

**ESTUDIO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES DE
Lippia origanoides H.B.K., EN TRES ESTADOS FENOLÓGICOS.**

CARLOS ALBERTO RUIZ NOVA

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

2008

**ESTUDIO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES DE
Lippia origanoides H.B.K., EN TRES ESTADOS FENOLÓGICOS.**

CARLOS ALBERTO RUIZ NOVA

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

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

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2008**

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elena Stashenko y al Dr. Jairo René Martínez, por ser mis profesores no sólo de química analítica sino de también de literatura, gramática, historia, geografía y política, además de sus valiosas lecciones de vida.

A COLCIENCIAS, por la financiación de este proyecto.

A mi abuela Socorro por su financiación y apoyo moral durante mi carrera y porque nunca dejó de creer en mi.

A toda mi familia, en especial a mi hermana, mi mamá, mis abuelas, mi tía Amparo, mi papá, y en especial a mi tía Rosa, mi tío Gilberto, Nana e Iván, porque fueron mi familia a lo largo de la carrera.

A Ginna, por su apoyo y ayuda en el desarrollo del proyecto.

A mis compañeros del laboratorio por los aportes hechos a esta investigación.

DEDICATORIA

A mi abuelo, Moisés Nova, por sus enseñanzas que aportaron a la realización de este trabajo.

A las mujeres más maravillosas del mundo, mi mamá Marta, mi hermana, Cata, mis sobrinas, Maria Paula y Silvia, y mis abuelas, Socorro y Hercilia, por su apoyo incondicional; y a mi amorcito, Ginna, porque este proyecto fue un logro mutuo.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
1. ANÁLISIS DE LA LITERATURA	5
1.1 ACEITES ESENCIALES	5
1.1.1 Métodos industriales de obtención de los AE	7
1.1.2. Control de calidad de los AE y su adulteración	8
1.2. MERCADO DE LOS ACEITES ESENCIALES	11
1.2.1. Aspectos del mercado del AE de tomillo y productos relacionados.	15
1.3 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES VEGETALES EN EL LABORATORIO	16
1.3.1 Hidrodestilación asistida por microondas	16
1.3.2 Destilación-extracción simultánea con solvente	17
1.3.3. Extracción con fluido supercrítico (CO ₂)	17
1.4 SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES DE UN EXTRACTO	18
1.4.1. Cromatografía de gases capilar	19
1.4.2. Espectrometría de masas	21
1.4.3. Cromatografía de gases-espectrometría de masas	22
1.5. PLANTAS AROMÁTICAS	22
1.5.1. Metabolitos secundarios en plantas	23
1.5.2. Terpenos	24
1.5.3. Monoterpenoides	25
1.5.4. Sesquiterpenoides	25
1.5.5. Quimiotipos	25
1.5.6. Familia <i>Verbenaceae</i>	26
1.5.7. Aspectos del cultivo de plantas aromáticas	27
2. ANÁLISIS CIENCIOMÉTRICO	29
2.1. BASE DE DATOS <i>Web of Science (ISI Web of Knowledge, Thomson)</i>	29

2.1.1.	<i>Lippia origanoides</i>	29
2.1.2	Timol	30
2.2.	BASE DE DATOS <i>Elsevier (SCOPUS)</i>	33
2.2.1.	<i>Lippia origanoides</i>	33
2.2.2.	Timol	34
2.3	<i>LIPPIA ORIGANOIDES</i>	37
2.3.1.	Habitat	37
2.3.2	Composición y propiedades del AE	38
2.3.3	Otros estudios	39
2.4.	TIMOL	40
2.4.1	Aceites esenciales que contienen timol	40
2.4.2	Bioactividad del timol y de los aceites esenciales que lo contienen	41
3.	METODOLOGÍA	44
3.1.	RECOLECCIÓN Y PROPAGACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	44
3.2.	IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA	46
3.3.	MUESTREO DEL MATERIAL VEGETAL Y TRATAMIENTO PREVIO	46
3.4.	EXTRACCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES DE <i>L. origanoides</i> H.B.K.	46
3.4.1	Obtención de los aceites esenciales por el método MWHD	47
3.4.2.	Obtención de extractos por el método SDE	48
3.4.3.	Obtención de extractos por el método SFE (CO ₂)	49
3.5.	PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS POR GC-MS	50
3.6.	ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS POR GC-MS	50
3.6.1.	Cromatografía de gases en columnas con fase estacionaria apolar	51
3.6.2.	Cromatografía de gases en columnas con fase estacionaria polar	52
3.6.3.	Sistema de detección y adquisición de los datos	52
3.6.4.	Identificación	53

3.7.	CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES MAYORITARIOS DEL AE DE <i>L. origanoides</i>	54
3.7.1	Evaluación de la reproducibilidad de la técnica de extracción de AE	55
3.7.2	Cuantificación interna	56
3.7.3	Cuantificación externa	57
3.8	PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS	59
4.	RESULTADOS	61
4.1.	RECOLECCIÓN Y PROPAGACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	61
4.1.1.	Análisis cualitativo del AE obtenido de las hojas de los quimiotipos de <i>L. origanoides</i> , colectados en Jordán Sube	61
4.1.2.	Porcentajes de rebrote	63
4.1.3.	Análisis de suelos	64
4.2.	IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS QUIMIOTIPOS DE <i>L. origanoides</i>	64
4.3.	RENDIMIENTOS DE LOS AE DE <i>L. origanoides</i> OBTENIDOS POR MWHD	65
4.4	ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES Y EXTRACTOS DE <i>L. ORIGANOIDES</i>	67
4.4.1.	Influencia de la técnica de extracción sobre el número y el tipo de metabolitos secundarios detectados por GC-MS	83
4.4.2.	Influencia del quimiotipo sobre la composición de los extractos y AE de <i>L. origanoides</i>	86
4.4.3.	Variación composicional del AE y extractos de <i>L. origanoides</i> , en función del estado fenológico	90
4.5.	CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS MAYORITARIOS del AE de <i>L. origanoides</i>	98
4.5.1.	Evaluación de la reproducibilidad del método de extracción del AE, de la sumatoria de las áreas cromatográficas	98
4.5.2.	Cuantificación externa de cuatro compuestos mayoritarios en los AE de <i>L. origanoides</i> .	100
4.6.	PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS AE OBTENIDOS	100

5.	CONCLUSIONES	103
6.	RECOMENDACIONES	105
7.	BIBLIOGRAFÍA	106
	ANEXOS	119

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Principales países importadores y exportadores de aceites esenciales en el mundo.	13
Figura 2. Dinámica de las importaciones Colombianas de aceites esenciales y mezclas odoríferas durante el periodo 1998-2002.	14
Figura 3. Diagrama de bloques principales de un cromatógrafo acoplado a espectrómetro de masas.	20
Figura 4. Países con más publicaciones sobre el timol. [Base de datos: <i>Web of Science (ISI Web of Knowledge, Thomson)</i> . [Periodo de observación: 2001-2008. Fecha de consulta: 25 de abril de 2008. Ecuación de búsqueda: TS= ("timol")].	31
Figura 5. Dinámica de las publicaciones sobre el timol en los últimos siete años. [Base de datos: <i>Web of Science (ISI Web of Knowledge, Thomson)</i> . [Periodo de observación: 2001-2008. Fecha de consulta: 25 de abril de 2008. Ecuación de búsqueda: TS= ("timol")].	32
Figura 6. Relación entre publicaciones sobre el timol y las revistas científicas. [Base de datos: <i>Web of Science (ISI Web of Knowledge, Thomson)</i> [Periodo de observación: 2001-2008. Fecha de consulta: 25 de abril de 2008. Ecuación de búsqueda: TS= ("timol")].	33
Figura 7. Publicaciones sobre el timol, según las diferentes áreas de investigación. [Base de Datos: <i>Elsevier (SCOPUS)</i> . Periodo de observación: 2001-2008. Fecha de consulta: 25 de abril de 2008. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (<i>Lippia organoides</i>)].	37
Figura 8. Etapas en el establecimiento del cultivo experimental.	45
Figura 9. Ubicación de los quimiotipos en la parcela experimental.	47
Figura 10. Montaje para hidrodestilación asistida por microondas.	48
Figura 11. Equipo de destilación-extracción simultánea a microescala para solventes de alta densidad. A. Balón con el material vegetal y agua sumergido en un baño de aceite mineral, B. Balón con CH ₂ Cl ₂ calado en un baño de agua y C. Extremo inferior del cuerpo del montaje, donde se	49

lleva a cabo la extracción líquido-líquido.

Figura 12. Etapas de la extracción con fluido supercrítico y sus aditamentos. 50

Figura 13. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Plus* acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5975 Network*. 51

Figura 14. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890N Network Series GC* acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 5975 Inert XL*. 53

Figura 15. Equipos para la realización de mediciones según las normas ISO 279 y 280 (E). 60

Figura 16. Rendimientos del aceite esencial de *L. origanoides*, obtenidos de plantas colectadas en tres periodos de crecimiento. 67

Figura 17. Perfiles cromatográficos típicos de los AE y extractos obtenidos de hojas de *L. origanoides*, QI, en la primera floración, por: **A.** MWHD, **B.** SDE, **C.** SFE. Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV). La identificación de los compuestos se reporta en la **Tabla 15**. 68

Figura 18. Perfiles cromatográficos típicos de los AE y extractos obtenidos de hojas de *Lippia origanoides*, QII en la primera floración, por: **A.** MWHD, **B.** SDE, **C.** SFE. Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV). La identificación de los compuestos se reporta en la **Tabla 16**. 75

Figura 19. Estructuras químicas de los principales compuestos detectados en los extractos y aceites esenciales de *L. origanoides*. 80

Figura 20. Variación de las familias de compuestos químicos presentes en los extractos SDE de *L. origanoides* según el quimiotipo. 88

Figura 21. Variación de los familias de compuestos químicos presentes en los extractos SFE de *L. origanoides* según el quimiotipo. 89

Figura 22. Relación A_x/A_{istd} de los principales compuestos comunes en los cromatogramas de los dos quimiotipos de *L. origanoides*. (Istd=*n*-tetradecano) 90

Figura 23. Relación A_x/A_{istd} de los principales compuestos en los cromatogramas del AE de *L. origanoides*, quimiotipo QI. 91

Figura 24. Relación A_x/A_{istd} de los compuestos mayoritarios del AE *L.* 92

origanoides, QII.

Figura 25. Perfiles cromatográficos del AE de *Lippia origanoides* QI, en función del estado fenológico de la planta: **A.** F1; **B.** PF; **C.** F2; Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV). 93

Figura 26. Perfiles cromatográficos del AE de *Lippia origanoides*, QII, en función del estado fenológico: **A.** F1; **B.** PF; **C.** F2; Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV). 95

Figura 27. Variación de las familias de compuestos, en los AE de *L. origanoides* QI, en función del estado fenológico. 97

Figura 28. Variación de las familias de compuestos, en los AE de *L. origanoides* QII, en función del estado fenológico. 98

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación de los aceites esenciales.	6
Tabla 2. Parámetros analíticos empleados en el control de calidad de los AE.	10
Tabla 3. Principales usos de los AEs.	11
Tabla 4. Publicaciones sobre <i>L. origanoides</i> en la Base de Datos <i>Web of Science (ISI Web of Knowledge, Thomson)</i> [Periodo de observación: 1970-2008. Fecha de consulta: 25 de abril de 2008. Ecuación de búsqueda: TS= (" <i>Lippia origanoides</i> ")].	30
Tabla 5. Publicaciones sobre <i>L. origanoides</i> en la Base de Datos <i>Elsevier (SCOPUS)</i> [Periodo de observación: 1970-2008. Fecha de consulta: 25 de abril de 2008. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (<i>Lippia origanoides</i>)].	34
Tabla 6. Autores con el mayor número de estudios publicados sobre el timol. [Base de Datos: <i>Elsevier (SCOPUS)</i> Periodo de observación: 2001-2008. Fecha de consulta: 25 de abril de 2008. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (<i>Lippia origanoides</i>)].	35
Tabla 7. Tipo de publicaciones sobre el timol. [Base de Datos: <i>Elsevier (SCOPUS)</i> . Periodo de observación: Todos los años. Fecha de consulta: 25 de abril de 2008. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (<i>Lippia origanoides</i>)].	36
Tabla 8. Patrones de hidrocarburos lineales y patrones de terpenos certificados utilizados para determinar los I _k .	57
Tabla 9. Volúmenes de soluciones preparadas para llevar a cabo la cuantificación interna.	58
Tabla 10. Compuestos principales (>1,0%) del AE, obtenido de hojas de <i>L. origanoides</i> , QI colectada en Jordan Sube.	62
Tabla 11. Compuestos principales (>1,0%) del AE, obtenido de hojas de <i>L. origanoides</i> , QII colectada en Jordan Sube.	63
Tabla 12. Porcentajes de rebrote de los quimiotipos QI y QII <i>L.</i>	63

origanoides.

Tabla 13. Números de COL asignados a los quimiotipos I y II de *L.* 65

origanoides.

Tabla 14. Alturas, pesos y rendimientos (AE) promedio de *L. Origanoides*, 66
obtenidos para tres estados fenológicos de la planta.

Tabla 15. Cantidad relativa (%) e identificación de los metabolitos 69
secundarios volátiles y semivolátiles de *L. origanoides*, quimiotipo I
aislados por diferentes técnicas de extracción.

Tabla 16. Cantidad relativa (%) e identificación de los metabolitos volátiles 76
y semivolátiles de *L. origanoides*, quimiotipo II, aislados por diferentes
técnicas de extracción.

Tabla 17. Composiciones del AE de *L. origanoides* colectadas en Brasil y 82
Venezuela, reportadas por distintos autores.

Tabla 18. Variación del número de compuestos detectados en *L.* 84
origanoides QI, en función de la técnica de extracción.

Tabla 19. Variación de las cantidades relativas de los grupos de 85
compuestos encontrados en *L. origanoides*, QI y QII, con respecto a la
técnica de extracción.

Tabla 20. Cantidad relativa (%) e identificación de los componentes 91
principales del AE y extractos de *Lippia origanoides* quimiotipo I, extraídos
en tres estados fenológicos.

Tabla 21. Cantidad relativa (%) e identificación de los componentes 96
principales del AE y extractos de *Lippia origanoides*, Q II, extraídos de las
plantas en tres estados fenológicos.

Tabla 22. Coeficientes de variación de áreas cromatográficas totales de 99
los aceites esenciales de *L. origanoides*.

Tabla 23. Cuantificación de los componentes principales del AE de *L.* 101
origanoides.

Tabla 24. Propiedades fisicoquímicas de los aceites esenciales de *L.* 102
origanoides.

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Rutas de fragmentación de los compuestos mayoritarios del AE de <i>L. origanoides</i> .	120
Anexo 2. MS, I_K y t_R de patrones de terpenos certificados.	126
Anexo 3. Perfiles cromatográficos típicos de los AE obtenidos de hojas de <i>L. origanoides</i> QI y QII, recolectadas en Jordán Sube (Santander, Colombia).	131
Anexo 4. Resultados de análisis de suelos.	133
Anexo 5. Curvas de calibración.	136

ABREVIATURAS, SIGLAS Y ACRÓNIMOS

A	Área cromatográfica.
AE	Aceite(s) esencial(s).
CENIVAM	Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Aromáticas y Medicinales Tropicales
CIBIMOL	Centro de Investigación en Biomoléculas.
CV	Coefficiente de variación.
D _f .	Espesor de la fase estacionaria, μm.
D.I.	Diámetro interno.
€	Euro(s).
EE.UU.	<i>United States of America</i> (Estados Unidos).
e.g.	<i>Exempli gratia</i> (Por ejemplo).
Etc.	Etcétera
EI	<i>Electrón impact</i> (Impacto de electrones).
EU	<i>European Union</i> (Unión Europea).
eV	Electrón-voltio(s).
f.e.	Fase estacionaria
FID	<i>Flame Ionization Detector</i> (Detector de ionización en llama).
FP	Fenilpropanos.
F1	Primera floración.
F2	Segunda floración.
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases).
GC-MS	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas).
GLP	<i>Good Laboratory Practice</i> (Buenas practicas de laboratorio).
H	Hidrocarburos lineales.
i.e.	<i>id ets.</i> (Es decir).
I _k	Índice(s) de Kovàts

ISO	<i>Internacional Organization for Standarization</i> (Organización Internacional para la Estandarización).
Istd	Estándar interno
<i>L. origanoides</i>	<i>Lippia origanoides</i> .
M	Hidrocarburos monoterpénicos.
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar.
<i>m/z</i>	Relación masa-carga.
M ⁺	Ion molecular
MO	Monoterpenos oxigenados.
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas).
MSD	<i>Mass Selective Detector</i> (Detector selectivo de masas).
MV	Material vegetal.
MWHD	<i>Microwave-Assisted Hydroditillation</i> (Hidrodestilación asistida por microondas).
OC	Otros compuestos oxigenados.
PCA	<i>Principal Component Análisis</i> (Análisis de componentes principales).
PF	Post-floración
P.M.	Peso molecular.
% p/p	Porcentaje peso a peso.
ppm	Partes por millón.
QI	Quimiotipo I
QII	Quimiotipo II
S	Hidrocarburos sesquiterpénicos.
SDE	<i>Simultaneous Distillation-Extraction</i> (Destilación-extracción simultánea con solvente).
SFE	<i>Supercritical Fluid Extraction</i> (Extracción con fluido supercrítico).
SO	Sesquiterpenos oxigenados.
TIC	<i>Total Ionic Current</i> (Corriente iónica total).
t _R	Tiempo de retención (min).
UIS	Universidad Industrial de Santander.

RESUMEN

TITULO*: INTERVENCIÓN DE TRABAJO SOCIAL EN LA CONFORMACIÓN DE COOPROSOYA COMO UNA ALTERNATIVA PARA MEJORAR CONDICIONES NUTRICIONALES Y GENERAR INGRESOS EN EL BARRIO MARÍA PAZ DE BUCARAMANGA.

AUTORA: MORALES TOLOSA, ADRIANA ANDREA**.

PALABRAS CLAVES: Estilos de Vida Saludable, Desarrollo Humano, Capital Social, Calidad de vida, Cooperativismo, Cooperativa de Soya

CONTENIDO

En el presente informe se describe el desarrollo de la práctica de Trabajo Social en la Corporación para la Promoción de Estilos de Vida Saludable SURGIR, realizada con el objeto de fortalecer el proceso de formación de COOPROSOYA una cooperativa que procesa soya conformada por habitantes del barrio María Paz de la ciudad de Bucaramanga con el fin de convertirse en una fuente generadora de ingresos y de mejorar las condiciones nutricionales y a la vez generar estilos de vida saludable y contribuir al mejoramiento de su calidad de vida.

La intervención es fundamentada teóricamente con la siguiente temática: Estilos de Vida Saludable, Calidad de Vida, Desarrollo Humano, Capital Social y finalmente sobre Cooperativismo. La metodología utilizada para la actualización del diagnóstico y formulación del proyecto productivo se realizó de forma participativa mediante la aplicación de formularios, entrevistas grupales, reuniones informativas y talleres; lo cual permitió la caracterización y descripción demográfica y el análisis de la situación actual del sector.

A través de la práctica se logró dar inicio a un proceso social en el ámbito comunitario con algunos de los habitantes del barrio María Paz de Bucaramanga, constituyéndose la Cooperativa de Procesadores de Soya COOPROSOYA dirigida a promover el bienestar social y mejoramiento de su calidad de vida. Así mismo permitió la confrontación entre práctica y teoría permitiendo evaluar los conocimientos adquiridos en la academia y la utilidad de aplicación en la realidad.

* Informe Mejorado

** Facultad de Ciencias Humanas. Director MILTON ORTÍZ PICÓN Trabajador Social

ABSTRACT

TITLE: Social work intervention in COOPROSOYA shaping as an alternative to improve nutritional status and generate profits in Maria Paz neighborhood in Bucaramanga. *

AUTHOR: MORALES TOLOSA, ADRIANA ANDREA**.

KEY WORDS: Healthy Lifestyles, Human Development, Social Capital, Quality of Life, Cooperatives, Soybean Cooperative.

CONTENT

The present report describes the development of the practice of Social Work at the Corporation for Promotion of Healthy Lifestyles SURGIR, conducted with the aim of strengthening the process of forming COOPROSOYA cooperative, soybean processing formed by residents of the neighborhood Maria Paz in Bucaramanga, in order to become a source of revenue and improve nutritional status and simultaneously generate healthy lifestyles and help improve their quality of life.

The intervention is grounded in theory with the following theme: Healthy Lifestyles, Quality of Life, Human Development, Social Capital and finally on Cooperatives. The methodology used to update the diagnosis and development of productive project, was conducted in a participatory manner through the application forms, group interviews, briefings and workshops, which allowed the characterization and demographic description and analysis of the current situation.

Through the practice was reached to initiate a social process at community level with some of the inhabitants of the Maria Paz neighborhood in Bucaramanga, becoming the Soybean Processors Cooperative COOPROSOYA aimed at promoting social welfare and improving their quality of life. Likewise allowed the confrontation between theory and practice allowing assess the knowledge acquired in the academy and the usefulness of application in reality.

*Report Improved.

** Faculty of Human Sciences. Director MILTON ORTIZ PICON Social Worker

INTRODUCCIÓN

Muchas plantas aromáticas poseen características farmacológicas o sea, se les atribuyen propiedades benéficas para curar enfermedades. Es necesario, desde el punto de vista científico establecer una relación entre la medicina tradicional y las actividades química, biológica y terapéutica de las plantas [1].

Los aceites esenciales (AE) son mezclas complejas de compuestos naturales que tienen su origen en las plantas aromáticas; son extremadamente volátiles y poseen un intenso olor. Muchas plantas que producen AE, pertenecen a diversas familias, entre las cuales figuran: *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Apiaceae*, *Rutaceae*, *Lauraceae*, *Myrtaceae*, *Magnolialaceae*, *Pinaceae* y *Lilaceae* [2].

Los AE se utilizan ampliamente en cosmética, perfumería, fitoterapia y en alimentos como saborizantes, por esta razón, poseen una gran demanda internacional, principalmente, en los países desarrollados. Su obtención se realiza principalmente por hidrodestilación o arrastre con vapor, métodos industriales, relativamente económicos y fáciles de implementar.

El valor económico y la aplicabilidad industrial de las esencias están directamente relacionados con su composición química, que determina todas las propiedades (físicoquímicas, organolépticas, etc.) y las actividades (antioxidantes, antimicrobiales y antifúngicas). Es por ello, que el establecimiento de la composición de los aceites esenciales es una tarea importante y requiere de la combinación de métodos de extracción de los metabolitos secundarios de la planta [3]; algunos de estos métodos son: hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD), extracción con fluido supercrítico (SFE) y destilación-extracción simultánea con solvente (SDE).

Las técnicas instrumentales para analizar los aceites esenciales varían desde espectroscopía ultravioleta-visible (UV-VIS) e infrarroja (IR) hasta separaciones por cromatografía de gases (GC) e identificación por espectrometría de masas (MS).

Lippia origanoides H.B.K. pertenece a la familia *Verbenaceae*, cuyas plantas se caracterizan por la producción de aceite esencial. La existencia de quimiotipos es una característica notable en esta familia y, en particular, para el género *Lippia* [4]. Debido a esto, en el presente trabajo se realizó un amplio estudio, empleando distintas técnicas extractivas y cromatográficas, de los AE provenientes de dos quimiotipos de *L. origanoides* encontrados en el Cañón del río Chicamocha y cultivados mediante esquejes en parcelas experimentales, ubicadas en el Complejo Agroindustrial Piloto del CENIVAM, UIS.

Es de gran interés la actividad antibacteriana de los compuestos naturales debido a su utilización para preservar los alimentos. Los AE de las plantas son una fuente potencial de agentes antimicrobianos de origen natural. Algunos aceites esenciales de plantas, incluyendo *Thymus vulgaris* (Tomillo) y *Ocimum basilicum* (Albahaca) [5], inhiben totalmente el desarrollo de hongos en los granos de maíz. La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de las especias utilizadas en cocina, está asociada a la presencia de compuestos fenólicos. La especie *L. origanoides* puede ser propuesta como fuente alternativa de estos fenoles debido a su alta concentración en el AE, y el rendimiento alto del mismo (ca. 2%). Además, el AE de uno de los quimiotipos es rico en timol, posee una alta actividad biológica [6-8], perfilándose como posible ingrediente activo en cosmeceúticos, productos que, además de ser cosméticos, tienen la propiedad de curar alguna enfermedad causada por microorganismos. El otro quimiotipo de *L. origanoides* que se estudió, posee un AE de aroma amaderado-cítrico por la presencia de compuestos como *p*-cimeno y *trans*- β -cariofileno [9] y puede ser usado en perfumería

o como aromatizante de productos de limpieza doméstica y enmascarador de olores de algunos materiales.

Para incorporar en el ámbito nacional una especie vegetal con fines agroindustriales, se necesita estudiar exhaustivamente la planta en cultivos experimentales, con el fin de determinar la composición del aceite esencial y extractos en distintos estados fenológicos y así determinar los periodos de mayor productividad. Por tanto, COLCIENCIAS, a través del Laboratorio de Cromatografía, CIBIMOL, y otros grupos de investigación de cuatro Universidades públicas del país, buscan responder a esta necesidad creando la Unión Temporal, Centro de Investigación de Excelencia, CENIVAM, cuyo objetivo es la puesta en marcha a nivel piloto de la cadena productiva de aceites esenciales en Colombia.

La infraestructura que poseen el Complejo Agroindustrial Piloto de CENIVAM y el Laboratorio de Cromatografía, ubicados en el *campus* principal de la Universidad Industrial de Santander, UIS, ofrecieron condiciones óptimas para llevar a cabo el proyecto propuesto, implementar la metodología, desde la siembra de la especie a estudiar, hasta la identificación de sus metabolitos secundarios por GC-MS. Los costos del proyecto fueron cubiertos por COLCIENCIAS y el Laboratorio de Cromatografía a través del contrato CENIVAM-Colciencias RC-432-2004.

Se obtuvieron resultados interesantes sobre la composición de la planta en distintos estados fenológicos, por ejemplo, que en el AE y en los extractos obtenidos de plantas durante la floración se aumentó la cantidad de timol y *p*-cimeno, compuestos con actividad biológica [10]. También se encontró que el rendimiento del AE al final de la floración fue mayor, pero no la biomasa representada por el peso de las hojas. La medición de algunas propiedades fisicoquímicas según los protocolos de las normas ISO, fue otro de los objetivos alcanzados en esta investigación.

Dentro de los objetivos de la agroindustria de plantas aromáticas y aceites esenciales, está el de contribuir al desarrollo regional y nacional, mediante el estudio de los recursos naturales que ofrecen las variedades geográfica y térmica de nuestro país, y el aprovechamiento de tecnologías limpias y asequibles al trabajador rural y al empresario nacional. Este trabajo siguió estos principios, puesto que la planta es nativa y se siguieron buenas prácticas agrícolas en el establecimiento de su cultivo, además se obtuvieron subproductos reutilizables después de las destilaciones, *i.e.* el compost.

Algunos de los resultados obtenidos durante la investigación se publicaron en las memorias del IX Congreso Colombiano de Fitoquímica, Pereira 2007 y de ISEO, Gratz, Austria 2007. También se publicaron dos artículos, uno en la revista *Scientia et Tecnología* de la Universidad Tecnológica de Pereira y el otro, en *Natural Product Communications*.

Este trabajo contiene 25 tablas, 28 figuras y se citan 106 referencias bibliográficas.

1. ANÁLISIS DE LA LITERATURA

1.1 ACEITES ESENCIALES

Hace siglos que se descubrió que los principios activos, responsables por las fragancias de las plantas se podían aislar por su calentamiento con agua. Estos principios, fases oleosa y acuosa, se obtuvieron por su condensación en una superficie fría. A los aceites separados de la fase acuosa se les llamó “aceites esenciales” o “aceites etéreos”, debido a su alta volatilidad [11]; aunque hay algunas excepciones como los AE de *Cognac* y *Cornmint* [12]. Gran parte del presente estudio se dedica a los AE, que se definen como “parte del metabolismo de un vegetal, compuesto generalmente por terpenos (mezclas líquidas en su mayoría, que forman una sola fase), que están asociados o no a otros componentes, la mayoría de ellos volátiles, y que generan en conjunto el aroma de dicho vegetal” [13].

Los AE representan sólo una pequeña fracción de la planta de la cual se derivan, pero le dan un olor característico a toda la planta [14]. Existe una gran gama de AE, los hay desde los que poseen aromas finísimos y son empleados en perfumería (e.g. AE de vetiver), hasta los que no poseen tan agradables olores, pero sí otras cualidades, por ejemplo, pueden usarse como agentes antibacteriales o antifúngicos (e.g. AE de oregano); otros aceites pueden ser tóxicos para los humanos, por ejemplo, AE de Boldo, algunos, se utilizan en aromaterapia como el de ylang-ylang o como saborizantes de bebidas gaseosas como los de los cítricos y del jengibre.

Los AE se pueden clasificar de acuerdo con su consistencia, origen y naturaleza química de los compuestos mayoritarios [15] (Véase la **Tabla 1**). Acorde con la consistencia, existen esencias fluidas líquidas a temperatura ambiente (AE de *Lippia organoides*); bálsamos, que son de

consistencia muy espesa (bálsamo del Perú); oleorresinas que tienen la fragancia de la planta en forma muy concentrada y son líquidos muy viscosos o semisólidos (e.g. oleorresina de pimienta negra).

Tabla 1. Clasificación de los aceites esenciales.

CRITERIO	CLASIFICACIÓN	EJEMPLOS
CONSISTENCIA	FLUIDOS	Líquidos muy volátiles a temperatura ambiente: Esencias de menta, salvia, limón y albahaca.
	BÁLSAMOS	De consistencia espesa, poco volátiles y propensos a polimerizarse: Bálsamos de copaiba y de Perú.
	OLEORRESINAS	Líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas: Caucho, gutapercha y oleorresina de páprika, etc.
ORIGEN	NATURALES	Se obtienen directamente de la planta y no se someten posteriormente a ninguna modificación física o química: Esencias de plantas aromáticas y flores.
	ARTIFICIALES	Se obtienen a través de los procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno de sus componentes principales, o son la mezcla de varias esencias naturales, e.g. esencia de anís enriquecida con anetol.
	SINTÉTICAS	Mezclas de diversos productos químicos obtenidos sintéticamente.

Tabla 1, Continuación

NATURALEZA QUÍMICA DE LOS COMPONENTES MAYORITARIOS	TIPO MONOTERPENOIDE	Esencias de albahaca, salvia, menta, etc, en las cuales prevalecen monoterpenos, C ₁₀ .
	TIPO SESQUITERPENOIDE	Esencias de ciprés, copaiba, pino, etc, en las cuales abundan sesquiterpenos, C ₁₅ .
	COMPUESTOS OXIGENADOS	Esencias de geranio, jazmín, lavanda, ylang-ylang, ricos en compuestos oxigenados, ésteres, alcoholes, aldehídos.

Respecto a su origen, los AE se clasifican como naturales, artificiales o sintéticos. Los artificiales son AE que son enriquecidos con algún componente (AE de geranio enriquecido con linalool), los sintéticos son mezclas de componentes que han sido obtenidos químicamente [16].

1.1.1 Métodos industriales de obtención de los AE. Para obtener los AE a escala industrial, existen los siguientes dos procedimientos, que se utilizan de acuerdo con los requerimientos del material vegetal [17]: **A.** Expresión en frío, que consiste en presionar el material vegetal hasta obtener el AE que se arrastra con agua a temperaturas bajas, este método se utiliza para obtener AE de la cáscara de cítricos, que es inestable a temperaturas altas y es difícil de extraer, porque se encuentra contenido en glándulas duras; **B.** Métodos destilativos, sobre los cuales se tratará a continuación.

- **Métodos destilativos.** Se utilizan principalmente tres métodos para obtener los AE a partir del material vegetal. El primero consiste en sumergir material vegetal parcialmente en agua dentro del alambique, este proceso se denomina hidrodestilación o destilación con agua. En el segundo método, conocido como destilación agua-vapor, se coloca una cantidad de agua en el fondo del destilador y sobre ésta en un

falso fondo se pone el material vegetal. Los anteriores procesos requieren de una fuente de calor que puede ser gas natural, y un sistema de condensación que utiliza agua como refrigerante, ésta se recircula con ayuda de una bomba hacia el sistema de enfriamiento y de nuevo al condensador; por estas razones los costos son relativamente bajos. Un tercer proceso denominado destilación con vapor o arrastre con vapor, requiere de una caldera que produce el vapor, el cual se introduce en el alambique donde se encuentra el material vegetal, esto hace más costoso el método y más difícil de implementar, pero a cambio de esto, se obtienen los AE de mayor calidad, en un periodo de tiempo más corto.

En los métodos destilativos el agua penetra los tejidos de la planta disolviendo parcialmente los componentes volátiles, difundándose por las membranas celulares y vaporizándose desde la superficie, luego el AE se arrastra por el vapor de agua hasta el condensador y, finalmente, se separa por decantación; este proceso continúa hasta que se agote el AE en los tejidos [13, 18]. Como el agua es el solvente de extracción, en la fase inicial del proceso los compuestos oxigenados (polares), se destilan más rápido que los compuestos terpénicos no oxigenados que destilan después, en orden creciente de su punto de ebullición [19].

1.1.2 Control de calidad de los AE y su adulteración. Se requiere establecer la composición química y algunas propiedades fisicoquímicas de los AE para clasificarlos de acuerdo con la calidad que se desee para determinada especie. Como ejemplo ilustrativo está el aceite de ylang-ylang, pues de acuerdo con el contenido de compuestos oxigenados (*i.e.* acetato y benzoato de bencilo), el valor del aceite esencial se incrementa, así como su posición en la escala de calidad que va desde la tercera (la más baja), cuando el AE es rico en sesquiterpenos no oxigenados, hasta la “Extra”, cuando el AE es rico en compuestos oxigenados como ésteres [20]. El control de calidad de un aceite esencial tiene como objetivo garantizar que éste tenga unas determinadas características

composicionales y organolépticas definidas, y que éstas se mantengan de un lote de producción a otro. A través de un análisis químico se puede evaluar:

- El cumplimiento de las normas de calidad;
- Detección de adulteraciones;
- Diferenciación de calidades;
- Normalización de calidades, e.g. estandarización de una esencia de menta por mezclado de distintas partidas con diferentes calidades;
- Determinación que el producto es realmente natural.

Para rechazar un determinado lote de producción de AE se utilizan diferentes parámetros analíticos y los valores obtenidos para una muestra se comparan con los establecidos en la correspondiente norma [13]. Los principales parámetros analíticos empleados en el control de calidad de los AE se resumen en la **Tabla 2**.

La cromatografía es el método que más se usa para análisis de AE en los últimos años; por ejemplo, la cromatografía de gases acoplada a espectroscopía infrarroja se utilizó para la determinación de adulteraciones, es el caso del AE de tomillo Francés conocido como “*Thyme de Provence*”, el cual tiene un precio elevado comparado con el aceite esencial de tomillo de Marruecos, que se agrega al Francés como adulteración, pero ningún AE de tomillo tiene como compuesto mayoritario borneol excepto el de Marruecos (ca. 26.22%); de esta manera, se puede descubrir la adulteración del “*Thyme de Provence*”, realizando la cuantificación de borneol por GC-IR [21].

Tabla 2. Parámetros analíticos empleados en el control de calidad de los AE.

1. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS	Olor, color, apariencia
2. DETERMINACIONES FÍSICAS	Densidad, poder rotatorio, índice de refracción, miscibilidad con etanol, punto de congelación, punto de inflamación, rango de destilación.
3. ÍNDICES QUÍMICOS	Índices de acidez, de éster, de saponificación, de acetilo y de fenoles.
4. CARACTERÍSTICAS CROMATOGRÁFICAS	Perfil cromatográfico, cuantificación de los componentes principales.
5. CARACTERÍSTICAS ESPECTROSCÓPICAS	Espectros ultravioleta-visible, Infrarrojo, espectrometría de masas.
6. OTRAS DETERMINACIONES	Residuos de pesticidas, metales pesados.

De la misma manera, el analista químico hoy en día acude a la cromatografía como la técnica de separación y a la espectrometría de masas para identificar los compuestos presentes en las mezclas. El poder de GC-MS radica en los avances de la técnica de separación y en el desarrollo de la detección sensible por espectrometría de masas; así como en los nuevos sistemas de tratamiento de datos que son de gran importancia en el área de los aceites esenciales [22]. Además de la combinación GC-MS, hay otras importantes técnicas en la industria perfumística como lo es la cromatografía de gases con detección olfativa, puesto que la relación entre la concentración del componente e intensidad de su olor puede variar para diferentes compuestos, y no siempre los componentes mayoritarios detectados por FID (detector de ionización en llama) o MSD (detector selectivo de masas) son los mayores contribuyentes en el olor del aceite, en cambio, con asistentes humanos como “detectores” (narices), su significado sí se puede determinar mejor [23].

1.2 MERCADO DE LOS ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales son productos de alto valor comercial en el mercado mundial, que aunque no se consumen directamente, en forma pura, tienen múltiples aplicaciones en las industrias de fragancias, aromas y sabores, medicamentos y otros productos con diferentes usos químicos; cada industria requiere distintos AE [13, 24], lo que se puede resumir en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Principales usos de los AE.

Sector económico	Industria	Áreas de aplicación
Fragancias	Perfumes	Acentuar notas de superficie, medias y bajas de perfumes y aguas de perfume, de tocador etc.
	Cosméticos	Hacer más agradable, o impartir identidad a los productos cosméticos, <i>i.e.</i> jabones, champúes, cremas.
	Aseo y limpieza	Otorgar fragancia a los productos de limpieza para pisos, baños, cocinas, etc.
	Plásticos y Pinturas	Enmascaradores de olores que poseen los cauchos y algunos pigmentos.
Aromas y Sabores	Alimentos	Confitería: menta, anís, eucalipto, jengibre. Cárnicos como jamón y salchichas: tomillo orégano. Condimentos: mostaza, albahaca, tomillo.
	Bebidas	Refrescos y licores: lúpulo, anís, sazafrán, jengibre, cítricos.
	Cigarros	Menta y vainilla.
Medicamentos (medicina alternativa)	Antisépticos	Tomillo, clavo, menta y orégano.
	Con efecto sobre el SNC	Nerolí y lavanda, sedantes; limón, eufórico; valeriana y lúpulo, tranquilizantes.
	Efecto sobre el aparato respiratorio.	Tomillo, eucalipto y pino
	Efecto sobre el aparato digestivo	Manzanilla, anís, romero y coriandro.
	Aromaterapia	Vetiver, Ylang-ylang.

Tabla 3, Continuación

Otras actividades químicas	Petroquímica	Utilización de terpenos como vehículo de flotación y lubricantes
	Disolventes	Disolventes para oleos y pinturas, y para limpiadores de <i>chips</i> de computadores
	Biocidas	Bactericidas: tomillo, clavo, orégano y menta. Insecticidas: coriandro, citronela, limonaria, tomillo.

Los sectores económicos que más utilizan los AE son de alimentos, aromas, sabores y de fragancias; estas actividades facturaron en 2004 cerca de 11 billones de Euros, de los cuales el 6% se destinó a investigaciones concernientes al desarrollo de tecnología [25]. El 50 % de la producción mundial se destinó a aromatizantes, el 25% a las fragancias, el 10% a aromaterapia, el 5% a fitoterapia y a la obtención productos de mayor valor agregado (citral, eugenol, anetol, timol, carvona entre otros) útiles, entre otras cosas, en química orgánica fina [26, 27]. Las empresas europeas que más se destacan en el consumo de AE y oleorresinas con fines cosméticos son Unilever del Reino Unido, Wella y Beresdorf de Alemania, y L’Oreal y Sanofi de Francia [28].

Los Estados Unidos y la Unión Europea (EU) son los mayores consumidores de los AE en el mundo; los países de la Unión Europea en 2004 consumieron 48.600 toneladas de los AE, por un valor de 501 millones de Euros [25]. Entre 2002 y 2004 hubo un incremento en el volumen de consumo en el 3%, aunque los precios mostraron fluctuaciones, países como Francia, Inglaterra y Alemania mantuvieron un aumento promedio del 3% en el volumen de consumo; sin embargo, países como Hungría y República Checa, que son nuevos socios de la EU, junto con Finlandia, aumentaron el consumo de los AE en porcentajes que van del 18% (Finlandia) hasta el 99% (Hungría). Países

Latinoamericanos como Argentina, Brasil y México, junto con otros en vía de desarrollo rápido, como India, Marruecos e Indonesia, representan el 60% de las importaciones de aceites esenciales de la EU [25]. La **Figura 1** representa la participación de algunos países en el mercado mundial de aceites esenciales [29].

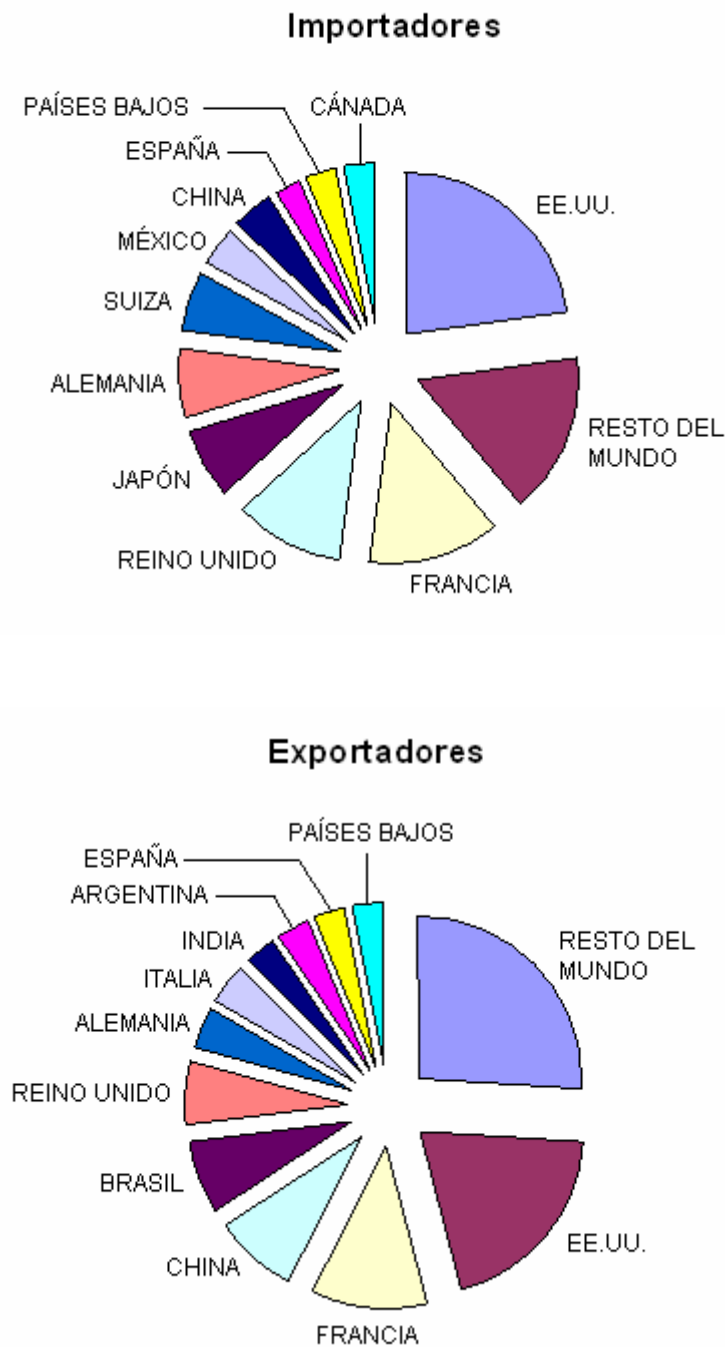


Figura 1. Principales países importadores y exportadores de aceites esenciales en el mundo.

En el 2007 EE.UU. exportó una cifra récord de 1,19 billones de dólares, incrementando en 13 % lo registrado en 2006; Canadá y la Unión Europea son los principales importadores con un 26 y 24 %, respectivamente [30].

Por su parte, Colombia importó en el año de 2002, cerca de 163 millones de dólares, siendo EE.UU. y México los principales proveedores, esta demanda está representada principalmente por empresas multinacionales con sedes en Colombia [24]. El valor de las importaciones en dólares disminuyó durante el periodo de 1998-1999, presentando el aumento de 2001 a 2002, que fue en c.a. 100% (Ver **Figura 2**). Aunque nuestro país no es un productor de los AE y otras mezclas odoríferas, en 2002 exportó cerca de 20 millones de dólares por este concepto, en su mayoría a países del área Andina, pero esto fue producto de la actividad comercializadora (compra-venta) de multinacionales radicadas en nuestro país [24]; de ahí, se vislumbra la necesidad de crear una industria nacional de los AE.

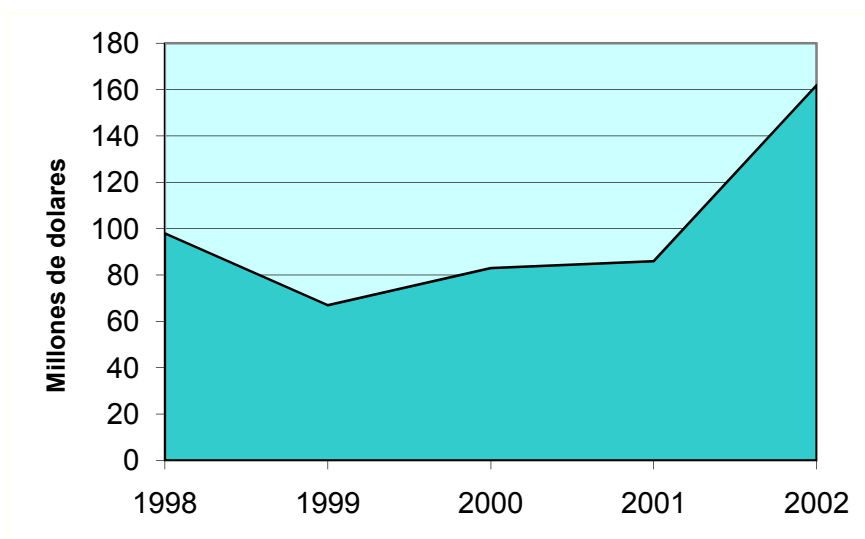


Figura 2. Dinámica de las importaciones colombianas de aceites esenciales y mezclas odoríferas durante el periodo 1998-2002.

1.2.1 Aspectos del mercado del AE de tomillo y productos relacionados. Dentro de los usos principales del aceite esencial de tomillo figuran los siguientes: como saborizante en cárnicos reemplazando a la hierba seca, ingrediente de salsas u otros condimentos, agente antibacterial y antioxidante en alimentos semiprocesados; los AE y extractos ricos en este compuesto como los de algunos quimiotipos de orégano, tomillo e inclusive el de *Lippia origanoides* se han usado como biocidas orgánicos [31].

Dentro de otros usos, no menos importantes, está el de preparados homeopáticos contra afecciones respiratorias y digestivas. También el AE de tomillo lo usan como fungicida ecológico, y el timol presente en el AE de tomillo es utilizado como acaricida contra el parasito *Varroa* en apicultura [32].

Empresas francesas como *Essences Naturelles Corses*, se especializan en la producción de aceite de tomillo [33]; algunas otras empresas como *Laksmi Traders* y *Rajesh Trading* de India, se ocupan de la separación de timol de los AE, que lo contienen, para su posterior comercialización [33, 34], pues éste es un producto costoso, aunque no se disponga de cifras fiables en este concepto. En Argentina el precio del AE de tomillo llega a costar 94,8 dólares por un kilogramo [29]. Según el directorio comercial español Kompass [35], hay 159 empresas en el mundo que comercializan el AE de tomillo, la mayoría de ellas están en países como la India (27), Francia (32), Polonia (21), Suiza (8) y España (4). De otro lado, hay en el mundo 35 que se dedican a comercializar el timol, la mayoría está radicada en Francia (8), España (6), y en la India (2).

El AE de *L. origanoides* por poseer una composición similar al del tomillo, podría sustituirlo en algunos usos. Además el AE de *L. origanoides* ya ha mostrado actividad biológica, y se han encontrado cantidades altas de timol en el. Aprovechando el mercado del AE de tomillo el AE de *L. origanoides* podría competir con este teniendo en cuenta su rendimiento, la mayor producción de biomasa y su fácil adaptación en climas calidos.

1.3 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES VEGETALES EN EL LABORATORIO

Comúnmente se utilizan tres técnicas para extraer metabolitos secundarios volátiles en el laboratorio, a saber: hidrodestilación asistida por microondas (MWHD), destilación-extracción simultánea con solvente (SDE) y extracción con fluido supercrítico (SFE). Stashenko E. y colaboradores [36] han investigado diferentes técnicas -entre las cuales se encuentran las tres anteriores-, para la extracción de los metabolitos secundarios de *Lepechinea schiedeana*, mostrando que SFE permitió aislar compuestos más pesados y menos volátiles, *i.e.* diterpenoides y fitoesteroides, que no fueron extraídos por las demás técnicas (SDE y MWHD); mientras que SDE recuperó principalmente mono- y sesquiterpenoides y sus análogos oxigenados. MWHD es una técnica que extrae los AE con un perfil cromatográfico similar al obtenido de aceites extraídos por técnicas a escala industrial.

1.3.1 Hidrodestilación asistida por microondas. Esta técnica fue patentada por J. Paré [37], es de gran utilidad para la extracción de los AE a escala de laboratorio, pues es rápida, sencilla y relativamente económica. En su modificación, que se usó en este trabajo, el material vegetal se sumerge al agua dentro de un matraz de 2 L; luego, bajo el efecto de la radiación, el agua se calienta hasta ebullición disolviendo parcialmente el AE alojado en los tejidos vegetales. Estas estructuras celulares se rompen por la presión de vapor elevada y la esencia se libera, y se arrastra por el vapor de agua, que luego se condensa.

En el Laboratorio de Cromatografía de la UIS se han realizado numerosos trabajos, usando esta técnica y optimizando las variables de extracción, para un mejor rendimiento, como lo describen Stashenko y colaboradores [38] y Tsarkova [39]. En estas investigaciones, el balón que contiene el material, se introduce al horno microondas comercial, el material vegetal y el agua se calientan en el matraz, así se permite aislar el aceite, evaporarlo y luego condensarlo en una trampa tipo Dean-Stark. El tiempo

de extracción es de aproximadamente 40 min, que es mucho menor que las 3 ó 4 horas necesarias para la hidrodestilación convencional.

Craveiro y colaboradores [40], también describen un método de extracción por microondas para AE como el de *Lippia sidoides*, en el cual con ayuda de una bomba de vacío y una trampa de frió, se logra obtener el extracto en tan solo 5 min.

1.3.2 Destilación-extracción simultánea con solvente. Godefroot y colaboradores [41], en 1981 reportaron el diseño de un equipo modificado a micro-escala de destilación-extracción simultánea con solvente, a partir del descrito en 1964 por Likens y Nickerson [42]. Este método permite operar con solventes de alta densidad, sin necesidad de concentrar el extracto por evaporación, que se recoge en 1 mL de solvente, siendo el diclorometano el más utilizado por su densidad y su compatibilidad con los compuestos presentes en el AE. Al trabajar con estos volúmenes de solvente y pequeñas cantidades de material vegetal se reducen los costos del análisis, la contaminación, así como el tiempo, pues un estudio completo, incluyendo la preparación de la muestra y el análisis cromatográfico, dura 4 h [41]. Además, el método permite también cuantificar sustancias que se encuentran a nivel de trazas en concentraciones del orden de ppb.

En el Laboratorio de Cromatografía se han realizado estudios con esta técnica, utilizando un montaje similar al descrito por Godefroot, siguiendo una metodología descrita por Stashenko y colaboradores [3], en la cual se introducen 10 g del material vegetal (MV) con 30 mL de agua, 2 mL de diclorometano; la extracción dura 2 h, y se inyecta en el cromatógrafo 1 mL de extracto.

1.3.3 Extracción con fluido supercrítico (CO₂). En la actualidad, la extracción con fluido supercrítico es cada vez más usada para la extracción de esencias de las plantas [43]. Esta técnica ha ganado aceptación porque es considerada segura para la salud de las personas y,

los extractos obtenidos han sido reconocidos por su calidad de olor y sabor sobre otro tipo de extractos, aunque la SFE sea costosa; estas características son los que se tienen en cuenta en el momento de elegir esta técnica [44, 45]. Además es un método funcional ya que variando las condiciones de temperatura y presión se pueden obtener selectivamente diferentes clases de extractos. El uso de ciertas sustancias, a presiones y temperaturas cercanas a las críticas, se basa en que éstas podrían ser consideradas como solventes adecuados para la extracción de metabolitos volátiles y semivolátiles de las plantas [46-48].

La técnica, patentada por Walter Jennings de *J & W Scientific* [49], incluye un montaje tipo Soxhlet, el cual se introduce, junto con el CO₂ sólido (hielo seco), en un cilindro metálico que soporta presiones altas (hasta 1500 psi), y que mantiene las condiciones requeridas para que el CO₂ se comporte como fluido supercrítico. De esta manera se puede realizar una extracción en Soxhlet convencional, pero en condiciones sub- y super críticas [50]. Además, la alta densidad del CO₂ supercrítico hace que éste sea un solvente adecuado para una gran variedad de sustancias. En el Laboratorio de Cromatografía se han establecido condiciones para extracción de metabolitos secundarios volátiles, *i.e.* 10 g de MV, 320 g de CO₂ y 2 h de extracción, así lo reportan Stashenko y colaboradores en sus trabajos [3, 50].

1.4 SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES DE UN EXTRACTO

En la actualidad, los métodos modernos de análisis de aceites esenciales están basados principalmente en la cromatografía de gases capilar, usando detectores convencionales, *e.g.* de ionización en llama (FID) y selectivo de masas (MSD) [19].

El estudio de la composición y el control de calidad de las esencias se realizan a través de diferentes métodos de separación, identificación y cuantificación, entre los cuales se destacan los siguientes [51]:

- Métodos químicos de separación (obtención de derivados);
- Destilación fraccionada;
- Cromatografía de capa fina;
- Cromatografía en columna (obtención de fracciones);
- Cromatografía líquida de alta eficiencia (fraccionamiento);
- Cromatografía de gases (separación de componentes y su cuantificación);
- Espectrometría de masas (identificación de los compuestos);

El presente estudio, principalmente, está sustentado en la cromatografía de gases capilar, que es la técnica más usada en el análisis de los AE. A continuación, se tratarán brevemente los puntos más importantes.

1.4.1 Cromatografía de gases capilar. A principios del siglo XIX Mikhail Tswett, botánico ruso, que trabajó en la Universidad de Varsovia, separó pigmentos naturales en zonas coloreadas, por el paso de extractos vegetales a través de columnas adsorbentes empacadas. Más tarde, él designó como “cromatografía” (escritura del color), al fenómeno observado [47]. Desde entonces, se ha empleado este término para referirse a todos los procesos que conlleven distribución de compuestos entre dos fases, una móvil y otra, estacionaria, así no sean coloreadas las zonas separadas, que son analizadas por cromatografía de gases. De esta manera, la cromatografía de gases es un método de separación en el cual los componentes de una muestra se reparten o distribuyen entre dos fases: una de éstas es estacionaria, con un área superficial relativamente grande, y la otra es un gas el cual se percola a través de la fase estacionaria [44]. La muestra es vaporizada y arrastrada por una fase gaseosa móvil a través de la columna muy delgada. La repartición de las sustancias entre las fases estacionaria líquida y móvil (equilibrio), se presenta de acuerdo con sus solubilidades a determinada temperatura. Los componentes de la muestra, llamados solutos o analitos, se separan de los otros basados en sus presiones de vapor *relativas* y por la afinidad por la fase estacionaria. Este tipo de proceso cromatográfico se llama

elución [52]. Este, y otros procesos, se llevan a cabo en un cromatógrafo de gases que consta de inyector, columna, detector y un sistema de datos, así como se muestra en la **Figura 3**.

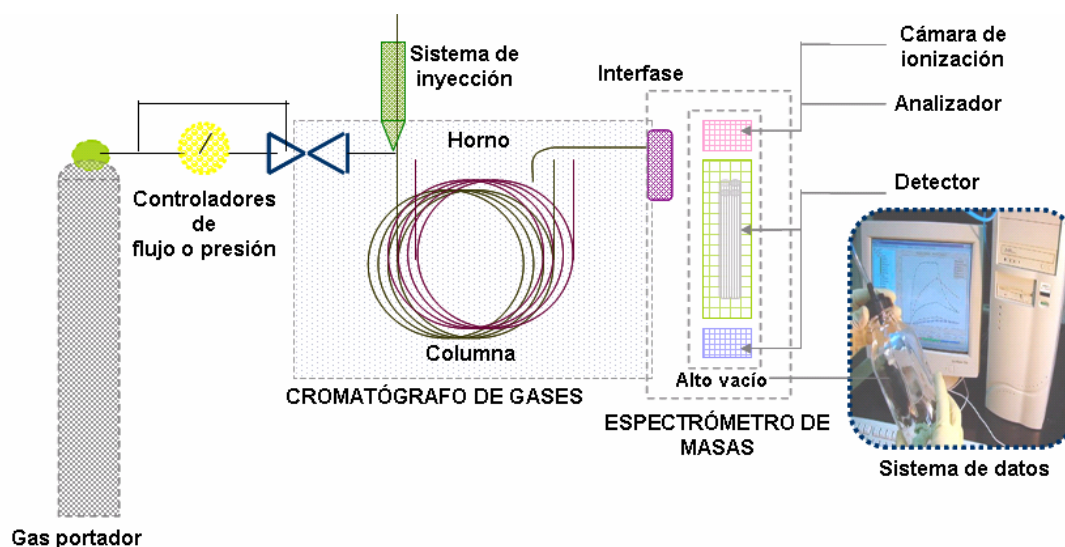


Figura 3. Diagrama de bloques principales de un cromatógrafo acoplado a espectrómetro de masas.

La columna cromatográfica es la parte más importante del sistema cromatográfico, cuya elección está guiada por la naturaleza de la muestra a analizar. La polaridad de la fase estacionaria, diámetro y longitud de la columna influyen directamente sobre la eficiencia de la separación y el tiempo de análisis [53]. Las columnas usadas actualmente están constituidas por un tubo de sílice fundida que es flexible, de diámetro muy pequeño (estándar, 0.25 mm) y variadas longitudes (desde 15 a 100 m); éstas proporcionan resolución alta y permiten separar analitos en función de sus diferentes polaridades, volatilidades y pesos moleculares. Entre las columnas más usadas se encuentran la DB-WAX, que posee una fase polar de poli(etilenglicol) y la DB-5MS de fase estacionaria apolar de 5%-fenil-poli(dimetilsiloxano); estas fases están soportadas sobre las paredes de la columna. Como fases móviles comunes se encuentran los gases helio, argón, nitrógeno e hidrógeno siendo el primero el gas más empleado en la cromatografía capilar. Por otra parte, también existe una

serie de detectores con principios fisicoquímicos de funcionamiento distintos, que se eligen de acuerdo con la naturaleza de los analitos; entre los más comunes están el detector de nitrógeno-fósforo (NPD), que es un detector selectivo, de captura de electrones (ECD), de ionización en llama (FID) y selectivo de masas (MSD), entre otros. Los modos de inyección también varían en función de la naturaleza de los solutos y su concentración en la matriz; a saber: *split*, *splitless*, *on-column*.

1.4.2 Espectrometría de masas. La espectrometría de masas con ionización por impacto de electrones, está basada en la generación de iones en fase gaseosa a partir de las moléculas de analito, seguida de la separación de esos iones y su detección. El espectro de masas resultante es un gráfico de la abundancia relativa de los iones producidos en función de su relación m/z . Hoy en día, la espectrometría de masas es una técnica altamente desarrollada, gracias a los modernos sistemas de tratamiento de datos, entre otras características. Esta técnica comprende cinco pasos: (1) Introducción de la muestra; (2) Ionización de los analitos en fase gaseosa, a presión reducida; (3) Separación de iones según sus masas (más exactamente, m/z); (4) Detección de los iones (medición de corrientes iónicas) y, (5) Procesamiento y análisis de los datos. MS es una técnica de separación y detección de iones fragmento, cuyo análisis permite establecer la estructura molecular de una sustancia ionizada y disociada [48].

MS es una técnica de aplicación analítica en muchos estudios cualitativos y cuantitativos. Las aplicaciones cualitativas comprenden la elucidación estructural de compuestos desconocidos, entre los cuales figuran productos naturales, metabolitos de drogas y otros xenobióticos, y compuestos sintéticos, entre otros. En este campo, MS es importante para la determinación de la fórmula molecular o composición elemental (MS de alta resolución) y elucidación estructural. MS es la técnica espectrométrica más sensible para el análisis molecular, comparado con otras técnicas como espectroscopías NMR o IR. En el análisis cuantitativo MS se aplica en el desarrollo definitivo de métodos de referencia y en la

validación de procedimientos para el análisis minucioso de algunas muestras, e.g. policlorodibendioxinas y drogas en matrices biológicas, agentes para *doping*, entre otras [54].

1.4.3 Cromatografía de gases – espectrometría de masas. El primer reporte de esta combinación realizada por Holmes y colaboradores, apareció en 1960 [44], desde entonces pasaron cinco años hasta que se dispuso comercialmente de un equipo que acoplara las dos técnicas. Hoy en día GC-MS es la técnica que goza de gran importancia y valor para análisis de los AE. La característica esencial de la espectrometría de masas aplicada a su análisis es que los espectros de masas son particularmente únicos para muchos componentes de aceites esenciales e.g. terpenos. Sin embargo, la combinación del tiempo de elución del compuesto con su espectro de masas, hacen que la calidad de los datos y la confiabilidad de la identificación aumenten considerablemente [22, 47,48]. Los tiempos de retención de la sustancia y de los de hidrocarburos lineales se utilizan para determinar los llamados índices de Kovàts (Ver la fórmula en la página 50), que sirven para identificar tentativamente los compuestos, pues todas las sustancias que se analizan por GC tienen I_k diferentes, aunque raramente pueden tener los I_k muy cercanos. La identificación por MS se hace por comparación del espectro de la sustancia con los espectros de distintas bases de espectros e.g. NIST, Wiley, Adams, o con los de los patrones certificados; siendo el analista químico quien verifica las rutas posibles rutas de fragmentación y los fragmentos característicos de ciertos grupos de moléculas.

1.5 PLANTAS AROMÁTICAS

Desde hace mucho tiempo el hombre ha utilizado plantas aromáticas para aliviar algunas de las dolencias que lo aquejaban y para aromatizar los sitios de sus rituales o los lugares donde moraba. Desde entonces, su memoria se enriqueció con sabores y olores, que fueron formando parte de su cultura e idiosincrasia [13]. Desde los antiguos Egipcios en 2300 a.C., que utilizaban tomillo, hasta los grandes conquistadores que

narraban de olores y esencias como la pimienta, canela o cacao, se tienen nociones sobre planta aromáticas y su uso. Se estima que hay unas 25000 plantas aromáticas de las cuales solo se conocen químicamente el 10% [55]. Otras estimaciones se pueden encontrar en la literatura, donde el número de plantas aromáticas se acerca a 3000 de ellas sólo se comercializan 250 [21].

Existen muchas especies vegetales con propiedades aromáticas, desde plantas superiores, hasta algas o líquenes. Algunas familias botánicas como las Pináceas, Verbenáceas, Mirtáceas, Lamiáceas, Rutáceas, Lauráceas, Piperáceas, Apiáceas y Asteráceas son fuente de productos aromáticos. Se estima, que aproximadamente el 65% del mercado de esencias proviene de especies cultivadas, el 1% de especies silvestres y el 33% de árboles, mayormente, explotaciones forestales [13]. Otro punto importante es que para especies cultivadas siempre se espera una producción constante de composición estable, lo que no han podido lograr algunas empresas pequeñas en nuestro país [24].

1.5.1 Metabolitos secundarios en plantas. Todas las células vegetales realizan procesos metabólicos comunes que conducen a la formación de compuestos como azúcares simples, aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos y polímeros derivados de ellos, polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, entre otros, esenciales para la vida celular y, en general, de la planta. Estos procesos se denominan metabolismo primario y los compuestos formados se designan como metabolitos primarios. Además de estos procesos, las plantas desarrollan otras rutas que conducen a la formación de compuestos usualmente peculiares de ciertos grupos taxonómicos, que hacen parte del metabolismo secundario, a los que se les conoce como metabolitos secundarios [56-59].

Anteriormente, los metabolitos secundarios de las plantas se consideraban sustancias de “desecho” para los vegetales, carentes de una función fisiológica definida; en la actualidad, se conoce que, si bien los compuestos secundarios no tienen, como los metabolitos primarios,

una importancia para la célula productora, sí pueden poseer importancia fisiológica para el organismo productor como un todo. Dentro de todos estos compuestos se encuentran los isoprenoides y, más específicamente, los terpenoides, que son compuestos abundantes en los AE [56].

La biosíntesis de los metabolitos secundarios suele hallarse restringida a fases específicas del desarrollo tanto del organismo como de la células especializadas, y a períodos de estrés causados, por ejemplo, por la deficiencia de nutrientes, factores ambientales, o el ataque de microorganismos o insectos, entre otros [55] y se lleva a cabo en tres rutas, principalmente, la del acetato-malonato, del acetato mevalonato y del ácido shiquímico. Los metabolitos secundarios juegan un rol ecológico muy importante en la planta.

1.5.2 Terpenos. Los terpenos o isoprenoides constituyen uno de los grupos más grandes de compuestos secundarios presentes en el reino vegetal. En las plantas, igual que en los mamíferos, los isoprenoides se sintetizan a partir del compuesto C₅ isopentenil pirofosfato (IpPP), que se puede considerar como el isopreno activo, compuesto “hipotético” de Ruzička [51, 57]. Los isoprenoides se clasifican, según el número de unidades de isopreno, así: monoterpenos (2 unidades); sesquiterpenos (3 unidades); diterpenos (4 unidades), triterpenos (6 unidades), tetraterpenos (8 unidades) y politerpenos (más de 8 unidades).

En la fase preliminar de la formación de IpPP, participa el acetilcoenzima A, como precursor el cual, por la mediación de una enzima, se convierte al ácido mevalónico, que por la intervención de otra enzima, origina el IpPP; a partir de éste, se forman el geranil pirofosfato, que da origen a los monoterpenos, el farnesil pirofosfato que da origen a los sesquiterpenos y el geranil geranil pirofosfato, a partir del cual se forman los diterpenos [55, 57].

1.5.3 Monoterpenoides. Estas sustancias constituyen una amplia familia de alcoholes, hidrocarburos, cetonas monoterpénicas, etc., los cuales son un grupo importante de compuestos presentes en los aceites esenciales obtenidos a partir de las raíces, hojas y tallos de varias plantas. Ellos poseen olores agradables y algunos son de suma importancia industrial, ya sea aislados o como una mezcla. Los monoterpenos se dividen en tres grupos: acíclicos, monocíclicos, bicíclicos y tricíclicos [11, 60].

Dentro de los monoterpenoides acíclicos se encuentran diferentes grupos funcionales; e.g. citral (neral y geranial) y linalool. Los monoterpenos cíclicos también presentan funciones, dentro de las más interesantes se encuentran óxidos y epóxidos, e.g. eucaliptol. Los monoterpenos bicíclicos pueden ser divididos en cinco grupos: grupo de los tujanos, del carano, del pinano, del canfano y grupo del fenchano [60].

1.5.4 Sesquiterpenoides. En los AE los sesquiterpenos son una fracción más pesada y menos volátil, que los monoterpenoides. Ellos se forman por la unión de tres unidades de isopreno. Estos compuestos son relativamente más “nuevos”, que los monoterpenos, pues sólo hasta finales del siglo XIX fueron descubiertos y sólo hasta 1920 se logró conocer más a fondo sobre su estructura. Los sesquiterpenos se dividen en acíclicos, monocíclicos, bicíclicos y tricíclicos; hay un grupo muy interesante de sesquiterpenos que se denominan azulenos, los cuales poseen colores azules y violetas [11, 31]. Estos compuestos también tienen una importancia industrial, pues se utilizan como enmascaradores de olores y fijadores de fragancias y aromas.

1.5.5 Quimiotipos. Quimiotipos son variaciones químicas naturales que suceden en el metabolismo secundario de las plantas, inducidas, quizá por factores ambientales (e.g. tipo de suelo, altitud, exposición al sol, lluvia, época de colecta, variaciones estacionales) [61, 62], que someten al individuo o a un grupo a una condición de estrés, lo que hace que su metabolismo produzca algunos metabolitos en mayor cantidad que otros.

Esto no siempre puede ser cierto en su totalidad y las variaciones observadas puedan estar influenciadas también por factores genéticos.

Hay plantas que pueden presentar diferencias muy marcadas en la composición de su aceite con respecto a un compuesto en particular. Por ejemplo, el contenido de carvacrol en *Lippia organoides* puede variar del 0,1 al 60% [63]. En otros casos, la misma planta puede cambiar su apariencia, como *Lantana camara*, la cual presenta una variación en el color de sus flores amarillo-naranja y rosado-violeta, así como en la composición de su AE [14]. Otros dos interesantes estudios en Brasil y en el Sur de África, se llevaron a cabo con el objeto de dividir numerosas muestras de *Lippia glandulosa* y *Lippia javanica* respectivamente, en grupos químicos para saber cuántos quimiotipos se encuentran en las zonas bajo estudio; las extracciones de AE se realizaron en los dos casos por hidrodestilación convencional y la separación e identificación de componentes por GC-MS. En el primer caso, se describieron dos quimiotipos encontrados en una carretera de 120 km de longitud en un terreno plano, en el segundo caso, se identificaron cinco grupos químicos en un área de 40000 m² [64, 65].

1.5.6 Familia Verbenaceae. Las plantas que pertenecen a la familia *Verbenaceae*, que incluye tanto plantas herbáceas como leñosas, reúnen cerca de 800 especies. Las verbenáceas poseen flores hermafroditas, que tienen forma bilabiada, con el tubo largo y encorvado, cuatro estambres, dos de ellos más largos [66]. Los frutos varían en tamaño, siendo vistosos como en las *Lantana* y pequeños u ocultos en el caso de las *Lippias*, y se descomponen en la madurez [67]. Su distribución es casi mundial y sobresalen por sus cualidades medicinales los géneros *Lantana*, *Lippia*, *Aloysia* y *Verbena*. El estudio de sus aceites esenciales está ampliamente reportado por métodos instrumentales, GC-MS, confirmado por el uso de técnicas de espectroscopía infrarroja y resonancia magnética nuclear de carbono-13 [4, 68].

- **Género *Lippia*.** Este género comprende más de 200 especies de plantas entre las que se encuentran hierbas, arbustos y pequeños árboles. Estas especies se distribuyen principalmente a través de países de Centro y Sur América, y territorios de África tropical. Muchas de estas plantas se utilizan para enfermedades respiratorias y gastrointestinales, presentan diferentes actividades antibacteriales, antifúngicas y antivirales. Las partes aéreas de *Lippias* se utilizan como condimentos, y algunas revisten gran importancia económica, pues sus AE tienen aplicaciones industriales, e.g. los aceites de *Lippia citriodora* y *Lippia graveolens* [4, 68, 69].

1.5.7 Aspectos del cultivo y la cosecha de plantas aromáticas. El aprovechamiento de especies silvestres ha tenido en las últimas décadas un mal manejo, debido a esto hay especies cercanas a la extinción, se observan problemas relacionados con degradación de suelos, y en comunidades rurales la pérdida de trabajo y la reducción del recurso económico proveniente del campo. Las poblaciones de plantas de interés pueden trasladarse a cultivos a través de procesos de domesticación, lo que muy probablemente conlleve un aumento en la producción por unidad de superficie y en la rentabilidad. Para llevar una especie a cultivos, hay que elaborar un paquete tecnológico apropiado para su manejo agrícola, lo que permitirá obtener rendimientos altos con costos de producción más bajos, o sea, con índices de rentabilidad altos [13].

El manejo agrícola va desde técnicas apropiadas para la preparación de la tierra, selección del material genético a sembrar, labores culturales como riego, desmalezado, control de plagas, hasta técnicas de cosecha y postcosecha. El momento de la cosecha o recolección del material tiene una importancia clave para la maximización de la concentración de los componentes esenciales (metabolitos) valiosos. También es importante conocer qué órgano contiene la mayor cantidad de “principio activo” o esencia en el momento de la cosecha, ello, para obtener un producto final con la concentración adecuada. Paralelamente, estos “principios activos”

se desarrollan en determinados momentos del ciclo de la planta, por lo que es indispensable conocerlo, para su manejo y aprovechamiento [70].

2. ANALÍISIS CIENCIOMÉTRICO

La vigilancia tecnológica es un proceso sistemático, que permite analizar y difundir información, mediante métodos legales con el ánimo de identificar y anticipar oportunidades o riesgos y tomar decisiones oportunas. Este proceso sistemático utiliza herramientas como bases de datos, patentes y buscadores de *Internet* que ayudan en el proceso de organización de la información, que es el objetivo primordial de la cienciometría [71, 72]. La cienciometría es el análisis cuantitativo de la actividad científica y técnica, ella permite situar a: un individuo, una disciplina científica, una institución y a un país dentro del contexto de productividad científica.

El estudio fue basado en la búsqueda de publicaciones recopiladas en dos bases de datos, a saber: *Elsevier (SCOPUS)* y *Web of Science (ISI Web of Knowledge, Thomson)*, usando palabras clave “*Lippia origanoides*”, y “Timol”. Fueron cinco las publicaciones encontradas en las dos bases de datos, usando la palabra “*Lippia origanoides*” como se muestra en las **Tablas 4 y 5**; la búsqueda se realizó teniendo en cuenta todos los artículos publicados y referenciados en estas bases de datos. En el caso de la palabra “timol” el periodo de búsqueda fue de 2001 a marzo de 2008, y se encontraron 791 publicaciones en *Web of Science (ISI Web of Knowledge, Thomson)* y de 1091 en *Elsevier (SCOPUS)*.

2.1 BASE DE DATOS WEB OF SCIENCE (ISI WEB OF KNOWLEDGE, THOMSON)

2.1.1 L. *origanoides*. En la **Tabla 4** se observa que las publicaciones disponibles en esta base de datos son de origen suramericano: dos de Brasil, dos de Venezuela, y una de Colombia, en la última por primera vez se comparan la composición y la actividad antioxidante de dos quimiotipos. Estudios de la composición y propiedades del AE sólo hay

tres, las cuales prueban que el AE, rico en carvacrol y timol, inhibe el crecimiento de bacterias y hongos, y posee una actividad antioxidante significativa, de ahí, derivan sus aplicaciones en alimentos.

Tabla 4. Publicaciones sobre *L. origanoides* en la Base de Datos *Web of Science (ISI Web of Knowledge, Thomson)* [Periodo de observación: 1970-2008. Fecha de consulta: 25 de abril de 2008. Ecuación de búsqueda: TS= ("*Lippia origanoides*")].

Autores	Año	Revista	Área de aplicación	País
Stashenko, Ruiz, Muñoz, <i>et al.</i>	2008	Natural Products Communications	Química	Colombia
Oliveira, Leitao, Bizzo, <i>et al.</i>	2007	<i>Food Chemistry</i>	Alimentos	Brasil
Rodriguez, y Sanabria	2005	<i>Interciencia</i>	Alimentos	Venezuela
Guevara, Rosales, y Sanoja	2005	<i>Interciencia</i>	Ambiental	Venezuela
Dos Santos, Lopez, Graças, <i>et al.</i>	2004	<i>Journal of Essential Oil Research</i>	Química de alimentos	Brasil

2.1.2 Timol. Debido a que en este estudio en la composición del AE de uno de los quimiotipos entra timol como componente mayoritario (c.a. 66%) y que es una planta de alto rendimiento del AE, se realizó una búsqueda de publicaciones, sobre este compuesto, y se encontró un número grande de estudios, reflejando que el tema relacionado con el timol y sus propiedades es actual. En la **Figura 4**, se muestra la distribución de estudios en los diferentes países con énfasis en los nueve, que más publicaron. Los EE.UU. es el país que más estudios presenta, seguido de Irán y de cuatro países mas, *i.e.* Italia, Francia, España y

Turquía; en estos últimos países el timol a partir de los cultivos de tomillo y orégano. Se destaca también la presencia de Brasil entre los países con más publicaciones sobre este compuesto.

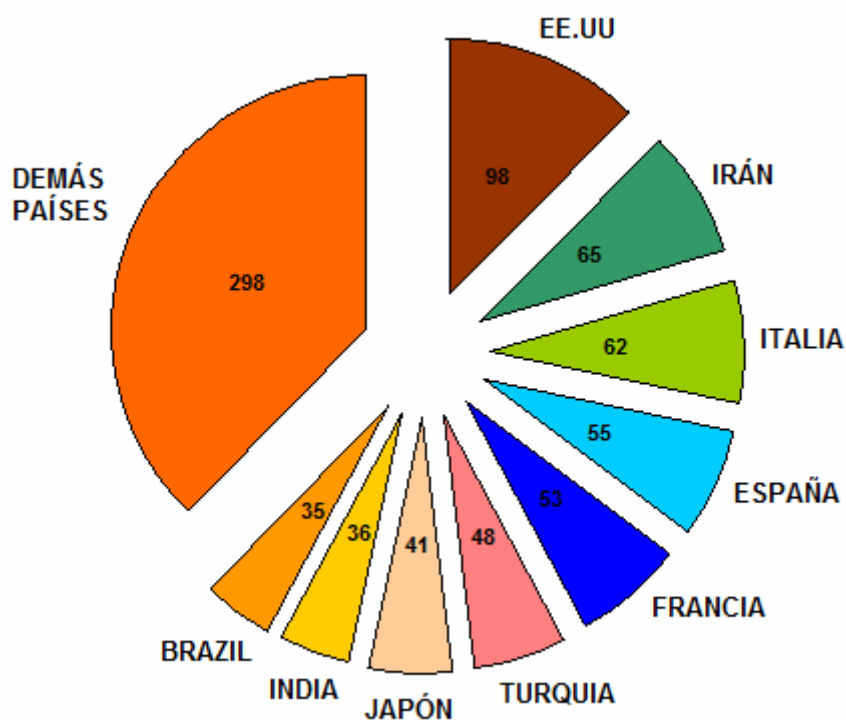


Figura 4. Países con más publicaciones sobre el timol. [Base de datos: *Web of Science (ISI Web of Knowledge, Thomson)*. [Periodo de observación: 2001-2008. Fecha de consulta: 25 de abril de 2008. Ecuación de búsqueda: TS= ("timol")].

El aumento en el número de publicaciones de 2001 a 2005 y el buen repunte en los años 2006 y 2007 (**Figura 5**), muestran cómo cada vez se encuentran nuevas fuentes naturales del compuesto y cómo las aplicaciones se van incrementando y de ahí la posibilidad que la demanda del producto también; en los tres primeros meses de 2008 se encontraron 41 estudios sobre el timol, con la posibilidad de que esta cifra se mantenga o aumente.

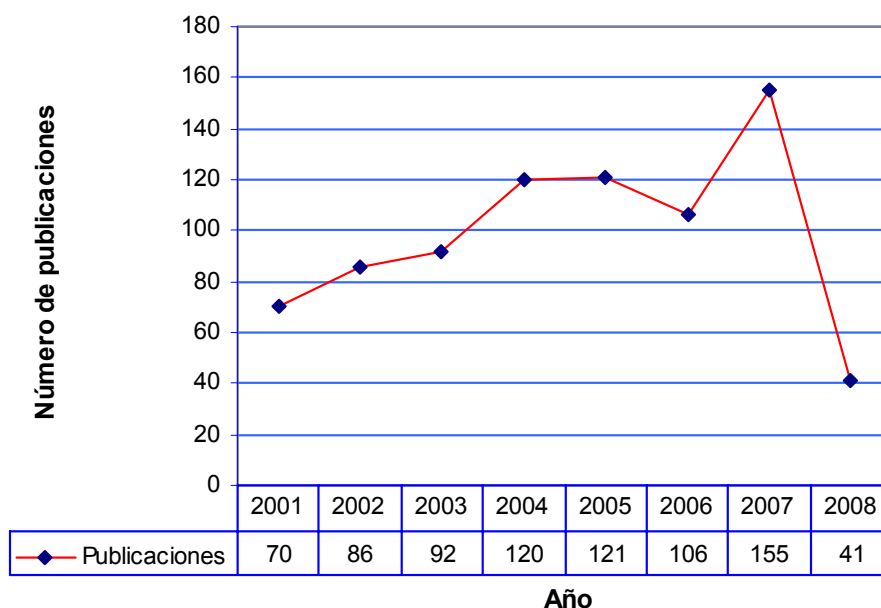


Figura 5. Dinámica de las publicaciones sobre el timol en los últimos siete años. [Base de datos: *Web of Science (ISI Web of Knowledge, Thomson)*. [Periodo de observación: 2001-2008. Fecha de consulta: 25 de abril de 2008. Ecuación de búsqueda: TS= (“timol”)].

En la **Figura 6**, se muestra que en la revista *Journal of Essential Oil Research* se publicó la mayoría de estudios sobre el timol o sobre los AE de plantas que lo contienen. La aplicación que tiene el timol en el campo de los alimentos, como agente fungicida y bactericida, hace que revistas como *Journal of Agricultural and Food Chemistry* y *Journal of Food Protection* publiquen un buen número de estudios sobre este compuesto. Otras publicaciones interesantes aparecen en revistas como *American Bee Journal* y *Caries Research*, reflejando que el timol posee aplicaciones como acaricida contra *Varroa jacobsoni*, que causa grandes pérdidas a los apicultores; y como agente antiséptico y antibacterial en la salud oral.

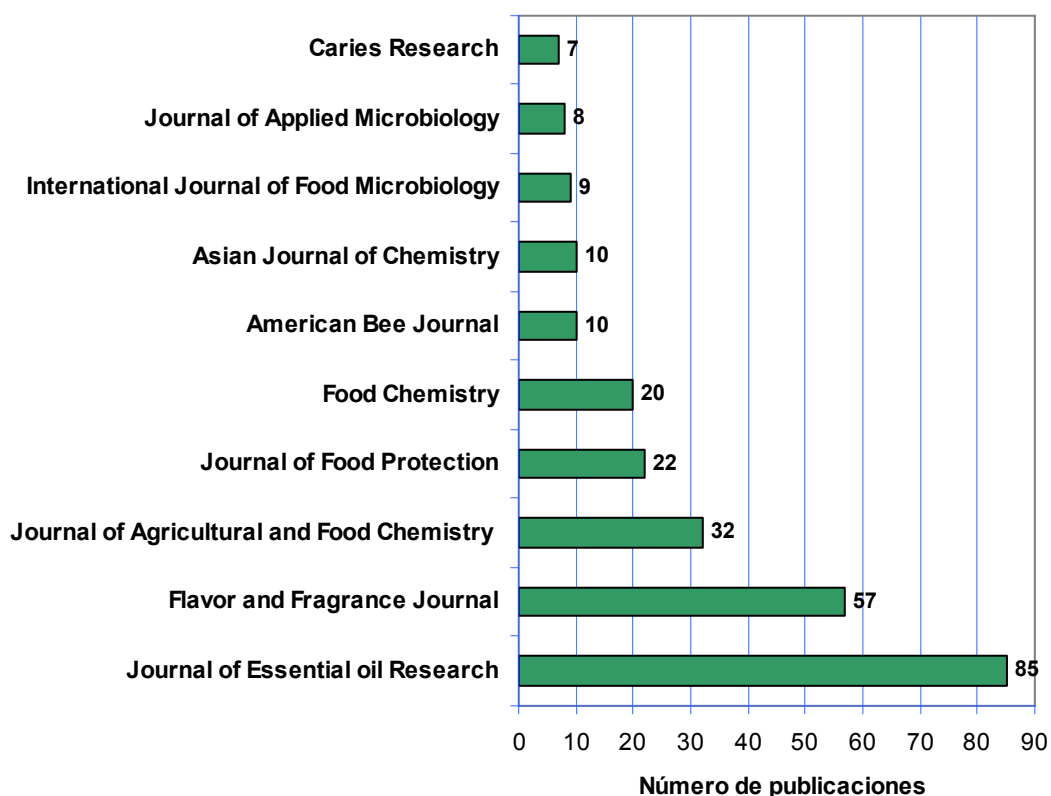


Figura 6. Relación entre publicaciones sobre el timol y las revistas científicas. [Base de datos: *Web of Science (ISI Web of Knowledge, Thomson)* [Periodo de observación: 2001-2008. Fecha de consulta: 25 de abril de 2008. Ecuación de búsqueda: TS= (“timol”)].

2.2 BASE DE DATOS *ELSEVIER (SCOPUS)*

2.2.1 *L. origanoides*. En esta base de datos se encontraron, al igual que en *Web of Science*, cinco publicaciones, de las cuales cuatro son las mismas. Aparece también una publicación alemana, que no comprende el área de los AE sino la de otros compuestos *i.e.* los catalponoles, que son alcoholes sesquiterpénicos. Este artículo es el más antiguo encontrado en las dos bases de datos (Ver **Tabla 5**).

Tabla 5. Publicaciones sobre *L. origanoides* en la Base de Datos *Elsevier (SCOPUS)* [Periodo de observación: 1970-2008. Fecha de consulta: 25 de abril de 2008. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (*Lippia origanoides*)].

Autores	Año	Revista	Área de aplicación	País
Oliveira, Leitao, Bizzo, et al	2007	<i>Food Chemistry</i>	Alimentos	Brasil
Rodriguez, Sanabria	2005	<i>Interciencia</i>	Alimentos	Venezuela
Guevara, Rosales, Sanoja	2005	<i>Interciencia</i>	Ambiental	Venezuela
Dos Santos, Lopez, Graças, et al.	2004	<i>Journal of Essential oil Research</i>	Química	Brasil
Brieskorn, y Pöhlmann	1976	<i>Archiv. der Pharmazie</i>	Fármacos	Alemania

2.2.2 Timol. En esta base de datos se encontró un número significativamente mayor de publicaciones, sobre el timol que el encontrado en *Web of Science*. En la **Tabla 6**, se listan los apellidos y el número de publicaciones realizadas por los diez autores, con mayor productividad sobre este tema. De estos investigadores, la mayoría son turcos y franceses y también se destaca la presencia de un autor iraní. En la gran mayoría de estos estudios, se investigó el efecto del timol sobre diferentes microorganismos, y en los demás, se trabajó con plantas que contienen timol en cantidades altas.

Tabla 6. Autores con el mayor número de estudios publicados sobre el timol. [Base de Datos: *Elsevier (SCOPUS)* Periodo de observación: 2001-2008. Fecha de consulta: 25 de abril de 2008. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (*Lippia origanoides*)].

Autor	País	Nº de publicaciones
Chalchat, J.C.	Irán	13
Sefidkon, F.	Turquía	11
Isman, M.B.	Francia	10
Baser, K.H.C.	Francia	9
Varel, V.H.	EE.UU.	9
Daferera, D.	Croacia	8
Milos, M.	Turquía	8
Polissiou, M.	Francia	8
Figueredo, G.	España	7
Morelli, I.	Turquía	7

Como ocurre en la mayoría de búsquedas, los recursos que más se encuentran disponibles en las bases de datos, son los artículos científicos, y esta búsqueda no es la excepción (**Tabla 7**). Se destaca el número alto de revisiones sobre el timol (51), ratificando la gran variedad de sus propiedades y aplicaciones. Otra clase de publicaciones importantes son las memorias de conferencias, realizadas en congresos *Paper Conference*.

Tabla 7. Tipo de publicaciones sobre el timol. [Base de Datos: *Elsevier (SCOPUS)*. Periodo de observación: 2001-2008. Fecha de consulta: 25 de abril de 2008. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (*Lippia origanoides*)].

Tipo de documento	N° de publicaciones
Artículos	981
Revisiones	51
<i>Paper conference</i> (memorias de congresos)	30
<i>Letter</i>	6
Notas	6
Artículos <i>in press</i>	4
<i>Short survey</i> (comunicaciones cortas)	2
Editoriales	1

Las áreas de investigación son de los indicadores más dicientes de la actividad científica, puesto que ellas proporcionan una idea sobre los campos de aplicación. En la **Figura 7**, se observa, que el timol presenta aplicaciones en la agricultura, así como en áreas de alimentos, química, farmacéutica, microbiología, entre otras. Además, tiene un uso importante en odontología por su actividad antibacterial, siendo usado en la curación de enfermedades bucales producidas por bacterias; se encuentra en productos de higiene oral como los enjuagues bucales.

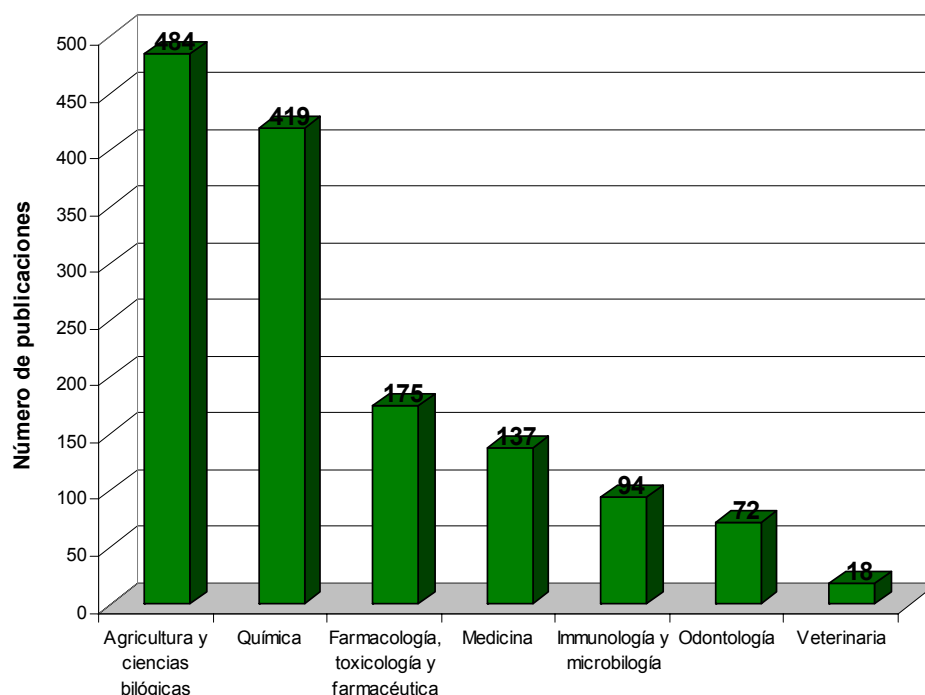


Figura 7. Publicaciones sobre el timol, según las diferentes áreas de investigación. [Base de Datos: *Elsevier (SCOPUS)*. Periodo de observación: 2001-2008. Fecha de consulta: 25 de abril de 2008. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (*Lippia origanoides*)].

2.3 *Lippia origanoides*

La planta *Lippia origanoides* es una especie endémica de la región que va desde México a Brasil [63]. En Colombia se puede encontrar en zonas con ambientes secos o semidesérticos. Esta planta también se conoce con nombres populares como “Orégano cimarrón” y “Orégano de monte”; es un arbusto de 1 a 3.5 m de alto, muy ramificado con hojas aovadas y opuestas, y con inflorescencias axiales de color blanco y muy aromáticas. Para los usos medicinales están aprovechadas sus propiedades como expectorante, antiespasmódico y emenagogo, siendo utilizadas para estos fines sus hojas [4].

2.3.1 Hábitat. En el Cañón del Río Chicamocha (Santander, Colombia), se pueden encontrar plantas de *L. origanoides* formando alianzas y asociaciones vegetativas con otras plantas que presentan en forma

general, rasgos como espinas y agujones, y, en algunos casos sustancias tóxicas que las protegen de cabras e insectos [8, 73]. Esta planta crece en terrenos con inclinaciones de 5 a 45°, que van desde terrazas aluviales hasta laderas con suelos entisoles poco evolucionados. Las terrazas aluviales donde crece más frecuentemente *L. origanoides*, presentan las siguientes características: pedregosas, bien drenadas, pH neutro, contenido bajo de materia orgánica y pobres en fósforo soluble [73].

La zona presenta un monto anual de lluvias de 730.8 mm; se identifican dos épocas de lluvias, una que va de abril a junio y la otra de septiembre a octubre, siendo este último periodo el más lluvioso (124.4 mm). También son dos los periodos secos del año, uno que va de noviembre a marzo y el otro de julio a agosto, siendo enero el mes más seco (11.2 mm). La temperatura media anual es de 24.5°C, la media máxima es de 35.7°C y la media mínima es de 15.8°C [73].

2.3.2 Composición y propiedades del aceite esencial. Son pocos los estudios que se pueden encontrar sobre la composición y propiedades de esta planta, si se compara con el volumen de publicaciones que existen sobre otras plantas del mismo género *Lippia*, como, por ejemplo, *Lippia alba*, *Lippia dulcis*, *Lippia glandulosa*, etc. La mayoría de los estudios sobre *L. origanoides*, publicados en revistas de alto impacto científico, se realizaron en Venezuela, Alemania y Brasil. En Colombia, se han llevado a cabo sobre todo estudios biológicos; las investigaciones sobre la composición química de los metabolitos secundarios volátiles aislados por diferentes técnicas extractivas en diferentes estados vegetativos no se conocen, o, por lo menos, éstas no fueron publicadas.

La composición de los AE de *L. origanoides* colectadas en Cabeceiras, Campo Maior y Jose Freitas, tres localidades del Brasil, presentó como compuestos mayoritarios carvacrol (37.3, 42.9 y 35.5%); *p*-cimeno (12.1, 45.8 y 11.9%) y timol (6.1, 5.1 y 8.4%), respectivamente. Los aceites esenciales se obtuvieron por hidrodestilación convencional y se

analizaron por GC-MS, éstos mostraron actividad contra bacterias *Gram-positivas*, como *Staphylococcus aureus*, y *Gram-negativas* como *Escherichia coli*, y contra hongos como *Candida albicans* [1]. Actualmente, se conoce que el carvacrol y el timol presentan actividades antifúngica, antibacterial y antioxidante [7, 10, 16, 74]. La actividad antimicrobiana de aceites esenciales de especies aromáticas aparece asociada generalmente a los compuestos fenólicos [59, 69], como queda demostrado en un estudio donde compuestos como carvacrol, eugenol y timol aislados de aceite esencial, inhiben el crecimiento de varios microorganismos [10].

Otro estudio sobre el aceite esencial de esta planta [63], colectada en Oriximina, Brasil, obtenido por hidrodestilación convencional y analizado por GC-MS, muestra que el carvacrol fue el compuesto mayoritario (38.6%), seguido del timol (18.5%) y del *p*-cimeno (10.4%). En esta investigación, de nuevo, se evaluaron las actividades antibacterianas y antifúngicas, encontrándose que este aceite inhibe, en la mayoría de los experimentos, el crecimiento de los microorganismos en mayor grado de que lo hacen los fármacos de control, Amfotericina B, Vancomicina y Metilicina.

Hay dos estudios no tan recientes, que tratan de la composición del AE de *L. origanoides*, que resultan interesantes porque se demuestra que hay otros dos quimiotipos de la especie, a saber uno posee el timol, que es el componente mayoritario, ca. 60%, con la presencia de carvacrol a nivel de trazas [75]; en otro estudio se concluye, que dentro de los cuatro principales componentes no se encuentran ni el timol ni el carvacrol [76].

2.3.3 Otros estudios. Un estudio interesante sobre especies con potencial forrajero para cabras [77] mostró, que *L. origanoides* es una especie apetecida por las cabras en épocas de verano. Estos rumiantes comen sus hojas y tallos jóvenes, cuyo valor nutricional se estudió y se determinó que *L. origanoides* es una planta con poco contenido de

proteína cruda (9.42%), alto porcentaje de fibra cruda (38.87%) y bajo porcentaje de cenizas (4.25%).

Hay otros dos estudios sobre *L. origanoides*, realizados en Venezuela y publicados en la revista *Interciencia* [31, 78]. En el primero, se estudia el efecto del extracto etanólico sobre dos hongos que provocan la rizoctoniosis del maíz, lo que causa grandes pérdidas. Este extracto etanólico en bajas concentraciones causó la total inhibición de *Rhizoctonia solani* y *Bipolaris maydis* [31]. La aplicación de resultados de este estudio radica en que estos extractos reemplazarían a productos agroquímicos sintéticos que son contaminantes y nocivos para los humanos. El segundo estudio [78], evalúa el potencial de especies nativas de la región Guayana para repoblar terrenos degradados por la minería; se demostró que especies como *L. origanoides*, sirven para ser sembradas en estas zonas, pues además de ser nativas, toleran gran cantidad de metales pesados en los suelos.

2.4 TIMOL

El timol es un sólido cristalino, de olor pungente, y pertenece a los metabolitos secundarios vegetales de tipo fenilpropanoide [79]. De masa molecular 150,22 g/mol una densidad de 0,97 g/mL y un punto de fusión de 50°C, presenta una gran ventaja al aislarlo, de sus fuentes naturales. Presenta. Este compuesto se usa mucho para la fabricación del mentol, por hidrogenación. Se disuelve fácilmente en bases formando sales [80].

2.4.1 Aceites esenciales que contienen timol. Hay un variado número de plantas que contienen este compuesto fenólico en sus AE, pero principalmente el timol se encuentra en los AE de *Thymus vulgaris* y *Thymus zygis*, los cuales se comercializan en el mercado [17]. También hay otras especies como *Thymus serpyllum* o tomillo silvestre, y *Thymus satureoides* conocido como tomillo Marroquí, que poseen timol. En todas estas especies se encuentra el timol como compuesto mayoritario, junto con el α -terpineol, linalool y borneol; pero es el timol el que hace

preciados estos aceites en los mercados de esencias [17, 21]. También se puede hallar este fenilpropanoide en quimiotipos de *Origanum vulgare* encontrado en Grecia, Lituania e Italia [81-83], y en algunas plantas del género *Lippia*, como *Lippia sidoides*, *Lippia graveolens*, *Lippia microphilla* y *Lippia origanoides* [4, 84].

2.4.2 Bioactividad del timol y de los aceites esenciales que lo contienen. Muchas sustancias de origen animal y vegetal se han usado por el hombre desde hace tiempo, por esto, hoy en día son objeto de numerosas investigaciones encaminadas a su aislamiento, estudio e implementación como posibles agentes farmacéuticos, cosméticos, aromatizantes de distintos productos de aseo humano y doméstico, preservantes de alimentos y plaguicidas con un efecto negativo reducido sobre el ambiente. Algunas de estas sustancias se encuentran en los aceites esenciales, pero para poder aprovecharlos de una manera rentable, tienen que encontrarse en concentraciones relativamente altas [85]. El timol, sustancia de tipo fenólico, se puede obtener de manera sintética a partir del *m*-cresol y propileno [86]. Sin embargo, el timol se halla en varias plantas mencionadas anteriormente, las cuales tienen un uso ethnobotánico definido, y sus AE son ricos en timol y se han evaluado contra diversos microorganismos patógenos con resultados interesantes, puesto que inhiben el crecimiento de los microorganismos de una manera comparable con la de medicamentos control [4, 69, 84].

Una de las propiedades más conocidas del timol y de los AE que lo contienen, es su marcada actividad antioxidante. Este compuesto tiene efectos sobre los mecanismos de generación del anión-radical superóxido (O_2^-), radical hidroxilo (OH^-) y el oxígeno molecular singulete (1O_2), causantes de varias patologías, entre otras, cáncer [74]. También se ha comprobado el efecto del timol y del aceite de tomillo contra el crecimiento de bacterias como *Shigella* sp., *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, implicadas en la contaminación y daño de algunos alimentos [10]; en algunos estudios [7, 10] se concluyó, que esta sustancia se puede adicionar, en concentración baja, a alimentos

semiprocados, sin afectar su sabor, para inhibir la acción de las bacterias evaluadas.

Otro estudio [5], destaca una mayor actividad de los aceites esenciales de tomillo y orégano, en comparación con la de 50 aceites esenciales de otras especies comunes, probados contra diez microorganismos que causan una variedad de enfermedades, y contaminan alimentos; este poder se midió como la cantidad mínima inhibitoria (%v/v) de AE; se destacó el AE de tomillo como uno de los pocos inhibidores de *Pseudomonas aeruginosa*; con dosis menores de este aceite respecto a los demás, se inhibieron microorganismos como *Candida albicans* y *Escherichia coli*. Adicionalmente, se ha evaluado con resultados positivos el efecto protector del timol en linfocitos humanos contra un derivado aminado del imidazol y la mitomicina C, que son sustancias mutagénicas [87].

La planta *Lippia origanoides* que tiene un AE rico en compuestos fenólicos como el timol, exhibe propiedades antioxidantes, antifúngicas contra *Candida albicans* y *Candida tropicalis* y antibacteriales contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, además, ha sido evaluada su citotoxicidad en células Vero, concluyéndose que es un AE no tóxico [6, 9].

De la búsqueda realizada en las dos bases de datos se concluye que la planta bajo estudio no había sido objeto de muchas investigaciones, por lo tanto su AE no tiene una aplicación definida, pero sí, interesantes propiedades. Según al análisis cuantitativo realizado al timol, este es un compuesto con una buena actividad biológica, que tiene variadas aplicaciones, aunque no se cuentan con cifras fiables respecto a la comercialización del mismo.

Con base en la revisión bibliográfica se planteó la metodología del trabajo, para cumplir los principales objetivos propuestos, a saber: 1. Estudiar la composición de los AE y extractos obtenidos de dos quimiotipos de *L. origanoides*, 2. Utilizar las técnicas MWHD, SDE y SFE para llevar a cabo el estudio, 3. Comparar la composición de AE y extractos, y el rendimiento del AE en tres épocas de cosecha, y, 4. Realizar una ficha técnica de los AE. Ninguno de los anteriores objetivos, que fueron alcanzados con esta investigación, se habían reportado en la literatura, pero a partir de la ciencimetría y la revisión bibliográfica, surgieron las ideas que condujeron al planteamiento de los mismos.

3. METODOLOGÍA

3.1 RECOLECCIÓN Y PROPAGACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Los segmentos nodales de *L. origanoides* fueron recolectados en el municipio de Jordán Sube (Santander), y cortados a una longitud entre 12 y 15 cm, verificando que en ellos se presenten dos nudos como mínimo para asegurar un adecuado crecimiento de la futura planta; también se recolectó MV para realizar una extracción por el método MWHD y con el propósito de comprobar la identidad de cada posible quimiotipo. Los segmentos nodales se sembraron a una profundidad de 4 cm en el sustrato que consistió en una mezcla 50:50 de arena:lombrinaza (materia orgánica), sobre bandejas de 50 puestos. Se agregaron micorrizas para ayudar al desarrollo de las raíces, luego, se colocaron en un vivero con malla polisombra que permitía el 50% de radiación incidente, hasta los 65 días de edad, cuando las plántulas se trasplantaron a campo.

Las plantas se sembraron en camas de 3.8 m a 5.0 m de longitud, dejando 40 cm entre cada planta y 90 cm entre camas. En la **Figura 8**, se muestran las etapas seguidas en el establecimiento del cultivo. Los cuidados del cultivo consistieron en la eliminación de malezas cada 30 días y riego cada 2 días durante los primeros dos meses, luego de este periodo, se regaban 2 veces por semana. Al suelo se le practicó un análisis de micro- y macronutrientes y de materia orgánica, para conocer su estado nutricional y corregir las falencias.

Los anteriores procedimientos se llevaron a cabo en el Complejo Agroindustrial Piloto de CENIVAM, y en el Laboratorio Químico de Suelos, ubicados en el *campus* principal de la Universidad Industrial de Santander.



ESQUEJES (12-15 cm)



PLÁNTULAS (90x40 cm)



CULTIVO

Figura 8. Etapas en el establecimiento del cultivo experimental.

3.2 IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA

La identificación botánica del material vegetal de trabajo, se llevó a cabo en el Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia (sede Bogotá), y fue realizada por el doctor J. L. Fernández-Alonso, a quien el autor expresa su agradecimiento. Los pliegos testigos de las plantas quedaron depositados como muestras permanentes en el Herbario Nacional Colombiano (COL, Bogotá) y en el Herbario de CENIVAM.

3.3 MUESTREO DEL MATERIAL VEGETAL Y TRATAMIENTO PREVIO.

Los muestreos se llevaron a cabo en las horas de la mañana (6:30 am), durante tres estados fenológicos de la planta, a saber: primera floración (70 días), post-floración (115 días) y segunda floración (155 días). Se seleccionaron y recolectaron aleatoriamente 8 plantas por cada muestreo, las hojas de todas las plantas se mezclaron para homogeneizar la muestra, se descartaron las hojas dañadas y amarillas. Las hojas que se utilizaron en las réplicas de las extracciones se colocaron en bolsas Ziploc® y se guardaron en un refrigerador a 4°C. Adicionalmente, se midieron la altura de las plantas, tamaño de hojas y peso de la biomasa total. A las hojas de *Lippia origanoides* se les retiraron los elementos extraños como insectos y residuos de tierra. Éstas se limpiaron, se lavaron y se cortaron en pequeños pedazos de aproximadamente 1 cm². En la **Figura 9**, se muestra un diagrama con la disposición de las plantas en el cultivo.

3.4 EXTRACCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES DE *Lippia origanoides* H.B.K.

Con el fin de obtener una información más completa sobre cuáles son los metabolitos secundarios volátiles y semivolátiles presentes en cada uno de los quimiotipos de *L. origanoides*, éstos fueron extraídos por tres

técnicas diferentes. Las extracciones se realizaron por triplicado, para los tres estados fenológicos nombrados anteriormente.

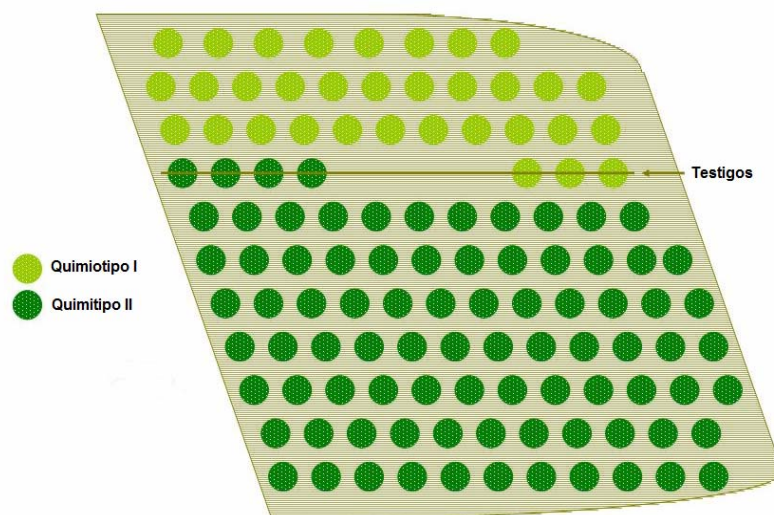


Figura 9. Ubicación de los quimiotipos en la parcela experimental.

3.4.1 Obtención de los aceites esenciales por el método MWHD. Las hojas, previamente limpias y pesadas (ca. 200 g), se sometieron al proceso de extracción en un equipo tipo *Clevenger* con reservorio de destilación *Dean-Stark* adaptado a un sistema de calentamiento por radiación de microondas, en un horno convencional *LG Intelowave*, modelo MS-1242ZK (Seúl, Corea), con potencia de salida 1200 W y frecuencia de radiación 2.5 GHz [38, 88]. Se adicionaron 300 mL de agua destilada. El tiempo total de extracción fue de 40 min, divididos en 4 turnos (4X10 min) a intervalos entre ellos de 1 min. La potencia del horno (720 W) se fijó al 60 % de la potencia total del equipo. En la **Figura 10** se puede observar el montaje para MWHD.

Los AE obtenidos se secaron con Na_2SO_4 anhidro de JT Backer (Phillisburg, NJ, EE.UU.), para evitar su daño por humedad. Los AE aislados se pesaron en una balanza METTLER TOLEDO PB 1502-S (Küsnacht, Suiza), los pesos se promediaron y el rendimiento de esencia se calculó con base en el peso de MV inicial.

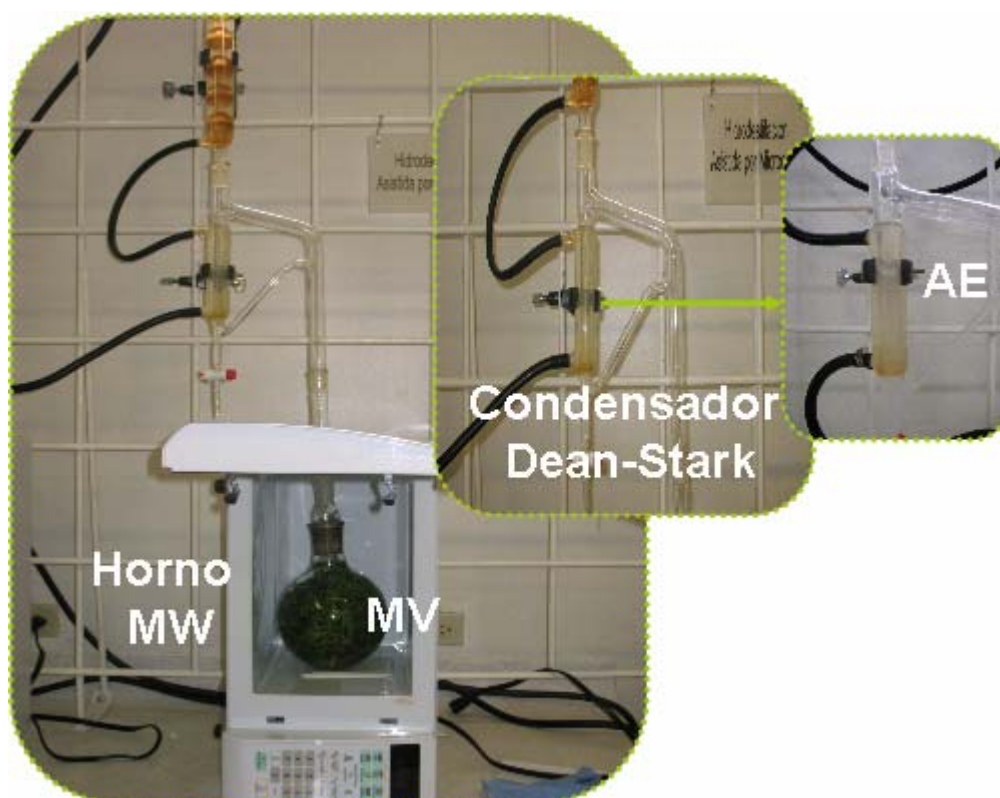


Figura 10. Montaje para hidrodestilación asistida por microondas.

3.4.2 Obtención de extractos por el método SDE. Para este propósito, se utilizó un equipo de extracción a micro-escala para solventes de alta densidad, similar al equipo de Likens y Nickerson, modificado por Godefroot y colaboradores y descrito en [41], y siguiendo la metodología de Stashenko y colaboradores [61, 64]. El material vegetal preparado (ca. 10 g), se introdujo a un balón de 50 mL (**A**) y se adicionó agua hasta que ésta cubriera en su totalidad el material vegetal (ca.30 mL), el balón se sumergió en un baño de aceite a 120 °C. En el otro balón de 10 mL (**B**), se agregaron 2 mL de diclorometano de Sigma-Adrich (Bellafonte, EE.UU) junto con dos perlas para regular la ebullición , éste se sumergió en un baño de agua a 70°C. En el cuerpo de extracción (**C**) se agregaron volúmenes iguales de 1.5 mL de diclorometano y agua, como lo ilustra la **Figura 11**. El proceso de destilación-extracción fue de 120 min. El extracto obtenido (aproximadamente 1.5 mL) se concentró a 1 mL, con ayuda de una corriente de N₂.

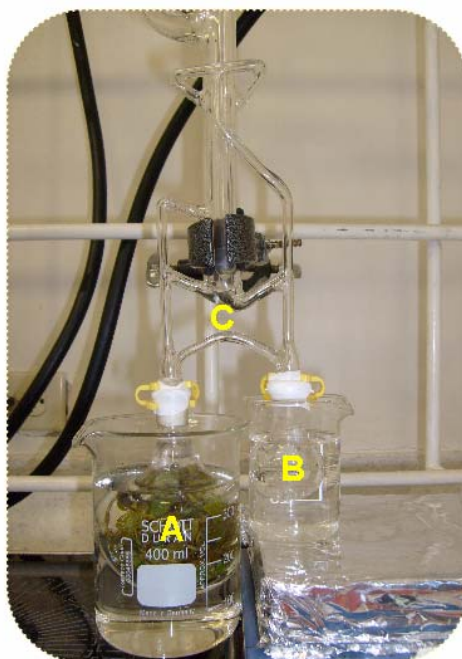


Figura 11. Equipo de destilación-extracción simultánea a microescala para solventes de alta densidad. **A.** Balón con el material vegetal y agua sumergido en un baño de aceite mineral, **B.** Balón con CH_2Cl_2 calado en un baño de agua y **C.** Extremo inferior del cuerpo del montaje, donde se lleva a cabo la extracción líquido-líquido.

3.4.3 Obtención de extractos por el método SFE (CO_2). Para este tipo de extracción se utilizó un equipo Soxhlet de alta presión (J & W Scientific, U.S. Pat. N° 4.006.062, 4.265.860). Se introdujeron 10 g de material vegetal en el cuerpo del equipo Soxhlet, y se pesaron ca. 320 g de CO_2 sólido, que se agregaron a un reactor metálico entre las paredes de éste y el cuerpo Soxhlet inmerso en él. El sistema se selló rápidamente para evitar que se escapara el CO_2 sublimado y la parte inferior del reactor se sumergió a un baño termostatado Büchi W20 (Suiza) con agua a una temperatura de 50 °C. Con esta temperatura del baño térmico se logró que la presión interna del reactor alcanzara los 1100 psi, este proceso de extracción tuvo una duración de 2 h; una vez alcanzado este tiempo, se enfrió el reactor en un baño refrigerante circulatorio Cole Palmer (Chicago, IL, EE.UU.) hasta que la presión interna llegó a los 500 psi, se procedió a despresurizarlo y se retiró el extracto. A continuación,

en la **Figura 12**, se muestran en detalle, los reactores metálicos que contienen en su interior los cuerpos Soxhlet para la extracción SFE.



Figura 12. Etapas de la extracción con fluido supercrítico.

3.5 PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS POR GC-MS

De los extractos y los AE obtenidos se retiró el agua que pudo haberse adicionado durante el proceso, antes de su análisis por GC-MS. Para esto, se utilizó sulfato de sodio anhidro, el cual se añadió al recipiente que contenía el aceite o el extracto. Para los AE obtenidos por MWHD, se disolvieron 50 μL en 1 mL de diclorometano, y se agregó 1 μL de patrón interno (*n*-tetradecano). Al extracto obtenido por SFE se agregaron 1.5 mL de diclorometano y se concentró con una corriente de nitrógeno (AGA Fano S.A, Bucaramanga, Colombia.) hasta un volumen de 1 mL, luego, y se adicionó 1 μL de patrón interno. Los extractos en diclorometano (ca. 1.5 mL), que se obtuvieron por SDE, se concentraron con nitrógeno hasta menos de 1 mL, se añadió la misma cantidad de patrón interno que en los casos anteriores y se aforó a 1 mL.

3.6 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS POR GC-MS

El análisis de las muestras de AE de *L. origanoides* se llevó a cabo por cromatografía de gases capilar en dos cromatógrafos con columnas de

fases estacionarias polar y apolar, acoplados a detectores selectivos de masas. Lo anterior con el fin de tener una mayor certeza sobre composición química de los extractos y aceites esenciales.

3.6.1 Cromatografía de gases en columnas con fase estacionaria apolar. Una vez preparadas, las muestras se sometieron a un análisis por cromatografía de gases, en un equipo *Agilent Technologies 6890 Plus* (Palo Alto, CA, EE.UU.) acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5975 Network*, equipado con puerto de inyección *split/splitless* (250°C, relación *split*, 1:30), e inyector automático *Agilent 7863*. El cromatógrafo utilizado se observa en la **Figura 13**.

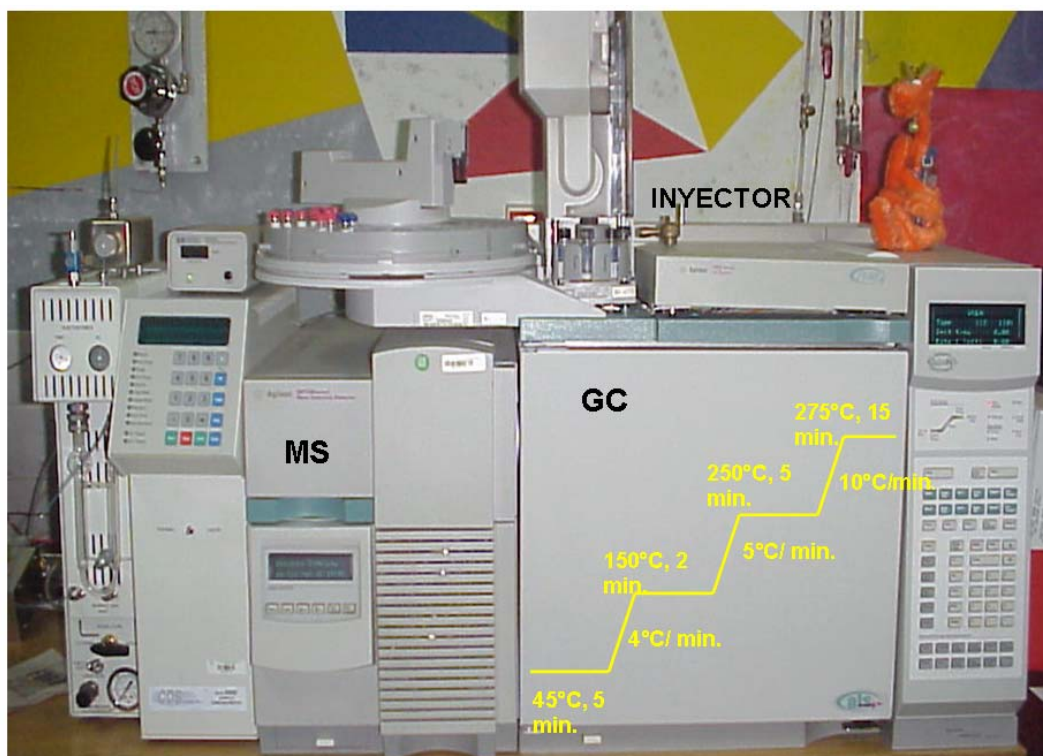


Figura 13. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Plus* acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5975 Network*.

Para separar los metabolitos secundarios volátiles (MSV) se empleó una columna capilar de sílice fundida DB-5MS (*J & W Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.), de 60 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25 μ m, d_f , con fase estacionaria de

5 %-fenil-poli(metilsiloxano). Como gas de arrastre (fase móvil) se utilizó helio (He, 99.9995%, AGA Fano, S.A.), con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 16.47 psi, velocidad lineal de 26 cm.s⁻¹, y flujo constante de 1 mL.min⁻¹. La temperatura del horno se programó desde 45 °C (5 min), luego se aumentó @ 4 °C/min hasta 150 °C (2 min), después @ 5 °C/min hasta 250 °C (5 min) y, finalmente, @ 10 °C/min hasta 275 °C (15 min).

3.6.2 Cromatografía de gases en columnas con fase estacionaria polar. Igualmente, todas las muestras se analizaron por cromatografía de gases en un equipo *Agilent Technologies 6890N Network Series GC* (Palo Alto, CA, EE.UU.), acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 5975 Inert XL*, equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (250 °C, relación *split*, 50:1), e inyector automático *Agilent Technologies 7863B, Series Injector*. En la **Figura 14**, se aprecia el cromatógrafo utilizado para este análisis.

La separación de los MSV se llevó cabo en una columna de sílice fundida DB-WAX (*J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.*), con fase estacionaria entrecruzada e inmovilizada de poli(etilenglicol) de 60 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25 µm, d_f. Como gas de arrastre (fase móvil) se utilizó helio (He, 99.9995%, AGA Fano, S.A.), con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 20.15 psi y flujo constante de 1 mL.min⁻¹. Se programó la temperatura del horno de la siguiente manera: desde 45 °C (5 min) hasta 150 °C (3 min) @ 3°C/min, y hasta 220 °C (5 min) @ 4°C/min.

3.6.3 Sistema de detección y adquisición de los datos. Los espectros de masas y corrientes iónicas reconstruidas (TIC), se obtuvieron mediante impacto de electrones de energía de 70 eV. Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia se mantuvieron a 230 y 285°C, respectivamente. Los espectros de masas y las corrientes iónicas totales (TIC) se obtuvieron en un analizador cuadrupolar, por medio de barrido automático de frecuencia (*full scan*), a 4.75 scan.s⁻¹, en el rango de *m/z* 40-350. Los datos cromatográficos y espectrométricos,

fueron adquiridos y procesados por el sistema de datos *Hewlett-Packard ChemStation G17001DA* (Versión D 00.01.27, 2002).

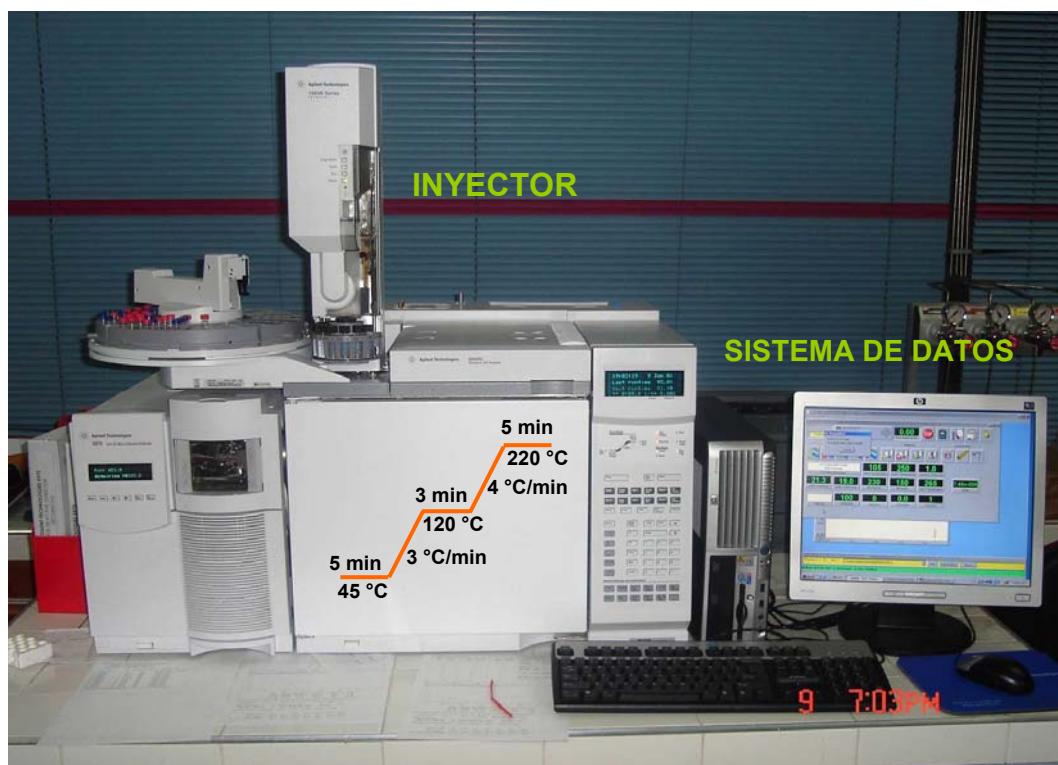


Figura 14. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890N Network Series GC* acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 5975 Inert XL*.

3.6.4 Identificación. La identificación de los metabolitos secundarios volátiles se llevó a cabo usando criterios cromatográfico y espectrométrico.

- **Parámetros cromatográficos.** Utilizando los tiempos de retención t_R de los compuestos se calcularon los índices de retención de Kovats, I_k . Éstos se calcularon teniendo en cuenta los t_R de una serie homóloga de sustancias de referencia, hidrocarburos lineales desde C_8 hasta C_{25} corridos en cada uno de los cromatógrafos bajo los mismos parámetros operacionales utilizados para los AE y extractos. Para su cálculo se utilizó la siguiente **Ecuación 1** [89, 90]:

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

Donde $n < N$ y:

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

t_{Rx} = Tiempo de retención del compuesto de interés (min);

t_{Rn} = Tiempo de retención del hidrocarburo que eluye antes del compuesto de interés (min);

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

Los I_k calculados para las fases estacionarias polar y apolar fueron se compararon con los I_k , reportados en la literatura [91]. Además, se compararon los t_R de algunos compuestos presentes en los extractos y AE, con los t_R de sustancias de referencia, (patrones de terpenos certificados) que se corrieron bajo los mismos parámetros cromatográficos operacionales.

- **Parámetro espectrométrico.** Los fragmentogramas obtenidos de cada uno de los compuestos presentes en los extractos y aceites esenciales, se compararon con los almacenados en las bases de datos NIST 02, Willey 138K o Adams 2005. Esta última especializada en terpenos y otros compuestos presentes en los AE y extractos de diferentes plantas.

3.7 CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES MAYORITARIOS DEL AE DE *L. origanoides*.

Los metabolitos secundarios volátiles y semivolátiles, que estaban en mayor proporción en los AE de las plantas bajo estudio se cuantificaron aplicando dos métodos. El primero de ellos se realizó para obtener las concentraciones aproximadas de los compuestos en cuestión. La

reproducibilidad del método utilizado en la obtención de los AE se evaluó en términos del porcentaje de la desviación estándar o coeficiente de variación (CV) de la sumatoria de áreas de todos los compuestos presentes en los AE obtenidos al realizar tres replicas de las extracciones. Con el segundo método se obtuvieron las concentraciones definitivas de los metabolitos secundarios.

3.7.1 Evaluación de la reproducibilidad de la técnica de extracción de AE. La reproducibilidad de la técnica MWHD, se evaluó en términos de la sumatoria de las áreas de todos los compuestos, y del área del patrón interno *n*-tetradecano (**Ecuación 2**). Para este propósito se realizaron tres extracciones independientes, conservando el material vegetal en bolsas Zploc®, y a una temperatura de 4°C, para evitar daños. Se utilizó el mismo montaje *Clevenger* y horno microondas, utilizando los mismos parámetros de extracción descritos en la **Sección 3.4.1**.

$$\frac{\sum A_x}{A_{istd}} = X_i \quad \text{Ecuación 2.}$$

Para el tratamiento estadístico de datos se calcularon: el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación. Las ecuaciones empleadas [92] fueron:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad \text{Ecuación 3.}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad \text{Ecuación 4.}$$

$$S = \frac{\sigma * t}{\sqrt{n}}$$

Ecuación 5.

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} * 100\%$$

Ecuación 6.

Donde:

\bar{X} = Valor promedio;

A_x = Área de cada pico cromatográfico;

X_i = Valor parámetro (Ecuación 2.);

n = Número de replicas;

σ = Desviación estándar;

S = Desviación estándar para 3 réplicas;

t = 4,30 (t de *Student* para un nivel de confianza del 95%);

CV = Coeficiente de variación (%).

3.7.2 Cuantificación interna. Este método se realizó teniendo en cuenta el área del estándar interno, ISTD, *n*-tetradecano (*Merck, Reference Substance for Gas Chromatography*). Las características del estándar se reportan en la **Tabla 8**. El estándar se adicionó a los AE y extractos (1 μ L) durante la preparación de la muestra para el análisis cromatográfico (**Sección 2.5**). Este análisis se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Plus* (Palo Alto, CA, EE.UU.), cuyas características se describieron en la **Sección 2.6.1**.

Las áreas de cada uno de los compuestos se compararon con el área del patrón interno. Suponiendo, que la respuesta del detector del ISTD y de los compuestos son similares, las concentraciones de cada uno de los metabolitos se determinaron con base en la **Ecuación 7**, así:

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

Ecuación 7

Donde:

C_x: Concentración del compuesto de interés (ppm);

C_A: Concentración del estándar interno (ppm);

A_x: Área del compuesto de interés (Cuentas);

A_A: Área del estándar interno (Cuentas).

Tabla 8. Patrones de hidrocarburos lineales y patrones de terpenos certificados utilizados para determinar los I_k.

Compuesto	Productor	Pureza
<i>trans</i> -β-Cariofileno	<i>Sigma Aldrich</i>	98%
<i>p</i> -Cimeno	<i>Sigma Aldrich</i>	98%
α-Felandreno	<i>Sigma Aldrich</i>	98%
γ-Terpineno	<i>Sigma Aldrich</i>	98%
Timol	<i>Sigma Aldrich</i>	99%
<i>n</i> -Tetradecano	<i>AccuStandard</i>	99.5%
Serie homóloga de hidrocarburos C ₈ -C ₂₅	<i>AccuStandard</i>	-

3.7.3 Cuantificación externa. De acuerdo con los resultados obtenidos en la estandarización interna, se construyeron curvas de calibración de cada uno de los compuestos, cuyas características aparecen en la **Tabla 9**. Se prepararon soluciones *Stock* para cada uno de los metabolitos; a partir de estas soluciones se prepararon diluciones de concentraciones menores que la concentración obtenida por la cuantificación interna, teniendo en cuenta que estas curvas sirvieran para las concentraciones encontradas del compuesto en los AE de cada uno de los dos quimiotipos.

Tabla 9. Volúmenes de soluciones preparadas para llevar a cabo la cuantificación interna.

Volumen. solución stock (μL)	Concentración, ppm			
	<i>p</i> -Cimeno	γ -Terpineno	Timol	<i>trans</i> - β -Cariofileno
0,5	----	21	25	----
1	----	41	50	----
2	85	82	99	89
5	213	206	248	222
10	426	412	495	444
15	639	618	743	666
20	851	825	990	888
50	2129	2061	2476	2221
100	4257	4123	4952	4442
150	6386	6184	7428	6663
200	8514	8245	9904	8885
300	12771	12368	14856	13327
400	17028	16490	19808	17769
600	25542	24735	29712	26654
	42570	41225	49520	44424

Después de la preparación de soluciones, se procedió a analizarlas bajo los mismos parámetros cromatográficos empleados para el análisis de los AE. Con los datos obtenidos, se construyeron las curvas de calibración (Áreas Vs. Concentración) para cada uno de los metabolitos de interés. Las curvas se ajustaron por regresión lineal teniendo en cuenta que la respuesta del detector en el rango de concentraciones preparadas fue lineal. Los factores de respuesta del equipo, R_f , para cada uno de los compuestos analizados se determinaron con base en la pendiente obtenida para cada recta, así:

$$R_f = \frac{\text{Concentración}(\mu\text{g}/\text{mL})}{\text{Área}(\text{cuentas})} \quad \text{Ecuación 8.}$$

Las concentraciones de los metabolitos presentes en los AE, finalmente, se calcularon con base en los R_f de las sustancias de referencia certificados. Estas concentraciones se expresaron en g compuesto/g material vegetal y en kg compuesto/Ha. Esta forma de expresar los datos es de gran utilidad, puesto que con ésto se pueden realizar cálculos preliminares para el cultivo en extensiones de terreno mucho más grandes.

3.8 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

Con el objeto de hacer una ficha técnica del AE colombiano de *L. origanoides*, para quimitipos “timol” y “*p*-cimeno”, se realizó la determinación de su densidad, índice de refracción y solubilidad en etanol.

La densidad de los AE se determinaron en un picnómetro de 9.814 mL que se calibró a 20°C (BRAND, Wertheim, Alemania), y la temperatura requerida se obtuvo con ayuda de un baño refrigerante circulatorio Cole Palmer (Chicago, IL, EE.UU). El procedimiento, que se aplicó, estuvo de acuerdo con la norma ISO 279:1998 (E) [93].

Para determinar la solubilidad de los AE en etanol, se utilizó etanol absoluto (99.8%, Sigma-Aldrich, Seelze, Alemania), y se adoptó la metodología de acuerdo con la norma ISO 875:1999 (E) [94].

Los índices de refracción a 20°C se midieron en un refractómetro tipo Abbe ATAGO NAR-1T, (Tokio, Japón), según la norma ISO 280:1998 (E) [95]. La temperatura se controló, usando un baño refrigerante circulatorio Cole Palmer.

En la **Figura 15** se muestran los equipos usados para la medición de densidades e índice de refracción.



Refractómetro



Densidad

Figura 15. Equipos para la realización de mediciones según las normas ISO 279 y 280 (E).

4. RESULTADOS

4.1 RECOLECCIÓN Y PROPAGACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

La recolección del material vegetal se realizó en el Cañon del Río Chicamocha. Durante el proceso de propagación se analizaron los porcentajes de rebrote, las composiciones de los AE obtenidos a partir de las hojas de los quimiotipos I y II colectados en Jordán Sube y el análisis de suelos.

4.1.1 Análisis cualitativo del AE obtenido de las hojas de los quimiotipos de *L. origanoides* colectados en Jordán Sube.

Paralelamente a la recolección del MV para propagación, se llevaron a cabo las extracciones de las hojas de cada uno de los quimiotipos por el método MWHD y el posterior análisis por GC-MS. El análisis de los AE servirá como confirmación a la forma como se clasificaron las plantas en campo, según su olor. A continuación, en las **Tablas 10 y 11**, se muestran las cantidades relativas de los principales componentes de AE de los quimiotipos recolectados y sus respectivos cromatogramas obtenidos en la columna apolar se encuentran en el **Anexo 3**. En los QI y QII se detectaron 96 y 51 compuestos, respectivamente, con cantidades relativas mayores de 0,06%; en QI se identificaron positivamente 82 compuestos y en QII se identificaron 46.

Los metabolitos secundarios que se encontraron en mayor proporción en el AE del QI, obtenido de las hojas de plantas recolectadas en Jordán Sube, fueron los mismos que se analizaron en los AE obtenidos en los tres muestreos posteriores realizados al cultivo experimental. Como se aprecia en la **Tabla 10** el α -felandreno se encuentra en mayor proporción, mientras que durante la primera y segunda floraciones y post-floración el *p*-cimeno fue el componente mayoritario. Otros compuestos importantes fueron el *p*-cimeno (11%), limoneno, β -felandreno y *trans*- β -cariofileno

(9.3%). A las plantas propagadas de este quimiotipo se les llamó quimiotipo I.

Tabla 10. Compuestos principales (>1,0%) del AE, obtenido de hojas de *L. origanoides*, QI colectada en Jordan Sube.

N° Pico ^a	Compuesto	I _k		Cantidad relativa,%
		DB-5	DB-WAX	
4	α -Pinoeno	934	1028	2,0
8	β -Mirceno	990	1152	1,6
10	α -Felandreno	1010	1158	11,0
12	<i>p</i> -Cimeno	1026	1273	9,7
13	Limoneno + β -Felandreno	1031	1196 1164	12,5
15	γ -Terpineno	1060	1240	2,1
58	<i>trans</i> - β -Cariofileno	1428	1597	9,3
60	β -Copaeno	1440	1067	1,0
64	α -Humuleno	1464	1674	5,5
72	<i>trans</i> -Muurola-4(14),5-dieno + α -Muuruleno + α -Selineno	1507	1786 1784 1721	1,8
75	δ -Cadineno	1530	1788	2,1
85	Óxido de cariofileno +Viridiflorol	1593	2008 2112	2,5
95	<i>epi</i> - α -Cadinol + <i>epi</i> - α -Muurolol + α -Cadinol	1657	2141 2211	2,7
96	α -Eudesmol + β -Eudesmol	1677	2250 2239	6,3

^a Número de pico en la **Figura 1** del **Anexo 3**

La composición del AE de las hojas del QII proveniente del Cañon del Río Chicamocha no presentó variaciones significativas respecto a lo que se encontró en los tres muestreos posteriores realizados al cultivo experimental. El timol (57,3%) fue el compuesto mayoritario seguido del *p*-cimeno (6,5%) y del γ -terpineno (4,4%). El estudio que se les practicó a las plantas sirvió para diferenciarlas de acuerdo con los componentes mayoritarios; a las plantas propagadas de este quimiotipo se les llamó quimiotipo II.

Tabla 11. Compuestos principales (>1,0%) del AE, obtenido de hojas de *L. origanoides*, QII colectada en Jordan Sube.

N° Pico ^a	Compuesto	I _k		Cantidad relativa, %
		DB-5	DB-WAX	
3	α-Pineno	935	1028	1,0
7	β-Mirceno	990	1153	2,7
9	δ-2-Careno	1013		1,8
11	p-Cimeno	1025	1269	6,5
15	γ-Terpineno	1061	1239	5,9
16	trans-Hidrato de sabineno	1107	1462	0,69
25	Metil timil éter	1226	1590	1,1
29	Timol	1292	2182	57,3
30	Carvacrol	1305	2210	1,5
32	Acetato de timilo	1350	1866	0,91
36	trans-β-Cariofileno	1428	1598	3,0
41	α-Humuleno	1464	1674	1,9

^a Número de pico en la **Figura 2** del **Anexo 3**

4.1.2 Porcentajes de rebrote. De los quimiotipos encontrados en el lugar de recolección se sembraron segmentos nodales, así: quimiotipo I, QI-50 y del quimiotipo II, QII-250, respectivamente. Los porcentajes de rebrote (**Tabla 10**) son un reflejo de lo encontrado en el sitio de recolección donde en promedio por cada 10 plantas del QII se encontraba solo una del QI. Aunque estos dos fenómenos puedan o no estar relacionados.

Tabla 12. Porcentajes de rebrote de los quimiotipos QI y QII *L. origanoides*.

Quimiotipo	Segmentos nodales sembrados	Segmentos nodales germinados	Rebrote %
QI	50	39	78
QII	250	228	91.2

Posteriormente, en campo se estableció el cultivo con aproximadamente 30 plantas de QI y 82 de QII.

4.1.3 Análisis de suelos. Antes de sembrar las plantas de *L. origanoides* en un terreno con buenas condiciones nutricionales, se realizó un análisis de suelos. Las muestras se tomaron de 5 puntos diferentes en el terreno, cavando hoyos de 40 cm y tomando cortes de tierra de todas las capas. El análisis fue realizado en el Laboratorio Químico de Suelos, que dirige el profesor Jaime Camargo. Se encontró, que el suelo presentó baja acidez (pH 5.6), con contenido bajo de materia orgánica, nitrógeno total, así como algunos elementos menores (Mg, B, Fe, Mn, Cu, y Zn); se presentaron altos niveles de fósforo y azufre, mientras que calcio, potasio y sodio se encontraron en niveles normales. La textura del suelo es adecuada. En el **Anexo 4**, se adjunta el resultado detallado de estos análisis. La interpretación de los resultados y los correctivos necesarios se realizaron con ayuda del técnico agrónomo, Juan Manuel Neira.

4.2 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS QUIMIOTIPOS DE *L. origanoides*.

Los resultados de la identificación botánica mostraron que las plantas, que poseen AE de diferente composición, pertenecían a la misma especie o sea eran quimiotipos. Las plantas presentaban hojas opuestas de color verde oscuro por el haz y verde claro-grisáceo en el envés, inflorescencias racimosas de color blanco y tallos café lignificados en la base. Los números asignados en el Herbario Nacional Colombiano (COL) se muestran a continuación en la **Tabla 13** La identificación fue llevada a cabo por el Dr. José Luís Fernández.

Tabla 13. Números de COL asignados a los quimiotipos I y II de *L. organoides*.

Especie	Quimiotipo	Familia	N° COL
<i>Lippia organoides</i> H.B.K.	QI	Verbenaceae	519798
<i>Lippia organoides</i> H.B.K.	QII	Verbenaceae	519799

4.3 RENDIMIENTOS DE LOS AE DE *L. organoides* OBTENIDOS POR MWHD

Se obtuvieron los rendimientos de los aceites esenciales de plantas colectadas en tres estados fenológicos. Luego, se calculó el rendimiento para AE para 1 Ha de cultivo, para estimar lo que se puede esperar en cuanto a rentabilidad de esta especie.

El rendimiento de esencia se halló dividiendo el peso del AE obtenido sobre el peso de MV introducido en el balón. Los rendimientos no se mantuvieron constantes a lo largo del estudio, lo cual refleja la variación en la producción de AE (R), así como también en los pesos promedio (W) y alturas promedio (H) de las plantas como se muestra en la **Tabla 14**.

Las variaciones en el peso de las hojas permiten observar, que *L. organoides* es una especie que es susceptible al ciclo vegetativo, en cambio, la altura de las plantas no se afectó. La producción de AE también muestra una dependencia del ciclo vegetativo, puesto que aunque hay menos biomasa al final de floración (representada por el peso de hojas), la concentración de AE en las células es mayor. La diferencia en el rendimiento de AE entre los dos quimiotipos es significativa, para los tres estados fenológicos. Todas estas características influyen sobre la producción de AE por Ha (Ver **Tabla 14**).

Tabla 14. Alturas, pesos y rendimientos (AE) promedio de *L. Origanoides*, obtenidos para tres estados fenológicos de la planta.

Parámetro	DÍA 70 (Primera floración)		DÍA 115 (Post-floración)		DÍA 155 (Segunda floración)	
	QI	QII	QI	QII	QI	QII
H (cm)	120 ± 21	120 ± 27	130 ± 41	120 ± 28	130 ± 28	140 ± 39
W (g)/planta	90 ± 23	390 ± 81	70 ± 21	180 ± 52	90 ± 21	260 ± 63
R (%)	0,39 ± 0,08	1,6 ± 0,5	0,51 ± 0,09	2,2 ± 0,2	0,47 ± 0,09	1,6 ± 0,2
R (kgAE/Ha)	9,7	173,2	9,9	109,9	11,7	115,4

Nota: Los valores de altura de las plantas y peso de hojas fueron obtenidos promediando 8 mediciones. Los valores de rendimiento (%) resultaron después de promediar tres medidas.

En el **Figura 16** se observa más claramente la relación entre el rendimiento de esencia y el estado fenológico. Se puede resaltar que al final de floración, la cantidad de AE en las hojas aumenta. Esto es una característica propia de cada planta, puesto que de acuerdo con el estudio de Senatore, F [96], cuando se cosechaban hojas de *Thymus pulegiodes* a lo largo de un año, la cantidad de AE aumentaba durante la floración plena, mientras que para la palmarrosa el incremento se observa al final de la floración.

Los rendimientos encontrados difieren de los obtenidos por Oliveira y colaboradores [63], que reportan 1,0%, para el quimiotipo rico en carvacrol. La regulación en la producción AE en las plantas se debe a múltiples factores, y entre los más importantes están el estado vegetativo y/o ontogenia, tal como lo explica Sangwan *et. al* [97].

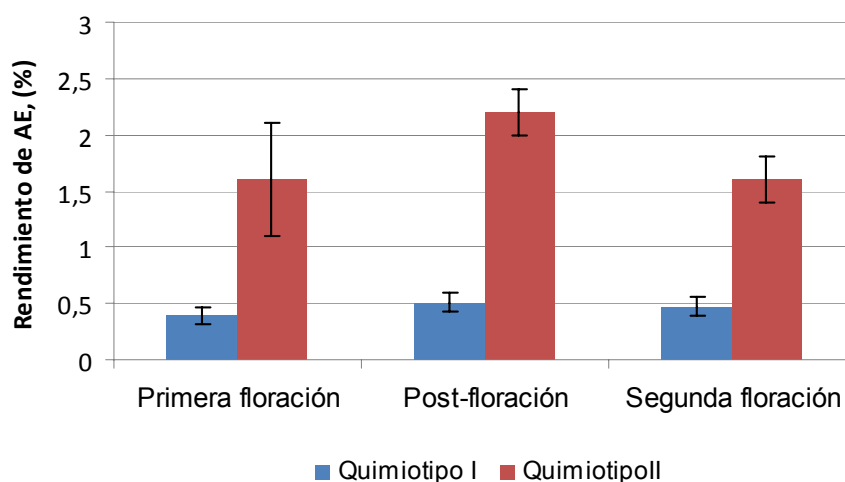


Figura 16. Rendimientos de los aceites esenciales de *L. origanoides*, obtenidos de plantas colectadas en tres periodos de crecimiento.

4.4 ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS AE Y EXTRACTOS DE *L. origanoides*

Los extractos y AE fueron analizados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, GC-MS, usando los parámetros operacionales expuestos en las **Secciones 3.6.1 y 3.6.2** de la parte experimental. En los extractos y AE de los QI y QII se detectaron 123 y 81 compuestos respectivamente, con cantidades relativas mayores al 0,06%, de los cuales se identificaron positivamente 101 (82%) en QI, la mayoría monoterpenos y en QII se identificaron positivamente 69 (85%), la mayoría fueron fenilpropanoides. Los aceites esenciales de los quimiotipos estudiados presentan 48 compuestos en común. Las **Figuras 17 y 18**, muestran los perfiles cromatográficos típicos de los AE y extractos obtenidos por MWHD, SDE y SFE, de las plantas QI y QII. Se observan claramente las diferencias en la composición de cada uno de los extractos, para ambos quimiotipos.

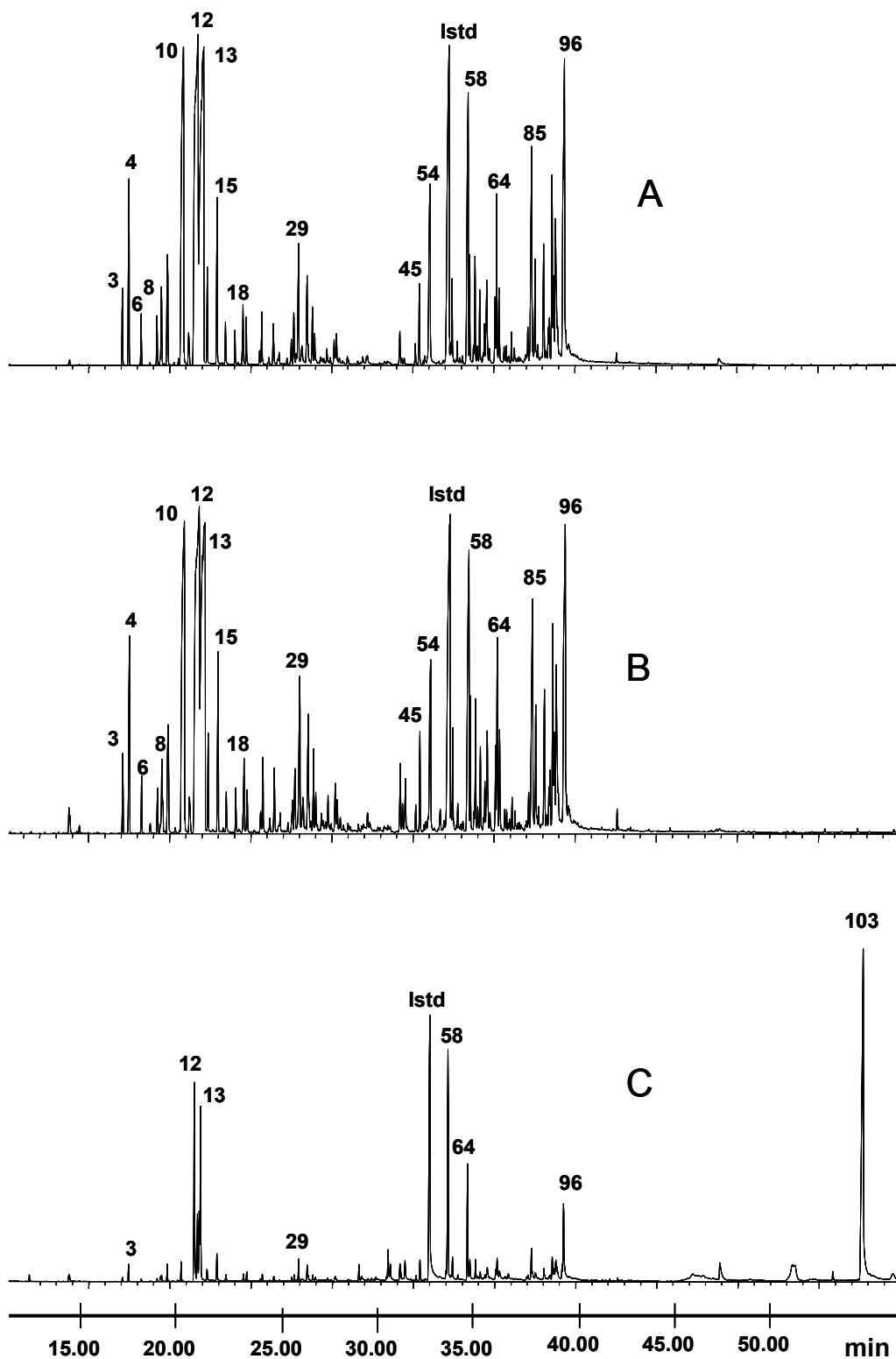


Figura 17. Perfiles cromatográficos típicos de los AE y extractos obtenidos de hojas de *L. organoides*, QI, en la primera floración, por: **A.** MWHD, **B.** SDE, **C.** SFE. Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV). La identificación de los compuestos se reporta en la **Tabla 15**.

Tabla 15. Cantidad relativa (%) e identificación de los metabolitos secundarios volátiles y semivolátiles de *L. origanoides*, quimiotipo I aislados por diferentes técnicas de extracción.

N° Pico ^a	Compuesto	Tipo	I _k ^b		Cantidad relativa, % ± s (n=3) ^c		
			DB-5	DB-WAX	MWHD	SDE	SFE
1	<i>trans</i> -2-Hexenal	OC	848	1213	0,068 ± 0,009	0,09 ± 0,01	N.D.
	+ <i>cis</i> -3-Hexenol	OC		1387			
2	<i>n</i> -Hexanol	OC	859		N.D.	0,084 ± 0,006	N.D.
3	α-Tujeno	M	925	1023	0,8 ± 0,1	0,39 ± 0,02	0,95 ± 0,07
4	α-Pineno	M	934	1028	2,4 ± 0,5	3,1 ± 0,1	1,33 ± 0,04
5	Canfeno	M	948	1073	0,6 ± 0,1	0,67 ± 0,06	N.D.
6	Sabineno	M	971	1125	0,25 ± 0,08	0,41 ± 0,03	0,60 ± 0,08
7	1-Octen-3-ol	M	974	1448	1,0 ± 0,1	0,81 ± 0,07	0,92 ± 0,03
	+ β-Pineno	M		1112			
8	β-Mirceno	M	990	1152	1,6 ± 0,1	1,9 ± 0,1	1,37 ± 0,09
9	<i>trans</i> -Acetato de hexen-3-ilo	OC	1006		0,13 ± 0,02	0,083 ± 0,001	N.D.
10	α-Felandreno	M	1010	1158	10,3 ± 0,3	7,0 ± 0,2	2,32 ± 0,09
11	α-Terpineno	M	1019	1164	0,58 ± 0,07	0,56 ± 0,07	N.D.
12	<i>p</i> -Cimeno**	FP	1025	1272	14,6 ± 0,6	16 ± 2	3,9 ± 0,1
13	Limoneno	M	1032	1196	15 ± 2	16 ± 1	4,9 ± 0,1
	+ β-Felandreno	M		1164			
	+ 1,8-Cineol	MO		1210			
14	<i>trans</i> -β-Ocimeno	M	1049	1251	0,68 ± 0,07	0,73 ± 0,09	0,78 ± 0,02
15	γ-Terpineno	M	1060	1240	2,1 ± 0,1	2,2 ± 0,2	1,55 ± 0,09
16	<i>cis</i> -Hidrato de sabineno	MO	1071	1550	0,66 ± 0,05	1,6 ± 0,1	N.D.

Tabla 15, Continuación.

17	Terpinoleno	M	1091	1280	0,21 ± 0,06	0,25 ± 0,03	N.D.
18	Linalol	MO	1102	1543	0,62 ± 0,03	0,8 ± 0,1	0,43 ± 0,04
19	<i>trans</i> -Hidrato de sabineno	MO	1105	1463	0,40 ± 0,08	0,37 ± 0,04	N.D.
20	<i>trans-p</i> -Menta-2,8-dienol	MO	1125		0,21 ± 0,02	0,18 ± 0,02	N.D.
21	<i>cis-p</i> -2-Mentenol	MO	1128	1613	0,45 ± 0,07	0,49 ± 0,06	0,5 ± 0,2
22	<i>cis-p</i> -Menta-2,8-dienol	MO	1140		0,099 ± 0,005	0,21 ± 0,02	N.D.
23	<i>trans-p</i> -2-Mentenol	MO	1142	1601	0,62 ± 0,06	0,67 ± 0,05	0,6 ± 0,1
	+ <i>trans</i> -Sabinol	MO					
24	Alcanfor	MO	1149	1496	0,19 ± 0,01	0,24 ± 0,03	N.D.
	+ Óxido de pineno*	MO					
25	Pinocarvona	MO	1166		0,076 ± 0,003	0,10 ± 0,03	N.D.
26	δ-Terpineol	MO	1169	1630	0,34 ± 0,02	0,262 ± 0,009	0,36 ± 0,07
27	Borneol	MO	1173	1718	0,78 ± 0,03	0,52 ± 0,08	0,56 ± 0,01
28	<i>cis</i> -Butanoato de hexen-3-ilo*	OC	1177		0,13 ± 0,01	N.D.	N.D.
29	Terpinen-4-ol	MO	1181	1598	1,52 ± 0,03	1,2 ± 0,2	0,79 ± 0,02
30	Criptona	MO	1186	1888	0,54 ± 0,07	0,47 ± 0,05	<i>tr</i>
	+ <i>p</i> -Cimen-8-ol	MO					
31	α-Terpineol	MO	1193	1685	0,66 ± 0,04	1,11 ± 0,09	0,67 ± 0,08
32	<i>cis</i> -Piperitol	MO	1195		0,18 ± 0,02	0,15 ± 0,02	N.D.
33	<i>cis</i> -Sabinol*	MO	1201	1673	0,43 ± 0,06	0,51 ± 0,04	0,40 ± 0,09
34	<i>trans</i> -Piperitol	MO	1206		0,21 ± 0,03	0,21 ± 0,04	<i>tr</i>
35	<i>trans</i> -Carveol	MO	1215	1757	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	N.D.
36	<i>m</i> -Cumenol*	FP	1220		0,10 ± 0,02	0,09 ± 0,01	N.D.
37	<i>cis-p</i> -Menta-(7),8-dien-2-ol	MO	1227		0,21 ± 0,02	0,18 ± 0,01	<i>tr</i>
38	<i>cis</i> -Carveol	MO	1229	1797	<i>tr</i>	0,10 ± 0,01	N.D.

Tabla 15, Continuación.

39	Neral	MO	1230	1671	<i>tr</i>	0,14 ± 0,06	N.D.
40	Acetato de β-sabinilo*	MO	1241		0,32 ± 0,04	0,51 ± 0,09	0,78 ± 0,09
41	Cuminal*	FP	1242		0,30 ± 0,06	0,24 ± 0,01	N.D.
42	Carvotanacetona	MO	1246		<i>tr</i>	0,16 ± 0,02	N.D.
43	Geranial	MO	1268	1718	0,135 ± 0,003	0,084 ± 0,004	N.D.
44	Felandral*	MO	1275		N.D.	0,7 ± 0,1	N.D.
45	Timol**	FP	1291	2168	1,4 ± 0,1	0,11 ± 0,02	<i>tr</i>
46	Carvacrol	FP	1302	2202	0,25 ± 0,05	0,18 ± 0,02	<i>tr</i>
47	3-Metil-4-isopropilfenol*	FP	1309	2160	<i>tr</i>	0,115 ± 0,009	N.D.
48	Isomero timol, C ₁₀ H ₁₄ O (N.I.)	FP	1316		N.D.	N.D.	0,7 ± 0,1
49	Sesquiterpeno, C ₁₅ H ₂₄ (N.I.)	S	1320		N.D.	N.D.	0,54 ± 0,05
50	α-Cubebena	S	1351	1466	0,44 ± 0,06	0,30 ± 0,04	0,7 ± 0,1
51	Eugenol	FP	1359	2163	0,11 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,38 ± 0,01
52	Compuesto oxigenado, C ₁₀ H ₁₂ O ₂ (N.I.)	OC	1364		<i>tr</i>	0,35 ± 0,07	0,6 ± 0,1
53	α-Ylangeno	S	1379	1488	0,21 ± 0,04	0,20 ± 0,03	0,53 ± 0,07
54	α-Copaeno	S	1384	1493	0,87 ± 0,03	0,77 ± 0,04	0,81 ± 0,02
55	β-Bourboneno	S	1393	1524	0,083 ± 0,003	0,13 ± 0,01	<i>tr</i>
56	β-Gurgujeno*	S	1414	1521	N.D.	0,18 ± 0,02	N.D.
57	Sesquiterpeno, C ₁₅ H ₂₆ (N.I.)	S	1424		<i>tr</i>	0,14 ± 0,02	0,42 ± 0,04
58	<i>trans</i> -β-Cariofileno**	S	1428	1597	5,8 ± 0,3	6,8 ± 0,3	4,5 ± 0,5
59	α- <i>trans</i> -Bergamoteno	S	1438	1594	0,18 ± 0,02	0,20 ± 0,03	<i>tr</i>
60	β-Copaeno	S	1440	1607	0,66 ± 0,07	0,65 ± 0,08	0,83 ± 0,07
61	Aromadendreno	S	1448	1660	0,20 ± 0,05	0,22 ± 0,02	0,54 ± 0,08
62	<i>cis</i> -Muurolo-3,5-dieno	S	1453		N.D.	0,11 ± 0,01	N.D.
63	<i>trans</i> -Muurolo-3,5-dieno	S	1456		<i>tr</i>	0,17 ± 0,01	<i>tr</i>

Tabla 15, Continuación.

64	α -Humuleno	S	1464	1674	2,9 ± 0,1	3,95 ± 0,09	3,1 ± 0,3
65	<i>cis</i> -Muurolo-4(14),5-dieno*	S	1471		0,79 ± 0,09	0,73 ± 0,08	0,9 ± 0,1
66	<i>trans</i> -Cadina-1(6),4-dieno	S	1481		0,18 ± 0,02	0,17 ± 0,02	<i>tr</i>
67	γ -Muurolo	S	1486	1698	0,93 ± 0,02	0,81 ± 0,04	1,0 ± 0,1
68	α -Amorfeno	S	1490	1687	0,23 ± 0,02	0,15 ± 0,01	<i>tr</i>
69	Germacreno D	S	1492	1710	0,40 ± 0,08	0,50 ± 0,02	0,80 ± 0,05
70	<i>cis</i> -Cadina-1,4-dieno	S	1501	1799	0,08 ± 0,01	0,14 ± 0,02	<i>tr</i>
71	Valenceno	S	1504	1716	0,53 ± 0,05	0,29 ± 0,04	0,46 ± 0,02
72	<i>trans</i> -Muurolo-4(14),5-dieno	S	1507	1786	1,42 ± 0,03	1,1 ± 0,1	0,84 ± 0,06
	+ α -Muurolo	S		1784			
	+ α -Selineno	S		1721			
73	δ -Amorfeno	S	1515	1687	0,21 ± 0,04	0,14 ± 0,02	<i>tr</i>
74	γ -Cadineno	S	1521	1786	0,72 ± 0,06	0,52 ± 0,08	0,70 ± 0,08
75	δ -Cadineno	S	1530	1788	1,9 ± 0,2	1,6 ± 0,1	0,94 ± 0,06
76	<i>cis</i> -Calameneno	S	1535	1843	0,95 ± 0,2	0,55 ± 0,08	0,69 ± 0,08
	+ Zonareno	S		1741			
77	<i>trans</i> -Cadina-1,4-dieno	S	1541	1796	0,19 ± 0,04	0,15 ± 0,02	0,67 ± 0,08
78	α -Cadineno	S	1545	1804	0,14 ± 0,02	0,11 ± 0,02	<i>tr</i>
79	Elemol	SO	1556	2085	0,22 ± 0,04	0,13 ± 0,01	<i>tr</i>
80	<i>trans</i> -Nerolidol	SO	1565	1994	0,16 ± 0,02	0,10 ± 0,02	N.D.
81	β -Calacoreno	S	1569		N.D.	0,11 ± 0,02	N.D.
82	Sesquiterpeno oxigenado, C ₁₅ H ₂₆ O, P.M. 222	SO	1576		0,91 ± 0,09	0,12 ± 0,02	<i>tr</i>
83	Carofilenilol*	SO	1589		0,097 ± 0,002	0,09 ± 0,02	0,53 ± 0,01
84	Espatuleno	SO	1591	2139	0,48 ± 0,06	0,38 ± 0,11	0,63 ± 0,07

Tabla 15, Continuación.

85	Óxido de cariofileno + Viridiflorol	SO SO	1593	2008 2112	1,80 ± 0,08	2,83 ± 0,05	2,1 ± 0,5
86	Guaiol	SO	1601	2100	1,12 ± 0,06	0,73 ± 0,04	0,67 ± 0,02
87	Sesquiterpeno oxigenado, C ₁₅ H ₂₆ O	SO	1614		0,116 ± 0,008	0,09 ± 0,01	N.D.
88	2,(7 <i>cis</i>)-Bisaboladien-4-ol	SO	1618		0,19 ± 0,03	0,13 ± 0,01	<i>tr</i>
89	Epóxido de humuleno II + 1,10-di- <i>epi</i> -Cubenol*	SO SO	1622	2060	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,01	1,15 ± 0,09
90	Junenol*	SO	1628		0,13 ± 0,02	0,09 ± 0,02	<i>tr</i>
91	Muurola-4,10(14)-dien-1-β-ol	SO	1639		0,35 ± 0,05	0,26 ± 0,02	0,41 ± 0,06
92	<i>epi</i> -Cuben-1-ol	SO	1637	2079	0,43 ± 0,06	0,38 ± 0,07	0,47 ± 0,09
93	γ-Eudesmol	SO	1540	2184	1,03 ± 0,04	1,6 ± 0,02	1,1 ± 0,2
94	Cariofila-4(12),8(13)-dien-5α-ol	SO	1648		1,12 ± 0,07	0,8 ± 0,1	0,58 ± 0,08
95	<i>epi</i> -α-Cadinol + <i>epi</i> -α-Muurolol + α-Cadinol	SO SO SO	1657	2141 2211	2,74 ± 0,06	2,5 ± 0,02	1,0 ± 0,2
96	β-Eudesmol + α-Eudesmol	SO SO	1677	2250 2239	7,3 ± 0,3	5,1 ± 0,2	1,34 ± 0,09
97	Bulnesol	SO	1682		<i>tr</i>	0,09 ± 0,01	N.D.
98	Cadalenol	FP	1687	2233	0,28 ± 0,06	0,10 ± 0,02	0,40 ± 0,08
99	Sesquiterpeno oxigenado C ₁₅ H ₂₆ O	SO	1799		N.D.	0,18 ± 0,03	0,43 ± 0,06
100	Criptomeridiol	SO	1806		N.D.	N.D.	3,7 ± 0,3
101	Tricosano	H	2306		N.D.	N.D.	0,56 ± 0,03
102	Metoxichalcona*	OC	2418		N.D.	N.D.	0,49 ± 0,08
103	Pinocembrin*	OC			N.D.	N.D.	36,5 ± 0,3
104	Heptacosano*	H			N.D.	N.D.	0,86 ± 0,08

Tabla 15, Continuación.

105	N.I.*	OC	N.D.	N.D.	1,38 ± 0,09
106	Octacosano*	H	N.D.	N.D.	0,93 ± 0,08
107	Nonacosano*	H	N.D.	N.D.	0,54 ± 0,05
108	Untriacontano*	H	N.D.	N.D.	0,8 ± 0,1
<hr/>					
	Hidrocarburos monoterpénicos	M	35±4	34±2	14,7±0,6
	Monoterpenos oxigenados	MO	8,5±0,7	11±1	4,6±0,7
	Hidrocarburos sesquiterpénicos	S	20±2	20.9±1	19±2
	Sesquiterpenos oxigenados	SO	19±1	17±8	14±1
	Fenilpropanos	FP	17,0±0,9	17±2	5,4±0,3
	Otros compuestos oxigenados	OC	0,33±0,04	0,61±0,09	39,0±0,6
	Hidrocarburos lineales	H	0	0	3,7±0,3

^a Número de pico en la Figura 17.

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

^c Promedio de tres extracciones independientes, % ± σ^*t / \sqrt{n} ; n=3; t=4,30; σ =desviación estándar.

N.D. No detectado.

N.I. No identificado.

tr Detectado en trazas (<0,06%).

*Identificado tentativamente.

**Identificado por espectrometría de masas usando patrones certificados.

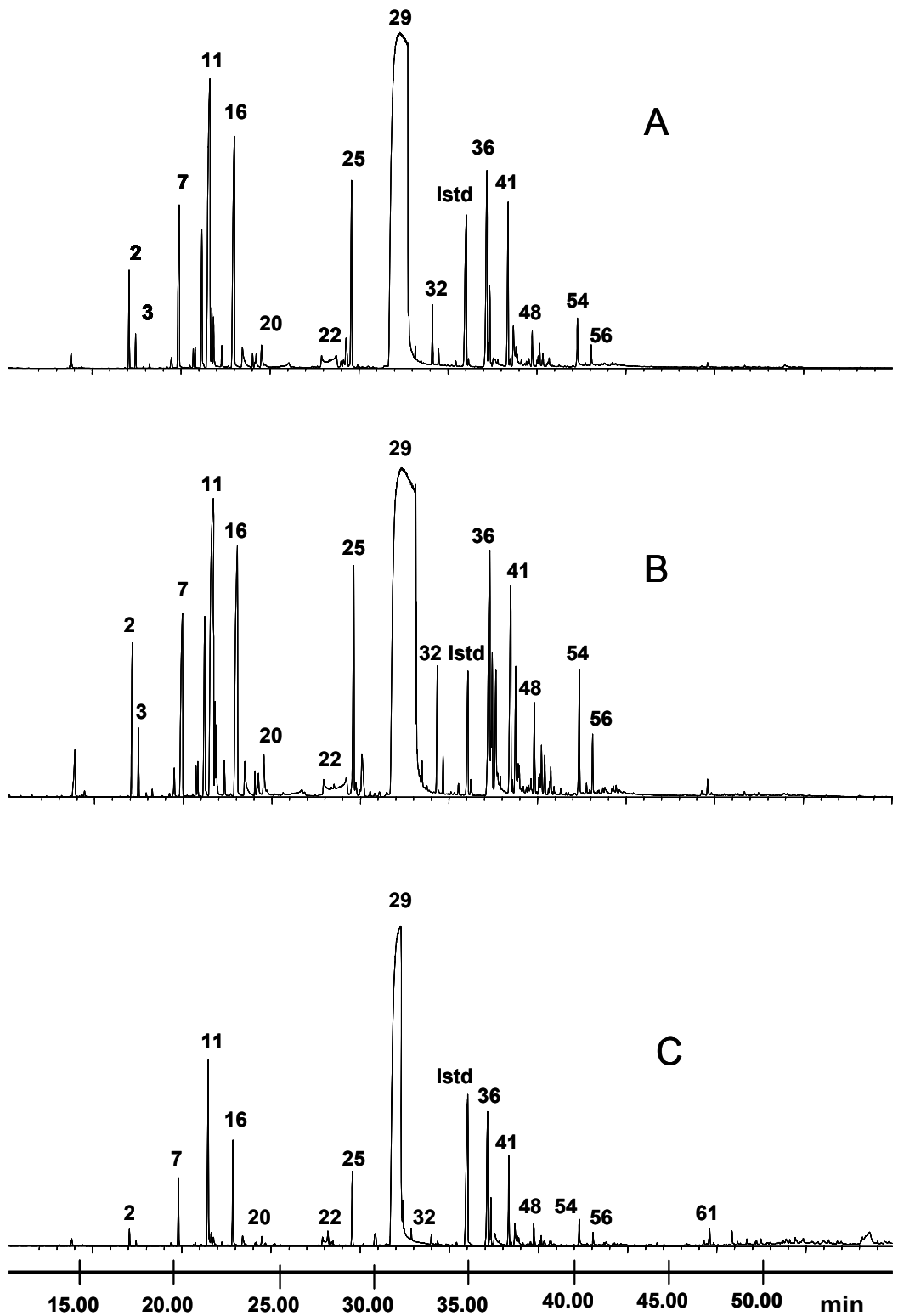


Figura 18. Perfiles cromatográficos típicos de los AE y extractos obtenidos de hojas de *Lippia origanoides*, QII en la primera floración, por: **A.** MWHD, **B.** SDE, **C.** SFE. Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV). La identificación de los compuestos se reporta en la **Tabla 16**.

Tabla 16. Cantidad relativa (%) e identificación de los metabolitos volátiles y semivolátiles de *L. origanoides*, quimiotipo II, aislados por diferentes técnicas de extracción.

N° Pico ^a	Compuesto	TIPO	I _k ^b		Cantidad relativa, % ± s ^c		
			DB-5	DB-WAX	MWHD	SDE	SFE
1	<i>trans</i> -2-Hexenal	OC	848	1213	0,26 ± 0,02	0,27 ± 0,01	0,36 ± 0,05
	+ <i>cis</i> -3-Hexenol	OC		1387			
2	α-Tujeno	M	925	1023	0,97 ± 0,04	1,1 ± 0,2	0,28 ± 0,03
3	α-Pineno	M	934	1028	0,29 ± 0,04	0,46 ± 0,04	N.D.
4	Canfeno	M	948	1073	<i>tr</i>	0,064 ± 0,004	N.D.
5	Sabineno	M	971	1125	<i>tr</i>	0,061 ± 0,002	N.D.
6	3-Octenol	M	974	1448	0,18 ± 0,04	0,27 ± 0,03	<i>tr</i>
	β-Pineno	M		1112			
7	β-Mirceno	M	990	1152	2,2 ± 0,2	2,17 ± 0,04	1,3 ± 0,1
8	α-Felandreno	M	1010	1158	0,16 ± 0,02	0,17 ± 0,03	N.D.
9	δ-2-Careno	M	1013		0,17 ± 0,02	0,173 ± 0,009	N.D.
10	α-Terpineno	M	1019	1164	1,83 ± 0,08	1,57 ± 0,05	<i>tr</i>
11	<i>p</i> -Cimeno**	FP	1025	1269	7,2 ± 0,9	7,4 ± 0,2	5,1 ± 0,2
12	Limoneno	M	1031	1196	0,50 ± 0,03	0,486 ± 0,006	0,30 ± 0,04
13	β-Felandreno	M	1033	1165	0,23 ± 0,02	0,39 ± 0,03	0,33 ± 0,02
14	1,8-Cineol	MO	1035	1223	<i>tr</i>	0,065 ± 0,007	N.D.
15	<i>trans</i> -β-Ocimeno	M	1049	1251	0,190 ± 0,006	0,30 ± 0,09	N.D.
16	γ-Terpineno	M	1060	1240	4,4 ± 0,2	4,7 ± 0,1	2,5 ± 0,1
17	<i>cis</i> -Hidrato de sabineno	MO	1071	1550	0,13 ± 0,01	0,46 ± 0,03	0,31 ± 0,02
18	Terpinoleno	M	1091	1280	0,11 ± 0,01	0,14 ± 0,02	N.D.

Tabla 16, Continuación.

19	6,7-Epóxido de mirceno + <i>p</i> -Cimeno	MO M	1096	1324	0,23 ± 0,02	0,30 ± 0,02	0,29 ± 0,09
20	Linalol	MO	1102	1543	0,17 ± 0,01	0,39 ± 0,02	0,23 ± 0,04
21	Alcanfor	MO	1148	1496	N.D.	0,065 ± 0,003	N.D.
22	4-Terpineol + Compuesto oxigenado, C ₁₀ H ₁₈ O (N.I.)	MO MO	1180	1598	0,30 ± 0,04	1,05 ± 0,07	0,59 ± 0,08
23	<i>p</i> -Cimen-8-ol + Estragol	MO FP	1187	1852	N.D.	<i>tr</i>	0,22 ± 0,09
24	Umbellulona*	MO	1226	1662	0,53 ± 0,02	0,44 ± 0,05	N.D.
25	Metil timil éter	FP	1226	1589	2,25 ± 0,09	1,75 ± 0,08	1,2 ± 0,1
26	<i>cis-p</i> -Menta-(7),8-dien-2-ol	MO	1229		<i>tr</i>	0,09 ± 0,01	N.D.
27	Isómero del metil timil éter C ₁₁ H ₁₆ O (N.I.)	FP	1284		N.D.	N.D.	0,21 ± 0,04
28	Timoquinona	MO	1287	2163	N.D.	0,07 ± 0,01	0,66 ± 0,06
29	Timol**	FP	1293	2182	66 ± 1	58 ± 1	68 ± 1
30	Carvacrol	FP	1304	2210	1,54 ± 0,05	1,18 ± 0,05	1,6 ± 0,4
31	3-Metil-4-isopropilfenol*	FP	1308		0,11 ± 0,02	0,24 ± 0,04	0,21 ± 0,03
32	Acetato de timilo	FP	1350	1866	1,890 ± 0,009	1,10 ± 0,05	0,20 ± 0,04
33	Eugenol	FP	1359		0,12 ± 0,02	0,19 ± 0,02	0,14 ± 0,05
34	α-Copaeno	S	1384	1493	<i>tr</i>	0,08 ± 0,01	0,14 ± 0,04
35	<i>cis</i> -α-Bergamoteno	S	1410		<i>tr</i>	0,15 ± 0,03	N.D.
36	<i>trans</i> -β-Cariofileno**	S	1428	1597	3,58 ± 0,02	4,5 ± 0,2	3,4 ± 0,5
37	α-Cedreno*	S	1430	1598	0,16 ± 0,02	0,38 ± 0,03	0,21 ± 0,06
38	<i>trans</i> -α-Bergamoteno	S	1440	1594	0,68 ± 0,04	0,95 ± 0,08	0,86 ± 0,04
39	4-(1,1-Dimetil-1,2-bencenodiol*)	OC	1451		N.D.	1,65 ± 0,05	N.D.
40	<i>trans</i> -β-Farneseno	S	1458	1670	N.D.	0,09 ± 0,01	N.D.

Tabla 16, Continuación.

41	α -Humuleno	S	1464	1674	2,41 \pm 0,04	2,0 \pm 0,1	1,9 \pm 0,3
42	<i>trans</i> -Cadina-1(6),4-dieno*	S	1481		<i>tr</i>	1,1 \pm 0,1	0,14 \pm 0,07
43	Hidroxianisol butilado* (BHA, Antioxidante)	OC	1484	2448	0,39 \pm 0,03	0,9 \pm 0,1	0,58 \pm 0,07
44	γ -Muuruleno	S	1486	1698	0,18 \pm 0,02	0,28 \pm 0,03	0,24 \pm 0,06
45	<i>ar</i> -Curcumeno	S	1488	1775	0,071 \pm 0,005	0,14 \pm 0,01	0,13 \pm 0,06
46	Germacreno D	S	1492	1710	<i>tr</i>	0,10 \pm 0,02	<i>tr</i>
47	α -Muuruleno	S	1508	1784	<i>tr</i>	0,19 \pm 0,02	<i>tr</i>
	+ α -Selineno	S		1721			
48	β -Bisaboleno	S	1516	1745	0,29 \pm 0,06	0,50 \pm 0,02	0,34 \pm 0,09
	+ β -Curcumeno	S		1770			
49	γ -Cadineno	S	1521	1786	0,076 \pm 0,008	0,16 \pm 0,02	0,14 \pm 0,04
50	δ -Cadineno	S	1530	1788	0,14 \pm 0,01	0,31 \pm 0,04	0,24 \pm 0,01
51	<i>trans</i> -Calameneno	S	1534	1833	0,097 \pm 0,007	0,20 \pm 0,03	0,15 \pm 0,01
	+ <i>trans</i> - γ -Bisaboleno	S					
52	<i>cis</i> -Calameneno	S	1537	1843	<i>tr</i>	0,20 \pm 0,02	0,23 \pm 0,06
	+ <i>trans-iso</i> - γ -Bisaboleno	S					
53	<i>trans</i> -Nerolidol	SO	1565	1994	N.D.	0,08 \pm 0,04	<i>tr</i>
54	Óxido de cariofileno	SO	1591	2006	0,22 \pm 0,01	0,21 \pm 0,03	0,56 \pm 0,06
55	2,(7 <i>cis</i>)-Bisaboladien-4-ol	SO	1618		N.D.	0,09 \pm 0,01	<i>tr</i>
56	Epóxido de humuleno II	SO	1621	2060	0,12 \pm 0,02	0,08 \pm 0,01	0,24 \pm 0,01
57	epoxi <i>allo</i> -Aromadendreno*	SO	1650		N.D.	N.D.	0,14 \pm 0,06
58	Cariofila-4(12),8(13)-dien-5 α -ol	SO	1652		N.D.	0,07 \pm 0,01	0,16 \pm 0,06
	+ <i>epi</i> - α -Muurolol*	SO					
59	α -Eudesmol	SO	1676	2240	N.D.	0,082 \pm 0,004	0,13 \pm 0,08
60	β -Bisabolol	SO	1679	2248	N.D.	0,082 \pm 0,006	<i>tr</i>

Tabla 16, Continuación.

61	<i>cis,cis,cis</i> -7,10,13-Hexadecatrienal*	OC	1897	N.D.	N.D.	0,28 ± 0,05
62	Fitol*	OC	1932	N.D.	N.D.	0,27 ± 0,08
63	Tricosano	H	2306	N.D.	N.D.	1,4 ± 0,1
64	Tetracosano	H	2387	N.D.	N.D.	0,14 ± 0,07
65	Pentacosano	H	2490	N.D.	N.D.	0,16 ± 0,03
66	Mono-2-etilhexil-ftalato*	OC		N.D.	N.D.	0,22 ± 0,08
67	Hexacosano *	H		N.D.	N.D.	1,1 ± 0,3
68	Heptacosano*	H		N.D.	N.D.	0,22 ± 0,07
69	Nonacosano*	H		N.D.	N.D.	0,14 ± 0,01
70	N.I.			N.D.	N.D.	0,20 ± 0,07
71	Untriacontano*	H		N.D.	N.D.	0,95 ± 0,07
	Hidrocarburos monoterpénicos	M		11,2 ± 0,7	12,1 ± 0,7	4,7 ± 0,3
	Monoterpenos oxigenados	MO		1,4±0,1	3,0±0,7	2,4±0,4
	Hidrocarburos sesquiterpénicos	S		7,6±0,2	11,3±0,8	8±1
	Sesquiterpenos oxigenados	SO		0,34±0,03	0,7±0,1	1,2±0,3
	Fenilpropanos	FP		79±2	70±2	77±2
	Otros compuestos oxigenados	OC		0,65±0,05	2,8±0,2	1,7±0,3
	Hidrocarburos lineales	H		0	0	4,1±0,7

^a Número de pico en la Figura 18.

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

^c Promedio de tres extracciones independientes, % ± σ^*t / \sqrt{n} ; n=3; t=4,30; σ =desviación estándar.

N.D. No detectado.

N.I. No identificado.

tr Detectado en trazas.

*Identificado tentativamente.

**Identificado por espectrometría de masas usando patrones certificados.

En las **Tablas 15 y 16** se listan los compuestos detectados en los AE y extractos de *L. origanoides* QI y QII, según el orden de elución en la columna DB-5 (f.e. apolar), así como sus t_R e I_K calculados a partir de los tiempos de retención en las dos columnas. Algunos de estos valores se compararon con los de terpenos certificados, en el **Anexo 2** se muestran los espectros de masas y los t_R de estos compuestos. El compuesto mayoritario en los extractos SDE y en el AE, obtenidos del QI fue el *p*-cimeno (16 y 14,6% respectivamente). En los extractos SFE, el compuesto mayoritario fue el pinocembrin (36,5%) que es una flavonona. En los extractos SFE, SDE y en los AE del QII, el compuesto mayoritario fue el timol (68, 58 y 66% respectivamente). Las estructuras químicas de los compuestos mayoritarios se muestran en la **Figura 19**.

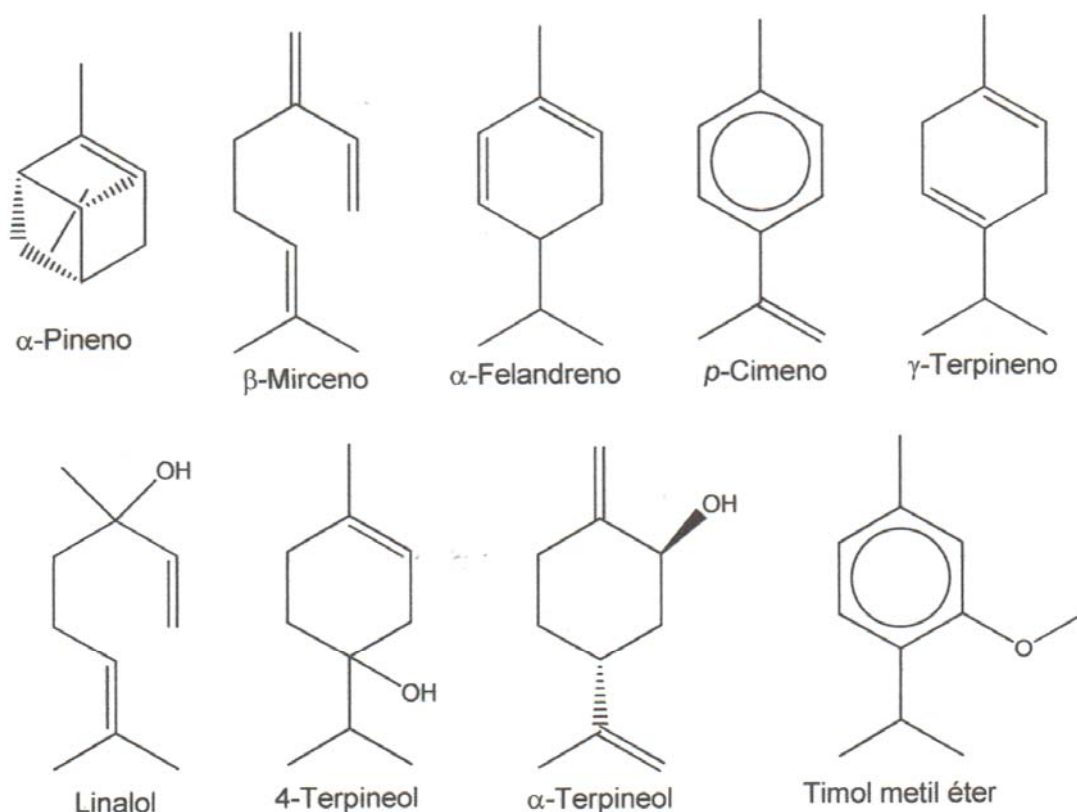
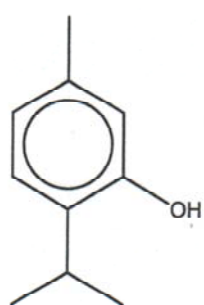
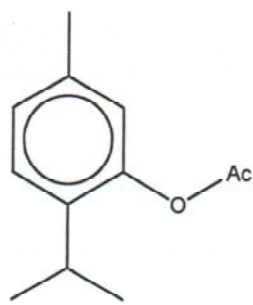


Figura 19. Estructuras químicas de los principales compuestos detectados en los extractos y aceites esenciales de *L. origanoides*.

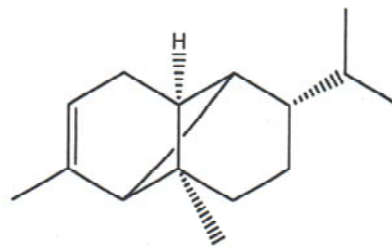
Figura 19, Continuación



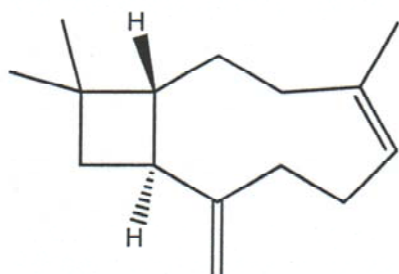
Timol



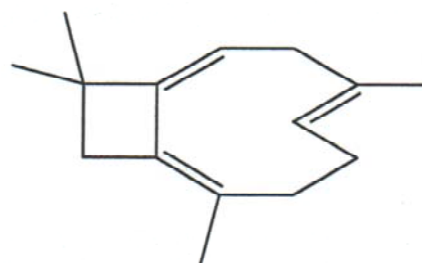
Acetato de timilo



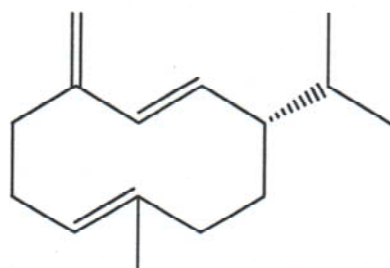
α -Copaeno



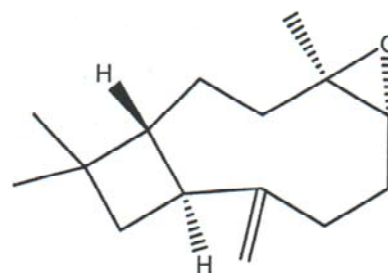
trans- β -Cariofileno



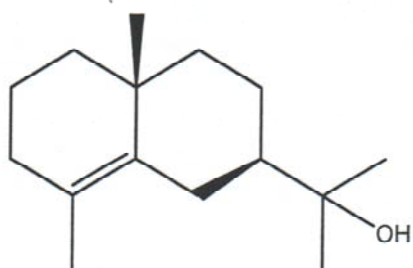
α -Humuleno



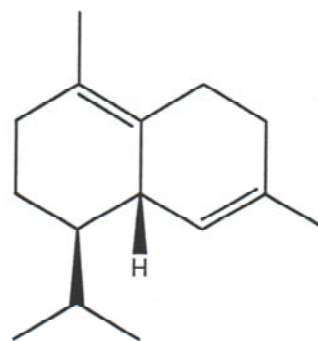
Germacreno D



Óxido de cariofileno

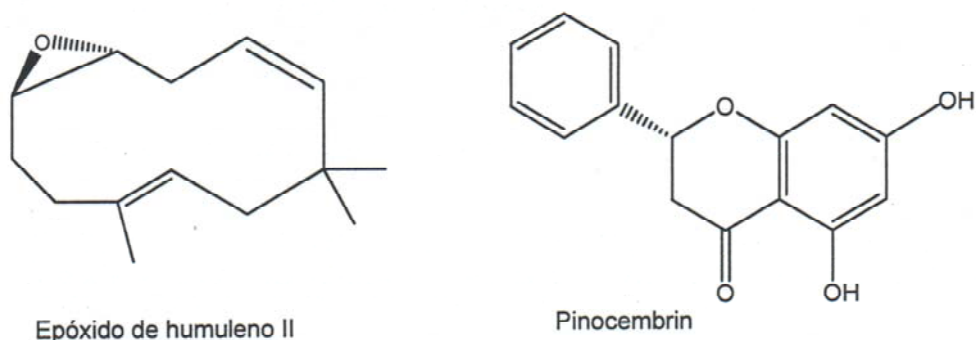


γ -Eudesmol



γ -Cadineno

Figura 19, Continuación



En diferentes publicaciones sobre la composición química de los aceites esenciales, obtenidos por hidrodestilación convencional de *Lippia organoides*, realizados en Brasil, muestran que el aceite aislado de QII tiene una cantidad muy alta de timol (>60%), lo que no se reportó antes. Aunque en dos estudios brasileños se describe un quimiotipo "timol", en el AE este compuesto no excedía el 38,4%. Los porcentajes del timol en los AE de *L. organoides* de origen brasileño y venezolano reportados por distintos autores se muestran en la **Tabla 17**. El aceite esencial obtenido del QI presenta una composición muy similar a la del AE de una muestra anteriormente estudiada en el Laboratorio de Cromatografía de la UIS por Castañeda [9], en donde el *p*-cimeno fue el componente mayoritario.

Tabla 17. Composiciones del AE de *L. organoides* colectadas en Brasil y Venezuela, reportadas por distintos autores.

Compuesto	Cantidad relativa, (%)				
	Morais [75]	Gallino [76]	Terblanché [98]	Dos Santos [1]	Oliveira [63]
<i>p</i> -Cimeno	27,8	3,2	4,2	11,9	10,3
Timol	20,6	38,4	38,4	8,4	18,5
Carvacrol	---	0,4	0,36	33,5	38,6

El número de compuestos varía apreciablemente de una técnica extractiva a otra, así como también la cantidad relativa de compuestos

clasificados por familias químicas. SDE fue la técnica que permitió extraer mayor número de compuestos, seguida de MWHD y, finalmente, de SFE. Un aspecto importante a resaltar es que la diferencia en la composición química de los AE aislados de los quimiotipos estudiados, reafirma las distintas notas olfativas que hay entre ellos, pues a partir de su olor éstos fueron distinguidos en campo.

4.4.1 Influencia de la técnica de extracción sobre el número y el tipo de metabolitos secundarios volátiles en *L. origanoides* detectados por GC-MS. Los AE del QI presentaron una coloración amarilla clara, en cambio, los del QII fueron amarillo-marrón. Los dos aceites fueron líquidos viscosos al tacto, y presentaron olores muy intensos, pero diferentes entre sí. Los extractos obtenidos por SDE fueron levemente coloreados con tonalidad amarilla muy pálida, en cambio los obtenidos por SFE presentaron una apariencia resinosa y un color amarillo-marrón con un olor similar a los de los AE de las respectivas plantas.

Para obtener mayor información sobre la composición química de los metabolitos secundarios presentes en las hojas de *L. origanoides*, éstas fueron sometidas a extracción por las 3 técnicas diferentes. Los extractos SDE fueron ricos en monoterpenos, que son los más volátiles entre los metabolitos estudiados y, en general, ésta fue la técnica, con la cual se obtuvieron extractos con el número más alto de compuestos, como lo muestra la **Tabla 18**. Por esta razón, se logró identificar algunos compuestos que no se reportaron antes para esta especie. Godefroot *et al.* [41] encontró que al utilizar la SDE, los porcentajes de recuperación de algunos compuestos fueron cercanos al 100%, adicionalmente, es una técnica funcional que permite aislar sustancias de diversas matrices, e.g. fenoles de suelos [99], compuestos volátiles del aroma del vino [100], entre otras. SFE permitió obtener extractos con alto contenido de compuestos semivolátiles como sesquiterpenos, hidrocarburos lineales (C>25) y cetonas de alto peso molecular, que no se encontraron en los demás extractos, pero, en general, se detectaron menos compuestos, que por otras técnicas de extracción tal como se observa en la **Tabla 18**. La

utilización de la técnica MWHD fue de gran utilidad, porque permitió aislar AE en un tiempo muy corto (40 min Vs 3 h por el método de hidrodestilación convencional), en general con esta técnica se obtuvo un número de compuestos intermedio, es decir, menos compuestos que por SDE pero más que por SFE. La composición de los AE obtenidos por MWHD presenta más similitud con SDE que con SFE.

Tabla 18. Variación del número de compuestos detectados en *L. organoides* QI, en función de la técnica de extracción.

Técnica de extracción	QI			QII		
	F1	PF	F2	F1	PF	F2
SDE	112	109	92	66	57	59
MWHD	98	87	84	44	37	51
SFE	75	66	56	58	49	41

F1: Primera floración; PF: Post-floración; F2: Segunda floración.

El número de compuestos detectados por SDE para QI y QII fue mayor que para las técnicas SFE y MWHD, para todos los estados fenológicos. En los extractos SDE y SFE, y el AE del QI, se presentó una disminución en el número de compuestos a medida que la planta crecía (**Tabla 18**). En contraste con lo anterior, el AE del quimiotipo II (QII) no mostró la misma tendencia: a medida que pasaba el tiempo, el número de compuestos aumentaba en los extractos, sobre todo, durante la segunda floración. Los extractos SFE y SDE obtenidos de QII, no mostraron el mismo comportamiento que los AE, pues el número de compuestos en los primeros disminuyó, mientras que en los segundos este número casi se mantuvo constante sobretodo entre la post-floración y la segunda floración.

En la **Tabla 19** se observa, que la cantidad relativa de compuestos clasificadas por familias de compuestos varió de una técnica extractiva a

otra. Los hidrocarburos monotérmicos fueron la familia más abundante en los AE y extractos SDE, pero no en los extractos obtenidos por SFE, debido a que el compuesto identificado como pinocembrin, que se incluyó en el grupo de otros compuestos oxigenados (**OC**), fue el mayoritario, inclusive por encima del *p*-cimeno y α -felandreno, como se observa en la **Tabla 15**. Otro grupo de compuestos exclusivos de los extractos SFE fueron los hidrocarburos lineales.

Tabla 19. Variación de las cantidades relativas de las familias de compuestos encontrados en *L. origanoides*, QI y QII, en la primera floración con respecto a la técnica de extracción.

Familias de compuestos	QI			QII		
	SDE	MWHD	SFE	SDE	MWHD	SFE
M	34	35	14,7	12,1	11,2	4,7
MO	11	8,5	4,6	3	1,4	2,4
S	20,9	20	19	11,3	7,6	8
SO	17	19	14	0,7	0,34	1,2
FP	17	17	5,4	70	79	77
OC	0,61	0,33	39	2,8	0,65	1,7
H	0	0	3,7	0	0	4,1

M: Hidrocarburos monotérmicos; MO: Monoterpenos oxigenados; S: Hidrocarburos sesquitérmicos; SO: Sesquiterpenos oxigenados; FP: Fenilpropanos; OC: Otros compuestos oxigenados; H: Hidrocarburos lineales.

Se observa en la **Tabla 19**, que para el QII hubo diferencias significativas en la distribución de los compuestos según familias, en los AE y extractos obtenidos por diferentes métodos. Las cantidades relativas de hidrocarburos monotérmicos (**M**) y fenilpropanos (**FP**) en las muestras SDE y MWHD fueron similares. En las técnicas SFE y MWHD las cantidades relativas de hidrocarburos sesquitérmicos (**S**) se mostraron iguales. La cantidad de fenilpropanos (**FP**) fue levemente mayor en el AE que en los extractos. Los hidrocarburos (**H**), solo estuvieron presentes en las muestras SFE.

La composición de los extractos varió de manera similar a los reportes publicados por Stashenko y colaboradores los cuales trabajaron con las mismas técnicas pero con distintas especies vegetales como *L. alba* [38], *S. americana* [3] y *C. odorata* [20]. En estos trabajos los perfiles cromatográficos de las técnicas MWHD y SDE fueron similares pero diferentes del de SFE, aunque un factor importante en la similitud o discordancia puede deberse a las distintas condiciones de trabajo escogidas.

4.4.2 Influencia del quimiotipo sobre la composición de los extractos y AE de *L. origanoides*. Las plantas del quimiotipo QI se caracterizaron por olores muy agradables, que se pueden asociar con los de la madera, debido principalmente a la presencia de sesquiterpenos como el *trans*- β -cariofileno, α -humuleno, y sus homólogos oxigenados, óxido de cariofileno y epóxido de humuleno; y a notas cítricas, debido a la presencia de compuestos *p*-cimeno, limoneno, α -felandreno, respectivamente, según lo reportan Jirovetz y colaboradores [101, 102]. Aunque la fragancia la conforma una mezcla compleja de compuestos, las sustancias que están en pequeñas proporciones, también podrían tener una influencia sobre ésta. El quimiotipo QII, en cambio, presenta un olor a orégano, que es pungente debido a la presencia de timol.

El compuesto mayoritario en el quimiotipo QI fue el *p*-cimeno, detectado en los extractos obtenidos por SDE, en cantidades relativas de 16-18,4%. Como se puede observar en la **Figura 20**, el grupo de compuestos más importante en el extracto SDE fue el de los hidrocarburos monoterpénicos, con contribuciones altas de α -pineno (3,1%), α -felandreno (7,0%), limoneno (<16%) y γ -terpineno (2,2%). Otro grupo importante fue el de los hidrocarburos sesquiterpénicos, representado en su mayoría por *trans*- β -cariofileno (6,8%), α -humuleno (3,9%) y γ -muuroleno (0,81%). El extracto SDE del quimiotipo QII se caracterizó por la presencia de timol y otros compuestos fenilpropanoides (**FP**), entre los cuales se destacan el timol (58%), *p*-cimeno (7,4%), acetato de timilo

(1,10%) y carvacrol (1,2%). Otros compuestos importantes fueron los hidrocarburos monoterpénicos, representados en su mayoría por β -mirreno (2,2%) y γ -terpineno (4,7%), y los hidrocarburos sesquiterpénicos, *trans*- β -cariofileno (4,5%) y α -humuleno (2,0%). La cantidad de monoterpenos oxigenados (**MO**) y sesquiterpenos oxigenados (**SO**) fue mayor en el quimiotipo QI que en el QII. Esto podría también ser una causa de la agradable fragancia de los extractos SFE y de los AE del QI, puesto que algunos de estos compuestos e.g. linalol, α -terpineol y 4-terpineol, son responsables de notas odoríferas agradables [100]. Las variaciones anteriores entre individuos de la misma especie, quizás, se deban a factores como la edad de la planta u ontogenia, o, a variaciones genéticas, y se podrían posiblemente descartar las variaciones ambientales puesto que cuando se colectaron las plantas de ambos quimiotipos, éstas se encontraban compartiendo el mismo sitio.

En los extractos SFE obtenidos a partir del quimiotipo QI, el compuesto mayoritario identificado fue pinocembrin (36,5%) que hizo parte de la familia de otros compuestos oxigenados (**OC**) que componían cerca del 80% de la muestra. El pinocembrin que se detectó en el quimiotipo QI, es un compuesto de tipo flavonoide, que se encuentra en especies vegetales como *Pinus cembra* (Pinaceae), *Glycyrriza spp.* (Leguminosae), *Prunus spp.* (Rosaceae) y *Helichrysum spp.* (Compositae), además, inhibe el crecimiento de *Bacillus sp.* en concentraciones de 3 μ g/mL, y es efectivo contra *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Cryptococcus neoformans* en concentraciones de 0,1-3 mg/mL [103]. En el **Anexo 1** se muestran el espectro de masas de este compuesto y su esquema de fragmentación.

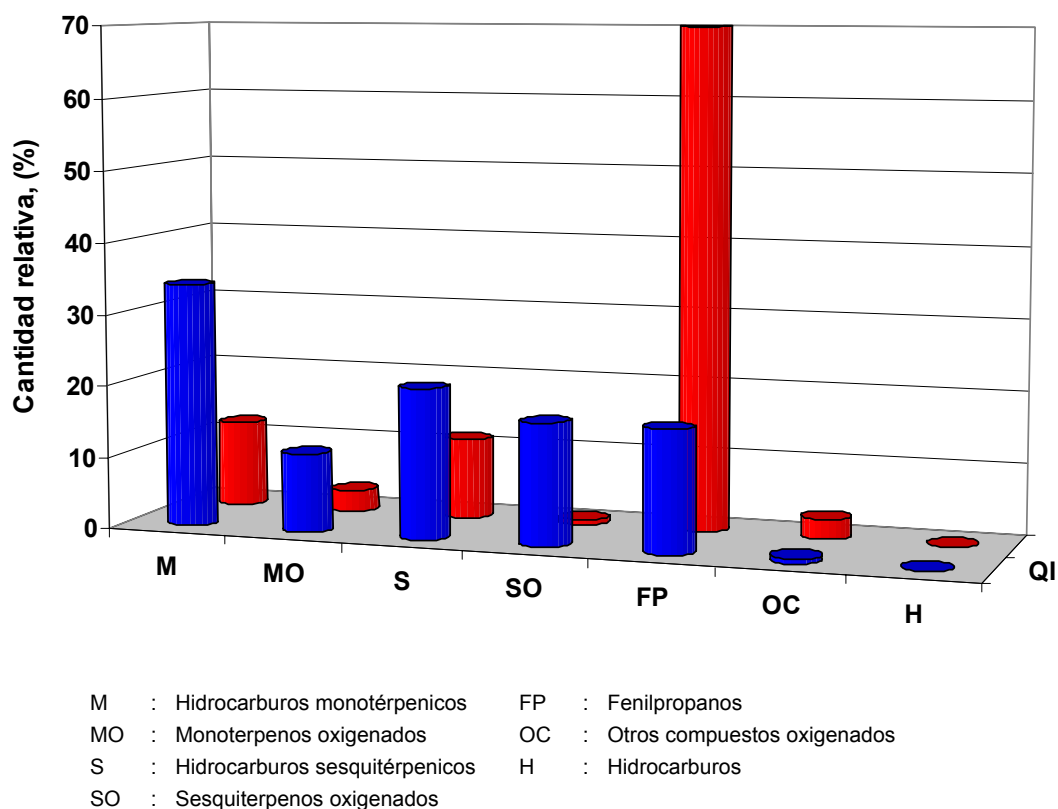


Figura 20. Variación de las familias de compuestos químicos presentes en los extractos SDE de *L. origanoides* según el quimiotipo.

Los sesquiterpenos (19%) fueron la segunda familia de compuestos en importancia como se muestra en la **Figura 21**, siendo *trans*- β -cariofileno (4,5%) y el α -humuleno (3,1%) los compuestos más representativos. Los extractos SFE aislados del quimiotipo QII, con *ca.* del 77% de compuestos tipo fenilpropanoide, se caracterizaron por un alto contenido de timol (66%). Esta técnica podría ser utilizada como recurso en la obtención de timol con altos rendimientos. Los hidrocarburos sesquitérmicos aportaban un alto porcentaje en el extracto SFE. Los hidrocarburos lineales se encontraron en mayor cantidad relativa y en número en el quimiotipo QII (4,1%), que en el QI.

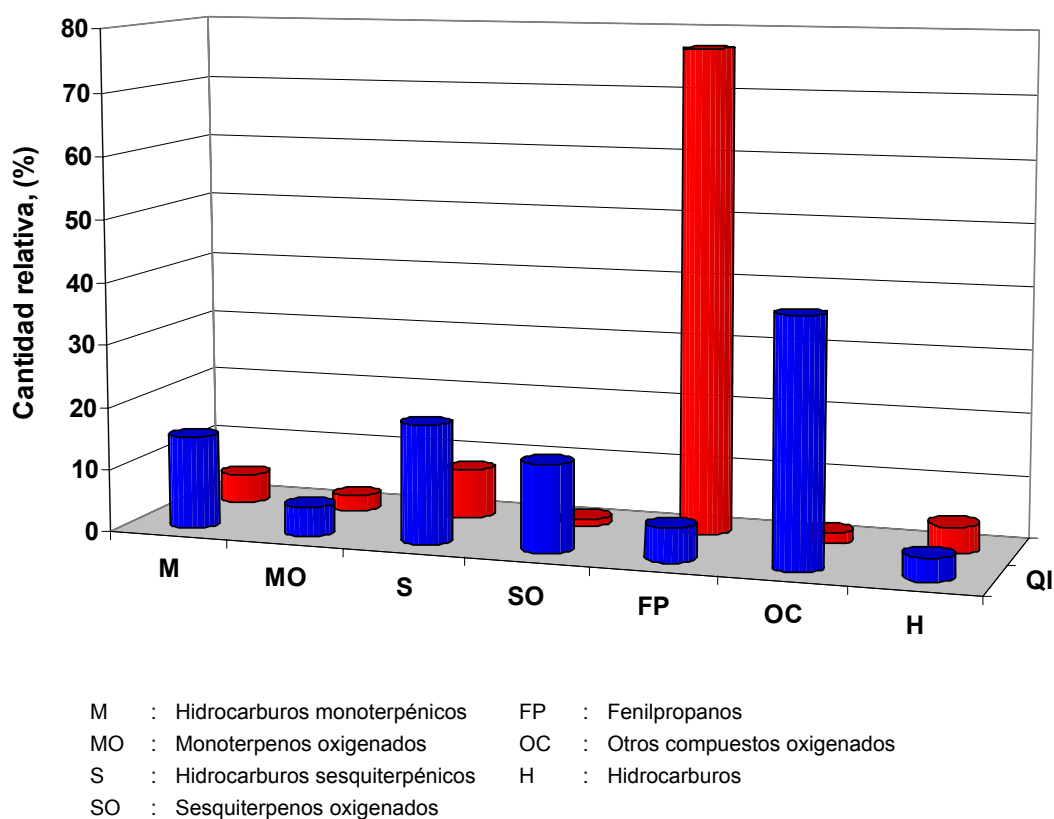


Figura 21. Variación de los familias de compuestos químicos presentes en los extractos SFE de *L. origanoides* según el quimiotipo.

En la **Figura 22** se comparan las áreas relativas (A_x/A_{istd}) de compuestos comunes, presentes en los quimiotipos QI y QII. *p*-Cimeno se encuentra en cantidades mayores en el quimiotipo QI, al igual que el *trans*- β -cariofileno y α -humuleno, mientras que los monoterpenos β -mirceno y γ -terpineno, aparecen en cantidades mayores en los AE del quimiotipo QII. Estas variaciones entre individuos de la misma especie botánica, quizás, se deban a factores como la edad de la planta u ontogenia, o, a variaciones genéticas, y se podrían descartar las variaciones ambientales puesto que cuando se colectaron las plantas, éstas se encontraban en una misma población y crecían en la misma área.

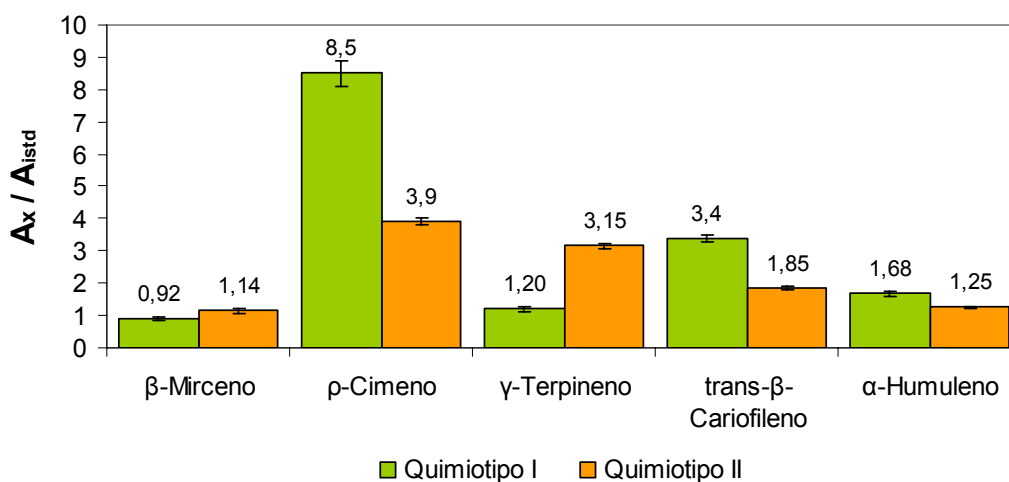


Figura 22. Relación A_x/A_{istd} de los principales compuestos comunes en los cromatogramas de los dos quimiotipos de *L. origanoides*. (Istd=n-tetradecano)

4.4.3 Variación composicional del AE y extractos de *L. origanoides*, en función del estado fenológico. Las Figuras 23 y 24 muestran las relaciones “Área compuesto/Área istd” en los cromatogramas de los AE obtenidos de los dos quimiotipos estudiados. En la Figura 23, se muestra el cambio que hubo en la relación A_x/A_{istd} , de los cuatro compuestos más abundantes en el AE del QI; las cantidades de los éstos aumentan en los periodos de floración, y disminuyen en post-floración. El mayor aumento fue en el α -felandreno, al igual que la disminución durante el periodo de final de floración. El orden de concentración de los cuatro compuestos en las hojas del AE del quimiotipo QI durante los tres estados fenológicos estudiados fue el mismo, es decir: 1. ρ -Cimeno, 2. α -Felandreno, 3. *trans*- β -Cariofileno y 4. α -Humuleno.

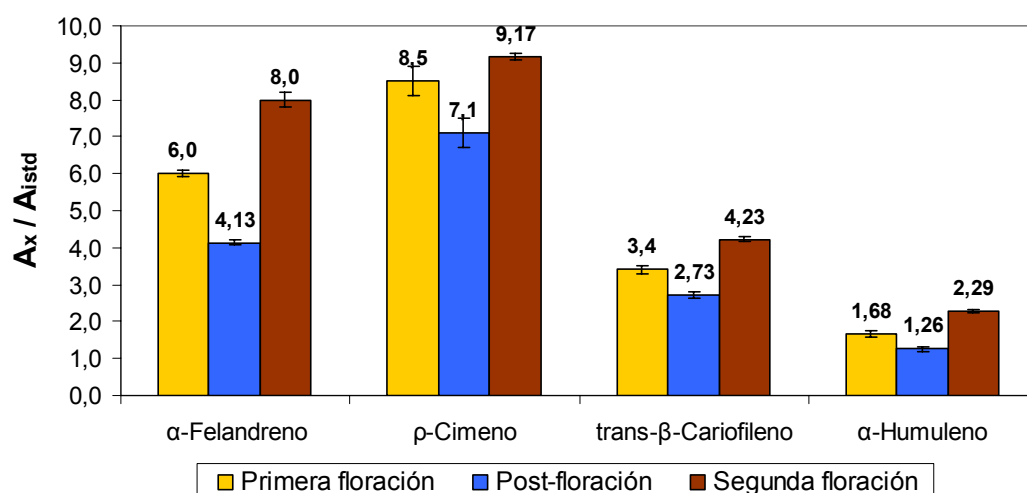


Figura 23. Relación A_x/A_{istd} de los principales compuestos en los cromatogramas del AE de *L. origanoides*, quimiotipo QI.

En la **Figura 24** se muestra la variación en la relación Área del compuesto/Área del Istd de los cuatro compuestos mayoritarios del AE del quimiotipo QII en función del estado fenológico. Los cambios en las concentraciones de los compuestos de QII muestran una similitud con los de QI, debido a que en el estado de post-floración las relaciones A_x/A_{istd} de los cuatro metabolitos son menores que en las floraciones. De los compuestos analizados solo la cantidad relativa de timol fue mayor en la primera floración.

Las variaciones durante los estados vegetativos evaluados coinciden con lo reportado por Hudaib y colaboradores [104], quienes encontraron que el tomillo presenta un mayor rendimiento de AE en post-floración, pero la cantidad relativa del timol desciende durante este estado fenológico, y aumenta durante la floración. En otro estudio realizado por Senatore [96], la cantidad total de timol, carvacrol, p -cimeno y γ -terpineno, se mantuvo constante en *Thymus pulegioides*, durante los distintos estados fenológicos estudiados a lo largo del ciclo vegetativo de la planta. En *L. origanoides* no se observó este comportamiento, ya que durante diferentes estados fenológicos la cantidad total de estos compuestos varió.

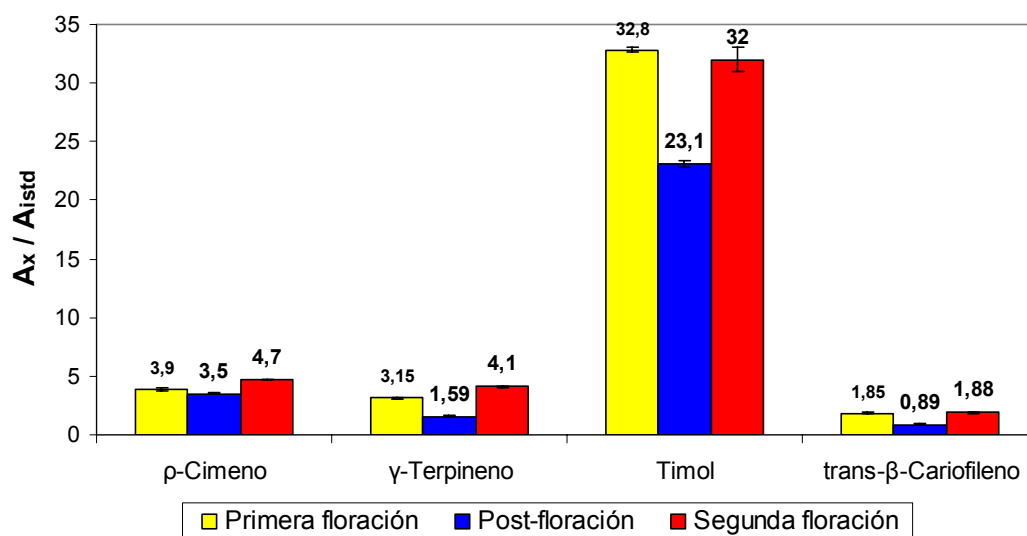


Figura 24. Relación A_x/A_{istd} de los compuestos mayoritarios del AE *L. organoides*, QII.

En las **Tablas 20** y **21** se muestra la variación de la cantidad relativa, %, de algunos compuestos mayoritarios en los AE y extractos de *L. organoides*, durante los tres estados fenológicos estudiados. Las variaciones que tuvieron los compuestos de acuerdo con la técnica extractiva no fue la misma durante los tres estados fenológicos estudiados, es decir los datos no mostraron una tendencia generalizada. Los cambios de las cantidades relativas, %, no van de acuerdo con las relaciones A_x/A_{istd} mostradas en las **Figuras 23** y **24**, debido principalmente a que en todos los estados fenológicos estudiados no se detectaron el mismo número de compuestos, por lo tanto, las cantidades relativas, %, varían en mayor grado que las relaciones A_x/A_{istd} .

A continuación, en las **Figuras 25** y **26**, se muestran los perfiles cromatográficos de los AE obtenidos por MWHD, de las plantas recolectadas durante los tres estados fenológicos estudiados. En las **Tablas 20** y **21**, aparecen las cantidades relativas de estos aceites.

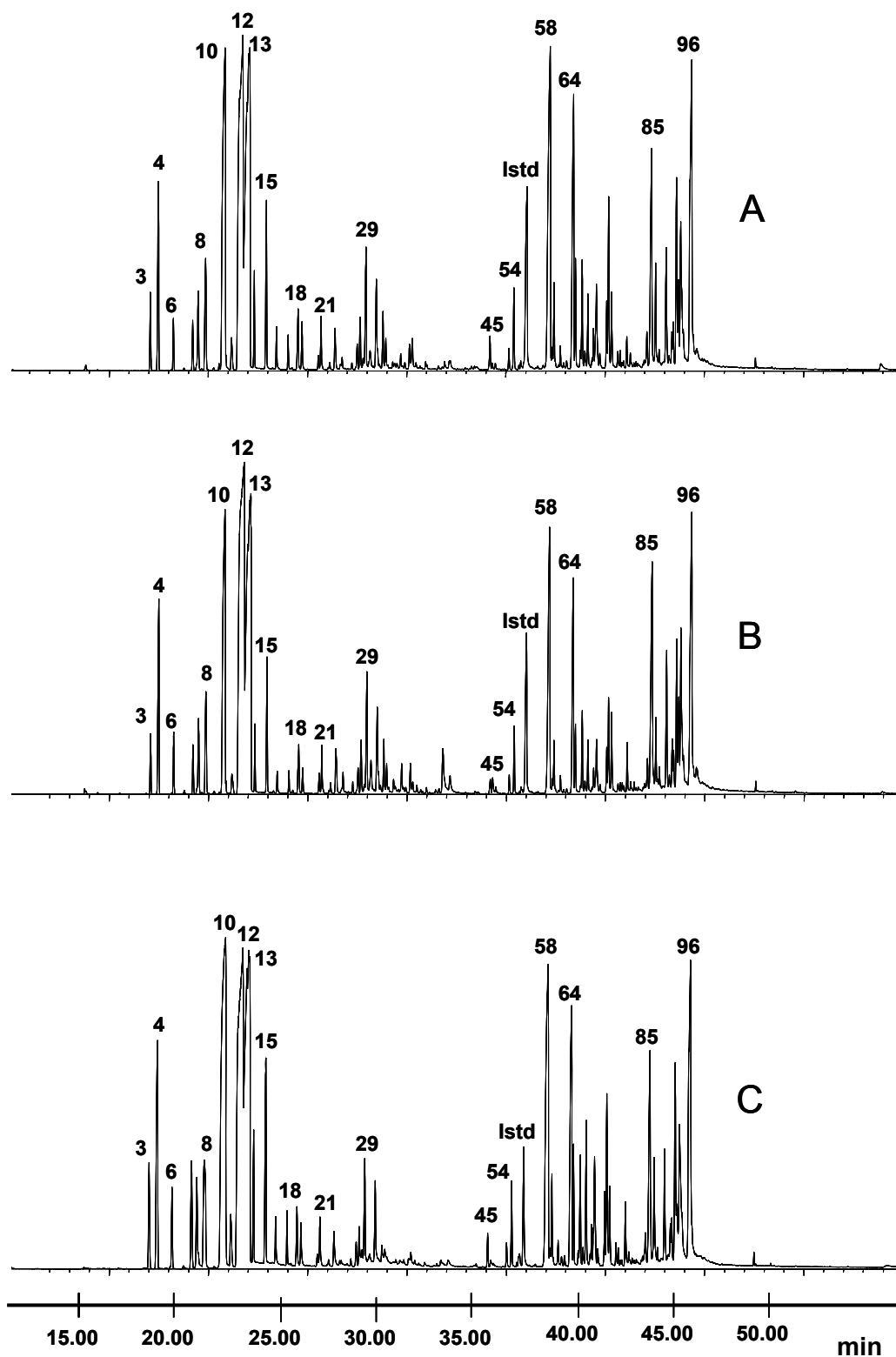


Figura 25. Perfiles cromatográficos del AE de *Lippia organoides* Q1, en función del estado fenológico de la planta: **A.** F1; **B.** PF; **C.** F2; Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV).

Tabla 20. Cantidad relativa (%) e identificación de los componentes principales del AE y extractos de *Lippia organoides* quimiotipo I, extraídos en tres estados fenológicos.

Compuesto	Técnica de extracción	Cantidad relativa, % *		
		Primera floración	Post-floración	Segunda floración
α -Pinoeno	MWHD	2,4 ± 0,5	2,80 ± 0,04	2,9 ± 0,2
	SDE	3,1 ± 0,1	2,6 ± 0,2	3,3 ± 0,1
	SFE	1,33 ± 0,04	0,7 ± 0,2	0,9 ± 0,1
α -Felandreno	MWHD	10,3 ± 0,3	9,9 ± 0,5	12,7 ± 0,5
	SDE	7,0 ± 0,2	8,9 ± 0,5	9,6 ± 0,4
	SFE	2,32 ± 0,09	1,3 ± 0,2	2,2 ± 0,3
<i>p</i> -Cimeno	MWHD	14,6 ± 0,6	17 ± 1	14,5 ± 0,7
	SDE	16 ± 2	17 ± 1	18,4 ± 0,3
	SFE	3,9 ± 0,1	4,6 ± 0,5	4,1 ± 0,7
Limoneno	MWHD	15 ± 2	17 ± 1	13,4 ± 0,5
+ β -Felandreno	SDE	16 ± 1	18,0 ± 0,6	16,0 ± 0,9
+1,8-Cineol	SFE	4,9 ± 0,1	7,2 ± 0,6	7,5 ± 0,03
γ -Terpineno	MWHD	2,1 ± 0,1	1,7 ± 0,1	2,03 ± 0,02
	SDE	2,2 ± 0,2	1,7 ± 0,2	2,1 ± 0,1
	SFE	1,55 ± 0,09	1,3 ± 0,3	1,5 ± 0,2
<i>trans</i> - β -Cariofileno	MWHD	5,8 ± 0,3	6,5 ± 0,2	6,7 ± 0,5
	SDE	6,8 ± 0,3	6,0 ± 0,1	7,8 ± 0,3
	SFE	4,5 ± 0,5	5,8 ± 0,4	5,2 ± 0,2
α -Humuleno	MWHD	2,9 ± 0,1	3,1 ± 0,1	3,6 ± 0,2
	SDE	3,95 ± 0,09	3,4 ± 0,2	4,2 ± 0,2
	SFE	3,1 ± 0,3	2,7 ± 0,3	3,5 ± 0,4
Óxido de cariofileno +Viridiflorol	MWHD	1,80 ± 0,08	2,1 ± 0,9	2,9 ± 0,1
	SDE	2,83 ± 0,05	3,07 ± 0,09	3,2 ± 0,3
	SFE	2,1 ± 0,5	1,9 ± 0,2	1,9 ± 0,2
Epóxido de humuleno II +1,10-di- <i>epi</i> -Cubenol	MWHD	1,1 ± 0,1	0,14 ± 0,01	1,04 ± 0,02
	SDE	1,2 ± 0,01	1,16 ± 0,01	1,05 ± 0,01
	SFE	1,15 ± 0,09	0,8 ± 0,3	0,59 ± 0,07
β -Eudesmol + α -Eudesmol	MWHD	7,3 ± 0,3	6,7 ± 0,4	6,2 ± 0,9
	SDE	5,1 ± 0,2	4,2 ± 0,2	5,3 ± 0,2
	SFE	1,34 ± 0,09	1,2 ± 0,3	1,7 ± 0,2

* Promedio de tres extracciones independientes, % \pm σ^*t / \sqrt{n} , n=3, t=4,30, σ =desviación estándar.

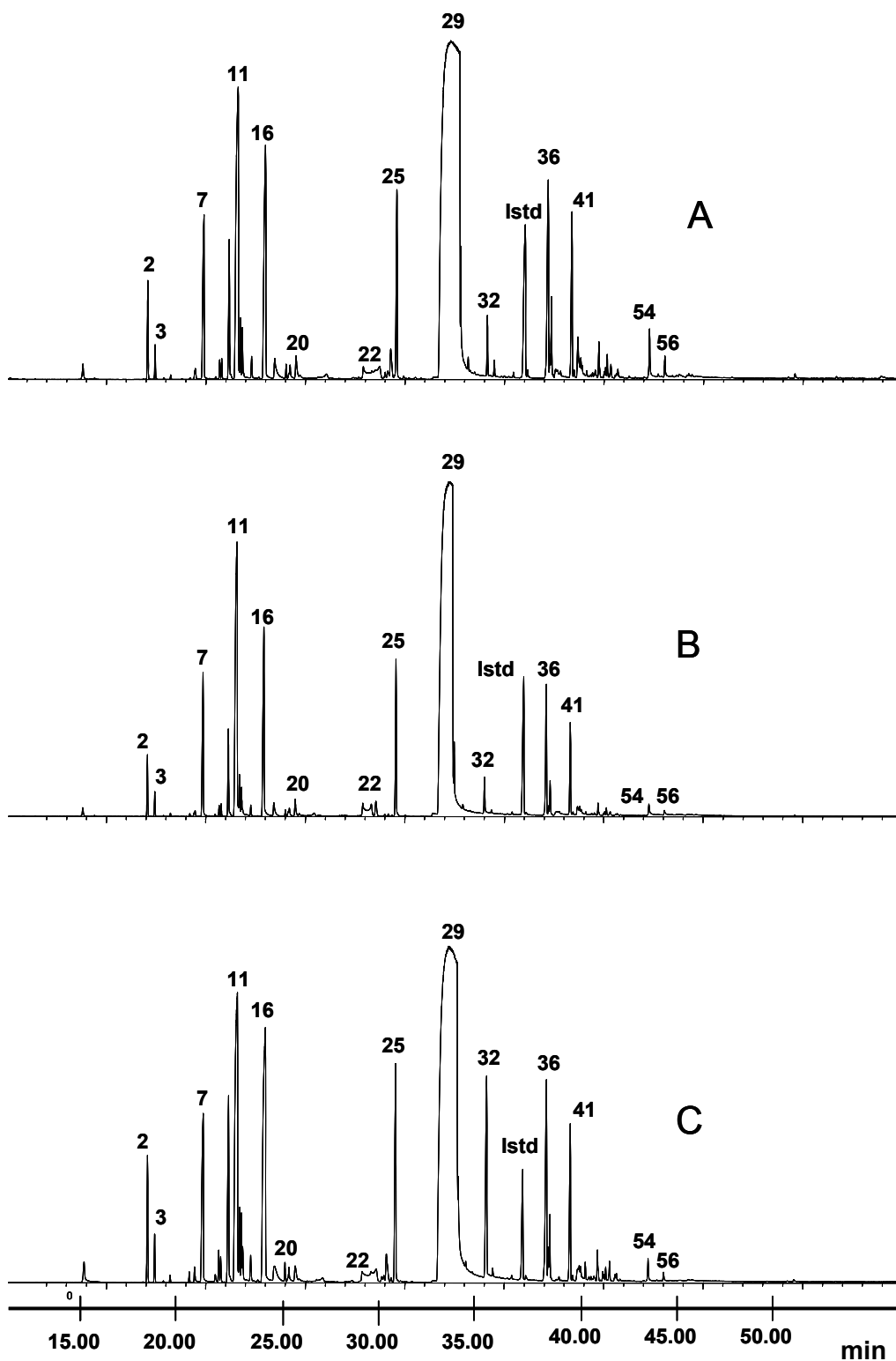


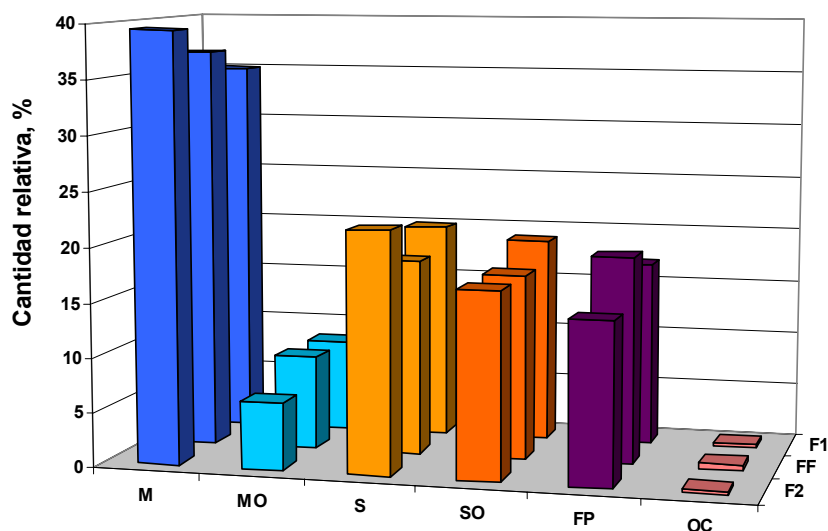
Figura 26. Perfiles cromatográficos del AE de *Lippia origanoides*, QII, en función del estado fenológico: **A.** F1; **B.** PF; **C.** F2; Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV).

Tabla 21. Cantidad relativa (%) e identificación de los componentes principales del AE y extractos de *Lippia origanoides*, Q II, extraídos en tres estados fenológicos.

Compuesto	Técnica de extracción	Cantidad relativa, % *		
		Primera floración	Post-floración	Segunda floración
α -Tujeno	MWHD	0,97 \pm 0,04	0,55 \pm 0,05	0,43 \pm 0,04
	SDE	1,1 \pm 0,2	0,65 \pm 0,05	0,48 \pm 0,02
	SFE	0,28 \pm 0,03	0,26 \pm 0,04	0,28 \pm 0,07
Mirceno	MWHD	2,2 \pm 0,2	2,84 \pm 0,05	3,1 \pm 0,3
	SDE	2,17 \pm 0,04	3,2 \pm 0,1	2,97 \pm 0,09
	SFE	1,3 \pm 0,1	1,4 \pm 0,2	1,3 \pm 0,2
<i>p</i> -Cimeno	MWHD	7,2 \pm 0,9	9,8 \pm 0,3	8,1 \pm 0,2
	SDE	7,4 \pm 0,2	8,4 \pm 0,4	8,1 \pm 0,4
	SFE	5,1 \pm 0,2	4,9 \pm 0,3	6,5 \pm 0,9
γ -Terpineno	MWHD	4,4 \pm 0,2	4,6 \pm 0,1	7,0 \pm 0,2
	SDE	4,7 \pm 0,1	4,9 \pm 0,1	6,5 \pm 0,1
	SFE	2,5 \pm 0,1	2,5 \pm 0,3	3,7 \pm 0,6
Metil timil éter	MWHD	2,25 \pm 0,09	2,6 \pm 0,5	2,7 \pm 0,1
	SDE	1,75 \pm 0,08	3,3 \pm 0,2	4,0 \pm 0,3
	SFE	1,2 \pm 0,1	2,3 \pm 0,1	1,43 \pm 0,04
Timol	MWHD	66 \pm 1	66 \pm 1	54,5 \pm 0,6
	SDE	58 \pm 1	57 \pm 1	57 \pm 1
	SFE	68 \pm 1	66 \pm 1	65 \pm 2
Carvacrol	MWHD	1,54 \pm 0,05	1,6 \pm 0,3	1,92 \pm 0,07
	SDE	1,18 \pm 0,05	1,6 \pm 0,1	1,3 \pm 0,2
	SFE	1,6 \pm 0,4	2,6 \pm 0,3	3,9 \pm 0,08
Acetato de timilo	MWHD	1,890 \pm 0,009	0,57 \pm 0,06	3,8 \pm 0,2
	SDE	1,10 \pm 0,05	1,3 \pm 0,1	1,7 \pm 0,2
	SFE	0,20 \pm 0,04	0,41 \pm 0,09	0,67 \pm 0,06
<i>trans</i> - β -Cariofileno	MWHD	3,58 \pm 0,02	2,54 \pm 0,08	3,2 \pm 0,1
	SDE	4,5 \pm 0,2	4,1 \pm 0,2	4,06 \pm 0,09
	SFE	3,4 \pm 0,5	4,4 \pm 0,3	4,8 \pm 0,5
α -Humuleno	MWHD	2,41 \pm 0,04	1,47 \pm 0,09	1,93 \pm 0,09
	SDE	2,0 \pm 0,1	2,10 \pm 0,07	2,57 \pm 0,09
	SFE	1,9 \pm 0,3	2,6 \pm 0,2	3,3 \pm 0,2

* Promedio de tres extracciones independientes, % \pm σ^*t / \sqrt{n} , n=3, t=4,30, σ =desviación estándar.

La **Figura 27** muestra, que no hubo grandes variaciones entre las familias de compuestos del QI, en función del estado fenológico. La cantidad relativa de hidrocarburos monoterpénicos disminuye en el AE con el cambio de estado fenológico, mientras los sesquiterpenos oxigenados aumentan en la segunda floración. Las cantidades relativas de monoterpénos oxigenados y fenilpropanos, incrementan hacia post-floración (**PF**) y disminuyen levemente durante la segunda floración (**F2**). Los sesquiterpenos presentaron cantidades relativas que disminuyen al final de floración.



M	: Hidrocarburos monoterpénicos	FP	: Fenilpropanos
MO	: Monoterpenos oxigenados	OC	: Otros compuestos oxigenados
S	: Hidrocarburos sesquiterpénicos	H	: Hidrocarburos lineales
SO	: Sesquiterpenos oxigenados		

Figura 27. Variación de las familias de compuestos, en los AE de *L. organoides* QI, en función del estado fenológico.

En comparación con la cantidad relativa de fenilpropanos, los demás grupos de compuestos en el QII, no fueron tan abundantes en los AE. Las cantidades de hidrocarburos monoterpénicos descendieron de 17 al 11% de la primera floración a la post-floración. La cantidad de hidrocarburos sesquiterpénicos desciende después de la primera floración y vuelve a aumentar durante la segunda (Ver **Figura 28**).

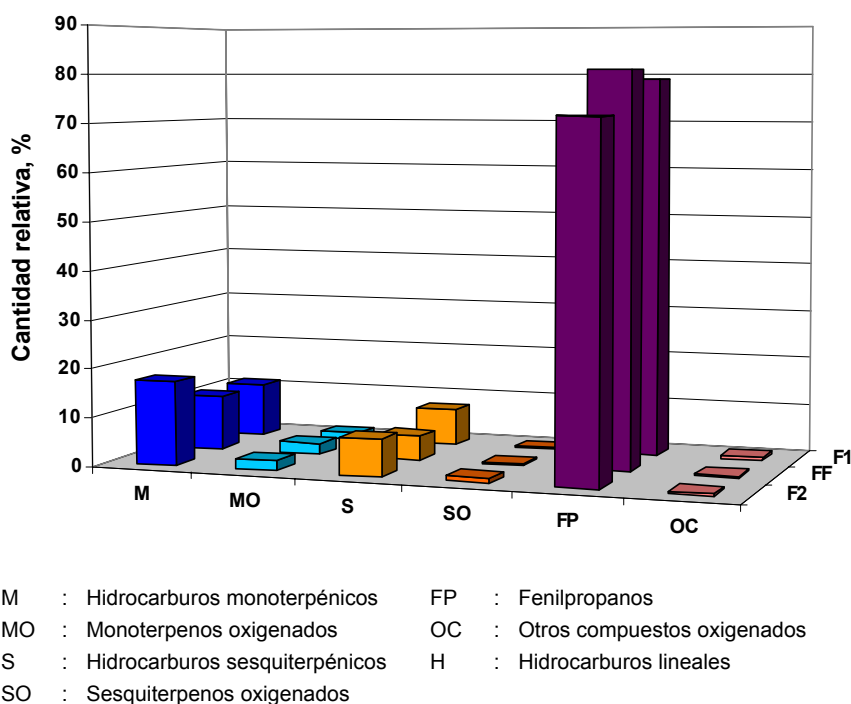


Figura 28. Variación de las familias de compuestos, en los AE de *L. organoides* QII, en función del estado fenológico.

4.5 CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS MAYORITARIOS DEL AE DE *L. organoides*.

Los compuestos mayoritarios se cuantificaron de acuerdo con la disponibilidad de sus patrones certificados. Se evaluó la repetibilidad del método de extracción. Las muestras se dividieron en tres porciones, y se conservaron en una nevera a 4°C, en bolsas Ziploc®. Cuando se utilizaron las hojas, para hacer las réplicas de extracción, éstas no presentaron daños, ni alteraciones visibles y conservaban sus acentuadas fragancias.

4.5.1 Evaluación de la reproducibilidad del método de extracción del AE, de la sumatoria de las áreas cromatográficas. La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas es muy sensible a cualquier cambio o interferencia que pueda tener una muestra. Por lo tanto, cuando se extraen los analitos, y se hace un posterior análisis, es

necesario minimizar cualquier variación o cambio que puedan intervenir en estos procesos.

Se evaluó la reproducibilidad del método de obtención de AE, usando hidrodestilación asistida por la radiación de microondas. Se pesó la misma cantidad de material vegetal de cada quimiotipo, así: 100,3±0,9 del QI y 200,1± 0,9 g del QII, se utilizó para cada extracción los mismos montajes *Clevenger* y hornos microondas. La recolección del material vegetal se realizó a la 6:30 a.m., en un día sin lluvias; la muestra se manipuló tal como se describió en la **Sección 3.3**.

Tabla 22. Coeficientes de variación de las áreas cromatográficas totales de los aceites esenciales de *L. organoides*, QI y QII.

Quimiotipo	Área		$\Sigma A_x/A_{istd}$	\bar{X}	S^c	CV, % ^d
	ΣA_x^a	A_{istd}^b				
QI	5881614758	158073497	37,21	36,92	0,7319	2,0
	6043917120	163684128	36,92			
	6046275385	165113223	36,62			
QII	4984619228	134412980	36,01	35,30	1,664	4,7
	5002527748	142062164	35,21			
	5060167710	145902465	34,68			

^aSumatoria de las áreas de todos los compuestos; ^bÁrea del patrón interno (*n*-tetradecano); ^c $S=\sigma*t/\sqrt{n}$, $t=4,303$ para el 95% de confianza.; ^d $CV=S/X$

Según las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP), los coeficientes de variación para las áreas cromatográficas no deben superar el 10% [105]. En la **Tabla 22** se presentan los valores de los coeficientes de variación de la sumatoria de las áreas correspondientes a todos los picos cromatográficos, para cada quimiotipo. Como se aprecia en la **Tabla 22**, las áreas cromatográficas presentaron coeficientes menores de 5%. Esto demuestra que la reproducibilidad del método de extracción del AE fue aceptable, lo cual se ve reflejado en los buenos análisis que se le practicaron a cada uno de los AE.

4.5.2. Cuantificación externa de cuatro compuestos mayoritarios en los AE de *L. origanoides*. En la **Tabla 23** se muestran los cambios en la cantidad de los compuestos cuantificados en las hojas de *L. origanoides*, se extrapolo su contenido para una hectárea de cultivos. Se aprecia, que las cantidades relativas de compuestos como el γ -terpineno y *p*-cimeno en el quimiotipo QI descienden en la post-floración y aumentaron durante la segunda floración, pero no se obtuvieron cantidades apreciables de éstos (1,7 y 0,24 kg/kg Ha), por la baja producción de biomasa (ca. 70 g/planta) y la baja cantidad relativa de estos en el AE (ca. 15 y 2% de *p*-cimeno y γ -terpineno respectivamente). A partir de las plantas del quimiotipo QII se pueden obtener altas cantidades de timol y γ -terpineno (hasta 114 y 8 kg/Ha, respectivamente). El timol es un compuesto de valor agregado, de partida para la síntesis del mentol, importante en la industria de alimentos, además posee propiedades biológicas interesantes e.g. antibacterial y antifúngico [106]. La especie *L. origanoides* estudiada presenta dos quimiotipos muy interesantes pues se cultiva de una forma muy sencilla y además en 70 días puede obtenerse una buena cosecha de material vegetal destinado a la extracción de AE y timol, que puede ser extraído enfriando el aceite, pues su rango de fusión es de 48-51°C [80]

4.6 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS AE OBTENIDOS.

A continuación, se muestran los resultados de tres normas exigidas por compradores y utilizadas por productores de AE, para demostrar la calidad de sus productos. Todo el conjunto de normas ISO le dan identidad a un AE, de acuerdo con su origen, planta fuente y procesos post-destilativos, e.g. rectificación. Las normas se realizaron de acuerdo con las disponibilidades de AE, materiales y reactivos requeridos para el buen cumplimiento de éstas. Los ensayos se fundamentaron en normas ISO, que se enuncian en la **Sección 3.8.** de la metodología experimental. Por lo tanto, se aplicaron estas tres normas, para de tener más criterios de identificación de los AE estudiados, junto con su perfil cromatográfico y la identificación estructural.

Tabla 23. Cuantificación de los componentes principales del AE de *L. origanoides*.

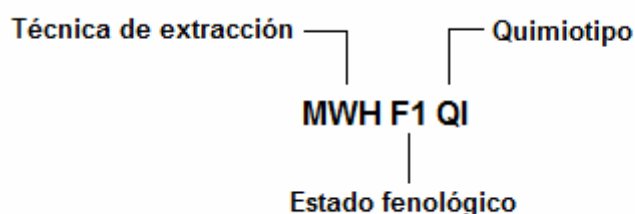
Compuesto		QI*			QII*		
		F1**	PF**	F2**	F1**	PF**	F2**
<i>p</i> -Cimeno	g/kg MV	0,56±0,06	0,72±0,09	0,68±0,06	1,15±0,04	2,2±0,1	1,30±0,06
	kg/Ha	1,4	1,6	1,7	12,5	10,8	9,3
γ -Terpineno	g/kg MV	0,080±0,009	0,087±0,006	0,096±0,006	0,70±0,08	1,02±0,06	1,12±0,09
	kg/Ha	0,20	0,17	0,24	7,6	5,1	8,1
Timol	g/kg MV	-----	-----	-----	10,6±0,2	14,5±0,4	8,7±0,5
	kg/Ha	-----	-----	-----	114,3	72,5	62,9
<i>trans</i> - β -Cariofileno	g/kg MV	0,22±0,01	0,33±0,01	0,31±0,03	0,57±0,03	0,56±0,02	0,51±0,04
	kg/Ha	0,56	0,64	0,78	6,2	2,8	3,7

*QI y QII representan los quimiotipos I y II respectivamente.

**F1, FF y F2 representan la primera floración, post-floración y la segunda floración respectivamente.

MV representa material vegetal.

Con el propósito de clasificar los aceites esenciales, se adoptó la siguiente nomenclatura, para nombrarlos:



Según los datos mostrados en la **Tabla 24**, las propiedades fisicoquímicas de los AE obtenidos de las plantas en diferentes estados fenológicos no presentaron variaciones significativas, pero si hay diferencias apreciables con el cambio de quimiotipo. La densidad encontrada para el AE del QII se puede explicar con base en la densidad del timol, que es ca. 0,972 g/mL [79], ya que éste representa mas del 50% del aceite. La solubilidad en etanol se expresa como el volumen de solución etanol-agua de cierta concentración (% p/p) necesario para solubilizar un mililitro de AE, sin que se presente opalescencia [93]. Por lo tanto, se observa que el AE del QII es más soluble en etanol, que el del QI, por la presencia de fenilpropanos

en una cantidad mayor. El AE obtenido a partir del QII, en cambio, es rico en monoterpenos y sesquiterpenos (**Figura 32**), que son poco solubles en solventes polares.

Tabla 24. Propiedades fisicoquímicas de los aceites esenciales de *L. organoides*.

Código AE	Densidad (g/mL) (20°C)	Índice de refracción (20°C)	Solubilidad en etanol, %				
			55 (mL)	65 (mL)	75 (mL)	85 (mL)	95 (mL)
MWHF1QI	0,871±0,003	1,481±0,001	-----	>4,0	>2,4	>2,0	>1,5
MWHF1QII	0,950±0,003	1,511±0,001	>3,6	>2,5	>1,3	>1,0	>0,4
MWHFFQI	-----	1,482±0,001	-----	>4,5	>2,4	>2,0	>1,5
MWHFFQII	0,948±0,004	1,510±0,002	>3,8	>2,7	>1,2	>1,0	>0,5
MWHF2QI	0,869±0,002	1,482±0,001	-----	>4,3	>2,3	>1,8	>1,4
MWHF2QII	0,949±0,002	1,509±0,001	>3,5	>2,7	>1,2	>1,0	>0,5

5. CONCLUSIONES

El estudio comparativo de dos quimiotipos de *L. origanoides* permitió establecer similitudes y diferencias en aspectos agronómicos y fenológicos, principalmente desde el análisis de sus metabolitos secundarios. La reproducción de *L. origanoides* mediante esquejes permitió altos porcentajes de rebrote (78 y 91% para QI y QII, respectivamente). El rendimiento de la extracción de AE dependió del estado fenológico de la planta y alcanzó su mayor valor (0,51 y 2,2% para QI y QII respectivamente) en la post-floración. Durante los periodos fenológicos estudiados, la producción de biomasa más baja se observó en la post-floración (70 y 180 g/planta, para QI y QII, respectivamente).

La aplicación de criterios cromatográficos y espectroscópicos permitió identificar el 80% de los metabolitos secundarios detectados en los AE y extractos de ambos quimiotipos de *L. origanoides* (123 y 81 compuestos para QI y QII, respectivamente). Los hidrocarburos monoterpénicos fueron los más abundantes en las fracciones aisladas del quimiotipo QI (35% en el AE, 34% en el extracto SDE y 14,7% en el extracto SFE). En contraste, en el quimiotipo QII, la familia de compuestos mayoritaria fue la de los fenilpropanoides (79% en el AE, 70% en el extracto SDE y 77% en los extractos SFE).

Se realizaron las fichas técnicas de los AE de *L. origanoides*, quimiotipos QI y QII, de acuerdo con las normas ISO, como otro criterio más de identidad de éstos. Se encontró que el AE del quimiotipo QII fue más denso, su índice de refracción fue mayor y es más soluble en soluciones etanólicas que el del quimiotipo QI.

De acuerdo con la cuantificación realizada, las cantidades de compuestos presentes en el quimiotipo QI no son altas: *p*-cimeno (ca. 1,7 kg/Ha); γ -terpeneno (ca. 0,24 kg/Ha) y *trans*- β -cariofileno (ca. 0,78 kg/Ha). De otro

lado a partir del quimiotipo QII se pueden obtener altas cantidades de los compuestos cuantificados: timol (ca. 114 kg/Ha), *p*-cimeno (ca. 12 kg/Ha), γ -terpineno (ca. 8,1 kg/Ha) y *trans*- β -cariofileno (ca. 6,2 kg/Ha). Estas cantidades fueron notablemente afectadas, por el estado fenológico de la planta, siendo más altas durante las floraciones.

6. RECOMENDACIONES

Se recomienda extender los cultivos de *Lippia origanoides* y realizar extracciones de su AE a escala industrial.

Se recomienda realizar la evaluación organoléptica del AE de *Lippia origanoides* quimiotipo QI, pues posee un agradable aroma que podría ser aprovechado en varias aplicaciones perfumísticas.

Se recomienda nombrar los quimiotipos estudiados de acuerdo con los compuestos mayoritarios presentes, a saber: Quimiotipo “*p*-cimeno” y Quimiotipo “timol”.

7. BIBLIOGRAFÍA

[1] DOS SANTOS, J.; LOPES D., J.; CITO, G.L., DE OLIVEIRA, E.H., LIMA, S.G., and REIS, F.A. Composition and Biological Activity of Essential Oils from *Lippia organoides* H.B.K. *J. Essent. Oil Res*, **2004**, 16, pp. 504-506.

[2] PIZZALE R. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oils of Different Botanical Origin. *Universita Degli Studi di Udine*, **1998**, 12, pp. 6-9.

[3] STASHENKO, E., PUERTAS, M., and COMBARIZA, M. Volatile secondary metabolites from *Spilanthes americana* obtained by simultaneous steam distillation-solvent extraction and supercritical fluid extraction. *J. Chromatogr. A*, **1996**, 752, pp. 223-232.

[4] PASCUAL, M., SLOWING, K., CARRETERO, E., SÁNCHEZ MATA, D., and VILLAR R. *Lippia*: Traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *J. Ethnopharmacol.*, **2001**, 76, pp. 201-214.

[5] HAMMER, K. A., CARSON, S. F., and RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plants extracts. *J. Applied Microbiol.*, **1999**, 86, pp. 985-990.

[6] CELIS, C. N. Estudio comparativo de la composición y la actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de *Lippia alba*, *Lippia organoides* y *Phyla dulcis*, especies de la familia *Verbenaceae*. Tesis de Grado, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, **2007**, 153p.

- [7] LAMBERT R. J., SKANDAMIS, P. N., COOTE, P. J., and NYCHAS, G. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Applied Microbiol.*, **2001**, 91, pp. 453-462.
- [8] ROJAS, J., MORALES, A., MARQUEZ, A., RONDON, M., VERES, K and MATHE, I. Comparative study of the chemical composition of the essential oil of *Lippia oreganoides* collected in two different seasons in Venezuela. *Nat. Prod. Commun.* **2006**, 1 (3), pp. 205-207.
- [9] CASTAÑEDA, M.L. Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas colombianas. Tesis de Grado, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, **2007**, 166 p.
- [10] BAGAMBOULA, C. F., UYTENDAELE, M., and DEBEVERE, J. Inhibitory Effect of Thyme and Basil Essential Oils, Carvacrol, Thymol, Estragol, Linalool and *p*-Cymene towards *Shigella sonnei* and *S. Flexner*. *Food Microb*, **2004**, 21, pp. 33-34.
- [11] De MAYO, P. The chemistry of natural products. Volumen II: Mono- and sesquiterpenoids. New York: Interscience Publishers, **1959**, pp. 1-6, 33-178, 180-238.
- [12] TISSERAND, B., BALACS, T., and CLOWELL, J. Essential oil safety, a guide for health care professionals. London: Churchill Livingstones. **1999**, pp. 120-190.
- [13] BANDONI, A. (Ed)., Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. La Plata: Red de Editoriales Universitarias, **2000**, p.p.29, 154-164, 197-232.

- [14] RANDRIANALIJAONA, J-A., RAMANOELINA, P., RASOARAHONA, J., and GAYDOU, E.M. Seasonal and chemotype influences on the chemical composition of *Lantana camara* L. Essential oils from Madagascar. *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 545, pp. 46-52
- [15] STASHENKO, E. Obtención, modificación y caracterización espectrocópica de aceites esenciales colombianos. IV Congreso Colombiano de Fitoquímica, Bucaramanga, Colombia, **1996**. Resúmenes, pp. 29-53.
- [16] mail.fq.edu.uy/~planta/pdf/FarmacognosiaPE80/bolilla4.pdf. Aceites Esenciales. Fecha de consulta: 15 de diciembre de 2006.
- [17] GÜENTER, E., The essential oils. New York: Ed. Van Nostrand, **1948**, Vol 1. 1, pp. 427, 500-504, 744-755.
- [18] MUÑOZ, F. Plantas Medicinales y aromáticas, estudio, cultivo y procesado. Madrid: Ed. Mundi Prensa, **1987**, 365 p.
- [19] SANDRA P., and BICCHI, C. Capillary gas chromatography in essential oil analysis. New York: Huethig Verlag, **1987**, p. 120.
- [20] STASHENKO, E., QUIROZ, N., and MARTINEZ, J.R. HRGC/FID/NPD and HRGC/MSD Study of Colombian ylang-ylang (*Cananga odorata*) oils obtained by different extraction tecmniques. *J. High Resol. Chromatogr.*, **1996**, 19, pp. 353-358.
- [21] LAWRENCE, B.M., Essential Oils 1976-1978. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation, **1976**. p.p. 8, 23.
- [22] MARRIOTT, P.J., SHELLIE, R., and CORNWELL, C. Gas Chromatographic Technologies for the Analysis of Essential Oils. *J. Chromatogr. A*, **2001**, 936, pp. 1-22.

[23] EYRES, G., MARRIOTT, P., and J., DUFOUR, J. P. The combination of gas chromatography-olfatometry and multidimensional gas chromatography for the characterisation of essential oils. *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1150, pp.70-77.

[24] www.humboldt.org.co/biocomercio. Estudio del mercado nacional de aceites esenciales. Fecha de consulta: marzo 24 de 2007.

[25] EU Market Brief 2005. [Sitio en internet]. Disponible en: www.cbi.nl. Fecha de consulta: marzo 24 de 2007.

[26] Marketing manual and web directory for organic spices, herbs and essential oils. [Sitio en internet]. Disponible en: www.intracen.com. Fecha de consulta: 24 de marzo de 2007.

[27] The United Nations Conference on trade and Development. [Sitio en internet]. Disponible en: www.biotrade.org/docs/biotradebrief-crescentiacujete.pdf. Fecha de consulta: 24 de marzo de 2007.

[28] Essential oil and oleoresins. [Sitio en internet]. Disponible en: www.intracen.com. Fecha de consulta: 24 de febrero 2008.

[29] Análisis de la tendencia del mercado internacional de aceites esenciales. [Sitio en internet]. Disponible en: www.exportar.org.ar/publicaciones/aceitesesenciales.pdf Fecha de consulta: 24 de marzo de 2007.

[30] Tropical Products: World Market and Trade. [Sitio en internet]. Disponible en: www.fas.usda.gov/psdonline/circulars/tropical.pdf. Fecha de consulta: 24 de febrero 2008.

[31] RODRÍGUEZ, D. A. y SANABRIA, M. A. Efecto del extracto de tres plantas silvestres sobre la rizoctoniosis, la mancha sureña del maíz y los patógenos que la causan. *Interciencia*, **2001**, 30, (12), pp. 739-744.

[32] Gel y fungicida con base en timol. [Sitio en internet]. Disponible en: www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/apicola/nati0401.pdf. Fecha de consulta: 24 de febrero de 2008.

[33] BOARD, N. The complete technology book of essential oils (aromatic chemicals). New Delhi: Asia Pacific Business Press Inc, **2005**, pp. 526-533.

[34] Essential oils proceses and formulation hand book. New Delhi: Enginers Indian Research Institute. **2005**, pp. 205.

[35] Directorio internacional de empresas. [Sitio en internet]. Disponible en: www.kompass.es. Fecha de consulta: 24 de febrero 2008.

[36] STASHENKO, E., CERVANTES, M., COMBARIZA, M. Y., and MARTINEZ J. HRGC/FID and HRGC/MSD Análisis of the secondary metabolites obtained by different extraction methods from *Lepechinia schiedeana* and *in vitro* evaluation of its antioxidant activity. *J. High Resol. Chromatogr.*, **1999**, 22, pp. 343-349.

[37] PARÉ, J. R. J. European Patent Application 0485668A1., **1992**.

[38] STASHENKO, E., JARAMILLO, B., and MARTÍNEZ, J. Comparison of Different Extraction Methods for the analysis of Volatile Secondary Metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, Grown in Colombia and Evaluation of its *in vitro* Antioxidant Activity. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1025, pp. 93-103.

[39] TSARKOVA, T. Desarrollo de la técnica de extracción de metabolitos secundarios de plantas aromáticas utilizando la radiación de microondas. Tesis de maestría. Escuela de Química. Universidad Industrial de Santander, **2007**, p.p. 27-31.

- [40] CRAVEIRO, A., MATOS, F. J., ALENCAR, J. W., and PLUMEL, M. Microwave oven extraction of essential oil. *Flavour Fragr. J.*, **1989**, 4, pp. 43-44.
- [41] GODEFROOT, M., SANDRA P., and VERZELE, M. New method for quantitative essential oil analysis. *J. Chromatogr*, **1981**, 203, pp. 203-325.
- [42] LIKENS, S. T., and NICKERSON, G. B. Detection of certain hop oil constituents in brewing products, en: SANDRA P. and BICCHI, C. Capillary gas chromatography in essential oil analysis. New York: Huethig Verlag, **1987**. p. 89.
- [43] GOMES, P., MATA, N.G. and RODRIGUES, A.E. Production of rose geranium oil using supercritical fluid extraction. *J. Supercritical Fluids*. **2007**, 41, pp. 50-60.
- [44] BRAITHWAITE, A., and SMITH, F. J. Chromatographic methods. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, **1999**, pp. 1-14.
- [45] CRUZ J.F., JÄRVENPÄÄ, E.P., HUOPALAHTI, R., and SIVIK, B. Comparison of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. Oils from Mozambique as obtained by hydrodistillation and supercritical carbon dioxide extraction. *J. Agric. Food. Chem.* 49, **2001**, pp. 2339-2342.
- [46] BRAGA, M., EHLERT, P., MING, L. C., and MEIRELES, M.A. Supercritical fluid extraction from *Lippia alba*: global yields, kinetic data, and extract chemical composition. *J. Supercrit. Fluids*, **2005**, 34, pp. 149-156.
- [47] JENNINGS, W., MITTFELDLT, E., and STREMPLE, P. Analytical gas chromatography. San Diego: Academic Press, **1987**, pp. 1-287.

[48] KELLNER, R., MERMET, J. M., OTTO, M., VALCARCEL, M., and WIDMWER, H.M. (Ed). Analytical Chemistry. Berlín: Willey-VCH, Verlag GmbH & Co. **2004**, pp.407-409; 554, 823-825; 867.

[49] J&W. US Patent N° 4,006,860 4,265,860

[50] STASHENKO, E., ACOSTA, R. and MARTINEZ, J. R. High resolution gas chromatographic analysis of the secondary metabolites obtained by subcritical-fluid extraction from Colombian rue (*Ruta graveolens* L.). *J. Biochem. Biophys. Methods.*, **2000**, 43, pp. 379-390.

[51] DOMÍNGUEZ, X. A. Métodos de investigación fitoquímica. México D.F.: Ed. Limusa, **1988**, pp. 45-66.

[52] McNAIR, H. and MILLER, J. M. Basic gas chromatography. New York: John Willey & Sons, **1998**, pp. 1-9.

[53] GROB, R. L. Modern practice of gas chromatography. New York: John Willey & Sons, **1995**, pp. 1-44.

[54] De HOFFMANN, E. and STROOBANT, V. Mass spectrometry, principles and applications. Manchester: John Willey & Sons, **2005**, pp. 1-9; 183-186.

[55] PALACIOS, E. E. Economía y plantas medicinales. Universidad Mayor de San Marcos. CSI, Boletín 52. **2002**, pp. 28-31.

[56] TAIZ, L., and ZEIGER, E. Plant Physiology. Boston: Sinauer Associates, **2002**, p.p. 171-175.

[57] AZCÓN-BIETO, J. y TALÓN M. Fundamentos de fisiología vegetal. Barcelona: McGraw-Hill Interamericana, **2000**, 622p.

- [58] HABERMEHL, G. G. Secondary and tertiary metabolites as plants toxins. *Toxicon*, **1998**, 36, (11), pp. 1707-1719.
- [59] PICHERSKI, E. and GANG, D. R. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends Plant. Sci.*, **2000**, 5, (10), pp. 439-445.
- [60] IKAN, R. Natural products, a laboratory guide. San Diego: Academic Press. **1991**, pp. 168-174.
- [61] McGIMPSEY, J. A., DOUGLAS, M. H., van KLINK, J. W., BEAVREGARD, D.A., and PERRY, N.B. Seasonal variation in essential oil yield and composition from naturalized *Thymus vulgaris* L. in New Zealand. *Flavour Fragr. J.*, **1994**, 9, pp. 347-352.
- [62] RICCIARDI, G. y RICCIARDI, A. Efecto de las Variaciones Estacionales sobre la Composición Química del Aceite Esencial de Plantas de "Salvia morada" de Sáenz Peña (Chaco). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura-UNE. [Sitio en Internet] Disponible en: www.unne.edu.ar. Fecha de consulta: 15 de diciembre de 2006.
- [63] OLIVEIRA D.N., LEITAO G.G., BIZZO H.R., LOPES, D., ALVIANO, C.S., ALVIANO, D.S., and LEITAO, S.G. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* H.B.K. *Food Chem.*, **2007**, 101, (1), pp. 236-240.
- [64] MAIA, J. S., da SILVA, M. H., ANDRADE, E. H., and CARREIRA, L.M. Essential oil variation in *Lippia glandulosa* Schauer. *J. Essent. Oil Res*, **2005**, 17, (8), pp. 676-680.
- [65] VILJOEN, A. M., SUBRAMONEY, S., van VUUREN, S. F., BASER, K.H., and DEMIRCI, B. The composition, geographical variation and antimicrobial activity of *Lippia javanica* (*Verbenacea*) leaf essential oils. *J. Ethnopharmacol.*, **2005**, 96, pp. 271-277.

- [66] FONT QUER. P. Plantas medicinales, El Dioscórides renovado. Madrid: Ed. Labor S.A., **1993**, p. 634.
- [67] GARCÍA, B. H. Flora Medicinal de Colombia, Botánica Médica. Tomo II . 2ª ed, Bogotá: Ed. Tercer Mundo, **1992**, pp. 508-509, 495.
- [68] CRAVEIRO A., ALENCAR, J., MATOS, J., ANDRADE, C.H., and MACHADO, M.I. Essential oils from Brazilian Verbenaceae. Genus *Lippia*. *J. Nat. Prod.*, **1981**, 44, (5), pp. 598-601.
- [69] HERNÁNDEZ, T., CANALES, M., AVILA J.G., DURAN, A., CABALLERO, J., ROMO DE VIVAR, A., and LIRA, R. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). *J. Ethnopharmacol*, **2003**, 88, pp. 181-188.
- [70] VOGEL, H. Boletín de plantas medicinales y aromáticas. Santiago: Fundación para la innovación agraria. **2003**, pp. 4-5.
- [71] ROSSI, J.P. y DELFINO, J.M. Cienciometría, instrumentos de evaluación y crítica. *Ciencia hoy en línea*. Universidad de buenos aires. **2005**. [Sitio en internet]. Disponible en: www.cienciahoy.org.ar/ln/hoy89/cienciometria.htm. Fecha de consulta: 24 de febrero de 2008.
- [72] ARAUJO, J.A. y ARENCIBIA, R.J. Informetría, bibliometría y Cienciometría: aspectos teórico-prácticos. **2002**. [Sitio en Internet]. Disponible en: bvs.sld.cu/revistas/aci/vol10_4_02/aci040402.htm. Fecha de consulta: 24 de febrero de 2008.
- [73] ALBESIANO, S., RANGEL-CH, J., y CADENA A. La vegetación del Cañon del Rio Chicamocha (Santander, Colombia). *Caldasia*, **2003**, 25 (1), pp. 74-75.

- [74] KRUK, I., MICHALSKA, and T., LICHSZTELD, K.. The effect of thymol and its derivatives on reactions generating reactive oxygen species. *Chemosphere*, **2000**, 41, pp. 1059-1064.
- [75] MORAIS, A., MOURÃO, J. C., GOTTLIEB, O., *et. al.* Óleos essenciais da Amazonia contendo timol. *Acta Amazonica*, **1972**, 2, (1), pp. 45-46.
- [76] GALLINO, M. Una *Verbenaceae* essenciera ricca in timolo: *Lippia organoides* H.B.K. *Essenza Deriv. Agrum.*, **1987**, 57, pp. 628-629.
- [77] DURAN, G., y GARCIA, I. La Especie Caprina y el Ecosistema Pastizal Espinar en el Valle Baragua-Estado Lara. *Vet. Trop.*, **1981**, 6, pp. 9-12.
- [78] GUEVARA , R., ROSALES, J. y SANOJA, E. Vegetación pionera sobre rocas, un potencial biológico para la revegetación de áreas degradadas por la minería de hierro. *Interciencia*, **2005**, 30, (10), pp. 644-652.
- [79] SVICERV, A.M., SMIYH, R.J., ZHOU, T., HERNADEZ, M., LIU, W. y CHU, C.L. Effects of thymol fumigation on survival and ultrastructure of *Mollinia fruticosa*. *Postharvest Biology and Technology*. 45, **2007**, pp. 228-233.
- [80] BURDOCK, G.A. Fenaroli's handbook of flavor ingredients. 5 ed. Boca Ratón: CRC Press, **2005**. 502p.
- [81] FLEISHER, A. and SNEER, N. Oregano spices and *Origanum* chemotypes. *J. Sci. Food Agric.*, **1982**, 33, pp. 441-448.
- [82] KOKKINI, S. Taxonomy diversity and distribution of *Origanum* species, en: PADULOSI, S., Oregano. Roma: International Plant Genetic Resources Institute, **1997**, pp. 7-11.

[83] MOCKUTE, D., GENOVAITE, B. and JUDZENTIENE, A. The essential oil of *Origanum vulgare* L. ssp. *Vulgare* growing wild in Vilnius district (Lithuania). *Phytochem.*, **2001**, 57, pp. 65-69.

[84] MONTEIRO, M.A., ROCHA DE MELO, and A.K., MEDEIROS, L. Topical and anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves. *J. Ethnopharmacol.*, **2007**, 111, pp. 378-382.

[85] LAHLOU, M. Methods to Study the Phytochemistry and Bioactivity of Essential Oils. *Phytother. Res.*, **2004**, 18, pp. 435-438.

[86] Thymol. [Sitio en internet]. Disponible en: www.bio.chemtek.com/thymol. Fecha de consulta: 15 diciembre de 2006.

[87] AYDIN, S., BASARAN, A. A. and BASARAN, N. The effects of thyme volatiles on the induction of DNA damage by the heterocyclic amine IQ and mitomycin C. *Genetic Toxicol. Environmen. Mutagenesis*, **2005**, 581, pp. 43-53.

[88] DURAN, D.C. Estudio del aceite esencial de *Lippia alba* (Fam. *Verbenaceae*) y de los aspectos fisiológicos en diferentes etapas de su crecimiento bajo tres niveles de luz. Tesis de Grado, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, **2005**, 122 p.

[89] KOVÀTS, E. Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. *Advan. Chromatogr.*, **1965**, 1, pp. 229-247.

[90] JENINGS, W. Analytical Gas Chromatography. San Diego: Academic Press, **1987**, 259 p.

[91] ADAMS, R. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4 ed, Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation, **2007**, 804 p.

[92] MILLER, J.C., y MILLER, J.N. Estadística para química analítica. 2ed. Wilmington: Addison-Wesley Iberoamericana. **1993**, pp. 20-28.

[93] Norma ISO 279: **1998**(E) Essential oils. Determination of relative density at 20°C.

[94] Norma ISO 875: **1999**(E) Essential oils. Evaluation of miscibility in ethanol.

[95] Norma ISO 280: **1998**(E) Essential oils. Determination of refractive index at 20°C.

[96] SENATORE, N.S. Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in campania (southern Italy). *J. Agric. Food Chem.* **44**, **1996**, pp. 1327-1332.

[97] SANGWAN, N.S., FAROOQI, A.H., SHABIH, F. and SANGWAN, R.S. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regul.* **34**, **2001**, pp. 3-21.

[98] TERBLANCHÉ, F.C. and KORNELIUS, G. Essential oils constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae)-A literature review. *J. Essent. Oil Res.* **8**, **1996**, pp. 471-485.

[99] BARTAK, P., FRNKOVÁ, P. and CAP, L. Determination of phenols using simultaneous steam distillation-extraction. *J. Chromatogr. A.* **867**, **2000**, pp. 281-287.

[100] BLANCH, G.P., REGLERO, G. and HERRAIZ, M. Rapid extraction of winw aroma compounds using a new simultaneous distillation –solvent extraction device. *Food Chem.* 56 (4), **1996**, pp. 439-444.

[101] EDRIS, A.M., JIROVETZ, L., BUCHBAUER, G., DENKOVA, Z., STOYANOVA, A. and SLAVCHEV, A. Chemical composition, antimicrobial activities and olfative evaluation of a *Salvia officinalis* L. (Sage) essential oil from Egypt. *J. Essent. Oil Res.* 19, **2007**, pp. 288-291.

[102] JIROVETZ, L., BUCHBAUER, G., SCHMIDT, E., STOYANOVA, A.S., DENKOVA, Z., NIKOLOVA, R., and GEISLER, M. Purity, antimicrobial activities and olfactic evaluations of geraniol/nerol and various of their derivatives. *J. Essent. Oil Res.* 19, **2007**, pp. 288-291.

[103] HARBORNE, J.B., and BAXTER, H. Phytochemical dictionary. A handbook of bioactive compounds from plants. London: Taylor and Francis. **1993**, p. 383

[104] HUDAIB, B. M., SPERONT, E., DI PIETRA, A. M., and CAURINI, V. GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29, **2002**, pp. 691-700.

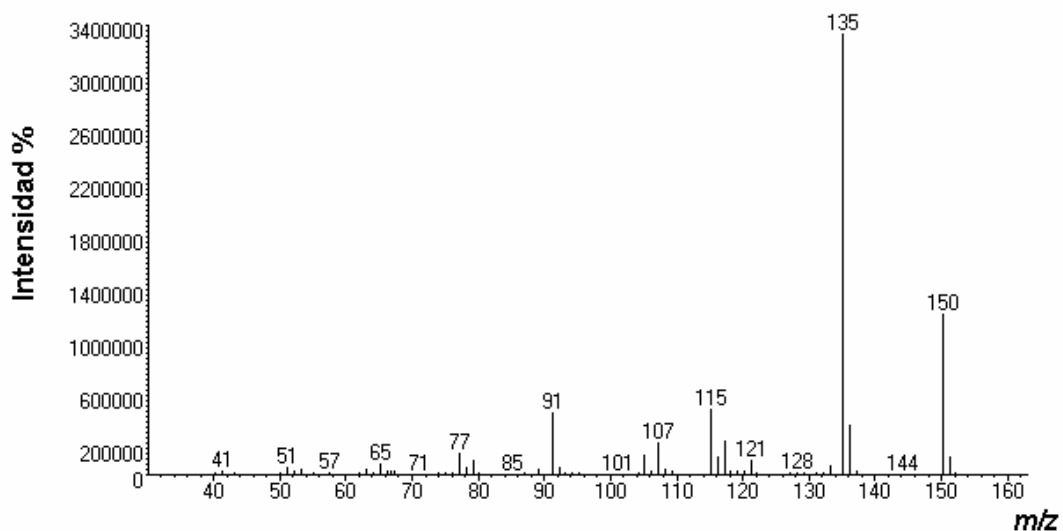
[105] GARNER, W., BARGE, M., and USSURY, J. Good laboratory practice standars. Washington D. C. : ACS Professional Reference Book, **1992**, 321 p.

[106] BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Inter. J. Food Microbiol.* 94, **2004**, pp. 223-254.

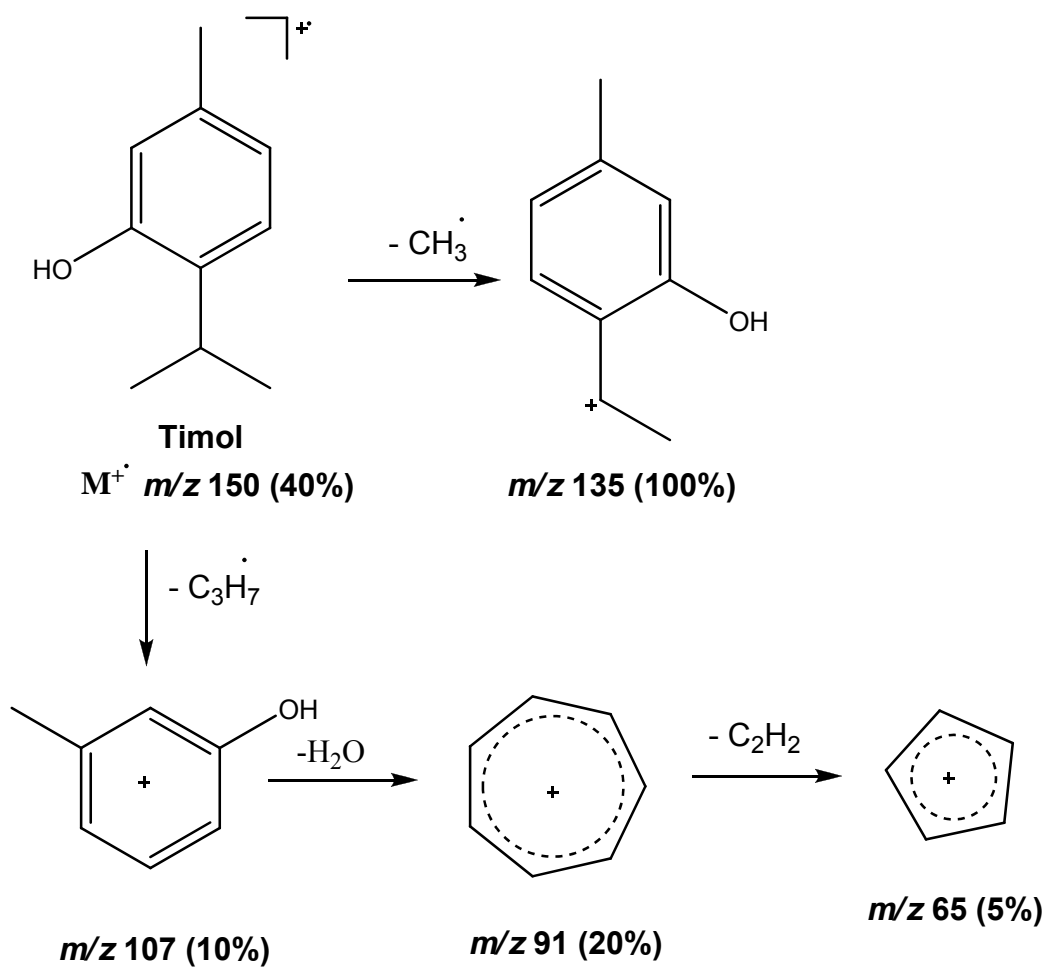
ANEXOS

Anexo 1. Rutas de fragmentación de los compuestos mayoritarios del AE
de *L. origanoides*.

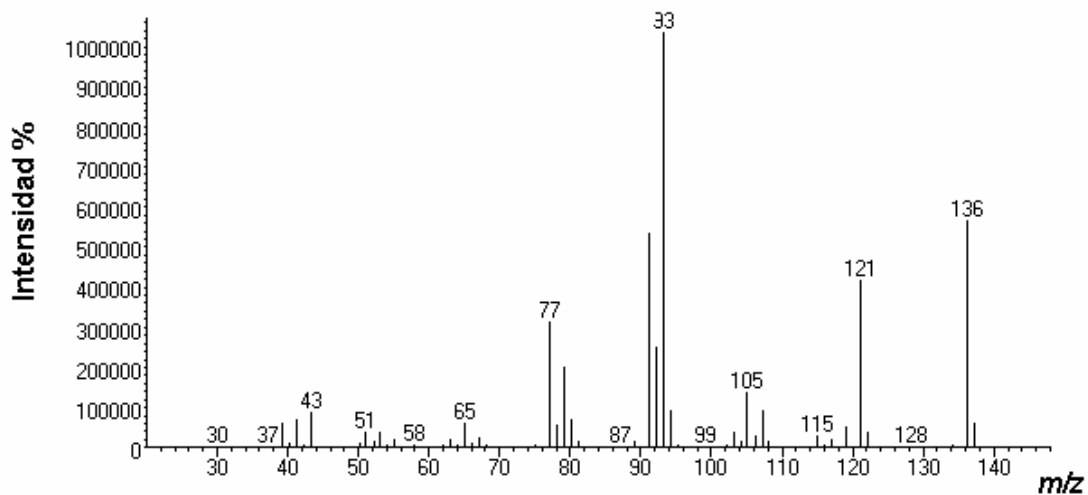
Anexo 1 – Figura 1. Espectro de masas del timol (EI, 70 eV).



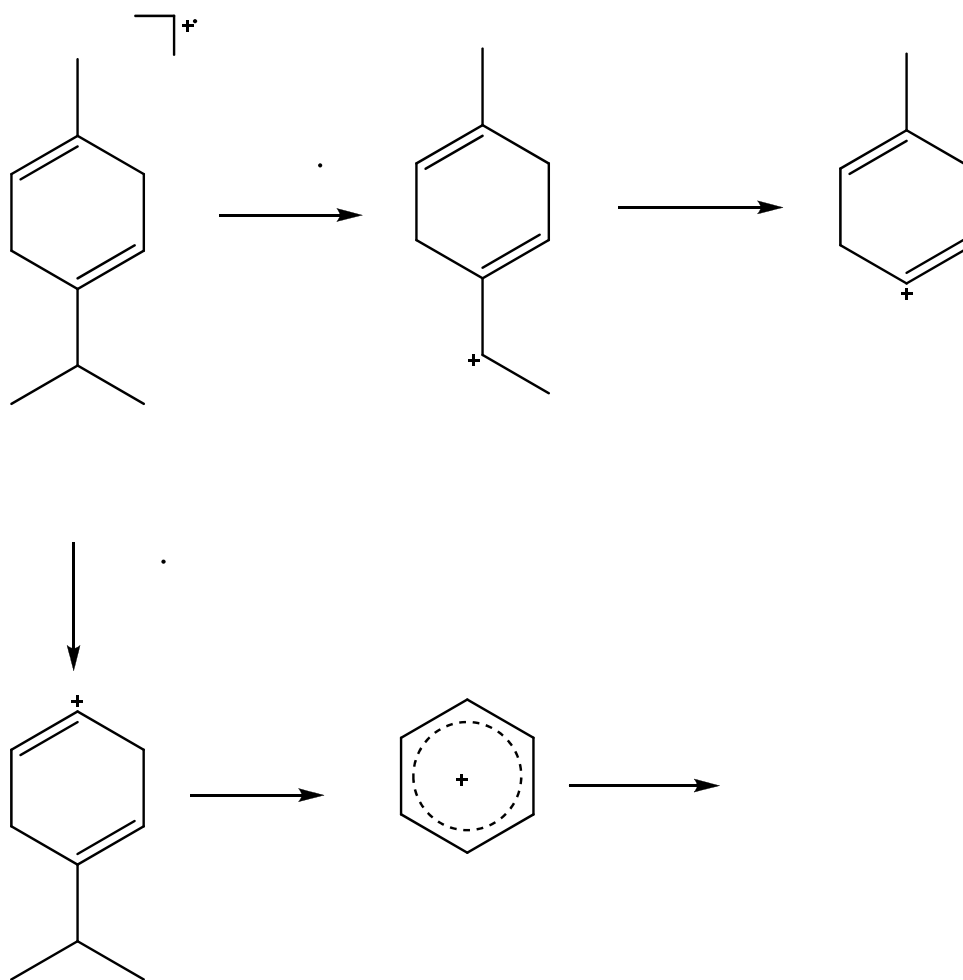
Esquema 1. Posibles rutas de fragmentación del timol.



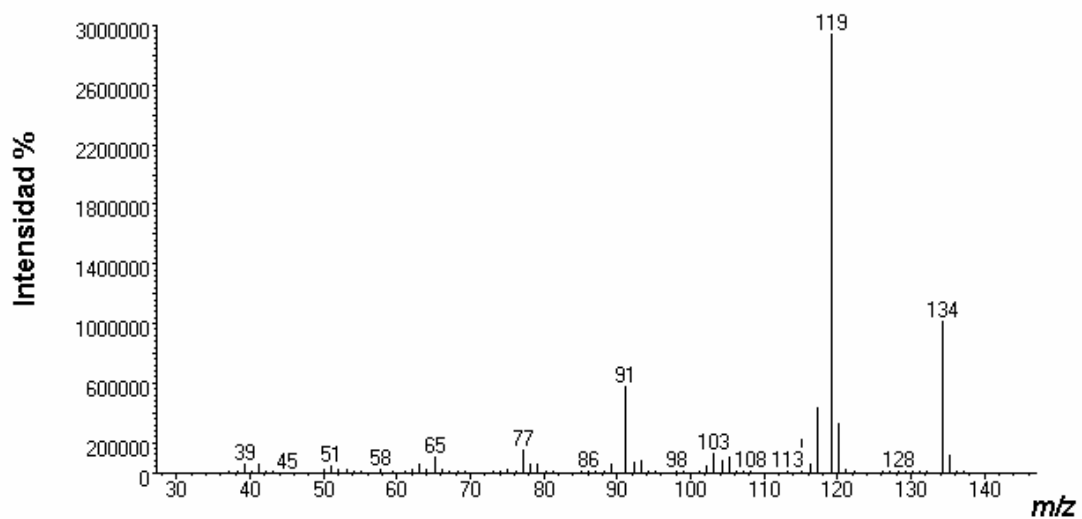
Anexo 1 – Figura 2. Espectro de masas del γ -terpineno (EI, 70 eV).



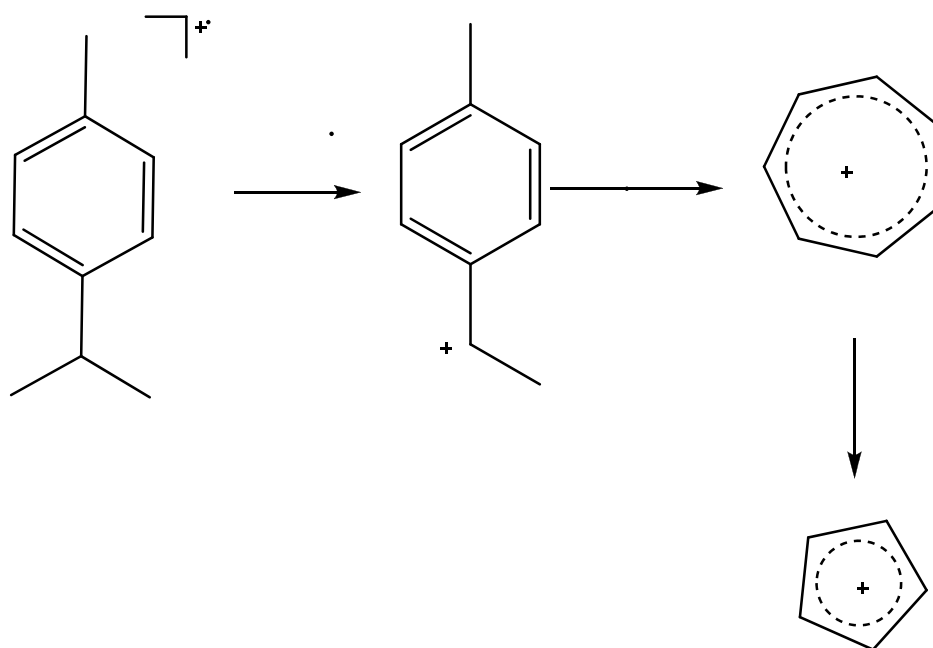
Esquema 2. Posibles rutas de fragmentación del γ -terpineno.



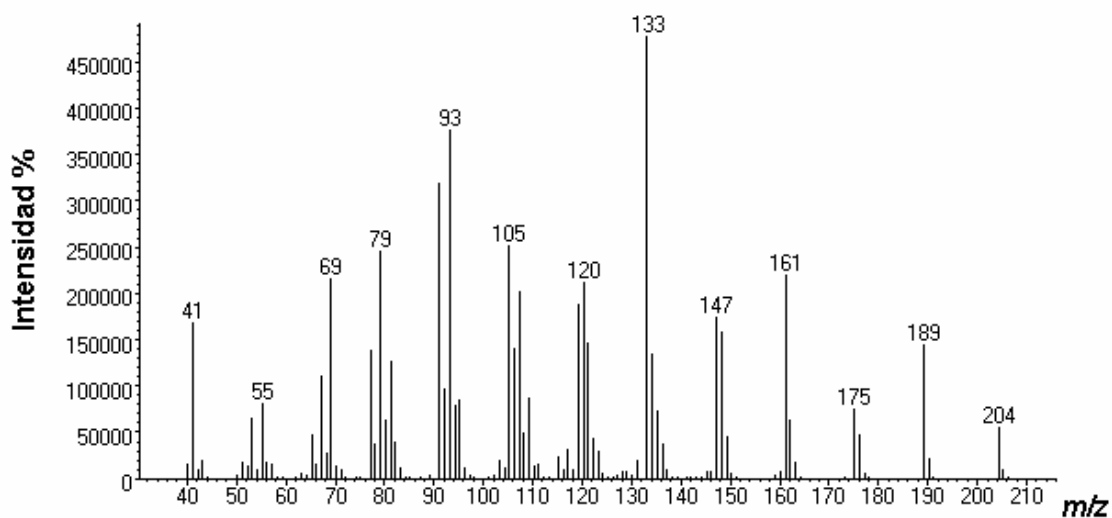
Anexo 1 – Figura 3. Espectro de masas del *p*-cimeno (EI, 70 eV).



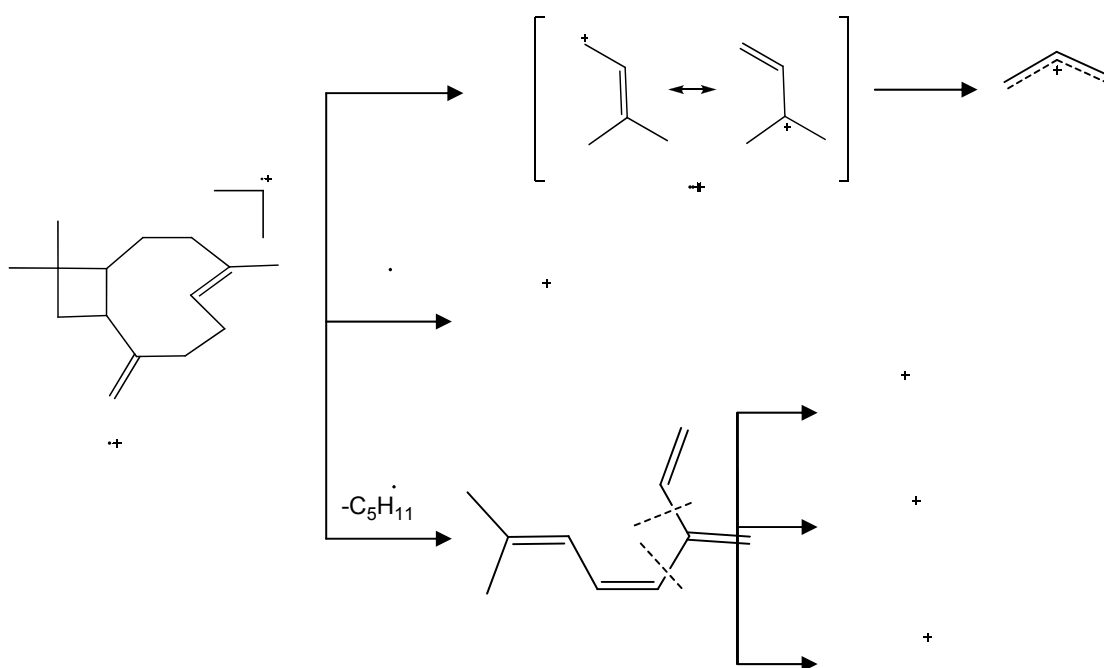
Esquema 3. Posibles rutas de fragmentación del *p*-cimeno.



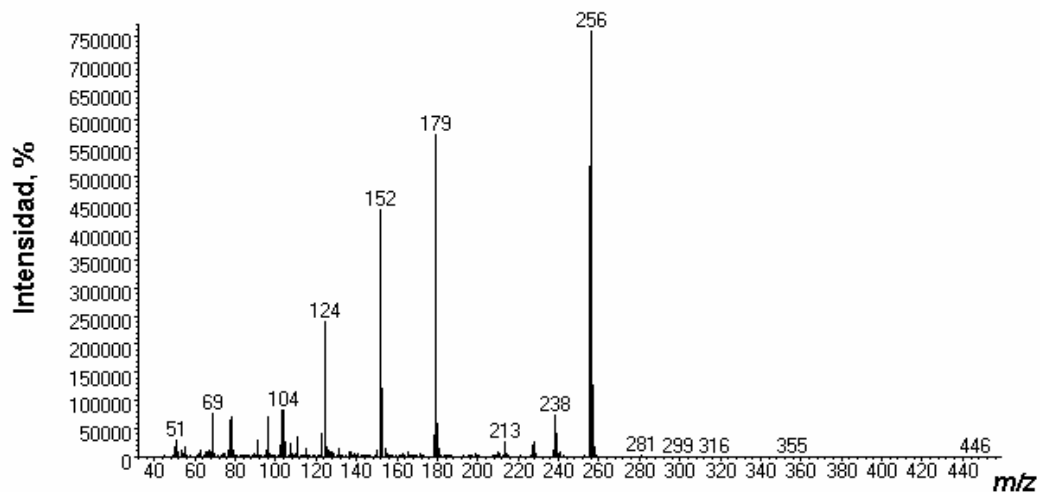
Anexo 1 – Figura 4. Espectro de masas del cariofileno (EI, 70 eV).



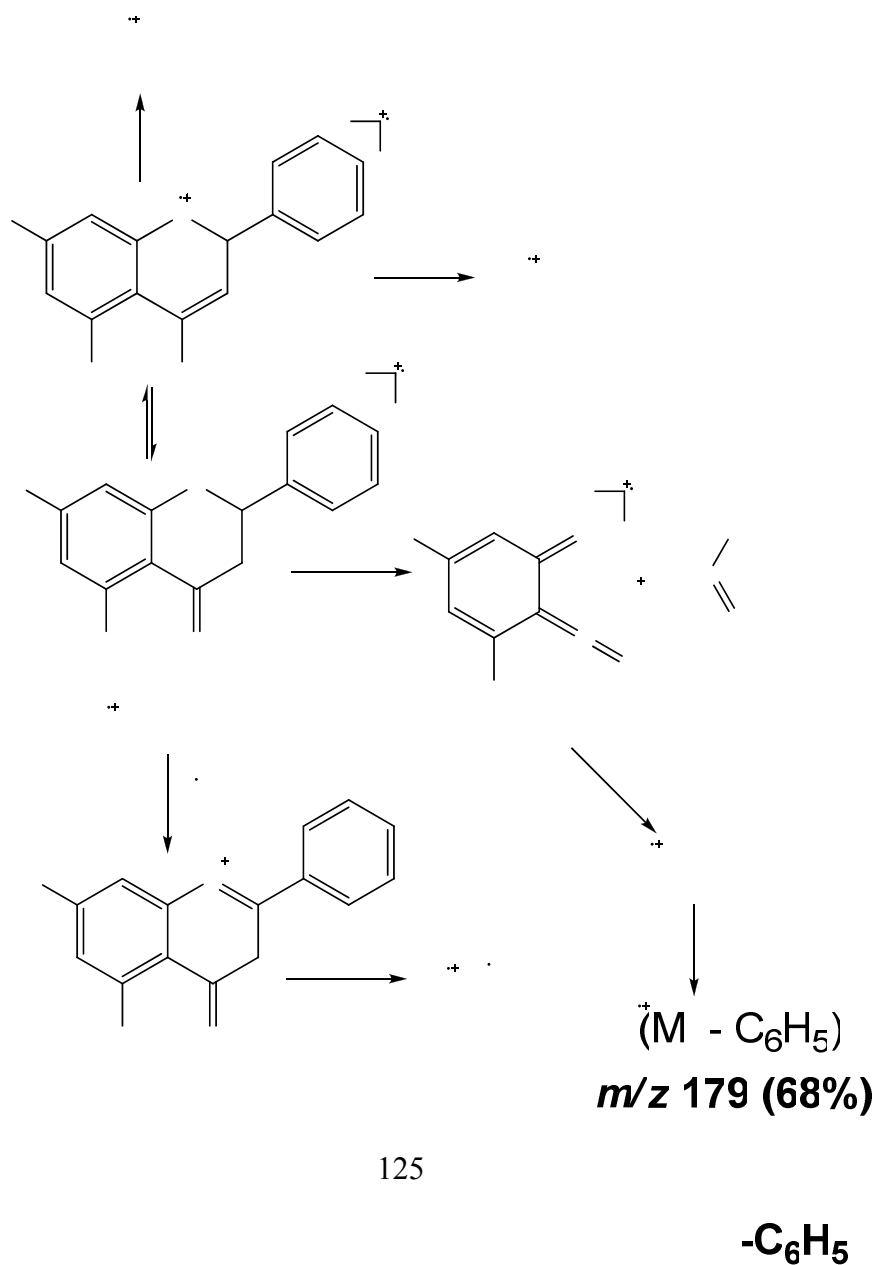
Esquema 4. Posibles rutas de fragmentación del cariofileno.



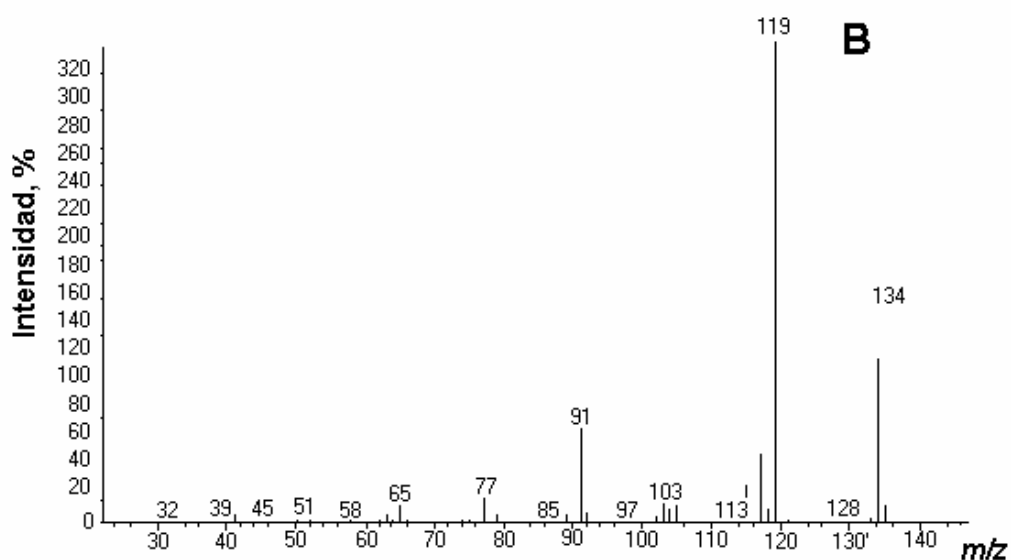
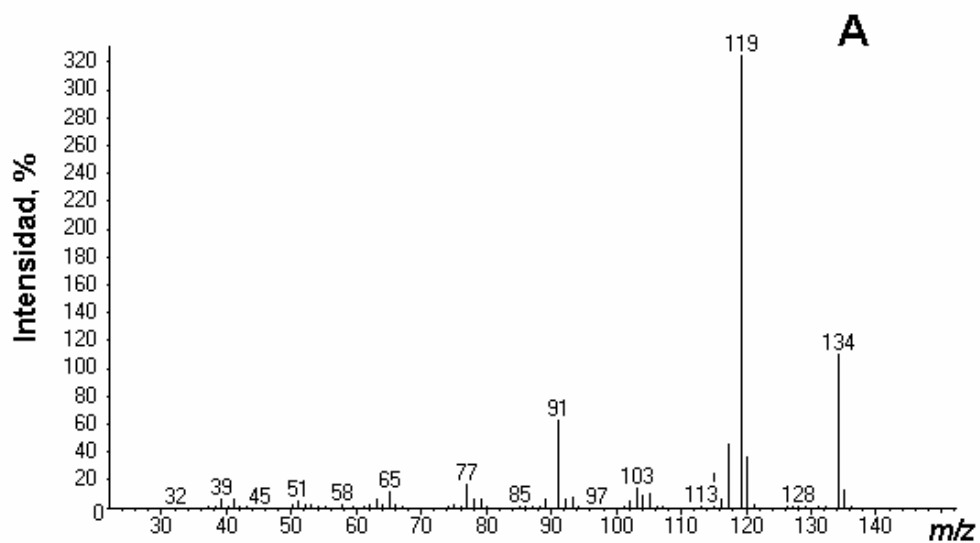
Anexo 1 – Figura 5. Espectro de masas del pinocembrin(EI, 70 eV).



Esquema 5. Posibles rutas de fragmentación del pinocembrin.



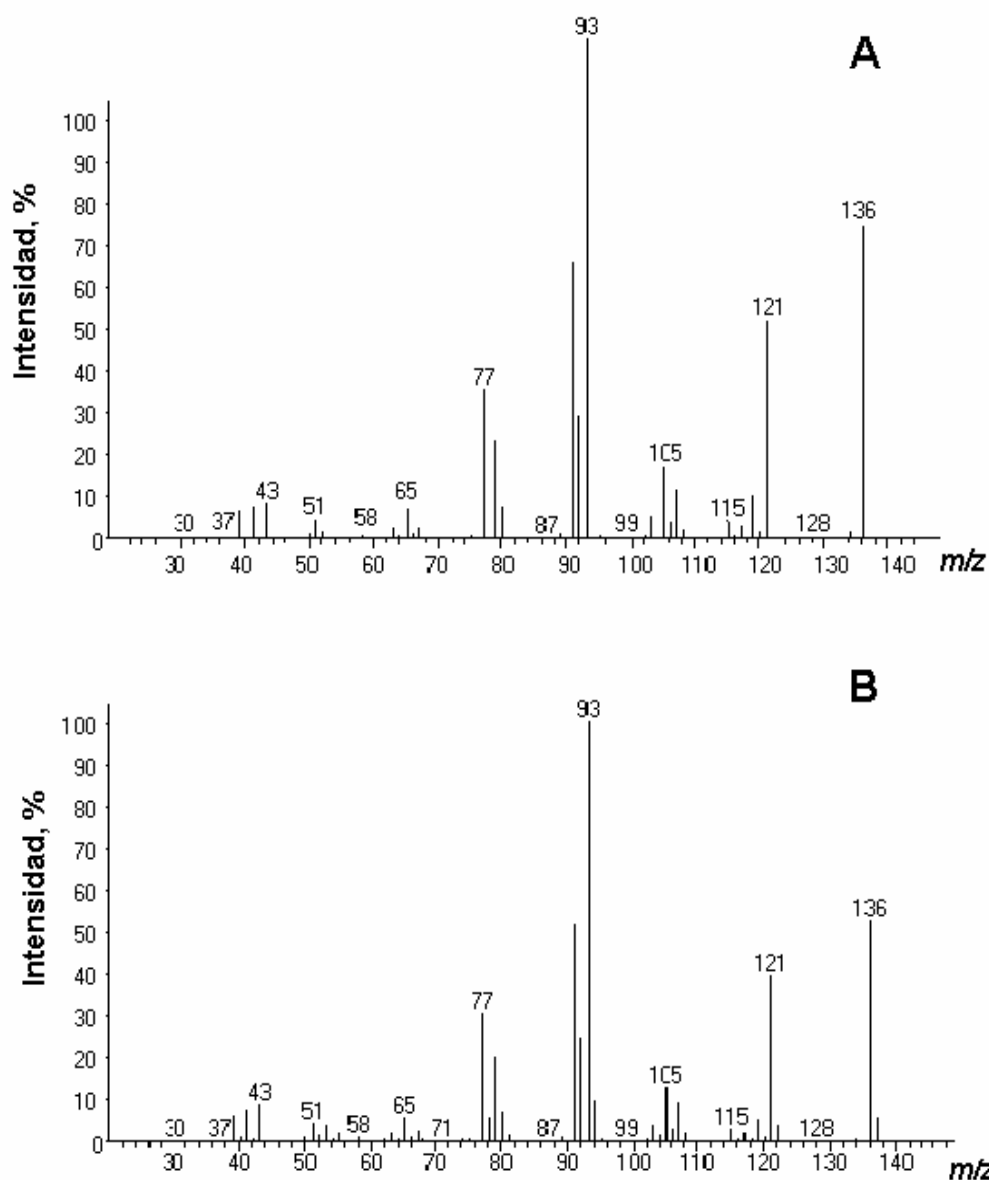
Anexo 2. MS, I_k y t_R de patrones de terpenos certificados.



Anexo 2-Figura 1. Espectro de masas del *p*-cimeno obtenido por EI (70 eV): **A.** Patrón certificado del *p*-cimeno; **B.** MS del *p*-cimeno presente en el AE de *Lippia organoides*.

Anexo 2-Tabla 1. Tiempo de retención e índices de Kováts del *p*-cimeno.

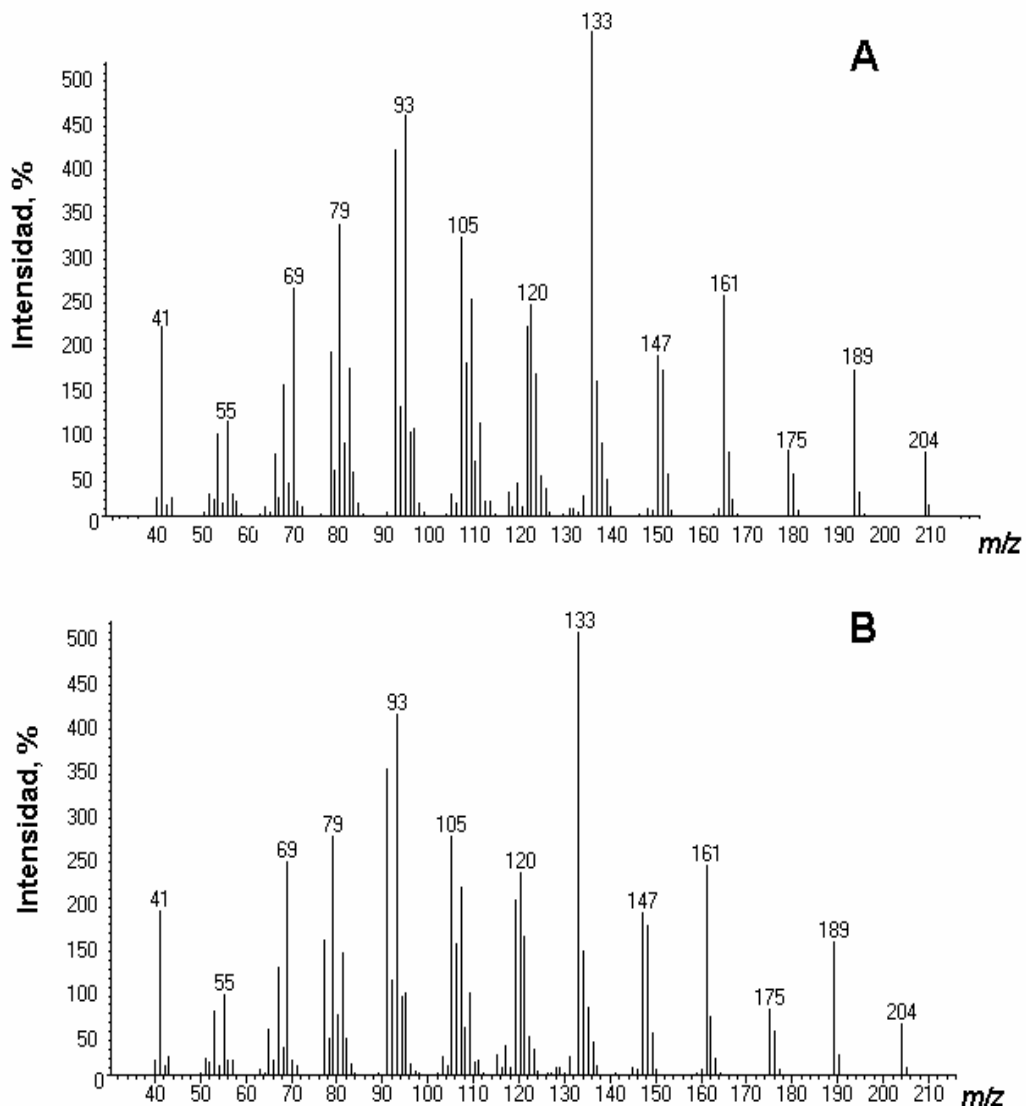
Compuesto	t_R (DB-5,60 m)		I_k (t° program.)		
	Patrón certificado	Aceite esencial	Literatura [91]	Patrón certificado	Aceite esencial
<i>p</i> -Cimeno	21,51	21,63	1020	1024	1025



Anexo 2-Figura 2. Espectro de masas del γ -terpineno obtenido por EI (70 eV): **A.** Patrón certificado del γ -terpineno; **B.** MS del γ -terpineno presente en el AE de *Lippia origanoides*.

Anexo 2-Tabla 2. Tiempo de retención e índices de Kováts del γ -terpineno.

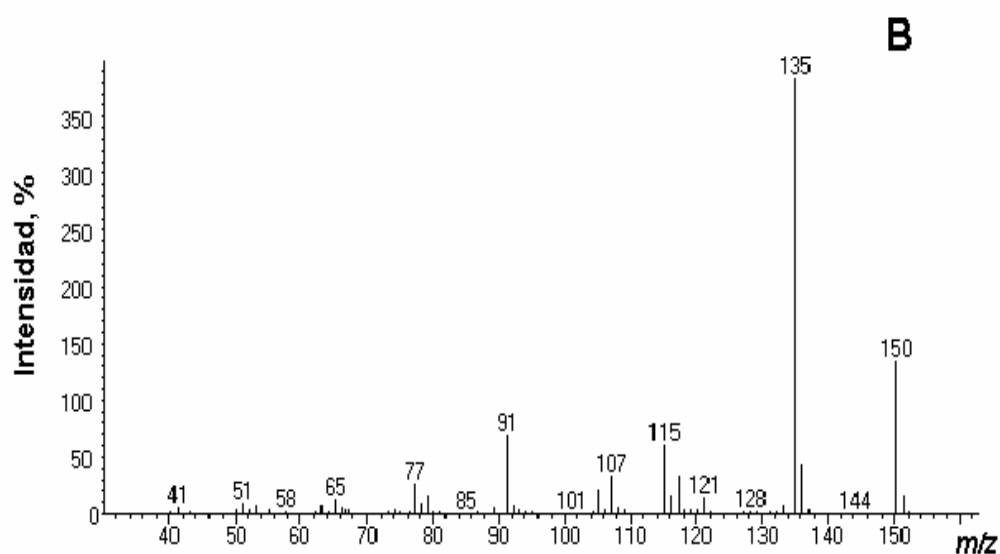
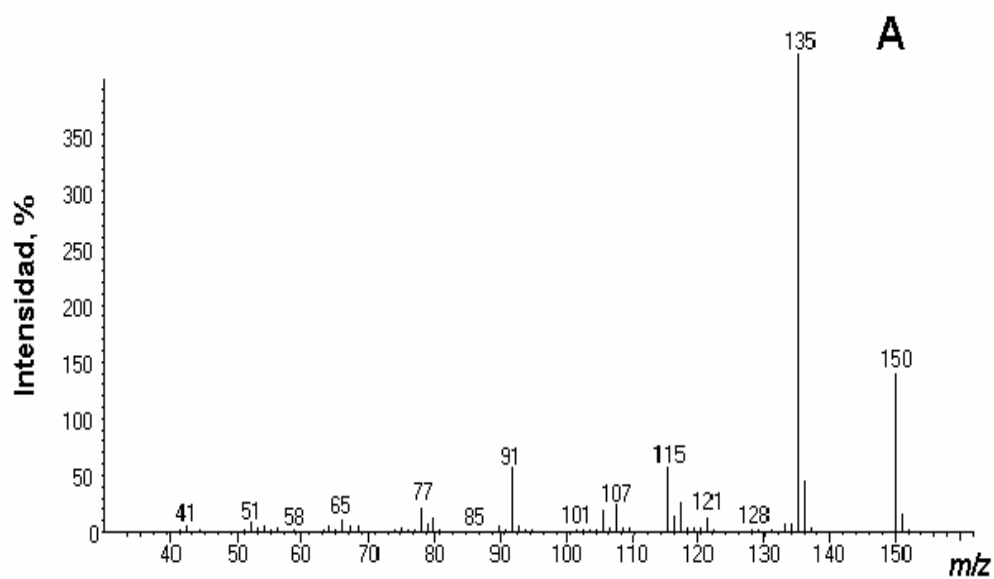
Compuesto	t_R (DB-5,60 m)		I_k (t° program.)		
	Patrón certificado	Aceite esencial	Literatura [91]	Patrón certificado	Aceite esencial
γ -terpineno	22,91	22,95	1054	1058	1060



Anexo 2-Figura 3. Espectro de masas del *trans*- β -cariofileno obtenido por EI (70 eV): **A.** Patrón certificado del *trans*- β -cariofileno; **B.** MS del *trans*- β -cariofileno presente en el AE de *Lippia organoides*.

Anexo 2-Tabla 3. Tiempo de retención e índices de Kováts del *trans*- β -cariofileno.

Compuesto	t_R (DB-5,60 m)		I_k (t° program.)		
	Patrón certificado	Aceite esencial	Literatura [91]	Patrón certificado	Aceite esencial
<i>trans</i> - β -cariofileno	37,12	37,17	1417	1426	1428



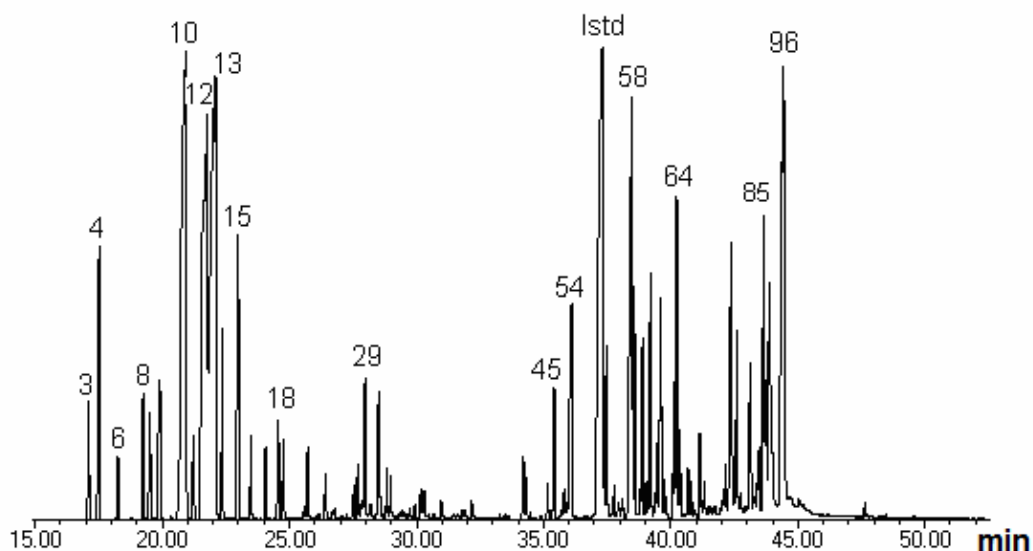
Anexo 2-Figura 4. Espectro de masas del timol obtenido por EI (70 eV): **A.** Patrón certificado del timol; **B.** MS del timol presente en el AE de *Lippia origanoides*.

Anexo 2-Tabla 4. Tiempo de retención e índices de Kováts del timol.

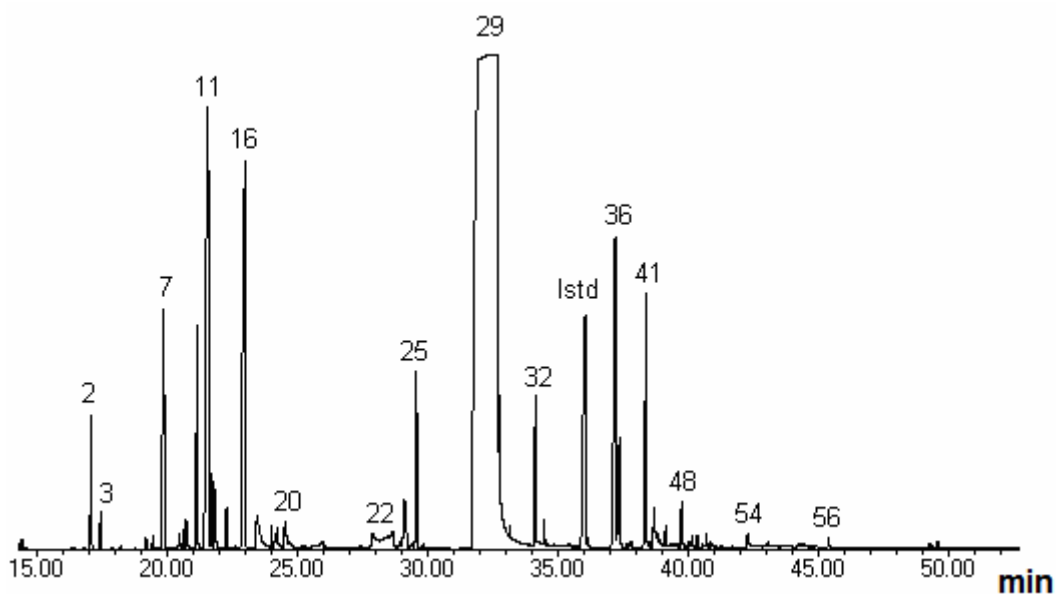
Compuesto	t_R (DB-5,60 m)		I_k (t° program.)		
	Patrón certificado	Aceite esencial	Literatura [91]	Patrón certificado	Aceite esencial
Timol	31,85	31,91	1289	1289	1291

Anexo 3. Perfiles cromatográficos típicos de los AE obtenidos de hojas de *L. organoides* QI y QII, recolectadas en Jordan Sube (Santander, Colombia).

Anexo 3-Figura 1. Perfil cromatográfico típico del AE obtenido de hojas de *L. organoides* del quimiotipo QI recolectadas en Jordan Sube (Santander, Colombia). Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV). La identificación de los compuestos se reporta en la **Tabla 15**.





Anexo 3-Figura 2. Perfil cromatográfico típico del AE obtenido de hojas de *L. organoides* del quimiotipo QII recolectadas en Jordan Sube (Santander, Colombia). Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV). La identificación de los compuestos se reporta en la **Tabla 16**.



Anexo 4. Resultados análisis de suelos.

LABORATORIO QUÍMICO DE SUELOS PROGRAMA DE SUELOS DIRECCIÓN: Carrera 27 Calle 9 Ciudad Universitaria Teléfono: 6344000 Ext. 2499 Bucaramanga - Santander del Sur		CONVENIO GOBERNACIÓN DE SANTANDER - UIS SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL Teléfonos: 6301963 Fax: 6300480 - 6339018 ESCUELA DE QUÍMICA - UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER		ANÁLISIS DE SUELOS: UN BENEFICIO MAYOR Y PRIORITARIO PARA EL CAMPO DIA: 11 MES: NOVIEMBRE AÑO: 2006																			
CLIENTE: CENIVAM DIRECCIÓN: TOPOGRAFÍA:		MUNICIPIO: Bucaramanga VEREDA: Centro DEPARTAMENTO: Santander		Finca: Centro Cenivam Cultivo: Lippia origanoides																			
EXTENSIÓN:		ANÁLISIS SOLICITADOS		AZUFRE: X CIC: X CE:																			
RESULTADO DEL ANÁLISIS DE SUELOS																							
No. Orden	No. Lab.	pH Unidad	% C	P (ppm) Bray II	Ca	Mg	0,75	0,09	0,36	—	58	14	28	TEXTURA	CIC meq/100g	CE mmhos/cm	S	B	Fe	Mn	Cu	Zn	
1	851	5,6	0,50	80	5,78	0,75	0,09	0,36	—	58	14	28	Francó-Arcilloarenoso	32,3	0,25	6,80	1,3	0,24	1,16				
PARAMETROS		MÉTODO ANALÍTICO		OBSERVACIONES																			
pH: Potencial de Hidrógeno C: Carbono P: Fósforo disponible Ca, Mg, Na, K Al: Aluminio intercambiable % Textura B: Boro Fe, Mn, Cu, Zn S: Azufre CIC Capacidad Intercambio Catiónico CE: Conductividad Eléctrica		Electrométrico: Relación 1:1 Agua destilada Colorimétrico: Walkley Black K2Cr2O7-H2SO4 Colorimétrico: Bray II. HCl 0,1 N-NH4F 0,03 N Absorción Atómica: Acetato de Amonio Valoración: Extracción KCl Bouyoucos: Agua destilada Colorimétrico: Extracción Fosfato Monocálcico Absorción Atómica: Extracción con DTPA Turbidimétrico: Extracción Fosfato Monocálcico Electrométrico: Extracción Acetato de Amonio Agua destilada		VoBo																			
		JAIME CAMARGO HERNÁNDEZ Químico Mat. Prof. 0047																					

 <p>LABORATORIO QUÍMICO DE SUELOS PROGRAMA DE SUELOS DIRECCIÓN: Carrera 27 Calle 9 Ciudad Universitaria Teléfono: 6344000 Ext.2469</p>	<p align="center">CONVENIO GOBERNACIÓN DE SANTANDER – UIS SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL Teléfonos: 6301966 Fax: 6300480 – 6339018 ESCUELA DE QUÍMICA – UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER</p>	<p>ANÁLISIS DE SUELOS: UN BENEFICIO MAYOR Y PRIORITARIO PARA EL CAMPO</p>
<p>Bucaramanga – Santander del Sur</p>	<p>MUNICIPIO: Bucaramanga VEREDA: Centro</p>	<p>20 Noviembre 2006</p>
<p>CLIENTE: CENIVAM</p>	<p>DEPARTAMENTO: Santander</p>	<p>Fincas: Centro Centivam</p>
<p>DIRECCIÓN:</p>	<p>TELÉFONOS</p>	<p>Cultivo: Lippia origanoides</p>
<p>TOPOGRAFÍA: Ondulado</p>	<p>EXTENSIÓN: 15000m²</p>	
<p>No. Laboratorio: 851</p>		
<p>Lote:</p>		
<p>Edad: Inicial</p>		
<p>Análisis de Resultados: La reacción del suelo es medianamente ácida (pH=5.6). El contenido de materia orgánica es bajo. El nivel de Nitrógeno total es bajo. El nivel de Fósforo, Azufre es alto. El nivel de Calcio, potasio es medio. El nivel de Magnesio, Boro, hierro, Manganeso, Cobre, zinc es bajo. El nivel de Sodio es normal. La textura es adecuada.</p>		
<p>Recomendaciones: *APLICAR POR HECTÁREA-AÑO LO SIGUIENTE: Nitrógeno: 110 kilos. Calcio: 28 kilos. Magnesio: 25 kilos. Potasio: 32 kilos. Boro: 1,7 kilos. Hierro: 2,0 kilos. Manganeso: 2,2 kilos. Cobre: 2,1 kilos. Zinc: 2,4 kilos. Como fuente de éstos nutrientes se pueden utilizar abonos orgánicos o abonos químicos. La dosis total recomendada se puede dividir en 3 0 4 aplicaciones por año. En el momento que se apliquen los abonos al suelo debe estar húmedo. NOTA: para poder recomendar abonos orgánicos es necesario conocer previamente su composición química, para conocer en que porcentaje se encuentran los diferentes nutrientes del abono.</p>		
		<p align="right">  Hernan Castellanos P. Ingeniero Agrónomo U. Nai. T.P. 11090 </p>

Anexo 5. Curvas de Calibración.

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

Calibración p-Cimeno Nivel alto

Calib. Data Modified : Thursday, 24 24e January 24e 2008 10:49:56 a.m.
 Calculate : Area Percent
 Rel. Reference Window : 0.000 %
 Abs. Reference Window : 0.080 min
 Rel. Non-ref. Window : 0.000 %
 Abs. Non-ref. Window : 0.080 min
 Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
 Uncalibrated Peaks : not reported
 Partial Calibration : Yes, identified peaks are recalibrated
 Correct All Ret. Times: No, only for identified peaks

Curve Type : Linear
 Origin : Ignored
 Weight : Equal

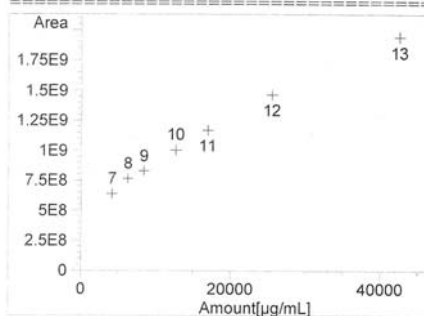
Recalibration Settings:
 Average Response : Average all calibrations
 Average Retention Time: Floating Average New 75%

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

Signal 1:

RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [µg/mL]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
21.470	1	7 4257.00000	6.37219e8	6.68059e-6	p-Cimeno
		8 6386.00000	7.66496e8	8.33143e-6	
		9 8514.00000	8.29284e8	1.02667e-5	
		10 1.27710e4	1.00534e9	1.27032e-5	
		11 1.70280e4	1.16885e9	1.45681e-5	

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



p-Cimeno at exp. RT: 21.470
 Correlation: 0.99568
 Residual Std. Dev.: 46445326.44000
 Formula: y = mx + b
 m: 33712.38092
 b: 5.52420e8
 x: Amount [µg/mL]
 y: Area

Method E:\CHEM32\1\METHODS\WILLIAM\APOLAR\G-TERPINENONB.M

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

Calibración 1,8-Cineol Nivel bajo

Calib. Data Modified : January 28, 2008 4:16:31 p.m.

Calculate : Area Percent

Rel. Reference Window : 0.000 %

Abs. Reference Window : 0.080 min

Rel. Non-ref. Window : 0.000 %

Abs. Non-ref. Window : 0.080 min

Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Uncalibrated Peaks : not reported

Partial Calibration : Yes, identified peaks are recalibrated

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

Curve Type : Linear

Origin : Forced

Weight : Equal

Recalibration Settings:

Average Response : Average all calibrations

Average Retention Time: Floating Average New 75%

Calibration Report Options :

Printout of recalibrations within a sequence:

Calibration Table after Recalibration

Normal Report after Recalibration

If the sequence is done with bracketing:

Results of first cycle (ending previous bracket)

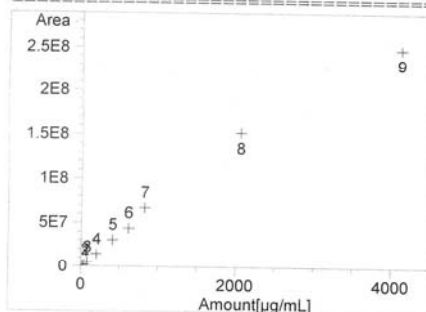
Signal 1:

RetTime [min]	Sig	Lvl	Amount [µg/mL]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
22.790	1	1	21.00000	6.38932e5	3.28673e-5	gamma-Terpineno
		2	41.00000	1.74008e6	2.35622e-5	
		3	82.00000	4.90817e6	1.67068e-5	
		4	206.00000	1.42381e7	1.44683e-5	
		5	412.00000	3.03717e7	1.35653e-5	
		6	618.00000	4.37736e7	1.41181e-5	
		7	825.00000	6.72380e7	1.22698e-5	
		8	2061.00000	1.52608e8	1.35052e-5	
		9	4123.00000	2.48149e8	1.66150e-5	

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

Method E:\CHEM32\1\METHODS\WILLIAM\APOLAR\G-TERPINENONB.M

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



Correlation: 0.99502
Residual Std. Dev.: 10718934.92609
Formula: y = mx
m: 63740.53812
x: Amount [µg/mL]
y: Area

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

Calibración trans-Cariofileno Nivel bajo

Calib. Data Modified : February 18, 2008 11:02:37 a.m.
 Calculate : Area Percent
 Rel. Reference Window : 0.000 %
 Abs. Reference Window : 0.080 min
 Rel. Non-ref. Window : 0.000 %
 Abs. Non-ref. Window : 0.080 min
 Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
 Uncalibrated Peaks : not reported
 Partial Calibration : Yes, identified peaks are recalibrated
 Correct All Ret. Times: No, only for identified peaks

 Curve Type : Linear
 Origin : Forced
 Weight : Equal

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

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

Signal 1:

RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [µg/mL]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
30.130	1	89.00000	1.44463e7	6.16073e-6	trans-Cariofileno
	2	222.00000	2.72783e7	8.13833e-6	
	3	444.00000	6.13407e7	7.23826e-6	
	4	666.00000	1.12085e8	5.94190e-6	
	5	888.00000	1.53970e8	5.76735e-6	
	6	2221.00000	3.26157e8	6.80961e-6	
	7	4442.00000	5.42488e8	8.18819e-6	

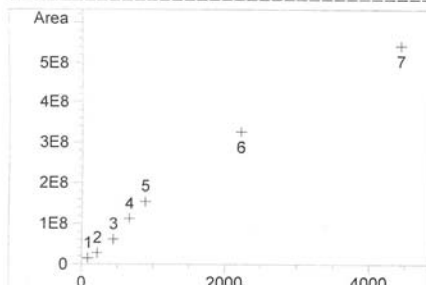
1 Warnings or Errors :

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

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

No Entries in table
 =====

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



trans-Cariofileno at exp. RT: 30.130

Correlation: 0.99459
 Residual Std. Dev.: 28190468.88494
 Formula: y = mx
 m: 129254.14477
 x: Amount[µg/mL]
 y: Area

Method E:\CHEM32\1\METHODS\WILLIAM\APOLAR\TIMOLNA.M

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

Calibración Timol Nivel alto

Calib. Data Modified : Monday, 28 28e January 28e 2008 5:21:07 p.m.

Calculate : Area Percent

Rel. Reference Window : 0.000 %
Abs. Reference Window : 0.080 min
Rel. Non-ref. Window : 0.000 %
Abs. Non-ref. Window : 0.080 min
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Uncalibrated Peaks : not reported
Partial Calibration : Yes, identified peaks are recalibrated
Correct All Ret. Times: No, only for identified peaks

Curve Type : Linear
Origin : Ignored
Weight : Equal

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

Calibration Report Options :

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

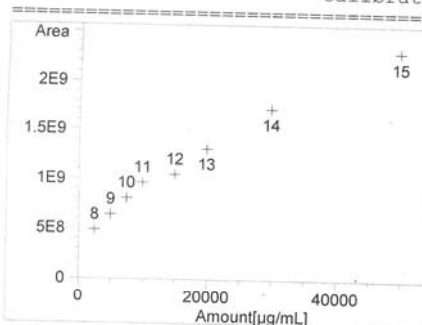
Signal 1:

RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [µg/mL]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
31.960	1 8	2476.00000	4.87026e8	5.08392e-6	Timol
	9	4952.00000	6.41225e8	7.72272e-6	
	10	7428.00000	8.07610e8	9.19751e-6	
	11	9904.00000	9.64176e8	1.02720e-5	
	12	1.48560e4	1.04800e9	1.41756e-5	
	13	1.98080e4	1.30846e9	1.51385e-5	
	14	2.97120e4	1.71322e9	1.73428e-5	
	15	4.95200e4	2.30044e9	2.15263e-5	

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

Method E:\CHEM32\1\METHODS\WILLIAM\APOLAR\TIMOLNA.M

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



Timol at exp. RT: 31.960

Correlation: 0.99223
Residual Std. Dev.: 80716331.46245
Formula: y = mx + b
m: 37925.80852
b: 5.01438e8
x: Amount [µg/mL]
y: Area