

**Optimización de elementos base de la cadena de valor de los aceites  
esenciales para el diseño de un prototipo de repelente de insectos**

**Diego Camilo Durán García, Químico *M.Sc.***

**Universidad Industrial de Santander  
Facultad de Ciencias  
Escuela de Química  
Doctorado en Química  
Bucaramanga  
2015**

**Optimización de elementos base de la cadena de valor de los aceites  
esenciales para el diseño de un prototipo de repelente de insectos**

**Diego Camilo Durán García, Químico M.Sc.**

**Tesis presentada como requisito parcial para  
optar al título de Doctor en Química.**

**Directores:**

**Elena E. Stashenko, Química *Ph.D.***

**Jairo R. Martínez, Químico *Ph.D.***

**Universidad Industrial de Santander  
Facultad de Ciencias  
Escuela de Química  
Doctorado en Química  
Bucaramanga  
2015**

## **DEDICATORIA**

*A mis padres: Mario y Mimy, por todos los valores que formaron en mí y por el excelente ejemplo de perseverancia y lucha por la vida.*

*Gracias.*

## AGRADECIMIENTOS

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

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

A los doctores Amanda Lucia Mora, Jesús Olivero, Stelia Carolina Méndez y Herminsul Cano, por la evaluación y aportes a la presente tesis doctoral.

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

A todos mis amigos y compañeros del Centro de Cromatografía y Espectrometría de Masas CROM-MASS y del Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM, en especial a Cori, Yuri, Lady, Andres y Andrés, Guspy, Delver, Sandra, José Virgilio, Juan Camilo. A los hermanos menores: Sombra “El Terrible”, Suka “La Grande”, Cucho “El Sabio”, que nos acompañan desde lo alto, a Bonifacio “El Magnífico”, Nené “El Hermoso” y Pedro “El Grande”, quienes me acompañaron en varias noches de trabajo y estudio.

A Colciencias: Contratos *RC-245-2011*, *RC-0572-2012*, *RC-0343-2013*, Beca Doctorados Nacionales 494-2009. Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural: Contratos 2007V3400-129-134; 2008V3781-3740. A la Vicerrectoría de Investigación y Extensión – UIS: Proyecto 5194.

Al Grupo de Investigación en Química Ambiental y Computacional de la Universidad de Cartagena, por el apoyo brindado en los ensayos de repelencia, en especial a los profesores Karina Caballero y Jesús Olivero y al Profesional Biólogo Ricardo Hernández Lambraño.

A las asociaciones de productores de plantas aromáticas y aceites esenciales del Departamento de Santander: Coagrosocorro, Manuela Beltrán y Aproasesco (Socorro); ACRESS (Sucre) y Asprocep, SAPAM SAT (Barbosa y Puente Nacional).

Finalmente, a todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron en la realización de esta tesis doctoral.

Muchas gracias a todos.

***“Camilo Cénivam”.***

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	35
<b>CAPÍTULO 1</b>	39
<b>1. MARCO TEÓRICO</b>	40
1.1. Aceites esenciales	40
1.1.1. Generalidades	40
1.1.2. Biosíntesis de los aceites esenciales	42
1.1.3. Métodos de extracción de los aceites esenciales	43
1.1.3.1. Expresión	43
1.1.3.2. Arrastre con vapor	44
1.1.3.2.1. Equipo de destilación por arrastre con vapor	44
1.1.3.3. Destilación con agua-vapor	51
1.1.3.4. Hidrodestilación	51
1.1.4. Aplicaciones y propiedades de los aceites esenciales	52
1.1.5. Variables que afectan la cantidad y composición de los AE	53
1.1.6. Control de calidad y valor de los aceites esenciales	55
1.1.7. Análisis de la composición química de los aceites esenciales	57
1.1.7.1. Cromatografía de gases	58
1.1.7.2. Cromatografía de gases – espectrometría de masas	61
1.1.8. La cadena de valor de los aceites esenciales	61
1.1.9. Especies bajo estudio	66
<b>2. PARTE EXPERIMENTAL</b>	79
2.1. Identificación botánica de las especies	79
2.2. Propagación, cultivos y cosecha del material vegeta	79
2.2.1. Selección del material vegetal	83
2.3. Manejo post-cosecha del material vegetal	84
2.4. Obtención de los aceites esenciales por el método de arrastre con vapor	85
2.5. Estudio de las variables que afectan el rendimiento y composición de los aceites esenciales de orégano de monte, citronela,	86

	palmarrosa y tomillo	
2.5.1.	Diseño experimental	86
2.6.	Análisis estadístico y encaje de modelos polinómicos a los datos experimentales	89
2.6.1.	Optimización del modelo y validación	90
2.7.	Caracterización química y cuantificación de los componentes de los aceites esenciales mediante GC-MS; GC-FID	91
2.7.1.	Preparación de muestras para el análisis por GC-MS y GC-FID	91
2.7.2.	Análisis por cromatografía de gases – espectrometría de masas GC-MS	91
2.7.3.	Análisis por GC-FID	92
2.8.	Elaboración de la ficha técnica de los aceites esenciales	95
2.8.1.	Ensayos fisicoquímicos para el control de calidad de aceites esenciales	96
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	101
3.1.	Identificación botánica de las especies bajo estudio	101
3.2.	Propagación y establecimiento de cultivos experimentales	101
3.3.	Rendimientos de extracción de los aceites esenciales de orégano de monte, citronela, palmarrosa y tomillo	104
3.4.	Análisis cromatográfico de los aceites esenciales (GC-MS).	111
3.5.	Evaluación de los parámetros de extracción de los aceites esenciales de <i>Thymus vulgaris</i> , <i>Lippia origanoides</i> , <i>Cymbopogon nardus</i> y <i>Cymbopogon martinii</i> , obtenidos por el método de arrastre con vapor	124
3.5.1.	Determinación de las mejores condiciones para la extracción de los aceites esenciales de <i>Thymus vulgaris</i> , <i>Lippia origanoides</i> , <i>Cymbopogon nardus</i> y <i>Cymbopogon martinii</i> por el método de arrastre con vapor	130
3.6.	Ficha técnica de los aceites esenciales	146
<b>4.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	151
<b>5.</b>	<b>DIVULGACIÓN DE RESULTADOS</b>	153
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA Capítulo 1</b>	154

	<b>CAPÍTULO 2</b>	163
	<b>INTRODUCCIÓN</b>	164
<b>1.</b>	<b>MARCO TEÓRICO</b>	166
1.1.	Destilación	166
1.1.1.	Destilación por lotes	166
1.1.2.	Destilación a presión reducida	169
1.1.3.	Destilación fraccionada	169
1.1.4.	Destilación fraccionada con columna giratoria (Spinning band distillation)	172
1.1.4.1.	<i>Spinning Band</i>	173
1.1.5.	Principios de la destilación fraccionada	174
1.1.5.1.	Diagramas de temperatura – composición	174
1.1.5.2.	Diagramas de equilibrio líquido – vapor	176
1.2.	Destilación fraccionada de aceites esenciales – adición de valor	176
1.3.	Componentes mayoritarios de los aceites esenciales	180
1.3.1.	Citronelal	180
1.3.2.	Citronelol	182
1.3.3.	Timol y carvacrol	183
1.4.	Actividad repelente de aceites esenciales	184
1.4.1.	Métodos para el análisis de la repelencia	187
1.5.	<i>Tribolium castaneum</i> (escarabajo rojo de la harina)	189
1.6.	Pronto alivio ( <i>Lippia alba</i> )	192
<b>2.</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	194
2.1.	Material vegetal	194
2.1.1.	<i>Lippia alba</i> (pronto alivio)	194
2.1.2.	<i>Lippia origanoides</i> (orégano de monte) y <i>C. nardus</i> (citronela).	194
2.2.	Obtención de los aceites esenciales	195
2.2.1.	<i>Lippia alba</i> (pronto alivio)	195
2.2.2.	<i>Lippia origanoides</i> y <i>Cymbopogon nardus</i>	196
2.3.	Destilación fraccionada de los aceites esenciales	197
2.4.	Caracterización química por GC-MS de aceites esenciales y fracciones obtenidas por destilación fraccionada	199

2.5.	Evaluación de la actividad repelente de los aceites esenciales y fracciones frente a <i>Tribolium castaneum</i> (Herbst)	200
2.5.1.	Insectos de la especie <i>Tribolium castaneum</i> (Herbst)	200
2.5.2.	Determinación de la actividad repelente: método de área de preferencia	202
2.6.	Análisis estadístico	205
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>206</b>
3.1.	Composición química y actividad repelente de los aceites esenciales de <i>Lippia alba</i> recolectada en diferentes regiones de Colombia, frente a <i>Tribolium castaneum</i>	206
3.1.1.	Rendimientos de extracción de pronto alivio ( <i>L. alba</i> )	206
3.1.2.	Composición química de los AE de pronto alivio ( <i>L. alba</i> )	206
3.1.3.	Actividad repelente de los AE de pronto alivio ( <i>L. alba</i> )	214
3.2.	Fraccionamiento del AE de orégano de monte ( <i>L. organoides</i> ): composición química y actividad repelente	219
3.2.1.	Fraccionamiento y composición química del AE de <i>L. organoides</i>	219
3.2.2.	Actividad repelente del AE y fracciones de <i>Lippia organoides</i>	225
3.3.	Fraccionamiento del AE de citronela ( <i>C. nardus</i> ): composición química y actividad repelente	233
3.3.1.	Fraccionamiento y composición química del AE de <i>C. nardus</i>	233
3.3.2.	Actividad repelente del AE y fracciones de <i>Cymbopogon nardus</i>	239
<b>4.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>248</b>
<b>5.</b>	<b>DIVULGACIÓN DE RESULTADOS</b>	<b>250</b>
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA Capítulo 2</b>	<b>251</b>
	<b>CAPÍTULO 3</b>	<b>259</b>
	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>260</b>
<b>1.</b>	<b>MARCO TEÓRICO</b>	<b>262</b>
1.1.	Encapsulamiento de aceites esenciales	262
1.2.	Métodos de encapsulamiento de los aceites esenciales	265
1.2.1.	Procesos de microencapsulación de Tipo A, basados en procesos químicos	266
1.2.2.	Procesos de microencapsulación de Tipo B	266

1.3.	Caracterización de las partículas encapsuladas	269
1.3.1.	Eficiencia de encapsulamiento (EE)	270
1.4.	<i>Headspace</i> estático (S-HS)	272
<b>2.</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	273
2.1.	Encapsulamiento del AE y fracciones de orégano de monte	273
2.2.	Monitoreo mediante <i>Headspace</i> estático de la fracción volátil del AE y fracciones de <i>L. origanoides</i> , encapsulados en PEG-6000	275
2.3.	Determinación de la eficiencia de la encapsulación	275
2.4.	Determinación del tamaño del AE y fracciones de <i>L. origanoides</i> encapsulados en PEG-6000	276
2.5.	Caracterización química de la fracción volátil de AE y fracciones encapsuladas	277
2.5.1.	Determinación de la cinética de liberación de los compuestos volátiles presentes en los encapsulados de PEG-6000	277
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	278
3.1.	Encapsulamiento del AE y fracciones de <i>L. origanoides</i>	278
3.1.1.	Eficiencia de encapsulamiento (EE)	287
3.2.	Tamaño de partículas encapsuladas	288
3.3.	Propuesta de prototipo de repelente de insectos	289
<b>4.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	292
<b>5.</b>	<b>DIVULGACIÓN DE RESULTADOS</b>	293
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA Capítulo 3</b>	294
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	296

## LISTADO DE TABLAS

		Pág.
<b>Tabla 1.</b>	Principales sectores y ramas de industrias donde se utilizan aceites esenciales y productos derivados	52
<b>Tabla 2.</b>	Parámetros analíticos utilizados en el control de calidad de aceites esenciales	56
<b>Tabla 3.</b>	Densidades de siembra empleadas en el establecimiento de cultivos experimentales empleados en el estudio	83
<b>Tabla 4.</b>	Diseño experimental factorial $2^3$ extendido empleado para evaluar el efecto del tamaño de partícula, el secado del material vegetal y la densidad de carga sobre el rendimiento de extracción y la composición del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> (tomillo)	87
<b>Tabla 5.</b>	Diseño experimental factorial $2^3$ extendido empleado para evaluar el efecto del tamaño de partícula, la densidad de carga y la presión del vapor, sobre el rendimiento de extracción y la composición de los aceites esenciales de <i>Lippia origanoides</i> (orégano de monte), <i>Cymbopogon nardus</i> (citronela) y <i>Cymbopogon martinii</i> (palmarrosa)	88
<b>Tabla 6.</b>	Reactivos empleados para la evaluación de las pruebas fisicoquímicas	98
<b>Tabla 7.</b>	Equipos empleados para la evaluación de las pruebas fisicoquímicas, según las normas ISO	98
<b>Tabla 8.</b>	Material vegetal propagado y establecido en los cultivos experimentales para el desarrollo de la Tesis	102
<b>Tabla 9.</b>	Rendimientos de extracción de los aceites esenciales de <i>Thymus vulgaris</i> , obtenidos en los diferentes experimentos correspondientes al diseño experimental factorial $2^3$ extendido	107
<b>Tabla 10.</b>	Rendimientos de extracción de los aceites esenciales de <i>Lippia origanoides</i> ., obtenidos en los diferentes experimentos	108

	correspondientes al diseño experimental factorial 2 <sup>3</sup> extendido	
<b>Tabla 11.</b>	Rendimientos de extracción de los aceites esenciales de <i>Cymbopogon nardus</i> , obtenidos en los diferentes experimentos correspondientes al diseño experimental factorial 2 <sup>3</sup> extendido	109
<b>Tabla 12.</b>	Rendimientos de extracción de los aceites esenciales de <i>Cymbopogon martinii</i> , obtenidos en los diferentes experimentos correspondientes al diseño experimental factorial 2 <sup>3</sup> extendido	110
<b>Tabla 13.</b>	Cantidad relativa (%) e identificación de los principales compuestos encontrados en el aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> L. obtenidos por el método de arrastre con vapor	113
<b>Tabla 14.</b>	Áreas cromatográficas totales y áreas cromatográficas de los compuestos mayoritarios obtenidas mediante el análisis por GC-FID en los experimentos según el diseño experimental para la especie <i>Thymus vulgaris</i>	115
<b>Tabla 15.</b>	Cantidad relativa (%) e identificación de los principales compuestos encontrados en el aceite esencial de <i>Lippia origanoides</i> obtenidos por el método de arrastre con vapor	116
<b>Tabla 16.</b>	Cantidad relativa (%) e identificación de los principales compuestos encontrados en el aceite esencial de <i>Cymbopogon nardus</i> obtenidos por el método de arrastre con vapor	118
<b>Tabla 17.</b>	Cantidad relativa (%) e identificación de los principales compuestos encontrados en el aceite esencial de <i>Cymbopogon martinii</i> obtenidos por el método de arrastre con vapor	119
<b>Tabla 18.</b>	Áreas cromatográficas totales y áreas cromatográficas de los compuestos mayoritarios obtenidas mediante el análisis por GC-FID en los experimentos según el diseño experimental para la especie <i>Lippia origanoides</i>	121
<b>Tabla 19.</b>	Áreas cromatográficas totales y áreas cromatográficas de los compuestos mayoritarios obtenidas mediante el análisis por GC-FID en los experimentos según el diseño experimental para	122

	la especie <i>Cymbopogon nardus</i> .	
<b>Tabla 20.</b>	Áreas cromatográficas totales y áreas cromatográficas de los compuestos mayoritarios obtenidas mediante el análisis por GC-FID en los experimentos según el diseño experimental para la especie <i>Cymbopogon martinii</i> .	123
<b>Tabla 21.</b>	Resultados obtenidos al aplicar el diseño factorial $2^3$ extendido al estudio del proceso de extracción de aceites esenciales de la especie <i>Thymus vulgaris</i> L. Datos del observable normalizados	124
<b>Tabla 22.</b>	Resultados obtenidos al aplicar el diseño factorial $2^3$ extendido al estudio del proceso de extracción del aceite esencial de la especie <i>Lippia origanoides</i> . Datos del observable normalizados	125
<b>Tabla 23.</b>	Resultados obtenidos al aplicar el diseño factorial $2^3$ extendido al estudio del proceso de extracción del aceite esencial de la especie <i>Cymbopogon nardus</i> . Datos del observable normalizados	126
<b>Tabla 24.</b>	Resultados obtenidos al aplicar el diseño factorial $2^3$ extendido al estudio del proceso de extracción del aceite esencial de la especie <i>Cymbopogon martinii</i> . Datos del observable normalizados	126
<b>Tabla 25.</b>	Análisis de varianza para la respuesta del diseño experimental implementado al estudio de la extracción del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> L., por el método de arrastre con vapor	128
<b>Tabla 26.</b>	Análisis de varianza para la respuesta del diseño experimental implementado al estudio de la extracción del aceite esencial de <i>Lippia origanoides</i> L., por el método de arrastre con vapor	128
<b>Tabla 27.</b>	Análisis de varianza para la respuesta del diseño experimental implementado al estudio de la extracción del aceite esencial de <i>Cymbopogon nardus</i> L., por el método de arrastre con vapor	129
<b>Tabla 28.</b>	Análisis de varianza para la respuesta del diseño experimental implementado al estudio de la extracción del aceite esencial de	129

	<i>Cymbopogon martinii.</i> , por el método de arrastre con vapor	
<b>Tabla 29.</b>	Ecuaciones obtenidas en el proceso de optimización de las variables del proceso de extracción y manejo postcosecha del aceite esencial de tomillo	130
<b>Tabla 30.</b>	Datos de validación del modelo matemático obtenido para la extracción del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> por el método de arrastre con vapor	132
<b>Tabla 31.</b>	Coefficientes de la ecuación polinómica ajustada al modelo matemático para las variables de humedad retirada (% p/p) y densidad de carga ( $\text{kg/m}^3$ ), en la extracción del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> L. por el método de arrastre con vapor	133
<b>Tabla 32.</b>	Valores óptimos de las variables empleadas en el proceso de extracción del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> L. por el método de arrastre con vapor	133
<b>Tabla 33.</b>	Mejores ecuaciones obtenidas como modelos para el proceso de extracción y manejo postcosecha de los aceites esenciales de orégano de monte, citronela y palmarrosa	135
<b>Tabla 34.</b>	Datos de validación de los modelos matemáticos obtenidos para la extracción de los aceites esenciales de <i>L. origanoides</i> , <i>C. nardus</i> y <i>C. martinii</i> por el método de arrastre con vapor	136
<b>Tabla 35.</b>	Coefficientes de las ecuaciones polinómicas ajustadas a los modelos matemáticos para las variables de tamaño de picado (cm), presión del vapor (psi) y densidad de carga ( $\text{kg/m}^3$ ), en la extracción de los aceites esenciales de <i>L. origanoides</i> , <i>C. nardus</i> y <i>C. martinii</i> por el método de arrastre con vapor	138
<b>Tabla 36.</b>	Valores de las variables empleadas en la extracción de los AE de <i>L. origanoides</i> , <i>C. nardus</i> y <i>C. martinii</i> por el método de arrastre con vapor, que permitieron obtener los valores optimizados del observable	141
<b>Tabla 37.</b>	Cantidad de aceite esencial (kg) obtenida por hectárea de	145

	cultivo por año, para las cuatro especies evaluadas, empleando las mejores condiciones de extracción por el método de arrastre con vapor	
<b>Tabla 38.</b>	Ficha técnica del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> , obtenido bajo las mejores condiciones de extracción evaluadas	146
<b>Tabla 39.</b>	Ficha técnica del aceite esencial de <i>Lippia organoides</i> , obtenido bajo las mejores condiciones de extracción evaluadas	148
<b>Tabla 40.</b>	Ficha técnica del aceite esencial de <i>Cymbopogon nardus</i> , obtenido bajo las mejores condiciones de extracción evaluadas	149
<b>Tabla 41.</b>	Ficha técnica del aceite esencial de <i>Cymbopogon martinii</i> , obtenido bajo las mejores condiciones de extracción evaluadas	150
<b>Tabla 42.</b>	Valores de las variables estudiadas, junto con la producción del AE por hectárea por año	151
<b>Tabla 43.</b>	Propiedades fisicoquímicas de citronelal, citronelol, timol y carvacrol	181
<b>Tabla 44.</b>	Número de <i>Voucher</i> (Herbario Nacional Colombiano) y rendimiento del AE de plantas <i>Lippia alba</i> , recolectadas en diferentes regiones de Colombia	195
<b>Tabla 45.</b>	Condiciones de presión y temperatura para el fraccionamiento de los AE de <i>L. organoides</i> y <i>C. nardus</i>	198
<b>Tabla 46.</b>	Composición química de los aceites esenciales de <i>Lippia alba</i> (quimiotipo carvona), obtenidos por MWHD, de plantas recolectadas en diferentes regiones de Colombia	208
<b>Tabla 47.</b>	Composición química de los aceites esenciales de <i>Lippia alba</i> (quimiotipo citral y carvona-citral), obtenidos por MWHD, de plantas recolectadas en diferentes regiones de Colombia	211
<b>Tabla 48.</b>	Porcentajes de repelencia obtenidos de los aceites esenciales de <i>Lippia alba</i> obtenidos de diferentes regiones de Colombia y el repelente comercial (IR3535) frente a <i>Tribolium castaneum</i> , a diferentes tiempos de exposición y concentración	215
<b>Tabla 49.</b>	Balance de masa de la rectificación del AE <i>Lippia organoides</i> ,	220

	empleando la tecnología de eje rotante. Presión de trabajo 10 Torr	
<b>Tabla 50.</b>	Composición química mayoritaria del AE <i>Lippia origanoides</i> y sus fracciones volátil (F1) y de fondo (FD), obtenidas por destilación fraccionada a presión reducida (10 Torr), empleando la tecnología de eje rotante	221
<b>Tabla 51.</b>	Reproducibilidad del porcentaje de timol y carvacrol y del peso del fondo de destilación, obtenido en la destilación fraccionada del AE de <i>Lippia origanoides</i>	223
<b>Tabla 52.</b>	Porcentajes de repelencia obtenidos para el aceite esencial de <i>Lippia origanoides</i> , sus fracciones volátiles y de fondo, obtenidas por destilación fraccionada, y el repelente comercial (IR3535) frente a <i>Tribolium castaneum</i> , a diferentes tiempos de exposición y concentración	226
<b>Tabla 53.</b>	Composición química mayoritaria del AE de <i>Lippia origanoides</i> y sus fracciones volátil (F1) y de fondo (FD), obtenidas por destilación fraccionada a presión reducida (10 Torr), empleadas para la evaluación de la actividad repelente frente a <i>T. castaneum</i>	229
<b>Tabla 54.</b>	Balance de masa de la rectificación del AE de <i>C. nardus</i> , empleando la tecnología de eje rotante. Presión de trabajo 7 Torr.	234
<b>Tabla 55.</b>	Composición química mayoritaria del AE de citronela y sus fracciones volátiles (F1 y F2), de fondo (FD) y de redestilación (RD) de la fracción 1, obtenidas por destilación fraccionada a presión reducida (7 Torr)	235
<b>Tabla 56.</b>	Reproducibilidad del porcentaje de citronelal y del peso del redestilado de la fracción 1, obtenido en la destilación fraccionada del AE de citronela	238
<b>Tabla 57.</b>	Porcentajes de repelencia obtenidos para el aceite esencial de	240

	<i>Cymbopogon nardus</i> , sus fracciones volátiles y de fondo, obtenidas por destilación fraccionada, y el repelente comercial (IR3535) frente a <i>Tribolium castaneum</i> , a diferentes tiempos de exposición y concentración	
<b>Tabla 58.</b>	Composición química mayoritaria del AE de citronela y sus fracciones volátiles (F1, F2, RD) y de fondo (FD), obtenidas por destilación fraccionada a presión reducida (7 Torr), empleadas para la evaluación de la actividad repelente frente a <i>T. castaneum</i>	243
<b>Tabla 59.</b>	Aplicaciones del encapsulamiento de aceites esenciales y los métodos empleados	264
<b>Tabla 60.</b>	Área cromatográfica de la fracción volátil, monitoreadas a 70°C mediante S-HS-GC-FID, del AE, F1 y FD de <i>Lippia organoides</i> encapsulados en PEG-6000, sometido a evaporación a 40°C. Periodo de muestreo: 30 días	283
<b>Tabla 61.</b>	Eficiencia de encapsulamiento del AE y fracciones F1 y FD de <i>L. organoides</i> en el polímero PEG-6000	287
<b>Tabla 62.</b>	Diámetro y potencial zeta de las partículas de AE y fracciones de <i>L. organoides</i> encapsuladas en PEG-6000 después de 24 horas de realizar el procedimiento de encapsulamiento (método del polímero fundido). n=3	289
<b>Tabla 63.</b>	Mejores condiciones técnicas obtenidas para el diseño de un prototipo de repelente de insectos que emplea el aceite esencial de <i>Lippia organoides</i> encapsulado en PEG-6000	290

## LISTADO DE FIGURAS

		Pág.
<b>Figura 1.</b>	Principales rutas de biosíntesis de los metabolitos secundarios de plantas	43
<b>Figura 2.</b>	Generador de vapor marca Teknik, instalado en el municipio de Sucre (Santander) y empleado en esta investigación	45
<b>Figura 3.</b>	Esquema de un extractor tradicional	46
<b>Figura 4.</b>	Difusor de vapor	46
<b>Figura 5.</b>	Cuellos de cisne utilizados en equipos de extracción	47
<b>Figura 6.</b>	Condensador de serpentín	48
<b>Figura 7.</b>	Diagrama de un condensador de tubos y carcaza	49
<b>Figura 8.</b>	Separadores de aceites esenciales y condensados	50
<b>Figura 9.</b>	Destilador de aceites esenciales por el método de arrastre con vapor con capacidad de 300 kg de material vegetal, instalado en la Vereda el Retiro, Sucre, Santander. Diciembre de 2011	51
<b>Figura 10.</b>	Partes principales de un cromatógrafo de gases	59
<b>Figura 11.</b>	Parcelas experimentales de cidrón ( <i>Lippia citriodora</i> ) establecidas en el Municipio de Sucre, Santander (Agosto de 2011)	63
<b>Figura 12.</b>	Tratamiento de postcosecha del material vegetal recolectado. <b>A.</b> Picado. Picadora Penagos PE-800. <b>B.</b> Secado en bandejas a temperatura ambiente. Vereda el retiro, Sucre, Santander, marzo de 2011	64
<b>Figura 13.</b>	Proceso de extracción de aceites esenciales por el método de arrastre con vapor. Vereda el Retiro, Municipio de Sucre, Santander, agosto de 2011	64
<b>Figura 14.</b>	Cromatógrafos de gases con diferentes sistemas de detección empleados en la caracterización química de los aceites esenciales. Laboratorio de Cromatografía y	65

	Espectrometría de Masas – CROM-MASS – CIBIMNOL – UIS	
<b>Figura 15.</b>	Planta piloto para la elaboración de jabones líquidos y sólidos. Jabones líquidos desarrollados. CIBIMOL, UIS noviembre de 2010	65
<b>Figura 16.</b>	Plantas de <i>Thymus vulgaris</i> L., cultivos en el municipio de Sucre, Santander. Octubre de 2010	67
<b>Figura 17.</b>	Plantas de <i>Lippia origanoides</i> , cultivos en el municipio de Socorro, Santander. Julio de 2010.	69
<b>Figura 18.</b>	Cultivo de palmarrosa ( <i>C. martinii</i> ), Finca Tierra Buena, Municipio del Socorro, Santander. Fotografía Proyecto 2007V3400-129 MADR-UIS	73
<b>Figura 19.</b>	Plantas de <i>Cymbopogon nardus</i> , cultivos experimentales en el Complejo Piloto de CENIVAM-UIS. Marzo de 2014	77
<b>Figura 20.</b>	Cultivos experimentales de <i>Cymbopogon martinii</i> (A), <i>Lippia origanoides</i> (B) y <i>Cymbopogon nardus</i> (C) establecidos en los municipios de Socorro y Barbosa, Santander	80
<b>Figura 21.</b>	Propagación del material vegetal en los viveros ubicados en las Sede UIS-Socorro, UIS-Barbosa (A) y en la Vereda La Pradera del Municipio de Sucre, Santander (B)	82
<b>Figura 22.</b>	Tratamiento postcosecha del material vegetal recolectado. Picado. Picadora Penagos PE-800. B. Secado en bandejas a temperatura ambiente. UIS-Socorro, noviembre 2010 (arriba). Vereda el Retiro, Sucre, Santander, febrero de 2011	84
<b>Figura 23.</b>	Destilador de aceites esenciales por el método de arrastre con vapor con capacidad de 300 kg de material vegetal, instalado en la Vereda el Retiro, Sucre, Santander. Diciembre de 2010	86
<b>Figura 24.</b>	Esquema general del diseño experimental aplicado al proceso de extracción del AE de tomillo	88
<b>Figura 25.</b>	Cromatógrafos de gases <i>Agilent Technologies 6890 Plus</i>	93

	<i>Series</i> y 7890 GC System acoplados a detectores selectivos de masas <i>Agilent Technologies 5973 Network</i> y 5975C, equipados con un puertos de inyección <i>split/splitless</i> y un inyector automático <i>Agilent 6890</i> . Foto: Camilo Durán, Laboratorios CIBIMOL-CENIVAM, octubre 2014	
<b>Figura 26.</b>	Cromatógrafo de gases de alta resolución <i>Agilent Technologies 6890N</i> , con detector de ionización en llama (FID). Foto: Camilo Durán, Laboratorios CIBIMOL-CENIVAM	93
<b>Figura 27.</b>	Equipos y montajes empleados durante la determinación de las propiedades fisicoquímicas de AE, según las normas internacionales ISO. <b>A.</b> Titulador volumétrico Karl Fischer, Mettler Toledo DL31 (Norma ISO 11021). <b>B.</b> Refractómetro tipo Abbe, Atago Nart-1T (Norma ISO 280). <b>C.</b> Picnómetro Brand y vaso refrigerante (Norma ISO 279). <b>D.</b> Polarímetro Optical Instruments (Norma ISO 592). Fotografías Andrea Agudelo. CIBIMOL CENIVAM-2012	99
<b>Figura 28.</b>	Registro fotográfico de las parcelas experimentales establecidas en el Municipio de Sucre, Santander (2009-2011)	103
<b>Figura 29.</b>	Planta de extracción de AE, instalada y puesta en marcha en el municipio de Socorro (Santander). Foto: Camilo Durán, Diciembre de 2010	104
<b>Figura 30.</b>	Planta de extracción de AE, instalada y puesta en marcha en el municipio de Sucre (Santander). Foto: Camilo Durán, Diciembre de 2010	105
<b>Figura 31.</b>	Planta de extracción de AE, instalada y puesta en marcha en el municipio de Barbosa (Santander). Foto: Camilo Durán, Febrero de 2015	105
<b>Figura 32.</b>	Aceites esenciales de <i>Thymus vulgaris</i> L. obtenidos en cada uno de los experimentos. Foto: Camilo Durán, Laboratorio	106

	CIBIMOL-CENIVAM, enero de 2011	
<b>Figura 33.</b>	Cromatograma típico obtenido por GC-MS del AE de <i>Thymus vulgaris</i> L., obtenido por el método de arrastre con vapor. Columna DB-5MS (60 m). <i>Split</i> 1:30. MSD (EI, 70 eV). <i>Istd</i> ( <i>n</i> -tetradecano)	112
<b>Figura 34.</b>	Cromatograma típico obtenido por GC-MS del AE de <i>Lippia origanoides</i> , obtenido por el método de arrastre con vapor. Columna DB-5MS (60 m). <i>Split</i> 1:30. MSD (EI, 70 eV). <i>Istd</i> ( <i>n</i> -tetradecano)	116
<b>Figura 35.</b>	Cromatograma típico obtenido por GC-MS del AE de <i>Cymbopogon nardus</i> , obtenido por el método de arrastre con vapor. Columna DB-5MS (60 m). <i>Split</i> 1:30. MSD (EI, 70 eV)	117
<b>Figura 36.</b>	Cromatograma típico obtenido por GC-MS del AE de <i>Cymbopogon martinii</i> , obtenido por el método de arrastre con vapor. Columna DB-5MS (60 m). <i>Split</i> 1:30. MSD (EI, 70 eV). <i>Istd</i> ( <i>n</i> -dodecano)	119
<b>Figura 37.</b>	Respuesta experimental ( $W_{AE} * A_{cm}$ ) para la extracción del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> L. por el método de arrastre con vapor Vs los valores obtenidos según el modelo matemático, al aplicar el diseño factorial	132
<b>Figura 38.</b>	Superficie de respuesta para el efecto de la densidad de carga en el alambique (kg/m <sup>3</sup> ) y el porcentaje de humedad del material vegetal de tomillo, sobre la cantidad de AE (kg) y área cromatográfica total de los compuestos timol, $\gamma$ -terpineno y <i>p</i> -cimeno	134
<b>Figura 39.</b>	Respuesta experimental ( $W_{AE} * A_{cm}$ ) para la extracción del aceite esencial de <i>Cymbopogon martinii</i> por el método de arrastre con vapor Vs los valores obtenidos según el modelo matemático, al aplicar el diseño factorial ( <b>Ecuación No 14</b> )	140
<b>Figura 40.</b>	Corte longitudinal de las hojas de citronela y palmarrosa. Foto	144

Andres Ramírez (septiembre 2015)

<b>Figura 41.</b>	Cromatograma típico del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> (tomillo)	147
<b>Figura 42.</b>	Cromatograma típico del aceite esencial de <i>Lippia origanoides</i>	148
<b>Figura 43.</b>	Cromatograma típico del aceite esencial de <i>Cymbopogon nardus</i>	149
<b>Figura 44.</b>	Cromatograma típico del aceite esencial de <i>Cymbopogon martinii</i>	150
<b>Figura 45.</b>	Montaje de destilación por lotes simple	167
<b>Figura 46.</b>	Montaje a nivel de laboratorio para la destilación fraccionada con adaptación para vacío	168
<b>Figura 47.</b>	<i>Spinning band distillation</i> (Tomado de <a href="http://www.brinstrument.com">www.brinstrument.com</a> )	173
<b>Figura 48.</b>	Diagrama de Temperatura-Composición para un sistema binario	175
<b>Figura 49.</b>	Diagrama equilibrio líquido – vapor a presión constante para un sistema de dos componentes	176
<b>Figura 50.</b>	Estructura del citronelal (3,7-dimetil-6-octenal)	180
<b>Figura 51.</b>	Estructura del citronelol (3,7-dimetil-6-octen-1-ol)	182
<b>Figura 52.</b>	Timol	184
<b>Figura 53.</b>	Carvacrol	184
<b>Figura 54.</b>	Ciclo de vida del escarabajo rojo de la harina (Fotografía y montaje, Grupo Química Ambiental y Computacional, Universidad de Cartagena)	189
<b>Figura 55.</b>	Planta de <i>Lippia alba</i> (pronto alivio). <b>A.</b> Quimiotipo citral. <b>B.</b> Quimiotipo carvona	192
<b>Figura 56.</b>	Montaje de hidrodestilación asistida por la radiación de microondas, MWHD. Fotografía Andres Ramírez. 2015	196
<b>Figura 57.</b>	Equipo de destilación fraccionada B/R Instrument 800 – <i>High Efficiency Micro Distillation</i>	197
<b>Figura 58.</b>	Mantenimiento y selección de los insectos <i>T. castaneum</i> para los ensayos de repelencia	201
<b>Figura 59.</b>	Esquema general del experimento de repelencia, empleando el método de área de preferencia (cinco diferentes	203

	concentraciones). Fuente: Grupo Química Ambiental y Computacional. Universidad de Cartagena	
<b>Figura 60.</b>	Registro fotográfico del ensayo de repelencia empleando el método de área de preferencia	204
<b>Figura 61.</b>	Perfil cromatográfico típico del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> Mill., quimiotipo carvona, obtenido por MWHD. Columna DB-5MS (60 m). Detector selectivo de masas (EI. 70 eV)	207
<b>Figura 62.</b>	Perfil cromatográfico típico del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> Mill., quimiotipo citral, obtenido por MWHD. Columna DB-5 (60 m). Detector selectivo de masas (EI. 70 eV)	210
<b>Figura 63.</b>	Perfil cromatográfico típico del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> Mill., quimiotipo carvona-citral, obtenido por MWHD. Columna DB-5 (60 m). Detector selectivo de masas (EI. 70 eV)	211
<b>Figura 64.</b>	Representación gráfica de las composiciones químicas relativas de los aceites esenciales de <i>Lippia alba</i> , aislados por MWHD, de 15 regiones diferentes de Colombia, en el espacio formado por los primeros dos componentes principales	213
<b>Figura 65.</b>	Correlación entre el porcentaje de repelencia y la cantidad relativa de compuestos oxigenados presentes en los aceites esenciales de <i>Lippia alba</i> obtenidos de plantas cosechadas en diferentes regiones de Colombia	217
<b>Figura 66.</b>	Perfiles cromatográficos típicos del aceite esencial de <i>Lippia origanoides</i> y sus fracciones obtenidas mediante destilación fraccionada (F1 y FD). Columna DB-5MS (60 m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV)	224
<b>Figura 67.</b>	Cantidad relativa de los componentes mayoritarios presentes en el AE, fracción volátil (F1) y fracción de fondo (FD) de <i>Lippia origanoides</i> , obtenidos mediante destilación fraccionada a presión reducida, con tecnología de columna rotante	225

<b>Figura 68.</b>	Porcentajes de repelencia del aceite esencial de <i>Lippia origanoides</i> (AE), fracciones (F1, FD), componentes mayoritarios (timol, carvacrol) y el repelente comercial (IR3535), frente a <i>Tribolium castaneum</i> , 2 h de exposición	228
<b>Figura 69.</b>	Porcentaje de repelencia del AE, fracciones F1 y FD y los compuestos timol y carvacrol frente a <i>T. castaneum</i> , a una concentración de 0.2 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ , para 2 y 4 horas de exposición	230
<b>Figura 70.</b>	Esquema general de la biosíntesis de los compuestos timol y carvacrol en plantas aromáticas	231
<b>Figura 71.</b>	Perfiles cromatográficos típicos del aceite esencial de citronela y sus fracciones obtenidas mediante destilación fraccionada (F1, F2 y FD). Columna DB-5MS (60 m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). (1) citronelal; (2) citronelol; (3) geraniol	236
<b>Figura 72.</b>	Cantidad relativa de los componentes mayoritarios presentes en el AE, fracciones volátiles (F1, F2, RD) y la fracción de fondo (FD) de citronela, obtenidos mediante destilación fraccionada a presión reducida, con tecnología de columna rotante. S-OH: sesquiterpenoles	238
<b>Figura 73.</b>	Porcentajes de repelencia del aceite esencial de citronela (AE), fracciones (F1, F2, RD, FD) y el repelente comercial (IR3535), frente a <i>Tribolium castaneum</i> , 2 h de exposición. 0.2 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$	242
<b>Figura 74.</b>	Porcentaje de repelencia del AE, fracciones F1, F2, RD y FD frente a <i>T. castaneum</i> , a una concentración de 0.2 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ , para 2 y 4 horas de exposición	245
<b>Figura 75.</b>	Correlación entre el porcentaje de repelencia y la cantidad relativa de compuestos oxigenados presentes en el AE y fracciones de citronela	246
<b>Figura 76.</b>	Automuestreador de espacio de cabeza, <i>Headspace Sampler</i>	272

	Hewlett Packard 7694E, acoplado a un cromatógrafo de gases GC-FID: Hewlett Packard 5890 Series II	
<b>Figura 77.</b>	Procedimiento de encapsulamiento del AE y fracciones F1 y FD de <i>Lippia origanoides</i> , mediante el método de dispersión del polímero fundido, PEG-6000	274
<b>Figura 78.</b>	Extracción del AE y fracciones de <i>L. origanoides</i> del sistema encapsulado con PEG-6000, por adición de agua	276
<b>Figura 79.</b>	Área cromatográfica total de los componentes volátiles del AE de orégano de monte ( <i>L. origanoides</i> ), presentes en el <i>Headpace</i> @70°C, en función del tiempo, a dos temperaturas de evaporación en el ambiente. S-HS-GC-FID, columna DB-WAX de 60 m	279
<b>Figura 80.</b>	Área cromatográfica total de los componentes presentes en el <i>Headspace</i> @70°C, del AE encapsulado en PEG-6000 y el AE sin encapsular, en función del tiempo. <i>Autosampler</i> S-HS-GC-FID, columna DB-WAX de 60 m	281
<b>Figura 81.</b>	Perfiles cromatográficos típicos de la fracción volátil del aceite esencial de <i>Lippia origanoides</i> (AE) encapsulado en PEG-6000, en diferentes días de muestreo (3, 10 y 14) obtenidos mediante S-HS-GC-FID, columna DB-WAX de 60 m	282
<b>Figura 82.</b>	Cinética de liberación de los compuestos presentes en el aceite esencial de <i>Lippia origanoides</i> (AE) y fracciones (F1, FD), encapsulados en PEG-6000. Monitoreo del área cromatográfica total, mediante S-HS-GC-FID, columna DB-WAX de 60 m	284
<b>Figura 83.</b>	Cinética de liberación de los compuestos mayoritarios del aceite esencial de <i>Lippia origanoides</i> , encapsulado en PEG-6000. Monitoreo del área cromatográfica de cada componente, mediante S-HS-GC-FID, columna DB-WAX de 60 m	286

**Figura 84.** Prototipo de cinta adhesiva doble faz con efecto repelente 291  
contra insectos *T.castaneum*, que contiene AE de *L.*  
*origanoides* encapsulado en PEG-6000

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

<b>AE</b>	Aceite(s) esencial(es)
<b>ANOVA</b>	Análisis de la varianza
<b>AV</b>	Arrastre con vapor
<b>C.V.</b>	Coefficiente de variación
<b><i>C. martinii</i></b>	<i>Cymbopogon martinii</i>
<b><i>C. nardus</i></b>	<i>Cymbopogon nardus</i>
<b>CO</b>	Compuestos oxigenados
<b>COL</b>	Número de colección del Herbario Nacional Colombiano
<b>d.i.</b>	Diámetro interno, mm
<b>d<sub>f</sub></b>	Espesor de la fase estacionaria, μm
<b>DLS</b>	<i>Dynamic Light Scattering</i>
<b>EE</b>	Eficiencia de encapsulamiento
<b>e.g.</b>	<i>Exempli gratia</i> (Por ejemplo)
<b>EI</b>	Energía de ionización
<b>eV</b>	Electrón – Voltio
<b>F1</b>	Fracción 1; fracción liviana
<b>F2</b>	Fracción 2
<b>FD</b>	Fracción de fondo – fondo de la destilación
<b>FID</b>	<i>Flame Ionization Detector</i> (Detector de ionización en llama)
<b>GC</b>	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases o cromatógrafo de gases, según el contexto)
<b>GC – FID</b>	<i>Gas Chromatography with Flame Ionization Detector</i> (Cromatografía de gases con detector de ionización en llama)
<b>GC – MS</b>	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas)
<b>ha</b>	Hectárea

<b>HD</b>	Hidrodestilación
<b>HNC</b>	Herbario Nacional Colombiano
<b>HP</b>	<i>Hewlett-Packard</i>
<b>HS</b>	<i>Headspace</i> (Espacio de cabeza)
<b>HS-SPME</b>	<i>Headspace Solid - Phase Microextraction</i> (Microextracción en fase sólida en el modo <i>headspace</i> ).
<b><i>i.e.</i></b>	<i>Id ets</i> (Es decir, o sea)
<b><math>I_k</math></b>	Índice de retención de Kováts
<b>IRL</b>	Índice de retención lineal
<b>IR3535</b>	Etilbutilacetilaminopropionato
<b><i>Istd</i></b>	<i>Internal Standard</i> (Estándar interno)
<b><i>L. alba</i></b>	<i>Lippia alba</i>
<b><i>L. origanoides</i></b>	<i>Lippia origanoides</i>
<b><i>m/z</i></b>	Relación masa carga
<b>M</b>	Monoterpeno (s)
<b>MO</b>	Monoterpeno(s) oxigenado(s)
<b>MS</b>	<i>Mass Spectrum, Mass Spectra, Mass Spectrometry</i> (Espectro(s) de masas o Espectrometría de masas, según el contexto)
<b>MSD</b>	<i>Mass Spectrometric Detector</i> (Detector selectivo de masas)
<b>MV</b>	Material vegetal
<b>MW</b>	<i>Microwave</i> (Microondas u horno de microondas), según el contexto
<b>MWHD</b>	<i>Microwave - Assisted Hydro - Destillation</i> (Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas).
<b>P &amp; T</b>	<i>Purge-and-Trap</i> (Purga y trampa)
<b>PA</b>	Poli(acrilato)
<b>PCA</b>	Análisis de componentes principales
<b>PDMS</b>	Poli(dimetilsiloxano)
<b>PDMS/DVB</b>	Poli(dimetilsiloxano)/Divinilbenceno

<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PLGA</b>	Ácido poliláctico-glicólico
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>PTFE</b>	Poli(tetraflúoretileno)
<b>RD</b>	Redestilación
<b>S</b>	Sesquiterpeno(s)
<b>SD</b>	Desviación estándar
<b>SFE</b>	<i>Supercritical Fluid Extraction</i> (Extracción con fluido supercrítico)
<b>S-HS</b>	<i>Headspace estático</i>
<b>SPME</b>	Microextracción en fase sólida
<b><i>Spray drying</i></b>	Secado por atomización
<b>SO</b>	Sesquiterpeno(s) oxigenado(s)
<b>t<sub>R</sub></b>	Tiempo de retención (min)
<b>t<sub>RR</sub></b>	Tiempo de retención relativo (min)
<b>TIC</b>	<i>Total Ion Current</i> (Corriente iónica total)
<b><i>T. castaneum</i></b>	<i>Tribolium castaneum</i>
<b><i>T. vulgaris</i></b>	<i>Thymus vulgaris</i>

## RESUMEN

**TÍTULO: OPTIMIZACIÓN DE ELEMENTOS BASE DE LA CADENA DE VALOR DE LOS ACEITES ESENCIALES PARA EL DISEÑO DE UN PROTOTIPO DE REPELENTE DE INSECTOS \***

**Autor:** Diego Camilo Durán García \*\*

**Palabras clave:** aceite esencial, optimización, fraccionamiento, actividad repelente, micro-encapsulamiento.

Mediante la construcción de modelos matemáticos empíricos, con base en diseños factoriales, se establecieron las mejores condiciones de tamaño de partícula, presión de vapor, densidad de carga y humedad retirada del material vegetal, en la destilación por arrastre con vapor, de los aceites esenciales (AE) de las especies tomillo, orégano de monte, citronela y palmarrosa. Se evaluó la actividad repelente frente a *T. castaneum* de los AE de *Lippia alba*, *Lippia origanoides* y *Cymbopogon nardus*. El AE de *L. origanoides*, presentó un porcentaje de repelencia igual o superior al compuesto de control (IR3535), a las 2 y 4 h de exposición. Los resultados de composición química y actividad biológica mostraron la existencia de una correlación positiva entre la cantidad de los compuestos oxigenados, presentes en los AE de *L. alba* y *C. nardus* y la actividad repelente frente a *T. castaneum*. Se evaluó la cinética de liberación de los compuestos volátiles presentes en AE y fracciones obtenidas por destilación fraccionada a presión reducida de *L. origanoides*, encapsulados en una matriz polimérica (PEG-6000). La cinética de liberación de los compuestos encapsulados del AE de *L. origanoides* fue más lenta que la de sus fracciones. Este procedimiento permitió estabilizar, en función del tiempo, la emisión de los componentes volátiles activos presentes en el AE. Se lograron tamaños de partícula entre 210-250 nm y valores de carga superficial (potencial zeta) de -8,0 mV. Se logró un porcentaje de encapsulamiento del AE de *L. origanoides* en PEG-6000 del 60% y una liberación sostenida de sus componentes hasta por 20 días, a 40°C. Los resultados obtenidos, permitieron proponer las condiciones técnicas para el diseño de un sistema prototipo que controle y repela la población de insectos de la especie *T. castaneum*, basados en el AE de *L. origanoides* encapsulado en PEG-6000.

\* Tesis Doctoral.

\*\* Facultad de Ciencias, Escuela de Química.

Directores: Elena E. Stashenko y Jairo René Martínez Morales

## ABSTRACT

**TITLE: OPTIMIZATION OF CRITICAL ELEMENTS ON THE ESSENTIAL OILS VALUE CHAIN TOWARDS THE DESIGN OF AN INSECT REPELLENT PROTOTYPE\***

**Author:** Diego Camilo Durán García \*\*

**Keywords:** essential oil, optimization, fractionation, repellent activity, microencapsulation.

Empirical mathematical models, based on factorial designs, were used to determine the best extraction conditions to obtain, by steam distillation essential oils (EO) from thyme, mountain oregano, citronella and palmarosa. For this purpose, parameters such as particle size, vapor pressure, charge density, and moisture needed to be removed from the plant material were studied. The repellent activity of *Lippia alba*, *Lippia origanoides* and *Cymbopogon nardus* EO was evaluated against *T. castaneum*. The EO of *L. origanoides*, showed a repellency percentage higher than the control compound (IR3535) after 2 and 4 h of exposure. In addition, a thorough analysis of the chemical composition and the biological activity of the EO of *L. alba* and *C. nardus* showed a positive correlation between the amount of oxygenated compounds and its repellent activity against *T. castaneum*. Another part of this work involved the evaluation of the kinetics of evaporation of volatile compounds present in the EO of *L. origanoides* and its fractions, (obtained by fractional distillation of *L. origanoides*) encapsulated after encapsulation in a polymer matrix (*i.e.* PEG-6000). Results showed that, pure EO encapsulated on PEG-6000, provided a slower release of volatile substances, compared with light fractions (LF) and found fractions (FF). Indeed, by having a 60 % *L. origanoides* EO encapsulated, it was possible to get a continuous and constant release of *L. origanoides* EO components at 40 °C over a period of 20 days. The microencapsulation stabilized the emission of volatile active components present in the EO. These results were obtained by using particles sizes ranging from 210 to 250 nm, and values of surface charge (*i.e.* zeta potential) of -8.0 mV. Overall this work presents a set of technical conditions suitable for the design of an insect repellent prototype, based on *L. origanoides* EO encapsulated in PEG-6000, able to control and repel the population of the specie *T. castaneum*.

\* Doctoral Thesis.

\*\* Facultad de Ciencias, Escuela de Química.

Directors: Elena E. Stashenko y Jairo René Martínez Morales

## INTRODUCCIÓN

El tema central que enmarca la presente tesis doctoral, es el desarrollo en Colombia, de la agroindustria de los aceites esenciales y su incorporación en una cadena de valor. Colombia es un importador neto de aceites esenciales, a pesar de poseer las condiciones geobotánicas para producirlos. Sin embargo, este es un mercado bastante competitivo que requiere un soporte técnico y científico continuo para lograr productos de alta calidad a bajos costos y en cantidad suficiente, con un suministro ininterrumpido. La participación en el mercado mundial de aceites esenciales requiere que cada actor esté en capacidad de ofrecer volúmenes anuales de producción del orden de 0,5 toneladas o más, para los aceites esenciales de mayor comercio. Los rendimientos de extracción de los aceites esenciales varían, generalmente, entre el 0.2 al 1.0% en peso. La masa vegetal que se recoge por cosecha cambia según la especie vegetal, pero puede tomarse como promedio una producción de 20 toneladas por hectárea cada año, con base en que en Colombia, en la gran mayoría de los casos se logran 3 cosechas por año. Estas cifras indican que en promedio, se requiere un cultivo de 5 ha para lograr 0,5 ton de aceite esencial, lo cual impone requisitos logísticos, operativos y técnicos particulares que requieren atención especial, para lograr competitividad.

El Centro de Investigación en Biomoléculas, CIBIMOL de la UIS, adscrito al Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM, durante los últimos 10 años ha venido desarrollando proyectos de investigación a escala piloto (6-8 ha) en el Departamento de Santander, con financiación del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Gracias a estos proyectos se ha venido implementando la infraestructura básica de la cadena productiva de los aceites esenciales, que incluye los sistemas propagación del material vegetal (viveros), el cultivo bajo prácticas de la agricultura limpia, el control preventivo de plagas con pesticidas

no-sintéticos, los procedimientos de cosecha y secado del material vegetal, la extracción del aceite esencial por arrastre con vapor de agua, y el compostaje del material vegetal residual. Los resultados parciales de esta experiencia muestran que sí es posible producir en Colombia aceites esenciales a precios competitivos en el mercado internacional, pero que los márgenes de utilidad son bastante estrechos y se logran solamente si se optimizan los rendimientos agrícolas y de extracción, se reducen costos logísticos (transporte del material vegetal) y de operación (mano de obra calificada) y se desarrollan productos donde se incorporan los aceites producidos ruralmente. También, es necesario avanzar en los procedimientos de rectificación de aceites esenciales, ya que esta etapa tecnológica hace que el valor unitario del aceite esencial en muchos casos se duplique. Algunas de las especies vegetales candidatas a suplir parte de la demanda nacional de aceites esenciales y por las cuales se ha mostrado algún interés son: *Cymbopogon nardus* (sector cosmético), *Cymbopogon martinii* (sector cosmético y de aseo), *Lippia origanoides* (sector agrícola y avícola) y *Thymus vulgaris* (sector cosmético y agrícola). Es por esta razón, que en la presente investigación se profundizó en la optimización de los procesos industriales para su producción, la rectificación y aislamiento de componentes de interés de estos aceites y su posterior estudio de la actividad biológica, para ser incorporados en productos finales, como por ejemplo, un repelente de insectos.

La presente tesis doctoral contempló la realización de tres bloques experimentales, para aplicar diversos procedimientos de optimización al diseño competitivo de un prototipo de repelente de insectos, mejorando los procesos de destilación, rectificación y liberación prolongada de aceites esenciales.

El primer capítulo abordó la optimización de los procesos de destilación, por el método de arrastre con vapor, para cuatro especies vegetales (tomillo, orégano de monte, citronela y palmarrosa), por medio de métodos de superficie de

respuesta. Se obtuvieron modelos matemáticos que describieron el comportamiento de la cantidad de cada aceite esencial (AE) y su composición química mayoritaria, en función de las variables densidad de carga dentro del alambique, tamaño de partícula, presión del vapor suministrado para la extracción y el porcentaje de humedad del material vegetal antes de la destilación. Con base en cada modelo empírico evaluado, se establecieron las mejores condiciones de extracción y manejo postcosecha, que permitieron obtener la mayor cantidad de AE con la mejor calidad posible.

En el segundo capítulo se estudiaron las propiedades repelentes de los aceites esenciales de pronto alivio, orégano de monte y citronela, frente al gorgojo castaño de la harina (*Tribolium castaneum*), empleando el método de área de preferencia. También, se sometieron a procesos de fraccionamiento y rectificación los AE de orégano de monte y citronela, con el fin de obtener fracciones de composición química reproducible y para evaluar la actividad repelente de fracciones y AE por separado, con el fin de encontrar posibles correlaciones entre la actividad biológica y la composición química de los AE y fracciones.

El tercer capítulo, abordó el estudio del encapsulamiento y la cinética de liberación de las sustancias volátiles del AE y fracciones de orégano de monte (*L. origanoides*), en una matriz polimérica (PEG-6000). Se presentan los resultados del estudio comparativo de los perfiles y cinética de liberación de sustancias volátiles, del aceite esencial de *Lippia origanoides*, que permitieron seleccionar las condiciones de micro-encapsulamiento del AE crudo y fracciones enriquecidas en diferentes componentes, para la liberación prolongada de mayor utilidad en el diseño de un prototipo de repelente contra insectos.

Con base en los mejores resultados de extracción del AE por el método de arrastre con vapor, los estudios de repelencia contra el insecto *T. castaneum* y las condiciones del encapsulamiento del AE de *L. origanoides*, se propuso un sistema prototipo que controla y repele la población de insectos de la especie *T. castaneum*, para su control en silos de almacenamiento de alimentos.

Esta investigación se desarrolló con la activa participación de productores de plantas aromáticas y aceites esenciales en los Municipios de Socorro, Sucre, Barbosa y Puente Nacional, Santander y con el soporte científico – tecnológico de los grupos CIBIMOL-UIS y Química Ambiental y Computacional de la Universidad de Cartagena, adscritos al Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM.

# Capítulo 1

## Aceites esenciales: generalidades y optimización de las variables de extracción

Mediante la construcción de modelos matemáticos empíricos, con base en diseños factoriales, se establecieron las mejores condiciones de tamaño de partícula, presión de vapor, densidad de carga y humedad retirada del material vegetal, en la destilación por arrastre con vapor, de los aceites esenciales (AE) de las especies tomillo, orégano de monte, citronela y palmarrosa, que permitieron obtener la mayor cantidad de AE, con la mejor calidad posible, en términos del mayor contenido de los componentes mayoritarios (timol, carvacrol, citronelal y geraniol). Los resultados obtenidos muestran que es posible desarrollar en Colombia, la agroindustria de los aceites esenciales, para al menos tres de las cuatro especies estudiadas. Los AE cumplieron satisfactoriamente con los estándares internacionales de calidad (Normas ISO). La especie *Lippia origanoides*, presentó los mejores resultados en la producción de su AE y por ello, es considerada en este estudio como una planta promisorio para su agroindustrialización en Santander, Colombia.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. ACEITES ESENCIALES

#### 1.1.1. Generalidades.

Un aceite esencial (AE) o esencia es una mezcla compleja de sustancias químicas que forman parte del metabolismo secundario de las plantas aromáticas; esta mezcla puede ser extraída mediante la destilación con arrastre con vapor, la destilación agua vapor, por hidrodestilación, o por expresión, en el caso de las cáscaras de los cítricos. Los constituyentes mayoritarios de los AE son moléculas de bajo y mediano peso molecular, generados en la planta por varias rutas biosintéticas; pertenecen a diferentes clases de sustancias químicas, *e.g.*, alcoholes, ácidos, ésteres, fenoles y terpenos, entre muchas otras. A algunos de ellos, les caracterizan un olor típico y una alta volatilidad. A ciencia cierta y con los detalles experimentales requeridos, todavía no se conocen todos los papeles que juegan los metabolitos secundarios en las plantas, porque ellos cumplen varias funciones y operan a través de diversos mecanismos [1].

Los aceites esenciales en las plantas pueden encontrarse en las diferentes células oleíferas (jengibre, cúrcuma, vainilla), en los canales secretorios (pino, artemisia, anís, angélica), estar presente en las glándulas (cítricos, eucaliptos) o en los tricomas (muchas plantas de las familias Verbenacea, Labiada, Asterácea, Solanácea, Geraniácea) [1]. El material vegetal, al ser sometido al vapor de agua, libera una mezcla odorífera líquida (aceite esencial) de una gran variedad de sustancias volátiles, que recuerdan el olor, en forma muy concentrada, de la misma planta. Esta mezcla puede tener desde 50 hasta más de 300 sustancias químicas y está compuesta por hidrocarburos terpénicos, sus derivados oxigenados, alcoholes, aldehídos y cetonas, así como por éteres, ésteres, compuestos fenólicos, fenilpropanoides y otros derivados [1]. La composición

química del aceite esencial también puede cambiar de acuerdo con el método de extracción y las condiciones de extracción que se empleen [2].

De planta a planta, el rendimiento de un aceite cambia mucho, puede variar desde < 0.01% en flores de jazmín y rosa hasta el 4-6% en semillas de cilantro, anís o coriandro. En promedio, las plantas aromáticas herbáceas poseen de 0,5 a 2% del aceite esencial. El rendimiento del aceite es una característica transcendental desde el punto de vista económico y de rentabilidad del proceso de su obtención; pero, existe otra propiedad, no menos importante, que es la calidad organoléptica del aceite, su apreciación sensorial, si es agradable o no, bienoliente, interesante, novedosa e inusual, sirve o no para su posterior incorporación a diversos productos comerciales [3, 5].

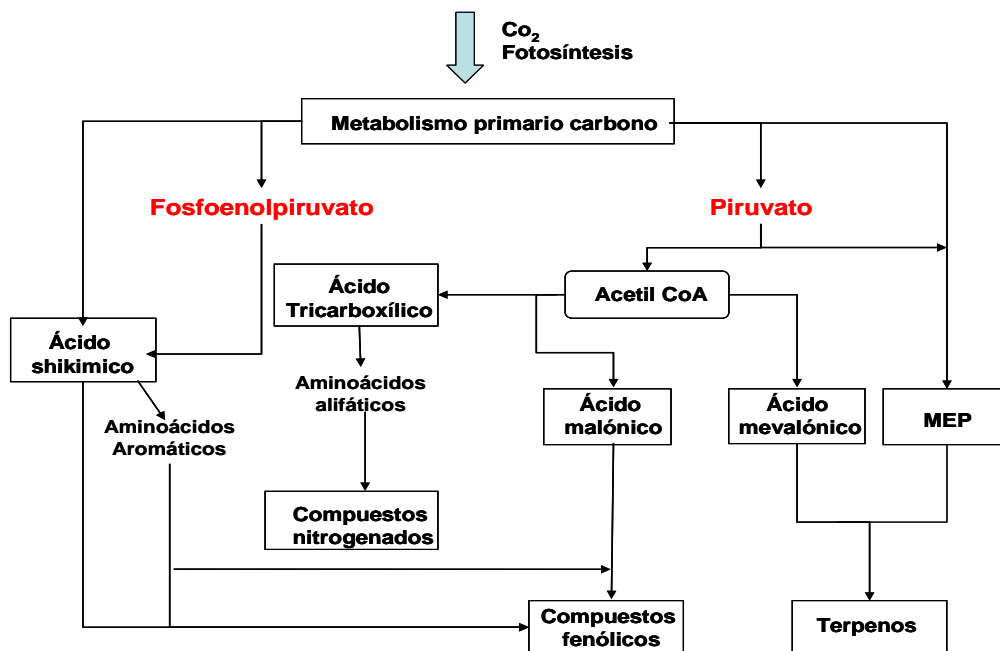
Los aceites esenciales obtenidos de plantas aromáticas, están formados en su mayoría por hidrocarburos terpénicos o terpenos (monoterpenos,  $C_{10}H_{16}$  y sesquiterpenos,  $C_{15}H_{24}$ ) y sus derivados oxigenados (alcoholes, aldehídos, cetonas y, menos frecuentemente, ácidos), que juntos se llaman terpenoides [6]. Debido a su variada composición química, los aceites esenciales o sus componentes, son agentes antibacterianos, antifúngicos, exhiben propiedades antidiabéticas y antivirales [1]. La clave del éxito en el uso de algunos aceites esenciales para eliminar bacterias, *e.g.*, *Staphylococcus aureus*, *E.coli*, resistentes a los antibióticos tradicionales y varios hongos patógenos, está relacionada con la composición muy compleja de los aceites, que son mezclas multicomponente formadas por sustancias con actividad biológica diversa, potenciada a menudo precisamente gracias a esta combinación única de varios componentes, que ejercen un notorio sinergismo [7].

### 1.1.2. Biosíntesis de los aceites esenciales.

Las plantas producen una gran diversidad de compuestos orgánicos, los cuales no tienen una relación muy directa con su crecimiento y desarrollo, este tipo de sustancias son conocidas como metabolitos secundarios [8]. Generalmente, estos compuestos no se relacionan directamente con el proceso de fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, síntesis de proteínas, asimilación de nutrientes, formación de carbohidratos, atribuidos exclusivamente al metabolismo primario de la planta [8].

Según su estructura química, los metabolitos secundarios se pueden clasificar en tres grupos: terpenos o terpenoides (análogos oxigenados), fenoles y sus derivados y compuestos nitrogenados. Se consideran varias rutas de biosíntesis para cada grupo de compuestos (**Figura 1**); para el caso de los terpenos, existen las rutas del ácido mevalónico y del metileritritolfosfato (MEP). Se observa, que ambas rutas biosintéticas dependen directamente del metabolismo primario de la planta y, éste, a su vez, de la capacidad fotosintética de la misma [8].

Durante varios años se ha considerado, que los metabolitos secundarios en las plantas son un material de desecho de las mismas. Sin embargo, varias investigaciones [9,10] han demostrado que estas sustancias actúan como mecanismo de defensa contra diferentes animales, enfermedades, condiciones climáticas adversas, así como atrayentes de insectos, agentes de polinización y/o como factores de competición con otras plantas [9].



**Figura 1.** Principales rutas de biosíntesis de los metabolitos secundarios de plantas [10].

### 1.1.3. Métodos de extracción de los aceites esenciales.

Para la extracción de aceites esenciales existen dos grandes grupos, a saber: por expresión y destilativos. La elección del método a utilizar es función del tipo de material a procesar (raíces, hojas, frutos, cáscaras, etc.) y de la estructura celular en donde se encuentre almacenado el aceite [11]. A continuación se describe cada grupo:

**1.1.3.1. Expresión.** Este método se emplea comúnmente en la obtención de aceites esenciales de cítricos, cuya esencia se encuentra distribuida en glándulas de la cáscara de los frutos. Sometiendo la corteza a una presión adecuada, se extrae el aceite de las glándulas y se arrastra con agua. Los aceites esenciales de los cítricos son muy susceptibles a degradación por calor o aire, por eso el proceso debe realizarse a temperaturas bajas [11, 12].

**1.1.3.2. Arrastre con vapor.** Este proceso se lleva a cabo con un vapor seco sobrecalentado, generado usualmente por una caldera o calderín, que penetra el material vegetal a presión más alta que la atmosférica. La destilación por arrastre con vapor, que se emplea para extraer la mayoría de los aceites esenciales, es una destilación de mezcla de dos líquidos inmiscibles y consiste, en resumen, en una vaporización a temperaturas inferiores a las de ebullición de cada uno de los componentes volátiles. Esta vaporización, se logra por efecto de una corriente directa de vapor de agua que, ejerce la doble función: de calentar la mezcla hasta su punto de ebullición y disminuir la temperatura de ebullición por adicionar la tensión de vapor del vapor que se inyecta, a la de los componentes volátiles de los aceites esenciales, que se encuentran en el material vegetal contenido en el alambique. Los vapores generados en el destilador pasan a través del llamado cuello de cisne (refrigerante) y se enfrían en un condensador, donde regresan a la fase líquida agua y aceite esencial. Los dos productos inmiscibles, finalmente, se separan en un decantador o vaso Florentino [1, 13].

**1.1.3.2.1. Equipo de destilación por arrastre con vapor.** El equipo básico consta de un generador de vapor, que puede ser una caldera o calderín, un alambique, una tapa en forma de cuello de cisne, un condensador y un vaso separador o Florentino. A continuación se describen cada una de las partes:

➤ **Generador de vapor**

El generador de vapor o caldera (Véase **Figura 2**), es el equipo que provee de vapor el agua al equipo de extracción. Un generador de vapor se puede definir como una serie de dispositivos que aprovechando el poder calorífico de un combustible producen vapor.

La capacidad de un generador de vapor se expresa en “Caballos Caldera” (CC). Para definir este término se estima, que un generador de vapor tiene una

capacidad de un caballo caldera, cuando es capaz de producir 15.65 kg/h (34.5 lb/h) de vapor saturado a 100° C, utilizando agua de alimentación a la misma temperatura [13].



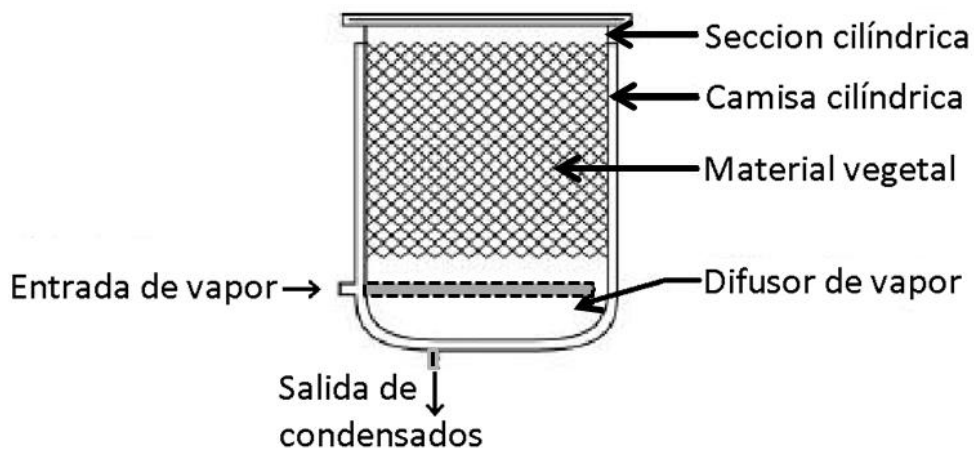
**Figura 2.** Generador de vapor marca Tecnik, instalado en el municipio de Sucre (Santander) y empleado en esta investigación.

### ➤ **Alambique**

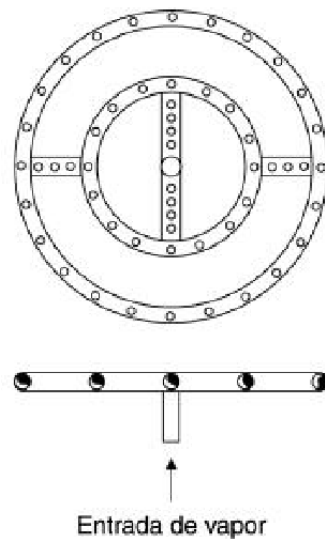
El alambique, destilador o extractor (Véase **Figura 3**) es donde se deposita el material a destilar. Consiste en un tanque cilíndrico de un diámetro menor que la altura, que tiene en la parte superior una tapa que debe ser cerrada herméticamente.

El destilador se construye en diversos materiales cuyo espesor es también variable según la carga de material vegetal, pero es preferible que sea de acero

inoxidable. En la parte inferior se encuentra una rejilla que separa el material vegetal de un falso fondo donde se ubica el difusor de vapor (Véase **Figura 4**), que consta de una tubería en espiral o en cruz, con una distribución de perforaciones en la parte superior y a lo largo de esta, dándole así uniformidad a la distribución del vapor. En el fondo del alambique hay una válvula de drenaje de capacidad suficiente para permitir que cualquier cantidad de agua, que se condense dentro de la carga y gotee hacia el fondo, pueda ser extraída durante la destilación.



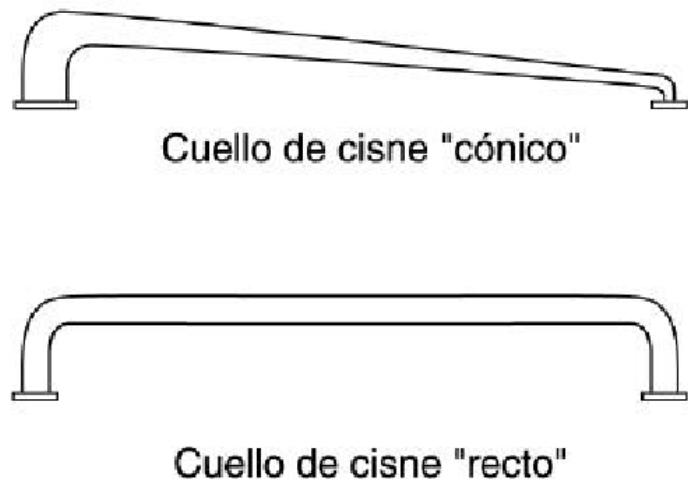
**Figura 3.** Esquema de un extractor tradicional.



**Figura 4.** Difusor de vapor.

➤ **Cuello de cisne**

El cuello de cisne es el conducto que comunica la tapa del extractor con el condensador. En algunos casos, la tapa del alambique tiene incorporado este dispositivo o parte de él. Dentro del cuello de cisne circula la mezcla de vapor de agua y aceite esencial. Debe ser diseñado de tal forma, que reduzca al mínimo las posibilidades de condensación de vapores dentro del extractor mismo, evitando un indeseable reflujó y permitiendo su rápida transferencia hacia el condensador del sistema. Estos dispositivos pueden ser fabricados con diseño cónico y, en ocasiones, con diseño recto (Véase **Figura 5**). El cuello de cisne debe ser fácilmente desmontable, por lo que de preferencia se utilizan sistemas de conexiones "rápidas" y, sobre todo, teniendo en cuenta, que cada vez que se cargue o descargue el extractor con material vegetal, debe desconectarse el cuello de cisne del condensador y, en ocasiones, de la misma tapa del extractor. Esto permite una mayor eficiencia en el proceso al disminuir el tiempo operacional, lo cual repercute en una mayor producción [14].

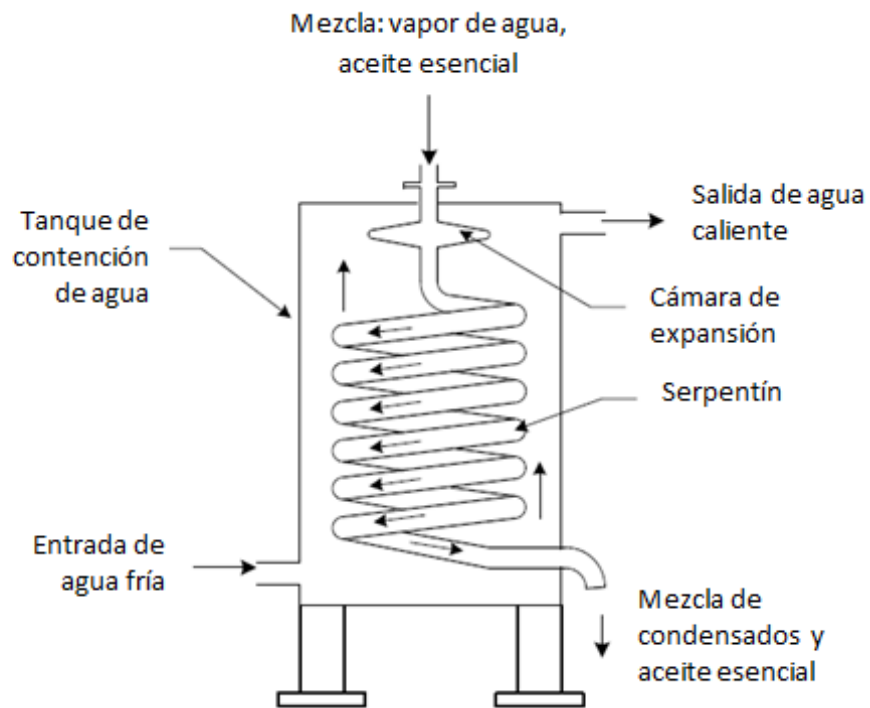


**Figura 5.** Cuellos de cisne utilizados en equipos de extracción.

## ➤ Condensador

Para la condensación de vapores se pueden utilizar varios tipos de condensadores, para los cuales es necesario considerar los espacios disponibles en el lugar de instalación del equipo de extracción, así como la posición de los separadores de aceite.

Uno de los condensadores utilizados consta de serpentín y cámara de expansión (Véase **Figura 6**). En este tipo de condensador se alimenta la mezcla de vapores a una cámara de expansión, donde se obtiene la mayor parte de los condensados, y estos van descendiendo a la parte baja del condensador.



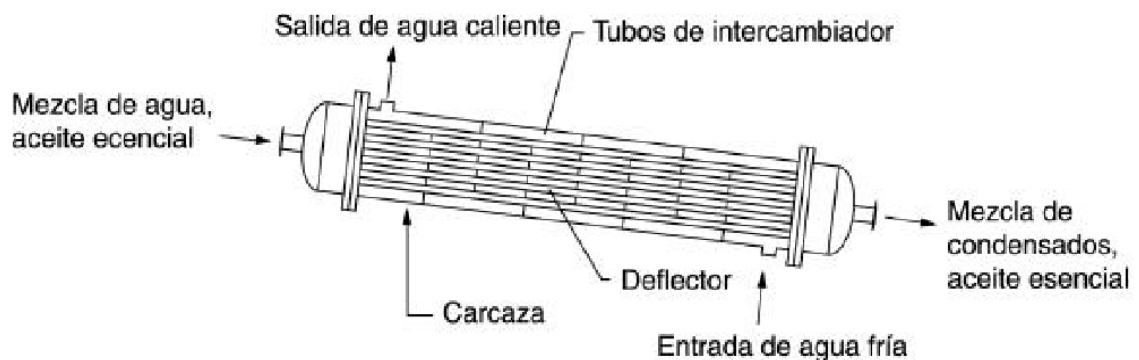
**Figura 6.** Condensador de serpentín.

En este tipo de condensador, el diámetro de la tubería del serpentín disminuye a medida que se aleja del cuello de cisne, para evitar un taponamiento en la primera porción de la cañería, y también para optimizar la transferencia de calor en las

últimas porciones del serpentín, dado que allí el condensado ya es un líquido, por lo que conviene que ocupe la mayor parte del tubo.

El serpentín y la cámara de expansión están ubicados dentro de un tanque de contención de agua de enfriamiento, esta agua deberá estar circulando para aumentar el coeficiente de transferencia de calor. El agua fría, que se utiliza para la condensación, se alimenta en la parte inferior del tanque de contención y se descarga por la parte superior de este. Se debe tener cuidado, ya que tanto el serpentín como la cámara de expansión deben permanecer constantemente sumergidos al agua de enfriamiento. Con el fin de no hacer un gasto excesivo de agua, se recomienda utilizar una torre de enfriamiento para recircularla.

Otro condensador utilizado es el de haz de tubos, que aunque es térmicamente más eficiente que el diseño anterior, su fabricación es más costosa (Véase **Figura 7**). Otra ventaja que presenta es su mayor seguridad, en el sentido de que si por algún motivo se tapona (por sobresalto del material vegetal en el extractor, o por cristalización de productos sólidos, presentes en gran proporción en algunas esencias como mentol, alcanfor o borneol por ejemplo, el vapor tiene otras salidas alternativas que hacen que no se genere una sobrepresión excesiva en el alambique.

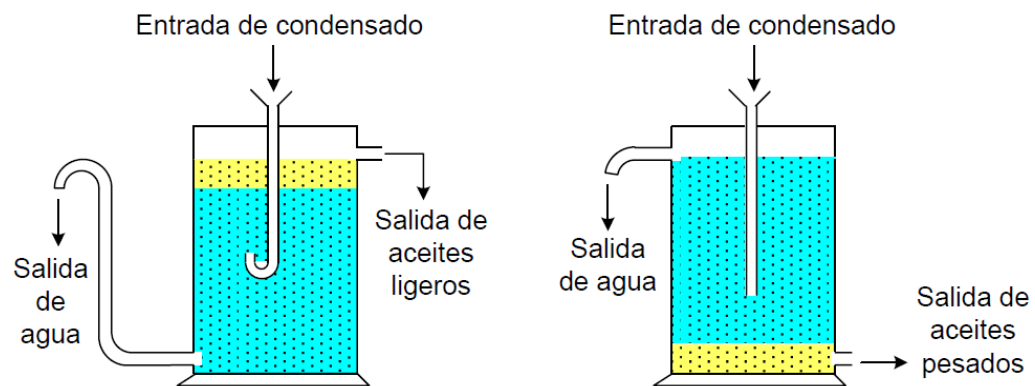


**Figura 7.** Diagrama de un condensador de tubos y carcaza.

En este modelo, la mezcla de vapores suele alimentarse por dentro de los tubos y el agua de enfriamiento circulante por el exterior de estos.

➤ **Vaso separador o “Florentino”**

Llamado también vaso *Florentino*, es un dispositivo utilizado para separar la mezcla de aceite esencial agua condensada. Debido a las características propias de los aceites esenciales, se pueden dividir en dos grandes grupos: aceites esenciales pesados y para los aceites esenciales ligeros. Esta división se basa en que los aceites esenciales, que tienen una densidad muy cercana o mayor que la del agua, denominados “aceites esenciales pesados”, por consiguiente, se depositan en la parte inferior del separador. Por lo contrario, los “aceites esenciales ligeros”, que tienen la densidad menor que la del agua, se acumulan en la superficie de ésta (Véase **Figura 8**) [2, 13].



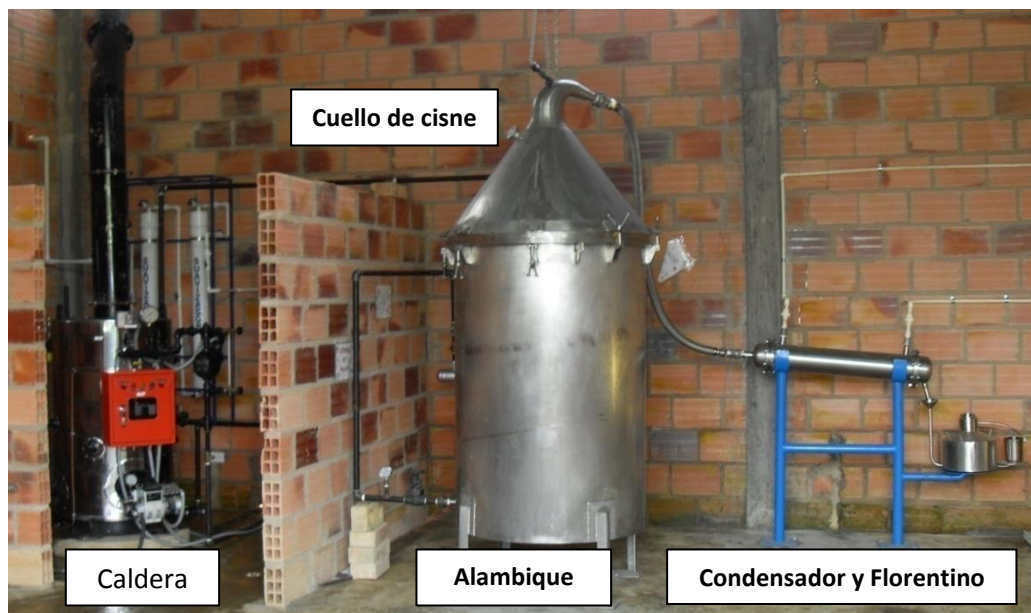
**Figura 8.** Separadores de aceites esenciales y condensados.

Estas características de asentarse en el fondo del separador y la de flotar en la superficie del agua, facilitan la separación del aceite esencial. Existe una gama extensa de separadores de aceites esenciales, lo cual permite seleccionar el adecuado para cada caso particular [13].

En la **Figura 9** se puede observar el conjunto del equipo empleado para la obtención de aceites esenciales por el método de arrastre con vapor.

**1.1.3.3. Destilación con agua-vapor.** En este sistema de extracción se emplea un vapor húmedo, proveniente del agua en ebullición, que traspasa el material vegetal suspendido encima del volumen de agua que hierve, apoyado sobre una malla. La mayoría de plantas herbáceas se destilan por este método;

**1.1.3.4. Hidrodestilación.** En este proceso el material vegetal se sumerge directamente en el agua, que se calienta a ebullición. Este método se usa para la destilación del material vegetal delicado, por ejemplo, flores (e.g., ylang-ylang, rosas).



**Figura 9.** Destilador de aceites esenciales por el método de arrastre con vapor con capacidad de 300 kg de material vegetal, instalado en la Vereda el Retiro, Sucre, Santander. Diciembre de 2011.

#### 1.1.4. Aplicaciones y propiedades de los aceites esenciales.

Las aplicaciones que encuentran los aceites esenciales son muy amplias y variadas. Son tres los sectores principales que los usan; entre ellos, figuran las industrias de alimentos, farmacéutica y de sabores & fragancias, productos de aseo y sector cosmético, que utilizan aceites esenciales en grandes cantidades (Véase **Tabla 1**) [15]. Después de las industrias del petróleo y farmacéutica, la industria de sabores y fragancias, perfumes, cosméticos y productos de aseo, ocupa el tercer lugar en la macroeconomía, en cuanto al tamaño de capital y recursos económicos que mueve, la fuerza laboral y la estructura para investigación, desarrollo e innovación, que involucra [1].

Los aceites esenciales se usan como ingredientes en pastas dentífricas, champús, cremas, aceites para masajes, perfumes, lociones, como aromatizantes; en múltiples productos de aseo, de higiene personal, como desinfectantes, o desodorantes.

**Tabla 1.** Principales sectores y ramas de industrias donde se utilizan aceites esenciales y productos derivados [1].

Sectores	Ramas	Aceites esenciales
Industria cosmética y de productos de aseo	Higiene personal Jabones y detergentes Productos de belleza Perfumes y afines Dentífricos	Cítricos Eucalipto y derivados Mentas, lavandas Rosa, patchouli Romero, salvia
Industria de alimentos	Bebidas tipo <i>Cola</i> Dulces, confitería Salsas, enlatados Bebidas alcohólicas Tabaco, aromatizantes	Cítricos Anís, hinojo, coriandro Oleorresinas, <i>flavours</i> Vainilla, Especies Mentas
Industria farmacéutica	Fitocosméticos Cosmecéticos Homeopatía Aromaterapia	Cítricos Limonaria, citronela Eucalipto y derivados Lavanda, Romero, Salvia

Entre las tendencias modernas de uso de los aceites esenciales figuran, entre otras, las siguientes: el desarrollo de los ingredientes naturales *funcionales*, por ejemplo, la adición a los alimentos y a los productos almacenados de aceites esenciales con propiedades antifúngicas (aceites de orégano, tomillo, cítricos), el microencapsulamiento de aceites esenciales con propiedades antimicrobianas o antioxidantes (orégano, coriandro, romero) en ciclodextrinas, que permite una liberación paulatina de sus ingredientes al producto que se desea proteger, y las combinaciones de ingredientes naturales funcionales con efectos sensoriales, antioxidantes y antimicrobianos para mejorar la seguridad de productos (alimentos, bebidas, productos de aseo personal, cosméticos) [1].

#### **1.1.5. Variables que afectan la cantidad y composición de los aceites esenciales.**

La composición de los AE se ve afectada por numerosas variables, entre las cuales figuran, en primer lugar, el tipo de material vegetal que se utiliza, el método de extracción, y las condiciones agroecológicas en las cuales se desarrollan las plantas. Entre las condiciones de la extracción, se pueden mencionar, *e.g.* el tiempo de extracción, temperatura, presión, tamaño de partícula y la cantidad de material vegetal, entre otras [1, 12, 13]. Por ejemplo, se ha determinado que para algunas plantas, el flujo de vapor es una variable influyente en el rendimiento de la extracción. La velocidad de obtención del aceite aumenta conforme el flujo del vapor se incrementa. Esto indica que la mayor transferencia del aceite al vapor, se produce cuando existe mayor convección del vapor dentro del material vegetal contenido en el alambique [16]. Otra variable que influye en el proceso de extracción es la densidad de carga. Su importancia está relacionada con la porosidad del material vegetal empacado dentro del alambique. Diferentes ensayos realizados en la extracción del aceite esencial de naranja [17], mostraron que el principal factor que influyó en el proceso de destilación por arrastre con

vapor saturado fue la densidad de carga. Una densidad de carga pequeña puede producir un descenso en el rendimiento de la destilación. Una densidad de carga alta produce exceso de condensación de vapor, lo cual aumenta la solubilidad de algunos compuestos del aceite, que puede ser más difícil extraerlos. Además, se pueden producir ciertos caminos de preferencia por donde el vapor tenga menos resistencia a fluir, lo que evita el contacto homogéneo del vapor con todo el material empacado, disminuyendo así los rendimientos de extracción. La densidad de carga está directamente relacionada con el tamaño de partícula del material vegetal. Tamaños menores pueden favorecer un mayor rendimiento de extracción del aceite esencial, debido a que se presenta una mayor área superficial de donde se puede extraer el aceite. La presión es otra variable a tener en cuenta en el proceso de extracción por arrastre con vapor. Rezzoug y colaboradores [18], obtuvieron los mejores valores de presión (410 KPa), contenido de humedad del material vegetal (0,40 g H<sub>2</sub>O/g de material seco) y tiempo de extracción (15,8 min), en la optimización del proceso de extracción del aceite esencial de romero (*R. officinalis*), empleando la metodología de superficie de respuesta. Los observables medidos fueron el rendimiento de extracción y la cantidad de  $\alpha$ -pineno, canfeno, 1,8-cineol, alcanfor, borneol y  $\alpha$ -terpineol presentes en el AE.

Otro de los aspectos más importantes a tener en cuenta sobre la variación de la composición de los AE, está relacionado con el momento oportuno para comenzar la cosecha del material vegetal, ya que existe un momento óptimo en cada órgano de la planta, cuando la acumulación de principios activos es máxima; este es función de su estado fenológico, y también cambia con las variaciones metabólicas durante el día. Teniendo en cuenta el periodo de vegetación, el momento oportuno depende principalmente de los siguientes factores: condiciones atmosféricas, latitud, altitud, exposición lumínica, condiciones del terreno, densidad de siembra y grado de fertilización [1, 13].

Investigaciones adelantadas en parcelas experimentales de 100 y 1000 m<sup>2</sup> en el Complejo Agroindustrial Piloto del Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM en la UIS y Proyectos productivos en el Departamento de Santander, han mostrado que la composición química, el rendimiento de extracción y la calidad de los aceites esenciales obtenidos de especies como el pronto alivio (*Lippia alba*), la albahaca (*Ocimum sp*), el cidrón (*Lippia citriodora*) romero (*Rosmarinus officinalis*) salvia (*Salvia officinalis*) y el geranio (*Pelargonium graveolens*), entre otros, dependen del estado fenológico de la planta, del tiempo y tipo de extracción, de las condiciones ambientales, del tiempo de secado, de sus niveles de fertilización y de la hora del día para cosechar [19-25].

#### **1.1.6. Control de calidad y valor de los aceites esenciales.**

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

- El cumplimiento de normas de calidad;
- Detección de adulteraciones: por ejemplo, la adición de diluyentes;
- Discriminación de las calidades: cómo diferenciar el origen de una esencia.
- Normalización de calidades;
- Determinación de la autenticidad del producto natural.

Las características estudiadas deben ser suficientemente descriptivas del producto para que permitan detectar aquellas desviaciones que se consideren suficientes para rechazar un lote. Para ello, se utilizan diferentes parámetros analíticos y los valores obtenidos para una muestra se comparan con los establecidos en la

correspondiente norma, que habrá sido dictada por algún organismo de normalización (e.g. ISO) o, en su defecto, por el propio interesado [1, 13].

Los principales grupos de parámetros analíticos utilizados para valorar la calidad de un aceite esencial, se clasifican en seis tipos (Véase **Tabla 2**), que van desde las características organolépticas hasta las características espectroscópicas, pasando por la determinación de constantes físicas e índices químicos y el estudio del perfil cromatográfico, que incluirá la determinación cuantitativa de los principales componentes [1, 13].

**Tabla 2.** Parámetros analíticos utilizados en el control de calidad de aceites esenciales.

1. Características organolépticas	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Olor</li> <li>➤ Color</li> <li>➤ Sabor</li> </ul>
2. Determinaciones físicas	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Densidad</li> <li>➤ Poder rotatorio</li> <li>➤ Índice de refracción</li> <li>➤ Solubilidad en etanol</li> <li>➤ Punto de congelación</li> <li>➤ Punto de inflamación</li> </ul>
3. Índices químicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Índices de: acidez éster saponificación acetilo fenoles</li> </ul>
4. Características cromatográficas	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Perfil cromatográfico (GC)</li> <li>➤ Cuantificación de los principales componentes.</li> </ul>
5. Características espectroscópicas	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Espectroscopía ultravioleta – visible</li> <li>➤ Espectroscopía infrarroja</li> <li>➤ Espectrometría de masas</li> </ul>
6. Otras determinaciones	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Residuos de pesticidas</li> <li>➤ Presencia de metales pesados</li> </ul>

La calidad del aceite (en primer lugar, sensorial) y la relación de sus componentes mayoritarios deben obligatoriamente responder a las exigencias del mercado en cuanto a cumplir las normas sobre el aceite dado y los rangos porcentuales de sus componentes principales, así como las propiedades físico-químicas y sensoriales. La calidad de un aceite esencial puede cambiar de una cosecha a otra debido a factores agronómicos diferentes, al momento de recolectar la planta o a los procesos de extracción empleados. Es muy importante mantener una calidad homogénea del aceite esencial, para obtener confianza del comprador.

Es muy importante realizar experimentos y estudios previos a escala piloto, relacionados, entre otros, con parámetros de cultivo, tratamiento post-cosecha y la optimización de procesos de destilación, ello, para obtener un aceite esencial con calidad alta y así posibilitar su competitividad en el mercado. Para mejorar los precios de los productos, hay que invertir en su desarrollo, sobre todo, para aumentar su calidad. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que se pueden encontrar durante la comercialización de un aceite tanto a los compradores de volúmenes, como a los que buscan la calidad. La calidad del aceite alta eleva también su precio (por el costo de producción), aunque los volúmenes grandes de un aceite, pero con calidad más baja, pueden “compensar” la diferencia de precios. Los costos de producción de un aceite esencial dependen, entre otros, de los siguientes factores: (1) mano de obra; (2) posibilidad de mecanización de cosecha del material vegetal y (3) tipo de combustible usado en la destilación: la energía involucrada en un proceso de transformación determina mayoritariamente su costo [1].

#### **1.1.7. Análisis de la composición química de los aceites esenciales (GC-MS).**

Para la utilización de un aceite esencial, además del estudio de factibilidad de producción para su aplicación específica, es absolutamente necesario conocer su

composición detallada. Este conocimiento, junto con las características fisicoquímicas y organolépticas del aceite, son parámetros imprescindibles para establecer la calidad, según las exigencias del mercado mundial. Por ello, es importante estudiar las variables que afectan la composición del AE, tales como: forma de cultivo, condiciones geobotánicas, métodos de extracción, época de recolección, parte de la planta, métodos de almacenamiento, manejo del material vegetal, edad, actividad biológica, entre otras [1, 11-13]. El establecimiento de estos dos aspectos, composición y parámetros de calidad, se hace a través de diferentes métodos de separación, identificación y cuantificación, entre los cuales se encuentran:

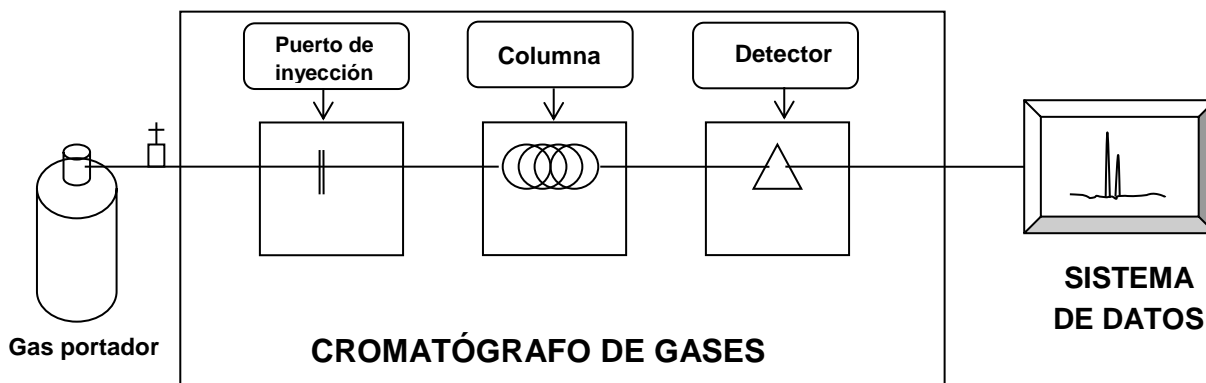
- Métodos químicos de separación (obtención de derivados);
- Destilación fraccionada;
- Cromatografía de capa fina;
- Cromatografía preparativa;
- Cromatografía en columna;
- Cromatografía líquida de alta eficiencia (*obtención de fracciones*);
- Cromatografía de gases (*separación de la mezcla, cuantificación de los constituyentes*).

En la actualidad, los métodos modernos de análisis de aceites esenciales están fundamentados básicamente en la cromatografía de gases capilar usando detectores convencionales, principalmente, de ionización en llama (FID) y selectivo de masas (MSD) [26].

#### **1.1.7.1. Cromatografía de gases**

La cromatografía de gases (GC) es una técnica de separación, basada en la partición de analitos entre una fase móvil gaseosa (helio, argón, hidrógeno,

nitrógeno) y una fase estacionaria, constituida por un sólido o líquido, soportado sobre las paredes de la columna [27-28]. La columna se coloca en un horno con temperatura regulable y programable, lo que permite influir de forma decisiva en la separación de los componentes de la mezcla. El cromatógrafo (**Figura 10**) se completa con un sistema de inyección, que permite introducir la muestra en la columna y un detector, que detecta las diferentes sustancias a medida que van saliendo de la columna, una vez separadas.



**Figura 10.** Partes principales de un cromatógrafo de gases.

Las columnas cromatográficas utilizadas actualmente son de tipo capilar, están constituidas por un tubo de cuarzo flexible (sílice fundida) de diámetro muy pequeño (normalmente 0.25 mm) y diversa longitud (25 a 60 m, y hasta 100 m), proporcionan alta resolución y permiten separar las mezclas multicomponente de sustancias de diversa polaridad y/o peso molecular (monoterpenos, sesquiterpenos, etc.). Las columnas más utilizadas en el análisis de aceites esenciales son las de CARBOWAX [poli(etilenglicol), fase polar] y DB-5MS [poli(dimetilsiloxano), fase apolar] [29-30].

La eficiencia de la separación cromatográfica está determinada principalmente por la fase estacionaria, geometría de la columna y la temperatura de operación. Una temperatura alta de operación acorta el tiempo de residencia de los componentes de la muestra en la columna. Al llegar al detector, los componentes generan señal,

que se amplifica y registra en forma de un cromatograma. La reproducibilidad de resultados requiere un estricto control de condiciones de operación, tales como flujo del gas portador y temperatura, esta última se puede manejar de manera isotérmica o programada [27-28].

La parte más importante del sistema cromatográfico es la columna, cuya elección está guiada por la naturaleza de la muestra a analizar. La polaridad de la fase estacionaria, diámetro y longitud de la columna influyen directamente sobre la eficiencia de la separación y el tiempo de análisis [27].

Para la identificación tentativa de los componentes de un aceite esencial mediante GC se utiliza la comparación de sus tiempos de retención (tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la aparición del pico cromatográfico), con los de patrones, analizados bajo las mismas condiciones operacionales. Sin embargo, los tiempos de retención dependen de numerosas variables, tales como: la técnica de inyección, las variaciones de temperatura o flujo de los gases, el diseño del equipo, etc. [26]. Por ello, ha sido necesaria la introducción de parámetros más “reproducibles” como son los tiempos de retención relativos y los índices de retención lineales (IRL). Estos se calculan a partir de los tiempos de retención de cada compuesto comparado con una serie de *n*-alcanos, bajo condiciones de temperatura programada en el horno del cromatógrafo.

Los IRL se usan en el análisis de aromas de alimentos, extractos, bebidas, muestras biológicas, gasolinas, pesticidas, esencias de frutas y aceites esenciales [31-32]. La identificación tentativa de los componentes del aceite se realiza a través de comparación de los índices de retención de las sustancias patrón en dos fases estacionarias, polar y apolar, con los índices obtenidos para los componentes del aceite esencial. Un listado de índices de retención en columna DB-5MS (30 m, 0.25 mm i.d. 0.25  $\mu$ m) para compuestos presentes en aceites esenciales, aromas y fragancias, fue recopilado por Robert Adams [32].

La información que proporcionan los índices de retención respecto a la identidad de los componentes de la esencia, es muy valiosa, sin embargo, la identificación confirmatoria de los mismos no puede basarse exclusivamente en ellos, ya que muchos poseen valores muy cercanos y su reproducibilidad, sobre todo, en columnas polares no es muy alta. Por ello, es necesario aplicar otras técnicas, entre las cuales se destacan la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS), donde la identificación de los componentes se basa en los criterios espectroscópicos.

#### **1.1.7.2. Cromatografía de gases – espectrometría de masas**

La combinación de la cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS) es una de las herramientas analíticas más poderosas. Durante los últimos treinta años, ha demostrado que es uno de los métodos más eficientes para el estudio de la composición de los aceites esenciales [26]. Es un método adecuado para la identificación debido a que los componentes del aceite son compuestos volátiles y de bajo peso molecular (< 300 Da).

La cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS), es la herramienta analítica más importante para el seguimiento de los procesos de obtención de los aceites esenciales y su control de calidad. Cualquier comprador de AE, siempre exigirá la ficha técnica del aceite, y principalmente, la composición química determinada mediante GC-MS, ya que el contenido de ciertos compuestos de interés, determinan el valor comercial del producto.

#### **1.1.8. La cadena de valor de los aceites esenciales.**

Los aceites esenciales no son un bien de consumo directo, son materias primas o insumos industriales y se dirigen, principalmente, a las siguientes ramas de: (1)

industria de las fragancias; (2) industria de aromas y sabores; (3) industria de productos medicamentosos; (4) industria química y de productos derivados. El uso de aceites esenciales como ingredientes fragantes se aprovecha en perfumes (aguas de perfume y de tocador, colonias), cosméticos (jabones, cremas, lociones, productos para el maquillaje, champús, desodorantes, pastas dentífricas), productos domésticos de aseo y limpieza (aromatizantes ambientales, limpieza de pisos, cocinas, baños), plásticos (enmascaradores de olores, para la aromatización de juguetes), textiles (tratamientos con mordientes antes y después del teñido), pinturas (enmascaradores de olores, solventes biodegradables) y en papelería (impregnación con fragancias de cuadernos, papel higiénico, toallas faciales y sanitarias). La industria de alimentos incorpora a los aceites esenciales en diferentes artículos, a saber: Confitería con diferentes sabores, *snacks*, galletería, lácteos, cárnicos, conservas, productos procesados (orégano, tomillo), condimentos picantes (jengibre, cúrcuma, páprika, pimienta), bebidas (aceites de cítricos, mentas), licores (anís, mentas, cardamomo, ajeno), en medicamentos y en tabacos y cigarrillos (mentas) los aceites esenciales se utilizan como aromatizantes y para enmascarar los sabores amargos [1].

El Centro de Investigación en Biomoléculas, CIBIMOL, adscrito a Centro de Excelencia CENIVAM, ha venido desarrollando proyectos de investigación a escala piloto (6 ha) en los municipios de Socorro, Sucre y Barbosa, en Santander, con financiación del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y Colciencias. Gracias a estos proyectos se implementaron en estos 3 municipios la infraestructura básica de la cadena productiva de los aceites esenciales, que incluye los sistemas de germinación y propagación del material vegetal, el cultivo bajo prácticas de la agricultura limpia, el control preventivo de plagas con pesticidas no-sintéticos, los procedimientos de cosecha y secado del material vegetal, la extracción del aceite esencial por arrastre con vapor de agua, y el compostaje del material vegetal residual. Los resultados de esta experiencia muestran que sí es posible producir en Colombia aceites esenciales a precios

competitivos en el mercado internacional, pero que los márgenes de utilidad son bastante estrechos y se logran solamente si se optimizan los rendimientos agrícolas y de extracción, y se reducen costos logísticos (transporte del material vegetal) y de operación (mano de obra calificada). También es necesario avanzar en los procedimientos de rectificación de aceites esenciales, ya que esta etapa tecnológica hace que el valor unitario del aceite esencial en muchos casos se duplique. Las especies candidatas a suplir parte de la demanda nacional de aceites esenciales y por las cuales se ha mostrado algún interés son: *Cymbopogon nardus* (sector cosmético), *C. citratus* (sector cosmético), *C. martinii* (sector cosmético y de aseo), *Lippia origanoides* (sector agrícola y avícola), *Thymus vulgaris* (sectores cosmético y agrícola). Es por esta razón, que en la presente investigación se profundizó en la optimización de los procesos industriales para su producción, la rectificación y aislamiento de componentes de interés y su posterior incorporación en productos finales.

En las **Figuras 11-15** se presentan algunas imágenes de la infraestructura instalada en los Proyectos Productivos adelantados en el Departamento de Santander.



**Figura 11.** Parcelas experimentales de cidrón (*Lippia citriodora*) establecidas en el Municipio de Sucre, Santander (Agosto de 2011).



**Figura 12.** Tratamiento de postcosecha del material vegetal recolectado. **A.** Picado. Picadora Penagos PE-800. **B.** Secado en bandejas a temperatura ambiente. Vereda el retiro, Sucre, Santander, marzo de 2011.



**Figura 13.** Proceso de extracción de aceites esenciales por el método de arrastre con vapor. Vereda el Retiro, Municipio de Sucre, Santander, agosto de 2011.



**Figura 14.** Cromatógrafos de gases con diferentes sistemas de detección empleados en la caracterización química de los aceites esenciales. Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas – CROM-MASS – CIBIMNOL – UIS.



**Figura 15.** Planta piloto para la elaboración de jabones líquidos y sólidos. Jabones líquidos desarrollados. CIBIMOL, UIS noviembre de 2010.

### 1.1.9. Especies bajo estudio

#### ➤ *Thymus vulgaris* (tomillo)

La especie vegetal *Thymus vulgaris* L. (Véase **Figura 16**), conocido popularmente como “tomillo”, es una planta aromática, vivaz, leñosa, muy polimorfa, de 10 a 40 cm de altura, con numerosas ramas, leñosas, erectas, compactas, parduzcas o blancas y aterciopeladas; presenta hojas de 3 a 8 mm lineales, oblongas y brevemente pediceladas; las flores son axilares y agrupadas en la extremidad de las ramas, a veces, con inflorescencias interrumpidas; las brácteas son verdes grisáceas; el cáliz, algo giboso; la corola, un poco más larga que el cáliz [12].

Es una especie muy variable, tanto en su fenología como en la composición química de su aceite esencial. En Francia y España, se han detectado seis quimiotipos diferentes, según su componente mayoritario e.g., (timol, geraniol, linalol y carvacrol), siendo el quimio tipo “timol” el más abundante [33-34]. Su aceite esencial se compone principalmente de timol, carvacrol, 1,8-cineol, alcanfor, geraniol, cariofileno,  $\beta$ -pineno y  $\alpha$ -terpineol [33-37].

Se han realizado diferentes estudios sobre la actividad biológica de *Thymus vulgaris* L: se destaca su potente actividad antioxidante, comparable con la del butilhidroxitolueno (BHT), un antioxidante sintético, que es capaz de modificar la acción de algunos carcinógenos [38]. También presenta actividad antibacteriana para diferentes especies como el *Enterococcus faecium* (responsable de importantes infecciones clínicas, incluyendo infección urinaria, bacteremia, endocarditis, diverticulitis y meningitis). Asimismo, se destaca su actividad antifúngica [39-40] y, principalmente, antiaflatoxigénica. Las aflatoxinas son un grupo importante de contaminantes de los alimentos, producidos principalmente por parte de algunos hongos *Aspergillus* en condiciones favorables de temperatura

y humedad relativa [37]. Adicionalmente, *Thymus vulgaris* L. presenta actividad antimicótica, insecticida y como conservante de alimentos [36, 40].



**Figura 16.** Plantas de *Thymus vulgaris* L., cultivos en el municipio de Sucre, Santander. Octubre de 2010.

El tomillo es una planta con diversas propiedades y aplicaciones. Sus hojas se pueden utilizar frescas o secas como especia [41]. El aceite esencial extraído de las hojas frescas y de las flores se usa como aditivo en alimentos, en productos farmacéuticos y en cosméticos. Se le atribuyen propiedades antisépticas, antiespasmódicas, cicatrizantes, antioxidantes, antibacterianas y antifúngicas, entre otras. [12]. La capacidad antioxidante de del AE de tomillo medida por métodos espectrofotométricos ha sido fuertemente estudiada, encontrándose que el tomillo exhibe capacidad antirradicalaria cercana a antioxidantes sintéticos como el BHT y el  $\alpha$ -tocoferol, debido principalmente a la presencia de compuestos como timol y carvacrol [42-43]. A su vez, el tratamiento de carnes procesadas cocidas con el aceite esencial de *T. vulgaris* mostró que el producto presenta baja oxidación y que aunque no muestre actividad antimicrobiana, tiene importante

actividad como antioxidante y puede actuar de forma sinérgica en combinación con otros extractos que tengan propiedades antimicrobianas [44]. La evaluación de la actividad antifúngica del AE *T. vulgaris* contra la especie *Colletotrichum acutatum*, hongo que ocasiona al tomate una enfermedad denominada antracnosis, permitió establecer el fuerte efecto que posee el AE de tomillo sobre el hongo, ya que se obtuvo una inhibición total de su crecimiento, superando incluso la actividad mostrada por parte del Manzate®, fungicida sintético y de uso comercial [45].

➤ ***Lippia origanoides* (orégano de monte)**

Algunos de los sinónimos por los que se le conoce, son *Lippia berterii* Spreng y *Lantana origanoides* H.B.K. *Lippia origanoides* es una especie endémica de la región que va desde México a Brasil (Véase **Figura 17**). En Colombia se encuentra principalmente en ambientes secos o semidesérticos. Esta planta también es conocida con nombres populares como: orégano cimarrón y orégano de monte; es un arbusto de 1 a 3.5 m de alto, muy ramificado con inflorescencias axiales de color blanco y muy aromáticas. Esta planta puede crecer en altitudes entre 0 y 1800 m.s.n.m., en suelos cuyo contenido en materia orgánica es regular pero químicamente fértiles, con textura fina y pH neutros [46]. Se puede reproducir por semillas y esquejes. No se conocen cultivos de la especie pero se pueden adoptar parámetros de cultivo tomados de otras especies de su mismo género como *Lippia alba*. En campo las plántulas se pueden sembrar a una distancia de 0.5 m entre plantas y 0.9 m entre surcos dobles, con 0.5 m de calle. La experiencia obtenida en el Complejo Piloto de Aceites Esenciales en la UIS, con esta planta, mostró que la primera cosecha se puede realizar hacia el cuarto mes después de trasplantada, momento en el cual alcanza un tamaño aproximado de 0.8 a 1.2 m [47]. Entre sus usos medicinales están: expectorante, antiespasmódico y emenagogo [48].



**Figura 17.** Plantas de *Lippia origanoides*, cultivos en el municipio de Socorro, Santander. Julio de 2010.

El aceite esencial de *L. origanoides* presenta los siguientes compuestos mayoritarios: carvacrol (34-43%); timol (5-8%);  $\gamma$ -terpineno (8-11%). El aceite esencial presenta actividad contra bacterias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* y Gram-negativas como *Escherichia coli* y contra hongos como *Candida albicans* [49-50]. Actualmente, se conoce que el carvacrol y el timol presentan actividades antifúngica, antibacterial y antioxidante [48, 51-52]. La actividad antimicrobiana en aceites esenciales de especies aromáticas está asociada con los compuestos fenólicos. Algunos compuestos como carvacrol, eugenol, linalol, y timol purificados a partir de aceite esencial inhiben el crecimiento de varios microorganismos. El carvacrol ha mostrado efectos bactericidas contra *Salmonella* en pescado almacenado a 4°C; algunas bacterias presentan un deceso en la producción de toxinas en presencia del carvacrol [50].

El análisis de la composición química del aceite esencial de *L. origanoides* que crece en Colombia, mostró que presenta compuestos fenólicos como componentes mayoritarios: timol y carvacrol (ca. 53,2%). Entre otros compuestos identificados se encuentran *p*-cimeno (10,1%),  $\gamma$ -terpineno (8,2%) y *trans*- $\beta$ -

cariofileno (3,4%), con rendimientos de extracción del 2,3% obtenido por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD) [51].

Estudios de los metabolitos secundarios de la *L. origanoides* permitieron conocer variaciones en la composición química de la planta, lo que ha conducido a designar tres quimiotipos, uno rico en carvacrol, otro compuesto mayoritariamente por timol, y un tercero diferenciado por su contenido de alfa- y beta-felandreno [51]. También, se observaron cambios drásticos en la composición química del AE de la planta recolectada en la cuenca oriental del Cañón del Chicamocha, donde el porcentaje de carvacrol varía significativamente, encontrándose como compuesto mayoritario, difiriendo con lo reportado en la literatura [52]. También han sido reportados quimiotipos de la planta en Venezuela [53] y Brasil [54-55].

El aceite esencial de *Lippia origanoides* puede ser un sustituto de los aceites esenciales de especies como *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, entre otras, para los cuales hay aplicaciones industriales. Estas aplicaciones abarcan usos como saborizante o condimento, en medicina alternativa, antifúngico y repelente de insectos; además existe la posibilidad de aislar el timol y el carvacrol con buen rendimiento debido a que son los compuestos mayoritarios del aceite. Estos también son utilizados como precursores en la síntesis orgánica de otros compuestos.

*L. origanoides* es una planta reconocida por sus diversas aplicaciones. Es usada como especia, la infusión de sus flores y hojas se usa para el tratamiento del dolor de estómago, cólicos, indigestión, diarrea, náuseas, molestias menstruales, fiebre, entre otros, así como antiséptico general de la boca y la garganta [56].

Méndez *et al.* (2007) encontraron que existe un potencial de uso de los extractos vegetales de *L. origanoides* como alternativa para el control de enfermedades de plantas causadas por patógenos como *Rhizoctonia solani* y *Bipolaris maydis* del

suelo y del follaje, causando una reducción del 30 -80% para el caso del primer patógeno [57]. A su vez, se ha estudiado el efecto bacteriostático de la planta en especies de *Nocardias sp.* observando el detenimiento de su crecimiento a pesar de que no inactiva las especies permanentemente [58]. También, se estudió el efecto bacteriostático en especies de *Escherichia coli*, *Salmonella tiphyurium* y *Staphylococcus aureus* en concentraciones superiores a las activas para la amoxicilina, exhibiendo una actividad cercana al 40% de la actividad del antibiótico para cada bacteria [55].

Ensayos *in vivo* e *in vitro* de extractos etanólicos de hojas de *L. origanoides* demostraron el potencial de la planta para el control de la antracnosis ocasionada por el hongo *Colletotrichum gloesporioides* en frutos de mango (*Mangifera indica*), logrando disminuciones de daño del fruto entre 33-37% [58].

Aceites esenciales de *L. origanoides* y algunos de sus componentes mayoritarios fueron evaluados *in vitro* sobre la línea tumoral HeLa y la línea no tumoral Vero para identificar su potencial citotóxico. Se identificó un posible uso antitumoral y esto sugirió que la actividad citotóxica de los aceites se debe no sólo a sus componentes mayoritarios, sino a un sinergismo entre sus componentes [59].

La evaluación de la capacidad antioxidante permitió identificar que la *L. origanoides* posee capacidad antirradicalaria, debida principalmente, a compuestos fenólicos [51], siendo su capacidad cercana al antioxidante sintético BHT e incluso mayor. Ensayos de citotoxicidad del aceite indican que este no presenta toxicidad alguna, lo que lo hace apto para el consumo humano [59].

Fuentes *et al.* (2009), evaluaron el efecto protector sobre el ADN de la *L. origanoides* contra la genotoxicidad inducida por bleomicina, estableciendo que el aceite reduce significativamente la genotoxicidad en una forma dependiente de la dosis, efecto relacionado directamente por la cantidad de carvacrol y timol [60].

También, se ha investigado la actividad antiviral del AE y se halló un efecto inhibitorio contra el virus de la fiebre amarilla (YFV). El mecanismo de acción parece ser la inactivación del virus [61]. Olivero *et al.* [62] evaluaron la actividad repelente (método de área de preferencia) de tres aceites esenciales, entre ellos el de *L. origanoides*, frente a *Tribolium castaneum*. *L. origanoides* presentó la mejor capacidad repelente entre los tres evaluados, con valores de CR<sub>50</sub> al menos cinco veces inferiores a los registrados para IR3535 (compuesto control). Este hecho posiciona a este aceite esencial como candidato promisorio para ser utilizado en la formulación de productos repelentes contra insectos (porcentaje de repelencia del 98% a una concentración de 0.2 µL/cm<sup>2</sup>).

➤ ***Cymbopogon martinii* (palmarrosa)**

El género *Cymbopogon* (Poaceae) es una hierba perenne originaria de Asia y en los países tropicales se estima más de 100 especies, entre ellas, *Cymbopogon martinii* (palmarosa) (Véase **Figura 18**). Esta especie presenta hojas aromáticas, ásperas, estrechas y con más de 50 cm de longitud, que son utilizadas para fines industriales y, en huertas caseras, para uso en la medicina tradicional [63].

Esta planta tropical, crece bien en suelos un poco secos con requerimiento de agua medio, y temperaturas de 20-25 °C; preferiblemente los suelos deben tener un pH neutro, pero puede crecer en forma moderada en suelos alcalinos. Se propaga mediante semillas o vegetativamente por esquejes. Las semillas son mezcladas con arena y plantadas en filas a una distancia de 15 a 20 cm. Se requieren unos 2.5 kg de semillas para un terreno de una hectárea [64]; su germinación se ve afectada por la temperatura [65].

Las plántulas de ca. 15 cm de alto son trasplantadas a una distancia de 60 cm entre ellas; se ha visto que distancias de 60 x 30 cm o 30 x 30 cm permiten el aumento del crecimiento y rendimiento de aceite esencial (AE) siendo este

igualmente dependiente de la fertilización del suelo; en cuanto a la propagación vegetativa, los esquejes suelen plantarse a una profundidad de 60 cm en filas que están a una distancia de 60 cm. Para un mayor crecimiento de la planta mediante la adición de fertilizantes, se recomienda en el caso de una hectárea de suelo de fertilidad moderada usar una mezcla de 40 kg nitrógeno, 50 kg de fósforo y 40 kg de potasio [66].

El AE se obtiene por hidrodestilación o por destilación con vapor; los cortes del material vegetal se pueden realizar hasta 4 veces por año. Los rendimientos de AE varían entre el 0.15 a 0.5 % comúnmente; la cantidad de AE varía de acuerdo con el florecimiento. Antes de este los rendimientos están entre 0.15-0.50 % y luego de este entre 0.15-0.40%; el contenido de aceite se distribuye en un 0.1-0.15% en los tallos, con baja concentración (ppm) de los compuestos mayoritarios [67]; 0.1-0.5% en las hojas y el mayor contenido en las flores con un 0.75-1.20% [64].



**Figura 18.** Cultivo de palmarrosa (*C. martinii*), Finca Tierra Buena, Municipio del Socorro, Santander. Fotografía Proyecto 2007V3400-129 MADR-UIS

La palmarrosa suele afectarse fácilmente por la variación en su irrigación. Se ha encontrado que un gran incremento en la irrigación tiene un efecto adverso en su crecimiento. Relaciones de profundidad del agua de riego: evaporación acumulativa (AR:EA) del 0.5 son adecuadas [68], así mismo con 0.75 AR:EA y suplemento nitrógeno, se ve un incremento en los rendimientos de AE. Se reportan incrementos en el número de cosechas y de la cantidad de biomasa y por ende de la cantidad de AE, en cultivos abastecidos por agua lluvia y suplemento de 80 kg de N/ha [69] y disminución de hasta un ca. 22% de los rendimientos con el aumento del carbonato de sodio residual presente en las aguas de riego.

El aceite esencial de palmarrosa presenta entre sus componentes principales el geraniol (65-85%) y el acetato de geranilo (6-12%). Otros componentes como el citral (neral+geranial), citronelol y linalol no superan juntos el 12%. En menor proporción están compuestos como el sabineno, mirceno, limoneno, ocimeno, geranial, farnesol, entre otros.

En Colombia se estudió el AE de *Cymbopogon martinii*, obtenido por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD), sus compuestos mayoritarios fueron el geraniol (70%), seguido del acetato de geranilo (16%) y linalol (3.7%) [70].

En general, los aceites esenciales de la palmarrosa son utilizados como agente aromatizante en la industria de perfumería y cosmética por su agradable olor a rosas, así como sedativo, sudorífico, carminativo, febrífugo, diurético, antipirético, anti-reumático, antiséptico, debido a su acción fungistática, y según Guenther [11], para la preparación de jabones, colonias y desodorantes, en la industria química. Por estas aplicaciones, el precio del aceite esencial ha sido considerado “compensador” y cada día aumenta la demanda en el mercado nacional e internacional.

Leal *et al.* [71] comentan que la composición química del aceite esencial de palmarrosa puede ser bastante variable, conforme la diversidad genética, el

hábitat y los tratos culturales. En este sentido, [72] recomiendan que en plantíos comerciales sean utilizados espaciamientos de 1 m entre plantas y 0,5 m entre líneas. Este cultivo prefiere suelos arenosos, ricos en materia orgánica. La planta se desarrolla satisfactoriamente en un rango de pH de 5,0 a 6,5. La época ideal de plantío es al final de la estación lluviosa, en la cual, el suelo posee una buena humedad. El mismo autor recomienda la protección del suelo con cobertura muerta. En la India, en plantíos comerciales se recomienda que sean utilizados espaciamientos de 1 m entre líneas y 0,5 m entre plantas (20.000 plantas ha<sup>-1</sup>). De todas formas, se sugiere la implantación de ensayos en cada local de cultivo para definir la mejor densidad de plantas [68].

Cuando el suelo fue intensamente labrado, Datta [72] recomienda una aplicación de 62 kg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y 50 kg de K<sub>2</sub>O por hectárea en el momento del plantío, además de 125 kg de N distribuidos durante el ciclo de la planta. La aplicación foliar de urea al 1% también fue bastante eficiente. El autor recomienda la aplicación de pequeñas dosis de fósforo y potasio en cobertura. Después de cada colecta se recomienda la aplicación de las mismas cantidades de fertilizantes que fueron aplicadas en el plantío. Con dosis de 185 kg de N ha<sup>-1</sup>, Bhan *et al.* [73] obtuvieron en sus experimentos, rendimientos de aceites superiores a 349 kg/ha.

#### ➤ ***Cymbopogon nardus* (citronela)**

La citronela, *C. nardus* (L.) Rendle (Véase **Figura 19**) es una planta originaria de Sri Lanka, pertenece a la familia de las gramíneas (Poaceae). Es una hierba aromática que puede alcanzar los 2.5 m de altura, de hojas alargadas de 1 m de longitud y 1-5 cm de ancho, de color verde claro. Sus hojas son utilizadas para el tratamiento del reumatismo, de problemas menstruales e intestinales. El aceite esencial de *C. nardus* presenta actividad antimicrobial contra *Pseudomonas putida*, actividad inhibitoria del crecimiento de *Aspergillus niger* y actividad analgésica [74]. Usualmente, el componente mayoritario del aceite esencial de

esta especie es el citronelal (34-41%), seguido del geraniol (16-24%) y del citronelol (7-9%). No obstante, en India y en Costa de Marfil se reportan aceites esenciales de esta especie en los cuales geraniol (36-46%) o isopulegol (71%) es, respectivamente, el componente mayoritario. El rendimiento en aceite esencial de esta especie se encuentra comprendido entre 0.6 y 1.2% [74].

La citronela (*C. nardus*) se cultiva sobre todo en Sri Lanka, y por lo tanto el aceite obtenido de ella se conoce como aceite de citronela de Ceilán. La especie *Cymbopogon winterianus*, también conocida como citronela de Java, se diferencia de *C. nardus* por su alto contenido de geraniol (25-40%).

La presencia de los derivados fenólicos (metil eugenol y metil isoeugenol) es la diferencia más significativa entre el tipo de Ceilán y el aceite de tipo Java. Las variedades silvestres de citronela que crecen en Sri Lanka presentan altos contenidos de fenilpropanoides en comparación con las trazas presentes en el aceite de tipo Java [74].

El aceite esencial de citronela es una de las principales materias primas empleada en la industria cosmética, principalmente, en la perfumería, para el aislamiento de compuestos como el citronelol, geraniol, citronelal e hidroxicitronelal.

El aceite se utiliza principalmente, en perfumería, tanto directa como indirectamente. Jabones, detergentes, productos de limpieza del hogar, productos técnicos, insecticidas, etc., están perfumados a menudo exclusivamente, con este aceite. También, es un componente valioso en perfumería para los jabones y detergentes. El citronelal se utiliza ocasionalmente, en las composiciones florales de cítricos, cereza, jengibre, etc. Sin embargo, la mayor importancia del citronelal radica en su papel como material de partida para otros derivados. Hidroxicitronelal puede prepararse a partir de citronelal, y es un ingrediente clave en la composición de perfumes florales. Se encuentra en casi todo tipo de fragancia floral y un gran número de los no florales. Para perfumes de jabón, se utiliza un

grado ligeramente más áspero. En alto grado se utiliza en composiciones de sabor. También se emplea como ambientador y repelente de insectos [74].

El período de cosecha afecta el rendimiento y la calidad del aceite esencial de citronela. La primera cosecha se obtiene después de 4-6 meses después de sembrada. Subsecuentemente, las cosechas se pueden realizar con intervalos entre 60-90 días, dependiendo del nivel de fertilización del suelo y de factores ambientales. Bajo condiciones normales, durante el primer año es posible obtener de dos a tres cosechas y de tres a cuatro en los siguientes años, dependiendo del manejo agronómico y mantenimiento de los cultivos. En cuanto al rendimiento del aceite esencial por hectárea de cultivo, es posible obtener para el primer año entre 80-100 kg de aceite esencial y los años posteriores esta producción puede incrementarse hasta 150 kg de aceite esencial por ha. El rendimiento de extracción del aceite esencial varía entre el 0.5-1.0%. [74]



**Figura 19.** Plantas de *Cymbopogon nardus*, cultivos experimentales en el Complejo Piloto de CENIVAM-UIS. Marzo de 2014.



**Figura 19.** Plantas de *Cymbopogon nardus*. Cultivos experimentales (0.1 ha) municipio del Puente Nacional, Santander, Vereda Petaqueros. Agosto de 2015.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1. Identificación botánica de las especies

La caracterización botánica de las especies bajo estudio: *Lippia origanoides* (orégano de monte), *Thymus vulgaris* (tomillo), *Cymbopogon martinii* (palmarrosa) y *Cymbopogon nardus* (citronela), se llevó a cabo en el Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia (Bogotá). Los pliegos-testigo para cada planta quedaron depositados como muestras permanentes en el Herbario Nacional Colombiano (COL, Bogotá). Las plantas fueron clasificadas por los doctores J. L. Fernández y O. Rivera-Díaz., a quienes los autores expresan su más sincero agradecimiento.

### 2.2. Propagación, cultivos y cosecha del material vegetal

Las plantas de *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon nardus* y *Lippia origanoides* se cultivaron en parcelas experimentales, en los municipios del Socorro, Barbosa y Puente Nacional, Santander, durante el segundo semestre de 2009 y segundo semestre de 2013. Las áreas de cultivo para cada especie fueron de aproximadamente dos hectáreas, distribuidas en diez parcelas de 0.1 ha (Véase **Figura 20**). El material vegetal de *Thymus vulgaris*, fue cultivado en parcelas experimentales ubicadas en los corregimientos de La Pradera (Vereda El Retiro) y La Granja del Municipio de Sucre, Santander. El área de cultivo fue de 1.0 ha, distribuida en 10 parcelas de 0.1 ha. Los cultivos se establecieron durante el primer semestre de 2010 (Véase **Figura 20a**).



**A**



**B**



**C**

**Figura 20.** Cultivos experimentales de *Cymbopogon martinii* (A), *Lippia origanoides* (B) y *Cymbopogon nardus* (C) establecidos en los municipios de Socorro y Barbosa, Santander.



**Figura 20a.** Cultivos experimentales de *Thymus vulgaris* y *Salvia officinalis* establecidos en el municipio de Sucre, Santander.

Para las especies orégano de monte, tomillo y citronela, se tomaron segmentos nodales de 10-15 cm de longitud de plantas maduras, los cuales se plantaron en una mezcla de materia orgánica, arena y arcilla (1:2:1) (Véase **Figura 21**). Las estacas enraizadas, provenientes del vivero (edad 40 días), se trasplantaron a campo de acuerdo con las densidades de siembra presentadas en la **Tabla 3**. La palmarrosa fue propagada mediante semillas certificadas, obtenidas de un cultivo experimental ubicado en el Complejo Piloto CENIVAM, en la UIS-Bucaramanga. Los cuidados de los cultivos consistieron en riegos, que garantizaron el establecimiento y el desarrollo de la plantación, en la eliminación de malezas, cuando fue necesario y en la aplicación de insumos agrícolas para el control de plagas y enfermedades. La fertilización de los cultivos se realizó con la aplicación de abono orgánico, 300 g por planta, al inicio del cultivo y posteriormente, después de cada cosecha. El material vegetal empleado para la obtención de los aceites

esenciales por el método de arrastre con vapor, correspondió a la segunda cosecha de cada especie, después de 12 meses de trasplantadas.



**A**



**B**

**Figura 21.** Propagación del material vegetal en los viveros ubicados en las Sede UIS-Socorro, UIS-Barbosa (A) y en la Vereda La Pradera del Municipio de Sucre, Santander (B).

**Tabla 3.** Densidades de siembra empleadas en el establecimiento de cultivos experimentales empleados en el estudio.

Especie	Distancia, m			Plantas por hectárea
	Entre plantas	Entre surcos	Entre surco doble	
<i>Cymbopogon martinii</i>	0,4	0,5	0,6	45.455
<i>Cymbopogon nardus</i>	0,4	0,7	0,7	35.714
<i>Lippia origanoides</i>	0,5	0,4	0,7	36.364
<i>Thymus vulgaris</i>	0.4	0.7	-	35.714

**2.2.1. Selección del material vegetal.** La recolección del material vegetal se realizó manualmente en horas de la mañana, después de eliminado el rocío, mediante el corte del follaje con tijeras podadoras, a 30 cm del suelo, de todas las parcelas experimentales. Posteriormente, el material vegetal proveniente de los cultivos, fue mezclado y homogeneizado para los posteriores tratamientos postcosecha. Para cada especie se recolectaron aproximadamente 3 toneladas de material vegetal fresco. El tomillo y el orégano de monte fueron recolectados en estado de floración, después de la primera cosecha. La citronela y la palmarrosa, fueron recolectadas cuatro meses después de la primera cosecha, la cual sirvió como poda de formación.

El material vegetal utilizado para los diferentes experimentos fue recolectado en las parcelas de la vereda El Retiro, perteneciente a los Corregimientos La Pradera y la Granja, pertenecientes todos al Municipio de Sucre (Santander), para el caso del tomillo, y en los municipios de Socorro (Vereda Quebradas) y Puente Nacional (Vereda Petaqueros); para la palmarrosa, citronela y el orégano de monte.

### 2.3. Manejo post-cosecha del material vegetal

El material vegetal proveniente de los cultivos fue sometido a un proceso de secado en un caney tipo invernadero recubierto con polietileno transparente de alta densidad. El secado se realizó al ambiente, con temperaturas promedio de 18°C (Sucre, Santander), 22°C (Socorro, Santander) y 20°C (Barbosa, Santander). El secado del material se hizo de forma homogénea, es decir, realizando volteos periódicos cada tres horas y con un seguimiento que permitiera controlar su deshidratación (Véase **Figura 22**).



**Figura 22.** Tratamiento postcosecha del material vegetal recolectado. Picado. Picadora Penagos PE-800. B. Secado en bandejas a temperatura ambiente. UIS-Socorro, noviembre 2010 (arriba). Vereda el Retiro, Sucre, Santander, febrero de 2011.

Posteriormente, el material vegetal homogeneizado y seco, de acuerdo con las necesidades de cada experimento, se picó para su inmediata destilación de acuerdo con el diseño experimental para cada especie bajo estudio. Para ello, se empleó una picadora marca Penagos, referencia PE-800 (Véase **Figura 22**).

#### **2.4. Obtención de los aceites esenciales por el método de arrastre con vapor**

Los aceites esenciales se obtuvieron por el método de arrastre con vapor, a partir del material vegetal cosechado, picado y secado (100 kg), de acuerdo con los diseños experimentales para cada especie bajo estudio (**Sección 2.5.1**). Se empleó un destilador con un alambique de 1.0 m<sup>3</sup> (Véase **Figura 23**). El vapor de agua sobrecalentado se obtuvo a partir de una caldera de 6 BHP (Tecnik), que empleó gas natural como combustible. La presión de trabajo se ajustó desde 50 a 110 psi, dependiendo del experimento. El tiempo de extracción fue de 40 min para el tomillo y de 120 min para las especies citronela, palmarrosa y orégano de monte. Se empleó un condensador de haz de tubos para la condensación de la mezcla agua/aceite esencial, el cual empleó agua como refrigerante. Para la separación del aceite esencial, se empleó un vaso Florentino con un volumen de 40 L. El flujo del vapor fue de 0.8 L/min.

Al final del proceso de extracción, se agregó sulfato de sodio al aceite extraído, para retirar el agua residual. Para cada especie bajo estudio, se realizaron cinco réplicas de las extracciones, en el punto medio del diseño experimental, para determinar el error. También se adelantaron extracciones posteriores al diseño experimental, para evaluar el modelo generado, con las mejores condiciones de extracción. En total se llevaron a cabo 96 extracciones.



**Figura 23.** Destilador de aceites esenciales por el método de arrastre con vapor con capacidad de 300 kg de material vegetal, instalado en la Vereda el Retiro, Sucre, Santander. Diciembre de 2010.

## **2.5. Estudio de las variables que afectan el rendimiento y composición de los aceites esenciales de orégano de monte, citronela, palmarrosa y tomillo.**

### **2.5.1. Diseño experimental**

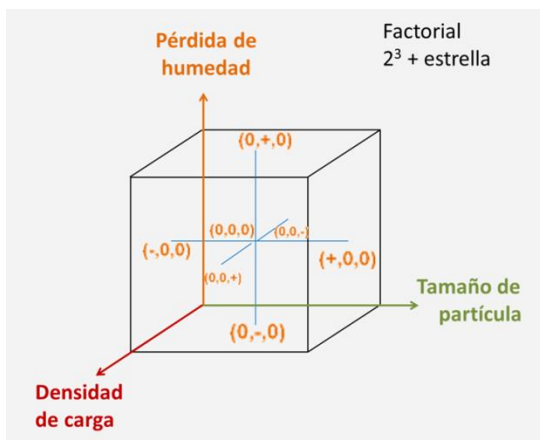
Con el objeto de establecer las condiciones más apropiadas para el tamaño de partícula (cm), densidad de carga ( $\text{kg/m}^3$ ), porcentaje de secado (%p/p de pérdida de humedad) y presión de trabajo (psi) para la extracción de los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* (tomillo), *Lippia organoides* (orégano de monte), *Cymbopogon nardus* (citronela) y *Cymbopogon martinii* (palmarrosa), se evaluaron diferentes tamaños de partícula, combinados con distintas densidades de carga, grados de secado o no del material vegetal y presión de trabajo de la caldera que suministró el vapor para la extracción de los AE; para ello, se implementó un diseño

experimental factorial de  $2^3$  extendido. Las variables de respuesta fueron los rendimientos de extracción y los componentes mayoritarios de cada aceite esencial. El error experimental se determinó con base en las mediciones efectuadas en el punto medio de las variables estudiadas. En las **Tablas 4 y 5** se presentan los diseños experimentales implementados para las especies bajo estudio, así como los valores de las variables tomados. En la **Figura 24** se presenta un esquema el diseño experimental.

**Tabla 4.** Diseño experimental factorial  $2^3$  extendido empleado para evaluar el efecto del tamaño de partícula, el secado del material vegetal y la densidad de carga sobre el rendimiento de extracción y la composición del aceite esencial de *Thymus vulgaris* (tomillo).

Experimento	Niveles de las variables		
	Tamaño partícula, cm	Pérdida de humedad, %(p/p)	Densidad de carga, kg/m <sup>3</sup>
1	0,5	0	85
2	10,0	0	85
3	0,5	70	85
4	10,0	70	85
5	0,5	0	146
6	10,0	0	146
7	0,5	70	146
8	10,0	70	146
9	0,5	35	116
10	10,0	35	116
11	0,9	0	116
12	0,9	70	116
13	0,9	35	85
14	0,9	35	146
15*	0,9	35	116
16*	0,9	35	116
17*	0,9	35	116
18*	0,9	35	116
19*	0,9	35	116

\* Niveles de variables empleados para determinar el error experimental del método. Tiempo de extracción: 40 min.



**Figura 24.** Esquema general del diseño experimental aplicado al proceso de extracción del AE de tomillo

**Tabla 5.** Diseño experimental factorial  $2^3$  extendido empleado para evaluar el efecto del tamaño de partícula, la densidad de carga y la presión del vapor, sobre el rendimiento de extracción y la composición de los aceites esenciales de *Lippia origanoides* (orégano de monte), *Cymbopogon nardus* (citronela) y *Cymbopogon martinii* (palmarrosa).

Experimento	Niveles de las variables		
	Tamaño partícula, cm	Presión de la caldera (PSI)	Densidad de carga, $\text{kg/m}^3$
1	0.5	50	200 <sup>a,b</sup>
2	30	50	200 <sup>a,b</sup>
3	0.5	110	200 <sup>a,b</sup>
4	30	110	200 <sup>a,b</sup>
5	0.5	50	320 <sup>a</sup> ; 240 <sup>b</sup>
6	30	50	320 <sup>a</sup> ; 240 <sup>b</sup>
7	0.5	110	320 <sup>a</sup> ; 240 <sup>b</sup>
8	30	110	320 <sup>a</sup> ; 240 <sup>b</sup>
9	0.5	80	260 <sup>a</sup> ; 220 <sup>b</sup>
10	30	80	260 <sup>a</sup> ; 220 <sup>b</sup>
11	0.9	50	260 <sup>a</sup> ; 220 <sup>b</sup>
12	0.9	110	260 <sup>a</sup> ; 220 <sup>b</sup>
13	0.9	80	200 <sup>a,b</sup>
14	0.9	80	320 <sup>a</sup> ; 240 <sup>b</sup>

Continuación, **Tabla 5.**

Experimento	Niveles de las variables		
	Tamaño partícula, cm	Presión de la caldera (PSI)	Densidad de carga, kg/m <sup>3</sup>
15*	0.9	80	260 <sup>a</sup> ; 220 <sup>b</sup>
16*	0.9	80	260 <sup>a</sup> ; 220 <sup>b</sup>
17*	0.9	80	260 <sup>a</sup> ; 220 <sup>b</sup>
18*	0.9	80	260 <sup>a</sup> ; 220 <sup>b</sup>
19*	0.9	80	260 <sup>a</sup> ; 220 <sup>b</sup>

\* Niveles de variables empleados para determinar el error experimental del método. **a.** Valores para las especies citronela y palmarrosa; **b.** valores para la especie orégano de monte. Tiempo de extracción: 120 min. Material vegetal fresco.

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

Para el análisis estadístico de los resultados se empleó el programa STATISTICA (Versión 6.0, StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, EE. UU), con el cual se realizaron los análisis de varianza y de componentes principales de las concentraciones (g/L) de los compuestos mayoritarios presentes en los aceites esenciales tomillo, citronela, palmarrosa y orégano de monte extraídos por arrastre con vapor. El propósito de este análisis fue encontrar relaciones entre la composición química de los aceites esenciales aislados de las plantas aromáticas por arrastre con vapor, con los perfiles cromatográficos obtenidos por GC-FID y GC-MS.

Para el encaje de los modelos polinómicos, a partir de la colección de datos obtenidos, al aplicar los diseños experimentales factoriales 2<sup>3</sup>, se tomaron como observables los resultados de multiplicar la cantidad (kg) de los aceites esenciales, obtenidos por cada lote de destilación en un alambique de capacidad de 1m<sup>3</sup>, con la sumatoria de las áreas cromatográficas de los componentes mayoritarios

presentes en cada AE, a saber: **tomillo** (timol,  $\gamma$ -terpineno y  $p$ -cimeno); **palmarrosa** (geraniol, acetato de geraniol); **citronela** (citronelal, citronelol, geraniol); **orégano de monte** ( $p$ -cimeno,  $\gamma$ -terpineno, timol y carvacrol). En cada caso, se normalizaron los valores de las variables y del observable. Para el análisis de varianza se empleó el método de Yates, con el fin de determinar cuáles variables eran factores a tener en cuenta en los modelos polinómicos (variables que mostraron significancia en los procesos de extracción de los aceites esenciales por el método de arrastre con vapor). Se usó el valor crítico del parámetro F para 1 y 4 grados de libertad, con un nivel de confianza de probabilidad de  $P = 0,05$ .

Para la obtención de los modelos matemáticos, que relacionaron, la cantidad de AE obtenido (kg) y las áreas cromatográficas de los componentes mayoritarios presentes en los AE de tomillo, palmarrosa, citronela y orégano de monte con las diferentes variables bajo estudio (tamaño de partícula, secado, densidad de carga, presión de vapor), se estimaron por cada especie un total 10 ecuaciones polinómicas, las cuales fueron resueltas por el método de mínimos cuadrados. Para determinar el modelo que mejor se ajustó a las variables evaluadas, se compararon los  $R^2$  ajustados, así como la varianza que el modelo no fue capaz de explicar (LOF).

### **2.6.1. Optimización del modelo y validación.**

Para obtener los mejores valores de las ecuaciones seleccionadas para cada especie en la **Sección 2.6.**, estas se derivaron parcialmente respecto a cada variable y se igualaron a cero. Los valores obtenidos se renormalizaron y aplicaron experimentalmente para corroborar el modelo obtenido. Para ello, se usó el procedimiento experimental descrito en la **Sección 2.4.** Se tomaron al menos tres puntos experimentales para corroborar el modelo.

## **2.7. Caracterización química y cuantificación de los componentes de los aceites esenciales mediante GC-MS; GC-FID.**

Con el objetivo de realizar una caracterización química completa y cuantificación de los metabolitos secundarios volátiles presentes en los aceites esenciales de tomillo, citronela, palmarrosa y orégano de monte, se emplearon las técnicas de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y la cromatografía de gases con el detector de ionización en llama (GC-FID).

### **2.7.1. Preparación de muestras para el análisis por GC-MS y GC-FID**

Con el fin de eliminar impurezas y agua residual, los AE fueron filtrados a través de sulfato de sodio anhidro. Se tomó una alícuota de cada aceite esencial (50  $\mu$ L), a la cual se le adicionaron 0.5  $\mu$ L de *n*-tetradecano (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) como patrón interno. Esta mezcla se aforó a un volumen de 1 mL, con diclorometano (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EE.UU.).

### **2.7.2. Análisis por cromatografía de gases – espectrometría de masas GC-MS.**

El análisis cromatográfico y los espectros de masas de las muestras de aceites esenciales se obtuvieron en los equipos *Agilent Technologies 6890 Plus Series GC System*, acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5973 Network, Mass Selectivity Detector* y *Agilent Technologies 7890 GC System*, acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5975C, Mass Selectivity Detector (Figura 25)*, equipados con puertos de inyección *split/splitless* (250°C, relación de *split* 30:1), un inyector automático *Agilent Technologies 7863* y un *Auto sampler Agilent Technologies 7863*. La separación de los analitos se realizó empleando dos columnas de polaridad ortogonal, a saber: columna capilar apolar DB-5MS (*J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.*) de

60m x 0,25 mm., D.I. x 0,25  $\mu$ m,  $d_f$ , con fase estacionaria de 5%-fenil-poli(metilsiloxano); columna capilar polar DB-WAX (*J&W Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.) de 60m x 0,25 mm., D.I. x 0,25  $\mu$ m,  $d_f$ , con fase estacionaria de poli(etilenglicol). El gas de arrastre empleado en el análisis fue helio (99.995 %) (Linde, COL), con una presión de entrada en la cabeza de columna de 16,47 psi. La programación del horno para la columna DB-WAX fue: 50°C (5 min.) a 5°C/min hasta 150°C (2 min), a 5°C/min hasta 230°C (35 min). El modo de inyección fue *split* (30:1 @ 250 °C). Para la columna DB5-MS, la programación del horno fue: 45°C (5 min.) a 4°C/min hasta 150°C (2 min.) a 5°C/min hasta 250°C (5 min.), a 10°C/min hasta 275°C (50 min.); modo de inyección *split* (30:1 @ 250°C). Los espectros de masas se obtuvieron por impacto con electrones (EI) de energía de 70 eV. Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia se mantuvieron a 230 y 285°C, respectivamente. Los espectros de masas y las corrientes iónicas totales (TIC, por sus siglas en inglés, *Total Ion Current*) se obtuvieron en un analizador cuadrupolar, por medio de barrido automático de frecuencia (*full scan*), en el rango de masas de  $m/z$  40-350. Los datos cromatográficos fueron adquiridos y procesados con el sistema de datos *Hewlett-Packard MSChemStation G17001DA* (Versión D 00.01.27, 2002), que incluye las bases de datos Wiley, NIST y Adams 2004.

### 2.7.3. Análisis por GC-FID

Se empleó un cromatógrafo GC *Agilent Technologies* 6890N, equipado con un inyector *split/splitless* (250°C, relación *Split* 1:30) y un detector de ionización en llama (FID) (250°C) (**Figura 26**). Para el procesamiento de datos, se utilizó el programa *Chem Station* (HP Rev. B.03.02). Para la separación de los analitos, se usó una columna capilar apolar, DB-5MS, de 60 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25  $\mu$ m,  $d_f$ , con fase estacionaria de 5%-fenil-poli(metilsiloxano). La programación de temperatura para el horno fue de 40°C (15 min) hasta 250°C @ 5°C min<sup>-1</sup>. El gas de arrastre empleado fue helio (99.995 %), con una presión de entrada en la

cabeza de la columna de 200 kPa y una velocidad lineal de  $26 \text{ cm s}^{-1}$ . El gas auxiliar fue nitrógeno, a  $30 \text{ mL/min}$ .



**Figura 25.** Cromatógrafos de gases *Agilent Technologies* 6890 *Plus Series* y 7890 *GC System* acoplados a detectores selectivos de masas *Agilent Technologies* 5973 *Network* y 5975C, equipados con un puertos de inyección *split/splitless* y un inyector automático *Agilent* 6890. Foto: Camilo Durán, Laboratorios CIBIMOL-CENIVAM, octubre 2014.



**Figura 26.** Cromatógrafo de gases de alta resolución *Agilent Technologies* 6890N, con detector de ionización en llama (FID). Foto: Camilo Durán, Laboratorios CIBIMOL-CENIVAM.

La cuantificación de los componentes de cada AE extraído e identificado, se llevó a cabo empleando la técnica de estandarización interna, utilizando el *n*-tetradecano como patrón interno. La concentración, a la cual se llevó el patrón interno en el extracto, fue de 380 ppm. Las áreas de los picos cromatográficos de cada uno de los componentes de las muestras se compararon con el área del patrón interno. Suponiendo, que los factores de respuesta del detector para el patrón interno y para los componentes de la mezcla son similares, las concentraciones de cada uno de los componentes se calcularon con base en la **Ecuación 1**, donde  $C_X$  y  $C_A$  son las concentraciones del compuesto de interés y del patrón interno, respectivamente, y  $A_X$  y  $A_A$  son sus áreas cromatográficas, en cuentas, así:

$$C_X = C_A \times \frac{A_X}{A_A}$$

**Ecuación 1**

$C_X$ = Concentración del compuesto de interés.

$C_A$ = Concentración del patrón interno.

$A_X$ = Área cromatográfica del compuesto de interés.

$A_A$ = Área cromatográfica del patrón interno.

También, se empleó la cuantificación de los componentes principales de los aceites esenciales de las especies bajo estudio, empleando el método de calibración con estándar externo. Para ello, las curvas de calibración con estándar externo, se prepararon empleando materiales de referencia certificados, comprados a *Sigma – Aldrich* (Milwaukee, EE.UU.), a saber:  $\gamma$ -terpineno (98%), *p*-cimeno (97%), timol (98%), carvacrol (98%), geraniol (98%), acetato de geranilo (98%), citronelal (96%), citronelol (99%). Para cada sustancia de referencia 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 en el rango de 1000 a 10000 ppm.

## **2.8. Elaboración de la ficha técnica de los aceites esenciales**

Debido a las múltiples variables que afectan la composición de los aceites esenciales, se han establecido especificaciones y estándares de calidad para los aceites esenciales comercializados en el mercado internacional. Estas normas provienen de asociaciones de productores, y de compradores y entidades supranacionales, entre las que se destaca la *International Standards Organization*, ISO. Entre más de 200 Comités Técnicos que posee la ISO, el Comité Técnico 54 está dedicado exclusivamente a los aceites esenciales. Además de las normas sobre las metodologías para estas determinaciones, el Comité 54 también ha producido normas para diversos aceites esenciales [75]. En estas normas aparecen los valores mínimo y máximo que se aceptan para diferentes calidades (grados) y orígenes de un mismo aceite esencial. Debido a que Colombia no ha participado en el mercado internacional como productor de aceites esenciales, no existen normas ni registros de los intervalos dentro de los que fluctúan los valores de los parámetros fisicoquímicos que caracterizan sus aceites. Para documentar estos intervalos, en la presente investigación se determinaron ocho parámetros fisicoquímicos de calidad diferentes, adicionales a la caracterización mediante GC-MS, para las muestras de los aceites esenciales obtenidos bajo las mejores condiciones de extracción, de las cuatro especies bajo estudio. Con los resultados de estos ensayos, se construyeron las fichas técnicas de calidad para los aceites esenciales producidos en el Departamento de Santander, Colombia. A continuación se describen los ensayos empleados.

### 2.8.1. Ensayos fisicoquímicos para el control de calidad de aceites esenciales

- **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. 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 [76].
- **Índice de refracción (ntD), norma ISO 280:** mide el grado de cambio de dirección y velocidad de la luz al pasar desde un medio a otro [77]. El índice de refracción disminuye con el aumento de la temperatura y está intrínsecamente relacionado con la densidad una sustancia.
- **Rotación óptica ( $\alpha_D$ ), norma ISO 592:** mide el ángulo, en radianes, 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 [78]. La naturaleza enantiomérica del AE puede ser levorrotatoria (L, l, -), lo que significa que la muestra rota el plano de la luz polarizada hacia la izquierda; o viceversa (dextrorrotatoria= D, d, +).
- **Contenido de humedad (H): valoración de Karl Fisher, ISO 11021 [79]:** con este método se determina mediante una valoración bivolamétrica, 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 al presentarse 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 [80]:** es la temperatura constante o la temperatura máxima, observada cuando el AE en un estado líquido súper-enfriado, libera el calor latente de fusión.
- **Punto de inflamación (FLP), norma ISO/TR 11018 [81]:** 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:

- **Índice de acidez (AV), norma ISO 1242:** determina los mg de KOH necesarios para neutralizar los ácidos libres presentes en 1 g de AE [82]. 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.
- **Índice de ésteres (EV), norma ISO 709 [83]:** determina los mg de KOH requeridos para neutralizar el ácido liberado por la hidrólisis de los ésteres presentes en 1 g de aceite esencial.

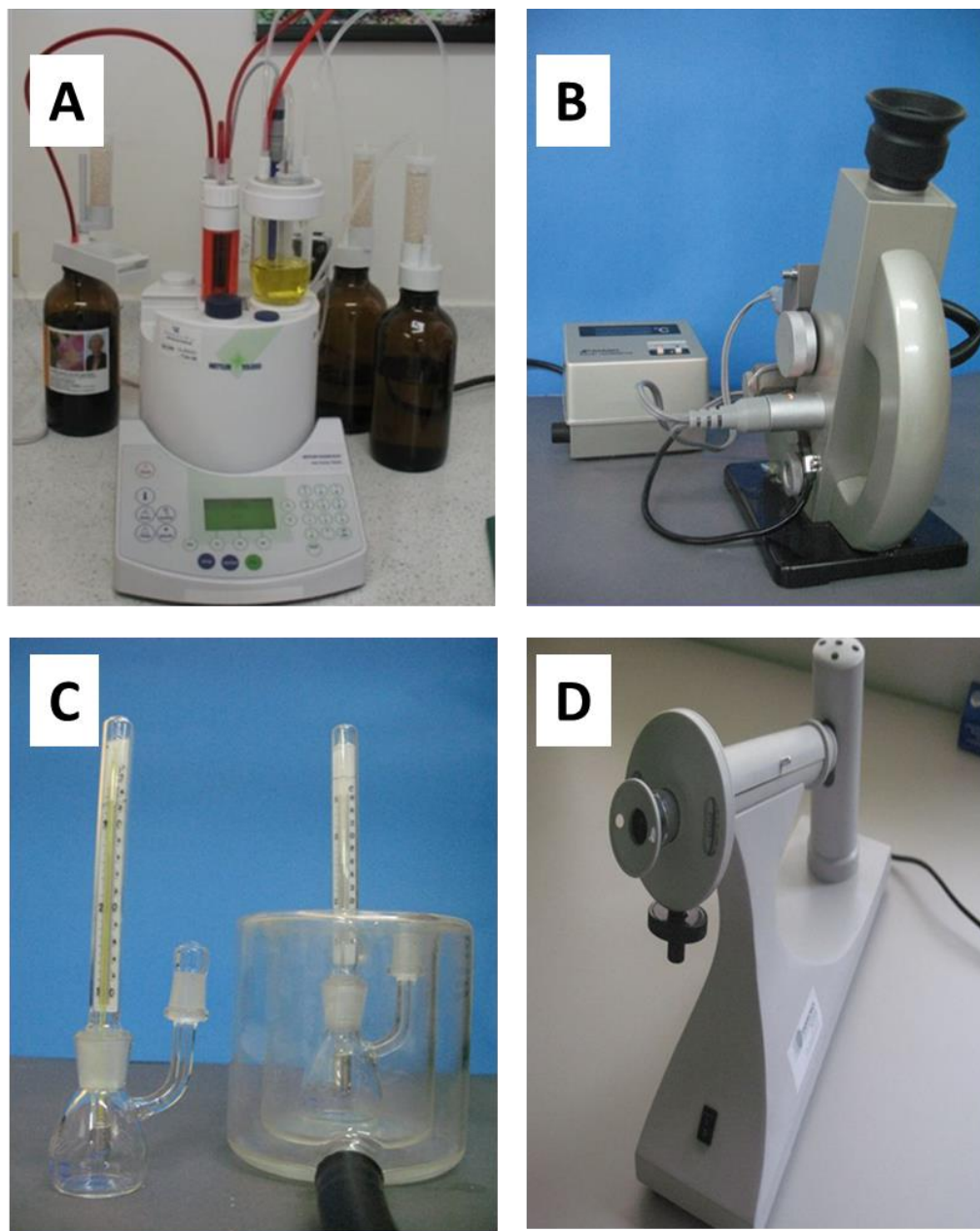
Todos los ensayos fisicoquímicos evaluados a los AE bajo estudio, se realizaron de acuerdo con las normas internacionales ISO, descritas anteriormente. En las **Tablas 6 y 7**, se presentan los reactivos y equipos empleados en cada una de las pruebas y en la **Figura 27**, se muestran los montajes utilizados.

**Tabla 6.** 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%		
1-Bromonaftaleno, 99%	MERCK - Darmstadt, Alemania	
R-(+)-Limoneno, 97%	Sigma-Aldrich – Buchs, Suiza	$\alpha_D^t$ ; ISO 592
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 7.** Equipos empleados para la evaluación de las pruebas fisicoquímicas, según las normas ISO.

Equipos	Norma ISO
Picnómetro de 9.835 mL (BRAND, Wertheim, Alemania;	D, ISO 279
Refractómetro tipo <i>Abbe</i> ATAGO NAR-1T (Tokio, Japón), rango de medición de 1.300 a 1.700 ± 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), con portamuestras de 10 y 5 cm de longitud.	$\alpha_D^t$ , ISO 592
Titulador volumétrico <i>Karl Fischer</i> (METTLER TOLEDO DL31).	H, ISO 11021
<i>Data logger/thermometer</i> HH306A (Omegaette, EE.UU.), rango de medida -200 a 1370 °C ± 0.2, con doble entrada para termocupla tipo K	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.	FLP, ISO/TR 11018
Bureta doble clase A, BRAND, de 2 ± 0.01 mL.	AV, ISO 1242



**Figura 27.** Equipos y montajes empleados durante la determinación de las propiedades fisicoquímicas de AE, según las normas internacionales ISO. **A.** Titulador volumétrico Karl Fischer, Mettler Toledo DL31 (Norma ISO 11021). **B.** Refractómetro tipo Abbe, Atago Nart-1T (Norma ISO 280). **C.** Picnómetro Brand y vaso refrigerante (Norma ISO 279). **D.** Polarímetro Optical Instruments (Norma ISO 592). Fotografías Andrea Agudelo. CIBIMOL CENIVAM-2012.



**Figura 27.** Equipos y montajes empleados durante la determinación de las propiedades fisicoquímicas de AE, según las normas internacionales ISO. **A.** *Data logger/thermometer* HH306A, Omega (norma ISO 1041). **B.** *SetaFlash Tester Series 3*, con copa cerrada (Norma ISO 11018). **C.** Bureta doble clase A, BRAND, (Norma ISO 1242). **D.** Bureta clase B (BRAND), frascos de saponificación de 100 mL (Norma ISO 709). Fotografías Andrea Agudelo. CIBIMOL CENIVAM-2012.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Identificación botánica de las especies bajo estudio

Los resultados de identificación taxonómica para las especies bajo estudio fueron los siguientes: *Lippia origanoides* Kunth (N° COL 512075), *Thymus vulgaris* L. (N° COL 555843), *Cymbopogon martinii* (Roxb) W. Watson (N° CE-00461), *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle (N° COL 578357). Las plantas fueron clasificadas por los doctores J. L. Fernández y O. Rivera-Díaz. Para el caso de la especie palmarrosa, esta fue ingresada a la Colección del Centro de Excelencia CENIVAM, a partir de semillas certificadas y comercializadas por la empresa *B&TWorld seeds* (París, Francia).

#### 3.2. Propagación y establecimiento de cultivos experimentales

La primera fase de la tesis doctoral contempló la multiplicación del material vegetal bajo estudio, a saber: *Thymus vulgaris* (tomillo), *Lippia origanoides* (orégano de monte), *Cymbopogon martinii* (palmarrosa) y *Cymbopogon nardus* (citronela). Para ello, inicialmente se adquirieron 10.000 plántulas de cada especie, a empresas nacionales. El material adquirido fue trasplantado a campo en 10 parcelas de 500 m<sup>2</sup> y mantenido durante 6 meses. En la **Tabla 8**, se presenta la cantidad total de plantas propagadas por especie, así como el porcentaje de su viabilidad.

Para esta fase fue necesaria la construcción de cuatro viveros tecnificados, cada uno de 110 m<sup>2</sup> (Véase **Figura 21**), con estructura metálica, sistema de riego por nebulización, con módulos de 3 niveles para almacenar las bandejas de germinación (cada una con 50 puestos). La producción de material vegetal en estos viveros constituyó el mejor medio para seleccionar, producir y propagar masivamente especies aromáticas; además permitió prevenir y controlar los

efectos de plagas y enfermedades que afectan a las plántulas en esta etapa de desarrollo.

**Tabla 8.** Material vegetal propagado y establecido en los cultivos experimentales para el desarrollo de la Tesis.

<b>Especie</b>	<b>Esquejes/semillas sembrados</b>	<b>Esquejes viables</b>	<b>% de plantación</b>
<i>Thymus vulgaris</i>	51.500	50.000	97%
<i>Lippia origanoides</i>	40.000	38.250	85%
<i>Cymbopogon martinii</i>	52.000	50.960	98%
<i>Cymbopogon nardus</i>	42.000	39.900	95%

La segunda fase del Proyecto consistió en el establecimiento de los cultivos experimentales, 10 por cada especie. La preparación y establecimiento de los lotes experimentales para cada especie bajo estudio, se llevó a cabo teniendo en cuenta las Buenas Prácticas Agrícolas, empleando curvas a nivel y construcción de terrazas cuando fue necesario. En la **Figura 28** se presentan algunas imágenes de las etapas de establecimiento y cosecha de las plantas bajo estudio así como de las labores agrícolas implementadas. Las labores de preparación y conservación de los terrenos experimentales, consistieron en las siguientes actividades: limpieza, recolección de escombros y material grueso; picado y repicado del terreno; trazado en curvas a nivel; desterronamiento y nivelación; construcción y adecuación de terrazas; construcción de drenajes; arreglo de talud; aplicación de correctivos y abonos orgánicos; trasplante de material vegetal; control fitosanitario y de arvenses.

En general la adaptabilidad agronómica de las cuatro especies fue buena en los municipios de Socorro, Sucre y Barbosa, Santander.



**Preparación de terrenos y drenajes.**



**Cultivo de orégano de monte. Socorro.**



**Cultivo de tomillo. Sucre, Santander.**



**Cultivo de tomillo. Sucre, Santander.**



**Cultivo de citronela. Barbosa.**



**Cultivo de palmarrosa. Socorro.**

**Figura 28.** Registro fotográfico de las parcelas experimentales establecidas en el Municipio de Sucre, Santander (2009-2011).

### 3.3. Rendimientos de extracción de los aceites esenciales de orégano de monte, citronela, palmarrosa y tomillo.

Como resultados de Proyectos ejecutados con el apoyo del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y Colciencias, se instalaron y se pusieron en marcha tres plantas industriales para la extracción de aceites esenciales en los municipios de Socorro (Sede UIS-Socorro), Sucre (Vereda el Retiro) y Barbosa, Santander (Sede UIS-Barbosa), véanse **Figuras 29-31**. Se realizaron varias destilaciones de prueba siguiendo el procedimiento descrito en el **Numeral 2.4**, con material vegetal de diferentes especies vegetales (citronela, palmarrosa, romero, tomillo, entre otras) y se obtuvieron rendimientos de extracción entre el 0.3-1.0 % p/p de AE.



**Figura 29.** Planta de extracción de AE, instalada y puesta en marcha en el municipio de Socorro (Santander). Foto: Camilo Durán, Diciembre de 2010.



**Figura 30.** Planta de extracción de AE, instalada y puesta en marcha en el municipio de Sucre (Santander). Foto: Camilo Durán, Diciembre de 2010.



**Figura 31.** Planta de extracción de AE, instalada y puesta en marcha en el municipio de Barbosa (Santander). Foto: Camilo Durán, Febrero de 2015.

Después de realizadas las pruebas preliminares de funcionamiento con los equipos de destilación, empleando diferentes especies vegetales y corroborando que los rendimientos de extracción se encontraran en los rangos descritos en la literatura, se procedió a realizar las destilaciones con base en los diseños experimentales para cada especie bajo estudio, presentados en la **sección 2.5.1.**, con el propósito de determinar los valores óptimos para el tamaño de partícula (cm), % de humedad retirada, presión de vapor (psi) y densidad de carga (kg/m<sup>3</sup>), que proporcionaron la mayor cantidad y mejor calidad de cada aceite esencial. En las **Tablas 9 a 12** se presentan los resultados de los rendimientos de extracción de los aceites esenciales para cada uno de los experimentos. En la **Figura 32** se presentan los AE de la especie *Thymus vulgaris* envasados.



**Figura 32.** Aceites esenciales de *Thymus vulgaris* L. obtenidos en cada uno de los experimentos. Foto: Camilo Durán, Laboratorio CIBIMOL-CENIVAM, enero de 2011.

**Tabla 9.** Rendimientos de extracción de los aceites esenciales de *Thymus vulgaris*, obtenidos en los diferentes experimentos correspondientes al diseño experimental factorial 2<sup>3</sup> extendido.

<b>Exp.</b>	<b>Tamaño partícula, cm</b>	<b>Humedad retirada, %</b>	<b>Densidad kg/m<sup>3</sup></b>	<b>Rendimiento de extracción, % (p/p)</b>
<b>1</b>	0,5	0	85	<b>0,11</b>
<b>2</b>	10,0	0	85	<b>0,08</b>
<b>3</b>	0,5	70	85	<b>0,28</b>
<b>4</b>	10,0	70	85	<b>0,23</b>
<b>5</b>	0,5	0	146	<b>0,10</b>
<b>6</b>	10,0	0	146	<b>0,11</b>
<b>7</b>	0,5	70	146	<b>0,51</b>
<b>8</b>	10,0	70	146	<b>0,53</b>
<b>9</b>	0,5	35	116	<b>0,24</b>
<b>10</b>	10,0	35	116	<b>0,17</b>
<b>11</b>	0,9	0	116	<b>0,08</b>
<b>12</b>	0,9	70	116	<b>0,28</b>
<b>13</b>	0,9	35	85	<b>0,16</b>
<b>14</b>	0,9	35	146	<b>0,23</b>
<b>15</b>	0,9	35	116	<b>0,22</b>
<b>16</b>	0,9	35	116	<b>0,23</b>
<b>17</b>	0,9	35	116	<b>0,23</b>
<b>18</b>	0,9	35	116	<b>0,24</b>

**Tabla 10.** Rendimientos de extracción de los aceites esenciales de *Lippia organoides*., obtenidos en los diferentes experimentos correspondientes al diseño experimental factorial 2<sup>3</sup> extendido.

<b>Exp.</b>	<b>Tamaño partícula, cm</b>	<b>Presión del vapor, psi</b>	<b>Densidad kg/m<sup>3</sup></b>	<b>Rendimiento de extracción, % (p/p)</b>
<b>1</b>	0.5	50	200	<b>1,84</b>
<b>2</b>	30	50	200	<b>1,24</b>
<b>3</b>	0.5	110	200	<b>0,85</b>
<b>4</b>	30	110	200	<b>1,42</b>
<b>5</b>	0.5	50	240	<b>1,67</b>
<b>6</b>	30	50	240	<b>1,31</b>
<b>7</b>	0.5	110	240	<b>1,10</b>
<b>8</b>	30	110	240	<b>1,11</b>
<b>9</b>	0.5	80	220	<b>1,31</b>
<b>10</b>	30	80	220	<b>1,57</b>
<b>11</b>	0.9	50	220	<b>1,17</b>
<b>12</b>	0.9	110	220	<b>1,29</b>
<b>13</b>	0.9	80	200	<b>1,30</b>
<b>14</b>	0.9	80	240	<b>1,33</b>
<b>15</b>	0.9	80	220	<b>1,40</b>
<b>16</b>	0.9	80	220	<b>1,43</b>
<b>17</b>	0.9	80	220	<b>0,89</b>
<b>18</b>	0.9	80	220	<b>0,99</b>

**Tabla 11.** Rendimientos de extracción de los aceites esenciales de *Cymbopogon nardus*, obtenidos en los diferentes experimentos correspondientes al diseño experimental factorial  $2^3$  extendido.

<b>Exp.</b>	<b>Tamaño partícula, cm</b>	<b>Presión del vapor, psi</b>	<b>Densidad kg/m<sup>3</sup></b>	<b>Rendimiento de extracción, % (p/p)</b>
<b>1</b>	0.5	50	200	<b>0,46</b>
<b>2</b>	30	50	200	<b>0,33</b>
<b>3</b>	0.5	110	200	<b>0,33</b>
<b>4</b>	30	110	200	<b>0,38</b>
<b>5</b>	0.5	50	320	<b>0,28</b>
<b>6</b>	30	50	320	<b>0,34</b>
<b>7</b>	0.5	110	320	<b>0,31</b>
<b>8</b>	30	110	320	<b>0,36</b>
<b>9</b>	0.5	80	260	<b>0,47</b>
<b>10</b>	30	80	260	<b>0,31</b>
<b>11</b>	0.9	50	260	<b>0,34</b>
<b>12</b>	0.9	110	260	<b>0,29</b>
<b>13</b>	0.9	80	200	<b>0,35</b>
<b>14</b>	0.9	80	320	<b>0,37</b>
<b>15</b>	0.9	80	260	<b>0,55</b>
<b>16</b>	0.9	80	260	<b>0,53</b>
<b>17</b>	0.9	80	260	<b>0,55</b>
<b>18</b>	0.9	80	260	<b>0,43</b>

**Tabla 12.** Rendimientos de extracción de los aceites esenciales de *Cymbopogon martinii*, obtenidos en los diferentes experimentos correspondientes al diseño experimental factorial  $2^3$  extendido.

<b>Exp.</b>	<b>Tamaño partícula, cm</b>	<b>Presión del vapor, psi</b>	<b>Densidad kg/m<sup>3</sup></b>	<b>Rendimiento de extracción, % (p/p)</b>
<b>1</b>	0.5	50	200	<b>0,21</b>
<b>2</b>	30	50	200	<b>0,22</b>
<b>3</b>	0.5	110	200	<b>0,25</b>
<b>4</b>	30	110	200	<b>0,26</b>
<b>5</b>	0.5	50	320	<b>0,26</b>
<b>6</b>	30	50	320	<b>0,28</b>
<b>7</b>	0.5	110	320	<b>0,26</b>
<b>8</b>	30	110	320	<b>0,32</b>
<b>9</b>	0.5	80	260	<b>0,25</b>
<b>10</b>	30	80	260	<b>0,26</b>
<b>11</b>	0.9	50	260	<b>0,26</b>
<b>12</b>	0.9	110	260	<b>0,30</b>
<b>13</b>	0.9	80	200	<b>0,28</b>
<b>14</b>	0.9	80	320	<b>0,33</b>
<b>15</b>	0.9	80	260	<b>0,29</b>
<b>16</b>	0.9	80	260	<b>0,29</b>
<b>17</b>	0.9	80	260	<b>0,22</b>
<b>18</b>	0.9	80	260	<b>0,31</b>

Los rendimientos de extracción para las cuatro especies bajo estudio variaron entre el 0.08% y el 1.84%. En términos generales, los menores rendimientos de extracción para el AE de tomillo, se obtuvieron a partir de material vegetal fresco. Una mayor humedad en el material vegetal, genera un mayor espesor de agua

entre los lugares internos del material vegetal en donde se almacena el aceite esencial y el exterior por donde pasa el vapor sobrecalentado, que por efecto de difusión extrae el aceite. Esta capa impide una mayor extracción del aceite y por ende una disminución en su rendimiento. Los mayores rendimientos de extracción para el tomillo se encuentran por debajo de los rangos reportados en la literatura, que varían entre el 0.5 y 2.0% p/p [84]. Para la especie *Lippia origanoides*, los mayores rendimientos de extracción se lograron para presiones de extracción entre 50 y 80 psi. Posiblemente, esto puede ocurrir porque el vapor a una mayor presión, presenta un menor tiempo de residencia en la interfase entre el material vegetal y el vapor de agua, generándose una menor difusión de masa hacia la salida de alambique. Los rendimientos del AE de *L. origanoides*, estuvieron muy por encima (>1%) de los rendimientos habituales para aceites esenciales, lo cual lo posiciona como una de las especies promisorias. Para las especies de citronela y palmarrosa, los rendimientos de extracción estuvieron dentro del rango internacional (0.2-0.8%) esperado para estas especies [74]. Esto aporta información útil para viabilizar la producción de este tipo de aceites en Colombia.

#### **3.4. Análisis cromatográfico de los aceites esenciales (GC-MS).**

En la **Figura 33** se muestra la corriente iónica total reconstruida (TIC), obtenida por GC-MS, del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. Los compuestos identificados en el aceite esencial se presentan en la **Tabla 13**. Para la identificación de los compuestos, los datos fueron procesados con el sistema de datos *Hewlett-Packard MS ChemStation G17001DA* (Versión D 00.01.27, 2002), que incluyó las bases de datos Wiley, NIST y Adams 2004. Se usaron los espectros de masas e índices de retención lineales, los cuales se calcularon con base en la **Ecuación N° 1** [32].

$$I_R = 100n + 100 \left[ \frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \right]$$

**Ecuación N° 1**

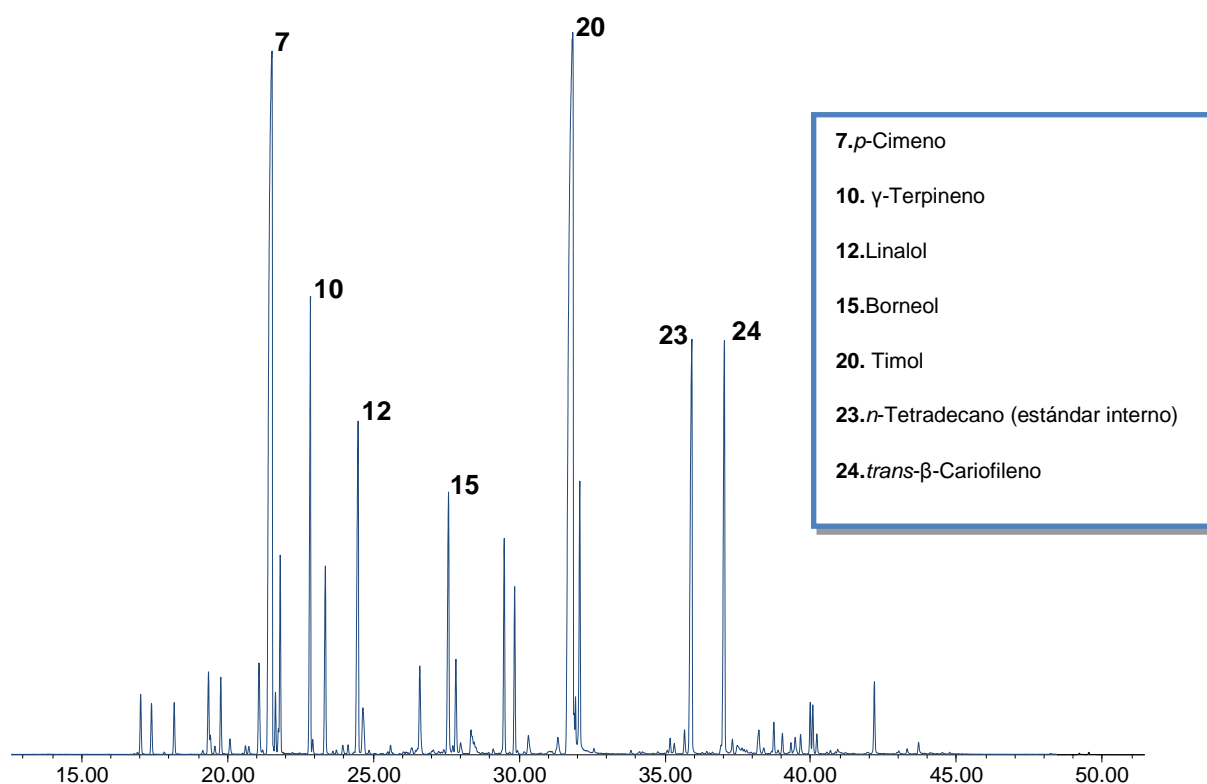
Donde  $n < N$

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

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

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

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



**Figura 33.** Cromatograma típico obtenido por GC-MS del AE de *Thymus vulgaris* L., obtenido por el método de arrastre con vapor. Columna DB-5MS (60 m). *Split* 1:30. MSD (EI, 70 eV). *Istd* (*n*-tetradecano).

**Tabla 13.** Cantidad relativa (%) e identificación de los principales compuestos encontrados en el aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. obtenidos por el método de arrastre con vapor.

Nº pico <sup>a</sup>	t <sub>R</sub> , min	IRL <sup>b</sup>	IRL <sup>c</sup>	Compuesto	GC área, %
1	17,0	928	924	α-Tujeno	0,7
2	17,4	937	932	α-Pineno	0,5
3	18,2	954	946	Canfeno	0,5
4	19,4	980	974	1-Octen-3-ol	1,0
5	19,8	990	988	β-Mirceno	0,8
6	21,1	1020	1014	α-Terpineno	1,2
<b>7</b>	<b>21,5</b>	<b>1031</b>	<b>1020</b>	<b>p-Cimeno</b>	<b>12,3</b>
8	21,6	1034	1024	Limoneno	0,5
9	21,8	1038	1026	Eucaliptol (1,8-Cineol)	2,2
<b>10</b>	<b>22,9</b>	<b>1063</b>	<b>1054</b>	<b>γ-Terpineno</b>	<b>6,4</b>
11	23,4	1075	1065	cis-Hidrato de sabineno	2,3
12	24,5	1102	1095	Linalol	3,0
13	24,7	1106	1098	trans-Hidrato de sabineno	0,9
14	26,6	1156	1141	Alcanfor	1,1
15	27,6	1181	1165	Borneol	1,6
16	27,9	1188	1174	Terpinen-4-ol	1,2
17	28,4	1201	1196	α-Terpineol	0,4
18	29,5	1232	1232	Metil-timil-éter	2,4
19	29,9	1242	1241	Metil-carvacril-éter	1,7
<b>20</b>	<b>31,9</b>	<b>1296</b>	<b>1289</b>	<b>Timol</b>	<b>45,8</b>
21	32,0	1298	1297	Acetato de isobornilo	0,5
22	32,1	1302	1298	Carvacrol	3,3
23	37,1	1434	1417	trans-β-Cariofileno	3,9
24	38,2	1469	1452	α-Humuleno	0,4
25	38,8	1484	1478	γ-Muruleno	0,3
26	40,0	1524	1513	γ-Cadineno	0,5
27	40,1	1527	1522	δ-Cadineno	0,5
28	42,2	1598	1582	Óxido de cariofileno	0,9

<sup>a</sup> Número de pico en la **Figura 33**.

<sup>b</sup> Índices de retención lineales determinados experimentalmente en la columna DB-5MS.

<sup>c</sup> Índices de retención lineales de la literatura [32].

Como puede observarse en la **Tabla 13**, en el aceite de *Thymus vulgaris* se identificaron positivamente 28 compuestos, cuyas señales individuales fueran mayores del 0,3% del área cromatográfica total, lo que corresponde a un 96.8% de todos los compuestos detectados; los compuestos mayoritarios fueron el *p*-cimeno,  $\gamma$ -terpineno y el timol. Los AE de tomillo obtenidos por el método de arrastre con vapor, presentaron un perfil con un alto contenido de timol, aceptado internacionalmente de acuerdo con la Norma ISO 14715:2010, para especies de tomillo ricas en timol, cuyo rango varía entre el 37 y el 55% de timol.

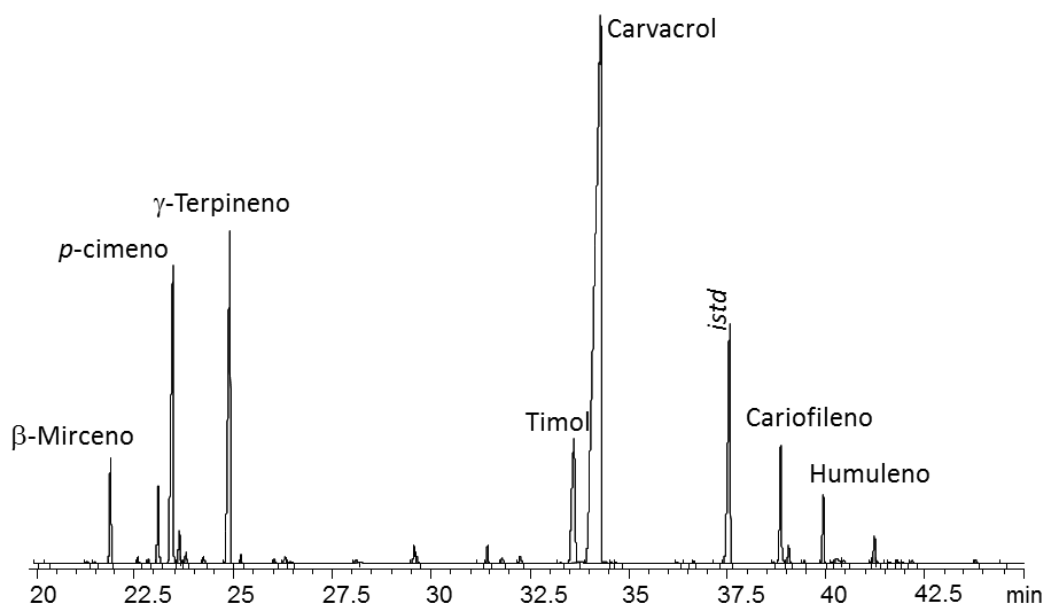
En la **Tabla 14** se presentan las áreas cromatográficas totales y las áreas cromatográficas de los compuestos mayoritarios obtenidas mediante el análisis por GC-FID, para cada uno de las extracciones realizadas según el diseño de experimentos.

En las **Figuras 34 a 36**, se presentan las corrientes iónicas totales reconstruidas (TIC), obtenidas por GC-MS, de los aceites esenciales de *Lippia origanoides*, *Cymbopogon nardus* y *Cymbopogon martinii*. Los compuestos identificados en estos aceites esenciales se presentan en las **Tablas 15 a 17**.

En las **Tablas 18 a 20** se presentan las áreas cromatográficas totales y las áreas cromatográficas de los compuestos mayoritarios obtenidas mediante el análisis por GC-FID, para cada uno de las extracciones realizadas según el diseño de experimentos de las especies *Lippia origanoides*, *Cymbopogon nardus* y *Cymbopogon martinii*.

**Tabla 14.** Áreas cromatográficas totales y áreas cromatográficas de los compuestos mayoritarios obtenidas mediante el análisis por GC-FID en los experimentos según el diseño experimental para la especie *Thymus vulgaris*.

Exp.	Tamaño partícula, cm	Humedad retirada, % (p/p)	Densidad, kg/m <sup>3</sup>	Rendimiento de extracción, %(p/p)	Área cromatográfica, cuentas			
					Total	p-Cimeno	γ-Terpineno	Timol
1	0,5	0	85	0,11	63435	10346	5835	30408
2	10	0	85	0,08	69548	10325	6248	35091
3	0,5	70	85	0,28	61730	20744	4810	16106
4	10	70	85	0,23	63518	25482	4063	18924
5	0,5	0	146	0,10	58320	9103	6627	26992
6	10	0	146	0,11	62525	10341	7320	28289
7	0,5	70	146	0,51	63498	18326	8128	15152
8	10	70	146	0,53	63151	22987	5754	13161
9	0,5	35	116	0,24	67079	9312	8736	30197
10	10	35	116	0,17	64950	10861	7281	29577
11	0,9	0	116	0,08	61300	9587	6371	2928
12	0,9	70	116	0,28	59910	21000	3828	14621
13	0,9	35	85	0,16	70430	9061	6759	35853
14	0,9	35	146	0,23	65565	9412	7882	30388
15	0,9	35	116	0,22	74263	10841	8157	35284
16	0,9	35	116	0,23	74562	12325	9339	31872
17	0,9	35	116	0,23	65805,1	8278	7242	32947
18	0,9	35	116	0,24	65546	7705	7465	33564



**Figura 34.** Cromatograma típico obtenido por GC-MS del AE de *Lippia origanoides*, obtenido por el método de arrastre con vapor. Columna DB-5MS (60 m). Split 1:30. MSD (EI, 70 eV). Istd (*n*-tetradecano).

**Tabla 15.** Cantidad relativa (%) e identificación de los principales compuestos encontrados en el aceite esencial de *Lippia origanoides* obtenidos por el método de arrastre con vapor.

N° pico <sup>a</sup>	t <sub>R</sub> , min	IRL <sup>b</sup>	IRL <sup>c</sup>	Compuesto	GC área, %
1	19,0	928	924	α-Tujeno	1.1
2	19,4	937	932	α-Pineno	0.5
3	21,4	980	974	1-Octen-3-ol	0.2
4	21,8	990	988	β-Mirceno	2.5
5	23,1	1020	1014	α-Terpineno	1.6
<b>6</b>	<b>23,5</b>	<b>1031</b>	<b>1020</b>	<b>p-Cimeno</b>	<b>13.6</b>
7	23,6	1034	1024	Limoneno	0.5
8	23,8	1038	1026	Eucaliptol (1,8-Cineol)	0.5
<b>9</b>	<b>25,0</b>	<b>1063</b>	<b>1054</b>	<b>γ-Terpineno</b>	<b>8.7</b>
10	25,4	1075	1065	cis-Hidrato de sabineno	0.4
11	26,5	1102	1095	Linalol	0.2
12	29,9	1188	1174	Terpinen-4-ol	0.9
13	31,6	1232	1232	Metil-timil-éter	1.3

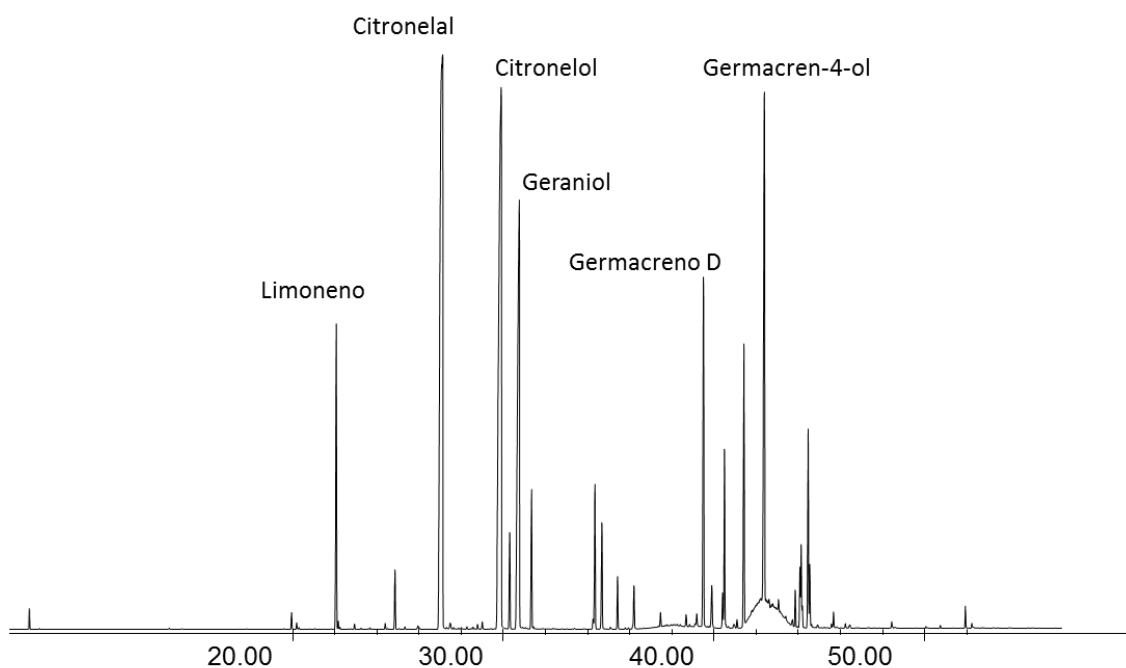
Continuación, **Tabla 15.**

Nº pico <sup>a</sup>	t <sub>R</sub> , min	IRL <sup>b</sup>	IRL <sup>c</sup>	Compuesto	GC área, %
14	31,9	1242	1241	Metil-carvacril-éter	0.3
15	33,9	1296	1289	Timol	9.6
16	34,3	1302	1298	Carvacrol	42.5
17	39,1	1434	1417	<i>trans</i> -β-Cariofileno	5.0
18	40,3	1469	1452	α-Humuleno	2.9
19	44,3	1598	1582	Óxido de cariofileno	1.1

<sup>a</sup> Número de pico en la **Figura 34.**

<sup>b</sup> Índices de retención lineales determinados experimentalmente en la columna DB-5MS.

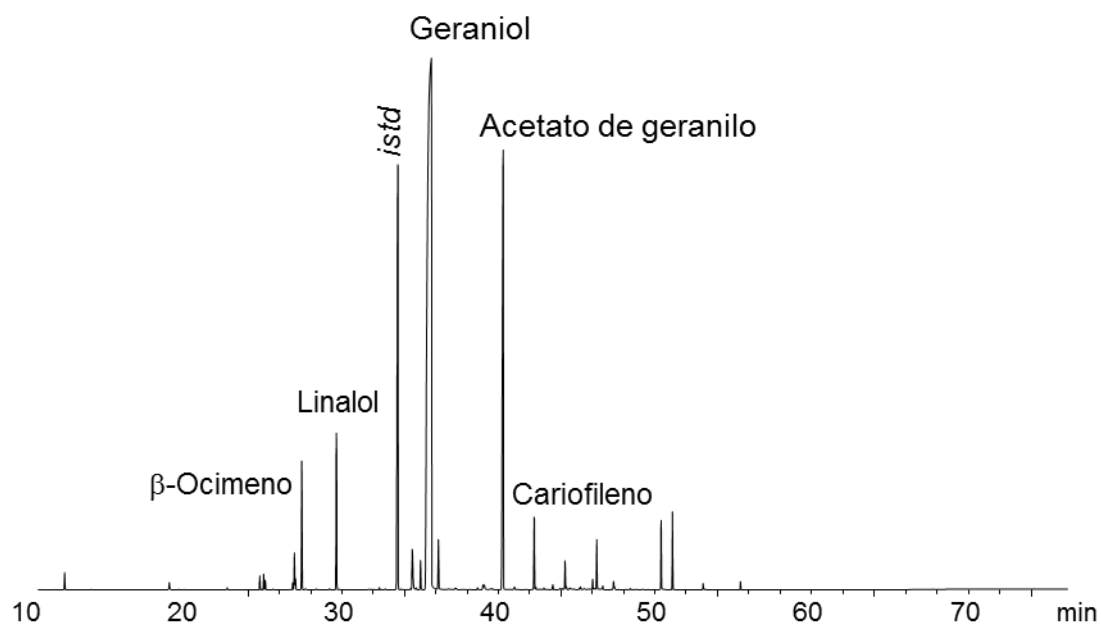
<sup>c</sup> Índices de retención lineales de la literatura [32].



**Figura 35.** Cromatograma típico obtenido por GC-MS del AE de *Cymbopogon nardus*, obtenido por el método de arrastre con vapor. Columna DB-5MS (60 m). *Split* 1:30. MSD (EI, 70 eV).

**Tabla 16.** Cantidad relativa (%) e identificación de los principales compuestos encontrados en el aceite esencial de *Cymbopogon nardus* obtenidos por el método de arrastre con vapor.

N° pico <sup>a</sup>	t <sub>R</sub> , min	IRL <sup>b</sup>	IRL <sup>c</sup>	Compuesto	GC área, %
1	20,20	989	988	β-Mirceno	0,07
<b>2</b>	<b>22,08</b>	<b>1034</b>	<b>1024</b>	<b>Limoneno</b>	<b>3,8</b>
3	24,86	1100	1095	Linalol	0,7
<b>4</b>	<b>27,14</b>	<b>1159</b>	<b>1148</b>	<b>Citronelal</b>	<b>28,2</b>
<b>5</b>	<b>29,87</b>	<b>1230</b>	<b>1223</b>	<b>Citronelol</b>	<b>17,1</b>
6	30,28	1241	1235	Neral	0,2
<b>7</b>	<b>30,74</b>	<b>1254</b>	<b>1249</b>	<b>Geraniol</b>	<b>11,7</b>
8	31,31	1269	1269	Geranial	0,30
9	34,34	1350	1350	Acetato de citronelilo	2,5
10	34,67	1358	1356	Eugenol	1,5
11	35,41	1377	1379	Acetato de geranilo	0,9
12	36,19	1397	1389	β-Elemeno	0,6
<b>13</b>	<b>39,48</b>	<b>1495</b>	<b>1484</b>	<b>Germacreno D</b>	<b>4,4</b>
14	39,88	1508	1500	α-Muuroleno	0,6
15	40,39	1526	1513	γ-Cadineno	0,4
16	40,48	1529	1522	δ-Cadineno	1,9
17	40,94	1544	1345	α-Cubebeno	0,07
18	41,40	1560	1548	Elemol	6,2
<b>19</b>	<b>42,37</b>	<b>1593</b>	<b>1574</b>	<b>Germacren-4-ol</b>	<b>8,8</b>
20	43,84	1648	1630	γ-Eudesmol	0,3
21	44,06	1656	1638	<i>epi</i> -α-Cadinol	0,6
22	44,12	1658	1640	<i>epi</i> -α-Muurolol	1,0
23	44,45	1671	1652	α-Cadinol	1,9
24	44,53	1674	1652	α-Eudesmol	0,5



**Figura 36.** Cromatograma típico obtenido por GC-MS del AE de *Cymbopogon martinii*, obtenido por el método de arrastre con vapor. Columna DB-5MS (60 m). Split 1:30. MSD (EI, 70 eV). Istd (*n*-dodecano).

**Tabla 17.** Cantidad relativa (%) e identificación de los principales compuestos encontrados en el aceite esencial de *Cymbopogon martinii* obtenidos por el método de arrastre con vapor.

N° pico <sup>a</sup>	t <sub>R</sub> , min	IRL <sup>b</sup>	IRL <sup>c</sup>	Compuesto	GC área, %
1	20,76	983	981	6-Metil-5-hepten-2-ona	0,3
2	21,01	988	988	β-Mirceno	0,3
3	21,11	991	989	6-Metil-5-hepten-2-ol	0,2
4	22,87	1032	1024	Limoneno	0,1
5	22,98	1035	1032	<i>cis</i> -β-Ocimeno	0,6
6	23,05	1037	1026	1,8-Cineol	0,2

Continuación, **Tabla 17.**

N° pico <sup>a</sup>	t <sub>R</sub> , min	IRL <sup>b</sup>	IRL <sup>c</sup>	Compuesto	GC área, %
7	23,45	1046	1044	<i>trans</i> -β-Ocimeno	2,3
<b>8</b>	<b>25,67</b>	<b>1099</b>	<b>1095</b>	<b>Linalol</b>	<b>3,1</b>
9	30,51	1224	1227	Nerol	1,2
10	31,04	1238	1235	Neral	0,5
<b>11</b>	<b>31,73</b>	<b>1256</b>	<b>1249</b>	<b>Geraniol</b>	<b>62,8</b>
12	32,19	1268	1269	Geranial	1,0
<b>13</b>	<b>36,32</b>	<b>1378</b>	<b>1379</b>	<b>Acetato de geranilo</b>	<b>13,3</b>
14	38,31	1435	1417	<i>trans</i> -β-Cariofileno	1,3
15	40,28	1494	1484	Germacreno D	0,5
16	42,31	1563	1561	Nerolidol	0,9

En el aceite esencial de orégano de monte (*L. origanoides*), se identificaron 19 componentes mayoritarios (>0.2%), entre ellos, carvacrol (43%), timol (9.6%), γ-terpineno (8.7%) y *p*-cimeno (13.6%). El alto contenido de carvacrol en este AE, determina su posible aplicación, ya que este componente es empleado como agente antifúngico para varias formulaciones [50, 56, 58]. En el aceite esencial de citronela, se identificaron como componentes principales el citronelal (28%), citronelol (17%) y geraniol (12%). Con base en esta composición, se puede indicar que es del tipo citronela originaria de Java, cuyo contenidos de citronelal y geraniol varían entre el 25 al 40% y 20 y 25%, respectivamente (Norma ISO 3848).

En el aceite esencial de palmarrosa (*C. martinii*), se identificaron 16 compuestos, mayoritarios. El componente principal fue el geraniol (63%) seguido del acetato de geranilo (13%). El contenido de geraniol para esta especie fue inferior al rango reportado para las plantas que crecen en la India, cuyo valor mínimo es del 74% (Norma ISO-4727).

**Tabla 18.** Áreas cromatográficas totales y áreas cromatográficas de los compuestos mayoritarios obtenidas mediante el análisis por GC-FID en los experimentos según el diseño experimental para la especie *Lippia origanoides*.

Exp.	Tamaño partícula, cm	Presión del vapor, psi	Densidad, kg/m <sup>3</sup>	Rendimiento de extracción, %(p/p)	Área cromatográfica, cuentas				
					Total	p-Cimeno	γ-Terpineno	Timol	Carvacrol
1	0.5	50	200	<b>1,84</b>	13982306390	150638535	98837990	1790529795	7497304131
2	30	50	200	<b>1,24</b>	6803465970	897063588	515455397	690028673	2858467655
3	0.5	110	200	<b>0,85</b>	13446617838	1238419778	862922855	1667818596	5537939053
4	30	110	200	<b>1,42</b>	8676620150	1034518234	735044795	874069265	3502574612
5	0.5	50	240	<b>1,67</b>	6061362943	529424555	310887686	696941832	3068446663
6	30	50	240	<b>1,31</b>	4633095091	601036080	424277553	405288200	2081300198
7	0.5	110	240	<b>1,10</b>	8439059254	910585153	601972089	930381688	3656207422
8	30	110	240	<b>1,11</b>	5989697253	907755624	685282695	515340134	2307134745
9	0.5	80	220	<b>1,31</b>	3925112993	576280106	381380990	376436247	1755210236
10	30	80	220	<b>1,57</b>	16564153393	1625329287	1,155E+09	2091874421	6133623210
11	0.9	50	220	<b>1,17</b>	6382779470	784890736	519733814	661262578	2782695625
12	0.9	110	220	<b>1,29</b>	10183084502	950943060	671588174	1186756186	4356144750
13	0.9	80	200	<b>1,30</b>	7227082543	618090259	416895458	859844295	3353528254
14	0.9	80	240	<b>1,33</b>	4527537999	629320310	396063966	373268121	2115136147
15	0.9	80	220	<b>1,40</b>	2145516926	329530667	211636065	194618192	1022397770
16	0.9	80	220	<b>1,43</b>	9310167279	943486450	619517807	1031064754	3906977472
17	0.9	80	220	<b>0,89</b>	11134639876	1349076923	880411640	1112989265	4461762954
18	0.9	80	220	<b>0,99</b>	4557682960	765677719	470076939	381225642	1834721050

**Tabla 19.** Áreas cromatográficas totales y áreas cromatográficas de los compuestos mayoritarios obtenidas mediante el análisis por GC-FID en los experimentos según el diseño experimental para la especie *Cymbopogon nardus*.

Exp.	Tamaño partícula, cm	Presión del vapor, psi	Densidad, kg/m <sup>3</sup>	Rendimiento de extracción, %(p/p)	Área cromatográfica, cuentas				
					Total	Citronelal	Citronelol	Geraniol	Germacren-4-ol
1	0.5	50	200	<b>0,46</b>	26697970001	3826464560	4717652143	2536330111	5197896117
2	30	50	200	<b>0,33</b>	30643664972	4939875819	5337598504	3447923464	4812232920
3	0.5	110	200	<b>0,33</b>	34301499214	3851080910	5366764380	3122427249	6268748713
4	30	110	200	<b>0,38</b>	19054905322	4559226535	3340073710	2042764385	2599314839
5	0.5	50	240	<b>0,28</b>	18099953392	2062912430	3688231450	1580120441	3384598381
6	30	50	240	<b>0,34</b>	14686851278	3341200619	2909352922	1646906730	2081262762
7	0.5	110	240	<b>0,31</b>	29304569890	3882989656	5322870501	2807578292	3252493197
8	30	110	240	<b>0,36</b>	19465483352	4642825460	3459452681	2056648695	3026987015
9	0.5	80	220	<b>0,47</b>	26498881077	5184069251	5318086279	2774357669	3428007963
10	30	80	220	<b>0,31</b>	15665218063	4302075976	2613938629	1786863335	1809226037
11	0.9	50	220	<b>0,34</b>	22809821988	3226153154	3914513602	2172256547	3354214478
12	0.9	110	220	<b>0,29</b>	28056574671	4478672147	4592717705	2886476265	3772545553
13	0.9	80	200	<b>0,35</b>	24124834105	3203900134	3439650503	1800470821	4748183300
14	0.9	80	240	<b>0,37</b>	13087572687	2331380345	2401448993	1243241716	2383703967
15	0.9	80	220	<b>0,55</b>	23432833823	4852279667	4043416790	2530398537	2077840855
16	0.9	80	220	<b>0,53</b>	15740673044	3409691950	3023591539	1697889329	2048732439
17	0.9	80	220	<b>0,55</b>	21067975395	4751095214	3972728320	2454031981	1997857741
18	0.9	80	220	<b>0,43</b>	13081579022	2482849641	2439633330	1269428202	1643839226

**Tabla 20.** Áreas cromatográficas totales y áreas cromatográficas de los compuestos mayoritarios obtenidas mediante el análisis por GC-FID en los experimentos según el diseño experimental para la especie *Cymbopogon martinii*.

Exp.	Tamaño partícula, cm	Presión del vapor, psi	Densidad, kg/m <sup>3</sup>	Rendimiento de extracción, %(p/p)	Total	Área cromatográfica, cuentas	
						Geraniol	Acetato de geraniol
1	0.5	50	200	<b>0,21</b>	43434,8	27097,2	8000,0
2	30	50	200	<b>0,22</b>	49548,0	30269,6	7564,9
3	0.5	110	200	<b>0,25</b>	61729,6	30903,9	6489,1
4	30	110	200	<b>0,26</b>	63517,7	33590,3	7894,7
5	0.5	50	240	<b>0,26</b>	78319,5	48064,6	7954,3
6	30	50	240	<b>0,28</b>	82524,9	55218,7	8897,9
7	0.5	110	240	<b>0,26</b>	73498,2	53033,7	6812,8
8	30	110	240	<b>0,32</b>	93150,6	65100,7	9873,4
9	0.5	80	220	<b>0,25</b>	67079,1	43659,6	8001,0
10	30	80	220	<b>0,26</b>	64950,2	44494,6	7000,0
11	0.9	50	220	<b>0,26</b>	61299,8	40910,1	6500,0
12	0.9	110	220	<b>0,30</b>	59909,8	36231,2	8214,7
13	0.9	80	200	<b>0,28</b>	70429,5	39903,0	7958,9
14	0.9	80	240	<b>0,33</b>	95565,0	69355,5	9971,9
15	0.9	80	220	<b>0,29</b>	94262,9	56177,7	9895,0
16	0.9	80	220	<b>0,29</b>	74561,8	56940,1	10150,0
17	0.9	80	220	<b>0,22</b>	65805,1	37095,9	11258,0
18	0.9	80	220	<b>0,31</b>	75546,2	52972,3	11945,4

**3.5. Evaluación de los parámetros de extracción de los aceites esenciales de *Thymus vulgaris*, *Lippia origanoides*, *Cymbopogon nardus* y *Cymbopogon martinii*, obtenidos por el método de arrastre con vapor.**

Los resultados, al aplicar los diseños factoriales a la extracción de los aceites esenciales de las cuatro especies bajo estudio, para evaluar la eficiencia de la extracción y calidad del aceite (cantidad del AE y concentración de los componentes mayoritarios), se presentan en las **Tablas 21 a 24**. El observable empleado, para cada caso, fue el resultado de multiplicar la cantidad de AE ( $W_{AE}$ , kg) obtenido por lote de destilación en un alambique con capacidad de  $1 \text{ m}^3$ , por la sumatoria de las áreas cromatográficas de los componentes mayoritarios ( $A_{CM}$ ) presentes en los aceites esenciales, a saber: *Thymus vulgaris* (timol,  $\gamma$ -terpineno y *p*-cimeno); *Lippia origanoides* (carvacrol, timol,  $\gamma$ -terpineno); *Cymbopogon nardus* (citronelal, citronelol, geraniol); *Cymbopogon martinii* (geraniol, acetato de geranilo), calculados con base en la integración de sus respectivos picos cromatográficos. Se empleó el método de normalización de máximos y mínimos

**Tabla 21.** Resultados obtenidos al aplicar el diseño factorial  $2^3$  extendido al estudio del proceso de extracción de aceites esenciales de la especie *Thymus vulgaris* L. Datos del observable normalizados.

Exp.	Tamaño partícula, cm	Humedad retirada, %	Densidad, $\text{kg/m}^3$	Respuesta $W_{AE} * A_{CM}$
1	0,5	0	85	-0,235
2	10	0	85	-0,2477
3	0,5	70	85	-0,1459
4	10	70	85	-0,1731
5	0,5	0	146	-0,2117
6	10	0	146	-0,1954
7	0,5	70	146	0,1785
8	10	70	146	0,1909
9	0,5	35	116	-0,1057

Continuación, **Tabla 21.**

Exp.	Tamaño partícula, cm	Humedad retirada, %	Densidad, kg/m <sup>3</sup>	Respuesta W <sub>AE</sub> * A <sub>CM</sub>
10	10	35	116	-0,1659
11	0,9	0	116	-0,2367
12	0,9	70	116	-0,1033
13	0,9	35	85	-0,1987
14	0,9	35	146	-0,0747
15	0,9	35	116	-0,107
16	0,9	35	116	-0,0944
17	0,9	35	116	-0,1216
18	0,9	35	115,5	-0,113

**Tabla 22.** Resultados obtenidos al aplicar el diseño factorial 2<sup>3</sup> extendido al estudio del proceso de extracción del aceite esencial de la especie *Lippia organoides*. Datos del observable normalizados.

Exp.	Tamaño partícula, cm	Presión del vapor, psi	Densidad, kg/m <sup>3</sup>	Respuesta W <sub>AE</sub> * A <sub>CM</sub>
1	0.5	50	200	0,311560955
2	30	50	200	-0,146703833
3	0.5	110	200	-0,496857581
4	30	110	200	-0,010637826
5	0.5	50	240	0,503142418
6	30	50	240	0,157348582
7	0.5	110	240	-0,084582652
8	30	110	240	-0,069638181
9	0.5	80	220	0,040694377
10	30	80	220	0,199458387
11	0.9	50	220	-0,104486362
12	0.9	110	220	-0,015239738
13	0.9	80	200	-0,101836588
14	0.9	80	240	0,183168537
15	0.9	80	220	0,156528353
16	0.9	80	220	0,116031028
17	0.9	80	220	0,178891482
18	0.9	80	220	0,160851304

**Tabla 23.** Resultados obtenidos al aplicar el diseño factorial  $2^3$  extendido al estudio del proceso de extracción del aceite esencial de la especie *Cymbopogon nardus*. Datos del observable normalizados.

Exp.	Tamaño partícula, cm	Presión del vapor, psi	Densidad, kg/m <sup>3</sup>	Respuesta $W_{AE} * A_{CM}$
1	0.5	50	200	0,22097677
2	30	50	200	0,40697228
3	0.5	110	200	0,57939836
4	30	110	200	-0,13930847
5	0.5	50	320	-0,18432380
6	30	50	320	-0,39604719
7	0.5	110	320	0,34384888
8	30	110	320	-0,11995429
9	0.5	80	260	0,21159195
10	30	80	260	-0,29909441
11	0.9	50	260	0,03769397
12	0.9	110	260	0,28501983
13	0.9	80	200	0,09968212
14	0.9	80	320	-0,42060164
15	0.9	80	260	0,06706203
16	0.9	80	260	0,03443437
17	0.9	80	260	-0,04441467
18	0.9	80	260	-0,04377341

**Tabla 24.** Resultados obtenidos al aplicar el diseño factorial  $2^3$  extendido al estudio del proceso de extracción del aceite esencial de la especie *Cymbopogon martinii*. Datos del observable normalizados.

Exp.	Tamaño partícula, cm	Presión del vapor, psi	Densidad, kg/m <sup>3</sup>	Respuesta $W_{AE} * A_{CM}$
1	0.5	50	200	-0,44642331
2	30	50	200	-0,43363220
3	0.5	110	200	-0,32992913
4	30	110	200	-0,28521312

Continuación, **Tabla 24.**

Exp.	Tamaño partícula, cm	Presión del vapor, psi	Densidad, kg/m <sup>3</sup>	Respuesta W <sub>AE</sub> * A <sub>CM</sub>
5	0.5	50	320	0,18307869
6	30	50	320	0,27661231
7	0.5	110	320	0,20058453
8	30	110	320	0,51086921
9	0.5	80	260	-0,09170804
10	30	80	260	-0,03749385
11	0.9	50	260	-0,06552856
12	0.9	110	260	0,09986252
13	0.9	80	200	-0,22538036
14	0.9	80	320	0,55357669
15	0.9	80	260	0,07574442
16	0.9	80	260	0,08715070
17	0.9	80	260	-0,22988896
18	0.9	80	260	0,15771847

El análisis de varianza ANOVA para los observables calculados, permitió evaluar estadísticamente la significancia de las variables bajo estudio, para cada especie, a saber: tamaño de partícula (cm), humedad retirada (% p/p), presión de vapor (psi) y densidad de carga (kg/m<sup>3</sup>). En las **Tablas 25 a 28** se presentan los resultados de las variables que fueron factores, al compararlos con el valor de F umbral.

El valor crítico del parámetro **F** para 1 y 4 grados de libertad con un nivel de probabilidad P=0.05, fue de **7,71**. Para la posterior evaluación de los modelos que explicaran el comportamiento del rendimiento y composición química mayoritaria de los aceites esenciales, se tomaron en cuenta las variables independientes y sus combinaciones, que presentaron un cociente F por encima del valor umbral. Estas variables fueron las que presentaron un mayor efecto sobre el observable medido (cantidad de AE, kg y área cromatográfica, cuentas, de los componentes mayoritarios).

**Tabla 25.** Análisis de varianza para la respuesta del diseño experimental implementado al estudio de la extracción del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L., por el método de arrastre con vapor.

Fuente de variación	Cociente*	Efecto
Tamaño de partícula, cm	0,2	NO
Humedad retirada, %	1129,2	SI
Densidad de carga, kg/m <sup>3</sup>	745,7	SI
Tamaño x humedad retirada	0,4	NO
Tamaño x densidad	6	NO
Humedad retirada x densidad	479,6	SI
Tamaño x humedad retirada x densidad	0,1	NO

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

Tal como se aprecia en la **Tabla 25**, para el caso de la especie *Thymus vulgaris* L., se concluye que solamente los efectos de la humedad retirada (% p/p) y la densidad de carga (kg/m<sup>3</sup>) resultaron significativos, así como la interacción entre la humedad retirada y la densidad de carga.

**Tabla 26.** Análisis de varianza para la respuesta del diseño experimental implementado al estudio de la extracción del aceite esencial de *Lippia origanoides* L., por el método de arrastre con vapor.

Fuente de variación	Cociente*	Efecto
Tamaño de partícula, cm	2,16	NO
Presión del vapor, psi	523,10	SI
Densidad de carga, kg/m <sup>3</sup>	171,03	SI
Tamaño x presión del vapor	404,03	SI
Tamaño x densidad	4,73	NO
Presión del vapor x densidad	519,59	SI
Tamaño x presión del vapor x densidad	80,45	SI

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

**Tabla 27.** Análisis de varianza para la respuesta del diseño experimental implementado al estudio de la extracción del aceite esencial de *Cymbopogon nardus* L., por el método de arrastre con vapor.

Fuente de variación	Cociente*	Efecto
Tamaño de partícula, cm	76,61	SI
Presión del vapor, psi	19,93	SI
Densidad de carga, kg/m <sup>3</sup>	106,5	SI
Tamaño x presión del vapor	70,22	SI
Tamaño x densidad	1,07	NO
Presión del vapor x densidad	145,30	SI
Tamaño x presión del vapor x densidad	22,35	SI

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

**Tabla 28.** Análisis de varianza para la respuesta del diseño experimental implementado al estudio de la extracción del aceite esencial de *Cymbopogon martinii*, por el método de arrastre con vapor.

Fuente de variación	Cociente*	Efecto
Tamaño de partícula, cm	20,24	SI
Presión del vapor, psi	25,38	SI
Densidad de carga, kg/m <sup>3</sup>	676,10	SI
Tamaño x presión del vapor	11,40	NO
Tamaño x densidad	5,88	SI
Presión del vapor x densidad	20,55	SI
Tamaño x presión del vapor x densidad	3,24	NO

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

Para el caso de las especies *Cymbopogon nardus* y *C. martinii*, se concluye que las tres variables estudiadas, presión del vapor generado en la caldera, densidad de carga y el tamaño del material vegetal, resultaron significativos, así como sus interacciones, a excepción de la interacción tamaño de partícula y densidad,

probablemente, debido a que se pueden considerar redundantes, en el sentido que al obtener un menor tamaño de partícula, se puede lograr una mayor densidad de carga en el alambique.

Se emplearon los factores hallados para la construcción de diferentes modelos matemáticos, que predijeran el mejor producto  $W_{AE} \cdot A_{cm}$ , del rendimiento y la composición química de los aceites esenciales bajo estudio.

### 3.5.1. Determinación de las mejores condiciones para la extracción de los aceites esenciales de *Thymus vulgaris*, *Lippia origanoides*, *Cymbopogon nardus* y *Cymbopogon martinii* por el método de arrastre con vapor.

En la **Tabla 29** se presentan las ecuaciones evaluadas en la optimización del proceso de extracción del aceite esencial de tomillo, por el método de arrastre con vapor, así como los valores del  $R^2$  estadístico ajustado y el error propio del modelo LOF (*lack of fit*, falta de ajuste) calculados.

**Tabla 29.** Ecuaciones obtenidas en el proceso de optimización de las variables del proceso de extracción y manejo postcosecha del aceite esencial de tomillo.

<i>Thymus vulgaris</i> (tomillo)			
Ecuación N°	Ecuación	$R^2$	LOF, %
<b>2</b>	<b><math>y = b_0 + B + C + BC + B^2 + C^2 + B^2C^2</math></b>	<b>0.92</b>	<b>4</b>
3	$y = b_0 + B + C$	0,51	14
4	$y = b_0 + B + C + AC + BC$	0.66	21
5	$y = b_0 + B + C + BC + B^2$	0.41	19

Continuación, **Tabla 29**.

<b><i>Thymus vulgaris</i> (tomillo)</b>			
<b>6</b>	$y = b_0 + B + C + BC + C^2$	0.55	20
<b>7</b>	$y = b_0 + B + C + C^2$	0.61	25
<b>8</b>	$y = b_0 + B + C + B^2$	0.55	20
<b>9</b>	$y = b_0 + B + C + BC + B^2 + C^2$	0.63	20
<b>10</b>	$y = b_0 + B + C + BC + B^2 C^2$	0.54	30
<b>11</b>	$y = b_0 + B + C + B^2 C^2$	0.77	18

**B:** % Humedad retirada (p/p); **C:** Densidad de carga (kg/m<sup>3</sup>)

De acuerdo con los resultados obtenidos en la evaluación del modelo polinómico para la optimización del método de extracción por arrastre con vapor del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L., la **Ecuación N° 2** presentó el valor de R<sup>2</sup> estadístico más alto ajustado. De esta manera, 92% de la variabilidad correspondió a las áreas cromatográficas de los componentes mayoritarios del aceite esencial y a su rendimiento de extracción.

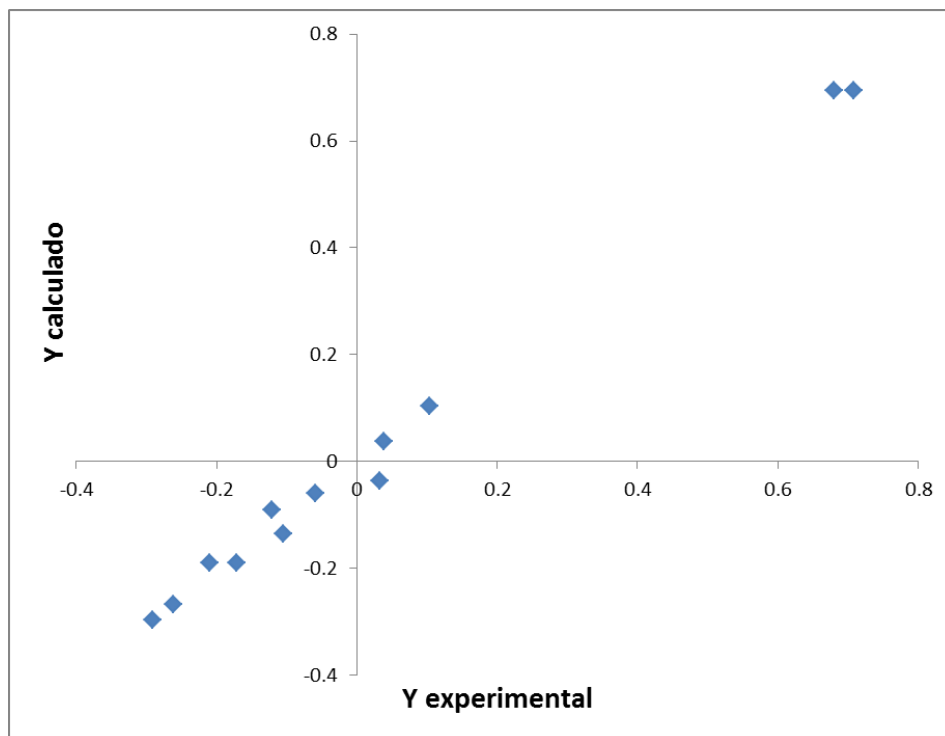
La **Ecuación N° 2** se validó con valores diferentes a los utilizados en el diseño experimental. En la **Tabla 30** se presentan los niveles evaluados, las respuestas experimental ( $W_{AE} * A_{cm}$ ) y calculada por el modelo matemático planteado. En la **Figura 37** se muestran los valores calculados para los modelos obtenidos, respecto a la respuesta experimental producida en la extracción de aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. por el método de arrastre con vapor.

En la **Tabla 31** se presentan los valores de los coeficientes obtenidos para las variables descritas en la **Ecuación N° 2**, necesarios para encontrar las condiciones óptimas de extracción de aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. por el método de arrastre con vapor. Los valores óptimos encontrados para cada variable se presentan en la **Tabla 32**.

**Tabla 30.** Datos de validación del modelo matemático obtenido para la extracción del aceite esencial de *Thymus vulgaris* por el método de arrastre con vapor.

$$y = b_0 + b_1B + b_2C + b_3B \times C + b_4B^2 + b_5C^2 + b_6B^2C^2$$

Tamaño, cm	Humedad retirada, %(p/p)	Densidad de carga, kg/m <sup>3</sup>	Respuesta calculada normalizada	Respuesta experimental normalizada	Error, %
9,0	70	107,0	0,31676582	0,35168821	9,9
9,0	70	153,0	0,05150011	0,05578639	7,7
9,0	0	115,5	0,49769488	0,46601985	6,8
9,0	35	85,0	0,37217402	0,35938039	3,6



**Figura 37.** Respuesta experimental ( $W_{AE} * A_{cm}$ ) para la extracción del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. por el método de arrastre con vapor Vs los valores obtenidos según el modelo matemático, al aplicar el diseño factorial (**Ecuación No 2**).

**Tabla 31.** Coeficientes de la ecuación polinómica ajustada al modelo matemático para las variables de humedad retirada (% p/p) y densidad de carga (kg/m<sup>3</sup>), en la extracción del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. por el método de arrastre con vapor.

Variable	Coefficiente
<b>B: Humedad retirada, %</b>	0,4895
<b>C: Densidad de carga, kg/m<sup>3</sup></b>	0,4049
<b>BC</b>	0,7138
<b>C<sup>2</sup></b>	-0,4777
<b>B<sup>2</sup></b>	-0,1742
<b>B<sup>2</sup>C<sup>2</sup></b>	3,4848
<b>b<sub>0</sub>, constante</b>	<b>-0,0152</b>

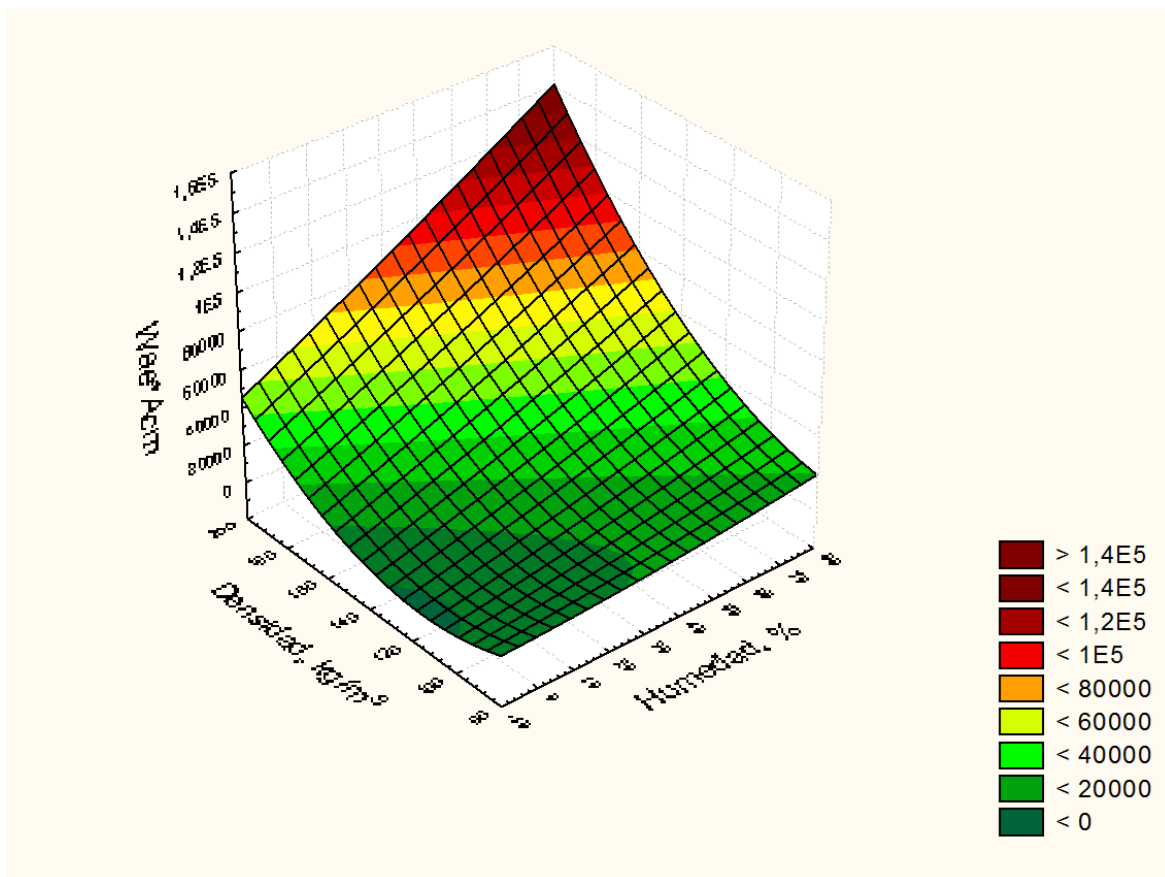
**Tabla 32.** Valores óptimos de las variables empleadas en el proceso de extracción del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. por el método de arrastre con vapor.

$$y = b_0 + b_1B + b_2C + b_3B \times C + b_4B^2 + b_5C^2 + b_6B^2C^2$$

Tamaño de partícula, cm	Humedad retirada, %	Densidad de carga, kg/m <sup>3</sup>	Respuesta , W <sub>AE</sub> * A <sub>cm</sub>
<b>10</b>	<b>30</b>	<b>192</b>	<b>0,75226</b>

Las variables que más influyeron sobre la respuesta en la producción del AE de tomillo, con alto contenido de timol, fueron el contenido de agua en el material vegetal y la densidad de carga en el alambique. Bajo las condiciones optimizadas fue posible obtener 0.46 kg de AE de tomillo por metro cúbico de destilación (0.25% p/p), con un porcentaje de timol del 64.2%. En la **Figura 38**, se presenta la superficie de respuesta del observable medido para la extracción del AE de tomillo. Se observa que el valor obtenido como óptimo, se encuentra dentro del área, que presenta lo mayores valores de cantidad de AE, kg y área cromatográfica de los compuestos timol,  $\gamma$ -terpineno y *p*-cimeno.

Los resultados obtenidos son similares con los reportados por Hassanali y colaboradores [85], quienes reportaron contenidos de timol en el AE de *T. vulgaris* del 50%, con rendimientos de extracción de 0.5%p/p a partir de material vegetal en estado de floración.



**Figura 38.** Superficie de respuesta para el efecto de la densidad de carga en el alambique (kg/m<sup>3</sup>) y el porcentaje de humedad del material vegetal de tomillo, sobre la cantidad de AE (kg) y área cromatográfica total de los compuestos timol,  $\gamma$ -terpineno y *p*-cimeno.

Análogamente, para la obtención y validación de los modelos matemáticos que explicaron el comportamiento de la especie *L. origanoides*, *C. nardus* y *C. martinii*, se obtuvieron al menos diez ecuaciones en cada caso. En la **Tabla 33** se presentan las mejores ecuaciones obtenidas en la modelación del proceso de extracción de los aceites esenciales, por el método de arrastre con vapor, para estas tres especies. También se presentan los valores del  $R^2$  estadístico ajustado y el error propio del modelo LOF (*lack of fit*, falta de ajuste) calculados.

**Tabla 33.** Mejores ecuaciones obtenidas como modelos para el proceso de extracción y manejo postcosecha de los aceites esenciales de orégano de monte, citronela y palmarrosa.

<b><i>Lippia origanoides</i> (orégano de monte)</b>			
<b>Ecuación N°</b>	<b>Ecuación</b>	<b><math>R^2</math></b>	<b>LOF, %</b>
<b>12</b>	$y = b_0 + B + C + AB + B^2 + C^2$	0.93	2
<b><i>Cymbopogon nardus</i> (citronela)</b>			
<b>13</b>	$y = b_0 + A + B + C + AB + AC + A^2$	0.96	2
<b><i>Cymbopogon martinii</i> (palmarrosa)</b>			
<b>14</b>	$y = b_0 + A + B + C + A^2 + B^2 + C^2$	0.97	3

**A:** Tamaño de partícula (cm); **B:** Presión de vapor (psi); **C:** Densidad de carga ( $\text{kg/m}^3$ )

Los mejores modelos polinómicos (**Ecuaciones 12-14**) que explicaron el comportamiento de la extracción de los aceites esenciales de *L. origanoides*, *C. nardus* y *C. martinii*, presentaron valores de  $R^2$  estadísticos altos, los cuales explicaron la variabilidad de las áreas cromatográficas de los componentes mayoritarios de las aceites esenciales y el rendimiento de extracción, en porcentajes del 93, 96 y 97%, respectivamente. El buen ajuste de los modelos propuestos, se vio reflejado en un bajo porcentaje de error propio del modelo LOF (*lack of fit*, falta de ajuste), que en todos los casos estuvo por debajo del 5%.

Las **Ecuaciones 12 a 14**, se validaron con valores diferentes a los descritos en los diseños experimentales para cada especie. En la **Tabla 34** se presentan los niveles evaluados, las respuestas experimental ( $W_{AE} * A_{cm}$ ) y calculada de cada modelo matemático planteado. En la **Figura 43** se presentan los valores calculados para el modelo obtenido, respecto a la respuesta experimental producida en la extracción del aceite esencial de *C. martinii* por el método de arrastre con vapor. Los resultados obtenidos muestran que el modelo propuesto representa bien el comportamiento de la producción de aceite esencial y el contenido de geraniol y acetato de geraniol, en función de las variables de estudio, dentro del rango evaluado.

En la **Tabla 35** se presentan los valores de los coeficientes obtenidos para las variables descritas en las **Ecuaciones 12 a 14**, necesarios para encontrar las condiciones óptimas de extracción de los aceites esenciales de *L. origanoides*, *C. nardus* y *C. martinii*, por el método de arrastre con vapor. Los valores óptimos encontrados para cada variable se presentan en la **Tabla 38**.

**Tabla 34.** Datos de validación de los modelos matemáticos obtenidos para la extracción de los aceites esenciales de *L. origanoides*, *C. nardus* y *C. martinii* por el método de arrastre con vapor.

<b><i>Lippia origanoides</i> (orégano de monte)</b>					
<b>Ecuación No. 12. <math>y = b_0+B+C+AB+B^2+C^2</math></b>					
<b>Tamaño, cm</b>	<b>Presión del vapor, psi</b>	<b>Densidad de carga, kg/m<sup>3</sup></b>	<b>Respuesta calculada normalizada</b>	<b>Respuesta experimental normalizada</b>	<b>Error, %</b>
9,0	100	250	0,013414691	0,0125214	7,1
9,0	90	250	0,117484845	0,1258794	6,7
9,0	80	250	0,22475782	0,2357891	4,7

Continuación, **Tabla 34.**

<b><i>Cymbopogon nardus</i> (citronela)</b>					
<b>Ecuación No. 13. <math>y = b_0 + A + B + C + AB + AC + A^2</math></b>					
<b>Tamaño, cm</b>	<b>Presión del vapor, psi</b>	<b>Densidad de carga, kg/m<sup>3</sup></b>	<b>Respuesta calculada normalizada</b>	<b>Respuesta experimental normalizada</b>	<b>Error, %</b>
1,5	80	367	-0,195252656	-0,18284023	6,8
30,0	80	320	-0,528517798	-0,55773158	5,2
0,9	80	230	0,020745792	0,02279101	9,0
<b><i>Cymbopogon martinii</i> (palmarrosa)</b>					
<b>Ecuación No. 14. <math>y = b_0 + A + B + C + A^2 + B^2 + C^2</math></b>					
<b>Tamaño, cm</b>	<b>Presión del vapor, psi</b>	<b>Densidad de carga, kg/m<sup>3</sup></b>	<b>Respuesta calculada normalizada</b>	<b>Respuesta experimental normalizada</b>	<b>Error, %</b>
0,9	80	310	0,48017052	0,484064147	<b>0.8</b>
0,9	80	317	0,11248748	0,117455104	<b>4.2</b>
0,9	80	328	0,45756085	0,431934762	<b>5.9</b>
0,9	80	277	-0,10592242	-0,107148458	<b>1.1</b>

Los modelos matemáticos evaluados permitieron predecir con un alto nivel de confianza, la cantidad y calidad de los aceites esenciales de orégano de monte, citronela y palmarrosa, en términos de la concentración de los componentes mayoritarios de sus aceites. Para el caso del orégano de monte, la mayor producción del AE, con el mayor contenido de carvacrol, se logró para el material vegetal picado a 0.8 cm, cargado al alambique con una densidad de 249 kg/m<sup>3</sup> y una presión del vapor de agua proveniente de la caldera, de 51 psi. Estos valores fueron corroborados experimentalmente, y se encontró la máxima respuesta del modelo, correspondió a un rendimiento de extracción del 2.0% y un porcentaje de

carvacrol de 65.7%, con una producción de 4.98 kg de aceite esencial por metro cúbico de destilación.

**Tabla 35.** Coeficientes de las ecuaciones polinómicas ajustadas a los modelos matemáticos para las variables de tamaño de picado (cm), presión del vapor (psi) y densidad de carga (kg/m<sup>3</sup>), en la extracción de los aceites esenciales de *L. origanoides*, *C. nardus* y *C. martinii* por el método de arrastre con vapor.

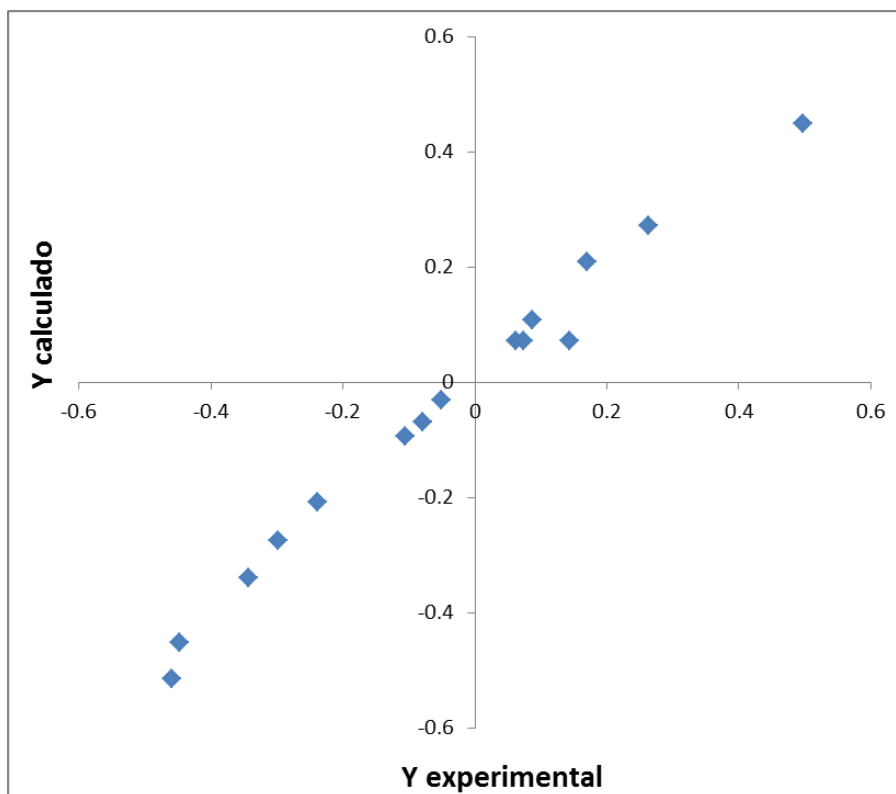
<b><i>Lippia origanoides</i></b>	
<b>Variable</b>	<b>Coefficiente</b>
<b>A: Tamaño de partícula, cm</b>	-0,4430
<b>B: Presión del vapor, psi</b>	0,3005
<b>C: Densidad de carga, kg/m<sup>3</sup></b>	0,8382
<b>AB</b>	0,0577
<b>B<sup>2</sup></b>	-0,3904
<b>C<sup>2</sup></b>	-0,4430
<b>b<sub>0</sub>; constante</b>	0,1580
<b><i>Cymbopogon nardus</i></b>	
<b>Variable</b>	<b>Coefficiente</b>
<b>A: Tamaño de partícula, cm</b>	-6,001
<b>B: Presión del vapor, psi</b>	-11,629
<b>C: Densidad de carga, kg/m<sup>3</sup></b>	-12,227
<b>AB</b>	-39,439
<b>AC</b>	-38,898
<b>A<sup>2</sup></b>	16,760
<b>b<sub>0</sub>; constante</b>	-3,203

Continuación, **Tabla 35.**

<b><i>Cymbopogon martinii</i></b>	
<b>Variable</b>	<b>Coefficiente</b>
<b>A: Tamaño de partícula, cm</b>	5,025
<b>B: Presión del vapor, psi</b>	0,176
<b>C: Densidad de carga, kg/m<sup>3</sup></b>	0,724
<b>AB</b>	-12,385
<b>AC</b>	-0,212
<b>A<sup>2</sup></b>	0,329
<b>b<sub>0</sub>; constante</b>	2,524

La citronela presentó el mejor rendimiento de extracción (0.66%), con el mayor contenido de citronelal (37.1%), citronelol (15.2%) y geraniol (20.6%), cuando el material vegetal fresco fue picado con un tamaño de 1.0 cm, una densidad de carga de 330 kg/m<sup>3</sup> y una presión del vapor a la entrada del alambique de 108 psi. Bajo estas condiciones de extracción, fue posible obtener 2.16 kg de aceite esencial por metro cúbico de destilación.

El modelo matemático evaluado para la especie palmarrosa, tuvo errores de predicción debajo del 6% (Véase **Figura 39**). Para esta especie, la mayor producción de AE con el mayor contenido de geraniol, se logró para el material vegetal picado a 0.5 cm, una densidad de carga en el alambique de 205 kg/m<sup>3</sup> y una presión del vapor inyectado al material vegetal de 50 psi. Bajo estas condiciones, fue posible obtener rendimientos de extracción del 0.52%, con una producción de 1.06 kg de aceite esencial por metro cúbico de destilado y un 77,5% de geraniol.



**Figura 39.** Respuesta experimental ( $W_{AE} * A_{cm}$ ) para la extracción del aceite esencial de *Cymbopogon martinii* por el método de arrastre con vapor Vs los valores obtenidos según el modelo matemático, al aplicar el diseño factorial (Ecuación No 14).

En la **Tabla 36**, se resumen los valores obtenidos para los puntos máximos de las ecuaciones que mejor describieron el comportamiento de la destilación de los aceites esenciales de *L. origanoides*, *C. nardus* y *C. martinii*, por el método de arrastre con vapor. También, se presentan las cantidades relativas (%), obtenidas de los compuestos mayoritarios en cada AE, obtenidas experimentalmente, mediante GC-MS.

**Tabla 36.** Valores de las variables empleadas en la extracción de los AE de *L. organoides*, *C. nardus* y *C. martinii* por el método de arrastre con vapor, que permitieron obtener los valores optimizados del observable.

<b><i>Lippia organoides</i></b>			
$y = b_0 + B + C + AB + B^2 + C^2$			
Tamaño de partícula, cm	Presión del vapor, psi	Densidad de carga, kg/m <sup>3</sup>	Respuesta, Respuesta $W_{AE} * A_{CM}$
0.5	51	250	0,57960100
Observables			
Rendimiento de extracción: 2.0%			
Compuestos mayoritarios: carvacrol (65.7%), timol (14.3%)			
<b><i>Cymbopogon nardus</i></b>			
$y = b_0 + A + B + C + AB + AC + A^2$			
Tamaño de partícula, cm	Presión del vapor, psi	Densidad de carga, kg/m <sup>3</sup>	Respuesta, Respuesta $W_{AE} * A_{CM}$
1.0	108	330	0,59112424
Observables			
Rendimiento de extracción: 0.66%			
Compuestos mayoritarios: citronelal (37%), citronelol (15.2%), geraniol (20.6%)			
<b><i>Cymbopogon martinii</i></b>			
$y = b_0 + A + B + C + A^2 + B^2 + C^2$			
Tamaño de partícula, cm	Presión del vapor, psi	Densidad de carga, kg/m <sup>3</sup>	Respuesta, Respuesta $W_{AE} * A_{CM}$
0.5	50	205	0,48651930
Observables			
Rendimiento de extracción: 0.52%			
Compuestos mayoritarios: geraniol (77.5%), acetato de geranilo (13.8%)			

Los modelos empíricos planteados para las cuatro especies bajo estudio, describieron bien el comportamiento de la cantidad de AE producido y el contenido de los componentes mayoritarios, en la extracción por arrastre con vapor. Sin embargo, no ofrecen información acerca de los mecanismos de transferencia de masa dentro del destilador. Estos mecanismos son complejos, ya que se incluyen efectos combinados de la **difusión, evaporación y convección** de los componentes que conforman el AE presentes en el material vegetal (MV). En una descripción general del proceso, el vapor caliente generado en la caldera debe llegar hasta los sacos (tricomas) que almacenan el AE dentro del material vegetal, debe vencer resistencias difusivas previas, para penetrar y salir de la matriz vegetal a través de los poros de la pared celular. Finalmente, los componentes del AE en fase vapor deben llegar hasta el tope de la columna transportados por la fuerza convectiva del vapor que asciende a través del lecho empacado de MV. Existen por lo menos, tres fenómenos controlantes del proceso de destilación de AE [16]: El primero, una vaporización del AE, en la interfase entre el MV y el vapor de agua. El segundo, la transferencia de masa por difusión, que se da en la interface entre la superficie del MV y el vapor de agua, creándose en ella un gradiente de concentración de los componentes del AE. Y el tercero, luego de la difusión, la masa de vapor arrastra los compuestos del AE a lo largo del alambique, dando lugar a un transporte convectivo de materia, según los criterios de la ley de *Fick*. [86].

Para el caso de la extracción del AE tomillo, la influencia del contenido de agua en el material vegetal presentó un efecto grande sobre la cantidad de AE extraído. El material vegetal seco, produjo un mayor rendimiento de extracción del AE, que el fresco. Probablemente, el mayor contenido de agua en el material vegetal fresco, crea una capa en la interfase, superficie del material vegetal/vapor de agua, lo cual impide una buena difusión del AE hacia el vapor de agua, a la vez que evita una mayor vaporización del AE. El efecto del tamaño de partícula no fue significativo en la extracción del AE de tomillo, lo cual es ventajoso en el proceso de

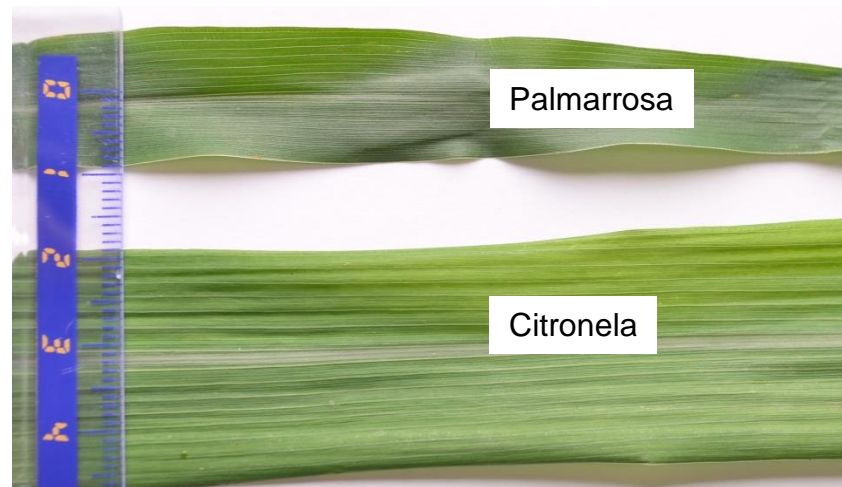
extracción, porque se evita consumir energía en el picado. Sin embargo, se debe tener cuidado al momento de acomodar el material vegetal en el alambique, ya que es necesario garantizar la densidad de carga homogénea para el proceso ( $192 \text{ kg/m}^3$ ), y de esta manera, evitar caminos preferenciales para el vapor.

Las mejores condiciones de extracción de las especies orégano de monte y palmarrosa, mostraron que se requieren bajas presiones (ca. 50 psi) y densidades intermedias (200-250  $\text{kg/m}^3$ ) para obtener la mayor cantidad de AE con el mejor contenido de los componentes mayoritarios (carvacrol, geraniol). Estas condiciones de extracción, probablemente, favorecen el tiempo de interacción entre la superficie del material vegetal y el vapor que fluye por el alambique a una menor velocidad, lo que genera un mejor gradiente de difusión del AE. Esto también se ve favorecido por el menor tamaño de partícula logrado para estas especies, ya que de esta manera se incrementa el área superficial de la matriz, lo que aumenta los puntos de difusión del AE hacia el vapor de agua.

En la extracción del AE de citronela, se lograron los mejores rendimientos de extracción con el mayor contenido de citronelal (37.1%) y citronelol (15.2%), a presiones por encima de los 100 psi y densidades mayores de  $330 \text{ kg/m}^3$ . Esto puede ser ocasionado por el mayor grosor y ancho de las hojas de citronela, comparado con la palmarrosa, que requirió una menor presión de trabajo para la extracción del AE. En la **Figura 40**, se puede apreciar la diferencia en tamaño de las hojas de estas dos especies, así como su grosor. Las hojas de citronela son mucho más corrugadas, quebradizas y ásperas que las hojas de palmarrosa, las cuales son lisas y con una menor lignificación en sus nervaduras. De acuerdo con lo anterior, una posible explicación al uso de una mayor presión del vapor para la extracción del AE de citronela, cuando se emplean densidades altas ( $>300 \text{ kg/m}^3$ ) de empaquetamiento en el alambique, es que el vapor suministrado requerirá un mayor esfuerzo para atravesar las hojas y extraer su aceite esencial. El vapor encuentra una mayor resistencia por el mayor espesor de las hojas; por ende,

requiere una mayor presión para que el AE se difunda desde las vacuolas donde está contenido, atravesando una matriz mucho más gruesa y con un mayor contenido de celulosa, hasta la superficie en la interfase material vegetal-vapor.

Otra variable importante en la extracción del AE de citronela, fue el tamaño de partícula. Tamaños inferiores a 1 cm, mostraron una disminución en el rendimiento y la calidad del AE. Una explicación a este hecho, es que durante el picado del material vegetal, a tamaños inferiores a 1 cm, se genera calentamiento localizado en la picadora, lo cual puede generar la volatilización de alguno de los constituyentes del AE, por efecto de la alta temperatura.



**Figura 40.** Corte longitudinal de las hojas de citronela y palmarrosa. Foto Andres Ramírez (septiembre 2015).

Con base en las condiciones de extracción y las variables post-cosecha optimizadas para el proceso de obtención de los aceites esenciales por el método de arrastre con vapor, y suponiendo una producción homogénea de material vegetal y unas densidades de siembra de 80.000 plantas por hectárea para el tomillo y 55.000 plantas por hectárea para el orégano de monte, la citronela y la palmarrosa, se calculó la cantidad de aceite esencial que se produciría

anualmente, en una hectárea de estas especies. En la **Tabla 37**, se presentan los resultados.

**Tabla 37.** Cantidad de aceite esencial (kg) obtenida por hectárea de cultivo por año, para las cuatro especies evaluadas, empleando las mejores condiciones de extracción por el método de arrastre con vapor.

<b>Especie</b>	<b>Cosechas por año</b>	<b>Rendimiento de extracción, %p/p</b>	<b>Cantidad de AE por año, kg</b>
Tomillo	4	0,25	84
Orégano de monte	3	2,0	396
Citronela	3	0,66	327
Palmarrosa	3	0,52	215

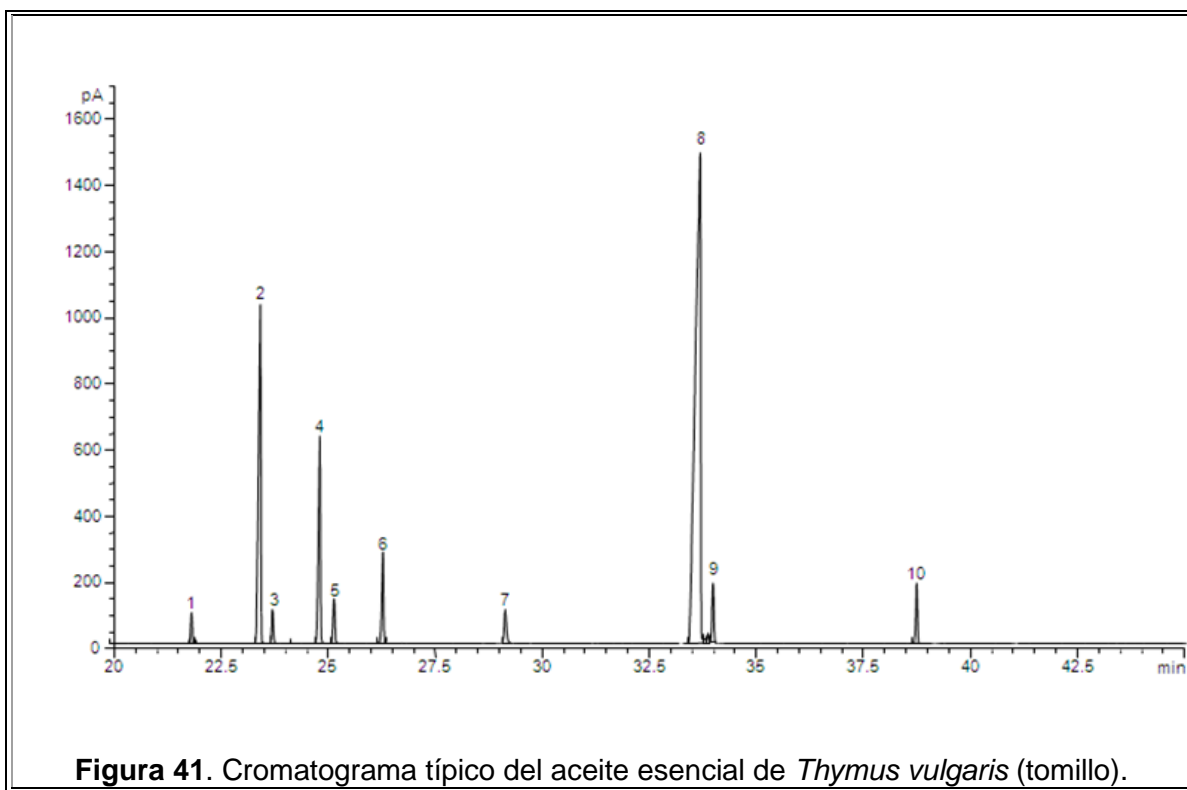
La mayor productividad se logra para el aceite esencial de orégano de monte, seguida de la citronela. Estos resultados muestran la importancia de optimizar cada etapa del proceso productivo de los aceites esenciales, ya que la disminución en el rendimiento de extracción en el rango de 0.1-0.3%, puede hacer que la producción de aceites esenciales a gran escala sea inviable. Este es el caso del AE de tomillo, el cual, a pesar de que se optimicen las condiciones de extracción, aparentemente, no es viable su producción, puesto que no supera el umbral de 100 kg de AE por hectárea de cultivo, comparado con cultivos establecidos en España y norte de África. En este sentido, es necesario evaluar el componente agronómico del cultivo, para mejorar la producción de biomasa de las plantas. Plantas de tomillo cultivadas en Irán, lograron productividades de biomasa 18 toneladas por ha y una producción de 123 kg de AE de tomillo anuales [85]. Las plantas de tomillo empleadas en este estudio, fueron obtenidas de cultivos experimentales en el municipio de Sucre, Santander, en donde se evidenció una baja luminosidad y una alta humedad, factores que probablemente, afectaron la productividad agronómica de esta especie.

### 3.6. Ficha técnica de los aceites esenciales

En las **Tablas 38 a 41**, se presentan los resultados de los ensayos fisicoquímicos efectuados a los aceites esenciales obtenidos por el método de arrastre con vapor, para las cuatro especies bajo estudio, empleando las mejores condiciones de extracción, para construir su ficha técnica de calidad.

**Tabla 38.** Ficha técnica del aceite esencial de *Thymus vulgaris*, obtenido bajo las mejores condiciones de extracción evaluadas.

<b>Propiedades fisicoquímicas</b>			
<b>Norma</b>	<b>Parámetro</b>	<b>Resultado</b>	<b>n</b>
ISO 1242: 1999	Índice de acidez (mg de KOH/g de AE)	0.30 ± 0.01	3
ISO 709: 2001	Índice de ésteres (mg de KOH/g de AE)	27.4 ± 2.8	3
ISO 279: 1998	Densidad relativa	0.93 ± 0.01	3
ISO 280: 1998	Índice de refracción (n <sub>D</sub> )	1.501 ± 0.001	3
ISO 11021: 1999	Humedad (%)	1.07 ± 0.01	3
ISO/TR 11018:1997	Flash point (°C)	69.7 ± 0.4	3
ISO 1041:1973	Punto de congelación (°C)	-0.5 ± 0.1	3
ISO 592: 1998	Rotación óptica	+ 3.37 ± 0.67	3
<b>Solubilidad en etanol (Norma ISO 875: 1999)</b>			
<b>Concentración, % (v/v)</b>		<b>95%</b>	
V' (Miscible)		0.1-20.0 mL	
<b>Componentes mayoritarios del aceite esencial</b>			
<b>Nº</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad relativa, %</b>	
1	α-Pineno	1.0	
2	p-Cimeno	12.5	
3	1,8-Cineol	1.1	
4	γ-Terpineno	6.5	
5	cis-Hidrato de sabineno	2.0	
6	Linalol	3.6	
7	Borneol	1.6	
8	Timol	64.2	
9	Carvacrol	3.2	
10	trans-β-Cariofileno	3.0	



Los resultados de los ensayos fisicoquímicos empleados para monitorear la calidad de los aceites esenciales de tomillo, citronela y palmarrosa, estuvieron dentro de los rangos estipulados en las normas ISO-14715:2010, ISO-3848:2001 e ISO-4727:1988, respectivamente. Esto indica que bajo las mejores condiciones de extracción obtenidas para estas especies, se produjeron aceites esenciales con altos estándares de calidad, lo cual permite su comercialización en el mercado global. Para el caso del AE de *Lippia organoides*, del cual no existe una norma internacional, se puede tomar como referencia el AE de *Origanum vulgare*, cuyo porcentaje de carvacrol en el AE, debe estar por encima del 60%. Con base en esta información, se puede indicar que el AE de *L. organoides*, se podría catalogar como un producto de buena calidad, además, de darle una denominación de origen, puesto que esta especie solo crece en Centro y Sur América. Con base en la Norma ISO 3848, se puede indicar que el AE de citronela es del tipo originaria de Java, cuyo contenidos de citronelal y geraniol varían entre el 25 al 40% y 20 y 25%, respectivamente.

**Tabla 39.** Ficha técnica del aceite esencial de *Lippia origanoides*, obtenido bajo las mejores condiciones de extracción evaluadas.

<b>Propiedades fisicoquímicas</b>			
<b>Norma</b>	<b>Parámetro</b>	<b>Resultado</b>	<b>n</b>
ISO 1242: 1999	Índice de acidez (mg de KOH/g de AE)	11.82 ± 0.61	3
ISO 709: 2001	Índice de ésteres (mg de KOH/g de AE)	4.2 ± 1.8	3
ISO 279: 1998	Densidad relativa	0.96 ± 0.07	3
ISO 280: 1998	Índice de refracción (n <sub>D</sub> )	1.510 ± 0.001	3
ISO 11021: 1999	Humedad (%)	1.40 ± 0.16	3
ISO/TR 11018:1997	Flash point (°C)	44.3 ± 0.1	3
ISO 1041:1973	Punto de congelación (°C)	-0.7 ± 0.2	3
ISO 592: 1998	Rotación óptica	+ 4.95 ± 0.07	3
<b>Solubilidad en etanol (Norma ISO 875: 1999)</b>			
<b>Concentración, % (v/v)</b>		<b>95%</b>	
V' (Miscible)		0.1-20.0 mL	
<b>Componentes mayoritarios del aceite esencial</b>			
<b>Nº</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad relativa, %</b>	
1	<i>p</i> -Cimeno	3.7	
2	$\gamma$ -Terpineno	4.5	
3	Timol	7.8	
4	Carvacrol	67.5	
5	<i>trans</i> - $\beta$ -Cariofileno	4.0	
6	$\alpha$ -Humuleno	1.1	

**Figura 42.** Cromatograma típico del aceite esencial de *Lippia origanoides*.

**Tabla 40.** Ficha técnica del aceite esencial de *Cymbopogon nardus*, obtenido bajo las mejores condiciones de extracción evaluadas.

<b>Propiedades fisicoquímicas</b>			
<b>Norma</b>	<b>Parámetro</b>	<b>Resultado</b>	<b>n</b>
ISO 1242: 1999	Índice de acidez (mg de KOH/g de AE)	1.59 ± 0.01	3
ISO 709: 2001	Índice de ésteres (mg de KOH/g de AE)	23.7 ± 1.6	3
ISO 279: 1998	Densidad relativa	0.88 ± 0.01	3
ISO 280: 1998	Índice de refracción (n <sub>D</sub> )	1.466 ± 0.001	3
ISO 11021: 1999	Humedad (%)	1.43 ± 0.04	3
ISO/TR 11018:1997	Flash point (°C)	86.4 ± 0.3	3
ISO 1041:1973	Punto de congelación (°C)	-1.0 ± 0.5	3
ISO 592: 1998	Rotación óptica	+ 4.7 ± 0.02	3
<b>Solubilidad en etanol (Norma ISO 875: 1999)</b>			
<b>Concentración, % (v/v)</b>		<b>95%</b>	
V' (Miscible)		0.1-20.0 mL	
<b>Componentes mayoritarios del aceite esencial</b>			
<b>Nº</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad relativa, %</b>	
1	Limoneno	4.8	
2	Citronelal	37.1	
3	Citronelol	15.2	
4	Geraniol	12.2	
5	Acetato de citronelilo	2.9	
6	Eugenol	2.4	
7	Acetato de geraniolo	1.6	

**Figura 43.** Cromatograma típico del aceite esencial de *Cymbopogon nardus*.

**Tabla 41.** Ficha técnica del aceite esencial de *Cymbopogon martinii*, obtenido bajo las mejores condiciones de extracción evaluadas.

<b>Propiedades fisicoquímicas</b>			
<b>Norma</b>	<b>Parámetro</b>	<b>Resultado</b>	<b>n</b>
ISO 1242: 1999	Índice de acidez (mg de KOH/g de AE)	0.53 ± 0.03	3
ISO 709: 2001	Índice de ésteres (mg de KOH/g de AE)	59.4 ± 0.6	3
ISO 279: 1998	Densidad relativa	0.89 ± 0.05	3
ISO 280: 1998	Índice de refracción (n <sub>D</sub> )	1.476 ± 0.001	3
ISO 11021: 1999	Humedad (%)	2.08 ± 0.01	3
ISO/TR 11018:1997	Flash point (°C)	68.0 ± 0.5	3
ISO 1041:1973	Punto de congelación (°C)	-0.5 ± 0.1	3
ISO 592: 1998	Rotación óptica	+ 4.90 ± 0.07	3
<b>Solubilidad en etanol (Norma ISO 875: 1999)</b>			
<b>Concentración, % (v/v)</b>		<b>95%</b>	
V' (Miscible)		0.1-20.0 mL	
<b>Componentes mayoritarios del aceite esencial</b>			
<b>Nº</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad relativa, %</b>	
1	<i>trans</i> -β-Ocimeno	1.7	
2	Linalol	1.5	
3	Geraniol	77.5	
4	Acetato de geranilo	1.7	
5	<i>trans</i> -β-Cariofileno	4.0	
6	Nerolidol	5.1	

**Figura 44.** Cromatograma típico del aceite esencial de *Cymbopogon martinii*.

#### 4. CONCLUSIONES

- Con la realización de la presente tesis doctoral y la participación de 70 familias de los municipios de Socorro, Sucre, Barbosa y Puente Nacional, Santander, se logró la instalación satisfactoria de tres plantas para la extracción de aceites esenciales por el método de arrastre con vapor, así como la implementación de 8 ha de cultivos de las especies tomillo, orégano de monte, citronela y palmarrosa.
- El estudio de las variables que afectan el tratamiento post-cosecha y el proceso de destilación de las plantas aromáticas para la obtención de sus aceites esenciales, condujo al establecimiento de las mejores condiciones de extracción que permiten lograr los mayores rendimientos con la mejor calidad posible. Este conocimiento fue transferido a los productores vinculados a la investigación, junto con las mejores condiciones de siembra, fertilización y corte, para las especies *Thymus vulgaris* y *Cymbopogon martinii*.
- Se determinaron las condiciones óptimas de extracción de cuatro AE, que proporcionaron la mejor calidad del aceite, en términos de la cantidad de los componentes mayoritarios y rendimiento del AE por hectárea de cultivo. En la **Tabla 42** se presentan los valores de las variables estudiadas, junto con la producción del AE por hectárea por año.

Especie	Tamaño de partícula, cm	Presión del vapor, psi	Densidad de carga, kg/m <sup>3</sup>	humedad retirada del MV	Cantidad de AE por ha/año, kg
<i>T. vulgaris</i>	10	80	192	30%	84
<i>L. origanoides</i>	0.5	51	249	10-20%	396
<i>C. nardus</i>	1.0	108	330	10-20%	327
<i>C. martinii</i>	0.5	50	205	10-20%	215

MV: material vegetal

- Las fichas técnicas de calidad de los aceites esenciales de tomillo, citronela y palmarrosa producidos en Santander, cumplen con los estándares de calidad impuestos por el mercado internacional, declarados en las Normas ISO para cada aceite esencial (ISO-14715, para aceite de tomillo, ISO-3848, para aceite de citronela, ISO 14715, para aceite de tomillo). La calidad del AE de orégano de monte, fue comparativamente similar que el AE de *Origanum vulgare*, lo cual lo ubica como una especie promisorio de calidad, con denominación de origen para Colombia.
  
- A través del Programa “Fortalecimiento y aumento de la competitividad de la cadena productiva nacional de aceites esenciales y productos derivados”, financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR) y Colciencias, al cual estuvo vinculada la presente tesis doctoral, se han dado pasos significativos que favorecen las condiciones básicas para el desarrollo en esta región, de una industria de aceites esenciales, con características propias. En efecto, ya se cuenta con los fundamentos para emprender una industria: disponibilidad o potencialidad de producción de materias primas, equipamiento para destilación y conocimientos para su manejo eficiente.

## 5. DIVULGACIÓN DE RESULTADOS

Parte del contenido y resultados parciales del presente capítulo fueron publicados de la siguiente manera:

### **Ponencias en congresos:**

Estudio del efecto de diferentes variables sobre el rendimiento y composición del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. obtenido por destilación por arrastre con vapor. DC Durán, VY Pérez, C Cárdenas, JR Martínez M, E Stashenko. XV Congreso Latinoamericano de Cromatografía y Técnicas Afines, **COLACRO-2014**. Cartagena de Indias, Colombia–Hotel Caribe. 29 de septiembre a 3 de octubre de 2014.

### **Artículos:**

Elena E. Stashenko, Jairo René Martínez, Diego Camilo Durán, Yuri Córdoba, Deyanira Caballero. Estudio comparativo de la composición química y la actividad antioxidante de los aceites esenciales de algunas plantas del género *Lippia* (Verbenaceae) cultivadas en Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias* 2014, Vol XXXVIII (Supl.) 89-105.

Javier Alberto Pinzón-Torres, Nelson Jovany Contreras Porras, Diego Camilo Durán Garcia, Jairo René Martínez Morales, Elena Stashenko. Green biomass production and quality of essential oils of palmarrosa (*Cymbopogon martini* Roxb.) with application of synthesis fertilizers and organic fertilizers. *Acta Agronómica* 2014, 63(4): 335-342.

### **Capítulo de libro:**

Elena Stashenko, Diego Camilo Durán G., Jairo René Martínez M. Aceites esenciales: aspectos generales (capítulo 1). En *Plantas Aromáticas y Aceites Esenciales: Estudio y Aplicaciones*. División de Publicaciones UIS, Bucaramanga, Colombia, octubre 2012, 314 p. ISBN 978-958-57687-0-3.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS CAPÍTULO 1

1. STASHENKO, Elena E. Aceites Esenciales. División de Publicaciones UIS, Bucaramanga, **2009**. pp. 13 -21, 37-48.
2. E. F. K. (Tim) Denny. Field Distillation for Herbaceous Oils. 3rd Ed. Denny, McKenzie Associates, Lilydale, Tasmania, Australia, 2001, 275 p.
3. E. J. Bowles. The Chemistry of Aromatherapeutic Oils. 3rd Ed. Allen & Unwin, Crows Nest, Australia, 2003, 236 p.
4. G. Ohloff. Scent and Fragrances. The Fascination of Odors and their Chemical Perspectives. Springer-Verlag, Berlin, 1994, 238 p.
5. S. Arctander. Perfume and Flavor Materials of Natural Origin. Allured Publishing Corp., Carol Stream, IL, 1994, 736 p.
6. J. B. Harborne, H. Baxter (Eds.). Phytochemistry Dictionary. A Handbook of Bioactive Compounds from Plants. Taylor & Francis, London, 1993, 791 p.
7. B. M. Lawrence (Ed.). The Antimicrobial/Biological Activity of Essential Oils. Allured Publishing Corp., Carol Stream, IL, 2005, 504 p.
8. TAIZ L., ZEIGER, E. Plant physiology. Massachusetts: Sinauer Associates, 2002. p.p. 171-192, 285-290.
9. KESSLER, A., and BALDWING, I. T. Defensive function of herbivore induced plant volatile emissions in nature, in: TAIZ L., ZEIGER, E. Plant physiology. Massachusetts: Sinauer Associates, **2002**. p.p. 286-288.
10. TRAPP, S., and CROTEAU, R. Defensive resin biosynthesis in conifers. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **2001**. 52: 689-724.
11. E. Guenter. The Essential Oils. Vols. I–VI. Robert E. Krieger Publishing Company, Malabar, FL, 1948 - 1952.
12. MUÑOZ, F., Plantas medicinales y aromáticas, estudio, cultivo y procesado. Madrid: Mundi Prensa, **1987**. 365p.
13. BANDONI, Arnaldo (Ed). Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores.

- Argentina: Red de Editoriales Universitarias, La Plata, **2000**. pp. 29-43, 149-171, 197- 232.
14. P. Joliet. *Interrelation between Insects and Plants*. CRC Press, Boca Ratón, FL, 1998, 309 p.
  15. A. L. Bandoni, M. P. Czepak (Eds.). *Os recursos vegetais aromáticos no Brasil: seu aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabres*. Edufes, Vitória, 2008, 624 p.
  16. CERPA, M. *Hidrodestilación de aceites esenciales: modelado y caracterización*. Tesis Doctoral. Valladolid: Universidad Valladolid. Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente. 2007, 304 p.
  17. SALAZAR, I Y ALZATE, C. Evaluación del proceso integral para la obtención de aceite esencial y pectina a partir de cáscara de naranja. En: *Ingeniería y ciencia*. Junio, 2011. vol. 7, no. 13, p. 65-86. ISSN 1794-9165.
  18. REZZOUG, S.A., BOUTEKEDJIRET, C., ALLAF, K., Optimization of operating conditions of rosemary essential oil extraction by a fast controlled pressure drop process using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 2005, 71, 9-17.
  19. Stashenko EE., Germán Gómez. “Comparación de la composición química y de la actividad biológica de los aceites esenciales de 2 quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br obtenidos variando las condiciones de extracción y secado”, Escuela de Química, UIS, 2007.
  20. Stashenko EE., Andrea Agudelo, Katerine Blanco, Jairo René Martínez, “Estudio comparativo del aceite esencial de *Lippia alba* Mill N.E. Brown ex Britton & Wills obtenido de plantas cultivadas con tres tipos de abono orgánico (compost)”. Escuela de Química, UIS, 2007.
  21. Stashenko EE., Johan Reyes y Gregorio Patiño, Jairo René Martínez, “Análisis comparativo de los metabolitos secundarios volátiles de dos especies de *Ocimum* (Labiatae), en función del método de extracción y estudio de su actividad biológica”. Escuela de Química, UIS, 2007.

22. Stashenko EE., Olga Díaz, Jairo René Martínez, “Comparación de la composición química y actividad biológica del aceite esencial de *Lippia citriodora* cultivada en tres regiones de Colombia”. Escuela de Química, UIS, 2007.
23. Stashenko EE., Carol Cárdenas y Saydé Duarte, Jairo René Martínez, “Estudio circadiano del contenido de carvona en el extracto obtenido de las hojas de *Lippia alba* (fam. Verbenaceae)”. Escuela de Química, UIS, 2007.
24. Stashenko EE., Deynny Mendivelso y Martha Olivares, Jairo René Martínez, “Estudio de la influencia del método de extracción, época de recolección y tiempo de secado del material vegetal sobre la composición y rendimiento del aceite esencial de la especie *Pelargonium graveolens*”. Escuela de Química, UIS, 2007.
25. Stashenko EE., Edwin Bottia y Adriana Vargas, Jairo René Martínez, “Estudio de la composición química de los aceites esenciales de seis plantas cultivadas en diferentes zonas geográficas de los municipios de Bolívar, el Peñón y Vélez (Santander)”. Escuela de Química, UIS, 2008.
26. SANDRA, P., BICCHI C., Capillary gas chromatography in essential oil analysis. New York: Huethig Verlag, 1987. 435p.
27. GROB, R. L., Modern practice of gas chromatography. New York: John Wiley & Sons, 1985. p.p. 895-897.
28. JENNINGS, W., Analytical gas chromatography. San Diego: Academic Press, 1987. 259p.
29. JENNINGS, W., SHIBAMOTO, T., Qualitative analysis of flavour and fragrance volatile by capillary glass chromatography. New York: Academic Press, 1980. 472p.
30. KARASEK, F. W., and VIAV, A. C., Topics in chemical instrumentation. GC-MS data system. J. Chem. Educ. 1984. 61: (9), 233A.-236A.
31. KOVÁTS, E., Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. Advan. Chromatogr. 1965. 1: 229-247.

32. ADAMS, P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th Edition, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, 2004.
33. GUILLÉN, M. D. and MANZANOS M. J. Study of the composition of the different parts of a Spanish *Thymus vulgaris* L. plant. *Food Chemistry*, Vol. 63, No. 3. 1998. pp. 373-383.
34. ROTA, Maria C., HERRERA, Antonio., MARTÍNEZ, Rosa M., SOTOMAYOR, Jose A., and JORDÁN, María J., Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*, Vol. 19, 2008, 681-687.
35. HUDAID, Mohammad., SPERONI, Ester., DI PIETRA, Anna M., CAVRINI, Vanni., GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle., *JPBA*, Vol. 29, 2002. pp. 691-700.
36. REDDY, M. V., ANGERS, Paul., GOSSELIN, André, and ARUL, Joseph., Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits, *Phytochemistry*, Vol. 47, No. 8, 1998. pp. 1515-1520.
37. BLUM, Carsten, KUBECZKA, Karl- Heinz., BECKER, Klaus, Supercritical fluid chromatography-mass spectrometry of thyme extracts (*Thymus vulgaris* L.), *J. Chromatogr.*, 773, 1997. pp. 377-380.
38. LEE, Seung-Joo, UMANO, Katumi, SHIBAMOTO, Takayuki and LEE, Kwang-Geun, Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties., *Food Chemistry*, No. 91, 2005. pp. 131-137.
39. GUMUS, Tuncay, Determination of the changes of antifungal properties of *Satureja hortensis*, *Thymus Vulgaris* and *Thymbra spicata* exposed to gamma irradiation., *Radiation Physics and Chemistry*, Vol. 79, 2010. pp. 109-114.
40. KUMAR, Ashok, SHUKLA, Ravindra and SINGH, Priyanka, Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservative against post

- harvest fungal infestation of food commodities., *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, No. 9, 2008. pp. 575-580.
41. SIMON, J.; MORALES, M.; PHIPPEN, W.; VIEIRA, R.; HAO, Z. A source of aroma compounds and a popular culinary and ornamental herb. J. Janick (Ed.), *Perspectives on new crops and new uses*. Alexandria, VA: ASHS Press. 1999, 499-505.
  42. CHIZZOLA, R.; MICHITSCH, H.; FRANZ, C. Antioxidative properties of *Thymus vulgaris* leaves: comparison of different extracts and essential oil chemotypes. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 6897-6904.
  43. AMNER MUÑOZ, A.; KOUZNETSOV, V.; STASHENKO, E. Composition and in-vitro antioxidant capacity of essential oils rich in thymol, carvacrol, trans-anethole or estragole. *Revista Salud UIS.* 2009, 41, 287-294.
  44. CARDONA, L.; MEJÍA, L. Evaluación del efecto antioxidante de aceites esenciales y extractos de *Eugenia caryophyllata*, *Origanum vulgare* y *Thymus vulgaris*. *Biosalud.* 2009, 8, 58-70.
  45. DIEGO A. ALZATE O, D.; MIER, G.; AFANADOR, L.; DURANGO, D.; GARCÍA, C. Evaluation of phytotoxicity and antifungal activity against *Colletotrichum acutatum* of essential oils of thyme (*Thymus vulgaris*), lemongrass (*Cymbopogon citratus*), and its main constituents. *VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica.* 2009, 16, 116-125.
  46. ALBESIANO S., RANGEL Ch. y CADENA A., La vegetación del Cañón del río Chicamocha. 2003. *Caldasias* 25(1): 73-99.
  47. Carlos Ruiz, Fabián Tunarosa, Elena Stashenko y Jairo R. Martínez. Estudio comparativo por GC-MS de metabolitos secundarios volátiles de dos quimiotipos de *Lippia origanoides* H.B.K. obtenidos por diferentes técnicas de extracción, *Scientia et Technica* año XIII, 2007, No 33: 325-328..
  48. PASCUAL, M.E., SLOWING, K., CARRETERO, E., et al. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *J. Ethnopharmacol.* 2001. (76): 201-214.

49. DOS SANTOS, F.J.B., LOPES, A.D., GRACAS, A.M. et al. Composition and Biological Activity of Essential Oils from *Lippia origanoides* H.B.K. J. Essent. Oil Res. 2004 (16): 504-506.
50. OLIVEIRA, D.R., LEITAO, G.G., BIZZO, H.R., et al. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. Food Chem. 2007 (101): 236-240.
51. E. Stashenko, C.A. Ruíz, G. Arias, D.C. Durán, W. Salgar, M. Cala, J.R. Martínez, *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS analysis. Journal of Separation Science 2010, 33 (1), 93-103.
52. Elena Stashenko, Carlos Ruiz, Amner Muñoz, Martha Castañeda, and Jairo Martínez, "Composition and antioxidant activity of essential oils of *Lippia origanoides* H.B.K. grown in Colombia, Natural Product Communications, 2008, 3 (4), 563-566.
53. ROJAS, J., MORALES, A., MARQUEZ, A., RONDON, M., VERES, K and MATHE, I. Comparative study of the chemical composition of the essential oil of *Lippia oreganoides* collected in two different seasons in Venezuela. Nat. Prod. Commun. 2006, 1 (3), pp. 205-207.
54. OLIVEIRA D.N., LEITAO G.G., BIZZO H.R., LOPES, D., ALVIANO, C.S., ALVIANO, D.S., and LEITAO, S.G. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. Food Chem., 2007, 101, (1), pp. 236-240.
55. DOS SANTOS, J.; LOPES D., J.; CITO, G.L., DE OLIVEIRA, E.H., LIMA, S.G., and REIS, F.A. Composition and Biological Activity of Essential Oils from *Lippia origanoides* H.B.K. J. Essent. Oil Res, 2004, 16, pp. 504-506
56. Oliveira, D. 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, 111.
57. RODRÍGUEZ, D.; SANABRIA, M. Efecto del extracto de tres plantas silvestres sobre la rizoctoniosis, la mancha sureña del maíz y los patógenos que las causan. Interciencia. 2005, 30, 739-744.

58. MÉNDEZ, R.; SERRANO, J.; CHATAING, B.; JIMENEZ, D.; MORA, D.; ROJAS, L.; USUBILLAGA, A.; O'CALLAGHAN, J. Estudio comparativo de la actividad biológica del aceite esencial *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchy el aceite esencial *Lippia organoides* Hbk sobre tres especies de *Nocardia* sp. *Salud & Desarrollo Social*. 2007,2, 49-52.
59. ZAPATA, B.; DURÁN, C.; STASHENKO, E.; CORREA, J.; BETANCUR, L. Cytotoxic activity of essential oils of *Lippia organoides* H.B.K and its major constituents. *Salud UIS*. 2009, 41, 215-222.
60. VICUÑA, G.; STASHENKO, E.; FUENTES, L. Chemical composition of the *Lippia organoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. *Fitoterapia*. 2010, 81, 343-349.
61. MENESES, R.; OCAZONEZ, R.; MARTÍNEZ, J.; STASHENKO, E. Inhibitory effect of essential oils obtained from plants grown in Colombia on yellow fever virus replication in vitro. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2009, 8, 1-6.
62. Jesús Olivero Verbel, Karina Caballero Gallardo, Beatriz Jaramillo Colorado, Elena E Stashenko. Actividad repelente de los aceites esenciales de *Lippia organoides*, *Citrus sinensis* y *Cymbopogon nardus* cultivadas en Colombia frente a *Tribolium castaneum*, Herbst. *Salud UIS* 2009; 41: 244-250.
63. Lorenzi H, Matos FJA (2002) Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 512p.
64. Mittal R, Singh SP (2007) Shifting from agriculture to agribusiness: The case of aromatic plants. *Agric. Econ. Res. Rev.* 20:541-550.
65. Verma SK, Kumar B, Ram G, Singh HP, Lal RK (2010) Varietal effect on germination parameter at controlled and uncontrolled temperature in palmarosa (*Cymbopogon martinii*) *Industrial Crops and Products* 32:696-699.
66. E. A. Weiss. *Essential Oil Crops*. CAB International, New York, 1997, 600 p.
67. García M, Stashenko E, Martínez J (2010) Estudio comparativo de los metabolitos secundarios volátiles del *Cymbopogon martinii* (Palmarrosa)

- obtenidos por diferentes técnicas de extracción. Bucaramanga: Tesis de Pregrado en Química, Universidad Industrial de Santander.
68. Singh M, Sharma S (2001) Influence of irrigation and nitrogen on herbage and oil yield of palmarosa (*Cymbopogon martinii*) under semi-arid tropical conditions. *European Journal of Agronomy* 14:157-159.
  69. Rajeswara RBR (2001) Biomass and essential oil yields of rainfed palmarosa (*Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats. var. *motia* Burk.) supplied with different levels of organic manure and fertilizer nitrogen in semi-arid tropical climate. *Industrial Crops and Products*, 14 171–178.
  70. Rodríguez Raúl, Ruiz Carlos, Arias Ginna, Castro Hans, Martínez Jairo y Stashenko Elena. Estudio comparativo de la composición de los aceites esenciales de cuatro especies del género *Cymbopogon* (Poaceae) cultivadas en Colombia. *BLACMA*. 2012, 11 (1): 77 – 85.
  71. LEAL, T.C.A.B., Freitas, S.P., Silva, J.F., Carvalho, A.J., *Cymbopogon citratus* (Dc) Stapf) in different ages, *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 2005 (2), 61-64.
  72. Datta SC (1982) Cultivation of *Cymbopogon winterianus* Jowitt for production of citronella (Java) oil. In: Atal CK, Kapur BM. (eds). *Cultivation and utilization of aromatic plants*. Jammu-Tawi, India: Council of Scientific and Industrial Research, 1982. p.325-330.
  73. Bhan MK, Kanti R, Kak SN, Pal S, Rekha K (1999) Response of new improved strain RL-931 of *Cymbopogon* to nitrogen fertilization. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences*, 21: 1027-1029.
  74. Anand Akhila (ed). *Essential Oils-Bearing Grasses, The Genus Cymbopogon*. Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles. CRC Press Taylor and Francis Group. Boca Raton FL (EE.UU). 2010. pp 72-73, 122-124.
  75. <http://www.iso.org/iso/en/CatalogueListPage.CatalogueList?COMMID=1855> (Consultado el 12-05-13).
  76. International Organization for Standardization, *Essential oils: determination of relative density at 20 °C*, ISO 279, Reference Method, 1998.

77. International Organization for Standardization, Essential oils: determination of refractive index, ISO 280, 2 ed. 1998.
78. International Organization for Standardization, Essential oils: determination of optical rotation, ISO 592, 2 ed., 1998.
79. 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.
80. International Organization for Standardization, Essential oils: determination of freezing point, ISO 1041, 1973.
81. International Organization for Standardization, General guidance on the determination of flashpoint, Technical report ISO/TR 11018.
82. International Organization for Standardization. Essential oils: determination of acid value, ISO 1242. 1999.
83. International Organization for Standardization. Essential oils: determination of ester value, ISO 709. 2001.
84. A. Husain. Essential Oil Plants and their Cultivation. Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants. Lucknow, India, 1994, 292 p.
85. Hassanali Naghdi, Darab Yazdani, Sajed Mohammad Ali, Fatemeh Nazari. Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L., Industrial Crops and Products. 2004, 19, 231-236.
86. BIRD, R., STEWART, W., y LIGHTFOOT, E. Fenómenos de transporte. 2 ed. Mexico D.F.: Limusa Wiley, 2006.

### Fraccionamiento de aceites esenciales y evaluación de la actividad repelente frente a *Tribolium castaneum*

Se evaluó la actividad repelente frente a *T. castaneum* de aceites esenciales de *Lippia alba*, *Lippia origanoides* y *Cymbopogon nardus*, obtenidos por los métodos de hidrodestilación asistida por microondas y arrastre con vapor, así como de sus fracciones obtenidas mediante destilación fraccionada a presión reducida. Mediante la rectificación de los AE se logró obtener composiciones reproducibles de los AE de *L. origanoides* y *C. nardus*. El AE, las fracciones volátiles (F1) y las fracciones de fondo (FD) de *L. origanoides*, presentaron un porcentaje de repelencia igual o superior al compuesto de control (IR3535), a las 2 y 4 h de exposición. Se encontraron mejores valores para aquellas fracciones, que presentaron contenidos intermedios (5-15%) de  $\gamma$ -terpineno, timol y cariofileno. Concentraciones por encima de 0,002  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$  de carvacrol, disminuyeron el porcentaje de repelencia contra la especie *T. castaneum*, a las 2 y 4 h de exposición. Los AE de *L. alba* que mostraron mayor repelencia fueron aquellos que presentaron un alto contenido de compuestos oxigenados tales como carvona, neral, geranial, geraniol, piperitona y piperitenona. Los resultados de composición química y actividad biológica mostraron la existencia de una correlación directa ( $r = 0,9939$ ) entre la cantidad de los compuestos oxigenados, presentes en los aceites esenciales de *L. alba*, y la actividad repelente frente a *T. castaneum*. Las fracciones del AE de *C. nardus* con contenidos entre el 5-25% de citronelal, citronelol, geraniol, elemol y germacren-4ol presentaron los mejores resultados de repelencia contra *T. castaneum*. Se encontró correlación positiva ( $R^2=0.996$ ) entre el contenido de compuestos oxigenados en el AE de citronela y el incremento en la actividad repelente frente a *T. castaneum*.

## INTRODUCCIÓN

La destilación es uno de los procesos de separación más ampliamente empleados en la industria química. En este proceso, la separación de los componentes se presenta por sus diferencias en las volatilidades relativas, de tal forma que cuando la fase líquida se pone en contacto con la fase vapor, se produce una transferencia de materia entre ambas fases, lo que produce que en el vapor se concentren los componentes más volátiles, mientras que en el líquido lo hagan los menos volátiles.

La refinación de mezclas complejas ha sido objeto de profundo desarrollo en la petroquímica. La técnica básica es la destilación y este es el método que utiliza a nivel mundial la industria de aceites esenciales [1, 2]. Existen metodologías manuales y automatizadas para el diseño de sistemas de destilación para una gran cantidad de sustancias relacionadas con el petróleo. La información fundamental para la utilización de estas metodologías son los datos del equilibrio líquido-vapor para las sustancias o mezclas a procesar. En el caso de los constituyentes del petróleo esta información está disponible en muchas fuentes, pero esto no se cumple para los aceites esenciales y sus componentes. Sin embargo, gracias a todos los desarrollos logrados en el uso de la destilación como proceso unitario en la ingeniería química, se considera que la destilación es una tecnología madura y los principios básicos son aplicables a la solución de los problemas de aislamiento y refinación que se encuentran en la industria de aceites esenciales.

El escarabajo rojo de la harina, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera), es uno de los principales insectos que afectan la calidad y cantidad de los granos, cereales y productos agrícolas que son almacenados para el consumo humano. Las pérdidas reportadas en el mundo, alcanzan el 40% al año [3]. Para el control de plagas en granos almacenados se emplean diferentes insecticidas sintéticos;

sin embargo, su uso conlleva efectos desfavorables, tales como: contaminación de aguas y suelos, eliminación de insectos benéficos y toxicidad para las especies expuestas y los consumidores [4, 5]. Adicionalmente, los insectos han adquirido resistencia contra la mayoría de los plaguicidas sintéticos, lo cual disminuye su eficacia en la protección de los granos almacenados [6].

Una alternativa al consumo de los plaguicidas sintéticos, es el uso de los aceites esenciales (AE), los cuales actúan como bioinsecticidas, ya que contienen compuestos que presentan propiedades repelentes. AE obtenidos de plantas de las familias Verbenaceae (*L. origanoides*) y Poaceae (*C. martinii*), han mostrado buenos resultados de repelencia contra *T. castaneum* [7], sin embargo, no se conoce con precisión, cuál o cuáles componentes de la mezcla, son los que presentan la mayor actividad repelente.

En el presente capítulo, se presentan los resultados de los procesos de destilación y fraccionamiento de los aceites esenciales de citronela (*C. nardus*) y orégano de monte (*L. origanoides*), empleando la destilación fraccionada con columna giratoria (*Spinning Band Distillation*). Para ambos AE, se obtuvieron fracciones de diferente composición química, las cuales fueron sometidas a estudios de actividad repelente, por el método de área de preferencia, frente a *Tribolium castaneum*, con el propósito de evidenciar qué fracción presentaba la mayor actividad biológica. Adicionalmente, se estudió el efecto repelente y composición química de aceites esenciales de *Lippia alba*, obtenidos de diferentes regiones de Colombia.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. Destilación

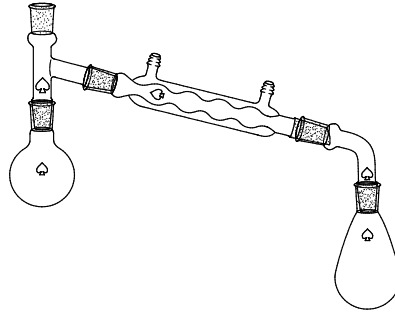
La destilación es una técnica que consiste en la separación de los componentes de una mezcla, por sus diferencias en los puntos de ebullición. En esta técnica, se recolectan separadamente, el líquido destilado y el residuo. En un sistema cerrado existe un equilibrio de fases entre el líquido y el vapor del sistema. En el momento en que se realiza una destilación, el vapor es removido del sistema y condensado como destilado. Así, la condición de equilibrio cambia y el sistema poco a poco va enriqueciendo la fase vapor con los componentes más volátiles que van siendo removidos simultáneamente del sistema para romper nuevamente el equilibrio. A medida que el vapor se va enriqueciendo respecto a un componente volátil, mejor será la eficiencia de separación [8].

Hay dos métodos generales de destilación, continuo y discontinuo (por lotes). La operación en continuo se da comúnmente a nivel industrial, cuando el material a destilar puede ser cargado continuamente sin interrumpir la destilación. La operación por lotes predomina en trabajo de laboratorio e industrialmente, cuando la cantidad de material a destilar no es suficiente para mantener un proceso en continuo.

#### 1.1.1. Destilación por lotes.

El proceso de destilación por lotes consiste en destilar una cantidad específica de una mezcla líquida y obtener un destilado. En la **Figura 45** se muestra el montaje para una destilación simple en modo discontinuo a escala laboratorio, el cual consiste en un recipiente unido a un condensador y un recipiente recolector. Hay dos tipos de destilación por lotes; la destilación simple que se emplea con

frecuencia en montajes de laboratorio cuando la diferencia de los puntos de ebullición de los componentes a separar es mayor de 30 °C. y la destilación con rectificación o columna de fraccionamiento cuando la diferencia es menor de 30°C.

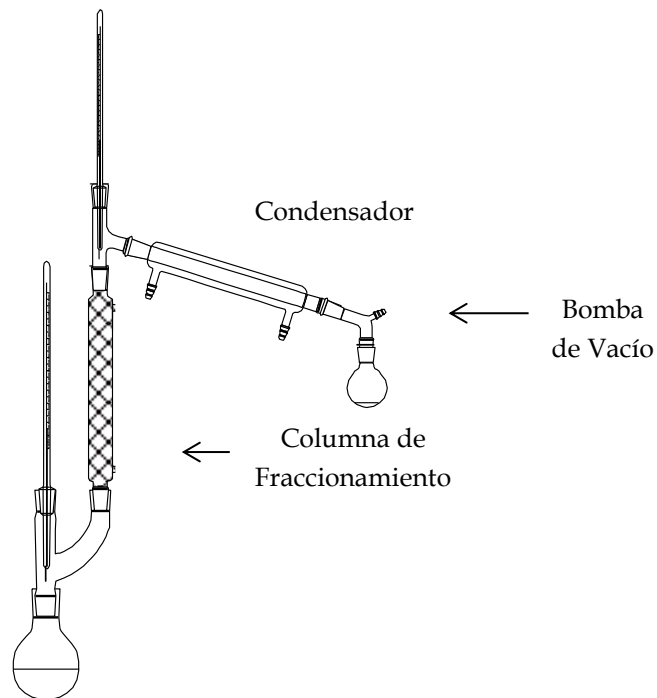


**Figura 45.** Montaje de destilación por lotes simple [8].

La destilación con fraccionamiento consiste en una serie de volatilizaciones y condensaciones continuas en una misma columna; esto con el fin de enriquecer, respecto a un componente volátil específico, el vapor que es removido en la parte superior de la columna. Cuando la mezcla volatilizada es enfriada a tal punto que los componentes con mayor punto de ebullición son condensados, ocurre un enriquecimiento de los componentes con menor punto de ebullición en fase vapor los cuales son retirados de la columna. El montaje empleado a nivel de laboratorio se presenta en la **Figura 46**.

La destilación discontinua con fraccionamiento se emplea para la obtención de productos en un rango de composición específica. Inicialmente se carga el líquido a destilar y la columna es operada bajo reflujo total hasta encontrar un estado estacionario. Una vez alcanzado este estado, parte del destilado removido del sistema es devuelto a la columna; la relación de lo que se devuelve y lo que se remueve de la columna se denomina relación de reflujo (R). Esta condición se mantiene hasta extraer la mayor cantidad de destilado posible, cuya composición sea acorde a la deseada. Además, es posible retirar fracciones, al recibir el

destilado en diferentes recipientes según la composición del destilado y/o de la temperatura de destilación.



**Figura 46.** Montaje a nivel de laboratorio para la destilación fraccionada con adaptación para vacío [8].

En las destilaciones por lotes la columna opera como una sección de enriquecimiento. A medida que avanza el proceso de destilación, la composición del material destilado disminuye en el componente más volátil, mientras que el destilado combinado alcanza la composición deseada [9]. Para la destilación por lotes de sistemas multicomponentes la complejidad del problema depende de cuántos componentes están involucrados, qué producto se desea separar y el grado de separación que se requiera. El problema del diseño se hace más fácil cuando el componente más volátil es el que se retira de la columna con un grado más alto de pureza que el siguiente componente más pesado que compone la mezcla [10]. Como casos de estudio se tomaron los aceites esenciales de *Cymbopogon nardus*, cuyos componentes de interés que requieren ser retirados

de la columna son citronelol y citronelal; y el AE de *Lippia origanoides*, cuyos componentes de interés son timol y carvacrol.

### **1.1.2. Destilación a presión reducida**

Se usa para destilar sustancias a temperaturas por debajo de su punto normal de ebullición. Muchas sustancias no pueden purificarse por destilación a la presión ordinaria debido a que se pueden generar procesos de descomposición o polimerización, a temperaturas cercanas a su punto de ebullición normal. En otros casos, la destilación requiere grandes inversiones de energía. Como alternativa a estas dificultades, se emplea el método de destilación a presión reducida, en el cual, generalmente, se utilizan columnas empacadas, pero también existen otros tipos de columna como lo son: las de platos y las de banda rotatoria [11].

Para el caso de estudio, el fraccionamiento de los AE de citronela y orégano de monte, se realizó mediante destilación fraccionada a presión reducida, empleando un equipo, cuyo principio operacional es la destilación con columna rotatoria, “*Spinning Band Distillation*” [12].

### **1.1.3. Destilación fraccionada**

La destilación fraccionada o rectificación se caracteriza porque una fracción del vapor que sale por la parte superior de la columna de destilación es condensada y reintroducida en esta como reflujo. Puede tratarse de un proceso discontinuo o continuo, siendo esto último lo más usual. La operación se lleva a cabo en columnas de rectificación, en cuyo interior se ponen en contacto una fase líquida y una fase vapor, que fluyen en contracorriente. En el interior de la columna se produce una serie de vaporizaciones y condensaciones sucesivas a través de las cuales se obtiene la separación deseada. Se habla de columnas de relleno o de

pisos según las fases que se pongan en contacto de forma continua o discontinua [13].

Una columna de rectificación sencilla consta de tres corrientes externas al sistema: el destilado, que sale por la parte superior o cabeza de la columna, el residuo, que abandona la columna por la zona inferior o cola, y el alimento, que se introduce entre ambas. La columna se complica a medida que se introducen otros alimentos o se extraen diferentes productos a lo largo de la misma, como es el caso de la destilación del petróleo. También, suele constar de un condensador, que puede ser total o parcial, situado en la cabeza de la columna, y de una caldera en la base, que suministra la energía necesaria para llevar a cabo la separación, generando el vapor que asciende por la columna e intercambia materia con el reflujo.

En la sección de la columna que queda por encima del alimento, conocida como sección de enriquecimiento, se produce un aumento de la concentración en el vapor de los componentes más volátiles, mientras que la sección que queda por debajo del alimento, o sección de agotamiento, el líquido se empobrece en estos componentes.

Para que una columna de rectificación funcione es necesario que exista una corriente de líquido que alimente a la última etapa de la columna, desde la cual se produce el vapor que sale por la cabeza de esta como producto. La corriente de reflujo ayuda a la separación de la mezcla conforme va descendiendo piso a piso por la columna. En efecto, esta corriente absorbe los componentes más pesados de forma que en el vapor se concentran los más volátiles. El reflujo se produce por condensación de todo o parte del vapor que sale por la cabeza de la columna y la posterior introducción de una parte del líquido condensado de nuevo a la columna. Se conoce como relación de reflujo al cociente entre el caudal de reflujo, y el caudal del producto final obtenido o destilado. Una columna de rectificación tiene

dos límites de operación basados en la relación de reflujo: el reflujo mínimo y el reflujo total. Bajo condiciones de reflujo mínimo, no vuelve suficiente líquido a la columna como para enriquecer el vapor que sube por la misma respecto a los componentes más ligeros: en estas condiciones no varía la composición de todos los componentes de un piso a otro, ya que las corrientes que se cruzan entre etapas se encuentran en equilibrio y por lo tanto no se produce transferencia de materia entre ellas; para obtener la separación deseada es necesario un número infinito de pisos teóricos, en cada uno de los cuales se produjera un cambio infinitesimal en las composiciones. La operación de la columna a reflujo mínimo o por debajo de este es imposible. El otro límite de operación basado en el reflujo se conoce como reflujo total. En este caso el número de pisos requeridos para alcanzar una separación dada es el mínimo (las dos fases que se cruzan entre etapas tienen la misma composición), pero no se obtiene producto, ya que todo el destilado se devuelve a la columna como reflujo.

Es evidente que cualquier columna debe funcionar con una relación de reflujo intermedia entre el mínimo y el reflujo total, siendo el factor económico el determinante de la relación de reflujo elegida.

El objetivo fundamental de la destilación es la separación de dos o más componentes de una mezcla dada, en unos productos que han de cumplir ciertas especificaciones. En una columna sólo se pueden separar cuantitativamente dos componentes. Así, para separar completamente una mezcla de  $c$  componentes hacen falta  $c-1$  columnas. Si se trata de una mezcla binaria, el grado de separación especificado se podrá conseguir con una sola columna. Si se trata de una mezcla de tres o más componentes, sólo se podrá especificar el grado de separación entre dos de ellos, o bien haría falta más de una columna de rectificación. Sin embargo, en ocasiones lo que se pretende es dividir un alimento en dos fracciones con diferente composición, y entonces dichas fracciones pueden considerarse como pseudocomponentes y sólo será necesaria una columna [13].

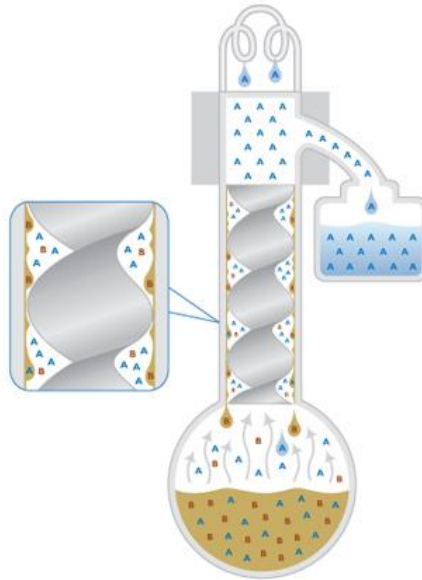
#### 1.1.4. Destilación fraccionada con columna giratoria (*Spinning band distillation*).

Este tipo de destilación se utiliza para hacer destilaciones al vacío y con movimiento giratorio. En el interior de la torre existe un eje que gira a gran velocidad permitiendo el contacto continuo entre el líquido y el vapor en las paredes del eje (Véase **Figura 47**). El sistema genera una película del solvente descendente que se evapora fácilmente, y se evitan sobrecalentamientos que puedan resultar en degradación térmica. El número de platos teóricos en estas columnas depende de las condiciones de operación como presión y relación de reflujo.

Las principales características de este sistema de destilación son las siguientes:

- **Alta pureza.** El alto número (>30) platos teóricos de la columna permite obtener destilados con alta pureza. En sabores, fragancias, productos naturales y aceites esenciales, incluso un pequeño aumento en la pureza, se puede traducir en un gran incremento en el valor económico.
- **Baja retención.** En la columna *spinning band distillation* se quedan menos de 1,5 mililitros después que la destilación se ha completado. Esto quiere decir que se pierde muy poca cantidad de material valioso en el proceso de purificación.
- **Baja caída de presión.** La caída de presión desde la parte superior hasta el fondo, es muy baja, comparada con una torre empacada. Esto puede resultar ventajoso cuando se trabaja con sustancias muy sensibles a cambios bruscos de temperatura o presión.
- **Automatización.** El proceso puede ser totalmente automático; una vez que los

parámetros deseados están programados, la columna puede operar sin intervención del operador [14].



**Figura 47.** *Spinning band distillation* (Tomado de [www.brinstrument.com](http://www.brinstrument.com))

#### 1.1.4.1. *Spinning Band*.

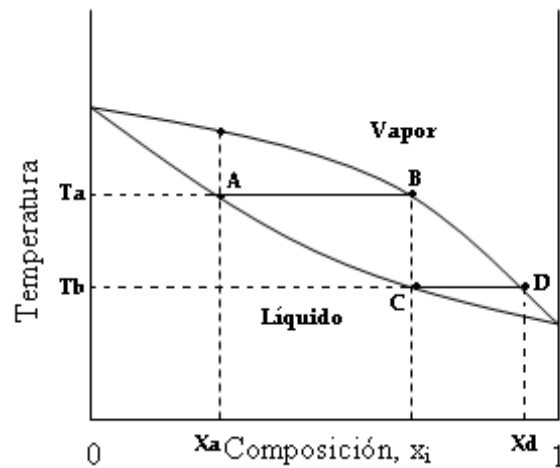
Hay dos tipos principales de columnas de *spinning band*, de teflón y de metal. La de teflón es la más común y tiene un máximo de 50 platos teóricos a presión atmosférica. Son adecuadas para destilaciones que lleguen hasta los 225°C; el teflón no es adecuado para temperaturas superiores a esta, ya que se vuelve suave y debido a la fuerza ejercida por los giros se puede partir.

En situaciones donde la temperatura de ebullición esté por encima de los 225°C se puede usar una columna *Spinning band* metálica; el metal más común usado para fabricar *spinning bands* es el Monel. Este es un acero inoxidable con un alto contenido de molibdeno que le confiere una alta resistencia a la corrosión que puedan causar las sustancias con las que se trabaje [14].

### 1.1.5. Principios de la destilación fraccionada

Para la separación de una mezcla de compuestos volátiles por destilación fraccionada se requiere que la composición de la fase vapor de la mezcla volátil difiera de la composición de la fase líquida de la mezcla. La facilidad con la que se puede llevar a cabo la separación de los componentes volátiles de una mezcla está relacionada con la diferencia en la concentración del(los) analito(s) de interés en las fases líquida y vapor; mientras la concentración en fase vapor sea significativamente mayor que en la fase líquida el proceso de separación se podrá llevar a cabo fácilmente [15]. La relación de composición de un analito en las fases líquida y vapor de una matriz puede ser determinada de forma experimental, midiendo las concentraciones en equilibrio de ambas fases, lo cual es de gran ayuda en el diseño de procesos de destilación fraccionada. En el diseño de una columna para un propósito específico, es necesario conocer la curva de equilibrio líquido-vapor para el sistema a destilar. La curva de equilibrio es graficada luego de una serie de determinaciones individuales de la concentración del analito de interés en las fases vapor y líquida en el equilibrio. Para la construcción de estas curvas, las determinaciones se realizan en mezclas que varían su composición, partiendo del compuesto puro de menor punto de ebullición, hasta alcanzar una composición donde solo se encuentre el compuesto de mayor punto de ebullición. En conclusión, la determinación de la curva de equilibrio consiste en establecer la composición de muestras de vapor condensado y del líquido en equilibrio.

**1.1.5.1. Diagramas de temperatura – composición.** En los diagramas de temperatura – composición (**Figura 48**) se relacionan la composición de las fases líquida y vapor a diferentes temperaturas y a una presión establecida (presión constante).

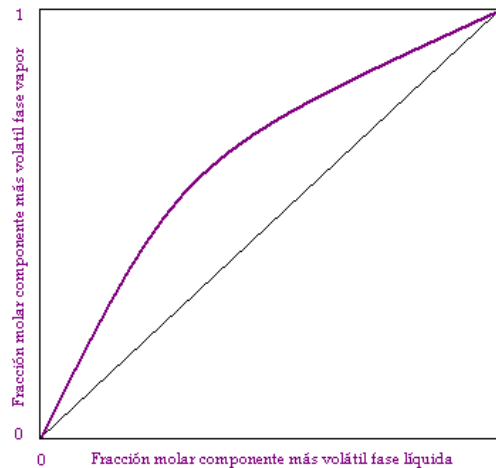


**Figura 48.** Diagrama de Temperatura-Composición para un sistema binario.

El diagrama anterior representa un sistema ideal de dos componentes, donde la línea inferior del diagrama determina la composición de la fase líquida mientras que la línea superior define la composición de la fase vapor del componente más volátil. Los puntos en la región media describen estados en los cuales coexisten en equilibrio líquido y vapor. La línea de unión (línea AB de la **Figura 48.**) de la región líquido-vapor comunica las composiciones del vapor y del líquido que coexisten a esa temperatura ( $T_a$ ). Para los procesos de destilación fraccionada las etapas que se realizan están dadas en la **Figura 48** por las líneas AB, BC y CD. La línea AB indica las composiciones en equilibrio a la temperatura A ( $T_a$ ) de ambas fases (líquido y vapor). La línea BC consiste en la condensación del vapor de composición inicial hasta una temperatura B ( $T_b$ ) para obtener un líquido de esta misma composición. Simultáneamente este líquido está en equilibrio con vapor cuya composición está dada por  $x_d$  [16]. De esta manera se pasa de un líquido cuya composición inicial es  $x_a$  a un líquido de composición que es  $x_d$ , enriqueciéndolo en el (los) componente (s) más volátil (es). Este proceso realizado consecutivamente es la base de la destilación fraccionada, donde cada etapa consiste en condensación y re-evaporación.

**1.1.5.2. Diagramas de equilibrio líquido – vapor.** Para la elaboración de los diagramas de equilibrio líquido – vapor se utiliza la misma información que en los diagramas de temperatura – composición, solo que se grafica composición de vapor vs composición de líquido a temperatura o presión constante como se muestra en la **Figura 49**.

En este tipo de diagramas se grafican directamente las parejas de composiciones en equilibrio. La línea a 45° representa cuando el vapor y el líquido tienen la misma composición [16]. Estos diagramas son de gran importancia para el diseño de procesos destilativos.



**Figura 49.** Diagrama equilibrio líquido – vapor a presión constante para un sistema de dos componentes.

## 1.2. Destilación fraccionada de aceites esenciales – adición de valor

La composición química de los aceites esenciales depende en gran medida de las condiciones bajo las cuales se cultivan las plantas. El clima, el suelo y la época de corte son sólo algunos de los factores que pueden influir sobre la composición del aceite. En la comercialización de los AE es importante garantizar al comprador un

producto con unas características específicas que cumplan unos estándares de calidad previamente estipulados, y que exista estabilidad en la composición química. De allí la importancia de obtener un aceite esencial de composición uniforme y reproducible, sin importar el origen del material vegetal. Para esto, dentro de la cadena productiva de los AE, una etapa decisiva es la rectificación. El proceso de rectificación unifica la composición del AE por métodos destilativos, posibilita la remoción de ciertos componentes indeseados del aceite, así como también permite obtener fracciones ricas en ciertos compuestos de interés.

La rectificación de los AE permite separar y/o concentrar algún o algunos componentes, así como estandarizar la composición del mismo, lo cual es primordial al momento de su comercialización. Sin un suministro constante en la composición química de los aceites esenciales, es muy difícil penetrar el mercado. Esto se debe a que los AE son materias primas de varios productos finales (cosméticos, farmacéuticos, de aseo), los cuales deben garantizar sus propiedades organolépticas y funcionales entre lotes de producción diferentes. Es por ello, que la rectificación o fraccionamiento de los AE proporciona un mayor valor agregado, comparado con la comercialización de los AE crudos, los cuales varían su composición química dependiendo de las condiciones agroecológicas de los cultivos y al proceso mismo de la destilación, tal como se pudo apreciar con los resultados de optimización presentados en el Capítulo 1.

Adicionalmente, mediante el proceso de rectificación se pueden obtener fracciones de los aceites esenciales, con propiedades biológicas superiores a los aceites esenciales crudos, lo que genera un mayor valor, dependiendo de la aplicación final del destilado.

El desempeño de columnas de destilación a presión reducida fue estudiado en el aceite esencial de citronela y naranja. En un equipo de destilación discontinuo se evaluó la influencia de la presión entre 1 a 20 mbar y relaciones de reflujo de 1:1 a 10:1. Para el aceite esencial de citronela fue posible eliminar el limoneno, una

fracción de destilado rica en citronelal y una fracción de fondos enriquecida en citronelol y geraniol. Para el aceite esencial de naranja el fraccionamiento permitió la eliminación completa del limoneno a una presión de 1 mbar [17]. Para la destilación fraccionada a presión reducida (10 Torr) del aceite esencial de *Tsuga canadensis* se reportó la concentración de 11 componentes; triciclono,  $\alpha$ -pineno, canfeno,  $\beta$ -pineno, mirceno,  $\alpha$ -felandreno, limoneno,  $\alpha$ -tujona, canadero, acetato de bornilo y un alcohol terciario no identificado. Estas fracciones se obtuvieron por debajo de 105 °C [18]. En otro estudio, a partir de la rectificación del aceite esencial de mirto en una columna de 3 m rellena de anillos de vidrio se logró la obtención de 3 fracciones concentradas en: la primera  $\alpha$ -pineno y 1,8-cineol, la segunda en 1,8-cineol y la tercera en acetato de mirtenilo [19].

Este método de separación permite evaluar aquellos componentes de la mezcla que brindan alguna actividad biológica. Estudios realizados sobre aceites esenciales de *C. nardus* permitieron inferir que el mirceno, elemol o metil-iso-eugenol son los componentes principales responsables de la actividad letal frente a las larvas *Culex quinquefasciatus* [20]. En otra investigación, las fracciones obtenidas por destilación fraccionada a presión reducida por lotes de aceites esenciales de eneldo, cilantro y eucalipto, revelaron que la actividad antimicrobiana difiere y excede en algunos casos a la actividad de los aceites esenciales crudos. Esto sugiere la existencia de interacciones complejas entre los compuestos activos [21].

El uso de destilación fraccionada en columna giratoria a presión reducida (0,8 Torr) seguido de un proceso de cristalización permitió la separación de ésteres metílicos de longitudes de cadena de 14-18 con un 95% de pureza a partir de linalina [22]. Este tipo de columnas permite obtener gran número de platos teóricos en diseños compactos con altas eficiencias. Su uso en aceites esenciales permite la concentración o aislamiento de sustancias de interés para su posterior estudio en ensayos de actividad biológica.

La destilación fraccionada por lotes del enebro (*Juniperus communis*) [23], en una columna de 36 etapas teóricas, operando a presión reducida (8-3.35 kPa), permitió la obtención de 14 fracciones, donde en las 6 primeras se aisló el  $\alpha$ -pineno, con una concentración mayor de 98,3% en masa. En las otras fracciones, se logró concentrar sabineno y mirceno. A partir del orégano mexicano, Castillo y colaboradores [24], lograron obtener una fracción enriquecida en timol y carvacrol del 74%, a partir de la hidrodestilación fraccionada.

Una de las aplicaciones más importantes a nivel comercial, en donde se emplea la destilación fraccionada, es la desterpenación de los AE de cítricos, a saber, mandarina, limón y naranja. Con la desterpenación se logran mejorar las características organolépticas y calidades de los AE, que a su vez elevan su costo. Por ejemplo, el AE de naranja crudo o *single fold* cuyo costo varía entre 2-7 US\$/kg, puede alcanzar un precio hasta de US \$75/kg (AE diez fold o ten fold), cuando es removida la mayor cantidad de terpenos [25, 26].

Otro ejemplo interesante es el aceite esencial de ylang-ylang, el cual se destila de las flores del árbol de *Cananga odorata* (Familia Anonáceae). Este aceite se utiliza en los perfumes finos "*haute gamme*". La producción del aceite está concentrada en las islas Comores, en el Océano Índico. Francia es el principal comprador del aceite de Comores, Mayotte y Madagascar (isla Nosy-Bé), también es el principal exportador de este aceite a los EE.UU., uno de los grandes mercados de fragancias. Tradicionalmente, el aceite esencial de ylang-ylang se produce (se fracciona) en 5 categorías: (1) Supremo Extra (*Extra-Supérieur*); (2) Extra (*Extra*); (3) Premier grado (*Première*); (4) Segundo grado (*Deuxième*) y, (5) Tercer grado o categoría (*Troisième*). El aceite producido en Comores es el más completo de los de todos los orígenes. Indonesia produce "cananga oil", aceite de ylang-ylang crudo, no fraccionado, que compite con el aceite de Tercera Categoría. La producción total mundial del aceite de ylang-ylang de todos los orígenes se estima en 100 toneladas por año; la producción del aceite en las Comores varía en el rango de 50 a 65 toneladas anuales, en Mayotte, 10 – 20 toneladas, mientras que

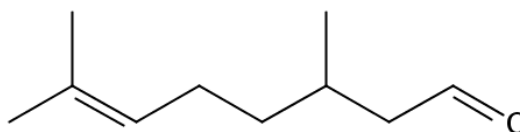
en Madagascar se destilan de 20 a 25 toneladas. La demanda en el mercado del aceite de ylang-ylang es estable, fuerte, los precios del aceite se han incrementado ligeramente desde 2012. Los aceites de más baja calidad (*Troisième*), poseen precios de alrededor de 60 EUR/kg, y los aceites de calidad Extra tienen precios que pueden efectivamente variar de 100 a 120 EUR/kg [25, 26].

### 1.3. Componentes mayoritarios de los aceites esenciales.

A continuación se presenta una breve descripción de los componentes mayoritarios presentes en los AE de citronela y orégano de monte, de interés por sus propiedades biológicas y organolépticas. En la **Tabla 43**, se presentan algunas propiedades de estos compuestos.

#### 1.3.1. Citronelal

El citronelal (**Figura 50**) es un monoterpenoide, metabolito secundario principal presente en el aceite esencial de citronela (*C. nardus*). Se usa principalmente, como aromatizante en jabones, champúes, productos de aseo, en perfumes y principalmente, como repelente de insectos [25]



**Figura 50.** Estructura del citronelal (3,7-dimetil-6-octenal)

**Tabla 43.** Propiedades fisicoquímicas de citronelal, citronelol, timol y carvacrol.

Propiedad	Compuesto			
	Citronelal	Citronelol	Timol	Carvacrol
CAS	106-23-0	106-22-9	89-83-8	499-75-2
Nombre IUPAC	3,7-dimetil-6-octenal	3,7-dimetil-6-octen-1-ol	5-metil-2-(metiletil)fenol	2-metil-5-(metiletil)fenol
Formula molecular	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O
Peso molecular, g/mol	154.25	156.27	150.22	150.22
Densidad, g/cm <sup>3</sup> (20°C)	0.8573	0.8599	0.9699	0.9772
Punto de fusión, °C	No disponible	<25	51	3-4
Punto de ebullición, °C (@760 mmHg)	207	225	232	237-238
Índice de refracción (20°C)	1.4460	1.4559	1.5227	1.52295
Solubilidad en agua	Parcialmente soluble	106 mg/L	Poco soluble	Poco soluble
Nota aromática	Limón	Rosas dulces	Tomillo	Orégano, picante

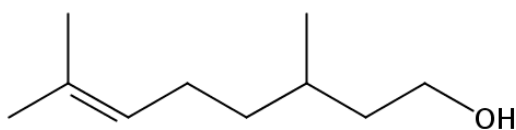
El aceite esencial de citronela, es uno de los más importantes en el mercado mundial, debido a su alto contenido de citronelal, el cual es aislado del AE para su posterior reducción a citronelol. La citronela se encuentra dentro de los 20 AE más comercializados en el mundo, ya que es una fuente importante de citronelal, citronelol y geraniol, que se emplean principalmente, en perfumería, productos de

aseo personal y productos industriales [27]. Este AE se produce principalmente en las islas de Java y Ceilán (Sri Lanka).

La principal diferencia entre los tipos de aceite de Ceilán y Java es la proporción relativa de geraniol y citronelal. El aceite de citronela de Java se caracteriza por una alta proporción de geraniol (11-13%) y citronelal (32-45%), lo que lo hace una fuente importante para derivados tales como citronelol e hidroxicitronelal, que se utilizan ampliamente en la composición de perfumes de alta gama. Otros componentes principales del aceite son el acetato de geraniol (3% -8%) y limoneno (1% - 4%).

### 1.3.2. Citronelol

El citronelol (Véase **Figura 51**) es un alcohol terpénico utilizado en cosméticos, fragancias finas, en la elaboración de champú, jabones de tocador y en algunos productos de tipo no cosmético como limpiadores y detergentes [28]. La utilización mundial de esta sustancia es de 10 a 100 toneladas métricas anuales [28]. Las fuentes de este interesante compuesto pueden ser tanto de origen sintético, por medio de la reducción del citronelal, así como de origen natural, pues el citronelol se presenta en algunos AE del género *Cymbopogon*, principalmente, en la citronela (*C. nardus*) proveniente de Java y Sri Lanka. Es un líquido aceitoso amarillo pálido con aroma descrito como dulce, de rosa, floral y mohoso. Su olor a rosa, lo hace uno de los alcoholes terpénicos comercialmente más importantes.

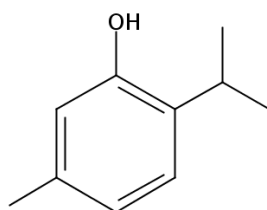


**Figura 51.** Estructura del citronelol (3,7-dimetil-6-octen-1-ol)

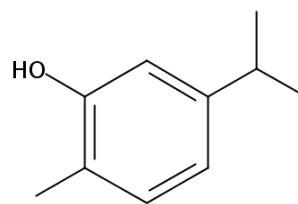
Actualmente, debido al gran interés que existe por los productos naturales, el aislamiento de compuestos de alto valor presentes en los AE por medio de la destilación fraccionada es un campo en creciente desarrollo [29], sin embargo, esta técnica presenta ciertas limitaciones ya que la presencia de otros compuestos con puntos de ebullición cercanos, algunas reacciones de isomerización y la labilidad de ciertos componentes, son algunos factores interferentes [30]. Particularmente, el citronelol en el AE de *Cymbopogon nardus* se encuentra junto con el geraniol, un compuesto que dificulta su aislamiento debido a la cercanía de sus puntos de ebullición. Algunos autores ya han reportado esta dificultad en el aislamiento del citronelol [31-33], no obstante existen algunas alternativas que involucran ciertos cambios químicos para lograr la separación de dichos compuestos.

### 1.3.3. Timol y carvacrol

El timol y el carvacrol (Véanse **Figuras 52-53**) son dos isómeros, monoterpenos oxigenados, de tipo fenilpropanoide, que difieren entre sí, en la posición del grupo hidroxilo en el anillo fenólico. El timol es un sólido cristalino, de olor pungente [34]. Presenta una gran ventaja al aislarlo, de sus fuentes naturales. Este compuesto se usa mucho para la fabricación del mentol, por hidrogenación. Se disuelve fácilmente en bases formando sales [35]. El carvacrol es un líquido viscoso de color amarillo claro. Ambos compuestos son ligeramente solubles en agua y muy solubles en alcoholes y solventes orgánicos [36]. Estos compuestos se pueden encontrar en los aceites esenciales de especies como *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare*, *Satureja montana*, *Satureja hortensis*, *Lippia origanoides*, entre otras. El timol y el carvacrol presentan propiedades antimicrobianas, antioxidantes, antifúngicas, repelentes, antivirales, hepatoprotectora, anticarcinogénicas, entre muchas otras [36]. El timol se emplea en formulaciones de enjuagues bucales, como principio activo antibacterial.



**Figura 52.**Timol



**Figura 53.** Carvacrol

#### **1.4. Actividad repelente de aceites esenciales.**

Por varios años, los insectos han sido un problema asociado al almacenamiento de alimentos y a la transmisión de enfermedades en los humanos. La infestación de la comida almacenada por parte de algunos artrópodos, puede ocasionar problemas a la salud, debido a que los insectos contaminan los alimentos con sus excrementos [37]. El escarabajo rojo de la harina, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera), es uno de los principales insectos que afectan la calidad y cantidad de los granos, cereales y productos agrícolas que son almacenados para el consumo humano. Las pérdidas reportadas en el mundo, alcanzan el 40% al año [3]. Para el control de plagas en granos almacenados se emplean diferentes insecticidas sintéticos. Sin embargo, su uso conlleva efectos desfavorables, tales como: contaminación de aguas y suelos, eliminación de insectos benéficos y toxicidad para las especies expuestas y los consumidores [4-5]. Adicionalmente, los insectos han adquirido resistencia contra la mayoría de los plaguicidas sintéticos, lo cual disminuye su eficacia en la protección de los granos almacenados [6].

Los repelentes de artrópodos se definen como sustancias químicas que causan en un artrópodo movimientos orientados lejos de su fuente [38]. También se definen como sustancias que actúan de forma local o a distancia, disuadiendo a un artrópodo de volar, aterrizar o picar la piel humana o animal [39]. El DEET (N,N-dietil-3-metilbenzamida) ha sido el repelente de artrópodos más utilizado durante

más de cinco décadas y está disponible en una amplia gama de concentraciones y de los productos que se pueden aplicar a la piel o la ropa [40]. DEET es un repelente de amplio espectro que es muy eficaz contra varias especies de mosquitos [41,42], moscas y los chinches [40]. DEET es también eficaz contra las garrapatas, pero generalmente se considera que es menos repelente que la permetrina o piperidinas [43,45].

Un repelente ideal debe proporcionar protección contra un amplio espectro de artrópodos para al menos 8 h, que no sea tóxico, no irritante, inodoro y no grasoso [38]. Este repelente aún no ha sido desarrollado. Normalmente, el desarrollo de los repelentes ha sido impulsado por la necesidad de proteger a las tropas militares contra artrópodos hematófagos, los cuales son vectores de enfermedades humanas. El aumento de los viajes internacionales y el movimiento de humanos de las zonas urbanas a las zonas rurales, expone a muchas personas a los patógenos por vectores artrópodos, lo cual ha aumentado el interés público en los repelentes. El desarrollo de un repelente, implica una sofisticada química computacional y un modelamiento molecular tridimensional, así como la evaluación tradicional de compuestos con base en pruebas biológicas [38].

Una alternativa al consumo de los plaguicidas sintéticos, es el uso de los aceites esenciales (AE), los cuales pueden actuar como controles naturales, ya que contienen compuestos que presentan propiedades repelentes. Muchos aceites esenciales han sido evaluados para el control de diferentes plagas de grano almacenado [39,46]. AE obtenidos de plantas de las familias Verbenaceae (*L. organoides*) y Poaceae (*C. martinii*), han mostrado buenos resultados de repelencia contra *Tribolium castaneum*, a concentraciones entre 0.02 y 0.2  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ . En este rango, los AE mostraron una mayor repelencia que el producto sintético IR3535-Merck® (etilbutilacetilaminopropionato) [7].

Aceites esenciales de especies de los géneros *Cymbopogon*, *Ocimum* y *Eucalyptus*, han sido empleados en la preparación de formulaciones comerciales.

Varios extractos y aceites esenciales aislados de especies del género *Cymbopogon* han sido evaluados frente a distintas clases de artrópodos. *Cymbopogon excavatus* presentó una repelencia del 100% por 2 horas, cuando fue evaluado frente a *Anopheles arabinensis*, disminuyendo la actividad hasta un 59.3% después de 4 horas de exposición. El AE de *C. winterianus* mezclado con vainillina al 5% resultó en una protección del 100% por 6 horas frente a las especies de mosquito *Aedes aegypti*, *A. dirus* y *Culex quinquefasciatus*, resultados comparables con los observados con una formulación de N,N-dietil-3-metilbenzamida (DEET) al 25%. El aceite de *C. martinii* proporcionó total repelencia por 12 horas frente a mosquitos de la familia Anopheles en una prueba de campo. *C. citratus* ha sido formulado exitosamente en solución de parafina líquida [39].

Algunos componentes de los aceites esenciales, tales como:  $\alpha$ -pineno, eugenol, limoneno, terpineol, citronelol, citronelal, alcanfor y timol, han sido reportados con propiedades repelentes. Dentro de los sesquiterpenos, el  $\beta$ -carofileno es el más citado como un fuerte repelente frente a *Aedes aegypti*. Las propiedades repelentes de algunos AE regularmente parecen estar asociadas con la presencia de monoterpenos y sesquiterpenos; otros autores han encontrado que el fitol, un alcohol lineal diterpénico tiene una actividad repelente alta frente al *Anopheles gambiae*. Además, los compuestos oxigenados: alcohol fenil etílico,  $\beta$ -citronelol, alcohol cinnamílico y geraniol, aislados del aceite esencial de *Dianthus caryophyllum*, mostraron actividad repelente contra garrapatas *Ixodes ricinus* [47].

También se ha observado que compuestos que contienen el grupo funcional hidroxilo dentro de su estructura, han resultado más activos que sus análogos hidrocarbonados [39]. Otros estudios indican que terpenoides con dos grupos funcionales poseen una actividad repelente mayor. Por ejemplo, la actividad repelente de 20 terpenoides sintetizados con dos grupos sustituyentes/funcionales (uno cargado negativamente, con una función éster, éter o alcohol y otro positivamente, con una función alcano) estuvo asociada con la presencia de

cargas parciales positivas en el extremo de las moléculas, caracterizando la naturaleza electrofílica del grupo; la cual a su vez podría modular las interacciones de estos compuestos con el receptor [39,47].

El momento dipolar (MD) y el punto de ebullición han sido relacionados con la actividad repelente. También se ha demostrado que los compuestos repelentes de mosquitos deben poseer una apropiada presión de vapor y punto de ebullición, para mantener la duración del tiempo de contacto del mosquito con el repelente, afectando de esta forma los quimiorreceptores olfativos del mismo [39,47].

#### **1.4.1. Métodos para el análisis de la repelencia.**

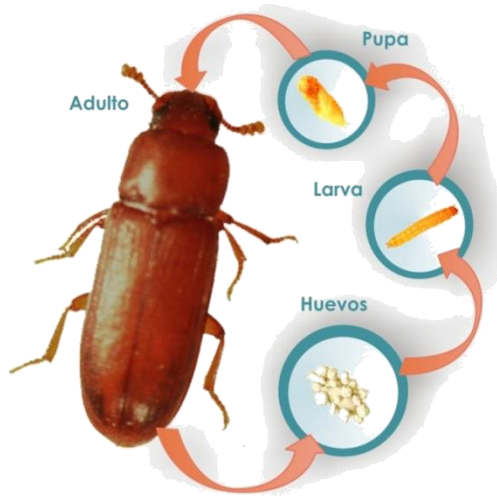
Un problema en la investigación y desarrollo de nuevos repelentes, es la falta de un método de ensayo normalizado. Las primeras búsquedas de repelentes buscaban identificar rápidamente un amplio espectro de propiedades: que no sean irritantes, que no sea necesario usar plastificantes, que presenten eficacia y una larga duración. Sin embargo, se presta poca atención al desarrollo de un método de ensayo normalizado [48]. Incluso, hoy en día, una gran variedad de métodos se utilizan para probar repelentes para diferentes artrópodos. Los estudios difieren en el periodo de tiempo en el cual se examina la repelencia, las etapas de vida de las especies utilizadas, la formulación y la cantidad de ingrediente activo ensayado, así como la aplicación del repelente en diferentes tipos de materiales que pueden o no afectar la volatilización del repelente; el uso de un huésped animal o no; la variabilidad en la consideración de repelencia táctil versus el espacio de repelencia; y los enfoques de ensayos de campo en comparación con los de laboratorio. Estas variaciones en la metodología de las pruebas y las condiciones de ensayo hacen que la comparación entre los estudios sea problemática y difícil de relacionar con el uso del mundo real de los repelentes para la protección personal. En una revisión Neiro *et al.* [39], mostraron que los métodos de

evaluación pueden variar dependiendo de la clasificación, por órdenes, de los insectos evaluados. En especies del orden Dipterae, el método más popular consiste en la disolución de los AE en un volumen de solvente determinado y aplicado uniformemente en el brazo de un voluntario, mientras que el otro brazo es tratado sólo con el solvente, esto para ser tomado como control. En insectos del orden Coleóptera, la actividad repelente de los AE es usualmente evaluada mediante el desarrollo de ensayos en cajas de Petri. Un papel filtro es dividido en dos mitades. En la primera mitad, la cantidad de AE es disuelta en un solvente orgánico volátil y adicionada uniformemente; y en la otra, el mismo volumen de solvente es agregado, para ser utilizado como control. Las dos mitades son nuevamente unidas y colocadas dentro de la caja de Petri, un número de insectos es colocado en el centro de la caja la cual es posteriormente tapada. Después de algunas horas, el número de organismos en cada una de las mitades es registrado, para finalmente calcular el porcentaje de repelencia; un método similar ha sido empleado en insectos neópteros del orden Phthiraptera (ftirápteros o piojos) [47].

Lo que es realmente importante son los estudios comparativos de los diferentes métodos para las pruebas de repelencia, especialmente los estudios entre las pruebas prácticas de campo que cuentan con voluntarios humanos o sujetos animales frente a potenciales pruebas de laboratorio sin un anfitrión que podrían imitar la prueba de campo. Uno de estos estudios adelantado por Matthewson *et al.* sobre artrópodos [49], encontró una pobre correlación de los resultados para diferentes compuestos en presencia y ausencia de un anfitrión para la garrapata de patas rojas, *Rhipicephalus evertsi*. Al parecer, el metabolismo de xenobióticos (compuestos ajenos al cuerpo), debido a las diferentes propiedades de unión (a la ropa, el pelo y la piel), y el transporte trans-epitelial, pueden afectar la actividad de un repelente [49]. Por esta razón, es necesaria información adicional para desarrollar una prueba de laboratorio modelo, en donde se involucren las condiciones reales de uso.

### 1.5. *Tribolium castaneum* (escarabajo rojo de la harina).

El escarabajo rojo de la harina (*T. castaneum*), pertenece a la familia Tenebrionidae, es considerado una plaga en todo el mundo y un organismo modelo, para la investigación de seguridad alimentaria y en etología. En su etapa adulta es delgado y mide de 3-6 mm de largo, es de color que va de rojizo castaño a marrón. Se le identifica por los últimos tres segmentos antenales, que son proporcionalmente más anchos y mejor definidos que los anteriores. Las larvas son alargadas, de color blanco cremoso hasta tornarse amarillo marrón, y generalmente miden de 5 a 6 mm de longitud. En la **Figura 54**, se muestra un esquema del ciclo reproductivo del insecto. Este ciclo de vida, presenta cuatro estados bien definidos: el huevo (10-12 días), la larva (20-30 días), la pupa (10-12 días) y el insecto joven (4 días) y adulto (> de 4 días).



**Figura 54.** Ciclo de vida del escarabajo rojo de la harina (Fotografía y montaje, Grupo Química Ambiental y Computacional, Universidad de Cartagena).

Un método común para el tratamiento de poblaciones de *T. castaneum* en las instalaciones de procesamiento de alimentos, es la aplicación de insecticidas en forma de aerosoles. La aplicación del aerosol puede proporcionar una buena cobertura de las superficies expuestas. Sin embargo, no tienen la capacidad de penetrar en las zonas ocultas, ocupadas por las poblaciones de insectos. Las aplicaciones con aerosol pueden consistir en un único insecticida o en una combinación de insecticidas con diferentes modos de acción. La transferencia de un insecticida empleado para el control de los escarabajos, por contacto con superficies expuestas al insecticida y los lugares donde se ocultan, alimentan o reproducen, por adherencia a su cuerpo o alimento, es un método conocido como transferencia horizontal de insecticidas [50].

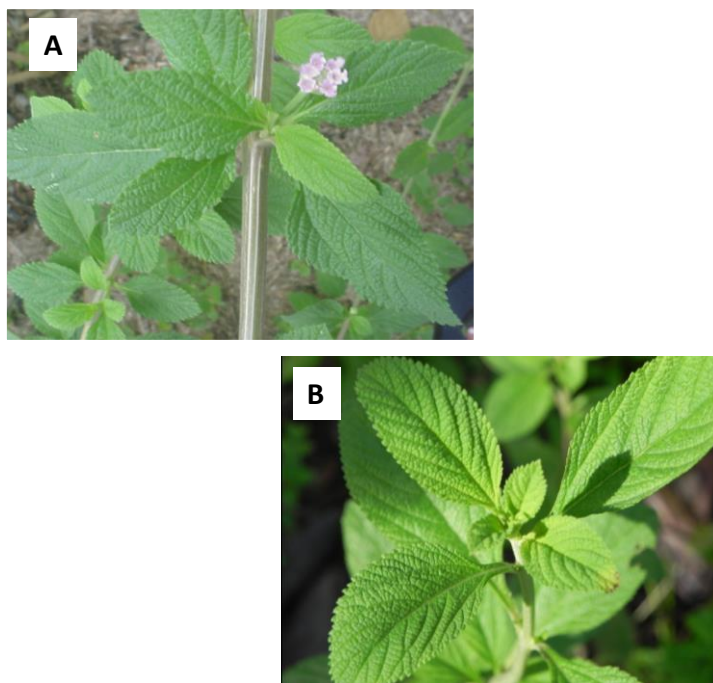
*Tribolium castaneum* tiene tres rasgos biológicos que podrían facilitar la transferencia horizontal de insecticidas o sustancias repelentes: los adultos se mueven entre los residuos de la harina, en las áreas abiertas y en las zonas donde se ocultan. Las áreas abiertas, podrían ser tratadas con insecticida, lejos de las fuentes de alimentos, en las cuales se podrían aplicar repelentes. Los adultos que sobreviven a esta exposición, podrían llevar a los lugares ocultos, el insecticida adherido a su cuerpo y en los residuos de la harina, donde podrían transferir directa o indirectamente a otro individuo la sustancia de control. En segundo lugar, los machos producen una agregación de feromonas que atraen a ambos sexos, lo que causa la formación de grupos. Estas agregaciones de insectos que lleven adherida la sustancia control, aumenta el potencial de transferencia horizontal, lo que ayudaría a un mejor y efectivo control del insecto [50].

En el presente trabajo, se evaluó la actividad repelente contra *T. castaneum*, empleando en método de área de preferencia, de aceites esenciales de *Lippia alba*, *Lippia organoides* y *Cymbopogon nardus*. Para los dos últimos casos, además del AE se evaluó la repelencia de diferentes fracciones obtenidas por destilación fraccionada a presión reducida. Para el caso de la especie *Lippia alba*, se emplearon AE obtenidos a partir de material vegetal proveniente de diferentes

lugares de Colombia. El objetivo de esta parte de la tesis doctoral fue conocer si existen correlaciones entre la actividad repelente y las diferencias en la composición química de los AE y fracciones, con el propósito de identificar el o los metabolitos responsables de la actividad biológica.

### **1.6. Pronto alivio (*Lippia alba*)**

La planta *Lippia alba* Mill N.E. Brown ex Britton & Wills. (familia Verbenaceae) (Véase **Figura 55**), un subarbusto muy aromático, es ampliamente distribuida y crece espontáneamente en las Américas Central y del Sur [51]. La planta es conocida también como *Lippia geniculata* HBK o *Lantana alba* Mill y, por sus nombres populares, “Pronto alivio” (Colombia) [52], “Melissa” (Brasil) [53], “Salvia morada” (Argentina) [54] y “Quita dolor” (Cuba) [55], entre otros; es una hierba perenne, erecta, algunas veces arbusto o subarbusto, crece hasta 2 m y presenta un fuerte olor a limón, lima o menta. Crece en alturas de hasta 1800 m.s.n.m. y se puede encontrar en climas cálido húmedo, cálido seco y templado. Se desarrolla en regiones sin exceso de calor o frío, con temperaturas de hasta 32 °C, con alta intensidad lumínica. Debido a su rusticidad responde a diversos tipos de suelos como arcillosos y limosos con pH de 5-6. Esta condición hace que sus principios activos y calidad del aceite cambien, presentando notables variaciones en el contenido de terpenos y sesquiterpenos, de acuerdo con el origen de la planta [56].



**Figura 55.** Planta de *Lippia alba* (pronto alivio). **A.** Quimiotipo citral. **B.** Quimiotipo carvona

La composición química del aceite de esta especie es muy variable dependiendo del lugar del mundo donde se recolecte. Es así como el limoneno (44%) y la piperitona (31%) fueron componentes mayoritarios en *L. alba* originaria de Guatemala [57]; el linalool fue el principal compuesto en esencias destiladas en India (65%) [58,59], Uruguay (55%) [60] y Brasil [61]. El aceite esencial de *L. alba*, que crece en Santander (Colombia), fue rico en dos compuestos, a saber: el limoneno (33%) y la carvona (51%) [52]; el último es un ingrediente de alto valor agregado, que se usa en muchos artículos cosméticos, perfumes y productos de uso personal (jabones, pastas dentífricas, etc) [62]. En estudios adelantados sobre la composición química de la esencial de *L.alba*, se evidencia, claramente, la existencia de al menos cinco quimiotipos principales: el primero caracterizado por su alto contenido de carvona (29-65%), el segundo por su alto contenido de linalool (47-90%) el tercer quimiotipo rico en citral (neral y geranial, 22-70%), el

cuarto por la presencia de metil chavicol (56%) y 1,8-cineol (13%) [63] y el quinto por presentar mayoritariamente mircenona (58%) [63].

La especie *L. alba* ha presentado actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Salmonera typha*. Se le atribuyen características medicinales como sedante, antiespasmódica, emenagoga, para tratar problemas digestivos; se ha empleado para aliviar dolores de huesos, cólicos, gracias a que presenta propiedades analgésicas . En Brasil el té de sus hojas se ha empleado como tranquilizante y también para aliviar problemas gastrointestinales [65,66]. En Colombia, esta especie ha sido utilizada como antiespasmódica en infusión teiforme, también se ha usado para la diabetes, diaforética y para trastornos digestivos. El quimiotipo carvona que crece en Colombia mostró actividad anti-herpética in vitro sobre monocapa de células HeLa infectadas [67].

El aceite esencial obtenido de hojas de *L. alba* presenta actividad in vitro contra algunos patógenos como *Trichopyton mentagrophytes*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa* y también contra ciertos hongos como *Dreschlera oryzae* y *Fusariumi moniliforme*. Posee actividad antiulcerogénica y es utilizada en África y Américas del Sur y Centro, para tratamientos gastrointestinales [68].

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1. Material vegetal

#### 2.1.1. *Lippia alba* (pronto alivio)

Las plantas (hojas y tallos) de *L. alba* empleadas en el estudio comparativo fueron recolectadas por personal adscrito al Centro de Excelencia CENIVAM, provenientes de diferentes lugares de Colombia, a saber: Cundinamarca (Anolaima), Tolima (Flandes y Venadillo), Boyacá (Cubará), Santander (Bucaramanga, Suaita y Bolívar), Antioquia (Puerto Berrío), Arauca (Saravena), Bolívar (Turbaco y Colorado), Valle del Cauca (Cali y Palmira), Quindío (Armenia) y Cesar (San Martín).

La identificación taxonómica de las muestras botánicas, se llevó a cabo en el Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia (Bogotá). Los pliegos testigos de cada planta quedaron depositados como muestra permanente en el Herbario Nacional Colombiano (COL, Bogotá) de la siguiente manera: *Lippia alba* (Mill) N.E.Br, los números de colección (COL) se presentan en la **Tabla 44**. Las plantas fueron clasificadas por el doctor José Luís Fernández Alonso.

#### 2.1.2. *Lippia origanoides* (orégano de monte) y *Cymbopogon nardus* (citronela).

Las plantas de *Lippia origanoides* y *Cymbopogon nardus* se obtuvieron de parcelas experimentales, en los municipios del Socorro y Barbosa, Santander, durante el segundo semestre de 2009 y segundo semestre de 2013, de acuerdo con el procedimiento descrito en la **Sección 2.2. del Capítulo 1**.

**Tabla 44.** Número de *Voucher* (Herbario Nacional Colombiano) y rendimiento del AE de plantas *Lippia alba*, recolectadas en diferentes regiones de Colombia

Nº	Localidad	Departamento	<i>Voucher specimen</i>	Condiciones geográficas		Rendimiento, (%p/p)±SD (n=3)
				Altitud (m.s.n.m)	Temperatura (°C)	
1	Puerto Berrío	Antioquia	512082	125	27	0.48±0.02
2	Cubará	Boyacá	512083	600	26	0.78±0.01
3	Anolaima	Cundinamarca	484350	1650	19	0.51±0.03
4	Bucaramanga	Santander	480751	960	25	0.43±0.02
5	Flandes	Tolima	484352	300	26	0.73±0.01
6	Cali	Valle del Cauca	512078	1000	25	0.60±0.01
7	Palmira	Valle del Cauca	512077	1000	27	0.55±0.02
8	Suaita	Santander	517306	1500	19	3.0±0.1
9	Armenia	Quindío	480753	1480	22	3.2±0.2
10	Bolívar	Santander	480754	2600	17	2.5±0.2
11	San Martín	Cesar	480755	120	30	2.4±0.1
12	Venadillo	Tolima	516930	348	27	2.5±0.1
13	Saravena	Arauca	512084	220	27	0.36±0.02
14	Colorado	Bolívar	512272	180	27	0.30±0.02
15	Turbaco	Bolívar	516929	80	28	0.83±0.03

## 2.2. Obtención de los aceites esenciales

### 2.2.1. *Lippia alba* (pronto alivio)

Los aceites esenciales de *Lippia alba*, se obtuvieron a partir de hojas y tallos (300 g) picados en trozos de 1-2 cm, provenientes del material cosechado, por el método de hidrodestilación asistida por la radiación de microondas, MWHD [52]. La extracción se llevó a cabo empleando un equipo de destilación tipo Clevenger con reservorio de destilación Dean Stark y adaptación para calentamiento por radiación de microondas, a través de un horno de microondas convencional

KENDO, modelo MO-124, con una potencia de salida de 800 vatios y frecuencia de radiación de 2.5 GHz (Véase **Figura 56**). Se adicionó un volumen de agua de 250 mL. Al final del proceso de extracción, se agregó sulfato de sodio al aceite extraído, para secar el agua residual. Cada extracción tuvo una duración de 45 minutos, en 3 sesiones de 15 min.



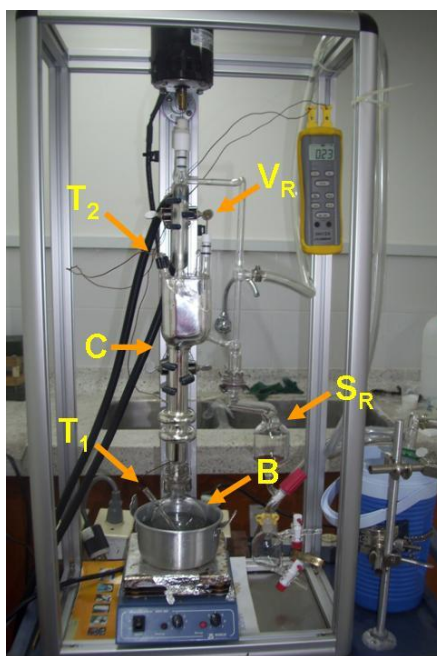
**Figura 56.** Montaje de hidrodestilación asistida por la radiación de microondas, MWHD. Fotografía Andres Ramírez. 2015.

### **2.2.2. *Lippia origanoides* y *Cymbopogon nardus***

Los aceites esenciales de *L. origanoides* y *C. nardus*, se obtuvieron por el método de arrastre con vapor, de acuerdo con el procedimiento descrito en la **Sección 2.4. del Capítulo 1**, empleando las condiciones óptimas de extracción.

### 2.3. Destilación fraccionada de los aceites esenciales

Para el fraccionamiento de los aceites esenciales de *L. origanoides* y *C. nardus*, se empleó un equipo a escala de laboratorio (B/R Instrument 800 – *High Efficiency Micro Distillation*), provisto con una columna de teflón con 30 etapas teóricas (Véase **Figura 57**). Este equipo consta de un balón de vidrio (B), con capacidad para 25 mL, el cual está conectado a un sistema de calentamiento y a una termocupla que registra la temperatura del aceite (T1). Este balón está acoplado a una columna (C) giratoria de 30 platos teóricos con un recubrimiento adiabático. En la parte superior de esta, se encuentra otra termocupla que registra la temperatura en la cabeza de la columna (T2) y un condensador con un baño frío que permite condensar los vapores. Unida a la columna está la válvula de reflujo (VR) de control manual que permite el paso del destilado al sistema de recolección de muestra (SR).



**Figura 57.** Equipo de destilación fraccionada B/R Instrument 800 – *High Efficiency Micro Distillation*.

Para el fraccionamiento de los AE se tomaron aproximadamente 15 g, los cuales se transfirieron al balón de 25 mL. Luego, el balón fue asegurado a la torre y sumergido en un recipiente que contenía aceite mineral y una resistencia regulada por un controlador de temperatura. Posteriormente, se ajustó la presión del sistema para cada caso y se dio inicio al calentamiento. Al observar el descenso de la primera gota de destilado de la parte superior de la torre, se encendió el motor de la columna (*Spinning band*). Conforme aumentó la temperatura en el balón de alimentación del AE, se realizó el registro de las temperaturas T1 y T2, con el propósito de reconocer las temperaturas en las que se daban los equilibrios (la temperatura permanecía constante), durante los cuales se recogieron las fracciones. En la **Tabla 45**, se presentan las temperaturas y las presiones de trabajo a las cuales se recogieron las fracciones para los AE de *L. origanoides* y *C. nardus*. En cada caso los experimentos se realizaron por triplicado.

**Tabla 45.** Condiciones de presión y temperatura para el fraccionamiento de los AE de *L. origanoides* y *C. nardus*.

Aceite esencial	Fracción (F)	T <sub>1</sub> (°C)	T <sub>2</sub> (°C)	Presión (Torr)
<i>Lippia origanoides</i>	F1	94-95	55-58	10
	Fondo	-	-	10
<i>Cymbopogon nardus</i>	F1	104-106	63-66	7
	F2	111-113	81-82	7
	F3	126-130	102-107	7
	Fondo	-	-	7

Cada fracción obtenida fue envasada en un recipiente ámbar, rotulada y refrigerada para su posterior análisis por cromatografía de gases – espectrometría de masas.

#### **2.4. Caracterización química por GC-MS de aceites esenciales y fracciones obtenidas por destilación fraccionada.**

Una alícuota de cada aceite esencial y fracción (50  $\mu\text{L}$ ) se disolvió en diclorometano hasta el volumen final de 1 mL. Luego, 1  $\mu\text{L}$  de la solución se inyectó al equipo de GC-MS, para su análisis cromatográfico.

La identificación de los componentes presentes en los AE y fracciones se llevó a cabo por cromatografía de gases – espectrometría de masas (GC-MS), empleando un cromatógrafo Agilent Technologies 6890 Plus (HP, Palo Alto, California, USA) acoplado a un detector selectivo de masas Agilent Technologies MSD 5973, equipado con un puerto de inyección split/splitless (1:50), un inyector automático Agilent 7863, un sistema de datos HP-MS ChemStation G17001DA (Versión D.00.01.27, 2002), incluyendo las bases de datos NBS 75K, WILEY 138K, NIST 2002 y ADAMS 2004.

Se utilizó una columna capilar apolar de sílice fundida DB-5MS (J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU) de 60 m x 0.25 mm, D.I x 0.25  $\mu\text{m}$ , df con fase estacionaria de 5% fenil – poli(metil siloxano) y una columna polar de sílice fundida DB-WAX (J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU) de 60 m x 0.25 mm, D.I x 0.25  $\mu\text{m}$ , df con fase estacionaria de poli(etilenglicol). La temperatura del horno se programó desde 45°C, (5 minutos) hasta 150°C (2 minutos) a razón 4°C/min, luego se incrementó hasta 250°C (5 minutos) a razón de 5°C/min. Finalmente, la temperatura aumentó a razón de 10°C/min hasta alcanzar 275°C (15 minutos). Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia se mantuvieron a 230 y 285 °C, respectivamente. Los espectros de masas y corrientes iónicas reconstruidas (TIC) se obtuvieron en un cuadrupolo, por medio de barrido automático de frecuencia (*full scan*), a 6 scan  $\text{s}^{-1}$ , en el rango de masas  $m/z$  40-350. Para la identificación de los compuestos se usaron los espectros de masas e índices de retención lineales, empleando una mezcla de hidrocarburos C6-C25

(AccuStandard®). También, se emplearon sustancias de referencia para la identificación de los componentes mayoritarios de los aceites esenciales, a saber, citronelal, citronelol, geraniol, timol, carvacrol, carvona, neral geranial (Sigma Aldrich).

## **2.5. Evaluación de la actividad repelente de los aceites esenciales y fracciones frente a *Tribolium castaneum* (Herbst).**

Para la evaluación de la actividad repelente de los aceites esenciales de *Lippia alba*, *Lippia organoides*, *Cymbopogon nardus* y sus fracciones obtenidas por destilación fraccionada, se contó con la colaboración del Grupo de Química Ambiental y Computacional de la Universidad de Cartagena, lugar donde se adelantó la primera rotación del Programa de Doctorado en Química.

### **2.5.1. Insectos de la especie *Tribolium castaneum* (Herbst)**

Para los bioensayos fue utilizada una cepa de *Tribolium castaneum*, Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae), conocida comúnmente como gorgojo rojo de la harina, la cual fue obtenida de avena infestada por el gorgojo en locales comerciales del mercado municipal de la ciudad de Cartagena, Bolívar. En el laboratorio, la cepa fue cultivada en recipientes de vidrio cubiertos por una malla de plástico, la cual contenía harina de avena como sustrato y alimento, y se mantenía bajo condiciones controladas de luminosidad (fotoperíodos de 10:14 h, luz: oscuridad), temperatura de  $26\pm 2$  °C, y humedad relativa de 70-85%. Para los ensayos fueron seleccionados organismos adultos. En la **Figura 58** se presenta registro fotográfico del mantenimiento de la cepa de *T. castaneum* y el procedimiento de selección para el ensayo de repelencia.



Muestra de avena infestada con gorgojos



Separación de pupas e insectos



Clasificación de los insectos por estado de desarrollo

**Figura 58.** Mantenimiento y selección de los insectos *T. castaneum* para los ensayos de repelencia.



Selección de los gorgojos adultos para el ensayo

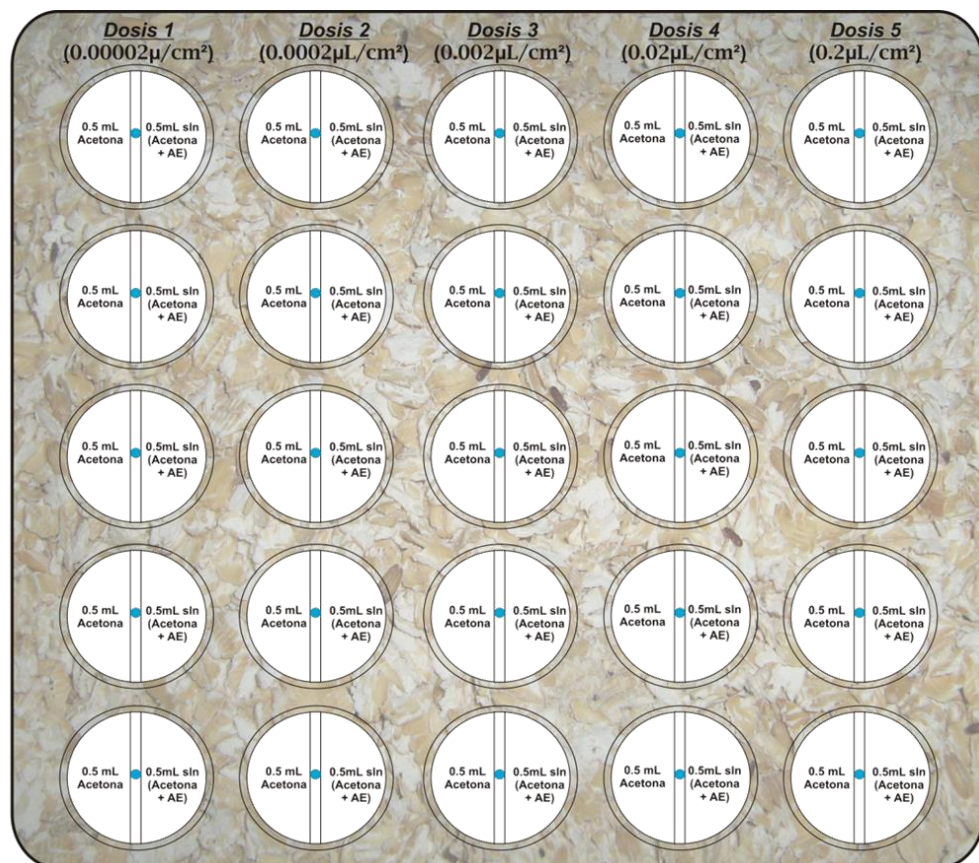
Continuación, **Figura 58.**

### **2.5.2. Determinación de la actividad repelente: método de área de preferencia**

La actividad repelente de los aceites esenciales y fracciones obtenidas mediante destilación fraccionada a presión reducida, contra *Tribolium castaneum* fue evaluada utilizando el ensayo de área de preferencia descrito por Taponjoui *et al.* [69]. En este método, los gorgojos son colocados en el interior de una caja de Petri que contiene un papel de filtro cortado por la mitad, colocando sobre una de las secciones la solución a evaluar (AE, fracción) y sobre la otra el respectivo vehículo (acetona). Los aceites esenciales y fracciones fueron disueltos en acetona y las soluciones dispuestas en la sección correspondiente del papel de filtro, aplicando volúmenes iguales para generar concentraciones de 0.00002, 0.0002, 0,002, 0,02 y 0,2  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ . Para el caso de los AE de *L. alba*, se emplearon las concentraciones de 0,002, 0,02 y 0,2  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ . Como control positivo fue empleada una formulación repelente comercial (*Stay off®*), la cual contiene como ingrediente activo etilbutilacetilaminopropionato (IR3535) al 15%. Por su naturaleza química, seguridad y baja toxicidad, este compuesto es considerado como un bioplaguicida [70]. El experimento fue iniciado al agregar en la parte central de cada caja de

Petri un total de 20 adultos de *Tribolium castaneum*. Se contaron los organismos presentes en cada mitad luego de 2 y 4 horas de exposición. En las **Figuras 59-60** se presentan el esquema general del ensayo y fotografías del montaje.

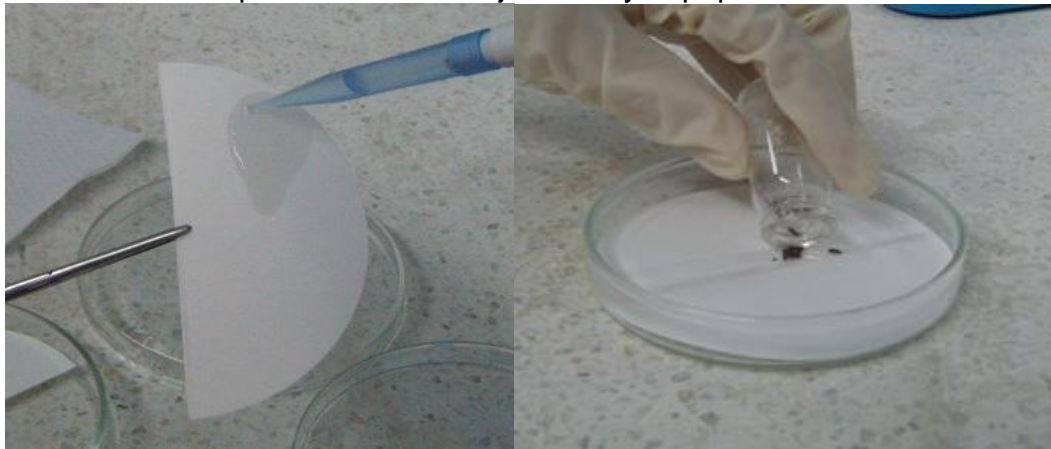
El porcentaje de repelencia (PR) para un determinado tiempo de exposición fue calculado empleando la siguiente fórmula:  $PR = [(Nc - Nt) / (Nc + Nt)] \times 100$ , donde  $Nc$  y  $Nt$  son el número de insectos en las áreas control (acetona) y tratadas, respectivamente. Cada concentración de aceite esencial fue evaluada por triplicado y los experimentos fueron repetidos dos veces, en días diferentes.



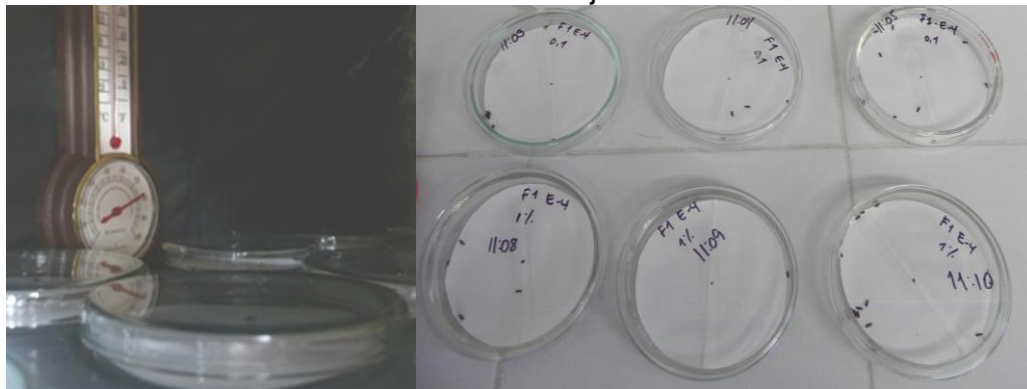
**Figura 59.** Esquema general del experimento de repelencia, empleando el método de área de preferencia (cinco diferentes concentraciones). Fuente: Grupo Química Ambiental y Computacional. Universidad de Cartagena.



Preparación de las cajas Petri y el papel de filtro



Aplicación de la solución de AE/acetona sobre el papel y siembra de los insectos en la caja Petri



Almacenamiento de las Cajas Petri y lectura del ensayo a las 2 y 4 horas

**Figura 60.** Registro fotográfico del ensayo de repelencia empleando el método de área de preferencia.

## 2.6. Análisis estadístico

Para apreciar mejor la relación entre la composición química los aceites esenciales de *Lippia alba* obtenidos por MWHD de las quince regiones de Colombia, se compararon por medio del análisis de componentes principales (PCA) las cantidades relativas de los metabolitos secundarios volátiles identificados para cada aceite esencial, mediante el software STATISTICA, Versión 6.0, StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA.

Los resultados de repelencia son presentados como la media del porcentaje de repelencia  $\pm$  error estándar ( $X \pm SD$ ). El número promedio de insectos presentes en cada mitad del papel filtro fue comparada mediante la prueba t-pareada. El signo obtenido en el cálculo del porcentaje de repelencia (PR) fue empleado para cualificar la acción repelente (positivo) o atrayente (negativo) del aceite esencial o fracción. En todos los casos, la distribución normal y la homogeneidad de varianzas fueron evaluadas previamente utilizando los test de Kolmogorov-Smirnov y Bartlett, respectivamente.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Composición química y actividad repelente de los aceites esenciales de *Lippia alba* recolectada en diferentes regiones de Colombia, frente a *Tribolium castaneum*.

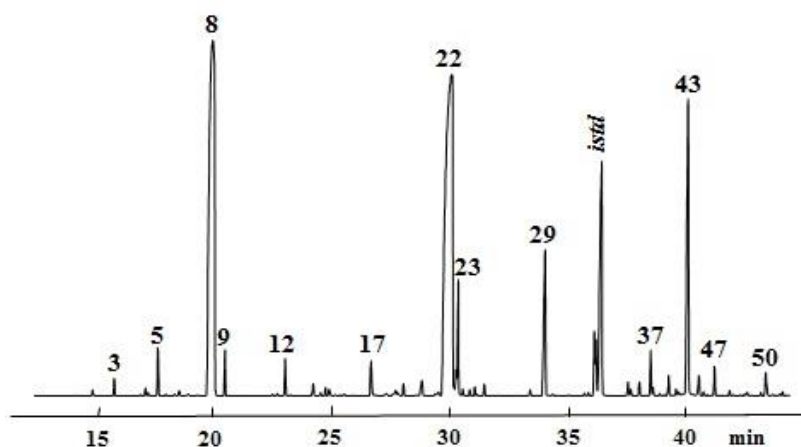
##### 3.1.1. Rendimientos de extracción de pronto alivio (*L. alba*)

En la **Tabla 44** se presentan los rendimientos obtenidos para los aceites esenciales de *Lippia alba* evaluados. El mayor rendimiento (3-3.2%p/p) se logró para las plantas cultivadas en las regiones de Armenia (9), Suaita (8) y Bolívar, Santander (10), Venadillo, Tolima (12) y San Martín, Cesar (11), caracterizadas por su alto contenido de carvona. Contrariamente, los rendimientos más bajos (0.3-0.36% p/p) se obtuvieron en las plantas cultivadas en Colorado, Bolívar (14) y Saravena, Arauca (13), que presentaron el citral (neral + geranial) y la mezcla carvona + citral, respectivamente, como componentes mayoritarios en el aceite.

##### 3.1.2. Composición química de los AE de pronto alivio (*L. alba*)

En la **Figura 61** se ilustra el perfil cromatográfico típico de los metabolitos secundarios volátiles, aislados por MWHD, de hojas y tallos de las plantas *L. alba* provenientes de las regiones de Cundinamarca (3), Tolima (5, 12), Boyacá (2), Santander (4, 8, 10), Valle del Cauca (6, 7), Quindío (9), Cesar (11) y Antioquia (1), el cual fue común para todas las especies recolectadas de estas zonas. En total se identificaron 59 compuestos en concentraciones relativas mayores de 0.05%, distribuidos por familias de compuestos de la siguiente manera: monoterpenos (30-35%), sesquiterpenos (10-20%), monoterpenos oxigenados (30-63%) y sesquiterpenos oxigenados (0.3-4%).

Los AE obtenidos de plantas cosechadas en los departamentos de Cundinamarca (3), Tolima (Flandes-5) y Quindío (9), se caracterizaron por presentar un mayor contenido de sesquiterpenos, mientras que el AE obtenido de las plantas recolectadas en Cali, Valle del Cauca, presentó un porcentaje de sesquiterpenos oxigenados muy bajo (0.2%). La identificación de los componentes y sus cantidades relativas (%) se reportan en la **Tabla 46**. Los componentes mayoritarios presentes en estos aceites fueron la carvona (34-50%), seguida del limoneno (26-36%), biciclosesquifelandreno (3-14%), piperitenona (2-7%), piperitona (2-4%) y  $\beta$ -bourboneno (0.9-3%). En promedio, los aceites esenciales del quimiotipo carvona, presentaron una distribución de compuestos oxigenados del 52,2%.



**Figura 61.** Perfil cromatográfico típico del aceite esencial de *Lippia alba* Mill., quimiotipo carvona, obtenido por MWHD. Columna DB-5MS (60 m). Detector selectivo de masas (El. 70 eV). La identificación de los picos se reporta en la **Tabla 48**.

**Tabla 46.** Composición química de los aceites esenciales de *Lippia alba* (quimiotipo carvona), obtenidos por MWH, de plantas recolectadas en diferentes regiones de Colombia.

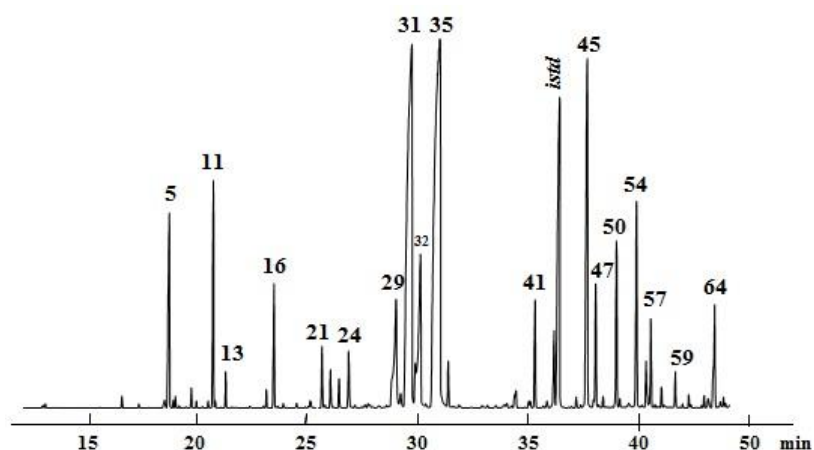
N° Pico <sup>a)</sup>	Compuesto	I <sub>R</sub>		Cantidad relativa, % <sup>d)</sup>											
		DB-5MS <sup>b)</sup>	DB-WAX <sup>c)</sup>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	<i>cis</i> -3-Hexenol	859	1289	0.00	0.60	0.21	0.14	0.29	0.00	0.00	0.13	0.00	0.16	0.07	0.00
2	$\alpha$ -Pino	939	921	0.08	0.10	0.00	0.12	0.06	0.15	0.06	0.12	0.13	0.10	0.10	0.00
3	Canfeno	954	965	0.28	0.19	0.08	0.32	0.15	0.37	0.16	0.30	0.34	0.20	0.29	0.11
4	1-Octen-3-ol	979	1351	0.00	0.13	0.16	0.15	0.08	0.00	0.00	0.09	0.06	0.09	0.08	0.00
5	$\beta$ -Mirce	991	1064	1.00	0.97	0.53	0.87	0.95	1.16	0.68	0.85	0.89	0.66	0.99	0.80
6	<i>p</i> -Cimeno	1008	1172	0.17	0.11	0.00	0.11	0.14	0.13	0.11	0.12	0.15	0.11	0.18	0.13
7	Isobutanoato de isopentilo	1015	994	0.07	0.08	0.00	0.00	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09	0.08
<b>8</b>	<b>Limoneno</b>	<b>1037</b>	<b>1105</b>	<b>28.09</b>	<b>31.23</b>	<b>30.32</b>	<b>31.83</b>	<b>28.45</b>	<b>36.14</b>	<b>34.07</b>	<b>29.97</b>	<b>30.17</b>	<b>30.85</b>	<b>26.16</b>	<b>30.20</b>
9	<i>trans</i> - $\beta$ -Ocimeno	1048	1153	0.71	0.40	0.44	0.73	0.79	0.58	0.59	0.34	0.63	0.61	0.61	0.28
10	Terpinoleno	1089	1186	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.04	0.05	0.03	0.06	0.00
11	<i>p</i> -Cimeno	1093	1338	0.00	0.07	0.00	0.00	0.00	0.07	0.00	0.05	0.00	0.00	0.04	0.00
12	Linalool	1100	1453	0.42	0.43	0.72	0.64	0.58	0.73	0.56	0.58	0.59	0.69	0.36	0.32
13	<i>trans-p</i> -Menta-2,8-dien-1-ol	1126	1580	0.15	0.27	0.29	0.27	0.22	0.30	0.17	0.34	0.20	0.19	0.25	0.37
14	<i>trans</i> -Hidrato de pino	1133	1460	0.00	0.00	0.07	0.07	0.07	0.07	0.00	0.06	0.06	0.05	0.07	0.00
15	<i>cis</i> -Óxido de limoneno	1138	1350	0.27	0.09	0.12	0.15	0.18	0.15	0.14	0.18	0.16	0.15	0.21	0.10
16	<i>cis-p</i> -Menta-2,8-dien-1-ol	1141	1707	0.00	0.20	0.25	0.18	0.14	0.21	0.12	0.20	0.12	0.13	0.12	0.21
17	Borneol	1180	1613	0.73	0.52	0.73	0.82	0.66	0.67	0.50	0.76	0.73	0.64	0.80	0.31
18	<i>cis</i> -Dihidrocarvona	1203	1517	0.22	0.20	0.16	0.22	0.25	0.20	0.21	0.11	0.22	0.17	0.40	0.33
19	<i>trans</i> -Dihidrocarvona	1212	1537	0.18	0.21	0.11	0.25	0.17	0.00	0.21	0.07	0.26	0.16	0.46	0.49
20	<i>trans</i> -Carveol	1230	1745	0.54	0.60	0.40	0.52	0.58	0.34	0.66	0.73	0.56	0.63	0.93	0.54
21	<i>cis</i> -Carveol	1244	1776	0.00	0.26	0.16	0.14	0.26	0.24	1.04	0.00	0.26	0.00	0.00	0.34
<b>22</b>	<b>Carvona</b>	<b>1260</b>	<b>1653</b>	<b>40.60</b>	<b>41.48</b>	<b>35.06</b>	<b>38.31</b>	<b>39.35</b>	<b>38.77</b>	<b>35.44</b>	<b>41.88</b>	<b>34.34</b>	<b>38.89</b>	<b>42.19</b>	<b>50.25</b>
<b>23</b>	<b>Piperitona</b>	<b>1266</b>	<b>1641</b>	<b>2.46</b>	<b>2.50</b>	<b>2.97</b>	<b>2.61</b>	<b>1.89</b>	<b>2.25</b>	<b>3.50</b>	<b>3.34</b>	<b>2.54</b>	<b>3.58</b>	<b>2.92</b>	<b>3.10</b>
24	<i>cis</i> -Óxido de carvona	1270	1798	0.15	0.13	0.14	0.15	0.12	0.12	0.13	0.26	0.16	0.20	0.29	0.22
25	Isopiperitenona	1277	1754	0.16	0.12	0.09	0.11	0.15	0.07	0.11	0.14	0.11	0.11	0.20	0.12
26	<i>trans</i> -Óxido de carvona	1282	1745	0.24	0.21	0.17	0.15	0.16	0.21	0.14	0.22	0.14	0.15	0.25	0.15
27	Timol	1291	2092	0.40	0.22	0.19	0.23	0.17	0.12	0.31	0.19	0.08	0.25	0.28	0.00
28	<i>trans</i> -Acetato de carvilo	1335	1678	0.13	0.16	0.14	0.14	0.17	0.16	0.09	0.20	0.05	0.16	0.17	0.11
<b>29</b>	<b>Piperitenona</b>	<b>1349</b>	<b>1842</b>	<b>5.40</b>	<b>4.48</b>	<b>3.10</b>	<b>4.40</b>	<b>4.15</b>	<b>1.72</b>	<b>4.85</b>	<b>5.57</b>	<b>3.74</b>	<b>4.21</b>	<b>6.76</b>	<b>6.14</b>
30	Eugenol	1357	2080	0.08	0.00	0.09	0.00	0.10	0.00	0.09	0.05	0.06	0.10	0.13	0.00
31	$\alpha$ -Copaeno	1387	1399	0.06	0.08	0.13	0.08	0.12	0.16	0.08	0.13	0.21	0.13	0.07	0.00

Tabla 46, Continuación

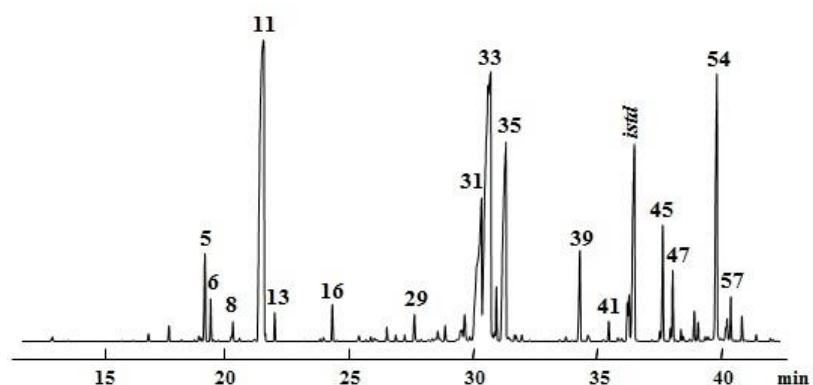
N° Pico <sup>a)</sup>	Compuesto	I <sub>R</sub>		Cantidad relativa, % <sup>d)</sup>											
		DB-5MS <sup>b)</sup>	DB-WAX <sup>c)</sup>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
32	<b>β-Bourboneno</b>	<b>1396</b>	<b>1428</b>	<b>0.87</b>	<b>1.95</b>	<b>1.94</b>	<b>1.31</b>	<b>1.26</b>	<b>2.59</b>	<b>1.91</b>	<b>2.40</b>	<b>2.99</b>	<b>1.24</b>	<b>1.49</b>	<b>0.99</b>
33	β-Elemeno	1398	1496	0.90	0.00	1.76	1.06	1.07	0.00	0.00	0.05	0.08	1.51	0.00	0.00
34	β-Ylangeno	1432	1483	0.27	0.29	0.39	0.29	0.33	0.37	0.22	0.28	0.48	0.25	0.26	0.11
35	<i>trans</i> -β-Cariofileno	1435	1506	0.18	0.17	0.75	0.14	0.92	0.21	0.43	0.23	0.30	0.78	0.19	0.00
36	β-Gurjuneno	1444	1447	0.30	0.28	0.44	0.27	0.38	0.45	0.24	0.33	0.54	0.35	0.26	0.14
37	<i>trans</i> -β-Farneseno	1456	1573	0.25	0.30	0.46	0.82	0.61	0.82	0.22	0.31	0.74	0.64	0.31	0.00
38	<i>allo</i> -Aromadendreno	1458	1557	0.12	0.16	0.22	0.16	0.18	0.19	0.11	0.18	0.00	0.15	0.13	0.00
39	α-Humuleno	1471	1580	0.00	0.00	0.06	0.00	0.08	0.00	0.00	0.04	0.03	0.04	0.00	0.00
40	γ-Gurjuneno	1475	1587	0.40	0.42	0.58	0.39	0.46	0.53	0.36	0.30	0.65	0.35	0.33	0.11
41	γ-Muuroleno	1483	1599	0.11	0.13	0.19	0.13	0.20	0.16	0.10	0.11	0.15	0.11	0.09	0.00
42	Germacreno D	1486	1552	0.09	0.10	0.16	0.09	0.14	0.19	0.10	0.07	0.18	0.11	0.08	0.00
<b>43</b>	<b>Biciclosesquifelandreno</b>	<b>1497</b>	<b>1624</b>	<b>10.58</b>	<b>8.55</b>	<b>11.38</b>	<b>8.99</b>	<b>10.90</b>	<b>8.37</b>	<b>8.78</b>	<b>6.01</b>	<b>13.62</b>	<b>7.72</b>	<b>8.63</b>	<b>3.37</b>
44	Bicilgermacreno	1509	1608	0.73	0.49	0.78	0.50	0.83	0.58	0.50	0.54	1.17	0.78	0.88	0.22
45	δ-Amorfeno	1514	1667	0.12	0.09	0.11	0.10	0.12	0.09	0.12	0.17	0.63	0.25	0.23	0.00
46	γ-Cadineno	1526	1671	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.19	0.00
47	Cubebol	1528	1855	1.15	0.39	1.48	0.56	0.91	0.00	1.26	0.76	0.94	1.14	0.48	0.26
48	<i>trans</i> -γ-Bisaboleno	1546	1680	0.00	0.00	0.17	0.09	0.07	0.09	0.08	0.08	0.18	0.34	0.00	0.00
49	<i>trans</i> -Nerolidol	1565	1946	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
50	Germacren-4-ol	1590	1967	0.44	0.26	0.57	0.39	0.39	0.07	0.48	0.32	0.24	0.22	0.31	0.00
51	Espatunelol	1591	2043	0.19	0.11	0.24	0.22	0.17	0.03	0.20	0.09	0.00	0.07	0.09	0.00
52	Óxido de cariofileno	1600	1909	0.00	0.00	0.24	0.00	0.11	0.00	0.12	0.08	0.00	0.10	0.00	0.00
53	Salvial-4(14)-en-1-ona	1610	1931	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
54	Presilfiperfolan-8-ol	1613	1970	0.10	0.00	0.07	0.08	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00
55	Epoxy- <i>allo</i> -Alloaromadendreno	1630	2272	0.00	0.00	0.20	0.14	0.00	0.00	0.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
56	<i>trans</i> -Asarona	1648	2314	0.06	0.00	0.08	0.05	0.00	0.00	0.15	0.10	0.00	0.09	0.00	0.00
57	α-Eudesmol	1656	2116	0.10	0.13	0.21	0.12	0.09	0.12	0.08	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00
58	α-Cadinol	1670	2105	0.00	0.00	0.20	0.13	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
59	Kusinol	1700	2284	0.17	0.17	0.26	0.27	0.17	0.00	0.33	0.42	0.00	0.23	0.36	0.00

a) Número del pico en la **Figura 65**; b) índices de retención lineales determinados experimentalmente en columna DB-5MS (60 m); c) índices de retención lineales determinados experimentalmente en columna DB-WAX (60 m); d) Promedio de tres extracciones (RSD 0.5-10%).

En las **Figuras 62** y **63** se presentan los perfiles cromatográficos de los aceites esenciales de *L. alba* extraídos por MWHD, provenientes de los departamentos de Bolívar (14 y 15), con 53 compuestos, y Arauca (13), con 59 compuestos, respectivamente. En la **Tabla 47** se reportan los compuestos identificados y sus cantidades relativas (%). Los componentes mayoritarios encontrados en los AE de Bolívar fueron el neral y geranial (citral) (51-56%), isómeros geométricos del citral, el *trans*- $\beta$ -cariofileno (4-7%), geraniol (6-8%), nerol (3-4%), 6-metil-5-hepten-2-ona (5%), limoneno (4%) y linalol (2%); mientras que para el AE del departamento de Arauca, los componentes mayoritarios fueron la carvona (25%), limoneno (22%), neral y geranial (citral, 21%) y biciclosesquifelandreno (8%). Los aceites esenciales de las plantas recolectadas en el departamento de Bolívar, presentaron el mayor contenido de monoterpenos oxigenados (70 y 76%). El AE obtenido de plantas de *L. alba* recolectadas en Saravena, Arauca, presentó una distribución de la siguiente manera: monoterpenos (25%), monoterpenos oxigenados (51.3%) y sesquiterpenos y sus análogos oxigenados 17 y 1.5% respectivamente.



**Figura 62.** Perfil cromatográfico típico del aceite esencial de *Lippia alba* Mill., quimiotipo citral, obtenido por MWHD. Columna DB-5 (60 m). Detector selectivo de masas (EI. 70 eV). La identificación de los picos se reporta en la **Tabla 49**.



**Figura 63.** Perfil cromatográfico típico del aceite esencial de *Lippia alba* Mill., quimiotipo carvona-citral, obtenido por MWHD. Columna DB-5 (60 m). Detector selectivo de masas (El. 70 eV). La identificación de los picos se reporta en la **Tabla 47**.

**Tabla 47.** Composición química de los aceites esenciales de *Lippia alba* (quimiotipo citral y carvona-citral), obtenidos por MWHD, de plantas recolectadas en diferentes regiones de Colombia.

N° Pico <sup>a)</sup>	Compuesto	I <sub>R</sub>		Cantidad relativa, % <sup>d)</sup>		
		DB-5MS <sup>b)</sup>	DB-WAX <sup>c)</sup>	13	14	15
1	<i>cis</i> -3-Hexenol	840	1289	0.1	0.1	0.0
2	$\alpha$ -Pineno	939	921	0.1	0.1	0.2
3	Canfeno	954	965	0.3	0.1	0.0
4	1-Octen-3-ol	979	1351	0.1	0.2	0.0
<b>5</b>	<b>6-Metil-5-hepten-2-ona</b>	<b>986</b>	<b>1241</b>	<b>1.9</b>	<b>4.3</b>	<b>5.0</b>
6	$\beta$ -Mirceno	991	1064	0.7	0.1	0.1
7	6-Metil-5-hepten-2-ol	992	1365	0.0	0.1	0.2
8	$\alpha$ -Felandreno	1009	1066	0.5	0.2	0.1
9	Isobutanoato de isopentilo	1015	994	0.1	0.1	0.1
10	<i>p</i> -Cimeno	1028	1172	0.0	0.1	0.1
<b>11</b>	<b>Limoneno</b>	<b>1034</b>	<b>1105</b>	<b>22.4</b>	<b>3.7</b>	<b>3.7</b>
12	$\beta$ -Felandreno	1036	1111	0.0	0.1	0.1
13	<i>trans</i> - $\beta$ -Ocimeno	1047	1153	0.5	0.4	0.3
14	Terpinoleno	1089	1186	0.05	0.0	0.0
15	Rosafurano	1092	1303	0.1	0.2	0.4
16	Linalool	1100	1453	0.6	1.9	2.1
17	<i>trans-p</i> -Menta-2,8-dien-1-ol	1126	1580	0.1	0.0	0.0
18	<i>exo</i> -Fenchol	1128	1491	0.0	0.1	0.0
19	<i>cis</i> -Óxido de limoneno	1137	1350	0.1	0.0	0.0

Tabla 47, Continuación

N° Pico <sup>a)</sup>	Compuesto	I <sub>R</sub>		Cantidad relativa, % <sup>d)</sup>		
		DB-5MS <sup>b)</sup>	DB-WAX <sup>c)</sup>	13	14	15
20	<i>cis-p</i> -Menta-2,8-dien-1-ol	1141	1707	0.1	0.0	0.0
21	Citronelal	1154	1381	0.3	0.8	0.8
22	<i>cis</i> -Crisantenol	1162	1449	0.1	0.5	0.6
23	Epóxido de rosafurano	1171	1509	0.1	0.4	1.1
24	Borneol	1181	1613	0.6	0.9	0.9
25	<i>cis</i> -Dihidrocarvona	1203	1517	0.4	0.0	0.0
26	<i>trans</i> -Dihidrocarvona	1211	1537	0.3	0.0	0.0
27	Citronelol	1224	1673	0.0	0.0	0.1
28	<i>trans</i> -Carveol	1228	1745	0.6	0.0	0.0
29	Nerol	1231	1708	0.7	3.9	2.6
30	Isogeraniol	1236	1719	0.1	0.3	0.5
<b>31</b>	<b>Neral</b>	<b>1248</b>	<b>1589</b>	<b>10.4</b>	<b>22.6</b>	<b>24.6</b>
<b>32</b>	<b>Geraniol</b>	<b>1252</b>	<b>1755</b>	<b>0.0</b>	<b>6.4</b>	<b>8.3</b>
<b>33</b>	<b>Carvona</b>	<b>1258</b>	<b>1653</b>	<b>25.3</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>
34	Piperitona	1264	1641	1.1	0.0	0.1
<b>35</b>	<b>Geranial</b>	<b>1275</b>	<b>1643</b>	<b>10.4</b>	<b>28.8</b>	<b>31.5</b>
36	Isopiperitona	1278	1754	0.2	0.0	0.0
37	<i>trans</i> -Óxido de carvona	1284	1745	0.1	0.0	0.0
38	Timol	1291	2092	0.1	0.0	0.0
39	Piperitenona	1349	1842	2.2	0.0	0.0
40	Eugenol	1357	2080	0.2	0.4	0.3
41	Acetato de geranilo	1379	1662	0.4	1.6	0.7
42	$\alpha$ -Copaeno	1385	1399	0.1	0.0	0.0
43	$\beta$ -Elemeno	1397	1496	1.7	1.3	0.9
44	$\beta$ -Ylangeno	1432	1483	0.2	0.0	0.0
<b>45</b>	<b><i>trans</i>-<math>\beta</math>-Cariofileno</b>	<b>1436</b>	<b>1506</b>	<b>2.4</b>	<b>6.8</b>	<b>4.2</b>
46	$\beta$ -Gurjuneno	1444	1447	0.2	0.0	0.0
47	$\alpha$ -Guaieno	1447	1498	1.3	1.8	1.6
48	<i>trans</i> - $\beta$ -Farneseno	1456	1570	0.2	0.1	0.1
49	<i>allo</i> -Aromadendreno	1459	1557	0.1	0.0	0.0
50	$\alpha$ -Humuleno	1471	1580	0.5	2.4	1.9
51	$\gamma$ -Gurjuneno	1475	1587	0.3	0.1	0.1
52	$\gamma$ -Muuroleno	1483	1599	0.1	0.0	0.0
53	Germacreno D	1486	1552	0.1	0.2	0.0
<b>54</b>	<b>Biciclosesquifelandreno</b>	<b>1496</b>	<b>1624</b>	<b>8.0</b>	<b>3.1</b>	<b>1.8</b>
55	Isobutanoato de geranilo	1508	1633	0.0	0.0	0.7
56	Biciclogermacreno	1509	1608	0.7	0.7	0.0
57	$\alpha$ -Bulneseno	1515	1627	0.8	1.2	0.9
58	Cubebol	1528	1855	0.4	0.3	0.2
59	<i>trans</i> - $\gamma$ -Bisaboleno	1547	1680	0.1	0.4	0.4
60	<i>trans</i> -Nerolidol	1565	1946	0.04	0.1	0.1

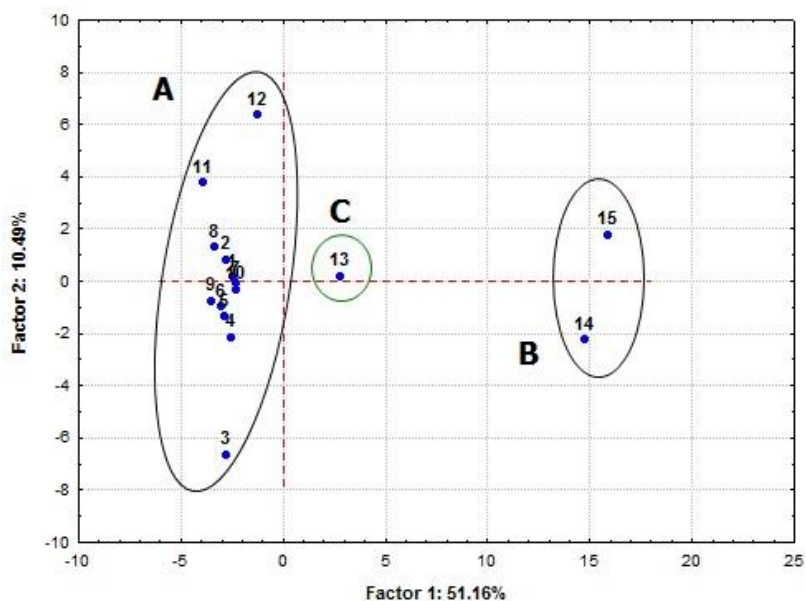
a) Número del pico en las Figura 66 y 67

b) índices de retención lineales determinados experimentalmente en columna DB-5MS (60 m)

c) índices de retención lineales determinados experimentalmente en columna DB-WAX (60 m)

d) Promedio de tres extracciones (RSD 0.5-10%)

El análisis de componentes principales, PCA (**Figura 64**), aplicado a los AE de *Lippia alba* obtenidos de plantas recolectadas en diferentes regiones de Colombia indica que más del 60% de la información de las **Tablas 46-47**, puede ser representada por un subespacio de dos coordenadas (componentes principales), construido con base en las combinaciones lineales de las áreas relativas (%) de los componentes presentes en los diferentes AE (Figura 4). Estos resultados muestran claramente la existencia de 3 quimiotipos; el primero (**A**) caracterizado por su alto contenido de carvona (41%), limoneno (36%), biciclosesquifelandreno (11%) y piperitenona (5%), en los departamentos de Cundinamarca (3), Tolima (5, 12), Boyacá (2), Valle del Cauca (6, 7), Santander (4, 8, 10), Antioquia (1), Quindío (9) y Cesar (11). El segundo quimiotipo (**B**) en los municipios de Colorado (14) y Turbaco (15), Bolívar, se destacó por su alto contenido de neral y geranial (citrал, 54%) y *trans*- $\beta$ -cariofileno (8%). Un tercer quimiotipo, denominado “intermedio” (**C**), fue rico en carvona (25%), limoneno (22%) y citral (21%), obtenido de plantas que crecieron en el departamento de Arauca (13).



**Figura 64.** Representación gráfica de las composiciones químicas relativas de los aceites esenciales de *Lippia alba*, aislados por MWHD, de 15 regiones diferentes de Colombia, en el espacio formado por los primeros dos componentes principales.

### 3.1.3. Actividad repelente de los AE de pronto alivio (*L. alba*)

Los resultados de la actividad repelente de los 15 aceites esenciales y el repelente comercial (IR3535) contra la especie *Tribolium castaneum* se presentan en la **Tabla 48**. De los 15 aceites esenciales evaluados, solo 4 presentaron un porcentaje de repelencia igual o superior al compuesto control (IR3535), a las 2 y 4 h de exposición. Estos AE se caracterizaron por su alto contenido de monoterpenos y sesquiterpenos oxigenados. El aceite esencial obtenido de plantas recolectadas en Turbaco (15), Bolívar (quimiotipo B), presentó la mayor actividad repelente (98%), significativamente superior al compuesto control. Su composición química fue mayoritariamente de monoterpenos oxigenados, a saber: neral, geranial, geraniol y nerol (76,7%). El aceite esencial de *Lippia alba* caracterizado como quimiotipo C, con un contenido intermedio de carvona y citral, presentó una actividad repelente intermedia entre el quimiotipo carvona (A) y el quimiotipo citral (C). Estos resultados mostraron que existe una correlación directa ( $R^2=0,9939$ ) entre el porcentaje de los compuestos oxigenados (CO) presentes en los aceites esenciales de *Lippia alba* y la actividad repelente frente a *Tribolium castaneum*, tal como se puede apreciar en la **Figura 65**.

Es importante anotar que la repelencia generada tanto por los aceites como por el producto comercial no presentó diferencias significativas cuando fueron comparados los dos tiempos de exposición. Así mismo, en todos los casos, la variabilidad en los datos de repelencia fue mayor para la concentración del aceite esencial más diluida (Véase **Tabla 48**).

**Tabla 48.** Porcentajes de repelencia obtenidos de los aceites esenciales de *Lippia alba* obtenidos de diferentes regiones de Colombia y el repelente comercial (IR3535) frente a *Tribolium castaneum*, a diferentes tiempos de exposición y concentración.

Aceite esencial	Quimiotipo	Cantidad relativa de CO en el AE, %	Concentración, $\mu\text{L}/\text{cm}^2$	% de repelencia $\pm$ SD (n=6)	
				2 h	4 h
1	A	53,6	0,002	34 $\pm$ 5	32 $\pm$ 4
			0,02	58 $\pm$ 4	57 $\pm$ 4
			0,2	69 $\pm$ 2	66 $\pm$ 5
2	A	53,5	0,002	32 $\pm$ 6	30 $\pm$ 5
			0,02	57 $\pm$ 3	55 $\pm$ 2
			0,2	68 $\pm$ 5	65 $\pm$ 3
3	A	47,5	0,002	28 $\pm$ 4	26 $\pm$ 4
			0,02	53 $\pm$ 5	52 $\pm$ 3
			0,2	60 $\pm$ 6	58 $\pm$ 5
4	A	50,6	0,002	32 $\pm$ 5	30 $\pm$ 4
			0,02	55 $\pm$ 4	54 $\pm$ 3
			0,2	66 $\pm$ 3	64 $\pm$ 3
5	A	51,0	0,002	29 $\pm$ 4	28 $\pm$ 3
			0,02	54 $\pm$ 3	52 $\pm$ 4
			0,2	65 $\pm$ 5	61 $\pm$ 2
6	A	46,2	0,002	26 $\pm$ 7	24 $\pm$ 5
			0,02	52 $\pm$ 5	50 $\pm$ 4
			0,2	58 $\pm$ 4	58 $\pm$ 4
7	A	50,1	0,002	30 $\pm$ 3	30 $\pm$ 3
			0,02	56 $\pm$ 2	54 $\pm$ 5
			0,2	64 $\pm$ 4	64 $\pm$ 4
8	A	56,0	0,002	36 $\pm$ 6	33 $\pm$ 4
			0,02	61 $\pm$ 4	60 $\pm$ 2
			0,2	72 $\pm$ 3	69 $\pm$ 3
9	A	45,4	0,002	22 $\pm$ 6	20 $\pm$ 5
			0,02	50 $\pm$ 4	50 $\pm$ 3
			0,2	56 $\pm$ 3	55 $\pm$ 4
10	A	51,9	0,002	31 $\pm$ 5	28 $\pm$ 4
			0,02	55 $\pm$ 4	53 $\pm$ 3
			0,2	66 $\pm$ 3	63 $\pm$ 4
11	A	57,5	0,002	37 $\pm$ 4	35 $\pm$ 2
			0,02	63 $\pm$ 2	61 $\pm$ 3
			0,2	74 $\pm$ 1	70 $\pm$ 2

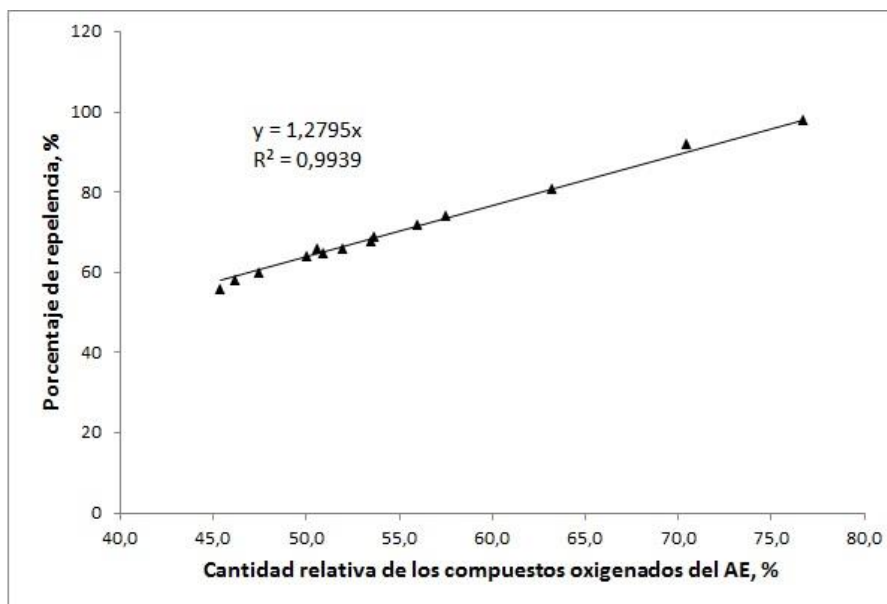
Continuación, **Tabla 48.**

Aceite esencial	Quimiotipo	Cantidad relativa de CO en el AE, %	Concentración, $\mu\text{L}/\text{cm}^2$	% de repelencia $\pm$ SD (n=6)	
				2 h	4 h
12	A	63,3	0,002	41 $\pm$ 5	37 $\pm$ 2
			0,02	69 $\pm$ 6	66 $\pm$ 3
			0,2	81 $\pm$ 3	78 $\pm$ 3
13	C	51,3	0,002	40 $\pm$ 6	35 $\pm$ 4
			0,02	67 $\pm$ 5	65 $\pm$ 3
			0,2	80 $\pm$ 4	78 $\pm$ 4
14	B	70,5	0,002	47 $\pm$ 3	40 $\pm$ 5
			0,02	79 $\pm$ 5	75 $\pm$ 4
			0,2	92 $\pm$ 4	90 $\pm$ 4
15	B	76,7	0,002	50 $\pm$ 4	48 $\pm$ 5
			0,02	84 $\pm$ 3	78 $\pm$ 3
			0,2	98 $\pm$ 2	94 $\pm$ 2
IR3535	-	-	0,002	54 $\pm$ 8	40 $\pm$ 9
			0,02	60 $\pm$ 6	50 $\pm$ 5
			0,2	78 $\pm$ 5	76 $\pm$ 6

De acuerdo con los valores de repelencia, la capacidad repelente, de los aceites esenciales de *Lippia alba*, evaluada decrece en el orden quimiotipo citral (B) > quimiotipo “intermedio” (C) > quimiotipo carvona (A), siendo los casos B y C, comparativamente mayores que los observados para el repelente comercial (IR3535).

La correlación encontrada entre la cantidad de monoterpenos oxigenados y el porcentaje de repelencia, es consistente con los resultados reportados por otros autores [71], quienes encontraron que compuestos como eugenol, carvona, citral, terpineol, citronelol, citronelal, alcanfor y timol presentaron altos valores de repelencia contra insectos del orden Diptera, comparado con sus análogos hidrocarbonados. Tunón y colaboradores [72] encontraron que los compuestos oxigenados: alcohol fenil etílico,  $\beta$ -citronelol, alcohol cinnamílico y geraniol, aislados del aceite esencial de *Dianthus caryophyllum*, mostraron actividad

repelente contra garrapatas *Ixodes ricinus*, similar a lo encontrado para el aceite esencial de *Lippia alba* quimiotipo citral (C) [47].



**Figura 65.** Correlación entre el porcentaje de repelencia y la cantidad relativa de compuestos oxigenados presentes en los aceites esenciales de *Lippia alba* obtenidos de plantas cosechadas en diferentes regiones de Colombia.

Estudios adelantados por Enan 2001 [73], mostraron que el eugenol imita la octopamina, un importante neurotransmisor en los insectos, ocasionando un incremento en los niveles de calcio intracelular en la clonación de células cerebrales de *Periplaneta americana*. No está claro el mecanismo de acción de la repelencia en los artrópodos, y existe un conflicto en la evidencia existente en la literatura. Sin embargo, se reporta que los repelentes actúan con los receptores olfatorios de los mosquitos, bloqueándoles la sensación de olor [39]. Es importante anotar que algunas propiedades como el momento dipolar (MD) y el punto de ebullición han sido relacionadas con la actividad repelente. Ma *et al.*, 1999 [74] sugirieron un óptimo MD al que los compuestos poseen mayor repelencia. Por otro lado, ha sido demostrado que los compuestos efectivamente repelentes de

mosquitos deben poseer una apropiada presión de vapor y punto de ebullición para mantener la duración del tiempo de contacto del mosquito con el repelente, afectando de esta forma los quimiorreceptores olfativos del mismo [75]. De acuerdo con lo anterior y con base en la correlación encontrada entre la actividad repelente y la cantidad de compuestos oxigenados presentes en los AE de *Lippia alba*, es posible sugerir, que debido a las bajas presiones de vapor de los monoterpenos oxigenados, sean estos los responsables principales de la actividad repelente en los aceites esenciales evaluados.

En la literatura es bien conocido el efecto repelente e insecticida de una gran cantidad de aceites esenciales y extractos orgánicos obtenidos de especies aromáticas [39]. En Colombia, uno de los países con mayor biodiversidad en el mundo, los AE podrían ser empleados como control de diversos organismos perjudiciales para la industria de alimentos, entre los que se encuentran el *Tribolium castaneum*, el cual constituye uno de los más destacados por su impacto económico sobre harinas, cereales, pastas, galletas, nueces entre otros. Aunque para el control de estos organismos están disponibles varios productos químicos sintéticos, uno de los argumentos en contra de su utilización es la baja selectividad y frecuente aparición de efectos nocivos en las personas que los usan. En el presente estudio, la actividad repelente de aceites esenciales de al menos 4 plantas cultivadas en Colombia fueron evaluados contra *T. castaneum*, y los resultados demuestran que estos aceites tienen tan buenas o mejores propiedades repelentes que el producto comercial IR3535.

El aceite esencial de *Lippia alba* quimiotipo citral presentó la mejor capacidad repelente entre los 15 evaluados, con valores de repelencia, al menos en un 25%, superior a los registrados para IR3535. Este hecho posiciona a este aceite esencial como candidato promisorio para ser utilizado en la formulación de productos repelentes contra insectos.

No fueron encontradas diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de repelencia obtenidos a las 2 y 4 horas de exposición. Sin embargo, existe una leve tendencia a la disminución de la actividad repelente con el aumento del tiempo de exposición, hecho que puede ser atribuido a la alta volatilidad de los metabolitos presentes en los aceites esenciales.

### **3.2. Fraccionamiento del AE de orégano de monte (*L. origanoides*): composición química y actividad repelente.**

#### **3.2.1. Fraccionamiento y composición química del AE de *L. origanoides*.**

Los aceites esenciales de *L. origanoides* obtenidos por el método de arrastre con vapor, de acuerdo con las condiciones de extracción descritas en el Capítulo 1, presentaron un rendimiento de extracción que varió entre el 1.2 al 1.5%p/p. Con base en pruebas preliminares, en la rectificación del AE de orégano de monte, se optó por tomar una sola fracción volátil (F1) del AE, en el rango de temperatura, en la parte superior de la columna (T2), de 54-59°C a una presión de 10 Torr. Esta fracción estuvo compuesta principalmente por *p*-cimeno y  $\gamma$ -terpineno. En La **Tabla 49** se presentan los resultados del balance de masa del proceso de rectificación de los AE de *L. origanoides*. Mediante este proceso, fue posible obtener dos fracciones reproducibles. Una fracción 1 (F1) con una masa porcentual promedio del 20% y una fracción de fondo (FD) con una masa porcentual promedio del 79%. Se presentó un bajo porcentaje de pérdida de la masa original del AE, cuyo valor no superó el 2%. Estas pérdidas se dieron porque una pequeña porción del AE quedó adherida en las paredes internas de la columna rotatoria. También, en algunos casos, se evidenció la condensación de parte del aceite en las trampas que emplea el equipo, para el sistema de vacío. La buena reproducibilidad de los resultados en la obtención de las fracciones, muestra una alta eficiencia de la

tecnología de destilación fraccionada con eje rotante, para la rectificación del aceite esencial de *L. origanoides*.

**Tabla 49.** Balance de masa de la rectificación del AE *Lippia origanoides*, empleando la tecnología de eje rotante. Presión de trabajo 10 Torr.

No Exp.	W <sub>AE</sub> , g	W <sub>F1</sub> , g	%F1	W <sub>FD</sub> , g	%FD	Pérdida de AE, g	% Pérdida
1	15,1	2,8	<b>18,6</b>	12,11	<b>80,4</b>	0,16	<b>1,1</b>
2	15,1	3,3	<b>22,0</b>	11,48	<b>76,1</b>	0,28	<b>1,9</b>
3	15,2	3,2	<b>21,3</b>	11,78	<b>77,6</b>	0,18	<b>1,2</b>
4	15,1	3,2	<b>21,3</b>	11,6	<b>76,9</b>	0,27	<b>1,8</b>
5	15,1	2,7	<b>18,0</b>	12,22	<b>81,1</b>	0,13	<b>0,9</b>
6	15,3	2,9	<b>19,0</b>	12,2	<b>79,8</b>	0,18	<b>1,2</b>
7	15,5	3,2	<b>20,6</b>	12,05	<b>77,7</b>	0,25	<b>1,6</b>
<b>Promedio</b>	15.2±0.2	3.1±0.2	<b>20±2</b>	11.9±0.3	<b>79±2</b>	0.21±0.06	<b>1.4±0.4</b>
<b>CV, %</b>	-	-	<b>7.7</b>	-	<b>2.4</b>	-	<b>28.3</b>

W<sub>AE</sub>: Peso de aceite esencial; W<sub>F1</sub>: Peso de la fracción 1; W<sub>FD</sub>: Peso de la fracción de fondo

En la **Tabla 50** se presenta la composición química mayoritaria de los AE de *L. origanoides* crudos, de las fracciones volátiles (F1) y de los fondos del destilado (FD), obtenidas mediante destilación fraccionada, empleando tecnología de eje rotante.

En la **Figura 66** se presentan los perfiles cromatográficos típicos del aceite esencial de *Lippia origanoides* y sus fracciones obtenidas mediante destilación fraccionada (F1 y FD). Columna DB-5MS (60 m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV).

**Tabla 50.** Composición química mayoritaria del AE *Lippia origanoides* y sus fracciones volátil (F1) y de fondo (FD), obtenidas por destilación fraccionada a presión reducida (10 Torr), empleando la tecnología de eje rotante.

Componente	IRL <sup>a</sup>	Cantidad relativa, %																				
		EXP-1			EXP-2			EXP-3			EXP-4			EXP-5			EXP-6			EXP-7		
		AE	F1	FD	AE	F1	FD	AE	F1	FD	AE	F1	FD	AE	F1	FD	AE	F1	FD	AE	F1	FD
β-Mirceno	990	2,1	6,7		1,9	7,1		2,4	4,5		2,1	3,7		2,2	8,5		2,6	8,9		2,2	6,8	
α-Terpineno	1020	1,2	7,9		1,7	7,5		1,5	4,7		1,3	3,8		1,4	4,4		2,0	6,5		2,0	6,2	
p-Cimeno	1031	8	59,3		11,9	43,1		14,2	53,8		14,0	55,2		13,4	47,2	5,1	10,3	32,2	3,6	11,1	34,0	4,6
γ-Terpineno	1063	4,8	22,3		10,7	35,8	1,1	10,0	32,5		7,6	32,0		9,7	29,6	4,1	12,3	37,5	5,5	13,2	40,6	7,0
<b>Timol</b>	<b>1296</b>	<b>8,4</b>	<b>-</b>	<b>9,4</b>	<b>11,4</b>	<b>-</b>	<b>16,2</b>	<b>5,9</b>	<b>-</b>	<b>8,5</b>	<b>5,2</b>	<b>-</b>	<b>6,6</b>	<b>6,1</b>	<b>-</b>	<b>7,7</b>	<b>6,6</b>	<b>-</b>	<b>8,4</b>	<b>5,5</b>	<b>-</b>	<b>8,1</b>
<b>Carvacrol</b>	<b>1302</b>	<b>61,0</b>	<b>-</b>	<b>71,1</b>	<b>51,7</b>	<b>-</b>	<b>66,3</b>	<b>44,4</b>	<b>-</b>	<b>66,9</b>	<b>51,0</b>	<b>-</b>	<b>65,3</b>	<b>46,6</b>	<b>-</b>	<b>59,2</b>	<b>52,6</b>	<b>-</b>	<b>67,7</b>	<b>43,5</b>	<b>-</b>	<b>62,7</b>
trans-β-Cariofileno	1434	6,9	-	7,7	2,6		3,9	4,5		6,4	4,1		5,3	4,7		5,7	3,4		4,3	1,3		1,9
α-Humuleno	1469	3,1	-	3,6	1,4		2,2	2,5		3,7	2,2		2,9	2,6		3,1	1,7		2,2	0,5		1,0
Otros componentes	-	4,5	3,8	8,2	6,7	6,5	10	15	4,5	15	13	5,3	20	13	10	15	8,5	15	8,3	20,7	12	15
Porcentaje del peso de la fracción	-	-	<b>18,6</b>	<b>80,4</b>	-	<b>22,0</b>	<b>76,1</b>	-	<b>21,3</b>	<b>77,6</b>	-	<b>21,3</b>	<b>76,9</b>	-	<b>18,0</b>	<b>81,1</b>	-	<b>19,0</b>	<b>79,8</b>	-	<b>20,6</b>	<b>77,7</b>

<sup>a</sup> Índices de retención lineales determinados experimentalmente en la columna DB-5MS.

Exp: número del experimento

El fraccionamiento del AE de *L. origanoides* a presión reducida (10 Torr) permitió obtener una fracción volátil (F1) en el rango de temperatura de 54-59°C en la cabeza de destilación, compuesta principalmente por  $\gamma$ -terpineno (33%) y  $p$ -cimeno (46%). Esta fracción representó el 20% de la masa inicial del AE crudo. El fondo de la destilación (FD), quedó con un alto contenido de timol y carvacrol, aproximadamente, el 75% de la mezcla. La concentración de estos dos componentes en la fracción de fondo, representó un aumento del 30%, comparado con la cantidad presente en el AE crudo. Esta fracción correspondió aproximadamente el 80% de la masa total del aceite sometido al proceso de rectificación. En la **Figura 67**, se presenta el comportamiento de los componentes mayoritarios del AE de orégano de monte, antes y después del proceso de rectificación. Los resultados obtenidos en la rectificación del AE de orégano colombiano, son comparables con los obtenidos para el AE de orégano mexicano (*L. graveolens*) [24], en donde mediante la destilación fraccionada a presión reducida, en una columna empacada, se logró el incremento de la concentración del timol y carvacrol hasta en un 75% en la fracción de fondo.

La rectificación del AE de *L. origanoides*, empleando una columna giratoria, mostró ser un método reproducible para la concentración de los compuestos timol y carvacrol. La reproducibilidad fue evaluada en términos del coeficiente de variación (CV), obtenido para los siete experimentos independientes. En la **Tabla 51**, se presentan los valores del CV para la composición química de la fracción de fondo y el peso obtenido, en donde se evidencia que los coeficientes estuvieron por debajo de 10%, lo cual está de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio.

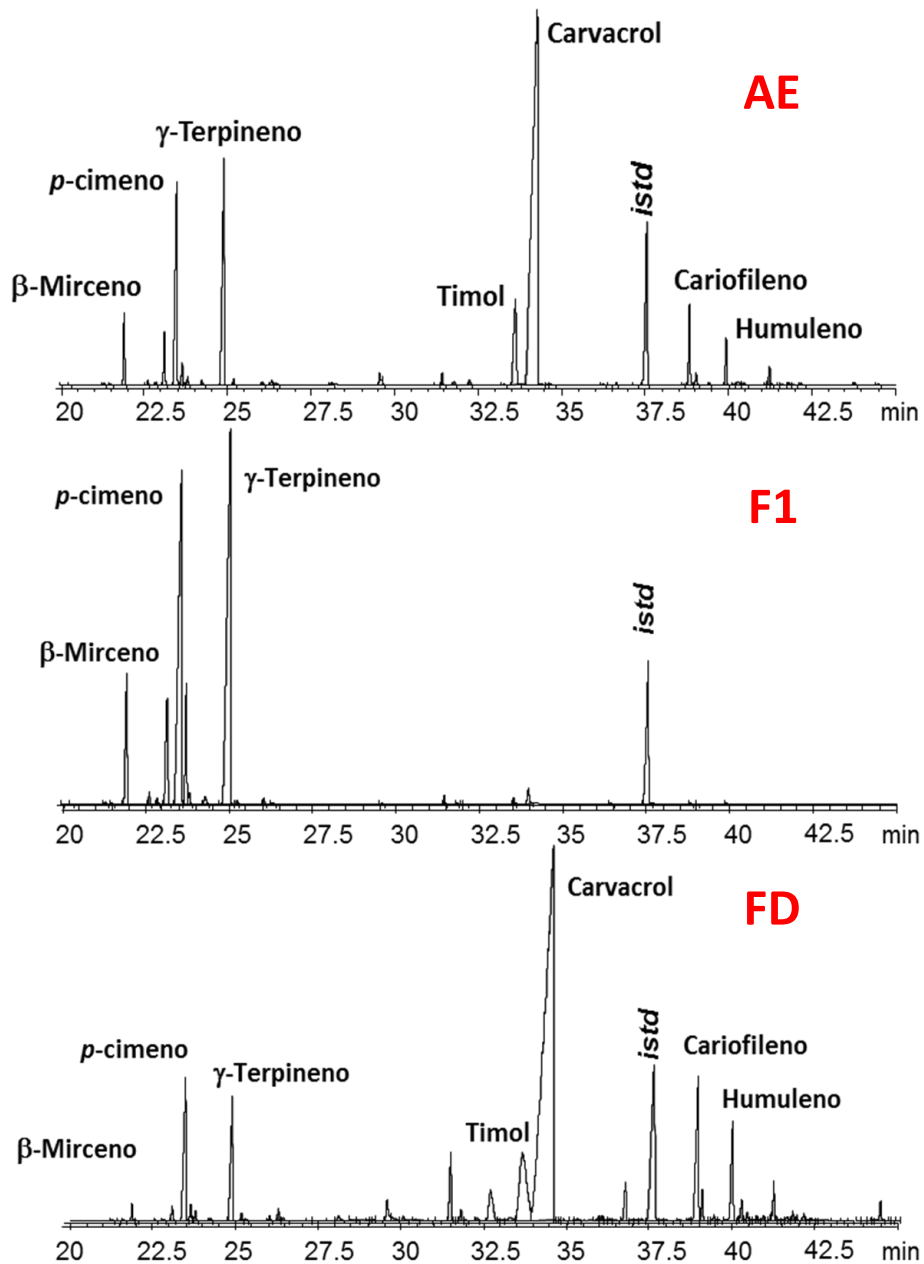
**Tabla 51.** Reproducibilidad del porcentaje de timol y carvacrol y del peso del fondo de destilación, obtenido en la destilación fraccionada del AE de *Lippia origanoides*.

Característica	Valor promedio (n=7)	SD (n=7)	CV, %
Contenido de Timol+carvacrol (%)	75	5	7,3
Peso de la fracción de fondo (g)	11,9	0,3	2,5

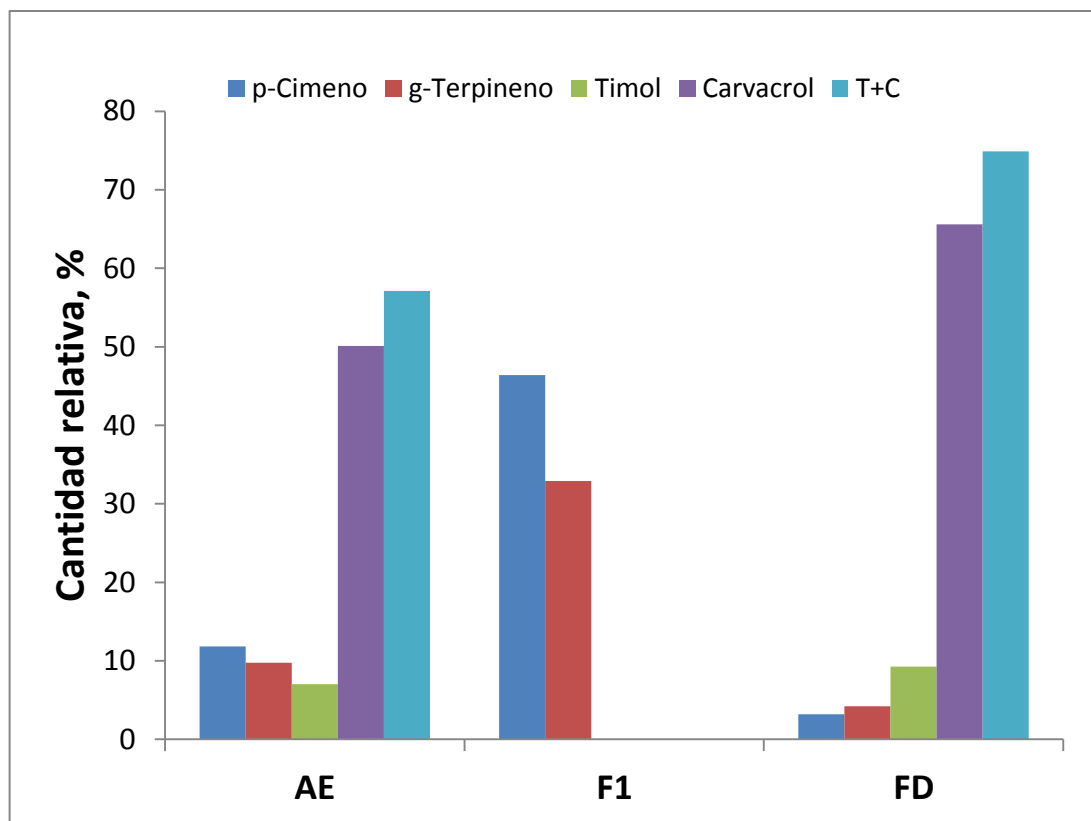
SD: desviación estándar

Un aspecto importante en la rectificación del AE de orégano de monte, es que las fracciones de fondo fueron enriquecidas con un alto contenido de timol y carvacrol (75%) a partir de un rango de concentraciones iniciales entre el 40 y el 60%, en el AE crudo, lo cual es muy bueno porque su valor comercial se incrementa. Teniendo en cuenta la importancia comercial y las propiedades biológicas de los dos compuestos fenólicos, timol y carvacrol, la fracción de fondo del destilado, generaría un mayor ingreso que el AE crudo. A partir de un kilogramo de aceite esencial de *L. origanoides*, con un contenido inicial entre el 45-57% de timol y carvacrol, se podrían obtener 800 g del fondo del destilado, con un contenido de timol y carvacrol hasta del 75%. Este incremento, en el contenido de timol y carvacrol, entre el AE crudo y rectificado, representaría un incremento en su valor comercial del 30-40%. Al comparar el precio del AE de tomillo crudo (*Thymus vulgaris*), análogo al AE de *L. origanoides*, cuyo valor en el mercado es de 85 dólares por kilogramo [25], y teniendo en cuenta los datos de productividad para este AE, discutidos en el **Capítulo 1** (396 kg de AE/ha/año), la producción del AE de *L. origanoides*, rectificado, podría llegar a generar ingresos anuales por

hectárea, de hasta 35.000 dólares anuales por hectárea de cultivo. Lo cual, le daría un margen diferenciador para introducir el AE en el mercado mundial de los aceites esenciales.



**Figura 66.** Perfiles cromatográficos típicos del aceite esencial de *Lippia origanoides* y sus fracciones obtenidas mediante destilación fraccionada (F1 y FD). Columna DB-5MS (60 m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV).



**Figura 67.** Cantidad relativa de los componentes mayoritarios presentes en el AE, fracción volátil (F1) y fracción de fondo (FD) de *Lippia origanoides*, obtenidos mediante destilación fraccionada a presión reducida, con tecnología de columna rotante.

### 3.2.2. Actividad repelente del AE y fracciones de *Lippia origanoides*.

Los resultados de la actividad repelente del AE de orégano de monte y las fracciones volátiles (F1) y de fondo, se presentan en la **Tabla 52**. También se presentan los resultados de repelencia de los compuestos timol y carvacrol.

**Tabla 52.** Porcentajes de repelencia obtenidos para el aceite esencial de *Lippia organoides*, sus fracciones volátiles y de fondo, obtenidas por destilación fraccionada, y el repelente comercial (IR3535) frente a *Tribolium castaneum*, a diferentes tiempos de exposición y concentración.

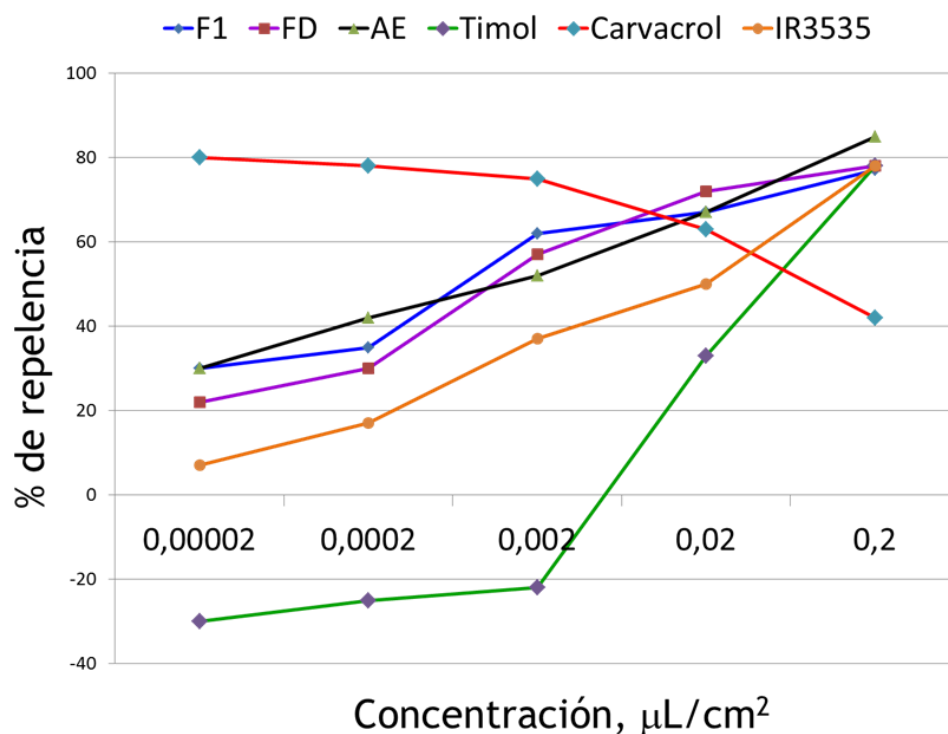
Muestra	Contenido de <i>p</i> -cimeno, $\gamma$ -terpineno	Contenido de timol, carvacrol, %	Concentración, $\mu\text{L}/\text{cm}^2$	% de repelencia $\pm$ SD (n=6)	
				2 h	4 h
<b>AE L. organoides</b>	21,6	56,2	0,00002	30 $\pm$ 7	38 $\pm$ 4
			0,0002	42 $\pm$ 6	50 $\pm$ 5
			0,002	52 $\pm$ 7	78 $\pm$ 6
			0,02	67 $\pm$ 5	82 $\pm$ 2
			<b>0,2</b>	<b>88<math>\pm</math>2</b>	<b>85<math>\pm</math>2</b>
<b>F1-EXP-2</b>	73,4	0	0,00002	30 $\pm$ 15	18 $\pm$ 15
			0,0002	35 $\pm$ 11	22 $\pm$ 9
			0,002	62 $\pm$ 4	32 $\pm$ 9
			0,02	67 $\pm$ 4	37 $\pm$ 7
			<b>0,2</b>	<b>77<math>\pm</math>5</b>	<b>47<math>\pm</math>8</b>
<b>F1-EXP-4</b>	87,2	0	0,00002	20 $\pm$ 17	7 $\pm$ 16
			0,0002	32 $\pm$ 11	13 $\pm$ 16
			0,002	47 $\pm$ 10	32 $\pm$ 15
			0,02	78 $\pm$ 4	75 $\pm$ 5
			<b>0,2</b>	<b>88<math>\pm</math>4</b>	<b>82<math>\pm</math>4</b>
<b>F1-EXP-5</b>	76,8	0	0,00002	33 $\pm$ 5	32 $\pm$ 6
			0,0002	52 $\pm$ 13	37 $\pm$ 10
			0,002	85 $\pm$ 3	60 $\pm$ 5
			0,02	92 $\pm$ 1	72 $\pm$ 4
			<b>0,2</b>	<b>95<math>\pm</math>2</b>	<b>83<math>\pm</math>5</b>
<b>F1-EXP-6</b>	69,7	0	0,00002	56 $\pm$ 7	56 $\pm$ 5
			0,0002	65 $\pm$ 5	58 $\pm$ 5
			0,002	70 $\pm$ 2	63 $\pm$ 4
			0,02	78 $\pm$ 6	67 $\pm$ 3
			<b>0,2</b>	<b>91<math>\pm</math>3</b>	<b>73<math>\pm</math>4</b>
<b>F1-EXP-7</b>	74,6	0	0,00002	23 $\pm$ 16	12 $\pm$ 12
			0,0002	57 $\pm$ 6	35 $\pm$ 11
			0,002	65 $\pm$ 9	52 $\pm$ 11
			0,02	68 $\pm$ 8	67 $\pm$ 4
			<b>0,2</b>	<b>78<math>\pm</math>1</b>	<b>75<math>\pm</math>2</b>
<b>FD-EXP-3</b>	0	75,4	0,00002	22 $\pm$ 13	2 $\pm$ 18
			0,0002	30 $\pm$ 6	13 $\pm$ 14
			0,002	57 $\pm$ 10	45 $\pm$ 7
			0,02	72 $\pm$ 4	63 $\pm$ 6
			<b>0,2</b>	<b>78<math>\pm</math>1</b>	<b>67<math>\pm</math>5</b>
<b>FD-EXP-4</b>	6,4	71,9	0,00002	10 $\pm$ 18	0 $\pm$ 15
			0,0002	43 $\pm$ 9	2 $\pm$ 17
			0,002	50 $\pm$ 2	42 $\pm$ 10
			0,02	78 $\pm$ 4	55 $\pm$ 8
			<b>0,2</b>	<b>90<math>\pm</math>3</b>	<b>81<math>\pm</math>4</b>

Continuación, **Tabla 52.**

Muestra	Contenido de <i>p</i> -cimeno, $\gamma$ -terpineno	Contenido de timol, carvacrol, %	Concentración, $\mu\text{L}/\text{cm}^2$	% de repelencia $\pm$ SD (n=6)	
				2 h	4 h
FD-EXP-5	13,2	62,0	0,00002	18 $\pm$ 16	15 $\pm$ 18
			0,0002	57 $\pm$ 6	38 $\pm$ 20
			0,002	70 $\pm$ 3	48 $\pm$ 4
			0,02	75 $\pm$ 3	55 $\pm$ 4
			<b>0,2</b>	<b>82<math>\pm</math>3</b>	<b>75<math>\pm</math>4</b>
FD-EXP-6	9,1	76,1	0,00002	-33 $\pm$ 15	-33 $\pm$ 18
			0,0002	42 $\pm$ 11	25 $\pm$ 16
			0,002	60 $\pm$ 5	53 $\pm$ 7
			0,02	75 $\pm$ 3	60 $\pm$ 6
			<b>0,2</b>	<b>82<math>\pm</math>3</b>	<b>73<math>\pm</math>4</b>
FD-EXP-7	11,6	70,8	0,00002	30 $\pm$ 7	12 $\pm$ 8
			0,0002	60 $\pm$ 5	40 $\pm$ 5
			0,002	67 $\pm$ 6	58 $\pm$ 7
			0,02	78 $\pm$ 4	60 $\pm$ 7
			<b>0,2</b>	<b>83<math>\pm</math>7</b>	<b>80<math>\pm</math>5</b>
Timol	-	98	0,00002	-30 $\pm$ 10	-20 $\pm$ 9
			0,0002	-25 $\pm$ 6	-16 $\pm$ 7
			0,002	-22 $\pm$ 6	-12 $\pm$ 5
			0,02	33 $\pm$ 3	57 $\pm$ 5
			<b>0,2</b>	<b>78<math>\pm</math>2</b>	<b>82<math>\pm</math>2</b>
Carvacrol	-	98	<b>0,00002</b>	<b>80<math>\pm</math>7</b>	<b>78<math>\pm</math>12</b>
			0,0002	78 $\pm$ 5	72 $\pm$ 7
			0,002	75 $\pm$ 5	70 $\pm$ 6
			0,02	63 $\pm$ 3	62 $\pm$ 4
			0,2	42 $\pm$ 2	40 $\pm$ 3
IR3535	-	-	0,00002	10 $\pm$ 13	8 $\pm$ 6
			0,0002	17 $\pm$ 9	16 $\pm$ 11
			0,002	54 $\pm$ 8	40 $\pm$ 9
			0,02	60 $\pm$ 6	50 $\pm$ 5
			<b>0,2</b>	<b>78<math>\pm</math>5</b>	<b>76<math>\pm</math>6</b>

Los resultados de la actividad repelente, mostraron que el aceite esencial, las fracciones volátiles (F1) y las fracciones de fondo (FD) de *L. organoides*, así como los compuestos timol (a altas concentraciones) y el carvacrol (a bajas concentraciones), presentaron un porcentaje de repelencia igual o superior al compuesto de control (IR3535), a las 2 y 4 h de exposición. La actividad repelente del AE y sus fracciones aumentó con el incremento de la concentración. En la **Figura 68**, se presenta el comportamiento del porcentaje de repelencia, a las dos

horas de exposición, en función de la concentración, del AE, las fracciones F1 y FD y los compuestos timol y carvacrol.



**Figura 68.** Porcentajes de repelencia del aceite esencial de *Lippia organoides* (AE), fracciones (F1, FD), componentes mayoritarios (timol, carvacrol) y el repelente comercial (IR3535), frente a *Tribolium castaneum*, 2 h de exposición.

En la **Figura 68**, se puede observar que concentraciones por encima de 0,002  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$  de carvacrol, disminuyeron el porcentaje de repelencia contra la especie *T. castaneum*, a las 2 y 4 h de exposición. Por el contrario, concentraciones bajas de timol ( $<0.02 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ ), generaron actividad atrayente hacia los insectos de *T. castaneum*.

En la **Tabla 53**, se presenta la composición química mayoritaria de las fracciones F1, FD y del aceite esencial de *L. organoides* a los cuales se les evaluó la actividad repelente.

**Tabla 53.** Composición química mayoritaria del AE de *Lippia origanoides* y sus fracciones volátil (F1) y de fondo (FD), obtenidas por destilación fraccionada a presión reducida (10 Torr), empleadas para la evaluación de la actividad repelente frente a *T. castaneum*.

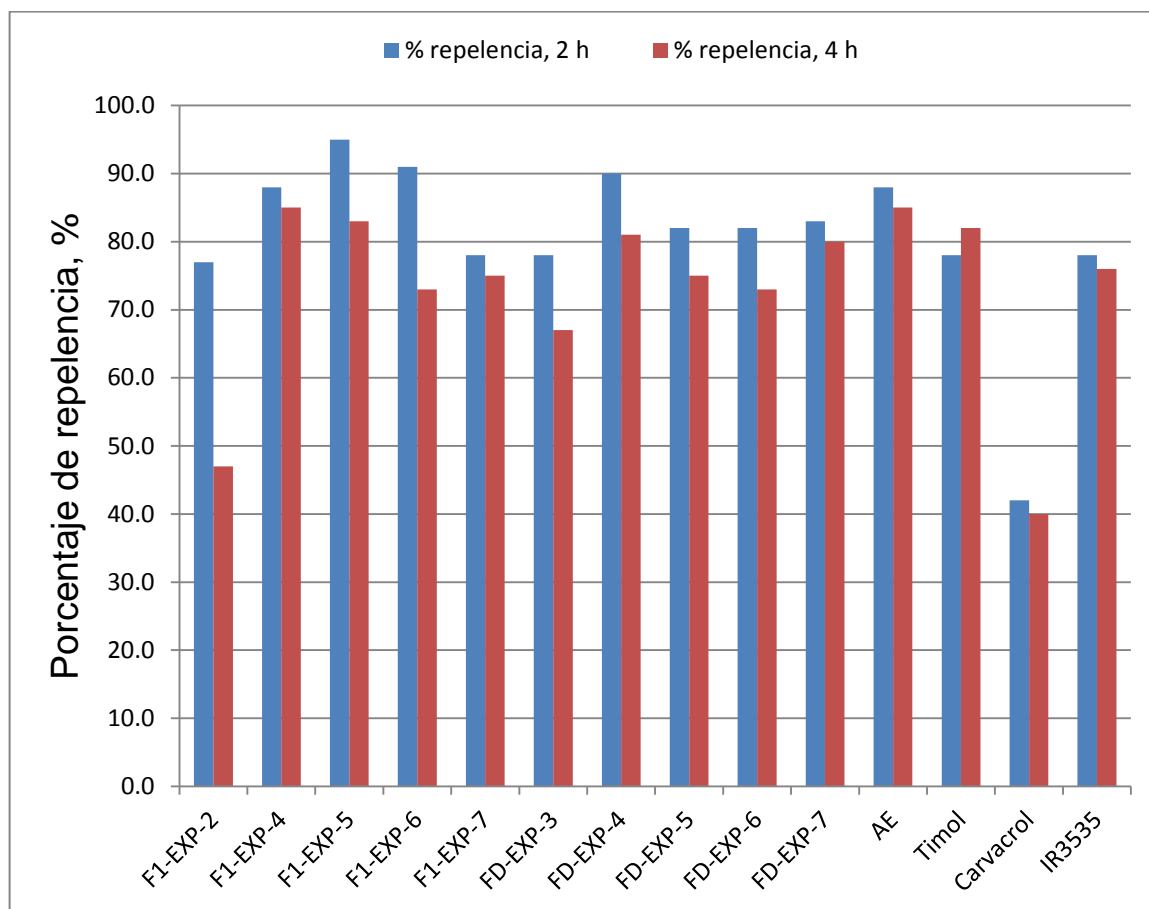
Componentes	Cantidad relativa, %										
	F1- EXP- 2	F1- EXP- 4	F1- EXP- 5	F1- EXP- 6	F1- EXP- 7	FD- EXP- 3	FD- EXP- 4	FD- EXP- 5	FD- EXP- 6	FD- EXP- 7	AE
$\beta$ -Mirceno	7,1	3,7	8,5	8,9	6,8	0	0	0	0	0	2,1
$\alpha$ -Terpineno	7,5	3,8	4,4	6,5	6,2	0	0	0	0	0	1,3
<i>p</i> -Cimeno	43,1	55,2	47,2	32,2	34	0	0	5,1	3,6	4,6	14
$\gamma$ -Terpineno	35,8	32	29,6	37,5	40,6	0	0	4,1	5,5	7	7,6
Timol	0	0	0	0	0	8,5	6,6	7,7	8,4	8,1	5,2
Carvacrol	0	0	0	0	0	66,9	65,3	59,2	67,7	62,7	51,0
<i>trans</i> - $\beta$ - Cariofileno	0	0	0	0	0	6,4	5,3	5,7	4,3	1,9	4,1
$\alpha$ -Humuleno	0	0	0	0	0	3,7	2,9	3,1	2,2	1	2,2
Otros componentes	6,5	5,3	10,3	14,9	12,4	14,5	19,9	15,1	8,3	14,7	12,5

F1: fracción volátil; FD: fondo de la destilación; Exp: número del experimento; AE: aceite esencial

En la **Figura 69**, se presenta el comportamiento del porcentaje de repelencia de las fracciones F1, FD, el AE y los compuestos timol y carvacrol, con un 98% de pureza, para una concentración de 0.2  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ , para 2 y 4 horas de exposición.

El aceite esencial, las fracciones volátiles (F1) y las fracciones de fondo del AE de *L. origanoides*, no presentaron diferencias significativas en el porcentaje de repelencia contra *T. castaneum*. Únicamente, las fracciones volátiles obtenidas en los experimentos 5 y 6, presentaron el mayor valor de repelencia para una concentración de 0.2  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ . Esto se debe a que estas fracciones presentaron un mayor porcentaje de otros componentes (10-14%), diferentes a los compuestos mayoritarios presentes en el AE. Estos compuestos fueron el  $\alpha$ -pineno, el limoneno, y el 1,8-cineol, los cuales son compuestos conocidos por sus propiedades repelentes [76]. Esto indica que los componentes que se encuentran

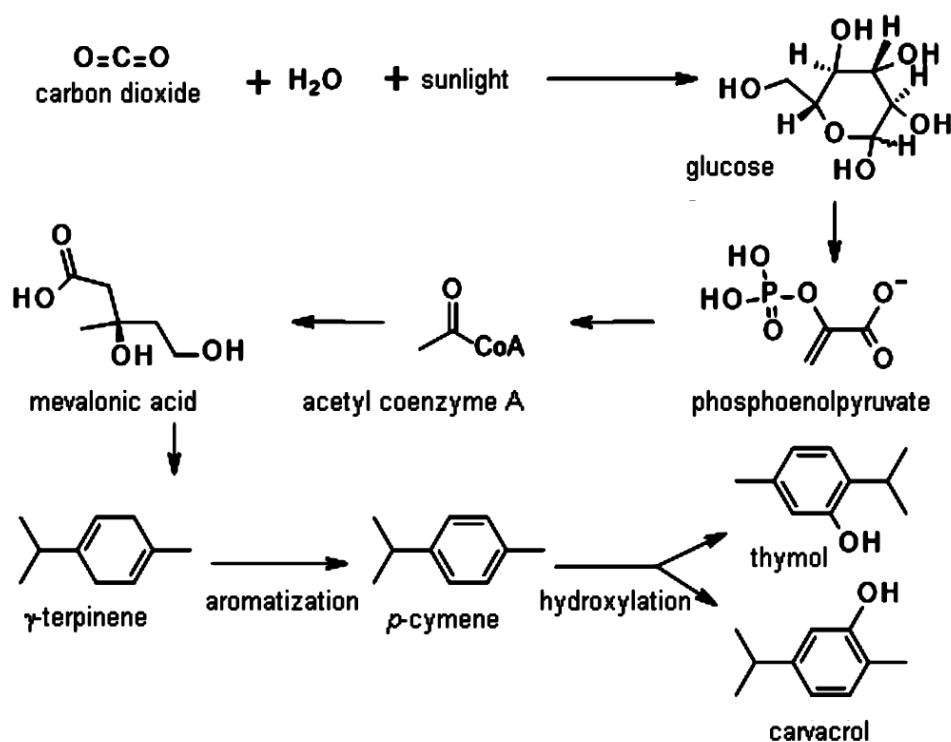
en baja proporción en el AE, también ejercen una acción repelente importante en la mezcla, lo cual evidencia la complejidad composicional de los aceites esenciales, frente a ensayos de actividad biológica.



**Figura 69.** Porcentaje de repelencia del AE, fracciones F1 y FD y los compuestos timol y carvacrol frente a *T. castaneum*, a una concentración de  $0.2 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ , para 2 y 4 horas de exposición.

Los valores similares de repelencia para el AE y fracciones volátiles y de fondo de *L. origanoides* a una concentración de  $0.2 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ , se puede deber a que los componentes que se encuentran en mayor concentración en cada fracción y el AE ( $\gamma$ -terpineno, *p*-cimeno, timol, carvacrol), presentan una estructura química de base común, que incluye el radical isopropilo unido a un anillo de seis miembros

aromatizado. Esta estructura, hace parte de la ruta de biosíntesis natural de estos compuestos en la planta. En la **Figura 70** se presenta el esquema general de la biosíntesis del timol y el carvacrol, en donde a partir del ácido mevalónico se sintetiza el  $\gamma$ -terpineno, que posteriormente, por aromatización genera el *p*-cimeno. Finalmente, la hidroxilación del *p*-cimeno, genera los isómeros timol y carvacrol.



**Figura 70.** Esquema general de la biosíntesis de los compuestos timol y carvacrol en plantas aromáticas [36].

En este sentido, la actividad repelente, del AE de *L. organoides* estaría asociada principalmente, a la presencia de estos cuatro componentes y sus isómeros. Estos resultados son consistentes con lo reportado por Feng Liu *et al.* [77], quienes encontraron que compuestos como el timol, carvacrol y el  $\alpha$ -terpineno, presentaron una alta respuesta olfatoria de repelencia contra insectos de *Culex*

*quinquefasciatus*. Esto supone un mecanismo de repelencia por saturación, en donde los filamentos de las antenas de los insectos, son capaces de detectar moléculas vaporizadas, que al saturar el ambiente donde se encuentra el insecto, genera que este se aleje de la fuente que detecta con sus antenas [38].

De otro lado, también, se observa que las mezclas de los componentes presentes en las fracciones y AE, demuestran un efecto sinérgico, al evidenciar, que la actividad repelente para el timol y carvacrol, fue menor que las mezclas evaluadas, en las cuales se incluían estos dos fenilpropanoides. Los compuestos que podrían estar asociados a este efecto, y que se encontraron en bajas proporciones en el AE y fracciones, son el  $\beta$ -mirceno, el limomeno, *trans*  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno y óxido de cariofileno. Estos terpenos y sesquiterpenos fueron reportados como compuestos con una alta respuesta olfatoria (respuesta a la repelencia) por parte del insecto *Culex quinquefasciatus* [77]. De otro lado, Park *et al.* [78], prepararon una formulación que contenía 2% de una mezcla de  $\alpha$ -terpineno, timol y carvacrol y la aplicaron en el área entre la muñeca y el codo de voluntarios, y encontraron una protección de hasta el 90%, durante 80 minutos, contra mosquitos de la especie *Culex pipiens pallens*. También, encontraron que el timol mostró repelencia similar a la del DEET, lo cual es consistente con los resultados obtenidos en este estudio.

Como conclusión general, se puede indicar que para obtener buenos porcentajes de repelencia contra la especie *T. castaneum*, a las 2 y 4 h de exposición a partir del AE de *L. origanoides*, no es necesario realizar su fraccionamiento. Es necesario garantizar, en el AE, contenidos bajos de  $\alpha$ -terpineno, cantidades intermedias (5-15%) de  $\gamma$ -terpineno, *p*-cimeno y cariofileno y porcentajes altos de timol-carvacrol (40-50%). Concentraciones por encima de 0,002  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$  de carvacrol, disminuyeron el porcentaje de repelencia.

### 3.3. Fraccionamiento del AE de citronela (*C. nardus*): composición química y actividad repelente.

#### 3.3.1. Fraccionamiento y composición química del AE de *C. nardus*.

Los rendimientos de extracción de los aceites esenciales de *C. nardus*, obtenidos por el método de arrastre con vapor, variaron entre el 0.3 al 1.5%p/p. Con base en pruebas preliminares en la rectificación del AE de citronela, se establecieron dos rangos de temperatura para la recolección de las diferentes fracciones del AE, a una presión de 7 Torr. La primera fracción (F1) se recogió cuando la temperatura en el tope de la columna de destilación alcanzó el rango de 63-66°C. Esta fracción estuvo compuesta principalmente por limoneno y citronelal. La segunda fracción (F2) se recogió en el rango de 81-82°C, compuesta principalmente por citronelal, citronelol y geraniol, la cual se unió a una tercera fracción, de composición semejante, obtenida en el rango de 102-107°C. El fondo de la destilación (FD), quedó enriquecido en citronelol, geraniol, sus respectivos acetatos y sesquiterpenos oxigenados. En la **Tabla 54** se presentan los resultados del balance de masa del proceso de rectificación de los AE de citronela.

Mediante este proceso, fue posible obtener tres fracciones reproducibles. Una fracción 1 (F1) con una masa porcentual promedio del 27,6%, una segunda fracción con un contenido porcentual del 37%, y una fracción de fondo (FD) con una masa porcentual promedio del 32%. Se presentó un bajo porcentaje de pérdida de la masa original del AE, cuyo valor no superó el 3%. Estas pérdidas se dieron porque una pequeña porción del AE quedó adherida en las paredes internas de la columna rotatoria. También, en algunos casos, se evidenció la condensación de parte del aceite en las trampas que emplea el equipo, para el sistema de vacío. La buena reproducibilidad de los resultados en la obtención de las fracciones, muestra una alta eficiencia de la tecnología de destilación fraccionada con eje rotante, para la rectificación del aceite esencial de citronela.

**Tabla 54.** Balance de masa de la rectificación del AE de *C. nardus*, empleando la tecnología de eje rotante. Presión de trabajo 7 Torr.

No Exp.	W <sub>AE</sub> , g	W <sub>F1</sub> , g	% F1	W <sub>F2</sub> , g	% F2	W <sub>FD</sub> , g	% FD	Pérdida de AE, g	% Pérdida
1	15,1	4,16	27,5	5,6	37,1	4,8	31,8	0,54	3,6
2	15,0	4,23	28,2	5,8	38,7	4,6	30,7	0,37	2,5
3	15,2	4,05	26,6	5,6	36,8	5,1	33,6	0,45	3,0
4	15,1	4,3	28,5	5,7	37,7	4,8	31,8	0,3	2,0
5	15,2	4,16	27,4	5,5	36,2	4,9	32,2	0,64	4,2
<b>P</b>	<b>15,1</b>	<b>4,2</b>	<b>27,6</b>	<b>5,6</b>	<b>37</b>	<b>4,8</b>	<b>32</b>	<b>0,46</b>	<b>3,0</b>
<b>SD</b>	0,1	0,1	0,7	0,1	1	0,2	1	0,13	0,9
<b>CV, %</b>	0,6	2,2	2,6	2,0	2,5	3,8	3,3	29,3	29,0

W<sub>AE</sub>: Peso de aceite esencial; W<sub>F1</sub>: Peso de la fracción 1; W<sub>F2</sub>: Peso de la fracción 2; W<sub>FD</sub>: Peso de la fracción de fondo; P: promedio; SD: desviación estándar; CV: coeficiente de variación.

Para aumentar el contenido de citronelal en uno de los destilados, la fracción más volátil (F1), fue sometida a un proceso de redestilación a una presión de 6 Torr. Una única fracción de este redestilado se tomó en el rango de temperatura de 77-78°C. Estas fracciones redestiladas (RD), presentaron un alto contenido de citronelal (>80%) y citronelol, principalmente. Se obtuvieron aproximadamente, 2.5 g de este redestilado, a partir de 4.2 g de la fracción 1, lo que representó el 60% de la masa original.

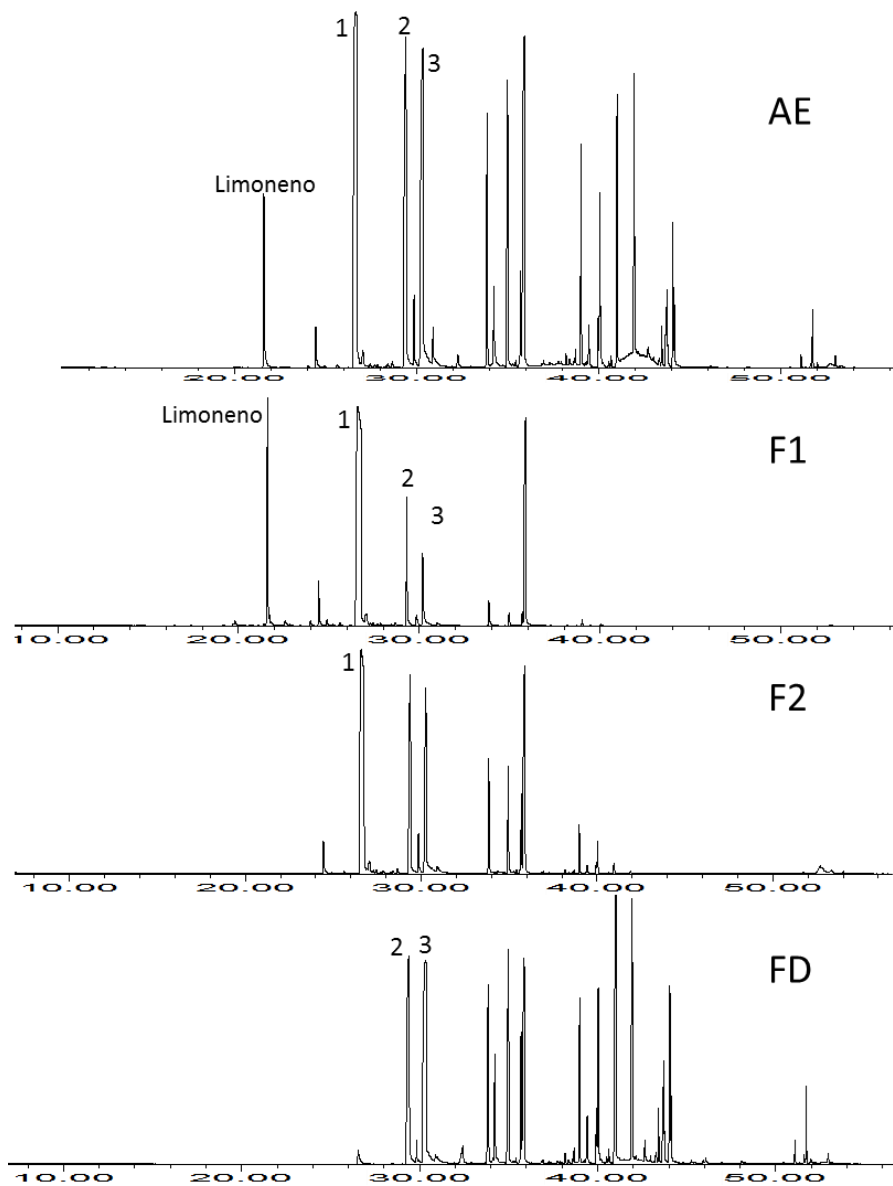
En la **Tabla 55** se presenta la composición química mayoritaria del AE de citronela crudo, de las fracciones volátiles (F1 y F2), de los fondos del destilado (FD), y de la redestilación de la fracción 1 (RD) obtenidas mediante destilación fraccionada, empleando tecnología de eje rotante. Para cada fracción se realizaron al menos tres réplicas, en algunos casos se realizaron seis y ocho réplicas.

**Tabla 55.** Composición química mayoritaria del AE de citronela y sus fracciones volátiles (F1 y F2), de fondo (FD) y de redestilación (RD) de la fracción 1, obtenidas por destilación fraccionada a presión reducida (7 Torr).

Fracción	Cantidad relativa, %																	
	Limoneno	Linalol	Citronelal	Estragol	Citronelol	Neral	Geraniol	Geranial	Acet de citronelilo	Eugenol	Acet de geranilo	$\beta$ -Elemeno	$\delta$ -Cadineno	Elemol	Germacren-4-ol	$\alpha$ -Muuroolol	$\alpha$ -Cadinol	otros
F1-Exp-1	16,4	2,8	61,8	1,4	7,8	0,8	5,0	0	1,7	0	0,8	0	0	0	0	0	0	1,2
F1-Exp-2	7,3	2,5	55,5	1,7	11,6	1,6	9,1	1,3	2,6	0	1,4	0	0	0	0	0	0	5,4
F1-Exp-3	10,6	8,6	74,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6,1
F2-Exp-1	0	1	81,6	0	7,3	1	4,1	1,2	1,0	0	0	1,1	0	0	0	0	0	1,7
F2-Exp-2	1,6	0	89,0	0,0	2,9	0	2,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3,9
F2-Exp-3	0	0	26,7	0	26,4	1,6	25,7	3	4,5	0	5	2,6	0	0	0	0	0	4,5
F2-Exp-4	0,3	0	88,6	0	3,5	0	3,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4,5
F2-Exp-5	1,5	1,4	36,2	1,3	18,3	3,9	9,3	2,9	5,8	0	2,2	4,7	0	0	0	0	0	11,7
F2-Exp-6	0,8	1,3	34,3	1,2	17,9	2,4	16,8	1,8	5,8	0	5,1	2,3	1,6	0	0	0	0	8,7
FD-Exp-1	0	0	0,7	0	23,7	0,4	16,9	0,7	4,3	3,2	6,6	2,1	4,2	12,1	9,1	4,6	6,2	1,3
FD-Exp-2	0	0	0,8	0	14,1	0,7	18	0,7	5,4	3,4	7,6	3,8	5,4	13	8,3	4,0	5,6	7,8
FD-Exp-3	0,6	0	26,9	0	19,8	2,7	17,3	3,9	7,5	1,7	6,2	6,8	2,2	0	0	0	0	1,3
FD-Exp-4	0	0	14,2	2,6	30,8	5,5	8,7	5,5	7,6	0	1,0	17,1	0	0	0	0	0	7
FD-Exp-5	0	0	13,4	0	13,4	0,1	22	0,3	5,3	2,5	8,6	1,1	5,6	11,4	2,7	2,5	4,1	3,6
FD-Exp-6	0	0	5,8	0,9	39,4	3,0	14,6	4,5	10,7	0	2,3	16	0	0	0	0	0	2,8
RD-1	0	0	94,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5,9
RD-2	0	0	82	0	5,9	0	5,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6,8
RD-3	0	1,1	88,4	0	4,2	0,7	2,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3,4
RD-4	0,3	0	96,6	0	0,8	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,8
RD-5	0	0	80,6	0	5,4	0	3,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10,5
RD-6	0	1	83	0	6,5	0,9	3,9	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3,7
RD-7	0	1,5	95	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0	3,5
RD-8	0	0	95,4	0	1,4	0	0,9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,3
AE	3,0	0,8	21,4	0	12,3	1,2	14,2	1,3	4,4	1,9	5,3	3,3	3,3	4,4	7,8	2,0	2,9	10,5

Exp: número del experimento; F1: fracción 1; F2: fracción 2; FD: fondo del destilado; RD: redestilado de la fracción 1

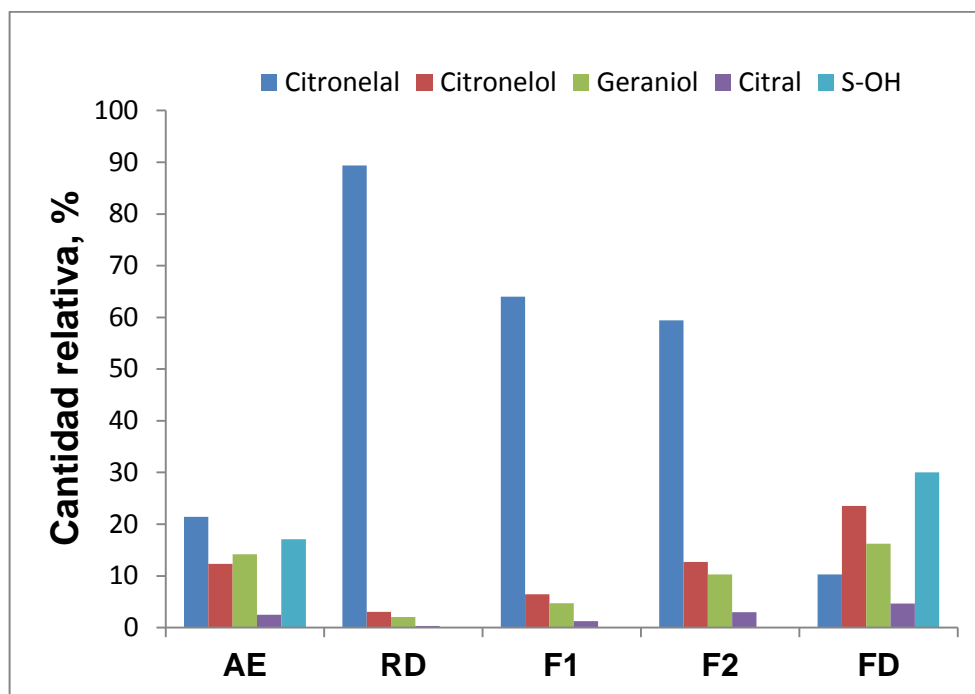
En la **Figura 71** se presentan los perfiles cromatográficos típicos del aceite esencial de citronela y sus fracciones obtenidas mediante destilación fraccionada (F1, F2 y FD). Columna DB-5MS (60 m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV).



**Figura 71.** Perfiles cromatográficos típicos del aceite esencial de citronela y sus fracciones obtenidas mediante destilación fraccionada (F1, F2 y FD). Columna DB-5MS (60 m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). (1) citronelal; (2) citronelol; (3) geraniol.

El fraccionamiento del AE de citronela a presión reducida (7 Torr) permitió obtener tres fracciones volátiles bien definidas: una primera fracción (F1) en el rango de temperatura de 63-66°C en la cabeza de destilación, compuesta principalmente por limoneno (15%), citronelal (64%) y citronelol (7%). Esta fracción representó el 28% de la masa inicial del AE crudo. A partir de esta fracción, se obtuvo su redestilado (RD) en un rango de temperatura de 77-78°C a una presión de 6 Torr, cuyo componente principal fue el citronelal (ca. 89%). Esta fracción representó el 10% de la masa inicial del AE. La segunda fracción (F2), se obtuvo en dos fases en los rangos de temperatura 81-82°C y 102-107°C. Estuvo compuesta principalmente por citronelal (59%), citronelol (13%), geraniol (10%) y citral (3-4%). Esta fracción correspondió al 37% de la masa del AE. El fondo de la destilación (FD), quedó con un alto contenido de citronelol (25-30%), geraniol (16%) y sesquiterpenos oxigenados (elemol, germacren-4-ol, cadinol), que lograron un 30% en la mezcla final. Esta fracción fue el 32% de la masa de AE. La concentración del citronelol en la fracción de fondo, uno de los componentes de interés, por sus propiedades repelentes, representó un aumento del 91%, comparado con la cantidad inicial presente en el AE crudo. También se presentó un incremento en la concentración de los sesquiterpenos, en un 75% respecto a lo presente en la mezcla inicial. En la **Figura 72**, se presenta la variación de los componentes mayoritarios del AE de citronela, antes y después del proceso de rectificación, en cada una de las fracciones obtenidas.

La rectificación del AE de citronela, empleando una columna giratoria, mostró ser un método reproducible para la concentración del citronelal, a partir de la redestilación de la primera fracción. La reproducibilidad fue evaluada en términos del coeficiente de variación (CV), obtenido para ocho experimentos independientes. En la **Tabla 56**, se presentan los valores del CV para el contenido de citronelal presente en el redestilado, y el peso obtenido, en donde se evidencia que los coeficientes estuvieron por debajo de 10%, lo cual está de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio.



**Figura 72.** Cantidad relativa de los componentes mayoritarios presentes en el AE, fracciones volátiles (F1, F2, RD) y la fracción de fondo (FD) de citronela, obtenidos mediante destilación fraccionada a presión reducida, con tecnología de columna rotante. S-OH: sesquiterpenoles.

**Tabla 56.** Reproducibilidad del porcentaje de citronelal y del peso del redestilado de la fracción 1, obtenido en la destilación fraccionada del AE de citronela.

Característica	Valor promedio (n=7)	SD (n=7)	CV, %
Contenido de citronelal (%)	89	7	7,9
Peso de la fracción de fondo (g)	2,1	0,1	4,8

SD: desviación estándar

Con base en los resultados del fraccionamiento del AE de citronela, dos fracciones representarían un interés comercial por sus altos contenidos de citronelal y citronelol, principales compuestos empleados en la elaboración de lociones, jabones, champúes y como fragancias de cosméticos [79]. El redestilado obtenido a partir de la fracción 1 y la fracción de fondo. A partir de un kilogramo de aceite esencial de citronela, con un contenido inicial entre el 20-30% de citronelal y 12 a 15% de citronelol, se podrían obtener 140 g del redestilado de la fracción 1, con un contenido de citronelal de hasta del 97%. En el fondo de la destilación podrían obtenerse 320 g de con un contenido de citronelol de hasta el 30%. Este incremento, del citronelal y citronelol, entre el AE crudo y el rectificado, representaría un incremento en su valor comercial de hasta un 300%. El precio del AE de citronela crudo en el mercado es de 16 dólares por kilogramo [25], y teniendo en cuenta los datos de productividad para este AE, discutidos en el **Capítulo 1** (327 kg de AE/ha/año), la producción del AE de citronela, rectificado, enriquecido en citronelal y citronelol, podría llegar a generar ingresos anuales por valor de 9600 dólares anuales por hectárea de cultivo. Esta condición, le daría un margen diferenciador, para introducir el AE de citronela colombiano, en el mercado mundial de los aceites esenciales.

### **3.3.2. Actividad repelente del AE y fracciones de *Cymbopogon nardus*.**

Los resultados de la actividad repelente del AE de citronela y las fracciones volátiles (F1, F2, RD) y de fondo, se presentan en la **Tabla 57** Los valores obtenidos de repelencia, mostraron que el aceite esencial, las fracciones volátiles (F1, F2) y las fracciones de fondo (FD) de citronela, presentaron un porcentaje de repelencia igual o superior al compuesto de control (IR3535), a las 2 y 4 h de exposición, para una concentración de 0.2  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ .

**Tabla 57.** Porcentajes de repelencia obtenidos para el aceite esencial de *Cymbopogon nardus*, sus fracciones volátiles y de fondo, obtenidas por destilación fraccionada, y el repelente comercial (IR3535) frente a *Tribolium castaneum*, a diferentes tiempos de exposición y concentración.

Muestra	Cantidad citronelal + citronelol, %	% de repelencia (2 h)					% de repelencia (4 h)				
		Concentración ( $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ )					Concentración ( $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ )				
		0,00002	0,0002	0,002	0,02	0,2	0,00002	0,0002	0,002	0,02	0,2
F1-EXP-1	69,6	28±4	43±13 <sup>b</sup>	57±7 <sup>b</sup>	58±8 <sup>b</sup>	65±4 <sup>b</sup>	2±5	12±6	48±9 <sup>b</sup>	50±4 <sup>b</sup>	62±5 <sup>b</sup>
F1-EXP-2	67,1	-30±7	22±28	32±14	58±9 <sup>b</sup>	60±10 <sup>b</sup>	-5±25	23±19	27±19	37±16	63±19 <sup>b</sup>
F1-EXP-3	74,7	27±22	58±13 <sup>b</sup>	62±17 <sup>b</sup>	75±4 <sup>b</sup>	80±5 <sup>b</sup>	12±22	58±7 <sup>b</sup>	65±15 <sup>b</sup>	73±7 <sup>b</sup>	78±4 <sup>b</sup>
F2-EXP-1	88,9	15±18	32±17 <sup>b</sup>	58±5 <sup>b</sup>	60±10 <sup>b</sup>	82±3 <sup>b</sup>	-8±14	23±16	53±3 <sup>b</sup>	60±11 <sup>b</sup>	76±3 <sup>b</sup>
F2-EXP-2	91,9	-30±21	23±10	55±2 <sup>b</sup>	55±6 <sup>b</sup>	83±6 <sup>b</sup>	-47±21 <sup>b</sup>	-5±8	55±5 <sup>b</sup>	57±6 <sup>b</sup>	77±2 <sup>b</sup>
F2-EXP-3	53,1	-3±4	12±24	22±13	72±8 <sup>b</sup>	88±3 <sup>b</sup>	-20±9	8±22	43±14 <sup>b</sup>	68±5 <sup>b</sup>	78±6 <sup>b</sup>
F2-EXP-4	92,1	23±19	52±6 <sup>b</sup>	62±5 <sup>b</sup>	67±4 <sup>b</sup>	72±6 <sup>b</sup>	13±29	45±18 <sup>b</sup>	55±15 <sup>b</sup>	57±9 <sup>b</sup>	72±5 <sup>b</sup>
F2-EXP-5	54,5	17±7	53±6 <sup>b</sup>	67±18 <sup>b</sup>	77±7 <sup>b</sup>	85±5 <sup>b</sup>	33±10	43±12 <sup>b</sup>	68±9 <sup>b</sup>	75±6 <sup>b</sup>	85±5 <sup>b</sup>
F2-EXP-6	52,2	20±8	27±6	30±19	63±8 <sup>b</sup>	67±3 <sup>b</sup>	13±14	27±7	30±14	45±12 <sup>b</sup>	65±6 <sup>b</sup>
FD-EXP-1	24,4	-8±21	35±18 <sup>b</sup>	60±11 <sup>b</sup>	92±4 <sup>b</sup>	92±5 <sup>b</sup>	-23±25	22±15	48±17 <sup>b</sup>	73±4 <sup>b</sup>	87±2 <sup>b</sup>
FD-EXP-2	14,9	25±17	47±11 <sup>b</sup>	52±11 <sup>b</sup>	85±5 <sup>b</sup>	97±2 <sup>b</sup>	3±24	33±10 <sup>b</sup>	40±13 <sup>b</sup>	80±6 <sup>b</sup>	90±3 <sup>b</sup>
FD-EXP-3	47,3	-38±8	8±20	33±20	48±11 <sup>b</sup>	75±7 <sup>b</sup>	-47±9	7±11	27±17	42±19 <sup>b</sup>	87±4 <sup>b</sup>
FD-EXP-4	45	-18±14	30±7	58±10 <sup>b</sup>	83±4 <sup>b</sup>	90±2 <sup>b</sup>	-15±16	25±15	43±9 <sup>b</sup>	75±8 <sup>b</sup>	90±2 <sup>b</sup>
FD-EXP-5	26,8	-10±11	27±19	52±7 <sup>b</sup>	88±4 <sup>b</sup>	93±3 <sup>b</sup>	1±15	15±18	65±13 <sup>b</sup>	75±9 <sup>b</sup>	88±1 <sup>b</sup>
FD-EXP-6	45,2	-63±13 <sup>b</sup>	-26±13	-10±3	60±5 <sup>b</sup>	76±6 <sup>b</sup>	-68±7 <sup>b</sup>	-48±17 <sup>b</sup>	-18±10	65±8 <sup>b</sup>	83±6 <sup>b</sup>

F1: fracción volátil 1; F2: Fracción volátil 2; FD: fondo de la destilación fraccionada;

<sup>b</sup>. Diferencias estadísticamente significativas entre el número de insectos en el área tratada y no tratada, utilizando la prueba T. pareada ( $P < 0.05$ ).

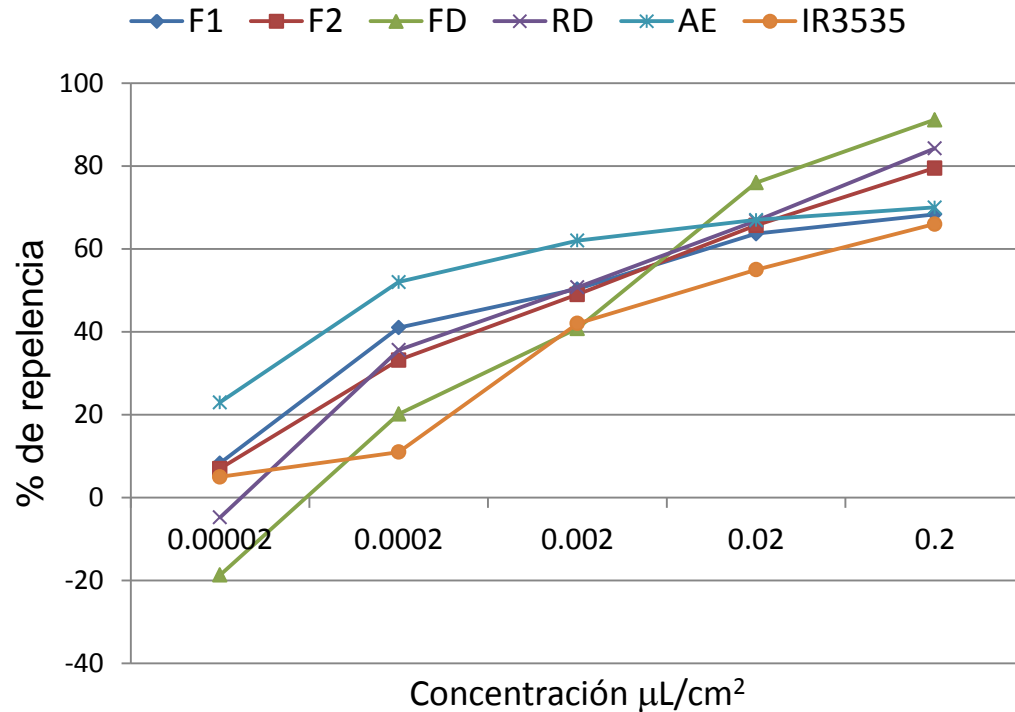
Continuación, **Tabla 57.**

Muestra	Cantidad citronelal + citronelol, %	% de repelencia (2 h)					% de repelencia (4 h)				
		Concentración (µL/cm <sup>2</sup> )					Concentración (µL/cm <sup>2</sup> )				
		0,00002	0,0002	0,002	0,02	0,2	0,00002	0,0002	0,002	0,02	0,2
RD-1	94,1	-40±11	15±12	25±8	38±6	73±7 <sup>b</sup>	-30±21	-8±15	22±13	25±11	78±7 <sup>b</sup>
RD-2	87,9	17±17	47±7 <sup>b</sup>	78±3 <sup>b</sup>	83±4 <sup>b</sup>	85±4 <sup>b</sup>	32±21	42±9 <sup>b</sup>	70±2 <sup>b</sup>	73±2 <sup>b</sup>	76±2 <sup>b</sup>
RD-3	92,6	12±17	28±15	33±14	73±11 <sup>b</sup>	77±3 <sup>b</sup>	13±16	20±12	22±13	70±6 <sup>b</sup>	80±6 <sup>b</sup>
RD-4	97,4	-27±10	53±16 <sup>b</sup>	75±8 <sup>b</sup>	88±4 <sup>b</sup>	92±3 <sup>b</sup>	-11±17	47±16 <sup>b</sup>	75±6 <sup>b</sup>	87±4 <sup>b</sup>	90±2 <sup>b</sup>
RD-5	86	-48±15 <sup>b</sup>	40±8 <sup>b</sup>	58±9 <sup>b</sup>	73±7 <sup>b</sup>	81±2 <sup>b</sup>	-46±21 <sup>b</sup>	27±17	42±19 <sup>b</sup>	72±9 <sup>b</sup>	82±4 <sup>b</sup>
RD-6	89,5	24±11	32±6	50±5 <sup>b</sup>	58±12 <sup>b</sup>	68±4 <sup>b</sup>	12±10	25±8	37±8	38±14	68±6 <sup>b</sup>
RD-7	95	12±18	35±11	42±15 <sup>b</sup>	63±8	67±3 <sup>b</sup>	-7±27	25±8	32±15	45±12 <sup>b</sup>	65±6 <sup>b</sup>
RD-8	96,8	12±17	35±15 <sup>b</sup>	45±8 <sup>b</sup>	58±14 <sup>b</sup>	97±2 <sup>b</sup>	0±29	32±10 <sup>b</sup>	35±11 <sup>b</sup>	52±6 <sup>b</sup>	87±3 <sup>b</sup>
AE	33,7	23±10	52±7 <sup>b</sup>	62±8 <sup>b</sup>	67±4 <sup>b</sup>	70±2 <sup>b</sup>	13±11	45±6 <sup>b</sup>	56±4 <sup>b</sup>	58±6 <sup>b</sup>	68±2 <sup>b</sup>
IR3535	-	11±12	18±7 <sup>b</sup>	55±8 <sup>b</sup>	60±5 <sup>b</sup>	68±2 <sup>b</sup>	10±12	16±11 <sup>b</sup>	40±8 <sup>b</sup>	50±5 <sup>b</sup>	64±2 <sup>b</sup>

F1: fracción volátil 1; F2: Fracción volátil 2; FD: fondo de la destilación fraccionada;

<sup>b</sup>. Diferencias estadísticamente significativas entre el número de insectos en el área tratada y no tratada, utilizando la prueba T. pareada (P<0.05).

La actividad repelente del AE de citronela y sus fracciones aumentó con el incremento de la concentración. En la **Figura 73**, se presenta el comportamiento del porcentaje de repelencia, a las dos horas de exposición, en función de la concentración, del AE, las fracciones volátiles F1, F2, RD y la fracción de fondo FD.



**Figura 73.** Porcentajes de repelencia del aceite esencial de citronela (AE), fracciones (F1, F2, RD, FD) y el repelente comercial (IR3535), frente a *Tribolium castaneum*, 2 h de exposición. 0.2  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ .

En la **Figura 73**, se puede observar que a concentraciones por debajo de 0,0002  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$  la fracción de fondo y el redestilado de la fracción 1, presentaron actividad atrayente en *T. castaneum*, a las 2 h de exposición. La actividad repelente del AE, disminuyó hacia los insectos de *T. castaneum*, cuando aumentó su concentración de 0.002  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ , comparado con la fracción 2, con el fondo del destilado y con el redestilado de la fracción 1. Esto indica, que la disminución en la concentración de

algún, o algunos componentes en la mezcla, sí ejercen un mayor efecto sobre la actividad repelente.

En la **Tabla 58**, se presenta la composición química mayoritaria de las fracciones F1, F2, RD y FD del aceite esencial de citronela, a los cuales se les evaluó la actividad repelente.

**Tabla 58.** Composición química mayoritaria del AE de citronela y sus fracciones volátiles (F1, F2, RD) y de fondo (FD), obtenidas por destilación fraccionada a presión reducida (7 Torr), empleadas para la evaluación de la actividad repelente frente a *T. castaneum*.

Compuesto	Cantidad relativa, %				
	F1	F2	FD	RD	AE
Citronelal	64,0	59,4	10,3	89,4	21,4
Citronelol	6,5	12,7	23,5	3,0	12,3
Neral	0,8	1,5	2,1	0,2	1,2
Geraniol	4,7	10,3	16,3	2,0	14,2
Geranial	0,4	1,5	2,6	0,1	1,3
Acetato de citronelilo	1,4	2,9	6,8	0,0	4,4
Eugenol	0,0	0,0	1,8	0,0	1,9
Acetato de geranilo	0,7	2,1	5,4	0,0	5,3
Elemol	0,0	0,0	12,1	0,0	4,4
Germacren-4-ol	0,0	0,0	9,1	0,0	7,8
$\alpha$ -Muurolol	0,0	0,0	4,6	0,0	2,0
$\alpha$ -Cadinol	0,0	0,0	4,2	0,0	2,9
<b>Total CO</b>	<b>78,6</b>	<b>90,3</b>	<b>98,7</b>	<b>94,8</b>	<b>79,1</b>
Otros componentes	21,4	9,7	1,3	5,2	20,9

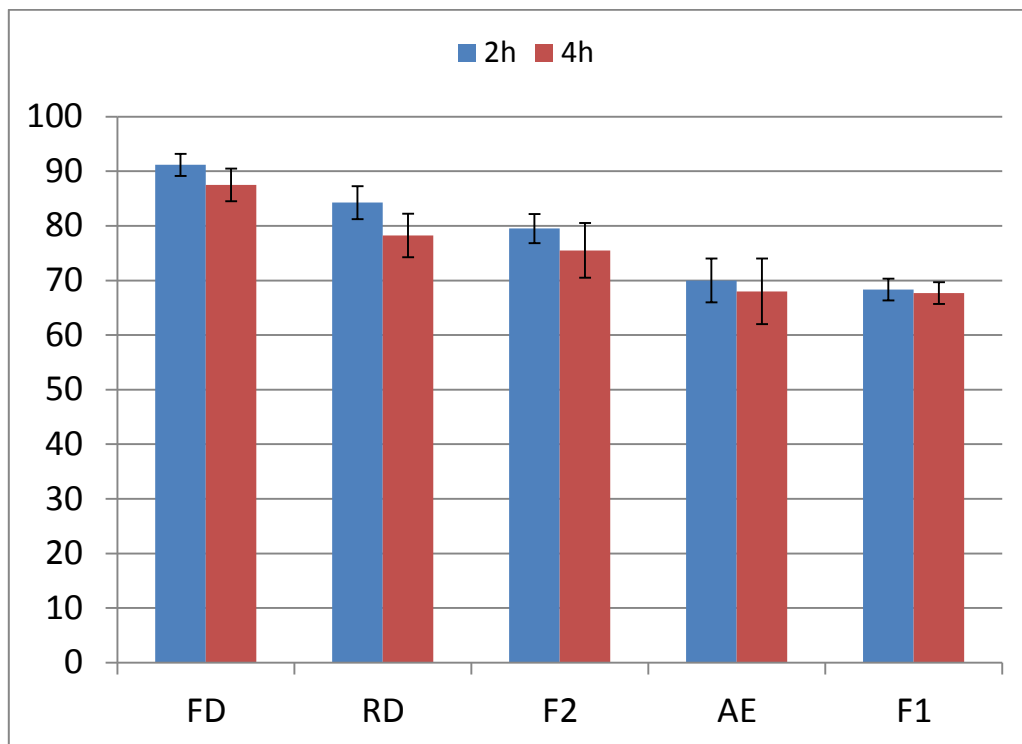
F1: fracción volátil 1; F2: fracción volátil 2; FD: fondo de la destilación; RD: Redestilado de la fracción 1; AE: aceite esencial; CO: compuestos oxigenados.

La fracción 1 se distinguió de las demás por su alto contenido de citronelal (ca. 64%). La redestilación de esta fracción a una presión de 6 Torr, condujo a la obtención de un redestilado compuesto principalmente por el 89-97% de citronelal. Este aumento en el contenido de citronelal en casi un 40%, produjo un incremento

significativo en la actividad repelente contra *T. castaneum*, aproximadamente en un 23%, para una concentración de 0.2  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ . Una posible explicación al mayor efecto repelente por el aumento de la concentración de citronelal, tiene que ver con el mecanismo de respuesta olfatoria que presentan algunos insectos. Feng y colaboradores [77], encontraron que la respuesta en los flagelos de las antenas de la especie *Culex quinquefasciatus*, frente al citronelal, producía en el insecto una respuesta en las neuronas olfativas, con una intensidad de hasta 100 registros por segundo. Esto indica que el insecto responde neuronalmente, al efecto del compuesto, alejándose de la fuente que origina este comportamiento. Este mismo efecto se observó para el citronelal, en concentraciones de al menos 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

En la **Figura 74**, se presenta el comportamiento del porcentaje de repelencia de las fracciones F1, F2 y RD, del fondo de la destilación, FD, y del AE, para una concentración de 0.2  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ , para 2 y 4 horas de exposición.

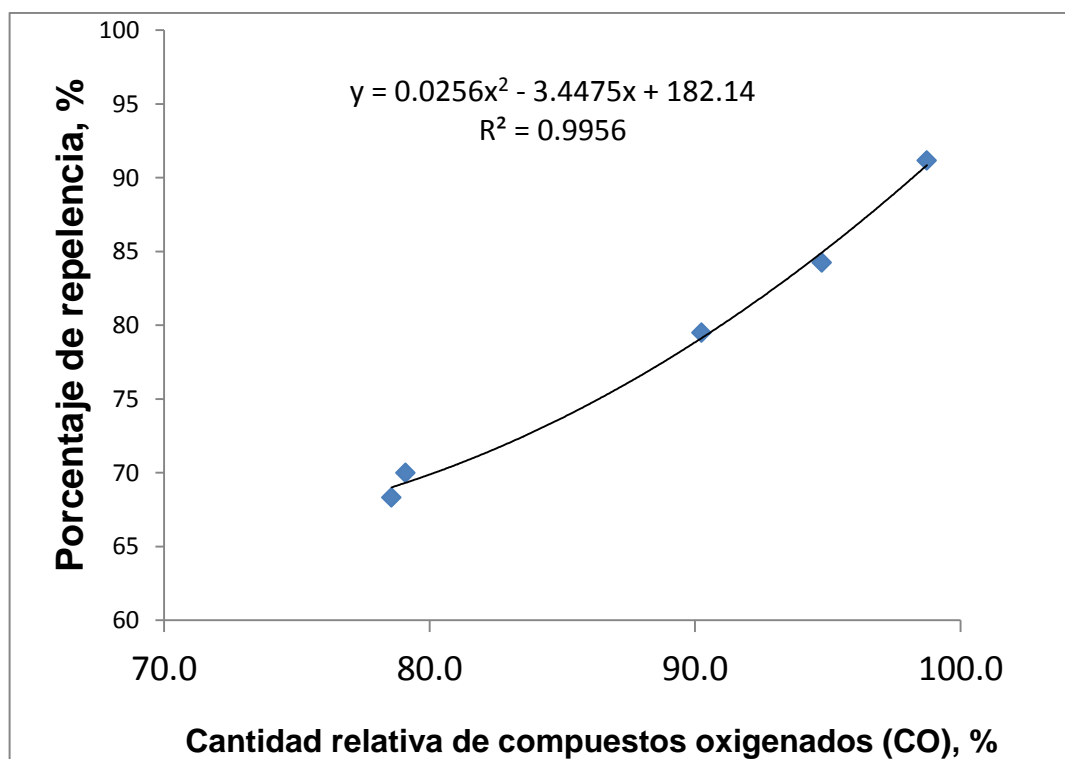
Los resultados de repelencia a las 2 y 4 horas de exposición del AE de citronela y las diferentes fracciones obtenidas mediante destilación fraccionada a presión reducida, no presentaron diferencias significativas. Este resultado es muy bueno, ya que el efecto de los componentes presentes en las mezclas perdura en el tiempo. El mejor resultado de repelencia se logró para la fracción del fondo del destilado, cuya diferencia composicional respecto al AE y demás fracciones, radicó en los altos contenidos de sesquiterpenos oxigenados tales como el elemol, germacren-4-ol, muurolol y  $\alpha$ -cadinol (ca. 30%). En el fondo también quedaron cantidades intermedias (10-25%) de los compuestos citronelal, citronelol y geraniol. Esto coincide con lo reportado por Annick *et al.*, quienes encontraron concentraciones letales para *T. castaneum*, de aceites esenciales del género *Cymbopogon*, de entre 1.2 a 7.5 mL/L de aire, entre cuyos componentes mayoritarios se encontraron citronelol, citronelal y geraniol [80].



**Figura 74.** Porcentaje de repelencia del AE, fracciones F1, F2, RD y FD frente a *T. castaneum*, a una concentración de 0.2 µL/cm<sup>2</sup>, para 2 y 4 horas de exposición.

Otro efecto que se observó en la actividad repelente del AE de citronela y sus fracciones frente a *T. castaneum*, es que, cuando se incrementó el contenido de compuestos de tipo monoterpenoide como citronelal, citronelol, geraniol, citral y de tipo sesquiterpenoide, como elemol, germacren-4-ol, muurolol en las mezclas, se incrementó su actividad repelente. Se encontró una correlación positiva entre el contenido de compuestos oxigenados totales en la mezcla y la actividad repelente. En la **Figura 75** se presenta esta relación, junto con la ecuación obtenida. La mayor repelencia (%), se encontró para la fracción de fondo, la cual se enriqueció principalmente, en los compuestos citronelal, citronelol, geraniol, acetatos de citronelilo y geranilo y el germacren-4-ol. Este comportamiento demuestra una vez más, la complejidad de las mezclas y fracciones de aceites esenciales, frente a ensayos de actividad biológica. No es posible identificar un único compuesto con la mejor actividad, sino que se trata de un efecto “comunitario” y de proporciones

definidas. El objetivo es entonces, encontrar las mejores proporciones de las mezclas, que presenten la mejor actividad biológica. En el caso del AE de citronela, se encontró preliminarmente, que se requieren contenidos intermedios de citronelal, citronelol, geraniol, gremacren-4-ol y contenidos bajos de los sesquiterpenoles, elemol, muurolol y  $\alpha$ -cadinol. El mayor efecto repelente que se presentó cuando aumentó la concentración de sesquiterpenoles en la mezcla, puede estar asociado al efecto “fijador” que pueden ejercer los sesquiterpenos, sobre los monoterpenoides. Su fijación se presenta por la similitud en sus estructuras químicas, que pueden formar puentes de hidrógeno, lo que hace que disminuya la presión de vapor de los compuestos más volátiles, lo cual produce que su efecto perdure un mayor tiempo en el ambiente donde se aplica el repelente.



**Figura 75.** Correlación entre el porcentaje de repelencia y la cantidad relativa de compuestos oxigenados presentes en el AE y fracciones de citronela.

La correlación encontrada entre la cantidad de compuestos oxigenados y el porcentaje de repelencia, es consistente con los resultados reportados por otros autores [71], quienes encontraron que compuestos como eugenol, carvona, citral, terpineol, citronelol, citronelal, alcanfor y timol presentaron altos valores de repelencia contra insectos del orden Diptera, comparado con sus análogos hidrocarbonados. Estudios adelantados por Enan [73], mostraron que el eugenol imita la octopamina, un importante neurotransmisor en los insectos, ocasionando un incremento en los niveles de calcio intracelular en la clonación de células cerebrales de *Periplaneta americana*. No está claro el mecanismo de acción de la repelencia en los artrópodos, y existe un conflicto en la evidencia existente en la literatura. Sin embargo, se reporta que los repelentes actúan con los receptores olfatorios de los mosquitos, bloqueándoles la sensación de olor [39]. Otro estudio en la especie *T. Castaneum* [81], demostró que cuando en la cadena hidrocarbonada de terpenos y sesquiterpenos se introduce el grupo hidroxilo en la posición terciaria, el porcentaje de repelencia y su toxicidad se incrementan. Este efecto, está relacionado con la capacidad de penetración de la cadena hidrocarbonada sobre cutícula lipofílica de los insectos y su posterior efecto repelente del grupo OH. Este efecto también fue evidenciado para el germacrol, cuya actividad repelente fue mayor que su análogo hidrocarbonado, el germacreno.

Como conclusión general, se puede indicar que para obtener buenos porcentajes de repelencia contra la especie *T. castaneum*, a las 2 y 4 h de exposición a partir del AE de citronela, a una concentración de  $0.2 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ , es necesario que en la mezcla, estén presentes compuestos oxigenados (monoterpenoles y sesquiterpenoles) por encima del 80%, con lo cual se garantiza un efecto repelente igual o superior al repelente comercial IR3535.

#### 4. CONCLUSIONES

- Se corroboró que la variabilidad en la composición química de los aceites esenciales extraídos de plantas de *Lippia alba* cosechadas en diferentes regiones de Colombia, genera valores diferentes de su repelencia contra *Tribolium castaneum*. Para aquellos AE que presentaron un alto contenido de monoterpenos oxigenados, se obtuvieron los más altos valores de repelencia contra el insecto evaluado.
- Los aceites esenciales de *Lippia alba* quimiotipos citral y carvona-citral poseen similar o mejor capacidad repelente que el producto comercial IR3535 contra *Tribolium castaneum*. La actividad repelente de los aceites esenciales tiende a disminuir con el tiempo de exposición, aunque para períodos de 2 y 4 horas, las diferencias no son significativas. Estos aceites esenciales de la flora colombiana son una fuente potencial de repelentes contra *T. castaneum*, por lo que podrían ser empleados para su control.
- Se logró la rectificación del aceite esencial de orégano de monte (*L. origanoides*), con un alto contenido de timol y carvacrol (ca. 75%), en el fondo de la destilación, con composición química reproducible, empleando el método de destilación fraccionada a presión reducida, con columna giratoria. Esta fracción del AE, podría llegar a representar ingresos de hasta 35.000 dólares anuales por hectárea de cultivo, teniendo como referencia el precio internacional del AE de tomillo, con alto contenido de timol.
- Los AE y fracciones de orégano de monte presentaron valores de repelencia contra *T. castaneum* iguales o superiores al control positivo empleado (IR3535). Los mejores valores de actividad repelente, se lograron para los AE con contenidos bajos de  $\alpha$ -terpineno, cantidades intermedias (5-15%) de  $\gamma$ -terpineno, *p*-cimeno y cariofileno y porcentajes altos de timol-carvacrol (40-

50%). Concentraciones por encima de 0,002 mL/cm<sup>2</sup> de carvacrol, disminuyeron el porcentaje de repelencia.

- El fraccionamiento del AE de citronela, permitió obtener tres fracciones con composición química reproducible y actividad repelente contra *T. castaneum* variable, la cual aumentó con el incremento de la concentración. Se logró obtener una fracción redestilada, en el rango de temperatura de 77-78°C, @ 6 Torr, con un rendimiento en peso del 13.8%, a partir del AE crudo, y un contenido de citronelal de hasta el 97%.
- Los mejores valores de repelencia en las fracciones y el AE de citronela, se obtuvieron para aquellas mezclas que presentaron contenidos intermedios (5-25%) de los compuestos monoterpénicos, citronelal, citronelol y geraniol, y de los sesquiterpenoles elemol, germacren-4-ol y muurolol.
- Se encontró una correlación positiva entre el contenido de compuestos oxigenados totales en la mezcla de aceites esenciales y fracciones de citronela y la respuesta de la actividad repelente contra *T. castaneum*. La relación encontrada fue de tipo polinómico de orden 2.

## 5. DIVULGACIÓN DE RESULTADOS

Parte del contenido y resultados parciales del presente capítulo fueron publicados de la siguiente manera:

### **Ponencias en congresos:**

Composición química y actividad repelente de los aceites esenciales de *Lippia alba* recolectada en diferentes regiones de Colombia, frente a *Tribolium castaneum*, Herbst. DC Durán, JR Martínez M, K. Caballero, J. Olivero, E Stashenko. XV Congreso Latinoamericano de Cromatografía y Técnicas Afines, **COLACRO-2014**. Cartagena de Indias, Colombia– Hotel Caribe. 29 de septiembre a 3 de octubre de 2014. Recibió galardón dentro de los mejores trabajos presentados en el Congreso.

Estudio de la actividad repelente y el encapsulamiento del aceite esencial y fracciones de *Lippia origanoides* H.B.K. DC Durán, JR Martínez M, K. Caballero, J. Olivero, E Stashenko. XV Congreso Latinoamericano de Cromatografía y Técnicas Afines, **COLACRO-2014**. Cartagena de Indias, Colombia– Hotel Caribe. 29 de septiembre a 3 de octubre de 2014. Recibió galardón dentro de los mejores trabajos presentados en el Congreso.

### **Artículos:**

Elena Stashenko, Jairo René Martínez, Mónica Cala, Diego Camilo Durán, Deyanira Caballero. Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants. *Journal Separation Science*. **2013**, 36, 192-202.

Lee Agudelo Gómez, Germán Augusto Gómez, Diego Camilo Durán, Elena Stashenko & Liliana Betancurt. Composición química y evaluación de la actividad antiherpética *in vitro* de aceites esenciales de *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown y sus componentes mayoritarios. *Salud UIS*. **2010**, 42: 230-239.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS CAPÍTULO 2

1. E.F.K. Denny, Field Distillation for Herbaceous Oils, 3ª Ed. Denny, McKenzie Associates, Lilydale, Australia, 2001.
2. Leopold Jirovets y Gerhard Buchbauer (Editores), Processing, Análisis and Application of Essential Oils, HKB, Dehradun, India, 2005.
3. Matthews GA. 1993. Insecticide application in the stores. In Matthews, G.A. and Hislop, E.C. (eds.). Application technology for crop protection. CAB, London. pp. 305-315.
4. Donahay E, Zalach D, Rindner M. 1992. Comparison of the sensitivity of the development stages of three strains of the red four beetle (Coleoptera: Tenebrionidae) to modified atmospheres. J Econ Entomol 85(2):1450-1452.
5. Kostyukovsky M, Ravid U, Shaaya E. 2001. The potential use of plant volátiles for the control of stored product insects and quarantine pests in cut flowers. In: Berna´ th, J., ZamborineNemeth, E., Crakerm, L., Kock, O. (Eds.), Proceedings of the International Conference on Medicinal and Aromatic Plants Possibilities and Limitations of Medicinal and Aromatic Plant Production in the 21st Century, 8–11 July, Budapest, Hungary. Act Hort 2002a; 576: 347-358.
6. Jembere B, Obeng D, Hassanali A, Nyamasyo G. 1995. Products derived from the leaves of *Ocimum kilimandscharium* (Labiatae) as post-harvest grain protectants against the infestation of three major stored product insect pests. Bull Entomol Res 85: 361-367.
7. Karina Caballero, Jesús Olivero, Elena Stashenko. Repellency and toxicity of essential oils from *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon flexuosus* and *Lippia organoides* cultivated in Colombia against *Tribolium castaneum*. *Journal of Stored Products Research*. 2012, 50: 62-65.
8. Carney, Thomas. Laboratory Fractional Distillation. The Macmillan Company. New York. **1949**.
9. Perry, R.; Green, D. Perry's Chemical Engineers' Handbook. Tomo II. Segunda Parte. Sección 13. Distillation. McGraw-Hill. New York. **1999**.

10. Hengstebeck, R.J. Distillation. Principles and design procedures. Reinhold Book Corporation. New York, **1961**.
11. Treybal, R. Operacions de transferencia de masa. Segunda edición. Capítulo 9. Destilación. McGraw-Hill. **1990**
12. [http://www.brinstrument.com/fractionaldistillation/spinning\\_band\\_distillation.html](http://www.brinstrument.com/fractionaldistillation/spinning_band_distillation.html)  
Consultado: 10 de septiembre de **2015**.
13. Juan Antonio Reyes. Diseño de columnas de rectificación y extracción multicomponente. Cálculo del reflujo mínimo. Tesis Doctoral. Universidad de Alicante. 1998.
14. Bin Zakaria, Ahmad Fadzli. *Extraction of Gaharu Essential Oil Using Spinning Band Distillation*. Malaysia, 2006. Tesis de grado (Ingeniería Química). University College of Engineering & Technology Malaysia. Faculty of Chemical & Natural Resources Engineering. **2006**
15. Uusi-Kyyny, P. Vapour liquid equilibrium measurements for process design. Dissertation for the degree of Doctor of Science in Technology. Helsinki University of Technology. Department of Chemical Technology. Laboratory of Chemical Engineering and Plant Design. **2004**.
16. Robinson, C. S.; Gilliland, E. R. Elements of Fractional Distillation. McGraw Hill Book Company Inc. Fourth edition. New York. **1950**.
17. Stephani C. *et al.* Journal of Food Engineering 102, 348–354, 2011.
18. Shaw A. The essential oil of *Tsuga Canadensis* (L.). J. Am. Chem. Soc. 73, 2859-2861, 1951.
19. Farah, A; Afifi, A; Fechtal, M; Chhen, A; Satrani, B; Talbi, M; Chaouch, A. fractional distillation effect on the chemical composition of Moroccan myrtle (*Myrtus communis* L.) essential oils. J. Flavour. Fragr, 2006, 21, 351–354.
20. Ranawera, Dayananda S. Mosquito-larvicidal activity of some Sri-Lankan plants. J Nat Sci Council Sri Lanka. 24(2), 63-69, 1996.
21. Delanquis J, Kareen S, Mazza G. Int. J. Food Microbiol. 74, 101-109, 2002
22. Linxing Yao and Earl G. Hammond. JAOCS 6, 83, 2006.

23. Milojević, S; Glisić, S; Skala, D. The batch fractionation of *Juniperus communis* L. Essential oil: experimental study, mathematical simulation and process economy. *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.*, 2010, 16, 183–191.
24. Castillo G., García J., Estarrón M. Extraction method that enriches phenolic content in oregano (*Lippia graveolens* H.B.K.) essential oil. *Journal of Food Process Engineering* 30 (2007) 661–669.
25. Steve Caiger. Essential Oils and Oleoresins. Report August 2015. International Trade Centre. 25p.
26. Stashenko, Elena E. Aceites Esenciales. División de Publicaciones UIS, Bucaramanga, **2009**. pp. 13 -21, 37-48.
27. Anand Akhila (ed). Essential Oils-Bearing Grasses, The Genus *Cymbopogon*. Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles. CRC Press Taylor and Francis Group. Boca Raton FL (EE.UU). 2010. pp 72-73, 122-124.
28. Lapczynski, A.; Bhatiaa, S. P.; Letizia, C. S.; Api, A. M. Fragrance material review on citronellol, 2008, *Food and Chemical Toxicology*, 46 (11), s110-s113.
29. Akhila, A (editor). Essential oil-bearing grasses. The genus *Cymbopogon*, 2010, CRC Press, Taylor & Francis group, Florida, USA.
30. Kubeczka, K. H. Progress in isolation techniques for essential oil constituents, 1985. En: Baerheim Svendsen and Scheffer (editors), *Essential Oils and Aromatic Plants*, Nijhoff Junk pub, Dordrecht, 107–126.
31. Siddiqui, M. S.; Sen, T.; Nigam, M. C.; Datta, S. C. Isolation of alcoholic constituents of the oil of citronella (Java) by sodium complex method, 1975, *Parfuemerie und Kosmetik*, 56 (7), 193 – 194.
32. Ninagawa, Y.; Ohmura, Y.; Nakahara, F.; Nakamoto, T.; Kawaguchi, T. Separation of citronellol, 1977, JP 52131506
33. Flatau, J.; Labbe, H. Separation of geraniol from citronellol, 1898, *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences*, (126), 1725-1727.

34. Svicerv, A.M., Smiyh, R.J., Zhou, T., Hernández, M., LIU, W. y CHU, C.L. Effects of thymol fumigation on survival and ultrastructure of *Mollinia fructicola*. *Postharvest Biology and Technology*. **45**, **2007**, pp. 228-233.
35. Burdock, G.A. Fenaroli's handbook of flavor ingredients. 5 ed. Boca Raton: CRC Press, **2005**. 502p.
36. Mendel Friedman. Chemistry and multibeneficial bioactivities of carvacrol (4-isopropyl-2-methylphenol), a component of essential oils produced by aromatic plants and spices. Review. *J. Agric. Food Chem.* 2014, 62, 7652-7670.
37. Cox P.D., Review. Potential for using semiochemicals to protect stored products from insect infestation. *Journal of Stored Products Research* 40 (2004) 1-25.
38. Brooke W., Bissinger R., Michael Roe., Tick Repellents: Past, present and future. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 96 (2010) 63-79.
39. Neuro S., Olivero J., Stashenko E., Repellent activity of essential oils: A Review. *Bioresource Technology* 101 (2010) 372-378.
40. S.P. Frances, Efficacy and safety of products containing DEET, in: M. Debboun, S. Frances, D. Strickman (Eds.), *Insect Repellents: Principles, Methods, and Uses*, CRC Press, Boca Raton, 2007, pp. 337-340.
41. H.H. Yap, K. Jahangir, J. Zairi, Field efficacy of four insect repellent products against vector mosquitoes in a tropical environment, *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 16 (2000) 241-244.
42. D.R. Barnard, R.-D. Xue, Laboratory evaluation of mosquito repellents against *Aedes albopictus*, *Culex nigripalpus*, and *Ochlerotatus triseriatus* (Diptera: Culicidae), *J. Med. Entomol.* 41 (2004) 726-730.
43. C.E. Schreck, D. Fish, T.P. McGovern, Activity of repellents applied to skin for protection against *Amblyomma americanum* and *Ixodes scapularis* ticks (Acari: Ixodidae), *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 11 (1995) 136-140.
44. J.F. Carroll, J.A. Klun, M. Debboun, Repellency of deet and SS220 applied to skin involves olfactory sensing by two species of ticks, *Med. Vet. Entomol.* 19 (2005) 101-106.

45. S.R. Evans, G.W. Korch Jr., M.A. Lawson, Comparative field evaluation of permethrin and DEET-treated military uniforms for personal protection against ticks (Acari), *J. Med. Entomol.* 27 (1990) 829–834.
46. Shaaya E, Ravid U, Paster N, Juven B, Zisman U, Pistarev V. 1991. Fumigant toxicity of essential oils against four major stored product insects. *J Chem Ecol.* 17(3): 499-504.
47. Jesús Olivero Verbel, Beatriz Jaramillo Colorado y Luz Neuro. Actividad repelente de aceites esenciales. Capítulo 6 en *Plantas Aromáticas y Aceites Esenciales: estudio y aplicaciones*. División de Publicaciones UIS. 2012: 201-222.
48. H. Dautel, Test systems for tick repellents, *Int. J. Med. Microbiol.* 293 (2004) S182–188.
49. Matthewson MD., Hughes G., Macpherson I., Bernard C. Screening techniques for the evaluation of chemicals with activity as tick repellents, *Pest. Sci.* 12 (1981) 455–462.
50. Angela M. Tucker, James F. Campbell, Frank H. Arthur, Kun Yan Zhu. Mechanisms for horizontal transfer of methoprene from treated to untreated *Tribolium castaneum* (Herbst). *Journal of Stored Products Research* 57 (2014) 36-42.
51. Gupta, M. P., 270 *Plantas medicinales Iberoamericanas*. Bogotá: CYTED – SECAB, 1995. 617p.
52. Stashenko, E., Jaramillo, B., Martínez, J. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *J. Chromatogr. A.* 2004. 1025: 93-103.
53. Zoghbi, M.G.B., Andrade, E.H.A., Santos, A.S., Silva, M.H.L., Maia, J.G.S. Essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. grown wild in the Brazilian Amazon, *Flavour Fragr. J.*, 1998. 13: 47-48.

54. Ricciardi, G. A. et al. Examen comparativo de la composición de los aceites esenciales de especies autóctonas de *Lippia alba*. (2000). Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad Nacional del Nordeste.
55. Pino, J.A., Ortega, A.G., Rosado, A., Rodríguez, M., Balujar, R. Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, Rev. Cubana Farm. 1997. 30: 1-8.
56. Guzman, S.P.; Cardozo, R., and García, V. Desarrollo agrotecnológico de *Lippia alba* (Millar) N.E.Br ex Britton y Wilson, Guillermo de Ockham., 2004. 7: (1). p.p 201-215.
57. Senatore, F., Rigano, D. Essential oil of two *Lippia* spp. (Verbenaceae) growing wild in Guatemala, Flavour Fragr. J., 2001. 16: (3), 169-171.
58. Bahl, J.R., Garg, S.N., Singh, S.C., Bansal, R.P., Naqvi, A.A., Kumar, S. Composition of linalool-rich essential oil from *Lippia alba* grown in Indian plains, Flavour Fragr. J. 2000. 15: 199-200.
59. Bahl, J.R., Sinha, S., Naqvi, A.A., Bansal, R.P., Gupta, A.K., Kumar, S. Linalool-rich essential oil quality variants obtained from irradiated stem nodes in *Lippia alba*, Flavour Fragr. J., 2002. 17: 127-132.
60. Lorenzo, D., Paz, D., Davies, P., Vila, R., Cañigual, S., Dellacassa, E. Composition of a new essential oil type of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown from Uruguay, Flavour Fragr. J. 2001. 16: p.p. 356-359.
61. Singh, G., Studies on essential oils. Part 15. GC/MS analysis of chemical constituents of leaf oil of *Lippia alba* (Mill.) from north India J. Essen. Oil Res. 1999. 11 (2), pp. 206-208.
62. De Carvalho, C., and De Fonseca, M.M. Carvone: why and how should one bother to produce this terpene. J. Food Chem., 2005, 95, p.p. 413-422.
63. Tucker, A.O., and Marciarello, M.J. Volatile leaf oil of the licore verbena "*Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown ex Britton and P. Wils. Var carterae moldenke" from the North American herb trade. J. Essen. Oil Res. 1999, 11: (3). p.p 314-316.

64. Fischer, U., López, R., Pöll, E., Vetter, S., Novak, J., and Franz, C. Two chemotypes within *Lippia alba* population in Guatemala. *Flav. Fragr. J.*, 2004, 19. p.p. 333-335.
65. Viana, G.; De VALE, T., RAO, V., and MATOS, F.J. Analgesic and antiinflammatory effects of two chemotypes of *Lippia alba*: A comparative study. *Pharm Biol.*, 1998, 36: (5). p.p 347-351.
66. Zétola, M.; Lima, T.C.; Sonaglio, D., González, G., Limberger, R.P., Petrovick, P.R., Bassani, V.L. CNS activities of liquid and spray-dried extracts from *Lippia alba*-Verbenaceae Brazilian false melissa; *J. Ethnopharm.* 2002, 82. p.p 207-215.
67. Agudelo L., Gómez G., Durán D., Stashenko E., Betancur L. Composición química y evaluación de la actividad antiherpética in vitro de aceites esenciales de *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown y sus componentes mayoritarios. *Revista Salud UIS.* 2010, 42: 230-239.
68. Vale, T.; Matos, F.J.; De Lima, T., and Viana, G.S. Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown chemotypes. *J. Ethnopharm.*, 1999, 167, pp. 127 – 133.
69. Tapondjou A, Adler C, Fontem D, Bouda H, Reichmuth C. Bioactivities of cymol and essential oils of *Cupressus sempervirens* and *Eucalyptus saligna* against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium confusum* du Val. *J. Stored Prod Res.* 2005, 41: 91-102.
70. O'Farrill H. 2008. Las Plagas del Hogar y el Jardín. Departamento de Protección de Cultivos. Universidad de Puerto Rico. Número 8: pp. 1-2.
71. Jaenson T, Palsson K, Borg A. 2006. Evaluation of extracts and oils of mosquito (Diptera: Culicidae) repellent plants from Sweden and Guinea-Bissau, *Journal of Medical Entomology*, 43 (1): 113-119.
72. Tunón H, Thorsell W, Mikiver A, Malander I. 2006. Arthropod repellency, especially tick (*Ixodes ricinus*), exerted by extract from *Artemisia abrotanum* and essential oil from flowers of *Dianthus caryophyllum*, *Fitoterapia* 77(4): 257-261.

73. Enan E. 2001. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 130: 325–337.
74. Ma D, Bhattacharjee A, Gupta R, Karle, J. 1999. Predicting mosquito repellent potency of N,N-diethyl-m-toluamide (DEET) analogs from molecular electronic properties. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 60(1): 1-6.
75. Wang Z, Song J, Chen J, Song Z, Shang S, Jiang Z, Han Z. 2008. QSAR study of mosquito repellents from terpenoid with a six-member-ring. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 18(9): 2854-2859.
76. Junaid U. Rehman, Abbas Ali, Ikhlas A. Khan. Plant based products: Use and development as repellents against mosquitoes: A review. *Fitoterapia* 95 (2014) 65-74.
77. Feng Liu, Li Chen, Arthur G. Appel, Nannan Liu. Olfactory responses of the antennal trichoid sensilla to chemical repellents in the mosquito, *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Insect Physiology*. 2013, 59: 1169-1177.
78. Park BS, Choi WS, Kim JH, Kim KH. Monoterpenes from thyme (*Thymus vulgaris*) as potential mosquito repellents. *J Am Mosq Control Assoc* 2005: 21:80–3.
79. A. Lapczynski, S.P. Bhatia, C.S. Letizia, A.M. Api. Fragrance material review on dl-citronellol. *Food and Chemical Toxicology* 46 (2008) S103–S109.
80. Annick D., Edwige A., Ewout R., Adams A., *et al.* Characterization of volatile compounds from three Cymbopogon species and Eucalyptus citriodora from Benin and their insecticidal activities against *Tribolium castaneum*. *Industrial Crops and Products*. 2015, 76: 306-317.
81. García M., Donadel O., Ardanaz C., Tonn C., Sosa M. Toxic and repellent effects of *Baccharis salicifolia* essential oil on *Tribolium castaneum*. *Pest Manag Sci*. 2005, 61:612–618.

### Encapsulamiento del aceite esencial de orégano de monte y evaluación de la cinética de liberación, en el diseño de un prototipo de repelente de insectos

Se evaluó la cinética de liberación de los compuestos volátiles presentes en el aceite esencial y fracciones volátil (F1) y de fondo (F2), obtenidas por destilación fraccionada a presión reducida, de la especie *Lippia origanoides*, encapsulada en una matriz polimérica (PEG-6000). Se empleó el método de dispersión del polímero fundido, para el encapsulamiento del AE y sus fracciones. Para el monitoreo de los componentes volátiles emitidos desde la matriz encapsulante, se empleó la técnica de extracción de espacio de cabeza en modo estático (*Headspace* estático), empleando un automuestreador de espacio de cabeza *Agilent Technologies 7694E*, acoplado a un GC-FID (Hewlett Packard 5890 Series II, columna DB-WAX [poli(etilenglicol)] de 60 m x 0.25 mm, D.I x 0.25  $\mu$ m, d<sub>r</sub>).

La cinética de liberación de sustancias volátiles por el material encapsulado en PEG-6000 fue más lenta para el AE de *L. origanoides* sin fraccionar, que para sus fracciones liviana (F1) y de fondo (FF). Este procedimiento permitió estabilizar, en función del tiempo, la emisión de los componentes volátiles activos presentes en el AE. Se lograron tamaños de partícula entre 210-250 nm y valores de carga superficial (potencial zeta) de -8,0 mV. Con estas características, se logró un porcentaje de encapsulamiento del AE de *L. origanoides* en PEG-6000 del 60% y una liberación sostenida de sus componentes hasta por 20 días, a 40°C.

Los resultados obtenidos permitieron proponer las condiciones técnicas para el diseño de un sistema prototipo que controle y repela la población de insectos de la especie *T. castaneum*, basados en el AE de *L. origanoides* encapsulado en PEG-6000.

## INTRODUCCIÓN

El escarabajo rojo de la harina, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera), es uno de los principales insectos que afectan la calidad y cantidad de los granos, cereales y productos agrícolas que son almacenados para el consumo humano. Es considerada la segunda plaga que afecta el almacenamiento de cereales y granos. Las pérdidas reportadas en el mundo, alcanzan el 40% al año. Para el control de esta plaga se emplean diferentes insecticidas sintéticos, principalmente, derivados organofosforados, piretroides, fumigantes tales como la fosfina y el bromuro de metilo. El uso de estos compuestos sintéticos es bastante rentable al evaluar la relación costo beneficio. Sin embargo, su uso masivo ha generado que los insectos adquieran resistencia contra la mayoría de compuestos sintéticos y cada vez se empleen concentraciones más altas para su control. Esto conlleva problemas de toxicidad (efectos secundarios para humanos) y contaminación para el ambiente [82].

Una alternativa para la sustitución de los plaguicidas sintéticos, es el uso de los aceites esenciales (AE), los cuales actúan como bioinsecticidas, ya que contienen compuestos que presentan propiedades repelentes, insecticidas, antialimentarias, entre otras [82]. Además, gran parte de los AE empleados para el control de insectos, presentan toxicidades bajas. Sin embargo, los AE, a pesar de sus grandes ventajas, también, presentan problemas relacionados con su alta volatilidad, su escasa solubilidad en agua y la alta susceptibilidad de varios componentes de los AE a la oxidación. Estos problemas deben ser resueltos, antes de que sean utilizados como una alternativa eficiente para el control de plagas de granos de almacenamiento.

Precisamente, en este capítulo, se aborda el problema relacionado con la alta volatilidad de algunos componentes de los aceites esenciales que son empleados como repelentes. Se plantea el encapsulamiento de mezclas repelentes activas

frente a *T. castaneum*, del AE de *L. origanoides* y fracciones obtenidas mediante destilación fraccionada a presión reducida, en una matriz polimérica (PEG-6000). El propósito del encapsulamiento del AE y fracciones, es estabilizar la composición química de las mezclas, en función del tiempo, y de esta manera, obtener un mayor efecto repelente contra *T. castaneum*.

Se emplearon los AE y fracciones obtenidas mediante destilación fraccionada a presión reducida, que presentaron los mejores resultados de repelencia frente a *T. castaneum*, presentados en el Capítulo 2. Se determinó, preliminarmente, la cinética de liberación de los componentes presentes en las mezclas encapsuladas.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. Encapsulamiento de aceites esenciales

El encapsulamiento de aceites esenciales, en diferentes matrices poliméricas, y por diferentes métodos, ha experimentado gran desarrollo en las últimas décadas. Sin embargo, una de las principales limitaciones en la preparación de las micro y nanocapsulas, es la pérdida de compuestos volátiles durante la etapa de preparación, en donde se incluye un calentamiento y posterior evaporación, como por ejemplo en la coacervación y el secado por atomización (*Spray drying*). De otro lado, la microencapsulación puede proporcionar muchas ventajas, tales como la protección de los AE de la degradación y a la rápida evaporación en el ambiente donde se emplean por sus propiedades biológicas. De hecho, las altas temperaturas, la radiación ultravioleta y la oxidación de algunos de sus componentes, podrían comprometer la actividad biológica de los AE. Las formulaciones de los AE en matrices poliméricas, como microcápsulas o microesferas, se podrían utilizar para realizar una liberación controlada de los principios activos encapsulados [83].

La microencapsulación es un proceso de recubrimiento de sustancias sólidas, líquidas o gaseosas con diferentes materiales, con miras a obtener partículas sólidas de tamaño micrométrico. Los productos resultantes de este proceso tecnológico reciben el nombre de “micropartículas”, “microcápsulas” o “microesferas”, las cuales se diferencian en su forma y estructura interna; sin embargo, todas presentan como característica común el poseer un tamaño de partícula menor de 1,0 mm [84].

La microencapsulación se emplea en varias áreas, entre las cuales figuran, farmacéutica, cosmética, perfumería, agricultura y alimentaria. Los aceites esenciales, son ampliamente, empleados en estos sectores por sus propiedades

aromáticas y biológicas, cuyos principios activos y notas aromáticas agradables pueden emplearse en el diseño de perfumes, fármacos y alimentos funcionalizados, entre otros [85].

A pesar de las ventajas que presentan los aceites esenciales, por sus propiedades biológicas y aromáticas, además de tratarse de un producto natural, de fácil obtención, baja toxicidad, también, presenta una serie de problemas de aplicación, los cuales se convierten en retos de investigación, para su posible aplicación como agentes repelentes para el control de insectos. Algunos de estos problemas están relacionados con su alta volatilidad (lo cual implica un tiempo muy corto de su acción), su escasa solubilidad en agua, y la alta susceptibilidad de varios componentes de los AE a la oxidación. Con el uso de matrices poliméricas para encapsular aceites esenciales, se podría minimizar el problema de la alta volatilidad de algunos de sus componentes, ya que a través de su encapsulamiento, se podrían fijar física y/o químicamente, obteniendo un mayor tiempo de acción. Tal es el caso del AE de *L. origanoides*, cuya actividad repelente frente a *T. castaneum*, fue superior al control positivo IR3535.

En la **Tabla 59**, se presentan varias aplicaciones del proceso de encapsulamiento de aceites esenciales y compuestos mayoritarios de estos, con propiedades biológicas. Se puede observar, una amplia variedad de métodos de encapsulamiento, tales como coacervación, secado por atomización (*Spray drying*), gelación iónica, nanoprecipitación, evaporación del solvente en emulsión, entre otras. Se han logrado obtener tamaños, en el rango de micro a nano – partículas. Las aplicaciones de los aceites esenciales encapsulados son muy variables, entre las que se encuentran como preservantes de alimentos, larvicidas, pesticidas, agentes antimicóticos y antioxidantes. Los polímeros más ampliamente usados son el quitosán, la goma arábica, maltodextrinas y el alginato [83].

**Tabla 59.** Aplicaciones del encapsulamiento de aceites esenciales y los métodos empleados [83].

<b>Aceite esencial / compuesto</b>	<b>Aplicación</b>	<b>Método de encapsulamiento</b>	<b>Polímero</b>	<b>Tamaño de partícula</b>
<i>Lippia sidoides</i>	Larvicida	Coacervación compleja	Quitosan	335-558 nm
<i>Origanum vulgare</i>	Preservante de alimentos	Fluido supercrítico	Almidón	< 10 µm
<i>Mentha piperita</i>	Antimicrobiano	Gelación iónica	Quitosan	< 100 nm
<i>Schinus molle</i>	Insecticida	<i>Spray drying</i>	Maltodextrina	0.2-40 µm
<i>Cymbopogon citratus</i>	Antimicrobiano	Coacervación simple	Alcohol polivinílico	10-250 µm
<i>Lavandula hybrida</i>	Biocida	<i>Spray drying</i>	PEG	30-100 µm
<i>Zanthoxylum limonella</i>	Repelente	Emulsión-evaporación	Alginato	209-233 µm
<i>Salvia hispánica</i>	-	<i>Spray drying</i>	Goma arábica	13-18 µm
Carvacrol	Antimicrobiano	Nanoprecipitación	PLGA	0.3 nm
Eugenol	Antioxidante	Gelación iónica	Quitosan	16-33 nm
Timol y carvacrol	Antifúngicos	Hidratación de capa	Colesterol	Liposomas

PLGA: Ácido poliláctico-glicólico.

## 1.2. Métodos de encapsulamiento de los aceites esenciales

La microencapsulación es el proceso por el cual partículas individuales o gotas de un material activo (núcleo) se rodean por una cubierta para producir cápsulas con tamaños en el rango de micras a milímetros, conocidas como microcápsulas. Cuando las partículas poseen un tamaño inferior a 1  $\mu\text{m}$ , el producto resultante del proceso de encapsulación recibe la denominación de “nanocápsulas” [86].

La aplicación de la microencapsulación alcanza campos muy variados:

- En la agricultura se utiliza al formular algunos insecticidas, fungicidas y en los fertilizantes de cesión lenta.
- En la industria alimentaria las microcápsulas se emplean para mantener la calidad de sustancias grasas, aceites, colorantes, saborizantes y aromatizantes. Estas liberan el material que contienen durante la preparación de las comidas o tras la ingestión.
- En cosmética y perfumería, es también frecuente el uso de microcápsulas con sustancias olorosas que liberan el perfume al frotar suavemente tras su aplicación.
- En farmacia reducen el efecto directo irritante causado por algunos medicamentos en la mucosa gástrica. Consiguen una liberación sostenida o controlada del principio activo a partir de la forma farmacéutica, y también que la liberación se produzca a modo de pulsos o a un determinado pH.

Como visión general del proceso de microencapsulación, se puede indicar que existen algunos tipos de procesos que están basados exclusivamente en fenómenos físicos, otros usan reacciones químicas de polimerización para producir la pared de la cápsula y otros combinan métodos físicos y químicos.

**1.2.1. Procesos de microencapsulación de Tipo A, basados en procesos químicos:** Entre los procesos de microencapsulación de tipo A se encuentran: coacervación compleja, polímero-polímero incompatible y proceso de inyección sumergido [87, 88].

La coacervación se define como la separación de dos fases líquidas en una solución coloidal. Una fase es rica en el polímero, llamada fase de coacervado y la otra, que no contiene el polímero se llama solución de equilibrio. En el caso de la coacervación sencilla, sólo interviene un polímero, mientras que la coacervación compleja implica la interacción de dos coloides de carga opuesta. La coacervación simple se basa en la adición de un disolvente miscible en una solución coloidal (polímero), que contienen en suspensión la sustancia que se quiere encapsular, la cual es inmisible con el solvente adicionado. Esto se traduce en la formación de dos fases: una es rica en moléculas coloidales (coacervado), y el otro es casi libre de coacervado. Por ejemplo, cuando la solución de sulfato de sodio, acetona o alcohol se añaden gradualmente a una solución de gelatina con agitación, se forma un coacervado [83].

**1.2.2. Procesos de microencapsulación de Tipo B:** basados en procesos físicos. Secado por atomización (*spray drying*), dispersión en polímero fundido, enfriamiento tras atomización (*spray chilling*), recubrimiento en lecho fluidizado, disco giratorio con orificios múltiples [87, 88].

***Spray drying:*** El secado por pulverización o atomización, es un método popular de micropartículas, que es fácil de operar y se usa muy frecuentemente a nivel industrial, porque permite una producción continua. Se compone de un líquido atomizado en pequeñas gotas, una etapa de secado, que se lleva a cabo utilizando un gas y la recolección de las partículas sólidas secas. La goma arábiga es uno de los materiales más comúnmente utilizado en la microencapsulación mediante secado por atomización. Este método presenta varias ventajas, tales

como: alta solubilidad, baja viscosidad y buenas propiedades emulsionantes. Sin embargo, la oscilación de la oferta, así como el aumento de los precios, está impulsando investigaciones para buscar otras alternativas [83]. Por ejemplo, la maltodextrina se usa comúnmente como alternativa. Sin embargo, debido a su baja capacidad emulsionante, se usa generalmente en combinación con otros biopolímeros tensoactivos, tales como goma arábiga, almidones modificados y proteínas, con el fin de obtener una microencapsulación más eficiente [83].

**Dispersión en polímero fundido:** En este método se calienta el polímero hasta su punto de fusión o ablandamiento, para mezclarlo profusamente con el aceite esencial o el extracto. La mezcla se deja enfriar y cuando ya está rígida, se pulveriza por métodos mecánicos [87, 88].

El encapsulamiento de aceites esenciales y extractos se realiza al formar micro o nano-partículas revestidas de polímeros. Por medio de este proceso se obtienen beneficios entre los cuales se encuentran la facilidad de manejo, puesto que es mejor manipular cápsulas sólidas y estables que líquidos volátiles, baja inflamabilidad y mayor aplicación de productos como suspensiones en medio acuoso.

En la literatura científica se encuentran reportes de polímeros útiles para este proceso. Para la aplicación de interés en este proyecto, se desea que los polímeros sean biocompatibles y biodegradables. Entre estos se encuentran hidroxipropil metilcelulosa (HPMC), alcohol polivinílico (PV(OH)), etilcelulosa (EC), polietilenglicol (PEG), ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), goma arábiga, quitosano (chitosán), goma xanthan, entre otros [83].

La efectividad del encapsulamiento en los aceites esenciales, y su efectividad, dependen en gran medida del tipo de polímero que se emplea y del método de encapsulamiento. Jayakumar *et al.* [89], encontraron que el aceite obtenido de

semillas de *A. indica*, puede ser encapsulado a partir de una emulsión de alginato de sodio entrecruzado con glutaraldehído y recubierto con almidón y PEG. El aceite encapsulado mostró un marcado efecto en la disminución de la velocidad de liberación del aceite de neem. Los resultados de FT-IR, indicaron que no existen interacciones químicas entre los ingredientes de la emulsión encapsulada y el agente encapsulante.

Werdin y colaboradores [82], reportan, que al encapsular aceites esenciales de geranio (*Pelargonium graveolens*) y bergamota (*Citrus bergamia*) en polietilenglicol PEG, obtuvieron una eficiencia de encapsulamiento de los AE del 75%, inclusive hasta seis meses después de incorporados al polímero. Adicionalmente, evaluaron la toxicidad de los AE encapsulados contra *T. castaneum* y encontraron una disminución en el efecto tóxico de los AE antes y después de encapsular de hasta el 50%. Por otro lado, para el AE de *Lippia sidoides* encapsulado en alginato, por el método de *Spray drying*, se encontró que la eficiencia de encapsulación fue del 55%. Además, el perfil de liberación *in vitro* del AE, mostró que entre el 45 al 95% del aceite, es liberado dentro las primeras 30 a 50 horas de encapsulado. Los tamaños de partícula del AE encapsulado estuvieron en el rango de 223-399 nm [90]. En Brasil, Abreu y colaboradores [91], encontraron que el nanogel basado en quitosan y el exudado de *Anacardium occidentale* (goma de anacardo), preparado mediante el método de *Spray drying*, permitió encapsular el AE de *L. sidoides*, con una eficiencia del 70%. La mejor relación de la matriz de encapsulamiento y el AE fue de 10:2, con un 5% de goma de anacardo. Con estos resultados, los tamaños de partícula del encapsulado estuvieron en el rango de 335-558 nm.

En el presente trabajo se escogió el polietilenglicol (PEG), como material de soporte para el encapsulamiento del AE de *Lippia origanoides* y fracciones obtenidas por destilación fraccionada a presión reducida. Este polímero fue seleccionado por su amplio rango de solubilidad, baja toxicidad, no interferencia

con las actividades enzimáticas y conformaciones de polipéptidos y facilidad de excreción de organismos vivos [82].

Los PEG son polímeros sintéticos, solubles en agua basados en oxietileno, con la estructura general  $H-[O-CH_2-CH_2]_n-OH$ . Su nombre está asociado a un número que hace referencia a la masa molecular del polímero. Estos materiales están disponibles en una amplia gama de pesos moleculares, que van desde líquidos a temperatura ambiente, PEG de 200-600, semisólidos, PEG 1500, sólidos semicristalinos, PEG 3000 a 20.000, y los sólidos resinosos para pesos moleculares mayores de 100.000. Recientemente, nanosistemas basados en PEG, con aceites esenciales y vegetales, han mostrado su potencial en el control de insectos, como el gorgojo rojo de la harina (*T. castaneum*) [92]. Otros estudios han reportado la actividad insecticida efectiva de varios sistemas encapsulados, sobre plagas que atacan granos almacenados, tales como *R. dominica* y *Sitophilus oryzae* (gorgojo del arroz) [93].

### **1.3. Caracterización de las partículas encapsuladas.**

Posterior al procedimiento de encapsulamiento, es necesario caracterizar los materiales poliméricos que contienen los principios activos. Esta caracterización, consiste en medir propiedades como tamaño promedio, distribución del tamaño, carga superficial, forma y lugares específicos donde se incorpora el principio activo, entre otros. Estas mediciones generalmente, se realizan a través de técnicas de dispersión de luz y de microscopía electrónica de barrido. También es muy importante conocer el porcentaje de principio activo encapsulado, su cinética de liberación, metabolismo después de liberado y posibles aspectos de degradación en la matriz polimérica [94].

El tamaño de las nanopartículas encapsuladas, es medido a través de técnicas de dispersión de luz, como DLS (por sus siglas en inglés *Dynamic Light Scattering*), la cual proporciona una medida del tamaño hidrodinámico de las partículas. En la técnica DLS, un haz de luz de láser monocromático, con una intensidad conocida, incide sobre una solución en donde se encuentran dispersas las nanopartículas. La luz que es dispersada por la solución, es función del movimiento browniano de las nanopartículas. Esta dispersión de luz genera un efecto Doppler, que cambia la longitud de onda de la luz incidente. Este cambio medido en microsegundos, está relacionado con el tamaño de las nanopartículas [94].

La carga superficial, es otra característica fundamental, que debe ser determinada, en la caracterización de nanopartículas. Esta propiedad, está relacionada con la medida del potencial zeta ( $\zeta$ ). El potencial zeta describe la intensidad del campo electrostático entre dos capas, en el límite de la película que recubre y el fluido. Los valores del potencial zeta pueden ser negativos y positivos, y entregan información acerca de la estabilidad de la partícula encapsulada. Este valor de zeta varía dependiendo de la naturaleza química del polímero y del principio activo o aceite esencial encapsulado. En cuanto mayor sea el valor absoluto del potencial zeta, mayor será la estabilidad de la nanopartícula [94].

### **1.3.1. Eficiencia de encapsulamiento (EE).**

La eficiencia del encapsulamiento es otra característica fundamental en la caracterización de partículas encapsuladas. Representa la relación entre la cantidad del principio activo o aceite esencial empleado, y que efectivamente, queda encapsulado, y la cantidad añadida en el proceso de formulación y preparación del encapsulado. Para fines prácticos del presente trabajo, la eficiencia de encapsulamiento fue determinada, como porcentaje de la siguiente forma:

$$\%EE = \frac{W}{W_0} * 100 \quad \text{Ecuación No. 15 [91]}$$

Donde:

W: Masa en g del aceite esencial o fracción encapsulado, extraído del polímero.

W<sub>0</sub>: Masa en g del aceite esencial o fracción adicionada en la formulación inicial.

#### **1.4. *Headspace* estático (S-HS).**

Un grupo de técnicas importantes para la extracción y el análisis de compuestos volátiles son las técnicas *headspace* (HS), entre las cuales figuran HS-dinámico o purga y trampa, HS-estático y la microextracción en fase sólida (SPME) en el modo *headspace*.

En la extracción en el modo *headspace*, los analitos (compuestos volátiles) son extraídos de la fase gaseosa que se encuentran en equilibrio con la muestra. El muestreo *headspace* es un método indirecto para la determinación de analitos volátiles en una muestra sólida o líquida, en la cual la fase vapor es analizada. Si los analitos en la fase vapor alcanzan el equilibrio con los presentes en la fase condensada, entonces, la técnica de muestreo se denomina *headspace* estático (S-HS). Existen varios métodos para S-HS, pero el más empleado es el sistema automático de inyección con *loop* presurizado, acoplado a un cromatógrafo de gases. Este sistema emplea una válvula de seis puertos, que pueden adaptarse para tres diferentes funciones, a saber: presurización, venteo y muestreo [0].

Inicialmente, la muestra se mantiene cierto tiempo dentro de un sistema termostático (horno de incubación), a una temperatura determinada, hasta que se alcance el equilibrio entre la fase vapor y la muestra. Para la etapa de

presurización, se adapta una válvula y el vial que contiene la muestra se eleva, para que el *septum* sea perforado por una aguja del equipo automuestreador y sea posible la entrada de un gas auxiliar, que generalmente, es nitrógeno.

Para la etapa del llenado del *loop*, la válvula se adapta para el venteo y la fase vapor, contenida en el vial, llena el *loop* durante un tiempo determinado, hasta que se alcanza el equilibrio. El *loop* se llena por diferencia de presión. Por último para la transferencia de la muestra al cromatógrafo de gases, desde el *loop*, la válvula se adapta para el muestreo, lo cual permite al gas de arrastre, llevarse la muestra contenida en el *loop*, hasta la columna cromatográfica, por medio de una línea de transferencia. En la **Figura 76**, se presenta el equipo automuestreador de espacio de cabeza *Agilent Technologies 7694E*, acoplado a un GC-FID (Hewlett Packard 5890 Series II).



**Figura 76.** Automuestreador de espacio de cabeza, *Headspace Sampler* Hewlett Packard 7694E, acoplado a un cromatógrafo de gases GC-FID: Hewlett Packard 5890 Series II

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

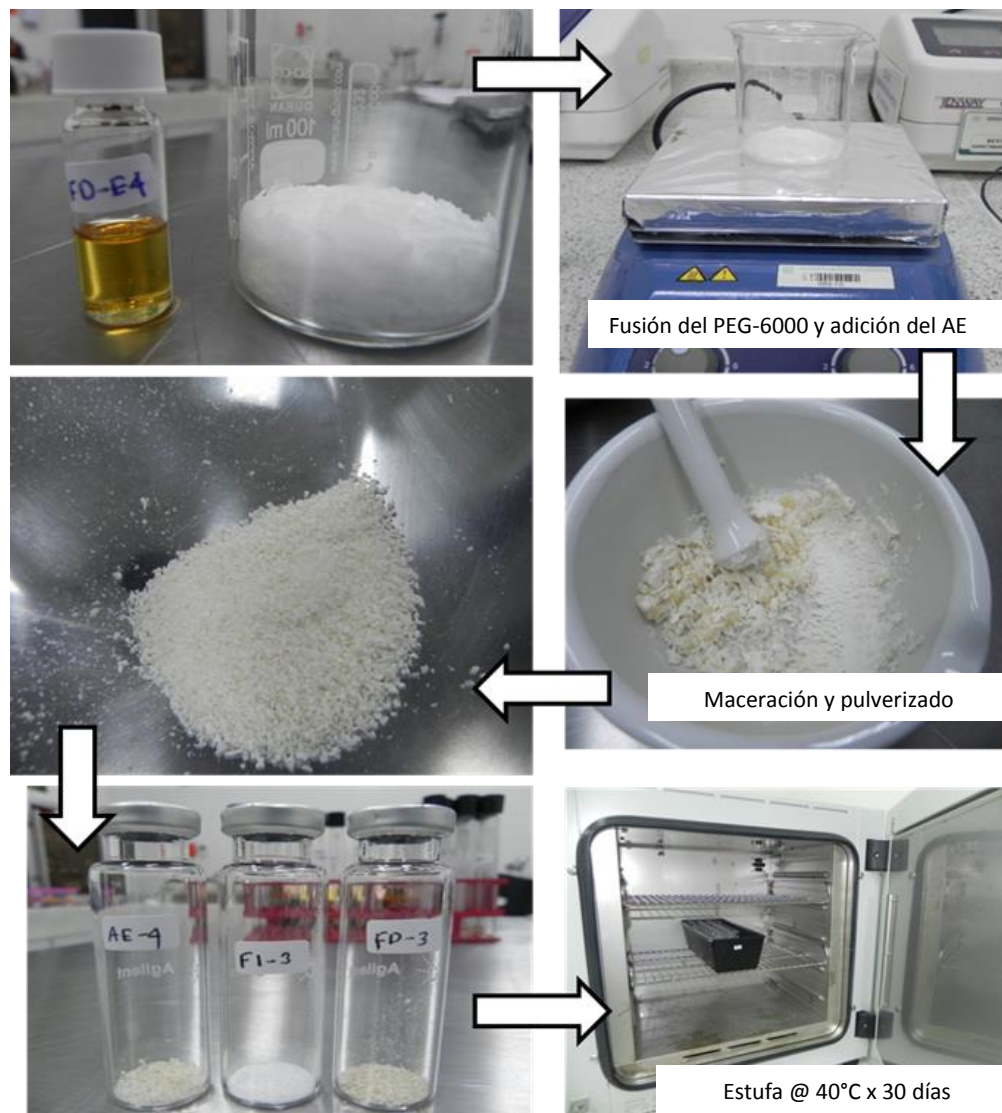
### 2.1. Encapsulamiento del AE y fracciones de orégano de monte

Se empleó el método de dispersión en polímero fundido, empleando PEG-6000 como matriz polimérica, para el encapsulamiento del aceite esencial de *Lippia origanoides* (AE) y las fracciones volátil (F1) y de fondo (FD), obtenidas mediante destilación fraccionada a presión reducida, de acuerdo con el procedimiento descrito en la **Sección 2.3.** del **Capítulo 2.**

Para el encapsulamiento del AE y fracciones F1 y FD, se prepararon soluciones al 11.2% peso a peso, de cada muestra. Esta concentración fue determinada con base en experimentos preliminares. Para ello, se tomaron 2.2 g de AE y fracciones F1 y FD y se adicionaron a 17.8 gramos de PEG-6000, fundido previamente en una vaso de precipitados de 100 mL, el cual se calentó hasta 60°C. El PEG-6000 y el AE y fracciones, se agitaron por 5 minutos para homogeneizar la formulación. Posteriormente, la mezcla se retiró de la placa de calentamiento y se dejó enfriar a temperatura ambiente (ca. 20°C). Luego de 30 minutos de reposo, la mezcla sólida fue transferida a un frasco de 100 mL con tapa y se almacenó en una nevera a 4°C, durante 24 horas.

El PEG-6000 solidificado con el AE y fracciones incorporadas, fue sometido a triturado y macerado, hasta pulverizarlo, el cual fue filtrado con un tamiz de malla de 0.3 micras. 0.2 g del sólido pulverizado con el AE y fracciones F1 y FD encapsuladas, se transfirieron a un vial de 20 mL para monitoreo por S-HS (*Agilent Technologies*). Se prepararon 30 viales de cada muestra de encapsulado del AE y las fracciones F1 y FD de *L. origanoides*. Seguidamente, los viales sin tapa, se introdujeron en una Estufa Binder ED-53 a 40°C. Este momento fue considerado como día cero de la medición, y posteriormente, cada vial fue retirado

cada 24 horas, para el monitoreo de su fracción volátil mediante S-HS, hasta el día 30. Como blanco de encapsulamiento, se realizó el mismo procedimiento, descrito anteriormente, con el PEG-6000, pero sin adición de AE o fracción. En la **Figura 77**, se presenta un resumen esquemático del procedimiento descrito anteriormente. Los experimentos de encapsulamiento se realizaron por triplicado.



**Figura 77.** Procedimiento de encapsulamiento del AE y fracciones F1 y FD de *Lippia organoides*, mediante el método de dispersión del polímero fundido, PEG-6000.

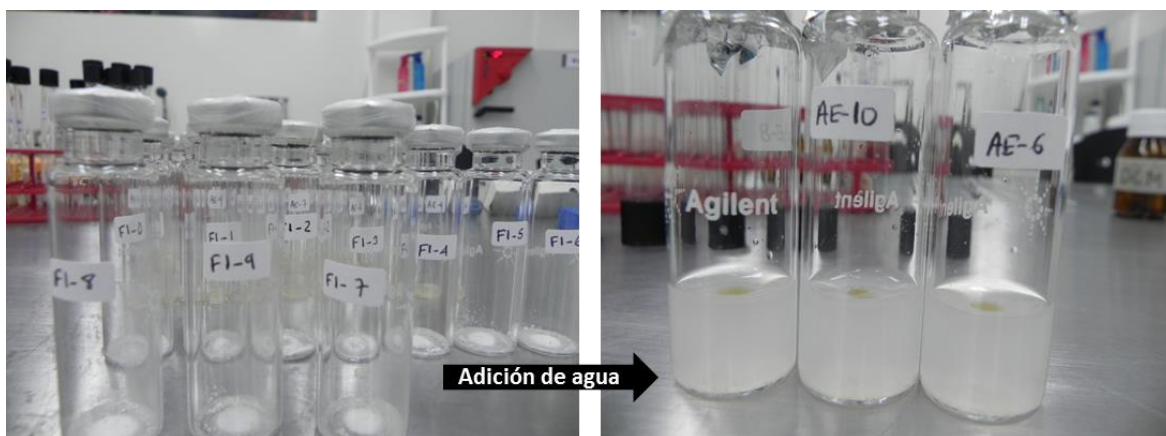
## 2.2. Monitoreo mediante *Headspace* estático de la fracción volátil del AE y fracciones de *L. origanoides*, encapsulados en PEG-6000.

Para el monitoreo de los compuestos volátiles del aceite esencial de *Lippia origanoides* y sus fracciones F1 y FD encapsulados en PEG-6000, se empleó un automuestreador de espacio de cabeza, *Headspace Sampler* Hewlett Packard 7694E, acoplado a un cromatógrafo de gases GC-FID: Hewlett Packard 5890 Series II, equipado con un carrusel portamuestras y un *loop* de 1 mL (Véase **Figura 76**). El monitoreo de la fracción volátil se realizó desde el día 0 hasta el día 30 después de realizar el procedimiento de dispersión del AE y fracciones en el PEG-6000. Se empleó un vial de 20 mL, proveniente de la estufa, para cada día asignado, el cual contenía 0.2 g del polímero con el AE y fracciones dispersos. Este vial fue sellado con tapa de aluminio y un *septum* de teflón. También, se empleó el blanco del PEG-6000, y el blanco del vial. También, se monitoreo el AE sin encapsular (0,022 g). Las temperaturas empleadas para el termostato, el *loop* y la línea de transferencia fueron 70, 80 y 300 °C, respectivamente. La presurización del vial de 20 mL fue de 18.5 psi; el nivel de agitación fue bajo. El tiempo de equilibrio @ 70°C entre la fase vapor y condensada fue de 10 min. Una alícuota (1 mL) del gas presente en la fase vapor del vial, fue transferida al GC-FID: Hewlett Packard 5890 Series II, equipado con columna polar DB-WAX [poli(etilenglicol)] de 60 m x 0.25 mm, D.I x 0.25 µm, df.).

## 2.3. Determinación de la eficiencia de la encapsulación

La eficiencia de encapsulación del aceite esencial y fracciones de *L. origanoides* en PEG-6000, se calculó con base en la **Ecuación 15**. La masa inicial del AE y fracciones F1 y FD, empleada fue de 2,2 g. Para calcular la masa en gramos del aceite esencial o fracción encapsulada, 24 horas después de realizar el procedimiento del encapsulamiento descrito en la Sección 2.1., se procedió a

romper la mezcla PEG-6000/AE, adicionando 10 mL de agua. De esta manera el PEG-6000 se solubilizó en el agua, y el AE y fracciones encapsuladas quedaron inmiscibles, como sobrenadante en la parte superior del vial (Véase **Figura 78**). Posteriormente, el AE y fracciones fueron retiradas con pipeta Pasteur y pesadas en una balanza analítica Mettler Toledo AL-204. Este procedimiento se realizó por quintuplicado para cada caso.



**Figura 78.** Extracción del AE y fracciones de *L. origanoides* del sistema encapsulado con PEG-6000, por adición de agua.

#### **2.4. Determinación del tamaño del AE y fracciones de *L. origanoides* encapsulados en PEG-6000.**

Para determinar el tamaño promedio de las partículas de PEG-600 con el AE y fracciones encapsuladas, así como su distribución hidrodinámica, se empleó la técnica de dispersión de luz dinámica DLS. Para ello, se empleó un equipo Malvern Zetasizer Nano-ZS. En cada caso, se tomaron 9.0 mg del encapsulado pulverizado, y se disolvieron en 1 mL de agua desionizada. También se cuantificó la carga superficial de las partículas encapsuladas, para lo cual se determinó el potencial zeta. Cada medición se realizó por triplicado.

## **2.5. Caracterización química de la fracción volátil de AE y fracciones encapsuladas**

La caracterización química del AE y fracciones de *L. origanoides*, así como de sus fracciones volátiles obtenidas mediante extracción del *headspace*, se realizó mediante cromatografía de gases - espectrometría de masas y cromatografía de gases con detector de ionización en llama. En los dos casos se empleó una columna capilar polar DB-WAX (J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.) de 60m x 0,25 mm., D.I. x 0,25  $\mu$ m, df, con fase estacionaria de poli(etilenglicol). Para cada caso se monitoreó la fracción volátil de los viales en donde se almacenaron 0.2 g de material encapsulado entre el día 0 al 30.

### **2.5.1. Determinación de la cinética de liberación de los compuestos volátiles presentes en los encapsulados de PEG-6000.**

Con el propósito de determinar el comportamiento de evaporación de los componentes del AE y fracciones F1 y FD, en la matriz polimérica de PEG-6000, se monitoreó el área cromatográfica total y de los componentes individuales mediante S-HS-GC-FID. Para ello, se empleó el procedimiento descrito en la Sección 2.2.

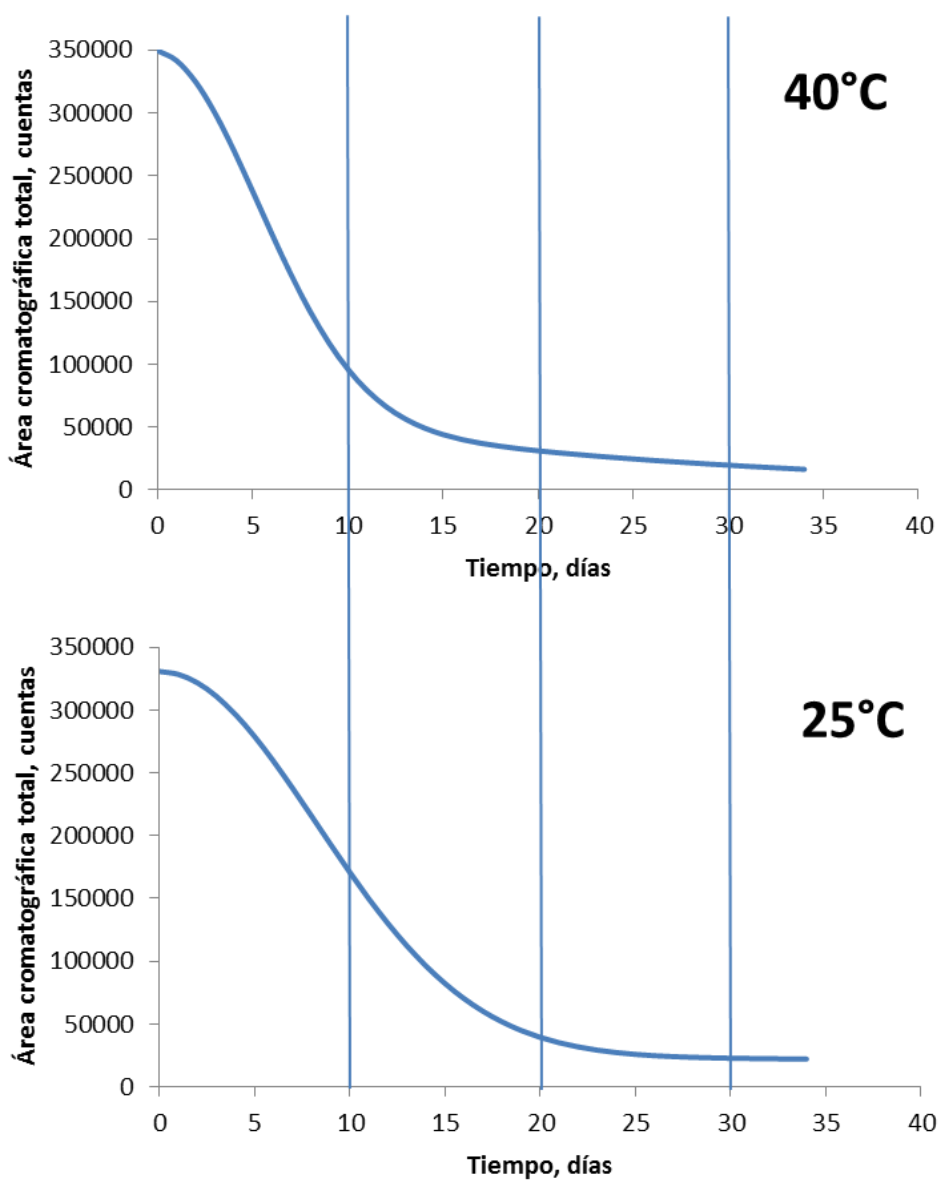
### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Encapsulamiento del AE y fracciones de *L. origanoides*

Mediante estudios preliminares, se determinó que la mejor relación entre el polímero PEG-6000 y la cantidad de aceite esencial o fracción de AE, fue del 11.2%p/p. También se estableció el tiempo de muestreo en 30 días y la temperatura a la cual se sometió el AE y fracciones encapsuladas en 40°C. En la **Figura 79**, se presenta el comportamiento de los componentes volátiles (área cromatográfica total), presentes en el espacio de cabeza, de 0.022 g del AE de *Lippia origanoides* sin encapsular, ajustados a un modelo exponencial, en función del tiempo, expuesto al ambiente a dos temperaturas (25 y 40°C) y monitoreados mediante la técnica *headspace* estático S-HS, con automuestreador, a 70°C, acoplada a cromatografía de gases con detector de ionización en llama (GC-FID). La frecuencia del muestreo fue cada 24 horas.

Se puede observar que después del día 30 de monitoreo, el área cromatográfica de los compuestos volátiles del AE de *L. origanoides*, sometido a evaporación a 25 y 40°C, permanece constante y disminuye significativamente su contenido en la fase vapor. Esto se debe a que los compuestos presentes en el AE, de menor peso molecular ( $\alpha$  y  $\gamma$  terpineno, limoneno, *p*-cimeno), se volatilizan más rápido a una mayor temperatura, debido a que la presión de vapor de los componentes aumenta. La disminución de los compuestos volátiles presentes en la fase vapor es mucho más rápida a 40°C que a 25°C, hasta el día 15. Sin embargo, después del día 20 su pendiente es similar. Esto muestra, que después de que se han volatilizado todos los componentes de menor peso molecular, en la matriz del AE quedan los componentes menos volátiles, de tipo fenilpropanoide (timol, carvacrol) y sesquiterpenoide (cariofileno, humuleno, óxido de cariofileno), cuyas presiones de vapor son menores y por ende más difíciles de evaporar. Es por ello, que

después del día 30 de monitoreo, queda un remanente pequeño de AE en el vial de muestreo.



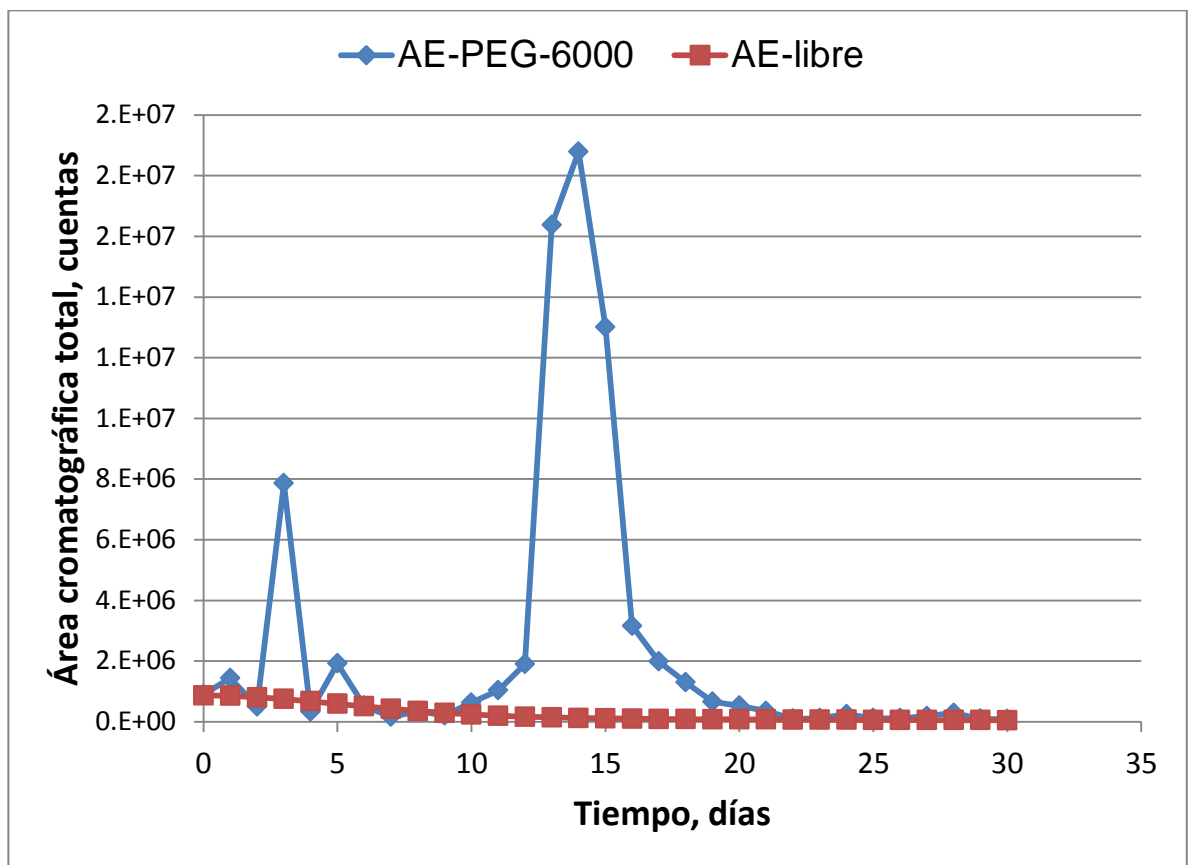
**Figura 79.** Área cromatográfica total de los componentes volátiles del AE de orégano de monte (*L. origanoides*), presentes en el *Headpace* @70°C, en función del tiempo, a dos temperaturas de evaporación en el ambiente. S-HS-GC-FID, columna DB-WAX de 60 m.

Los resultados presentados en la **Figura 79** muestran que es necesario realizar procedimientos que encapsulamiento de los aceites esenciales, que permitan aumentar la retención de sus componentes volátiles y que presentan propiedades biológicas, con el fin de prolongar su efecto, en este caso, prolongar el efecto repelente del AE de *L. origanoides* contra *T. castaneum*.

En la **Figura 80**, se presenta el comportamiento de la evaporación, a 40°C, de los componentes del AE de orégano de monte sin encapsular y encapsulado en la matriz de PEG-6000 (área cromatográfica total), en función del tiempo. Los resultados muestran un efecto positivo de la encapsulación del AE de *L. origanoides* con PEG-6000. Se encontró que el polímero estabilizó el aceite en la matriz, ya que se redujo significativamente la volatilidad y evaporación de los constituyentes del AE de orégano de monte. Se evidencia una evaporación sostenida y selectiva durante el periodo evaluado, debido a que se presentaron picos de evaporación de los componentes del AE, durante los días 1 a 5 y entre los días 10 a 20. Esto evidencia una afinidad química entre el AE y la matriz polimérica. Este comportamiento del AE encapsulado, podría sugerir una interacción ion-dipolo y puente de hidrogeno entre el polímero y los componentes del AE de orégano de monte, lo que hace que las moléculas se solvaten fácilmente, y su difusión hacia el exterior de la matriz polimérica sea más lenta y controlada. En la **Figura 81** se presentan los cromatogramas de la fracción volátil evaporada desde el sistema encapsulado a los 3, 10 y 14 días de monitoreo. Se evidencia, que hay una mayor retención de los compuestos carvacrol y timol hasta el día 10, momento desde el cual se presenta una mayor emisión desde el PEG-6000, lo cual puede estar relacionado con una interacción tipo puente de hidrógeno entre el grupo hidroxilo del fenol y los hidrógenos del PEG. Este mismo comportamiento fue reportado por autores que emplearon el PEG-6000 para encapsular los AE de geranio y bergamota [82]. Resultados similares fueron reportados por Oliveira y colaboradores, quienes encapsularon AE de *Lippia*

sidoides en alginato y goma de anacardo, empleando el método de secado por atomización (*Spray drying*) [90].

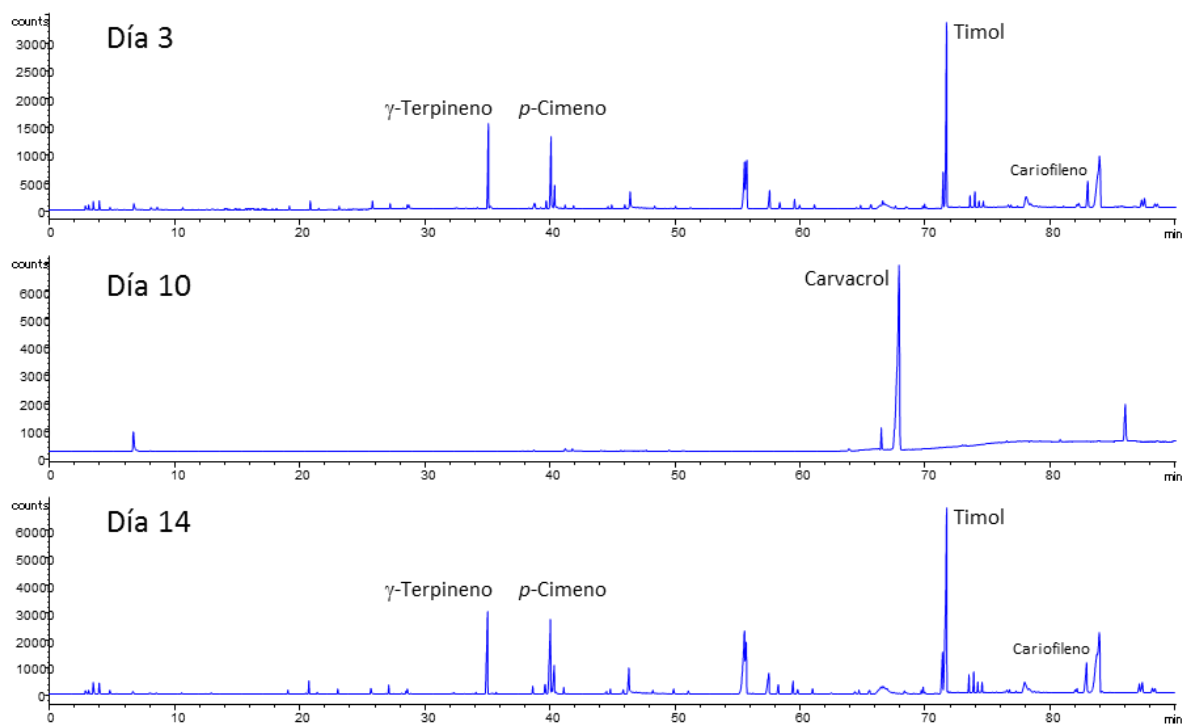
Por el contrario, el AE libre, mostró una pérdida significativa de los compuestos volátiles, durante las primeras horas de evaporación, a una temperatura de 40°C. Sus componentes volátiles, dentro del vial a 40°C, solo perduraron hasta el día cinco, con una menor concentración que la presentada en el AE encapsulado.



**Figura 80.** Área cromatográfica total de los componentes presentes en el *Headspace* @70°C, del AE encapsulado en PEG-6000 y el AE sin encapsular, en función del tiempo. *Autosampler* S-HS-GC-FID, columna DB-WAX de 60 m.

Los resultados del encapsulamiento del AE en PEG-6000, muestran que es posible lograr una liberación sostenida de los componentes del AE, hasta por 20 días, a una temperatura de 40°C.

En la **Tabla 60** se presenta el comportamiento del área cromatográfica total y de los componentes mayoritarios presentes en el AE y fracciones F1 y FD de *L. origanoides*, encapsulados en PEG-6000, monitoreadas por S-HS-GC-FID, en función del tiempo, expuestos a una temperatura de 40°C.

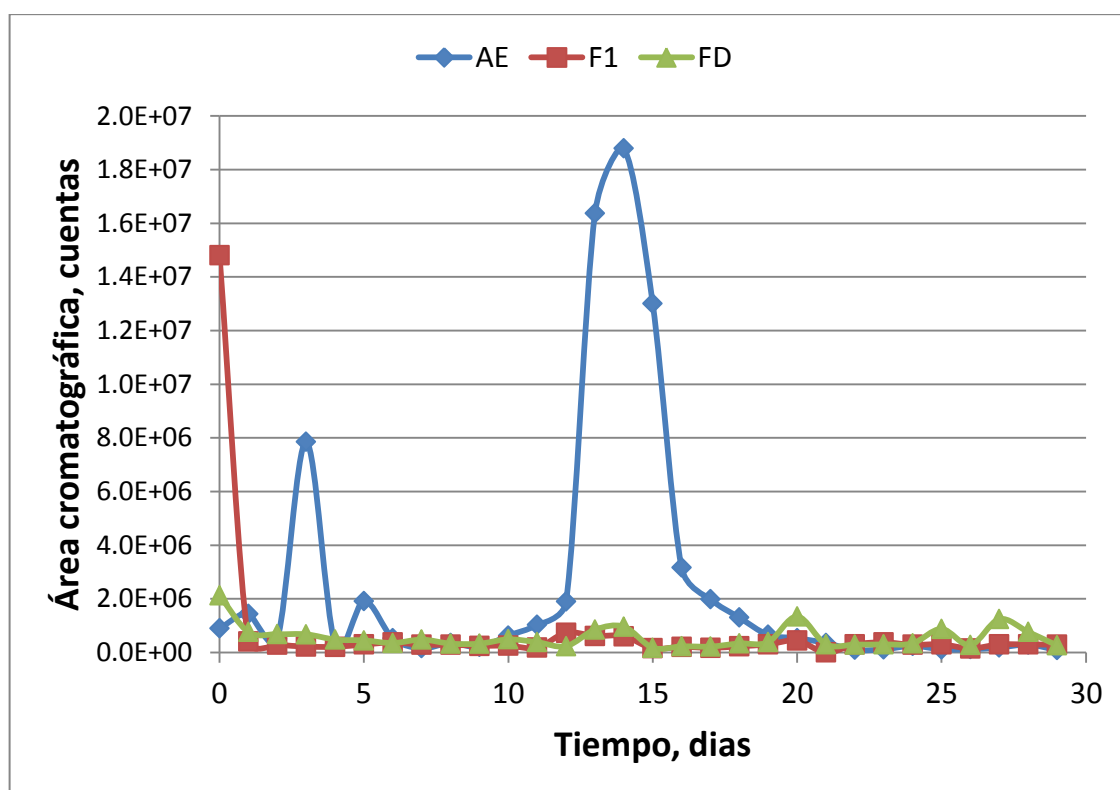


**Figura 81.** Perfiles cromatográficos típicos de la fracción volátil del aceite esencial de *Lippia origanoides* (AE) encapsulado en PEG-6000, en diferentes días de muestreo (3, 10 y 14) obtenidos mediante S-HS-GC-FID, columna DB-WAX de 60 m.

**Tabla 60.** Área cromatográfica de la fracción volátil, monitoreadas a 70°C mediante S-HS-GC-FID, del AE, F1 y FD de *Lippia origanoides* encapsulados en PEG-6000, sometido a evaporación a 40°C. Periodo de muestreo: 30 días.

Día de muestreo	AE	Área cromatográfica, cuentas							
		Compuestos presentes en AE encapsulado en PEG-6000						F1	FD
		$\gamma$ -Terpineno	$p$ -Cimeno	Timol	Carvacrol	Cariofileno	Óxido de cariofileno		
0	8,96E+05	15,22127	250,20067	7191,94043	4279,31348	2,51E+04	199,21259	1,48E+07	2,13E+06
1	1,44E+06	747,28253	1136,44421	3778,47363	2928,15991	1,22E+04	0	4,09E+05	7,64E+05
2	5,03E+05	158,05797	154,85031	5620,38135	2970,50977	9233,22266	0	2,94E+05	6,84E+05
3	7,86E+06	1837,83167	93,52198	2,31E+04	6483,01709	1,07E+04	6315,64697	2,20E+05	6,78E+05
4	3,33E+05	0	0	4842,50244	2450,62866	3959,01318	349,17245	2,12E+05	4,83E+05
5	1,92E+06	340,56006	0	9113,09082	3015,52197	3210,09424	1652,77625	2,99E+05	4,50E+05
6	5,28E+05	1457,99963	226,81311	2612,65576	1281,74255	1306,28491	59,58351	3,74E+05	3,52E+05
7	1,61E+05	0	0	4063,36621	2157,60181	787,40125	0	2,90E+05	4,81E+05
8	3,52E+05	0	0	3115,375	1630,72998	508,44748	0	2,91E+05	3,30E+05
9	2,07E+05	0	0	2041,85583	938,54541	268,57239	0	2,50E+05	3,30E+05
10	6,28E+05	0	0	4788,44629	8,35E+04	261,91519	0	2,54E+05	4,89E+05
11	1,03E+06	189,0865	0	7666,20508	1817,43811	733,6427	982,38959	1,81E+05	3,84E+05
12	1,90E+06	435,18036	0	6340,52002	2387,0354	1260,19446	1719,62354	7,34E+05	2,37E+05
13	1,64E+07	5520,95605	590,51105	4,03E+04	2906,92163	1,19E+04	1,75E+04	6,17E+05	8,50E+05
14	1,88E+07	6871,03711	704,39093	4,50E+04	1,07E+04	1,62E+04	2,19E+04	6,06E+05	9,62E+05
15	1,30E+07	4367,9292	425,20322	32369,1	9181,83691	0	13854,8	1,58E+05	1,76E+05
16	3,16E+06	149,89268	0	6683,67969	2005,98865	304,6958	314,073	2,11E+05	2,29E+05
17	1,99E+06	410,08572	0	9571,00195	241,69653	0	1992,4812	1,74E+05	2,22E+05
18	1,30E+06	204,53586	0	4751,92139	131,88936	0	100,50387	2,32E+05	3,36E+05
19	6,59E+05	0	0	3280,33301	910,32367	0	452,87848	3,03E+05	3,87E+05
20	5,31E+05	0	0	531,12488	3007,24341	6655,41748	0	4,43E+05	1,34E+06
21	3,55E+05	0	0	1746,18411	763,31561	0	0	1,56E+00	3,03E+05
22	9,69E+04	0	0	1090,29565	415,99823	0	0	2,99E+05	2,96E+05
23	1,18E+05	0	0	2415,84717	999,80176	0	0	3,78E+05	3,01E+05
24	2,47E+05	0	0	1240,31604	401,99585	0	174,05495	2,87E+05	3,42E+05
25	1,17E+05	0	0	1414,92883	509,26614	0	59,76535	3,04E+05	8,78E+05
26	1,19E+05	0	0	2064,14624	881,80225	0	0	1,51E+05	2,76E+05
27	1,88E+05	0	0	0	0	0	0	3,00E+05	1,24E+06
28	2,90E+05	0	0	836,85022	281,93994	70,74333	0	3,00E+05	7,67E+05
29	9,44E+04	0	0	1964,41516	855,3775	0	0	2,91E+05	2,64E+05
30	8,36E+04	0	250,20067	7191,94043	4279,31348	0	0	2,77E+05	2,68E+05

En la **Figura 82** se presenta el comportamiento de evaporación a 40°C, del aceite esencial (AE), la fracción 1 (F1) y la fracción de fondo (FD), de *Lippia origanoides*, encapsulados en PEG-6000. La composición química del AE y fracciones, corresponden al Experimento No 4 de la **Tabla 50**, presentada en el **Capítulo 2**. Los perfiles cromatográficos del AE y fracciones F1 y FD, se presentan en la **Figura 66** de la **Sección 3.2.1** del **Capítulo 2**.

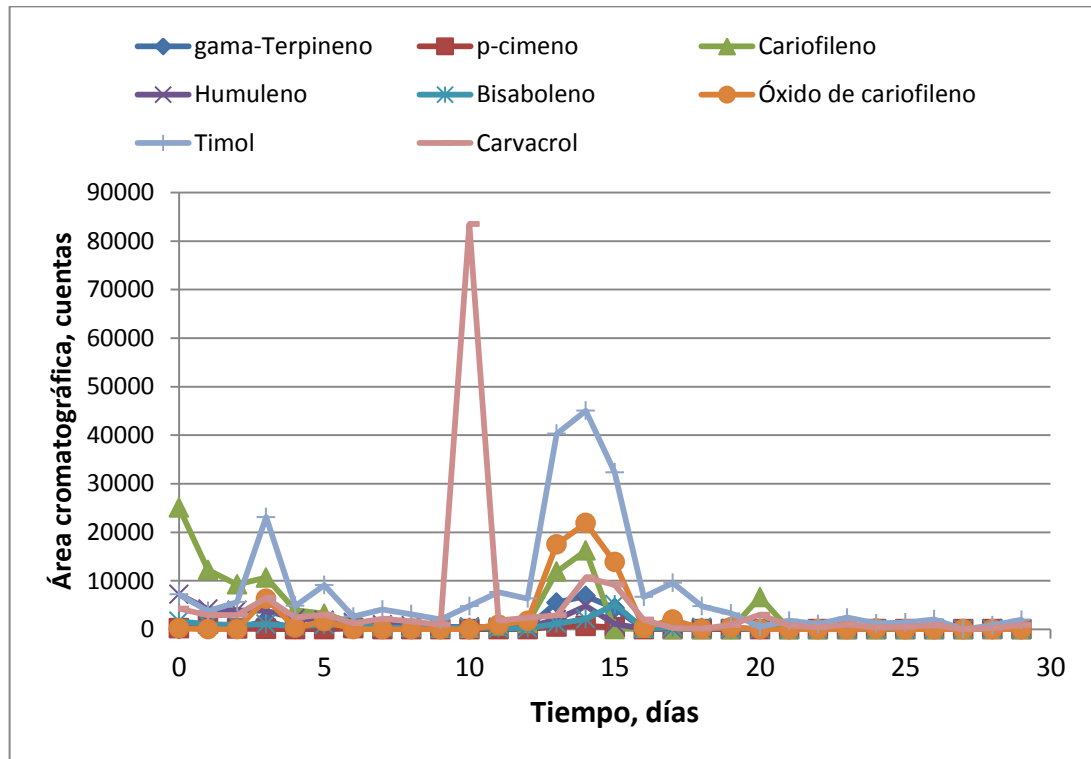


**Figura 82.** Cinética de liberación de los compuestos presentes en el aceite esencial de *Lippia origanoides* (AE) y fracciones (F1, FD), encapsulados en PEG-6000. Monitoreo del área cromatográfica total, mediante S-HS-GC-FID, columna DB-WAX de 60 m.

Los resultados de la cinética de liberación de los componentes presentes en el AE y fracciones de *L. origanoides*, muestran que el polímero PEG-6000, fue mucho más eficiente en retener los compuestos volátiles del AE como mezcla completa,

que los componentes mayoritarios, más volátiles, presentes en la fracción 1 (*p*-cimeno,  $\gamma$ -terpineno). Probablemente, esto se deba a que los componentes más pesados del AE de *L.origanoides* como timol, carvacrol, cariofileno, humuleno y óxido de cariofileno, actúan como fijadores de los componentes más volátiles. En la fracción 1 (F1), estos componentes no se encuentran, por lo tanto el efecto fijador no se observa y el PEG-6000, no lo encapsula eficientemente. En la fracción de fondo (FD), se observa un bajo contenido de sus constituyentes, en el monitoreo mediante S-HS-GC-FID. Esto se debe a que los componentes presentes en esta mezcla (timol, carvacrol, cariofileno, humuleno), tienen un mayor peso molecular y su presión de vapor es menor. Esto reduce su contenido en el espacio de cabeza a 70°, durante el monitoreo en el vial. Esta fracción perdura encapsulada en el polímero, en función del tiempo, hasta por 60 días. En la **Figura 83**, se presenta el comportamiento de evaporación, a 40°C, de los principales constituyentes del AE de *L. organoides*, encapsulado en PEG-6000, en función del tiempo, monitoreados mediante S-HS-GC-FID. En esta gráfica, se puede observar que se presenta una difusión- evaporación sostenida de los componentes, durante los primeros 20 días de monitoreo, logrando su mayor evaporación entre los días 10 a 15. Se puede apreciar un efecto fraccionado en la evaporación de los componentes. Primero se evaporan aquellos componentes de menor peso molecular y menor afinidad por la matriz polimérica. Sin embargo, también se observan varios picos de evaporación para componentes más pesados y que se encuentran en una mayor proporción en el AE encapsulado (timol y carvacrol). Esto se puede deber a que inicialmente, y posterior al homogenizado de la mezcla PEG-6000 / AE, hay una parte que queda expuesta en la superficie del polímero poroso, y otra porción que se difunde hacia el interior. La primera porción se volatiliza con la primera fracción del AE, debido a que los compuestos no quedan encapsulados, sino adsorbidos al exterior del material polimérico, o formando capas sucesivas envolventes. La segunda porción, que es atrapada, debe esperar un mayor tiempo para superar las interacciones ion-dipolo y puente de hidrógeno que se pueden formar con el polímero, para luego ser liberadas. En

el caso de compuestos de tipo sesquiterpenoide como el cariofileno y su óxido, se requiere un mayor tiempo para su evaporación y liberación del PEG-6000.



**Figura 83.** Cinética de liberación de los compuestos mayoritarios del aceite esencial de *Lippia origanoides*, encapsulado en PEG-6000. Monitoreo del área cromatográfica de cada componente, mediante S-HS-GC-FID, columna DB-WAX de 60 m.

El encapsulamiento del timol dentro de la matriz polimérica, fue mucho más eficiente que para el carvacrol y el *p*-cimeno. Esto se vio reflejado en que la evaporación del timol fue más lenta y sostenida en el tiempo. El *p*-cimeno se evaporó durante los primeros quince días, lo mismo que el carvacrol. La difusión-evaporación del timol fue mucho más lenta y se logró una alta concentración de este componente en el espacio de cabeza del vial, hasta 30 días después de encapsulado. Estos resultados son contrarios a los reportados por Martins y colaboradores [85], quienes encontraron que la difusión del timol presente en el

aceite esencial de tomillo, presentaba un coeficiente de difusión ( $1,39 \times 10^{-15} \text{ m}^2/\text{s}$ ) mayor que el *p*-cimeno, encapsulados en ácido poliláctico (PLA).

Estas diferencias presentadas en las velocidades de difusión de los componentes presentes en el AE de *L. origanoides*, probablemente se deban a las diferentes características hidrofóbicas e hidrofílicas de sus componentes, que pueden interactuar de manera diferente con la estructura del polietilenglicol – PEG-6000.

### 3.1.1. Eficiencia de encapsulamiento (EE).

En la **Tabla 61** se presentan los resultados del porcentaje de encapsuamiento del aceite esencial, fracciones F1 y FD de *L. origanoides* en PEG-6000, calculados con base en la **Ecuación No. 15**.

**Tabla 61.** Eficiencia de encapsulamiento del AE y fracciones F1 y FD de *L. origanoides* en el polímero PEG-6000.

Muestra	Peso del AE/ fracción extraída, g	Peso del AE/fracción adicionado a la formulación inicial	Eficiencia de encapsulamiento %±SD (n=5)
Aceite esencial (AE)	0,013	0,023	57±3%
Fracción volátil (F1)	0,006	0,022	27±5%
Fracción de fondo (FD)	0,009	0,022	41±3%

La mejor eficiencia de encapsulamiento del PEG-6000, se encontró para el AE de *L. origanoides* sin fraccionar. Probablemente, los componentes presentes en la mezcla del AE presentan un efecto sinérgico y de mayor cohesión entre ellos, que

permiten una mayor fijación al polímero PEG-6000. Estos resultados son consistentes con lo reportado por Oliveira y colaboradores [90], quienes reportaron una eficiencia de encapsulamiento para el AE de *L. sidoides*, en alginato, mediante el método de secado por atomización, del 55%, aceite cuya composición es similar a la de orégano de monte. Los bajos valores de encapsulamiento para las fracciones F1 y FD y las pérdidas encontradas para el AE, se pueden presentar debido a que parte de las mezclas se pueden quedar adheridas a las paredes de los materiales empleados durante la fusión del PEG-600 y la adición del AE. También, debido a la volatilización de los componentes durante el proceso de macerado y tamizado y a que, una porción del AE y fracciones adicionadas, no son adsorbidas dentro del polímero empleado. Además, se debe tener en cuenta que la eficiencia de encapsulamiento se evaluó 24 horas después de adicionado el AE y fracciones, una vez se solidificó homogéneamente el polímero, periodo durante el cual también se presentaron pérdidas por volatilización de los componentes.

### **3.2. Tamaño de partículas encapsuladas**

En la **Tabla 62** se presentan los resultados de tamaño de partícula (nm) y el potencial zeta (mV) de la partículas obtenidas en el encapsulamiento del AE y fracciones de *L. origanoides* en PEG-6000.

Los tamaños de partícula encontrados para el AE y fracciones de *L. origanoides* encapsulados en PEG-6000, estuvieron dentro del rango de 210 a 370 nm. Estos diámetros de partícula se encuentran dentro de los tamaños reportados para el encapsulamiento de aceites esenciales por diferentes métodos, generalmente, entre 100-600 nm [83, 85]. En el encapsulamiento de los AE de geranio y bergamota en PEG-6000, empleados para el control de *T. castaneum*, se lograron tamaños de partícula menores de 250 nm [82]. Resultados similares se lograron

en el encapsulamiento del AE de *L. sidoides* en alginato (método *Spray drying*), cuyo tamaño de partícula estuvo en el rango de 223-400 nm, con cargas superficiales (potencial zeta), de -36,2 mV [90]. Esto muestra que el método de encapsulamiento de dispersión del polímero fundido, es comparable con otros métodos de encapsulamiento, con la ventaja de que no emplea equipos sofisticados, lo cual genera menores costos de implementación y es relativamente fácil de efectuar.

**Tabla 62.** Diámetro y potencial zeta de las partículas de AE y fracciones de *L. origanoides* encapsuladas en PEG-6000 después de 24 horas de realizar el procedimiento de encapsulamiento (método del polímero fundido). n=3.

<b>Muestra encapsulada</b>	<b>Tamaño de partícula, nm±SD</b>	<b>Potencial zeta, mV±SD</b>	<b>Distribución del tamaño, %</b>
Aceite esencial (AE)	230±20	-8,0±0,5	98%
Fracción volátil (F1)	350±20	-19±3	97%
Fracción de fondo (FD)	250±10	-12±1	100%

Los valores de potencial zeta de las partículas encapsuladas variaron entre -7,5 a -22,0 mV. El mayor valor se logró para la fracción volátil (F1) del AE de *L. origanoides*, compuesta principalmente por *p*-cimeno y  $\gamma$ -terpineno. Las magnitudes de los potenciales zeta obtenidos, indican una buena estabilización de las partículas encapsuladas, lo que permite obtener soluciones homogéneas con una estabilidad moderada, las cuales podrán perdurar en el tiempo.

### 3.3. Propuesta de prototipo de repelente de insectos

Con base en los resultados de la optimización de los procesos de extracción de los aceites esenciales, de repelencia de los AE y fracciones de *L. origanoides*

contra *T. castaneum* y de encapsulamiento mediante el método de dispersión del polímero fundido, empleando PEG-6000, es posible proponer las condiciones técnicas para el desarrollo de un prototipo de repelente contra el gorgojo castaño de la harina (*T. castaneum*), teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el desarrollo de la presente investigación. En la **Tabla 63**, se presentan estas condiciones, con los mejores valores obtenidos, bajo las condiciones evaluadas.

**Tabla 63.** Mejores condiciones técnicas obtenidas para el diseño de un prototipo de repelente de insectos que emplea el aceite esencial de *Lippia origanoides* encapsulado en PEG-6000.

<b>Característica</b>	<b>Condición(es) requerida(s)</b>	<b>Observaciones</b>
Método de extracción	Arrastre con vapor	Emplear un alambique de 1 m <sup>3</sup>
Condiciones de extracción	Tiempo de extracción: 2 horas; tamaño de partícula: 0,5 cm; densidad de carga 250 kg/m <sup>3</sup> ; humedad retirada: 10-20%	Presión del vapor: 80 psi.
Composición química requerida	Timol + carvacrol: 40-50% $\gamma$ -Terpineno, <i>p</i> -cimeno y cariofileno: 5-15%	Determinada mediante GC-MS
Fraccionamiento del aceite esencial	No se requiere fraccionamiento del aceite esencial	
Porcentaje de repelencia contra <i>T. castaneum</i>	80-90%	Durante 48 horas el AE libre
Método de encapsulamiento	Dispersión del polímero fundido	
Tipo de polímero	PEG-6000	
Relación AE : polímero	11,2% p/p	
Porcentaje de encapsulamiento	60%	@40°C
Tiempo de efectividad	Hasta por 20 días después de encapsulado.	
Tamaño de partícula	210-250 nm	
Modo de uso	El sólido con el AE encapsulado es expuesto al ambiente, en donde se presenta la contaminación por los insectos	

Una propuesta de modo de uso del AE de *L. origanoides* encapsulado, sería en forma de cinta adhesiva, en la cual el polímero sólido con el AE encapsulado, es adherido a una cara de la cinta y por la otra tiene un pegamento, para adherir a



#### 4. CONCLUSIONES

- El aceite esencial de *Lippia origanoides* fue encapsulado de una manera eficiente en el polímero PEG-6000, empleando el método de dispersión del polímero fundido, con lo cual se lograron eficiencias de encapsulamiento de hasta el 60%.
- El encapsulamiento del AE de *L. origanoides*, en PEG-6000 permitió una liberación sostenida y controlada de los componentes mayoritarios del AE, hasta por 20 días, expuestos a una temperatura de 40°C.
- El método de dispersión del polímero fundido, en el encapsulamiento del AE de *L. origanoides*, permitió obtener soluciones homogéneas y estables cuyos tamaños de partícula estuvieron en el rango de 210 a 250 nm, con valores de potencial zeta de -8,0 mV. Este método, comparado con otros que emplean equipos sofisticados y costosos como en *Spray drying*, demostró ser una alternativa, sencilla, interesante y a muy bajo costo.
- La combinación de los resultados de optimización del proceso de destilación, actividad biológica y encapsulamiento del AE de *Lippia origanoides*, permitieron proponer el desarrollo de un prototipo de cinta adhesiva repelente contra *T. castaneum*, para su control en lugares de almacenamiento de alimentos.
- Con los resultados de la presente tesis doctoral, se evidencian los argumentos técnicos, para proponer a la especie *Lippia origanoides* como una planta promisoría para su desarrollo agroindustrial, en Colombia y su potencial incorporación en los mercados nacional e internacional. Además de incorporar productos finales, en donde se aprovechen sus propiedades biológicas.

## 5. DIVULGACIÓN DE RESULTADOS

Parte del contenido y resultados parciales del presente capítulo fueron publicados de la siguiente manera:

### **Ponencias en congresos:**

Estudio de la actividad repelente del aceite esencial y fracciones de *Lippia origanoides* H.B.K. DC Durán, JR Martínez M, K. Caballero, J. Olivero, E Stashenko. XV Congreso Latinoamericano de Cromatografía y Técnicas Afines, **COLACRO-2014**. Cartagena de Indias, Colombia– Hotel Caribe. 29 de septiembre a 3 de octubre de 2014. Recibió galardón dentro de los mejores trabajos presentados en el Congreso.

Estudio de la actividad repelente y el encapsulamiento del aceite esencial y fracciones de *Lippia origanoides* H.B.K. DC Durán, JR Martínez M, K. Caballero, J. Olivero, E Stashenko. Simposio Internacional de Aceites Esenciales **ISEO-SBOE-2015**. Rio de Janeiro, Brasil. 10-13 de noviembre de 2015. Recibió el **primer puesto** entre los pósteres presentados en el Simposio.

### **Artículos:**

Elena E. Stashenko, Jairo René Martínez, Diego Camilo Durán, Yuri Córdoba, Deyanira Caballero. Estudio comparativo de la composición química y la actividad antioxidante de los aceites esenciales de algunas plantas del género *Lippia* (Verbenaceae) cultivadas en Colombia. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias 2014, Vol XXXVIII (Supl.) 89-105.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS CAPÍTULO 3

82. Werdin J., Gutiérrez M., Ferrero A., Fernández B. Essential oils nanoformulations for stored-product pest control – Characterization and biological properties. 2014, *Chemosphere* 100: 130-138.
83. A. El Asbahani, K. Miladi, W. Badri, M. Sala, E.H. Aït Addi, H. Casabianca, A. El Mousadik, D. Hartmann, A. Jilale, F.N.R. Renaud, A. Elaissari. Essential oils: From extraction to encapsulation. 2015, *International Journal of Pharmaceutics* 483: 220-243.
84. Villamizar L., Martínez F., Determinación de las condiciones de microencapsulación de un baculovirus entomopatógeno mediante coacervación con Eudragit S100” 2008, *Vitae* 15(1): 123-131.
85. Martins I., Barreiro M., Coelho M., Rodrigues A. Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. 2014, *Chemical Engineering Journal* 245: 191-200.
86. Re, M.I. (1998). Microencapsulation by spray drying. *Drying Technology*, 16, 1195-1236.
87. Vilstrup, P. (2004). *Microencapsulation of Food Ingredients*. Ed. Leatherhead International Limited, Surrey, UK. pp 1-47.
88. Wampler, D. J. Flavor encapsulation: a method for providing maximum stability for dry flavor systems. *Cereal Foods World*. 1992, 37, 817-820.
89. Jayakumar Jerobin, R.S. Sureshkumar, C.H. Anjali, Amitava Mukherjee, Natarajan Chandrasekaran. Biodegradable polymer based encapsulation of neem oil nanoemulsion for controlled release of Aza-A. *Carbohydrate Polymers* 90 (2012) 1750– 1756.

90. Oliveira E., Paula H., De Paula R. Alginate/cashew gum nanoparticles for essential oil encapsulation. 2014, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 113: 146-151.
91. Flávia O.M.S. Abreu, Erick F. Oliveira, Haroldo C.B. Paula, Regina C.M. de Paula. Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation. 2012, *Carbohydrate Polymers* 89: 1277-1282.
92. FENG L., XUE G., FEN Z., CHAO-L. Structural Characterization of Nanoparticles Loaded with Garlic Essential Oil and Their Insecticidal Activity against *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). 2009, *J. Agric. Food Chem.* 57: 10156-10162.
93. Stadler, T., Buteler, M., Weaver, D.K., 2010. Novel use of nanostructured alumina as an insecticide. *Pest. Manage. Sci.* 66, 577–579.
94. Mohanraj V., Chen Y., Nanoparticles – A Review. 2006, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.* 5(1): 561-573.
- Kolb B., *Applied Head Space Gas Chromatography.* 1 Ed. Heyder, Londres, 1982, p. 185-186.

## 7. CONCLUSIONES GENERALES

- Se identificaron a escalas de laboratorio y piloto varios componentes determinantes de la adición de valor en la agroindustria de aceites esenciales, para especies vegetales nativas e introducidas.
- Los aceites esenciales estudiados cumplen con normas de calidad internacionales.
- La modelación de las condiciones de extracción de aceites esenciales permitió encontrar los conjuntos de valores específicos de cada especie vegetal para maximizar su producción y la cantidad relativa de sus componentes mayoritarios.
- La rectificación del aceite esencial de orégano de monte (*L. origanoides*) permitió la obtención de fracciones con un alto contenido de timol y carvacrol (ca. 75%) y composición química reproducible.
- Los mejores valores de repelencia en las fracciones y el AE de citronela, se obtuvieron para aquellas mezclas que presentaron contenidos intermedios (5-25%) de los compuestos monoterpénicos, citronelal, citronelol y geraniol, y de los sesquiterpenos elemol, germacren-4-ol y muurolol.
- Se encontró una correlación positiva entre el contenido de compuestos oxigenados totales en la mezcla de aceites esenciales y fracciones de citronela y la respuesta de la actividad repelente contra *T. castaneum*.
- Los aceites esenciales de *Lippia alba* quimiotipos citral y carvona-citral poseen similar o mejor capacidad repelente que el producto comercial IR3535 contra *Tribolium castaneum*.

- Aceites esenciales de *Lippia alba* con alto contenido de monoterpenos oxigenados mostraron los valores más altos de repelencia contra el *Tribolium castaneum*.
- La combinación de los resultados de optimización del proceso de destilación, actividad biológica y encapsulamiento del AE de *Lippia origanoides*, permitió proponer el desarrollo de un prototipo de cinta adhesiva repelente contra *T. castaneum*, para su control en lugares de almacenamiento de alimentos.