICAS POR MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA EN MODO *HEADSPACE*, ASISTIDO POR LA RADIACIÓN DE MICROONDAS.

Para el desarrollo y la validación del método propuesto en el Numeral **4.3.2.2.**, de la parte experimental, con el uso simultáneo de la HS-SPME y la radiación de microondas, se logró aislar la fracción volátil de plantas de *Lippia alba* y *Pelargonium graveolens* y compararla con la de sus aceites esenciales, aislados por la hidrodestilación. De acuerdo con lo reportado por Arthur y Pawliszyn [6], quienes argumentan que la radiación de microondas ($\nu=2450$ MHz) disminuye el tiempo de equilibrio de los compuestos volátiles en la fase vapor, facilitando así su extracción más rápida y eficiente por técnicas de extracción en modo HS, se implementó un método rápido y sencillo, donde se logra una migración de los analitos volátiles del material vegetal en un recipiente (50 mL) a temperatura de 70°C constante, en donde luego de alcanzar el equilibrio, se realiza la microextracción en fase sólida (SPME). En las **Figuras 23 y 24**, se presentan los cromatogramas típicos de los volátiles de las plantas y de sus aceites esenciales, aislados de hojas de *Lippia alba* y *Pelargonium graveolens*. Los componentes mayoritarios, así como sus cantidades relativas se presentan en las **Tablas 7 y 8**.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede apreciar que no existen diferencias significativas cualitativas en los perfiles cromatográficos de las fracciones volátiles de las plantas aromáticas (pronto alivio y geranio), monitoreadas en el modo *headspace* y los de sus aceites esenciales, lo cual sugiere que el método planteado, puede ser aplicado al análisis directo de las plantas aromáticas cultivadas industrialmente, ya que es posible monitorear de una manera rápida, el contenido de los componentes mayoritarios presentes, ello, antes de realizar la cosecha del material vegetal y el procedimiento mucho más largo, *i.e.*, extracción del aceite y su posterior análisis (ca. 3-4 h por muestra).

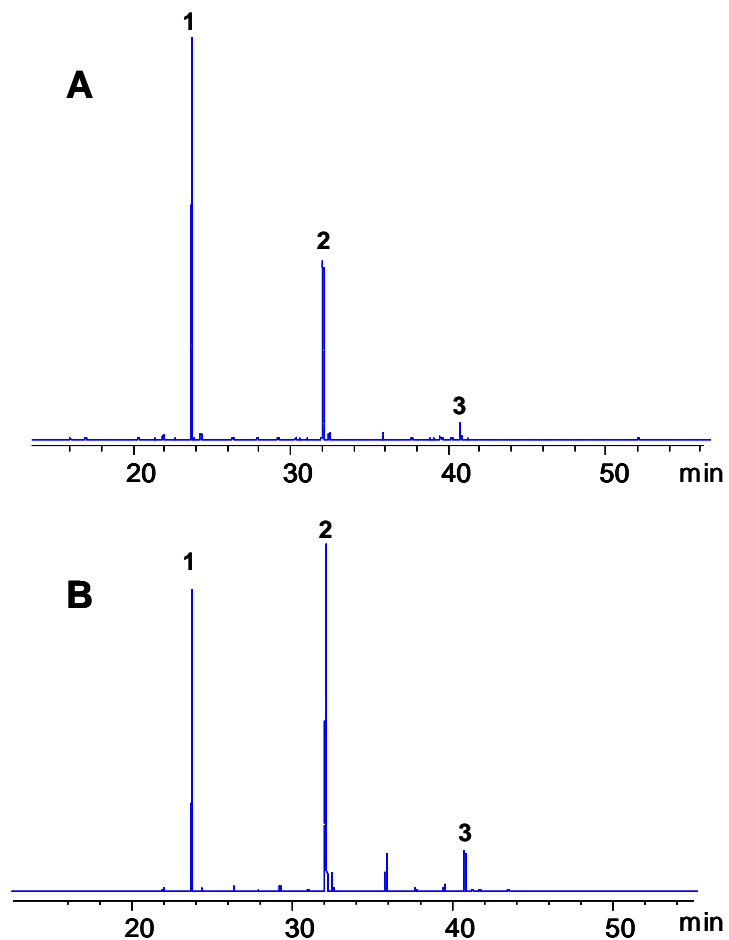


Figura 23. Perfiles cromatográficos típicos obtenidos por GC-FID, de los volátiles aislados por MW-HS-SPME de **A.** Hojas de *Lippia alba*; **B.** Su aceite esencial hidrodestilado. Compuestos mayoritarios: **1.** Limoneno; **2.** Carvona; **3.** Bicyclosesquifelandreno.

Tabla 7. Componentes mayoritarios extraídos por MW-HS-SPME, presentes en la fracción volátil de las hojas de *Lippia alba* y de su aceite esencial hidrodestilado.

Compuesto	GC área, %	
	Volátiles de la planta	Aceite esencial
Limoneno	51,6	29,2
Carvona	38,3	57,2
Bicyclosesquifelandreno	2,2	3,2

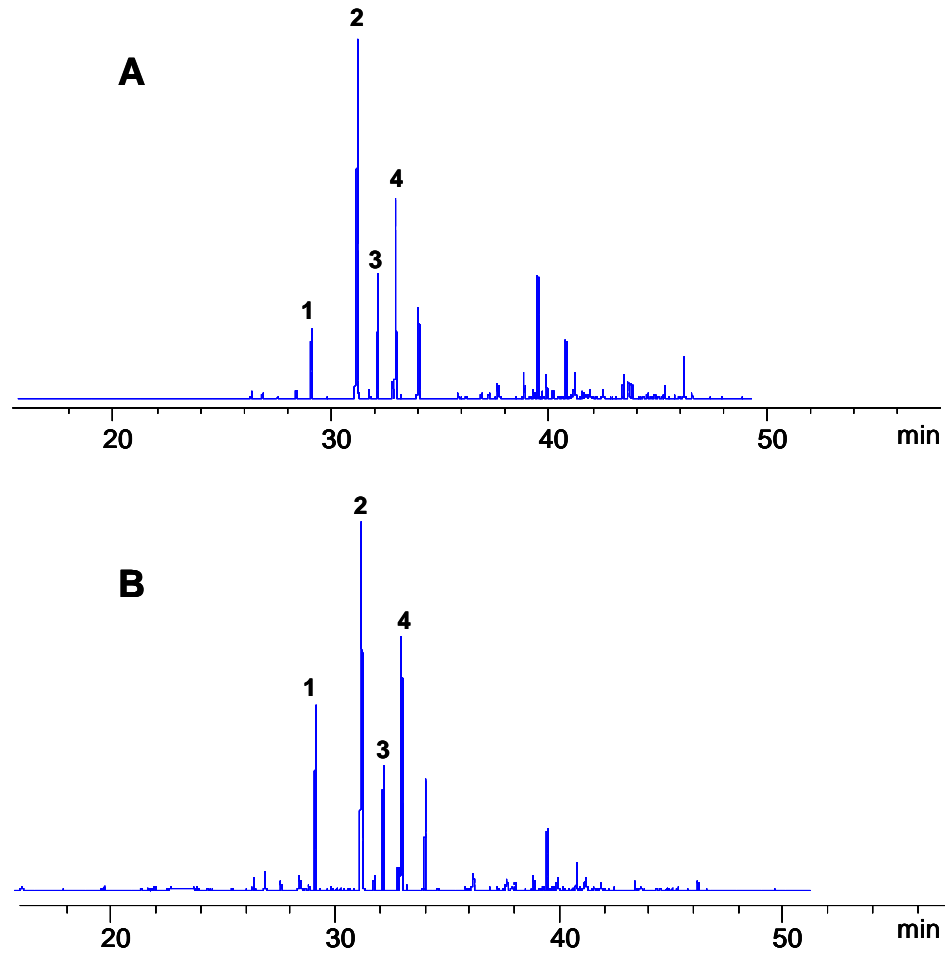


Figura 24. Perfiles cromatográficos típicos obtenidos por GC-FID, de los volátiles aislados por MW-HS-SPME de **A.** Hojas de *Pelargonium graveolens*; **B.** Su aceite esencial hidrodestilado. Compuestos mayoritarios: 1. *iso*-mentona; 2. citronelol; 3. geraniol; 4. geranial.

Tabla 8. Componentes mayoritarios extraídos por MW-HS-SPME, presentes en la fracción volátil de las hojas de *Pelargonium graveolens* y de su aceite esencial hidrodestilado.

Compuesto	GC área, %	
	Volátiles de la planta	Aceite esencial
<i>iso</i> -Mentona	11,0	3,8
Citronelol	29,0	32,1
Geraniol	7,9	8,6
Geranial	17,4	13,7

Las diferencias cuantitativas de los perfiles cromatográficos de los aceites esenciales y las fracciones volátiles de hojas y aceite esencial de *Lippia alba* y *Pelargonium graveolens* se pueden observar en las **Figuras 25** y **26**, respectivamente. Para el caso de *Lippia alba*, el método de SPME en modo *headspace*, asistida por la radiación de microondas, resultó ser mucho más eficiente para la extracción de limoneno y carvona a partir de hojas, comparado con la fracción volátil del aceite esencial. También resultó más eficiente en la extracción de limoneno, comparado con la cantidad presente en el aceite esencial obtenido por hidrodestilación. Lo anterior supone que el tiempo corto de muestreo (10 min) en el caso de SPME asistido por la radiación de microondas, favorece la adsorción de compuestos de tipo monoterpénico, como es el caso del limoneno.

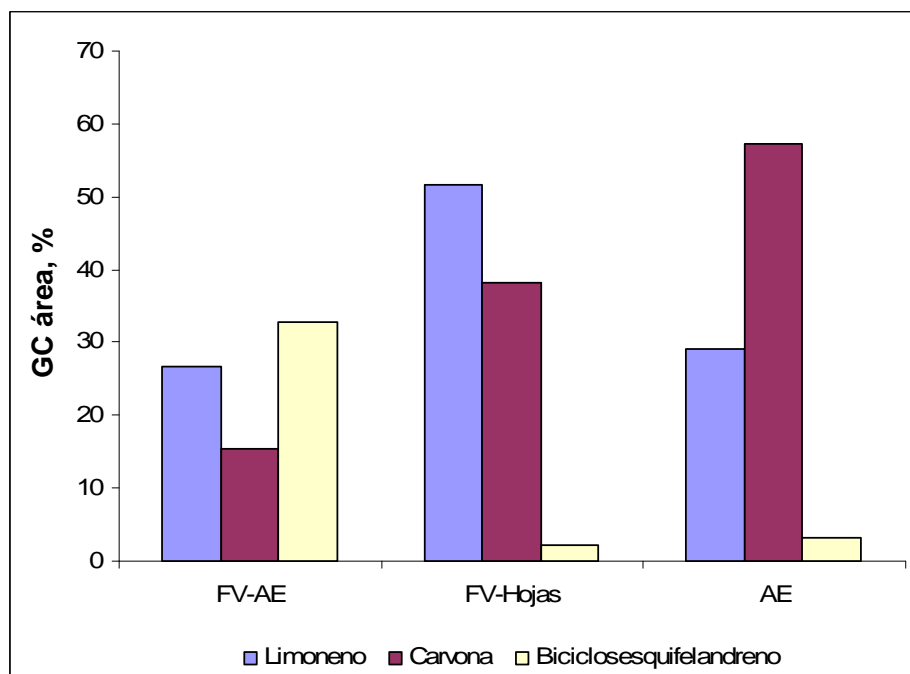


Figura 25. Principales compuestos presentes en las fracciones volátiles del aceite esencial (FV-AE), hojas (FV-Hojas) y el aceite esencial obtenido por hidrodestilación (AE) de *Lippia alba*.

Por el contrario, para tiempos de exposición de la fibra superiores a 20 min, se observa un fenómeno de competencia entre los monoterpenos y monoterpénos adsorbidas inicialmente, con los hidrocarburos sesquiterpénicos, e.g., biciclosesquifelandreno, lo cual concuerda con lo planteado por Pawliszyn y colaboradores, quienes argumentan que el fenómeno de competencia se presenta en fibras de PDMS, cuando la concentración de un analito excede el límite superior del rango lineal del recubrimiento, en este caso, carvona y limoneno [65].

En el caso de *Pelargonium graveolens*, el método de MWHD-HS-SPME, resultó más eficiente para la extracción de citronelol y geranial, lo cual concuerda con el tipo de fibra empleada (PA-85 μm), la cual es más afín a compuestos oxigenados.

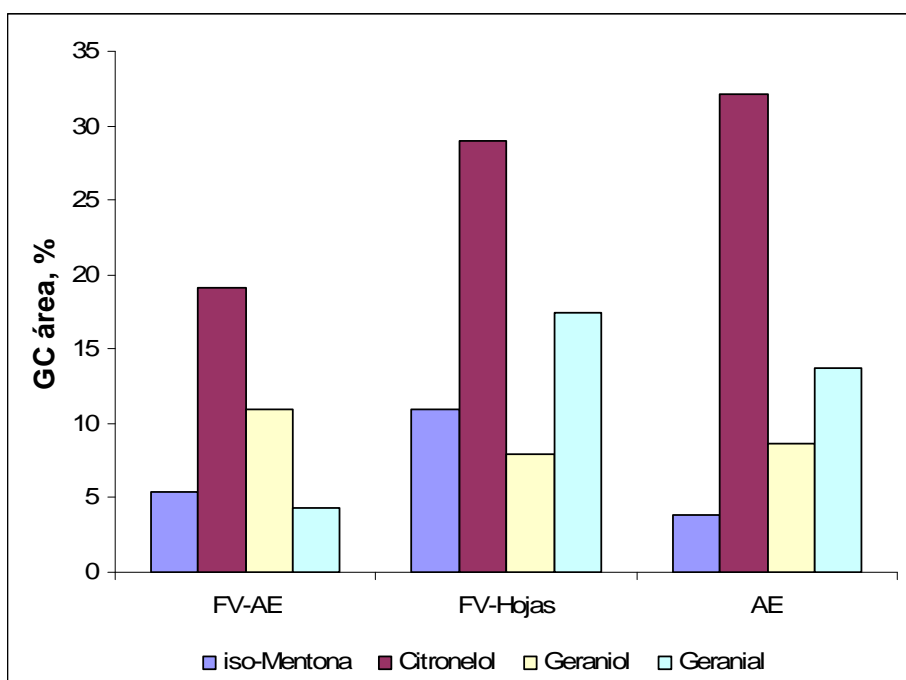


Figura 26. Principales compuestos presentes en las fracciones volátiles del aceite esencial (FV-AE), hojas (FV-Hojas) y el aceite esencial obtenido por hidrodestilación (AE) de *Pelargonium graveolens*.

5.4. EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE EXTRACCIÓN EN LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO MW-HS-SPME.

Los resultados, al aplicar el diseño factorial 3^3 más estrella a las especies *Lippia alba* y *Pelargonium graveolens*, para evaluar la eficiencia de extracción por el método de SPME en modo *headspace*, asistida por la radiación de microondas, se presentan en las **Tablas 9 y 10**, respectivamente. El observable empleado fue el cociente entre la sumatoria de las áreas cromatográficas de los componentes mayoritarios (A_{cm} , cuentas) presentes en las fracciones volátiles para cada especie vegetal y el área total (A_T , cuentas), calculados con base en la integración de los respectivos picos cromatográficos. Para el caso de *Lippia alba* se escogieron los compuestos limoneno y carvona, y para el caso de *Pelargonium graveolens*, el citronelol y geraniol.

Tabla 9. Resultados obtenidos al aplicar el diseño factorial 3^3 más estrella al estudio de los metabolitos secundarios volátiles de *Lippia alba*.

Experimento	Niveles codificados			Respuesta A_{cm}/A_T , cuentas
	Tiempo, min	Potencia, W	Agua, mL	
1	-	-	-	0,84834
2	+	-	-	0,88137
3	-	+	-	0,90534
4	+	+	-	0,88513
5	-	-	+	0,96008
6	+	-	+	0,95440
7	-	+	+	0,83044
8	+	+	+	0,91718
9	-	½	½	0,90794
10	+	½	½	0,89501
11	½	-	½	0,95868
12	½	+	½	0,87814
13	½	½	-	0,89124
14	½	½	+	0,88799
15	½	½	½	0,89976
15	½	½	½	0,91277
15	½	½	½	0,91466

Tabla 10. Resultados obtenidos al aplicar el diseño factorial 3³ más estrella al estudio de los metabolitos secundarios volátiles de *Pelargonium graveolens*.

Experimento	Niveles codificados			Respuesta A _{cm} /A _T , cuentas
	Tiempo, min	Potencia, W	Agua, mL	
1	-	-	-	0,41989
2	+	-	-	0,43140
3	-	+	-	0,62700
4	+	+	-	0,23753
5	-	-	+	0,35702
6	+	-	+	0,36902
7	-	+	+	0,51732
8	+	+	+	0,52951
9	-	½	½	0,41905
10	+	½	½	0,49869
11	½	-	½	0,43283
12	½	+	½	0,41174
13	½	½	-	0,31261
14	½	½	+	0,41423
15	½	½	½	0,438980465
15	½	½	½	0,446114745
15	½	½	½	0,430842280

Valores de los niveles:

Código/variable	Tiempo, min	Potencia, W	Agua, mL
-	2	330	0
+	4	550	80
½	3	440	40

El análisis de varianza ANOVA (**Tabla 11**) para la respuesta permitió evaluar estadísticamente la significancia de las variables bajo estudio, a saber: tiempo de extracción, potencia del horno y adición de agua.

Tabla 11. Análisis de varianza (ANOVA, Método de Yates) para la respuesta del diseño experimental implementado al estudio de los volátiles aislados de *Lippia alba* y *Pelargonium graveolens*.

Fuente de variación	<i>Lippia alba</i>		<i>Pelargonium graveolens</i>	
	Cociente*	Efecto	Cociente*	Efecto
Tiempo	14,0	Si	10,3	Si
Potencia	8,6	Si	9,2	Si
Agua	5,3	No	0,27	No
Tiempo x potencia	2,0	No	13,2	Si
Tiempo x agua	10,8	Si	13,3	Si
Potencia x agua	0,6	No	7,8	Si
Tiempo x potencia x agua	0,2	No	13,2	Si

* Cociente entre el cuadrado promedio y el cuadrado promedio estimado para el error experimental

El valor crítico del parámetro **F** para 1 y 4 grados de libertad con un nivel de probabilidad $P=0.05$, es de **7,71**.

Tal como se aprecia en la **Tabla 11**, para el caso de la especie *Lippia alba*, se concluye que solamente los efectos del tiempo y de la potencia son significativos, así como la interacción entre el tiempo y la adición de agua. Para la especie *Pelargonium graveolens*, los efectos significativos se presentaron para las variables del tiempo y de la potencia, así como su interacción y las interacciones entre el tiempo y el agua, la potencia y el agua y de las tres variables.

Con base en los resultados del análisis de la varianza, se procedió a optimizar el proceso de extracción por SPME en modo *headspace* asistida por la radiación de microondas.

5.4.1. Determinación de las condiciones óptimas para la extracción por MW-HS-SPME de las fracciones volátiles de *L. alba* y *P. graveolens*.

En la **Tabla 12** se presentan las ecuaciones evaluadas para optimizar el proceso de extracción por MW-HS-SPME de las fracciones volátiles de las especies *Lippia alba* y *Pelargonium graveolens*, así como los valores del R² estadístico ajustado y el error propio del modelo (LOF) calculados.

Tabla 12. Ecuaciones obtenidas para el proceso de optimización.

Nº	Ecuación	<i>Lippia alba</i>	
		R ²	LOF
1	$y = b_0 + A + B + C + AC + BC + ABC$	0.90	0.09
2	$y = b_0 + A + B + C$	0,31	1.46
3	$y = b_0 + A + B + C + AB + AC + BC + ABC$	0.56	2.1
4	$y = b_0 + A + B + C + BC + ABC$	0.41	1.9
5	$y = b_0 + A + B + C + AC + BC + ABC + B^2$	0.55	2.0
6	$y = b_0 + A + B + C + AC + BC + ABC + C^2$	0.61	2.1
7	$y = b_0 + A + B + C + AC + BC + ABC + A^2$	0.55	2.0
8	$y = b_0 + A + B + C + AC + BC + C^2 + BC^2$	0.41	2.0
9	$y = b_0 + A + B + C + AB + AC + BC + ABC + C^2$	0.54	2.1
10	$y = b_0 + A + B + C + AC + BC + ABC + B^2 + C^2$	0.57	2.1
11	$y = b_0 + A + B + C + AC + BC + ABC + C^2 + A^2 B^2 C^2$	0.53	2.1
Nº	Ecuación	<i>Pelargonium graveolens</i>	
		R ²	LOF
12	$y = b_0 + A + B + C + AB + AC + BC + ABC + B^2$	0.83	0.27
13	$y = b_0 + A + B + C + AB + AC + BC + ABC$	0,47	3.4
14	$y = b_0 + A + B + C + ABC$	0.3	3.2
15	$y = b_0 + A + B + C + AB + AC + BC$	0.52	1.3
16	$y = b_0 + A + B + C + AB + AC + BC + ABC + A^2 + B^2 + C^2$	0.49	1.1
17	$y = b_0 + A + B + C + BC + B^2$	0.36	10.9

A: Tiempo (min); **B:** Potencia (W); **C:** Agua (mL)

De acuerdo con los resultados obtenidos en las evaluaciones de los modelos polinómicos para la optimización del método de extracción de la fracción volátil de plantas de *Lippia alba* y *Pelargonium graveolens* mediante SPME en modo *headspace* asistida por la radiación de microondas, las **Ecuaciones N° 1 y N° 12** presentaron los mejores valores de R^2 estadístico ajustado y correspondieron de esta manera al **90** y al **83%** de la variabilidad de las áreas cromatográficas de los componentes mayoritarios de los aceites esenciales de pronto alivio y geranio, respectivamente.

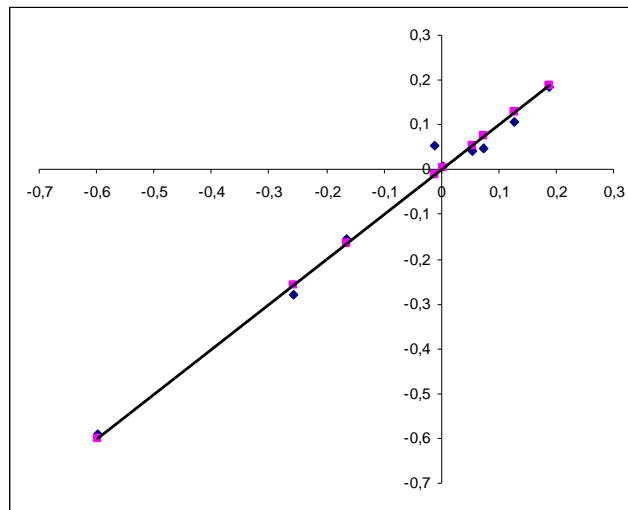
Las **Ecuaciones N° 1 y N° 12** se evaluaron con valores diferentes a los descritos en el diseño experimental, ello para validar los modelos obtenidos. En la **Tabla 13** se presentan los niveles evaluados para cada especie vegetal, las respuestas experimental (A_{cm}/A_T , cuentas) y calculada por los modelos matemáticos planteados para cada especie. En las **Figuras 27 y 28** se muestran los valores calculados para los modelos obtenidos Vs la respuesta experimental producida durante la extracción de los componentes volátiles de *Lippia alba* y *Pelargonium graveolens* por MW-HS-SPME.

Tabla 13. Datos de validación de los modelos matemáticos obtenidos para el método de extracción por MW-HS-SPME.

$y = b_0 + A + B + C + AC + BC + ABC$; <i>Lippia alba</i>					
Tiempo, min	Potencia, W	Agua, mL	Respuesta, A_{cm}/A_T, cuentas	Respuesta calculada según el modelo	Error, %
5	440	50	0,918333	0,918122	0.02
$y = b_0 + A + B + C + AB + AC + BC + ABC + B^2$; <i>Pelargonium graveolens</i>					
Tiempo, min	Potencia, W	Agua, mL	Respuesta, A_{cm}/A_T, cuentas	Respuesta calculada según el modelo	Error, %
5	440	50	0,379889	0.384911	1.3

En la **Tabla 14** se presentan los valores de los coeficientes obtenidos para las variables descritas en las **Ecuaciones 1 y 12**, necesarios para encontrar las

condiciones óptimas de extracción por el método MW-HS-SPME de volátiles de las plantas *Lippia alba* y *Pelargonium graveolens*. Los valores óptimos de cada variable y para cada especie vegetal, se presentan en la **Tabla 15**.



■ Y experimental; ■ Y calculado

Figura 27. Respuesta experimental (A_{cm}/A_T , cuentas) para la extracción por MW-HS-SPME de los volátiles de *Lippia alba* Vs los valores obtenidos según el modelo matemático, al aplicar el diseño factorial 3^3 más estrella.

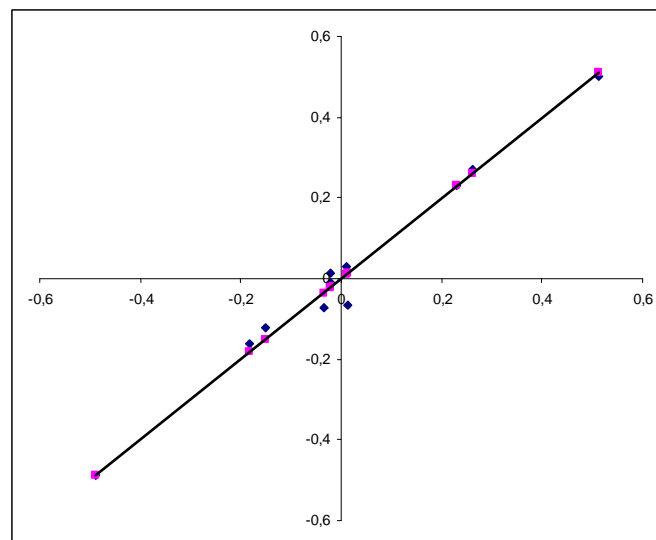


Figura 28. Respuesta experimental (A_{cm}/A_T , cuentas) para la extracción por MW-HS-SPME de los volátiles de *P. graveolens* Vs los valores obtenidos según el modelo matemático, al aplicar el diseño factorial 3^3 más estrella.

Tabla 14. Coeficientes de las ecuaciones polinómicas ajustadas a los modelos matemáticos para las variables tiempo de radiación (min), potencia de trabajo del microondas (W) y cantidad de agua (mL) adicionada, en la extracción por el método MW-HS-SPME de la fracción volátil de *Lippia alba* y *Pelargonium graveolens*.

<i>Lippia alba</i>	
Variable	Coeficiente
A: Tiempo de radiación, min	0,278656483
B: Potencia, W	0,287839835
C: Agua, mL	-0,261906424
AC	0,301429041
BC	0,119136175
ABC	0,141424884
b ₀ ; constante	-0,090721431
<i>Pelargonium graveolens</i>	
Variable	Coeficiente
A: Tiempo de radiación, min	-0,217873553
B: Potencia, W	0,194644427
C: Agua, mL	0,045825787
AB	-0,514533411
AC	0,516266626
BC	0,394838747
ABC	1,030083608
B ²	0,502974236
b ₀ ; constante	-0,094493575

En conclusión, las ecuaciones de los modelos ajustados para las especies *Lippia alba* y *Pelargonium graveolens*, fueron las siguientes:

***Lippia alba*:** $y = -0,090721431 + 0,278656483A + 0,287839835B - 0,261906424C + 0,301429041AC + 0,119136175BC + 0,141424884ABC$

$$y = -0,094493575-0,217873553A+0,194644427B+0,045825787C- \\ P. \textit{graveolens}: 0,514533411AB+0,516266626AC+0,394838747BC+1,030083608ABC \\ +0,502974236B^2$$

Para obtener los valores óptimos de cada variable bajo estudio de la extracción por el método MW-HS-SPME de los componentes volátiles de *Lippia alba* y *Pelargonium graveolens*, las **Ecuaciones N° 1 y N° 12** se derivaron respecto a cada variable. En la **Tabla 15** se presentan los valores óptimos de tiempo (min), potencia (W) y agua (mL), así como la respuesta (A_{cm}/A_T , cuentas), del proceso de extracción por MW-HS-SPME, de las fracciones volátiles de *Lippia alba* y *P. graveolens*.

Tabla 15. Valores óptimos de las variables empleadas en el proceso de extracción por MW-HS-SPME de las fracciones volátiles de *Lippia alba* y *Pelargonium graveolens*.

$y = b_0+A+B+C+AC+BC+ABC$; <i>Lippia alba</i>			
Tiempo, min	Potencia, W	Agua, mL	Respuesta, A_{cm}/A_T, cuentas
3.42	440	24	0,98675923
$y = b_0+A+B+C+AB+AC+BC+ABC+B^2$; <i>Pelargonium graveolens</i>			
Tiempo, min	Potencia, W	Agua, mL	Respuesta, A_{cm}/A_T, cuentas
2.58	770	74	0,70485283

A_{cm} : Área cromatográfica (cuentas) de los componentes mayoritarios de *Lippia alba* (limoneno + carvona) y *Pelargonium graveolens* (citronelol + geraniol).

A_T : Área cromatográfica (cuentas) del total de compuestos presentes en las fracciones volátiles obtenidas de *Lippia alba* y *Pelargonium graveolens*, respectivamente.

5.5. DETERMINACIÓN DE LAS FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO.

La descripción del procedimiento empleado para la determinación de las figuras analíticas de mérito del método, aparece en la **Sección 4.5** de la Parte Experimental.

- **Evaluación de la linealidad y la sensibilidad del método.** La linealidad y la sensibilidad del método se evaluaron empleando la curva de calibración con estándar externo. El método MW-HS-SPME con separación y análisis de los volátiles por GC-FID, fue lineal en el rango de concentraciones evaluadas, de 0 a 20.000 ppm para carvona, citronelol y geraniol, tal como se aprecia en la **Tabla 16**. La sensibilidad del método de extracción (MWH-D-HS-SPME), empleando el FID, fue mayor para el geraniol, seguida del citronelol y la carvona. En todos los casos, el método fue lineal cuando se adicionó su estándar de manera individual, corroborando de esta manera los resultados reportados por Xiong y colaboradores [93], quienes consideraron conveniente cuantificar los compuestos de manera individual.

Tabla 16. Linealidad y sensibilidad del método MW-HS-SPME.

Compuesto	Ecuación	R ²
Carvona	$y = 2,55 x - 20,495$	0,9983
Citronelol	$y = 3,08 x - 59,126$	0,9996
Geraniol	$y = 4,25 x - 44,365$	0,9994

- **Evaluación de la reproducibilidad del método.** Los mayores valores del coeficiente de variación para áreas y tiempos de retención (**Tablas 17 y 18**), de los compuestos volátiles analizados (carvona, citronelol y geraniol) fueron 5,9 y 0,3%, respectivamente. Como el valor del coeficiente de variación calculado para cada uno de los compuestos analizados por el método, no superó el 2% para el tiempo

de retención, ni el 10% para el área del pico cromatográfico, el método implementado puede considerarse de reproducibilidad alta, según lo estipulado por las Buenas Prácticas de Laboratorio.

Tabla 17. Reproducibilidad de las áreas de los picos cromatográficos seleccionados por el método MWHD-HS-SPME/GC-FID.

Compuesto	Área, cuentas			<X> (n = 6)	S	CV, %
Carvona	3727,20190	3927,90894	4002,29102	3844,43600	110,784	2,9
	3709,03589	3808,40283	3891,77539			
Citronelol	7,89593E+03	8,44508E+03	7,47081E+03	7,65902E+03	449,552	5,9
	7,53112E+03	7,56627E+03	7,04491E+03			
Geraniol	1,22980E+04	1,04814E+04	1,19878E+04	1,16731E+04	672,525	5,8
	1,14766E+04	1,14292E+04	1,23658E+04			

Tabla 18. Reproducibilidad de los tiempos de retención de los picos cromatográficos seleccionados por el método MWHD-HS-SPME/GC-FID.

Compuesto	Tiempo de retención, min			<X> (n = 6)	S	CV, %
Carvona	32,12	32,05	32,07	32,09	0,032	0,1
	32,08	32,12	32,13			
Citronelol	31,36	31,49	31,24	31,33	0,093	0,3
	31,30	31,22	31,35			
Geraniol	32,47	32,64	32,37	32,47	0,097	0,3
	32,37	32,50	32,49			

- **Determinación de los límites de detección y cuantificación.** Los límites de detección y cuantificación para la carvona, el citronelol y el geraniol, del método MW-HS-SPME/GC-FID, se reportan en la **Tabla 19**.

Tabla 19. Límites de detección y cuantificación para carvona, citronelol y geraniol.

Compuesto	LOD, ppm	LOQ, ppm
Carvona	0,26	0,52
Citronelol	0,44	0,88
Geraniol	0,35	0,70

6. CONCLUSIONES

- El uso de la SPME en modo *headspace* asistida por la radiación de microondas, permitió desarrollar un procedimiento analítico rápido y confiable para la extracción y determinación de compuestos volátiles de plantas aromáticas de *Lippia alba* y *Pelargonium graveolens*. El desarrollo de este método permitió disminuir en dos horas, el tiempo de análisis de los compuestos volátiles de plantas cultivadas industrialmente, comparado con el procedimiento tradicional de hidrodestilación (obtención del aceite esencial).
- El dispositivo experimental diseñado en este trabajo permitió controlar la temperatura del espacio en el que se realiza el muestreo de la fracción volátil. Esto contribuyó al logro de una buena reproducibilidad, lo cual constituye una mejora al procedimiento descrito por Deng y colaboradores en 2006 [18-20].
- Se determinaron las condiciones óptimas de extracción de los compuestos carvona y limoneno para la especie *Lippia alba* y citronelol y geraniol para *Pelargonium graveolens*, mediante el método de HS-SPME asistida por la radiación de microondas, empleando un diseño experimental factorial 3^3 mas estrella, con diferentes tiempos de extracción (T), niveles de potencia (P), y adición de agua (A), así como distintos tipos de recubrimiento de la fibra de SPME., a saber: *Lippia alba*: T= 3.42 min; P= 440 W; A= 24 mL; fibra PDMS-100 μm ; *Pelargonium graveolens*: T= 2.58 min; P= 770 W; A= 74 mL; fibra PA-85 μm .
- Al comparar los cromatogramas obtenidos de las fracciones volátiles de *Lippia alba* y *Pelargonium graveolens* empleando el método de HS-SPME asistida por la radiación de microondas, con los perfiles cromatográficos de

sus aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación, se encontró que fueron cualitativamente similares, lo cual permite aplicar el método desarrollado, al análisis directo de las plantas cultivadas industrialmente, y a establecer el procedimiento como una prueba diagnóstica, para el análisis de calidad de los cultivos.

- Para la especie *Lippia alba* se encontró que en comparación con la hidrodestilación, el método de HS-SPME asistida por la radiación de microondas fue más eficiente en la extracción de limoneno, y menos eficiente en la del biciclosesquifelandreno. De igual manera, con la fracción volátil de hojas de *Pelargonium graveolens*, obtenida por MW-HS-SPME fue mayor la extracción de geranial; sin embargo, el contenido de citronelol y geraniol fue mayor en el aceite esencial aislado por hidrodestilación. Las diferencias cuantitativas de los componentes mayoritarios de las fracciones volátiles de hojas de *L. alba* y *P. graveolens*, con los obtenidos en sus aceites esenciales, se debieron principalmente a fenómenos de competencia en las fibras de SPME (PDMS-100 μm , PA-85 μm), a los tiempos de extracción y la temperatura de muestreo.
- En las fracciones volátiles de los aceites esenciales de *Lippia alba* y *Pelargonium graveolens* se identificaron 33 y 100 metabolitos secundarios volátiles y semivolátiles, respectivamente. La fracción volátil de *L. alba* presentó un alto contenido de sesquiterpenos (54.4%), seguido de monoterpenos (27,3%) y monoterpenonas (17,2%). La fracción volátil de *P. graveolens* presentó mayoritariamente compuestos de tipo monoterpeno oxigenado (63.8%), seguido de sesquiterpenos (23.3%) y monoterpenonas (6.4%), principalmente.
- Los resultados de la evaluación de las figura analíticas de mérito mostraron que el método desarrollado de MW-HS-SPME fue lineal, sensible y

reproducible, de acuerdo con lo estipulado por las Buenas Prácticas de Laboratorio.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAM M., JUKLOV M, BAJER T, EISNER A, and VENTURA A., Comparison of three different solid-phase microextraction fibres for analysis of essential oils in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves., *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1084, 2–6.
2. ADAMS, Robert. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectroscopy, 4th Edition. USA: Allured Publishing Corporation, **2007**. 804p.
3. ALPENDURADA, M.F. Solid phase microextraction. A promising technique for sample preparation an environmental analysis, *J. Chromatogr. A*, **2000**, 889, 3-14.
4. ARAÚJO, J., ARENCIBIA, R., Informetría, bibliometría y cienciometría: aspectos teórico-prácticos. **2002**. (sitio en Internet). Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/aci/vol10_4_02/aci040402.htm. Fecha de consulta 1 de septiembre de 2009.
5. A Study into the Potential of Aromatic Plants for Essential Oils in Mozambique. MBB Consulting Services South (Pty) Ltd Stellenbosch, South Africa, **2006**.
6. ARTHUR, C.; and PAWLISZYN, J., Solid-phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.*, **1990**, 62, 2145-2148.
7. AVELLANEDA, Gustavo A., ROA, Gabriel H., Estudio de la estructura de mercado para la comercialización de aceites esenciales en Colombia. Bucaramanga: Tesis de grado (Economía). Facultad de Ciencias Humanas, Universidad Industrial de Santander, **2008**. 92p.

8. BAHL, J.R., SINHA, S., NAQVI, A.A., BANSAL, R.P., GUPTA, A.K., KUMAR, S. Linalool-rich essential oil quality variants obtained from irradiated stem nodes in *Lippia alba*, *Flavour Fragr. J.*, **2002**, 17, 127-132.
9. BANDONI, Arnaldo (Ed). Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Argentina: Red de editoriales universitarias, **2000**. p.p. 29-43, 149-171, 197-232.
10. BARSHICK, S-A. and GRIEST, W. H. Trace Analysis of Explosives in Seawater Using Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography/Ion Trap Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, 70(14), **1998**, pp. 3015-3020.
11. BAUER, K.; GARBE, D.; and SURBURG, H., Common fragrance and flavours materials, preparation, properties and uses, Wiley-VCH, 4a Ed., Weinheim, **2001**, 239 p.
12. BENVENISTE, B. and AZZO, N., Geranium Oil. Technical Bulletin, Vol II, Kato Woldwide, **1992**, in: LAWRENCE, B., Essential Oils 1995-2000, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, **2003**, pp. 100-104.
13. BOUSBIA, N., VIAN, M., FERHAT, M., *et al.* Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and Microwave Hydrodiffusion and Gravity. *Food Chemistry.*, *In Press*. **2009**.
14. C.C.R. de CARVALHO C., Da FONSECA M., Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene. *Food Chemistry.*, **2006**, 95, 413-422.

15. CASTRO M., JÍMENEZ M., and FERNÁNDEZ V., Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants En: *Trends Chem.*, **1999**, 11, (18), 708-716.
16. CENTRE FOR THE PROMOTION OF IMPORTS FROM DEVELOPING COUNTRIES: Market survey on natural ingredients for cosmetics. **2006**. Disponible en Internet :
<http://www.cbi.nl/show.php?file=marketinforesults.html&action>.
17. CHAI, M. and PAWLISZYN, J. B. Analysis of Environmental Air Samples by Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography/Ion Trap Mass Spectrometer. *Environ. Sci. Technol.*, **1995**, 29, (3), 693-701.
18. CHUNHUI Deng, Xiuqin Xu, Ning Yao, Ning Li, Xiangmin Zhang, Rapid determination of essential oil compounds in *Artemisia Selengensis* Turcz by gas chromatography-mass spectrometry with microwave distillation and simultaneous solid-phase microextraction., *Analytica Chimica Acta*, **2006** 556, 289–294.
19. CHUNHUI Deng, Yu Maob, Ning Yao., Development of microwave-assisted extraction followed by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry for quantification of camphor and borneol in *Flos Chrysanthemi Indici.*, *Analytica Chimica Acta*, **2006**, 575, 120–125.
20. CHUNHUI Deng, Jie Ji a, Ning Li a, Yingjia *et al.*, Fast determination of curcumol, curdione and germacrone in three species of *Curcuma* rhizomes by microwave-assisted extraction followed by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry., *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1117, 115–120.

21. DAWIDOWICZ, A., RADO, E., WIANOWSKA, D., *et al.* Application of PLE for the determination of essential oil components from *Thymus vulgaris* L., *Talanta*, **2008**, 76, 878-884.
22. 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, 37-146.
23. DOMÍNGUEZ, A. X., Métodos de investigación fitoquímica, México: Limusa, **1988**. p.p. 229, 239, 281.
24. DURÁN, Diego 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. Bucaramanga: Tesis de grado (Química). Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, **2005**. 122p.
25. EISERT, R. and PAWLISZYN, J. New Trends in Solid-Phase Microextraction. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **1997**, 27 (2), 103-135.
26. ESKILSON C., BJORKLUND E., Review: Analytical-scale microwave assisted extraction. En: *J. Chromatogr., A.* **2000**, 902, 227-250.
27. Exportaciones con aroma. Disponible en: http://www.dinero.com/wf_InfoArticulo.aspx?idArt=26875.
28. FERHAT, Mohamed *et al.*, An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel, *J. Chromatogr. A.*, **2006**, 1112, 121-126.

29. FLAMINI G., LUIGI P., MORELLI I., Composition of the essential oils and in vivo emission of volatiles of four Lamium species from Italy: *L. purpureum*, *L. hybridum*, *L. bifidum* and *L. amplexicaule*., *Food Chemistry*, **2005**, 91, 63–68.
30. GALLETI, G. C. and BONAGA, G., Analytical methods in the study of essential oils extraction, separation and identification techniques. *Chimica Acta Turcia*, **1988**, 16, 291-296.
31. GARCÍA A., SÁNCHEZ M., FERNÁNDEZ A., and LUQUE M., Fucoused Microwave-Assisted Soxhlet: An Advantageous Tool for Sample Extraction. *Anal Chem.*, **1988**, 70, 2426-2431.
32. GARCÍA, A., “Análisis de extractos y fracciones volátiles obtenidos de flores y rizomas de *Hedychium coronarium* köern (familia Zingiberacea)”. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, Escuela de Química, Tesis de Maestría, **2008**, p. 151.
33. GUENTHER, E., The essential Oils, Vol IV, Ed. Van Nostrand, New York, **1953**, pp.671-728.
34. GUPTA, M. P., 270 Plantas medicinales Iberoamericanas. Bogotá: CYTED – SECAB, **1995**, 617p.
35. HARPER, M. Sorbent Trapping of Volatile Organic Compounds from Air. *J. Chromatogr. A.*, **2000**, 885(12), 129-151.
36. HUSAIN, A., Essential Oil plants and their cultivation. India: Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Lucknow. **1994**, pp. 29-33.

37. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos "Alexander von Humboldt", Estudio del mercado nacional de aceites esenciales, **2003**.
38. Informe Mercado de Hierbas Aromáticas y Medicinales en Colombia.
Disponible en www.ecuadorexporta.org/productos_down/perfil_de_hierbas_aromaticas_en_colombia490.pdf.
39. JEAN, F. I. COLLIN, G. LORD, D., Essential oil and microwave extracts of cultivated plants. *Perfumer & Flavorist.*, **1992**, 17 (3), 35-41.
40. JIROVETZ L., *et al.*, Aroma compound analysis of *Piper nigrum* and *Piper guineense* essential oils from Cameroon using solid-phase microextraction–gas chromatography, solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry and olfactometry., *J. Chromatogr. A*, **2002**, 976, 265–275.
41. KENNETH, A. B., Hierbas aromaticas. Biblioteca del Jardín. Ediciones Folio. Barcelona. **1988**, pp. 26-42.
42. KINGSTON, H. M., JASSIE, L. B., Introduction to microwave sample preparation, theory and practice. Washington: American Chemical Society. **1988**. p.p. 7-31.
43. KOVÁTS, E., Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. *Advan. Chromatogr.*, **1965**, 1, 229-247.
44. KOZIEL, J. A.; NOAH, J. and PAWLISZYN, J. Field Sampling and Determination of Formaldehyde in Indoor Air with Solid-Phase Microextraction and On-Fiber Derivatization. *Environ. Sci. Technol.*, **2001**, 35(7), 1481-1486.

45. LEE, M-R.; YEH, Y-C.; HSIANG, W-S., and HWANG B. H. Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry for Determining Chlorophenols from Landfill Leaches and Soil. *J. Chromatogr. A.*, **1998a**, 806(2), 317–324.
46. LÓPEZ P., HUERGA M, BATLLE R, and NERÓN C., Use of solid phase microextraction in diffusive sampling of the atmosphere generated by different essential oils., *Analytica Chimica Acta*, **2006**, 559, 97–104.
47. LORD, H and PAWLISZYN, J. Evolution of solid-phase microextraction technology. *J. Chromatogr. A*, **2000**, 885, 153-193.
48. LORENZO, D., PAZ, D., DAVIES, P., VILA, R., CAÑIGUERAL, S., DELLACASSA, E. Composition of a new essential oil type of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown from Uruguay, *Flavour Fragr. J.* **2001**, 16, 356-359.
49. LUCCHESI, M., CHEMAT, F., SMADJA, J., Solvent free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro.distillation., *J. Chromatogr. A.*, **2004**, 1043, 323-327.
50. MANI, V. Properties of Commercial SPME Coatings. En: PAWLISZYN, J. (Editor). Applications of Solid Phase Microextraction. *Cambridge: Royal Society of Chemistry*, **1999**. 654 p.
51. Market survey of plant based-fragrances in Grenada. Disponible en: http://www.frp.uk.com/project_details.cfm/projectID/8127. Consultado: 20/06/2009.
52. MARRIOTT P, Shellie R, Cornwell C, Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils, *J. Chromatogr. A*, **2001**, 936, 1-22.

53. MARSILI, Ray (Ed). Flavor, Fragrance, and Odor Analysis. New York: Marcel Dekker Inc., **2002**. 424p
54. MARTOS, P. A. and PAWLISZYN, J. Sampling and Determination of Formaldehyde Using Solid-Phase Microextraction with On-Fiber Derivatization. *Anal. Chem.*, **1998**, 70(11), 2311-2320.
55. Maryline Abert Viana, Xavier Fernandezb, Franco Visinonic, Farid Chemata. Microwave hydrodiffusion and gravity, a new technique for extraction of essential oils. *J. Chromatogr. A.*, **2008**, 1190, 14-17.
56. Mebazaa Riadh, Mahmoudi Amine, Fouchet Marine, *et al.* Characterisation of volatile compounds in Tunisian fenugreek seeds. *Food Chem.*, **2009**, 115, 1326-1336.
57. MORA, A., "Desarrollo de métodos cromatográficos para la determinación de compuestos carbonílicos (aldehídos y cetonas) y ácidos carboxílicos en fase gaseosa". Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, Escuela de Química, Tesis Doctoral, **2006** pp. 69.
58. MUÑOZ, F., Plantas medicinales y aromáticas, estudio, cultivo y procesado. Madrid: Mundi Prensa, **1987**. 365p
59. NAMIEŚNIK, J.; ZYGMUNT, B. and JASTRZECEDILBSKA, A. Application of Solid-Phase Microextraction for Determination of Organic Vapours in Gaseous Matrices. *J. Chromatogr. A.*, **2000**, 885(1-2), 405-418.
60. NING Li, Chunhui Deng *et al.*, Gas chromatography–mass spectrometry following microwave distillation and headspace solid-phase microextraction for

- fast analysis of essential oil in dry traditional Chinese medicine., *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1133, 29–34.
61. PALA-PAU J., *et al.*, Analysis of the volatile components of *Lavandula canariensis* (L.) Mill., a Canary Islands endemic species, growing in Australia., *Biochemical Systematics and Ecology*, **2004**, 32, 55–62.
62. PARÉ, J. R. J., SIGAMIN, M., LAPOINTE, J., US Patent. 5.002.784., 1991.
63. PARÉ, J. R. J., European Patent Application 0485668A1., 1992.
64. PAWLISZYN, J., PAWLISZYN, B. and PAWLISZYN M., Solid-phase microextraction (SPME). *The Chemical Educator*, **1997**, 2(4), 7.
65. PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction: theory and practice. Ed. John Wiley and Son's, Inc. New York, **1997**, 241p.
66. PEÑALVER H., A. M. Aplicación de la microextracción en fase sólida al análisis medioambiental. Universitat Rovira I Virgili. Tarragona. España. **2002**, 322 p.
67. PINO, J.A., ORTEGA, A.G., ROSADO, A., RODRÍGUEZ, M., BALUJAR, R. Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, *Rev. Cubana Farm.*, **1997**, 30, 1-8.
68. PLUTOWSKA, Beata *et al.*, Arograms – Aromatic profiles in the appreciation of food quality, *Food Chemistry*, **2007**, 101, 845-872.
69. QUINTO P., LO PRESTI M , COSTA R and, DUGOB P., High-throughput analysis of bergamot essential oil by fast solid-phase microextraction–capillary

- gas chromatography–flame ionization detection., *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1103, 162–165.
70. RANA, V.; JUYAL, J.; and BLÁZQUEZ, A., Chemical constituents of essential oil of *Pelargonium graveolens* leaves, *Inter. J. Aromather.*, **2002**, 12(4), 216-218.
71. REIS, A. S.; GOMES DE ACEVEDO, E.; SARDIHA, 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.
72. ROHLOFF, J., Volatiles from rhizomes of *Rhodiola rosea* L., *Phytochemistry*, **2002**, 59, 655–661.
73. RUIZ, J.; VENTANAS, J. and CAVA, R. New Device for Direct Extraction of Volatiles in Solid Samples Using SPME. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49(11), 5115-5121.
74. SHIREY, R. E. Rapid Analysis of Environmental Samples Using Solid-Phase Microextraction (SPME) and Narrow Bore Capillary Columns. *J. High. Resolut. Chromatogr.*, **1995**, 18, 495-499.
75. Spices and herbs. A survey of the market for Spices and Herbs in Denmark. The Danish Import Promotion Programme, **2006**.
76. STASHENKO, E. E.; PUERTAS, M. A.; SALGAR, W.; DELGADO, W., and MARTÍNEZ, J. R. Solid-Phase Microextraction with On-Fibre Derivatisation Applied to the Analysis of Volatile Carbonyl Compounds. *J. Chromatogr. A*, **2000**, 886(1-2), 175-181.

77. 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*, **2004A**, 1025, 93–103.
78. STASHENKO E., JARAMILLO B. and MARTÍNEZ J., Analysis of volatile secondary metabolites from Colombian *Xylopiya aromatica* (Lamarck) by different extraction and headspace methods and gas chromatography., *J. Chromatogr. A*, **2004B**, 1025, 105–113.
79. STASHENKO E (Investigadora Principal)., “Estudio integral de especies aromáticas y medicinales tropicales promisorias para el desarrollo competitivo y sostenible de la agroindustria de esencias extractos y derivados naturales en Colombia”. Contrato RC-432 COLCIENCIAS – CENIVAM (2004).
80. STASHENKO E. ELENA, Aceites esenciales. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, **2009**. 180 p.
81. SENATORE, F., RIGANO, D. Essential oil of two *Lippia* spp. (Verbenaceae) growing wild in Guatemala, *Flavour Fragr. J.*, **2001**, 16 (3), 169-171.
82. SWARTZ, Michael and KRULL, Ira. Analytical method development and validation. New York: MARCEL DEKKER, **1997**. 92 p.
83. The Market for Natural Ingredients for Cosmetics in the EU. CBI Market Survey. October, **2008**. 56 p. Disponible en www.cbi.eu/disclaimer
84. TORRES Héctor A., Colombia: Cifras y datos, Rodríguez Quito Editores, Bogotá, **2003**.

85. ULRICH, S. Solid phase microextraction in biomedical analysis, *J. of Chromatogr. A*, 902, 2000, p.p. 167-194.
86. VAS, G. and VÉKEY K. Solid-Phase Microextraction: A Powerful Sample Preparation Tool Prior to Mass Spectrometric Analysis. *J. Mass Spectrom.*, **2004**, 39, 233-254.
87. WANG Z., DING L., LI T., ZHOU X., *et al.*, Improved solvent-free microwave extraction of essential oil from dried *Cuminum cyminum* L and *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1102, 11–17.
88. WEISS, E. A. Essential oil crops. Cambridge Cab international. **1997**, pp. 24-59.
89. World Market Forecast, Businessafrica.net Newsletter, 1(48) 2003.
90. www.fao.org/docrep/x5060s/x5060S08.htm; consultado: 10/09/2004
91. www.fao.org/docrep/t2360s/t2360s.htm; consultado: 10/09/2004
92. www.fao.org; consultado 3-10-2006
93. XIONG, G.; GOODRIDGE, C.; WANG, L.; CHEN, Y.; and PAWLISZYN, J., Microwave-assisted headspace solid-phase microextraction for the analysis of bioemissions from *Eucalyptus citriodora* leaves. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 7841-7847.
94. Yan Shen, Chao Han, Jidong Liu, Aili Liu, Xiaowu Ji, Cuiping Liu. Analysis of Volatile Components of *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax by Microwave-

Assisted Solvent Extraction and GC–MS. *Chromatographia*, **2008**, 68(7/8), 679-682.

95. YINGJIA Yu a, Taomin Huang *et al.*, Development of gas chromatography–mass spectrometry with microwave distillation and simultaneous solid-phase microextraction for rapid determination of volatile constituents in ginger., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2007**, 43, 24–31.

96. Zahr9698a Talebpour, Alireza Ghassempour, Monireh Abbaci, Hassan Y. Aboul-Enein. Optimization of Microwave-Assisted Extraction for the Determination of Glycyrrhizin in Menthazin Herbal Drug by Experimental Design Methodology. *Chromatographia*, **2009**, 70(1/2), 191-197.

97. ZOGHBI, M.G.B., ANDRADE, E.H.A., SANTOS, A.S., SILVA, M.H.L., MAIA, J.G.S. Essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. grown wild in the Brazilian Amazon, *Flavour Fragr. J.*, **1998**, 13, 47-48.

98. Z. Q. Fan, S. B. Wang, R. M. Mu, X. R. Wang, S. X. Liu, and X. L. Yuan. A Simple, Fast, Solvent-Free Method for the Determination of Volatile Compounds in *Magnolia grandiflora* Linn. *J. Anal. Chem.*, **2007**, 3, 289-294.