

**ADECUACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE UN PROCEDIMIENTO  
PARA LA OBTENCIÓN DEL ABSOLUTO DE FLORES DE  
*Polianthes tuberosa***

**ANDRÉS RAMÍREZ RESTREPO**

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

**2011**

**ADECUACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE UN PROCEDIMIENTO PARA LA  
OBTENCIÓN DEL ABSOLUTO DE FLORES DE  
*Polianthes tuberosa***

**ANDRÉS RAMÍREZ RESTREPO**

**Proyecto de Grado realizado en modalidad de Trabajo de Investigación como  
requisito parcial para optar al título de Químico**

**Directora**

**ELENA E. STASHENKO**

**Química, Ph. D. Profesora Titular, Escuela de Química.**

**Co-director**

**JAIRO RENÉ MARTÍNEZ**

**Químico, Ph. D. Profesor Titular, Escuela de Química.**

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

**2011**

## DEDICATORIA

*A Dios: sin Él, nada de esto sería posible.*

*A tí, estimado lector, quién da la verdadera vida a esta investigación cada vez que la lees.*

*A la “Legendaria flor de la gran fragancia”.*

*A Daniel y su familia, a quienes ama.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Elena Stashenko y Jairo Martínez, directores de esta investigación, quienes encauzaron científicamente el rumbo de este proyecto y de su autor.

A la UIS y al CENITC, al poner a disposición el material bibliográfico y el *software* necesarios para llevar a cabo esta investigación.

Al CENIVAM y todas las personas que en él y de forma intangible, hicieron posible indirectamente este trabajo.

A Nathalie Gómez y Néstor Marín, por su apoyo y especial atención al proyecto durante sus primeras etapas; así como por sus invaluable aportes durante la elaboración del trabajo a presentar en el CLAQ 2010.

A Olga Restrepo y Mauricio Cruz, como representantes de Floras de Tierralabra, por su profesionalismo en la información y material vegetal suministrados.

A Rodolfo Ramírez e Iván Ramírez, mi padre y mi tío, quienes con su apoyo financiero costearon mis estudios y estadía en Bucaramanga.

## CONTENIDO

	pág.
<b>INTRODUCCIÓN</b>	20
<b>1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA</b>	22
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	24
<b>3. OBJETIVOS</b>	26
<b>3.1 Objetivo general</b>	26
<b>3.2 Objetivos específicos</b>	26
<b>4. MARCO REFERENCIAL</b>	27
<b>4.1 Marco de antecedentes</b>	27
<b>4.1.1 Sobre la <i>Polianthes tuberosa</i>.</b>	27
<b>4.1.2 De las técnicas de extracción.</b>	29

<b>4.1.3 Sobre el área de estudio.</b>	30
<b>4.1.4 Cienciometría.</b>	30
<b>4.2 Marco conceptual</b>	35
<b>4.2.1 Extracción.</b>	35
<b>4.2.2 Separación.</b>	38
<b>4.2.3 Identificación.</b>	41
<b>4.2.4 Interpretación.</b>	43
<b>5. DISEÑO METODOLÓGICO</b>	48
<b>5.1 Hipótesis</b>	48
<b>5.2 Determinación del porcentaje de humedad</b>	48
<b>5.3 Determinación de la pérdida de humedad a través del tiempo</b>	49
<b>5.4 Obtención del absoluto</b>	50
<b>5.5 Optimización <i>Simplex</i></b>	51
<b>5.6 Interpretación analítica</b>	53
<b>5.7 Muestreo de las emisiones florales</b>	53

<b>5.8 Análisis instrumental</b>	<b>54</b>
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>57</b>
<b>6.1 Estudio del método de extracción</b>	<b>57</b>
<b>6.1.1 Estudio del porcentaje de humedad.</b>	<b>57</b>
<b>6.1.2 Estudio de la pérdida de humedad a través del tiempo.</b>	<b>57</b>
<b>6.1.3 Consideraciones sobre el proceso de extracción.</b>	<b>58</b>
<b>6.1.4 Consideraciones sobre pérdidas de sustancias.</b>	<b>59</b>
<b>6.2 Optimización y validación</b>	<b>61</b>
<b>6.2.1 Preliminares.</b>	<b>61</b>
<b>6.2.2 Modelo de primer orden.</b>	<b>64</b>
<b>6.2.3 Modelo de segundo orden.</b>	<b>65</b>
<b>6.2.4 Modelo de tercer orden.</b>	<b>67</b>
<b>6.2.5 Validación del modelo.</b>	<b>70</b>
<b>6.2.6 Límites del modelo matemático.</b>	<b>73</b>

<b>6.2.7 Señales paralelas a la optimización general.</b>	74
<b>6.3 Caracterización</b>	75
<b>6.3.1 Caracterización del absoluto y las emisiones florales.</b>	75
<b>6.3.2 Propiedades organolépticas del absoluto de <i>Polianthes tuberosa</i>.</b>	81
<b>6.3.3 Comparación entre la composición de absolutos de <i>Polianthes tuberosa</i>.</b>	82
<b>7. CONCLUSIONES</b>	85
<b>8. RECOMENDACIONES</b>	87
<b>9. DIVULGACIÓN</b>	89
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	90
<b>ANEXOS</b>	100

## LISTA DE ANEXOS

	pág.
<b>Anexo A.</b> Metabolitos secundarios volátiles en la <i>Polianthes tuberosa</i> .	100
<b>Anexo B.</b> Espectro de masas y ruta de fragmentación del ácido linoleico.	106
<b>Anexo C.</b> Espectro de masas y ruta de fragmentación del ácido palmítico.	108
<b>Anexo D.</b> Espectro de masas y ruta de fragmentación del ácido oleico.	110
<b>Anexo E.</b> Espectro de masas y ruta de fragmentación del linoleato de etilo.	112
<b>Anexo F.</b> Compuestos representativos en el extracto de nardo: caracterización y notas olfativas.	114
<b>Anexo G.</b> Certificado de participación.	117

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
<b>Figura 1.</b> Fotografía de la <i>Polianthes tuberosa</i> .	28
<b>Figura 2.</b> Número de publicaciones científicas sobre perfumería.	31
<b>Figura 3.</b> Investigación en perfumería por diferentes disciplinas.	31
<b>Figura 4.</b> Publicaciones sobre perfumería en revistas especializadas.	32
<b>Figura 5.</b> Número de publicaciones científicas sobre <i>Polianthes tuberosa</i> .	33
<b>Figura 6.</b> Investigación en <i>Polianthes tuberosa</i> por diferentes disciplinas.	34
<b>Figura 7.</b> Publicaciones sobre <i>Polianthes tuberosa</i> en revistas especializadas.	34
<b>Figura 8.</b> Ilustración del método <i>Simplex</i> .	45
<b>Figura 9.</b> Ejemplos de algunas superficies polinomiales.	46
<b>Figura 10.</b> Flores de <i>Polianthes tuberosa</i> antes y después del secado.	49
<b>Figura 11.</b> Procedimiento experimental.	51
<b>Figura 12.</b> Equipos analíticos utilizados.	55

<b>Figura 13.</b> Curva de secado a condiciones ambiente de flores de <i>Polianthes tuberosa</i> .	58
<b>Figura 14.</b> Simplex contruidos en el área explorada.	63
<b>Figura 15.</b> Modelo de primer orden.	64
<b>Figura 16.</b> Residuos del modelo de primer orden respecto al tiempo.	65
<b>Figura 17.</b> Modelo de segundo orden.	66
<b>Figura 18.</b> Residuos del modelo de segundo orden respecto al tiempo.	67
<b>Figura 19.</b> Modelo de tercer orden dividido en zonas.	70
<b>Figura 20.</b> Análisis de residuos para el modelo de tercer orden.	71
<b>Figura 21.</b> Costos y ganancias simuladas.	74
<b>Figura 22.</b> Perfil cromatográfico obtenido por GC-MS del absoluto de <i>Polianthes tuberosa</i> .	76
<b>Figura 23.</b> Perfil cromatográfico obtenido por GC-MS del extracto HS-SPME de <i>Polianthes tuberosa</i> .	77
<b>Figura 24.</b> Distribución de componentes clasificados por familias en los extractos de <i>Polianthes tuberosa</i> .	78

## LISTA DE TABLAS

	pág.
<b>Tabla 1.</b> Taxonomía de la <i>Polianthes tuberosa</i> .	27
<b>Tabla 2.</b> Condiciones experimentales para el primer <i>Simplex</i> .	52
<b>Tabla 3.</b> Porcentaje de humedad de las flores de <i>Polianthes tuberosa</i> .	57
<b>Tabla 4.</b> Condiciones y resultados experimentales.	62
<b>Tabla 5.</b> Comparación de señales.	63
<b>Tabla 6.</b> Comparación entre un nuevo punto experimental y la predicción del modelo.	73
<b>Tabla 7.</b> Comportamiento de otros indicadores respecto a los factores.	75
<b>Tabla 8.</b> Cantidad relativa (%) e identificación de los constituyentes de los extractos de <i>Polianthes tuberosa</i> .	79
<b>Tabla 9.</b> Comparación de las composiciones químicas del absoluto obtenido en el presente trabajo y descrito en la literatura.	83

## LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

- CENIVAM.** Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales.
- EO.** (*Essential Oil*) Aceite esencial.
- GC.** (*Gas Chromatography*) Cromatografía de gases.
- GC-MS.** (*Gas Chromatography – Mass Spectrometry*) Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
- GFP.** (*Green Fluorescent Protein*) Proteína verde fluorescente.
- HS-SPME.** (*Headspace – Solid Phase Micro Extraction*) Microextracción en fase sólida del espacio de cabeza.
- IUPAC.** (*International Union for Pure and Applied Chemistry*) Unión internacional para la química pura y aplicada.
- MS.** (*Mass Spectrometry*) Espectrometría de masas.
- PIB.** Producto Interno Bruto.
- PYMES.** Pequeñas y medianas empresas.
- SFE.** (*Supercritical Fluid Extraction*) Extracción con fluidos supercríticos.
- SPE.** (*Solid Phase Extraction*) Extracción en fase sólida.

## GLOSARIO

**Absorción.** Fenómeno de interacción entre dos sustancias que ocurre en la estructura interna de alguna de éstas, denominada absorbente.

**Adsorción.** Interacción en la superficie entre dos sustancias.

**Aroma.** Olor percibido de un extracto o sustancia sintética. Cuando cualquier materia prima ha sido procesada para mejorar o cambiar la calidad de su olor, a éste se le denomina “aroma”.

**Flavor.** Percepción al gusto o el olfato. Las sustancias responsables de los estímulos gustativos u olfativos se denominan sustancias *flavor* y aunque el término cubija todos los estímulos, éste se usa generalmente para aquellos que son agradables o apetecidos.

**Fluido supercrítico.** Un fluido supercrítico es aquel que se encuentra a temperaturas y presiones sobre su propio punto crítico. Una sustancia en estado supercrítico comparte propiedades de los gases y los líquidos simultáneamente.

**Fragancia.** Es el olor percibido de una sustancia natural y sin procesar. La fragancia de un producto puede ser muy diferente de su aroma. En algunos casos la materia prima se procesa para cambiar su fragancia por un aroma apetecido, y en otros se intenta que el aroma resemble la fragancia.

**Headspace.** Así se denomina a la fase vapor contenida sobre una sustancia. La fase vapor contiene los volátiles de la sustancia y la determinación de su composición es una técnica analítica en auge. También puede encontrarse como su traducción más literal: espacio de cabeza.

**Lixiviación.** Nombre técnico para el proceso de extracción sólido-líquido. Éste también contempla la filtración de materia orgánica contaminante en el suelo o la disolución en agua de minerales en rocas.

**Nota.** Término usado en perfumería para describir la fracción de una fragancia o aroma. Las notas son olores simples y unitarios que pueden clasificarse de muchas formas. La unión de notas puede formar acordes que al unirse forman un perfume complejo. Los perfumistas guardan notas en aromatecas para producir nuevos aromas.

**Off-flavor.** Nombre que se da a sustancias cuyo estímulo es desagradable, indeseable e incluso, perjudicial para la salud del consumidor.

## RESUMEN

**TITULO: ADECUACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE UN PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DEL ABSOLUTO DE FLORES DE *Polianthes tuberosa*.**\*

**Autor:** RAMÍREZ, Andrés.\*\*

**Palabras claves:** *Polianthes tuberosa*, absoluto, optimización.

En esta investigación, se realizaron tres estudios simultáneos sobre el procedimiento de obtención de absoluto de flores de nardo (*Polianthes tuberosa*): 1). Seguimiento de las sustancias involucradas en el procedimiento, a saber, agua, solvente, fragancia, hidrocarburos y materia estructural de las flores. Lo anterior implicó determinar la composición parcial durante la extracción, la purificación y el producto final (absoluto), su origen y destino. 2). Maximización del rendimiento, con el tiempo de extracción y la cantidad de solvente usada como factores dentro de un rango de valores viable. 3). Caracterización por GC-MS de la composición química del absoluto obtenido y de las emisiones florales *in vitro*.

Siguiendo el procedimiento estándar, usando éter de petróleo y etanol absoluto, se encontraron por optimización *Simplex* las condiciones experimentales que permitieron obtener el rendimiento más alto de absoluto (0.19%) de una forma reproducible. A estas mismas condiciones se registraron pérdidas lineales cercanas a los 60 g de solvente durante todo el proceso, además de otro 50% de pérdida durante la concentración con rotoevaporador. Los resultados obtenidos se describieron satisfactoriamente usando un modelo matemático de tercer orden, que permite predecirlos con errores menores al 5%, así como explicar los fenómenos que ocurren durante el procedimiento descrito.

El absoluto obtenido resembla la fragancia de la flor; no obstante, carece de las sustancias más volátiles. Se compone en su mayoría (>75%) por ácidos grasos, con el ácido linoleico como su componente mayoritario (43%), seguido del ácido palmítico (27%) y el ácido oleico (4.9%).

---

\* Proyecto de grado

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directora Elena E. Stashenko. Codirector Jairo René Martínez.

## ABSTRACT

**TITLE: ADECUATING AND OPTIMIZATING A PROCEDURE TO OBTAIN ABSOLUTE EXTRACT FROM *Polianthes tuberosa* FLOWERS.\***

**Autor:** RAMÍREZ, Andrés.\*\*

**Keywords:** *Polianthes tuberosa*, absolute, optimization.

In this investigation, three procedures to obtain absolute extract from nardo (*Polianthes tuberosa*) flowers were studied simultaneously. 1). Substance monitoring during the procedure: water, solvent, fragrance, waxes and flower structural compounds. Partial composition in the extraction, purification and final steps, their precedence and outcome were determined. 2). Yield maximization using the extraction time and the solvent flower ratio as factors on a local viable range. 3). Absolute extract and flower *in vitro* emission characterization by GC-MS.

Using petroleum ether and absolute ethanol, and following the common procedure, the best experimental conditions were found, by means of *Simplex* optimization, to obtain the highest yield possible (0.19%) of absolute in a reproducible way. Linear loss of solvents (about 60 g) and thereafter 50% by rotavapor was registered in these experimental conditions. A third order mathematic model was used to describe the obtained results, predicting them with less than 5% error and explaining the phenomena occurred during the procedure.

The absolute obtained bears resemblance with the flower emissions, nevertheless, the most volatile substances were absent. The absolute extract was composed by fatty acids in major proportion (>75%), with the linoleic acid as its principal compound (43%), followed by palmitic acid (27%) and oleic acid (4.9%).

---

\* Undergraduate proyect

\*\* Science Faculty. Chemistry School. Director Elena E. Stashenko. Codirector Jairo René Martínez.

## INTRODUCCIÓN

La ciencia y la industria están íntimamente relacionadas: la ciencia crea nuevos procesos y productos que se aprovechan en la industria, que en retorno los mejorará para su uso masivo por terceros, entre ellos, la academia. Esta relación se ha estrechado durante los últimos años desde que descubrimientos, como las nanopartículas o la proteína verde fluorescente (GFP), y avances como las moléculas de diseño e inclusive la química de sistemas, han permitido grandes avances en la industria, directa o indirectamente, aún cuando estos hallazgos se considerasen inicialmente curiosidades de laboratorio poco aplicables.

Un caso particular e interesante es la perfumería. Sus orígenes se remontan a la civilización egipcia y sus contemporáneos quienes utilizaron técnicas como la maceración o el *enfleurage* para la obtención de aromas. Otra práctica común, aún actualmente, es la combustión de material aromatizado, como el incienso, para generar humo fragante. De ahí, es el significado de la palabra perfume: a través del humo (del latín *per fume*). Es hasta el siglo XIX que la química moderna comienza a jugar un papel importante en la perfumería al dar paso a nuevos y económicos aromas mediante el uso de sustancias sintéticas. Posteriormente, elaboradas técnicas de extracción y separación, así como el uso de técnicas analíticas para identificar las moléculas responsables del aroma, hacen de la química, como declaró Ernest Beaux, la responsable del futuro de la perfumería, a través de la búsqueda de notas nuevas y originales.

Dentro de esta búsqueda de nuevos aromas, sintéticos o naturales, surgen muchas ideas que desarrollar y estructurar. Una de ellas, es aprovechar la producción de una flor conocida como nardo (*Polianthes tuberosa*), cuya

utilización fúnebre no hace uso de la exquisitez de su fragancia. Su absoluto es utilizado en perfumería de alta calidad y se encuentra presente en productos exclusivos, como el agua de tocador Heket (Givaudan) en forma de nota media. Esta flor ha sido cultivada con éxito en la zona floricultora de Antioquia (Colombia) y sería interesante usarla como materia prima para la producción de su absoluto. Así, en vez de exportar las flores como objetos ornamentales, podría obtenerse de ellas un extracto de alto valor comercial que produjese mayores beneficios económicos e hiciera parte de bienes o servicios que están en la actual tendencia económica: productos naturales, salud y belleza.

En el presente trabajo se muestran los resultados de tres estudios realizados simultáneamente con base en los experimentos de obtención de absolutos de *Polianthes tuberosa* mediante la técnica de extracción con solventes. El primero de ellos consistió en el seguimiento de las sustancias involucradas durante el proceso de extracción, como lo son el agua, solvente y la fragancia, etc., para conocer así en detalle las transferencias de masa y pérdidas involucradas en el método. Así mismo, se realizó una optimización de la extracción usando el método *Simplex* con el tiempo y la relación entre el solvente y el material vegetal como factores y el rendimiento de la extracción como señal. Finalmente, los extractos obtenidos se caracterizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

Estos resultados serán útiles para evaluar la eficacia del método propuesto en la obtención de extractos de *Polianthes tuberosa* y la posibilidad de llevar este método a la industria. También permitirá ampliar el conocimiento respecto a la flora con ocurrencia en Colombia y a fuentes naturales de sustancias de interés en la perfumería.

## 1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

Un producto no es exitoso por sí solo: para que lo sea, muchos factores como la publicidad, el sistema por el cual se comercializa o el momento del mercado, entran en juego. La búsqueda no es la del producto perfecto, sino la de aquél que se adecúe mejor a las necesidades del mercado [1]. Tal es el caso de los aceites esenciales y extractos, que cada vez toman más fuerza en todo el mundo. Colombia, durante 5 años a partir de 1998, importó 500 millones de dólares y exportó 97 millones de dólares en aceites esenciales (EO) [2].

La situación se torna irónica al tener en cuenta que Colombia, el segundo país más biodiverso en todo el planeta [3], destina el 0,27% de su Producto Interno Bruto (PIB) [4] a la compra de EO, que son productos naturales. Esto se debe a que la industria nacional, conformada por un número reducido de pequeñas y medianas empresas (PYMES), no logra suplir la demanda de EO y extractos. La cantidad de PYMES debería ser mayor; sin embargo, según un estudio realizado en 2003 [5], existen cuatro factores que entorpecen su aumento:

- Desconocimiento del proceso de producción y de la tecnología implicada en éste;
- Suministro insuficiente de materia prima destinada a producción de EO;
- Incertidumbre en la comercialización del producto obtenido;
- Falta de incentivos del gobierno para apoyar las iniciativas en el campo de los EO.

Para el objeto particular de estudio, el desconocimiento del proceso y su tecnología se debe, en gran medida, a que los estudios de carácter científico reportados o asequibles a la industria colombiana sobre la *Polianthes tuberosa* y

su extracto, no aportan información suficientemente detallada respecto al manejo de la flor o el procedimiento para la obtención de su extracto. Es sobre este punto particular que la ciencia química puede intervenir para mejorar, al menos parcialmente, la situación.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Aumentar el valor agregado de los productos se convierte cada vez más en una necesidad para las empresas en pos de poder competir en un mercado globalizado y exigente. Convertir a la *Polianthes tuberosa* de un producto final a la materia prima de un producto con un alto valor agregado es una propuesta promisorio. Las prácticas agronómicas actuales permiten producir 4,9 ton de flor de nardo al año por hectárea, cuyo valor total es cercano a los 60 millones de pesos, comercializada como flor de exportación. Sin embargo, las mismas flores podrían usarse para producir 9,3 kg de extracto de nardo avaluados hasta en 200 millones de pesos. El incremento en el beneficio económico es promisorio si es posible adecuar un proceso sencillo, económico, efectivo y tecnológicamente asequible para obtener el preciado extracto de las flores de *Polianthes tuberosa*.

El desarrollo de este proceso, como cualquier otro, sigue una serie de pasos conocida como transferencia de tecnología, que comienza con pruebas a escala de laboratorio, luego, a escala piloto y, finalmente, a escala industrial. En esta transferencia también deben intervenir la ingeniería de procesos y la agricultura; no obstante, es necesario que la ciencia química actúe primero para desarrollar la primera escala, considerando la importancia de romper la barrera de la desinformación y así comenzar a dar forma a la industria de EO y extractos en Colombia. Se hace evidente, que los resultados de este proyecto tienen repercusiones directas sobre la ciencia, al generar nuevo conocimiento; la industria, al poner dicho conocimiento a su disposición; y la comunidad colombiana, que gira en torno a éstas.

En atención a las razones anteriores, el Centro de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales (CENIVAM) con su vasta experiencia en fitoquímica, extracciones y productos naturales, decidió evaluar un proceso de extracción a escala de laboratorio dentro de los alcances propios de un proyecto enmarcado como: *trabajo presentado como requisito parcial para optar al título de Químico.*

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo general

- Determinar el procedimiento para aislar con el rendimiento más alto posible el conjunto de compuestos orgánicos volátiles de las flores de *Polianthes tuberosa*.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Establecer el procedimiento, las variables predominantes y las condiciones de partida en la obtención del absoluto de *Polianthes tuberosa*.
- Encontrar un punto de desempeño óptimo, teniendo en cuenta el procedimiento establecido anteriormente, usando el cociente de extracción como señal.
- Validar el punto óptimo encontrado y hallar la reproducibilidad intermedia del método como indicador de la factibilidad del escalamiento industrial del proceso.
- Caracterizar por GC-MS los metabolitos secundarios volátiles presentes en el extracto de las flores de *Polianthes tuberosa* con base en sus índices de retención y espectros de masas.

## 4. MARCO REFERENCIAL

### 4.1. Marco de antecedentes

**4.1.1. Sobre la *Polianthes tuberosa*.** El género *Polianthes* es endémico de México y se compone principalmente por 14 especies como la *P. tuberosa*, *P. geminiflora*, *P. oaxacana* y *P. palustris*, entre otras. El género está en la categoría de protección especial según el estado mexicano. No obstante, su distribución a través de la Sierra Madre Occidental y el Cinturón Transvolcánico no corresponde a Regiones Terrestres Protegidas ni a Áreas Naturales Protegidas, lo cual implica que el género enfrenta un alto riesgo de extinción futura [6]. Actualmente, la mayoría de estas especies se usa como ornamento y de todas ellas, la *P. tuberosa* es la más conocida y el género suele describirse a través de ésta (véase taxonomía en la **Tabla 1**).

**Tabla 1.** Taxonomía de la *Polianthes tuberosa*.

Reino	<i>Plantae</i>
Filo	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Liliopsida</i>
Orden	<i>Asparagales</i>
Familia	<i>Agavaceae</i>
Género	<i>Polianthes</i>
Especie	<i>tuberosa</i>

Fuente: página Universidad de Connecticut [7].

La *Polianthes tuberosa* es una hierba perenne con rizomas tubulares que crece en un periodo aproximado de 6 meses. Produce un follaje largo y delgado de color verde intenso. Florece formando una espiga de aproximadamente 1 metro de

altura sobre la cual nacen entre 20 y 32 flores de color blanco grisáceo (de allí su nombre científico *Polianthes*, del griego “*polios*” que significa “gris”). Las flores tienen una doble corona de pétalos y pueden medir desde 4 cm hasta 10 cm, con un peso que puede variar desde 0.5 g, las más pequeñas, hasta 2.5 g, las más voluminosas (véase **Figura 1**).

**Figura 1.** Fotografía de la *Polianthes tuberosa*.



Fuente: fotografía tomada por el autor en CENIVAM el 20 de octubre de 2009.

Su nombre común, “nardo”, es resultado de una larga lista de asociaciones erróneas con otras flores de agradable y fuerte aroma como son el nardo de espiga (*Nardostachys jatamsi*) o la azucena (*Lilium candidum*). Esta relación con la “legendaria flor de la gran fragancia” es, no obstante, bien merecida. Entre sus usos etnobotánicos, todos ellos de la cultura Azteca, se pueden encontrar tratamientos contra la fatiga, la fiebre, los tumores, la diarrea y la irritación cutánea por el calor, al usar extractos obtenidos de sus raíces; pero sus aplicaciones más

sobresalientes incluían el uso de resinas aromatizadas con su fragancia para eliminar los olores desagradables de las ceremonias de sacrificio y como aditivo en el chocolate. Su siembra, recolección y extracción estaba ya descrita por los aztecas quienes, se presume, podrían haber derivado la *Polianthes tuberosa* con el fin de tener una flor intensamente perfumada. Esta suposición se soporta en tres características fundamentales de la especie *Polianthes tuberosa*: 1). Es una especie infértil. 2). No se encuentra de forma salvaje; únicamente en cultivos. 3). No se relaciona con ninguna otra especie de su género de forma directa. El origen botánico incierto de la *Polianthes tuberosa* no ha impedido su uso en la elaboración de perfumes de la más alta calidad, ni de su cultivo y uso como materia prima para la obtención de sus extractos en países como Francia y Marruecos, pioneros en el manejo de esta planta [8].

Además de lo anterior, esta especie no escapa al interés científico. La fisiología de sus flores ha sido ampliamente estudiada, contando con publicaciones sobre sus estadios de desarrollo [9] y floración [10, 11], su ciclo circadiano [12, 13] y su coloración [14]. Otra porción importante de investigaciones gira en torno a la composición química de la planta: el aislamiento de nuevas moléculas, generalmente glicósidos [15-17]; la obtención y caracterización de su extracto [18] y sus aplicaciones [19, 20], incluyendo la industria de los aromas [21].

**4.1.2. De las técnicas de extracción.** La metodología y sus técnicas son bien conocidas, hecho que se ve reflejado en la cantidad de investigaciones existentes sobre la *Polianthes tuberosa* [22], estudios de flores similares cuyos resultados orientan y soportan la metodología a seguir [23-26] y las técnicas de extracción a usar: extracción con solventes para obtener concreto y absoluto [27, 28] y microextracción en fase sólida [29-31].

**4.1.3. Sobre el área de estudio.** La perfumería es un área cuyo impacto es tan grande que considerar la química moderna sin ésta resultaría difícil. Aunque la idea anterior pueda parecer exagerada, en verdad el estudio de los aromas y las fragancias acompaña a la civilización y la química desde su nacimiento, en conjunto con la metalurgia y los estudios sobre textiles. Evidencia de esto son registros escritos de civilizaciones antiguas (Saumerios: 3000 A.C., Babilonia: 2000 A.C.) que describen de manera detallada y objetiva la producción de aceites y perfumes, así como su uso en rituales, cosméticos, medicinas y recetas mágicas [32].

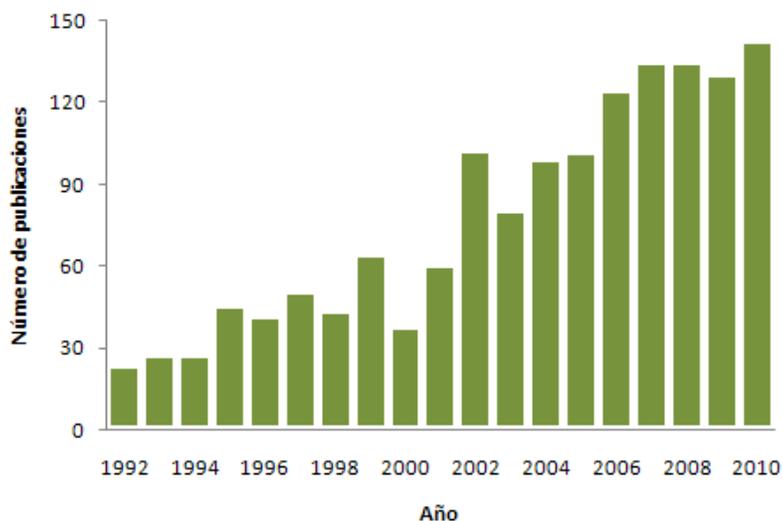
A la fecha hay una gran cantidad de artículos o *reviews* que tratan este tema que, aunque milenario, permanece siempre novedoso. El interés actual de la química respecto al estudio de sabores y fragancias tiene tres enfoques fundamentales: 1). La síntesis de nuevas moléculas con propiedades organolépticas (*flavor*) [33]. 2). La obtención de nuevos extractos naturales y 3). La detección y análisis de sustancias responsables de efectos *flavor* [34].

**4.1.4. Cienciometría.** El estudio de la *Polianthes tuberosa* enmarcado en el área de la perfumería, se hace válido al tener en cuenta los indicadores que demuestran su pertinencia y ubicación en el campo científico. Una revisión sobre la cantidad de artículos científicos publicados en la base de datos *Science Direct*, así como las patentes reportadas en *Scopus*, puede darnos una idea general del contexto.

En la **Figura 2** se observa el desarrollo de las investigaciones en perfumería a través del tiempo. Las investigaciones en esta área aumentan rápidamente en

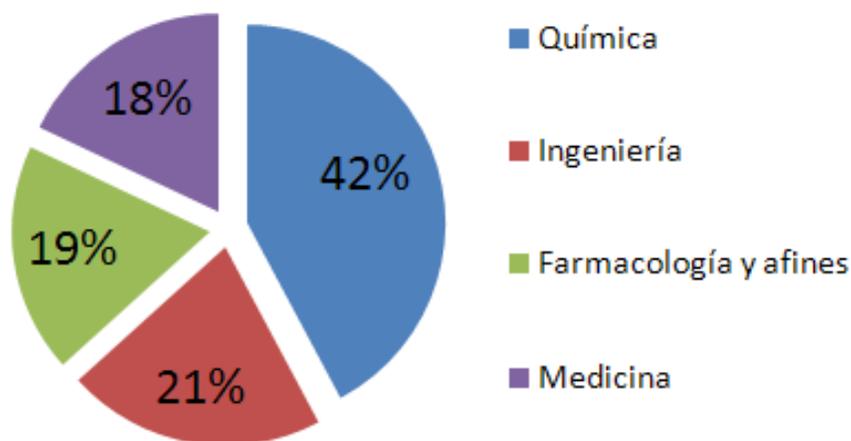
cuatro disciplinas diferentes: química, ingeniería, farmacología y medicina (véase **Figura 3**).

**Figura 2.** Número de publicaciones científicas sobre perfumería.



Fuente: Base de datos: *Science Direct*. Palabra clave: *perfumery*. Período de observación: 1992-2010. Artículos reportados: 2233. Fecha de consulta: 27 de octubre de 2010.

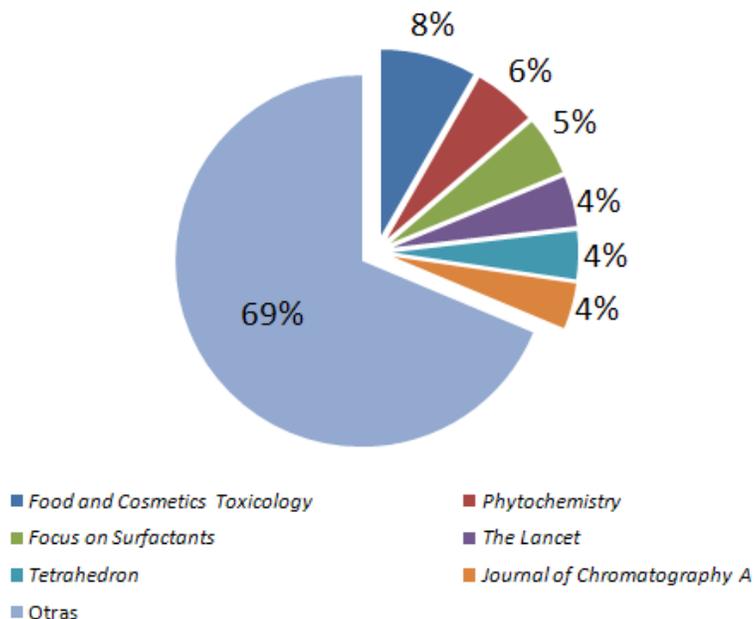
**Figura 3.** Investigación en perfumería por diferentes disciplinas.



Fuente: Base de datos: *Science Direct*. Palabra clave: *perfumery*. Período de observación: 1992-2010. Artículos reportados: 2233. Fecha de consulta: 27 de octubre de 2010.

De los artículos reportados, cerca del 7% estudia aceites esenciales, mientras que un 4% se enfoca en aromas y fragancias crudos (sin mezclar o procesar después de su obtención). Entre tanto, el enfoque de los estudios y sus aplicaciones es muy diverso. La relación de revistas con mayor cantidad de publicaciones aparece en la **Figura 4**. La base de patentes *Scopus* reporta 4.5 veces más patentes (9974) que artículos, lo cual se puede interpretar como una gran acogida y aplicación que se ha dado a esta área en la industria.

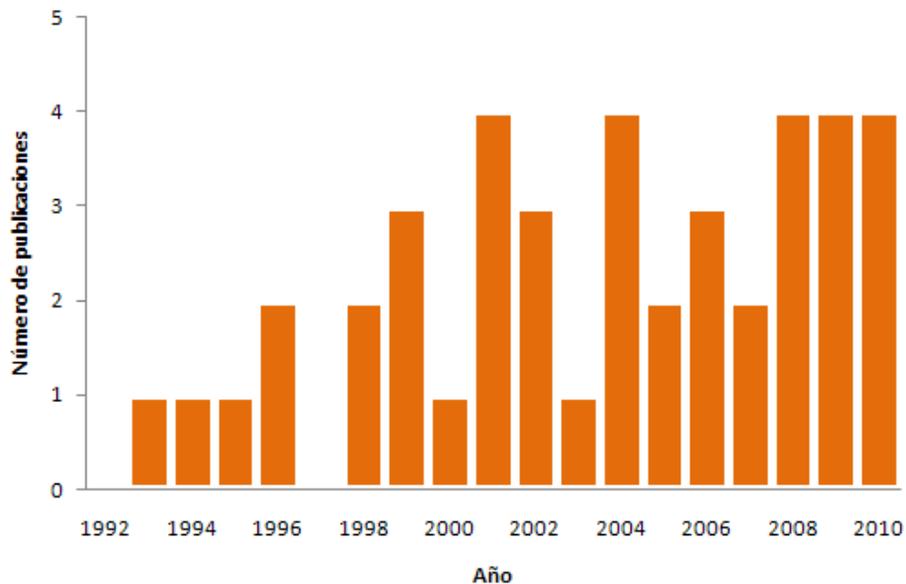
**Figura 4.** Publicaciones sobre perfumería en revistas especializadas.



Fuente: Base de datos: *Science Direct*. Palabra clave: *perfumery*. Período de observación: 1992-2010. Artículos reportados: 2233. Fecha de consulta: 27 de octubre de 2010.

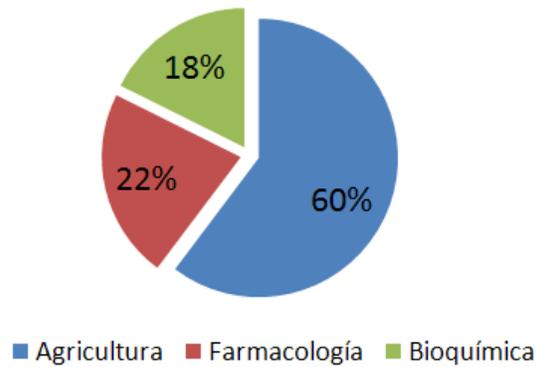
El desarrollo de los estudios sobre *Polianthes tuberosa* muestra un comportamiento diferente. La cantidad de publicaciones por año se ha mantenido relativamente constante durante la última década (véase **Figura 5**) y su enfoque está principalmente en la agricultura y las ciencias biológicas (**Figura 6**), lo cual también se refleja en las revistas especializadas (**Figura 7**), con publicaciones sobre a esta planta. A pesar de lo anterior, es interesante observar que hay 97 patentes (casi el doble que artículos) reportadas. De los estudios y patentes sobre el género *Polianthes*, cerca del 80% está directamente relacionado con la especie *Polianthes tuberosa*.

**Figura 5.** Número de publicaciones científicas sobre *Polianthes tuberosa*.



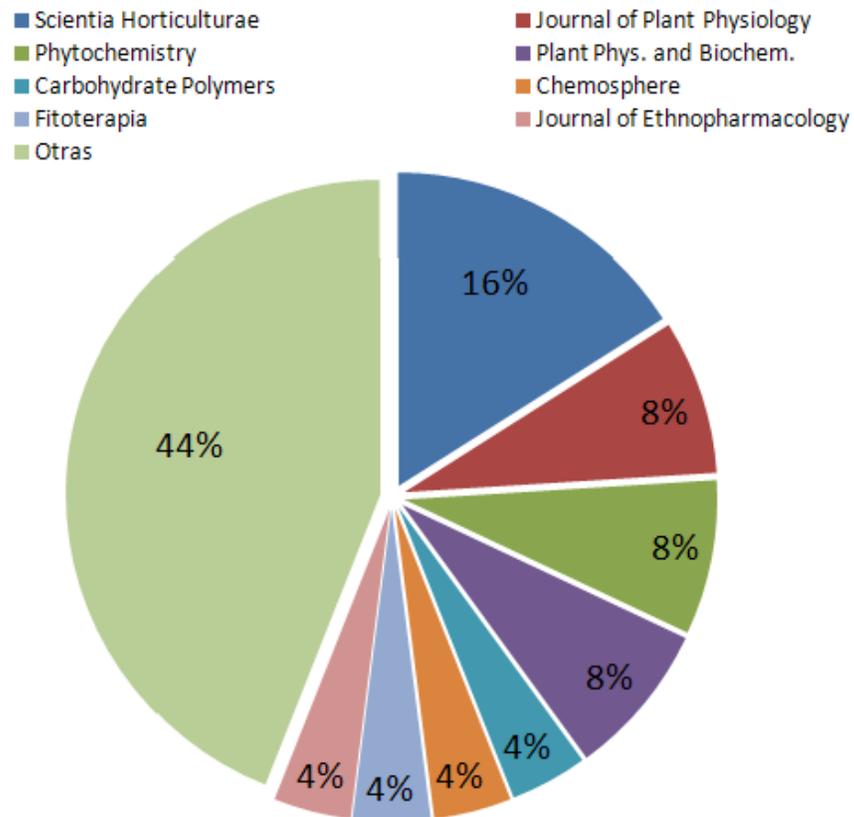
Fuente: Base de datos: *Science Direct*. Palabras clave: *polianthes AND tuberosa*. Período de observación: 1992-2010. Artículos reportados: 50. Fecha de consulta: 27 de octubre de 2010.

**Figura 6.** Investigación en *Polianthes tuberosa* por diferentes disciplinas.



Fuente: Base de datos: *Science Direct*. Palabras clave: *polianthes AND tuberosa*. Período de observación: 1992-2010. Artículos reportados: 50. Fecha de consulta: 27 de octubre de 2010.

**Figura 7.** Publicaciones sobre *Polianthes tuberosa* en revistas especializadas.



Fuente: Base de datos: *Science Direct*. Palabras clave: *polianthes AND tuberosa*. Período de observación: 1992-2010. Artículos reportados: 50. Fecha de consulta: 27 de octubre de 2010.

Todo lo anterior es indicador de un contexto amigable para la investigación: un proyecto sobre un objeto de estudio aún poco conocido pero de interés industrial, enmarcado en una disciplina prolija como lo es la perfumería.

## **4.2. Marco conceptual**

### **4.2.1. Extracción.**

**4.2.1.1. Concepto.** En la naturaleza existen toda clase de sustancias que captan el interés, científico o comercial, por sus características particulares. Estos compuestos de interés (analitos), generalmente se encuentran como parte de mezclas complejas o de biomasa llamada “matriz”. Para estudiar un analito es necesario separarlo de su matriz y a este proceso se le denomina “extracción”.

### **4.2.1.2. Fenómenos fundamentales de un proceso de extracción.**

- **Cambio del estado de agregación.** El estado de agregación corresponde a la forma física en la que se encuentra la materia, comúnmente vapor, líquida o sólida; normalmente, definida a través de sus variables termodinámicas: presión y temperatura [35]. Cada sustancia tiene rangos propios de presión y temperatura para los cuales está en uno de los tres estados. Si el analito y la matriz difieren apreciablemente en alguno de estos rangos, es posible cambiar el estado de agregación de solo uno de los dos para separarlos. Las etapas de evaporación, destilación y concentración son ejemplos típicos de este fenómeno.

- **Separación física.** La separación física hace uso el espacio real que ocupan las sustancias para separarlas aún si sus estados de agregación son iguales. Aprovechar esta separación requiere creatividad para idear sistemas apropiados, por ejemplo, filtros que impidan el paso de sustancias sólidas (filtración) [36] o montajes que permitan separar dos líquidos inmiscibles (decantación).
- **Migración por afinidad.** La migración por afinidad consiste en la transferencia de analito de una matriz a otra. Esta migración obedece a una disminución en la actividad química [37], ya que las sustancias buscan albergarse en matrices cuyas propiedades (polaridad, naturaleza química, formas de interacción) les sean similares o empáticas. Cuando la migración sucede, el analito se “reparte” por fracciones entre ambas matrices, que cambian su composición relativa. Estas fracciones se conocen como *coeficientes de reparto* o *cocientes de partición* [38]. Las extracciones en sus diversas formas (líquido-líquido, lixiviación) y los procesos de adsorción y absorción aprovechan este fenómeno para lograr la separación.

#### 4.2.1.3. Técnicas comunes para la obtención de extractos.

- **Enfleurage.** Consiste en la extracción sólido-líquido de material vegetal con grasas animales que se enriquecen con diversas etapas de extracción hasta lograr saturarlas. Es una técnica muy sencilla, aunque poco eficiente y obsoleta [39].
- **Concreto y absoluto.** Extracción de múltiples pasos que se vale de la rotoevaporación: una destilación a presión reducida, homogeneización por

rotación y, opcionalmente, calentamiento. Inicialmente, se macera el material vegetal con solvente apolar y este extracto se rotoevapora para obtener un sólido (*concreto*) que contiene grasas y ceras, junto con los compuestos de interés, que se extraen posteriormente con etanol absoluto. El nuevo extracto obtenido se concentra hasta obtener el extracto denominado *absoluto* [40]. Aunque opera bajo principios sencillos, esta técnica puede resultar compleja en primera instancia y requiere instrumentación especial, pero no muy sofisticada. Además de efectiva, es muy apropiada para muestras delicadas (termolábiles, hidrolizables, etc.) y económica a largo plazo, pues la mayoría de solventes se recuperan, lo que también disminuye el posible impacto ambiental y reduce los costos de operación [41].

- **Extracción con fluidos supercríticos** El disolvente que realiza la extracción es un fluido en estado supercrítico (generalmente, CO<sub>2</sub>). Es un método automatizable, amigable con el ambiente y muy efectivo, como resultado, proporciona un extracto semi-sólido, libre de solvente. Se evitan etapas posteriores de concentración y limpieza; sin embargo, la instrumentación a usar es muy costosa y compleja [42].
- **Extracción y microextracción en fase sólida.** Hace uso de un adsorbente para retener los analitos. En el caso de la extracción en fase sólida (SPE), se usa un cartucho relleno de adsorbente. Aunque es muy apropiada a nivel de laboratorio resulta inconveniente a escala industrial. La microextracción en fase sólida (SPME), por otra parte, es un método que elimina una gran cantidad de etapas de preparación de muestra, sin embargo es efectiva únicamente para análisis [43].

## **4.2.2. Separación.**

**4.2.2.1. Generalidades.** Ya que prácticamente nada se encuentra puro en la naturaleza y, de hecho, la mayoría de sustancias se encuentran en mezclas, se hace indispensable separarlas, para entender así el objeto de estudio particular dentro de ellas. Estas mezclas pueden ser muy complejas, como es el caso del petróleo, estar en cualquier estado de agregación y tener sustancias en concentraciones que varían desde porcentaje en peso hasta partes por trillón. Las circunstancias anteriores permiten intuir un hecho de suma importancia en la química analítica: la separación no es trivial. Actualmente, la cromatografía es la técnica de separación empleada en química instrumental y su uso puede ser en modos cualitativo, cuantitativo o preparativo, según el objetivo.

**4.2.2.2. Cromatografía.** Cromatografía es la técnica de separación por excelencia [44]. Su definición (IUPAC, 1993) la describe como un método físico de separación en el que los componentes de una mezcla se separan gracias a su distribución entre dos fases: una estacionaria y otra, que se mueve, en una dirección definida, se llama fase móvil.

A continuación, se mostrará una visión más detallada que explica cómo se da la separación. Un material que puede realizar procesos de adsorción o absorción, según sea el caso, se inmoviliza en una superficie (fase estacionaria). A través de él se hace pasar la mezcla que desea separarse usando un eluyente que determina la dirección de movimiento, según sea la fuerza motriz (fase móvil). La separación ocurre cuando las fases móvil y estacionaria interactúan. Los analitos migran desde la fase móvil por afinidad a la fase estacionaria. Como la fase móvil continúa su desplazamiento a través de la superficie, su composición relativa cambia y los analitos migran de regreso a la fase móvil, que los transporta cierta

distancia hasta que regresan a la fase estacionaria que se encuentra más adelante. Este proceso ocurre de manera cíclica para cada analito de la mezcla y durante todo el trayecto por la superficie de modo que, después de un tiempo determinado, cada analito ha recorrido una distancia particular y se encuentra físicamente separado de los demás.

La cromatografía es aplicable a la mayoría de mezclas de sustancias. La fase estacionaria puede ser sólida o líquida mientras la fase móvil puede tener casi cualquier estado de agregación; la separación puede darse, por ejemplo, por diferencias en el tamaño, la polaridad o el punto isoeléctrico de las moléculas; la fuerza motriz del proceso de separación puede ser térmica, mecánica, eléctrica o de otro tipo [45].

Las técnicas cromatográficas más usadas son la cromatografía de gases (GC), líquida (LC o HPLC), de capa fina (TLC) y la electroforesis capilar (EC). Para el análisis de aromas y fragancias el método preferido es GC.

**4.2.2.3. Cromatografía de gases.** Se denomina GC a las técnicas cromatográficas cuya fase móvil es un gas. El analito, no obstante, puede ser sólido, líquido o gaseoso. Los requisitos para hacer que una muestra sea susceptible de análisis por GC es que su presión de vapor sea mayor que 1 Torr, que sea estable dentro del rango de temperaturas de trabajo (hasta ca. 350 °C) y que pueda interactuar (absorberse o adsorberse) con la fase estacionaria [46].

El diseño del equipo para GC consiste *grosso modo* en un puerto de inyección que se encuentra a alta temperatura (250°C) y que transfiere cuantitativamente los

analitos a una columna capilar tubular abierta. Dentro de esta columna, que puede medir hasta 100 m, se encuentra la fase estacionaria donde ocurre la separación. La columna se encuentra en un horno cuya programación de temperatura debe separar la mezcla en sus constituyentes primarios. Éstos recorren la columna para llegar a un detector que mide, de alguna forma, la presencia de los analitos y produce una señal para cada uno de ellos. El resultado del análisis por GC es un cromatograma que relaciona la señal obtenida con el tiempo transcurrido desde el comienzo del análisis.

Una separación exitosa en GC depende de la presión (o velocidad de flujo), la temperatura, la naturaleza de las fases y su afinidad entre sí. A mayor velocidad de flujo o temperatura los compuestos saldrán más rápidamente; sin embargo, podrían co-eluir (solaparse) y salir al tiempo, impidiendo su distinción y cuantificación. Entre tanto, a mayor afinidad entre los analitos y la fase estacionaria, mayor será el tiempo de análisis.

El cromatograma brinda información muy importante, pues posee la evidencia de la separación de cada uno de los componentes de una mezcla. A pesar de que esta información resulta muy útil, tiene una gran limitación: los componentes carecen de identidad. La cromatografía por sí sola es una técnica de separación que necesita, en la mayoría de los casos, acompañarse de una herramienta capaz de revelar la identidad de los analitos.

**4.2.2.4. Índice de retención.** Este parámetro se desarrolló con el objetivo de identificar de manera general las señales (picos) producidas por los analitos. El índice de retención lineal se expresa por medio de la fórmula:

$$I_X = 100n + 100 \left( \frac{t'_{R(X)} - t'_{R(n)}}{t'_{R(n+1)} + t'_{R(n)}} \right)$$

$I_X$ : índice de retención lineal.

$n$ : número de carbonos de la n-parafina con tiempo de retención inmediatamente menor.

$t'_{R(X)}$ : tiempo de retención del analito.

$t'_{R(n)}$ : tiempo de retención de la parafina inmediatamente menor.

$t'_{R(n+1)}$ : tiempo de retención de la parafina siguiente en la serie homóloga.

El índice de retención es independiente de las condiciones experimentales (excepto la naturaleza de la fase estacionaria) y, después de normalizarlo respecto a una serie homóloga de n-parafinas, es una herramienta útil para estimar, en conjunto con técnicas espectroscópicas, la identidad de los analitos separados previamente por cromatografía [47].

### 4.2.3. Identificación.

**4.2.3.1. Definición.** El estudio de una mezcla, por ejemplo, un extracto floral, requiere identificar los compuestos que se han extraído y separado previamente, pues la identidad de los analitos es la que permitirá inferir sobre las propiedades organolépticas, biológicas o farmacológicas, del producto obtenido.

La identificación de un compuesto puede llegar a dos niveles diferentes: el nivel presuntivo, donde con algunas de sus características se propone una identidad con base en la similitud de éstas con una base de datos conocida; y el nivel confirmatorio, que involucra el uso de más de una técnica espectroscópica, la síntesis del analito o la comparación de su respuesta con la del compuesto patrón

certificado. Sólo si todas sus características (espectro infrarrojo, de resonancia, de masas, etc.) coinciden, se puede considerar la identificación confirmatoria.

**4.2.3.2. Espectrometría de masas.** Método excepcional que permite determinar la identidad de una sustancia [48]. Inicialmente, es necesario llevar el analito a fase gaseosa e ionizarlo. Dependiendo del tipo de analito y de la técnica que se utilice para ionizarlo (impacto de electrones, ionización química, ESI, MALDI, etc.) se forman diversas especies cargadas que son características. Una vez formadas, estas especies pasan a través de un analizador de masas, que puede impartir energía cinética a las especies cargadas por medio de interacción electromagnética. Siendo la masa una propiedad única de cada analito, la energía aplicada hará que éstos se muevan de forma particular y alcancen, en el momento correspondiente a su masa, un detector que registrará la corriente que produce su llegada.

Ya que la energía entregada corresponde a una interacción con campos electromagnéticos, lo que se mide realmente es la relación masa/carga ( $m/z$ ) de las especies del analito, dando como resultado el llamado espectro de masas, que permite dilucidar su identidad. No obstante, la mayoría de identificaciones son de carácter presuntivo al comparar el espectro obtenido con el de una base de datos..

**4.2.3.3. Acople GC-MS.** El uso acoplado de las técnicas de cromatografía y espectrometría de masas tiene una popularidad única como herramienta instrumental. Esto se debe a que combina velocidad de análisis, resolución, resultados cuantitativos, operación sencilla y bajo costo con la información de alta calidad, la detección sensible y la identificación. Este sistema, sin embargo, no es perfecto y combina también las limitaciones de ambas técnicas [49].

La técnica GC-MS ha encontrado una enorme acogida en el análisis de sabores y fragancias. Esto se debe, además de las ventajas anteriormente mencionadas, a la capacidad de esta herramienta para dilucidar estructuras de nuevas sustancias *flavor* mediante el uso de diferentes analizadores de masas. Dentro de este campo de acción también es posible verificar la autenticidad de sustancias *flavor* al determinar la relación isotópica de sus componentes o mediante el uso de columnas quirales para la determinación y separación de enantiómeros [50].

La técnica GC-MS permitiría dilucidar de manera confiable la composición e identidad de una mezcla compleja, un aceite esencial o un extracto floral, como lo es el absoluto de *Polianthes tuberosa*. El cromatograma obtenido se denomina la corriente iónica total procesada, pues en realidad es una relación tridimensional entre el tiempo de retención, la señal del espectrómetro y la relación masa/carga.

#### **4.2.4. Interpretación.**

**4.2.4.1. Quimiometría.** Ante un problema que requiere un acercamiento experimental surgen dudas respecto al método para resolverlo. Éste no puede ser ajeno a las variables predominantes para el proceso y tampoco puede replicarse infinitas veces por limitaciones de tiempo y dinero. Por lo anterior, es importante realizar un diseño de la ruta experimental a seguir para lograr, con pocos experimentos, recursos y tiempo; resultados confiables. Para este efecto se aplica la quimiometría.

La quimiometría se define como la disciplina que aplica a la información química métodos matemáticos y estadísticos para diseñar y seleccionar los mejores

procedimientos y medidas experimentales mientras provee la máxima información de los datos obtenidos al analizarlos. Cabe resaltar, que la quimiometría está íntimamente ligada al uso de la informática computacional, para resolver de manera práctica los problemas químicos.

Como bien lo expresa su definición, la quimiometría no es ajena a la estadística. Para el caso particular de este objeto de estudio, se hace uso únicamente de la estadística descriptiva, que permite mostrar de una forma clara los datos obtenidos y la incertidumbre asociada a éstos. Para interpretarlos se hace uso de modelos de optimización, algoritmos y herramientas computacionales. Esta interpretación está sujeta al diseño del experimento, que puede ser simultáneo, sistemático, difuso e incluso de prueba y error. En química analítica se prefieren los diseños sistemáticos pues abordan el objeto de estudio de forma objetiva.

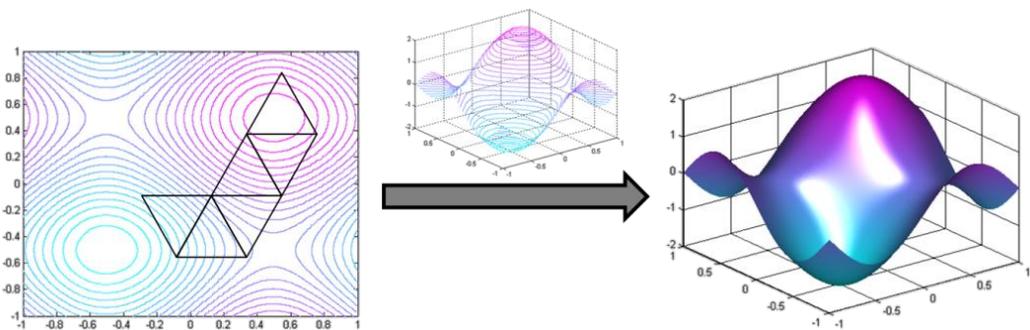
**4.2.4.2. Método *Simplex*.** El método *Simplex*, descrito por Nelder y Mead [51], consiste en construir una figura geométrica cuyo número de vértices es unitariamente mayor al número de variables controladas que se miden (factores). Ejemplificando, un experimento que requiera dos factores tiene por *Simplex* un triángulo que es el indicador de las curvas de nivel de una función tridimensional donde la tercera dimensión está dada por la respuesta (señal). Los *Simplex* pueden ser de tamaño fijo o de tamaño variable. Cada uno tiene un algoritmo diferente y, en general, se prefiere el método *Simplex* de tamaño variable que se describe a continuación, para dos variables controladas:

1. Hay que crear un *Simplex* usando tres puntos iniciales;
2. Hacer los experimentos en los primeros tres puntos;
3. Decidir entre las respuestas de los vértices, cuál representa la mejor respuesta, la siguiente mejor respuesta y la peor respuesta;

4. Generar un cuarto punto experimental reflejando el punto de peor respuesta sobre la línea que une los otros dos;
5. Experimentar en este cuarto punto;
6. Según sea la señal obtenida decidir el siguiente punto experimental. Este proceso es cíclico y termina si el cambio de la señal es menor que el error experimental o si los *Simplex* se hacen más pequeños que un tamaño previamente determinado.

Aunque *Simplex* es uno de los modelos más potentes para la búsqueda sistemática secuencial, el método presenta el problema que sus resultados pueden estar supeditados a un máximo local, de modo que no se encuentre el óptimo global. Para subsanar este inconveniente, el método puede combinarse con otros métodos llamados de superficie de respuesta. En estos métodos, se usan los datos para construir una función multidimensional (**Figura 8**) que, aplicada al *Simplex*, podría sugerir la posible presencia de otro máximo y dar una idea general de la relación entre los factores y la señal en estudio [52].

**Figura 8.** Ilustración del método *Simplex*.

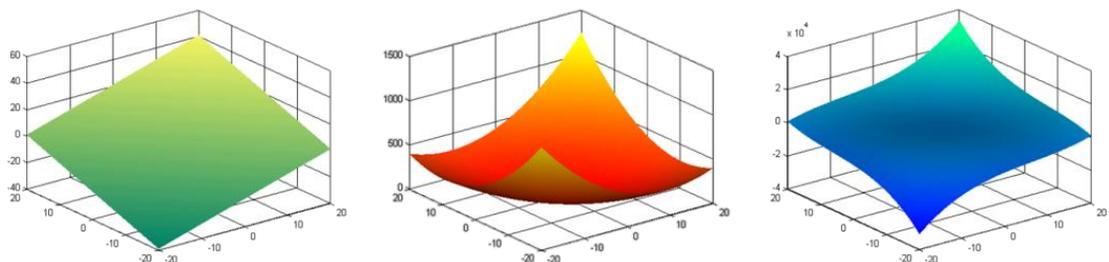


Fuente: ilustración elaborada por el autor usando MATLAB.

**4.2.4.3. Modelos matemáticos.** Los modelos matemáticos son la herramienta principal para analizar e interpretar los resultados obtenidos al usar métodos de superficie de respuesta. Su capacidad para describir la respuesta a los factores en un experimento, tanto de forma matemática como visual, hace de éstos la mejor forma de explorar conjuntos de datos que dependen de una o dos condiciones.

El uso de estas superficies como modelos supone que la señal puede describirse como una función cuyas variables son los factores controlados. Los modelos más empleados son aquellos cuya función es un polinomio (**Figura 9**), que suele ser de primer o segundo orden; no obstante, el diseño matemático no está restringido a estos modelos, cuyo enfoque general se ligó estrechamente a experimentos secuenciales, como el método *Simplex*, desde 1951 y actualmente su uso se expande a sectores como la industria o la economía [53].

**Figura 9.** Ejemplos de algunas superficies polinomiales.



\*De izquierda a derecha: lineal, cuadrática y cúbica.

Fuente: superficies elaboradas por el autor usando MATLAB.

**4.2.4.4. Estadística.** La evaluación final de datos experimentales requiere un tratamiento estadístico que pruebe la validez de los modelos que se proponen [54], o haga evidentes las interacciones entre variables respecto a la señal que se monitorea [55]. Para este fin, se usa, por ejemplo, la desviación estándar, el

coeficiente de variación y el ANOVA, todos ellos, descritos amplia y detalladamente en la literatura.

## 5. DISEÑO METODOLÓGICO

### 5.1. Hipótesis

Es posible adecuar el procedimiento de obtención de absolutos a escala de laboratorio, modificando sus variables predominantes, tiempo de extracción y relación solvente/flor, para obtener con el mayor cociente de extracción (masa de absoluto/masa de material vegetal) un absoluto a partir de las flores de *Polianthes tuberosa*.

### 5.2. Determinación del porcentaje de humedad

Para determinar el porcentaje de humedad de las flores de *Polianthes tuberosa* se ubicaron cuatro bandejas de aluminio con ca. 100 g de flor cada una de ellas. Estas bandejas permanecieron durante 36 horas en un horno Acerinox (Indumegas) a una temperatura cercana a 100 °C. Transcurrido este tiempo (**Figura 10**), se registró la masa final del material vegetal.

El porcentaje de humedad se determinó a través de la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de humedad} = \frac{\text{Masa húmeda [g]} - \text{Masa seca [g]}}{\text{Masa húmeda [g]}} \times 100 \quad (1)$$

**Figura 10.** Flores de *Polianthes tuberosa* antes y después del secado.



Fuente: fotografías tomadas por el autor en CENIVAM el 20 y 22 de octubre de 2010.

### 5.3. Determinación de la pérdida de humedad a través del tiempo

En este estudio, se ubicaron 6 bandejas de aluminio con ca. 100 g de flor cada una de ellas, a la intemperie, hasta 96 horas, tiempo durante el cual se midieron sus masas en una balanza Classic (Mettler Toledo, modelo: PB1502-S). El intervalo de tiempo para la medida de las masas fue irregular, entre 12 y 24 horas. El porcentaje de pérdida de peso se determinó a través de la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de pérdida de peso} = \frac{(mmv_{(0)} - mmv_{(t)})[g]}{mmv_{(0)} [g]} \times 100 \quad (2)$$

Donde  $mmv_{(t)}$  es la masa del material vegetal medida en gramos a un determinado tiempo  $t$ .  $t=0$  equivale a la masa inicial del material vegetal.

#### 5.4. Obtención del absoluto

Aunque existen procedimientos generales, es muy importante escoger aquel que cumpla con el objetivo que se quiere alcanzar. En el caso de la *Polianthes tuberosa*, era necesario un proceso que pudiera ser llevado a escala industrial y a la vez que produjese un artículo de elevado valor agregado. La técnica a utilizar es la extracción con solvente hacia la obtención de concretos y absolutos, pues puede escalarse (lo cual no sería posible actualmente con SFE) y da como resultado extractos apetecidos, de excelente calidad (imposibles de obtener por técnicas destilativas).

Las siguientes variables fueron usadas como factores en el método *Simplex* fueron: tiempo de extracción y relación solvente/flor, en concordancia con la literatura [56, 57]. La señal a optimizar fue el cociente de extracción, o rendimiento de extracción, que se define como la masa de extracto obtenida por masa de material vegetal utilizada. Como condiciones de partida se decidió usar el tiempo de 72 horas para la extracción y 0.5 como relación solvente/flor. El procedimiento para obtener el absoluto de *Polianthes tuberosa* se describe a continuación.

Flores de nardo (ca. 200 g) se introdujeron en un recipiente de vidrio y sobre ellas se agregó la masa de solvente necesaria según las condiciones del experimento (ca. 100 g de éter de petróleo; condiciones de partida). El recipiente se aisló de la luz al guardarlo dentro de una bolsa negra opaca en un casillero. Después de que transcurriese el tiempo fijado del experimento (ca. 72 horas; condiciones de partida) se transfirió el líquido a un embudo de decantación y se desechó el residuo del material vegetal. El líquido se decantó durante diez minutos y la fase acuosa se desechó. La fase orgánica se rotoevaporó (Rotoevaporador Büchi, modelo: KRv 64/45; bomba de vacío Franklin Electric, modelo: 4101020413), el solvente recuperado se almacenó para su uso en experimentos

posteriores y al concreto obtenido se agregó etanol absoluto en una relación 1:20 en peso (20 g de etanol por 1 g de concreto obtenido). La mezcla se guardó en un envase ámbar durante 24 horas a temperaturas inferiores a 5 °C, en una nevera (Indufrial, modelo: TPA 9417YAS). Transcurrido este tiempo, la mezcla se filtró al vacío, usando papel filtrante. El filtrado se concentró usando rotoevaporador y posteriormente por medio de flujo controlado de N<sub>2</sub>. Una vez la mezcla se solidificase, el proceso se consideró completo, y este extracto obtenido se denominó absoluto. Todas las medidas experimentales se tomaron por decuplicado (n=10) con una balanza Classic (Mettler Toledo, Modelo: PB1502-S) y cada condición experimental se midió por duplicado. La **Figura 11** muestra fotografías de algunos de los pasos descritos anteriormente.

**Figura 11.** Procedimiento experimental.



\*De izquierda a derecha: decantación, rotoevaporación, concreto, dilución en etanol, absoluto final.

Fuente: fotografías tomadas por el autor en CENIVAM el 27 de julio de 2010.

## 5.5. Optimización *Simplex*

El primer *Simplex* se construyó usando las coordenadas que se muestran en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Condiciones experimentales para el primer *Simplex*.

Coordenada	Factor	
	Tiempo, h	Relación solvente/flor, g/g
1	72,7 ± 0,41	0,503 ± 0,0045
2	140 ± 1,1	1,06 ± 0,011
3	70,8 ± 0,35	1,005 ± 0,0064

Fuente: datos experimentales tomados por el autor.  $x \pm s$ ;  $n = 2$ .

La predicción del próximo punto máximo se realizó siguiendo el algoritmo del modelo *Simplex* de tamaño variable. El algoritmo detallado se describe a continuación.

El *Simplex* triangular se compone de tres coordenadas, o vectores, denominados b (la mejor respuesta), n (la respuesta intermedia) y w (la peor respuesta). Para calcular la ubicación exacta de r (la cuarta coordenada) se halla p (el centroide del *Simplex*), que se define como:

$$p = \left[ \frac{b_i + n_i}{2}, \frac{b_j + n_j}{2} \right] \quad (3)$$

Una vez hallado p, r se encuentra a través de la siguiente fórmula:

$$r = p + \alpha(p + w) \quad (4)$$

Donde  $\alpha$  es un coeficiente cuyo valor depende de las circunstancias que se mencionan a continuación: para el primer *Simplex*  $\alpha=1$ . Si  $r>b$ , entonces la quinta

coordenada es un *Simplex* expandido con  $\alpha > 1$ . Si  $b > r > n$ , este *Simplex* se mantiene y con base en él se continua el barrido de la superficie de respuesta, es decir  $\alpha = 1$ . Si  $r < n$ , entonces,  $1 > \alpha > 0.5$  y, finalmente, en caso de que  $r < w$ , entonces  $0.5 > \alpha > -1$ . En total, se trazaron 5 *Simplex* sobre la superficie de respuesta haciendo uso de 7 vectores.

## 5.6. Interpretación analítica

Se desarrollaron tres modelos matemáticos usando el programa MATLAB®, Versión 7.0.4.365, que realizó los cálculos estadísticos así como la simplificación de matrices para encontrar los coeficientes de los modelos. Se evaluaron modelos matemáticos polinomiales de hasta tercer orden, cuyas fórmulas aparecen a continuación:

$$Y = c_1 t + c_2 R + c_3 \quad (5)$$

$$Y = c_1 t^2 + c_2 t + c_3 R^2 + c_4 R + c_5 tR + c_6 \quad (6)$$

$$Y = c_1 t^3 + c_2 t^2 + c_3 t + c_4 R^3 + c_5 R^2 + c_6 R + c_7 t^2 R + c_8 tR^2 + c_9 tR + c_{10} \quad (7)$$

Y: cociente de extracción.

t: tiempo de la extracción en horas.

R: relación solvente/flor en g/g.

$c_{(n)}$ : coeficientes del n-ésimo término del modelo matemático.

## 5.7. Muestreo de las emisiones florales

El muestreo de los compuestos orgánicos volátiles se hizo por medio de la técnica HS-SPME. Para ello, se midió el *headspace* de ca. 2 g de flores frescas, recién picadas, usando una fibra de SPME recubierta con poli(acrilato) (SUPELCO, 65  $\mu\text{m}$ ). El *headspace* se midió a 40 °C durante 15 min, después de un tiempo de pre-equilibrio de 10 min.

## 5.8. Análisis instrumental

La caracterización del absoluto se realizó analizándolo por GC-MS, usando columna polar y apolar. El extracto HS-SPME sólo se caracterizó usando columna polar.

Para llevar a cabo la separación del absoluto y del extracto HS-SPME en columna polar se usó un cromatógrafo *Agilent Technologies* 6890N, a las siguientes condiciones de trabajo:

- Inyección de muestra con inyector automático *Agilent Technologies* 7683B.
- Puerto de inyección a 250 °C, en modo *split* 1:30, con helio como gas de arrastre.
- Columna capilar DB-WAX, *J&W Scientific*, 60 m X 0.25 mm X 0.25µm.
- Programación del horno: 45 °C (10 min) @ 3 °C/min; 220 °C (5 min).

El cromatógrafo fue acoplado a un espectrómetro de masas *Agilent Technologies* 5975A como analizador espectroscópico, cuyas condiciones de trabajo fueron:

- Línea de transferencia a 250 °C.
- Ionización por impacto de electrones a 70 eV.
- Cámara de ionización a 230 °C
- Analizador cuadrupolar operado en modo *full scan*, en un intervalo *m/z* 45-350.

El análisis del absoluto en columna apolar se realizó usando un cromatógrafo *Agilent Technologies* 6890 Plus, a las siguientes condiciones de trabajo:

- Inyección de muestra con inyector automático *Agilent Technologies* 7683B.
- Puerto de inyección a 250 °C, en modo *split* 1:30, con helio como gas de arrastre.
- Columna capilar DB-5ms, *J&W Scientific*, 60 m X 0.25 mm X 0.25µm.

- Programación del horno: 45 °C (5 min) @ 4 °C/min; 150 °C (2 min) @ 5 °C/min; 250 °C (5 min) @ 10 °C/min; 275 °C (35 min).

El cromatógrafo fue acoplado a un espectrómetro de masas *Agilent Technologies* 5973N como analizador espectroscópico, cuyas condiciones de trabajo fueron:

- Línea de transferencia a 250 °C.
- Ionización por impacto de electrones a 70 eV.
- Cámara de ionización a 230 °C
- Analizador cuadrupolar operado en modo *full scan*, en un intervalo *m/z* 45-350.

Los equipos analíticos se muestran en la **Figura 12**.

**Figura 12.** Equipos analíticos utilizados.



\*De izquierda a derecha: GC-MS (*Agilent Technologies* 6890 Plus – 5973N), computador, GC-MS (*Agilent Technologies* 6890N – 5975A).

Fuente: fotografías tomadas en CENIVAM el 28 de octubre de 2010 por el autor.

La identificación de compuestos de la mezcla se realizó comparando los índices de retención y espectros de masas experimentales con los de las bases de datos Adams, Wiley y NIST.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Estudio del método de extracción

Es posible adecuar el procedimiento de obtención de absolutos a escala de laboratorio, modificando sus variables predominantes, *i.e.*, tiempo de extracción y relación solvente/flor, para obtener a partir de las flores de *Polianthes tuberosa* su absoluto con el mayor cociente de extracción (masa de absoluto/masa de material vegetal).

**6.1.1. Estudio del porcentaje de humedad.** Los resultados de la determinación del porcentaje de humedad de las flores de *Polianthes tuberosa* se muestran en la **Tabla 3**.

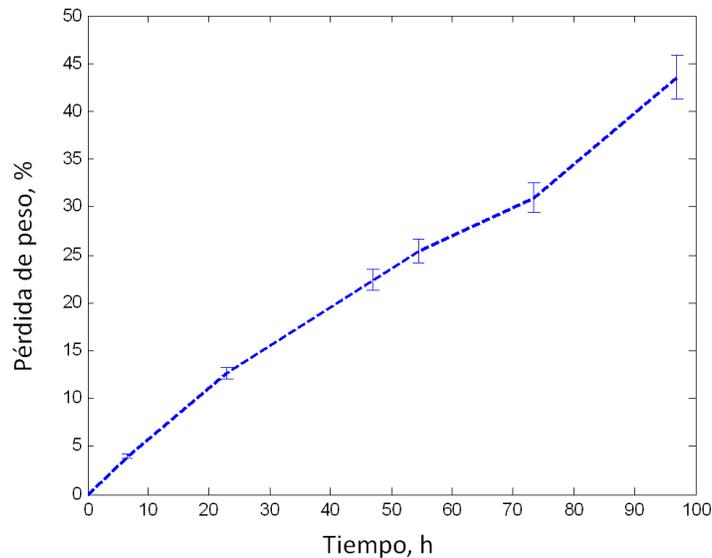
**Tabla 3.** Porcentaje de humedad de las flores de *Polianthes tuberosa*.

Peso húmedo, g	Peso seco, g	Humedad, %
100,2 ± 0,51	13,3 ± 0,18	86,7 ± 0,14

Fuente: datos experimentales tomados por el autor.  $x \pm s$ ;  $n = 4$ .

**6.1.2. Estudio de la pérdida de humedad a través del tiempo.** La **Figura 13** muestra los resultados obtenidos al hacer el seguimiento a la pérdida de peso de las flores de *Polianthes tuberosa*, a temperatura ambiente.

**Figura 13.** Curva de secado a condiciones ambiente de flores de *Polianthes tuberosa*.



Fuente: datos tomados por el autor. n = 6.

Como se puede observar, las flores de *Polianthes tuberosa* no pierden humedad con facilidad. Al cabo de cuatro días, las flores han perdido aproximadamente el 43% de su peso inicial, lo que representa cerca de la mitad de su humedad. Medir la pérdida de humedad después de este tiempo es muy impreciso, ya que se puede apreciar de forma visible la aparición de hongos y putrefacción en las flores.

**6.1.3. Consideraciones sobre el proceso de extracción.** Los datos anteriores permiten indagar sobre el proceso de extracción al observar el porcentaje de hidrolato obtenido de ésta. Las medidas muestran que el hidrolato obtenido es, para el mejor de los casos, ca. 46% respecto al material vegetal, poco menos de la mitad del hidrolato que se esperaría si el solvente lograse liberar la totalidad del agua retenida en la planta.

Lo anterior se explica si se considera que el solvente debe romper la pared celular de las flores para que se liberen los metabolitos secundarios, que posteriormente formarán el absoluto, y demás sustancias propias de su estructura, lo cual incluye agua y ácidos grasos. Este proceso puede ser deficiente por varios motivos entre los cuales destacan tres: 1). Energía insuficiente para producir el rompimiento celular, 2). Tiempo limitado de extracción o, 3). Saturación del solvente.

Si el fenómeno ocurre de esta forma, entonces, es evidente que los factores controlados no afectan únicamente el resultado final, sino también la cantidad de hidrolato obtenida. Del mismo modo, esta premisa puede extenderse a la cantidad de concreto obtenida. Por ende, debería ser posible relacionar estos tres resultados de algún modo y, de hecho, podrían usarse también como indicadores del proceso y así predecir el resultado final, es decir, el rendimiento de la extracción respecto al absoluto. Esta idea se ampliará y discutirá en detalle en el **Apartado 6.2.7.**

**6.1.4. Consideraciones sobre pérdidas de sustancias.** En general, durante cualquier proceso se espera que la masa se conserve por diversas razones como preservación de los analitos o evitar pérdidas de solventes o reactivos. En este proceso de extracción se presenta un alto porcentaje de pérdida de solventes que varía dependiendo de las condiciones del experimento. Se identificaron y estudiaron cuatro fuentes de pérdida de solvente, a saber: retención en el material vegetal, escape en la maceración, fugas durante el almacenamiento y pérdidas durante la concentración.

Paralelo al proceso de dilución de la pared celular ocurre otro fenómeno, a saber: las flores retienen parte del solvente. Inicialmente, según lo establecido en la metodología (véase sección 5.4) se tomaron ca. 200 g de flor fresca. Sin embargo, después de la extracción, independiente de los factores, el material vegetal pesaba 212 g (106% de su peso inicial). Esto no significa que las flores absorbieron la diferencia de peso en solvente, pues ya había ocurrido para este momento el rompimiento celular, liberación de agua y metabolitos de la flor. La explicación a este fenómeno no es clara, no obstante, al realizar una compresión en frío del macerado fue posible evidenciar la retención de solvente e hidrolato, que de otra forma se perdería junto con los desechos vegetales.

Después de comprimir el material vegetal macerado, su peso llegó aproximadamente a 152 g (76%) y se obtuvo el hidrolato (81 g), 46% del agua total de las flores. El resto de agua, aún retenida, correspondería aproximadamente a 93 g que se encuentran en el desecho. De los 59 g restantes, 26 g corresponden a la biomasa (peso seco) de las flores, lo que muestra que aún en el desecho hay ca. 33 g de solvente retenido que no puede recuperarse después de la compresión manual. Sin embargo, la retención de solvente dentro del desecho del material vegetal no es la única fuente de pérdidas de solvente. Debido a que la cantidad de solvente varía, y éstas son pérdidas lineales, no pueden expresarse como porcentajes generales: hay que evaluar los casos particularmente. Al usar 100, 150 y 200 g de solvente se esperaría que, con la pérdida por retención de solvente, los extractos tuviesen una masa aproximada de 67, 117 y 167 g, respectivamente. Sin embargo, la masa obtenida fue de 40, 89 y 140 g. La pérdida aproximada es en promedio de 27 g. que se liberan a la atmósfera durante la compresión, proceso que dura aproximadamente 10 minutos y se lleva a cabo a temperatura ambiente, que es unos 15 °C menor a la temperatura de ebullición del solvente.

Aparte de las pérdidas gracias a la retención y posterior recuperación de sustancia por parte de las flores es posible pensar en dos factores adicionales: el almacenamiento y las etapas de concentración. Al medir los contenedores antes y después de su debido almacenamiento es evidente que éste apenas sería responsable, en el peor de los casos, de la pérdida de ca. 0.3 g de solvente. Las demás pérdidas deben atribuirse entonces al proceso de rotoevaporación donde la refrigeración podría no ser suficiente para retener la totalidad del solvente, evitando así su recuperación total. En general, las pérdidas fueron del 36% para el éter de petróleo y de 50% para el etanol absoluto.

Resumiendo, se puede concluir que del solvente utilizado para la extracción las flores retienen 33 g, 27 g se pierden durante la compresión y del solvente restante se pierde cerca del 36% durante el proceso de concentración con rotoevaporador. Es evidente, que estas fuentes de pérdida son superables mejorando el proceso de compresión (lo cual permitiría recuperar 60 g adicionales mejorando simultáneamente el rendimiento de la extracción), y optimizando las condiciones de concentración por rotoevaporación usando, por ejemplo, grasas sellantes para alto vacío o un baño de enfriamiento con temperatura más baja. Ante el hecho anterior surge la inquietud sobre la pérdida de muestra durante estos procesos. Aunque es posible, se presume que la muestra es considerablemente menos volátil que el solvente, por lo cual no se verá tan afectada; no obstante, prevenir la pérdida de solvente es un punto que no puede ignorarse.

## **6.2. Optimización y validación**

**6.2.1. Preliminares.** Las condiciones experimentales exploradas durante la optimización *Simplex* y los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 4**,

construida a partir de los *Simplex* ilustrados en la **Figura 14**. De acuerdo con dichos resultados, se construyeron los modelos matemáticos que deben cumplir con la siguiente condición llamada condición de frontera: si alguno de los factores es nulo, la señal también debe serlo.

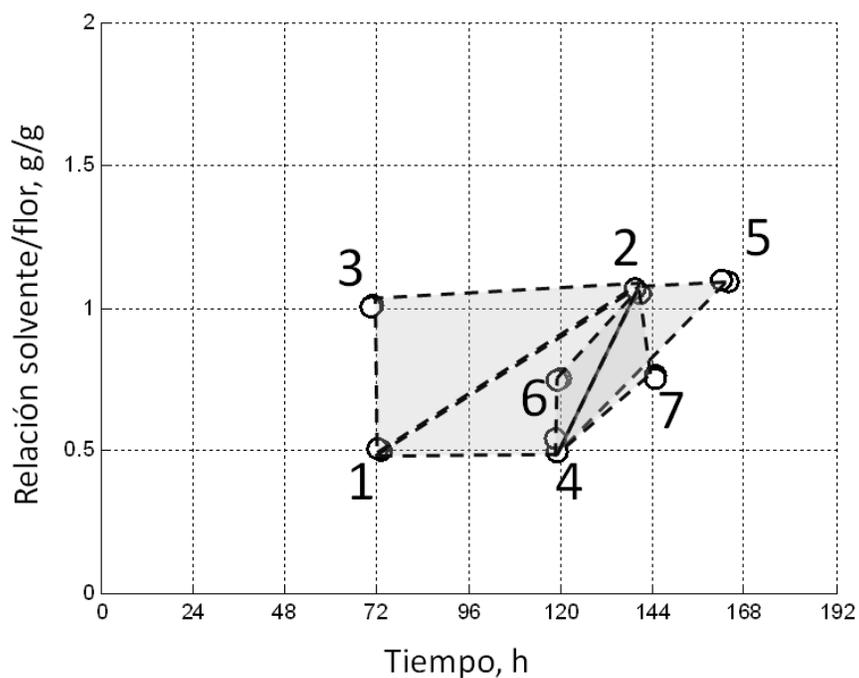
**Tabla 4.** Condiciones y resultados experimentales.

Coordenada	Factor		Señal
	Tiempo, h	Relación solvente/flor, g/g	Cociente de extracción, %
1	72,7 ± 0,41	0,503 ± 0,0045	0,12 ± 0,030
2	140 ± 1,1	1,06 ± 0,011	0,193 ± 0,0075
3	70,8 ± 0,35	1,005 ± 0,0064	0,046 ± 0,0059
4	119,1 ± 0,11	0,52 ± 0,032	0,15 ± 0,050
5	163 ± 1,2	1,092 ± 0,0029	0,134 ± 0,0070
6	119,7 ± 0,40	0,749 ± 0,0013	0,14 ± 0,018
7	144,9 ± 0,21	0,756 ± 0,0081	0,09 ± 0,019

Fuente: datos tomados por el autor.  $x \pm s$ ;  $n = 2$ .

Para verificar si los modelos se ajustan a los resultados experimentales, se compararon éstos con las señales de las superficies de respuesta (**Tabla 5**). A continuación, se analizará cada modelo en detalle, y lo que su información aporta a la comprensión del procedimiento estudiado.

**Figura 14.** Simplex construidos en el área explorada.



Fuente: superficie elaborada por el autor usando MATLAB.

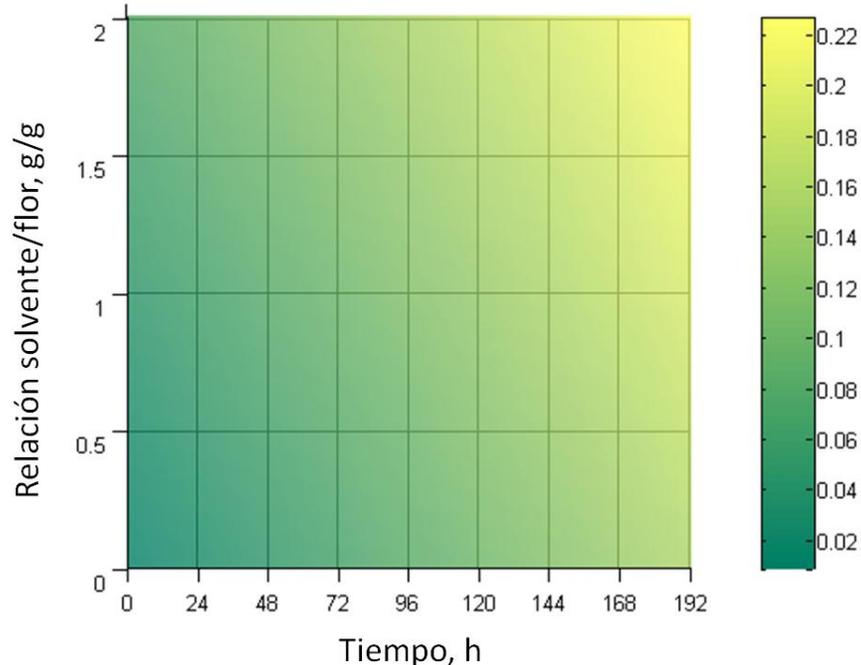
**Tabla 5.** Comparación de señales.

Coordenada	Factor		Señal	Cociente de extracción, %		
	Tiempo, h	Relación solvente/flor, g/g		1 <sup>er</sup> orden	2 <sup>o</sup> orden	3 <sup>er</sup> orden
1	72,7	0,503	0,12	0,08	0,11	0,13
2	140	1,06	0,193	0,154	0,207	0,193
3	70,8	1,005	0,046	0,098	0,088	0,046
4	119,1	0,52	0,15	0,12	0,13	0,15
5	163	1,092	0,134	0,173	0,139	0,139
6	119,7	0,749	0,14	0,13	0,13	0,14
7	144,9	0,756	0,09	0,12	0,06	0,09

Fuente: datos obtenidos por el autor.

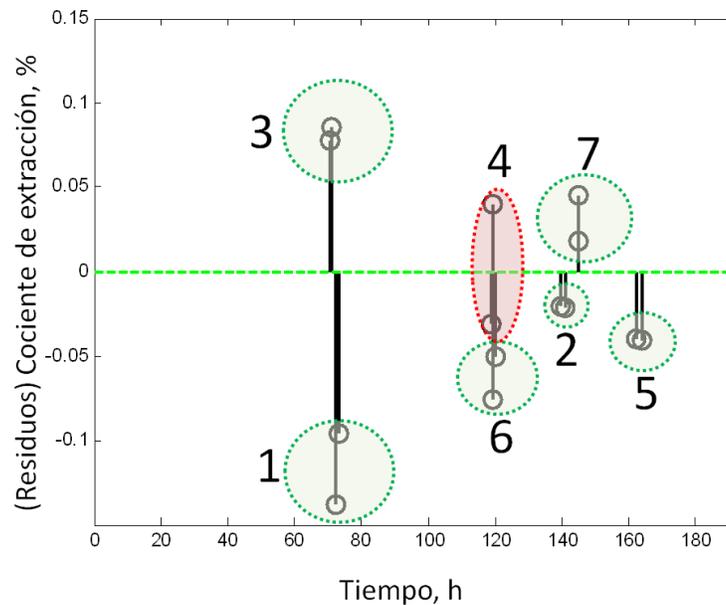
**6.2.2. Modelo de primer orden.** Es el más sencillo y supone que el efecto de los factores sobre la señal es lineal y aditivo. La figura resultante es un plano que comienza en el origen y describe un aumento indefinido de la señal a medida que los factores aumentan. En la **Figura 15** se observa una vista superior del modelo de primer orden. Se hace evidente que es inapropiado representar el procedimiento usando este modelo que describe, eventualmente, un crecimiento infinito en el rendimiento y que tampoco se ajusta a la condición de frontera, prediciendo aumentos en el rendimiento aún sin que transcurra tiempo o se use solvente. Además, el análisis de los residuos, cuya suma de cuadrados de residuos tiene por valor 0.0587, muestra claramente desviaciones preferenciales (**Figura 16**) para casi todos los puntos experimentales.

**Figura 15.** Modelo de primer orden.



Fuente: vista superior del modelo elaborado por el autor usando MATLAB.

**Figura 16.** Residuos del modelo de primer orden respecto al tiempo.



Fuente: gráfica elaborada por el autor usando MATLAB.

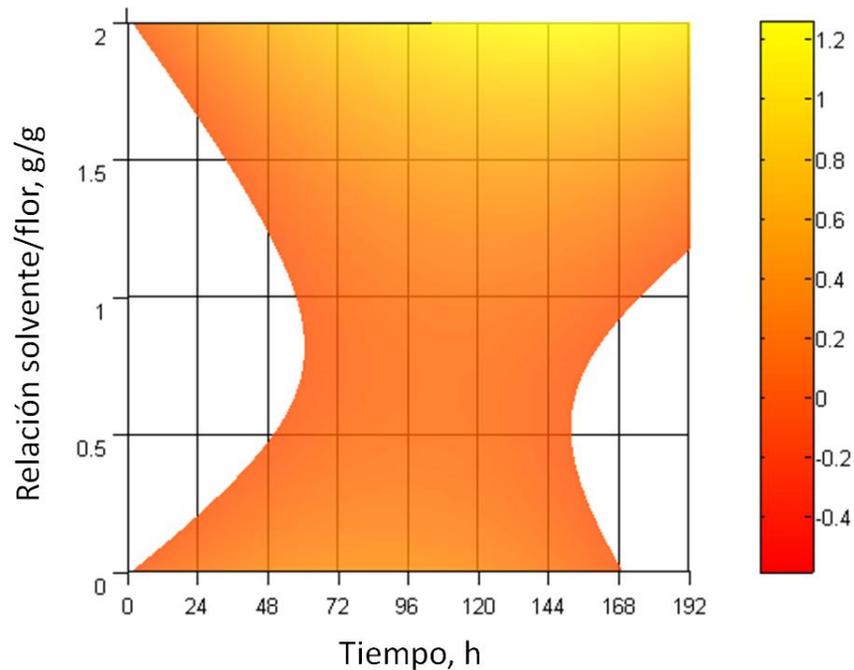
La **Ecuación 8** corresponde a este modelo y sus coeficientes indican que el factor con mayor impacto sobre la señal es el tiempo en horas. La constante, diferente de cero, corrobora el incumplimiento de la condición de frontera.

$$Y = 0.0008t + 0.0350R + 0.0087 \quad (8)$$

**6.2.3. Modelo de segundo orden.** El modelo de segundo orden (véase **Figuras 17 y 18**) supone interacción entre los dos factores, es decir, un efecto sinérgico. Aunque esto ressemble más la realidad, el modelo aún no es perfecto pues su semejanza con los datos experimentales cerca al punto máximo (el punto de mayor interés) es remota. A pesar de lo anterior, la suma de cuadrados de residuos disminuye a 0.0103, debido a que la cantidad de puntos experimentales

con sesgo (color verde), ahora se encuentran como se desearía: bien sea distribuidos al azar (color rojo) o sobre la superficie (color morado).

**Figura 17.** Modelo de segundo orden.

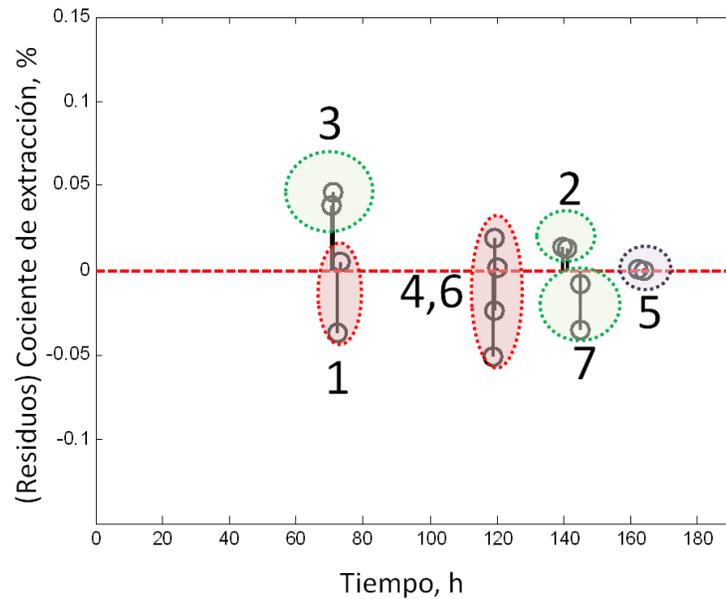


Fuente: vista superior del modelo elaborado por el autor usando MATLAB.

El modelo de segundo orden, descrito en la **Ecuación 9**, proporciona nueva información. La interacción entre los factores es ahora el término que más aporta a la señal, lo que corrobora el efecto sinérgico y la importancia de considerarlo en el modelo.

$$Y = -0.0001t^2 + 0.01t + 0.5817R^2 - 1.1677R + 0.0037tR + 0.0009 \quad (9)$$

**Figura 18.** Residuos del modelo de segundo orden respecto al tiempo.



Fuente: gráfica elaborada por el autor usando MATLAB.

**6.2.4. Modelo de tercer orden.** Aunque es más difícil de manejar, la información que el modelo otorga es más completa, pues contempla una mayor cantidad de interacciones, que se expresan claramente en su ecuación (10).

$$Y = -0.0005t^2 + 0.0466t - 0.4528R^3 + 4.1409R^2 - 6.4706R - 0.0001t^2R - 0.0197tR^2 + 0.0463tR \quad (10)$$

La constante es nula, que se interpreta como un cumplimiento cabal de la condición de frontera que los otros modelos no habían logrado. El término  $t^3$  tampoco aparece pues su coeficiente es nulo. Esto significa que el rendimiento no cambiará aún después de tiempos muy largos de extracción; condición que está inscrita en el término  $t^2$ , el término que más aporta a la señal. Éste, en conjunto con  $t$ , determina el tiempo límite para una extracción óptima y expresa que, después de mucho tiempo, el proceso llegará al equilibrio. En concordancia con la ecuación es posible reconocer que a tiempos cortos la influencia sobre la señal es

lineal, sin embargo, por encima de 93 horas la influencia se vuelve cuadrática, es decir, que el tiempo comienza a jugar un rol muy importante después de aproximadamente 4 días de extracción.

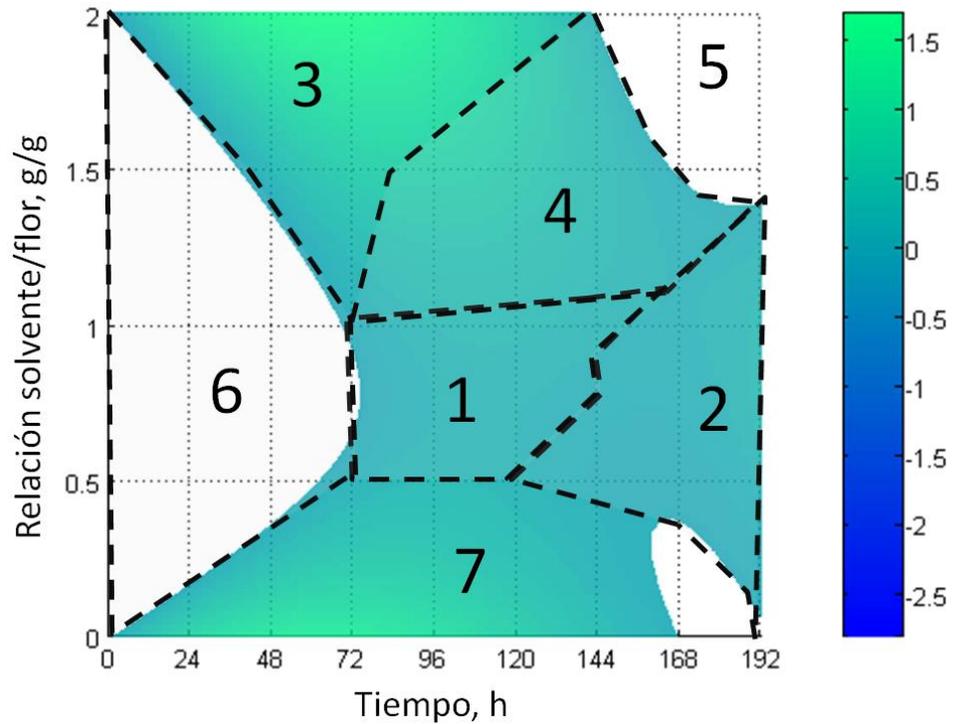
Los términos asociados a R expresan, como se esperaría, un aumento en el rendimiento a mayor relación solvente/flor. Teniendo en cuenta el rango de R (0.5 a 1.1) y sus coeficientes, es palpable que estos efectos son predominantemente lineales y que sólo valores de R sobre 1.5 habrían producido cambios considerables en su impacto. Como se discute más adelante, sobrepasar este valor no es conveniente.

Además de lo anterior, la interacción entre los factores en el modelo cúbico se torna de suma importancia. Aunque de los términos asociados a las interacciones el predominante es t-R, los nuevos términos de interacción contribuyen de manera significativa a la señal. La inclusión de estos términos de interacción sería responsable, en gran medida, del éxito de este modelo para la descripción del fenómeno estudiado.

Finalmente, cabe resaltar, que los coeficientes relacionados con el tiempo son números relativamente pequeños y esto se debe a las dimensiones de esta variable, cuyo valor absoluto se encuentra entre 70 y 170, a diferencia de la relación solvente/flor (0.5 a 1.1). Esta diferencia de valores es la responsable de los coeficientes pequeños relacionados con el tiempo, especialmente, aquellos términos asociados a  $t^2$ . Todo esto cobra el mayor sentido al recordar que el fenómeno maximizado es una extracción.

La **Figura 19** muestra una interpretación gráfica y general de los argumentos anteriormente expuestos y, en ella, se hacen visibles las influencias e interacciones de los factores. Para una mayor comprensión se ha dividido en siete zonas: 1). Corresponde al área de datos estudiada experimentalmente y explorada por medio del *Simplex*. 2). y 3). Muestran la influencia del tiempo y la relación solvente/flor sobre el proceso, respectivamente. 4). Se relaciona con el área de máxima interacción entre los dos factores. 5). Contiene la información relacionada con el cambio de impacto de la relación solvente/flor. 6). Presumiblemente indica el tiempo necesario para que el solvente destruya la pared celular de las flores. Como se puede apreciar, a medida que el volumen aumenta, el tiempo necesario para este proceso disminuye. 7). Podría corresponder a absorción del solvente por parte de las flores o a extracción insuficiente (pues las flores no están sumergidas del todo en el solvente). Aunque la interpretación de las zonas 6 y 7 es netamente presuntiva, ésta se basa en las experiencias ocurridas durante la investigación y la interpretación de los datos experimentales obtenidos: la desviación estándar de los datos experimentales con un valor de relación solvente/flor menor fue más alto en comparación con los demás puntos. Es de esperarse que alrededor de este rango de valores ocurra algo que no esté contemplado en los factores estudiados, que bien podría ser el fenómeno de absorción de solvente por parte de las flores y la necesidad de romper la pared celular, temas discutidos en los **Apartados 6.1.4 y 6.1.3**, respectivamente.

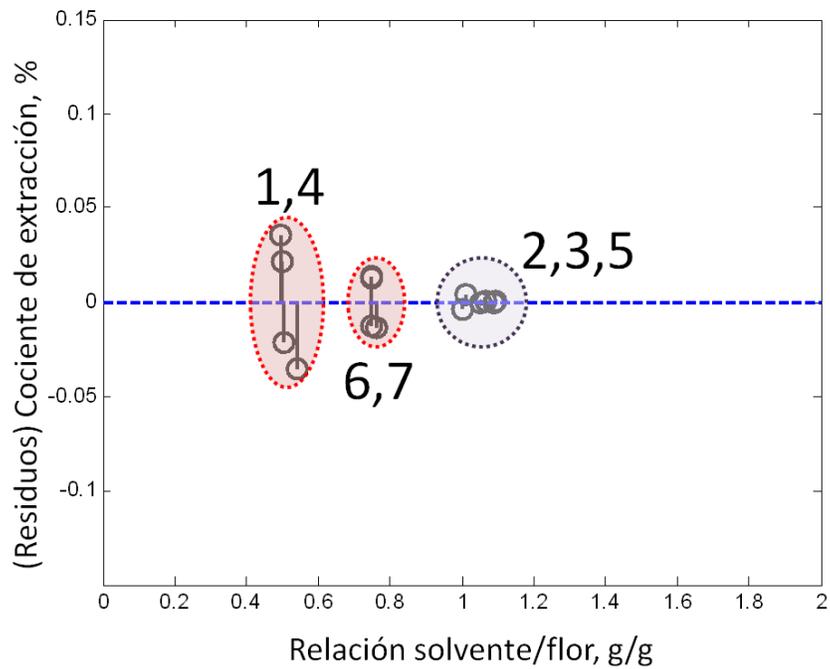
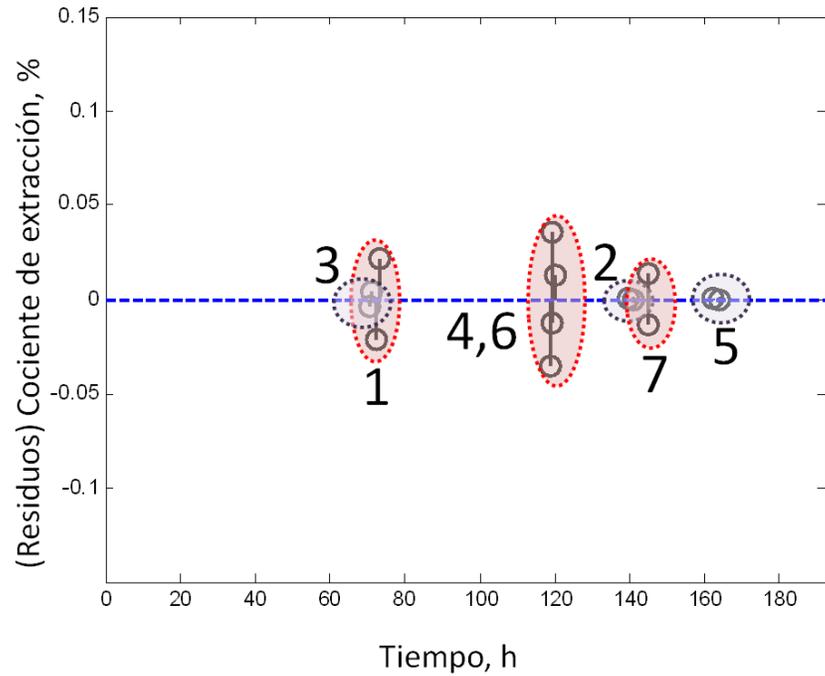
**Figura 19.** Modelo de tercer orden dividido en zonas.



Fuente: superficie elaborada por el autor usando MATLAB.

**6.2.5. Validación del modelo.** El modelo de tercer orden parece ajustarse bien a los datos experimentales obtenidos, pero hace falta saber si es autosuficiente para explicar el comportamiento del experimento. Para esto se hizo la evaluación de sus residuos respecto a los dos factores, que se muestra en la **Figura 20**.

**Figura 20.** Análisis de residuos para el modelo de tercer orden.



\*Arriba: residuos respecto al tiempo. Abajo: residuos respecto a la relación solvente/flor

Fuente: gráficas elaboradas por el autor usando MATLAB.

Es claro que el modelo se ajusta a los datos experimentales de modo que no hay sesgo en la desviación de los datos, como se espera de una distribución normal; lo que implica que la dispersión de los datos se debe al error aleatorio, que no existe un factor adicional tal que influya en la señal y que las variaciones de esta pueden ser explicadas congruentemente a través de los factores estudiados. Es interesante anotar, que el modelo se ajusta mejor a la relación solvente/flor a medida que ésta aumenta, lo cual no sucede con el tiempo, lo cual concuerda con la interpretación de las zonas 6 y 7 (ver apartado anterior).

La suma de los cuadrados de los residuos para este modelo es de 0.0041, valor más bajo que el obtenido por los modelos de segundo y primer orden (0.0103 y 0.0587, respectivamente). Este resultado es la prueba final de la idoneidad del modelo de tercer orden para describir el fenómeno: es el menor valor obtenido con estos datos experimentales y su magnitud es comparable con la desviación estándar de las medidas experimentales; siendo así, la precisión del modelo es comparable con la del experimento. La reproducibilidad intermedia está entre el 5% (para los valores mayores) y el 20% (para valores pequeños).

En concordancia con lo anterior, el modelo también debería ser predictivo, por lo menos, en el área de datos estudiada experimentalmente. Se realizó un nuevo experimento en un punto dentro del área de trabajo y se comparó con el modelo propuesto. La **Tabla 6** muestra el resultado: el modelo predijo el valor final de absoluto que se obtuvo tras el experimento, que se encuentra dentro del rango previsto por la suma de los cuadrados de los residuos, con un error de predicción de apenas el 2%.

**Tabla 6.** Comparación entre un nuevo punto experimental y la predicción del modelo.

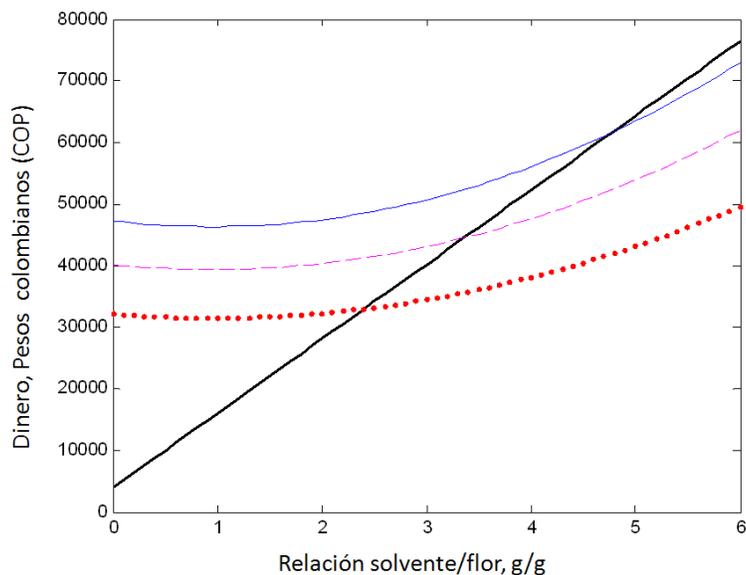
	Factor		Señal
	Tiempo, h	Relación solvente/lor, g/g	Cociente de extracción, %
<b>Experimental</b>	140,7	1,066	0,190
<b>Modelo</b>	140,7	1,066	0,194

Fuente: datos tomados por el autor. x; n = 2.

**6.2.6. Límites del modelo matemático.** A pesar de la efectividad del modelo para predecir rendimientos interpolados en el rango estudiado de los factores, su capacidad no es ilimitada y debe interpretarse y usarse de forma lógica. Como habría de esperarse, el modelo predice un alto rendimiento cuando la relación solvente/lor y el tiempo son elevados; no obstante el rendimiento no puede aumentar infinitamente y además un tercer factor se hace presente en este punto: los costos del proceso.

La **Figura 21** relaciona de manera general el aumento de los costos simultáneamente con el aumento de la relación solvente/lor. Como base de cálculo se usaron 200 g de material vegetal en un proceso de 120 horas de duración.

**Figura 21.** Costos y ganancias simuladas.



\*Negro: costo de la extracción. Azul: precio de venta. Magenta: precio sin margen comercial. Rojo: estimado de máximo costo de insumos.

Fuente: simulación realizada por el autor.

El costo aumenta linealmente con la cantidad de solvente utilizada hasta superar el precio de venta al público. Lógicamente es indeseable que esto suceda y el costo debe ser mucho menor que su precio de venta para percibir así alguna ganancia de su comercialización. Si además se cuentan los demás gastos implicados en el proceso, pues los insumos o son el total de los costos, se estima que superar de 2 la relación solvente/flor ya podría ser indeseable y hacer del absoluto un artículo más costoso de producir que de comprar.

**6.2.7. Señales paralelas a la optimización general.** Como se mencionó en el **Apartado 6.1.3**, sería posible monitorear el proceso de la extracción y el rendimiento final a través del hidrolato y el concreto obtenido. En la **Tabla 7** se relacionan los experimentos con su señal principal y los dos indicadores

propuestos. Al comparar estos indicadores con la señal se hace evidente la falta de relación entre ellos. Esto se explica al tener en cuenta que tanto el hidrolato como el concreto pueden no estar influidos por los factores estudiados de la misma forma que el absoluto y, por ello, aunque son parte del proceso, su relación no se hará explícita con el modelo usado para el absoluto.

**Tabla 7.** Comportamiento de otros indicadores respecto a los factores.

Coordenada	Factor		Cantidad relativa, %		
	Tiempo, h	Relación solvente/lor, g/g	Absoluto	Hidrolato	Concreto
1	72,7	0,503	0,12	37,14	0,35
2	140	1,06	0,193	30,77	0,40
3	70,8	1,005	0,046	45,79	0,43
4	119,1	0,52	0,15	32,75	0,50
5	163	1,092	0,134	36,89	0,37
6	119,7	0,749	0,14	45,81	0,46
7	144,9	0,756	0,09	45,26	0,42

\*El rendimiento de hidrolato y de concreto se calcula de forma similar al de absoluto.

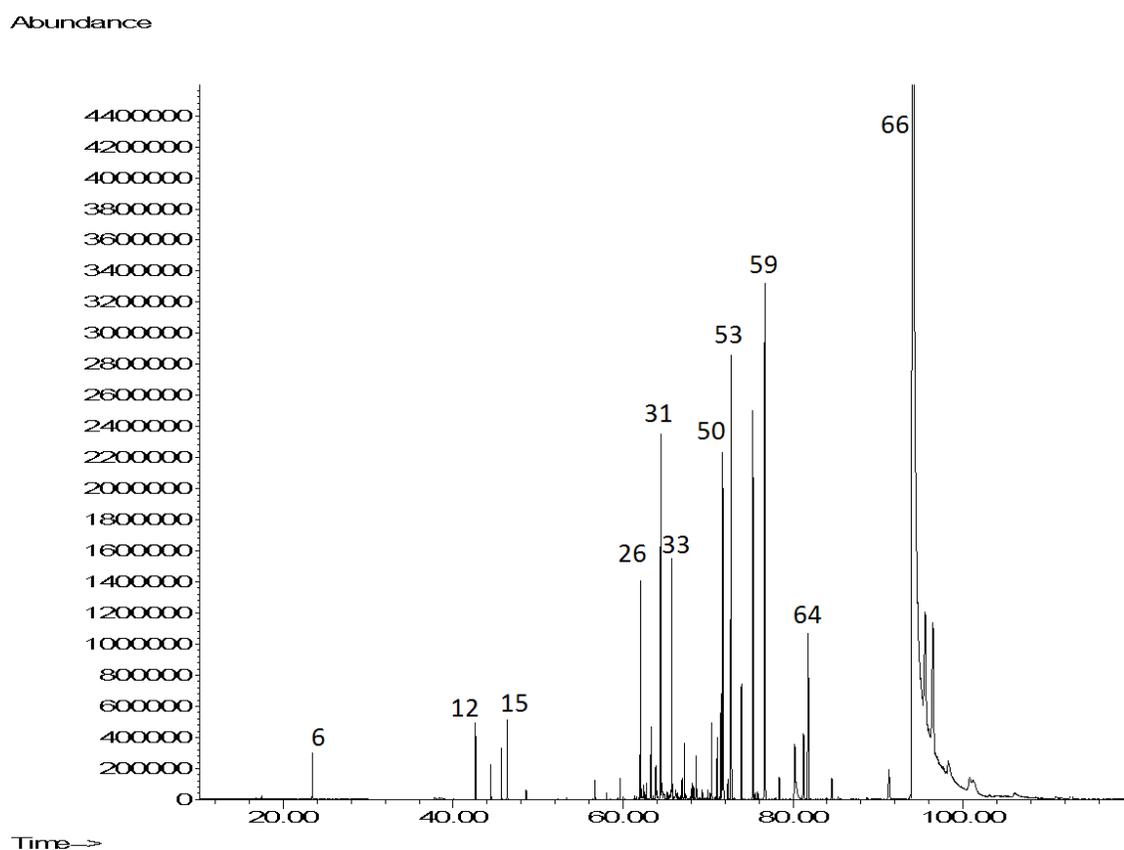
Fuente: datos tomados por el autor.  $x \pm s$ ;  $n = 2$ .

### 6.3. Caracterización

**6.3.1. Caracterización del absoluto y las emisiones florales.** Se encontraron 73 metabolitos secundarios en la *Polianthes tuberosa*: 28, sólo en el absoluto, 18, propios del espacio de cabeza y 27 comunes para ambos extractos. Los componentes mayoritarios del absoluto son el ácido linoleico (43%), el ácido palmítico (27%) y el ácido oléico (4.9%); los de la fracción volátil de las flores son el ácido linoleico (67%), el ácido oleico (10.5%) y el linoleato de etilo (2.03%). Los

cromatogramas típicos del absoluto y de la fase vapor de las flores *in vitro* aparecen en la **Figuras 22** y **23**, respectivamente. Sus picos están numerados, correspondiendo al encontrado en la **Tabla 8**.

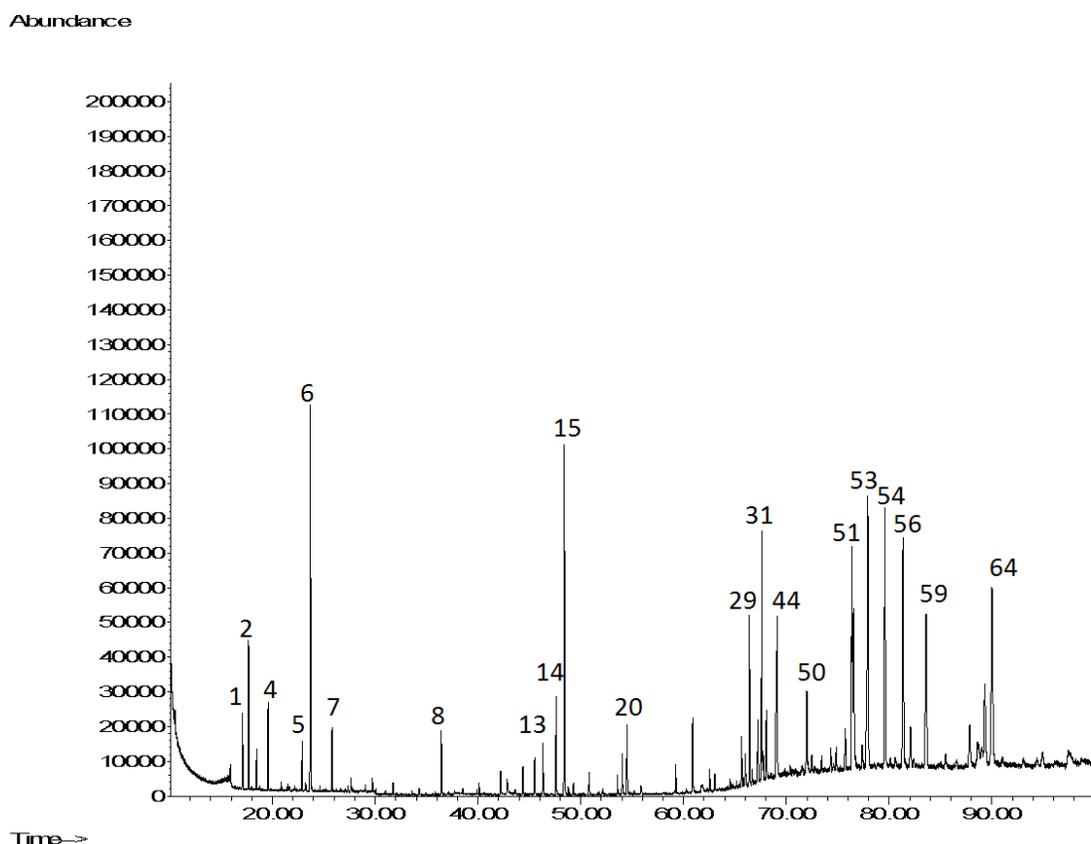
**Figura 22.** Perfil cromatográfico obtenido por GC-MS del absoluto de *Polianthes tuberosa*.



\*Columna DB-WAX, 60 m X 0.25 mm X 0.25µm. Detector MSD (EI, 70 eV)

Fuente: datos adquiridos en el cromatógrafo *Agilent Technologies 6890N*.

**Figura 23.** Perfil cromatográfico obtenido por GC-MS del extracto HS-SPME de *Polianthes tuberosa*.



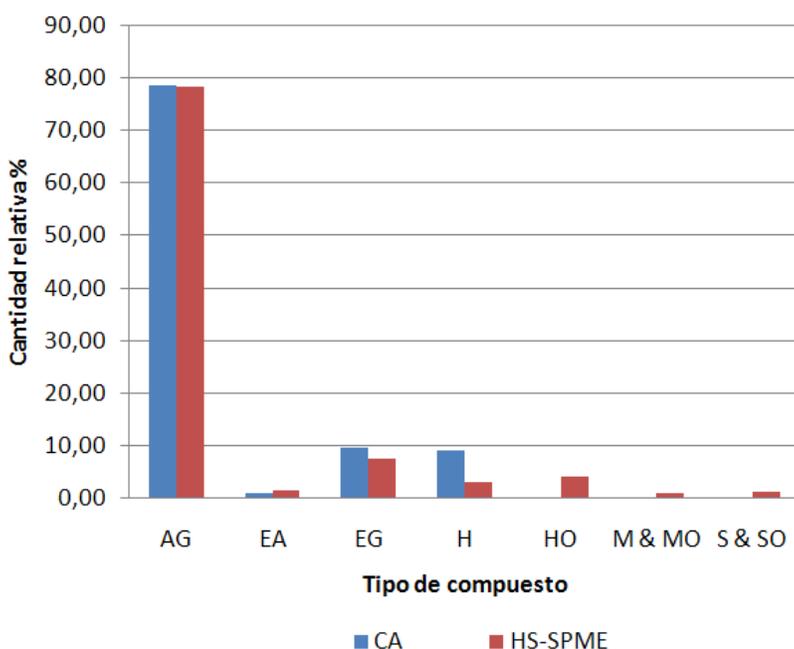
\*Columna DB-WAX, 60 m X 0.25 mm X 0.25µm. Detector MSD (EI, 70 eV)

Fuente: datos adquiridos en el cromatógrafo *Agilent Technologies* 6890N.

La distribución de los componentes por tipos de compuesto se muestra en la **Figura 24**. Es importante resaltar que, aunque un análisis de PCA establecería con certeza la similitud entre ambos extractos, se evidencia coincidencia en la naturaleza de los componentes mayoritarios (ácidos grasos), pero diferencias en los componentes minoritarios, que tienen incidencia sobre la fragancia final. La caracterización e identificación presuntiva de los extractos de *Polianthes tuberosa*, absoluto y HS-SPME, se muestra en la **Tabla 8**. Algunas estructuras de los compuestos se encuentran en el **Anexo A**, con su nombre y el número de pico

correspondiente, que aparece en la **Tabla 8**. Los espectros de masas y las rutas de fragmentación propuestas de los compuestos mayoritarios aparecen en los **Anexos B al E**.

**Figura 24.** Distribución de componentes clasificados por familias en los extractos de *Polianthes tuberosa*.



\*AG: ácidos grasos. EA: ésteres aromáticos. EG: ésteres grasos. H: hidrocarburos. HO: hidrocarburos oxigenados. M: monoterpenos. MO: monoterpenos oxigenados. S: sesquiterpenos. SO: sesquiterpenos oxigenados.

Fuente: gráfica realizada por el autor.

**Tabla 8.** Cantidad relativa (%) e identificación de los constituyentes de los extractos de *Polianthes tuberosa*.

N	I <sub>R</sub>	Compuesto	Cantidad relativa, %	
			Absoluto	Fracción volátil
1	1098	2,3-Dimetil-2-butanol	—	0,446 ± 0,0031
2	1108	2-Metil-2-pentanol	—	0,737 ± 0,0060
3	1120	3-Metil-2-pentanol	—	0,20 ± 0,020
4	1137	1,1-Dietoxi-3-metilbutano	—	0,140 ± 0,0039
5	1195	Limoneno	—	tr
6	1209	1,8-Cineol	tr	0,70 ± 0,018
7	1250	Tridecanol	—	tr
8	1472	Pentadecanol	—	0,107 ± 0,0030
9	1558	α-Bouroneno	—	tr
10	1590	2,3-Butanodiol	tr	0,20 ± 0,024
11	1625	1,2-Propanodiol	—	tr
12	1642	Benzoato de metilo	tr	tr
13	1690	Benzoato de etilo	0,12 ± 0,053	0,17 ± 0,011
14	1697	α-Terpineol	tr	0,34 ± 0,015
15	1742	Germacreno D	0,13 ± 0,037	1,28 ± 0,065
16	1765	Carvona	tr	tr
17	1836	Salicilato de bencilo	tr	tr
18	1914	Octadecanol	—	tr
19	1928	Exo-2-hidroxi-1,8-cineol	—	0,125 ± 0,0089
20	1942	Alcohol bencílico	—	0,32 ± 0,099
21	2007	Metil eugenol	tr	—
22	2049	Miristato de etilo	tr	—
23	2090	9-Oxononanoato de etilo	tr	—
24	2099	Eneicosano	tr	—
25	2170	NI	tr	—
26	2176	Metil isoeugenol	0,24 ± 0,025	—
27	2188	2-Metoxi-4-vinilfenol	tr	0,23 ± 0,074
28	2199	Docosano	tr	—
29	2217	Palmitato de metilo	0,19 ± 0,057	0,59 ± 0,075
30	2235	Antranilato de metilo	0,10 ± 0,037	0,3 ± 0,12
31	2255	Palmitato de etilo	1,5 ± 0,55	0,54 ± 0,011

**Tabla 8.** (Continuación)

N	I <sub>R</sub>	Compuesto	Cantidad relativa, %	
			Absoluto	Fracción volátil
32	2281	Palmitoleato de etilo	tr	—
33	2300	Tricosano	0,6 ± 0,11	0,401 ± 0,0060
34	2309	δ-Decalactona	—	0,11 ± 0,080
35	2317	(9Z)-Tricoseno	tr	—
36	2325	(9E)-Tricoseno	tr	—
37	2335	Jasmonato de metilo	tr	—
38	2341	Eugenol	tr	—
39	2352	Farnesol	0,11 ± 0,041	—
40	2358	Heptadecanoato de etilo	tr	—
41	2380	6-(Pent-2'-enil)-tetrahidropiran-2-ona	—	0,25 ± 0,040
42	2382	4-Vinilfenol	tr	—
43	2400	Tetracosano	0,11 ± 0,039	—
44	2415	2,4-bis-(1,1-Dimetiletil)-fenol	—	0,62 ± 0,087
45	2434	Oleato de metilo	tr	—
46	2459	Estearato de etilo	0,47 ± 0,026	—
47	2480	Oleato de etilo	0,39 ± 0,020	—
48	2488	(9E)-Octadecenoato de etilo	tr	—
49	2494	Linoleato de metilo	0,32 ± 0,056	1,3 ± 0,16
50	2500	Pentacosano	1,2 ± 0,18	1,11 ± 0,015
51	—	Cumarano	—	0,56 ± 0,064
52	—	(12Z)-Pentacoseno	tr	—
53	—	Linoleato de etilo	2,5 ± 0,68	2,03 ± 0,027
54	—	Linolenato de metilo	0,36 ± 0,072	1,70 ± 0,021
55	—	NI	—	0,12 ± 0,028
56	—	Linolenato de etilo	2,2 ± 0,84	1,44 ± 0,019
57	—	NI	—	0,16 ± 0,025
58	—	Fitol	tr	0,194 ± 0,0070
59	—	Benzoato de bencilo	0,9 ± 0,11	1,29 ± 0,017
60	—	Araquidato de etilo	0,39 ± 0,031	—
61	—	Ácido mirístico	0,19 ± 0,033	0,45 ± 0,063
62	—	Heptacosano	0,4 ± 0,10	0,270 ± 0,0090
63	—	(Z)-Heptacoseno	0,38 ± 0,069	0,482 ± 0,0090
64	—	(E)-Heptacoseno	1,0 ± 0,27	1,00 ± 0,022

**Tabla 8.** (Continuación)

N	I <sub>R</sub>	Compuesto	Cantidad relativa, %	
			Absoluto	Fracción volátil
65	—	Behenato de etilo	1,0 ± 0,80	—
66	—	Ácido palmítico	27 ± 1,4	—
67	—	(Z)-Nonacoseno	3,0 ± 0,6	—
68	—	(E)-Nonacoseno	2,0 ± 0,1	—
69	—	Ácido heptadecanoico	0,11 ± 0,017	—
70	—	Lignocerato de etilo	0,4 ± 0,11	—
71	—	Ácido esteárico	2,7 ± 0,98	0,64 ± 0,065
72	—	Ácido oleico	4,9 ± 0,14	10,5 ± 0,68
73	—	Ácido linoléico	43 ± 9,2	67 ± 3,2

\*tr: trazas. NI: no identificado. —: no detectado.  $x \pm s$ ; n = 3. I<sub>R</sub> obtenido en columna polar.

Fuente: datos experimentales obtenidos por el autor.

**6.3.2. Propiedades organolépticas del absoluto de *Polianthes tuberosa*.** El producto final es, como se describe en la literatura y por casas comerciales, un líquido viscoso de color ámbar (naranja amarillento) de olor floral-frutal. Se pidió a voluntarios ajenos a la investigación que enunciaran su percepción olfativa del producto final y ellos comentaron que el aroma era dulce (generalmente, describiéndolo a través de una fruta), muy penetrante y con cierto olor final pesado y resinoso.

La composición del absoluto explica la percepción olfativa. La presencia de ésteres, alcoholes y terpenos con aroma floral-frutal (4-vinilfenol, jasmonato de metilo, eugenol, antranilato de metilo, etc.) es la primera impresión que se recibe. Después, y enmascarado por los olores principales, se hace posible descubrir el *off-flavor* producido por los ácidos grasos e hidrocarburos, que agregan la nota pesada y resinosa al aroma. En las flores, como revela el análisis HS-SPME, es posible detectar sustancias más volátiles y delicadas (como el 1,8-Cineol o el  $\alpha$ -

Terpineol), que son las que dan el toque sutil a la fragancia de la flor de nardo, y que no se hace presente en su absoluto.

Podría parecer que, en controversia, el aroma debería ser resinoso y levemente floral, pues los ácidos grasos componen cerca del 70% del absoluto; pero los olores funcionan de forma diferente: están determinados por la sensibilidad de la nariz a las sustancias percibidas (que pueden estar hasta en ppb), y no por la cantidad de éstas. Así pues, una sustancia en concentraciones inferiores al componente mayoritario puede predominar sobre éste en la percepción olfativa. En el **Anexo F** se ofrece mayor información sobre las notas de los compuestos más sobresalientes en el extracto.

**6.3.3. Comparación entre la composición de absolutos de *Polianthes tuberosa*.** En la literatura también se describen extractos de *Polianthes tuberosa*, obtenidos por diversos métodos de preparación de muestra tales como destilación con vapor, extracción asistida por ultrasonido y SFE. Revercheron y Della Porta [58] publicaron en 1997 la composición de un absoluto de *Polianthes tuberosa* obtenido usando extracción con solvente, cuya composición se muestra en la **Tabla 9**. Se agregó la tercera columna para mostrar la cantidad relativa de los compuestos que también se encuentran en el absoluto obtenido durante esta investigación.

**Tabla 9.** Comparación de las composiciones químicas del absoluto obtenido en el presente trabajo y descrito en la literatura.

Compuesto	Cantidad relativa, %	
	Literatura	Presente trabajo
Octen-1-eno	0,38	—
<i>n</i> -Octano	0,25	—
$\alpha$ -Pino	0,14	—
1,8-Cineol	7,94	tr
Benzoato de metilo	8,98	tr
2-Metilbenzonitrilo	0,55	—
Acetato de bencilo	0,21	—
$\alpha$ -Terpineol	0,7	tr
Salicilato de metilo	4,92	—
Benzoato de etilo	0,42	0,12
Fenilbutilacetato	1,43	—
Antranilato de metilo	—	0,10
Eugenol	1,08	tr
$\alpha$ -Bourboneno	0,2	—
Metileugenol	2	tr
Cariofileno	0,23	—
$\alpha$ -Gurjuneno	0,11	—
<i>cis</i> -Isoeugenol	6,02	—
<i>cis</i> -Metiliseoeugenol	0,06	—
<i>cis</i> - $\alpha$ -Farneseno	0,17	—
Valenceno	5,26	—
Nepetalactona	6,58	—
Dehidronepetalactona	1,1	—
<i>trans</i> -Metiliseoeugenol	31,55	0,24
$\alpha$ -Farneseno	2,94	—

**Tabla 9.** (Continuación)

Compuesto	Cantidad relativa, %	
	Literatura	Presente trabajo
Acetato de eugenilo	12,97	—
Benzoato de bencilo	1,44	0,9
<i>n</i> -Nonadecano	0,13	—
<i>n</i> -Eicosano	0,16	—
<i>n</i> -Heneicosano	0,3	tr
<i>n</i> -Pentacosano	1,8	1,2

\*tr: trazas. —: no detectado.

Fuente: REVERCHON, E.; DELLA PORTA, G. Tuberose Concrete fractionation by supercritical carbon dioxide. En: J. Agric. Food Chem., 1997, vol. 45, p. 1356-1360.

Como es posible apreciar, los absolutos difieren notablemente en composición “compartiendo” unos pocos compuestos. Estas diferencias pueden deberse a que en el estudio se usó concreto comercial de *Polianthes tuberosa* como material de partida. El procedimiento para la obtención del absoluto también difiere notablemente del descrito en esta investigación, cuyo fin era evaluar un procedimiento sencillo y económico que pudiese ser aplicado a la industria.

## 7. CONCLUSIONES

El procedimiento de obtención de absolutos de *Polianthes tuberosa* propuesto en este estudio pudo adecuarse respecto a los factores estudiados para obtener absoluto con el mayor rendimiento posible (0.19%) dentro del rango de valores trabajado (70 a 170 h; 0.5 a 1.1 relación solvente/flor). La hipótesis planteada resultó ser cierta.

El mayor cociente de extracción (rendimiento de absoluto) de *Polianthes tuberosa* usando la metodología presente en este trabajo se obtuvo con una relación de solvente/flor de 1.1 g/g durante 140 horas de extracción. La reproducibilidad intermedia del proceso puede ser hasta del 95%.

Un modelo matemático de tercer orden fue necesario para describir, explicar y predecir el comportamiento del rendimiento de absoluto (coeficiente de extracción) respecto al tiempo (en horas) y la relación solvente/flor (relación peso a peso), ya que los factores interactúan según un modelo de este tipo. El modelo se aplicó para el rango de las variables trabajado y para el material vegetal estudiado. Las predicciones realizadas con este modelo tienen un error asociado mínimo del 2%.

El producto final obtenido fue un extracto a partir de las flores de *Polianthes tuberosa*. Ésta es una mezcla compleja de por lo menos 73 componentes. El absoluto se compone en mayor proporción ( $\geq 70\%$ ) por ácidos grasos. Sus componentes mayoritarios son el ácido linoleico (43%), el ácido palmítico (27%) y el ácido oleico (4.9%). El aroma resemblance la fragancia de la flor; sin embargo,

difiere notablemente en las sustancias más volátiles, e.g., 2,3-Dimetil-2-butanol, 2-Metil-2-pentanol y 3-metil-2-pentanol.

## 8. RECOMENDACIONES

El proceso de extracción descrito presenta ciertas falencias descubiertas a través del seguimiento de las sustancias involucradas. Sería ideal que estas deficiencias fuesen subsanadas a través de un estudio que encontrase la mejor forma de realizar la compresión de las flores y las concentraciones de los extractos conservando la mayor cantidad posible de solvente. Si se lograra, los costos disminuirían, el rendimiento y las ganancias aumentarían y el proceso se haría más fino y efectivo.

La literatura científica corrobora que existen más factores que los estudiados en este trabajo que afectan el proceso de extracción. El proceso total también cuenta con otras etapas que son susceptibles de optimizar, a saber, la extracción con etanol del concreto, la filtración, etc. Estudiar la influencia de otros factores y optimizar las demás etapas sería interesante y además aplicable a procedimientos similares en el futuro.

También existe conocimiento intuitivo sobre la flor que no se ha confirmado aún, como lo son el estadio de floración y la hora de cosecha. Estos factores ajenos al proceso de extracción afectan el resultado final, por ende deberían estudiarse para mejorar la calidad del absoluto y ampliar simultáneamente el conocimiento científico sobre la *Polianthes tuberosa*.

Finalmente, el absoluto obtenido es rico en ácidos grasos esenciales, especialmente en ácido linoleico (Omega 6), su componente mayoritario (43%).

Sería interesante indagar su utilidad en la industria cosmética pues podría ser ingrediente activo y aromatizante de forma simultánea en productos tópicos.

## 9. DIVULGACIÓN

Resultados parciales de este trabajo se presentaron en modalidad de póster bajo el nombre “Estudio por GC-MS de los compuestos volátiles presentes en absolutos y extractos (HS-SPME) de flores de *Polianthes tuberosa*” en el XXIX CONGRESO LATINOAMERICANO DE QUÍMICA, llevado a cabo del 27 de septiembre al 1 de octubre en Cartagena de Indias, Colombia (véase **Anexo G**).

## BIBLIOGRAFÍA

[1] KIYOSAKI, Robert. Diferentes cuadrantes... diferentes personas. En: El cuadrante del flujo de dinero. Argentina: Time & Money Network Editions, 2003. p. 31-33.

[2] BIOCOMERCIO SOSTENIBLE. 2003. Estudio del mercado colombiano de aceites esenciales. Instituto de investigación de recursos biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá D.C., Colombia. 109 PP. p. 44, 58

[3] ROMERO M., CABRERA E. Ortiz N. 2008. Informe sobre el estado de la biodiversidad en Colombia 2006-2007. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá D.C., Colombia. 181 PP. p. 35.

[4] INFORMACIÓN ECONÓMICA. BASE DE DATOS – SECTOR REAL. PIB grandes ramas de actividad económica a precios constantes de 1994. Trimestral desde 1994 (Millones de pesos). Banco de la república de Colombia. Bogotá D.C., Colombia.

[5] BIOCOMERCIO SOSTENIBLE, *Op. cit.*, p. 73

[6] SOLANO, E.; FERIA, T. Ecological niche modeling and geographic distribution of the genus *Polianthes L. (Agavaceae)* in Mexico: using niche modeling to

improve assessments of risk status. En: Biodiversity Conservation. 2007, vol. 16, p. 1885-1900.

[7] UNIVERSITY OF CONNECTICUT. College of liberal arts and sciences. Ecology and evolutionary biology plant growth facilities. *Polianthes tuberosa* L.[En linea] Estados Unidos: University of Connecticut, 2009. < <http://florawww.eeb.uconn.edu/200800002.html> >.[Consulta: 28 de agosto de 2009].

[8] TRUEBLOOD, E. "Omixochitl" the Tuberose (*Polianthes tuberosa*) En: Economic Botany. 1973, vol. 27, p. 157-173.

[9] CHANG, Shuo-Tsang; CHEN, Wen-Shaw; HSU, Ching-Yi; YU, Hsiao-Ching; DU, Bo-Shiun; HUANG, Kuang-Liang. Changes in cytokinin activities before, during and after floral initiation in *Polianthes tuberosa*. En: Plant Physiol. Biochem., 1999, vol. 37 N° 9, p. 679-684.

[10] SU, Wei-Ren; HUANG, Kuang-Liang; SHEN, Rong-Show; CHEN, Wen-Shaw. Abscisic acid affects floral initiation in *Polianthes tuberosa*. En: J. Plant Physiol., 2002, vol. 159, p. 557-559.

[11] HUANG, Chiung-Kuei; CHANG, Bao-Su. Changes in polyamine pattern are involved in floral initiation and development in *Polianthes tuberosa*. En: J. Plant Physiol., 2004, vol. 161 N° 6, p. 709-713.

[12] NAGAR, P. K. Changes in abscisic acid, phenols and indoleacetic acid in bulbs of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) during dormancy and sprouting. En: Scientia Horticulturae. 1995, vol. 63, p. 77-82.

[13] SOOD, Shweta; NAGAR, P. K. Alterations in endogenous polyamines in bulbs of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) during dormancy. En: Scientia Horticulturae (Amsterdam, Netherlands). 2005, vol. 105 N° 4, p. 483-490.

[14] HUANG, Kuang-Liang; MIYAJIMA, Ikuo; OKUBO, Hiroshi. Effects of temperature and shade treatment on flower colors and characteristics in newly established reddish-purple tuberose (*Polianthes*). En: Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University. 2000, vol. 45 N° 1, p. 57-63.

[15] MIMAKI, Yoshihiro. [et al.] Spirostanol Pentaglycosides from the Underground Parts of *Polianthes tuberosa*. En: Journal of Natural Products. 2002, vol. 65 N° 10, p. 1424-1428.

[16] FIRDOUS, S.; KHAN, K. M.; AHMAD V. U. A new glycoside from *Polianthes tuberosa*. En: Fitoterapia. 1999, vol. 70, p. 203-204.

[17] JIN, Jian-Ming; ZHANG, Ying-Jun; YANG, Chong-Ren. Spirostanol and Furostanol Glycosides from the Fresh Tubers of *Polianthes tuberosa*. En: Journal of Natural Products. 2004, vol. 67 N° 1, p. 5-9.

[18] REVERCHON, E.; DELLA PORTA, G. Tuberoso Concrete Fractionation by Supercritical Carbon Dioxide. En: J. Agric. Food Chem., 1997, vol. 45, p. 1356-1360.

[19] SHUKLA, S.; SINGH, V. K.; SINGH, D. K. The effect of single, binary, and tertiary combination of few plant derived molluscicides alone or in combination with synergist on different enzymes in the nervous tissues of the freshwater snail *Lymnaea (Radix) acuminata* (Lamarck). En: Pesticide Biochemistry and Physiology. 2006, vol. 85 N° 3, p. 167-173.

[20] TSHIKALANGE, T. E. In vitro anti-HIV-1 properties of ethnobotanically selected South African plants used in the treatment of sexually transmitted diseases. En: Journal of Ethnopharmacology. 2008, vol. 119 N° 3, p. 478-481.

[21] STERRETT, Frances S. The nature of essential oils: I. Production. En: Journal of Chemical Education. 1962, vol. 39 N° 4, p. 203-206.

[22] ROLDÁN-GUTIÉRREZ, Jannat M.; RUÍZ-JIMÉNEZ, J.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Ultrasound-assisted dynamic extraction of valuable compounds from aromatic plants and flowers as compared with steam distillation and superheated liquid extraction. En: Talanta. 2008, vol. 75 N° 5, p. 1369-1375.

[23] MATICH, Adam J.; YOUNG, Harry; ALLEN, Jhon M. *Actinidia arguta*: volatile compounds in fruit and flowers. En: Phytochemistry. 2003, vol. 63, p. 285-301.

[24] PERRIOT, Rodolphe; KATHARINA, Breme; MEIERHENRICH, Uwe, J. Chemical Composition of French Mimosa Absolute Oil. En: J. Agric. Food Chem., 2010, vol. 58 no. 3, p. 1844-1849.

[25] PALÁ-PAUL, J.; BROPHY, J. J.; GOLDSACK, R. J.; FONTANIELLA, B. Analysis of the volatile components of *Lavandula canariensis* (L.) Mill., a Canary Islands endemic species, growing in Australia. En: Biochemical Systematics and Ecology. 2004, vol. 32, p. 55-62.

[26] KURKCUOGLU, M.; BASER, K. H. C., Studies on turkish rose concrete, absolute, and hydrosol. En: Chemistry of Natural Compounds. 2003, vol. 39 N° 5, p. 457-464.

[27] MONSÁLVEZ, Manuel [*et al.*] Antifungal effects of n-hexane extract and essential oil of *Drimys winteri* bark against Take-All disease. En: Industrial Crops and Products. 2010, vol. 31, p. 239-244.

[28] GOMES, Paula B.; MATA, Vera G.; RODRIGUES, Alírio E. Production of rose geranium oil using supercritical fluid extraction. En: J. of Supercritical Fluids. 2007, vol. 41, p. 50-60.

[29] FLAMINI, Guido; CIONI, Pier L.; MORELLI, Ivano, Use of solid-phase micro-extraction as a sampling technique in the determination of volatiles emitted by

flowers, isolated flower parts and pollen. En: J. Chromatogr. A., 2003, vol. 998, p. 229-233.

[30] PINO, P. Guedes de; GONÇALVES, Rui F.; VALENTÃO, Patrícia. Volatile composition of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don using solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. En: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2009, vol. 49, p. 674-685.

[31] LI, Zu-Guang Li; LEE, Maw-Rong, SHEN, De-Long. Analysis of volatile compounds emitted from fresh *Syringa oblata* flowers in different florescence by headspace solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. En: Analytica Chimica Acta. 2006, vol. 576, p. 43-49.

[32] LEVEY, M. Perfumery in Ancient Babylonia. En: Journal of Chemical Education. 1954, vol. p. 373-375.

[33] FRÁTER, Georg; BAJGROWICZ, Jerzy A. y KRAFT, Philip. Fragrance Chemistry. En: Tetrahedron. Febrero , 1998, vol. 54, no. 456, p. 7633-7703.

[34] CSERHÁTI, Tibor. Chromatography of Aroma Substances and Fragrances. En: Chromatography of Aroma Compounds and Fragrances. Germany: Springer, 2010. p. 1-6.

[35] CASTELLAN, Gilbert W. Phase equilibria in simple systems. En: Physical Chemistry. Tercera edición. Massachusets: Addison- Wesley Publishing Company, 1983. p. 271.

[36] McQUARRIE, Donald A.; ROCK, Peter A. Separation of mixtures. En: General Chemistry. New York: W. H. Freeman and company, 1984. p. 114-121.

[37] CASTELLAN, Gilbert W. Equilibria between Condensed Phases. En: Physical Chemistry. Tercera edición. Massachusets: Addison- Wesley Publishing Company, 1983. P. 319-344.

[38] ALDERS, L. Phase equilibria. En: Liquid-liquid extraction; theory and laboratory practice. Segunda edición. Amsterdam: Elsevier Publishing Company, 1959. P. 4-30.

[39] FORTINEAU, Anne D. Chemistry perfumes your daily life. En: Journal of Chemical Education. 2004, vol. 81 N° 1, p. 45-50.

[40] FORTINEAU, Anne D. *Op. cit.*

[41] STERRETT, Frances S. *Op. cit.*

[42] SKOOG, Douglas A.; HOLLER, F. James; NIEMAN, Timothy A. Cromatografía y extracción con fluidos supercríticos. En: Principios de análisis instrumental. 5<sup>ta</sup> edición. Madrid: McGraw-Hill, 2001. p. 837-840.

[43] ROUESSAC, Francis; ROUESSAC, Annick. Sample preparation. En: Chemical Analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques. 2<sup>da</sup> edición. Inglaterra: John Wiley & Sons Ltd., 2007. p. 487-492.

[44] JENNINGS, Walter; MITTLEFEHL, Eric; STREMPLE, Philip. Introduction. En: Analytical Gas Chromatography. 2<sup>da</sup> edición. San Diego: Academic Press, 1997. p. 1-6.

[45] BRAITHWAITE, A.; SMITH, F. J. Introduction to chromatography. En: Chromatographic Methods. 5<sup>a</sup> edición. London: Kluwer Academic Publishers, 1999. p. 1-2.

[46] GROB, Robert L. Theory of gas chromatography. En: Modern Practice of Gas Chromatography. 3<sup>a</sup> edición. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1995. p. 51-53.

[47] ROUESSAC, Francis; ROUESSAC, Annick. Gas Chromatography. En: Chemical Analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques. 2<sup>da</sup> edición. Inglaterra: John Wiley & Sons Ltd., 2007. p. 54-57.

[48] HOFFMANN, Edmond de; STROOBANT, Vincent. Introduction. En: Mass Spectrometry Principles and Applications. 2<sup>da</sup> edición. New York: John Wiley & Sons Ltd., 2005. p. 1-9.

[49] McNAIR, Harold; MILLER, Special Topics. En: Basic Gas Chromatography. New York: John Wiley & Sons Ltd., 1998. p. 153-162.

[50] CARERI, M; MANGIA, A. Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analysis of Flavors and Fragrances. En: Current Practice of Gas Chromatography-Mass Spectrometry. New York: Marcel Dekker, Inc., 2001. p. 409-440.

[51] OTTO, Matthias. Optimization and experimental design. En: Chemometrics. Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry. Weinheim: Wiley-VCH, 1999. 314 p.

[52] MILLER, James; MILLER, Jane. Diseño de experimentos y optimización. En: Estadística y quimiometría para química analítica. 2<sup>da</sup> edición. Madrid: Prentice Hall, 2004. p. 208-216.

[53] KUEHL, Robert O. Diseños con superficie de respuesta. En: Diseño de Experimentos. España: Thomson Learning, 2001. p. 423-444.

[54] GEMPERLINE, Paul. Calibration. En: Practical guide to chemometrics. 2<sup>da</sup> edición. Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC, 2006. p. 114-116.

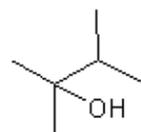
[55] *Ibid.*, p. 8-32.

[56] REVERCHON, E.; DELLA PORTA, G. *Op. cit.*

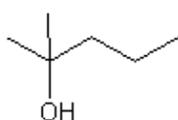
[57] ROLDÁN-GUTIÉRREZ, Jannat M.; RUÍZ-JIMÉNEZ, J.; LUQUE DE CASTRO, M. D. *Op. cit.*

[58] REVERCHON, E.; DELLA PORTA, G. *Op. cit.*

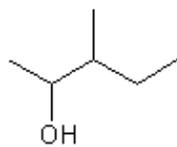
**ANEXO A. Metabolitos secundarios volátiles en la *Polianthes tuberosa*.**



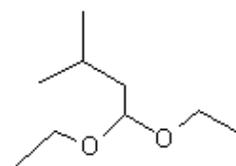
**1**  
2,3-Dimetil-2-butanol



**2**  
2-Metil-2-pentanol



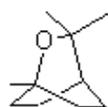
**3**  
3-Metil-2-pentanol



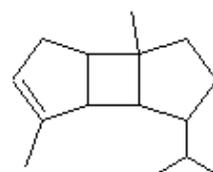
**4**  
1,1-Dietoxi-3-metilbutano



**5**  
Limoneno



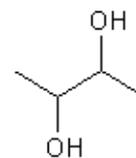
**6**  
1,8-Cineol, Eucaliptol



**9**  
 $\alpha$ -Bourboneno



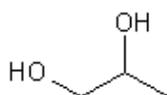
**7**  
Tridecanol



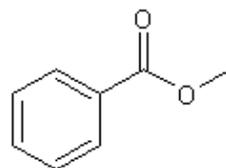
**10**  
2,3-Butanodiol



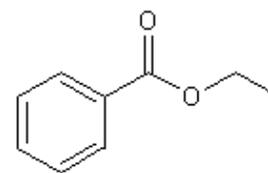
**8**  
Pentadecanol



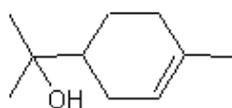
**11**  
1,2-Propanodiol



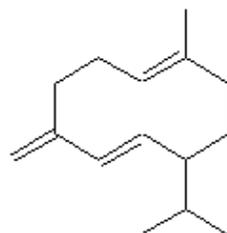
**12**  
Benzoato de metilo



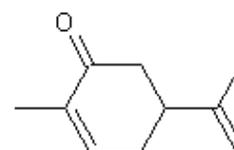
**13**  
Benzoato de etilo



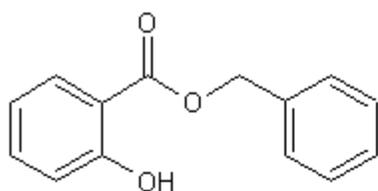
**14**  
 $\alpha$ -Terpineol



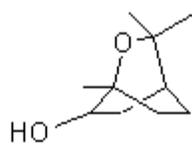
**15**  
Germacreno-D



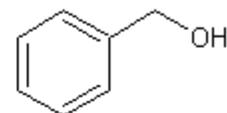
**16**  
Carvona



**17**  
Salicilato de bencilo



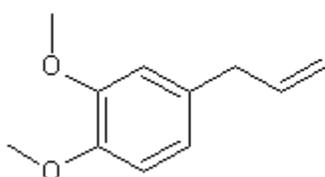
**19**  
Exo-2-hidroxi-1,8-cineol



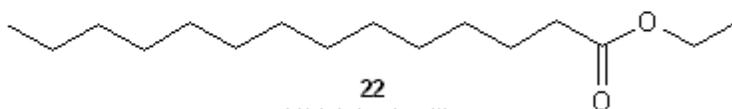
**20**  
Alcohol bencílico



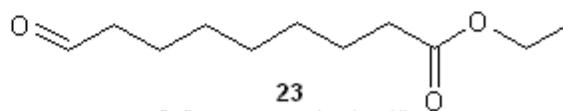
**18**  
Octadecanol



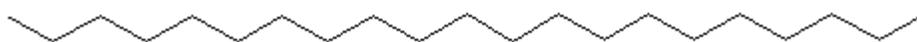
**21**  
Metil eugenol



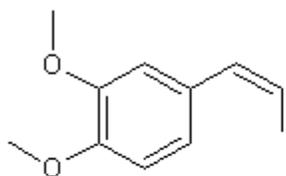
**22**  
Miristato de etilo



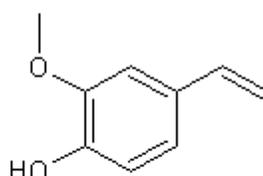
**23**  
9-Oxononanoato de etilo



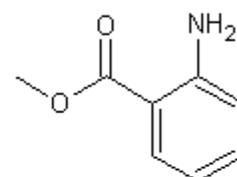
**24**  
Eneicosano



**26**  
Metil isoeugenol



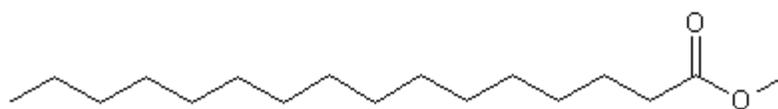
**27**  
2-Metoxi-4-vinilfenol



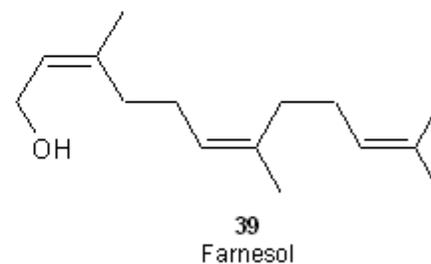
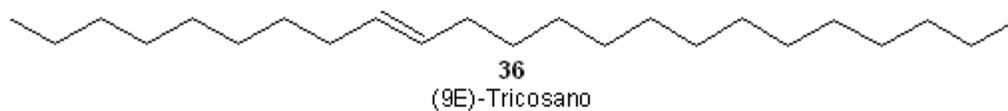
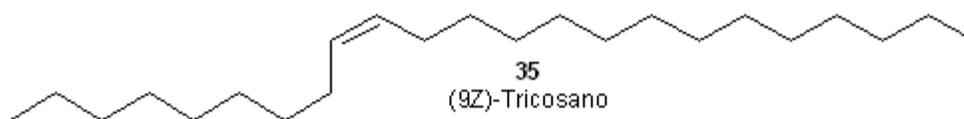
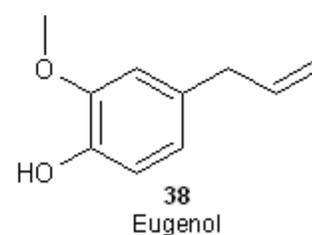
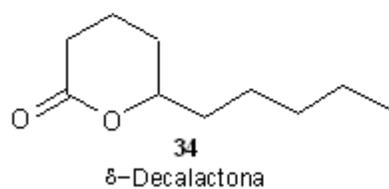
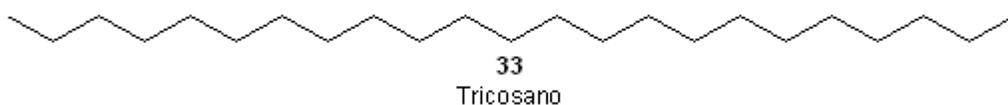
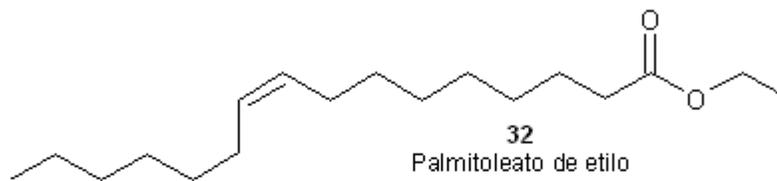
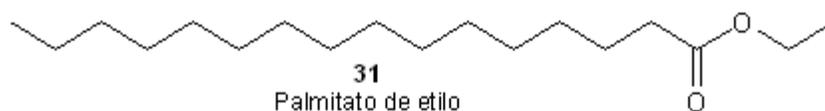
**30**  
Antranilato de metilo

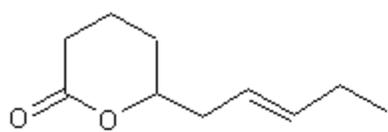


**28**  
Docosano

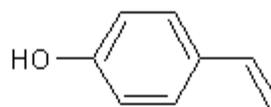


**29**  
Palmitato de metilo

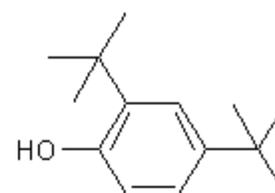




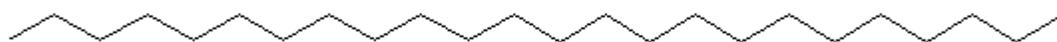
6-(Pent-2-enil)-tetrahidropiran-2-ona



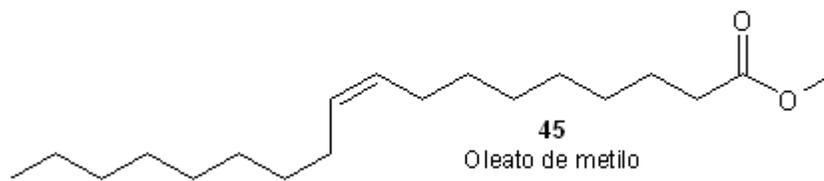
4-Vinilfenol



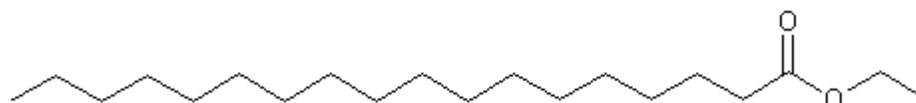
2,4-bis-(1,1-Dimetiletil)-fenol



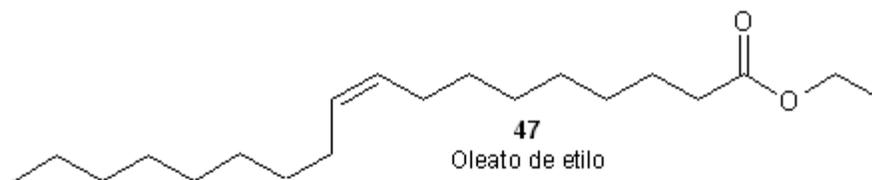
43  
Tetracosano



Oleato de metilo



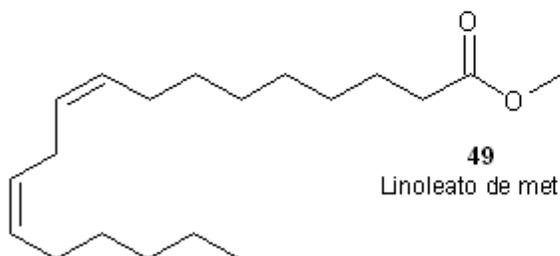
Estearato de etilo



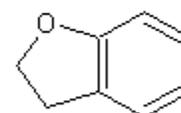
Oleato de etilo



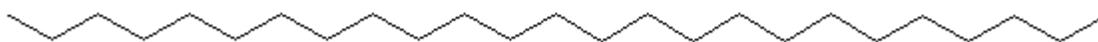
(9E)-Octadecenoato de etilo



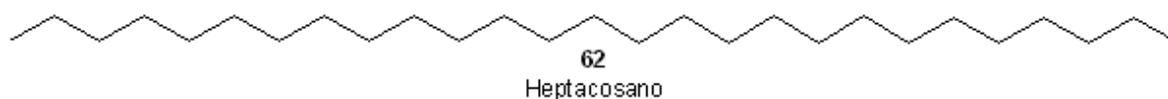
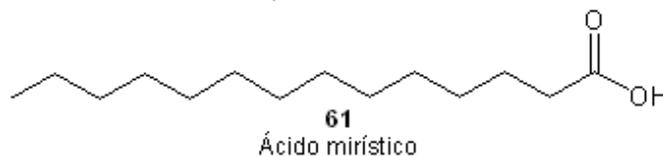
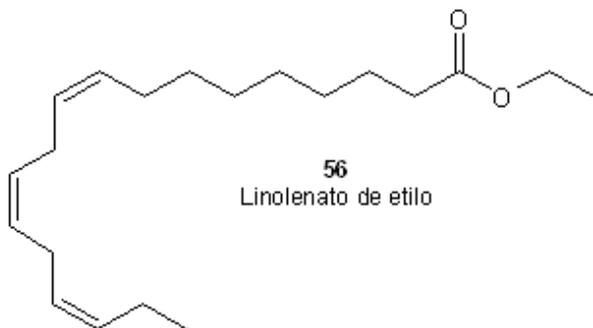
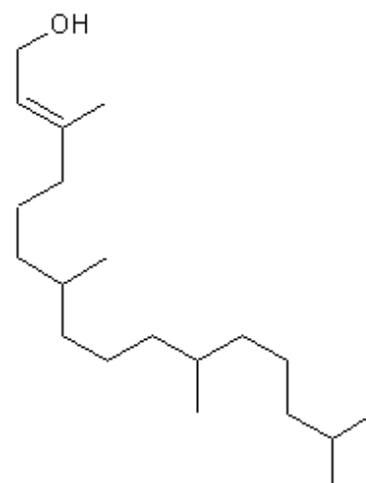
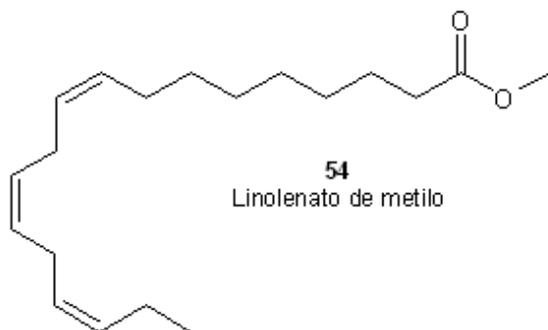
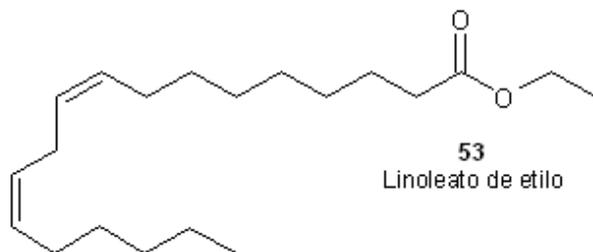
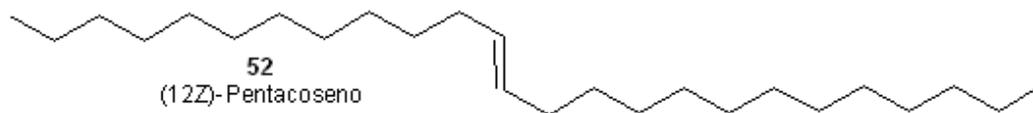
Linoleato de metilo

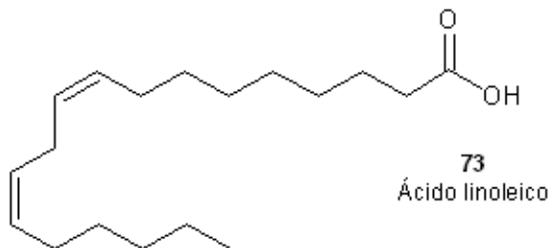
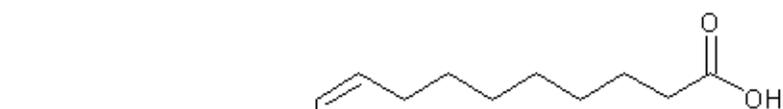
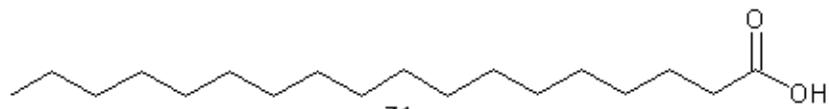
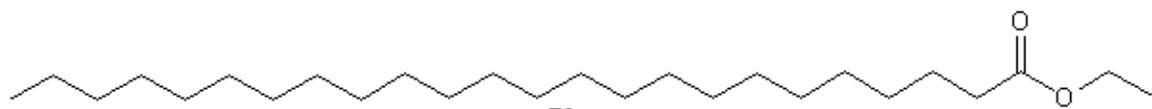
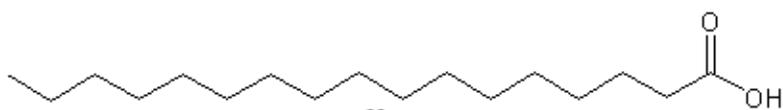
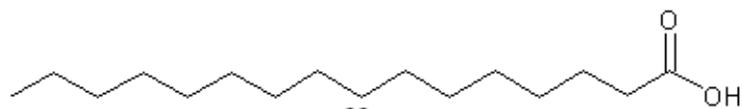
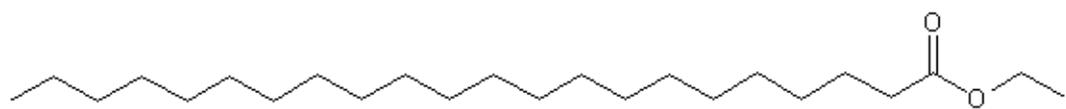


51  
Cumarano



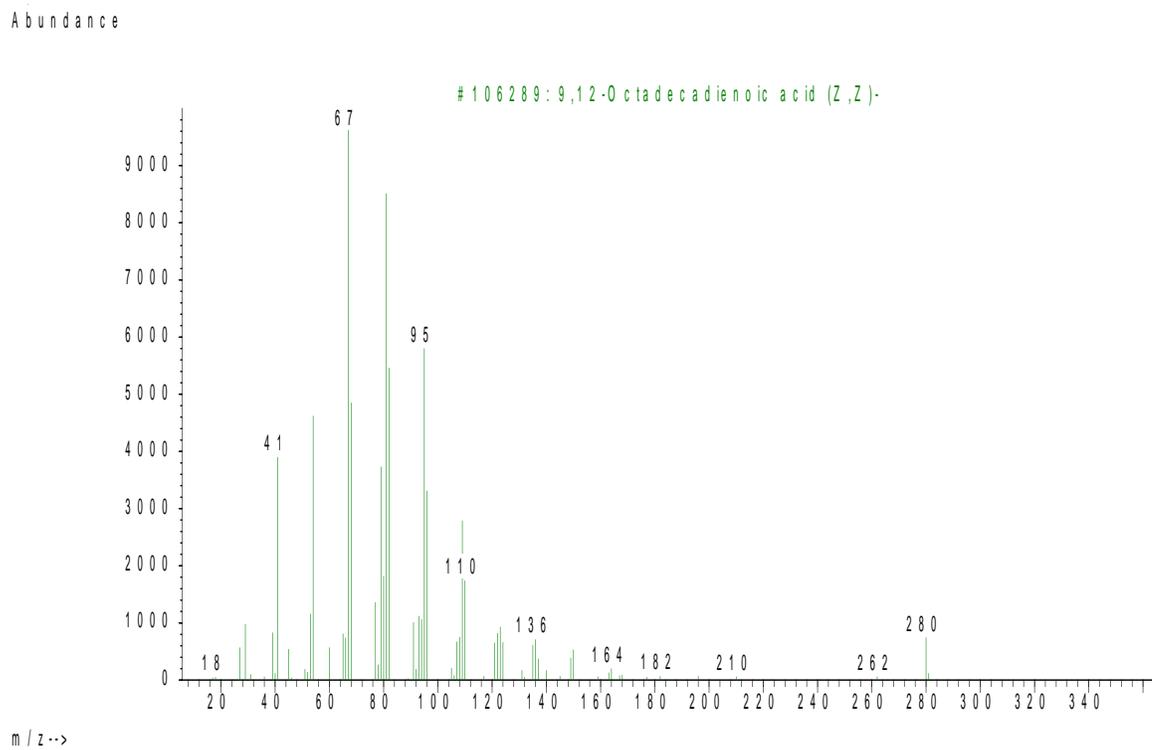
50  
Pentacosano

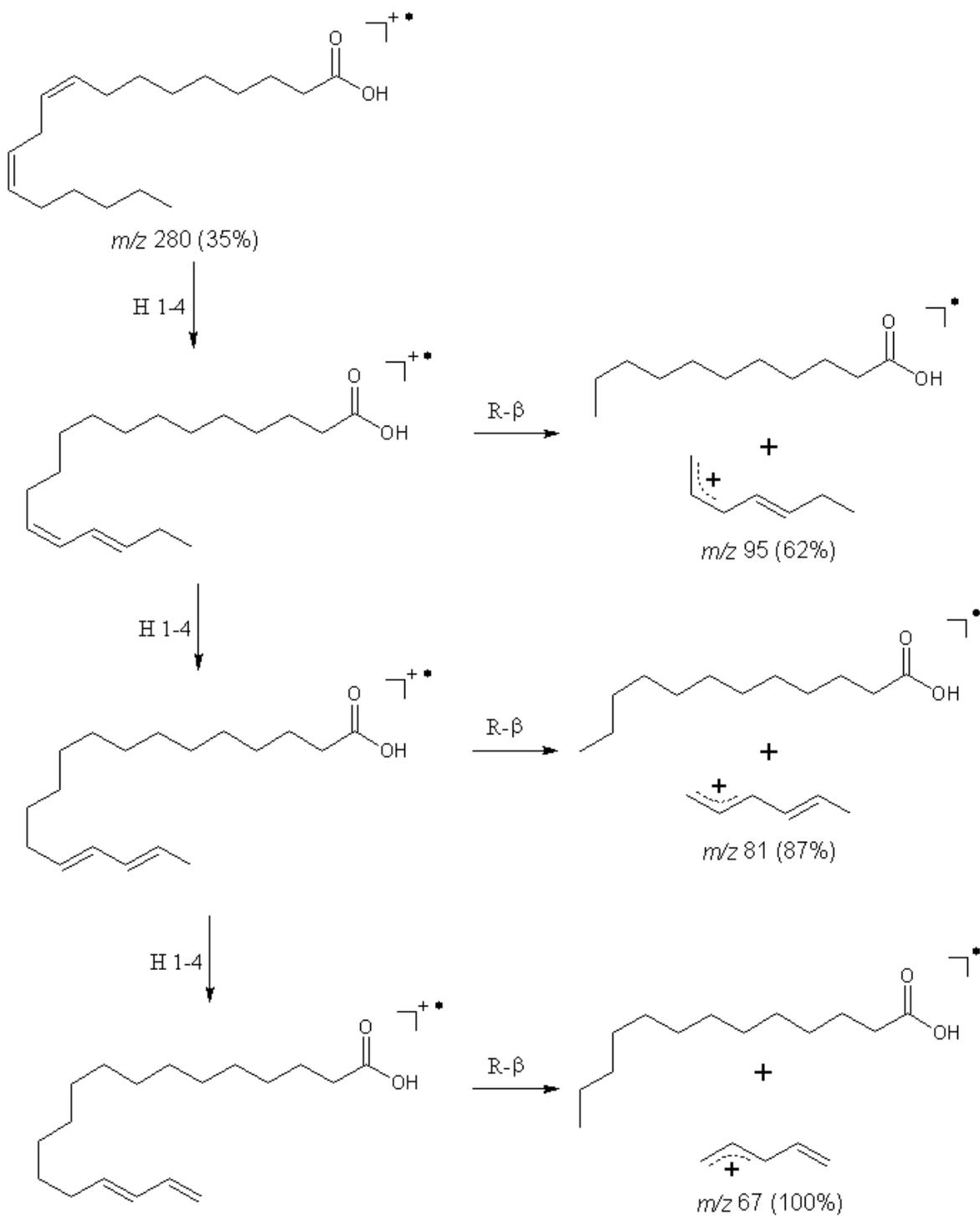




Fuente: moléculas dibujadas por el autor usando ACD/ChemSketch versión libre 12.01.

## ANEXO B. Espectro de masas y ruta de fragmentación del ácido linoleico.

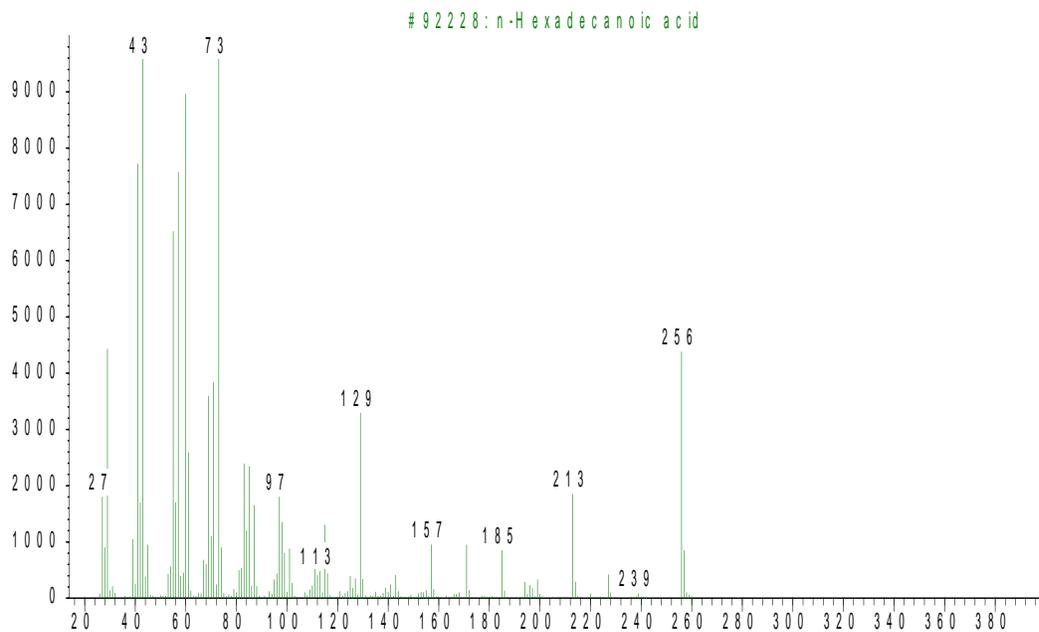




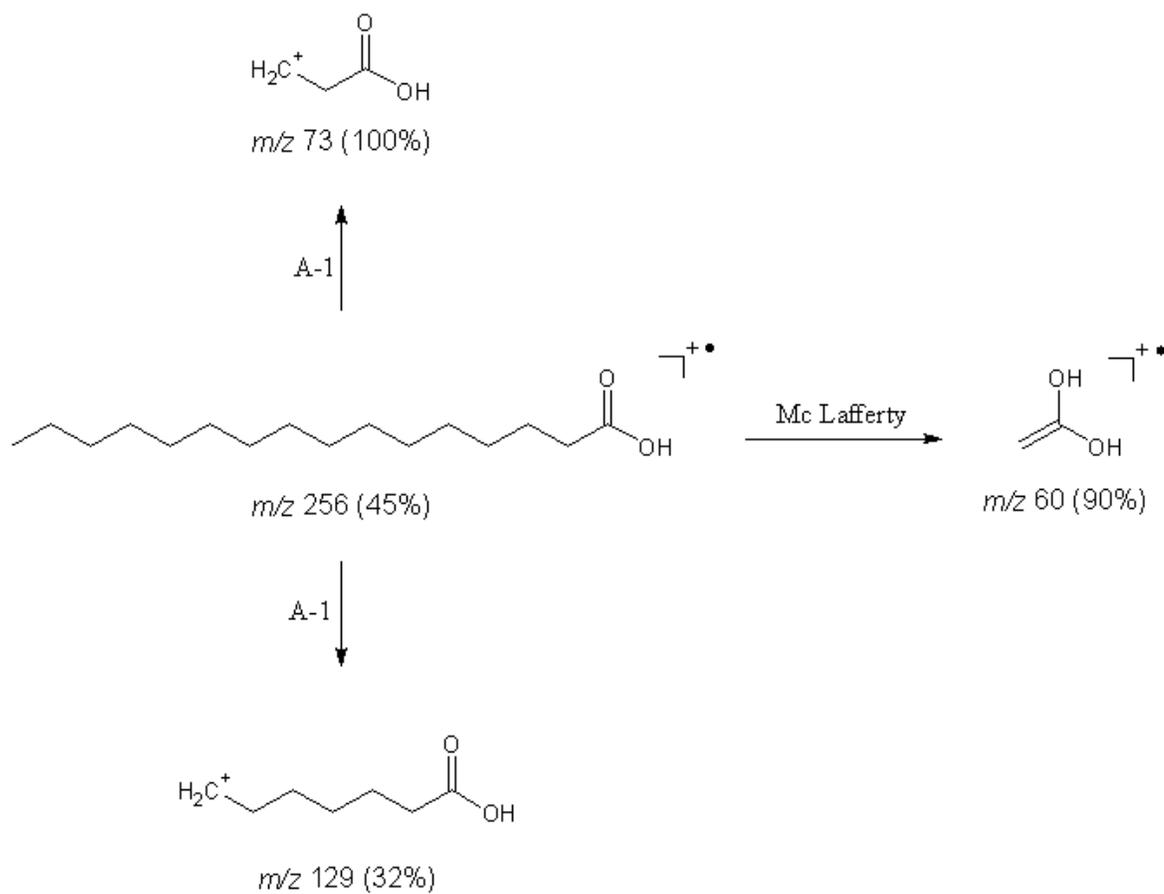
Fuente: espectro obtenido y ruta de fragmentación propuesta por el autor.

## ANEXO C. Espectro de masas y ruta de fragmentación del ácido palmítico.

Abundance

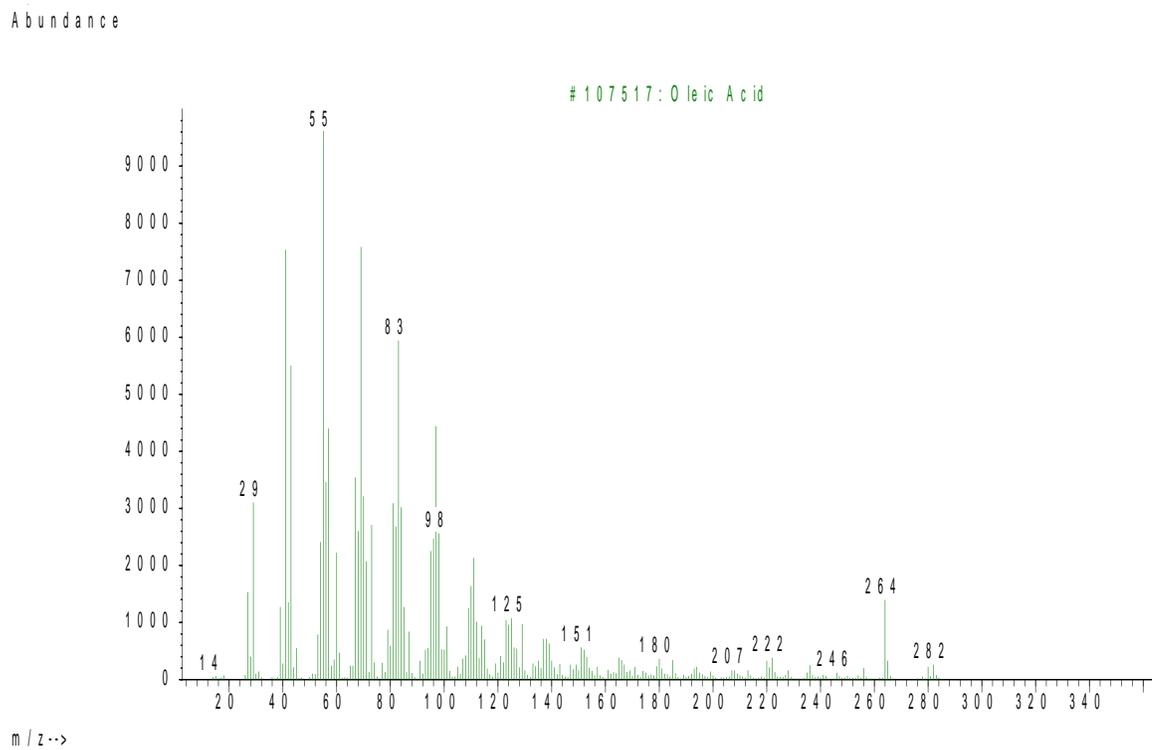


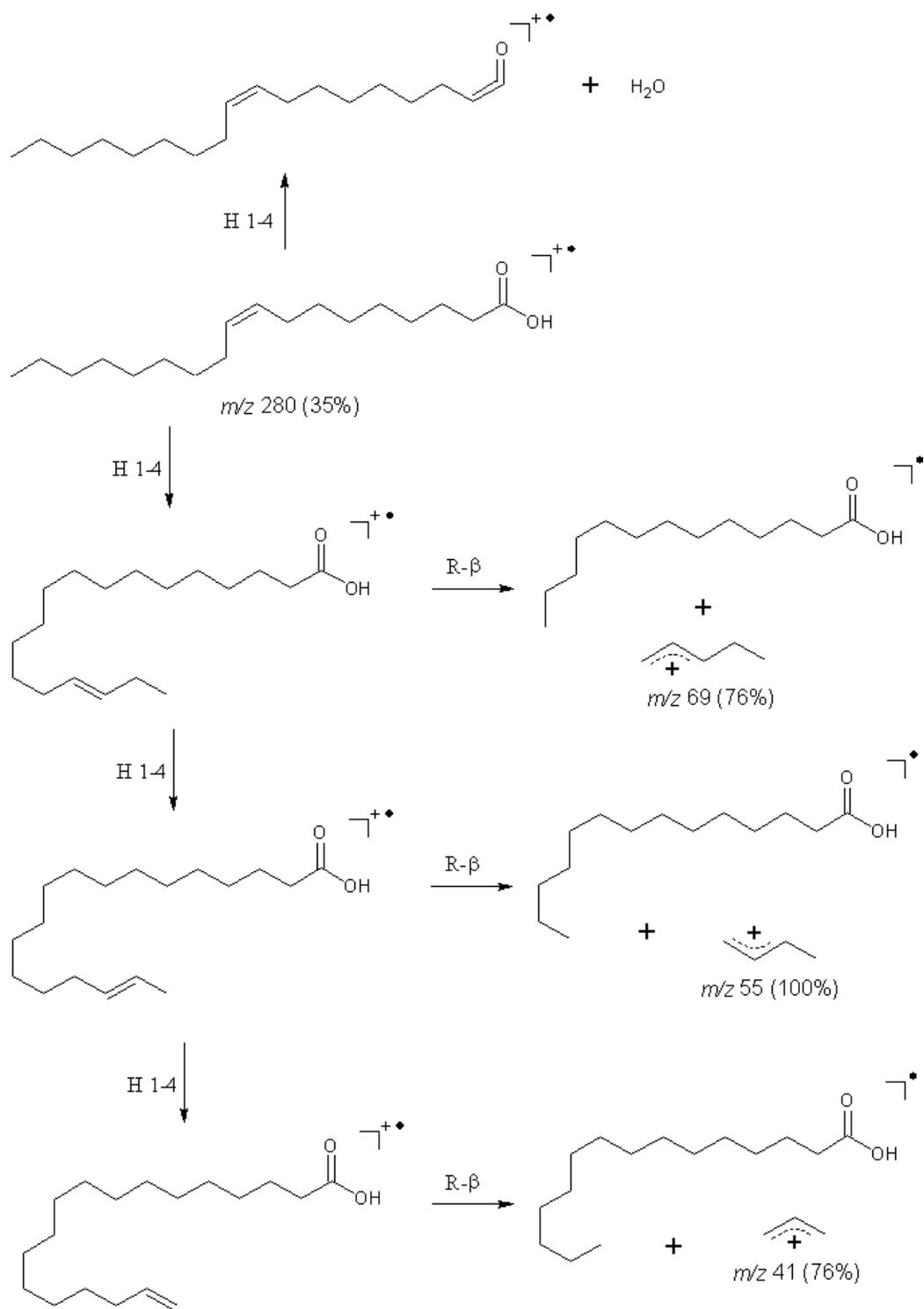
m/z-->



Fuente: espectro obtenido y ruta de fragmentación propuesta por el autor.

## ANEXO D. Espectro de masas y ruta de fragmentación del ácido oleico.

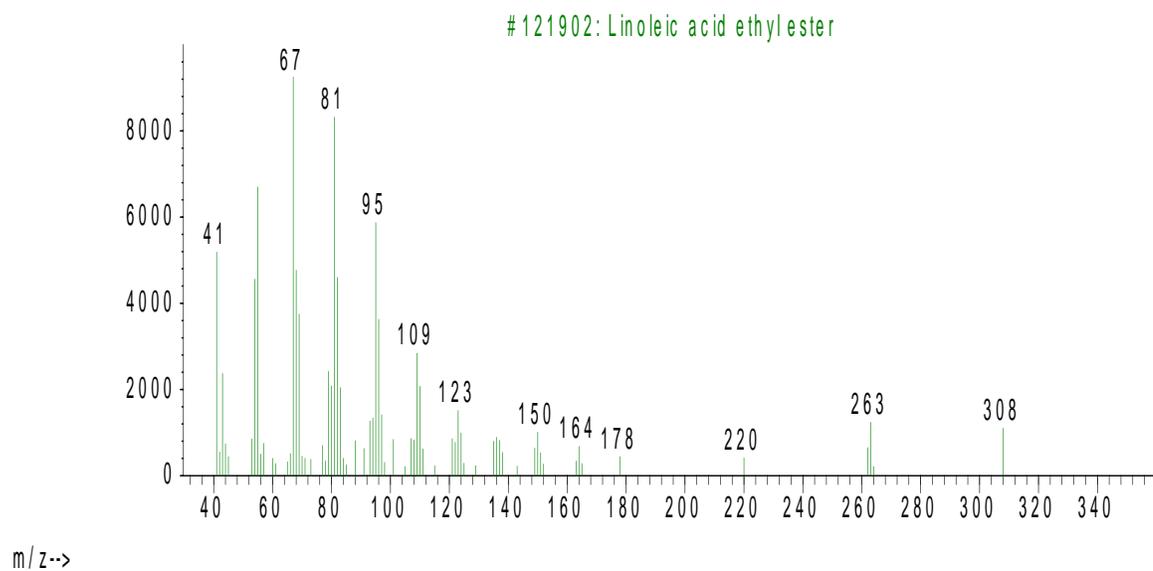


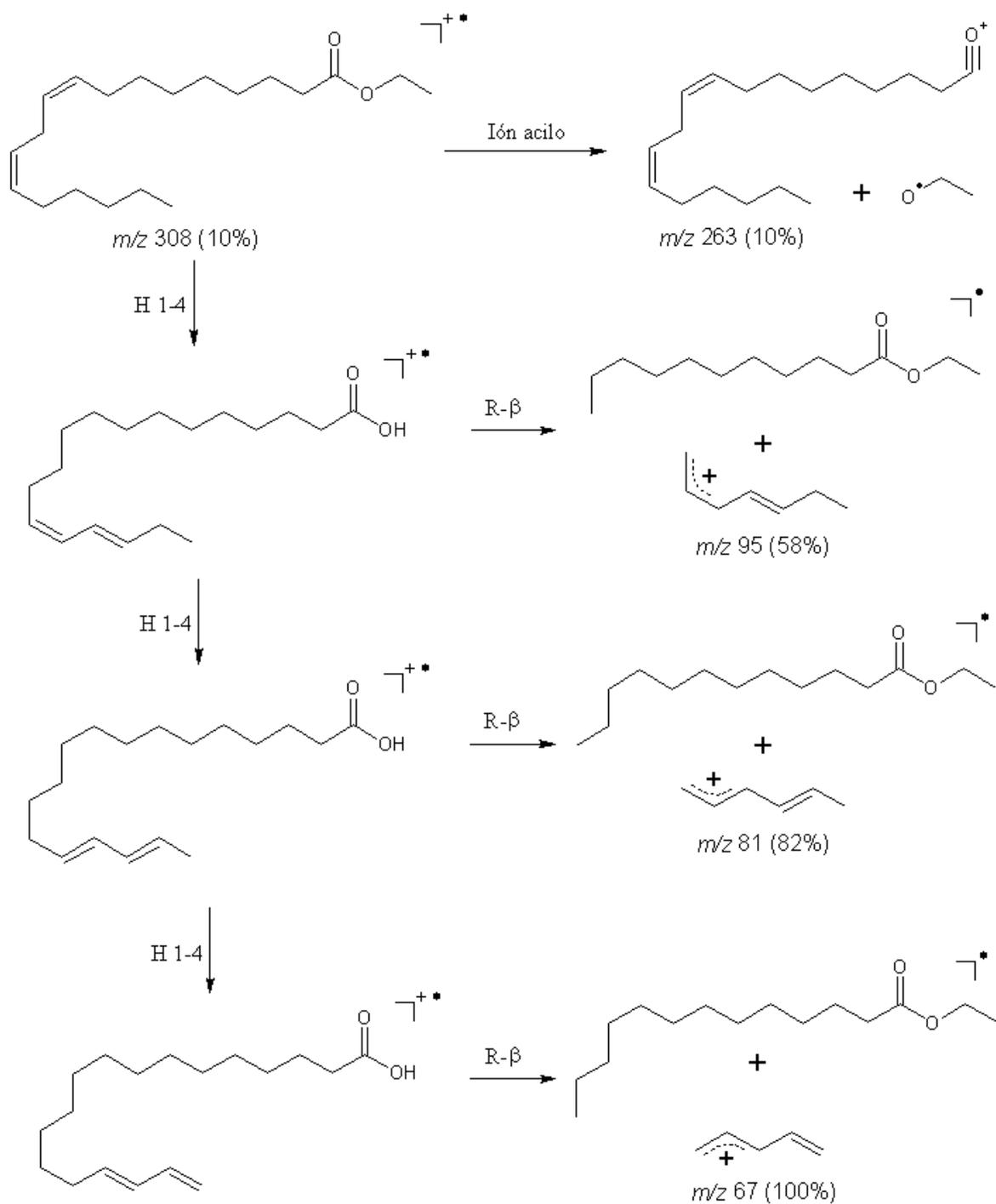


Fuente: espectro obtenido y ruta de fragmentación propuesta por el autor.

## ANEXO E. Espectro de masas y ruta de fragmentación del linoleato de etilo.

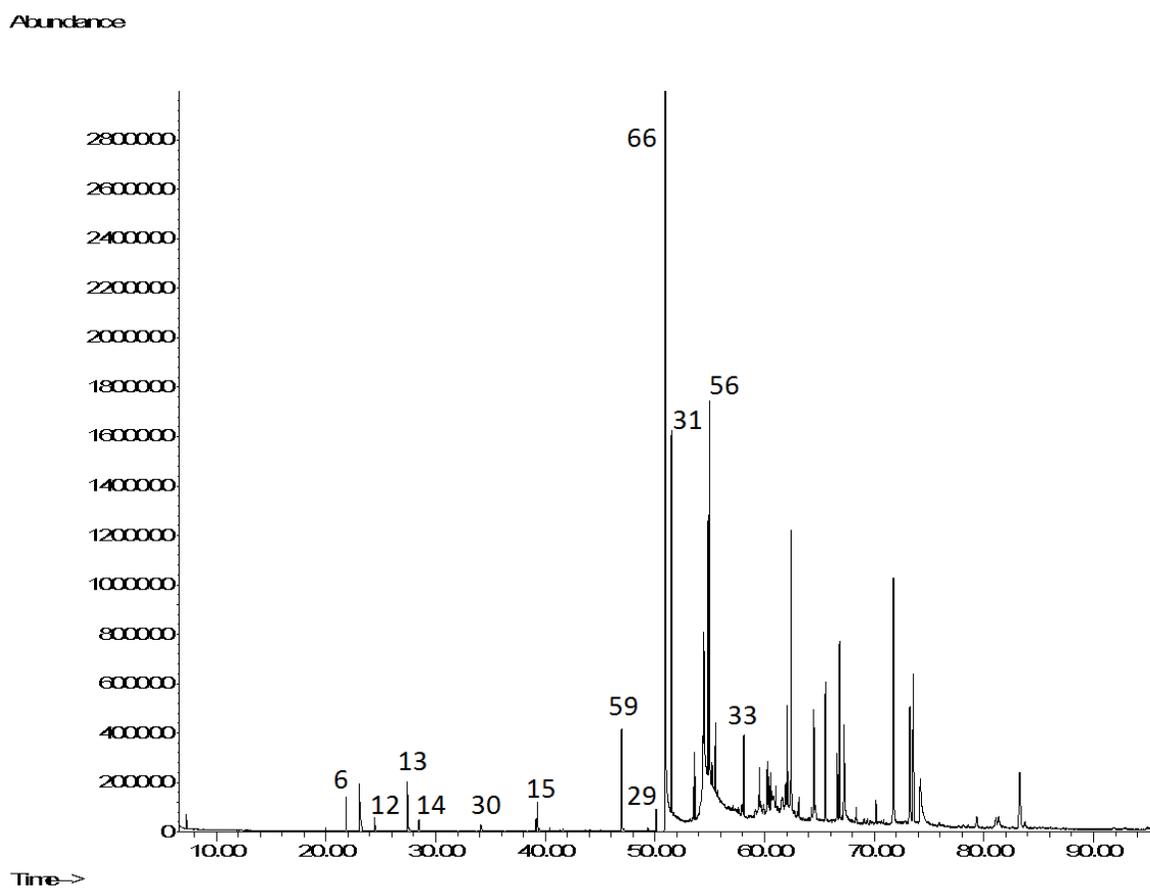
Abundance





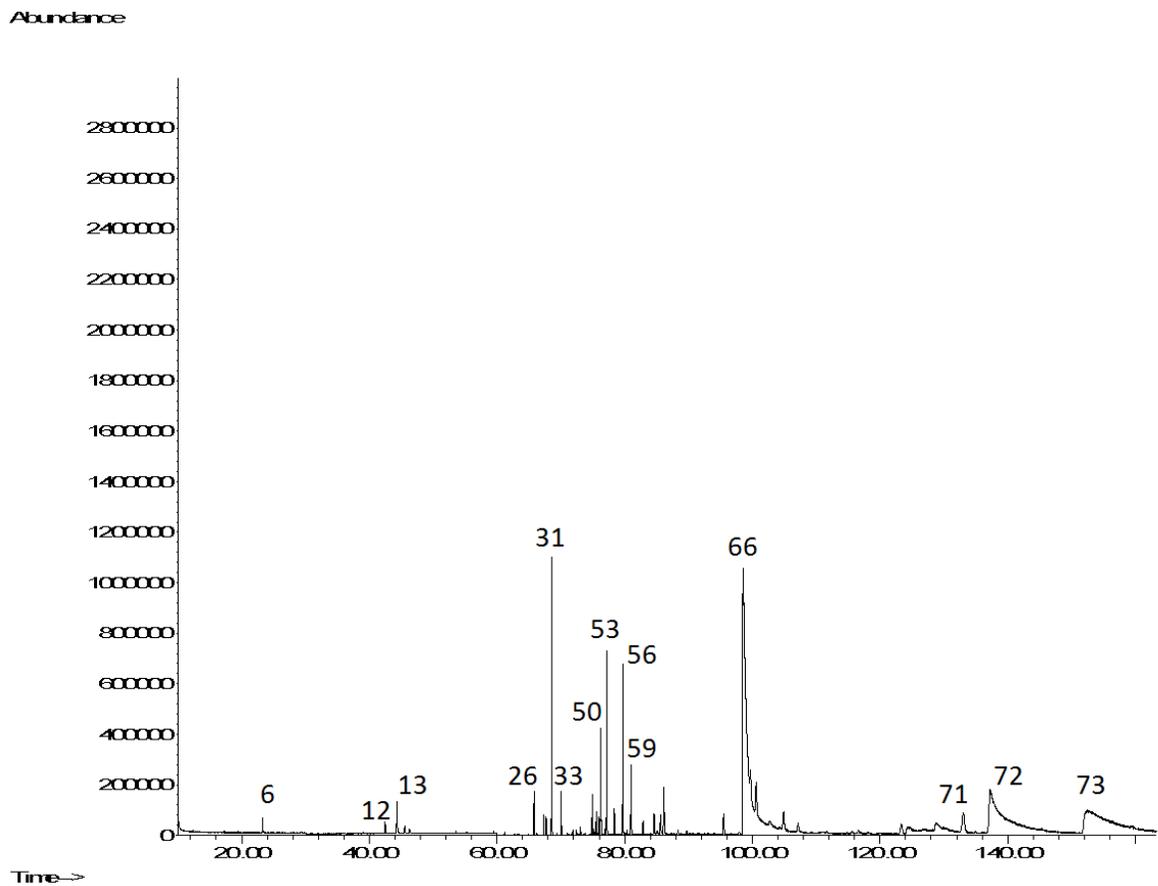
Fuente: espectro obtenido y ruta de fragmentación propuesta por el autor.

**ANEXO F. Compuestos representativos en el extracto de nardo:  
caracterización y notas olfativas.**



\*Columna DB-5MS, 60 m X 0.25 mm X 0.25 $\mu$ m. Detector MSD (EI, 70 eV)

Fuente: datos adquiridos en el cromatógrafo *Agilent Technologies 6890 Plus*.



\*Columna DB-WAX, 60 m X 0.25 mm X 0.25µm. Detector MSD (EI, 70 eV)

Fuente: datos adquiridos en el cromatógrafo *Agilent Technologies* 6890N.

N	$I_R$				Compuesto	Nota Olfativa
	Polar		Apolar			
	Exp.	Lit.	Exp.	Lit.		
6	1203	1214	1037	1039	1,8-Cineol	Mentolada
12	1615	1635	1099	1091	Benzoato de metilo	Floral, herbal
13	1661	1648	1175	1174	Benzoato de etilo	Floral, herbal
14	1693	1711	1202	1207	$\alpha$ -Terpineol	Floral, frutal
15	1711	1722	1495	1499	Germacreno D	Verde
26	2172	NR	1498	NR	Metil isoeugenol	Dulce
29	2215	NR	1924	1927	Palmitato de metilo	Oleosa
30	2227	2255	1352	1343	Antranilato de metilo	Floral
31	2253	NR	1991	1983	Palmitato de etilo	Dulce
33	2299	2300	2299	2300	Tricosano	Cerosa
43	2399	2400	2398	2400	Tetracosano	Cerosa
46	2456	2470	2190	2194	Estearato de etilo	Oleosa
49	2491	NR	2093	2092	Linoleato de metilo	Oleosa
50	2498	2500	2499	2500	Pentacosano	Cerosa
53	—	2530	2158	2159	Linoleato de etilo	Oleosa
54	—	NR	2099	2098	Linolenato de metilo	Oleosa
56	—	2596	2165	2169	Linolenato de etilo	Oleosa
59	—	NR	1782	1762	Benzoato de bencilo	Balsámica, herbal
66	—	2860	1964	1984	Ácido palmítico	Oleosa
71	—	3181	2123	2124	Ácido esteárico	Oleosa
72	—	3184	2140	2141	Ácido oleico	Oleosa
73	—	NR	2135	2130	Ácido linoleico	Oleosa

\*N: número de pico (**Tabla 8**). Exp.:  $I_R$  experimental. Lit.:  $I_R$  encontrado en la literatura. NR: no reportado. Base de datos: Pherobase.

Fuente: tabla y cromatogramas elaborados por el autor.

## ANEXO G. Certificado de participación.

### XXIX Congreso Latinoamericano de Química

CLAQ2010

Bogotá, D.C. 01 de octubre de 2010

La organización del XXIX Congreso Latinoamericano de Química – CLAQ 2010 certifica que el trabajo: ESTUDIO POR GC-MS DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES PRESENTES EN ABSOLUTOS Y EXTRACTOS (HS-SPME) DE FLORES DE *Polianthes tuberosa*, de los autores Elena Stashenko Stashenko, Jairo René Martínez Morales, Andrés Ramírez Restrepo, Néstor Armando Marín Solano, Nathalie Gómez Jaimes, fue presentado en Modalidad de POSTER.

El CLAQ 2010 se llevó a cabo entre el 27 de Septiembre y el 1° de Octubre de 2010 en el Centro de Convenciones de Cartagena de Indias.



**FABIAN PARADA ALFONSO**  
Presidente  
Comité Organizador – CLAQ 2010



**MIGUEL TOBAR CARRIZOSA**  
Presidente  
Comité Científico – CLAQ 2010

Calle 44 No. 45 - 67 Unidad Camilo Torres - Bloque C, Módulo 7, Oficina 202 • Teléfono: (57 1) 221 6920  
Fax: (57 1) 315 0751 - E-mail: [info@socolquim.com](mailto:info@socolquim.com) • [www.socolquim.com](http://www.socolquim.com) • [www.claq2010.com](http://www.claq2010.com)  
Bogotá, D. C. - Colombia

Fuente: Comité Organizador CLAQ 2010.