

IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION DE LOS PRINCIPALES COMPUESTOS
PRESENTES EN EL AROMA Y EL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE
OROZUL (*Phyla nodiflora L. Greene*)

DARMELY MILENA TOVAR
JOHANA MIREYA VILLOTA

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2007

IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION DE LOS PRINCIPALES COMPUESTOS
PRESENTES EN EL AROMA Y EL ACEITE ESENCIAL DE LAS HOJAS DE
OROZUL (*Phyla nodiflora L. Greene*)

DARMELY MILENA TOVAR
JOHANA MIREYA VILLOTA

Trabajo presentado como requisito parcial para optar el título de Químico

Director
M.Sc. Olga Lucía Benavides

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2007

“Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado, son responsabilidad de sus autores”.

Artículo 1º Del Acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966, emanado del Honorable Concejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación:

Director

Jurado

Jurado

San Juan de Pasto, Marzo de 2007

DEDICATORIA

A mi hijo Juan Esteban, a mis padres y a mis hermanos porque serán siempre mi motivación para emprender nuevos proyectos, por lo que quiero dedicarles el trabajo, el esfuerzo y la constancia de nuestro proyecto de investigación.

Darmely Tovar.

DEDICATORIA

La satisfacción al culminar mi trabajo de grado quiero compartirla con quienes estuvieron a mi lado brindándome su apoyo y compañía, mis padres Luz Marina y Omar, mis hermanos Oscar y Guiovany, mi hija Katherine, mi esposo Arturo a quienes con mucho amor dedico todo mi esfuerzo.

Johana Villota.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por concedernos la paciencia y la perseverancia.

A nuestros profesores por ser la guía de nuestra investigación en la Universidad de Nariño, especialmente a la Magister Olga Lucia Benavides y en la Universidad Nacional de Bogotá, a la Doctora Coralía Osorio

Al Químico David Perdomo por su colaboración en el Laboratorio de Cromatografía de la Universidad de Nariño.

Al médico terapeuta Vilson Sánchez por el financiamiento parcial a la investigación.

A nuestros familiares por su ánimo constante.

A nuestros amigos por el apoyo incondicional.

TABLA DE CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	21
1. OBJETIVOS	23
1.1 OBJETIVO GENERAL	23
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
2. MARCO TEÓRICO	24
2.1 BIOGÉNESIS DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE ORIGEN VEGETAL	25
2.2 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE AROMA Y ACEITE ESENCIAL	27
2.3 MÉTODOS DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL	32
2.3.1 Cromatografía	32
2.3.2 Cromatografía de gases	32
2.3.3 Espectrometría de masas	33
2.3.4 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	34
2.4 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS DEL AROMA Y ACEITE ESENCIAL	34
2.5 ANTECEDENTES DE LA ESPECIE VEGETAL	36
2.5.1 Descripción Botánica	36
2.5.2 Origen y ubicación	36
2.5.3 Usos	36

2.5.4 Estudios realizados	36
2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	37
2.6.1 Diseño irrestrictamente al azar (DIA)	37
3. METODOLOGÍA	39
3.1 RECOLECCIÓN E IDENTIFICACION TAXONÓMICA DEL MATERIAL VEGETAL	39
3.2 EXTRACCIÓN DEL AROMA DE LA PLANTA OROZUL (<i>Phyla nodiflora L. Greene</i>)	40
3.3 EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE LA PLANTA OROZUL (<i>Phyla nodiflora L. Greene</i>)	42
3.4 ANÁLISIS PRELIMINAR GC-MS EN LA UNIVERSIDAD DE NARIÑO	43
3.5 CUALIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS PRESENTES EN EL AROMA Y EL ACEITE ESENCIAL	44
3.5.1 Cualificación de los compuestos del aroma y del aceite esencial	44
3.5.2 Posibles rutas de fragmentación para MS	45
3.5.3 Cuantificación de los compuestos del aroma y del aceite esencial	45
4. ANÁLISIS DE RESULTADOS	47
4.1 RECOLECCIÓN E IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA ESPECIE VEGETAL	47
4.2 ESTANDARIZACIÓN PARA EL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DEL AROMA	47
4.3 IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR DE LOS COMPUESTOS DEL AROMA POR INDICE DE KOVATS	51
4.4 IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS DEL AROMA POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS	52

4.5 CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS DEL AROMA POR EL MÉTODO DEL ESTÁNDAR INTERNO	54
4.6 ESTANDARIZACIÓN PARA EL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL POR HIDRODESTILACIONA ASISTIDA POR RADIACION CON MICROONDAS	56
4.7 ANÁLISIS DE VARIANZA PARA HIRODESTILACIÓN ASISTIDA POR RADIACIÓN CON MICROONDAS	56
4.8 CALCULO DE RENDIMIENTO DE ACEITE ESENCIAL	58
4.9 IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR DE LOS COMPONENTES DEL ACEITE ESENCIAL POR INDICE DE KOVATS	59
4.10 IDENTIFICACION DE LOS COMPUESTOS DEL ACEITE ESENCIAL POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS	62
4.11 CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS DEL ACEITE ESENCIAL POR EL MÉTODO DEL ESTÁNDAR INTERNO	63
4.12 COMPARACIÓN ENTRE LOS COMPUESTOS OBTENIDOS EN EL AROMA Y EN EL ACEITE ESENCIAL DE LA ESPECIE VEGETAL <i>Phyla nodiflora L. Greene</i>	64
4.13 USOS Y APLICACIONES DE ALGUNOS DE LOS COMPUESTOS ENCONTRADOS EN EL AROMA Y EN EL ACEITE ESENCIAL	65
5. CONCLUSIONES	67
6. RECOMENDACIONES	68
BIBLIOGRAFÍA	69
ANEXOS	73

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Métodos clásicos de extracción de los AE	28
Cuadro 2. Métodos modernos para extracción de AE y aroma	32
Cuadro 3. Estudios realizados a la familia verbenácea	37
Cuadro 4. Series elutrópicas de eluyentes	41
Cuadro 5. Especificaciones para CG, Universidad de Nariño	43
Cuadro 6. Clasificación taxonómica de la especie vegetal <i>Phyla nodiflora L. Greene</i>	47
Cuadro 7. Polaridad de algunos solventes	48
Cuadro 8. Usos y aplicaciones de algunos de los compuestos identificados tanto en el aroma como en el AE de la especie vegetal <i>Phyla nodiflora L. Greene</i>	66

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Parámetros operacionales para DES	40
Tabla 2. Tratamientos aplicados a la extracción del aroma	41
Tabla 3. Especificaciones para MWHD	42
Tabla 4. Parámetros operacionales para MWHD	43
Tabla 5. Tratamientos aplicados para la extracción del AE por MWHD	43
Tabla 6. Condiciones operacionales para GC-MS, Universidad de Nariño	44
Tabla 7. Condiciones operacionales para GC-MS, Universidad Nacional de Colombia	45
Tabla 8. Concentración del Istd con sus respectivas áreas cromatográficas	46
Tabla 9. Promedio de compuestos obtenidos en el aroma	48
Tabla 10. Andeva para compuestos del aroma	48
Tabla 11. Identificación por IK de los compuestos del aroma	51
Tabla 12. Identificación por GC-MS de los compuestos del aroma	52
Tabla 13. Clasificación por número de isoprenos	54
Tabla 14. Clasificación de los compuestos del aroma	54
Tabla 15. Datos para la curva de calibración del Istd	54
Tabla 16. Cuantificación de los compuestos del aroma	55
Tabla 17. Promedio de compuestos obtenidos en el AE	56
Tabla 18. Andeva de AE para MWHD	56
Tabla 19. Ik, según ADAMS, para los compuestos extraídos del AE	59
Tabla 20. Identificación por GC-MS de los compuestos del AE	62
Tabla 21. Concentración de los compuestos del AE	63
Tabla 22. Clasificación de los compuestos del AE	64

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Rutas metabólicas de los Terpenos	26
Figura 2. Destilación por arrastre con vapor	29
Figura 3. Extracción con solvente	29
Figura 4. Esquema de destilación extracción simultánea	30
Figura 5. Montaje de Hidrodestilación asistida por radiación con microondas	31
Figura 6. Diagrama de un cromatógrafo de gases	33
Figura 7. <i>Phyla nodiflora L. Greene</i>	36
Figura 8. Lugar de muestreo Tambo – Nariño	39
Figura 9. Equipo DES, Universidad de Nariño	40
Figura 10. Equipo de MWHD, Universidad de Nariño	42
Figura 11. Equipo Instrumental de GC-MS, Universidad de Nariño	44
Figura 12. Perfiles cromatográficos obtenidos del aroma obtenidos en la Universidad de Nariño por GC-MS	49
Figura 13. Perfil cromatografico GC-MS para aroma – Universidad de Nariño	53
Figura 14. Perfil cromatografico GC-MS para aroma – Universidad Nacional de Colombia	53
Figura 15. Curva de calibración para el Istd	55
Figura 16. Perfiles cromatograficos por GC-MS de AE – Universidad de Nariño	57
Figura 17 Perfil cromatografico de AE – Universidad de Nariño	61
Figura 18. Perfil cromatográfico de AE – Universidad Nacional de Colombia	62
Figura 19. Concentración (ppm) de los componentes identificados en el AE	64
Figura 20. Concentración (ppm) de los compuestos que se conservan tanto en el AE como en el aroma	65
Figura 21. Monoterpenos - sesquiterpenos – hidrocarburos saturados presentes en el AE	65

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Espectros de masas de los compuestos obtenidos en el aroma y en el AE de las hojas de la especie vegetal <i>Phyla nodiflora L. Greene.</i>	73
Anexo B. Posibles Rutas de Fragmentación	80
Anexo C. Fórmulas para el desarrollo del Andeva	87

ABREVIATURAS

AE: Aceite esencial
AE´S: Aceites esenciales
ANDEVA: Analisis de varianza
Ax: Area cromatográfica del analito
CM: Cuadrados medios
CV: Coeficiente de variación
Cx: Concentración del analito
d.i: Diámetro interno
DES: Destilación extracción simultánea
DIA: Diseño irrestrictamente al azar
Fcal: F calculada
FC: Factor de corrección
FID: Detector de ionización en llama
Ftab: F tabulada
FV: Fuentes de variación
GC: Cromatografía de gases
GC-MS: Cromatografía de gases acoplada a espectrometria de masas
GL : Grados de libertad
Ik: Indices de Kóvats
Istd: Estandar interno (n-tetradecano)
M/z: Relación masa (m) carga (z)
Min: Minutos
MWHD: Hidrodestilación asistida por radiación con microondas
P: Acido fosfórico (H_3PO_4)
Rf: Factor de respuesta
SC: Suma de cuadrados
Tr: Tiempo de retención
Vf: Volumen final
Wx: Peso del material vegetal analizado

RESUMEN

Mediante la presente investigación se identificaron y cuantificaron los componentes del aceite esencial (AE) y del aroma de las hojas de la especie vegetal *Phyla nodiflora L. Greene*, utilizando como métodos de extracción la hidrodestilación asistida por radiación con microondas (MWHD) y la destilación extracción simultánea con solventes (DES); la cualificación y cuantificación se realizó por cromatografía de gases (GC) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

Los resultados obtenidos indicaron que el componente mayoritario del AE corresponde al limoneno con una concentración de 0.914 ppm, y en el aroma 3-metiltridecano cuya concentración fue de 0.184 ppm.

En el aroma el 66.66% de los compuestos identificados pertenecen al grupo de monoterpenos y 33.33% a hidrocarburos saturados, mientras que en el AE, se encontró un 57.14% de monoterpenos, un 28.57% de sesquiterpenos y 14.28% de hidrocarburos saturados.

Esta planta puede ser de interés fitoterapéutico, conocida en el departamento de Nariño como Orozul, comúnmente utilizada para combatir afecciones estomacales como gastritis, úlceras, reflujo y además por su aplicación cicatrizante.

ABSTRACT

By means of this investigation, were identified and quantified the components of the essential oil (AE) and aroma of the leaves of vegetal species ***Phylla nodiflora L. Greene***, using like extraction methods the hydrodistillation attended by radiation with microwaves (MWHD) and the distillation simultaneous extraction with solvent (DES); the qualification and quantification were made by chromatography of gases (GC) and gas chromatography coupled to spectrometry of masses (GC-MS).

The obtained results indicated that the majority component of the AE corresponds to the limoneno with a concentration of 0.914 ppm, and in the aroma to the 3-metiltridecano whose concentration was of 0.184 ppm.

In the aroma the 66.66% of identified compounds they belong to the group of monoterpenoids and 33.33% to saturated hydrocarbons, whereas in the AE, one was 57.14% of monoterpenoids, 28.57% of sesquiterpenoids and 14.28% of saturated hydrocarbons.

This plant that can be of phytotherapeutic interest, well-known in the department of Nariño like Orozul, commonly used to fight stomach affections like gastric, ulcer, reflux and also by their healing application.

INTRODUCCIÓN

Cada día y con mayor frecuencia surge un creciente interés por el estudio, producción y consumo de productos naturales provenientes de plantas aromáticas y medicinales, ya que ofrecen una diversidad de sustancias producto de su metabolismo; algunas son responsables de sus propiedades físicas, químicas, biológicas y otras están vinculadas con las interacciones ecológicas¹. Así por ejemplo, los aceites esenciales (AE's) considerados como metabolitos secundarios, han sido utilizados por el hombre desde la prehistoria con diversos propósitos, entre los que puede mencionarse los usos en colorantes, fragancias, insecticidas, drogas medicinales, cosméticos y en saborizantes². Actualmente, se ha revalorizado su utilidad en la vida cotidiana y consecuentemente la investigación científica en el área de los productos naturales. Las variadas aplicaciones que poseen los metabolitos secundarios obligaron al hombre a preocuparse de ellos en distintas formas, de acuerdo a las épocas históricas. Tradicionalmente se los extraían exclusivamente de plantas silvestres, esta práctica fue utilizada por miles de años hasta que se cayó en una explotación indiscriminada de los recursos naturales, poniéndose en peligro numerosas especies y en muchos casos llegando a la extinción.

Actualmente se sabe que los AE's son muy complejos, pueden contener hasta 500 sustancias químicas diferentes; y que en su estructura se encuentran unidades de isopreno (2- metil-1,3-butadieno)³. Del mismo modo, el aroma de una planta es considerado como el resultado de la producción de hormonas vegetales, definidas como aquellas sustancias que son sintetizadas en un determinado lugar de la planta y se translocan a otro, para regular el crecimiento, el desarrollo o el metabolismo vegetal⁴. La emanación pasiva de estas hormonas son las causantes del aroma.

El desarrollo de la ciencia y la tecnología han permitido ampliar enormemente el conocimiento de las propiedades y composición de los AE's de diferentes especies vegetales, tanto así, que se habla de su actividad antioxidante, alelopática y continuamente aparecen nuevas y mayores áreas de aplicación, más aún cuando se trata de especies vegetales cuya composición química no ha sido

¹ METABOLISMO VEGETAL. Disponible en internet: <http://www.es.wikipedia.org>. enciclopedia libre. Org.

² MATEOS, Pedro F. Producción Industrial de Metabolitos Secundarios. [en línea] [citado 12-02-2006] Disponible en Internet: <http://www.coli.usal.es/web/SEFIN/MI/tema0&MI.html>.

³ FESTER, G. MARTINUZZI, E. Aceites esenciales de la República de Argentina. [en línea] [citado 25-07-2006] Disponible en internet: <http://www.academianacionalciencias.org>.

⁴ PARRA, Rocio. Hormonas Vegetales. Revista FAO. [en línea] [citado 11-04-2005] Disponible en Internet: <http://www.biología-en-internet.com/dafaul.asp?Id=4&Fs=2>.

analizada; tal es el caso de la especie vegetal ***Phyla nodiflora L. Greene***, regionalmente conocida como Orozul y objeto de estudio del presente trabajo de investigación, y de la que por medicina tradicional, se conoce que ayuda a combatir afecciones estomacales como gastritis, úlceras, reflujo y además tiene aplicación cicatrizante cuando es usada en infusión, emplastos, maceración o zumo.

Se asume que la popularidad que han alcanzado los productos naturales obtenidos a partir de vegetales se debe a que medicinalmente han reemplazado a diversos fármacos, en el medio agropecuario posibilitan la disminución de costos en la producción agrícola, ya que evitan el uso de fungicidas, insecticidas, etc, por ser de carácter natural disminuyen el impacto ambiental y por la creencia de que por ser naturales son completamente efectivos e inoocuos⁵.

La identificación de los principales compuestos presentes en el aroma y el aceite esencial de la planta Orozul (***Phyla nodiflora L. Greene***) constituye una investigación orientada a la generación del conocimiento químico a partir del cual, se podría mejorar el uso farmacológico de los componentes de esta especie vegetal, se motive a otros grupos investigativos en la profundización de su estudio en los campos de la síntesis orgánica, hemisíntesis ó biotecnología.

⁵ ACEITES ESENCIALES. [en línea] [citado 22-07-2006] Disponible en Internet: <http://rbt.ots.ac.cr/read/revistas/44-2/cicci.htm>.

OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar químicamente el aroma y el aceite esencial presentes en las hojas de la especie vegetal ***Phyla nodiflora L. Greene***

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estandarizar las condiciones de extracción del aroma y el aceite esencial presentes en las hojas de la especie vegetal ***Phyla nodiflora L. Greene***

Extraer el aroma y el aceite esencial presentes en las hojas de la especie vegetal ***Phyla nodiflora L. Greene***

Identificar y cuantificar por GC-MS los principales compuestos presentes en el aroma y el aceite esencial de las hojas de la especie vegetal ***Phyla nodiflora L. Greene***

2. MARCO TEÓRICO

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes), farmacéutica y médica (saborizantes y principios activos). Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas que pueden tener la siguiente naturaleza química⁶:

Compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos).

Monoterpenos.

Sesquiterpenos.

Fenilpropanos.

En su gran mayoría son de olor agradable, aunque existen algunos de olor relativamente desagradable como por ejemplo los componentes que forman parte de la fracción aromática del ajo y la cebolla, los cuales contienen compuestos azufrados.

En el reino vegetal se producen diversas clases de compuestos naturales, tales como las grasas, los hidratos de carbono, las proteínas que desempeñan papeles importantes en el funcionamiento de los organismos. Estos productos naturales, junto con un número relativamente pequeño de sustancias análogas, existen en casi todos los organismos y se denominan “metabolitos primarios”⁷. Los procedimientos por los cuales se producen se llaman procesos metabólicos primarios.

Una segunda clase de productos naturales se denomina “metabolitos secundarios”; no tienen porque ser de importancia secundaria para el organismo, pero su distribución en la naturaleza tiende a ser más dependiente de las especies. Son el producto del metabolismo secundario, no poseen roles reconocidos en los procesos de asimilación, respiración, transporte y diferenciación y difieren de los metabolitos primarios por tener una distribución restringida en el reino vegetal⁸. Esto significa que un producto secundario en

⁶ FESTER, Op. cit., p.30.

⁷ G, Eduardo, *et al.* Introducción a los productos naturales. Argentina: secretaria general de los estados Americanos, 1985. P. 1-5.

⁸ *Ibid.*, p. 79-99.

particular, generalmente se halla sólo en una especie o en un grupo de especies taxonómicamente relacionadas. Además se presentan con una diversidad estructural asombrosa, por ejemplo: esteroides, flavonoides, alcaloides, terpenos, etc. El principal rol metabólico atribuido a estos grupos de sustancias es la protección frente al ataque de herbívoros y las infecciones microbianas o virales⁹. Pero también funcionan como atrayente de insectos polinizadores y como agente de competición planta-planta.

2.1 BIOGÉNESIS DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE ORIGEN VEGETAL

Los fenómenos vitales ocurridos tanto en animales como en vegetales provienen de una cadena de oxidaciones y reducciones, en las que se producen los metabolitos útiles para el crecimiento o reproducción del organismo o inútiles y hasta tóxicas. En la biogénesis de los compuestos secundarios hay reacciones en las que participan las enzimas, catalizadores orgánicos complejos muy efectivos y estereoselectivos¹⁰.

Siguiendo un criterio biosintético, los productos naturales secundarios podrían dividirse en tres grandes grupos de compuestos: nitrogenados, terpénicos y fenólicos. Los primeros, derivan principalmente de los aminoácidos. A partir de acetyl-Co A, a través de la ruta del mevalonato se sintetizan los terpenos, mientras que los metabolitos fenólicos provienen de dos vías diferentes: la del ácido shikímico y la de los policétidos o vía del malonato¹¹. Luego de cierto tiempo de ser producidos, algunos metabolitos secundarios son degradados a sus intermediarios metabólicos primarios, por lo que se propone que pueden funcionar como una reserva energética de nitrógeno y de carbono.

Para el caso de los terpenos, compuestos frecuentes en los AE's que según Ruzicka¹² su principio básico es una molécula de isopreno (2- metil – 1,3 butadieno); por la unión cabeza cola de dos moléculas de isopreno se obtienen

⁹ TROIANI, Rosa M. **Metabolitos Secundarios** [en línea] [citado 30-01-2005] 10p. Disponible en Internet: http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/ap/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/apbot-farm2e/22html.

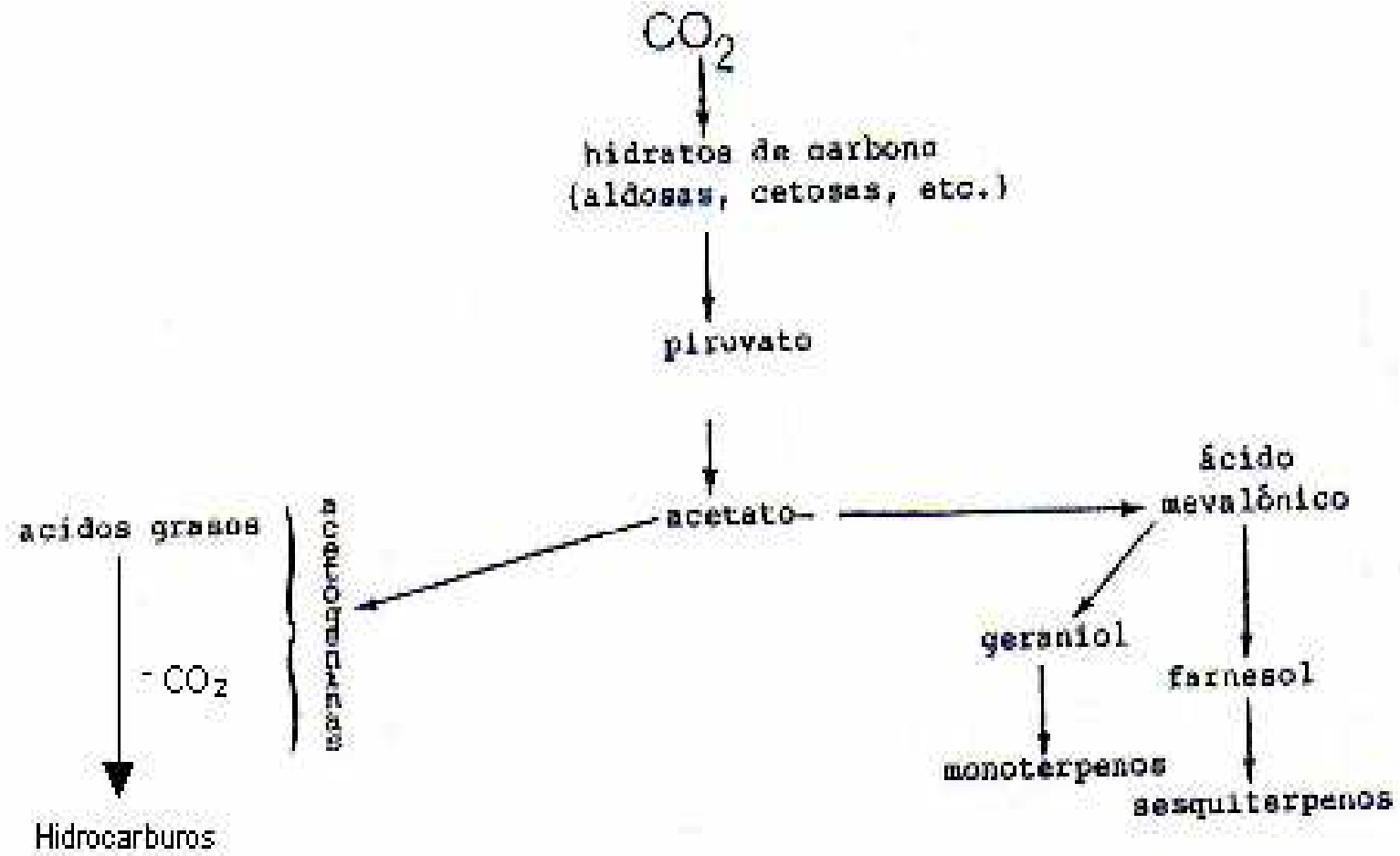
¹⁰ Ibid., p. 7.

¹¹ Rutas Metabolicas Básicas y Origen de los Metabolitos Secundarios. [en línea] [citado 28-09-2005]. Disponible en internet: <http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/op/ciencias-químicas-y-farmaceuticas/apbot-farma2e/22.html>.

¹² Ruzicka, citado por BU'LOCK, Jonh. Biosíntesis de productos naturales. Londres: Urmo, 1985. P. 66-79.

los monoterpenos, la unión de tres los sesquiterpenos, de cuatro los diterpenos, etc; se ha encontrado en su biosíntesis el ácido mevalónico (ácido 3,5 dihidroxi – metilpentanoico) que se convierte en reactivo pirofosfato de isopentenilo o su isómero; al reaccionar estos se forma el pirofosfato de geranilo con el esqueleto de un monoterpeno. La unión de éste con otro pirofosfato de isopentilo forma el pirofosfato de farnesilo correspondiente a un sesquiterpeno, según se ilustra en la Figura 1.

Figura 1. Rutas metabólicas de los terpenos e hidrocarburos



Los hidrocarburos son compuestos formados por átomos de carbono e hidrógeno, de gran abundancia en la naturaleza, presentes principalmente en el petróleo; sin embargo, el reino vegetal también sintetiza este tipo de compuestos, denominados hidrocarburos biogénicos¹³. La síntesis de este tipo de hidrocarburos está controlada por rutas metabólicas, lo cual trae como resultado mezclas de compuestos de limitada complejidad estructural relacionada directamente con las funciones biológicas específicas, tales como: alto grado de aislamiento con el medio externo, barrera protectora frente a pérdidas de agua por transpiración excesiva, defensa contra la acción de patógenos, radiación solar y contaminantes.

El origen de estos compuestos dentro de la ruta metabólica vegetal, se observa en la Figura 1, en la que unidades de acetato, seguramente activado como acetil-coenzima A, se unen generando acetogeninas, de las que a su vez se derivan los ácidos grasos, que por descarboxilación producen los hidrocarburos¹⁴.

2.2 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE AROMA Y ACEITE ESENCIAL

Desde tiempos inmemorables el hombre ha utilizado al reino vegetal para la obtención de productos como los aceites esenciales y los aromas, el método de aislamiento de estos materiales es función entre otros factores, del tipo de material a procesar como las hojas, las flores, tallos, cortezas, raíces, frutos, semillas, maderas, cáscaras frutales, frutos frescos y secos¹⁵; Por lo que para la extracción del aroma y el AE se han creado y perfeccionado diferentes técnicas, cuyo principio general es separar estas sustancias volátiles de la porción sólida de los tejidos vegetales, tales como pelos glandulares, cavidades esquisógenas (células separadas unas de otras), canales lisígenos (espacios resultantes por disolución celular), canales resinosos y canales gomosos; y obtenerlos en forma completamente pura, para su posterior análisis mediante procedimientos analíticos o instrumentales como la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas¹⁶.

Hay cuatro sistemas clásicos, indicados en el Cuadro 1 por medio de los cuales se puede extraer el aroma y el aceite esencial; cabe mencionar algunas de sus características, ya que gracias a estos antecedentes se ha logrado innovar con otros procedimientos¹⁷.

¹³ HARBORNE. J. *Phytochemical Methods. A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. London New York. Chapman and Hall. 1973. p. 160.

¹⁴ G. Op.Cit. p. 3-5.

¹⁵ TROIANI. Op. Cit.

¹⁶ FUJITA, Y; CUBIC; FESTER, W. *Extraction oil esencial*. en línea] [citado 30-01-2006] 7.p. Disponible en Internet: <http://www.fujitacubic.extractiolesencias&01.html>.

¹⁷ FUJITA, Y; CUBIC; FESTER, W. Op. cit., p. 2.

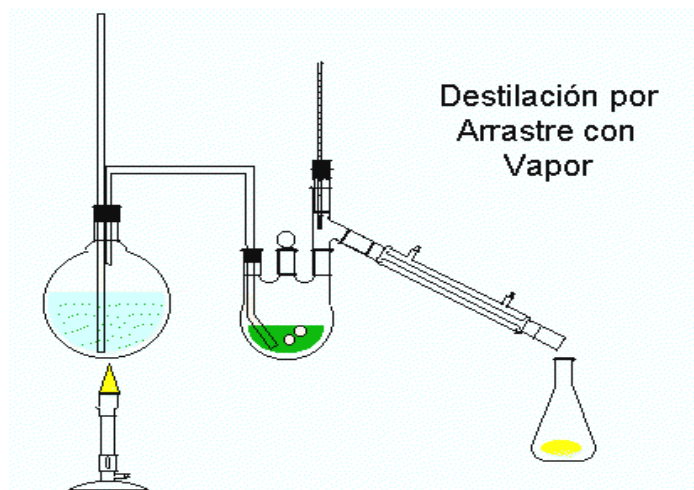
Cuadro 1. Métodos clásicos de extracción de AE

MÉTODO DE EXTRACCIÓN	CARACTERÍSTICAS
Destilación por arrastre con vapor	<p>Consiste en la vaporización a temperaturas inferiores a las de ebullición de cada uno de los componentes por efecto de una corriente directa de vapor de agua.</p> <p>Proceso económico porque utiliza agua en lugar de solventes orgánicos.</p>
Extracción con solvente	<p>El material vegetal se trata con un solvente cuidadosamente purificado.</p> <p>El solvente penetra en los tejidos, disuelve y desplaza el aceite esencial juntamente con vestigios de otras impurezas.</p> <p>Luego se evapora el solvente, por lo general al vacío y se deja un residuo que consiste en su mayor parte de aceite esencial.</p>
Expresión o enflorado	<p>Consiste básicamente en aplicar el material vegetal sobre platos de vidrio cubiertos con sebo puro o manteca, altamente absorbentes.</p> <p>Los platos son apilados unos sobre otros de manera que toda la fragancia emanante quede encerrada en un compartimiento hermético.</p> <p>Después de la absorción, la grasa es sometida a extracción alcohólica, que disuelve el aceite esencial encerrado, pero no la grasa insoluble.</p>
Prensado	<p>Implica el prensado de la materia vegetal a gran presión para hacer salir los aceites y otros líquidos.</p> <p>Posteriormente el aceite se separa por centrifugación.</p>

En las Figuras 2 y 3 se muestran los esquemas de algunos de los métodos de

extracción mencionados.

Figura 2. Destilación por arrastre con vapor



Fuente: www.computerhuesca.es/~fvalles/dibujos/destilac.htm

Figura 3. Extracción con solvente



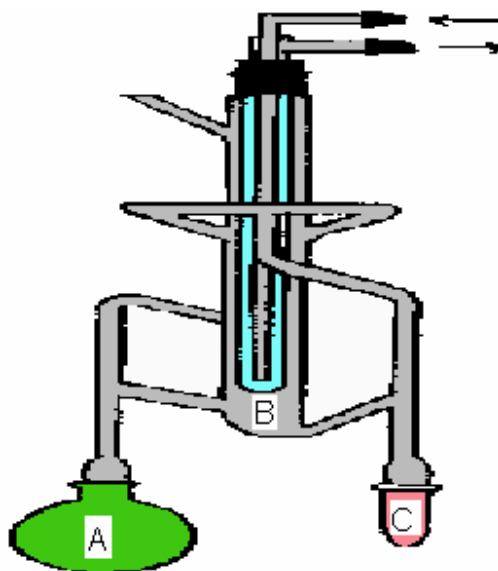
Fuente: www.computerhuesca.es/~fvalles/dibujos/destilac.htm

Aprovechando las ventajas y contratiempos en el manejo de estas técnicas Linkens y Nickerson¹⁸, desarrollaron un equipo de destilación extracción simultánea con solvente (para la obtención del aroma), que ha sido varias veces modificado y sobre el cual se hará énfasis a lo largo de la metodología,

¹⁸LINKENS, S. T and NICKERSON, G. B., Detection of Certain HopOil Constituents in Brewing Products. En: Am.Soc: Brew. Proc., 1964. P. 7-10.

conjuntamente con la hidrodestilación asistida por radiación con microondas, indicados en la Figuras 4 y 5, métodos con los cuales se desarrolla la presente investigación¹⁹.

Figura 4. Esquema de destilación extracción simultánea



Fuente: SERRANO, Martín. Estudio de la variación del aroma de flores de Ylang-Ylang, en función del tiempo de su almacenamiento y hora de recolección y de su posible actividad antioxidante *in vitro*. Bucaramanga, 2002, 93p. Trabajo de grado (Magister). Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias. Escuela de química área de productos naturales.

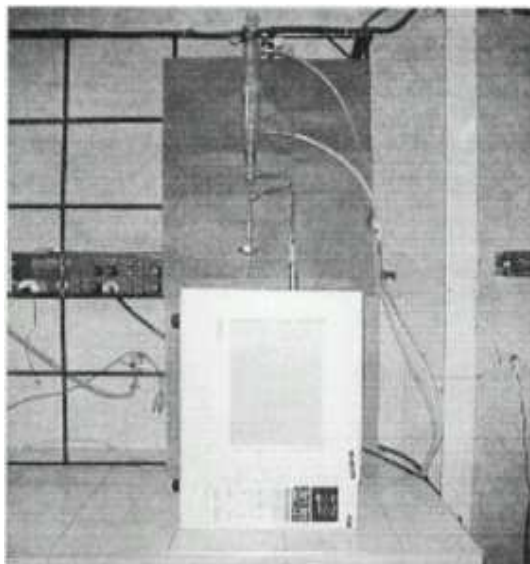
El material vegetal se coloca en el balón A y el disolvente en B, tanto A como B se conectan al condensador C. Se inicia con el calentamiento independiente de cada balón, evitando la ebullición en B para no generar salpicaduras. La función del disolvente es arrastrar y concentrar los vapores de A, sin vapor de agua.

La ventaja de este método es que no necesita de grandes cantidades de disolvente, que en cierto grado representa un problema ambiental y puede ser perjudicial para la salud. Además en aproximadamente dos horas de procedimiento se garantiza la obtención del aroma deseado. El equipo en general es bastante sencillo no necesita de un montaje complicado pero sí de una atención permanente.

La desventaja de este método es de tipo económico ya que genera costos en la utilización de solventes orgánicos.

¹⁹ SERRANO, Martín. Estudio de la variación del aroma de flores de Ylang-Ylang, en función del tiempo de su almacenamiento y hora de recolección y de su posible actividad antioxidante *in vitro*. Bucaramanga, 2002, 93p. Trabajo de grado (Magister). Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias. Escuela de química área de productos naturales.

Figura 5. Montaje de Hidrodestilación asistida por radiación con microondas



En la Figura 5, se observa el montaje completo de MWHD; dispuesto con un horno microondas corriente y un sistema de condensación en la parte superior. El método se basa en una destilación normal, la diferencia es que en el horno microondas se genera una radiación electromagnética que se dispersa homogéneamente en su interior, permitiendo un calentamiento uniforme del solvente y éste a su vez propicia el calentamiento y posterior ruptura de las estructuras celulares que contienen el AE que finalmente es recogido.

Las ventajas del método de MWHD son²⁰:

Obtención de AE en rangos de tiempo muy cortos.

Mayor control de temperatura y potencia.

Ausencia de solventes

Este sistema presenta la desventaja de que no puede utilizarse para la extracción de aceites esenciales a escala industrial, ya que el tamaño físico del equipo no lo permite.

²⁰ SERRANO, Op. cit., p. 12.

Existen otros métodos de extracción de aceites esenciales y aroma de plantas vegetales. En el cuadro 2 se destaca su principio básico.

Cuadro 2. Métodos modernos para extracción de aroma y aceites esenciales.

MÉTODO	PRINCIPIO BÁSICO
Fluidos supercríticos	Se basa en el cambio de propiedades de transporte y solubilidad que presenta un solvente en estado supercrítico ²¹ .
Microextracción en fase sólida (SPME)	Se basa en el recorrido de los analitos de la muestra al recubrimiento de la fibra hasta el tiempo que la concentración del analito ha alcanzado el equilibrio de distribución entre la muestra y el recubrimiento de la fibra ²² .
Purga y trampa	Separa volátiles de líquidos o sólidos, intentando aislar el 100% del analito de la muestra, bajo un control de temperatura de tiempo ²³ .

2.3 MÉTODOS DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL

2.3.1 Cromatografía. La cromatografía es una técnica de separación que se basa en la diferencia de distribución de una muestra entre dos fases: una estacionaria, que puede ser sólida o una delgada película líquida que recubre al sólido y una fase móvil, ya sea líquida o gaseosa que se percola sobre la fase estacionaria y alrededor de la misma²⁴. Dependiendo del tipo de fase estacionaria se establece una clasificación de la cromatografía, para la presente investigación se tiene en cuenta la cromatografía gaseosa.

2.3.2 Cromatografía de gases. En la cromatografía de gases, la fase móvil, se denomina gas portador, ya que es un gas inerte cuya finalidad es transportar las moléculas de la muestra a través de la columna. Esta técnica emplea el procedimiento de elusión, en el que la muestra se añade a la columna y el gas puro que actúa de portador fluye continuamente²⁵. Cuando se concluye el análisis, la columna queda lista para inyectar una nueva muestra. Además la

²¹ EISERT, R. PAWLISZYN, J. New Trends in Solid Phase Microextraction. Critical Reviews in Analytical Chemistry. 1997. 27 (2). p. 103-35.

²² EISERT, R. PAWLISZYN, J. Opt. Cit. p. 103-35.

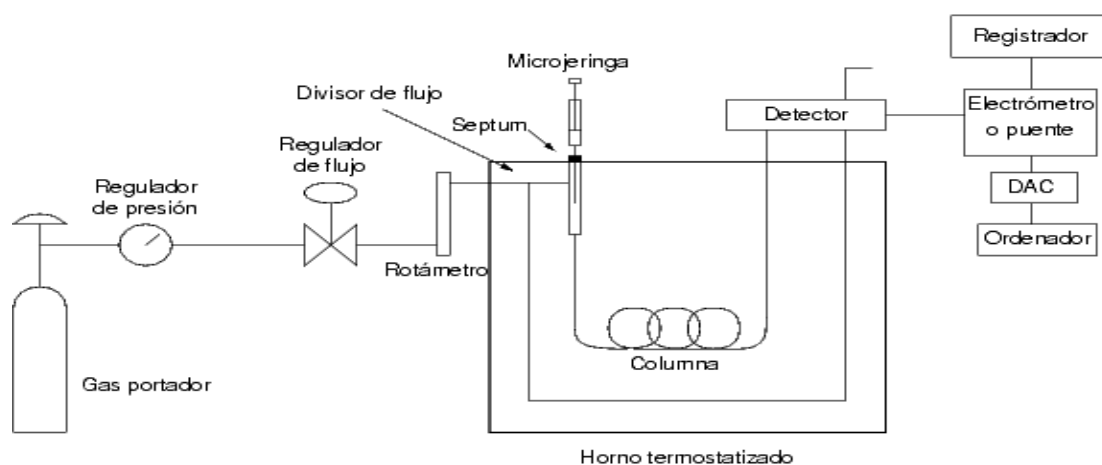
²³ EISERT, R. PAWLISZYN, J. Opt. Cit. p. 103-35.

²⁴ KEENETH, R. Análisis Instrumental. España: Pearson Educación, 2001. p. 430.

²⁵ Ibid. p. 400.

cromatografía de gases presenta ventajas como alta resolución, velocidad, sensibilidad (detecta ppm y a menudo ppb) y resultados cuantitativos, así mismo presenta el inconveniente de que solo maneja muestras volátiles, “limpias”, no es aplicable en muestras termolábiles; sin embargo, la exactitud y precisión en de los resultados es función de muchos factores técnicos, operacionales e instrumentales, como la elección correcta de la columna (tipo, longitud, diámetro) y el correcto uso de los componentes del cromatógrafo de gases: el sistema de inyección, la columna, y el detector²⁶. En la Figura 6 se indica el esquema general de un GC

Figura 6. Diagrama de un cromatógrafo de gases



Fuente: GUILD, L. Gas Chromatography butter wort. Londres: Heilderberg,1958 p. 330.

2.3.3 Espectrometría de masas. La MS es un método de análisis químico rápido, sensible que permite la máxima información sobre la estructura molecular con la mínima cantidad de muestra ($10^{-6} - 10^{-14}$ g)²⁷.

El espectrómetro de masas consta de una sistema de entrada, una fuente iónica, un analizador y un sistema de detección con registro computarizado. La función del sistema de entrada es la volatilización de la muestra, para una posterior ionización en la cámara de ionización, una separación de iones según la relación masa/carga en el analizador, su colección y análisis con el detector y finalmente su almacenamiento en la memoria del computador²⁸.

²⁶ KEENETH, Op. cit., p.432.

²⁷ Ibid., p.435.

²⁸ Ibid., p.436.

El espectro de masas es una gráfica que relaciona las masas de los iones con sus respectivas concentraciones en la corriente iónica total producida por la ionización de las moléculas del analito en la cámara de ionización²⁹.

2.3.4 Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas. Para un análisis químico avanzado existe una técnica moderna que resulta de la combinación de GC con MS denominada cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), con la que se garantiza un análisis rápido y completo de mezclas complejas, identificando simultáneamente los componentes y la proporción en la que se encuentran; es un método tan sensible que logra analizar muestras en concentraciones del rango de 10^{-4} y 10^{-12} g e incluso determinar impurezas en mínimas cantidades (10^{-14} g)³⁰.

La función del cromatógrafo de gases consiste en la separación de los componentes de la muestra, los cuales entran uno por uno en la fuente iónica, a través de la interfase encargada de disminuir la presión entre la columna cromatográfica y el espectrómetro de masas al sistema de datos computarizado del espectrómetro de masas³¹.

La unión de la columna cromatográfica con la cámara de ionización comprende la presencia de una interfase o separador cuyas funciones consisten en la separación del gas de arrastre de las moléculas del analito y la disminución simultánea de la diferencia de presión entre la GC y el MS³².

El sistema moderno de CG – MS consta de 3 bloques principales: un cromatógrafo, un espectrómetro de masas y un sistema de datos cuyo componente importante es un computador como en indica la figura 6; el gas de arrastre que más se utiliza es el Helio por su nula inflamabilidad, ligereza y además el hecho de tener un potencial de ionización (24.6 ev) más alto que el de cualquier molécula orgánica³³.

²⁹ SILVERTEINS. Spectrometric Identificación of Orgánic Compounds. Canadá : John Wiley & sons, INC,1991. p. 3-16.

³⁰ Ibid., p. 5-6.

³¹ SKOOG, DOUGLAS A. Y LEARY, JAMES J, Análisis Instrumental, Madrid: McGraw-Hill, 1994. p. 257.

³² Ibid., p. 234.

³³ CROMATOGRAFÍA DE GASES . En: Wikipedia, la enciclopedia libre. [en línea] [citado 30-01-2006] Disponible en Internet: http://es.wikipedia.org/wiki/CromatografA-a_de_gases

2.4 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS DEL AROMA Y ACEITE ESENCIAL

La identificación preliminar de los componentes de la mezcla se realiza con base en los tiempos de retención (Tr) que presentan los componentes de la muestra, los cuales se relacionan con los llamados Índices de Kovats (Ik) y la confirmación final por medio del análisis GC-MS, que relaciona la estructura de la molécula y su patrón de fragmentación determinados por las condiciones experimentales y sobre todo por la estructura molecular³⁴.

Los Ik indican el orden en que eluyen los compuestos de interés, respecto a parafinas lineales. Las condiciones de temperatura son un factor determinante para esta comparación. Si se usa rangos de temperatura programada, los Tr aumentan en forma lineal con el número de carbonos, por lo que su cálculo se realiza con la siguiente ecuación³⁵:

$$Ik = 100 * \frac{Tr(a) - Tr(b)}{Tr(c) - Tr(b)} + 100 * N \quad \text{Ecuación (1)}$$

Tr (a) = tiempo de retención del compuesto de interés
Tr (b) = tiempo de retención del n-alcano que eluye antes
Tr (c) = tiempo de retención del n-alcano que eluye después
N = número de carbonos del n-alcano que eluye antes

La cuantificación de los componentes presentes en el AE y el aroma del vegetal, se realiza por medio del estándar interno (Istd), n-tetradecano, haciendo uso de la siguiente ecuación³⁶:

$$Cx = \frac{Ax}{Rf} * \frac{Vf}{Wx} \quad \text{Ecuación (2)}$$

Cx = Concentración del compuesto (mg/Kg material vegetal)
Ax = Area cromatográfica del compuesto (cuentas)
Rf = Factor de respuesta del Istd (cuentas * L/ mg)
Vf = Volumen final del extracto (L)

³⁴ GUZINOWICS, B, GUZINOWICS M. Fundamentals of integrated GC. [en línea] [citado 30-01-2005] Disponible en Internet: <http://WWW.TheintegratedG-C/Msanalyticaldystem-serier.htm>.

³⁵ ALVAREZ, Alba T. Aislamiento, purificación e identificación de principios tóxicos alcaloidales en plantas del género *crotalaria* y alimento contaminado para aves. Bucaramanga, 2004, 135p. trabajo de grado (Magister en Química). Universidad Industrial Santander. Facultad de Ciencias. Area de Productos Naturales.

³⁶ GROB, R. MODERN. Practice of gas chromatography [en línea] [citado 12-02-2005] Disponible en Internet: <http://WWW.healphone/oilessences/sitdGC/consup/uk.htm>. 36

Wx = Peso de la muestra del material vegetal (Kg)

El Rf se calcula a partir de la pendiente en la recta, que se origina con diferentes concentraciones de Istd y las áreas cromatográficas del mismo.

2.5 ANTECEDENTES DE LA ESPECIE VEGETAL

2.5.1 Descripción Botánica. Arbusto que puede llegar a medir hasta un metro de altura, muy aromático, tallo cuadrangular, hojas opuestas, perennes, ovales, rugosas, de color verde, flores violetas o blancas agrupadas en espigas terminales³⁷.

Figura 7. *Phyla Nodiflora* L. Greene



2.5.2 Origen y ubicación. Esta planta se considera nativa de Estados Unidos. En Colombia, crece en el departamento de Nariño, específicamente en el Municipio del Tambo, ubicado a 43 Km del Municipio de Pasto, con aproximadamente 18°C de temperatura ambiente.

2.5.3 Usos. Dentro de la medicina natural casera, este vegetal es usado para mejorar la calidad de vida de personas que presentan afecciones estomacales,

³⁷ DUKE, Jim. Phytochemical and Ethnobotanical Databases. Chemical Verbenaceas. [en línea] [citado 06-01-2001] Disponible en Internet: http://www.crat/chemical_ethnobotanic37_unb/verbenaceas.org.htm.

tales como gastritis, úlceras, reflujo; además tiene aplicación cicatrizante cuando se usa en emplasto, maceración, infusión o zumo.

2.5.4 Estudios realizados. Teniendo en cuenta la revisión bibliográfica para la especie ***Phyla nodiflora L. Greene*** no se encontró ningún tipo de estudio químico realizado; sin embargo, se conoce su actividad moderada contra *Helicobacter pylori*³⁸, por lo tanto, se toma como referencia los estudios realizados a la familia Verbenácea^{39,40,41,42}, que corresponden básicamente a la composición química en cuanto a metabolitos secundarios, identificada por GC-MS y la actividad antimicrobial y alelopática como se señala en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Estudios realizados a la familia Verbenácea.

FAMILIA VERBENÁCEA	ESTUDIOS
<i>Lantana alba Mill</i>	Composición y propiedades antibacteriales del aceite esencial.
<i>Geniculata</i>	Actividad antioxidante de su aceite esencial.
<i>Lippias y Aloysias</i>	Análisis fitoquímico.

2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

2.6.1 Diseño irrestrictamente al azar (DIA). Conocido también como diseño completamente al azar, como su nombre lo dice, los tratamientos se distribuyen al azar en todas las unidades experimentales, pudiendo ser el número de repeticiones igual o diferente⁴³.

Generalmente se usa en experimentos en donde la variabilidad es pequeña y donde se puedan controlar algunos factores que muy a menudo la aumentan; este diseño se recomienda en fenómenos en donde se van a dedicar a la experimentación uniforme con los factores que pueden influenciar sobre los

³⁸ WAMG. Yuan-Chuen. Screening of anti-helicobacter pylori Herbs Deriving from Taiwanese folk medicinal plants. Departamento of Food Science National Chung-Hsing University. FEMS Immunology and Medical Microbiology. Vol. 23. Issue 2. (septiembre. 2004); p. 1.

³⁹ PINO, Jorge *et al.* Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial ***Lantana alba Mill***. En: Revista Cubana de Farmacia. Vol. 30, No. 1 (enero. 1996); p. 1-2.

⁴⁰ PRADA, F *et al.* Evaluación de la actividad antioxidante del Aceite esencial de ***geniculata***. En: cromatografía. ix congreso latinoamericano de cromatografía y técnicas afines. Colombia, 2002. p. 161.

⁴¹ JARAMILLO, E *et al.* Determinación de volátiles y semivolátiles en la ***Antana alba***. [En línea] [citado 10-04-2000] Disponible en Internet: http://WWW.cibimol/HRGC/FID/MSD_prc.htm.

⁴² RICCIARDI, G.; A. BANDONI, A., "Fitoquímica de Verbenáceas (*Lippias y Aloysias*) del Nordeste Argentino"; Disponible en internet <http://www.unne.edu.ar>; Comunicaciones científicas y Tecnológicas, UNNE; Exactas No. 039; (2006).

⁴³ LEGARDA, Lucio; LAGOS Tulio; VICUÑA, Luis. Diseño de experimentos agropecuarios. San Juan de Pasto : Unigraf , 2001. P. 38-39.

resultados del experimento y aun así, debe combinarse con el análisis de varianza para mayor precisión⁴⁴.

Para la interpretación de los resultados obtenidos en la identificación cualitativa y cuantitativa de los metabolitos secundarios de la planta en estudio existe el análisis de varianza (ANDEVA) que se dedica a relacionar los tratamientos y las unidades experimentales, en términos de estímulos y respuestas; y determina si las diferencias de los tratamientos aplicados son significativas o pueden atribuirse al error experimental; el carácter variable del diseño experimental permite obtener resultados que no se repiten es decir nunca son iguales, esto se debe a que además de los factores que intervienen, existen otros incontrolables, estos son la, diferencia genética entre las plantas, influencia climática, errores humanos, entre otros⁴⁵.

⁴⁴ LEGARDA. Op.cit. p. 39.

⁴⁵ Ibid., p. 75.

3. METODOLOGÍA

La identificación de los principales componentes presentes en el aroma y el AE de la planta orozul (*Phyla nodiflora L. Greene*) se desarrolló bajo las siguientes etapas:

Recolección e identificación taxonómica del material vegetal

Extracción del aroma de la planta orozul (*Phyla nodiflora L. Greene*) mediante destilación extracción simultanea.

Extracción del aceite esencial de la planta orozul (*Phyla nodiflora L. Greene*) por hidrodestilación asistida por radiación con microondas.

Cualificación y cuantificación de los compuestos tanto del aroma como del AE de la planta orozul (*Phyla nodiflora L. Greene*)

3.1 RECOLECCIÓN Y IDENTIFICACION TAXONÓMICA DEL MATERIAL VEGETAL

La recolección del material vegetal se realizó en el Municipio del Tambo (Nariño), Figura 8, ubicado a 43 Km del Municipio de Pasto, a una temperatura promedio de 18 °C; con un muestreo semanal completamente aleatorio, descartando únicamente la raíz de la planta. Las muestras se empacaron en bolsas de papel y se llevaron al Laboratorio de Compuestos Heterocíclicos y Productos Naturales de la Universidad de Nariño, en donde se separaron las hojas de tallos y flores, para ser sometidas al proceso de secado al medio ambiente, protegidas de la humedad. La identificación taxonómica se realizó en la Universidad del Cauca.

Figura 8. Lugar de muestreo Tambo - Nariño



3.2 EXTRACCIÓN DEL AROMA DE LA PLANTA OROZUL (*Phyla nodiflora L. Greene*)

El aroma se extrajo por medio del equipo DES (Destilación Extracción Simultánea) perteneciente al grupo de Investigación de productos naturales de la Universidad de Nariño mostrado en la Figura 9 con los siguientes parámetros operacionales, indicados en la Tabla 1.

Figura 9. Equipo DES, Universidad de Nariño

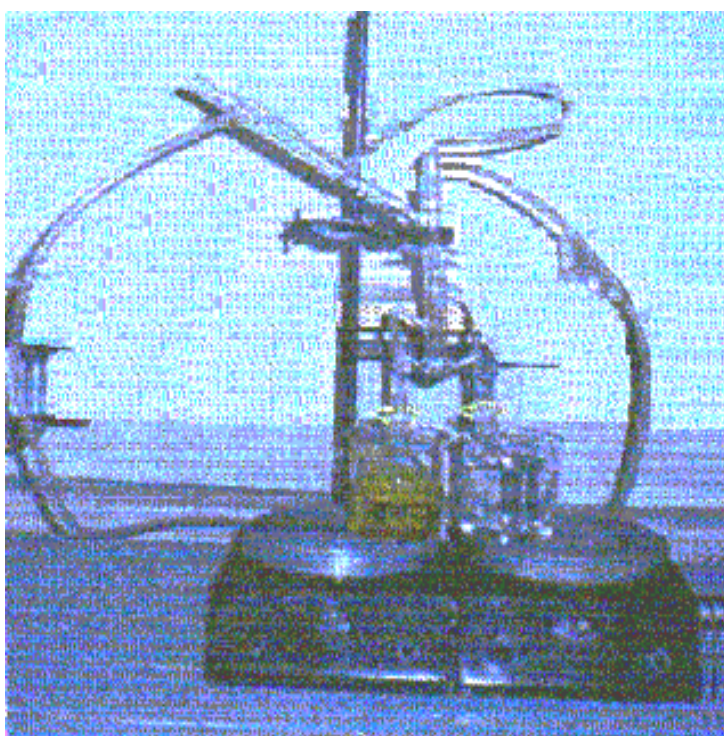


Tabla 1. Parámetros operacionales para DES

CARACTERÍSTICAS	CONDICIONES
Material vegetal	7.5 g
Solventes	❖ Mezcla de Diclorometano y acetato de etilo 2:1 ❖ Diclorometano
Volumen del solvente	5 ml

Tiempo de Extracción 60 y 120 minutos

Volumen de agua 5 ml

Cuadro 4. Series Elutrópicas de eluyentes

Según G. Wohlleben ⁴⁶	Según H.H Strain ⁴⁷
n-pentano	Eter de petróleo (p. eb 30-50 °C)
Eter de petróleo	Eter de petróleo (p. eb 50-70 °C)
n-hexano	Eter de petróleo (p. eb 70-100 °C)
Ciclohexano	Tetracloruro de carbono
Tetracloruro de carbono	Ciclohexano
Tricloroetileno	Sulfuro de carbono
Benceno	Eter dietílico
Diclorometano	Acetona
Cloroformo	Benceno
Dietileter	Tolueno
Acetato de etilo	Esteres de ácidos orgánicos
Piridina	1,2-dicloroetano, cloroformo, diclorometano
Acetona	Alcoholes
n-propanol	Agua
Etanol	Piridina
Metanol	Ácidos orgánicos
Agua	Mezclas de ácidos con bases, agua, alcoholes ó piridina

Estas series son de gran ayuda para la elección del eluyente adecuado. Las mezclas de dos o tres disolventes de polaridad distinta muchas veces dan mejores separaciones que eluyentes químicamente uniformes.

Para la estandarización se usó el diseño experimental DIA 4 x 3 (4 tratamientos x 3 réplicas), (según la Tabla 2); teniendo en cuenta como mejor tratamiento el que proporcione el mayor número de compuestos; evaluado mediante análisis con GC-MS y estadístico por Andeva.

Tabla 2. Tratamientos aplicados a la extracción del aroma

TRATAMIENTOS	SOLVENTE	TIEMPO EXTRACCIÓN
1	Mezcla solventes Diclorometano-acetato de etilo 2:1	60 minutos
2	Mezcla solventes Diclorometano-acetato de etilo 2:1	120 minutos

⁴⁶ WOHLLEBEN, G. En: Handbuch der Lebensmittel-chemie, Tomoll, Parte I, Edición Springer, 1963. p.12.

⁴⁷ STRAIN H. Chromatographic Adsorption Analysis. Nueva York: Interscience Publ, Inc, 1942. p.12.

3	Diclorometano	60 minutos
4	Diclorometano	120 minutos

Las muestras obtenidas se colectaron en viales de 1.5 ml y se almacenaron en refrigeración, después de agregar Na₂SO₄ anhidro con el fin de secarlas, para su posterior análisis por GC-MS.

3.3 EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE LA PLANTA OROZUL (*Phylla nodiflora L. Greene*)

La extracción del AE se llevó a cabo en el equipo de Hidrodestilación asistida por radiación con microondas (MWHD) perteneciente al grupo de Investigación de Productos Naturales de la Universidad de Nariño indicado en la Figura 10, con las características señaladas en la Tabla 3.

Figura 10. Equipo de MWHD, Universidad de Nariño

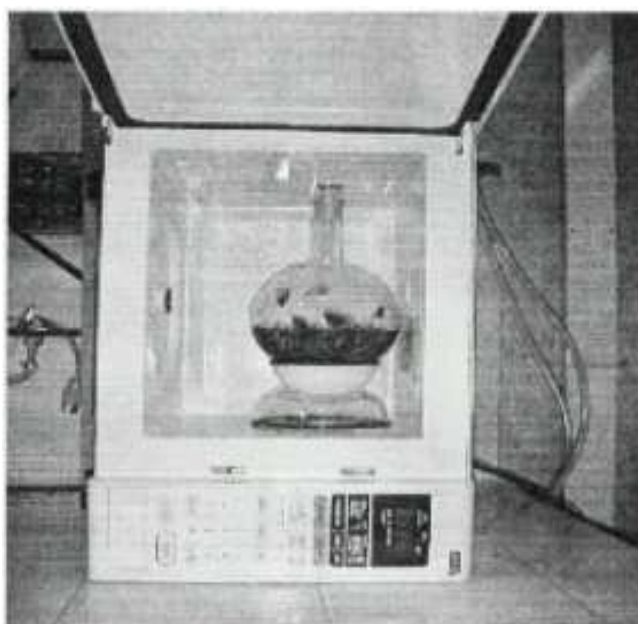


Tabla 3. Especificaciones para MWHD

CARACTERÍSTICAS	
Marca:	LG
Modelo	N. MB – 314 V 6
Voltaje.	120 v
Frecuencia:	2450 MHz

Las condiciones de operación se indican en la Tabla 4 y en la Tabla 5 los diferentes tratamientos aplicados.

Tabla 4. Parámetros operacionales para MWHD

CARACTERÍSTICAS	CONDICIONES
Material vegetal	150 g
Tiempo Extracción	30 y 60 min
Potencia	80 y 60 %
Solvente	Agua destilada 1000 ml

Tabla 5. Tratamientos aplicados para la extracción del AE por MWHD

TRATAMIENTOS	POTENCIA	TIEMPO EXTRACCIÓN
1	60 %	30 minutos
2	80 %	30 minutos
3	60 %	60 minutos
4	80 %	60 minutos

Para la estandarización se utilizó el diseño experimental DIA 4 x 3 (4 tratamientos x 3 réplicas), teniendo en cuenta como mejor tratamiento el que proporcionará el mayor número de compuestos, de acuerdo con los análisis por GC-MS y el análisis estadístico. Las muestras obtenidas se colectaron en viales de 1.5 ml, y se almacenaron en refrigeración, después de agregar Na₂SO₄ anhidro para secarlas, y realizar su posterior análisis.

3.4 ANÁLISIS PRELIMINAR GC-MS EN LA UNIVERSIDAD DE NARIÑO

El análisis por GC-MS para estandarizar los métodos de extracción del aroma y del AE, se realizó en el equipo de la Universidad de Nariño, ubicado en los Laboratorios Especializados indicado en la Figura 11, que posee las especificaciones señaladas en el Cuadro 5 y bajo las condiciones de la Tabla 6.

Cuadro 5. Especificaciones para GC - MS, Universidad de Nariño

CARACTERÍSTICAS	CONDICIONES
Marca	Shimadzu GC-MS QP - 5000
Columna	DB -5 de 30 m longitud, 0.25 mm d.i. y 0.25 µm espesor de fase estacionaria
Detector	MSD
Flujo óptimo*	1 ml/min
Límite de detección*	1 µL/L
Límite de cuantificación*	5 µL/L

*Gómez y Morán⁴⁸

Figura 11. Equipo Instrumental de GC-MS, Universidad de Nariño



Tabla 6. Condiciones operacionales para GC-MS, Universidad de Nariño

CARACTERÍSTICAS	CONDICIONES
Temperatura detector	280 °C
Temperatura inyector	250 °C
Temperatura columna	40 °C * 5 min 5 °C/min hasta 250 °C * 15 min
Gas de arrastre	Helio
Flujo interno	1 ml / min
Flujo total	25 ml / min
Presión	134 Kpa
Velocidad	40 cm/seg
Razón split less	10
Tiempo total	62 min

3.5 CUALIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS PRESENTES EN EL AROMA Y EL ACEITE ESENCIAL

⁴⁸ GOMEZ, Diana. MORAN, Mirosalba. Extracción e identificación de los metabolitos secundarios presentes en los frutos maduros de *Carica Candamarcensis Hooker filius*. Pasto. 2005. 123p. Trabajo de grado (Químico Puro) Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Grupo de investigación de Productos Naturales.

3.5.1 Cualificación de los compuestos del aroma y el aceite esencial. La posible identidad de los compuestos se estableció mediante el cálculo de los I_k con la ecuación (1) (Véase numeral 2.4), que posteriormente se compararon con los propuestos por Adams⁴⁹ y finalmente se hizo la identificación definitiva mediante el análisis GC-MS realizado en la Universidad Nacional de Colombia (Bogotá).

En la Universidad Nacional de Colombia (Bogotá) se encontró la identidad de cada compuesto tanto del aroma como del AE de la especie vegetal, usando CG-MS y la base de datos Wiley para productos naturales, analizando las muestras preparadas así: una alícuota de 0.3 ml de cada muestra se diluyó en 1 mL de diclorometano, se adiciona 0.4 µL de n-tetradecano como Istd ($\delta = 0.763$ g/mL) y se inyecta 0.4 µL a un cromatógrafo de gases Shimadzu GC 17A acoplado a un detector selectivo de masas QP5050, con una columna RTX – 5 (fenilmetil silicona, 30 m * 0.25 mm d.i), gas de arrastre Helio; a las condiciones indicadas en la Tabla 7.

Tabla 7. Condiciones operacionales para GC-MS, Universidad Nacional de Colombia

CARACTERÍSTICAS	CONDICIONES
Temperatura inyector	320 °C
Temperatura columna	60 °C * 4 min 4 °C/min hasta 320 °C por 25 min
Gas de arrastre	Helio
Flujo interno	1ml / min
Split	1:10

3.5.2 Posibles rutas de fragmentación para MS. El espectro de masas es una representación de las masas de los fragmentos cargados ionizados en función de su concentración relativa⁵⁰. Esta representación proporciona información útil acerca de la estructura de un compuesto químico.

3.5.3 Cuantificación de los compuestos del aroma y aceite esencial. En el método de estándar interno para cuantificar cada componente usando la Ecuación (2), (Véase numeral 2.4) se hace necesario calcular el Factor de Respuesta (Rf) del Istd, obtenido a partir de la pendiente de la recta que proporciona el área cromatografica de diferentes concentraciones de n-tetradecano, indicadas en la Tabla 8 y cuya repetibilidad se evaluó con la desviación estándar y el coeficiente de variación.

⁴⁹ ADAMS. Roberts. Identification of Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectroscopy. Ussa: Allured Publishing Corporation. 1995 P. 1-4.

⁵⁰ SILVERSTEIN, Op. cit., p. 23.

Tabla 8. Concentración del Istd con su respectiva área cromatográfica

Concentración n-tetradecano (p.p.m)
1
5
10
50
100
500
1.000

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 RECOLECCIÓN E IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA ESPECIE VEGETAL

La investigación de los componentes del aroma y del AE de la especie vegetal ***Phyla nodiflora L. Greene***, inició con la selección de la planta, teniendo en cuenta su reconocimiento dentro de la medicina tradicional en la región; para ubicar el sitio de muestro de dicha planta se hizo necesario llevar a cabo un recorrido preeliminar, las observaciones condujeron al Municipio del Tambo (Nariño), donde crecen arbustos durante casi toda la temporada del año.

Cuadro 6. Clasificación taxonómica de la especie vegetal ***Phyla nodiflora L. Greene***

CARACTERÍSTICA	CLASIFICACIÓN
Nombre científico	<i>Phyla nodiflora L. Greene</i>
Nombre Común	Orozul - fogfruit
Reino	Vegetal
Género	Phyla
Clase	Dicotiledónea
Familia	Verbenacea
Orden	Lamial

La clasificación taxonómica indicada en el Cuadro 6 se realizó en la Universidad del Cauca por el Doctor Bernardo Calvache en el Herbario del Museo de Historia Natural.

4.2 ESTANDARIZACIÓN PARA EL METODO DE EXTRACCION DEL AROMA

Para reconocer las mejores condiciones de extracción del aroma de las hojas de la especie vegetal ***Phyla nodiflora L. Greene*** se estandarizó la técnica de DES con el diseño experimental DIA, porque ofrece flexibilidad en cuanto al número de tratamientos y repeticiones, además se puede evaluar la variabilidad de cada tratamiento. Se tomó como factor de análisis, el mayor número de compuestos extraídos en 4 tratamientos con 3 repeticiones, como se indica en la Tabla 2 (ver numeral 3.2).

Para la selección de acetato de etilo y diclorometano como solventes de extracción se consideró la naturaleza química de las sustancias a extraer, como se sabe que los compuestos responsables del aroma en los vegetales, son de tipo alcanos,

alcohol, aldehídos, cetonas y ácidos, se observa que a excepción de los alcanos las demás funciones químicas tienen una relativa polaridad, por tanto y según el Cuadro 7 que indica el orden decreciente de polaridad de solventes, son los apropiados para la extracción⁵¹.

Cuadro 7. Polaridad de algunos solventes y solutos

DISOLVENTE	SOLUTO
Agua	Sales inorgánicas y orgánicas
Glicoles	Azúcares y taninos
Alcohol metílico y etílico.	Aceite de ricino, ceras.
Aldehídos, cetonas y alcoholes superiores, éteres, ésteres, halogenuros de alquilo y óxidos.	Resinas, ACEITES VOLATILES, electrolitos débiles, incluyendo barbituratos, alcaloides y fenoles.
Hexano, benceno y tetracloruro de carbono, éter etílico, éter de petróleo, aceites minerales y aceites vegetales.	Aceites fijos, grasas, vaselina, parafinas.

Fuente: Organic Solvents [en línea] [citado 12-12-2004] Disponible en Internet: [http://www.cucba.udg.mx/new/publicaciones/page_ibugana/ibugana_11\(2\).pdf](http://www.cucba.udg.mx/new/publicaciones/page_ibugana/ibugana_11(2).pdf).

Se preparó una mezcla de estos solventes en la proporción 2:1, buscando asegurar la extracción máxima de compuestos del aroma.

En la Tabla 9 se indica el promedio del número de compuestos obtenidos en los diferentes tratamientos aplicados en la extracción por DES.

Tabla 9. Promedio de compuestos obtenidos en el aroma

	T1	T2	T3	T4
	5	7	8	4
	2	6	6	6
	6	5	5	3
\bar{x}	4.33	6.00	6.33	4.33

El análisis estadístico de los resultados (Anexo C) se indica en la Tabla 10.

Tabla 10. Andeva para compuestos del aroma

Fuente de validación	de Grados libertad	de Suma cuadrados	de Cuadrados medios	F calculada	F tabulada
Tratamientos	3	10.25	3.42	0.003	4,07 (95 %) 0,05 (99 %)
Error	8	7861.00	982.625		7,59

⁵¹ Organic Solvents [en línea] [citado 12-12-2004] Disponible en Internet: [http://WWW.cucba.udg.mx/new/publicaciones/page_ibugana/ibugana_11\(2\).pdf](http://WWW.cucba.udg.mx/new/publicaciones/page_ibugana/ibugana_11(2).pdf).

Total	11	7871.25
-------	----	---------

Teniendo en cuenta lo referenciado por Legarda⁵² en el andeva si la F calculada es mayor que la F tabulada, se considera que hay diferencia significativa entre los tratamientos, pero si es menor a la probabilidad dada (1 %, 5 %) se considera que no hay diferencias detectables entre tratamientos.

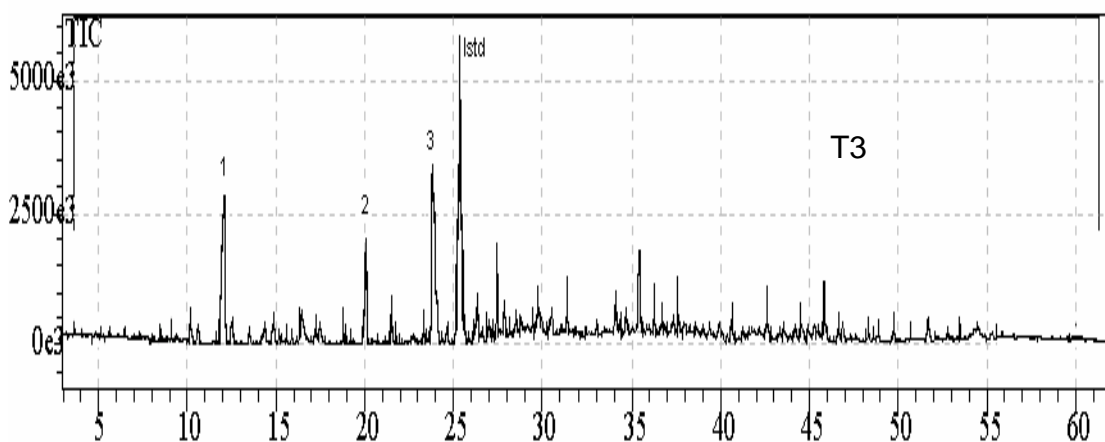
Por lo tanto, se puede concluir que no existe diferencia significativa entre los tratamientos aplicados para la extracción del aroma, ya que la F calculada es menor que la F tabulada, tanto al 95 % como al 99 %. Considerando posible tomar cualquier tratamiento de los aplicados.

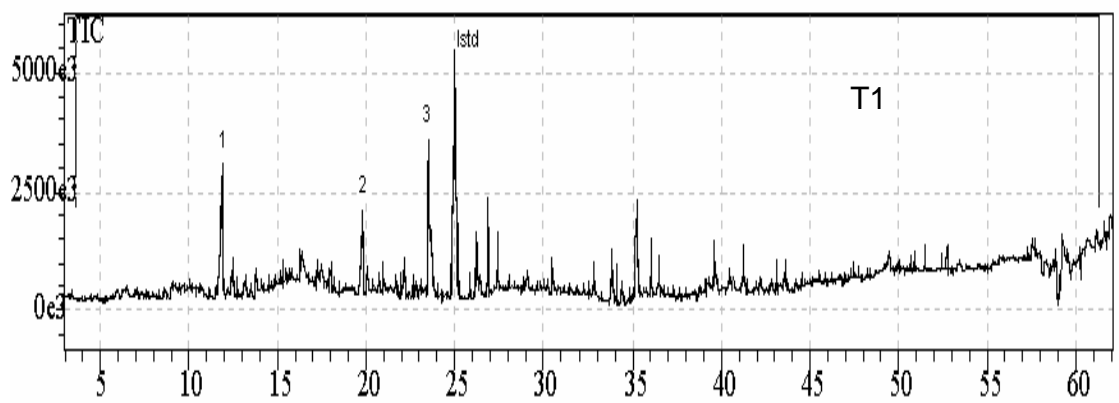
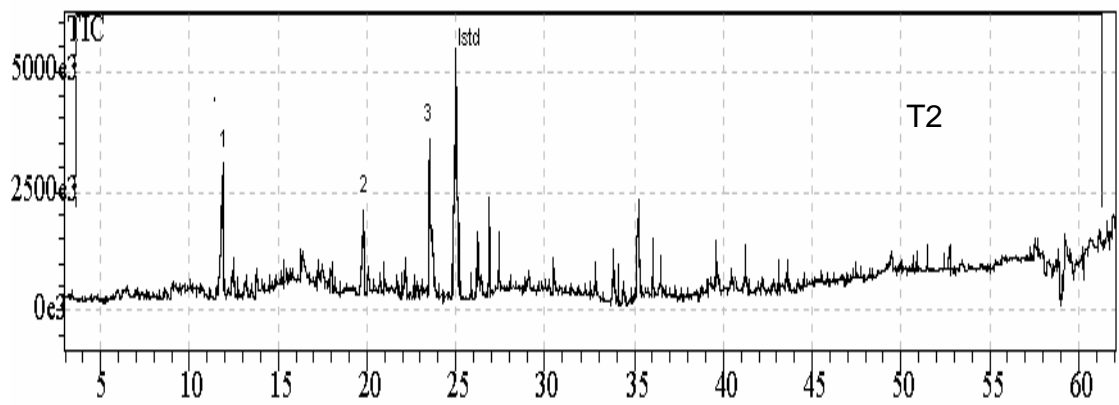
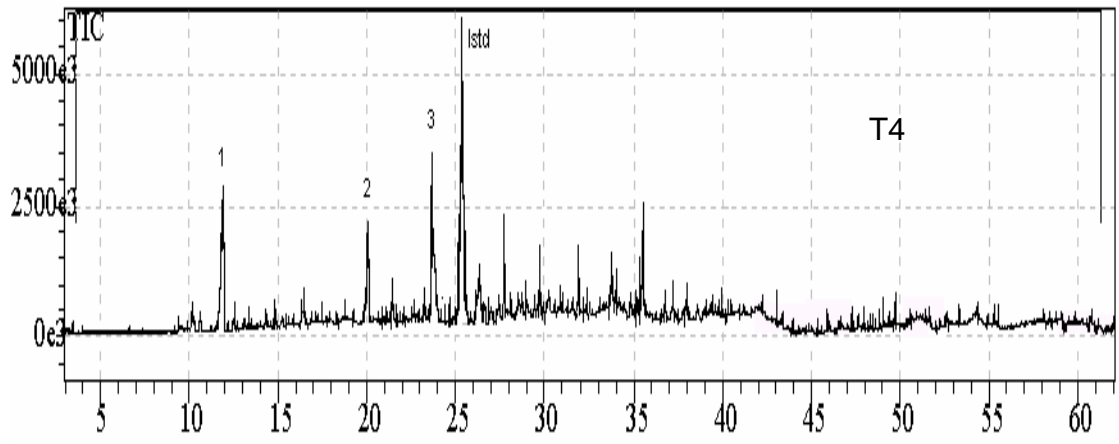
Si la extracción se realiza a 60 minutos, se obtiene mayor número de compuestos con diclorometano, pero si se realiza a 120 minutos, es mayor el número con la mezcla de solventes. Entre la extracción con diclorometano a 60 minutos y la mezcla de solventes a 120 minutos, se presenta una diferencia con respecto a la línea base y las señales de ruido que coloca al diclorometano como el mejor extractor de los compuestos del aroma. Además el análisis comparativo de los perfiles cromatograficos indicados en la Figura 12 muestra que el cromatograma obtenido con el tratamiento T3 presenta una mejor resolución, altura y ancho en el pico para cada compuesto, además una buena línea base. Por tal razón se continuarón los análisis con diclorometano durante 60 minutos, seleccionando los picos señalados como 1, 2, 3 porque aparecen en los cuatro cromatogramas.

Figura 12. Perfiles cromatográficos del aroma obtenidos en la Universidad de Nariño por GC-MS

T3) Diclorometano a 60 minutos
T4) Diclorometano a 120 minutos

T1) Mezcla de solventes a 60 minutos
T2) Mezcla de solventes a 120 minutos





4.3 IDENTIFICACION PRELIMINAR DE LOS COMPUESTOS DEL AROMA POR INDICES DE KOVATS

La identificación preliminar por IK se realizó calculando este valor con la Ecuación (1) (véase numeral 2.4) y al comparar con los datos recopilados en ADAMS,⁵³ no se aporta datos precisos sobre el nombre de cada compuesto según la Tabla 11.

Tabla 11. Identificación por Ik de los compuestos del aroma

No. Compuesto	tr	* IK cal	* IK rep	Nombre Probable
1	12.053	1031	1022	1-metil-2-(1-metiletil) benceno
			1023	Trimetil benceno
			1026	1-metil-4-(1-metiletil) ciclohexeno
			1027	1-metil-4-(1-metiletil) benceno
			1031	Limoneno
			1031	3-metileno-6-(1-metiletil) ciclohexeno
			1032	Acetilpiridina
			1032	Bencenometanol
			1033	Cineol
			1034	Tiazol 2- (2-metilpropil)
			2	20.185
1252	Carvona			
1252	Piperitona			
1253	Chavinol			
1253	Hidrato acetato sabineno			
1255	Geraniol			
1256	Fenil etenil acetato			
1257	Linalol acetato			
1257	Acido fenil metil ester propanoico			
1258	Mirtanol			
3	24.215	1373	1366	Metilundecanol
			1367	Acido 2-furanilmetenilester hexanoico
			1368	Ciclosativeno
			1369	1-propanol-3-fenil acetato
			1370	Orcinol
			1379	Acido cinamico – metilester
			1380	Malieno
			1380	Fenil – 4 – metil –3- pentanona


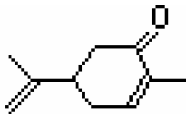
⁵³ ADAMS. Op. Cit., p 1-4.1369

1380 Damascenona
 1380 Dauceno

4.4 IDENTIFICACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS

En la Tabla 12 se muestra la identificación por GC-MS de los compuestos encontrados en el aroma.

Tabla 12. Identificación por GC-MS de los compuestos del aroma

No. Compuesto	Nombre del compuesto	% Similitud	Estructura
1	“Limoneno”	95	
2	“Carvona”	95	
3	3-metiltridecano	91	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH})_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$

Como se observa el porcentaje de similitud supera el 90 % en todos los compuestos, con lo que se tiene un alto grado de confiabilidad con respecto a la identidad de cada compuesto.

La causa principal de la ineficiencia con los IK se atribuye básicamente a que estos valores se comparan a unas condiciones operacionales diferentes, con una base de datos que utiliza la columna DB-5 con los realizados en una columna RTX-5, que a pesar de tener similitud en polaridad pueden presentar variación⁵⁴.

La comparación de los análisis por GC – MS de la Universidad de Nariño, Figura 13, con los de la Universidad Nacional, Figura 14, muestra el mismo número de picos, con lo que se asume que se trata de los mismos compuestos, ya que se tienen las mismas áreas cromatográficas. En la Figura 13 en los minutos superiores a 30 minutos se observa señales que en un principio se tomaron como compuestos de interés en el aroma, sin embargo, según Osorio⁵⁵ podrían ser impurezas, señales de ruido, que según Keulemans⁵⁶ pueden originarse debido a

⁵⁴ H, Ray. E, Daniel. Handbook of Drug Analysis. Applications in Forensic and Clinical Laboratories. Washington: American Chemical Society, 1997. p. 133.

⁵⁵ OSORIO, Coralia. Profesor asistente. Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 2006.

⁵⁶ KEULEMANS. A. Gas Chromatography. Reinhold Publ. ⁵³ Corp. Nueva York. 1957. pag 25.

la contaminación de las partes internas del CG-MS, el sangrado del septum o de la fase estacionaria de la columna, impurezas del gas de arrastre e incluso presencia de parafinas que podrían verificarse con ayuda de estándares.

Figura 13. Perfil cromatografico GC-MS para aroma – Universidad de Nariño

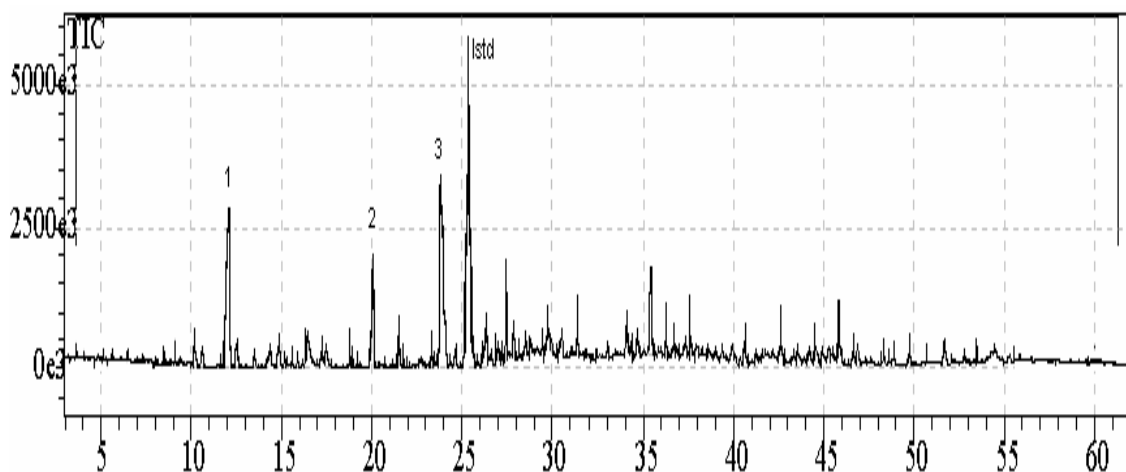
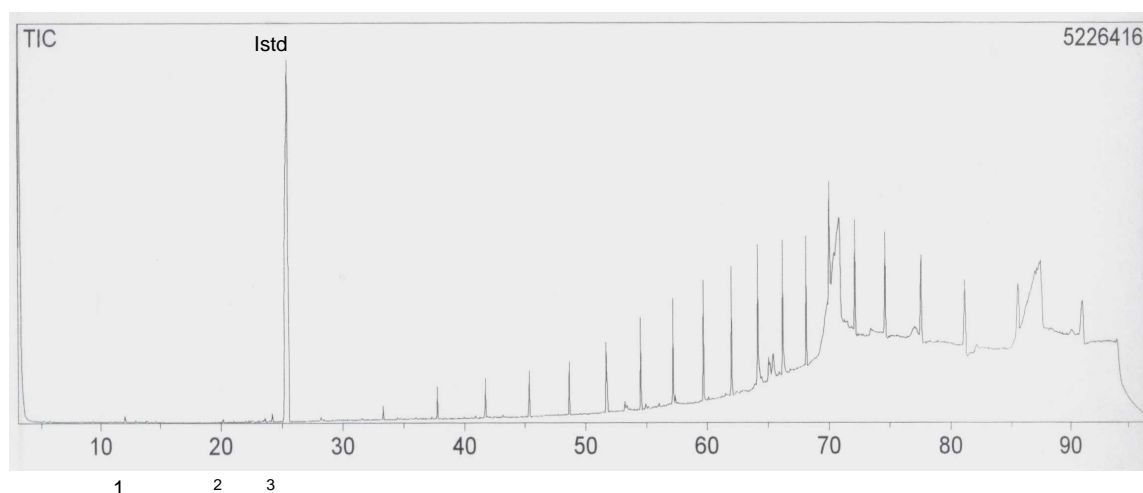


Figura 14. Perfil cromatografico GC-MS para aroma Universidad Nacional



En la Tabla 13 se indica la clasificación de los compuestos según el número de isoprenos en su estructura, referenciada por Bu'lock⁵⁷. Según esta clasificación los compuestos presentes en el aroma de las hojas de la especie vegetal *Phylla nodiflora L. Greene*, se agrupan como lo indica la Tabla 14.

Tabla 13. Clasificación por número de isoprenos

⁵⁷ BU'LOCK. Op. cit., p. 67-92

NOMBRE	FÓRMULA MOLECULAR	No. UNIDADES DE ISOPRENO
Monoterpenos	C ₁₀ H ₁₆	2

Tabla 14. Clasificación de los compuestos del aroma

CLASIFICACIÓN	COMPUESTO
Monoterpenos	Limoneno Carvona
Hydrocarburos saturados	3-metiltridecano

4.5 CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS DEL AROMA POR EL MÉTODO DEL ESTANDAR INTERNO

Para cuantificar los compuestos identificados, como se indica en la Tabla 16 se uso la Ecuación 2 (véase numeral 2.4). Los datos para el cálculo del Rf con su respectiva estadística, se muestran en la Tabla 15 y en la Figura 15 la gráfica correspondiente a la curva de calibración.

Tabla 15. Datos para la curva de calibración del Istd

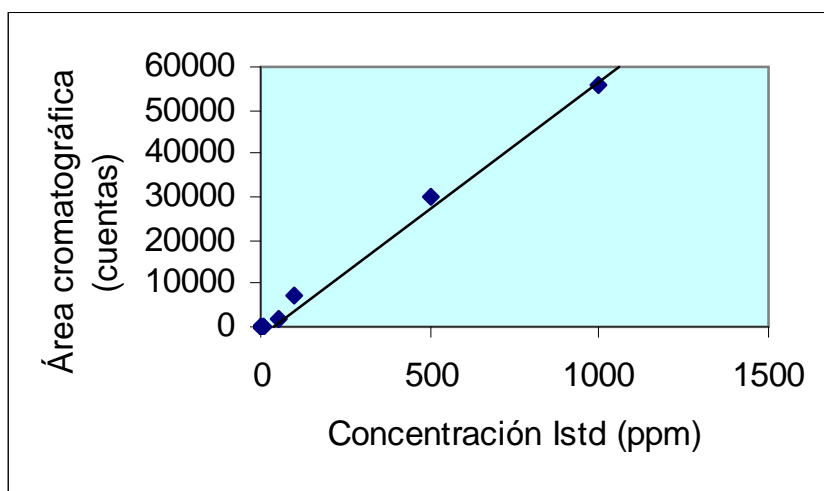
Concentración Istd	Áreas cromatográficas (Cuentas)	\bar{X}^*	δ^*	CV*	95 %LC*
1 ppm	35	33.670	1.530	4.54	3.792
	34				
	32				
5 ppm	113	119.332	5.500	4.61	13.654
	123				
	122				
10 ppm	226	226.333	1.527	0.675	3.792
	225				
	228				
50 ppm	1523	1523.000	1.000	0.065	2.483
	1522				
	1524				
100 ppm	6998	7062.667	101.791	1.44	252.71
	7180				
	7010				
500 ppm	29989	30075.67	75.082	0.25	184.4
	30121				
	30117				
1000 ppm	55613	55524.33	86.58	0.156	214.95
	55440				
	55520				

X*: Media

δ^* : Desviación estándar

CV*: Coeficiente de variación
 95%LC*: Límite de confianza al 95%

Figura 15. Curva de calibración para el Istd



En el análisis estadístico, Tabla 15, para la anterior curva de calibración se obtuvo un CV que no supera el 5 %; según Legarda⁵⁸ debe mantenerse en toda investigación a nivel de laboratorio, puesto que las condiciones de trabajo son más uniformes y homogéneas, reduciendo la variación en los resultados. En la ecuación de la recta, la pendiente representa el Rf correspondiente a 56.26 cuentas*L/μL equivalente a 73735.25 cuentas*L/mg, valor que se tiene en cuenta para el cálculo de las concentraciones de cada compuesto.

En la Tabla 16 se indican las respectivas concentraciones para cada uno de los compuestos identificados en el aroma.

Tabla 16. Cuantificación de los compuestos del aroma

No. Compuesto	Nombre del Compuesto	Area cromatográfica (cuentas)	Concentración (mg/Kg vegetal)
1	Limoneno	409904	0.143
2	Carvona	214132	0.070
3	3-metiltridecano	507790	0.184

De los 3 compuestos encontrados e identificados en el aroma de las hojas de la especie vegetal *Phyla nodiflora L. Greene*, el 3 – metiltridecano se encuentra en mayor proporción, seguido por el limoneno y finalmente el carvona.

⁵⁸ LEGARDA. Op. Cit., p. 49

4.6 ESTANDARIZACIÓN PARA EL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL POR HIDRODESTILACIÓN ASISTIDA POR RADIACIÓN CON MICROONDAS

Para seleccionar las mejores condiciones de extracción de AE en la especie vegetal *Phyla nodiflora L. Greene* se estandarizó la técnica MWHD con un diseño experimental DIA, basado en el mayor número de compuestos extraídos, en 4 tratamientos con 3 repeticiones registrados en la Tabla 5 (ver numeral 3.3) (Anexo C).

4.7 ANALISIS DE VARIANZA PARA HIDRODESTILACIÓN ASISTIDA POR RADIACIÓN CON MICROONDAS

El parámetro de estudio para el Andeva, es el mayor número de compuestos obtenidos en los diferentes tratamientos, en la Tabla 17 se indica el promedio de éstos.

Tabla 17. Promedio de compuestos obtenidos en el AE

T1	T2	T3	T4
13	15	12	10
10	12	13	9
8	11	13	13
\bar{x} 10.33	12.67	12.67	10.67

El Andeva para la extracción del AE por MWHD se indica en la Tabla 18.

Tabla 18. Andeva de AE para MWHD

Fuente de validación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Fcalculada	Ftabulada
Tratamientos	3	1408,33	469,44	6,95	8,84 (95 %) 27,49 99 %)
Error	8	540,67	67,58		
Total	11	1949,00			

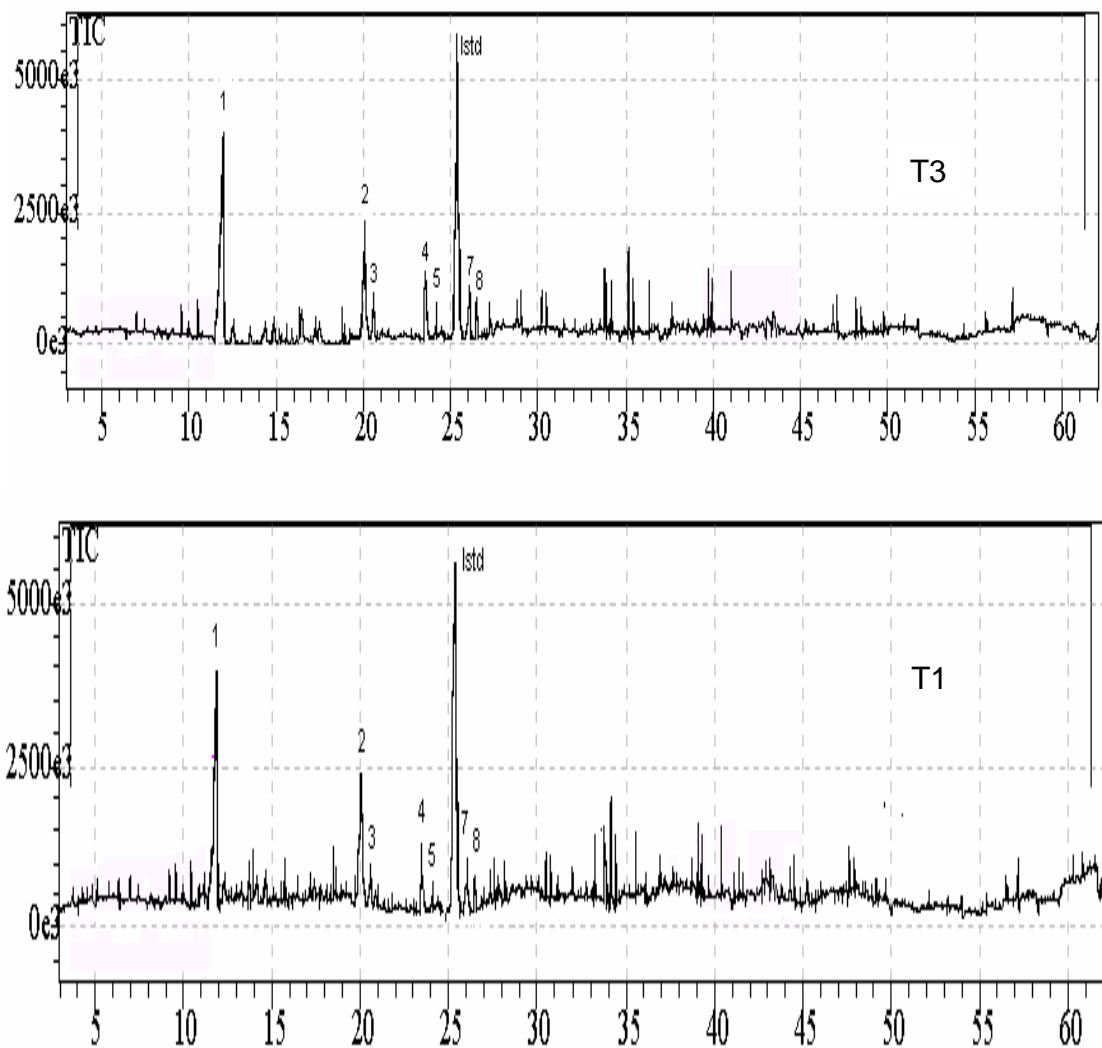
El Andeva, indica que no existe diferencia significativa entre los tratamientos aplicados para la extracción del AE, ya que la Fcalculada es menor que la Ftabulada, tanto al 95 % como al 99 %. Por lo tanto, es posible tomar cualquier tratamiento.

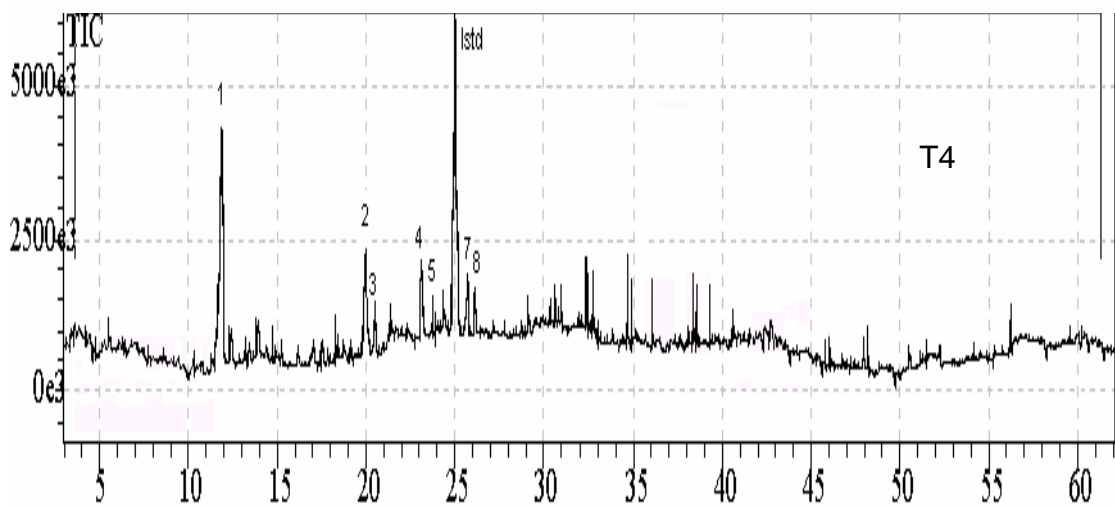
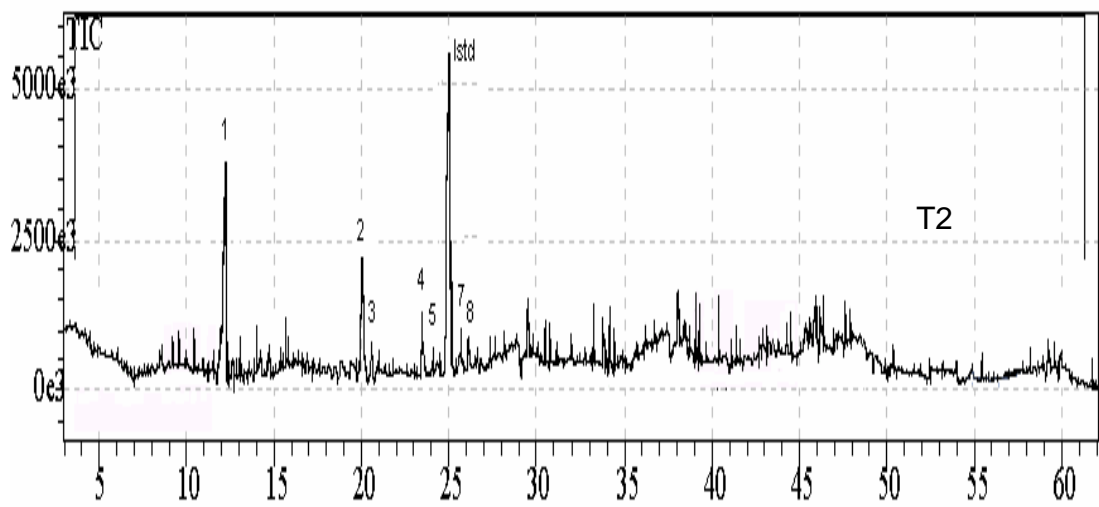
Los estudios posteriores se llevan a cabo con el AE obtenido a 60 % de potencia durante 60 minutos, porque en la comparación de los perfiles cromatograficos indicados en la Figura 16, en el cromatograma obtenido con el tratamiento T3, se presenta buena separación entre cada pico y por tanto una buena resolución, mientras que en los cromatogramas obtenidos con los tratamientos T2, T3 y T4 tienen una línea base poco defina y señales de ruido mayores, este hecho se hace más evidente en el cromatograma T1 y en el cromatograma T4.

Figura 16. Perfiles cromatografico por GC-MS de AE – Universidad de Nariño

T3) Potencia 60 % a 60 minutos
T1) Potencia 60 % a 30 minutos

T2) Potencia 80 % a 30 minutos
T4) Potencia 80 % a 60 minutos





4.8 CALCULO DE RENDIMIENTO DE ACEITE ESENCIAL

$$\% \text{RENDIMIENTO} = \frac{\text{Volumen de aceite esencial (ml)}}{\text{Material vegetal utilizado (g)}} * 100$$

$$\% \text{RENDIMIENTO} = \frac{0.3 \text{ ml}}{\text{Material vegetal utilizado (g)}} * 100 = 0.2$$

150 g

4.9 IDENTIFICACION PRELIMINAR DEL ACEITE ESENCIAL POR INDICES DE KOVATS

La identificación por IK, con la Ecuación 1 (véase numeral 2.4) arroja los resultados indicados en la Tabla 19.

Tabla 19. Ik, según ADAMS⁵⁹, para los compuestos extraídos del AE

No.	Tr	*	*	
Compuesto	Compuesto	IK cal	IK rep	Nombre compuesto
1	12.112	1033	1027	1-metil-4-(1-metiletil) benceno
			1031	Limoneno
			1031	3-metileno-6-(1-metiletil) ciclohexeno
			1032	Acetilpiridina
			1032	Bencenometanol
			1033	Cineol
			1034	Tiazol – 2- 82-metilpropil)
			1034	Acido 2- metil – propil ester 2- butenoico
			1037	3-metil-2,5-dimetil-4-hexen-2-ol
			1039	Lactona lavander
			1040	Ocimeno
2	20.283	1256	1252	Carvona
			1252	Piperitona
			1253	Chavinol
			1253	Hidrato acetato sabineno
			1255	Geraniol
			1256	2- Fenil etenil acetato
			1257	Acetato linalol
			1257	Acido propanoico – fenil metil ester
			1258	Mirtanol
			1259	Alcohol cinamil
			1258	2-decenal
3	20.555	1264	1261	Acido – 3,7-dimetil-metilester 6-octenoico
			1262	Acetato crisantenil
			1263	o- acetato guaicol
			1263	Ambersage
			1263	9-decen-1-ol
			1266	Cinamaldehido
			1267	Etilsalicilato
			1269	Acido 2-furanilmetilester – pentanoico
			1270	3,7 – dimetil – 2,6 – octadienal

⁵⁹ ADAMS. Op. Cit., p. 35

			1270	1-hexanol-5-metil-2(1-metiletil) acetato
4	23.615	1355	1351	Carvometil acetato
			1351	Cuveveno
			1351	Longipineno
			1354	Damascona
			1354	6-octen-1-ol-3,7-dimetil-acetato
			1355	Timolacetato
			1356	Dihidrocarveolacetato
			1356	Eugenol
			1357	Octadecanal
			1359	Damascenona
			1360	Nonalactona
5	24.169	1371	1365	Nerilacetato
			1366	2-metil-undecanal
			1367	Furfuranilhexanoato
			1368	Ciclosativeno
			1369	Hidrocinaamilacetato
			1370	Orcinol
			1379	Metilcinamato
			1380	Malieno
			1380	4-metil-1-fenil-3-pentanona
			1380	Damascenona
7	26.188	1432	1425	Metilundecanoato
			1426	Ionona
			1429	Tujoseno
			1429	Coumarina
			1429	Isobornil isobutirato
			1432	Calareno
			1433	Gama elemeno
			1434	Merilacetona
			1436	Ambrinol
			1436	Cedrano
8	26.526	1445	1443	Fenil acetatp (2,6-dimetoxi)
			1443	Vestitenona
			1443	Silfineno
			1443	Farneseno
			1444	Bakerol
			1447	Isoeugenol
			1447	Kusimeno
			1447	Himacaleno
			1449	Santaleno
			1452	Etilvanillin

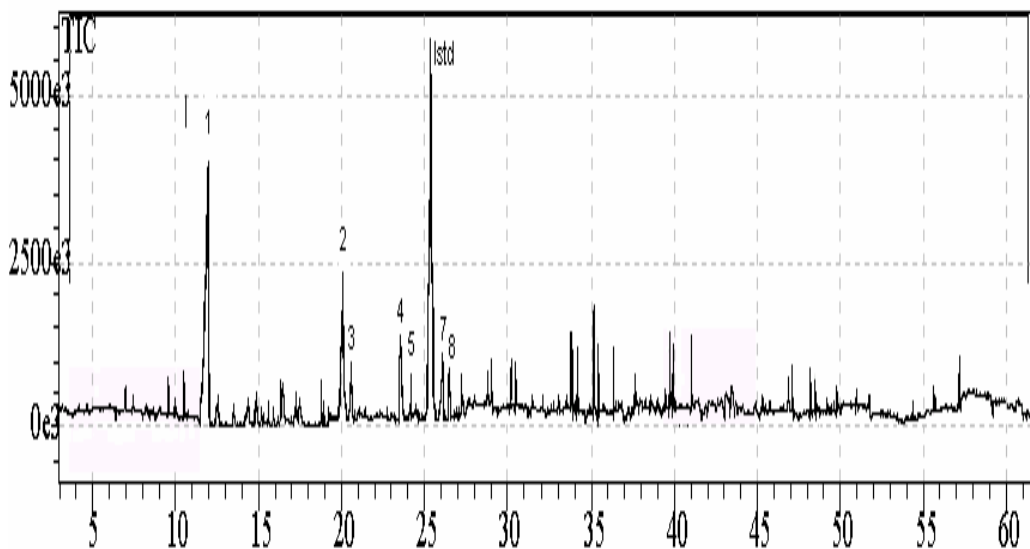
*Ik cal: Indice de Kovats calculado

*Ik rep: Índice de Kovats reportado

Los posibles nombres de los 7 compuestos encontrados se indican según los índices de Kovats reportados en la literatura⁶⁰. Sin embargo, no es posible asegurar con certeza que efectivamente dichos compuestos tienen esa identidad, ya que el grado de incertidumbre es suficientemente alto, puesto que se muestran, en algunos casos 10 nombres posibles para cada índice de Kovats y elegir cual de ellos corresponde exactamente, solo es posible con el análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, en el que se muestren porcentajes altos de similitud de cada compuesto de interés al compararlo con la base de datos apropiada.

Al observar y comparar la Figura 17 y Figura 18, que indican los cromatogramas para el AE realizados en la Universidad de Nariño y en la Universidad Nacional, respectivamente, hay coincidencia en las señales principales hasta un tiempo de 30 minutos, para tiempos posteriores en la Figura 17, hay señales que inicialmente se tomaron como posibles compuestos de interés presentes en el AE, pero según Osorio⁶¹ corresponden a impurezas, señales de ruido o parafinas cuya presencia se justifica según lo expuesto por Keulemans⁶².

Figura 17. Perfil cromatografico de Aceite esencial – Universidad de Nariño

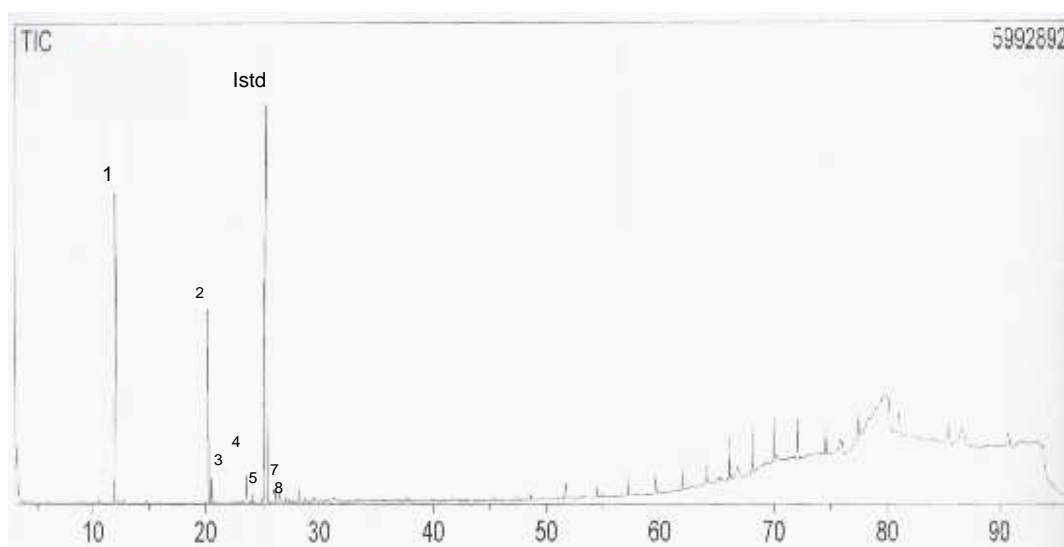


⁶⁰ Ibid. p. 36

⁶¹ OSORIO. Op. Cit.,

⁶² KEULEMANS, Op. Cit., p. 25



Figura 18. Perfil Cromatografico de Aceite Esencial - Universidad Nacional

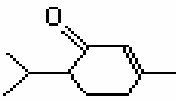
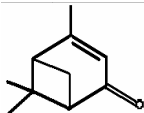
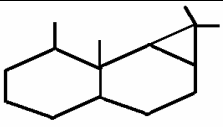
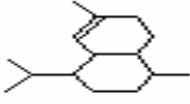


4.10 IDENTIFICACION DEL ACEITE ESENCIAL POR ESPECTROMETRIA DE MASAS

Con ayuda de la CG-MS se reportan los compuestos indicados en la Tabla 20 como se observa el porcentaje de similitud de los compuestos reportados por la base de datos, es lo suficientemente alto como para aceptar la identidad de cada componente del AE de las hojas de ***Phyla nodiflora L. Greene.***

Tabla 20. Identificación por GC-MS de los componentes del AE

No. Compuesto	Tiempo de Retención	Nombre del compuesto	% Similitud	Estructura
1	12.212	Limoneno	95	
2	20.283	Carvona	95	

3	20.555	Piperitona	85	
4	23.615	Verbenona	85	
5	24.169	3-metiltridecano	90	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$
7	26.188	Calareno	83	
8	26.526	Muroleno	84	

4.11 CUANTIFICACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL POR EL MÉTODO DEL ESTÁNDAR INTERNO

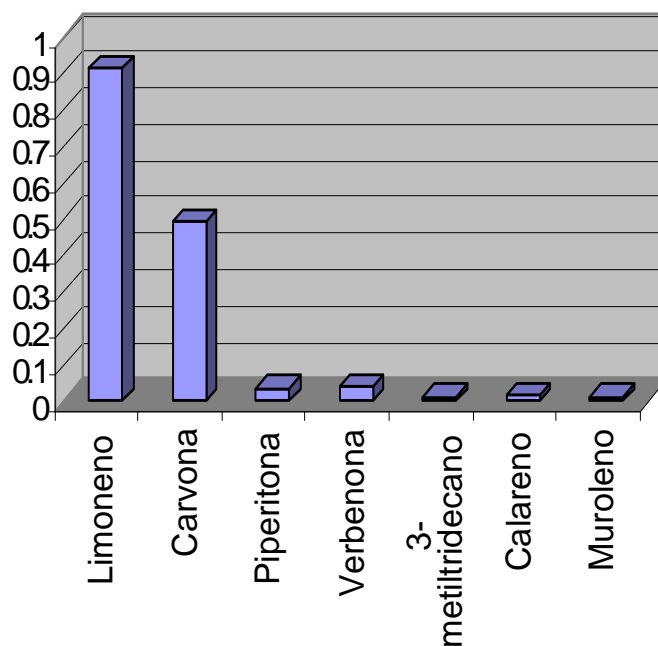
Los componentes identificados en el AE de la especie vegetal *Phyla nodiflora L. Greene* también se cuantificaron por el método del estándar interno, con la Ecuación 2 (véase numeral 2.4). Los valores de concentración Tabla 21 se calculan con el mismo Rf que se tuvo en cuenta para los compuestos del aroma, (véase numeral 4.5).

Tabla 21. Concentración de los compuestos del AE

No. Compuesto	Nombre del Compuesto	Area cromatografica (cuentas)	Concentración (mg/Kg vegetal)
1	Limoneno	33686512	0.914
2	Carvona	18186569	0.493
3	Piperitona	1272310	0.035
4	Verbenona	1506301	0.041
5	3 – metiltridecano	399978	0.011
7	Calareno	580974	0.016

Dentro de los componentes del AE los compuestos mayoritarios son el limoneno y la carvona, mientras que el 3-metiltridecano representa el compuesto con la menor concentración, como se observan en la Figura 19.

Figura 19. Concentración en ppm de los componentes identificados en el AE



La clasificación de los compuestos identificados en el AE de la especie vegetal *Phyla nodiflora L. Greene* se indican en la Tabla 22.

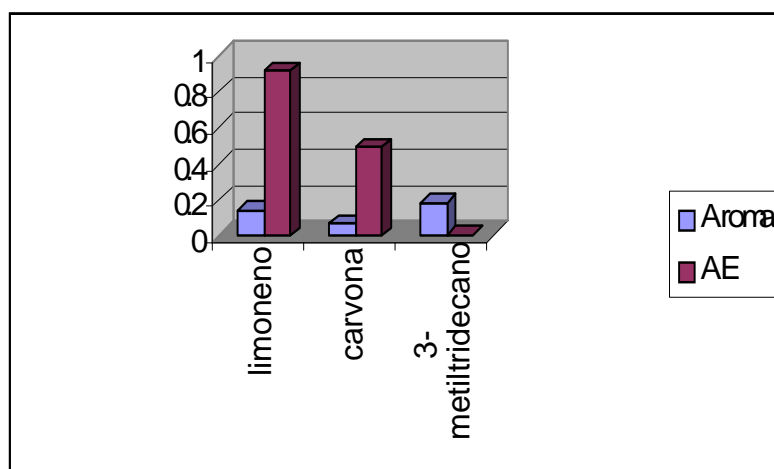
Tabla 22. Clasificación de los compuestos del AE

Clasificación	Compuesto
Monoterpenos	Limoneno
	Carvona
	Piperitona
	Verbenona
Sesquiterpenos	Calareno
	Muroleno
Hidrocarburo saturado	3-metiltridecano

4.12 COMPARACIÓN ENTRE LOS COMPUESTOS OBTENIDOS EN EL AROMA Y EN EL ACEITE ESENCIAL DE LA ESPECIE VEGETAL *Phyla nodiflora L. Greene*

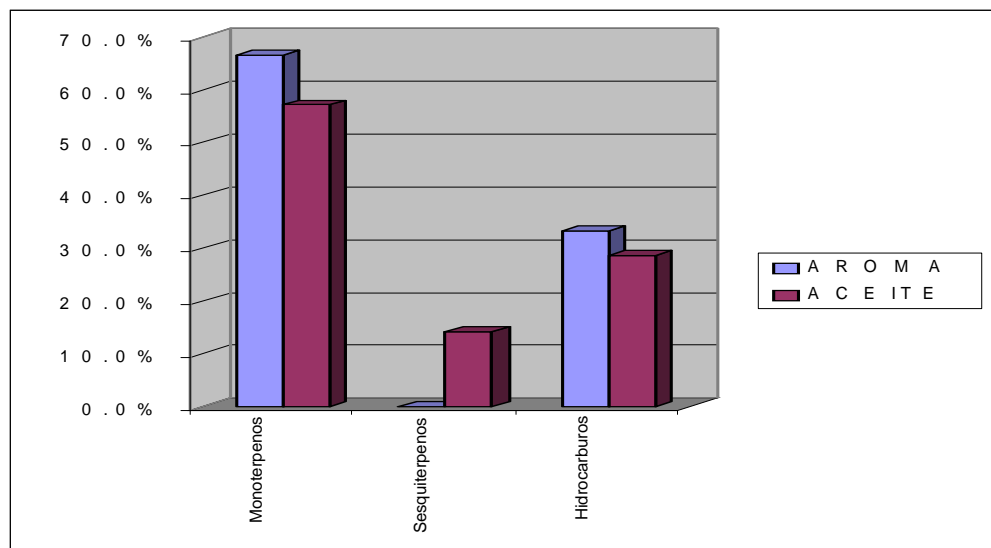
De la totalidad de compuestos identificados el limoneno, la carvona y el 3 – metil tridecano se conservan en el aroma y en el AE de la especie vegetal *Phyla nodiflora L. Greene*, en concentraciones diferentes como lo indica la Figura 20.

Figura 20. Concentraciones de los compuestos que se conservan tanto en el AE como en el aroma



La presencia de monoterpenos, sesquiterpenos e hidrocarburos saturados presentes en el aroma y el AE de la especie vegetal se indica en la Figura 21.

Figura 21. Monoterpenos- sesquiterpenos – hidrocarburos saturados presentes en el AE



4.13 USOS Y APLICACIONES DE LOS COMPUESTOS ENCONTRADOS EN EL AROMA Y EN EL ACEITE ESENCIAL

En el cuadro 8 se muestran los usos y aplicaciones de algunos de los compuestos identificados tanto en el aroma como en el AE de la especie vegetal *Phyla nodiflora L. Greene*.

Cuadro 8. Usos y aplicaciones de algunos de los compuestos identificados tanto en el aroma como en el AE de la especie vegetal *Phyla nodiflora L. Greene*.

COMPUESTO	USOS Y APLICACIONES
Limoneno	En los últimos años ha adquirido una singular importancia debido a su demanda como disolvente biodegradable.
Carvona	se utiliza en farmacia, cosmética y para la preparación de licores.
Verbenona	Acción antiinflamatoria en la zona respiratoria y por su buena capacidad muco-reguladora. Debido a su aroma agradable, se utiliza en perfumería, herbarios, y remedios herbarios.

Dentro de la estructura celular de la planta el 3-metiltridecano cumple la función de estabilizar y proteger las membranas vegetales contra las altas temperaturas o la alteración de la floración de las plantas vecinas.

En el Anexo B se indican las posibles rutas de fragmentación de los compuestos identificados tanto en el aroma como en el AE.

5. CONCLUSIONES

Con la técnica de extracción del aroma por el método DES se logró identificar tres compuestos el limoneno, la carvona y el 3-metiltridecano.

En el aroma el compuesto de mayor concentración corresponde al hidrocarburo 3-metiltridecano (0.184 ppm) y el de menor la carvona (0.070 ppm).

La variación de la potencia y el tiempo de extracción de la cantidad de componentes extraídos del AE por MWHD no afectó los resultados.

Con el método de MWHD se logró identificar siete compuestos en el aceite esencial correspondientes a: Limoneno, Carvona, Piperitona, Verbenona, 3 – metiltridecano, Calareno, Muroleno

En el AE el compuesto de mayor concentración corresponde al limoneno (0.914 ppm) y el de menor al 3-metiltridecano (0.011 ppm).

El aroma y el AE tienen en común tres compuestos a saber: limoneno, carvona, 3-metiltridecano.

En el aroma de la especie vegetal ***Phyla nodiflora L. Greene*** de los tres compuestos identificados, dos de ellos corresponden a monoterpenos y uno a hidrocarburos saturados

En el AE de la especie vegetal ***Phyla nodiflora L. Greene*** de los siete compuestos identificados, cuatro de ellos corresponden a monoterpenos, dos a sesquiterpenos y uno a hidrocarburos saturados.

6. RECOMENDACIONES

Dentro de los análisis adicionales para el aroma y el aceite esencial de la especie vegetal ***Phyla nodiflora L. Greene***, se recomienda:

Realizar otros estudios de actividad biológica.

Establecer la comparación con otros métodos de extracción como la microextracción en fase sólida (SPME) ó el uso de fluidos supercríticos (CSF) y arrastre con vapor.

Estos análisis complementarios se realizarían con el propósito de elegir el mejor método de extracción que proporcione alta pureza y calidad de los analitos y a su vez no provoque riesgos para la salud pública. Además el buen aprovechamiento de esta especie vegetal.

BIBLIOGRAFÍA

ACEITES ESENCIALES. [en línea] [citado 22-07-2005] Disponible en Internet: <http://rbt.ots.ac.cr/read/revistas/44-2/cicci.htm>.

ADAMS. Roberts. Identification of Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectroscopy. Ussa: Allured Publishing Corporation. 1995 P. 1-4.

ALVAREZ, Alba T. Aislamiento, purificación e identificación de principios tóxicos alcaloidales en plantas del género *crotalaria* y alimento contaminado para aves. Bucaramanga, 2004, 135p. trabajo de grado (Magister en Química). Universidad Industrial Santander. Facultad de Ciencias. Area de Productos Naturales

CROMATOGRAFÍA DE GASES . En: Wikipedia, la enciclopedia libre. [en línea] [citado 30-01-2005] Disponible en Internet: http://es.wikipedia.org/wiki/Cromatografía_de_gases.

DUKE, Jim. Phytochemical and Ethnobotanical Databases. Chemical Verbenaceas. [en línea] citado [06-01-2001] Disponible en Internet: http://www.crat/chemical_ethnobotanical_unb_verbenaceas.org.htm.

EISERT, R. PAWLISZYN, J. New Trends in Solid Phase Microextraction. Critical Reviews in Analytical Chemistry. 1997. 27 (2). p. 103-35

FESTER, G. MARTINUZZI, E. Aceites esenciales de la República de Argentina. [en línea] [citado 25-07-2006] Disponible en internet: <http://www.academianacionalciencias.org>

FUJITA, Y; CUBIC; FESTER, W. Extraction oil esencial. en línea] [citado 30-01-2005] Disponible en Internet: <http://www.fujitacubic.extractiolesences&01.html>.

G, Eduardo, *et al.* Introducción al estudio de los Productos Naturales. Argentina: secretaria general de los estados Americanos, 1985. P. 1-5.

GOMEZ, Diana. MORAN, Mirosalba. Extracción e identificación de los metabolitos secundarios presentes en los frutos maduros de ***Carica Candamarcensis Hooker filius***. Pasto. 2005. 123p. Trabajo de grado (Químico) Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Grupo de Investigación de Productos Naturales.

GROB, R. MODERN. Practice of gas chromatography [en línea] [citado 12-02-

- 2005]Disponible en Internet:
<http://WWW.healthphone/oilessences/sitdGC/consup/uk.htm>.
- GUILD, L. Gas Chromatography butter wort. Londres: Heiderberg, 1958. P. 330.
- GUZINOWICS, B, GUZINOWICS M. Fundamentals of integrated GC. [en línea] [citado 30-01-2005]Disponible en Internet: <http://WWW.TheintegratedGC/MSanalyticaldystem-serier.htm>.
- HARBORNE. J. Phytochemical Methods. A Guide to Modern Tecniques of Plant Analysis. London New York. Chapman and Hall. 1973. p. 160
- H, Ray. E, Daniel. Handbook of Drug Analysis. Aplicacions in Forensic and Clinical Laboratories. Washington: American Chemical Society, 1997. p. 133
- JARAMILLO, E *et al.* Determinación de volátiles y semivolátiles en la **Antana alba**. [En línea] [citado 10-04-2000]Disponible en Internet: http://WWW.cibimol/HRGC/FID/MSD_prc.htm.
- KEENETH, R. Análisis Instrumental. España: Pearson Educación, 2001. P. 430
- KEULEMANS. A. Gas Chromatography. Reinhold Publ. Corp. Nueva York. 1957. p. 25
- LEGARDA ,Lucio; LAGOS Tulio; VICUÑA, Luis. Diseño de experimentos agropecuarios. San Juan de Pasto : Unigraf , 2001. P. 38-39.
- LINKENS, S. T and NICKERSON, G. B., Detection of Certain HopOil Constituents in Brewing Products. En: Am.Soc: Brew. Proc., 1964. P. 7-10.
- MATEOS, Pedro F. Producción Industrial de Metabolitos Secundarios. [En línea] [citado 12-10-2005]Disponible en Internet: <http://www.coli.usal.es/web/SEFIN/MI/tema0&MI.html>
- METABOLISMO VEGETAL. Disponible en internet: <http://www.es.wikipedia.encyclopedia libre. org>
- Organic Solvents [en línea] [citado 12-12-2004]Disponible en Internet: [http://WWW.cucba.udg.mx/new/publicaciones/page_ibugana/ibugana_11\(2\).pdf](http://WWW.cucba.udg.mx/new/publicaciones/page_ibugana/ibugana_11(2).pdf)
- OSORIO, Coralia. Profesor asistente. Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia. Bogota. 2006

PARRA, Rocio. Hormonas Vegetales. Revista FAQ's. [en línea] [citado 11-04-2004] Disponible en Internet: <http://www.biología-en-internet.com/dafaul.asp?Id=4&Fs=2>

PINO, Jorge *et al.* Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial ***Lantana alba Mill.*** En: Revista Cubana de Farmacia. Vol. 30, No. 1 (enero. 1996); p. 1-2.

PRADA, F *et al.* Evaluación de la actividad antioxidante del Aceite esencial de ***geniculata.*** En: cromatografía. ix congreso latinoamericano de cromatografía y técnicas afines. Colombia, 2002. p. 161.

REINA, José. BORRAZ, Yolanda. Ceras epicuticulares en el reino vegetal: química, ultraestructura y aspectos evolutivos. Universidad de Málaga. [en línea] [citado 15-01-2007] Disponible en Internet: <http://www.encuentros.uma.es/encuentros43/ceras.html>.

Rutas Metabólicas Básicas y Origen de los Metabolitos Secundarios. [en línea] [citado 28-01-2004]. Disponible en internet: <http://mazinge.sisib.uchile.cl/repositorio/op/ciencias-químicas-y-farmacéuticas/apbot-farma2e/22.html>

Ruzicka, citado por BU'LOCK, Jonh. Biosíntesis de productos naturales. Londres: Urmo, 1965. P. 66-79.

SERRANO, Martín. Estudio de la variación del aroma de flores de Ylang-Ylang, en función del tiempo de su almacenamiento y hora de recolección y de su posible actividad antioxidante "*in vitro*". Bucaramanga, 2002, 93p. Trabajo de grado (Magister). Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias. Escuela de química área de productos naturales.

SILVERTEINS. Spectrometric Identificación of Orgánic Compounds. Canadá : John Wiley & sons, INC, 1991. p. 3-16

SKOOG, Douglas A. y Leary, James J, Análisis Instrumental, Madrid: McGraw-Hill, 1994. p. 257.

STRAIN H. Chromatographic Adsorption Analysis. Nueva York: Interscience Publ, Inc, 1942. p.12

TROIANI, Rosa M. Metabolitos Secundarios [en línea] [citado 30-01-2005] p.6 Disponible en Internet: http://mazinge.sisib.uchile.cl/repositorio/ap/ciencias_quimicas_y_farmacéuticas/apbot-

farm2e/22html.

WOHLLEBEN, G. En: Handbuch der Lebensmittel-chemie, Tomoll, Parte I, Edición Springer, 1963. p.12.

ANEXOS

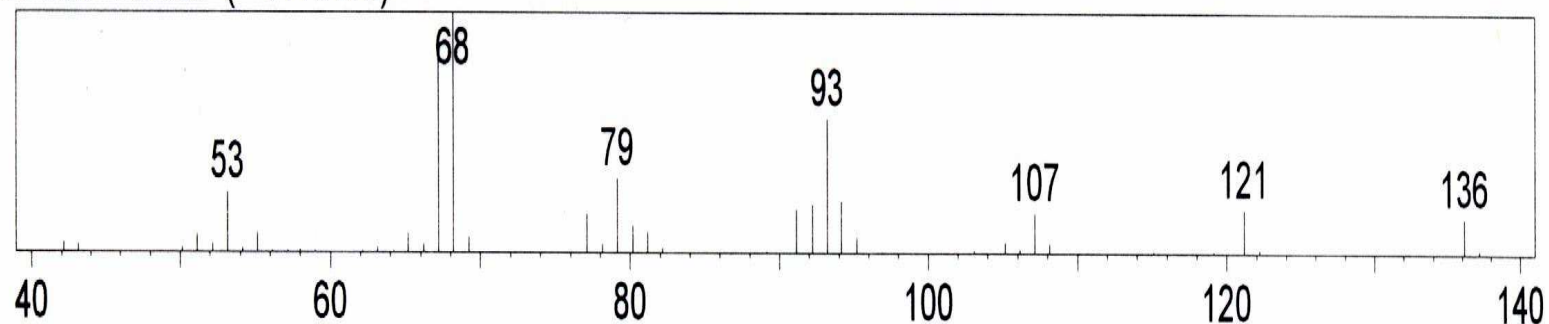
Anexo A. Espectros de masas de los compuestos obtenidos en el aroma y en el AE de las hojas de la especie vegetal *Phylla nodiflora L. Greene*.

Limoneno.

Mass Peak #: 67 Ret. Time: 12.112

Scan #: 1563

Base Peak: 68.20 (1119178)

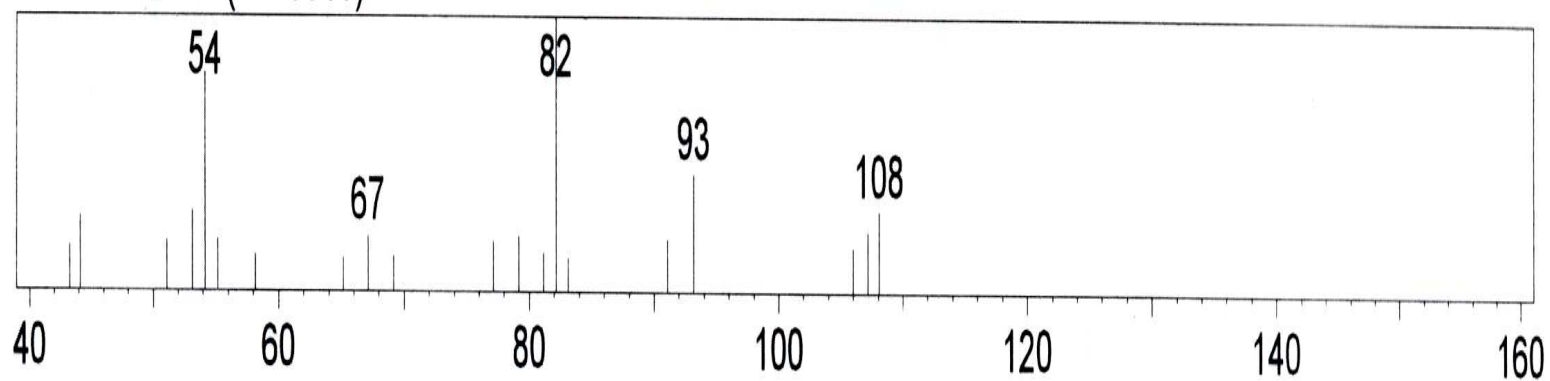


Carvona

Mass Peak #: 20 Ret. Time: 20.185

Scan #: 2947

Base Peak: 82.15 (8916)

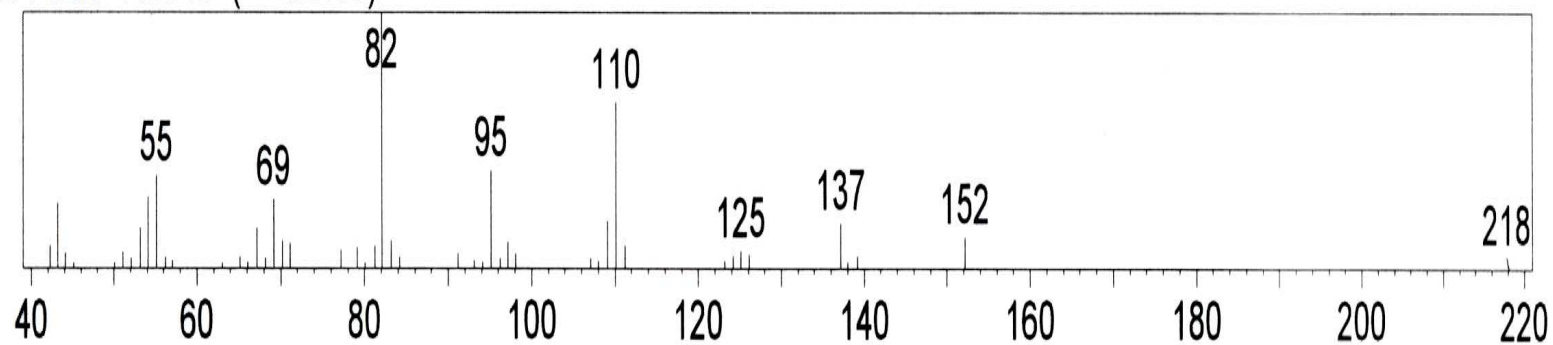


Piperitona

Mass Peak #: 48 Ret. Time : 20.558

Scan # : 3011

Base Peak : 82.10 (52480)

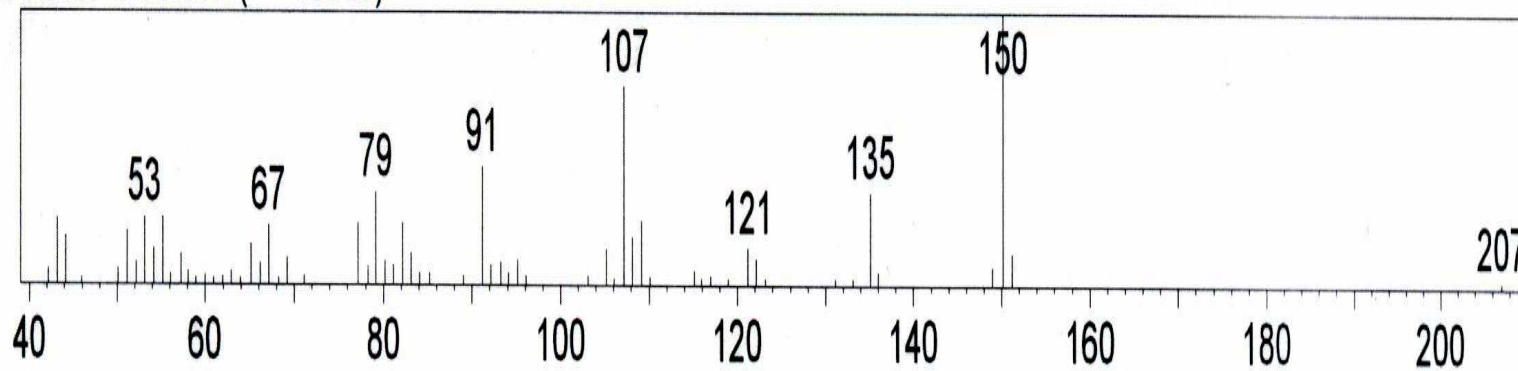


Verbenona

Mass Peak #: 63 Ret. Time: 23.615

Scan #: 3535

Base Peak: 150.15 (43202)

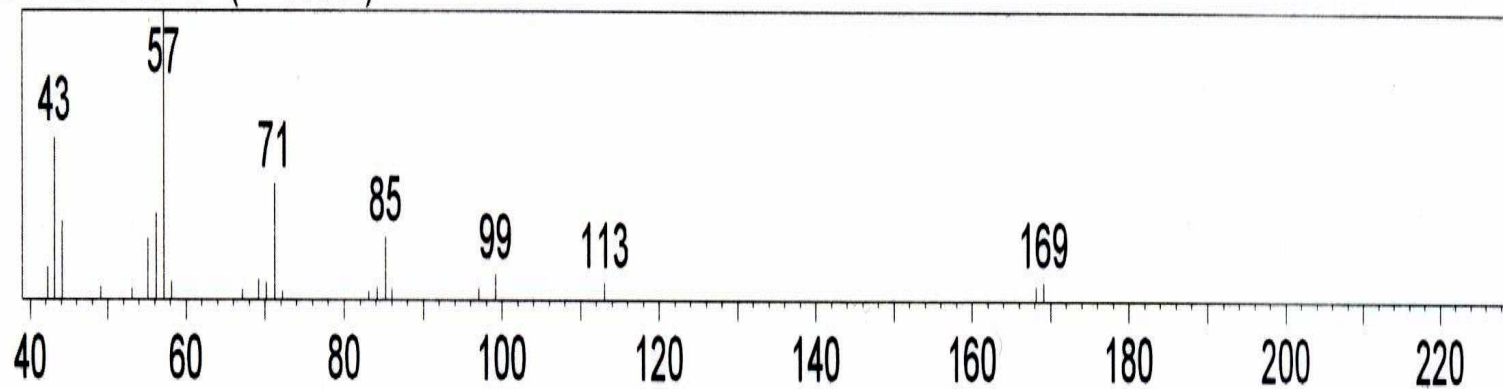


3-metiltridecano

Mass Peak # : 23 Ret. Time : 24.216

Scan # : 3638

Base Peak : 57.15 (31502)

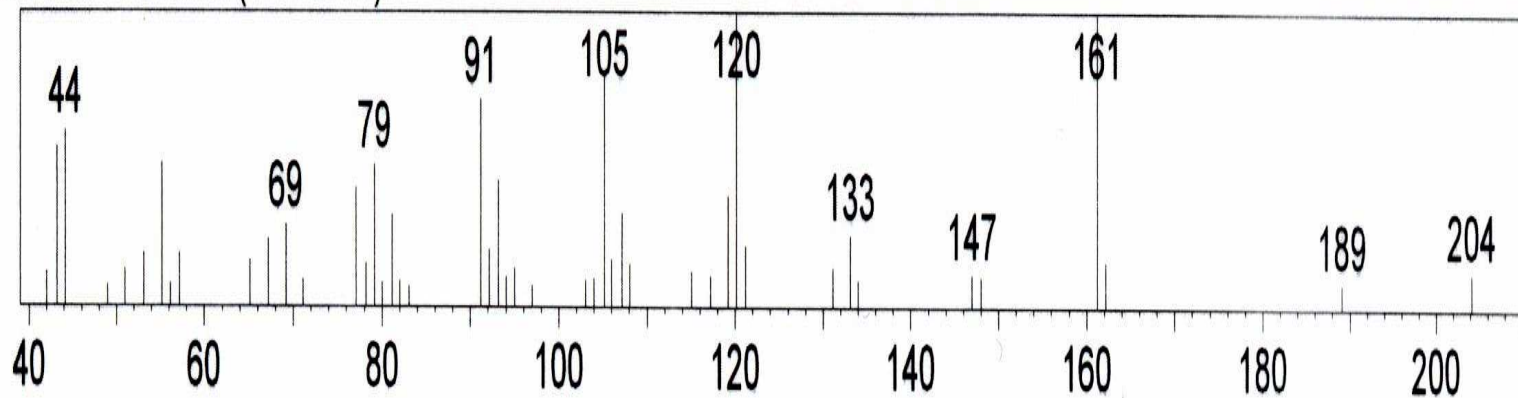


Calareno

Mass Peak #: 46 Ret. Time: 26.188

Scan #: 3976

Base Peak: 120.15 (13736)



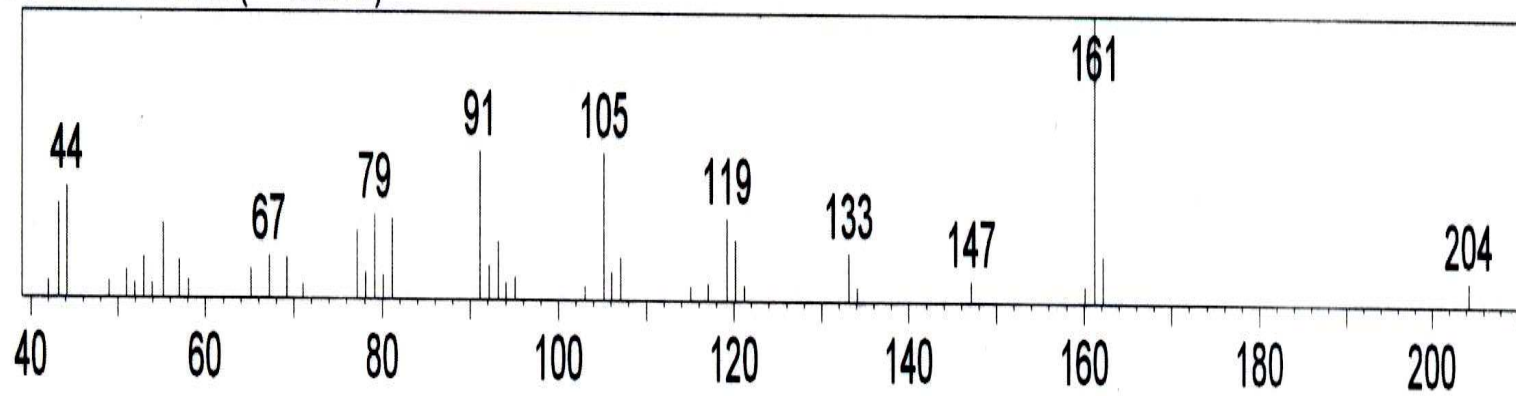
Muroleno

Data : OROZUL.D02

Mass Peak # : 41 Ret. Time : 26.526

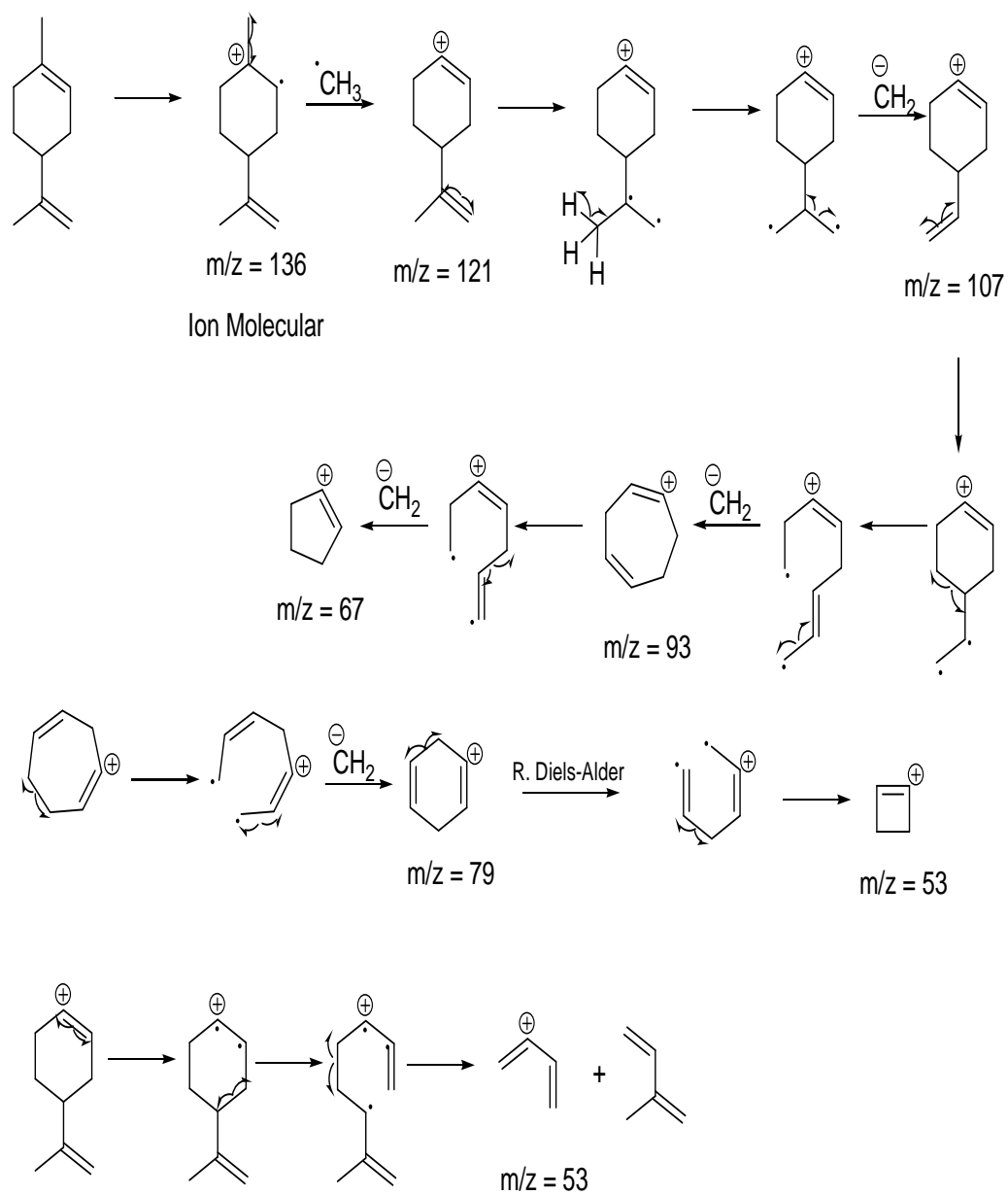
Scan # : 4034

Base Peak : 161.20 (20070)

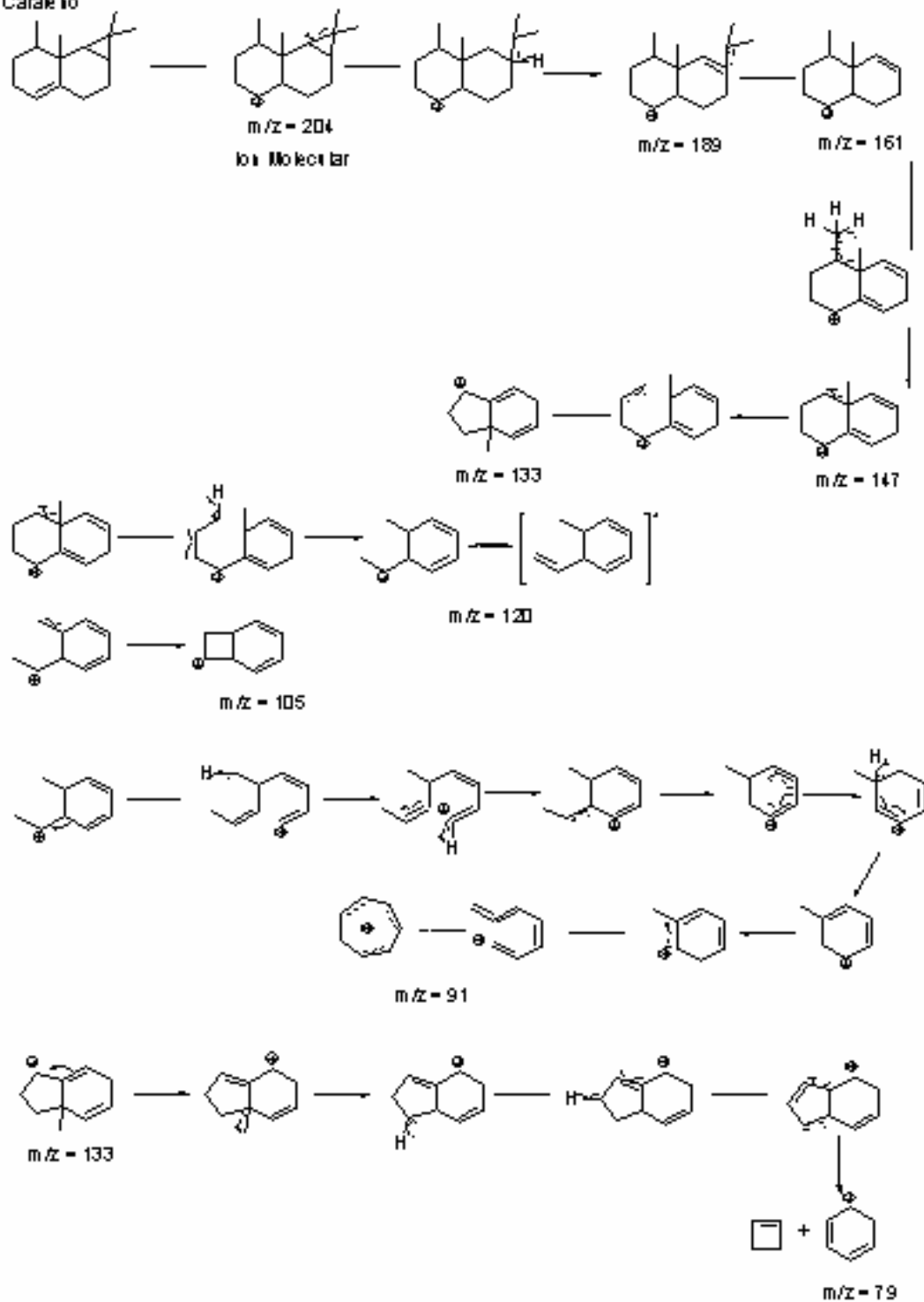


Anexo B. Posibles rutas de fragmentación

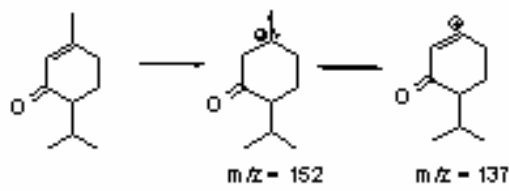
Limoneno



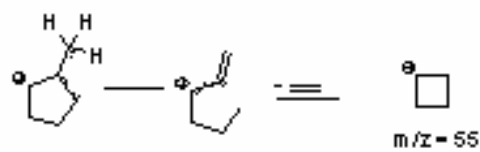
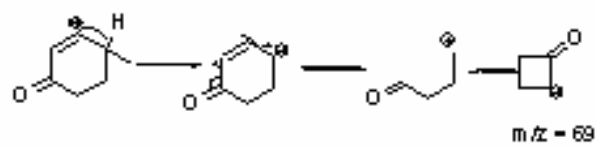
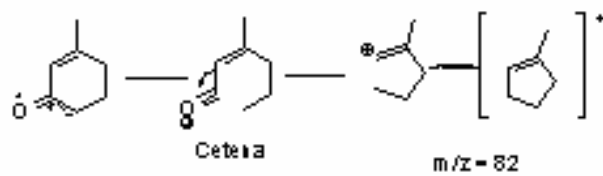
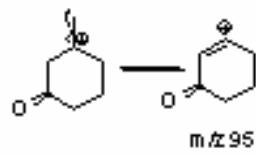
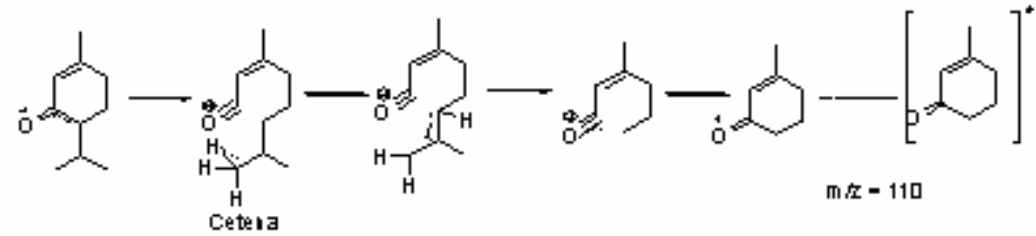
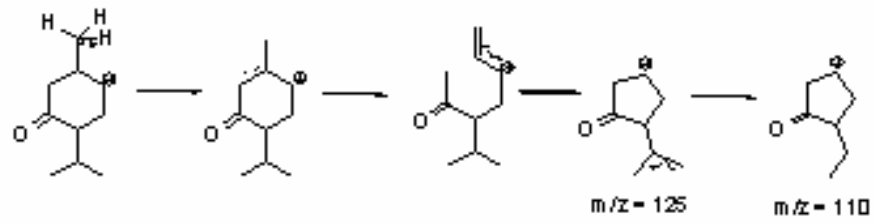
Carak 10



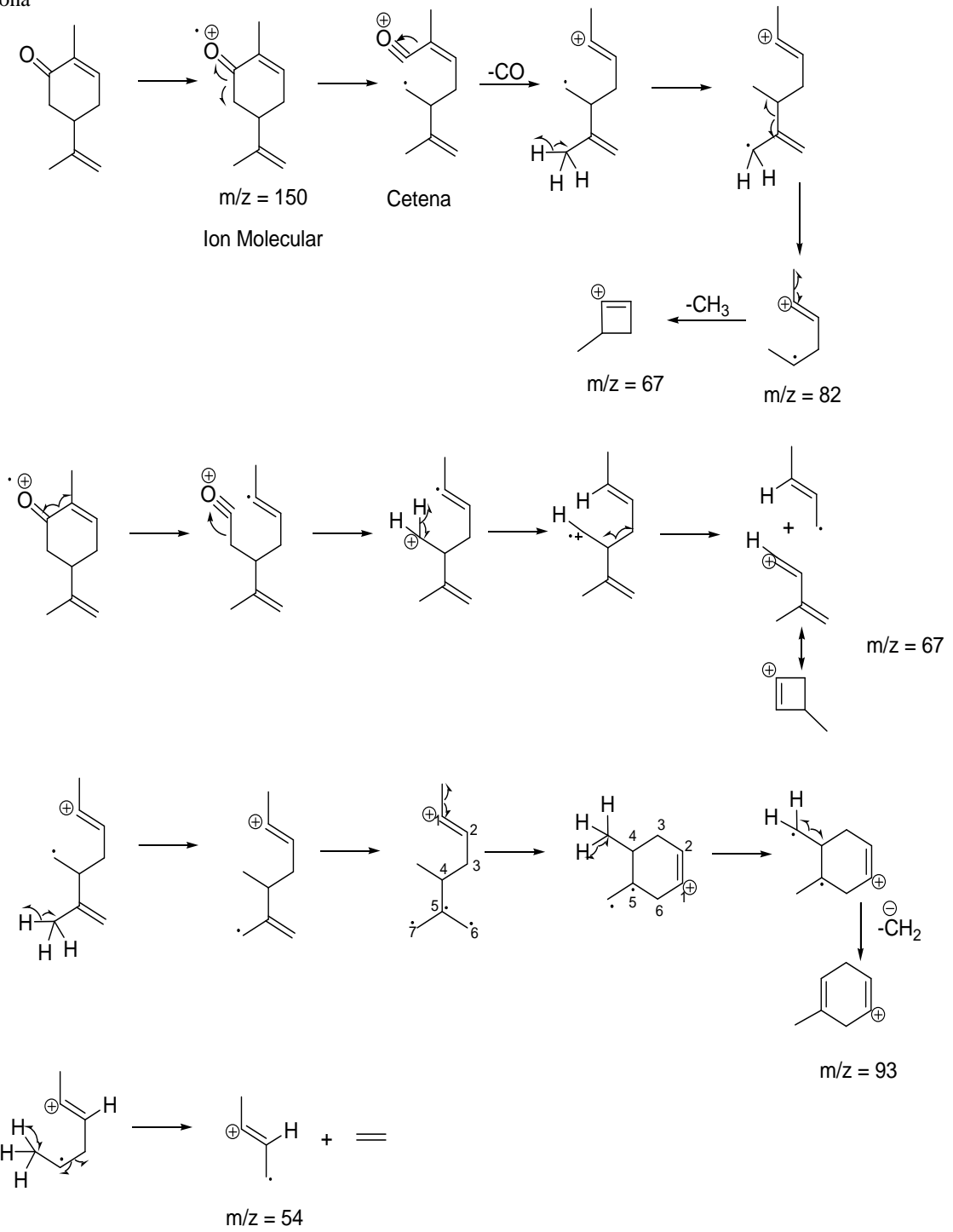
Piperibin



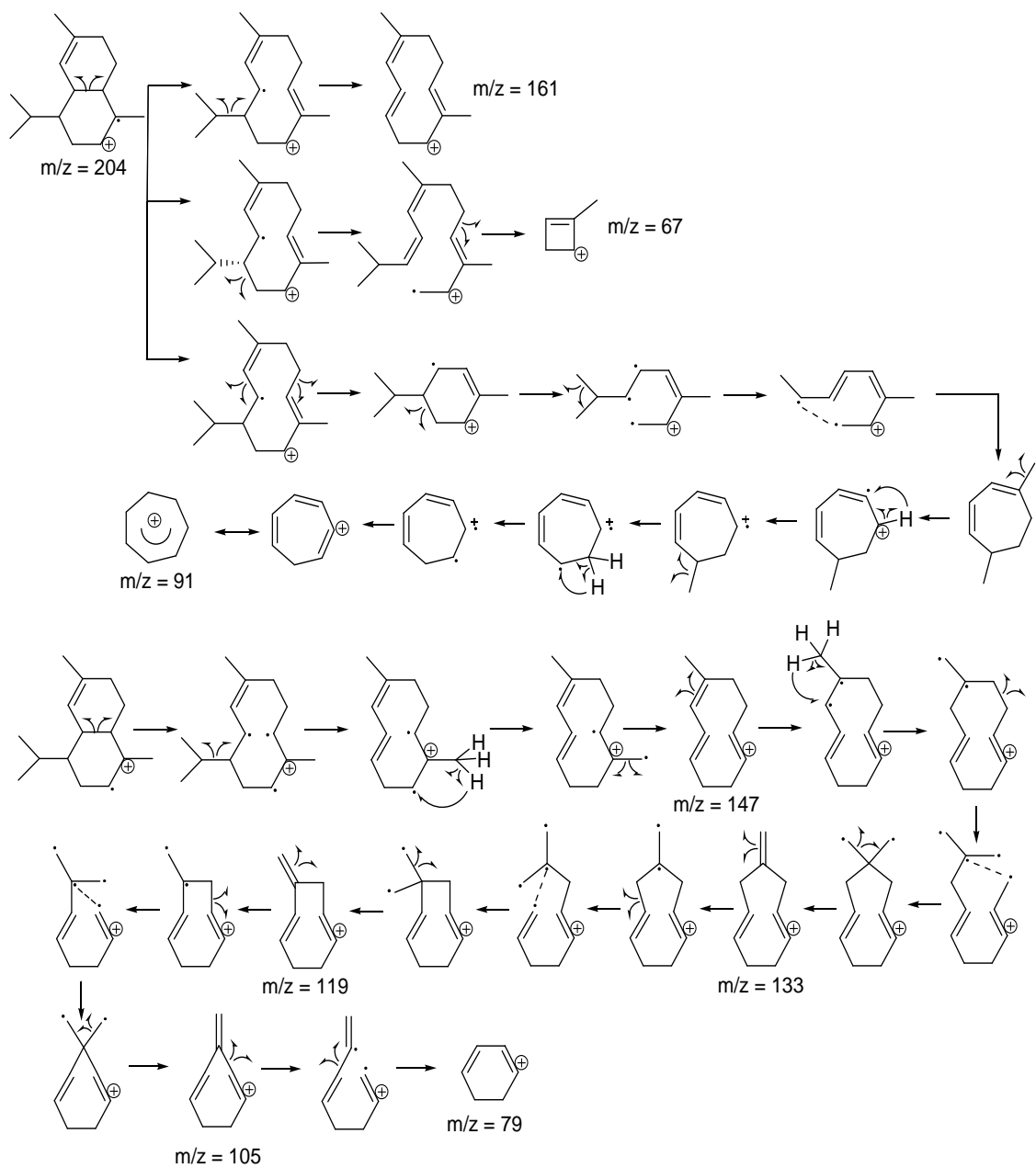
↳ Molekül Br



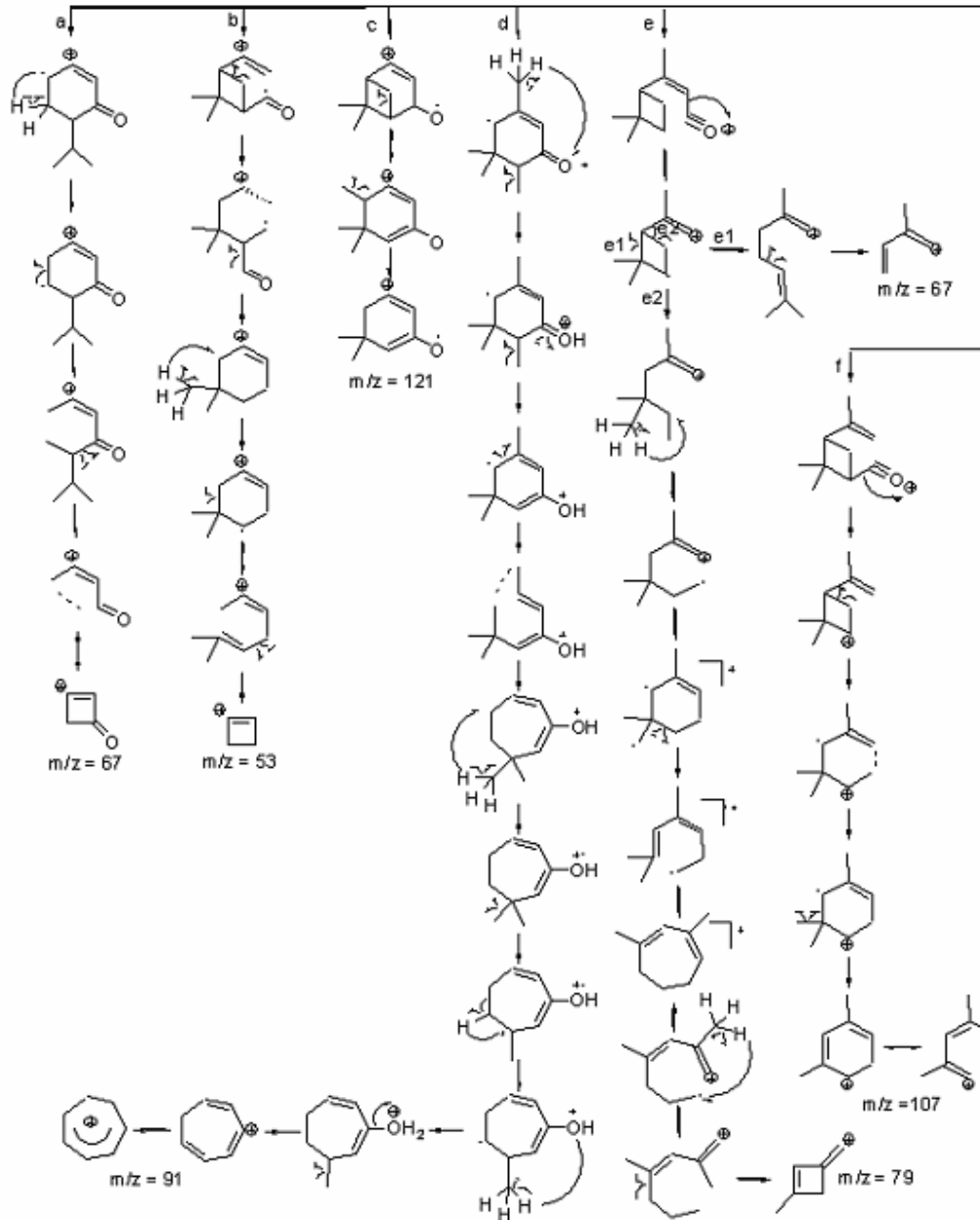
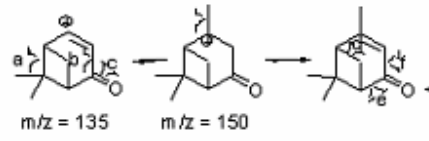
Carvona



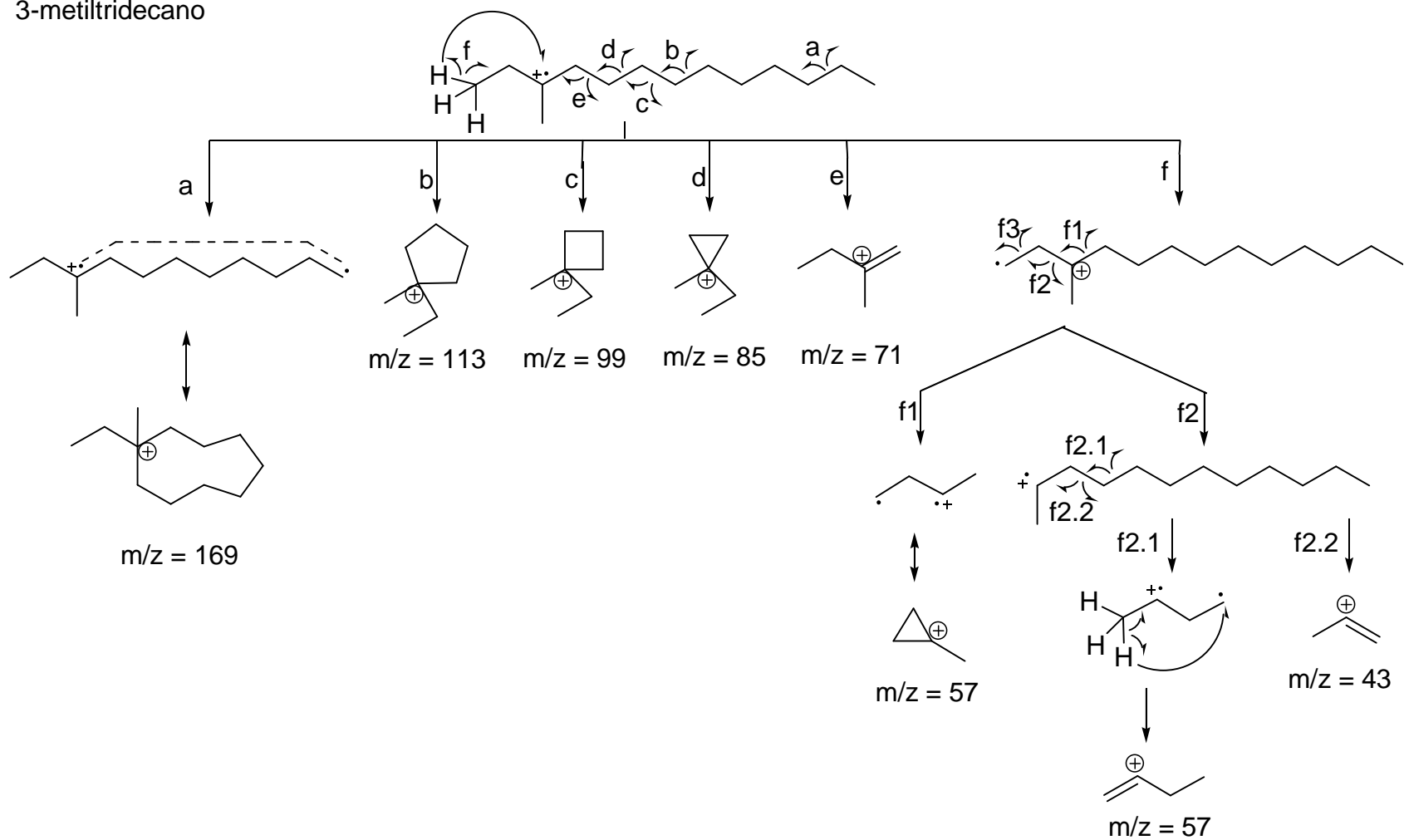
Muroleno



Verbenona



3-metiltridecano



Anexo C. Fórmulas para el desarrollo del Andeva

*FV	GL	SC	CM	F Calculada	F Tabulada
Tratamiento (t)	t - 1	$\Sigma X^2 / r - FC$	SCT/t-1	CMt / CME	*Tablas
Error (E)	T (r-1)	Diferencia	SCE/t(r-1)		
Total (T)	T * r - 1				

*FV: Fuentes de variación

GL: Grados de Libertad

SC: Suma de cuadrados

CM: Cuadrados medios

FC: Factor de corrección

SCT: Suma de cuadrados del tratamiento

SCE: Suma de cuadrados e

CMt: Cuadrado medio del tratamiento

CME: Cuadrado medio del tratamiento

$$FC = \frac{(\Sigma X)^2}{t * r}$$

*Tablas: Valores de F para probabilidades de 0,05 y 0,01