

ANÁLISIS ESTADÍSTICO MULTIVARIADO DE LAS PROPIEDADES  
FISICOQUÍMICAS DE TRES ACEITES ESENCIALES COLOMBIANOS PARA EL  
ESTABLECIMIENTO DE CRITERIOS DE CALIDAD

ANDREA JULIANA AGUDELO NIÑO, Química

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA  
2011

ANÁLISIS ESTADÍSTICO MULTIVARIADO DE LAS PROPIEDADES  
FISICOQUÍMICAS DE TRES ACEITES ESENCIALES COLOMBIANOS PARA EL  
ESTABLECIMIENTO DE CRITERIOS DE CALIDAD

ANDREA JULIANA AGUDELO NIÑO, Química

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

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  
2011

A quien ha sido mi apoyo incondicional y mi guía,  
en todo momento de mi vida y ha contribuido grandemente  
a que yo sea, quien hoy en día soy: mi tío Javier.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, porque siempre se ha manifestado generosamente en mi vida.

A la Dra. Elena E. Stashenko, por su ejemplo de tenacidad, sus enseñanzas y por compartir su visión de la vida, a quien quiero manifestarle mi admiración y aprecio.

Al Dr. Jairo René Martínez, por sus brillantes aportes en el desarrollo de este proyecto, quien me guió y apoyo en todo lo que necesité, para que se llevara exitosamente a cabo.

A los profesores Alirio Palma, Rafael Isaacs y José Carlos Gutiérrez, por confianza, su afecto y su amistad.

A todos mis compañeros de laboratorio, quienes contribuyeron a hacer amena mi estadía en el grupo de investigación, especialmente a Gustavito, Laura, Marce, Paola, Mónica, Martha Cervantez, Ever y Zaid: gracias por los momentos compartidos.

A todos mis compañeros y amigos de Maestría: Lina, Joel, Carlos, Gina, Néstor, Jorge y Carlos el “gato”.

A mis amigos de siempre: Adrianita, Eddy, Edwin, OlgaLi, Martha la O, Lucía, Rocío, Sindy, Fabiancho, Silvia: por el valioso vínculo que nos une, y que a pesar de la distancia y los distintos caminos, permanece fuerte e intacto.

A mi familia y a todos aquellos que de una u otra forma han hecho parte de mi vida e hicieron posible el logro de esta meta.

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural por la financiación del proyecto, a CENIVAM y el Laboratorio de Cromatografía por proporcionar todo lo que se necesitó para realizarlo.

Andrea Juliana Agudelo

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	16
1. ACEITES ESENCIALES	19
1.1 Generalidades de los AE	23
1.2 Análisis de AE por cromatografía de gases	23
1.3 Pruebas fisicoquímicas	25
1.4 Criterios de calidad de los AE	27
2. PLANTAS BAJO ESTUDIO	28
2.1 Familia Verbenaceae	28
2.1.1 <i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E. Brown ex Britton & Wills	28
2.1.2 <i>Lippia origanoides</i> H.B.K.	29
2.2 Familia Poaceae	31
2.2.1 <i>Cymbopogon flexuosus</i> Steud. Watts	33
3. QUIMIOMETRÍA	35
3.1 Análisis de componentes principales	35
3.2 Métodos de regresión	36
3.2.1 PCR y PLS	36
3.2.2 Validación de modelos	37
4. METODOLOGÍA	39
4.1 Pre-tratamiento de los AE	39
4.2 Análisis cromatográfico	39
4.2.1 Análisis GC-MS	39
4.2.2 Análisis GC-FID	41
4.3 Criterios de calidad	43
4.4 Análisis de las propiedades fisicoquímicas	43
4.5 Análisis estadístico	45
4.5.1 Reconocimiento de patrones:	48
4.5.2 Modelamiento	48
4.5.3 Selección de variables regresoras	48
4.5.4 Refinamiento de los modelos	49
5. RESULTADOS y ANÁLISIS	50
5.1 Caracterización de los AE	50
5.2 Análisis exploratorio de los AE (PCA)	63
5.3 Criterios de calidad para los AE	69
5.3.1 Criterios de calidad del AE de <i>C. flexuosus</i>	69
5.3.2 Criterios de calidad de los AE de <i>L. alba</i> y <i>L. origanoides</i>	71
5.4 Modelos matemáticos para la predicción del contenido de los compuestos mayoritarios de los AE	73
CONCLUSIONES	90
BIBLIOGRAFÍA	

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Esquema general del proceso investigativo básico de la industria de los AE en Colombia.	18
<b>Figura 2.</b> Cromatógrafo GC 6890 Plus acoplado con un detector selectivo de masas MSD 5975, <i>Agilent Technologies</i> .	41
<b>Figura 3.</b> Cromatógrafo <i>Agilent Technologies</i> 6890N Network Series GC, acoplado a un espectrómetro de masas <i>Agilent Technologies</i> 5973 Inert XL.	42
<b>Figura 4.</b> Cromatógrafo de gases GC 7890 ( <i>Agilent Technology</i> ) con FID.	43
<b>Figura 5.</b> Equipos y montajes empleados durante la determinación de las propiedades fisicoquímicas de AE, según las normas internacionales ISO.	46
<b>Figura 6.</b> Cromatograma típico del AE de <i>L. alba</i>	50
<b>Figura 7.</b> Cromatograma típico del AE de <i>C. flexuosus</i> .	53
<b>Figura 8.</b> Cromatograma típico del AE de <i>L. origanoides</i> .	56
<b>Figura 9.</b> Gráfico de puntos de las 81 muestras de AE de <i>L. alba</i> , usando como ejes los primeros 2 PCs de PCA de composición.	64
<b>Figura 10.</b> Gráfico de puntos de las 24 muestras de AE de <i>C. flexuosus</i> , usando como ejes los primeros 2 PC de PCA de composición (izquierda) y PCA de PFQ (derecha).	67
<b>Figura 11.</b> Gráfico de puntos de las 33 muestras de AE de <i>L. origanoides</i> , usando como ejes los primeros 2 PC de PCA de composición (izquierda) y PCA de PFQ (derecha).	68
<b>Figura 12.</b> Valores experimentales contra los predichos mediante los modelos seleccionados para cada compuesto mayoritario.	85
<b>Figura 13.</b> Valores experimentales contra los predichos de IR y D obtenidos de los modelos inversos.	87

## LISTA DE GRÁFICAS

	<b>Pág.</b>
<b>Gráfica 1.</b> Relación del número de publicaciones sobre AE función del tiempo.	20
<b>Gráfica 2.</b> Relación del número de publicaciones en diferentes áreas de estudio de los AE.	21
<b>Gráfica 3.</b> Países con mayor número de publicaciones sobre AE. Resultados parciales de la sumatoria de las instituciones que se registran con más de 50 artículos.	22
<b>Gráfica 4.</b> Registro cronológico de las publicaciones realizadas sobre el AE de <i>L. alba</i> .	30
<b>Gráfica 5.</b> Registro cronológico de las publicaciones realizadas sobre el AE de <i>C. flexuosus</i> .	34
<b>Gráfica 6.</b> Histogramas de las PFQ medidas a los AE de <i>L. alba</i> .	58
<b>Gráfica 7.</b> Histogramas de las PFQ medidas a los AE de <i>C. flexuosus</i> .	60
<b>Gráfica 8.</b> Histogramas de las PFQ medidas a los AE de <i>L. origanoides</i> .	61
<b>Gráfica 9.</b> Histogramas del contenido en ppm de carvona y limoneno en AE de <i>L. alba</i> .	65
<b>Gráfica 10.</b> Compuestos empleados en PCA de composición para <i>C. flexuosus</i> : visualización de los cambios entre una muestra y otra.	66
<b>Gráfica 11.</b> Número de PCs requeridos para predecir el contenido de los compuestos mayoritarios con PCR y PLS, según el RMSEP.	77
<b>Gráfica 12.</b> Distribución de los residuales para la predicción del contenido de los compuestos mayoritarios de los AE estudiados, obtenidos con los modelos seleccionados.	84

## LISTA DE TABLAS

		<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b>	Componentes mayoritarios del AE de <i>L. alba</i> , quimiotipo “carvona”, según su origen geográfico.	30
<b>Tabla 2.</b>	Componentes mayoritarios del AE de <i>L. origanoides</i> .	32
<b>Tabla 3.</b>	Relación del número de publicaciones en dos bases de datos para <i>L. origanoides</i> .	32
<b>Tabla 4.</b>	Componentes mayoritarios de AE de <i>C. flexuosus</i> de India.	34
<b>Tabla 5.</b>	Reactivos empleados para la evaluación de las pruebas fisicoquímicas.	44
<b>Tabla 6.</b>	Equipos empleados para la evaluación de las pruebas fisicoquímicas, según las normas ISO.	45
<b>Tabla 7.</b>	Cantidad relativa (%) e identificación de los componentes del AE de <i>L. alba</i> .	51
<b>Tabla 8.</b>	Cantidad relativa (%) e identificación de los componentes del AE de <i>C. flexuosus</i> .	52
<b>Tabla 9.</b>	Cantidad relativa (%) e identificación de los componentes del AE de <i>L. origanoides</i> quimiotipo carvacrol.	54
<b>Tabla 10.</b>	Resumen de la caracterización fisicoquímica de los AE de <i>L. alba</i> y resultado de la prueba de normalidad.	57
<b>Tabla 11.</b>	Resumen de la caracterización fisicoquímica de los AE de <i>C. flexuosus</i> y resultado de la prueba de normalidad.	59
<b>Tabla 12.</b>	Resumen de la caracterización fisicoquímica de los AE de <i>L. origanoides</i> y resultado de la prueba de normalidad.	59
<b>Tabla 13.</b>	Rangos intercuartílicos para las PFQ de los AE bajo estudio.	63
<b>Tabla 14.</b>	Comparación de las características de los AE estudiados con los valores establecidos por la norma ISO 3217-1974.	70
<b>Tabla 15.</b>	Comparación de los rangos establecidos (%) en la norma ISO 4718 para los componentes del AE de <i>C. flexuosus</i> , con los obtenidos para el AE colombiano.	70
<b>Tabla 16.</b>	Intervalos de confianza (95%) para las PFQ y contenido de carvona y carvacrol en los AE de <i>L. alba</i> y <i>L. origanoides</i> , respectivamente.	71
<b>Tabla 17.</b>	Comparación de los resultados obtenidos mediante diferentes métodos de regresión para la predicción del contenido de limoneno (%) en <i>L. alba</i> .	75
<b>Tabla 18.</b>	Factores de peso de las variables en los PCs con mayor varianza en PCR y PLS para la predicción del contenido de limoneno en <i>L. alba</i> .	76
<b>Tabla 19.</b>	Coefficientes de correlación de las PFQ medidas al AE de <i>L. alba</i> .	76

<b>Tabla 20.</b>	Comparación de los resultados obtenidos mediante diferentes métodos de regresión para predecir el contenido de carvona (%) en <i>L. alba</i> .	78
<b>Tabla 21.</b>	Factores de peso de las variables en los PCs con mayor varianza en PCR y PLS para la predicción del contenido de carvona (%) en <i>L. alba</i> .	78
<b>Tabla 22.</b>	Comparación de los resultados obtenidos mediante diferentes métodos de regresión para predecir el contenido de citral (%) en <i>C. flexuosus</i> .	79
<b>Tabla 23.</b>	Coefficientes de correlación de las PFQ con el citral.	79
<b>Tabla 24.</b>	Factores de peso de las variables en los PCs con mayor varianza en PCR y PLS para la predicción del contenido de citral en <i>C. flexuosus</i>	80
<b>Tabla 25.</b>	Comparación de los resultados obtenidos mediante diferentes métodos de regresión para predecir el contenido de carvacrol (%) en <i>L. origanoides</i> .	81
<b>Tabla 26.</b>	Coefficientes de correlación de las PFQ con el timol y el carvacrol (Carva).	81
<b>Tabla 27.</b>	Factores de peso de las variables en los 3 primeros PCs de PCR y PLS para la predicción del contenido de carvacrol en <i>L. origanoides</i> .	82
<b>Tabla 28.</b>	Comparación de los resultados obtenidos mediante diferentes métodos de regresión para predecir el contenido de timol (%) en <i>L. origanoides</i> .	83
<b>Tabla 29.</b>	Intervalos de tolerancia (95% de confianza) de los modelos seleccionados para la predicción de los compuestos mayoritarios en los AE estudiados.	83
<b>Tabla 30.</b>	Ejecución de los modelos para predecir RI y D a partir del porcentaje de los compuestos mayoritarios en los AE.	87
<b>Tabla 31.</b>	PFQ, contenido de carvona y limoneno experimental (exp) y predicho (pred) de fracciones (F) del AE de <i>L. alba</i> y condiciones de obtención.	89

## LISTA DE ECUACIONES

	<b>Pág.</b>
<b>Ecuación 1.</b> Índices de retención lineales.	24
<b>Ecuación 2.</b> Suma de cuadrados del error residual de predicción (PRESS)	37
<b>Ecuación 3.</b> Coeficiente de determinación ( $R^2$ )	37
<b>Ecuación 4.</b> Coeficiente de determinación ajustado ( $R^2_{adj}$ )	38
<b>Ecuación 5.</b> Normalización de los datos	48
<b>Ecuación 6.</b> Raíz media del error de predicción, RMSEP	49
<b>Ecuación 7.</b> Intervalos de tolerancia, probabilidad 95%	71
<b>Ecuación 8.</b> Desviación estándar del error de predicción, SEP	83

## LISTA DE ABREVIATURAS

AE	Aceite(s) esencial(es), según contexto.
AV	Índice de acidez
<i>C. flexuosus</i>	<i>Cymbopogon flexuosus</i> (Steud.) Wats
CV	Validación cruzada
D	Densidad relativa
EV	Índice de ésteres
F	Fracción
FID	Detector de ionización en llama
FLP	Punto de inflamación
FP	Punto de congelación
GC	Cromatografía de gases
GC-MS	GC acoplado a un detector selectivo de masas
H	Contenido de humedad
$I_{std}$	Estándar interno
ISO	Organización Internacional para Estándares
<i>L. alba</i>	<i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E. Brown
<i>L. origanoides</i>	<i>Lippia origanoides</i>
OLS	Regresión lineal simple
OR ( $\alpha_D^t$ )	Rotación óptica
P	Presión
PC	Componentes principales
PCA	Análisis de componentes principales
PCR	Regresión de componentes principales
PFQ	Propiedades fisicoquímicas
PLS	Regresión de mínimos cuadrados parciales
PRESS	Suma de cuadrados del error residual de predicción
$R^2$	Coefficiente de determinación
$R^2_{adj}$	Coefficiente de determinación ajustado
$R_i$	Índices de retención lineales
RI ( $n_D^t$ )	Índice de refracción
RMSEP	Raíz media del error de predicción
Mín	Mínimo
Máx	Máximo
MP	Fase móvil
MS	Espectrometría de masas
SP	Fase estacionaria
SEP	Desviación estándar del error de predicción
$t_R$	Tiempos de retención
T	Temperatura

## RESUMEN

TÍTULO: ANÁLISIS ESTADÍSTICO MULTIVARIADO DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE TRES ACEITES ESENCIALES COLOMBIANOS PARA EL ESTABLECIMIENTO DE CRITERIOS DE CALIDAD.\*

AUTOR: Andrea Juliana Agudelo Niño\*\*

Palabras Clave: Aceite esencial, propiedades fisicoquímicas, modelos matemáticos, establecimiento de normas, *Lippia alba*, *Lippia origanoides*, *Cymbopogon flexuosus*.

Las propiedades fisicoquímicas (PFQ) de: densidad, punto de ignición y de congelación, índices de refracción, de acidez y de ésteres, rotación óptica, junto con la composición química obtenida mediante cromatografía de gases de los aceites esenciales (AE) de *Lippia (L.) alba*, *Lippia (L.) origanoides* y *Cymbopogon flexuosus*, fueron empleadas para construir una base de datos para soportar el establecimiento de descriptores de criterios de calidad de AE de origen colombiano; formulándose intervalos de confianza (95%) para todas las PP medidas.

Los métodos de regresión lineal simple (OLS), de componentes principales (PCR) y de mínimos cuadrados parciales (PLS), se emplearon para construir modelos que pueden predecir los compuestos mayoritarios de los AE, a partir de la medición de las PFQ. La comparación de la raíz media del cuadrado del error de predicción, muestra que los resultados de OLS son los más cercanos a los valores experimentales y que requiere sólo de medir 4 de las 8 PFQ evaluadas. El coeficiente de determinación ( $R^2$ ), que expresa la varianza explicada por los modelos, fue de 0.641, 0.753, 0.840, 0.425 y 0.870, para los modelos de la carvona y el limoneno en *L. alba*, carvacrol y timol en *L. origanoides*, y citral en *C. flexuosus* respectivamente. Los intervalos de tolerancia para los modelos dados estuvieron entre 2.20 and 6.25%. A pesar de que los  $R^2$  estuvieron por debajo de 0.9, los resultados obtenidos permiten una útil predicción de la abundancia de los compuestos mayoritarios en cada uno de los AE, a partir de medidas que pueden ser llevadas a cabo en el campo.

\*Proyecto de Grado

\*\*Facultad de ciencias. Escuela de Química. Directora: Elena E. Stashenko, Química Ph. D.  
Codirector: Jairo René Martínez, Químico Ph. D.

## SUMMARY

TITLE: MULTIVARIATE STATISTICAL ANALYSIS OF THE PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF THREE COLOMBIAN ESSENTIAL OILS FOR THE SETTING OF QUALITY STANDARDS\*.

AUTHOR: Andrea Juliana Agudelo Niño\*\*

Keywords: essential oil, physicochemical properties, regression models, setting standards, *Lippia alba*, *Lippia organoides*, *Cymbopogon flexuosus*.

The physicochemical properties (PP): density, flash and freezing point, refractive index, ester and acid value, optical rotation, and chemical composition obtained by gas chromatography, of *Lippia alba*, *Lippia organoides* and *Cymbopogon flexuosus* essential oils (EO), were used to construct a database to support the establishment of standard quality descriptors as EO of Colombian origin. Confidence intervals (95%) were formulated for all measured PP.

Ordinary least-squares regression (OLS), principal component regression (PCR) and partial least squares (PLS) regression were employed to construct models for the prediction of the main EO components from the measured PP. Comparison of root mean squared error of prediction revealed that OLS results were closer to the experimental values and required the measurement of only four PP. The coefficient of determination ( $R^2$ ), which expresses the proportion of variance that is explained by the models were 0.641, 0.753, 0.840, 0.425 y 0.870 for carvone and limonene in *L. alba*, carvacrol and thymol in *L. organoides* and citral in *C. flexuosus*, respectively. The tolerance intervals for the given models were between 2.20 a 6.25%. Despite that  $R^2$  were below 0.9, the results obtained permit a useful prediction of EO main component abundance from measurements that can be performed in the field.

\*Research work

\*\*Science Faculty. Graduated Chemistry School. Directora: Elena E. Stashenko, Ph. D. Chemistry  
Codirector: Jairo René Martínez, Ph. D. Chemistry.

## INTRODUCCIÓN

El auge actual del consumo de productos naturales [1], ha volcado la atención sobre las plantas como fuente de principios activos, derivados de su gran capacidad de síntesis, desarrollada a su vez como estrategia de defensa para sobrevivir al impacto biótico y abiótico de su entorno [2]. En el caso de las plantas aromáticas los beneficios que ofrecen a la salud, se le atribuyen a sus aceites esenciales (AE) [2]; que además de propiedades curativas, presentan en la mayoría de los casos propiedades organolépticas y biológicas que les permiten ser ampliamente empleados en productos de consumo masivo, por lo que alrededor de 3000 esencias bien conocidas, 300 tienen alta importancia comercial [1, 3].

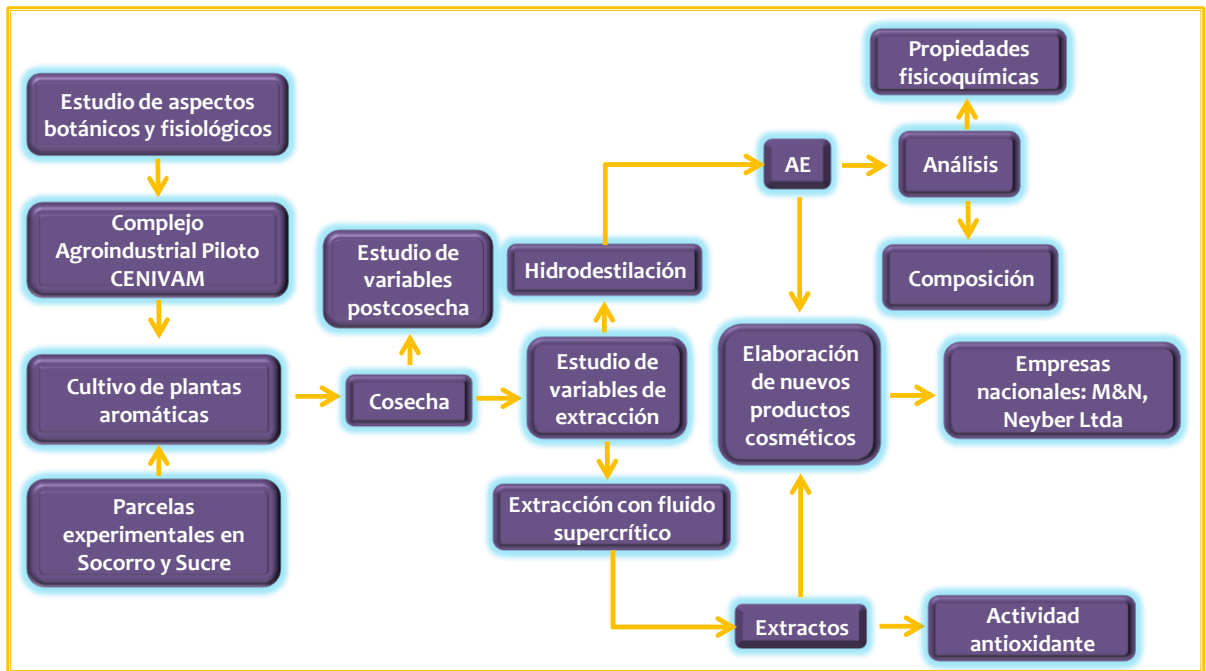
Esa importancia comercial, así como la aplicabilidad en la industria y el valor económico están directamente relacionados con la composición química del AE, que a su vez determina todas sus propiedades macroscópicas (físicoquímicas, olor, etc.) y las de la actividad biológica [4]; dado que esta composición es susceptible a cambios por factores de tipo externo como lo son las variaciones climáticas, la ubicación geográfica, las condiciones de cultivo, la disponibilidad de nutrientes, de agua, de luz solar, así como el estado vegetativo de la planta [3-6] y otros procesos, como el secado [7] y el método empleado en su extracción [4], los AE además de ser identificados con el nombre científico o común de la planta de la que provienen, son reconocidos de acuerdo con su país de origen; y sus propiedades físicoquímicas (PFQ), así como el contenido de sus compuestos constituyentes, no son constantes sino se encuentran dentro de un rango valores.

Además de reunir información básica (composición y PFQ) necesaria para la obtención de la denominación de origen de AE colombiano, el presente trabajo que hizo parte del programa: “Fortalecimiento y aumento de la competitividad de la cadena productiva nacional de AE y productos derivados” y se desarrolló dentro del proyecto “Estandarización, unificación de fichas técnicas de AE como productos de

exportación y obtención de algunos componentes y derivados”, financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR), junto con el laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander y la participación de comunidades campesinas (Véase **Figura 1**), obtuvo relaciones matemáticas sencillas que permiten determinar el contenido aproximado de los compuestos mayoritarios para los AE de *Lippia alba*, *Cymbopogon flexuosus* y *Lippia origanoides*, a partir de algunas de PFQ, evaluadas según las normas internacionales ISO.

De este modo, se podrá verificar la calidad de dichos AE con equipos básicos de laboratorio en las zonas rurales productoras, de acuerdo con su contenido de compuestos mayoritarios, que presentan algún interés comercial. Esto reducirá el tiempo y costos de análisis y contribuirá a hacer más rentable la industria de los AE en Colombia.

Esta investigación, que se resume en 90 páginas, mostró adicionalmente la relación directa y bidireccional entre la composición y las PFQ de los AE, que facilitará la identificación de posibles adulteraciones o valores atípicos, mediante la comparación de los resultados con los valores más frecuentes, encontrados en los intervalos de confianza, que se calcularon a partir de la base de datos generada en el proyecto. Resultados parciales del trabajo fueron expuestos en el X Congreso Colombiano de fitoquímica (Popayán, 2009) y el XXIX Congreso Latinoamericano de Química (Cartagena, 2010), como presentación oral y modalidad póster respectivamente.



**Figura 1.** Esquema general del proceso investigativo básico de la industria de los AE en Colombia.

## 1. ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales (AE), también llamados esencias, aceites volátiles o etéreos [1] son mezclas complejas, producto del metabolismo secundario de las plantas; se obtienen por hidrodestilación, destilación con vapor o por expresión, en el caso de las frutas cítricas; pueden ser biosintetizados por todos los órganos de la planta y son almacenados en células secretoras, cavidades, canales, células epidérmicas o tricomas glandulares [1, 3, 9], que compartimentan estos componentes, a menudo tóxicos para las células metabólicamente activas [7]; una característica importante de sus constituyentes derivada del proceso de obtención, es su naturaleza líquida volátil [10].

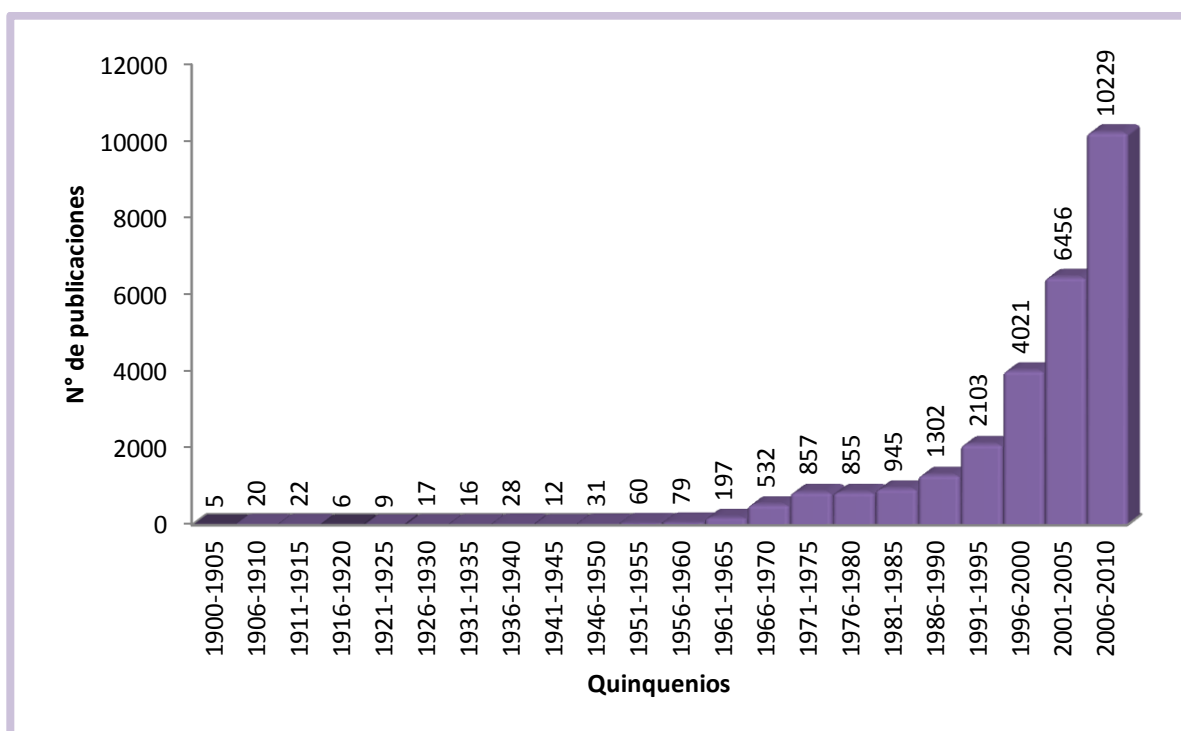
Su existencia o función en la naturaleza se atribuye a la interacción de las plantas con el medio ambiente. Los AE actúan como defensa contra virus, bacterias y hongos. También se les asocia con la reducción del apetito de los herbívoros, con la atracción de algunos insectos, para favorecer la dispersión de polen y semillas o para repeler insectos no deseables [3, 11].

Hoy en día los AE son una fuente importante de productos naturales renovables [9] que contribuyen al mantenimiento del equilibrio ecológico y se constituyen en una alternativa para la sustitución de productos químicos sintéticos [3, 10], al no producir efectos secundarios sobre la salud y el medio ambiente [6]. El interés por los productos naturales, la llamada “ola verde” ha ido incrementado notablemente en el mundo, y ha dirigido la atención de los científicos hacia las plantas aromáticas y, en especial, sus AE [1].

Con el fin de visualizar el desarrollo evolutivo en cuanto a la producción científica y el auge actual de los AE, se realizó una consulta cuantitativa, en la base de datos *Elservier (Scopus)* desde 1900 hasta la actualidad. La cuantificación es una

herramienta que emplea un conjunto de métodos cuantitativos para medir, analizar y comparar la actividad científica, a varios niveles de agregación por medio de la estadística de las publicaciones indexadas en bases de datos, con el fin de conducir estrategias tecnológicas o de monitoreo competitivo [12, 13]. En la **Gráfica 1**, resultado de la búsqueda cuantitativa, se hace evidente el interés de la comunidad científica hacia los AE, creciente especialmente en las últimas décadas.

**Gráfica 1.** Relación del número de publicaciones sobre AE en función del tiempo.

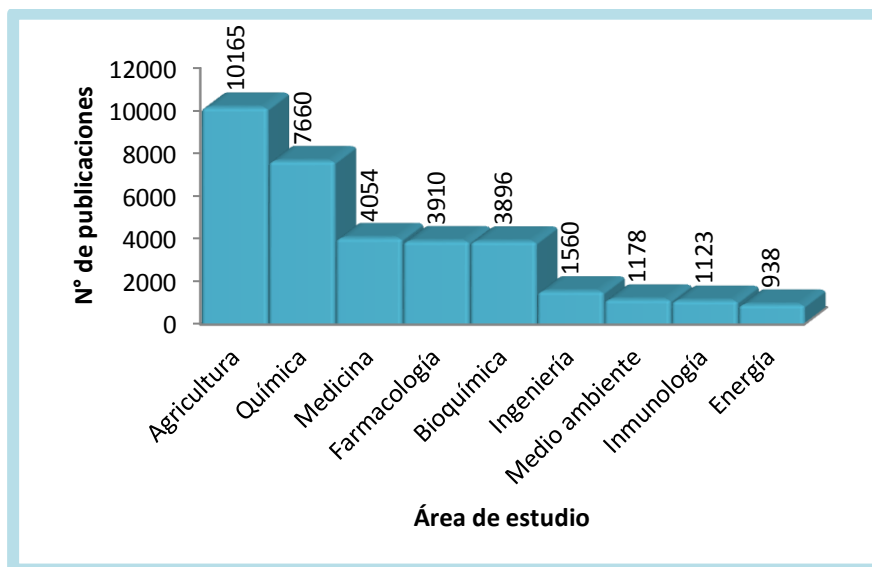


Base de datos: Scopus (Elsevier). Periodo de observación: 1900 - 2010. Ecuación de búsqueda: Article title, abstract. Palabras clave: essential oil. Fecha de consulta: septiembre 2 de 2010.

Este interés puede explicarse por la gran variedad de propiedades que poseen los AE, a saber: antisépticas (*i.e.* bactericidas, antivirales y fungicidas), medicinales y organolépticas, que les permiten tener diferentes aplicaciones, *e.g.*, en la industria farmacéutica, como analgésicos, sedativos, anti-inflamatorios, espasmolíticos, anestésicos locales; en la industria agronómica como supresores de brotes en tubérculos y en el manejo de plagas; en alimentos, como conservantes,

aromatizantes, saborizantes y aditivos; en perfumes como fragancias, en productos después del afeitado y en las industrias cosmética y de aseo personal. Los AE también se emplean en productos sanitarios, en dentistería, en medicina natural y como materia de partida en química fina [1, 3, 9, 10, 14]; pueden usarse para masajes mezclados con aceites vegetales y en aromaterapia [3]. La **Gráfica 2**, representa la polifuncionalidad de los AE, mostrando las 9 disciplinas en las que más publicaciones se han realizado en el periodo de 1990 a 2010.

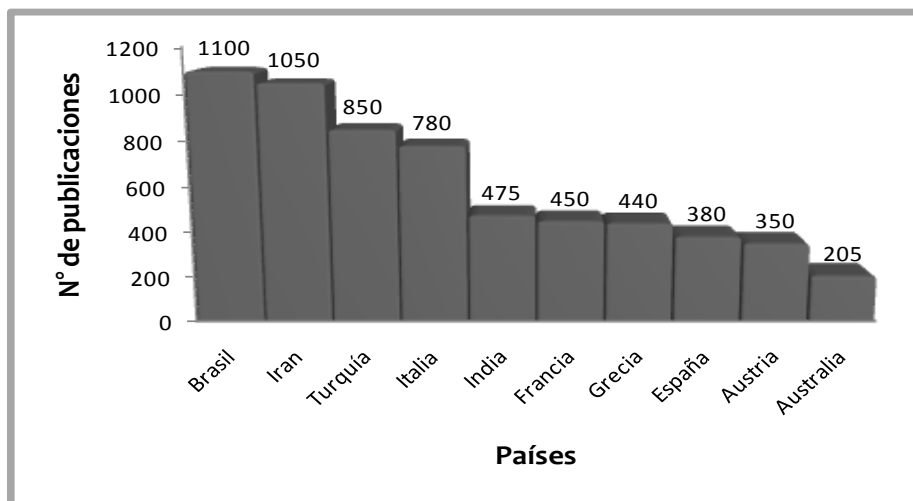
**Gráfica 2.** Relación del número de publicaciones en diferentes áreas de estudio de los AE.



Base de datos: Scopus (Elsevier). Periodo de observación: 1990 - 2010. Ecuación de búsqueda: Article title, abstract. Palabras-clave: essential oil. Fecha de consulta: septiembre 2 de 2010.

En este mismo periodo, se agruparon las instituciones que reportaron mayor número de publicaciones (> 50) según su país de origen. En la **Gráfica 3**, se muestran los 10 mejores resultados; Brasil, Irán y Turquía son los países con mayor participación en el área de investigación de los AE.

**Gráfica 3.** Países con mayor número de publicaciones sobre AE. Resultados parciales de la sumatoria de las instituciones que se registran con más de 50 artículos.



Base de datos: Scopus (Elsevier). Periodo de observación: 1900 - 2010. Ecuación de búsqueda: Article title, abstract. Palabras-clave: essential oil. Fecha de consulta: septiembre 2 de 2010.

El interés por los AE no sólo se restringe a la comunidad científica. El mercado de las fragancias y sabores maneja cifras cercanas a los 30.5 mil millones de USD dólares (2006) [15], los AE constituyen su segmento más grande, con un crecimiento anual del 3.6% para 2009, siendo los Estados Unidos el país con mayor participación (40%). Específicamente las diez esencias más comercializadas (con un 85% del total), son obtenidas de naranja, limón, menta, citronela, cedro, eucalipto, lavanda y lavandín, junto con las que contienen citral [16, 17]; entre las más costosas figuran AE de *patchouli*, geranio, jazmín, rosa y vetiver. Por su lado, el mercado nacional de tipo importador, se basa en la compra de mezclas para sabores y fragancias usadas por industrias de consumo masivo, adquiridas por empresas multinacionales desde sus casas matrices [17].

## 1.1 Generalidades de los AE

El procedimiento más empleado para la producción comercial de AE es la destilación con vapor [1, 3, 9], en donde se aprovecha la doble acción del calor y de la humedad del vapor, para romper las células que contienen el AE. El vapor se genera separadamente en una caldera y se pasa a través del material vegetal compactado en un alambique, la mezcla de vapor y AE pasa por un condensador y se colecta, separándose posteriormente el aceite por decantación [18].

En un AE los compuestos comúnmente encontrados son de tipo terpénico, formados por el rearrreglo de dos (monoterpenos,  $C_{10}H_{16}$ ), tres (sesquiterpenos,  $C_{15}H_{24}$ ) o más unidades de isopreno ( $C_5H_8$ ) y de tipo no terpénico, e.g., fenoles; todos son hidrocarburos y sus derivados oxigenados, llamados terpenoides, en el caso de terpenos que poseen oxígeno en sus estructuras. Estos compuestos pueden ser alcoholes, ácidos, ésteres, lactonas, epóxidos, aldehídos, cetonas, aminas, sulfuros y sus respectivos isómeros ópticos. Adicionalmente, también pueden encontrarse fenilpropanoides, ácidos grasos y sus ésteres [9], que definen en conjunto las propiedades [4] y, por ende, la calidad de un AE.

## 1.2 Análisis de AE por cromatografía de gases

La cromatografía de gases (GC) es un método de separación física en el cual los componentes de una mezcla son distribuidos entre una fase móvil (MP), que es un gas de arrastre ( $H_2$ , He o  $N_2$ ) y una fase estacionaria (SP) que recubre las paredes internas de un tubo capilar llamado columna, que actúa como medio de separación [19]. Las diferencias en el tiempo de residencia de los analitos en cada fase (repartición) a medida que se desplazan a lo largo de la columna, están afectadas por las presiones de vapor y por las distintas afinidades hacia la SP. Cada vez que la molécula entra a la columna es arrastrada hacia el detector por el flujo del gas de arrastre. Consecuentemente, los compuestos que poseen propiedades físicas y

químicas disimiles serán detectados en tiempos diferentes [20, 21]. Dentro de los detectores existentes, el más usado es el de ionización en llama (FID) empleado en el análisis y cuantificación de analitos orgánicos que contiene grupos hidrocarbonados [20]. La identificación de los compuestos que emergen de la columna, podría, en principio, realizarse mediante la comparación de los tiempos de retención ( $t_R$ ) experimentales con los de compuestos estándares; sin embargo, el criterio cromatográfico más empleado consiste es en hacer el paralelo con los índices de retención lineales ( $R_i$ , Véase **Ecuación 1**), donde se utiliza una serie de  $n$ -alcanos como referencia [19]; en lugar de sólo cotejar los  $t_R$ .

$$R_i = 100n + 100 \left( \frac{t_{R,x} - t_{R,a}}{t_{R,d} - t_{R,a}} \right) \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

$t_{R,x}$  =  $t_R$ , del pico x

$t_{R,a}$  y  $t_{R,d}$  son los  $t_R$  del  $n$ -alcano que eluye antes y después del pico x

$n$  = al número de carbonos del  $n$ -alcano que eluye antes del pico x.

Además, se utilizan criterios espectroscópicos, *i.e.*, los espectros de masas (relación masa/carga de los iones formados versus su abundancia), obtenidos del análisis GC acoplada a espectrometría de masas (MS) y su comparación con los de compuestos estándar registrados en una base de datos de masas [22, 23].

En cuanto a la cuantificación de los componentes de las muestras, los procedimientos se basan en la comparación de sus áreas, ya sea con las de una disolución patrón (método de estándar externo) analizada bajo las mismas condiciones cromatográficas, o con el área de un compuesto estándar introducido a una concentración conocida en la muestra (método del estándar interno ( $I_{std}$ )). También se emplea el procedimiento de normalización simple, donde el área de cualquier pico cromatográfico se expresa como un porcentaje del área total de todos los picos [23].

### 1.3 Pruebas fisicoquímicas

Las pruebas más reconocidas para AE y especias son establecidas por la Organización Internacional para Estándares (ISO), se usan ampliamente para ayudar a establecer la identidad de los AE y se basan en que los AE genuinos tienen valores y parámetros característicos para estos análisis. Lo que permite saber por comparación, si una muestra bajo estudio cumple con esos patrones de referencia establecidos para cada determinación [24]. Dentro de las pruebas fisicoquímicas para el control de calidad de los AE, existen aquellas de tipo general, a saber:

- **Densidad relativa (D) a 20°C, norma ISO 279:** se define como la relación entre la masa de un volumen dado de AE y la de un volumen igual de agua destilada, medidas a 20°C [24]. Los valores de densidad bajos se deben a un contenido de hidrocarburos monoterpénicos alto, mientras que densidades más elevadas indican mayor contenido de compuestos oxigenados, e.g., fenoles [26].
- **Índice de refracción ( $n_D^t$ ), norma ISO 280:** mide el grado de cambio de dirección y velocidad de la luz al pasar desde un medio a otro [27]. El índice de refracción disminuye con el aumento de la temperatura y está intrínsecamente relacionado con la densidad una sustancia [26].
- **Rotación óptica ( $\alpha_D^t$ ), norma ISO 592:** mide el ángulo, en miliradianes, descrito por la polarización del plano de una radiación luminosa de una longitud de onda de  $589.3 \pm 0.3$  nm, que corresponde a la línea D del sodio, cuando esta luz viaja a través de un espesor de 1 cm de AE, a una temperatura dada [28]. La naturaleza enantiomérica del AE puede ser levorotatoria ( $^L, l, -$ ), lo que significa que la muestra rota el plano de la luz polarizada a la izquierda; o viceversa (dextrorotatoria= $^D, d, +$ ) [9].

- **Contenido de humedad (H): valoración de Karl Fisher, ISO 11021 [29]:** con este método se determina mediante una valoración bivoltamétrica, el agua contenida en una muestra; el electrodo de doble punta de platino del equipo, se somete a una corriente eléctrica constante, que cambia cuando en el medio de reacción empieza a haber yodo libre del agente titulador, a causa de la neutralización total del agua en la muestra; con el fin de mantener constante la corriente eléctrica inicial, se produce un cambio en el potencial, que es la indicación del punto final de la valoración.
- **Punto de congelación (FP), norma ISO 1041 [30]:** es la temperatura constante o la temperatura máxima, observada cuando el AE en un estado líquido super-enfriado, libera el calor latente de fusión.
- **Punto de inflamación (FLP), norma ISO/TR 11018 [31]:** temperatura corregida a una presión de 101.325 kPa bajo la cual, en un recipiente cerrado, el líquido en evaluación, emite vapores que con el aire, producen una mezcla inflamable.

Las siguientes son pruebas para constituyentes específicos, e.g.:

- **Índice de acidez (AV), norma ISO 1242:** determina los mg de KOH necesarios para neutralizar los ácidos libres presentes en 1 g de AE [32]. Este indicador es importante, dado que la mayoría de procesos de degradación de los AE son catalizados por medios acuosos ácidos, en donde ocurren reacciones de hidratación, deshidratación, ciclaciones y fundamentalmente hidrólisis [33].
- **Índice de ésteres (EV), norma ISO 709 [34]:** determina los mg de KOH requeridos para neutralizar el ácido liberado por la hidrólisis de los ésteres presentes en 1 g de aceite esencial.

#### 1.4 Criterios de calidad de los AE

Para definir “calidad” no existe un criterio universal. En general, “calidad” es la combinación de atributos o características de un producto que tienen relevancia en su grado de aceptabilidad por parte del usuario [35] y la industria de los AE no es la excepción. Sólo los AE más reconocidos, *i.e.* los comercialmente más importantes poseen normas ISO que establecen los rangos bajo los cuales puede(n) variar el contenido de su(s) componente(s) mayoritario(s) y sus propiedades fisicoquímicas; *e.g.*, para el AE de sándalo (*Santalum álbum* L.) se ha establecido que el santalol, su componente de interés comercial debe estar presente en un 90% (ISO 3518, 2002) [36], mientras que para el AE de limonaria la norma ISO 3217 de 1974 fija un contenido de citral entre el 70 y 75% [37]; el AE de patchouli (ISO 3757, 2002) es aceptado o rechazado en el mercado dependiendo de su contenido de patchoulenol [38]; la norma ISO 4731 para el AE de geranio establece un porcentaje mínimo de contenido de geraniol de acuerdo con su lugar de origen, a saber: 42% para el AE de Borbón, de 35% para el Marruecos y de 40% tanto para el de Egipto y el de China [39].

De este modo, la calidad de un AE se relaciona básicamente con su composición. Para los AE que no cuentan con norma ISO los trabajos de investigación que hacen referencia a calidad, buscan aumentar el contenido del compuesto (por lo general, el mayoritario) que sea apetecido en la industria, ya sea por su aplicabilidad en productos de uso común o por su actividad biológica, *e.g.*, la *Mentha longifolia* L. de Sur África en la que el tipo de secado de sus hojas influye notablemente en el contenido de mentona [40]; la albahaca santa (*Ocimum tenuiflorum*), en la que se observó que al cosechar solo las ramas secundarias se obtiene mayor contenido de AE y de metil-eugenol [41].

A pesar de que la composición y, por ende, el análisis cromatográfico predominan como criterios de calidad para los AE, las propiedades fisicoquímicas son también un criterio útil de calidad, que no sólo permiten diferenciar un AE [42, 43], sino también obtener una relación directa con la composición [43] dada la estrecha relación existente entre sí [8].

## 2. PLANTAS BAJO ESTUDIO

### 2.1 Familia Verbenaceae

Las plantas de la familia Verbenaceae poseen alta diversidad botánica, amplia distribución en todo el mundo y variabilidad en sus usos [44]. El género *Lippia* perteneciente a esta familia, incluye aproximadamente 200 especies de hierbas, arbustos y pequeños árboles, la mayoría de ellos usados como remedios para problemas gastrointestinales y respiratorios. Esta familia muestra además una rica diversidad genética, con capacidad de sintetizar una gran variedad de constituyentes en los AE de plantas que crecen en diferentes partes del mundo [45].

#### 2.1.1 *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown ex Britton & Wills

*Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (*L. alba*), un arbusto aromático, con ramas cuadrangulares, alcanza una altura *c.a.* de 1.7 m [46], está ampliamente distribuido casi en todo el continente Americano (empezando desde Centro América) [47], se desarrolla bien tanto en regiones tropicales como subtropicales [48], su gran capacidad de adaptación se ve reflejada en su diversidad química, influenciada no sólo por factores de orden genético endógeno [49], sino también por variaciones de tipo externo [48, 50-53], por lo que presenta 7 quimiotipos de acuerdo con los componentes mayoritarios de su AE [46].

En forma de infusión, macerada en compresas y en baños, a esta planta se le atribuyen propiedades antiespasmódica, antipirética, antiinflamatoria, emenagoga, diaforética y analgésica [54]. La planta también se usa como expectorante y astringente [48]. Su AE posee actividades antiviral [55, 56] y antioxidante [57, 58] y sus extractos, actividad antimicrobiana [59 - 61].

*L. alba* es una especie que llama la atención por su potencial agronómico [62], produce alrededor de 5 ton/ha de biomasa foliar en 4 cortes al año [63], considerada como posible sustituto para los AE de alcaravea, eneldo y *Menta piperita* [64], ha sido muy estudiada en Brasil, que reporta 33 publicaciones en un periodo de 20 años, lo que está asociado tal vez al alto número de usos terapéuticos que posee la planta en medicina folclórica [65]. Le siguen Colombia e India que participan con 9 y 7 artículos, respectivamente. La mayoría de las investigaciones han sido realizadas en áreas de química de alimentos, agricultura y medicina, como campos de aplicación más importantes; es evidente el auge investigativo que posee la especie (Véase la **Gráfica 4**), que pasó de tener 48 artículos a mediados de 2009 a 67 para la fecha de consulta (02-09-2010).

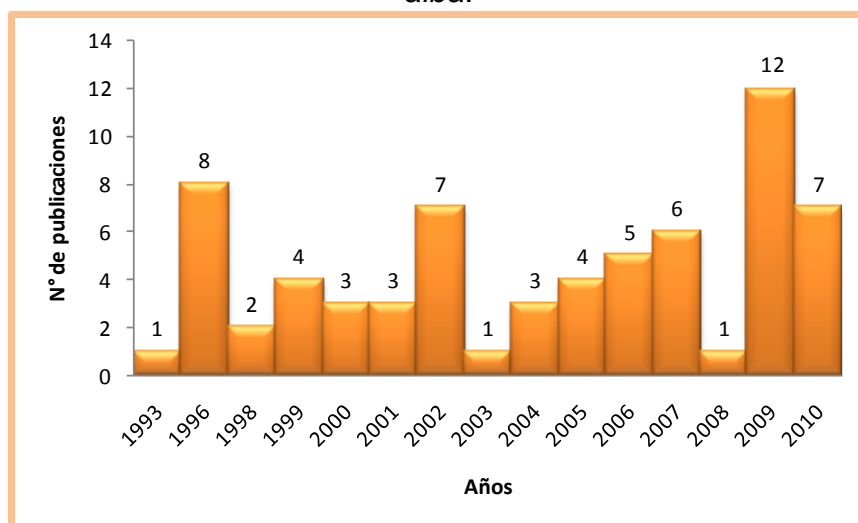
El quimiotipo “carvona” del AE de *L. alba* es considerado uno de los quimiotipos más productivos (obtención de biomasa y AE) y estables [62], el cual es objeto de estudio del presente trabajo; en la **Tabla 1**, se muestra la variación en sus componentes mayoritarios de acuerdo con su origen geográfico.

### **2.1.2 *Lippia organoides* H.B.K.**

*L. organoides* es un arbusto o árbol delgado muy aromático [68], de 1.5 m de altura [69], presenta hojas ovaladas con el ápice redondeado, flores blancas y pequeñas [70] nativo de Centro (México, Guatemala, Cuba) y Sur América (Guayana, Venezuela, Brasil y Colombia), principalmente en la región del Amazonas [68]. Es

una especie dominante en ambientes desfavorables, en especial, en zonas semiáridas caracterizadas por suelos secos, pobres en nutrientes y de alta incidencia lumínica [71].

**Gráfica 4.** Registro cronológico de las publicaciones realizadas sobre el AE de *L. alba*.



Base de datos: Scopus (Elsevier). Periodo de observación: 1900 - 2010. Ecuación de búsqueda: Article title, abstract. Palabras clave: “*Lippia alba*” and “essential oil”. Fecha de consulta: septiembre 2 de 2010.

**Tabla 1.** Componentes mayoritarios del AE de *L. alba*, quimiotipo “carvona” según su origen geográfico.

<i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E. Brown ex Britton & Wills				
Origen	Componentes mayoritarios del AE, %			
	Limoneno	Carvona	Otros	Nombre común
Brasil [66]	29.3	28.1	Germacreno D:19.8; mirceno: 10.0	Erva cidreira, carmelitana, falsa-melissa.
Noreste de Brazil [66]	30.4	54.7	p-Cimeno: 10.6	
Cuba [65]	6.5	29.0	Piperitenona: 8.3; guaieno: 11.5	Quita dolor, toronjil isleño.
Perú [67]	5.1	63.4	Germacreno D: 5.6	
Costa Rica [48]	24.9	62.4	Germacreno D: 2.7, mirceno: 1.2	Juanilama
Colombia [57]	32.6	57.2	Biciclosesquifelandreno: 7.3; piperitenona: 1.23.	Pronto alivio, curatodo, orégano de cerro.
Argentina [50]	-	60.0	-	Salvia morada
Brazil (Picaricaba)[62]	34.2	50.2	-	Ginger grass

*L. origanoides* tiene un aroma característico del orégano (quimiotipo rico en carvacrol), por lo que puede ser empleada como su sustituto [72] en la preparación de condimentos y para propósitos medicinales [73]. Su decocción se emplea para estimular el apetito, como remedio gastrointestinal, en el tratamiento de flujo vaginal, dolores menstruales y fiebre, como antiséptico para la boca, la garganta y las heridas [73]. El AE posee actividad antimicrobiana [70], antiviral [55], antifúngica [68], antioxidante [74], atribuidas al alto contenido de alcoholes fenólicos (*i.e.* carvacrol y timol) [1] y repelente [75]. En la **Tabla 2**, se muestran diferentes estudios realizados sobre la composición química del AE de esta especie.

En realidad, la información disponible sobre la planta es limitada; *Scopus* de *Elsevier* registra un total de 10 publicaciones. Dado que son investigaciones recientes (Véase la **Tabla 3**), se concluye que su estudio hasta ahora está comenzando y que falta mucho por conocer sobre esta especie. Las áreas de aplicación corresponden a las de alimentos y de agricultura y ciencias biológicas, siendo Colombia y Brasil los países origen de las publicaciones.

## **2.2 Familia Poaceae**

Los pastos de limón (*Cymbopogon* spp., Fam Poaceae) son hierbas perennes con numerosos tallos rígidos, que ascienden desde un corto rizoma, son autóctonos de áreas tropicales y semitropicales de Asia y se cultivan en Centro y Sur América, África y otros países tropicales [7], donde se adaptan fácilmente [79]. Dado que la floración nunca se ha observado en el cultivo, la identificación de la especie se basa en la composición química de su AE [80], que constituye alrededor del 1.5% del peso seco de sus hojas que poseen un aroma característico a limón [81].

**Tabla 2.** Componentes mayoritarios del AE de *L. organoides*.

Compuestos mayoritarios del AE, %			
Origen	Carvacrol	Timol	otros
Oriximiná [68]	38.6	18.6	<i>p</i> -Cimeno: 10.3; $\gamma$ -terpineno: 4.1; linalool: 2.5; timil-metil-éter: 2.2; <i>trans</i> - $\beta$ -cariofileno: 5.9.
Belém [76]	0.0	20.6	-
Minas Gerais [76]	0.4	38.4	-
Piauí (Brasil) [70]	42.9	8.4	$\gamma$ -Terpineno: 10.5; metil-timol: 8.7; <i>p</i> -cimeno: 15.8.
São Paulo [70]	6.7	20.6	$\gamma$ -Terpineno: 22.4; <i>p</i> -cimeno 27.8.
Anapurus Maranhão [69]	-	1.0	1,8-Cineol: 66.0; $\alpha$ -terpineol: 12.0; $\gamma$ -terpineno: 3.7; $\gamma$ 4-terpinenol: 3.0; $\gamma$ metiltimol 0.7%; nuevo quimiotipo.
Santander, Cauca, Nariño, Boyacá [77, 78].	51.8	-	<i>p</i> -Cimeno: 10.1; $\gamma$ -terpineno:4.4;
	-	-	<i>p</i> -Cimeno: 15.7; 1.8-cineol: 10.9
	32.9	14.4	<i>p</i> -Cimeno: 10.9, $\alpha$ -terpineno:3.1, $\beta$ -mirceno: 2.8.
	-	-	$\alpha$ - y $\beta$ -Felandrenos (6), <i>p</i> -cimeno (12), limoneno (5).
	40	11	<i>p</i> -Cimeno (13), $\gamma$ -terpineno (11).
	-	56	<i>p</i> -Cimeno (9), $\gamma$ -terpineno (5).

**Tabla 3.** Relación del número de publicaciones en dos bases de datos para *L. organoides*.

Número de publicaciones								
Base Scopus	Año						País	
	2010	2009	2008	2007	2006	2004	Brasil	Colombia
	3	3	1	1	1	1	3	7

Base de datos : Scopus (Elsevier). Periodo de observación: 1990 - 2010. Ecuación de búsqueda: Article title, abstract. Palabras clave: “*Lippia organoides*” and “essential oil”. Fecha de consulta: septiembre 3 de 2010.

### 2.2.1 *Cymbopogon flexuosus* Steud. Watts

*Cymbopogon flexuosus* (Steud.) Wats, también conocido como pasto de limón cochín o del Este de India, contiene de 75 a 85% de citral en su AE, compuesto que define su valor comercial [80]; este AE es considerado como candidato para innovar las estrategias terapéuticas contra el cáncer, ayudar al manejo del estrés y ha mostrado tener propiedades antifúngicas, antimicrobiales [81] y repelentes contra plagas de los granos [82].

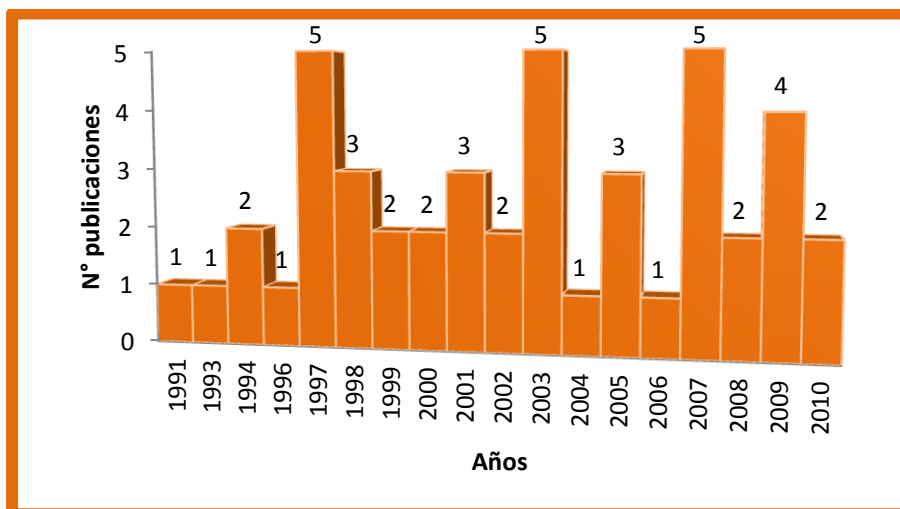
El citral, constituyente mayoritario del AE de *lemongrass*, es el nombre dado a la mezcla natural de dos aldehídos monoterpénicos acíclicos: geranial (*trans*-citral, citral A) y neral (*cis*-citral, citral B) [80]; posee un olor característico a limón, que le proporciona una importancia considerable en la industria de sabores y alimentos [7, 83], es también empleado en la síntesis de metil- y  $\beta$ -iononas, de vitamina A y E y es reconocido por sus actividades antifúngica, antibacterial e insecticida [7]. En la **Tabla 4**, se muestran los componentes mayoritarios del AE de *C. flexuosus*, lo que revela la existencia de varios quimiotipos.

Según la búsqueda cuantitativa, la India es uno de los países donde más estudios se han hecho sobre esta especie, dado que su AE hace parte de su comercio. Las disciplinas que más publicaciones han registrado en bases de datos indexadas son agricultura (34), química (15), bioquímica (12) y farmacología (11); el interés sobre la planta sigue vigente (Véase la **Gráfica 5**), a pesar de que la primera publicación sobre el AE de limonaria apareció en 1979.

**Tabla 4.** Componentes mayoritarios de AE de *C. flexuosus* de India.

Origen	Componentes mayoritarios, %			
	Geranial	Neral	Geraniol	Otros
India [83]	-	-	20.1	Acetato de geranilo: 12.2; $\alpha$ -bisabolol: 8.42; isointermedeol: 25.0; limoneno: 3.5; borneol: 1.9.
Oeste de la India [7]	41.0	30.0	5.0	$\beta$ -Mirceno: 15; nerol y otros volátiles ( $\leq$ 5%).
India Nororiental [82]	33.1	26.1	8.7	Acetato de geranilo: 18.9 <i>C. flexuosus</i> var. <i>flexuosus</i> .
India Nororiental [84]	14.9	-	18.2	Limoneno: 1.3; citronelol: 30.0; acetato de geranilo: 16.2; acetato de citronelilo: 6.1 <i>C. flexuosus</i> var. <i>arunachalis</i> .
India Nororiental [84]	0.2	-	-	Limoneno: 7.6; elemicina: 63.2; 1,10-di- <i>epi</i> -cubenol: 7.6 <i>C. flexuosus</i> var. <i>assamensis</i> .
	-	-	-	Limoneno: 3.2; <i>trans</i> -metil-isoeugenol: 21.1 <i>C. flexuosus</i> var. <i>sikkimensis</i> .

**Gráfica 5.** Registro cronológico de las publicaciones realizadas sobre el AE de *C. flexuosus*.



Base de datos : Scopus (Elsevier). Periodo de observación: 1990 a 2010. Ecuación de búsqueda: Article title, abstract. Palabras clave: “*Cymbopogon flexuosus*” and “essential oil”. Fecha de consulta: septiembre 3 de 2010.

### 3. QUIMIOMETRÍA

Svante Wold introdujo en 1972 el término “kemometri” o “quimiometría” por la combinación de las palabras “kemo”, para química y “metri”, de medida [85]. La quimiometría es la aplicación de métodos estadísticos y matemáticos a la química para designar o seleccionar procedimientos, optimizar experimentos y obtener máxima información mediante el análisis de datos [85, 86]. La quimiometría provee un gran número de herramientas como el análisis de componentes principales (PCA), la regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS), entre otras, para el reconocimiento de patrones, calibración y clasificación, métodos que pueden incrementar la velocidad y la objetividad en el manejo de la información [86].

#### 3.1 Análisis de componentes principales

Análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) es el método más empleado para calcular variables latentes (componentes principales; PC), su objetivo es la reducción de dimensiones mediante la obtención de un nuevo sistema de coordenadas, formado por esas variables latentes, que son ortogonales entre sí, y representan eficazmente las distancias que tienen los objetos (muestras) en el espacio inicial de mayor número de dimensiones (variables) [87, 88]. La proyección de los objetos en este subespacio de menor número de dimensiones, facilita por lo tanto, la interpretación de sus similitudes y diferencias y la identificación de sus características o patrones de comportamiento [88, 89, 90]. El desarrollo matemático de la técnica se presenta con mayores detalles en el trabajo [88].

En este proyecto, PCA ha sido empleado con el fin de reconocer tendencias de agrupación en cada uno de los AE analizados y para reconocer las características que presentan de acuerdo con sus propiedades fisicoquímicas y su composición.

## 3.2 Métodos de regresión

Hoy en día, la calibración multivariable se ha convertido en una parte indispensable en la química analítica moderna. Dentro de los diferentes métodos de regresión existentes para este tipo de calibración, que expresa la dependencia de una variable(s) respuesta sobre muchas variables independientes [91]; los métodos basados en análisis de factores como mínimos cuadrados parciales (PLS) y regresión de componentes principales (PCR), son los más empleados, dada su habilidad para superar problemas de colinealidad en los datos [92, 93].

### 3.2.1 PCR y PLS

El modelo estructural de PLS y PCR es básicamente el mismo, los datos son transformados en un nuevo conjunto de variables latentes o PC, que son empleadas para la regresión con una variable dependiente y [91, 93]. De este modo, estos métodos son una combinación de PCA que descompone los datos en factores de peso (*loadings*) y puntos (*score*, representación de los datos en el espacio de las variables latentes) y regresión de mínimos cuadrados [85]. Se diferencian entre sí, en que PLS usa los PC que están mayormente relacionados con  $y$ , mientras que PCR emplea los PC que contienen la mayor varianza de los datos. Así, el criterio para la selección de las variables latentes en PLS es la máxima covarianza entre los puntos  $x$  e  $y$ , dado que la covarianza combina alta varianza de los datos originales y alta correlación con la propiedad que se desea modelar [91, 93]. El desarrollo matemático de los métodos se encuentra en la monografía [91]. En el presente trabajo estas metodologías son usadas para predecir el contenido de los compuestos mayoritarios de los AE estudios a partir de las PFQ, dentro de los modelos obtenidos se eligen los que poseen mejor capacidad de ejecución de acuerdo con los siguientes criterios que se emplean para ese fin.

### 3.2.2 Validación de modelos

Los criterios de funcionamiento de un modelo se basan en el error de predicción (residuales), (diferencia entre el valor experimental y el predicho) y son de dos tipos, los criterios de ajuste que se usan para seleccionar el número de variables regresoras que debe contener un modelo y los de ejecución, que permiten conocer su capacidad de predicción [91, 93]:

Para evaluar la ejecución de un modelo, los siguientes criterios son los más empleados:

- **Suma de cuadrados del error residual de predicción (PRESS):** en general, disminuye con el incremento de la complejidad del modelo, debido a que éste se adapta muy bien a los datos empleados para su elaboración (datos de calibración).

$$PRESS = \sum_{i=1}^n (y_i - y'_i)^2 \quad \text{Ecuación 2.}$$

Donde  $y_i$  son los valores experimentales e  $y'_i$  los valores predichos.

- **Coefficiente de determinación ( $R^2$ ):** expresa la proporción de varianza que es explicada por el modelo; aumenta con el incremento del número de variables empleadas:

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - y'_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - y_{prom})^2} \quad \text{Ecuación 3.}$$

Con  $y_{prom}$  la media de los valores experimentales.

- **Ajuste del modelo:** En general, un modelo debe tener un buen poder de predicción. R-cuadrado ajustado ( $R^2_{adj}$ ) sirve para comparar modelos con diferente número de variables y caracterizar su ajuste, permitiendo seleccionar el más apropiado, teniendo en cuenta que entre dos modelos es preferible aquel que tenga un valor mayor de  $R^2_{adj}$ .

$$R^2_{Adj} = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - y'_i)^2 * (n-1)}{\sum_{i=1}^n (y_i - y_{prom})^2 * (n-m-1)} \quad \text{Ecuación 4.}$$

Con  $m$  igual al número de variables regresoras y  $n$  el número de objetos.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Pre-tratamiento de los AE

Los AE fueron extraídos mediante destilación con arrastre de vapor. Los aceites aislados de *L. alba* y *L. origanoides*, provinieron de los cultivos experimentales de la zona rural de Socorro (Departamento de Santander), mientras los de *C. flexuosus* se obtuvieron de cultivos establecidos en el Complejo Agroindustrial de CENIVAM. Antes de ser analizados fisicoquímicamente, todos los AE se secaron con sulfato de sodio anhidro (MERCK, Darmstadt, Alemania), se mezclaron con carbón activado (ABC, EE.UU.) y se filtraron, con el fin de remover sólidos suspendidos que pudieran estar presentes como resultado del proceso destilativo.

### 4.2 Análisis cromatográfico

Para el análisis cromatográfico, 50  $\mu$ L del AE, junto con 4  $\mu$ L de *n*-tetradecano (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), -empleado como estándar interno-, se disolvieron en diclorometano grado analítico (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EE.UU.) hasta un volumen final de 1 mL.

#### 4.2.1 Análisis por GC-MS

Los compuestos presentes en cada uno de los AE bajo estudio, se identificaron con base criterios cromatográficos (tiempos e índices de retención, uso de patrones para los componentes mayoritarios) y espectroscópicos (comparación de sus espectros de masas con los registrados en bases de datos y con los de patrones certificados).

La separación de dichos componentes se realizó en columnas de naturaleza apolar y polar. Para el análisis apolar, se empleó una columna capilar de sílice fundida DB-5MS (J&W *Scientific*) de 60 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno (D.I.) y recubierta con un espesor ( $d_f$ ) de 0.25  $\mu\text{m}$  de 5%-fenil-poli(metilsiloxano). Los cromatogramas y los espectros de masas se obtuvieron con un cromatógrafo GC 6890 Plus (*Agilent Technologies*, Palo Alto, CA, EE.UU.) equipado con un detector selectivo de masas MSD 5975 (impacto de electrones con energía de ionización (EI) de 70 eV; *Agilent Technologies*) y un inyector automático 7863, inyección *split/splitless* (relación *split* 1:30) (Véase **Figura 2**). La temperatura del horno se programó desde 45°C (5 min) hasta 150°C (2 min) subiendo a una razón de 4°C/min; luego, se incrementó a 5°C/min, hasta llegar a 250°C (5 min) y finalmente se calentó a una razón de 10°C/min, hasta alcanzar 275°C (15 min). Para el análisis en SP polar, se empleó una columna DB-WAX (J&W) de 60 m x 0.25 mm D.I. x 0.25  $\mu\text{m}$   $d_f$ , recubierta con poli(etilenglicol), se usó una rampa de calentamiento que empezó desde 45°C (5 min) aumentando a 3°C/min hasta 150°C (3 min), y a 4°C/min, hasta 220°C (5 min); este análisis se llevó a cabo en un cromatógrafo *Agilent Technologies 6890 Network, Series GC*, acoplado a un detector selectivo de masas 5973 (ionización impacto de electrones, EI, 70 eV; *Agilent Technologies Network*) e inyección *split/splitless* (relación *split* 1:30) (Véase **Figura 3**). En ambos casos, las temperaturas del puerto de inyección, cámara de ionización y línea de transferencia se establecieron a 250, 230 y 285°C respectivamente. Como gas transportador se empleó helio (99.995%, Aga Fano, Bucaramanga, Colombia), con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 155 kPa, una velocidad lineal de 27 cm/s (1 mL/min) de flujo constante. Los espectros de masas y las corrientes iónicas totales se obtuvieron mediante barrido automático (*full scan*) en un rango de masas  $m/z$  30-300 a 5 *scans/s* y fueron adquiridos y procesados por el *software Hewlett-Packard MS- ChemStation G1701-DA*, con librerías espectrales WILEY, NIST y ADAMS.

**Figura 2.** Cromatógrafo GC 6890 Plus acoplado con un detector selectivo de masas MSD 5973, *Agilent Technologies*.



#### 4.2.2 Análisis GC-FID

Para la cuantificación de los componentes de los AE, se emplearon los métodos de normalización de áreas, método de estándar interno y externo, con el uso de patrones certificados marca Sigma-Aldrich (carvona al 98%, limoneno al 97%, carvacrol al 98%, *p*-cimeno al 97%, citral al 97%, geraniol al 98% y timol al 99%). Los datos cromatográficos se adquirieron con un cromatógrafo de gases GC 7890 (*Agilent Technology*) equipado con FID, un inyector *Split/splitless* (relación *Split* 1:30) y un sistema de procesamiento de datos (*HP-ChemStation* Rev. B.03.02 [341]) (Véase **Figura 4**). La temperatura del detector y el inyector se mantuvieron a 250°C. Para la separación y determinación de los índices de retención lineales se usó una columna DB-5 (J&W Scientific) 60 m x 0.25 mm D.I. x 0.25  $\mu\text{m}$   $d_f$ , de 5%-

fenil-poli(metilsiloxano). La temperatura del horno se programó de manera idéntica al análisis GC-MS apolar descrito anteriormente. Como gas de arrastre se usó helio (99.995%, Aga Fano), con una presión de entrada a la cabeza de la columna de 170 kPa, una velocidad lineal de 22.95 cm/s (1 mL/min) de flujo constante. En el FID, se usaron los gases hidrógeno y aire, a 30 y 300 mL/min, respectivamente, y nitrógeno (30 mL/min) como gas *makeup*.

**Figura 3.** Cromatógrafo *Agilent Technologies 6890N Network Series GC*, acoplado a un espectrómetro de masas *Agilent Technologies 5975 Inert XL*.



Para la cuantificación con estándar interno se empleó *n*-tetradecano; en el método de cuantificación con estándar externo, para cada patrón se prepararon soluciones con concentraciones menores y superiores a las halladas por el método de estandarización interna, para cada uno de los compuestos mayoritarios. Se construyeron curvas de calibración para el limoneno (4700, 10000, 15300, 21200, 30200, 41900, 50700 y 60000 ppm), la carvona (5200, 10400, 15200, 20400, 30300, 40200, 51900 y 5900 ppm), el carvacrol (5488, 10192, 14700, 18816, 28910, 37828, 47432 y 57134 ppm), el timol (2886, 5771, 11244, 16616, 20796,

31442 y 39402 ppm) y el citral (4900, 9750, 14972, 20205, 31210, 40715, 49001 y 58456 ppm).

**Figura 4.** Cromatógrafo de gases GC 7890 (*Agilent Technology*) equipado con FID.



#### **4.3 Criterios de calidad**

Los criterios de calidad para los AE bajo estudio, se establecieron a partir de la base de datos generada con los valores de composición y PFQ de los AE trabajados, mediante la determinación de los intervalos de confianza (95%) para cada una de las pruebas que se evaluaron. Para el AE de *C. flexuosus* se realizó una comparación con los valores establecidos en la norma ISO-4718 para este AE.

#### **4.4 Análisis de las propiedades fisicoquímicas**

Todas las pruebas fisicoquímicas evaluadas en los AE se realizaron según las normas internacionales ISO, descritas en la Sección 1.3. En las **Tablas 5 y 6**, se describen los reactivos y equipos empleados en cada una de las pruebas y en la

**Figura 5**, se muestran los montajes utilizados. Adicionalmente, a los equipos ya detallados, se aclara que para pesar se empleó una balanza analítica AL204 de Mettler Toledo, con una precisión de  $\pm 0.0001$  g y para controlar la temperatura en las pruebas donde era necesario mantenerla constante, se usó un baño refrigerante Cole-Palmer (Chicago, IL, EE.UU.).

**Tabla 5.** Reactivos empleados para la evaluación de las pruebas fisicoquímicas.

Reactivo	Descripción	Norma ISO
Agua grado HPLC	MERCK - Darmstadt, Alemania	$n_D^t$ , ISO 280
<i>p</i> -Cimeno, 97%	Sigma-Aldrich – Buchs, Suiza	
Benzoato de bencilo, 99%	MERCK - Darmstadt, Alemania	
1-Bromonaftaleno, 99%	MERCK - Darmstadt, Alemania	$\alpha_D^t$ ; ISO 592
R-(+)-Limoneno, 97%	Sigma-Aldrich – Buchs, Suiza	
Etanol, 99.8%	Riedel-de Haën, Alemania	$\alpha_D^t$ , ISO 592; D, ISO 279; AV, ISO 1242; EV, ISO 709
Titrant 5	MERCK, Darmstadt, Alemania	H, ISO 11021
Metanol 99%	Riedel-de-Haën, Alemania	
Hielo seco	Adquirido en el comercio local	FP, ISO 1041
Hidróxido de potasio	Riedel-de-Haën, 85%	AV, ISO 1242; EV, ISO 709
Biftalato de potasio	Carlo Erba, 99.8%, Haute Normandie	
Fenoftaleína	J.T. Baker, EE.UU.	
Ácido clorhídrico	MERCK, 35%, Darmstadt, Alemania	EV, ISO 709

**Tabla 6.** Equipos empleados para la evaluación de las pruebas fisicoquímicas, según las normas ISO.

Equipos	Norma ISO
Picnómetro de 9.835 mL (BRAND, Wertheim, Alemania; <b>Figura 5A</b> )	D, ISO 279
Refractómetro tipo <i>Abbe</i> ATAGO NAR-1T (Tokio, Japón; <b>Figura 5B</b> ), rango de medición de 1.300 a $1.700 \pm 0.0002$ .	$n_D^t$ , ISO 280
Polarímetro ( <i>Optical Instruments</i> ) con lámpara de sodio (589 nm), escala de círculo completo (0 a 180° derecha e izquierda; <b>Figura 5C</b> ), con portamuestras de 10 y 5 cm de longitud.	$\alpha_D^t$ , ISO 592
Titulador volumétrico <i>Karl Fischer</i> (METTLER TOLEDO DL31, Véase <b>Figura 5D</b> ).	H, ISO 11021
<i>Data logger/thermometer</i> HH306A (Omegaette, EE.UU.), rango de medida -200 a 1370 °C $\pm 0.2$ , con doble entrada para termocupla tipo K (Véase <b>Figura 5E</b> )	FP, ISO 1041
<i>SetaFlash series 3 tester</i> , con copa cerrada, rango de temperatura ambiente a 300 °C y capacidad de 2 a 4 mL de muestra, <b>Figura 5F</b> .	FLP, ISO/TR 11018
Bureta doble clase A, BRAND, de $2 \pm 0.01$ mL, <b>Figura 5G</b>	AV, ISO 1242
Bureta clase B, BRAND, de $25 \pm 0.05$ mL, frascos de saponificación de 100 mL, con cuello esmerilado con condensadores de reflujo, <b>Figura 5H</b> .	EV, ISO 709

#### 4.5 Análisis estadístico

El análisis de los datos multivariable se realizó con el *software* gratuito R, Versión 2.9.1 (Bell Laboratories, Vienna, Austria) [94]; los datos se organizaron en matrices ( $n \times m$ ), de  $n$  objetos u observaciones ubicados en filas, donde cada una constituye una muestra de AE diferente; y en  $m$  variables colocadas en columnas, que representan las PFQ o la composición. Con el fin de tener una idea sobre la distribución de los datos, reconocer la presencia de asimetrías e identificar valores atípicos [95], se construyeron histogramas para cada una de las propiedades fisicoquímicas.

**Figura 5.** Equipos y montajes empleados durante la determinación de las propiedades fisicoquímicas de AE, según las normas internacionales ISO.

**5.A** Picnómetro BRAND y vaso refrigerante, norma ISO 279.



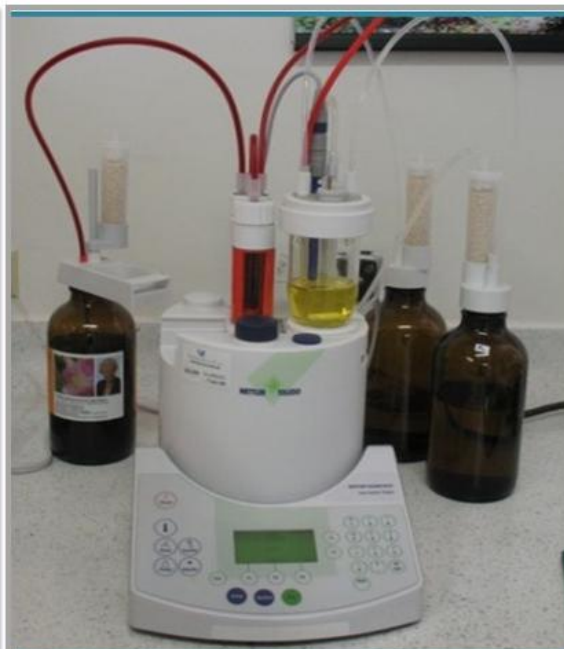
**5.B** Refractómetro tipo Abbe ATAGO NAR-1T, norma ISO 280.



**5.C** Polarímetro *Optical Instruments*, norma ISO 592.



**5.D** Titulador volumétrico Karl-Fischer, METTLER-TOLEDO DL31, norma ISO 11021.



**Figura 5, Continuación.**

**5. E** Data logger/thermometer  
HH306A, Omegaette, norma ISO 1041.



**5.F** SetaFlash tester series 3, con  
copa cerrada, norma ISO 11018.



**5. G** Bureta doble clase A, BRAND,  
norma ISO 1242



**5. H** Bureta clase B (BRAND), frascos de  
saponificación de 100 mL, norma ISO 709.



**4.5.1 Reconocimiento de patrones:** PCA se usó como un método estadístico para sugerir la estructura de correlación del conjunto de datos y para analizar las tendencias de las variables en relación a las características estudiadas [88, 96], para este procedimiento los datos fueron centrados y escalados (normalizados), según la **Ecuación 5**, para dar a cada variable la misma importancia inicial.

$$Normalización = \frac{x_i - x_{prom}}{x_{Máx} - x_{Mín}} \quad \text{Ecuación 5.}$$

**4.5.2 Modelamiento:** en el caso de *L. alba*, los datos se dividieron en un grupo de calibración y otro de validación, ya que se contaba con un número suficiente de muestras; para los demás AE (*L. origanoides* y *C. flexuosus*), se usaron la totalidad de datos disponibles para la generación de los modelos. Los métodos empleados fueron regresión lineal simple (OLS), PCR y PLS; en todos los casos se buscó la relación entre las PFQ y los componentes mayoritarios de cada uno de los AE.

**4.5.3 Selección de variables regresoras** [91]: además de los factores de peso obtenidos mediante PCR y PLS, y el procedimiento de validación cruzada, para seleccionar las variables a usar en los modelos se tuvieron en cuenta conceptos básicos como:

- La varianza de la variable, a un menor valor, menor es la información que puede proporcionar; sin embargo al depender de la escala de los datos, este criterio es apropiado sólo si las variables están medidas en escalas similares.
- Alto (absoluto) coeficiente de correlación con la variable dependiente (*y*); sin embargo, una variable con una débil correlación podría llegar a ser importante si es capaz de explicar variabilidad de *y* que no está incluida en las restantes.

**4.5.4 Refinamiento de los modelos:** la evaluación de los modelos obtenidos se realizó de acuerdo con las **Ecuaciones 2-4**; en el caso de pequeños grupos de muestras (<30), se usó el proceso de validación cruzada (CV), en el que el grupo de  $n$  objetos se divide aleatoriamente en  $s$  segmentos o partes de aproximadamente el mismo tamaño; uno de ellos se deja por fuera como grupo de validación, los demás ( $s-1$ ) se usan para generar los modelos, que una vez obtenidos, se aplican individualmente a dicho grupo de validación, proporcionando valores predichos provenientes de modelos con diversa complejidad. Este procedimiento se repite hasta que cada uno de los segmentos ha sido empleado para la predicción. El resultado es una matriz con  $n$  filas y  $a_{Máx}$  (igual al número de variables) columnas que contienen los valores predichos  $y'_{cv}$ . Los modelos se comparan con base en la raíz media del error de predicción (RMSEP; Véase **Ecuación 6**), donde un menor valor, sugiere una mejor capacidad de predicción por parte del modelo.

$$RMSEP = \sqrt{\frac{1}{z} \sum_{i=1}^z (y_i - y'_i)^2} \quad \text{Ecuación 6.}$$

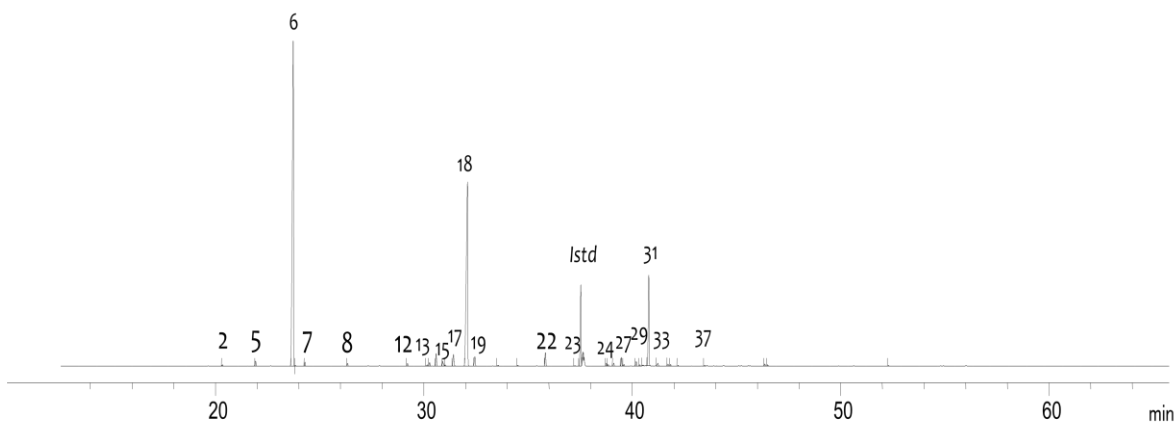
## 5. RESULTADOS y ANÁLISIS

### 5.1 Caracterización de los AE

La composición y propiedades macroscópicas de AE extraídos por hidrodestilación con arrastre de vapor de plantas establecidas en las parcelas experimentales de Socorro-Santander (*L. alba* y *L. origanoides*) y las ubicadas en el Complejo Agroindustrial de CENIVAM (*C. flexuosus*), se determinaron como paso básico para la obtención de la denominación de AE de origen colombiano y el establecimiento de la identidad de cada uno de los AE bajo estudio.

Las cantidades relativas (%), mínima (Mín), máxima (Máx) y promedio (Prom), en que se encuentran cada uno de los compuestos presentes en los AE de *L. alba*, *C. flexuosus* y *L. origanoides*, se registran en las **Tablas 7-9**. La enumeración usada en las tablas corresponde al orden de elución de los compuestos en la columna DB-5, que se refleja en los cromatogramas de los AE obtenidos por GC-FID (Véase **Figuras 6-8**).

**Figura 6.** Cromatograma típico del AE de *L. alba*



GC-FID, DB-5 (60m x 0.25mm x 0.25 $\mu$ m); identificación de los picos cromatográficos aparece en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Cantidad relativa (%) e identificación de los componentes del AE de *L. alba*.

N° pico <sup>a</sup>	I <sub>R</sub>		Compuestos	Cantidad relativa, % *		
	DB-5	DB-wax		Mín	Máx	Med
1	939	1018	α-Pineno	0.02	0.14	0.05
2	955	1060	Canfeno	0.03	0.22	0.13
3	978	1440	1-Octen-3-ol	0.00	0.05	0.01
4	983	1102	β-Pineno	0.00	0.12	0.03
5	992	1161	β-Mirceno	0.16	0.60	0.45
6	1037	1198	Limoneno	17.60	58.98	40.74
7	1050	1248	trans-β-Ocimeno	0.08	0.46	0.28
8	1100	1542	Linalool	0.11	0.44	0.26
9	1126	1626	trans-p-Menta-2,8-dien-1-ol	0.03	0.12	0.06
10	1140	1445	cis-Óxido de limoneno	0.02	0.17	0.07
11	1155	1457 + 1670	trans-Óxido de limoneno + cis-p-Menta-2,8-dien-1-ol	0.02	0.21	0.03
12	1176	1703	Borneol	0.15	0.34	0.25
13	1204	1609 + 1726	cis-Dihidrocarvona + neo-Dihidrocarveol	0.05	2.74	0.65
14	1213	1629 + 1751	trans-Dihidrocarvona + Dihidrocarveol	0.04	3.75	0.91
15	1223	1783	iso-Dihidrocarveol	0.04	1.26	0.33
16	1226	1834	trans-Carveol	0.05	0.33	0.14
17	1237	1808 + 1865	neo-iso-Dihidrocarveol + cis-Carveol	0.10	2.93	0.96
18	1256	1744	Carvona	20.08	47.24	31.24
19	1264	1713 + 1734	cis-Epóxido de piperitona + Piperitona	0.55	1.41	0.96
20	1285	1839	trans-Óxido de carvona	0.03	0.13	0.05
21	1342	1890	trans-Acetato de carvilo	0.04	0.07	0.05
22	1354	1934	Piperitenona	0.43	2.17	1.13
23	1395	1523 + 1592	β-Bourboneno + β-Elemeno	0.02	0.30	0.09
24	1439	1602	trans-β-Cariofileno	0.09	0.63	0.24
25	1442	1673	β-Copaeno	0.05	0.36	0.15
26	1450	1665	trans-β-Farnaseno + Aromadendreno	0.11	0.66	0.26
27	1462	1677	α-Humuleno	0.20	1.67	0.55
28	1475	1654	allo-Aromadendreno	0.02	0.40	0.06
29	1484	1698	Germacreno D	0.12	1.06	0.39
30	1489	1696	γ-Muuroleno	0.03	0.28	0.09
31	1504	1720	Biciclosesquifelandreno	2.70	21.87	7.39
32	1510	1779	α-Muuroleno + Biclogermacreno	0.01	0.11	0.04
33	1529	1762-1765	γ-Cadineno+ δ-Cadineno	0.00	0.35	0.12
34	1540	1825	trans-Calameneno	0.04	0.98	0.20

**Tabla 7, Continuación.**

35	1575	-	1-nor-Bourbonanona	0.01	0.06	0.02
36	1592	2059 -2134	Germacreno-D-4-ol + Espatuleno	0.01	0.06	0.03
37	1597	2001	Óxido de cariofileno	0.01	0.12	0.04
38	1601	-	Salvial-4(14)-en-1-ona	0.03	0.25	0.09
39	1620	2354	$\beta$ -Oplopenona	0.02	0.07	0.04
Resumen composicional según el tipo de compuesto				Mín	Máx	Med
Hidrocarburos monoterpénicos				17.9	60.5	41.7
Monoterpenos oxigenados				21.7	63.4	37.1
Hidrocarburos sesquiterpénicos				3.4	28.9	9.7
Sesquiterpenos oxigenados				0.15	1.1	0.4

<sup>a</sup> Número de pico en la Figura 6.

\*n=2

**Tabla 8.** Cantidad relativa (%) e identificación de los componentes del AE de *C. flexuosus*.

N° pico	I <sub>R</sub>		Compuestos	Cantidad relativa, % *		
	DB-5	DB-wax		Mín	Máx	Med
1	939	1018	$\alpha$ -Pino	0.00	0.04	0.01
2	955	1060	Canfeno	0.00	0.19	0.04
3	985	1331	6-Metil-5-hepten-2-ona	0.20	3.45	0.60
4	991	1163	$\beta$ -Mirceno	0.05	17.11	8.10
5	1034	1192	Limoneno	0.00	1.75	0.31
6	1038	1231	cis- $\beta$ -Ocimeno	0.10	0.63	0.37
7	1049	1247	trans- $\beta$ -Ocimeno	0.07	0.37	0.21
8	1094	1510	6,7-Epoximirceno	0.00	0.18	0.07
9	1097	1275	Terpinoleno	0.00	0.08	0.02
10	1100	1540	Linalool	0.46	2.29	0.79
11	1146	1511	exo-Isocitral	0.15	1.25	0.34
12	1156	1415	Citronelal	0.03	0.53	0.19
13	1165	1538	trans-Verbenol + cis-Isocitral	0.19	1.84	0.86
14	1177	1615	Epóxido de rosefurano	0.00	0.12	0.04
15	1183	1566	trans-Isocitral	0.49	2.72	1.35
16	1198	1544	4-cis-Decenal	0.00	0.14	0.06
17	1205	-	4-trans-Decenal	0.00	0.23	0.06
18	1229	1795	Nerol	0.00	10.12	0.57
19	1231	1760	Citronelol	0.19	4.76	1.06
20	1247	1685	Neral	15.46	32.16	28.84
21	1256	1843	Geraniol	2.73	18.06	7.23
22	1278	1735	Geranial	20.87	49.27	42.13
23	1294	1596	2-Undecanona	0.00	0.62	0.21

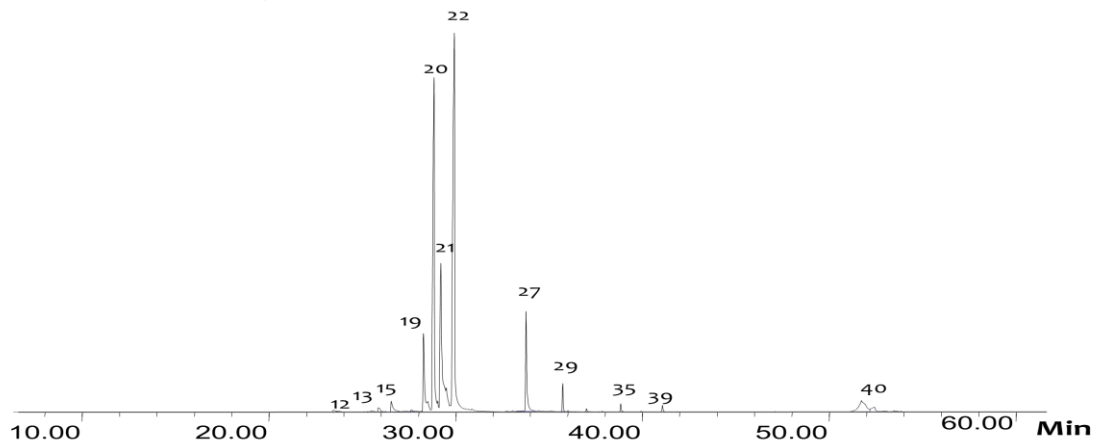
**Tabla 8, Continuación.**

24	1343	1645	Acetato de citronelilo	0.00	0.06	0.00
25	1353	-	Nerolato de etilo	0.00	0.66	0.10
26	1354	1732	Acetato de nerilo	0.00	1.79	0.22
27	1383	1752	Acetato de geranilo	0.08	10.29	2.26
28	1426	1601	trans- $\beta$ -Cariofileno	0.00	0.13	0.05
29	1442	1726	$\alpha$ -trans-Bergamoteno	0.03	1.16	0.38
30	1449	1601	$\alpha$ -Guaieno	0.00	0.10	0.03
31	1476	1709	$\gamma$ -Muuroleno	0.00	0.17	0.04
32	1497	1808	2-Tridecanona	0.00	0.48	0.15
33	1501	1698	Germacreno D	0.00	0.67	0.07
34	1502	1738	$\alpha$ -Bulseneno	0.00	0.22	0.01
35	1517	1762	$\gamma$ -Cadineno	0.00	0.15	0.02
36	1534	1765	$\delta$ -Cadineno	0.00	0.59	0.13
37	1562	2041	trans-Nerolidol	0.00	0.11	0.02
38	1566	2075	Hediciariol	0.00	0.80	0.07
39	1606	2001	Óxido de cariofileno	0.00	0.09	0.01
40	2028	-	6-cis,10-trans-Pseudofitol	0.02	0.17	0.06
Resumen composicional según el tipo de compuesto				Mín	Máx	Med
Hidrocarburos monoterpénicos				0.22	20.15	9.07
Monoterpenos oxigenados				40.9	140.6	86.9
Hidrocarburos sesquiterpénicos				0.03	3.18	0.73
Sesquiterpenos oxigenados				0.02	1.64	0.32
Contenido de citral				36.3	81.44	71.97

<sup>a</sup> Número de pico en la Figura 7.

\*n=2

**Figura 7.** Cromatograma típico del AE de *C. flexuosus*.



GC-FID, DB-5 (60m x 0.25mm x 0.25 $\mu$ m); La identificación de los picos aparece en la Tabla 8.

**Tabla 9.** Cantidad relativa (%) e identificación de los componentes del AE de *L. organoides* quimiotipo carvacrol.

N° pico <sup>a</sup>	I <sub>R</sub>		Compuestos	Cantidad relativa, %		
	DB-5	DB-wax		Mín	Máx	Med
1	931	1019	α-Tujeno	0.22	1.59	0.86
2	939	1018	α-Pineno	0.08	0.34	0.21
3	954	1060	Canfeno	0.00	0.05	0.02
4	978	1130	Sabineno	0.03	0.18	0.09
5	983	1102	β-Pineno	0.02	0.08	0.05
6	992	1160	β-Mirceno	0.86	4.53	2.44
7	1009	1155	α-Felandreno	0.04	0.32	0.17
8	1015	1094	Δ <sup>3</sup> -Careno	0.04	0.21	0.11
9	2021	1161	α-Terpineno	0.47	3.33	1.71
10	1030	1259	<i>p</i> -Cimeno	3.67	19.72	11.63
11	1034	1198	Limoneno	0.00	1.70	0.53
12	1035	1219	1,8-Cineol	0.07	1.09	0.33
13	1038	1163	β-Felandreno	0.00	0.47	0.09
14	1050	1248	<i>trans</i> -β-Ocimeno	0.04	0.38	0.18
15	1065	1238	γ-Terpineno	2.20	22.84	10.92
16	1073	1550	<i>cis</i> -Hidrato de sabineno	0.03	0.37	0.22
17	1094	1295	<i>p</i> -Cimeneno <sup>1</sup>	0.07	0.21	0.14
18	1100	1543	Linalool	0.12	0.41	0.24
19	1105	1465	<i>trans</i> -Hidrato de sabineno	0.05	0.24	0.13
20	1126	1626	<i>trans-p</i> -Menta-2,8-dien-1-ol	0.00	0.45	0.22
21	1129	1610	<i>cis-p</i> -Menta-2-en-1-ol	0.00	0.44	0.02
22	1148	1715	<i>trans-p</i> -Menta-2-en-1-ol	0.00	0.41	0.07
23	1174	1652	Umbelulona	0.00	0.20	0.04
24	1186	1704	Borneol	0.44	1.20	0.79
25	1191	1849	<i>p</i> -Cimen-8-ol	0.00	0.13	0.03
26	1203	1610	<i>cis</i> -Dihidrocarvona	0.00	0.18	0.02
27	1211	1630	<i>trans</i> -Dihidrocarvona	0.00	0.03	0.01
28	1232	1590	metil-eter timol	0.00	1.63	0.06
29	1236	1808	<i>neoiso</i> -Dihidrcarveol	0.00	1.61	0.78
30	1242	1763	Metil-carvacril éter	0.07	0.31	0.18
31	1252	1715	Carvona	0.00	3.44	0.71
32	1261	1733	Piperitona	0.00	5.75	0.19
33	1290	2168	Timol <sup>2</sup>	0.06	24.50	6.46
34	1302	2209	Carvacrol <sup>3</sup>	21.96	67.60	48.42
35	1347	1864	Acetato de timilo	0.00	0.10	0.01
36	1356	2164	Eugenol	0.00	0.26	0.06

**Tabla 9, Continuación.**

37	1367	1896	Acetato de carvacrilo	0.00	0.10	0.04
38	1386	1495	$\alpha$ -Copaeno	0.07	1.05	0.39
39	1395	1523	$\beta$ -Bourboneno	0.00	0.11	0.03
40	1434	1602	<i>trans</i> - $\beta$ -Cariofileno	0.00	1.38	0.09
41	1441	1598	<i>trans</i> - $\alpha$ -Bergamoteno	0.00	0.22	0.01
42	1442	1665	$\beta$ -Copaeno	0.00	6.38	3.82
43	1447	1648	<i>cis</i> - $\beta$ -Farnaseno	0.00	0.87	0.57
44	1455	1665	<i>trans</i> - $\beta$ -Farnaseno	0.00	0.04	0.01
45	1469	1676	$\alpha$ -Humuleno	0.03	0.23	0.10
46	1474	1654	<i>allo</i> -Aromadendreno	0.71	3.10	1.99
47	1484	1695	$\gamma$ -Muuroleno	0.00	0.16	0.04
48	1486	1770	<i>ar</i> -Curcumeno	0.20	1.08	0.52
49	1493	1698	Germacreno D	0.00	0.60	0.17
50	1498	1718	$\alpha$ -Zingibereno	0.00	0.06	0.01
51	1502	1715	$\beta$ -Selineno	0.00	0.66	0.11
52	1507	1779 + 1751	$\alpha$ -Muuroleno + Biciclogermacreno	0.00	0.12	0.04
53	1513	1745 + 1771	$\beta$ -Bisaboleno + $\beta$ -Curcumeno	0.00	1.36	0.74
54	1524	1762	$\gamma$ -Cadineno	0.00	0.87	0.07
55	1527	1767	$\delta$ -Cadineno	0.00	0.03	0.01
56	1532	1828	<i>trans</i> -Calameneno	0.00	0.50	0.09
57	1533	1862	<i>trans</i> - $\gamma$ -Bisaboleno	0.02	0.76	0.17
58	1545	1797	<i>trans</i> -Cadina-1,4-dieno	0.01	0.19	0.08
59	1547	1801	$\alpha$ -Cadineno	0.05	0.27	0.16
60	1619	2354	$\beta$ -Oplopenona	0.02	1.13	0.44
61	1640	2245	$\alpha$ -Cadinol	0.00	0.43	0.15
Resumen composicional según el tipo de compuesto				Mín	Máx	Med
Hidrocarburos monoterpénicos				7.67	55.75	29.0
Monoterpenos oxigenados				22.9	110.6	59.1
Hidrocarburos sesquiterpénicos				1.10	20.13	9.26
Sesquiterpenos oxigenados				0.02	1.56	0.60

<sup>a</sup> Número de pico en la Figura 8. \*n=2.

1-Cuantificado con la curva: [*p*-Cimeno]= Área-166.5 / 3582, R<sup>2</sup>= 0.995

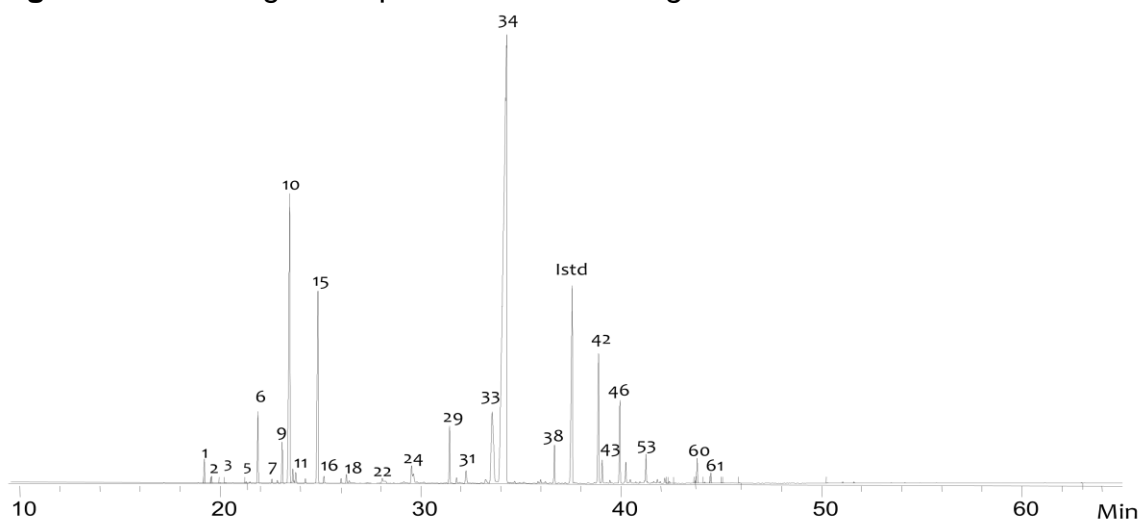
2-Cuantificado con la curva: [Timol]=Área -88.2/3338; R<sup>2</sup>= 0.999

3-Cuantificado con la curva: [Carvacrol]=Área -534/3243; R<sup>2</sup>= 0.999.

Los AE estudiados se caracterizan por ser de tipo *monoterpenoide*, con el predominio de compuestos oxigenados sobre aquellos que sólo tienen átomos de carbono e hidrógeno en su estructura. Por ejemplo, el citral (neral + geranial),

geraniol y nerol en *C. flexuosus* (Véase **Tabla 8**), carvacrol y timol en *L. origanoides* (Véase **Tabla 9**), carvona y piperitenona en *L. alba* (Véase **Tabla 7**). Lo que constituye una gran ventaja, ya que los AE con bajo contenido de hidrocarburos terpénicos son menos susceptibles a procesos de descomposición (enranciamiento), por ende, son más estables y más solubles en agua, lo que les permite ser fácilmente usados en distintas aplicaciones industriales, e.g., aromatización de bebidas [18, 33].

**Figura 8.** Cromatograma típico del AE de *L. origanoides*.



GC-FID, DB-5 (60m x 0.25mm x 0.25 $\mu$ m); identificación de los picos cromatográficos que aparecen en la Tabla 9.

En general, los AE presentaron una diferencia relativamente alta entre los valores máximo y mínimo (rango) de los compuestos mayoritarios y ausencia (o presencia en una cantidad menor que el nivel mínimo de detección de los sistemas de detección empelados) de los compuestos minoritarios entre una muestra y otra (Véase **Tablas 7-9**). Esta alta variabilidad en la composición, se puede atribuir a la influencia que tuvieron los diferentes tratamientos externos (densidad de siembra, época de corte, grado de fertilización, condiciones de extracción), a los que fueron sometidos los cultivos, sobre la producción de metabolitos secundarios en las plantas, así como a los cambios en las condiciones climáticas, entre cada uno de

los cortes, variabilidad que se refleja, a su vez, en las propiedades fisicoquímicas (PFQ; Véase **Tablas 10-12**) de los AE [4].

En las **Tablas 10, 11 y 12**, se indican los valores mínimo (Min), máximo (Máx), el promedio (Prom), la mediana (Med), la varianza, los cuantiles 1 (Q1) y 3 (Q3), que resumen los resultados obtenidos del análisis de las PFQ para cada AE; la distribución de los datos se evaluó con la aplicación de la prueba de Shapiro-Wilk, en la cual el valor  $p$  (probabilidad) debe ser mayor de 0.05, para aceptar que el conjunto de datos se distribuye normalmente y se muestra en la última columna de las tablas. Un resultado negativo para  $p > 0.05$ , indica que la variación de las propiedades macroscópicas de los AE no fue producto de la casualidad, sino que provino de las distintas condiciones experimentales externas a las que fueron sometidos los cultivos, que afecta como consecuencia las PFQ de los AE.

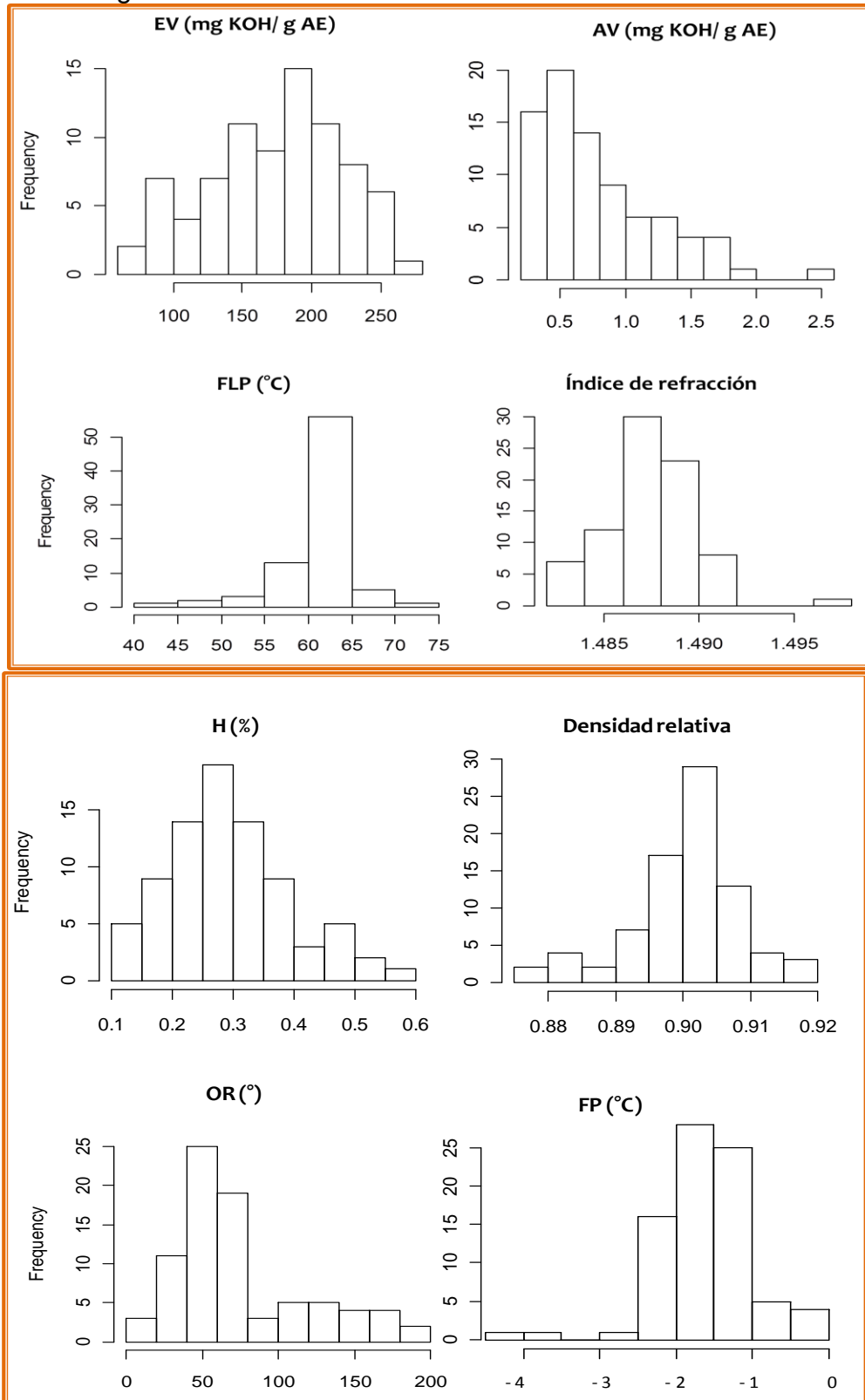
Para facilitar la interpretación de los datos obtenidos, se muestran en las **Gráficas 6, 7 y 8**, histogramas de las PFQ para cada uno de los AE estudiados, en los cuales no sólo se obtiene con facilidad la información sobre la distribución y dispersión de los datos, sino también se pueden visualizar asimetrías y la existencia de valores atípicos [95].

**Tabla 10.** Resumen de la caracterización fisicoquímica de los AE de *L. alba* y resultado de la prueba de normalidad.

Propiedad	Mín	Máx	Prom	Med	Q1	Q3	Varianza	Valor-p
AV*	0.233	2.40	0.787	0.629	0.464	1.040	0.207	$6.2 \cdot 10^{-6}$
EV*	75.21	265.1	173.3	181.1	140.1	216.1	2361	0.0309
FLP (°C)	43.6	70.2	61.2	61.9	60.1	63.2	17.7	$1.1 \cdot 10^{-7}$
RI	1.483	1.498	1.488	1.488	1.488	1.490	$5.67 \cdot 10^{-6}$	0.0012
H (%)	0.10	0.56	0.30	0.29	0.23	0.36	0.010	0.0763
D	0.88	0.92	0.90	0.90	0.90	0.91	$6.52 \cdot 10^{-5}$	0.0054
RO (°)	23.03	138.3	63.5	60.5	46.8	70.7	1936	$5.7 \cdot 10^{-7}$
FP (°C)	-4.6	0.00	-1.7	-1.7	-2.0	-1.3	0.44	0.004

\*Medido en mg de KOH/g de AE; n=81.

**Gráfica 6.** Histogramas de las PFQ medidas a los AE de *L. alba*.



**Tabla 11.** Resumen de la caracterización fisicoquímica de los AE de *C. flexuosus* y resultado de la prueba de normalidad.

Propiedad	Mín	Máx	Prom	Med	Q1	Q3	Varianza	Valor-p
AV*	0.656	9.61	1.48	1.91	1.21	5.28	8.19	$1.3 \cdot 10^{-3}$
EV*	34.7	69.3	47.6	46.6	40.1	52.2	95.5	0.077
FLP (°C)	30.5	38.9	34.1	34.0	33.2	35.2	2.98	0.179
RI	1.479	1.489	1.486	1.486	1.485	1.488	$5.92 \cdot 10^{-6}$	0.020
H (%)	1.20	3.62	2.11	1.97	1.60	2.61	0.473	0.061
D	0.88	0.90	0.89	0.89	0.89	0.89	$3.89 \cdot 10^{-5}$	$4.8 \cdot 10^{-4}$
OR (°)	-7.41	3.49	-3.24	-3.33	-4.16	-2.84	4.47	0.028
FP (°C)	-3.2	-1.0	-2.1	-2.1	-2.4	-1.7	0.23	0.881

\*Medidos en mg de KOH/ g de AE; n=24.

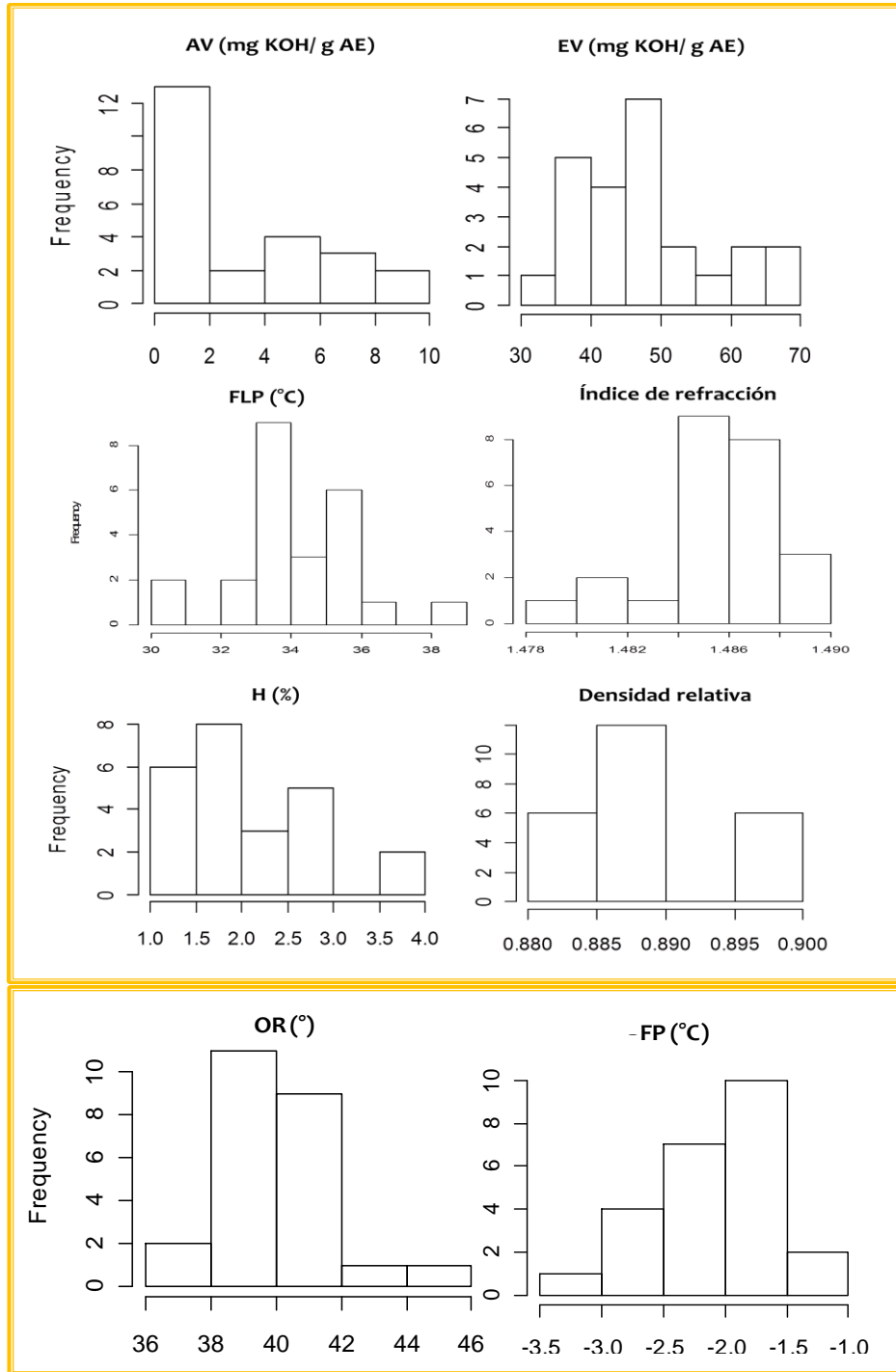
**Tabla 12.** Resumen de la caracterización fisicoquímica de los AE de *L. organoides* y resultado de la prueba de normalidad.

Propiedad	Mín	Máx	Prom	Med	Q1	Q3	Varianza	Valor-p
AV*	0.587	21.7	7.31	5.56	3.53	9.88	39.0	$4.9 \cdot 10^{-4}$
EV*	0.077	39.77	12.17	9.15	5.08	16.01	105.3	0.0043
FLP (°C)	37.7	69.5	54.3	53.3	44.5	67.6	118	0.0030
RI	1.491	1.541	1.505	1.504	1.500	1.506	$9.7 \cdot 10^{-5}$	$3.13 \cdot 10^{-6}$
H (%)	0.400	1.75	1.03	0.983	0.845	1.25	0.121	0.70
D	0.89	0.96	0.93	0.93	0.92	0.93	$2.59 \cdot 10^{-4}$	0.16
OR (°)	-4.75	142.94	73.16	97.48	13.95	110.69	2508	$9.3 \cdot 10^{-5}$
FP (°C)	-1.7	-0.40	-1.1	-1.2	-1.5	-0.73	0.17	0.67

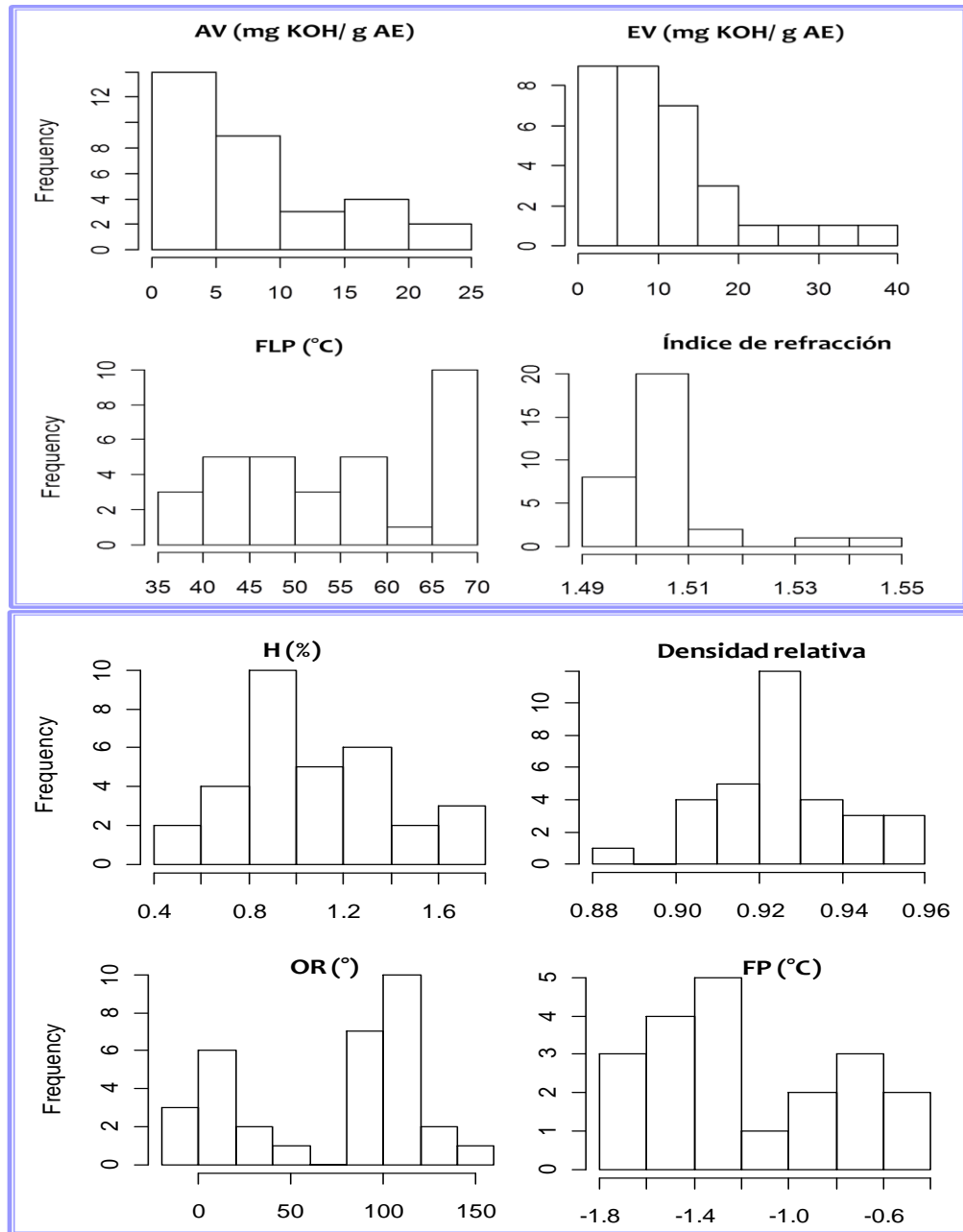
\*Medidos en mg de KOH/ g de AE; n=32.

Los cuartiles, medidas que se basan en la estadística de orden [95] reportados en las tablas, dividen los datos en 4 partes iguales de 25, 50 y 75% o primer (Q1), segundo (Q2=mediana) y tercer cuartil (Q3), y se emplearon teniendo en cuenta que no se veían afectados por valores atípicos; permitieron conocer la simetría y al igual que el histograma, fueron independientes de la distribución de los datos [97]; razones por las cuales para determinar la dispersión de las PFQ se usó el rango intercuartílico ( $Q_3-Q_1$ ; Véase **Tabla 13**).

**Gráfica 7.** Histogramas de las PFQ medidas a los AE de *C. flexuosus*.



**Gráfica 8.** Histogramas de las PFQ medidas a los AE de *L. organoides*.



A diferencia de los cultivos de *L. alba* y *L. organoides*, que fueron sometidos a condiciones controladas, los cultivos de *C. flexuosus* se constituyeron de parcelas aisladas, sembradas con diferencias de tiempo entre una y otra, creciendo con

distintas condiciones climáticas; por lo tanto, era de esperarse que sus PFQ se comportaran en su mayoría normalmente (e.g., EV, FLP, H y FP).

En todos los AE el contenido de humedad (H) varió aleatoriamente, esto es porque la humedad presente en las muestras, no depende del AE en sí, sino de su historia, específicamente de su proceso de separación del agua, una vez es extraído, y del secado con sulfato de sodio anhidro, antes de ser envasado. En el caso de *L. origanoides*, la H pudo influir en que su D y su FP se distribuyeran de forma normal, dado a que este AE está principalmente constituido de un alcohol (carvacrol ~ 50%), que puede formar puentes de H con el agua.

Los resultados de las pruebas fisicoquímicas de las especies estudiadas, pueden entenderse observando la composición de los AE. Al comparar los resultados de las especies entre sí (Véase **Tablas 10, 11 y 12** y **Gráficas 6, 7 y 8**), se puede apreciar que los AE más densos y con mayor RI corresponden a los de *L. origanoides*, esto se debe a su alto contenido de compuestos oxigenados (fenoles) que aumentan la densidad de un AE [26], directamente relacionada con el RI de una sustancia. Esto es, porque el RI depende de los dipolos eléctricos inducidos, que se generan al someter moléculas altamente polarizables a un campo eléctrico externo; por ende, a mayor número de moléculas (materiales más densos), mayor será el RI una sustancia [98].

Los AE más ácidos, según lo indican los resultados de AV, corresponden a *L. origanoides* y *C. flexuosus*, la justificación se encuentra en el contenido de fenoles y aldehídos respectivamente; ya que los primeros compuestos reaccionan con hidróxidos alcalinos, en este caso, KOH, que se emplea en la determinación de la prueba, mientras que los segundos tienden a sufrir procesos de oxidación, especialmente en AE almacenados por largo tiempo [8], como es el caso de algunas muestras de *C. flexuosus* bajo estudio, lo que termina incrementado su AV.

Los resultados más altos para FLP correspondieron al AE de *L. origanoides*, causado tal vez porque los fenoles, al ser más polares que las cetonas (carvona en *L. alba*), y los aldehídos (citral en *C. flexuosus*) y que pueden formar puentes de hidrógeno, le otorgan una baja presión de vapor al AE, incrementando su FLP. Igualmente, este fue el AE con mayor OR, seguido por *L. alba*, probablemente como consecuencia de que estos AE presentaban en su mayoría una coloración oscura, interfiriendo en esta determinación.

**Tabla 13.** Rangos intercuartílicos para las PFQ de los AE bajo estudio.

PFQ-AE	<i>L. alba</i>	<i>C. flexuosus</i>	<i>L. origanoides</i>
AV (mg KOH/gAE)	0.576	4.07	6.35
EV (mg KOH/gAE)	76.00	12.10	10.93
FLP (°C)	3.10	2.00	23.1
RI	0.0020	0.0030	0.006
H (%)	0.13	1.0	0.41
D	0.01	0.0	0.01
OR (°)	23.90	7.31	96.74
FP (°C)	0.7	0.7	0.77

En cuanto a la dispersión de los datos, el EV y OR fueron las PFQ con rangos más amplios (Véase **Tabla 13**), debido probablemente a que no están directamente relacionadas con la composición del AE, ya que ninguno de ellos posee ésteres en alta proporción y a que la OR se vio afectada por la fuerte coloración de las muestras. El AE con rangos más estrechos fue el de *C. flexuosus*, ya que estas plantas fueron cultivadas bajo condiciones aleatorias.

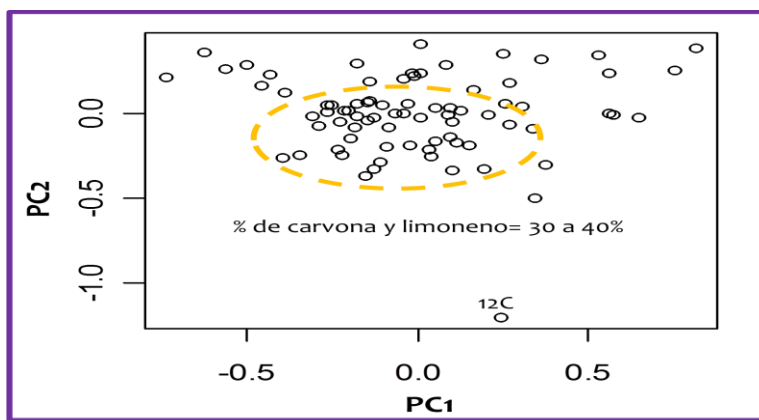
## 5.2 Análisis exploratorio de los AE (PCA)

Se realizó PCA a las matrices de datos de las PFQ y de composición (ppm) con el fin de establecer las similitudes y diferencias dentro de cada uno de los AE, de acuerdo con las distancias de los objetos (muestras) en el gráfico de puntos (gráfico *score*) proporcionado por este método [88]. Para su elaboración, los datos

fueron escalados según la **Ecuación 5**, la composición se expresó en ppm, obtenida mediante el método del estándar interno con *n*-tetradecano para los compuestos minoritarios y con la curva de cuantificación para los mayoritarios.

Para los AE de *L. alba* se usaron sus compuestos mayoritarios, a saber, limoneno, carvona, piperitona, piperitenona y biciclosesquifelandreno. Se realizó PCA individualmente y en conjunto a las matrices de datos de las PFQ y de composición (ppm). En ninguno de los casos se evidenció alguna tendencia clara de agrupamiento, mas bien, se aprecia la alta dispersión de las muestras a lo largo de los PC, tal y como se observa en la **Figura 9**, que es la representación de los objetos de PCA de composición en los primeros 2 PC, que abarcan el 85% del total de la varianza.

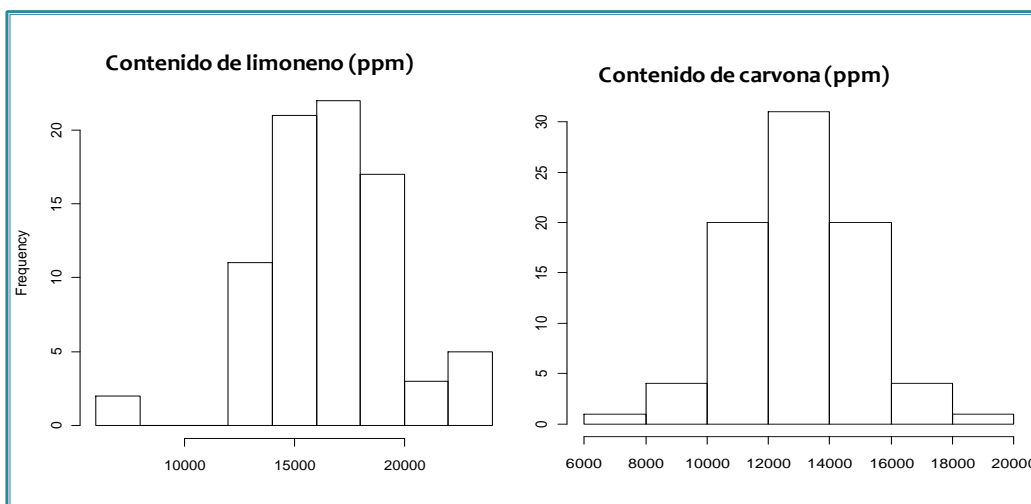
**Figura 9.** Gráfico de puntos de las 81 muestras de AE de *L. alba*, usando como ejes los primeros 2 PCs de PCA de composición.



Este resultado es bastante razonable, sabiendo que según el análisis GC, el contenido de carvona y limoneno varía de modo amplio y casi continuo, desde sus valores Mín hasta sus respectivos Máx (Véase **Gráfica 9**), excepto en el caso del limoneno, donde la muestra identificada como 12C en la **Figura 9**, está bastante alejada de las demás, debido a la poca cantidad que posee de este compuesto; sin embargo, en la parte central de la figura puede apreciarse una zona con mayor

densidad de puntos, la cual se muestra delimitada por una elipse y corresponde a muestras con contenido de carvona y limoneno similar entre sí, en un rango del 30 al 40%. En **Figura 9**, aquellos puntos ubicados en la parte superior derecha, son los que presentan el mayor contenido de limoneno, ya que PC1 y PC2 se relacionan positivamente con este compuesto y negativamente con la carvona. Los resultados de los demás PCA realizados, se omiten dada su semejanza con el caso mostrado.

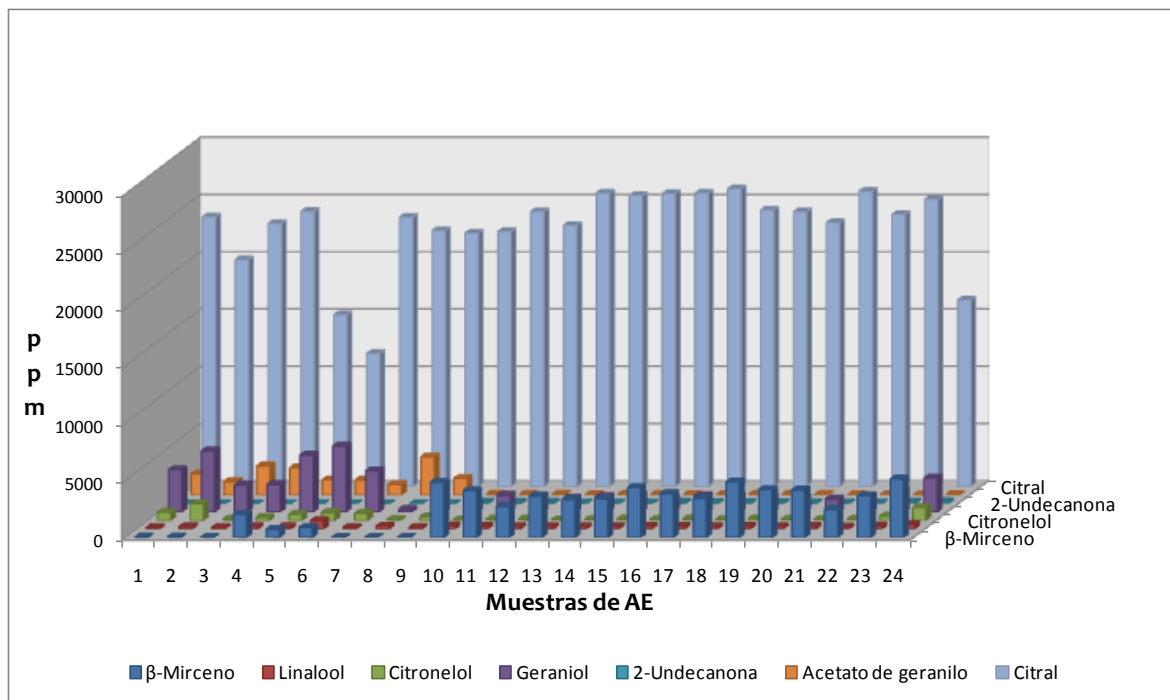
**Gráfica 9.** Histogramas del contenido en ppm de carvona y limoneno en AE de *L. alba*.



Para PCA de composición en *C. flexuosus*, además de sus constituyentes mayoritarios (neral y geranial), se emplearon como variables aquellos compuestos que presentaron cambios altos entre una muestra y otra, a saber:  $\beta$ -mirceno, linalool, citronelol, geraniol, 2-undecanona y acetato de geranilo (Véase **Gráfico 10**). Esta característica permitió que a diferencia de los AE de *L. alba*, las muestras de *C. flexuosus* representadas en los dos primeros PC que abarcan el 73% de la varianza, se separan en dos grupos bien diferenciados el uno del otro. El grupo más homogéneo (mayor cercanía de los puntos) resaltado en naranja (Véase **Figura 10A**, izquierda), se caracteriza por un alto contenido de  $\beta$ -mirceno, 2-undecanona y citral; mientras que el segundo, ubicado en la parte superior derecha

de la gráfica, contiene los porcentajes más altos de geraniol y acetato de geranilo y ausencia de 2-undecanona. Las muestras independientes identificadas como 6 y 24, presentan el máximo contenido de linalool y  $\beta$ -mirceno respectivamente, las cuales ostentan la menor cantidad de citral en los AE evaluados. Estas disimilitudes en la composición de los AE pueden atribuirse a que fueron muestras recolectadas con amplias desigualdades de tiempo, lo que implica que fueron cultivos desarrollados bajo condiciones climáticas heterogéneas, AE obtenidos en diferentes etapas del proyecto, por ende, las muestras se caracterizan por tener distintos periodos de almacenamiento.

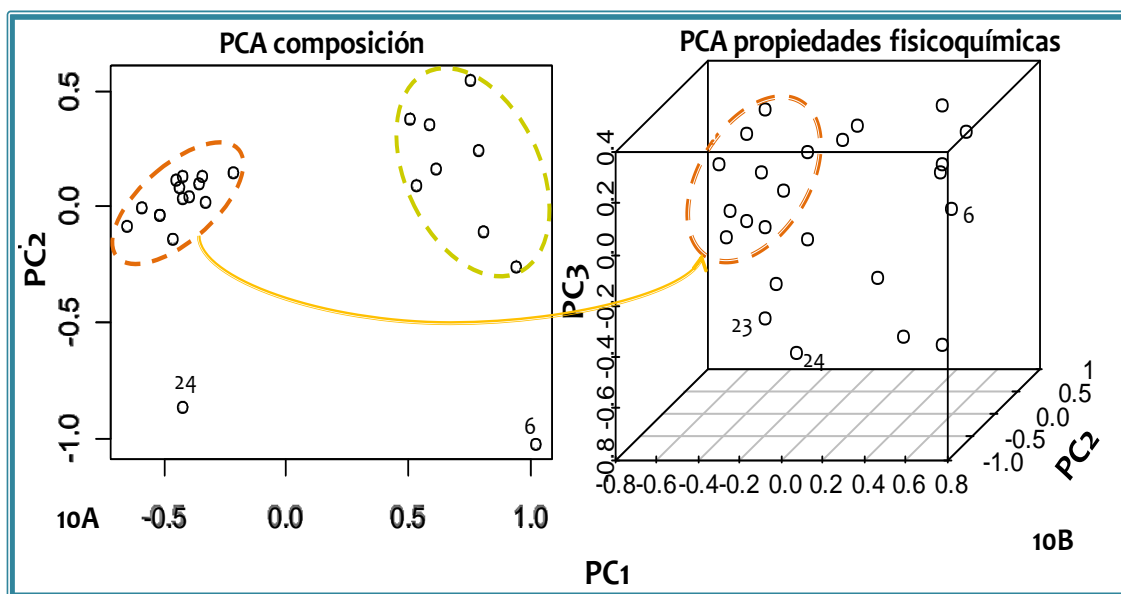
**Gráfica 10.** Compuestos empleados en PCA de composición para *C. flexuosus*: visualización de los cambios entre una muestra y otra.



El PCA de las PFQ (Véase **Figura 10B**); presenta una diferenciación menos marcada que PCA de composición, pero medianamente similar en cuanto a la ubicación de las muestras; aquellos AE con contenido similar de citral y  $\beta$ -mirceno, exhibieron PFQ afines, por lo que en la figura se puede observar la

correspondencia entre las dos familias de descriptores. En el nuevo espacio representado por los 3 primeros PC (varianza= 67%) de PCA de PFQ, los puntos ubicados hacia la derecha, constituyen las muestras con valores más altos de AV y D, mientras que hacia la izquierda se ubican muestras con mayor EV y FLP. Las muestras aisladas, como la 24 (máx AV y % $\beta$ -mirreno) y 23 (Máx RO y Mín % acetato de geranilo) presentan valores extremos de composición y PFQ.

**Figura 10.** Gráfico de puntos de las 24 muestras de AE de *C. flexuosus*, usando como ejes los primeros 2 PC de PCA de composición (izquierda) y PCA de PFQ (derecha).

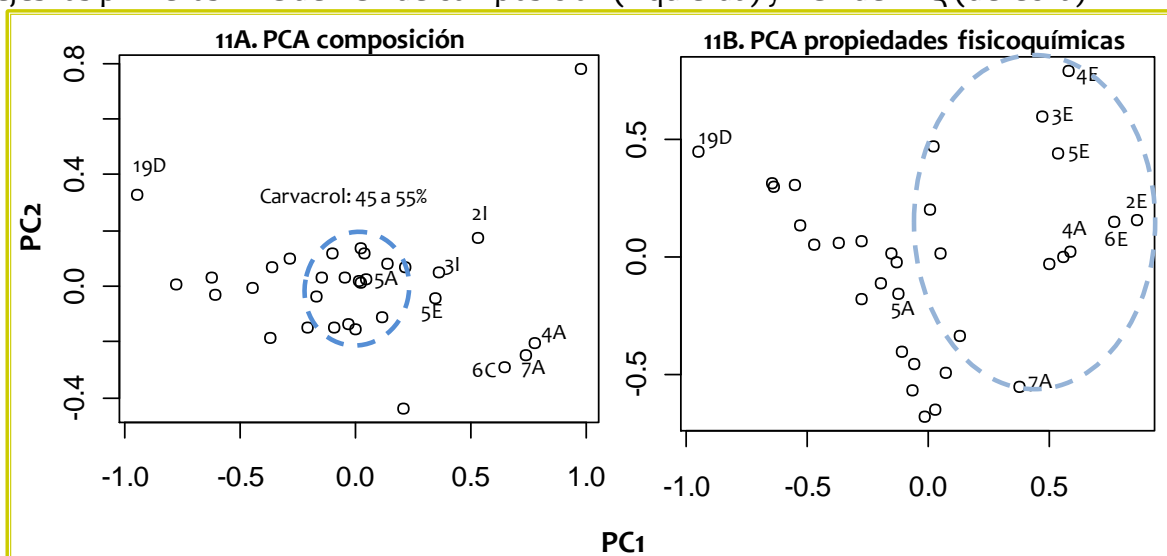


En *L. origanoides*, para PCA de composición se emplearon  $\beta$ -mirreno,  $\alpha$ -terpineno, *p*-cimeno,  $\gamma$ -terpineno, timol, carvacrol y  $\beta$ -copaeno, al estar presentes en mayor cantidad en el AE. Al igual que en *C. flexuosus* las muestras están menos dispersas en el nuevo espacio (PC; 75% de la varianza) que en *L. alba*; donde el carvacrol está relacionado positivamente con el PC1 y negativamente con el PC2, lo que implica que los AE con mayor contenido en este compuesto estarán ubicados en la zona inferior derecha de la gráfica (Véase **Figura 11A**), que son los puntos marcados como: 4A, 5A y 7A, 6C, 2I y 3I; la zona más densa, delimitada por la elipse, contiene muestras que poseen un porcentaje de carvacrol entre el 45 y

55%. Por su parte, los hidrocarburos monoterpénicos, e.g., *p*-cimeno, se relacionan negativamente con los PC es decir, que los AE ubicados en la parte izquierda serán los que tendrán mayor cantidad de estos componentes; como la muestra 19D, que tiene el valor mínimo de carvacrol y máximo de *p*-cimeno. El comportamiento opuesto entre estos dos terpenos, es fácilmente interpretado dado a que este hidrocarburo monoterpénico es el precursor biosintético del compuesto fenólico [66].

El PCA con los datos de las PFQ de los AE de *L. origanoides*, tiene una mayor tendencia de formación de grupos que PCA de composición, con un 63% del total de la varianza, los puntos ubicados en la parte superior derecha de la gráfica representan las muestras con mayor AV (3E-5E) Y FLP (2E y 6E, 4A), dada la relación positiva de los dos PC con estas propiedades. La muestra 19D presentó la mayor OR, su ubicación en la gráfica se debe a que el PC2 sitúa las muestras en la parte superior del plano por su correspondencia positiva con esta medida física. En la **Figura 11B**, se delimitan los AE con porcentaje de carvacrol mayor del 50%, con el fin de mirar la correspondencia entre las diferentes variables con la composición, tal y como se discutió en la sección anterior.

**Figura 11.** Gráfico de puntos de las 33 muestras de AE de *L. origanoides*, usando como ejes los primeros 2 PC de PCA de composición (izquierda) y PCA de PFQ (derecha).



### 5.3 Criterios de calidad para los AE

El primer paso para la elaboración de una norma de calidad consiste en obtener una cantidad de información suficiente que justifique la elección de unos rangos para las características seleccionadas a evaluar, los cuales deben ser en principio lo más amplios posible [24]. Por lo que los criterios de calidad desarrollados en el presente trabajo, se fundamentan en la base de datos obtenida de la evaluación composicional y de las PFQ de los AE estudiados, cuya constitución es elemental para aplicar esos datos como estándares de calidad para AE genuinos [8], que permitan más adelante por comparación, reconocerlos como AE de origen colombiano y llegar a discriminar si un AE cumple o no con los criterios definidos [24].

#### 5.3.1 Criterios de calidad del AE de *C. flexuosus*

A diferencia de los otros AE bajo estudio, el AE de *C. flexuosus* posee una alta demanda comercial y las normas de calidad ya establecidas. Por lo tanto, su caracterización fisicoquímica y composicional se realizó con el fin de evaluar si el AE producido en Colombia podría llegar a ser competitivo en términos de calidad. Los resultados obtenidos, muestran que no todos los AE estudiados cumplen con los criterios establecidos en la norma ISO 4718-2004 registrados en la **Tabla 14** [99], donde adicionalmente se comparan la totalidad de muestras analizadas y aquellas que tienen el valor mínimo requerido de citral (n=12); en ambos casos, los rangos en las PFQ siguen siendo ligeramente diferentes a los estipulados en la norma, excepto para el FLP que tiene un valor muy inferior al especificado.

Estas diferencias pueden ser atribuidas a disimilitudes en la composición de los AE colombianos con los empleados para establecer la norma, ya que estas propiedades macroscópicas dependen del conjunto de compuestos que constituyen

un AE. Por ejemplo, en la **Tabla 15** [37], se puede observar que hay desigualdades grandes en el contenido de geraniol y del acetato de geranilo y diferencias ligeras como para el limoneno y la 6-metil-5-hepten-2-ona. Uno de los factores que pudo influir en el caso de la disminución del FLP, que llama la atención por ser alrededor de la tercera parte del valor definido en la norma, es el mayor contenido de hidrocarburos monoterpénicos, específicamente del  $\beta$ -mirceno, que se encuentra en alta cantidad (Med~8%) y exhibe un FLP teórico de 41 °C.

**Tabla 14.** Comparación de las características de los AE estudiados con los valores establecidos por la norma ISO 3217-1974

Propiedad	Norma	AE colombiano	
	Rango	Rango (n=24)	Rango (n=12)*
RI	1.483 a 1.489	1.479 a 1.490	1.490
D	0.885 a 0.905	0.88 a 0.90	0.88 a 0.90
OR (°)	-4 a +1	-7.51 a 3.49	-7.51 a -1.22
FLP (°C)	89	30.5 – 38.9	32.7 – 38.9
Contenido de citral	75%	36 a 81%	75 a 81%

\* Muestras con contenido  $\geq$  al 75% de citral;

**Tabla 15.** Comparación de los rangos establecidos (%) en la norma ISO 4718 para los componentes del AE de *C. flexuosus*, con los obtenidos para el AE colombiano.

Compuesto	Norma ISO		AE colombiano	
	Mín	Máx	Mín	Máx
Limoneno	0.5	3.5	0.0	1.8
6-Metil-5-hepten-2-ona	0.1	2.0	0.2	3.45
trans- $\beta$ -Cariofileno	0.2	3.5	0.0	0.1
Neral	25.0	35.0	15.5	32.2
Geranial	35.0	47.0	20.9	49.3
Acetato de geranilo	0.5	6.0	0.1	10.3
Geraniol	1.5	8.0	2.7	18.1

### 5.3.2 Criterios de calidad de los AE de *L. alba* y *L. origanoides*

Para los AE de *L. alba* y *L. origanoides* que aún no poseen normas de calidad, el establecimiento de los rangos bajo los cuales cualquier AE de estas dos especies, debería tener su contenido de compuestos mayoritarios y sus PFQ, para ser considerados genuinos (*i.e.*, sin adulteraciones) y de origen “colombiano”, se basó en el cálculo de los valores más frecuentes encontrados en la muestra trabajada durante el proyecto. Esos rangos o intervalos de confianza se determinaron según la **Ecuación 7**, para los datos que se distribuyeron normalmente, para los que no, se usó el intervalo comprendido entre los cuartiles 0.025 y 0.97, en ambos casos, con una probabilidad del 95%; los resultados se muestran en la **Tabla 16**, en donde adicionalmente se registran los mismos intervalos para los AE de *C. flexuosus*.

$$Z = X_{prom} \pm \frac{1.96 * S}{\sqrt{n}} \quad \text{Ecuación 7*}.$$

\*S=desviación estándar y n= número de replicas

**Tabla 16.** Intervalos de confianza (95%) para las PFQ y contenido de carvona y carvacrol en los AE de *L. alba* y *L. origanoides*, respectivamente, al igual que para *C. flexuosus*.

	Compuesto	AV	EV	FLP	OR	RI	H	D	FP
	Carvona, % <i>Lippia alba</i>								
Mín	30.2	0.254	118.1	56.3	18.67	1.485	0.18	0.892	-2.5
Máx	32.3	1.79	228.1	65.8	179.1	1.491	0.41	0.910	-0.5
	Carvacrol, % <i>Lippia origanoides</i>								
Mín	44.8	5.41	7.81	51.2	53.56	1.502	0.96	0.921	-1.4
Máx	52.0	9.82	14.0	58.7	88.94	1.509	1.2	0.932	-0.8
	Citral, % <i>C. flexuosus</i>								
Mín	58.8	0.731	36.5	32.2	36.85	1.481	1.33	0.882	-2.6
Máx	83.1	9.29	58.6	36.1	43.83	1.489	2.89	0.896	-1.5

AV y EV en mg KOH/g AE; FLP y FP en °C; OR en °; H en %

Una posible guía, por lo menos en cuanto al contenido de carvona que el AE de *L. alba*, debería contener o la cantidad de AE que se debería obtener para que su producción industrial fuese competitiva, es el AE de alcaravea (*Carum carvi L.*), su análogo comercial, cuyo principal parámetro de calidad es el contenido de la carvona [100].

Con una producción anual de 1250 kg/ha de semillas [101], un rendimiento del AE del 3.5 al 5%, la alcaravea proporciona entre 24.1 y 34.4 kg de carvona al año/ha, al contener entre el 50 y 60% de este compuesto en su AE [102]. Su mayor desventaja, que le abre las puertas al AE de *L. alba* colombiano, como posible fuente de la carvona, es que la alcaravea es una planta anual o bianual, cuyo AE se encuentra dentro de una cáscara dura, por lo que su extracción requiere de tiempos de destilación largos, o el uso de solventes [101]; mientras que la obtención del AE en *L. alba*, requiere un esfuerzo menor al encontrarse en sus hojas y tallos. Adicionalmente, esta especie produce entre 6.5 y 10.8 kg/ha de carvona por cosecha; de acuerdo con los datos obtenidos en el Macroproyecto del que este trabajo hace parte, para igualar o superar la producción de la carvona a partir de la alcaravea, serán suficientes los 4 cortes al año que según Castro *et al.*, la planta proporciona [63].

*L. origanoides* puede compararse con el orégano, dado a que en la actualidad, se acepta que la importancia de esta especie es en sí, el sabor particular producido por su AE rico en carvacrol [68, 103]; por lo que cualquier planta que contenga este fenol, que es el que determina el valor comercial y la sostenibilidad del cultivo, puede considerarse como orégano [68], planta que contiene adicionalmente timol, *p*-cimeno y  $\gamma$ -terpineno [104] al igual que *L. origanoides*.

Dentro de las especies designadas como orégano con importancia económica están a saber: *Origanum vulgare* spp *viride* (griego), *Origanum onites* (turco), *Thymus capitatus* (español) y *Lippia graveolens* (mexicano) [105], este último con

un contenido promedio de carvacrol del 43.7% y una producción anual de 4000 toneladas, empleadas principalmente para fines culinarios, lo que muestra la amplia aceptación en el mercado que posee este tipo de plantas aromáticas [106]. A pesar de que no son datos relativos al consumo de AE, dan una idea de las oportunidades que puede llegar a tener la especie colombiana.

#### **5.4 Modelos matemáticos para la predicción del contenido de los compuestos mayoritarios de los AE**

Los modelos matemáticos se usan para simular un proceso sin la necesidad de realizarlo experimentalmente, con AE se han empleado modelos para predecir el rendimiento de extracción [107], la actividad biológica y el contenido de grupos de compuestos, e.g. monoterpenos [43], con resultados satisfactorios. Hasta el momento no se había intentando predecir el contenido de los compuestos mayoritarios de un AE a partir de sus propiedades macroscópicas, uno de los objetivos de este trabajo, cuyo logro se constituye en una gran ventaja para la industria colombiana de AE, al permitir evaluar la composición a partir de equipo básico de laboratorio en zonas rurales para evitar, de este modo, el análisis cromatográfico costoso.

Los modelos se desarrollaron con distintos métodos de regresión, tales como mínimos cuadrados simple (OLS), PCR y PLS. En OLS las variables se trabajaron en sus escalas correspondientes, mientras que para PCR y PLS se normalizaron según la **Ecuación 5**. Con el fin de obtener modelos con mayor capacidad de predicción se emplearon como criterios de selección de variables, el coeficiente de correlación de los compuestos a modelar con las PFQ y la importancia o factores de peso que PCR y PLS le dio a cada una de ellas.

En las **Tablas 17, 20, 22, 25 y 28**, se compara el poder de predicción de cada uno de los modelos obtenidos para el limoneno, carvona, citral, carvacrol y timol,

respectivamente. Sólo en el caso de *L. alba*, la validación se realizó con muestras destinadas para este fin (20 de 81); para los demás, dado el bajo número de datos se empleó el procedimiento de validación cruzada (CV) *leave-one-out* o LOO que consiste en dejar por fuera una de las muestras a la vez, para evaluar con esta, los modelos creados con las restantes  $n-1$  [91]. En cada una de las tablas se especifica el número de variables regresoras o PCs que contiene cada modelo, el valor RMSEP (Véase **Ecuación 6**) como medida del error de predicción y  $R^2$  para determinar el grado de ajuste de los datos. Dado que con PCR y PLS los modelos se construyen con PCs, no es evidente la contribución de las variables físicas, lo que normalmente se considera una desventaja de estas metodologías [91, 108]; por esto se muestran en las **Tablas 18, 21, 24 y 27**, los factores de peso de las propiedades fisicoquímicas en los PC de mayor varianza de PCR y PLS de los compuestos modelados.

En general, los modelos obtenidos por PCR y PLS presentaron menor capacidad de predicción que los elaborados mediante OLS, esto puede explicarse dada la baja correlación de las variables entre sí (Ver **Tablas 19, 23 y 26**), ya que estos métodos son útiles cuando las variables están altamente correlacionadas o existen en mayor cantidad que el número de objetos ( $m > n$ ) [109], características que no presenta este trabajo. PLS predice mejor que PCR con un menor número de PCs (Véase **Gráfica 6**); esto es porque las variables más influyentes en los PCs de PLS (Ver **Tablas 18, 21, 24 y 27**), corresponden a aquellas que están más correlacionadas con los distintos compuestos, mientras que PCR le proporciona más importancia a la variable con mayor varianza, haciendo los modelos más complejos de lo necesario [91, 108]. Sin embargo, con fines comparativos se construyeron modelos con el mismo número de PCs para ambas metodologías.

- **Modelos para *L. alba***

De la **Tabla 17**, según el valor de RMSEP, se puede concluir que los modelos más útiles para predecir el contenido de limoneno en el AE de *L. alba* son los obtenidos mediante OLS, específicamente, aquel que sólo tiene como variables regresoras EV, RI y D, a pesar de que no posee el mayor R<sup>2</sup>. Esto es porque posee las propiedades que más se correlacionan con el limoneno (Véase **Tabla 19**), ya que no necesariamente, el modelo que más se ajusta a los datos de calibración, es el que mejor predice nuevos casos.

**Tabla 17.** Comparación de los resultados obtenidos mediante diferentes métodos de regresión para la predicción del contenido de limoneno (%) en *L. alba*.

Método	Variables implicadas	N°V	N° PCs	RMSEP	R <sup>2</sup>
OLS	AV, EV, FLP, OR, RI, H, D	7	-	2.18	0.779
	EV, RI, D	3	-	1.43	0.753
	RI, D	2	-	1.44	0.747
	RI	1	-	2.23	0.698
	AV, FLP, RI, D (step)*	4	-	1.85	0.770
PCR		-	1	3.36	0.729
		-	2	3.03	0.781
		-	3	2.93	0.795
		-	4	2.71	0.824
PLS		-	1	2.36	0.867
		-	2	2.43	0.858
		-	3	3.29	0.741
		-	4	3.80	0.654

\*El modelo se obtuvo empleando el método de selección de variables *stepwise*, del programa estadístico R; N°V= número de variables, N° PCs= número de componentes principales.

Los modelos obtenidos para la carvona presentaron mayores valores de RMSEP (Véase **Tabla 20**) que los del limoneno, lo que se atribuye a que la carvona tiene, en general, una menor correlación con las propiedades fisicoquímicas (Ver **Tabla 19**) que ese compuesto. Igualmente, los modelos menos complejos y más aceptables se consiguieron con OLS, seguido de PLS y, por último, de PCR.

Exceptuando aquel, que con 5 PCs en PLS presentó el valor mínimo de RMSEP y uno de los valores más altos para  $R^2$  (Véase **Tabla 20**).

**Tabla 18.** Factores de peso de las variables en los PCs con mayor varianza en PCR y PLS para la predicción del contenido de limoneno en *L. alba*.

Variable	PCR			PLS		
	PC1	PC2	PC3	PC1	PC2	PC3
AV	-	-0.608	-0.214	-0.148	-0.465	0.572
EV	0.626	0.147	0.639	-0.449	0.948	-0.679
FLP	0.257	-0.189	-	-0.287	0.158	0.375
OR	-	-0.698	0.235	-	0.461	0.186
RI	0.368	-0.178	-0.210	-0.459	-0.324	-0.114
H	0.272	0.218	-0.618	-0.312	-	0.765
D	0.577	-	-0.237	-0.644	-0.162	-0.123
Varianza explicada	28.77	26.40	20.23	27.97	15.78	11.53

**Tabla 19.** Coeficientes de correlación de las PFQ medidas al AE de *L. alba*.

Ítem	Limoneno	Carvona	AV	EV	FLP	OR	RI	H	D
Limoneno	1.000								
Carvona	-0.507	1.000							
AV	-0.273	-0.151	1.000						
EV	-0.321	0.363	-0.199	1.000					
FLP	-0.267	0.228	0.194	0.165	1.000				
OR	-0.065	-0.164	0.335	0.011	0.193	1.000			
RI	-0.833	0.648	0.441	0.279	0.411	0.050	1.000		
H	-0.219	0.180	-0.139	-0.096	0.116	-0.057	0.137	1.000	
D	-0.786	0.756	0.206	0.321	0.313	0.028	0.769	0.219	1.000

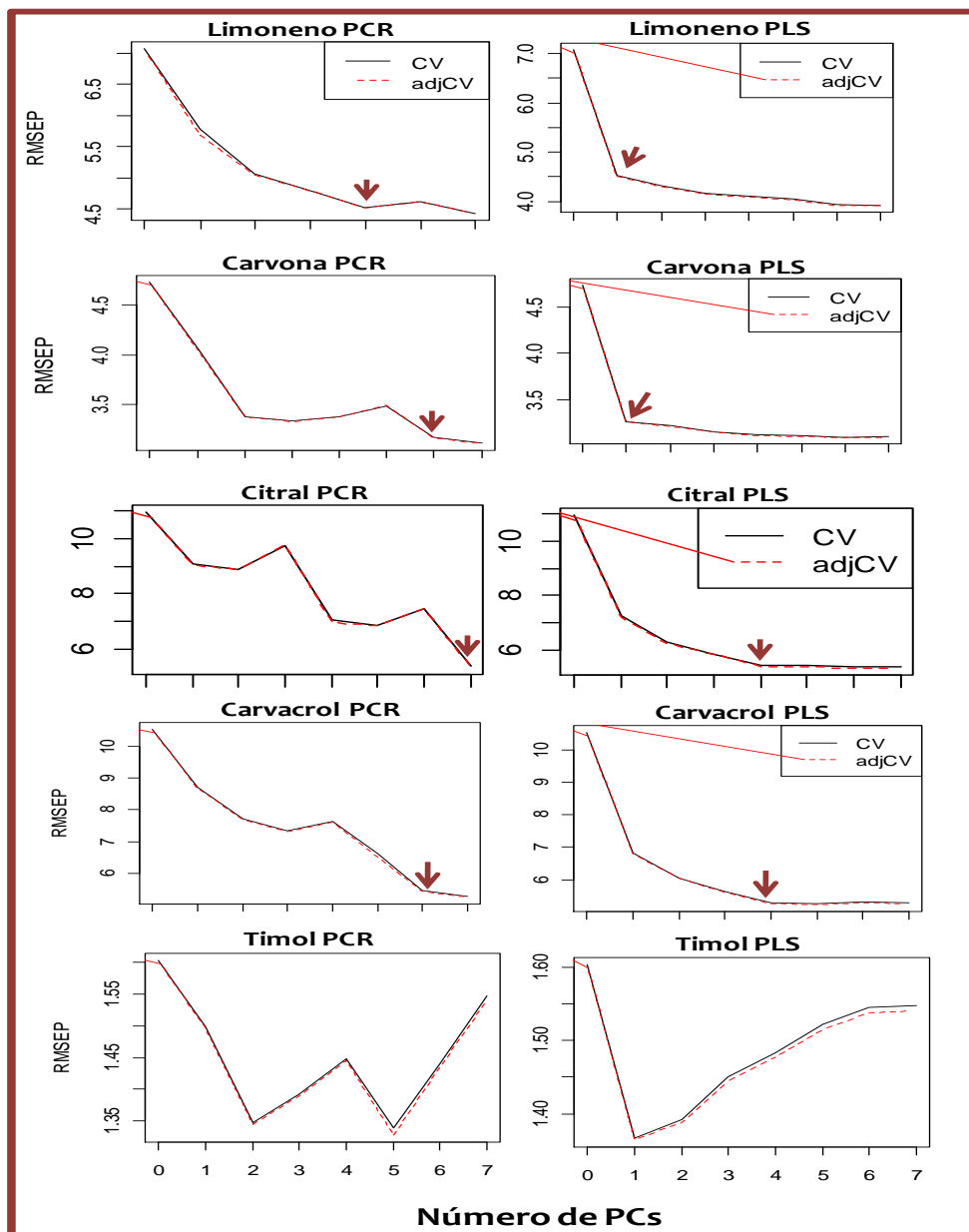
n=81.

- **Modelos para *C. flexuosus***

Las 24 muestras disponibles fueron empleadas en su totalidad para la generar los modelos matemáticos. Los mejores resultados de acuerdo con el valor RMSEP obtenidos mediante CV ( $RMSEP_{CV}$ ) se dieron con OLS, seguido de PLS y, por último, de PCR empleando como variables regresoras AV e RI, que fueron las que

más se correlacionaron con el contenido de citral en los AE (Véase **Tabla 23**) y OR junto con EV, que fueron las que mayor varianza mostraron (Véase **Tabla 11**); en las **Tablas 22 y 24**, se muestran los resultados conseguidos y los factores de peso para las variables en los tres primeros PCs de PCR y PLS.

**Gráfica 11.** Número de PCs requeridos para predecir el contenido de los compuestos mayoritarios con PCR y PLS, según el RMSEP.



CV: validación cruzada, adjCV: validación cruzada corregida con la media aritmética del error de predicción.

**Tabla 20.** Comparación de los resultados obtenidos mediante diferentes métodos de regresión para predecir el contenido de carvona (%) en *L. alba*.

Método	VARIABLES implicadas	N°V	N° PCs	RMSEP	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> <sub>adj</sub>
OLS	AV, EV, FLP, OR, RI, H, D	7	-	3.08	0.668	0.625
	EV, RI, D	3	-	3.14	0.586	0.565
	EV, AV, RI, D	4	-	3.14	0.664	0.641
	RI, D	2	-	3.52	0.574	0.560
	D	1	-	3.35	0.571	0.564
	AV, RI, D (step)*	3	-	3.56	0.664	0.647
PCR		-	1	4.54	0.077	
		-	2	4.11	0.240	
		-	3	4.02	0.275	
		-	4	4.06	0.262	
		-	5	4.07	0.256	
		-	6	3.24	0.530	
PLS		-	1	3.92	0.310	
		-	2	3.31	0.508	
		-	3	3.14	0.557	
		-	4	3.00	0.596	
		-	5	2.95	0.609	
		-	6	2.95	0.609	

\*El modelo se obtuvo empleando el método de selección de variables *stepwise*, del programa estadístico R; N°V= número de variables, N° PCs= número de componentes principales.

**Tabla 21.** Factores de peso de las variables en los PCs con mayor varianza en PCR y PLS para la predicción del contenido de carvona (%) en *L. alba*.

Variable	PCR			PLS		
	PC1	PC2	PC3	PC1	PC2	PC3
AV	0.329	-0.670	0.141	-	-0.941	0.517
EV	0.314	0.509	-0.587	0.466	-0.369	-0.500
FLP	0.262	-	-	0.210	-0.343	-
OR	0.153	-0.508	-0.631	-0.149	-0.653	0.668
RI	0.657	0.107	0.236	0.654	-0.191	0.282
H	-	-	0.403	0.158	0.252	-0.115
D	0.511	0.128	0.120	0.538	-	0.361
Varianza explicada	30.89	26.66	16.63	29.45	17.45	15.34

**Tabla 22.** Comparación de los resultados obtenidos mediante diferentes métodos de regresión para predecir el contenido de citral (%) en *C. flexuosus*.

Método	Variables implicadas	N°V	N° PCs	RMSEP <sub>CV</sub>	R <sup>2</sup>
OLS	AV, EV, FLP, OR, RI, H, D	7	-	1.28	0.900
	AV, RI, FLP	3	-	1.62	0.874
	AV, RI	2	-	1.67	0.870
	RI	1	-	1.81	0.859
	EV, RI, OR ( <i>step</i> )*	3	-	1.54	0.889
PCR		-	1	9.07	0.256
		-	2	8.90	0.283
		-	3	9.76	0.139
		-	4	7.05	0.550
		-	5	6.87	0.573
		-	7	5.38	0.738
PLS		-	1	7.27	0.522
		-	2	6.30	0.642
		-	3	5.86	0.690
		-	4	5.42	0.734
		-	5	5.45	0.731
		-	7	5.38	0.738

\*El modelo se obtuvo empleando el método de selección de variables *stepwise*, del programa estadístico R; N°V= número de variables, N° PCs= número de componentes principales.

**Tabla 23.** Coeficientes de correlación de las PFQ con el citral.

Ítem	Citral	AV	EV	RI	FLP	OR	D	H
Citral	1.000							
AV	-0.607	1.000						
EV	-0.150	-0.103	1.000					
RI	0.927	-0.732	-0.015	1.000				
FLP	0.374	-0.125	-0.063	0.323	1.000			
OR	0.101	0.105	-0.084	-0.014	0.193	1.000		
D	-0.109	0.388	0.354	-0.088	0.096	-0.012	1.000	
H	0.006	-0.005	0.050	0.084	-0.181	-0.023	0.095	1.000

**Tabla 24.** Factores de peso de las variables en los PCs con mayor varianza en PCR y PLS para la predicción del contenido de citral en *C. flexuosus*.

Variable	PCR			PLS		
	PC1	PC2	PC3	PC1	PC2	PC3
AV	0.729	-0.327	-	-0.778	0.356	0.435
EV	0.130	0.655	-0.235	-	-	-1.020
FLP	-	-	-0.277	0.195	0.349	-0.180
OR	-	-	-	-	0.189	0.162
RI	-0.444	0.262	-	0.589	0.286	0.133
H	-	0.311	0.913	-	-	-0.321
D	0.494	0.538	-0.168	-0.292	0.890	-0.690
Varianza explicada	32.4	21.9	16.6	30.2	16.0	15.1

- **Modelos para *L. origanoides***

Al igual que en el caso del citral, los modelos lineales simples obtenidos para el carvacrol poseen un alto  $R^2$  y una buena capacidad de predicción (Véase **Tabla 25**), debido a que posee una correlación suficientemente aceptable con las propiedades fisicoquímicas, para alcanzar estos resultados (Véase **Tabla 26**). Al igual que en los casos anteriores se generaron modelos mediante PCR y PLS, con resultados menos satisfactorios que los logrados con OLS. En la **Tabla 27**, se muestra la importancia que tiene cada propiedad en los diferentes PCs para ambos métodos.

A pesar del bajo contenido de timol en las muestras, se crearon modelos para estimar su contenido en los AE, ya que este fenol al igual que el carvacrol presenta actividad biológica [110] y contribuye a dar el característico sabor a orégano [104]. La baja correlación de este compuesto con las PFQ (Véase **Tabla 26**) medidas en el proyecto, indica que su aporte para el resultado final de esas propiedades macroscópicas en el AE es escaso, por lo que no sorprenden los valores de  $R^2$  bajos obtenidos en los modelos desarrollados (Véase **Tabla 28**); en cuya

elaboración se excluyó una muestra con contenido atípico (timol= 24.5%) del conjunto de datos ( $n-1=31$  muestras).

**Tabla 25.** Comparación de los resultados obtenidos mediante diferentes métodos de regresión para predecir el contenido de carvacrol (%) en *L. origanoides*.

Método	Variables implicadas	N°V	N° PCs	RMSEP <sub>CV</sub>	R <sup>2</sup>
OLS	AV, EV, FLP, OR, RI, H, D	7	-	1.87	0.859
	RI, D, FLP, H	4	-	2.14	0.839
	RI, D, FLP	3	-	2.20	0.835
	RI, D, H	3	-	2.18	0.838
	RI,D,AV	3	-	2.16	0.840
	RI, D	2	-	2.12	0.834
	EV, RI, D, H (step)*	4	-	2.00	0.854
PCR		-	1	8.71	0.271
		-	2	7.70	0.430
		-	3	7.33	0.484
		-	4	7.63	0.440
		-	5	6.61	0.580
		-	7	5.27	0.732
PLS		-	1	6.82	0.553
		-	2	6.05	0.648
		-	3	5.62	0.695
		-	4	5.30	0.730
		-	5	5.27	0.734
		-	7	5.27	0.732

\*El modelo se obtuvo empleando el método de selección de variables *stepwise*, del programa estadístico R; N°V= número de variables, N° PCs= número de componentes principales.  $n=33$ .

**Tabla 26.** Coeficientes de correlación de las PFQ con el timol y el carvacrol (Carva).

Ítem	Timol	Carva	AV	EV	RI	D	FLP	OR	H
Timol	1.000								
Carva	0.138	1.000							
AV	-0.158	0.192	1.000						
EV	-0.105	0.016	-0.308	1.000					
RI	0.171	0.507	0.403	-0.094	1.000				
D	0.376	0.886	0.032	0.157	0.341	1.000			
FLP	0.112	0.405	0.523	-0.153	0.464	0.325	1.000		
OR	-0.409	-0.369	0.095	0.071	-0.189	-0.480	-0.129	1.000	
H	0.157	0.680	0.259	0.365	0.279	0.704	0.285	-0.192	1.000

**Tabla 27.** Factores de peso de las variables en los 3 primeros PCs de PCR y PLS para la predicción del contenido de carvacrol en *L. origanoides*.

Variable	PCR			PLS		
	PC1	PC2	PC3	PC1	PC2	PC3
AV	0.451	-0.458	-	0.294	-0.686	0.477
EV	-0.107	0.223	-0.683	-	0.440	-0.510
RI	0.270	-	-	0.271	-	0.233
D	0.288	0.320	-0.235	0.433	0.409	-
FLP	0.663	-0.224	-	0.567	-0.701	0.234
OR	-0.322	-0.745	-0.456	-0.479	-	0.770
H	0.294	0.180	-0.515	0.420	0.385	-
Varianza explicada	36.76	25.85	16.72	34.58	18.75	15.08

- **Modelos seleccionados**

Como el interés de predecir los compuestos mayoritarios a partir de las propiedades fisicoquímicas radica en facilitar a los productores rurales de AE, una manera sencilla y económica, de determinar el contenido aproximado de los compuestos mayoritarios de los AE estudiados, se seleccionaron los modelos obtenidos mediante OLS y con menor número de variables (Véase **Tabla 29**), pero aceptable poder de predicción; a cada uno de éstos se les determinó el intervalo de tolerancia, calculando la desviación estándar del error de predicción (SEP; Véase **Ecuación 10**), que se usa ampliamente como medida de dispersión de la distribución del error [91]. La distribución empírica de los residuales se inspeccionó visualmente por medio de una gráfica de densidad (Ver **Gráfica 10**); dado que se aproximan a la distribución normal, cerca del 95% de los valores se encuentran en  $\pm 2\text{SEP}$  [91].

**Tabla 28.** Comparación de los resultados obtenidos mediante diferentes métodos de regresión para predecir el contenido de timol (%) en *L. origanoides*.

Método	Variables implicadas	NºV	Nº PCs	RMSEP <sub>CV</sub>	R <sup>2</sup>
OLS	AV, EV, FLP, OR, RI, H, D	7	-	1.67	0.480
	D,OR	2	-	1.93	0.425
	RI, D, FLP	3	-	1.97	0.404
	D, RI	2	-	2.03	0.404
	D (step)*	1	-	1.99	0.394
PCR		-	1	1.50	0.068
		-	2	1.35	0.246
		-	3	1.39	0.195
		-	4	1.45	0.128
		-	5	1.34	0.256
		-	7	1.55	0.005
PLS		-	1	1.36	0.224
		-	2	1.39	0.195
		-	3	1.45	0.126
		-	4	1.48	0.087
		-	5	1.52	0.038
		-	7	1.55	0.049

\*El modelo se obtuvo empleando el método de selección de variables *stepwise*, del programa estadístico R; NºV= número de variables, Nº PCs= número de componentes principales. n=32.

**Tabla 29.** Intervalos de tolerancia (95% de confianza) de los modelos seleccionados para la predicción de los compuestos mayoritarios en los AE estudiados.

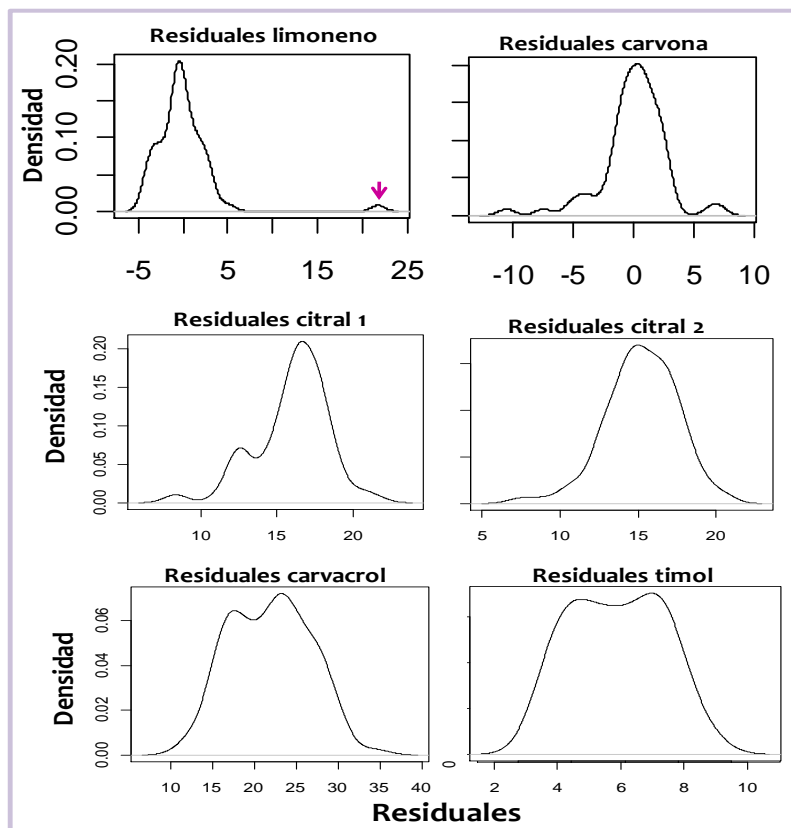
Compuesto y modelo	SEP	Intervalo de tolerancia
%Limoneno=2880 -0.0113EV -1740RI -275.7D	1.48	-2.93 a 2.93
%Carvona= -1010 -3.44AV -0.00101EV +484RI +353D	3.12	-6.25 a 6.25
%Citral 1= -6645.9 + 0.508AV + 4374.8RI	1.55	-3.10 a 3.10
%Citral 2= -5940 -0.14EV + 4030RI + 0.64OR	1.50	-3.00 a 3.00
%Carvacrol= -771.4+0.135AV+208.2RI+545.5D	2.20	-4.40 a 4.40
%Timol= 5.84 +3.79D -0.94OR	1.10	-2.20 a 2.20

$$SEP = \sqrt{\frac{1}{z-1} \sum_{i=1}^z (y_i - y'_i - bias)^2}, \quad bias = \frac{1}{z} \sum_{i=1}^z (y_i - y'_i)$$

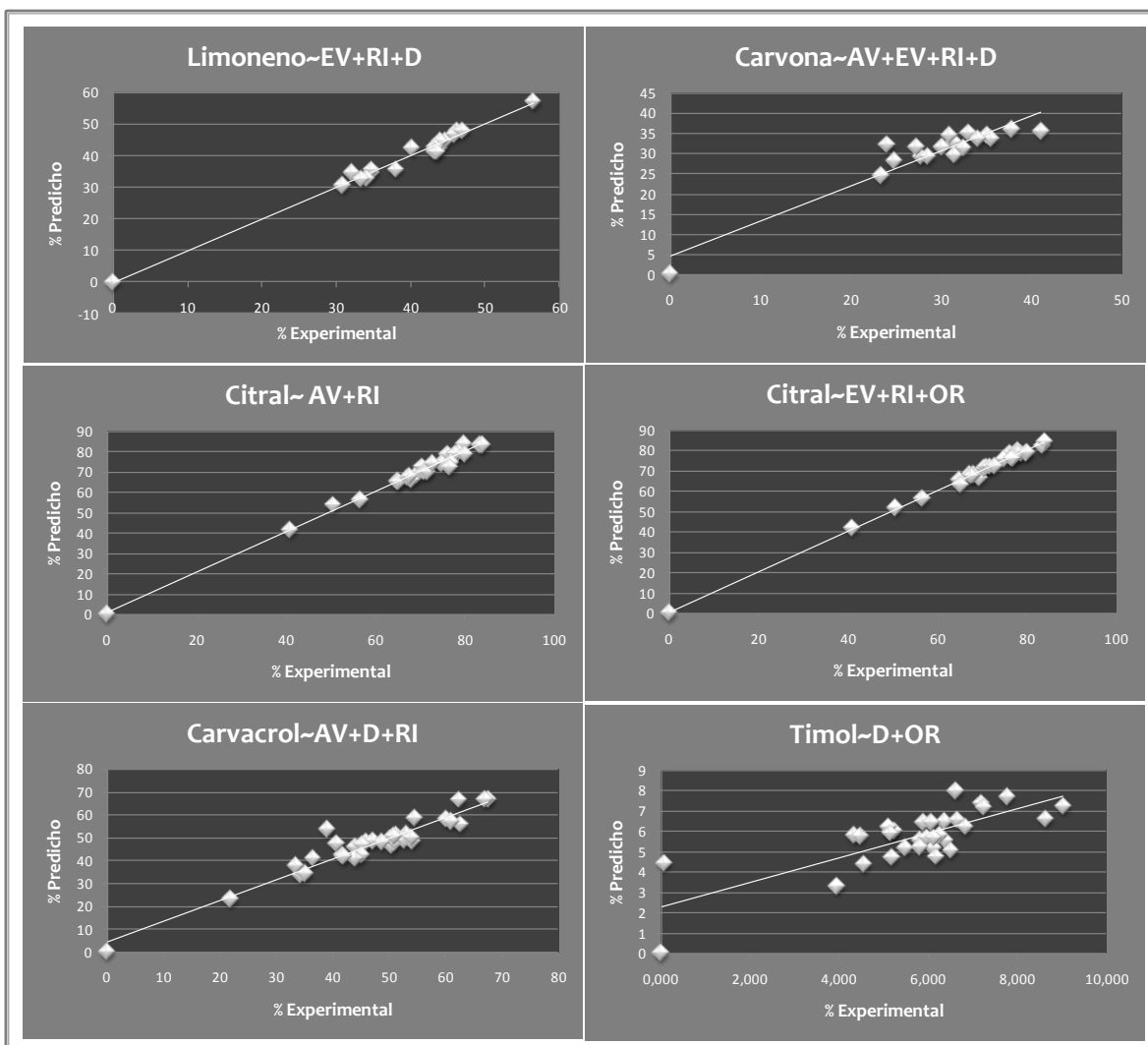
**Ecuación 8.**

Para el citral las diferencias de ejecución entre los dos modelos seleccionados (Véase **Tabla 29**) no son muy amplias, por lo que se sugeriría emplear solamente el RI y AV como variables regresoras, dado que son las que presentan mayor correlación con el citral y una alta variabilidad, en el caso de AV, reduciendo el tiempo y costo necesarios para la predicción aproximada de este compuesto en el AE. En la **Figura 12**, se grafica el contenido experimental contra los predichos para todos los compuestos mayoritarios, obtenidos mediante los modelos seleccionados (Véase **Tabla 29**), usando los datos de validación en el caso de *L. alba* y los valores predichos del mismo grupo de calibración, para los demás AE.

**Gráfica 12.** Distribución de los residuales para la predicción del contenido de los compuestos mayoritarios de los AE estudiados, obtenidos con los modelos seleccionados.



**Figura 12.** Valores experimentales contra los predichos mediante los modelos seleccionados para cada compuesto mayoritario.



Comparando los resultados obtenidos con los logrados en un trabajo similar, donde Porter y colaboradores [43], basados en la premisa de que las densidades de los sesquiterpenos y tricetonas son mayores que las de los hidrocarburos monoterpénicos, lograron diferenciar los AE de manuka (*Leptospermum scoparium*), rico en sesquiterpenos (>60%) y tricetonas (>30%) y kanuka (*Kunzea ericoides*), con alto contenido de monoterpénicos (e.g.,  $\alpha$ -pineno >50%), mediante el uso de la densidad, el índice de refracción y los niveles totales de sesquiterpenos,

los cuales están fuertemente correlacionados ( $R^2 > 0.974$ ); facilitando la identificación de mezclas comerciales y/o adulteraciones mediante equipo básico de laboratorio del AE de manuka con el de kanuka, que le disminuyen su alta actividad biológica. Por lo que puede considerarse que los resultados obtenidos en el presente trabajo son bastante buenos, a pesar de que no se obtuvieron  $R^2$  tan altos como para estos AE, esto es teniendo en cuenta que las propiedades macroscópicas como las organolépticas, las de actividad biológica y las PFQ, están asociadas a conjuntos de compuestos y no completamente a uno en particular [1, 8, 10], que fue en lo que consistieron cada uno de los modelos obtenidos.

- **Modelos inversos**

Con el objetivo de verificar si la relación de las PFQ con la composición es válida en doble sentido, se crearon modelos mediante OLS para predecir la D y el RI de los AE a partir del contenido (%) compuestos mayoritarios, dado que fueron estas las variables que mayor relación presentaron con la composición en todos los AE. Los resultados se registran en la **Tabla 30**.

Estos modelos presentan valores similares de  $R^2$  y  $R^2_{adj}$  a los generados para la predicción de la cantidad relativa de los compuestos, indicando que la relación puede manejarse en ambos sentidos. Con la excepción del RI estimado mediante el contenido de carvacrol y timol que presentó bajos  $R^2$  y  $R^2_{adj}$ ; este resultado puede asociarse con los bajos valores que tuvieron estos coeficientes para los modelos del timol (Ver **Tabla 28**). En el caso del AE de *C. flexuosus* fue necesario emplear 3 compuestos más, de los mayoritarios para alcanzar un buen nivel de predicción; por lo que con este ejercicio se pudo comprobar que el aporte en conjunto de cada terpeno es el que define una propiedad macroscópica.

En la **Figura 13**, se grafican la D y el RI experimentales contra los predichos para los modelos que mejor  $R^2$  (Véase **Tabla 30**) presentaron, estos resultados se vieron

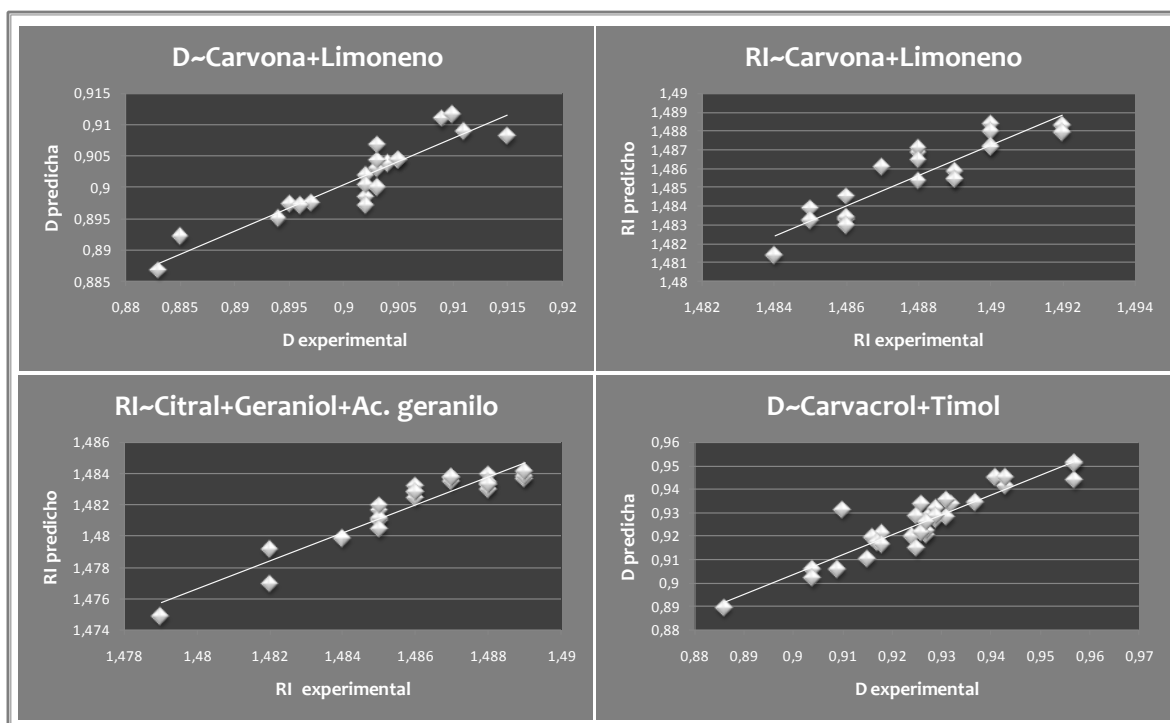
obviamente afectados por la relación que tienen estas PFQ con los compuestos mayoritarios de los AE (Ver **Tablas 19, 23 y 26**), siendo mejores para los AE en que mayor correlación existe.

**Tabla 30.** Ejecución de los modelos para predecir RI y D a partir del porcentaje de los compuestos mayoritarios en los AE.

Modelos	RMSEP	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> <sub>adj</sub>
D= $9.05 \cdot 10^{-1} + 6.80 \cdot 10^{-4} \text{Carvona} - 6.24 \cdot 10^{-4} \text{Limoneno}$ RI= $1.50 - 5.15 \cdot 10^{-5} \text{Carvona} - 3.18 \cdot 10^{-4} \text{Limoneno}$	$3.10 \cdot 10^{-3}$	0.700	0.689
D= $8.87 \cdot 10^{-1} + 1.62 \cdot 10^{-4} \text{Cit} + 1.93 \cdot 10^{-5} \text{Ger} - 1.05 \cdot 10^{-3} \text{Mir} - 9.50 \cdot 10^{-5} \text{Acg}$ RI= $1.47 + 1.79 \cdot 10^{-4} \text{Cit} - 6.09 \cdot 10^{-5} \text{Ger} - 1.33 \cdot 10^{-4} \text{Acg}$	$3.40 \cdot 10^{-3}$	0.618	0.538
D= $8.57 \cdot 10^{-1} + 1.27 \cdot 10^{-3} \text{Carvacrol} + 1.11 \cdot 10^{-3} \text{Timol}$ RI= $1.48 + 4.64 \cdot 10^{-4} \text{Carvacrol} + 2.82 \cdot 10^{-4} \text{Timol}$	$5.97 \cdot 10^{-3}$	0.852	0.842
	$8.56 \cdot 10^{-3}$	0.269	0.218

Cit=citral; Ger=geraniol; Mir=mirceno; Acg=acetato de geraniol

**Figura 13.** Valores experimentales contra los predichos de RI y D obtenidos de los modelos inversos.



- **Aplicación adicional**

Para conocer la ejecución de los modelos generados sobre ejemplares con composición diferente a la de la muestra usada, uno de los AE de *L. alba* empleados en este estudio se sometió a destilación fraccionada a presión reducida en el equipo *spinning band distillation* 9600 de la corporación B/R *Instrument*. Se obtuvieron 5 fracciones (F) con diverso contenido de limoneno y carvona, provenientes de recolectar el destilado en diferentes rangos de temperatura de condensación; las fracciones fueron obtenidas con la ayuda de dos estudiantes de pregrado de Ingeniería Química, Ever Ortiz y Zaid Rincón, cuyo trabajo de investigación consiste en la rectificación de este AE.

Las fracciones se analizaron fisicoquímicamente y mediante GC-FID, para aplicarles los modelos, los resultados de las pruebas realizadas y de la predicción del contenido de limoneno y carvona se registran en la **Tabla 31**, junto con sus condiciones de obtención (temperatura de condensación; T y presión; P). Cabe resaltar, que una ventaja adicional de los modelos seleccionados para la determinación de los compuestos mayoritarios de *L. alba*, es que no requieren de la medición de todas las propiedades fisicoquímicas empleadas en este estudio, lo que se constituye en ahorro de tiempo y costos si se trata de medirlas sólo con el fin de predecir el contenido de los componentes mayoritarios.

La capacidad de predicción deficiente mostrada para estas fracciones, se explica teniendo en cuenta que los modelos para la carvona y el limoneno empleados, fueron los seleccionados (Véase **Tabla 29**) del AE de *L. alba*, por lo que su uso debe limitarse a aquellos AE que estén dentro del rango de composición y de PFQ establecidos en los intervalos de confianza para la muestra analizada (Véase **Tabla 16**), que fueron los rangos de valores con los cuales se desarrollaron dichos modelos. Se puede observar al comparar esos valores límites con los presentados por las fracciones, que los modelos no aplican totalmente para este caso. Por esta

misma razón, en la **Gráfica 12**, donde se muestra la distribución de los residuales para los modelos del limoneno, se observa un pequeño intervalo alejado de los demás (indicado con una flecha), debido a que dentro del grupo de datos de validación hay un pequeño grupo de muestras con porcentajes altos (> 50%) de este compuesto, por lo que los modelos no se ejecutaron bien con estos AE, al ser valores atípicos con respecto a los analizados. Por lo tanto, estos modelos funcionan correctamente para los rangos establecidos, rangos que corresponderán a los AE con denominación de origen (e.g., AE de *L. organoides* colombiano).

**Tabla 31.** PFQ, contenido de carvona y limoneno experimental (exp) y predicho (pred) de fracciones (F) del AE de *L. alba* y condiciones de obtención.

Ítem	F1	F2	F3	F4	FONDO
T(°C)	61-67	65-67	92-95	98	-
P(mm Hg)	12	12	4	4	-
AV*	0.22	0.22	0.61	0.34	11
EV*	2.12	18	103.7	156	82
RI	1.473	1.473	1.491	1.493	1.513
D	0.843	0.943	0.973	0.948	1.078
Carvona <sub>exp</sub>	-	0.05	60.62	62.18	39.19
Carvona <sub>pred</sub>	-0.46	34.79	52.66	46.03	63.38
Error	0.46	-34.74	-7.96	16.15	24.19
Limoneno <sub>exp</sub>	90.47	88.06	0.10	-	-
Limoneno <sub>pred</sub>	85.36	57.61	17.09	18.74	-50.73
Error	5.11	30.46	16.99	-18.74	50.73

\*Medidos en mg de KOH/g deAE

## CONCLUSIONES

- Las propiedades fisicoquímicas (PFQ) son datos fácilmente adquiribles y apropiados para el establecimiento de la identidad de los AE de *L. alba*, *L. origanoides* y *C. flexuosus*; así como para la determinación cuantitativa de sus compuestos mayoritarios, siempre y cuando las muestras a evaluar estén dentro de los intervalos de las PFQ en los cuales se desarrollaron los modelos. De las 7 medidas físicas evaluadas, para fines cualitativos y de predicción, sólo 3 pruebas se hacen necesarias básicamente, a saber: D, RI y AV, lo que se constituye un logro adicional del presente trabajo, al reducirse entonces los costos y el tiempo de evaluación de muestras nuevas.
- La medición de las PFQ de D, RI, AV y EV permiten la determinación del contenido (%) del limoneno y carvona en el AE de *L. alba*, RI y AV del citral en *C. flexuosus*, las de AV, RI, D y OR del carvacrol y timol en *L. origanoides*; con intervalos de tolerancia (95% de confianza; medidos como  $\pm 2$  SEP) de  $\pm 2.93\%$ ,  $\pm 6.25\%$ ,  $\pm 3.10\%$ ,  $\pm 4.40$  y de  $\pm 2.20 \%$ , respectivamente. Al ser las medidas físicas más relacionadas con la composición de los AE, sirven como criterios para la identificación de su genuinidad y su distinción entre muestras de diferentes orígenes.
- La baja correlación entre las PFQ y su relación con los compuestos mayoritarios de los AE, permitió que los modelos obtenidos mediante OLS fuesen sencillos y con un ajuste aceptable, medido como  $R^2$ , entre el contenido (%) experimental y el predicho de 0.753, 0.641, 0.870 y 0.840 para el limoneno, carvona, citral y carvacrol, respectivamente.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] BURT, S., Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review, *Int. J. Food Microbiol.*, **2004**, 94, 223-253.
- [2] GRASSMANN, J., HIPPELI, S., ELSTNER., E., Review: Plant's defence and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress, *Plant Physiol. Biochem.*, **2002**, 40, 471-478.
- [3] BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M., Biological effects of essential oils- A review, *Food Chem. Toxicol.*, **2008**, 46, 446 – 475.
- [4] STASHENKO, E.E., TORRES, W., MARTÍNEZ, J.R. A Study of the compositional variation of the essential oil of ylang-ylang (*Cananga odorata* Hook Fil. et Thomson, *forma genuine*) during flower development, *J. High Resol. Chromatogr.*, **1995**, 18, 101-104.
- [5] MASOTTI, V., JUTEAU, F., BESSIE`RE, J.M., VIANO, J., Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities, *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 7115–7121.
- [6] TABATABAIE, S., NAZARI, J., Influence of nutrient concentrations and NaCl salinity on the growth, photosynthesis, and essential oil content of peppermint and lemon verbena, *Turk J. Agric. For.*, **2007**, 31, 245-253.
- [7] LEWINSOHN, E., DUDAI, N., TADMOR, Y., KATZIR, I., RAVID, U., PUTIEVSKY, E. and JOEL, M., Histochemical localization of citral accumulation in lemongrass leaves (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., Poaceae), *Ann Bot-London*, **1998**, 81, 35-39.
- [8] GUENTHER, E., The examination and analysis of essential oils, synthetics, and isolates, in: *The essential oils*, Volume I, New York: Litton Educational, **1948**, 227-271.
- [9] CAN, K.H., DEMIRCI, F., Chemistry of essential oils, In: *Flavour and fragrances: chemistry bioprocessing and sustainability*, Anadolu University, Faculty of Pharmacy, Eskişehir, Turkey: Springer, **2007**, 43 -75.
- [10] CRAVEIRO, A.A., CALDAS, D., Óleos essenciais e química fina, *Quim. Nova*, **1993**, 16 (3), 224-228.
- [11] LIMA, R., CARDOSO, M., MORAES, J., VIEIRA, S., MELO, B., FILGUEIRAS, C. Composição dos óleos essenciais de anis-estrelado *Illicium verum* L. e de

Capim-limão. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: avaliação do efeito repelente sobre *Brevicoryne brassicae* (L.) (Homoptera: Aphididae), *BioAssay*, **2008**, 3 (8), 1-6.

[12] [http://www.science-metrix.com/eng/methods\\_scientometrics\\_t.htm#top](http://www.science-metrix.com/eng/methods_scientometrics_t.htm#top)

Consultada el 29 de mayo de 2009.

[13] ROSSI, J.P., DELFINO, J.M., Cienciometría: instrumentos de evaluación y crítica, *Rev. Ciencia Hoy en Línea*, **2005**, 15 (89), 24-29.

[14] ISMAN, M.B., Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world, *Ann. Rev. Entomol.*, **2006**, 51, 45-66.

[15] [http://www.gcimagazine.com/marketstrends/segments/fragrance/15520492.html?utm\\_source=Most+Read&utm\\_medium=website&utm\\_campaign=Most+Read](http://www.gcimagazine.com/marketstrends/segments/fragrance/15520492.html?utm_source=Most+Read&utm_medium=website&utm_campaign=Most+Read).

Consultado el 1 de septiembre de 2010.

[16] <http://www.alacrastore.com/storecontent/ffocus/35020>, Freedomia Focus on Flavors & Fragrances. Consultado en septiembre de 2010.

[17] Instituto de investigación de recursos biológico Alexander von Humboldt, Biocomercio sostenible, Estudio del mercado colombiano de los aceites esenciales, Bogotá, Colombia, **2003**, 1 - 109.

[18] NEDFI CMD, Handbook on medicinal & aromatic plants (package of practices), Annexure III, Guwahati, India, **2005**, 97-98.

[19] NIESSEN, W.M.A., Current practice of gas chromatography-mass spectrometry, Chapter 1, Marcel Dekker, INC.: New York, **2001**, 1-20.

[20] STASHENKO, E., MARTÍNEZ, J., GC y GC-MS: configuración del equipo versus aplicaciones, *Scientia Chromatographica*, **2010**, 2 (3), 23-46.

[21] PICHARD, E., Practical laboratory skills training guides. Gas chromatography, RSC: Cambridge, UK, **2003**, 1-7.

[22] PRATS, M.S., JIMÉNEZ, A., Essential oils; analysis by GC, Encyclopedia of Chromatography, Taylor and Francis group, Boca Ratón: USA, 2<sup>da</sup> ed., volume one and two, **2005**, 591-594.

[23] ROUESSAC, F., ROUESSAC, A., Cromatografía de gases en: Análisis química, métodos y técnicas instrumentales modernas, McGraw Hill: Madrid, España, **2003**, 29-54.

- [24] BANDONI, A., Análisis y control de calidad de aceites esenciales, en: Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores, CYTED. Editorial Universidad Nacional de la Plata. 2ª ed., Argentina, La Plata, **2002**.
- [25] International Organization for Standardization, Essential oils: determination of relative density at 20 °C, ISO 279, Reference Method, **1998**.
- [26] DI GIACOMO, A., MINCIONE, B., Gli olii essenziali agrumari in Italia. Sottoprogetto 4, monografia raisa nº3, Laruffa Editore, **1994**, 208.
- [27] International Organization for Standardization, Essential oils: determination of refractive index, ISO 280, 2 ed. **1998**.
- [28] International Organization for Standardization, Essential oils: determination of optical rotation, ISO 592, 2 ed., **1998**.
- [29] METTLER TOLEDO. Tituladores Mettler Toledo DL31/DL38. Fundamentos de la valoración volumétrica según Karl-Fischer, con 10 aplicaciones seleccionadas, Folleto aplicativo 26, pp 6-8.
- [30] International Organization for Standardization, Essential oils: determination of freezing point, ISO 1041, **1973**.
- [31] International Organization for Standardization, General guidance on the determination of flashpoint, Technical report ISO/TR 11018.
- [32] International Organization for Standardization. Essential oils: determination of acid value, ISO 1242. 1999.
- [33] CLARK, B., CHAMBLEE, T., Acid-catalyzed reaction of citrus oils and other terpene-containing flavors, In off-flavors and beverages, Ed. Charalambous, G. Elsevier Science Pub. New York, NY., **1992**, 229-285.
- [34] International Organization for Standardization. Essential oils: determination of ester value, ISO 709. 2001.
- [35] KALUA, C.M., ALLEN, M.S., BEDGOOD, D.R., BISHOP, A.G., PRENZLER, P.D., ROBARDS, K., Olive oil volatile compounds, flavor development and quality: A critical review, *Food Chem.*, **2007**, 100, 273-286.
- [36] HOWES, M., SIMMONDS, M., KITE, G., Evaluation of the quality of sandalwood essential oils by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr., A*, **2004**, 1028, 307-312.

- [37] MOYLER, D., Citral from lemongrass and other natural sources its toxicology and legislation, in: Essential oil Bearing Grasses: The genus *Cymbopogon*, CRC Press: Boca Ratón, USA, **2009**, 223-237.
- [38] SINGH, M., SHARMA, S., RAMESH, S., Herbage, oil yield and oil quality of patchouli [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.] influenced by irrigation, organic mulch and nitrogen application in semi-arid tropical climate, *Ind. Crops Prod.*, **2002**, 16, 101-107.
- [39] International Organization for Standardization. Oil of geranium (*Pelargonium X spp.*), ISO 4731:2006.
- [40] ASEKUN, O.T., GRIERSON, D.S., AFOLAYAN, A.J., Effects of drying methods on the quality and quantity of the essential oil of *Mentha longifolia* L. subsp. *Capensis*, *Food Chem.*, **2007**, 101, 995-998.
- [41] KOTHARI, S.K., BHATTACHARYA, A.K., RAMESH, S., Essential oil yield and quality of methyl eugenol rich *Ocimum tenuiflorum* L.f. (syn. *O. sanctum* L.) grown in south India as influenced by method of harvest, *J. Chrom., A*, **2004**, 1054, 67-72.
- [42] KANKO, C., SAWALIHO, B., KONE, S., KOUKOUA, G., N'GUESSAN, Y., Étude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citrates*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus*, *C.R. Chimie*, **2004**, 7, 1039-1042.
- [43] PORTER, N., WILKINS, A., Chemical, physical and antimicrobial properties of essential oils of *Leptospermum scoparium* Kunzea and *ericoides*, *Phytochemistry*, **1998**, 50, 497-415.
- [44] TEIXEIRA, M.C., LEME, E.E., DELARMELINA, C., ALMEIDA, A., FIGUEIRA, G., SARTORATTO, A., Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*, *J. Ethnopharmacol.*, **2007**, 111, 197-201.
- [45] ARGYROPOULOU, C., DAFERERA, D., TARANTILIS, P., FASSEAS, C., POLISSIOU, M., Chemical composition of the essential oil from leaves of *Lippia citriodora* H.B.K. (Verbenaceae) at two developmental stages, *Biochem. Syst. Trans.*, **2007**, 35, 831-837.
- [46] HENNEBELLE, T., SAHPAZ, S., JOSEPH, H., BAILLEUL, F., Ethnopharmacology of *Lippia alba*, *J. Ethnopharmacol.*, **2008**, 116, 211-222.
- [47] GUPTA, M.P., 270 Plantas medicinales Iberoamericanas, 1a Ed., CYTED-SECAB, Bogotá, **1995**.

- [48] CICCIO, J.F., OCAMPO, R.A., Variación anual de la composición química del aceite esencial de *Lippia alba* (Verbenaceae) cultivada en Costa Rica, *Lankesteriana*, **2006**, 6 (3), 149-154.
- [49] MING, L.C. Influência de diferentes níveis de adubação orgânica na produção de biomassa e teor de óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. -Verbenaceae. (Tese mestrado). Curitiba: *UFPr.*, **1992**, 206.
- [50] RICCIARDI, G., VEGLIA, J., RICCIARDI, A., BANDONI, A., Examen comparado de la composición de los aceites esenciales de especies autóctonas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. BR., Argentina: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, *Comun. Cient. Tecnol.*, **1999**, VIII, 103-106.
- [51] RICCIARDI, G.; RICCIARDI, A.; BANDONI, A. Fitoquímica de Verbenáceas (*Lippias* y *Aloysias*) del nordeste Argentino, Facultad de Ciencias Exactas y Agrimensura. *Comun. Cient. Tecnol.* **2000**. pp.104-108.
- [52] MING, L.C., STEFANINI, M., RODRIGUES, S., Ação de fitorreguladores no crescimento da erva-cidreira-brasileira. *Horticult. Brasil.*, **2002**, 20 (1), 18-23.
- [53] TAVARES, E.S., JULIÃO, L.S., LOPES, D., BIZZO, H.R., LAGE, C.L.S., LEITÃO, S.G., Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes, *Rev. Bras. Farmacogn.*, **2005**, 15, 1-5.
- [54] BARBOSA-FILHO, J.M., MEDEIROS, K.C.P., DINIZ, M.F.F.M., BATISTA, L.M., ATHAYDE-FILHO, P.F., SILVA, M.S., CUNHA, E.V.L., ALMEIDA, J.R.G.S., QUINTANS-JÚNIOR, L.J., Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase, *Rev. Bras. Farmacogn.*, **2006**, 16, 258-285.
- [55] MENESES, R., OCAZONEZ, R., MARTÍNEZ, J.R., STASHENKO, E.E., Inhibitory effect of essential oils obtained from plants grown in Colombia on yellow fever virus replication in vitro, *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, 2009, 8 (1).
- [56] ABAD, M.; BERMEJO, P.; VILLAR, A.; SÁNCHEZ, S. y CARRASCO, L., Antiviral activity of medicinal plant extracts, *Phytother. Res.*, **1996**, 11, 198-202.
- [57] STASHENKO, E.E., JARAMILLO, B.E., MARTÍNEZ, J.R., Comparison of different extraction methods for 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, 93-103.
- [58] RAMOS, A., VISOZO, A., GARCÍA, A., RODRÍGUEZ, C.A., RIVERO, R., Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants, *J. Ethnopharmacol.*, **2003**, 87, 241-246.

- [59] AGUIAR, J., COSTA, M., NASCIMENTO, S., SENA, K., Atividade antimicrobiana de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae), *Rev. Bras. Farmacogn.*, **2008**, 18 (3), 436-440.
- [60] CÁCERES, A., ÁLVAREZ, A.V., OVANDO, A.E.O., SAMAYOA, B.E., Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 1. Screening of 68 plants against gram-positive bacteria, *J. Ethnopharmacol.*, **1991**, 31, 193- 208.
- [61] DUARTE, M.C.T., FIGUEIRA, G.M., SARTORATTO, A., REHDER, V.L.G., DELARMELENA, C., Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants, *J. Ethnopharmacol.*, **2005**, 97, 305-311.
- [62] YAMAMOTO, P.Y., COLOMBO, C.A., AZEVEDO, J.A., LOURENÇÃO, A.L., MAYO, M.O., da SILVA, G.D., CHIORATO, A.F., MELLO, A.L., SIQUEIRA, W.J., Performance of ginger grass (*Lippia alba*) for traits related to the production of essential oil, *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)*, **2008**, 65 (5), 481-489.
- [63] CASTRO, D.M.; MING, L.C.; MARQUES, M.O.M., Biomass production and chemical composition of *Lippia alba* (MILL.) N.E. BR. Ex Britt & Wilson in leaves on different parts in different seasons, *Acta Hort.*, **2002**, 569, 111-115.
- [64] United Nations, the United Nations conference on trade and development (UNCTAD), Market brief in the European Union for selected natural ingredients derived from native species, *Lippia alba*: prontoalivio, erva cidreira, juanilama, melissa, **2005**.
- [65] PINO, J.A., ORTEGA, A.G., ROSADO, A., RODRÍGUEZ, M., BALUJA, R., Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, *Rev. Cubana Farm.*, **1996**, 30 (1).
- [66] MAIA, J.G., ANDRADE, E.H.A., Database of the amazon aromatic plants and their essential oils, *Quim. Nova*, **2009**, 3, 595-622.
- [67] LECLERCQ, P.A., SILVA, H., GARCÍA, J.E., HIDALGO, T., CERRUTTI, M., MESTANZA, F. RÍOS, E., NINA, L., NONATO, R., ALVARADO, R., MENÉNDEZ, R., Aromatic plant oils of the Peruvian Amazon. Part 1. *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. and *Cornutia odorata* (Poeppig) Poeppig ex Schauer, Verbenaceae, *J. Essent. Oil. Res.*, **1999**, 11, 753-756.
- [68] OLIVEIRA, D., LEITÃO, G., BIZZO, H., LOPES, D., ALVIANO, D., ALVIANO, C., LEITÃO, S., Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* H.B.K., *Food Chem.*, **2007**, 101, 236-240.

- [69] SILVA, N.A., ANDRADE, E.H.A., MAIA, J.G., Capacidade antioxidativa e toxicidade do óleo essencial e extrato metanólico de *Lippia shomburgkiana* Schauer, Faculdade de Química, UFPA, Belém.
- [70] SANTOS, F. J. LOPES, J. A., CITO, A. M., OLIVEIRA, E. H., LIMA, S. G., REIS, F. A., Composition and biological activity of essential oils from *Lippia organoides* H.B.K., *J. Essent. Oil Res.*, **2004**, 16, 504–506.
- [71] ALBESIANO S, RANGEL-CH JO, CADENA, A., La vegetación del cañón del río Chicamocha (Santander, Colombia). *Caldasia*, **2003**, 25, 73-99.
- [72] FLEISHER, A., SNEER, N., Oregano spices and *Origanum* chemotypes, *J. Sci. Food Agric.*, **1982**, 33, 441–446.
- [73] OLIVEIRA, D.R., Levantamento Etnobotânico das Plantas Medicinais Utilizadas pela Comunidade de Oriximiná (Pará) com enfoque etnofarmacológico para o Gênero *Lippia*, Master Thesis, Rio de Janeiro: UFRJ/NPPN, **2004**.
- [74] STASHENKO, E.E., RUIZ, C., MUÑOZ, A., CASTAÑEDA, M., MARTINEZ, J., Composition and antioxidant activity of essential oils of *Lippia organoides* HBK grown in Colombia, *Nat. Prod. Commun.*, **2008**, 3 (4), 563-566.
- [75] NEIRO, L., OLIVERO, J., STASHENKO, E., Repellent activity of essential oils from seven aromatic plants grown in Colombia against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera), *J. Stored Prod. Res.*, **2009**, 45, 212-214.
- [76] GALLINO, M. A., Una Verbenacea Essenziera Ricca in Timolo: *Lippia organoides* H.B.K. *Essenze Derivati Agrumari*, **1987**, 57 (4), 628–629.
- [77] CELIS, C.N., Estudio comparative de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de *Lippia alba*, *Lippia organoides* y *Phyla (Lippia) dulcis*, especies de la familia Verbenaceae, Bucaramanga: Proyecto de grado (Química), Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, **2007**.
- [78] STASHENKO, E., MARTÍNEZ, J., RUÍZ, C., ARIAS, G., DURÁN, C., SALGAR, W., CALA, M., *Lippia organoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis, *J. Sep. Sci.*, **2010**, 33, 93-103.
- [79] MAY, A., BOVI, O., MAIA, N., MORAES, A., PINHEIRO, M., MARIO, M., Influência do intervalo entre cortes sobre a produção de biomassa de duas espécies de capim limão, *Hortic. Bras.*, **2008**, 26, 379-382.
- [80] FORMAČEK V, KUBEČZKA K., Essential oil analysis by capillarychromatography and carbon-13 NMR spectroscopy. New York: J. Wiley, **1982**, 155 -160.

- [81] SHARMA, P., MONDHE, D., MUTHIAH, S., Pal, H., SHAHI, A., SAXENA, A., QAZI, N., Anticancer activity of an essential oil from *Cymbopogon flexuosus*, *Chem. Biol. Interact.*, **2009**, 179, 160-168.
- [82] BOEKE, S.J., BARNAUD, J.J., KOSSOU, D.K., Efficacy of plant extract against the cowpea beetle, *Callosobruchus maculatus*. *Int. J. Pest Manage.*, **2004**, 50, 251-258.
- [83] LALKO, J., API, A., Citral: identifying a threshold for induction of dermal sensitization, *Regul. Toxicol. Pharm.*, **2008**, 52, ISSUE 1, 62-73.
- [84] NATH, S., SARMA, K., VAJEZIKOVA, I. and LECLERCQ, P., Comparison of volatile inflorescence oils and taxonomy of certain *Cymbopogon* taxa described as *Cymbopogon flexuosus* (Nees ex Steud.) Wats, *Biochem. Syst. Ecol.*, **2002**, 30, 151-162.
- [85] KEITHLEY, R., HEIEN, M., WIGHTMAN, R., Multivariate concentration determination using principal component regression with residual analysis, *Trends Anal. Chem.*, **2009**, 28 (9), 1127-1136.
- [86] CHRISTENSEN, J.H., TOMASI, G., Practical aspects of chemometrics for oil spill fingerprinting, *J.Chromatogr., A.*, **2007**, 1169, 1-22.
- [87] IODICE, A., PALUMBO, F., GREENACRE, M., Exploratory data analysis leading towards the most interesting simple association rules, *Comput. Stat. Data An.*, **2008**, 52, 3269-3281.
- [88] VARMUZA, K., FILZMOSER, P., Principal component analysis, in: Introduction to multivariate statistical analysis in chemometrics, CRC PRESS: Florida, Boca Raton, USA, **2008**.
- [89] CSERHÁTI, T., FORGÁCS, E., Chemometrics in chromatography, in: Encyclopedia of chromatography, Boca Raton, FL, **2005**.
- [90] SMITH, L., A tutorial on principal components analysis, **2002**. Disponible en: [http://www.cs.otago.ac.nz/cosc453/student\\_tutorials/principal\\_components.pdf](http://www.cs.otago.ac.nz/cosc453/student_tutorials/principal_components.pdf). Consultado en junio de 2009.
- [91] VARMUZA, K., FILZMOSER, P., Calibration, in: Introduction to multivariate statistical analysis in chemometrics, CRC PRESS: Boca Raton, USA, **2008**.
- [92] AL-ALAWI, S., ABDUL-WAHAB, S., BAKHEIT, C., Combining principal component regression and artificial neural networks for more accurate predictions of ground-level ozone, *Environ. Modell. Softw.*, **2008**, 23, 396-403.

[93] HEMMATEENEJAD, B., AKHOND, M., SAMARI, F., A comparative study between PCR and PLS in simultaneous spectrophotometric determination of diphenylamine, aniline and phenol: Effect of wavelength selection, *Spectrochim Acta, Part A*, **2007**, 67, 958-965.

[94] R, A language and environment for statistical computing, R Development Core Team, Foundation for Statistical Computing, [www.r-project.org](http://www.r-project.org), Vienna, Austria, 2009.

[95] FILZMOSER, P., HRON, K., REIMANN, C., Univariate statistical analysis of environmental (compositional) data: Problems and possibilities, *Sci. Total Environ.*, **2009**, 407, 6100-6108.

[96] IMAMURA, N., MIZOGUCHI, T., YAMAUCHI, H., KARPPINEN, M., Multivariate data analysis approach to understand magnetic properties of perovskite manganese oxides, *J. Solid State Chem.*, **2008**, 181, 1195-1203.

[97] VARMUZA, K., FILZMOSER, P., Introduction, in: Introduction to multivariate statistical analysis in chemometrics, CRC PRESS: United States of America, **2008**.

[98] LIU Y., DAUM, P., Relationship of refractive index to mass density and self-consistency of mixing rules for multicomponent mixtures like ambient aerosols, *J. Aerosol Sci.*, **2008**, 39, 974-986.

[99] International Organization for Standardization. Oil of lemongrass [*Cymbopogon flexuosus* (Nees ex Steudel) J.F. Watson], ISO 4718:2004(E).

[100] BOUWMEESTER, H., DAVIES, J., SMID, H., WELTEN, R., Physiological limitations to carvone yield in caraway (*Carum carvi* L.), *J. Crops Prod.*, **1995**, 4, 39-51.

[101] BAILER, J., AICHINGER, T., HACKL, G., de HUEBER, K., DACHLER, M., Essential oil content and composition in commercially available dill cultivars in comparison to caraway, *Ind. Crops Prod.*, **2001**, 14, 229-239.

[102] TOXOPEUS, H., BOUWMEESTER H., Improvement of caraway essential oil and carvone production in the Netherlands, *Ind. Crops Prod.*, **1993**, 1, 295-301.

[103] NHU-TRANG, T., CASABIANCA, H., GRENIER-LOUSTALOT, M., Deuterium/hydrogen ratio analysis of thymol, carvacrol,  $\gamma$ -terpinene and *p*-cymene in thyme, savory and oregano essential oils by gas chromatography-pyrolysis-isotope ratio mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1132, 219-227.

- [104] VITURRO, C., MOLINA, A., VILLA, W., HEIT, C., Characterization of *Origanum* species grown in Quebrada de Humahuaca, Jujuy, Argentina, through the study of the essential oils, *Mol. Med. Chem.*, **2010**, 21, 73-79.
- [105] WILKINS, C., OGAARD, J., Oregano headspace constituents, *Z Lebensn Unters Forsch*, **1991**, 192, 214-219.
- [106] Secretaria de Desarrollo Industrial, Fundación Produce, Análisis del potencial de la industria de aceites esenciales en especies nativas del estado de Chihuahua, **2003**.  
Consultada en noviembre de 2010. Disponible en:  
<http://201.131.19.30/estudios/agroindustria/Industria%20de%20Aceites%20Esenciales.pdf>
- [107] CASSEL, E., VARGAS, R.M.F., MARTINEZ, N., LORENZO, D., DELLACASSA, E., Steam distillation modeling for essential oil extractin process, *Ind. Crops Prod.*, **2009**, 29, 171-176.
- [108] JORGENSEN, K., SEGTMAN, V., THYHOLT, K., NÆS, T., A comparison of methods for analysing regression models with both spectral and designed variables, *J. Chemometr.*, **2004**, 18, 451-464.
- [109] VARMUZA, K., FILZMOSER, P., Comparison of some linear regression methods –available in R- for a QSPR problem, 4<sup>th</sup> German Conference on chemoinformatics, Poster presentation, Vienna University of Technology, Germany, **2008**.
- [110] SHIMODA, K., KONDO, Y., NISHIDA, T., HAMADA, H., NAKAJIMA, N., Biotransformation of thymol, carvacrol and eugenol by cultured cells of *Eucalyptus perriniana*, *Phytochemistry*, **2006**, 67, 2256-2261.