

**ESTUDIO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Lippia alba* (Fam. *Verbenaceae*) Y DE
LOS ASPECTOS FISIOLÓGICOS EN DIFERENTES ETAPAS DE SU
CRECIMIENTO BAJO TRES NIVELES DE LUZ**

DIEGO CAMILO DURÁN GARCÍA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2005**

**ESTUDIO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Lippia alba* (Fam. *Verbenaceae*) Y DE
LOS ASPECTOS FISIOLÓGICOS EN DIFERENTES ETAPAS DE SU
CRECIMIENTO BAJO TRES NIVELES DE LUZ**

DIEGO CAMILO DURÁN GARCÍA

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

**Directora: Elena Stashenko, Química, Ph. D.
Co-director: Nelson Rodríguez, Biólogo, M. Sc.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2005**

DEDICATORIA

A Mario y Mimy por todas sus enseñanzas y buenos consejos.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profundo sentimiento de gratitud hacia la doctora Elena Stashenko, auténtica embajadora de la cultura y la sabiduría, quien con su formidable carisma y perseverancia, me ha aportado innumerables enseñanzas en el campo académico y personal, para la construcción de una mejor Colombia.

Al doctor Jairo René Martínez, por tener siempre alguna respuesta a cualquier inquietud, fundamental para mi formación como investigador.

Al profesor Nelson Rodríguez por toda su colaboración y enseñanza para la ejecución de este proyecto y por apoyarme a incursionar en un área desconocida para nosotros los químicos.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Cromatografía, en especial a Amanda Lucia, por su hermosa sonrisa y amistad sincera.

A Yasmith, por su incondicional apoyo y colaboración en el levantamiento de los cultivos de Prontoalivio. Finalmente a todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron en la realización de este proyecto.

Resumen:

TITULO: ESTUDIO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Lippia alba* (Fam. Verbenaceae) Y DE LOS ASPECTOS FISIOLÓGICOS EN DIFERENTES ETAPAS DE SU CRECIMIENTO BAJO TRES NIVELES DE LUZ*

Autor: Diego Camilo Durán García**.

Palabras claves: Aceite esencial, *Lippia alba*, intensidad lumínica (IL), hidrodestilación, GC-MS.

Las plantas aromáticas suelen presentar una notable variación en la composición de sus AEs, debido principalmente a la existencia de “quimiotipos”, los cuales varían debido a factores ambientales y factores fisiológicos en las plantas.

En el trabajo, se evaluó el efecto de tres niveles de intensidad lumínica (100, 50, 20% IL) sobre la composición química del AE de *Lippia alba* (calidad y cantidad) y aspectos fisiológicos en cuatro épocas de recolección, en Bucaramanga, Colombia. El AE se obtuvo de hojas y tallos del material fresco por el método de hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD). Los parámetros fisiológicos fueron determinados con base en mediciones de masa seca de cada órgano y el área foliar de las plantas.

El principal componente encontrado en los AEs analizados fue la carvona (40-49%), seguido del limoneno (16-32%), el biciclosesquifelandreno (8-13%), la piperitenona (5-8%), piperitona (2-3%) y el β -bourboneno (1-2%). Las plantas de *L. alba* en los diferentes tratamientos de intensidad lumínica, mostraron variaciones en su rendimiento y cantidad de los componentes principales en el AE durante las diferentes etapas de desarrollo. Para las distintas épocas de recolección, se encontró que el mayor contenido de los componentes de interés *ca.* carvona, se obtuvo a partir de las plantas en estado de floración, independiente de la cantidad de luz recibida. Durante este periodo, las plantas del cultivo T2 (50% IL), resultaron ser las más productivas, puesto que lograron una mayor acumulación de metabolitos secundarios volátiles en sus órganos (hojas y tallos) y una aceptable producción de biomasa.

Los resultados de los parámetros fisiológicos indicaron que las plantas sometidas a la sombra modificaron sus características fisiomorfológicas, comparadas con las plantas “testigo” (T1), presentando plasticidad positiva en respuesta al estrés lumínico. Con este trabajo se pudo establecer que *Lippia alba* presenta habilidad para ser cultivada en asociación.

* Trabajo de grado.

** Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Elena Stashenko y Nelson Rodríguez.

Abstract:

TITLE : STUDY OF THE *Lippia alba* (Fam. *Verbenaceae*) ESSENTIAL OIL AND ITS PHYSIOLOGICAL ASPECTS IN DIFFERENT STAGES OF ITS GROWTH UNDER THREE LEVELS OF LIGHT*.

Author: Durán, Diego Camilo**.

Key words: Essential oil, *Lippia alba*, luminous intensity (IL), hydrodistillation, GC-MS.

Aromatic plants usually present a remarkable variation in the composition of their essential oils (EOs), which is due to the existence of “chemotypes”, which vary due to environmental and physiological factors in plants.

In this work, the effect of three levels of luminous intensity was evaluated (100, 50, 20% IL) on the chemical composition of the EO of *Lippia alba* (quality and amount) and physiological aspects at four stages of harvesting, in Bucaramanga, Colombia. The EO was obtained from leaves and stems of the fresh material by the of microwave-assisted hydrodistillation method (MWHD). The physiological parameters were determined with base in measurements of dry mass of each organ and the foliar area of the plants.

The main component found in the analyzed EOs was carvone (40-49%), followed by limonene (16-32%), bicyclosesquiphellandrene (8-13%), piperitenone (5-8%), piperitone (2-3%) and the β -bourbonene (1-2%). In the different treatments from luminous intensity, the plants of *L. alba*, showed variations in their yield and amount of the main components in the EO during their different stages of development. For the different times from harvesting, it was found that the greater content of the components of interest *ca.* carvone, was obtained from the plants in state of flowering, regardless the amount of light received. During this period, the plants from the T2 growing (50% IL), turned out to be the most productive, since they reached a greater accumulation of volatile secondary metabolites in its organs (leaves and stems) and an acceptable production of biomass.

The results of the physiological parameters indicated that the plants undergone to the shade modified their physio-morphological characteristics, compared to “witness” (T1) plants, presenting positive plasticity in response to luminous stress. With this work it was possible to establish that *Lippia alba* presents ability to be cultivated in association.

* Grade work.

** Faculty of Sciences, School of Chemistry, Stashenko, Elena and Rodríguez, Nelson.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	18
1. ANÁLISIS DE LA LITERATURA	22
1.1. Generalidades de los aceites esenciales	22
1.1.1. Definición	22
1.1.2. Propiedades fisicoquímicas de esencias	25
1.1.3. Métodos industriales de obtención de aceites esenciales	26
1.1.4. Métodos de obtención a escala de laboratorio	27
1.1.5. Análisis y control de calidad de los aceites esenciales	29
1.1.6. Variación de la composición de los aceites esenciales	37
1.1.7. Aplicaciones	39
1.1.8. Mercado mundial de los aceites esenciales	40
1.2. Aspectos ecofisiológicos de las plantas	42
1.2.1. Metabolitos secundarios	42
1.2.2. Intercambio gaseoso foliar en plantas	43
1.2.3. Análisis de crecimiento vegetal	46
1.3. <i>Lippia alba</i>	49
1.4. La carvona	51
2. PARTE EXPERIMENTAL	53
2.1. Identificación botánica	53
2.2. Propagación del material vegetal	53
2.3. Estudio de la incidencia de la radiación y etapa de crecimiento sobre la composición y rendimiento de AE de <i>Lippia alba</i>	54
2.4. Obtención de aceites esenciales	56
2.4.1. Recolección del material vegetal	56
2.4.2. Extracción	56

2.5. Preparación de la muestra para su análisis por GC-MS	56
2.6. Análisis cualitativo del AE de hojas y tallos de <i>Lippia alba</i>	57
2.7. Análisis cuantitativo del AE de hojas y tallos de <i>Lippia alba</i>	59
2.8. Medición de parámetros fisiológicos	60
2.8.1. Recolección del material vegetal	60
2.8.2. Determinación de área foliar	61
2.8.3. Determinación de masa seca	61
2.8.4. Determinación de parámetros de crecimiento	62
2.8.5. Determinación de la radiación incidente sobre el cultivo de <i>L. alba</i>	62
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
3.1. Rendimiento de los AEs de <i>Lippia alba</i> , obtenidos por MWHD	63
3.2. Caracterización química de los AEs de <i>Lippia alba</i> mediante GC-MS	65
3.2.1. Determinación de la composición del AE de <i>L. alba</i> obtenido por MWHD	65
3.2.2. Incidencia de la época de cosecha del material vegetal e intensidad lumínica sobre la composición del AE de <i>Lippia alba</i>	79
3.2.3. Comparación de la composición química de los AEs de <i>Lippia alba</i> , extraídos de hojas jóvenes y maduras	84
3.2.4. Análisis de los AEs de <i>Lippia alba</i> mediante GC-MS	89
3.2.5. Análisis de componentes principales (PCA) de los AEs de <i>Lippia alba</i> extraídos por MWHD	99
3.3. Aspectos ecofisiológicos de <i>Lippia alba</i>	101
3.3.1. Variables climáticas	101
3.3.2. Parámetros de crecimiento y acumulación de biomasa	101
3.4. Relación entre el rendimiento de AE de <i>Lippia alba</i> y su biomasa total	110
4. CONCLUSIONES	112
5. RECOMENDACIONES	114
6. BIBLIOGRAFÍA	115

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros analíticos utilizados en el control de calidad de aceites esenciales.

Tabla 2. Rendimiento (% p/p) del AE de *Lippia alba*, en función de su etapa de crecimiento e intensidad lumínica (IL).

Tabla 3A. Composición química de los AEs de *Lippia alba*, aislados por MWHD, de las plantas del cultivo con intensidad lumínica del 100% (T1), en función del período de crecimiento (días).

Tabla 3B. Composición química de los AEs de *Lippia alba*, aislados por MWHD, de las plantas del cultivo con intensidad lumínica del 50% (T2), en función del período de crecimiento (días).

Tabla 3C. Composición química de los AEs de *Lippia alba*, aislados por MWHD, de las plantas del cultivo con intensidad lumínica del 20% (T3), en función del período de crecimiento (días).

Tabla 4. Componentes principales en los AEs, aislados por MWHD, de hojas jóvenes (HJ) y maduras (HM) de *Lippia alba*, cultivada bajo condiciones T2.

Tabla 5. Valores promedios del peso seco total de plantas de *Lippia alba*, en función del periodo de crecimiento (días), bajo tres niveles de intensidad lumínica.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Partes principales de un cromatógrafo.

FIGURA 2. Principales bloques de un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas.

Figura 3. Principales rutas de biosíntesis de los metabolitos secundarios y su interrelación con los metabolitos primarios.

Figura 4. Estructuras de los isómeros ópticos de la carvona: **1a** (-)R-carvona; **1b** (+)S-carvona.

Figura 5. Esquema general del método de propagación de *Lippia alba* para tres niveles de intensidad lumínica.

Figura 6. Cultivo de *Lippia alba* bajo tres niveles de intensidad lumínica.

Figura 7. Esquema del equipo utilizado para la hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD).

Figura 8. Cromatógrafo de gases de alta resolución *Agilent Technologies* 6890 *Plus*, con detector selectivo de masas *Agilent Technologies* MSD 5973. Columna DB-1 (60 m X 0.25 mm X 0.25 μ m) con f.e. 100% - poli(dimetilsiloxano).

Figura 9. Variación del rendimiento del AE de *Lippia alba* en función de la etapa de crecimiento de la planta e intensidad lumínica.

Figura 10. Cromatograma típico del AE de *Lippia alba* Mill., obtenido por MWHD. Columna DB-1 (60 m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los picos se reporta en la **Tabla 3A**.

Figura 11. Fórmulas estructurales de los componentes identificados en el AE de *Lippia alba*, según su orden de aparición en los cromatogramas (**Figuras 9 y 12**). Los nombres aparecen en la **Tabla 3A**.

Figura 12. Distribución de los monoterpenos oxigenados en el AE de *L. alba*, en función del periodo de crecimiento y de la intensidad lumínica. T1=100% IL; T2=50% IL; T3=20% IL.

Figura 13. Perfiles cromatográficos típicos de los AEs de *L. alba*, obtenidos por MWHD, de plantas cultivadas a T1=100% IL: **A.** 70 días; **B.** 100 días; **C.** 130 días; **D** 160 días. Columna DB-1 (60 m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los picos se reporta en la **Tabla 3A**.

Figura 14. Concentración de la carvona ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de material vegetal), en los AEs de *L. alba*, obtenidos de las plantas cultivadas bajo tres niveles de intensidad lumínica (IL), en función del periodo de su recolección.

Figura 15. Concentración del limoneno ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de material vegetal), en los AEs de *L. alba*, obtenidos de las plantas cultivadas bajo tres niveles de intensidad lumínica (IL), en función del periodo de su recolección.

Figura 16. Perfiles cromatográficos típicos de los AEs de *Lippia alba*, obtenidos por MWHD, de las plantas del cultivo (T2): **A.** Hojas jóvenes; **B.** Hojas maduras. Columna DB-1 (60 m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los picos se reporta en la **Tabla 4**.

Figura 17. Principales compuestos presentes en los AEs de *Lippia alba*, obtenidos por MWHD de hojas jóvenes (HJ) y maduras (HM), de plantas cultivadas bajo las condiciones T2.

Figura 18. Concentración de la carvona ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de material vegetal) en AEs de *Lippia alba*, obtenidos de hojas jóvenes (HJ), maduras (HM) y de hojas y tallos en periodo de floración de la planta, cultivada bajo intensidad lumínica media ($T2 = 50\%$).

Figura 19. Espectro de masas del limoneno.

Figura 20. Espectro de masas del linalool.

Figura 21. Espectro de masas de la carvona.

Figura 22. Espectro de masas de la piperitona.

Figura 23. Espectro de masas de la piperitenona.

Figura 24. Espectro de masas del biciclosequifelandreno.

Figura 25. Representación gráfica de PCA, de las concentraciones ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de MV), de los componentes presentes en los aceites esenciales de *Lippia alba*, aislados por MWHD, para los diferentes tratamientos de intensidad lumínica y edad (días).

Figura 26. Promedios diarios de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) y radiación solar (W/m^2) durante el periodo del experimento (días). Datos obtenidos por la Estación Meteorológica de la CDMB, UIS.

Figura 27. Variación del peso seco total (g) de *Lippia alba* en cuatro épocas de muestreo, bajo tres niveles de intensidad lumínica (T1= 100% IL; T2= 50% IL ; T3= 20% IL).

Figura 28. Área foliar de *Lippia alba* bajo tres niveles de intensidad lumínica (IL), T1 (100% IL), T2 (50% IL) y T3 (20% IL), en función del crecimiento (días).

Figura 29. Tasa de asimilación neta de *Lippia alba*, bajo tres niveles de radiación incidente , en función del crecimiento (días) de la planta.

Figura 30. Tasa de crecimiento relativo de *Lippia alba*, bajo tres niveles de radiación incidente, en función del crecimiento (días) de la planta.

Figura 31. Área foliar específica de *Lippia alba*, bajo tres niveles de intensidad lumínica, en función del crecimiento (días) de la planta .

Figura 32. Relación del rendimiento de aceite esencial Vs biomasa de las plantas de *Lippia alba*, cultivadas bajo tres niveles de intensidad lumínica, en función del periodo de su crecimiento (días).

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Síntesis de la carvona vía oxidación del limoneno.

Esquema 2. Posibles rutas de fragmentación del limoneno.

Esquema 3. Posibles rutas de fragmentación del linalool.

Esquema 4. Posibles rutas de fragmentación de la carvona.

Esquema 5. Posibles rutas de fragmentación de la piperitona.

Esquema 6. Posibles rutas de fragmentación de la piperitenona.

Esquema 7. Posibles rutas de fragmentación del biciclosesquifelandreno.

ACRÓNIMOS

AE	Aceite esencial.
AEs	Aceites esenciales.
AF	Área foliar.
AFE	Área foliar específica.
°C	Grado(s) <i>Celsius</i> .
CAF	Coeficiente de área foliar.
CAM	Metabolismo ácido de Crasuláceas.
CDMB	Corporación Autónoma Regional para la Defensa de la Meseta de Bucaramanga.
cm	Centímetro (s).
DES	Destilación-extracción simultánea con solvente.
<i>e.g.</i>	Por ejemplo.
EI	Energía de ionización; <i>Electron impact</i> (impacto de electrones), según el contexto.
eV	Electrón-voltios.
f.e.	Fase estacionaria.
FID	<i>Flame ionization detector</i> (Detector de ionización en llama).
g	Gramo(s).
GC	Cromatografía de gases o cromatógrafo de gases, según el contexto.
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
GHz	GigaHertz.
IL	Intensidad lumínica.
<i>L. alba</i>	<i>Lippia alba</i> .
m	Metro(s).
m.s.m.n.	Metros sobre el nivel del mar.
<i>m/z</i>	Relación masa – carga.

M ⁺	Ión molecular.
m ²	Metro(s) cuadrado(s).
MEP	Metilnitrofosfato.
min	Minuto(s).
mL	Mililitro(s).
mm	Milímetro (s).
MS	Espectrometría de masas, espectro (s) de masas o espectrómetro de masas, según el contexto.
MSD	Detector selectivo de masas (<i>Mass selective detecto</i>).
MV	Material vegetal
MWHD	Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas.
Pa	Pascal(es).
PCA	Análisis de componentes principales.
PF	Peso foliar.
% p/p	Porcentaje peso a peso.
ppm	Partes por millón.
RDA	<i>Retro Diels-Alder</i> .
s	Segundo(s).
T1	Tratamiento 1: 100% de intensidad lumínica.
T2	Tratamiento 2: 50% de intensidad lumínica.
T3	Tratamiento 3: 20% de intensidad lumínica.
TAN	Tasa de asimilación neta.
TCA	Tasa de crecimiento absoluto.
TCR	Tasa de crecimiento relativo.
TIC	Corriente iónica total.
t _R	Tiempo de retención (min).
UIS	Universidad Industrial de Santander.
W	Vatio(s).
μL	Microlitro (s).
μm	Micrómetro(s).

INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente las plantas aromáticas y medicinales han sido utilizadas por el hombre en diferentes aspectos de la vida cotidiana, ya sea como medicamento natural, alimento, agente conservante, artículo de limpieza personal, o simplemente como arreglo ornamental y aromatizante. En la actualidad este conocimiento popular ha experimentado cambios a través del tiempo, evolucionando en lo que se conoce como la agroindustria de los productos naturales, con sus múltiples aplicaciones en las industrias de alimentos, cosmética y farmacéutica, entre otras.

Un aspecto importante que ha marcado en buena parte el desarrollo de la agroindustria de plantas aromáticas y medicinales, es el auge mundial en los últimos 15 años del consumo y utilización de productos exclusivamente de origen natural. Las plantas aromáticas en la actualidad aportan materia prima importante para la elaboración de una variada gama de productos en diferentes áreas (farmacéutica, cosmética, alimentos, etc). Al mismo tiempo que crece este auge hacia lo natural, se ha incrementado el interés hacia el entendimiento y conocimiento acerca del comportamiento de especies vegetales bajo diferentes ambientes de crecimiento. Evidencia de ello son los variados artículos científicos sobre plantas aromáticas, que se encuentran en diferentes revistas indexadas.

Colombia es un país con una inmensa riqueza biológica, que ofrece una amplia variedad de posibilidades, para una explotación adecuada de nuestros recursos naturales a escala agroindustrial. Para lograr esto, es necesario desarrollar investigación en aspectos sociales, económicos y tecnológicos, con el fin de ofrecer una alternativa a las personas interesadas en desarrollar este tipo de industria y, de esta forma, obtener un producto que sea competitivo en los mercados nacional e internacional. Las plantas aromáticas podrían ser una de las

tantas posibilidades que existen en nuestro país para generar industria y, más específicamente, en su aprovechamiento para la extracción de aceites esenciales (AEs), los cuales son mezclas de compuestos orgánicos, productos del metabolismo secundario de las plantas. Los AEs se emplean para la elaboración de mezclas saborizantes, aromatizantes, licores, perfumes, artículos de aseo, como enmascaradores de olores de pinturas y caucho, en la síntesis orgánica fina y como materias primas para la elaboración de productos farmacéuticos, entre otras aplicaciones [4, 40].

El presente trabajo hace parte de la línea de investigación sobre aceites esenciales del Laboratorio de Cromatografía del Centro de Investigación en Biomoléculas, CIBIMOL, de la Universidad Industrial de Santander, donde se han venido estudiando diferentes plantas tropicales con posible potencial para la extracción de AEs y su utilización a escala agroindustrial. Después de varios años de investigación en el laboratorio se han encontrado especies promisorias, tales como “Pronto alivio” (*Lippia alba*), entre otras; una planta que sorprende por sus múltiples aplicaciones tradicionales, e.g. en infusión teiforme como sedante, desinfectante, diaforética, emenagoga, antiespasmódica, entre otras [13]. Esta especie, al igual que varias plantas aromáticas, suele presentar una notable variación en la composición de su aceite esencial, debido principalmente a la existencia de los llamados “quimiotipos” [4], los cuales son individuos de una misma especie, morfológicamente idénticos, pero diferentes en la composición química de sus metabolitos secundarios volátiles, e.g. aceites volátiles, la cual varía debido a factores ambientales y fisiológicos de las plantas [37, 40, 56]. De acuerdo con esto, la calidad y el precio de un AE dependen principalmente de la presencia de compuestos de interés particular en el aceite (e.g. para perfumería o como materia prima para síntesis orgánica fina). Por otro lado, el “quimiotipo” de *Lippia alba* encontrado en nuestro país [52], ha generado interés por su alto contenido de la carvona (> 50%), el cual es un compuesto de alto valor agregado,

utilizado principalmente en la industria cosmética y como aromatizante en productos de uso personal (e.g. pastas dentífricas).

Por esta razón, el propósito de la presente investigación consistió en determinar las mejores condiciones de cultivo de "Pronto alivio", para extraer el AE con la calidad (contenido de carvona) y el rendimiento más alto posible, teniendo en cuenta la época de recolección y el efecto de diferentes intensidades de luz. También, se evaluaron estos mismos parámetros para determinar aspectos fisiológicos de las plantas de *Lippia alba*, tales como índices de crecimiento, área foliar, plasticidad y biomasa total, con el fin de establecer la incidencia del efecto de la sombra sobre la composición del AE, y verificar si existe una correlación entre la capacidad fotosintética de la planta (acumulación de biomasa) y la producción de metabolitos secundarios (AE), durante su desarrollo ontogénico. Las muestras de aceites esenciales fueron analizadas por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Los datos fisiológicos fueron calculados a partir del peso seco de los diferentes órganos de las plantas de *Lippia alba*.

Es importante destacar también las enormes ventajas que presenta la agroindustria esenciera, comparada con la producción de otros productos: además de la planta aromática, el agua y combustible son sus únicos insumos. El combustible puede ser el mismo material vegetal seco después de extraído; el método generalmente usado para la extracción, es destilación por arrastre con vapor o hidrodestilación, es económico y sencillo, además, el proceso genera pocos desechos industriales [4, 20].

Los resultados adquiridos en el presente trabajo serán de interés para la nascente industria de AEs en Colombia, ya que se ofrece una herramienta tecnológica y científica valiosa para el establecimiento de cultivos de *Lippia alba* a pequeña escala agrícola, para la implementación de una planta piloto para extraer el AE y el estudio de factibilidad para su industrialización. También se plantea una alternativa al pequeño y mediano industrial interesado en el desarrollo de la industria de AEs.

Llevando el proyecto a la macroescala, se podrá luego satisfacer la demanda interna en AEs, generando una nueva fuente de empleo para el campo y alternativas para la sustitución de cultivos de uso ilícito, cambios en las políticas de monocultivo y también nuevos ingresos en la cartera de productos de exportación de nuestro país.

1. ANÁLISIS DE LA LITERATURA

1.1. GENERALIDADES DE ACEITES ESENCIALES

1.1.1. DEFINICIÓN

Como una forma de generalizar al máximo este término, y tratando de no confundir conceptos, se puede definir a un aceite esencial o esencia, como una mezcla compleja de sustancias químicas que son parte del metabolismo de un vegetal, extraída mediante destilación con arrastre con vapor de agua o hidrodestilación y compuesta generalmente por terpenos que están asociados o no a otros componentes, la mayoría de ellos volátiles, que generan en conjunto, el olor de la planta [4, 16, 40, 51]. Para aclarar un poco más esta definición y ver algunas excepciones, se discute a continuación cada uno de sus puntos.

- **Metabolismo de la planta:** Tal vez éste es el concepto más importante a tener en cuenta cuando se trabaja con esencias, ya que al tratar de un alcaloide, de un flavonoide o de un azúcar, se está mencionando un producto puro, químicamente definido y con una fórmula característica. Por el contrario, cuando se trata de una esencia, debe tenerse presente que se está mencionando una mezcla de productos aislados en una proporción y con una composición muy variable que depende de varios factores. Generalmente, no es un solo metabolito el que compone la esencia, sino una mezcla. Todos los componentes de esta mezcla son productos volátiles a condiciones normales de temperatura y presión, pero también pueden tener en común su solubilidad en determinado solvente [4, 9, 16].

Otro aspecto importante que debe tenerse en cuenta, es que siendo una parte del metabolismo de una planta, la composición química de una esencia está en constante cambio, con proporciones variables de sus constituyentes o

transformándose unos en otros, según la parte de la planta, el momento de su desarrollo o el momento del día, entre otros [4, 6 - 10].

- **Composición:** Como parte del complejo metabolismo de una planta, las esencias abarcan una gama muy variada de constituyentes. Normalmente, asociados a los mono- y sesquiterpenos, aparecen también en su composición ésteres, alcoholes, aldehídos, cetonas, acetales, fenoles, glicósidos, ceras, hidrocarburos lineales, ácidos grasos, alcaloides, cumarinas y esteroides. En la actualidad, con el avance de nuevas tecnologías e instrumental en el campo de las ciencias de la separación, se ha ido conociendo mucho más sobre la composición de los AEs, entre los cuales se encuentra una heterogénea variedad de compuestos de diversa naturaleza química [4, 16, 40].

Debido a la complejidad de su composición, es aconsejable hacer una diferenciación entre los compuestos presentes en una esencia. Se mencionan entonces compuestos mayoritarios, cuando están en la esencia en una proporción mayor de 0.5-1%, y los minoritarios, menor que el 0.5%, que, en algunos casos, pueden encontrarse por centenares, sobre todo en las esencias de flores [4].

Esta clasificación de los constituyentes en función del contenido presente en cada esencia es fundamental, tanto para determinar la calidad de esencia, como para precisar sus características organolépticas o sus efectos fisiológicos. No existe en la actualidad un aceite esencial del cual se conozca en forma absoluta su composición química; todo depende del grado de sensibilidad del instrumento analítico con el cual se lo haya analizado [4].

- **Olor del vegetal:** El olor que tiene una planta viva no es el mismo que posee su esencia aislada. Ésto se debe a múltiples factores, los más importantes son

la volatilidad, solubilidad, metabolismo y ubicación de los compuestos de la esencia en los tejidos.

Para poder oler en una planta los productos aromáticos “pesados”, menos volátiles, es necesario secarla y, de esta manera, eliminar los más “livianos”. Como ésto no ocurre normalmente, la presencia de los más volátiles enmascara continuamente a los constituyentes aromáticos más “pesados”. Por otro lado, los productos con alta volatilidad suelen perderse durante los procesos extractivos, sobre todo cuando se utiliza la destilación por arrastre con vapor de agua. Al respecto, debe tenerse en cuenta, que cuando se obtiene una esencia por arrastre con vapor, algunos componentes quedan parcialmente retenidos en la fase acuosa, como ocurre con el alcohol feniletílico en la esencia de rosa, o algunos ácidos y ésteres livianos [4].

Una vez la planta es cosechada para ser extraída su esencia, el metabolismo de la misma no permanece inalterado, sino que continúa evolucionando en la medida que no se elimine la mayor cantidad de agua, lo que finalmente inhibe los procesos enzimáticos. Se ha demostrado experimentalmente que no es igual el olor de una flor en la planta, que la misma flor ya cortada [4].

De acuerdo con la ubicación en los tejidos, cada parte de la planta puede tener una esencia distinta en su calidad olfativa. Se puede pensar, que existe una esencia en las partes más externas de la planta, las que olemos, y otra esencia en las partes más internas, que no podemos oler, pero cuando son extraídas, se mezclan produciendo un aroma distinto del detectado en la planta viva [4, 16].

De una manera resumida se puede concluir, que un aceite esencial por definición es un producto volátil, de composición química compleja y con una enorme

variabilidad en lo que refiere a su calidad, propiedades y estabilidad, cualidades comunes a muchos productos naturales.

1.1.2. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE ESENCIAS

Los AEs son generalmente líquidos a temperatura ambiente, incoloros cuando están puros y frescos, pero se colorean cuando se exponen al aire (algunas esencias poseen un color muy particular como el azul de manzanilla, o el verde de bergamota). Poseen una densidad menor que la del agua, excepto algunas esencias como la de clavo. En general, son volátiles y una de sus principales características es su inestabilidad ante la luz y el oxígeno, ante la presencia de oxidantes, reductores, medios con pH extremos, o trazas de metales que puedan catalizar reacciones de descomposición. Esta inestabilidad que resulta un problema para la conservación y formulación de las esencias es un factor determinante en su utilización como precursores en la síntesis orgánica fina [4, 10, 16].

En cuanto a sus solubilidades, tienen la particularidad que si bien son solubles en medio no polar (son más liposolubles cuanto mayor contenido de hidrocarburos terpénicos tengan), también suelen tener alta solubilidad en etanol, lo que es ampliamente explotado en la elaboración de fragancias y extractos hidroalcohólicos para las industrias farmacéutica y cosmética.

Los aceites esenciales refractan la luz polarizada, propiedad que es usada para el control de su pureza, ya que poseen un índice de refracción característico, así como su poder rotatorio, en razón de que poseen en su composición numerosos productos ópticamente activos [4, 9, 16].

1.1.3. MÉTODOS INDUSTRIALES DE OBTENCIÓN DE ESENCIAS

Para la extracción de esencias 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 AE [16]. A continuación se describe cada grupo:

- **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 [16, 40].
- **Destilación.** Es el procedimiento más antiguo y difundido para la obtención de aceites esenciales debido a su bajo costo y simplicidad de equipo. Industrialmente la destilación se realiza en varias formas, a saber: destilación con agua o hidrodestilación, destilación con agua y vapor y destilación con vapor directo [10, 16, 40].

Durante la hidrodestilación, el agua en ebullición penetra los tejidos de la planta y disuelve una parte del aceite esencial presente en las estructuras contenedoras, esta solución acuosa se difunde a través de las membranas de las células, y el aceite se vaporiza inmediatamente desde la superficie. Este proceso continúa hasta que se remueve todo el aceite contenido en las glándulas de la planta.

Los constituyentes oxigenados del aceite son más solubles en el agua hirviendo (unas 100 veces más) que los hidrocarburos análogos. Por esta razón, la destilación del aceite esencial en sus etapas iniciales, los componentes se liberan de acuerdo con su grado de solubilidad, antes que siguiendo el orden de sus

puntos de ebullición. Luego, a medida que avanza la destilación, los compuestos se liberan en función de su temperatura de ebullición, siendo la última fracción muy rica en sesquiterpenos y sus análogos oxigenados. Otro factor que juega un papel importante durante la extracción mediante esta técnica, es el contenido de compuestos grasos (lípidos) en la planta, ya que son poco volátiles y, en cierto modo, retienen la fracción de hidrocarburos volátiles los cuales muestran más afinidad por los compuestos grasos que por los compuestos oxigenados [12, 16, 29].

1.1.4. MÉTODOS DE OBTENCIÓN A ESCALA DE LABORATORIO

Lo más importante en la obtención de AE a escala de laboratorio, es lograr que los extractos de las esencias representen en alto grado la composición original de la esencia en la planta. Los métodos de extracción que más se acercan a este propósito son:

- **Destilación – extracción simultánea con solvente (DES).** El sistema combinado de destilación - extracción con solvente simultánea, descrito por primera vez en 1966 por Likens y Nickerson [33], permite operar con solventes tanto de mayor, como de menor densidad que el agua; siendo el de mayor densidad, por ejemplo, el diclorometano, el más aplicado en la obtención de los AEs.

Posteriormente, Godefroot [14] reportó un método de análisis cuantitativo para AEs, basado en el sistema modificado de destilación - extracción simultánea con solvente, a microescala. El equipo, que se utiliza en la aplicación de esta técnica, está diseñado de tal manera, que todas las sustancias volátiles se recolectan en sólo 2 mL de solvente orgánico (diclorometano) [48].

La mayor ventaja de este método consiste en que el extracto no requiere una concentración adicional, por evaporación del solvente. Simplemente, se recoge su pequeña fracción (1.0 µL) y se inyecta directamente al cromatógrafo, con lo que se logra hacer una medición cuantitativa de las sustancias presentes, inclusive aquellas, que se encuentran en el orden de ppm. Debido al uso de pequeñas cantidades de solvente, se logra minimizar la contaminación y reducir el costo del proceso [14, 48].

- **Extracción asistida por la radiación de microondas (MWHD).** En esta técnica, patentada por J. Paré [42, 43], se utilizan solventes orgánicos transparentes a la radiación de microondas, en donde el material vegetal se sumerge y se somete a la acción muy corta de la radiación. Por el aumento en la temperatura, debido al agua que contiene el material vegetal, se rompen las estructuras celulares que contienen la esencia, por efecto de su presión de vapor, la cual, al ser liberada, se disuelve en el solvente [28, 42, 43].

La aplicación de esta técnica a la extracción de plantas aromáticas fue introducida por primera vez en 1992 por Jean F. I. y colaboradores [22], quienes obtuvieron y estudiaron la composición de los extractos de diferentes plantas, a saber: eneldo, alcaravea, hinojo y perejil, de la familia *Umbelliferae*; estragón (fam. *Compositae*), mejorana, orégano, tomillo salsero, salvia y tomillo (fam. *Labiatae*).

En el caso de la MWHD, que se realiza en el Laboratorio de Cromatografía de la UIS, el material vegetal se sumerge en agua (aproximadamente una tercera parte del material) en un equipo de destilación tipo Clevenger [52]. Por efecto de la radiación de microondas, obtenida de un horno de tipo comercial para este efecto, el agua se calienta hasta ebullición, en donde el vapor generado comienza a penetrar las estructuras celulares de la planta, que por efecto de calentamiento expulsan el AE contenido en ellas, que luego se difunde hacia la

superficie del material vegetal y éste, a su vez, es arrastrado por el vapor de agua; finalmente, el AE es condensado y recolectado. La destilación termina cuando todo el aceite es liberado de las glándulas que lo contienen.

El método de extracción asistida por la radiación de microondas, presenta ventajas sobresalientes con respecto a las técnicas tradicionales de destilación: es un proceso muy rápido y relativamente económico, los aceites esenciales obtenidos se encuentran libres de los productos de descomposición térmica y de contaminantes [22, 28, 52].

1.1.5. ANÁLISIS Y CONTROL DE CALIDAD DE LOS ACEITES ESENCIALES

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 [4, 16, 40]. El establecimiento de estos dos aspectos, composición y parámetros de calidad, se hace a través de diferentes métodos de separación, identificación y cuantificación [9, 16], 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 (*o obtención de fracciones*);
- Cromatografía de gases (*separación de la mezcla, cuantificación de los constituyentes*).

El análisis e identificación de los aceites esenciales en un principio, hace más de treinta años, era una tarea tediosa, que consumía muchísimo tiempo, y que requería el aislamiento y la purificación de cada componente, debido a que la mayoría de aceites son mezclas muy complejas. Para ello, se utilizaron la cromatografía en capa fina, cromatografía en columna, destilación fraccionada, etc., y la determinación estructural de sustancias constituyentes por métodos químicos tradicionales (obtención de derivados, reacciones de coloración, pruebas de grupos funcionales, etc.). En esta época, el control de aceites esenciales se limitaba en buena parte a la determinación de sus constantes físicas (solubilidad, densidad, poder rotatorio, índice de refracción, etc.) o algunos índices químicos (acidez, éster, acetilo, etc.) [4, 16].

Esta primera etapa de la analítica de las esencias fue iniciada por el químico Otto Wallach, quien mereciera por esta labor el Premio Nóbel de Química de 1910 [4]. Un segundo Premio Nóbel de Química, otorgado en 1952 a Martin y Synge, fue el inicio de una nueva etapa en el conocimiento de los aceites esenciales, gracias al desarrollo de la cromatografía en fase gaseosa [4].

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) [48].

- **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 [15, 23, 45, 46, 48]. 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 1**) 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.

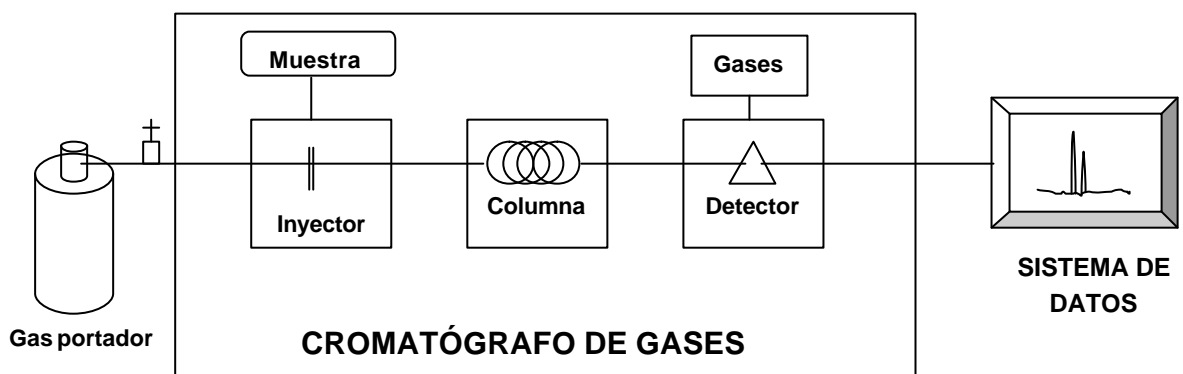


Figura 1. Partes principales de un cromatógrafo.

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 20M [poli(etilenglicol), fase polar] y OV-101 (DB-1, HP-1, Ultra 1 SP-30) [poli(dimetilsiloxano), fase apolar] [24, 46, 48].

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 [15, 23]. Al llegar al detector, los componentes generan señal, que se amplifica y registra en forma de un cromatograma [46, 48]. 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. Cuando el análisis se realiza en régimen isotérmico, la temperatura en el horno permanece constante, en tanto que en un proceso a temperatura programada, aumenta gradualmente con el tiempo durante el análisis [15, 23, 45, 46, 48].

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 [15, 24, 48].

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. [48]. Por ello, ha sido necesaria la introducción de parámetros más "reproducibles" como son los tiempos de retención relativos y los índices de retención. Éstos se calculan a partir de los tiempos de retención y por comparación con una serie de sustancias a las cuales se les asignan valores arbitrarios de índices de retención. Los más utilizados son los llamados índices de Kovàts, introducidos en 1958 por E. Kovàts [30] y definidos respecto a los tiempos de retención de una serie de *n*-alcanos.

Los índices de Kovàts se usan en el análisis de aromas de alimentos, extractos, bebidas, muestras biológicas, gasolinas, pesticidas, esencias de frutas y aceites esenciales [30]. 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 Kovàts en columnas CARBOWAX 20M y OV-101 para compuestos presentes en aromas y fragancias fue recopilado por Jennings y Shibamoto (1980) [24].

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.

- **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 veinte años, ha demostrado que es uno de los métodos más eficientes para el estudio de la composición de los aceites esenciales [48, 51-55]. 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 esencia se inyecta directamente al cromatógrafo, sin ningún tratamiento previo, lo cual elimina posibles modificaciones en la composición de la muestra o en la estructura de sus constituyentes. En el cromatógrafo, los componentes de la esencia se separan, entran al espectrómetro de masas, que permite registrar el espectro de cada una

de las sustancias separadas. Los constituyentes del aceite se identifican con base en patrones de fragmentación, que se observan en sus espectros de masas [36, 50, 51].

Los componentes del aceite pueden ser simultáneamente separados e identificados con base en sus tiempos y/o índices de retención y los espectros de masas, los cuales son característicos para cada sustancia. El método GC-MS permite realizar en una sola operación, para una muestra del orden de 1 μL , un análisis cualitativo junto con una indicación de las proporciones en las que se encuentran los componentes. Cuando se dispone de sustancia patrón, la calibración del equipo permite un análisis cuantitativo exacto de la muestra [39, 50]. La forma ómo las dos técnicas se acoplan, *i.e.* la GC y MS, se puede observar en la **Figura 2** [26, 50].

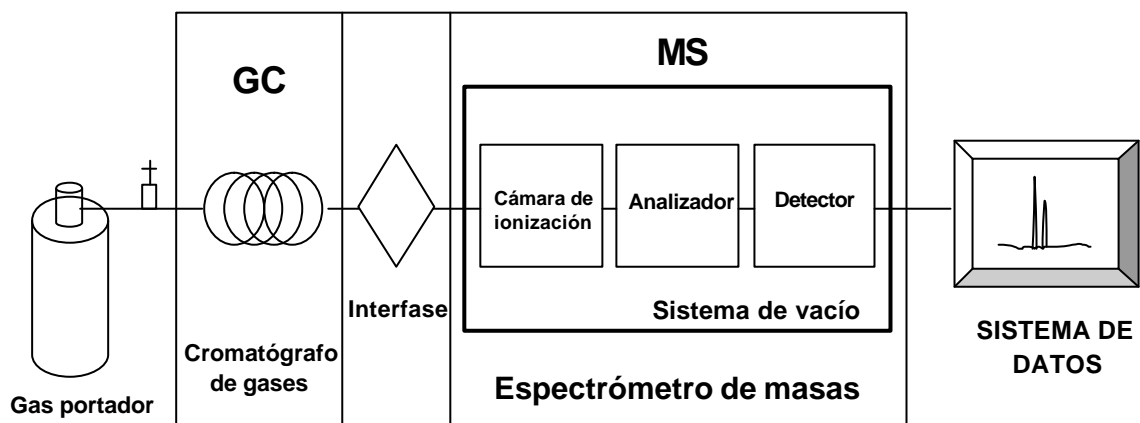


Figura 2. Principales bloques de un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas.

- **Espectrometría de masas**

La espectrometría de masas comprende el estudio de los iones-fragmento, productos de ionización de compuestos puros, generados en una cámara de ionización. Los iones se aceleran hacia el analizador de masas del instrumento, donde se separan según su relación masa/carga (m/z) y se registran de acuerdo con su abundancia (corriente iónica parcial). Este registro se conoce como espectro de masas y es característico para cada compuesto [36, 50].

El espectrómetro de masas es un equipo conformado por un sistema de vacío, cámara de ionización, analizador de masas, separador de iones y un detector acoplado a un sistema que amplifica y registra las señales en forma de un espectro de masas [26, 36, 50].

El espectrómetro de masas opera a presión reducida ($10^{-4} - 10^{-6}$ Pa) la cual se logra empleando bombas de difusión y/o turbomoleculares. Estas últimas son las más comercializadas ya que logran en menor tiempo el vacío requerido por el sistema [36, 50]. En la cámara de ionización del espectrómetro de masas se forman los iones o fragmentos ionizados, que proporcionan la información necesaria para identificar los componentes que eluyen de la columna cromatográfica. En esta cámara se generan principalmente dos tipos de iones, así: 1. El ión molecular M^+ , que resulta durante la pérdida de un electrón de una molécula neutra, y proporciona información acerca del peso molecular y la estabilidad de la especie bajo estudio; 2. Los iones-fragmento son iones “diagnóstico” de grupos funcionales presentes; el análisis de éstos puede ayudar a determinar la estructura e identificar un compuesto de interés [36, 50].

En la obtención de los iones de las especies bajo estudio, generalmente, se utiliza la ionización con impacto de electrones (EI). En esta técnica, se emplean electrones con una energía cercana a 70 eV, producidos por emisión termoiónica

de un filamento de tungsteno o renio. El haz de electrones choca en un ángulo apropiado con el flujo de moléculas neutras que pasan a través de la cámara de ionización y la energía transmitida produce inicialmente la ionización y, luego, la fragmentación de los iones moleculares “excitados”, con exceso de energía interna [50].

- **Control de calidad de aceites esenciales**

El control de la calidad de un aceite esencial tiene por objeto garantizar que éste 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 o, en su defecto, por el propio interesado [4].

Los principales grupos de parámetros analíticos utilizados para valorar la calidad de un aceite esencial, se clasifican en seis tipos (**Tabla 1**), 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 [4].

Tabla 1. Parámetros analíticos utilizados en el control de calidad de aceites esenciales.

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

1.1.6. VARIACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

La composición de los AEs 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 geobotánicas en las cuales se desarrollan las

plantas. Entre las condiciones de la extracción, se pueden mencionar, e.g. el tiempo de extracción, temperatura, presión, cantidad de material vegetal, entre otras [52-54].

Otra variable importante, que puede modificar la composición de los AEs, cuando el método de extracción involucra el proceso de hidrodifusión (como en la destilación), es el pH del medio en el cual está sumergido el material vegetal. La modificación de la composición de algunos aceites esenciales por medio del control de pH ha sido objeto de varios estudios, en los cuales se reportan la aparición de algunos nuevos compuestos y el aumento en el rendimiento del aceite esencial a determinado valor de pH [4].

Uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta sobre la variación de la composición de los AEs, 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; ello es función de su estado fenológico, y también debido a variaciones metabólicas durante el día. Teniendo en cuenta el periodo de vegetación, el momento oportuno depende de los siguientes factores:

- **Condiciones atmosféricas:** A causa de las diferencias que existen de un año a otro, el desarrollo de una planta puede variar produciéndose las fenofases (estados fenológicos) en fechas distintas. Por ejemplo, un año con temperaturas menores a las habituales o menos días de insolación, puede retardar la floración de un cultivo [4].
- **Latitud y altitud:** Al acercarse al Ecuador, las temperaturas medias más altas aceleran la vegetación y adelantan las fenofases. Por ejemplo, en Argentina por cada 10° de latitud hacia el norte se adelanta aproximadamente dos semanas la floración de algunas especies anuales [4].

- **La exposición a la luz:** Influye por el hecho que las pendientes expuestas al sol poseen una vegetación más avanzada, porque reciben una energía calórica y luminosa mayor que las que no están tan expuestas a la luz solar [4, 47, 56].
- **Las condiciones del terreno:** Son importantes, pues los suelos arenosos, minerales, sueltos, se calientan más fácilmente y permiten un crecimiento más rápido que los suelos arcillosos y pesados [4, 40].

1.1.7. APLICACIONES

Los AEs son utilizados ampliamente en diferentes ramas de la industria y con variados fines. Por ejemplo, en perfumería y cosmética como constituyentes principales que confieren el olor agradable a los productos; en la industria de alimentos y licores se usan como aromatizantes y saborizantes; en la industria farmacéutica para la obtención de extractos o compuestos orgánicos y principios activos, que se utilizan en la preparación de drogas, y en las industrias de plásticos y pinturas como enmascaradores de olores. En la industria química las esencias se emplean como materia prima para obtener compuestos de interés comercial, por ejemplo, el citral, geraniol, mentol o limoneno, entre otros [6, 10, 20, 38].

Debido a la heterogeneidad química que poseen, los AEs presentan un amplio espectro de propiedades biológicas, entre los cuales cabe mencionar los siguientes: efectos antiinflamatorios, antisépticos, desodorizantes, insecticidas, expectorantes, sedantes y estimulantes de la circulación. Los pocos efectos nocivos, fototóxicos, narcóticos, reacciones alérgicas y acciones cancerogénicas de los AEs, pueden producirse por el abuso o el mal uso que de ellos se hace [5, 31]. El valor comercial y el uso del aceite esencial dependen de su composición química, la cual, a su vez, está condicionada por diversos factores de tipo botánico, ambiental y agrícola, así como del método de extracción [4, 6].

1.1.8. MERCADO MUNDIAL DE LOS ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales poseen un amplio y variado mercado mundial, debido a las diversas industrias, con diferentes aplicaciones, que los utilizan como materia prima. En el 2003, se estimó que la producción mundial de AEs fue de unas 282.000 toneladas, con transacciones que alcanzaron los 2.5 billones de dólares [8, 11, 57]. Cerca del 50% de la producción mundial, es utilizada en saborizantes, predominantemente en bebidas no alcohólicas y dietéticas. El restante de la producción, se usa en fragancias (25%), aromaterapia (10%), fitoterapia (5%) y para el fraccionamiento y la obtención de sustancias químicas de mayor valor agregado (e.g. citral, eugenol, anetol, carvona, etc), empleados como materia prima en la síntesis orgánica fina (10%) [8, 11, 20].

En la actualidad, cerca del 85% del mercado mundial de AEs, es manejado por grandes empresas transnacionales, las cuales durante los últimos 12 años y, debido al fenómeno de la globalización, se han venido agrupando, con el fin de reducir los gastos fijos y optimizar los recursos tecnológicos y humanos, logrando una llamada masa crítica de investigación y desarrollo, que les permita competir a nivel internacional. Es el caso de Guivaudan-Roure, Tastemaker y Hercules (1992), Harman & Reimar y Dragocco, que dieron origen a las empresas multinacionales Symrise (2001) y a la unión de IFF con Bus Boak Allen (2002) [20, 57].

Los principales países productores de AEs en el mundo son: los Estados Unidos (EE.UU.), la Comunidad Europea (CE) y un número importante de países en vía de desarrollo (Brasil, Indonesia, China, India, entre otros) [8, 11, 20, 57]. En el 2003, la Comunidad Europea exportó el 55% del total de AEs en el mundo y los Estados Unidos el 15%. Los AEs, que tienen mayores implicaciones económicas en el mundo son de menta, limón, rosa, jazmín, aceites esenciales con alto contenido de citral, de sándalo, vetiver, patcholi, geranio, cedro, lavandina,

esencias de citronela y cítricos, los cuales en su gran mayoría son consumidos por los EE.UU. (40%), la CE (30%) y Japón (7%) [11, 20, 57].

El fenómeno de monopolización, en la producción y el consumo de AEs por parte de los EE.UU. y la CE, refleja dos aspectos importantes en el comportamiento del mercado mundial de estos productos: en primer lugar, el desarrollo mundial en sabores y fragancias, particularmente, en la formulación de componentes para su utilización final, es dominado por estas potencias, así, como la importación de la producción primaria para su procesamiento. Como segundo aspecto importante, la tendencia de las grandes transnacionales de exportar el producto procesado, al resto del mundo, generalmente, a países de Latinoamérica, Asia y África, beneficiándose doblemente al quedarse con el valor agregado del producto vegetal. Este fenómeno ocurre, al pie de la letra en nuestro país, básicamente, por la falta de una industria de AEs, que satisfaga las exigencias del mercado nacional.

Para los próximos años los mercados, que se esperan tengan mayor expansión, son los de Europa y Asia. Específicamente, el mercado de sabores, soporta una fuerte expansión debido a la renovación en las costumbres alimenticias de la población, que quiere conocer nuevos productos, entre los cuales se encuentran los llamados alimentos ecológicos y los étnicos, artículos de tradiciones o artes culinarios exóticos, generalmente, tropicales, donde abundan las especias, hierbas y sabores fuertes y raros [8, 20].

Por otro lado, es evidente la preferencia del usuario por consumir productos naturales y, en éste aspecto, juegan un papel importante los productos orgánicos, a pesar, de que sean casi un lujo en países desarrollados. Finalmente, en el mundo moderno, las personas prefieren cada día menos los productos con ingredientes sintéticos, debido a sus probables efectos tóxicos. Ésto no quiere decir, que todos los productos de origen natural no lo sean, una premisa, que

generalmente es creíble por la mayoría de las personas. Por estas razones, se espera en el futuro, una fuerte demanda de AEs en el mundo, que suplan las necesidades de una nueva generación de consumo, para lo cual, Colombia deberá estar preparada, máxime cuando cuenta con todo el recurso humano, tecnológico y toda una tradición agrícola, elementos necesarios, para generar una nueva industria de aceites esenciales.

1.2. ASPECTOS ECOFISIOLÓGICOS DE LAS PLANTAS

1.2.1. METABOLITOS SECUNDARIOS

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 [56]. 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 [56].

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 3**); 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 [32, 56].

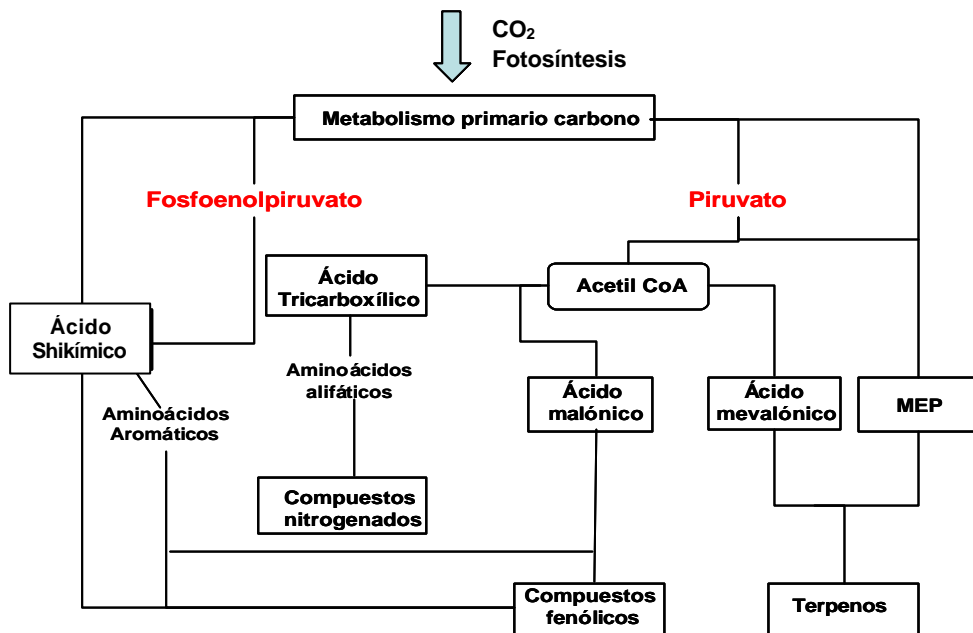


Figura 3. Principales rutas de biosíntesis de los metabolitos secundarios de plantas y su interrelación con los metabolitos primarios.

Durante varios años se ha considerado, que los metabolitos secundarios en las plantas son un material de desecho de las mismas. Sin embargo, investigaciones recientes [27, 59] 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 [56].

1.2.2. INTERCAMBIO GASEOSO FOLIAR EN PLANTAS

La fotosíntesis es un proceso fisiológico que es influenciado por factores abióticos, tales como: temperatura, humedad y luz, entre otros. Además, simultáneamente con la toma de CO₂ en la planta ocurre el proceso de transpiración (eliminación de agua), el cual puede generar un aumento o disminución en la capacidad fotosintética de la

planta, debido, principalmente, a que estos dos fenómenos suceden a través de un mismo órgano en la planta, *i.e.* los estomas; por ello, entender la transpiración es la base necesaria para estudiar la captación de CO₂ [47, 56].

- **TRANSPIRACIÓN**

La mayor parte del agua, que las raíces toman del suelo, entra a la planta en forma líquida y tarde o temprano se evapora en las hojas por medio del proceso de la transpiración. Además del vapor de agua, hay diversos gases que entran y salen de las plantas. En la hoja, la transferencia de gases se lleva a cabo al aire libre; tales intercambios incluyen el dióxido de carbono empleado en la fotosíntesis y liberado en la respiración, el oxígeno que se utiliza en la respiración y se libera en la fotosíntesis, así como el vapor de agua y materiales orgánicos volátiles y de otro tipo que se mueven hacia y desde la hoja. El intercambio de materiales está influido por las condiciones atmosféricas (humedad, viento, temperatura, etc.), por la entrada y salida de la radiación solar y también por la abertura y cierre de los estomas [25, 47].

Por lo general, la presión de vapor del agua es mayor dentro que fuera de la hoja de la planta; es por ello, que el vapor de agua difundirá hacia afuera. El vapor difunde más rápidamente cuando la diferencia en las presiones de vapor de ambos medios es mayor y con mayor lentitud cuando aumenta la resistencia a la difusión; tal vez, se deba al cierre parcial de los estomas (poros por donde ocurre la transpiración y captación de CO₂ en la planta). Si se utiliza bióxido de carbono en el interior de la hoja para la fotosíntesis, la presión parcial en ella será, al poco tiempo, menor que la que tiene en el exterior. En estas condiciones, el bióxido de carbono se difundirá hacia el interior de la hoja si puede hacerlo; es decir, si los estomas están abiertos, o si la cutícula es permeable a esta sustancia. Las moléculas orgánicas volátiles, tales como el isopreno y muchos aceites esenciales, se evaporan de la superficie de las hojas, debido a que las presiones parciales en éstas, son más elevadas que en la

atmósfera que las rodea. De esta forma, estos compuestos se difundirán hacia el exterior dando las fragancias características de muchas plantas aromáticas [25, 47].

- **ESTOMAS**

Es fácil suponer que los estomas se abren y cierran en respuesta a cambios del medio ambiente. En las plantas, que no siguen la fotosíntesis del Metabolismo Ácido de Crasuláceas (CAM), estas respuestas manejan los estomas, de tal forma, que el dióxido de carbono se difunda hacia su interior cuando se esté llevando a cabo la fotosíntesis, pero que el agua se conserve, cuando no pueda realizar fotosíntesis. Los estomas, entonces, se abren cuando hay luz y se cierran en la oscuridad. Se puede observar entonces que existe una competencia entre la fotosíntesis y la transpiración relacionada directamente con el cierre o apertura de los estomas. Dentro de los principales factores que influyen esta competencia se pueden mencionar: la concentración intercelular de CO_2 en la hoja, la temperatura y la intensidad de luz, que llega a la planta [24, 45]. Por otro lado, las moléculas de vapor de agua se difunden alrededor de 1.6 veces más rápido (debido a que su peso molecular es menor) que las moléculas de CO_2 y, que la atmósfera normalmente contiene de 10 a 100 veces más vapor de agua que CO_2 (25°C , $\text{H}_2\text{O} = 3.2$ a 32 mmol mol^{-1} ; $\text{CO}_2 = 0.351$ mmol mol^{-1}), por lo que las moléculas de agua que se difunden hacia afuera de los estomas influyen en la entrada de las moléculas de CO_2 [47].

Para cuantificar la capacidad fotosintética de una planta y su poder de transpiración, existen varios métodos, entre los cuales se encuentran, los lisimétricos o gravimétricos, en donde el cálculo se realiza por diferencia de peso, del agua eliminada por la planta, bajo condiciones controladas. Otro método utilizado es el de intercambio de gases, en donde se calcula el vapor de agua eliminado por la planta, en una atmósfera cerrada que rodea la hoja, con la ayuda de un equipo, empleado para este fin. Por medio de esta técnica se pueden calcular parámetros como la tasa

de transpiración, conductancia estomática, tasa de fotosíntesis y concentración de CO₂ en la hoja [47].

Otro parámetro importante, que permite cuantificar la capacidad de fijación de CO₂ en la planta, es el que está relacionado con la acumulación de biomasa en el tiempo, que puede ser evaluada en función de su área foliar e índices de crecimiento, entre los cuales se encuentran los siguientes: *Índice de Área Foliar*, *Tasa Asimilatoria Neta* (TAN), *Tasa de Crecimiento Relativo* (TCR) y *Tasa de Crecimiento Absoluto* (TCA) [18].

1.2.3. ANÁLISIS DE CRECIMIENTO VEGETAL

El fin último de la ecofisiología vegetal es comprender el comportamiento de las plantas en condiciones naturales. Por ejemplo, si deseamos medir la bioproduktividad de un cultivo, el componente de interés inmediato es la producción primaria neta o el rendimiento total. Por lo general, es necesario restringir el interés a las partes aéreas. En los cultivos, puede ser sólo de importancia el rendimiento agronómico (como el grano en los cereales). Por lo común, ésto se expresa como *Índice de Cosecha*, que es la relación porcentual que existe entre los rendimientos agronómico y biológico, en donde generalmente el rendimiento biológico en muchos cultivos se ha considerado como el total de la materia seca de la porción área. En cifras, estos índices suministran muy poca información acerca de los cambios que ocurren durante el crecimiento del cultivo. De manera similar, el análisis de intercambio de gas fotosintético se puede utilizar para describir las respuestas de la fijación de carbono en las plantas, a cambios en el ambiente y, finalmente, se puede usar para calcular el rendimiento total, pero no se obtiene información acerca de la asignación de materia seca en una nueva área foliar, que puede tener influencia considerable en la producción [47].

Blackman en 1919 [47], definió la producción de un vegetal en términos de una *Ley de Interés Compuesto*: “Si la tasa de asimilación por área foliar unitaria y la tasa de respiración permanecen constantes, y el tamaño del sistema foliar tiene una relación con el peso seco de la planta entera, la tasa de producción de material nuevo, medido en peso seco, seguirá la *Ley de Interés Compuesto*”. Tradicionalmente, ésta ha sido la base para el desarrollo de las técnicas del análisis del crecimiento vegetal. Estas técnicas pueden contestar algunas de las cuestiones planteadas acerca de la asignación de la biomasa seca en la planta y servir como una herramienta experimental intermedia entre aquellas del intercambio de gases y de producción primaria neta [47].

La aproximación al análisis de los factores que afectan el crecimiento y desarrollo de la planta en términos de la acumulación neta integrada en el tiempo (análisis de crecimiento), sólo requiere de la medición del área foliar y de la masa seca a intervalos de tiempo frecuentes; otras cantidades se obtienen por medio de cálculos a partir de los valores de estas variables [21].

Estos datos primarios de análisis de crecimiento pueden ser colectados de plantas individuales, o derivados de doseles enteros, aunque la naturaleza destructiva de las técnicas requiere del uso de grupos homogéneos de plantas o parcelas. Dentro de los principales componentes de análisis de crecimiento se encuentran los siguientes:

- **TASA DE CRECIMIENTO RELATIVO**

Este componente básico de análisis se define en cualquier instante del tiempo (t) como el incremento del material presente, y es el único componente del análisis del crecimiento que no requiere del conocimiento del tamaño del sistema asimilatorio (**Ecuación 1**).

$$TCR = \frac{\ln W_2 - \ln W_1}{t_2 - t_1}$$

Ecuación 1

W_2 = masa seca final (g)
 W_1 = masa seca inicial (g)
 t_2 = tiempo final (días)
 t_1 = tiempo inicial (días)

- **TASA DE ASIMILACIÓN NETA**

Se mencionó que la parte productiva de la planta es la superficie foliar, de modo que el crecimiento se expresa en función de dicha superficie, ya que ésta sería una medida directa de la eficiencia productiva de la planta [37]. La tasa de asimilación neta (TAN) de una planta o de un cultivo en cualquier instante de tiempo (t) se define como el incremento de material vegetal por unidad de material asimilado por unidad de tiempo [47]:

$$TAN = \frac{(W_2 - W_1)(\ln AF_2 - \ln AF_1)}{(AF_2 - AF_1)(t_2 - t_1)}$$

Ecuación 2

AF_2 = área foliar final (cm²)
 AF_1 = área foliar inicial (cm²)

- **COEFICIENTE DE ÁREA FOLIAR**

Es el resultado de dividir el área foliar (AF) por el peso total de la planta. Expresa en cada momento la proporción del área foliar cuya fotosíntesis mantiene a todo el individuo [37].

- **ÁREA FOLIAR ESPECÍFICA**

Es el cociente del área foliar/peso foliar (AF/PF). Es un índice del costo energético o material para la formación de una unidad de superficie foliar. Es típica su disminución en el curso del crecimiento de las plantas [37]

$$AFE = \frac{AF}{W_{hoja}}$$

Ecuación 3

1.3. *Lippia alba*

La planta *Lippia alba* Mill N.E. Brown ex Britton & Wills. (familia *Verbenaceae*), un subarbusto muy aromático, es ampliamente distribuida y crece espontáneamente en la América Central y del Sur [17]. La planta es conocida también como *Lippia geniculata* HBK o *Lantana alba* Mill y, en Colombia, por sus nombres populares, “Pronto alivio” (Antioquia), “Curatodo” y “Orégano de cerro” (Magdalena).

Esta especie se ha empleado como estomacal y antiespasmódica en infusión teiforme; también se ha usado como sedante, desinfectante, diaforética y emenagoga [13]. La planta se caracteriza por su intenso y penetrante olor y contiene de 0.1 a 1.2% del aceite volátil. La composición química del aceite esencial de *L. alba* depende sensiblemente del origen geográfico de la planta, las condiciones de su cultivo, la edad y la parte de la planta empleada para la extracción, y de algunos otros factores geobotánicas, lo que evidencian los trabajos sobre la composición química de *L. alba*, realizados en Guatemala [49], India [2, 3], Uruguay [34], Cuba [44], Brasil [61] y Colombia [52].

Es un arbusto ramificado, con una altura no superior a 1.5 m. Se establece en sitios con alta luminosidad, soporta épocas sin lluvia de hasta 6 semanas y crece mejor en altitudes entre 0 y 1100 m.s.n.m. [4]. Se puede reproducir por semillas, estacas o acodos. Los suelos pueden ser arcillosos, no inundados, con pH entre 5 y 6. Se siembra dejando una distancia de 0.4 a 0.6 m entre plantas y 0.9 m entre surcos dobles con 0.5 m de calle. La primera cosecha se realiza entre 5 y 6 meses después de la siembra [4]. En regiones secas puede ser necesario esperar hasta los 8 meses. En plantaciones del Caribe, se reportan rendimientos de 1 ton de material seco (hojas y flores) por ha. El rendimiento logrado en la extracción del aceite en el Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander ha sido del 0.6 al 0.8% p/p (planta fresca, hojas y tallos) [52].

Zoghbi y colaboradores [61] identificaron 3 quimiotipos de *L. alba* en 3 municipios de Brasil (Estado de Pará), en términos de los principales terpenos encontrados en los aceites esenciales. El primero (Municipio Santa María), se caracterizó por un alto contenido del 1,8-cineol (35%), el limoneno (18%) y la carvona (8.6%); el segundo quimiotipo (Municipio Belterra) se destacó por una alta proporción del limoneno (32%), la carvona (32%) y el mirceno (11%); y el tercero (Municipio Chaves), por el geranial (23%), el neral (14%) y el germacreno D (25%).

La revisión de la literatura sorprende con una inmensa variabilidad de los metabolitos secundarios volátiles aislados de plantas de *L. alba*, cultivadas en diferentes regiones del mundo. Así, el limoneno (44%) y la piperitona (31%) fueron componentes mayoritarios en *L. alba* originaria de Guatemala [49]; el linalol fue el principal compuesto en esencias destiladas en India (65%) [2, 3] y Uruguay (55%) [4]. El aceite esencial de *L. alba*, que crece en Santander (Colombia), fue rico en dos compuestos, a saber: el limoneno (24-37%) y la carvona (40-57%) [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 dentrificas, etc) [4].

1.4. LA CARVONA

La carvona $C_{10}H_{14}O$, es una cetona terpenoide, con dos isómeros ópticamente activos, a saber: la forma enantiomérica (-)R-carvona (**1a**), que se obtiene principalmente del AE de espermentina (*Menta spicata*) y, la forma enantiomérica (+)S-carvona (**1b**), componente principal del AE de alcaravea (*Carum carvi* L.) [19, 58].

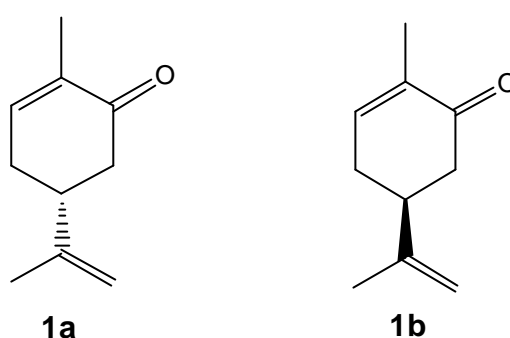


Figura 4. Estructuras de los isómeros ópticos de la carvona: **1a** (-)R-carvona; **1b** (+)S-carvona.

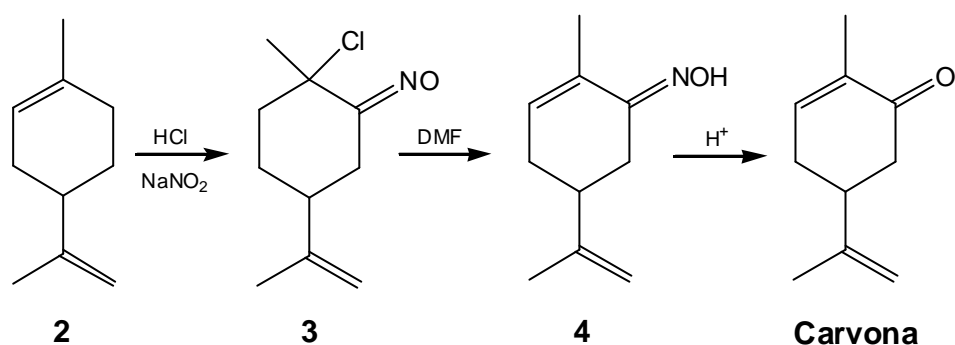
La alcaravea, es una planta nativa de la región oeste de Asia, se cultiva extensamente, en la región mediterránea de Europa, norte de África y Rusia. Su AE, contiene cerca de 51% de (+)S-carvona, que se obtiene de frutos maduros, momento en el cual se obtiene el mayor contenido de este componente. La Comunidad Europea es el principal exportador de la semilla de alcaravea, que es utilizada principalmente con fines culinarios y en la extracción del AE, para su posterior fraccionamiento y obtención de la carvona [35].

El AE de la espermentina, planta originaria de China, posee un 70% de (-)R-carvona. Uno de los primeros trabajos, que se encuentra sobre la carvona, es precisamente, el análisis del AE de esta planta, en el año 1974, por Nagasawa

y colaboradores [41], quienes encontraron que el contenido de la carvona en la esencia fue del 33%.

El AE de *Lippia alba*, que crece en nuestro país, es rico principalmente en la (-)R-carvona (ca. 50%), componente, que podría ser separado por métodos tales como la destilación fraccionada o la derivación química [7].

En la actualidad, uno de los métodos de obtención de carvona, en los diversos laboratorios del mundo, es la oxidación del limoneno **2** (**Esquema 1**), en donde la adición de ácido clorhídrico, en presencia de nitrito de sodio, genera el nitrosocloruro de limoneno **3**, el cual se protona en presencia de dimetilformamida (DMF), formando la carvoxima **4**, que por hidrólisis se convierte a carvona [19].



Esquema 1. Síntesis de la carvona vía oxidación del limoneno.

Una de las principales aplicaciones de la carvona, es su utilización en la síntesis orgánica fina, para la obtención de las decalinas quirales, tales como el (-) poligodial (un insecticida), el ambrox (fijador en perfumería) y el (-)-1,14-trimetil-2-decalol (inhibidor en la síntesis del colesterol) [60]. La (-)R- y la (+)S-carvona, es utilizada ampliamente, en la elaboración de jabones, champúes y en la fabricación de pastas dentífricas [4].

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA

La identificación botánica de *Lippia alba* se llevó a cabo en el Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia (Bogotá). El pliego testigo de la planta quedó depositado como muestra permanente en el Herbario Nacional Colombiano (COL, Bogotá), así: *Lippia alba* (Mill) N.E. Br. (N° COL 480749). La planta fue clasificada por el doctor J. L. Fernández, a quien los autores expresan su más sincero agradecimiento.

2.2. PROPAGACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Las plantas se cultivaron en el terreno de la Unidad de Crecimiento de Plantas y Ecofisiología Vegetal, de la Escuela de Biología, de la Universidad Industrial de Santander, durante el primer semestre de 2004. El área del cultivo fue de 150 m², distribuida en tres parcelas. Se tomaron segmentos nodales de 15 cm de longitud de una planta madura, cultivada en un jardín de la ciudad de Bucaramanga (carrera 26 con calle 14), los cuales se plantaron en una mezcla de materia orgánica, arena y arcilla (1:2:1). Las estacas enraizadas, provenientes del vivero (edad 40 días), se trasplantaron a campo a una distancia de 90 cm entre surcos y 40 cm entre plantas, en camas de 1.20 m por 10 m de largo (**Figura 5**). Cada parcela ocupó un área de 40 m² con un aproximado de 60 plantas. Los cuidados del cultivo consistieron en riegos, que garantizaron el establecimiento y el desarrollo de la plantación, y en la eliminación de malezas, cuando fue necesario.

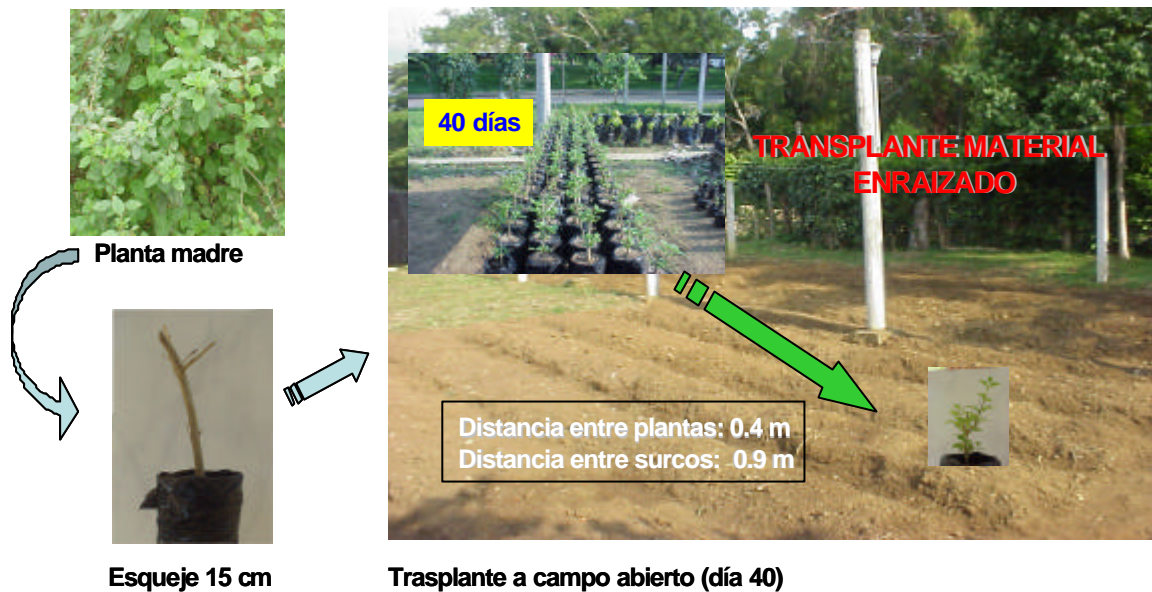


Figura 5. Esquema general del método de propagación de *Lippia alba*.

2.3. ESTUDIO DE LA INCIDENCIA DE LA RADIACIÓN Y ETAPA DE CRECIMIENTO SOBRE LA COMPOSICIÓN Y RENDIMIENTO DEL AE DE *Lippia alba*.

Con el fin de establecer las mejores condiciones a las cuales *L. alba* produciría el mayor contenido de compuestos de interés (*i.e.* carvona) con el mayor rendimiento del AE, se evaluaron los siguientes parámetros de cultivo:

- **Intensidad lumínica.** Se evaluó el efecto de tres intensidades de luz (IL), suministrada durante todo el crecimiento a las plantas; para tal efecto, se utilizaron mallas polisombra que permitieron el paso del 50 (T2) y 20% (T3) de radiación incidente, respectivamente, y un “testigo”, al cual no se le colocó malla, *i.e.* 100% (T1), tal como se muestra en la **Figura 6**.

- **Etapas de crecimiento.** Dado que la composición y rendimiento de AE de *L. alba*, dependen de su estado de desarrollo, se evaluaron cuatro etapas de crecimiento. El primer muestreo se realizó a partir del día 30, después de efectuado el transplante, para cada intensidad lumínica. Sucesivamente, los siguientes muestreos se realizaron a los 60, 90 y 120 días.

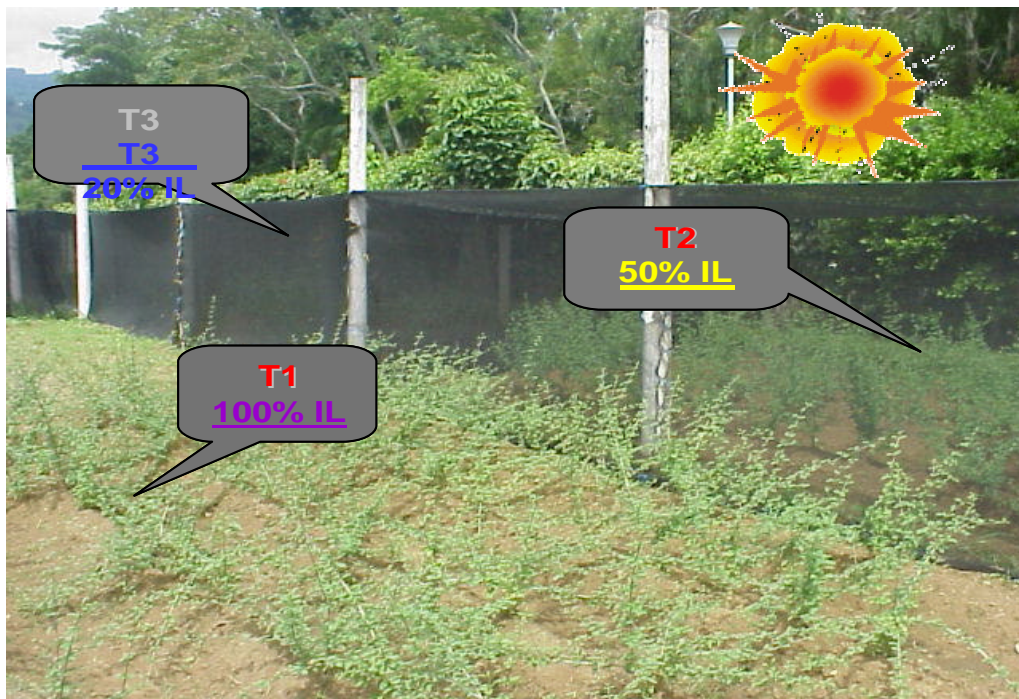


Figura 6. Cultivo de *Lippia alba* bajo tres niveles de intensidad lumínica (IL).

- **Edad de la hoja.** Se determinaron el rendimiento (%) del AE y la cantidad de la carvona en las hojas jóvenes (< 15 días) y maduras (8 meses). Para este experimento se tomaron hojas de la parte más alta de la planta, de color vivo y tallos tiernos, en el caso de las hojas jóvenes y, hojas de la parte inferior de la planta, de apariencia opaca y tallos leñosos, para el caso de las hojas más viejas. El material fue recolectado de la parcela con reducción del 50% en la intensidad lumínica (T2).

2.4. OBTENCIÓN DE ACEITES ESENCIALES

2.4.1. Recolección del material vegetal. La recolección del material vegetal se realizó manualmente en horas de la mañana, con la ayuda de tijeras de jardín a 15 cm del suelo a diez plantas al azar, para cada intensidad lumínica. El material cosechado se transportó en cajas de cartón hasta el Laboratorio, donde se realizaron las extracciones.

2.4.2. Extracción. Los aceites esenciales 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), descrito en [52]. El material vegetal se sometió a extracción en 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 800 vatios y frecuencia de radiación de 2.5 GHz (Véase **Figura 7**). Se adicionó un volumen de agua de 200 mL. Al final del proceso de extracción, se agregó sulfato de sodio al aceite extraído, para secar el agua residual. Cada extracción duró 40 min, y para cada muestra del material vegetal se repitió tres veces. En total se llevaron a cabo 42 extracciones.

2.5. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA SU ANÁLISIS POR GC-MS

Una alícuota del aceite esencial puro (50 μ L), junto con el patrón interno (*n*-tetradecano, 0.5 μ L) se disolvieron en diclorometano hasta el volumen final de 1 mL. Luego, 1 μ L de la solución se inyectó al equipo de GC-MS, para su análisis cromatográfico. El número de muestras analizadas fue de 42.

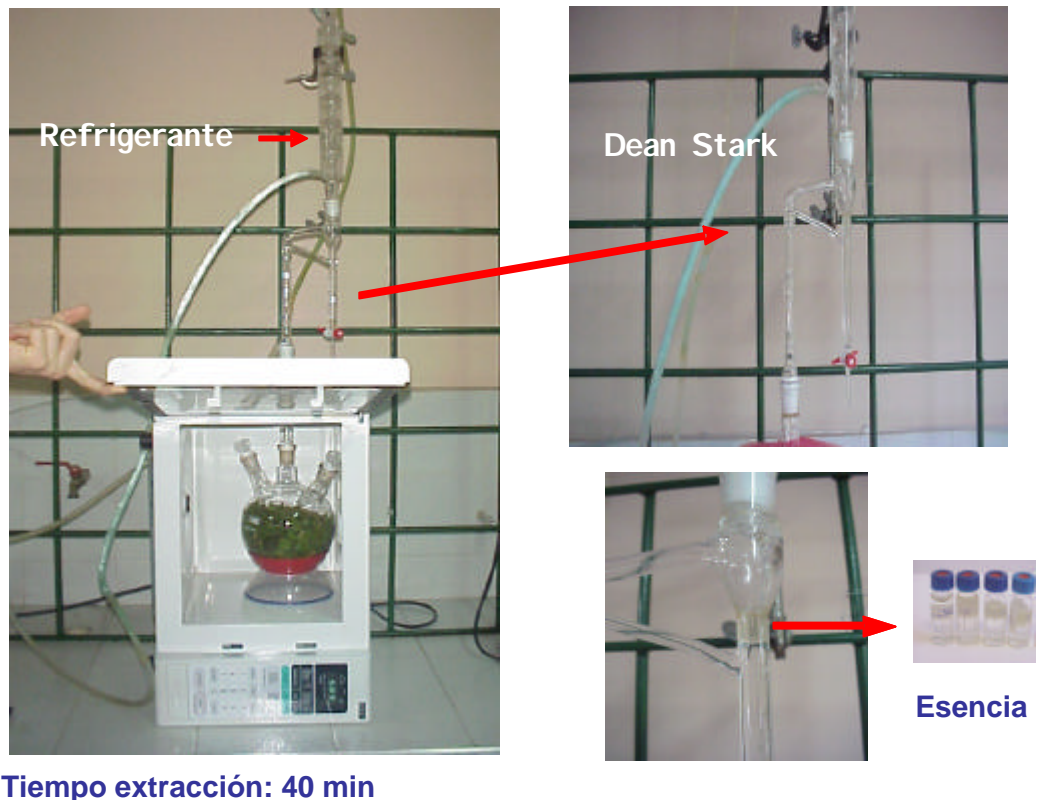


Figura 7. Esquema del equipo de hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD).

2.6. ANÁLISIS CUALITATIVO DEL AE DE HOJAS Y TALLOS DE *Lippia alba*

El análisis cualitativo de los AEs extraídos, se llevó a cabo por cromatografía de gases – espectrometría de masas (GC-MS) en un equipo *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 y NIST 2002 (**Figura 8**).

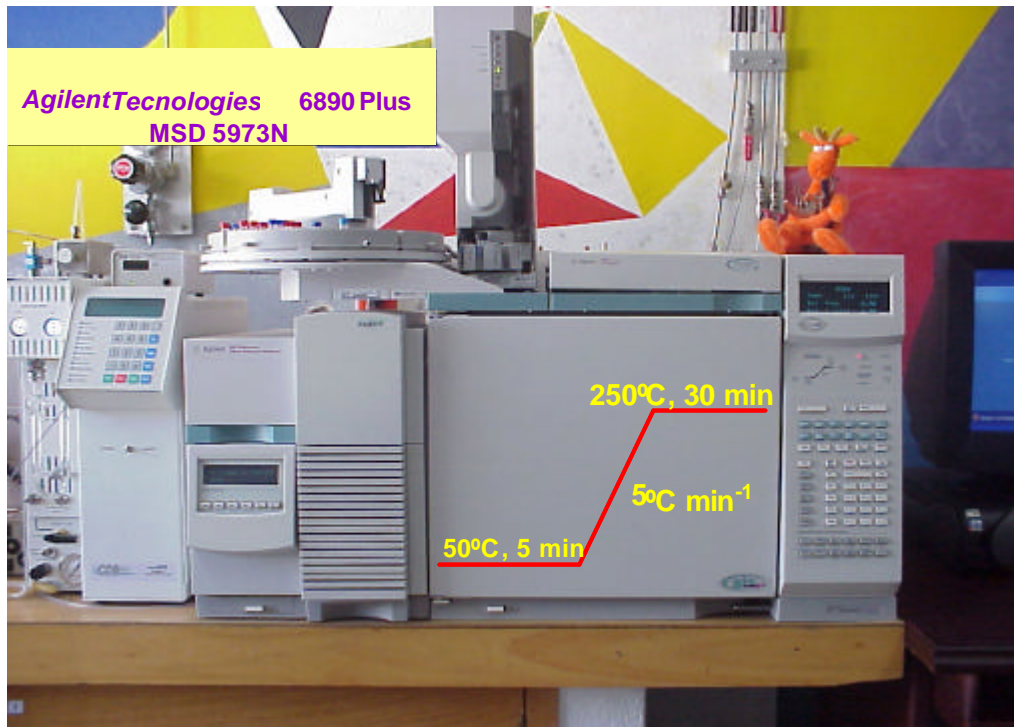


Figura 8. Cromatógrafo de gases de alta resolución *Agilent Technologies 6890 Plus*, con detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5973*. Columna DB-1: (60 m X 0.25 mm X 0.25 μm) con fase estacionaria de 100% poli(dimetilsiloxano).

Se usó una columna capilar de sílice fundida, DB-1 (*J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.*) de 60 m x 0.25 mm, D.I., con la fase estacionaria de 100% poli(dimetilsiloxano) de 0.25 μm de espesor. El gas de arrastre fue helio (99.9995%, *Aga Fano, S.A.*), con una velocidad lineal de 35 cm s^{-1} . La temperatura del horno fue programada de 45 $^{\circ}\text{C}$ (5 min) hasta 250 $^{\circ}\text{C}$ (30 min) @5 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia se mantuvieron a 230 y 285 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Relación *split* 1:50. Espectros de masas y corrientes iónicas reconstruidas (TIC) se obtuvieron en un cuadrupolo, por medio de barrido automático de frecuencia (*full scan*), a 4.75 *scan*

s⁻¹, en el rango de masas m/z 40-350. La homogeneidad de cada pico cromatográfico fue revisada, obteniendo fragmentogramas de masas, basados en iones característicos de cada compuesto (e.g. para monoterpenos m/z 93 y 136; para sesquiterpenos m/z 161 y 204, etc.). Para la identificación de los compuestos se usaron los espectros de masas e índices de retención de Kovàts, los cuales se calcularon con base en la **Ecuación 4** [30], y se compararon con los reportados en la literatura [1, 24].

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

Ecuación 4

Donde $n < N$

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

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

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

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

2.7. ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL AE DE HOJAS Y TALLOS DE *Lippia alba*

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 ($t_R = 26.59$ min). 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 5**, 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 5

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.

2.8. MEDICIÓN DE PARÁMETROS FISIOLÓGICOS

Con el fin de establecer la respuesta fisiológica de *L. alba* a los cambios producidos en el ambiente y a su desarrollo, se evaluaron algunos aspectos fisiológicos básicos. Ésto se realizó simultáneamente con las extracciones de los AEs, evaluando las mismas variables de intensidad lumínica y etapa de desarrollo, mencionadas en el **Numeral 2.3**.

2.8.1. Recolección del material vegetal. La recolección del material vegetal se realizó manualmente en horas de la mañana, con la ayuda de una pala, abriendo zanjas a 10 cm alrededor de la planta y a 20 cm de profundidad del suelo, a tres plantas al azar, para cada intensidad lumínica. Cada planta fue arrancada desde la raíz y colocada inmediatamente en un recipiente con agua para evitar su

deshidratación. El material cosechado se transportó al Laboratorio, donde se realizaron las mediciones de algunos parámetros fisiológicos.

2.8.2. Determinación del área foliar (AF). Para la medición del área foliar de cada planta, se tomaron 2 hojas del tercio alto, medio y bajo, a las cuales se les extrajo con la ayuda de un sacabocados un disco foliar. Seguidamente, cada disco foliar fue pesado y empacado en bolsa de papel para su posterior secado. El área interna del sacabocados fue de 1.0660 cm². Suponiendo que toda la superficie de cada hoja de la planta, puede ser tomada en pequeñas porciones circulares, el área foliar total de cada planta se calculó con base en la **Ecuación 6**, donde $W_{\text{hoja seca}}$ es el peso total de las hojas para cada planta; A_{Disco} es el área interna del sacabocados y, $W_{\text{Discos secos}}$ es el promedio de los seis discos foliares tomados de cada planta. Las determinaciones de área foliar se efectuaron por triplicado para cada intensidad lumínica.

$$AF_x = \frac{W_{hs} \times A_{disco}}{W_{ds}}$$

Ecuación 6

W_{hs} = Peso total de las hojas secas de cada planta.

A_{disco} = Área interna del sacabocados.

W_{ds} = Promedio de seis discos foliares tomados de cada planta.

2.8.3. Determinación de masa seca. Para la estimación de la masa seca o biomasa, el material cosechado fue colocado por separado (hojas, ramas y raíces) en bolsas de papel, en una estufa, para este fin, a 80°C durante 72 horas. Después de este tiempo, se procedió a pesar por separado cada parte de la planta. Las determinaciones de biomasa se efectuaron por triplicado para cada intensidad lumínica.

2.8.4. Determinación de parámetros de crecimiento. Se calcularon los componentes básicos de análisis de crecimiento: tasa de crecimiento relativo (TCR), tasa de asimilación neta (TAN) y área foliar específica (AFE), descritos en el **Numeral 3.2.3.**

2.8.5. Determinación de la radiación incidente sobre el cultivo de *L. alba*. Para conocer el porcentaje de reducción en la irradiancia solar que ofrecía la polisombra a los tratamientos 2 y 3, se utilizó un equipo de medición de fluorescencia, MINI PAM 2000 (Walz, Alemania). Los datos de la radiación total fueron tomados a diario, con un piranómetro, ubicado en la estación meteorológica de la CDMB, situada a 200 m de la unidad experimental. Las lecturas fueron dadas en vatios por metro cuadrado (W/m^2). En esta misma unidad meteorológica fueron tomados los datos de temperatura y precipitación durante el periodo del experimento.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Rendimiento de los AEs de *Lippia alba*, obtenidos por MWHD.

Los metabolitos secundarios volátiles de ‘Pronto alivio’ se obtuvieron por esta técnica siguiendo los pasos descritos en la Parte Experimental (**Sección 2.4**).

Los valores de rendimiento de esencia determinados con base en el peso del material vegetal, para cada una de las extracciones realizadas, se reportan en la **Tabla 2**. La **Figura 9** muestra la variación en el rendimiento del AE de *Lippia alba* con el desarrollo de la planta y los tratamientos de luz evaluados.

Tabla 2. Rendimiento (% p/p) del AE de *Lippia alba*, en función de su etapa de crecimiento e intensidad lumínica (IL).

Edad, días	T1 100% IL	T2 50% IL	T3 20% IL
70	0.15±0.01	0.14±0.01	0.11±0.01
100	0.38±0.01 (Floración)	0.33±0.01	0.15±0.01
130	0.37±0.01	0.56±0.02 (Floración)	0.23±0.01
160	0.59±0.02*	0.49±0.03	0.31±0.01

*Segundo ciclo reproductivo.

Los altos rendimientos de AEs, alcanzados por las plantas de *Lippia alba* durante su primer ciclo reproductivo, se obtuvieron para los tratamientos T1 (100% IL) y T2 (50% IL) en estado de floración de la planta, a los 100 y 130 días,

respectivamente, sobresaliendo T2 por poseer para el mismo estado fenológico un 47% más de esencia, comparada con la obtenida de plantas, sometidas al tratamiento T1. Esta diferencia supone un manejo más eficiente del contenido de agua en las plantas con sombra, lo que, a su vez, se traduce en una menor apertura de los estomas y, por consiguiente, en una menor pérdida de compuestos volátiles por parte de la planta. Para el caso, cuando la reducción en la intensidad lumínica fue del 80% (T3), el rendimiento del AE siempre estuvo por debajo del logrado para las plantas cultivadas bajo condiciones T1 y T2, ya que éstas no florecieron. Ésto muestra una incidencia directa de la cantidad de luz recibida por parte de las plantas de *Lippia alba* sobre la producción de metabolitos secundarios y su desarrollo fenológico.

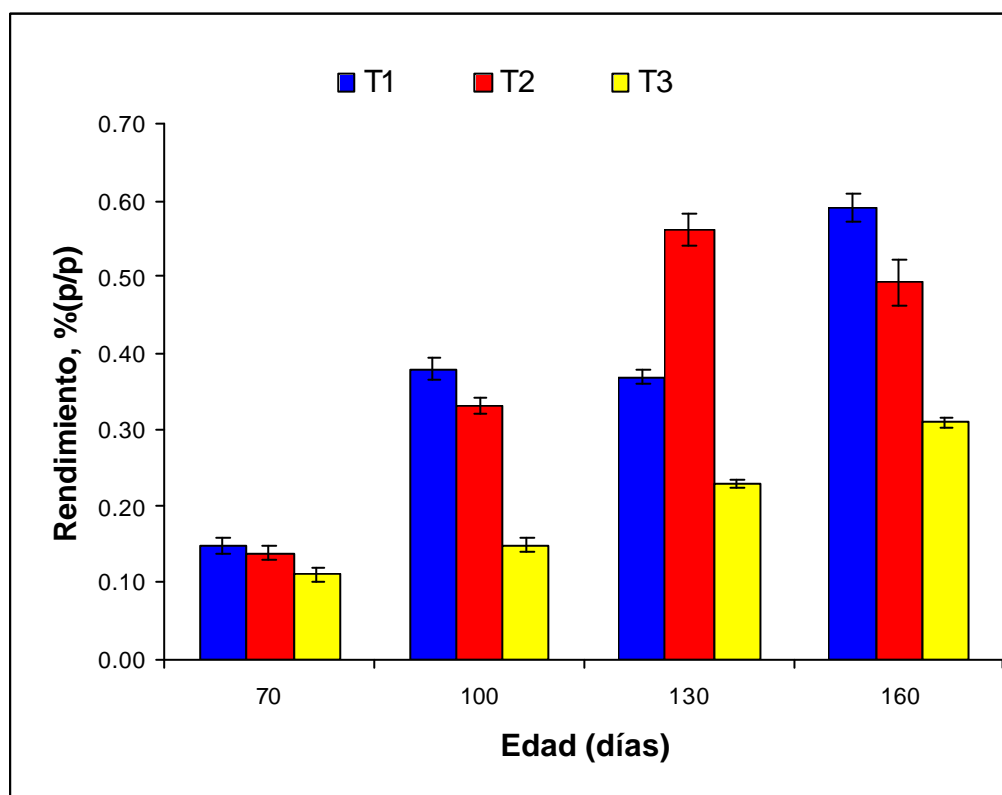


Figura 9. Variación del rendimiento del AE de *Lippia alba* en función de la etapa de crecimiento de la planta e intensidad lumínica (IL).

En la **Figura 9**, se puede observar, que las plantas de *Lippia alba* expuestas completamente a la luz, presentaron un comportamiento bimodal o cíclico, evidencia de ello fue que la producción de metabolitos secundarios y el rendimiento del AE dependieron del estado fenológico de la planta así: la primera etapa o inicio hacia floración (día 70); floración (día 100), postfloración (día 130) y, nuevamente inicio de floración (día 160). Durante el periodo de floración se obtuvo una mayor producción del AE y de compuestos de interés (*i.e.* carvona) en la esencia. Ésto es, a medida que las plantas comienzan un nuevo ciclo reproductivo, el rendimiento de la esencia aumenta, hasta floración. Entre ciclos reproductivos consecutivos, también se observó un incremento en el rendimiento de la esencia, para el caso de las plantas expuestas completamente a la radiación solar (T1, 100% IL).

3.2. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS AEs DE *Lippia alba* MEDIANTE GC-MS

Los aceites esenciales se obtuvieron de hojas y tallos, teniendo en cuenta variables, tales como la etapa de crecimiento, la intensidad lumínica recibida por las plantas y la edad de las hojas de *Lippia alba*. Las condiciones de extracción fueron descritas en la **Sección 2.4.2** de la Parte Experimental.

3.2.1. Determinación de la composición del AE de *L. alba*, obtenido por MWHD

En la **Figura 10** aparece el perfil cromatográfico típico, en la columna DB-1 (60 m), de los metabolitos secundarios volátiles, obtenidos por MWHD, de hojas y tallos de *Lippia alba*, para el tratamiento T1, en el día 100, durante la floración de la planta. Con base en los tiempos de retención, para cada pico cromatográfico, se determinaron los respectivos índices de Kovàts. Con base en éstos, los reportados

en la literatura [1] y en los espectros de masas, se identificaron los metabolitos secundarios volátiles presentes en las hojas y tallos de *Lippia alba*. Los componentes aparecen reportados en la **Tabla 3A** según su orden de elución de la columna apolar. La cuantificación de los componentes de los AEs, se realizó empleando la técnica de estandarización interna, así como se describe en la **Sección 2.7**. Las concentraciones calculadas con base en la relación de áreas entre el compuesto de interés y el estándar interno, se encuentran tabuladas en las **Tablas 3A-3C**, para cada intensidad lumínica. En la **Figura 11**, se ilustran las fórmulas estructurales de los metabolitos secundarios volátiles, identificados en el AE de *Lippia alba*.

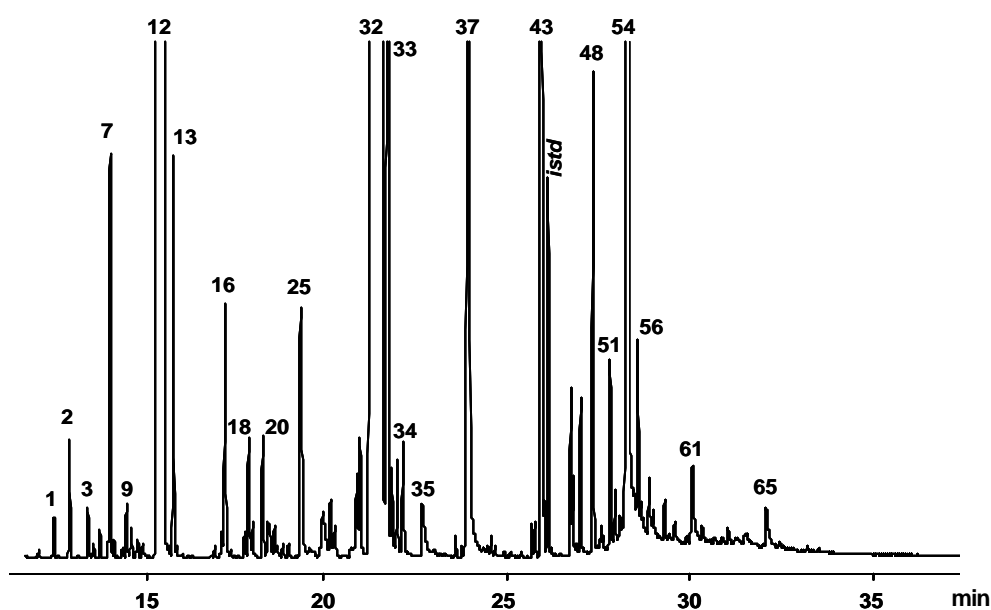


Figura 10. Cromatograma típico del AE de *Lippia alba* Mill., obtenido por MWHD. Columna DB-1 (60 m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los picos se reporta en la **Tabla 3A**.

En general, en los AEs analizados se identificaron 65 compuestos, agrupados en familias, así: monoterpenos (10), monoterpenos oxigenados (27), sesquiterpenos

(21) y sesquiterpenos oxigenados (5). En todos los AEs predominó la fracción terpénica oxigenada, con un promedio del 60%.

Tabla 3A. Composición química de los AEs de *Lippia alba*, aislados por MWHD, de las plantas del cultivo con intensidad lumínica del 100% (T1), en función del período de crecimiento (días).

N° Pico	Compuesto	I _K ^{a)}	Concentración, mg/kg de MV, ^{b)} días			
			DB-1	70	100	130
1	α -Pinoeno	-	0	151	140	98
2	Canfeno	-	31	440	396	253
3	1-Octen-3-ol	-	34	254	284	118
4	Sabineno	-	0	60	53	49
5	3-Octanol	-	0	0	0	0
6	β -Pinoeno	-	0	115	104	60
7	β -Mirceno	-	128	1798	1268	958
8	Acetato de 3-hexenilo	-	0	117	1511	0
9	<i>p</i> -Cimeno	-	22	265	289	152
10	Butanoato de amilo*	1002	0	157	171	87
11	Bencenacetaldéido	1012	0	102	0	0
12	Limoneno	1031	6840	95474	62636	33994
13	<i>trans</i> - β -Ocimeno	1040	149	1558	1406	667
14	<i>m</i> -Cimeno	1077	0	71	85	40
15	Terpinoleno	1083	0	124	112	58
16	Linalool	1086	161	1390	1453	624
17	<i>endo</i> -Fenchol	1104	0	137	149	66
18	<i>cis</i> -Óxido de limoneno	1107	58	668	898	429
19	<i>trans</i> -2-Pinanol	1111	22	201	165	88
20	<i>trans</i> -Óxido de limoneno	1120	66	634	709	335
21	α -Canfolenal*	1125	0	190	227	177
22	Alcanfor	1127	0	201	178	86
23	<i>cis</i> -2-Pinanol	1131	19	154	100	39
24	Hidrato de canfeno	1139	0	79	74	54
25	Borneol	1156	239	1995	2486	1047
26	<i>cis</i> -Dihidrocarvona	1176	89	634	1017	406
27	<i>trans</i> -Dihidrocarvona	1183	66	378	590	255
28	Dihidrocarveol	1187	0	229	285	133
29	<i>cis</i> -Carveol	1203	0	0	0	125
30	Metil chavicol	1209	82	618	685	335
31	<i>trans</i> -Carveol	1212	105	748	1015	416
32	Carvona	1233	13306	130415	112072	51100
33	Piperitona	1239	846	7696	8559	3541
34	Carvotanacetona*	1247	47	473	568	199
35	<i>trans</i> -Óxido de carvona	1253	67	609	905	354
36	Timol	1272	34	547	749	282
37	Piperitenona	1319	1953	15130	15517	5889
38	Eugenol	1333	0	0	151	57
39	δ -Elemeno	1341	0	100	96	49

Tabla 3A, Continuación

40	<i>trans</i> -Acetato de carvilo	1337	0	67	77	0
41	α -Copaeno	1384	0	150	192	85
42	β -Elemeno	1387	0	175	173	69
43	β -Bourboneno	1393	432	5236	5758	2389
44	1,5-di- <i>epi</i> - β -Bourboneno	1397	23	211	261	114
45	β -Cedreno	1425	46	727	820	323
46	<i>trans</i> - β -Cariofileno	1428	29	348	408	165
47	β -Gurjuneno	1436	54	716	840	329
48	β -Farneseno	1450	263	2489	2439	941
49	<i>cis</i> -Muurolo-4(14),5-dieno	1459	0	133	149	48
50	α -Humuleno	1461	0	57	68	0
51	<i>allo</i> -Aromadendreno	1468	70	940	1126	469
52	γ -Muurolo	1474	20	304	369	131
53	Germacreno D	1480	0	242	389	125
54	Biciclosesquifelandreno	1488	2243	24888	24244	11054
55	<i>trans</i> - β -Guaieno	1496	0	331	496	180
56	Biciclogermacreno	1500	92	1227	1385	529
57	γ -Cadineno	1505	0	296	313	65
58	Cubebol	1516	54	472	683	354
59	δ -Cadineno	1522	0	223	312	122
60	α -Bisaboleno	1537	22	197	207	82
61	Germacren-4-ol	1575	131	797	1036	451
62	Muurolol	1589	0	143	234	99
63	Tujopsanona*	1634	0	0	43	26
64	Hidroxi-9- <i>epi</i> -cariofileno*	1651	0	150	126	109
65	Kusinol*	1679	106	533	984	476

a) Índices de Kovàts determinados experimentalmente;

b) Promedio de tres extracciones independientes;

* Compuestos identificados tentativamente;

Tabla 3B. Composición química de los AEs de *Lippia alba*, aislados por MWHD, de las plantas del cultivo con intensidad lumínica del 50% (T2), en función del período de crecimiento (días).

N° Pico	Compuesto	I _k ^{a)}	Concentración, mg/kg de MV, ^{b)}			
			días			
		DB-1	70	100	130	160
1	α -Pino	-	0	129	211	55
2	Canfeno	-	20	389	560	154
3	1-Octen-3-ol	-	32	406	499	181
4	Sabineno	-	0	54	81	42
5	3-Octanol	-	0	0	193	0
6	β -Pino	-	0	104	141	55
7	β -Mirceno	-	123	1696	2558	729
8	Acetato de 3-hexenilo	-	0	146	118	0
9	<i>p</i> -Cimeno	-	19	263	419	119
10	Butanoato de amilo*	1002	0	143	222	60
11	Bencenacetaldéido	1012	0	97	118	0
12	Limoneno	1031	6244	88703	86866	27873
13	<i>trans</i> - β -Ocimeno	1040	140	1498	2191	621
14	<i>m</i> -Cimeno	1077	0	63	111	0
15	Terpinoleno	1083	0	122	147	47
16	Linalool	1086	139	1369	1806	540
17	<i>endo</i> -Fenchol	1104	0	132	175	52
18	<i>cis</i> -Óxido de limoneno	1107	36	534	958	264
19	<i>trans</i> -2-Pinanol	1111	17	184	235	67
20	<i>trans</i> -Óxido de limoneno	1120	49	524	822	218
21	α -Canfolenal*	1125	0	132	231	74
22	Alcanfor	1127	0	169	209	59
23	<i>cis</i> -2-Pinanol	1131	16	112	118	28
24	Hidrato de canfeno	1139	0	56	86	0
25	Borneol	1156	186	1938	2861	821
26	<i>cis</i> -Dihidrocarvona	1176	60	487	1047	281
27	<i>trans</i> -Dihidrocarvona	1183	45	411	757	144
28	Dihidrocarveol	1187	0	195	329	95
29	<i>cis</i> -Carveol	1203	0	0	0	237
30	Metil chavicol	1209	68	492	843	228
31	<i>trans</i> -Carveol	1212	84	775	1214	323
32	Carvona	1233	11399	128513	145114	42613
33	Piperitona	1239	744	7396	11095	3021
34	Carvotanacetona*	1247	47	439	682	159
35	<i>trans</i> -Óxido de carvona	1253	60	597	1071	266
36	Timol	1272	57	552	901	237
37	Piperitenona	1319	1702	14293	19471	5039
38	Eugenol	1333	0	0	204	0
39	δ -Elemeno	1341	0	111	156	0
40	<i>trans</i> -Acetato de carvilo	1337	0	57	97	0
41	α -Copaeno	1384	0	182	315	76
42	β -Elemeno	1387	0	222	242	63
43	β -Bourboneno	1393	389	3999	7525	1984
44	1,5-di- <i>epi</i> - β -Bourboneno	1397	17	1860	342	78

Tabla 3B, Continuación

45	β -Cedreno	1425	36	814	1047	251
46	<i>trans</i> - β -Cariofileno	1428	28	393	628	148
47	β -Gurjuneno	1436	42	789	1099	260
48	β -Farneseno	1450	220	2574	3113	806
49	<i>cis</i> -Muurolo-4(14),5-dieno	1459	0	164	195	24
50	α -Humuleno	1461	0	65	107	0
51	<i>allo</i> -Aromadendreno	1468	73	1101	1738	420
52	γ -Muurolo	1474	19	324	487	105
53	Germacreno D	1480	0	425	693	124
54	Biciclosesquifelandreno	1488	2444	29130	38261	10429
55	<i>trans</i> - β -Guaieno	1496	0	395	763	161
56	Biciclogermacreno	1500	123	1351	2231	511
57	γ -Cadineno	1505	0	286	470	38
58	Cubebol	1516	55	546	938	298
59	δ -Cadineno	1522	0	294	460	121
60	α -Bisaboleno	1537	18	231	301	82
61	Germacren-4-ol	1575	116	853	1259	404
62	Muurolol	1589	0	152	227	84
63	Tujopsanona*	1634	0	0	51	18
64	Hidroxi-9- <i>epi</i> -cariofileno*	1651	0	164	220	81
65	Kusinol*	1679	87	585	1042	330

a) Índices de Kovàts determinados experimentalmente;

b) Promedio de tres extracciones independientes;

* Compuestos identificados tentativamente;

Tabla 3C. Composición química de los AEs de *Lippia alba*, aislados por MWHD, de las plantas del cultivo con intensidad lumínica del 20% (T3), en función del período de crecimiento (días).

N° Pico	Compuesto	I _k ^{a)}	Concentración, mg/kg de MV, ^{b)}			
			días			
		DB-1	70	100	130	160
1	α -Pino	-	0	28	88	34
2	Canfeno	-	0	75	238	99
3	1-Octen-3-ol	-	26	340	600	258
4	Sabineno	-	0	0	48	26
5	3-Octanol	-	0	51	125	0
6	β -Pino	-	0	25	57	240
7	β -Mirceno	-	37	505	1173	396
8	Acetato de 3-hexenilo	-	0	52	81	0
9	<i>p</i> -Cimeno	-	0	84	198	99
10	Butanoato de amilo*	1002	0	50	98	42
11	Bencenacetaldéido	1012	0	0	0	0
12	Limoneno	1031	2589	31894	46205	21085
13	<i>trans</i> - β -Ocimeno	1040	50	552	1158	533
14	<i>m</i> -Cimeno	1077	0	28	65	0
15	Terpinoleno	1083	0	41	71	36
16	Linalool	1086	67	525	883	399
17	<i>endo</i> -Fenchol	1104	0	49	84	34
18	<i>cis</i> -Óxido de limoneno	1107	14	155	287	125
19	<i>trans</i> -2-Pinanol	1111	0	69	109	44
20	<i>trans</i> -Óxido de limoneno	1120	25	193	358	151
21	α -Canfolenal*	1125	0	30	62	29
22	Alcanfor	1127	0	60	93	38
23	<i>cis</i> -2-Pinanol	1131	0	42	69	27
24	Hidrato de canfeno	1139	0	26	55	0
25	Borneol	1156	106	772	1369	560
26	<i>cis</i> -Dihidrocarvona	1176	30	202	595	176
27	<i>trans</i> -Dihidrocarvona	1183	29	211	571	133
28	Dihidrocarveol	1187	0	74	128	53
29	<i>cis</i> -Carveol	1203	0	0	0	0
30	Metil chavicol	1209	46	169	458	172
31	<i>trans</i> -Carveol	1212	50	350	798	206
32	Carvona	1233	7505	58441	74690	31403
33	Piperitona	1239	487	3283	5602	2316
34	Carvotanacetona*	1247	26	194	315	126
35	<i>trans</i> -Óxido de carvona	1253	38	272	454	178
36	Timol	1272	45	294	456	190
37	Piperitenona	1319	1234	6632	10087	4137
38	Eugenol	1333	0	47	0	0
39	δ -Elemeno	1341	0	57	66	33
40	<i>trans</i> -Acetato de carvilo	1337	0	26	68	23
41	α -Copaeno	1384	10	84	173	61
42	β -Elemeno	1387	0	99	127	66
43	β -Bourboneno	1393	311	1150	3277	773
44	1,5-di- <i>epi</i> - β -Bourboneno	1397	0	1308	874	871

Tabla 3C, Continuación

45	β -Cedreno	1425	32	362	439	228
46	<i>trans</i> - β -Cariofileno	1428	27	202	365	135
47	β -Gurjuneno	1436	38	347	526	218
48	β -Farneseno	1450	172	1061	1630	528
49	<i>cis</i> -Muurolo-4(14),5-dieno	1459	0	81	113	27
50	α -Humuleno	1461	0	33	89	0
51	<i>allo</i> -Aromadendreno	1468	71	544	1041	360
52	γ -Muurolo	1474	14	151	300	93
53	Germacreno D	1480	0	221	432	146
54	Biciclosesquifelandreno	1488	2259	15540	24421	8967
55	<i>trans</i> - β -Guaieno	1496	0	227	428	158
56	Biciclogermacreno	1500	103	729	1479	505
57	γ -Cadineno	1505	33	125	265	87
58	Cubebol	1516	67	310	615	256
59	δ -Cadineno	1522	0	148	325	111
60	α -Bisaboleno	1537	16	92	180	53
61	Germacren-4-ol	1575	125	505	844	372
62	Muurolol	1589	18	82	152	60
63	Tujopsanona*	1634	0	18	29	13
64	Hidroxi-9- <i>epi</i> -cariofileno*	1651	0	70	16	50
65	Kusinol*	1679	101	318	482	217

a) Índices de Kovàts determinados experimentalmente;

b) Promedio de tres extracciones independientes;

* Compuestos identificados tentativamente;

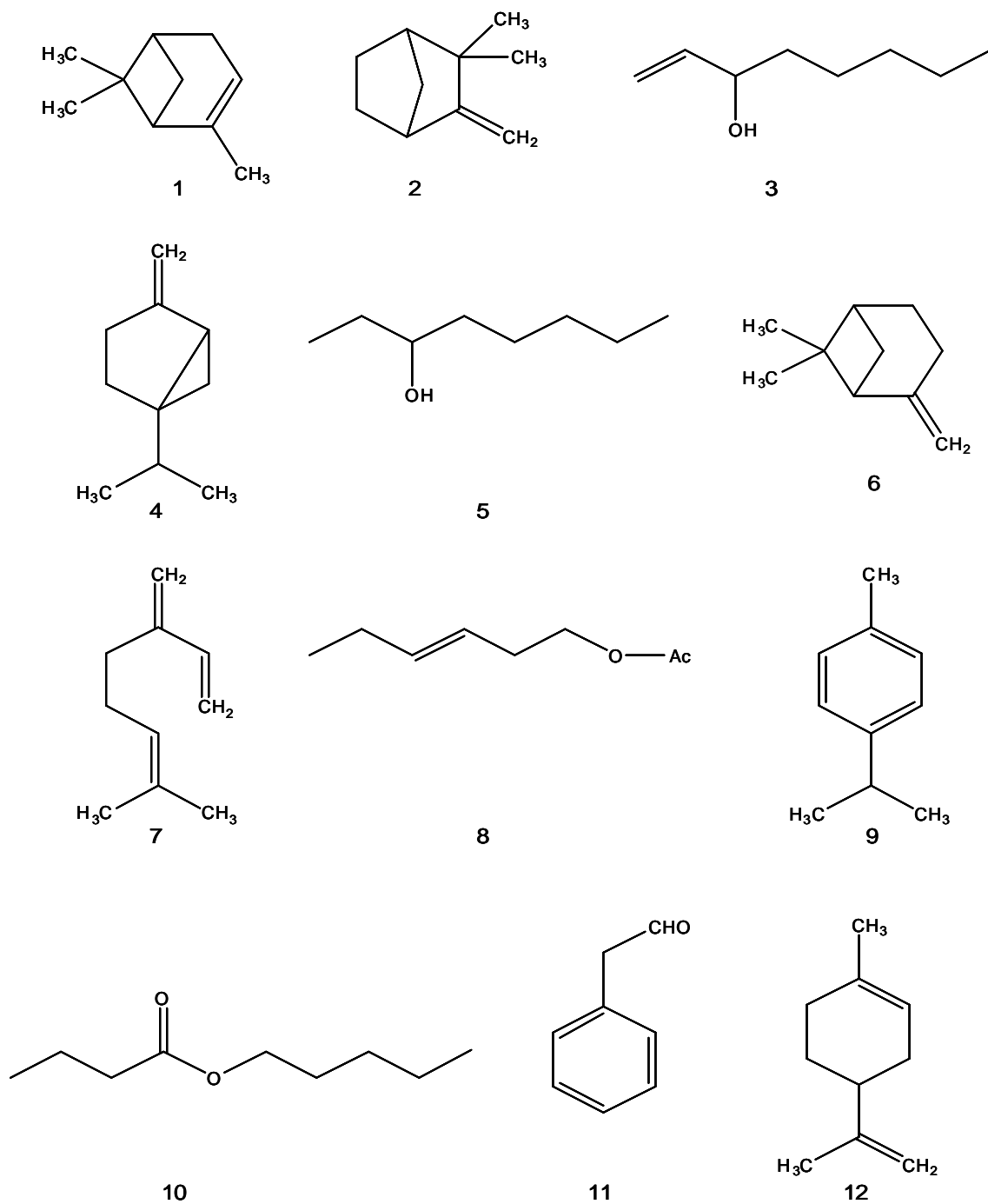
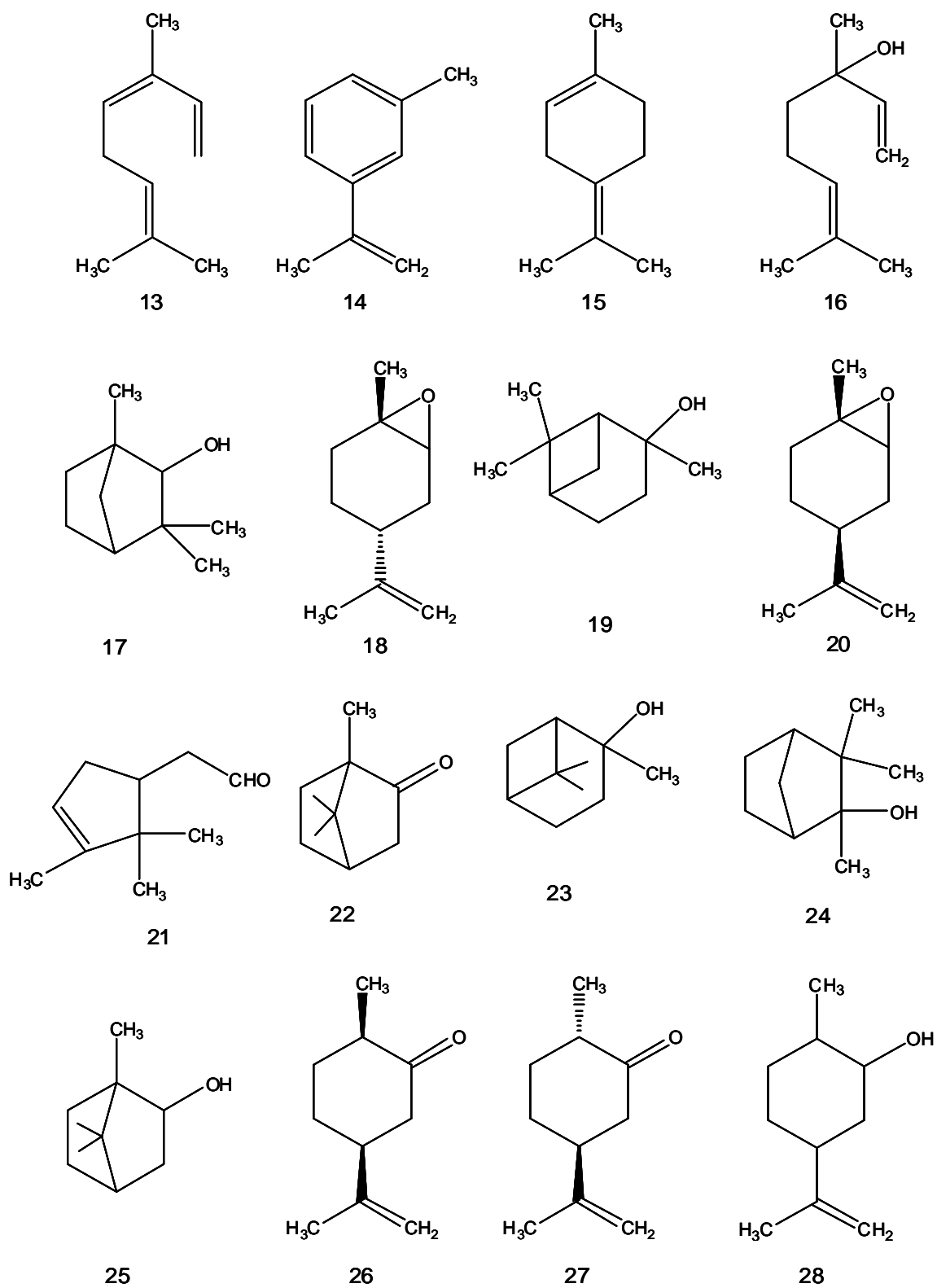
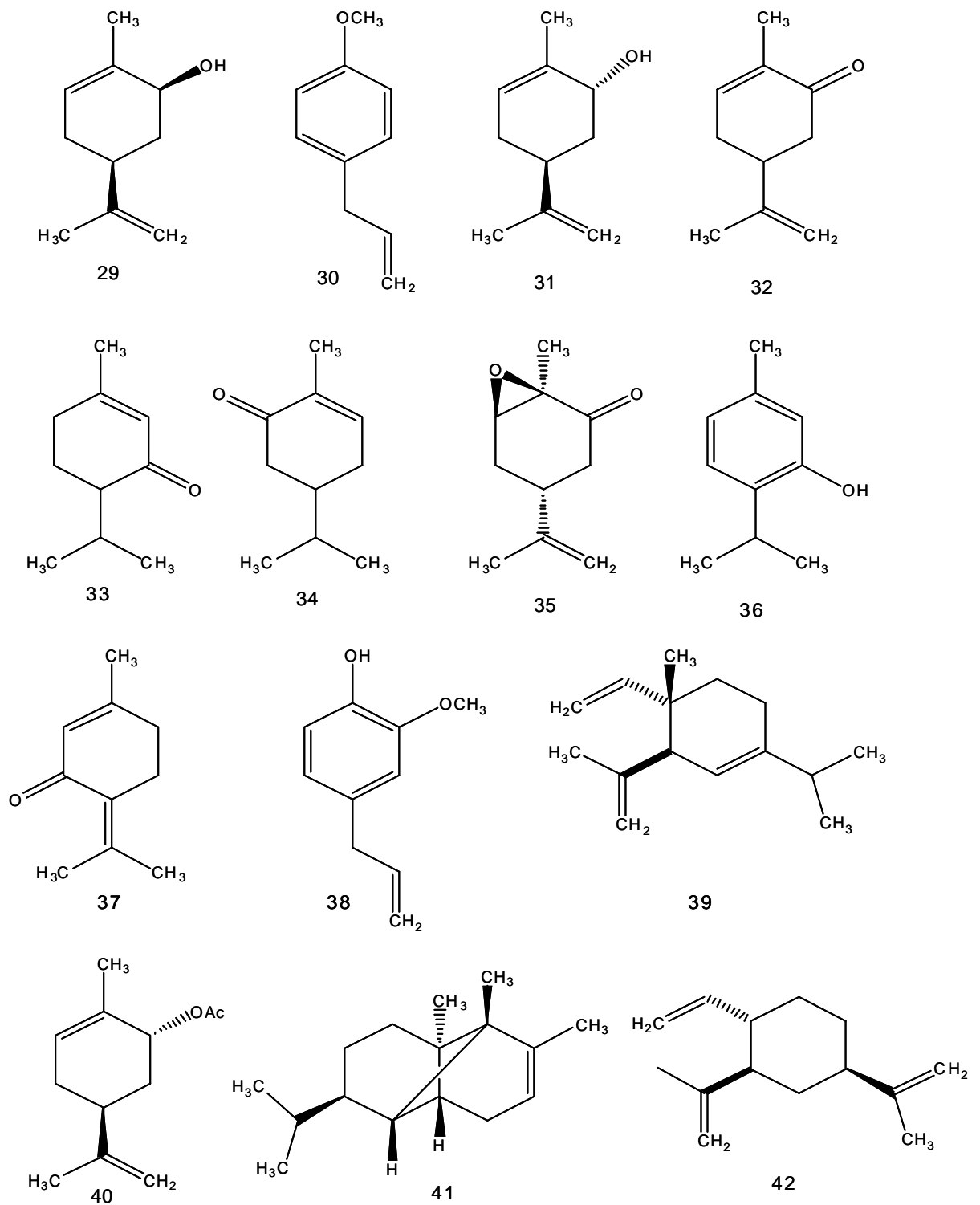


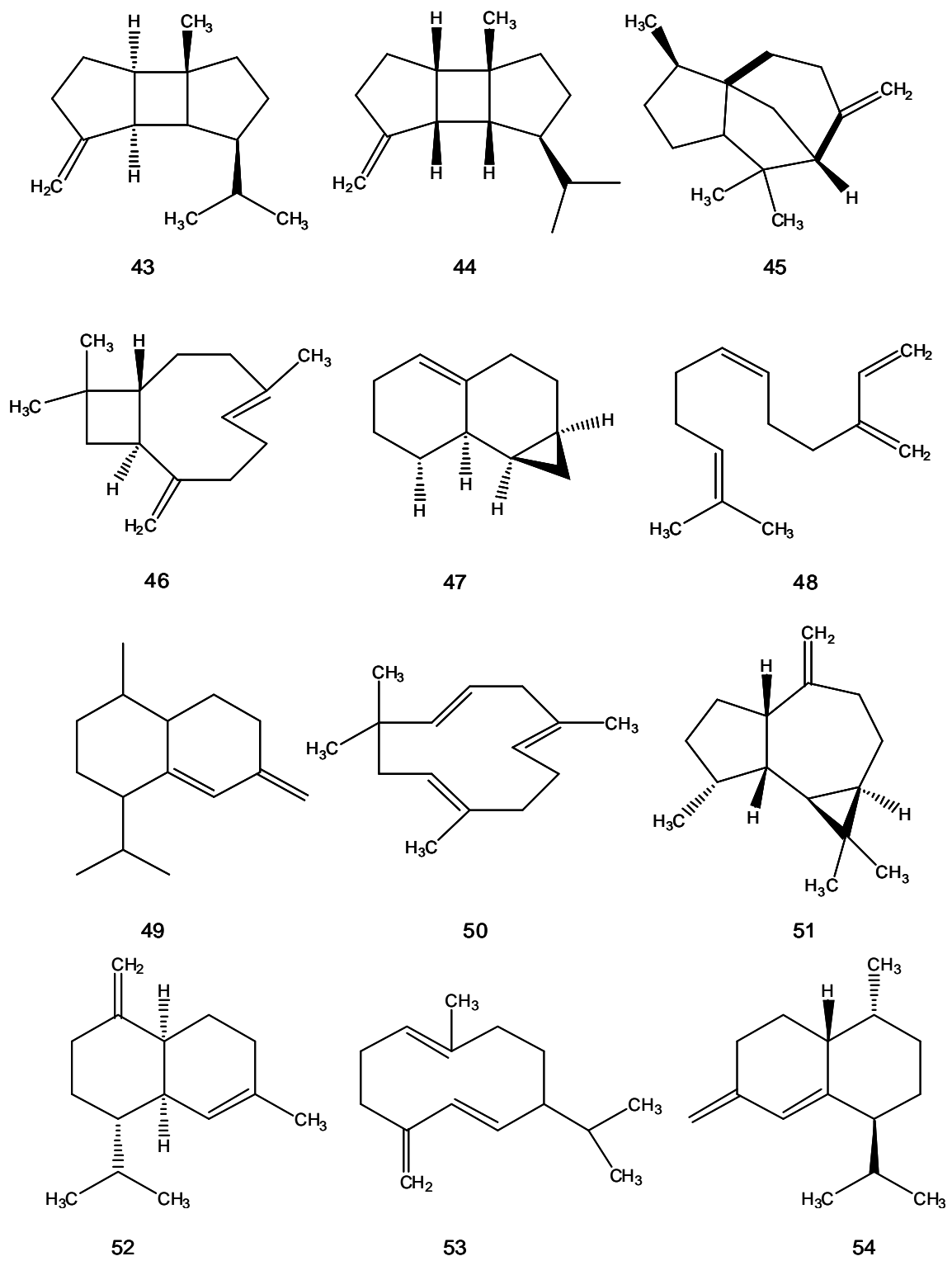
Figura 11. Fórmulas estructurales de los componentes identificados en el AE de *Lippia alba*, según su orden de aparición en los cromatogramas (**Figuras 9 y 12**). Los nombres aparecen en la **Tabla 3A**.



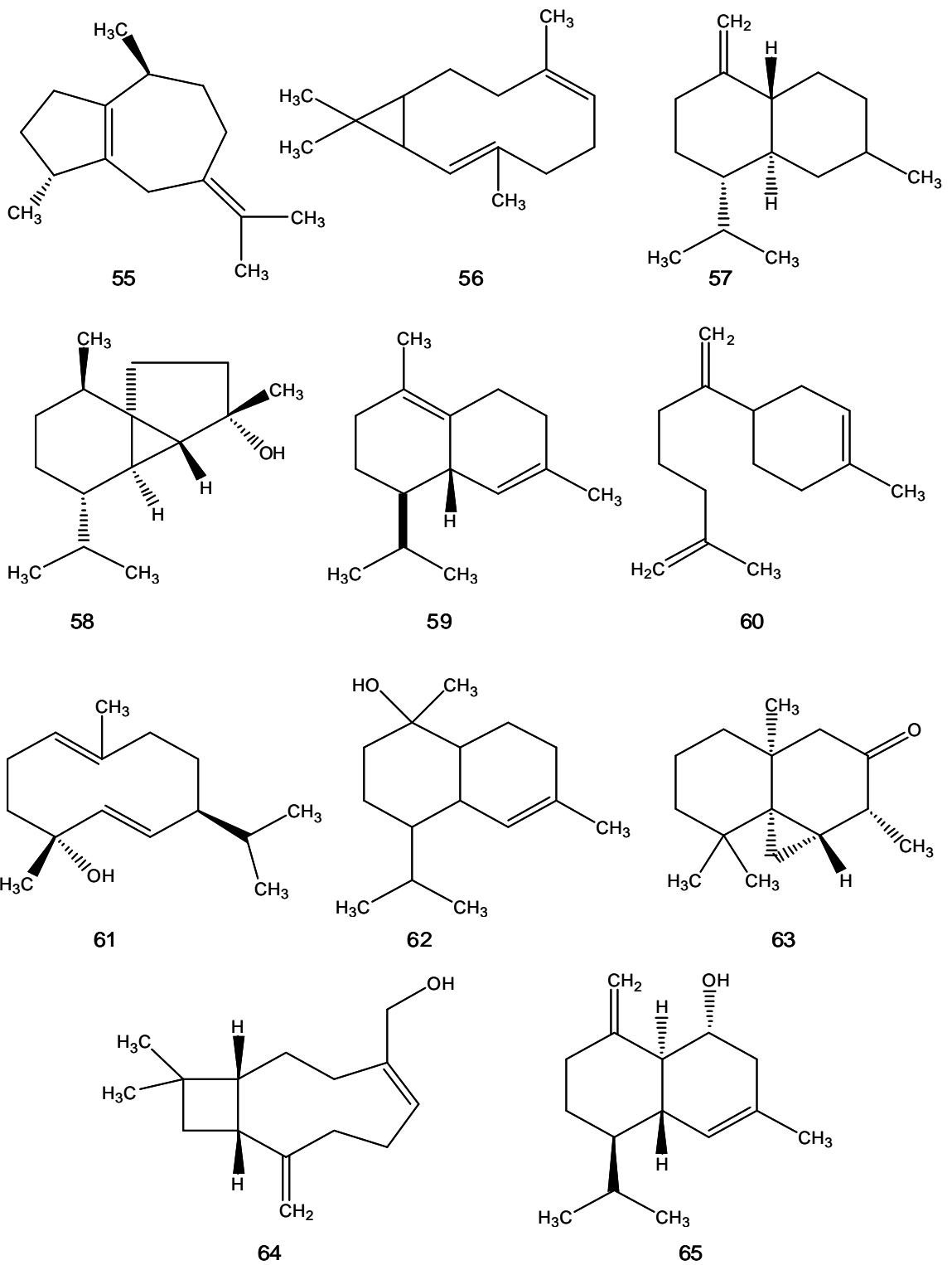
Continuación **Figura 11.**



Continuación **Figura 11.**



Continuación **Figura 11.**



Continuación **Figura 11.**

La distribución de los monoterpenos oxigenados (alcoholes, aldehídos, cetonas y óxidos) para los diferentes tratamientos de luz y época de cosecha, se presenta en la **Figura 12**, donde se observa que el mayor contenido de este tipo de compuestos se alcanzó para las plantas con una reducción de luz del 50%, en el día 130, correspondiente a la etapa de floración de *Lippia alba*.

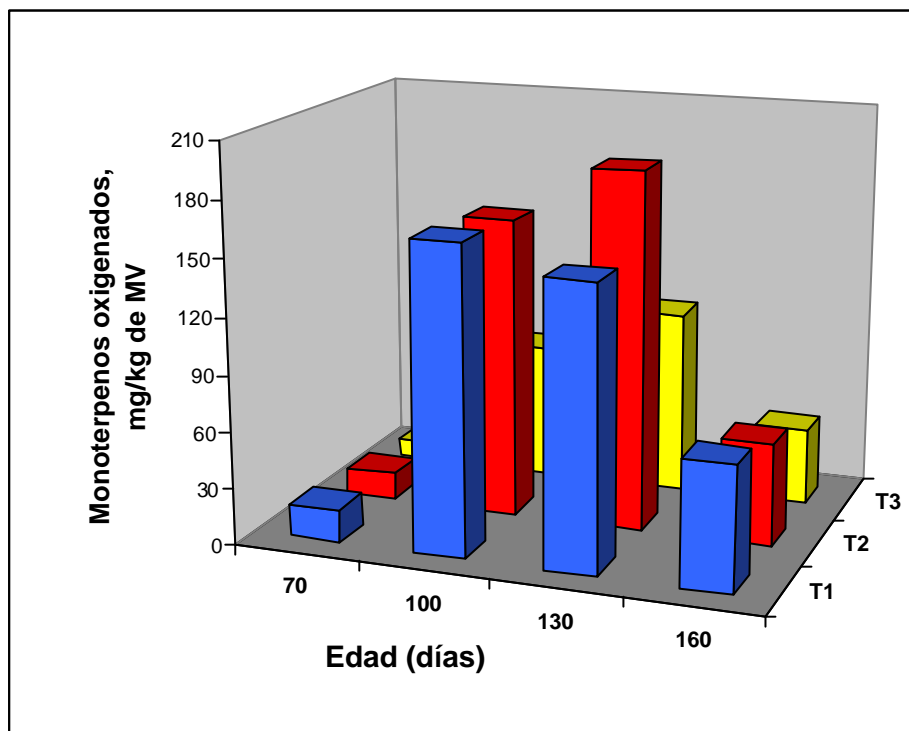


Figura 12. Distribución de los monoterpenos oxigenados en el AE de *L. alba*, en función del periodo de crecimiento y de la intensidad lumínica. T1=100% IL; T2=50% IL; T3=20% IL.

Las esencias, aisladas de hojas y tallos de *L. alba*, presentaron metabolitos secundarios volátiles comunes, siendo la carvona el compuesto mayoritario (40-48%), seguido por el limoneno (16-31%), el biciclosquifelandreno (8-14%), la piperitenona (5-7%), la piperitona (2-3%) y el β -bourboneno (1-2%).

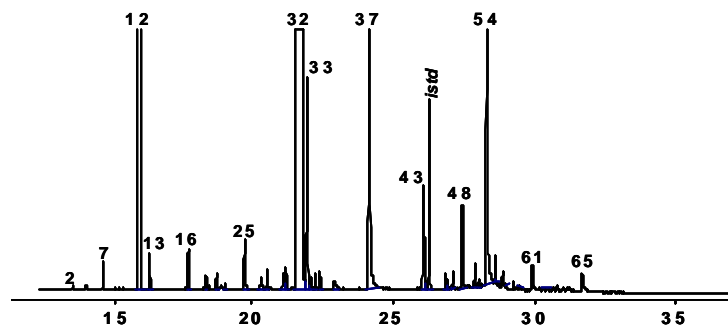
3.2.2. Incidencia de la época de cosecha del material vegetal e intensidad lumínica sobre la composición del AE de *Lippia alba*.

Debido a que las plantas aromáticas presentan variación en la composición química de sus AEs, dependiendo del estado fenológico de la planta y de variables ambientales como la cantidad de luz recibida, es necesario evaluar estos parámetros para establecer la calidad óptima requerida para el AE.

En la **Figura 13** se presentan los perfiles cromatográficos típicos, en columna DB-1 (60 m), de los aceites, obtenidos por MWHD de hojas y tallos de *Lippia alba*, cultivada en diferentes épocas de crecimiento.

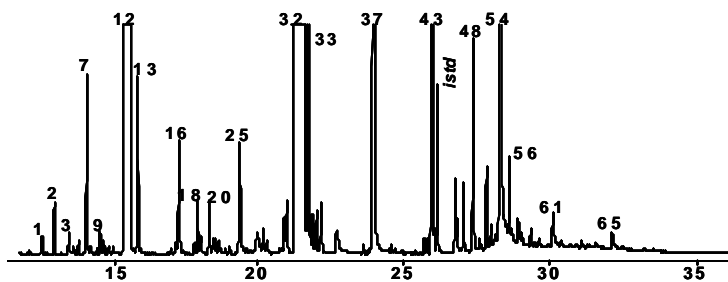
En general, la mayor diferencia cualitativa, se presentó entre los días 70 y 100, para los tres tratamientos de luz, cuando ocurrió un incremento en la fracción de hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpénicos en el aceite (pineno, sabineno, *m*-cimeno, terpinoleno, δ -elemeno, α -copaeno, β -elemeno, humuleno, entre otros). Después del día 100, la composición de los diferentes AEs no presentó cambios cualitativos, lo que refleja la similitud de sus perfiles cromatográficos (**Figura 13**).

La mayor variación entre los diferentes AEs fue de tipo cuantitativo, ya que el contenido de los principales componentes en los AEs (limoneno, carvona, piperitona, piperitenona, β -bourboneno y biciclosesquifelandreno) varió significativamente entre una época de cosecha a otra. Para las distintas épocas de recolección evaluadas, se encontró que el mayor contenido de los componentes de interés, *i.e.* carvona, se obtuvo a partir de las plantas en estado de floración, independientemente de la cantidad de radiación incidente a la cual fueron sometidas éstas (Véase **Tabla 3A-3C**).



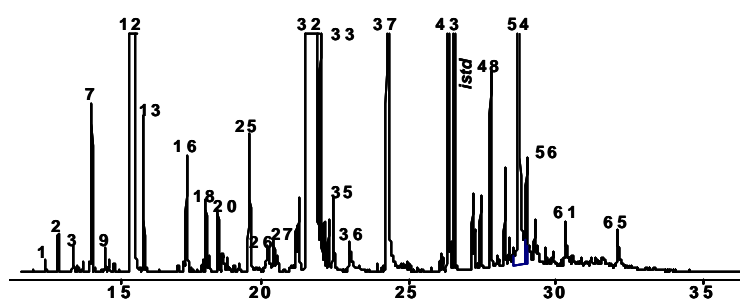
A

70 días



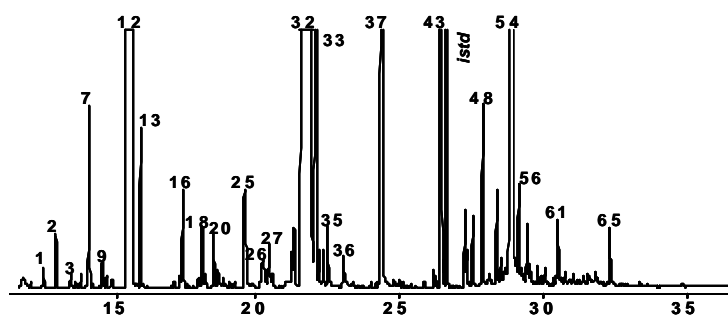
B

100 días



C

130 días



D

160 días

Figura 13. Perfiles cromatográficos típicos de los AEs de *L. alba*, obtenidos por MWHD, de plantas cultivadas a T1=100% IL : **A.** 70 días; **B.** 100 días; **C.** 130 días; **D.** 160 días. Columna DB-1 (60 m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los picos se reporta en la **Tabla 3A.**

Después de la floración, las plantas de *Lippia alba* mostraron una disminución en la producción de sus metabolitos secundarios, ya que la concentración de los componentes mayoritarios disminuyó, así como el rendimiento del AE obtenido del material vegetal (**Figura 9**).

La calidad comercial del AE de *Lippia alba* colombiano, podría evaluarse por el contenido de la carvona, ya que este compuesto se utiliza ampliamente en la elaboración de gomas de mascar, jabones, cremas dentales y en la síntesis orgánica fina, como precursor, en la búsqueda de nuevos fármacos [4]. Es por eso, que se evaluó su contenido en plantas, cultivadas en diferentes condiciones.

En la **Figura 14** se puede apreciar la variación del contenido de la carvona (g/kg de material vegetal) en los AEs de *Lippia alba*, en función de la época de recolección, para los tres tratamientos de luz incidente. Se observa el aumento en el contenido de la carvona con el crecimiento de la planta, llegando a su concentración máxima durante el florecimiento (floración). Ésto es a los 100 y 130 días para los tratamientos T1 (100% IL) y T2 (50% IL), respectivamente. En el caso del tratamiento T3 (20% IL), las plantas no alcanzaron la floración, por lo que el contenido de la carvona en todas las épocas de recolección, fue siempre inferior al de las plantas cultivadas bajo condiciones T1 y T2. Este hecho, indica que existe una incidencia directa de la radiación solar recibida por las plantas de *Lippia alba*, sobre la producción de metabolitos secundarios volátiles, ya que cuando se redujo significativamente la intensidad lumínica, como es el caso del cultivo T3, se observó una disminución en el rendimiento del AE y en el contenido de la carvona en la esencia. Por otro lado, estos resultados también muestran, que durante el periodo de floración, las plantas de *Lippia alba*, alcanzan un máximo en su metabolismo primario, lo que, a su vez, se ve reflejado en una mayor producción de metabolitos secundarios.

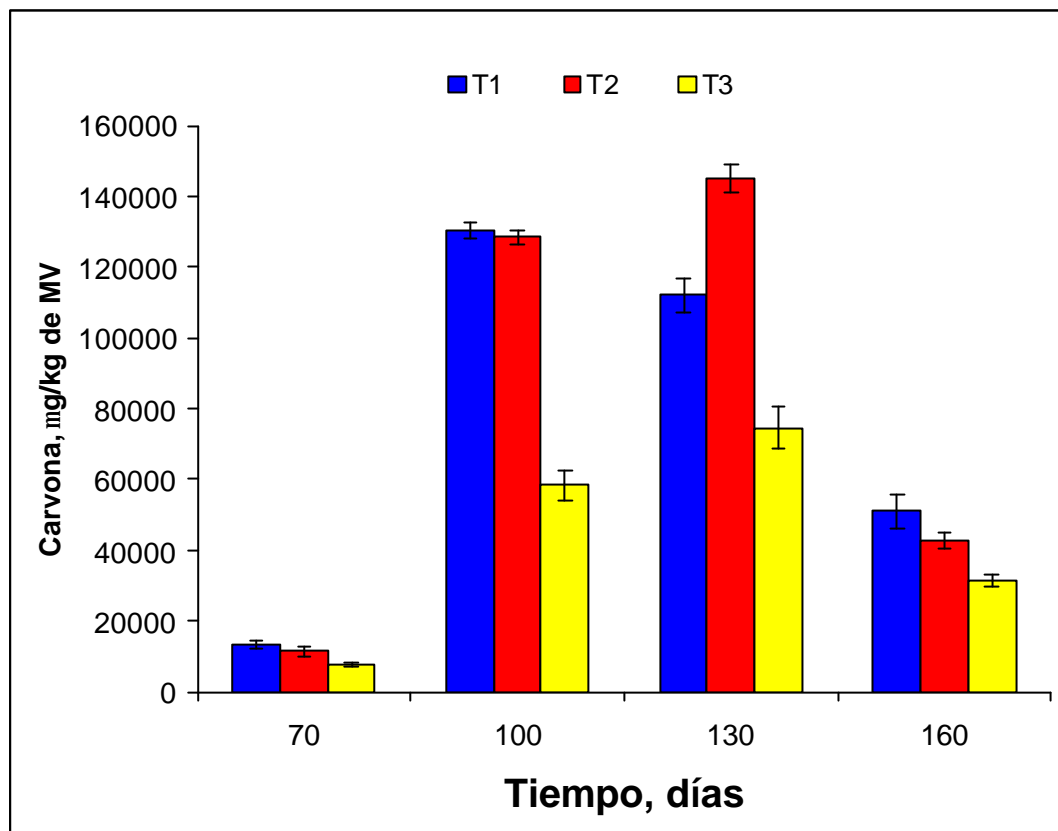


Figura 14. Concentración de la carvona (g/kg de material vegetal), en los AEs de *L. alba*, obtenidos de las plantas cultivadas bajo tres niveles de intensidad lumínica (IL), en función del periodo de su recolección.

Al comparar la calidad (contenido de carvona) de los AEs extraídos de las plantas cultivadas bajo condiciones T1 y T2, en estado de floración, se encontró que las plantas con una reducción del 50% en la radiación solar, produjeron aproximadamente un 10% más de carvona, que las plantas expuestas completamente a la luz. Este comportamiento indica, que las plantas, cultivadas bajo el tratamiento T2, poseen una menor transpiración, ya que, eliminan una menor cantidad de agua, por efecto de la sombra, que también se refleja en una menor volatilización de los metabolitos secundarios de las plantas, lo que aumenta el rendimiento del AE.

En la **Figura 15** se presenta la variación del contenido del limoneno (g/kg de material vegetal) en los AEs de *Lippia alba*, en función de la época de recolección de las plantas cultivadas, bajo tres niveles de intensidad lumínica. El comportamiento observado fue similar al de la carvona, ya que la concentración del limoneno también varió en los AEs de una época de recolección a otra, con la diferencia, que el mayor contenido del limoneno se alcanzó para el estado de floración en las plantas expuestas completamente a la luz (T1=100% IL).

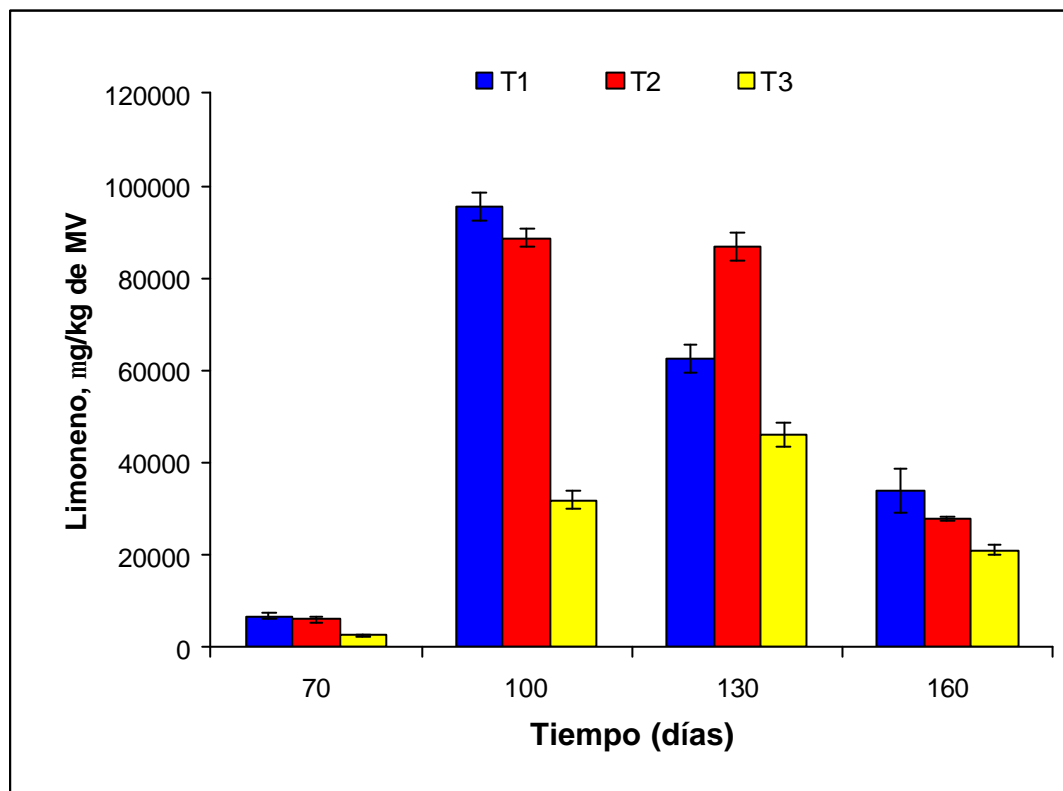


Figura 15. Concentración del limoneno ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de material vegetal), en los AEs de *L. alba*, obtenidos de las plantas cultivadas bajo tres niveles de intensidad lumínica (IL), en función del periodo de su recolección.

3.2.3. Comparación de la composición química de los AEs de *Lippia alba*, extraídos de hojas jóvenes y maduras

Con el propósito de conocer si existe alguna diferencia entre los AEs de *L. alba*, obtenidos de hojas jóvenes (edad menor de 15 días) y maduras (>8 meses), se siguió el procedimiento descrito en la **Sección 2.4** de la Parte Experimental, para las plantas cultivadas bajo el tratamiento T2.

En la **Figura 16** se pueden observar los perfiles cromatográficos de los AEs de *Lippia alba*, obtenidos de hojas jóvenes y maduras. La identificación de cada pico cromatográfico y su concentración ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de MV), aparecen reportadas en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Componentes principales en los AEs, aislados por MWHD, de hojas jóvenes (HJ) y maduras (HM) de *Lippia alba*, cultivada bajo condiciones T2.

N° Pico	Compuesto	I _k	Concentración, mg/kg de MV ^{a)}		
			DB-1	HJ (< 15 días)	HM (>8 meses)
1	Limoneno	1031		21754	26731
2	Linalool	1086		0	463
3	Borneol	1156		613	954
4	Carvona	1233		74169	88421
5	Piperitona	1239		3330	4719
6	Piperitenona	1319		10102	12857
7	β -Bourboneno	1393		4349	2965
8	1,5-di- <i>epi</i> - β -Bourboneno	1397		0	2034
9	β -Cedreno	1425		0	446
10	β -Gurjuneno	1436		0	488
11	β -Farneseno	1450		1938	1870
12	<i>allo</i> -Aromadendreno	1468		613	666
13	Biciclosesquifelandreno	1488		25948	21590
14	Biciclogermacreno	1500		955	802
15	Cubebol	1516		1277	1407
16	δ -Cadineno	1522		0	550
17	Germacren-4-ol	1575		2157	2185
18	Muurolol	1589		0	543
19	Kusinol*	1679		1455	2996

^{a)} Promedio de tres extracciones independientes;

En general, la composición química de los AEs obtenidos de hojas jóvenes y maduras, de *Lippia alba*, fue muy similar, cualitativamente se observó un aumento de la fracción sesquiterpénica (i.e. β -cedreno, β -gurjuneno, δ -cadineno), en los AEs de *L. alba*, extraídos de las hojas maduras. Los componentes mayoritarios en los diferentes AEs analizados fueron: la carvona (49-51%), el limoneno (15%), el biciclosesquifelandreno (13-17%), la piperitenona (7%) y la piperitona (2-3%).

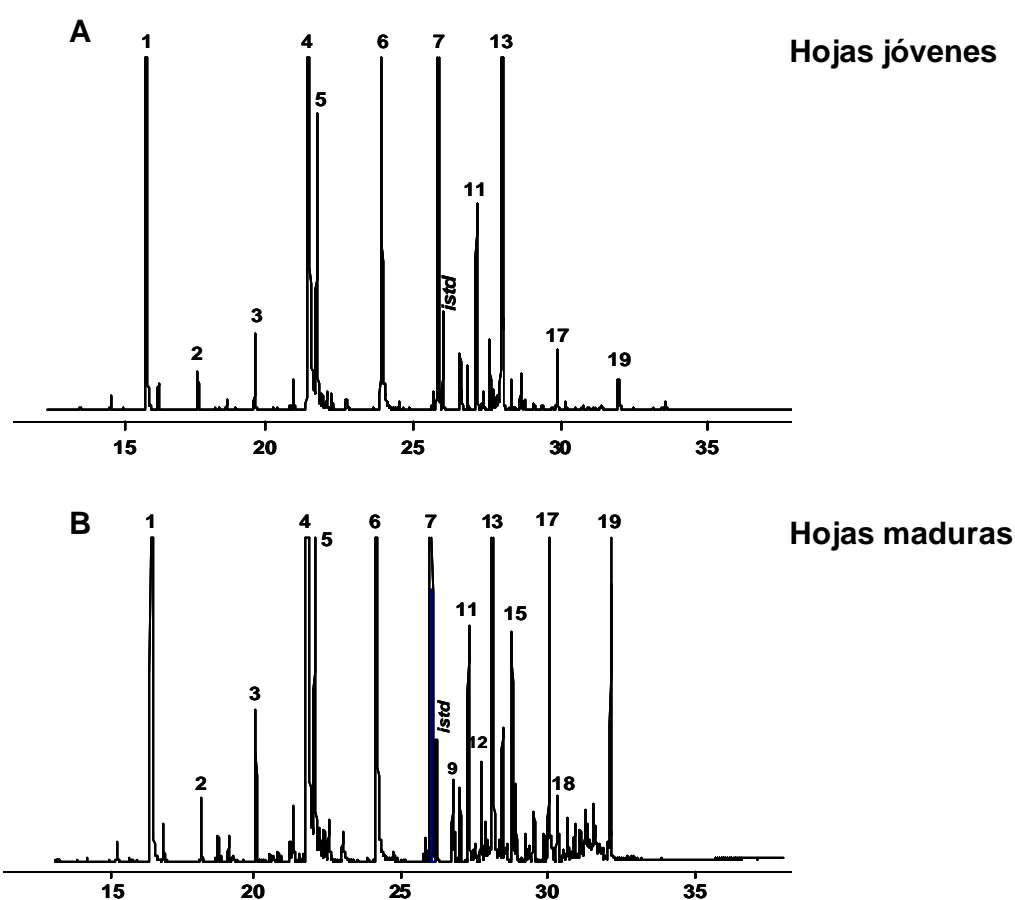


Figura 16. Perfiles cromatográficos típicos de los AEs de *Lippia alba*, obtenidos por MWHD, de las plantas del cultivo (T2): **A.** Hojas jóvenes; **B.** Hojas maduras. Columna DB-1 (60 m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los picos se reporta en la **Tabla 4**.

La mayor diferencia encontrada en las esencias de *L. alba*, obtenidas de hojas jóvenes y maduras, fue de tipo cuantitativo, debido a que las concentraciones de los compuestos principales en los AEs, tales como el limoneno, la carvona, la piperitenona y la piperitona, fueron mayores en las hojas maduras; mientras que el biciclosesquifelandreno y el β -bourboneno, principales sesquiterpenos en los AEs, presentaron una mayor concentración en las hojas jóvenes. En la **Figura 17** se puede observar este comportamiento.

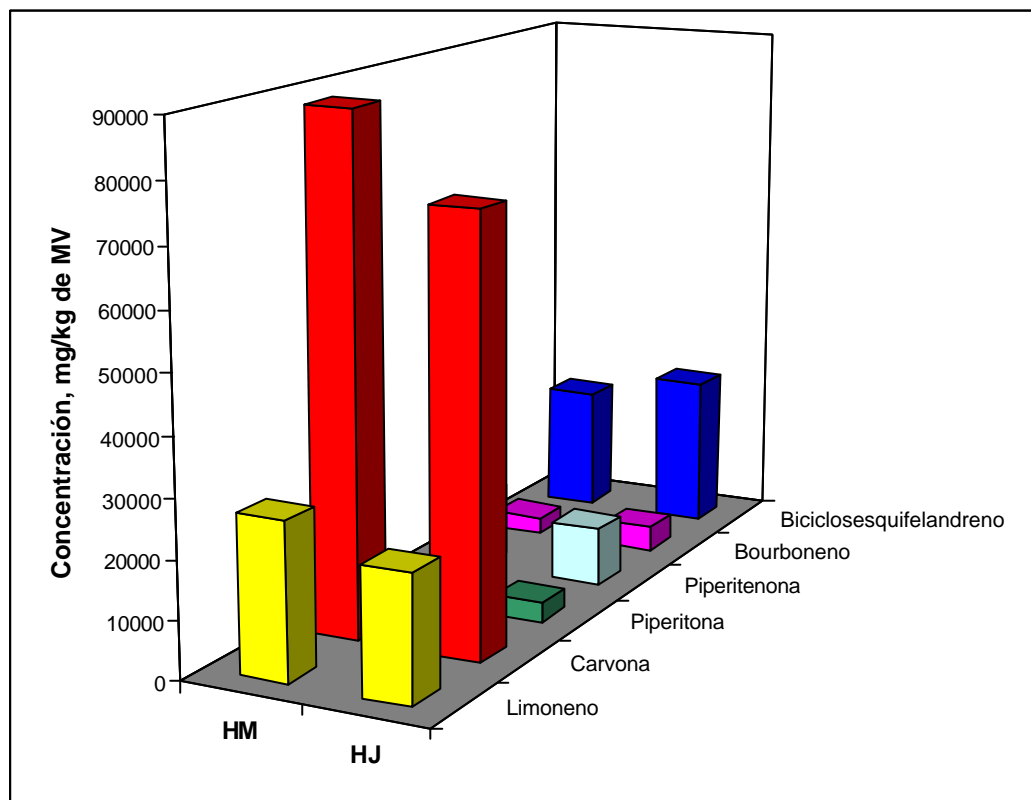


Figura 17. Principales compuestos presentes en los AEs de *Lippia alba*, obtenidos por MWHD de hojas jóvenes (HJ) y maduras (HM), de plantas cultivadas bajo las condiciones T2.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el AE de *Lippia alba*, extraído de hojas maduras, posee un 19, 16, 21 y 29% más de limoneno, carvona, piperitenona y piperitona, respectivamente, que el aislado de hojas jóvenes. Mientras que el AE de hojas jóvenes es un 49% más rico en fracción sesquiterpénica (β -bourboneno y biciclosesquifelandreno), que AE de hojas maduras. Estos resultados indican, que en la planta de *Lippia alba* debe existir un período de “acondicionamiento”, para que los metabolitos secundarios volátiles se distribuyan eficientemente en las hojas, con el desarrollo fenológico de la misma. En este sentido, si se desea obtener el AE de *Lippia alba* con la mayor calidad de carvona, es necesario, que las hojas de la planta alcancen cierta madurez, para lograr así una mayor acumulación de este metabolito volátil en la esencia.

Al comparar el contenido de la carvona presente en los AEs de *Lippia alba*, obtenidos por MWHD de hojas jóvenes y maduras, con los obtenidos de plantas (hojas y tallos) en estado de floración, del tratamiento T2 (ver **Figura 18**), se encontró, que en el último caso, se logra obtener una mayor acumulación de la carvona. Este comportamiento muestra la importancia del estado fenológico de la planta y del momento oportuno para la recolección del material vegetal sobre la calidad del AE de *L. alba*, ya que si se toman plantas muy jóvenes (< 15 días), o plantas muy maduras (>8 meses), no se logra obtener un AE de buena calidad, como el que se obtiene en el período de floración de la planta (130 días), momento en el cual, las plantas de *Lippia alba* alcanzan un máximo en el metabolismo primario, que, a su vez, repercute en una mayor acumulación de metabolitos secundarios volátiles, debido a que la biosíntesis de los últimos está directamente relacionada con la biosíntesis primaria de la planta [56].

El rendimiento obtenido de los AEs de *Lippia alba*, extraídos por MWHD de hojas jóvenes, fue de $0.53 \pm 0.01\%$ y del extraído de hojas maduras fue de $0.45 \pm 0.02\%$. Estos resultados muestran, que no es conveniente realizar el corte de hojas muy jóvenes, ni muy maduras, puesto que su rendimiento puede ser más bajo, que el

obtenido de las plantas en estado de floración, que es el estado fenológico oportuno para obtener el AE de *L. alba* con la calidad requerida, *i.e.* mayor cantidad de componentes oxigenados, *e.g.* carvona.

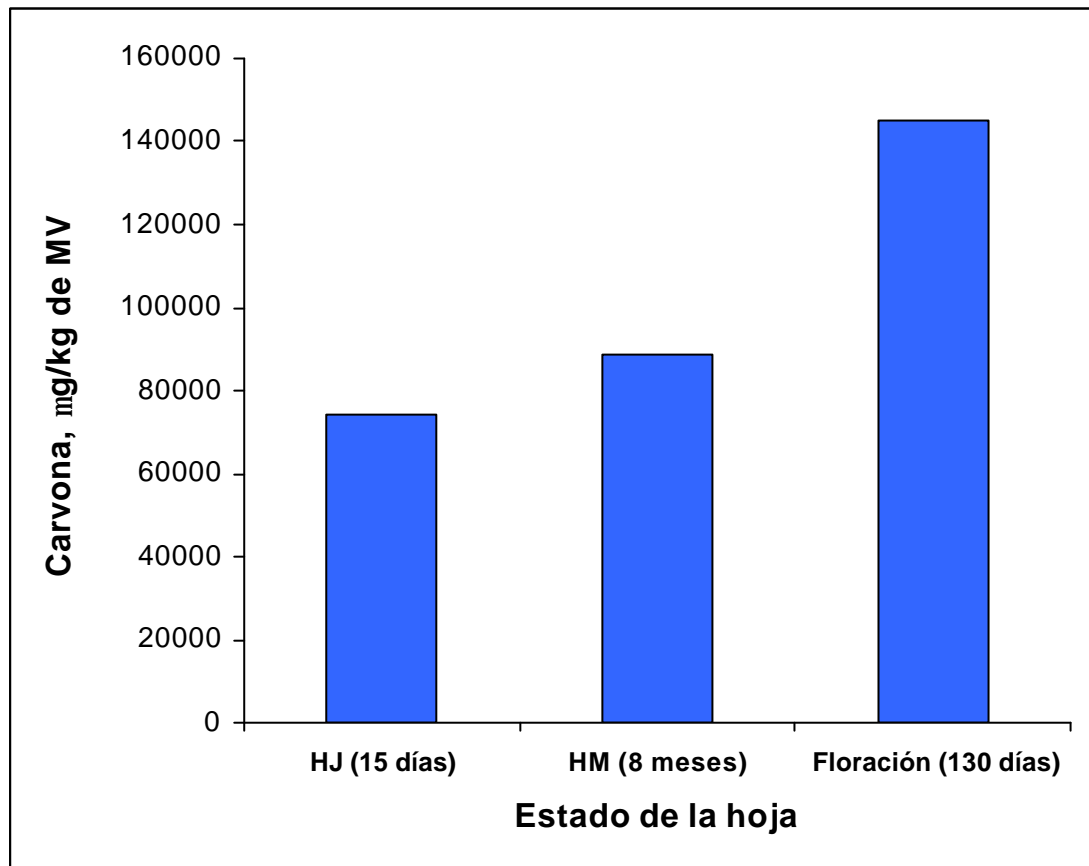


Figura 18. Concentración de la carvona ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de material vegetal) en AEs de *Lippia alba*, obtenidos de hojas jóvenes (HJ), maduras (HM) y de hojas y tallos en periodo de floración de la planta, cultivada bajo intensidad lumínica media ($T_2 = 50\%$).

3.2.4. Análisis de los AEs de *Lippia alba* mediante GC-MS

La identificación de los componentes presentes en las esencias aisladas de hojas y tallos de *Lippia alba*, se realizó empleando simultáneamente los valores de índices de retención de Kovàts, para ello, se utilizaron sustancias patrón de hidrocarburos lineales (C₁₀ – C₂₅), y sus espectros de masas (MS) obtenidos por el impacto de electrones (70 eV), los cuales se compararon con los reportados en la literatura [1, 24].

Los espectros de masas obtenidos experimentalmente de cada componente en la mezcla fueron comparados con los de las bases de datos del equipo, a saber: NBS 75K (75.000 MS), WILEY 138K (138.000 MS) y NIST 2002 (138.000 MS). También se llevó a cabo el análisis “manualmente” de las rutas de fragmentación. La homogeneidad de cada pico cromatográfico fue revisada, obteniendo fragmentogramas de masas basados en sus iones característicos para cada componente, e.g. monoterpenos, *m/z* 136 y 93; sesquiterpenos, *m/z* 204, 161, etc.

Los espectros de masas de los compuestos presentes en el AE, extraído de hojas y tallos de *Lippia alba*, exhibieron el aspecto característico para hidrocarburos y derivados oxigenados de origen monoterpénico y sesquiterpénico. A continuación, se presenta el análisis de algunos MS típicos obtenidos experimentalmente, para componentes mayoritarios del AE de *L. alba*.

Monoterpenos: En los espectros de masas de monoterpenos es común la presencia de iones en *m/z* 136, 121, 93, 79 y 77, cuya aparición se atribuye a la isomerización inicial del esqueleto molecular después de la ionización, por migración del doble enlace a lo largo de la estructura del monoterpeno. Debido a que los monoterpenos poseen el patrón de fragmentación muy similar, la manera de diferenciar entre los diversos hidrocarburos monoterpénicos, consiste en comparar las intensidades de sus fragmentos característicos, ya que las

diferencias en las intensidades, se deben a las “desigualdades” iniciales en las energías conformacionales de los monoterpenos, lo cual permite identificarlos, con base en sus espectros de masas (criterio espectroscópico) e índices de Kòvats, como un criterio cromatográfico adicional [51].

Limoneno: El espectro de masas del limoneno, un monoterpeno cíclico con dos enlaces dobles aislados, aparece en la **Figura 19**. La ionización disociativa del limoneno se presenta en el **Esquema 2**. El ión molecular M^+ en m/z 136 (26.8%) tiene una estabilidad W_{M^+} de 7.7%, y su fragmentación se caracteriza por una ruptura de tipo *retro Diels-Alder* (RDA), acompañada de la formación de un fragmento, pico de base, en m/z 68 (100%). Otros iones importantes producidos a partir del ión M^+ por pérdida del radical $CH_3\cdot$, eliminación del grupo isopropenílico y $2H\cdot$ son: $(M-CH_3)^+$ en m/z 121 (22.9%) y $(M-C_3H_5-2H)^+$ en m/z 93 (68.5%), respectivamente. El ión $(M-C_3H_5-2H)^+$ elimina posteriormente un radical $CH_3\cdot$, originando el fragmento en m/z 79 (36.4%), tal como aparece en el **Esquema 2**.

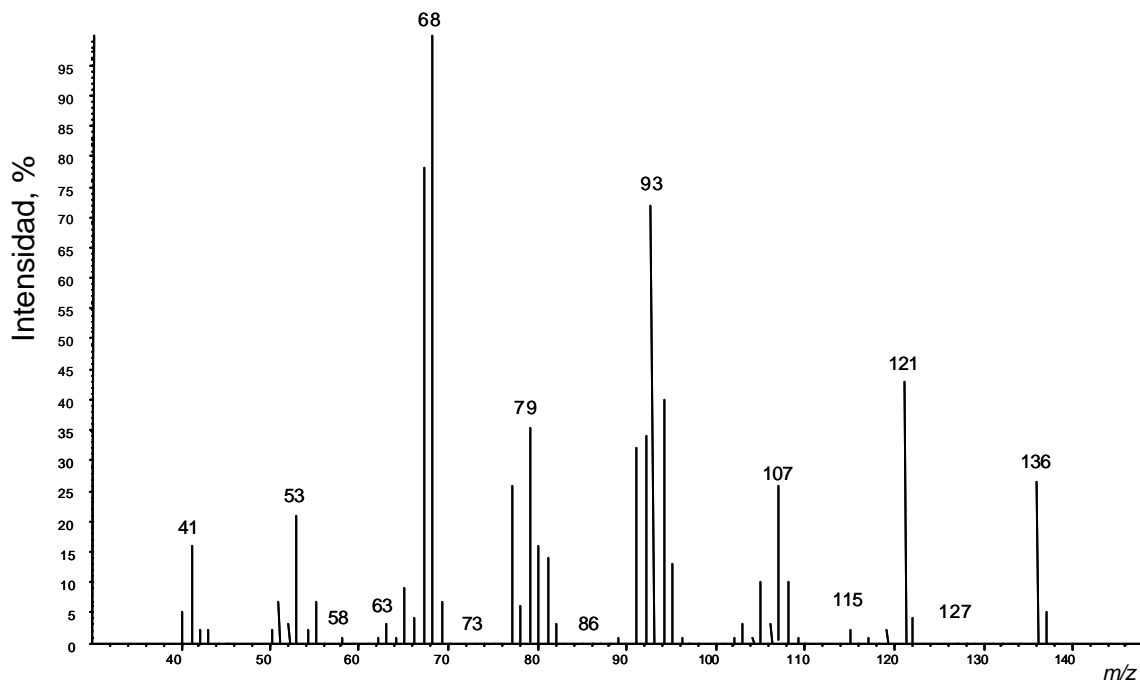
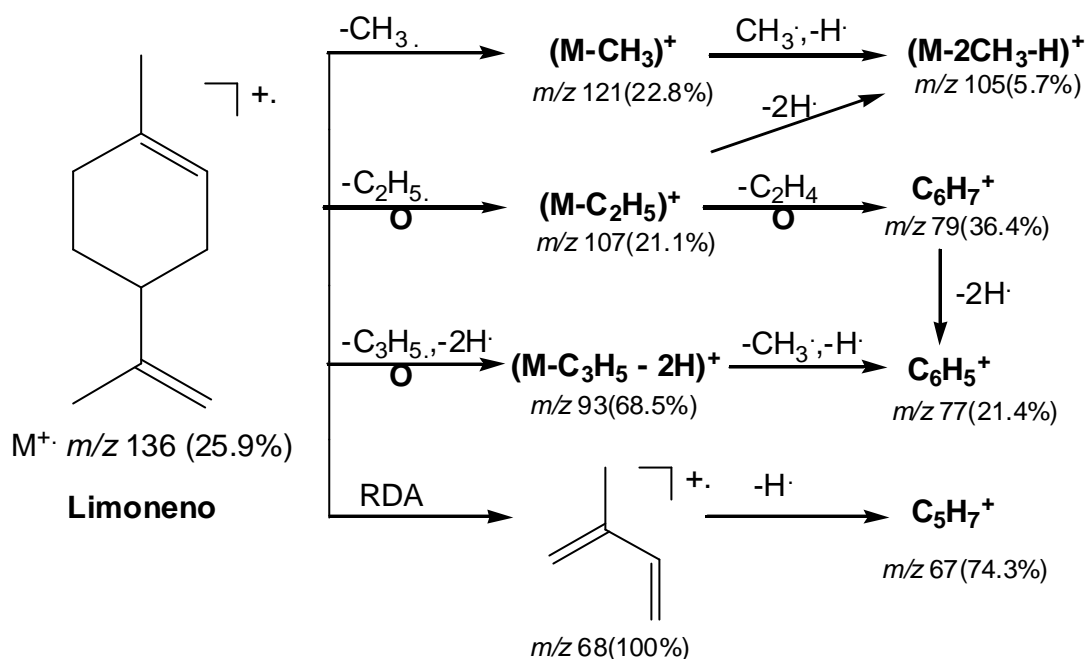


Figura 19. Espectro de masas del limoneno.



Esquema 2. Posibles rutas de fragmentación del limoneno.

Monoterpenoles: La presencia del grupo OH en las moléculas de monoterpenos, influye directamente sobre su disociación, presentando nuevas rutas de fragmentación. Sus espectros de masas resultan ser más complejos que los de los monoterpenos hidrocarbonados correspondientes. Los iones moleculares de los alcoholes son generalmente de intensidad baja o a menudo no se detectan. En el caso de los monoterpenoles la presencia del grupo hidróxilo se puede confirmar por la aparición en los MS de los iones $(M-H_2O)^+$ en m/z 136 y $(M-H_2O-CH_3)^+$ en m/z 121.

Linalool: El espectro de masas del linalool (**Figura 20**), presente en las esencias aisladas de hojas y tallos de *Lippia alba*, muestra claramente el patrón de fragmentación típico de monoterpenoles. En el MS de este alcohol no se detectó el ión molecular M^+ en m/z 154, sin embargo, su formación inicial se puede confirmar a través de la aparición del ión $(M-H_2O)^+$ en m/z 136 (7.1%), por eliminación de

una molécula de agua. Este último decae por pérdida paralela de los radicales CH_3 y C_3H_7 , generando, respectivamente, los iones $(\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3)^+$ en m/z 121 (26.4%) y $(\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_3\text{H}_7)^+$ en m/z 93 (81.4%), tal como aparece en el **Esquema 3**. El pico de base en el MS se produce por la ruptura alílica (**a**) del ión M^+ , acompañada de la localización de la carga positiva sobre el fragmento oxigenado en m/z 71 (100%).

Las dos rupturas alílicas (**a** y **b**) en el ión M^+ generan el fragmento $\text{C}_4\text{H}_7\text{O}^+$ en m/z 71 (**a**), pico de base en el espectro, y el ión hidrocarbonato C_5H_9^+ en m/z 69 (40%) (**b**). El primero decae posteriormente por eliminación de una molécula de etileno, con formación del fragmento CH_3CO^+ en m/z 43 (74.2%) y, el segundo, forma un ión alílico (m/z 41), también por pérdida de la molécula C_2H_4 . Los iones $\text{C}_4\text{H}_7\text{O}^+$ (m/z 71), C_5H_9^+ (m/z 69), CH_3CO^+ (m/z 43) y C_3H_5^+ (m/z 41) son fragmentos “diagnóstico” en el MS del linalool y permiten distinguirlo fácilmente de otros monoterpenoles, confirmando la presencia del grupo OH en la molécula y el número y la disposición de enlaces dobles en ella.

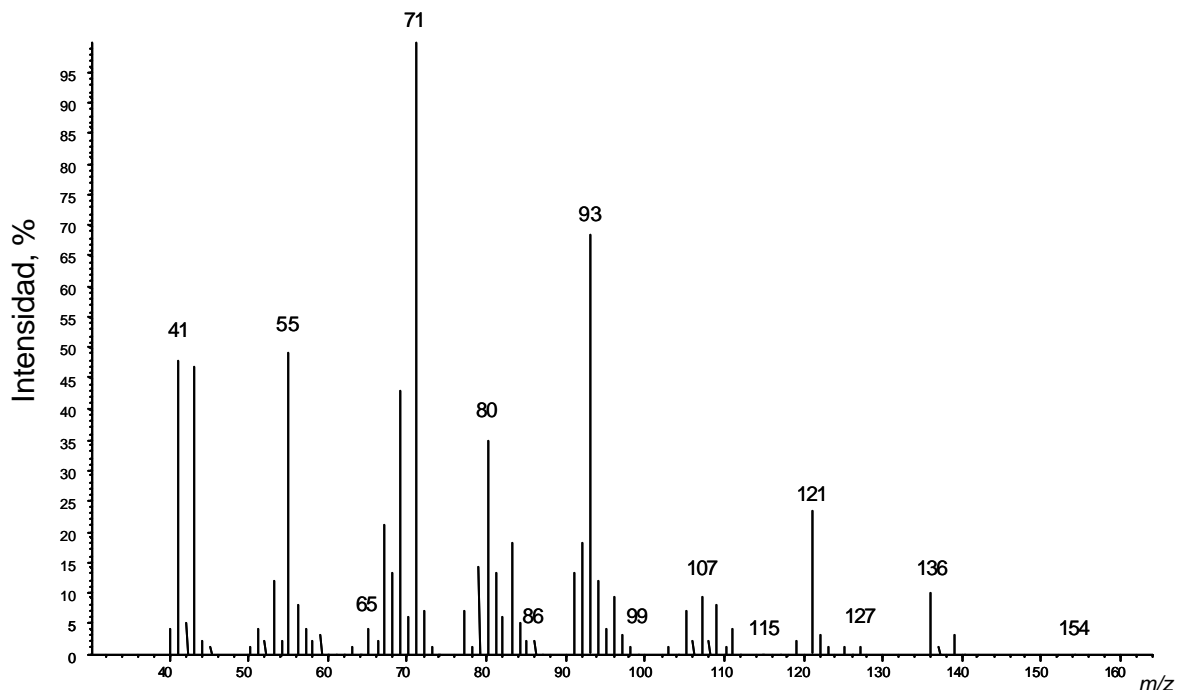
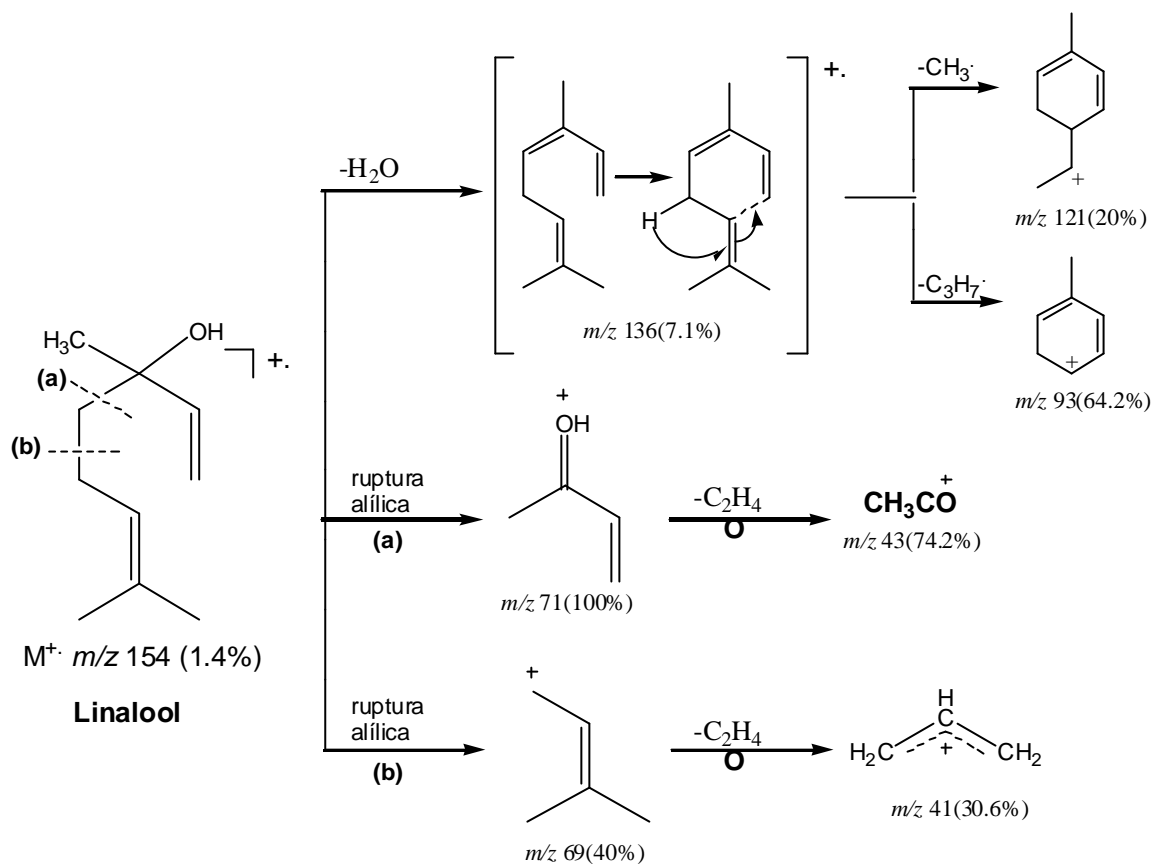


Figura 20. Espectro de masas del linalool.



Esquema 3. Posibles rutas de fragmentación del linalool.

Carvona: El espectro de masas de la carvona, el componente mayoritario identificado en los diferentes AE de *Lippia alba*, extraídos de hojas y tallos, se presenta en la **Figura 21**. La ionización disociativa de la carvona, por impacto de electrones a 70 eV, se muestra en el **Esquema 4**. El ión molecular M^+ en $m/z 150$ (11.3%) sufre una ruptura de tipo *retro Diels-Alder* (RDA), dando origen a la formación del pico de base en $m/z 82$ (100%). Otros iones importantes producidos a partir del ión M^+ por pérdida del radical $\text{CH}_3\cdot$, y de una molécula de propeno, después de un reordenamiento de hidrógeno, son $(\text{M}-\text{CH}_3)^+$ en $m/z 135$ (8%) y $(\text{M}-\text{C}_3\text{H}_6)^+$ en $m/z 108$ (38.2%), respectivamente. Este último, $(\text{M}-\text{C}_3\text{H}_6)^+$, elimina posteriormente un radical $\text{CH}_3\cdot$, originando el fragmento en $m/z 93$ (37.9%), tal como aparece en el **Esquema 4**. El fragmento, pico de base, en $m/z 82$, sufre una

pérdida de una molécula de CO, dando origen al catión-radical ($C_4H_6^+$) en m/z 54 (33.4%).

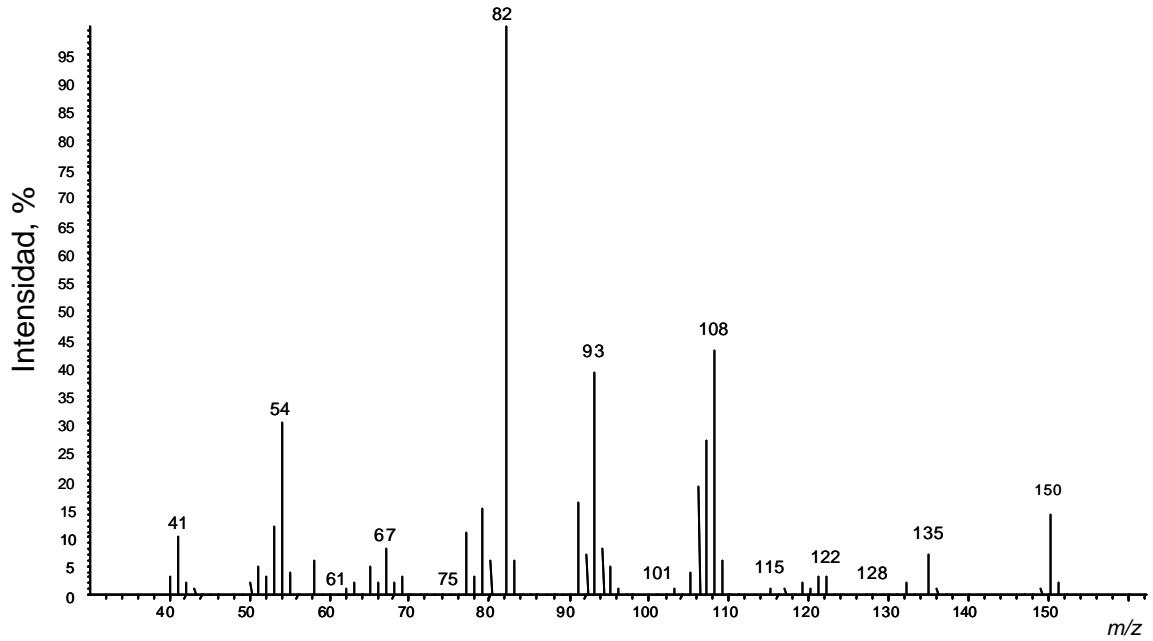
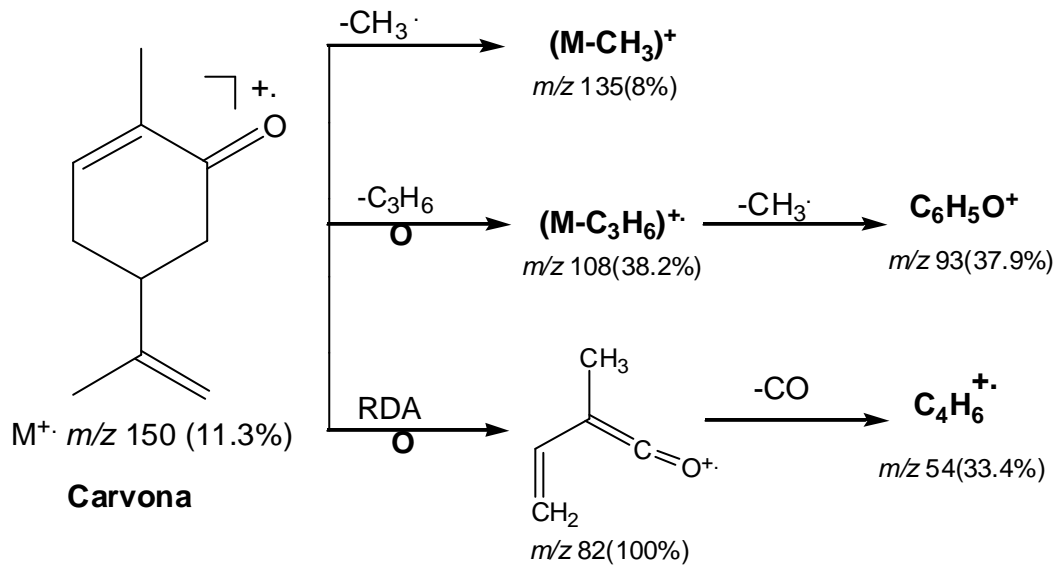


Figura 21. Espectro de masas de la carvona.



Esquema 4. Posibles rutas de fragmentación de la carvona.

Piperitona: El espectro de masas de la piperitona (**Figura 22**), una cetona terpenoide, presenta una ruta de fragmentación muy similar a la de la carvona. En el **Esquema 5**, se presenta la ionización disociativa de la piperitona por impacto de electrones, a 70 eV. El ion molecular M^+ de la piperitona en m/z 152 (21%), que sufre una ruptura *retro Diels-Alder* (RDA), da origen a la formación del pico de base en m/z 82 (100%), que luego sufre descarbonilación generando el catión-radical ($C_4H_6^+$) en m/z 54 (13%). Otros fragmentos, que se forman a partir del ion molecular M^+ por la pérdida del radical CH_3 , y una molécula de propeno, después de un reordenamiento de hidrógeno, tipo McLafferty intramolecular son $(M-CH_3)^+$ en m/z 137 (29%) y $(M-C_3H_6)^+$ en m/z 110 (88%), respectivamente. El catión-radical $(M-C_3H_6)^+$, elimina posteriormente un radical CH_3 , dando origen al ion $C_6H_7O^+$ en m/z 95 (38%), tal como aparece en el **Esquema 5**.

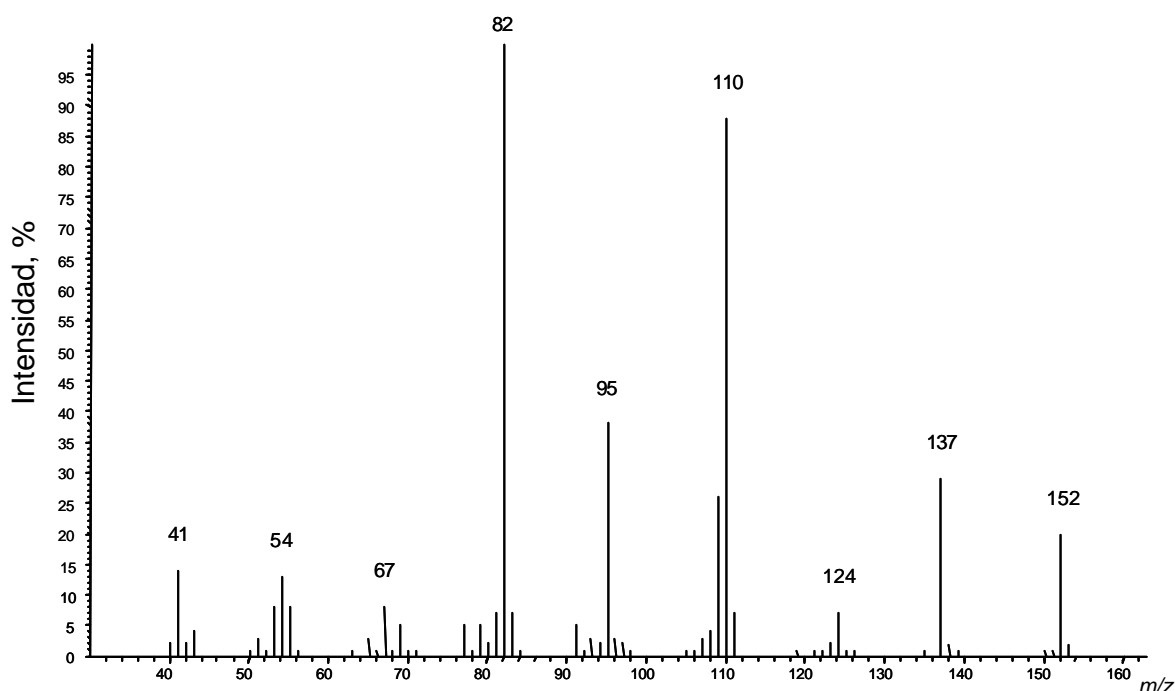
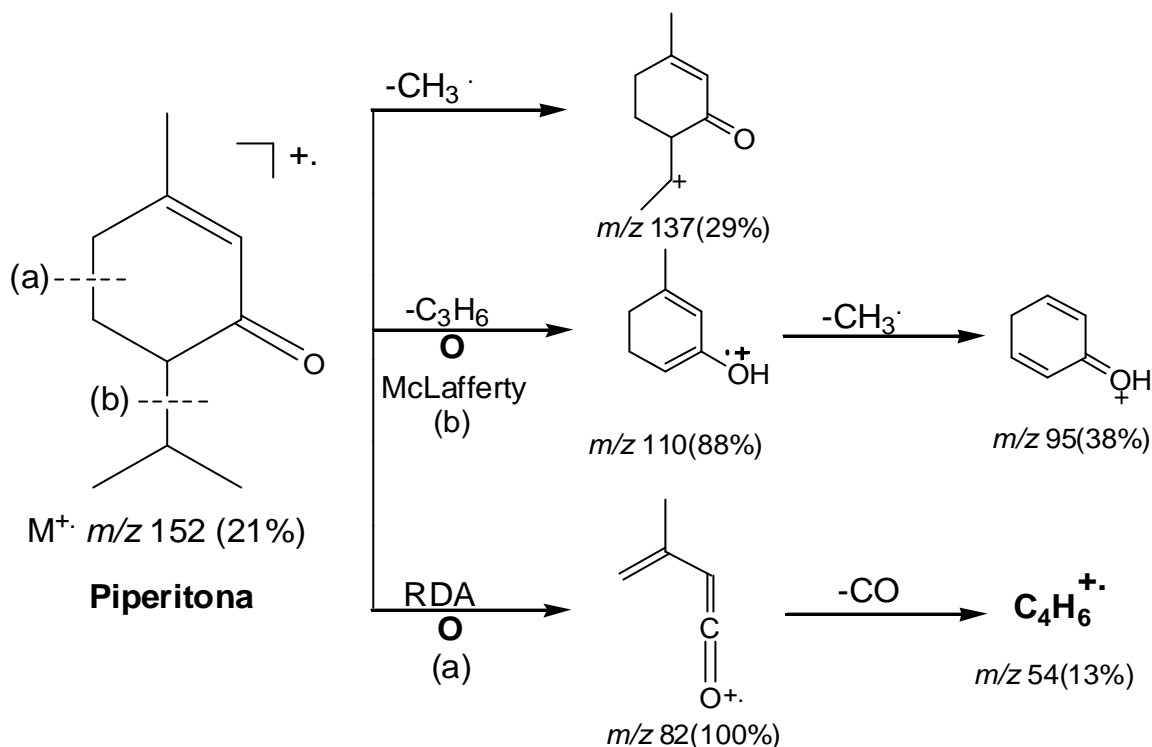


Figura 22. Espectro de masas de la piperitona.



Esquema 5. Posibles rutas de fragmentación de la piperitona.

Piperitenona: El espectro de masas de la piperitenona una cetona cíclica con dos enlaces dobles aislados, aparece en la **Figura 23**. La ionización disociativa de la piperitenona se presenta en el **Esquema 6**. El ion molecular, M^+ en m/z 150 (100%), pico de base, posee una alta estabilidad debido al sistema conjugado de dobles enlaces, su fragmentación se caracteriza por una ruptura α , con posterior pérdida de una molécula CO, que origina el catión-radical ($C_9H_{14}^+$) en m/z 122 (7%), éste, a su vez, elimina un radical CH_3^\cdot , generando el fragmento en m/z 107(55%), que al eliminar una molécula de eteno, da origen al ión en m/z 79 (17%). La eliminación de un radical metilo (CH_3^\cdot), a partir del ion molecular M^+ , produce el fragmento $(M-CH_3)^+$ en m/z 135 (32%), que, a su vez, elimina una molécula de propano, después de un reordenamiento, originando el ion $(C_6H_3O)^+$ en m/z 91(24%).

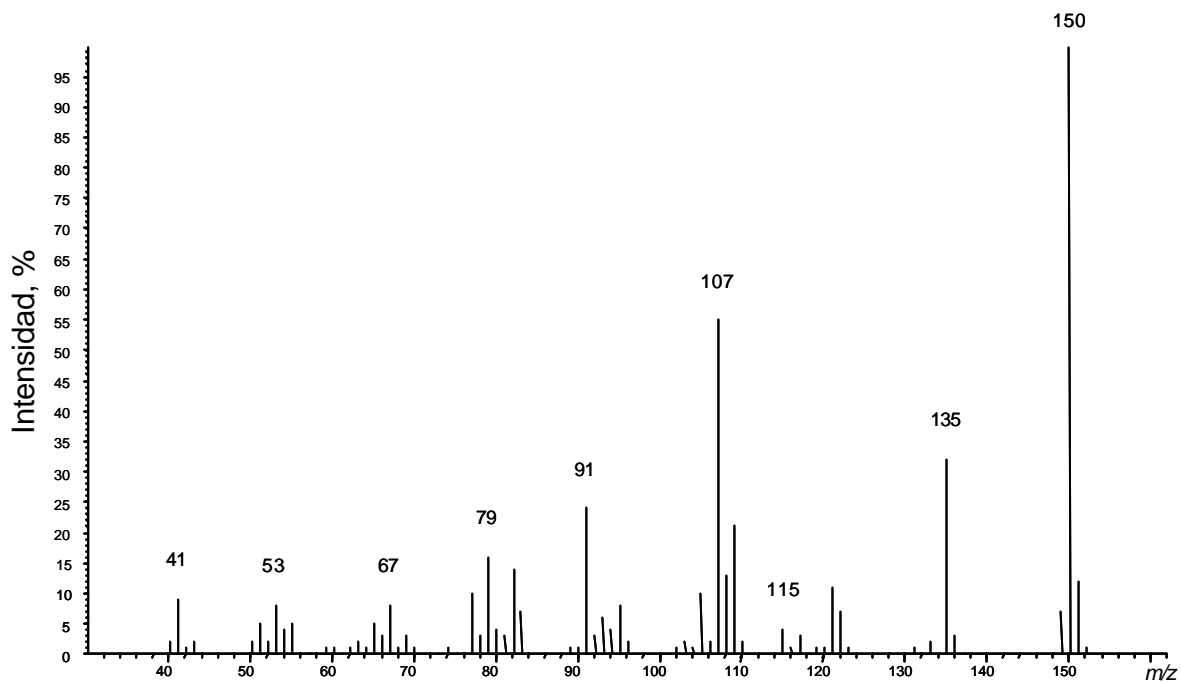
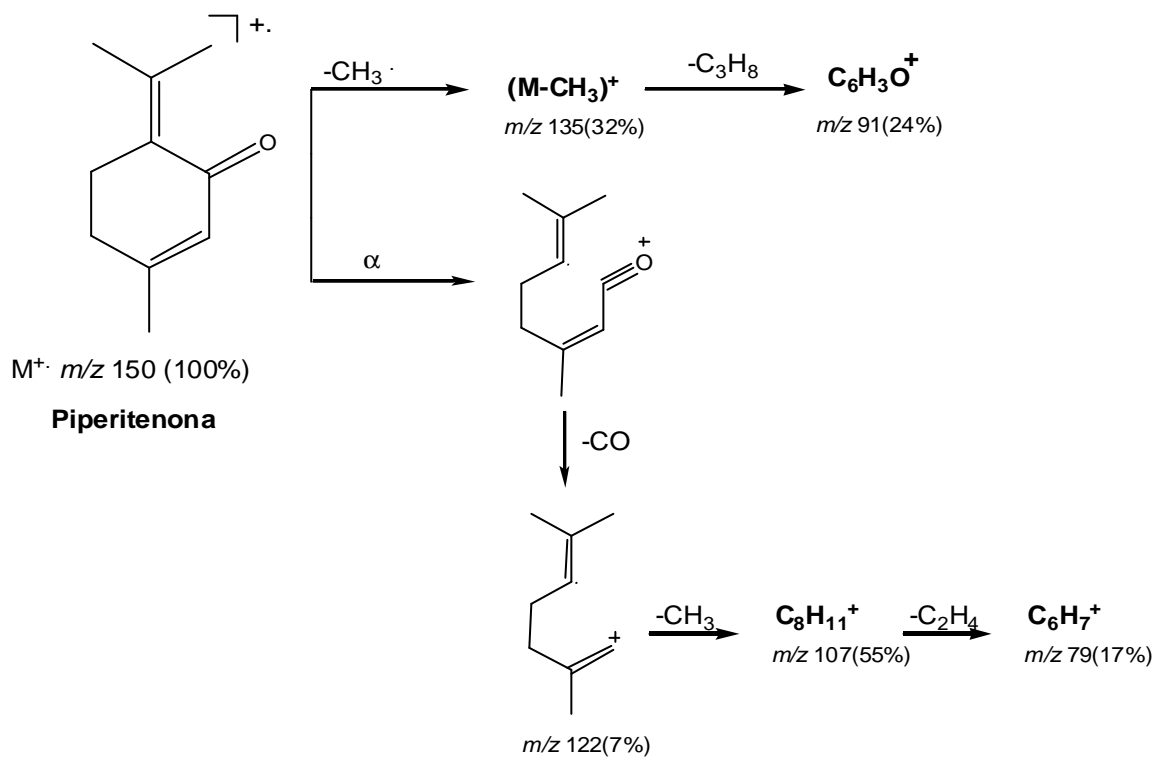


Figura 23. Espectro de masas de la piperitenona.



Esquema 6. Posibles rutas de fragmentación de la piperitenona.

Sesquiterpenos: Los espectros de masas de este tipo de compuestos se caracterizan, en muchos casos, por la presencia de una señal intensa en m/z 161, que corresponde al ion $(M-C_3H_7)^+$. La naturaleza cíclica de sesquiterpenos imparte cierta estabilidad a sus iones moleculares [36]; casi para todos los sesquiterpenos se puede observar la formación del ión M^+ en el espectro.

Biciclosesquifelandreno: En el espectro de masas del biciclosesquifelandreno (**Figura 24**) se observa el ion molecular M^+ en m/z 204 de intensidad media (17%), que decae por la pérdida del radical isopropílico, de la molécula ionizada, con formación del ión pico de base, $(M-C_3H_7)^+$, en m/z 161. Éste genera los iones fragmento en m/z 133 y 105 (15 y 42%, respectivamente), productos de dos reacciones monomoleculares consecutivas de tipo *retro Diels-Alder* (RDA), tal como se puede observar en el **Esquema 5**.

El pico de base $(M-C_3H_7)^+$, sufre reordenamiento por deslocalización de la carga positiva, y reacciones RDA consecutivas, para generar los iones $C_9H_{11}^+$ en m/z 119 (27%), $C_7H_7^+$ en m/z 91 (34%) y $C_6H_7^+$ en m/z 79 (20%), que son fragmentos “diagnostico” en el MS del biciclosesquifelandreno.

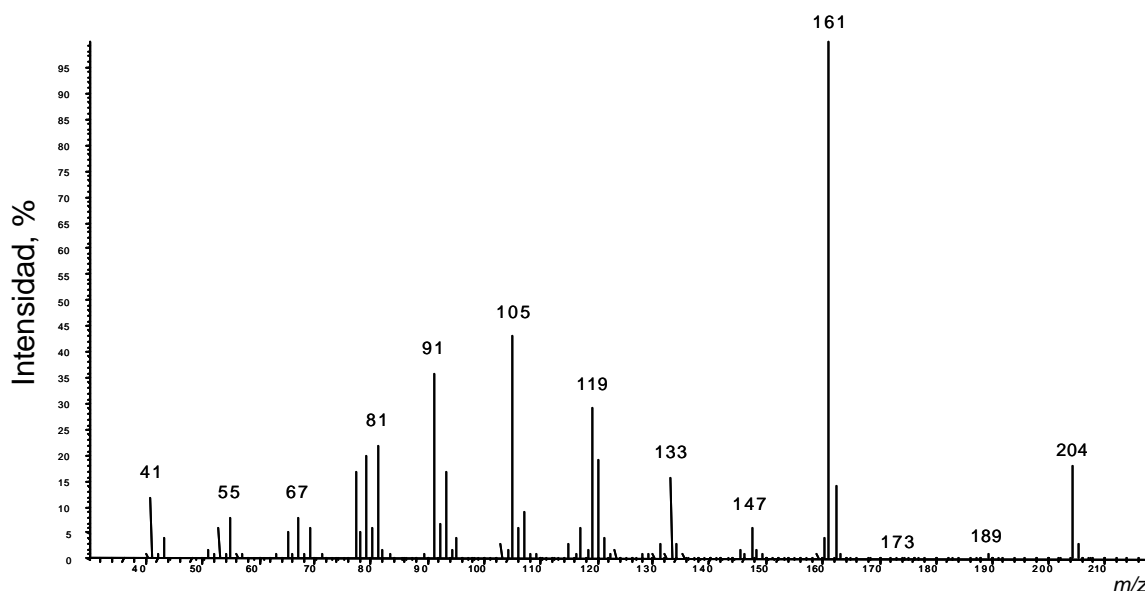
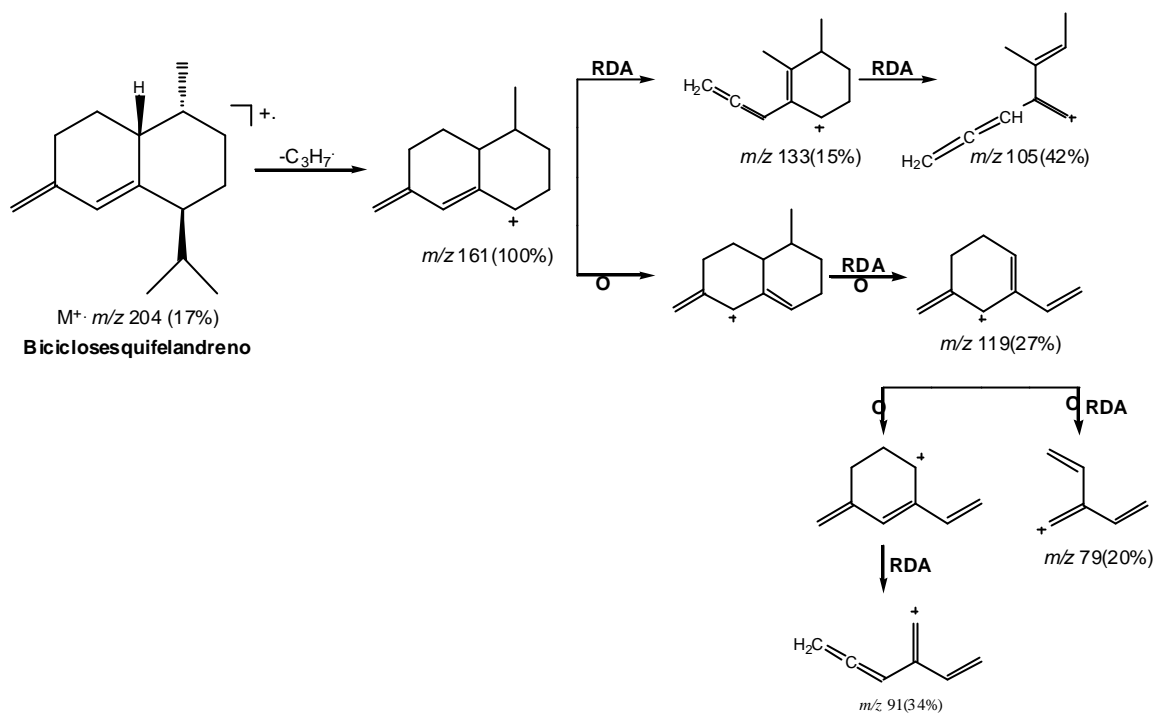


Figura 24. Espectro de masas del biciclosesquifelandreno.



Esquema 7. Posibles rutas de fragmentación del bicosesquifelandreno.

3.2.5. Análisis de componentes principales (PCA) de los AEs de *Lippia alba* extraídos por MWHD.

Para apreciar mejor la respuesta de las plantas a los tratamientos de luz, a que fueron sometidas y, de su etapa de desarrollo sobre la composición final del AE, las concentraciones de los metabolitos secundarios obtenidos por MWHD, se compararon por medio del análisis de componentes principales (PCA, STATISTICA, Versión 6.0, StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA). El resultado de PCA aplicado a los AEs de *L. alba* indica, que más del 70% de la información de las **Tablas 3A-3C**, puede ser representada por un subespacio de dos coordenadas (Componentes Principales), construido con base en las combinaciones lineales de las concentraciones ($\mu\text{g/kg}$ de MV) de los componentes

presentes en los diferentes AEs (**Figura 25**). El *Factor 1* involucra el 74% de la información y está representado básicamente por monoterpenos oxigenados (piperitenona, borneol, *endo*-fenchol, piperitona, etc.). El *Factor 2* corresponde al 6% de la información y está caracterizado por alcoholes (3-octanol, 1-octen-3-ol), monoterpenos (sabineno, canfeno, α y β -pinenos) y otros compuestos oxigenados.

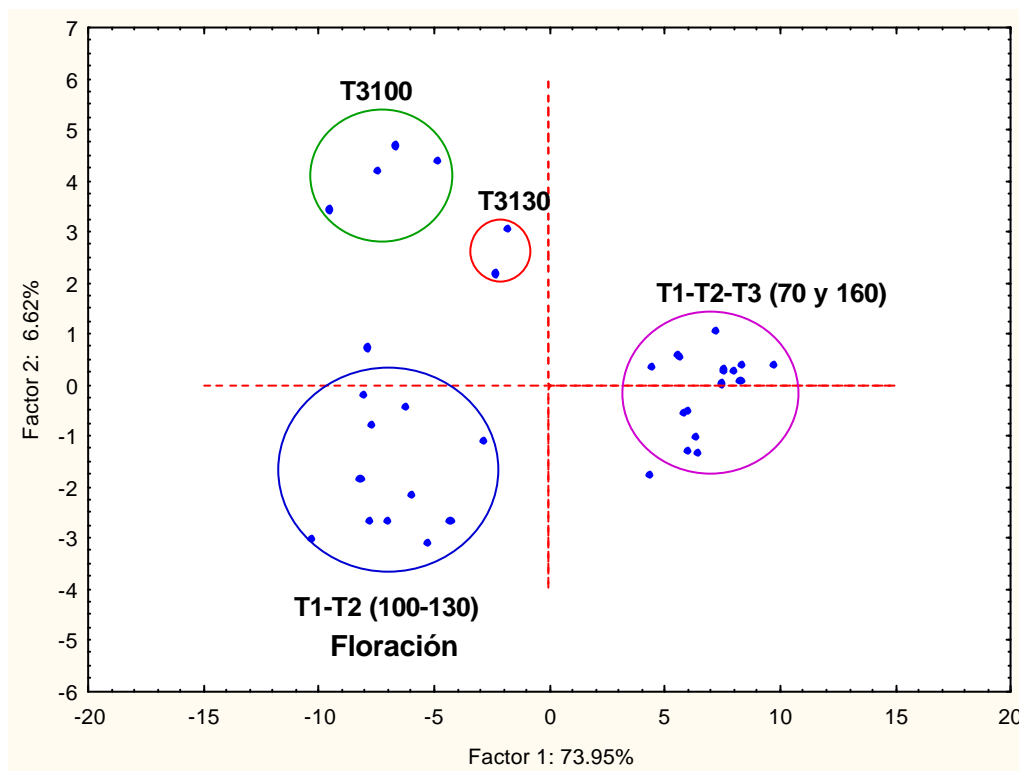


Figura 25. Representación gráfica de PCA, de las concentraciones ($\mu\text{g/kg}$ de MV) de los componentes presentes en los aceites esenciales de *Lippia alba*, aislados por MWHD, para los diferentes tratamientos de intensidad lumínica y edad (días).

En la **Figura 25** se puede observar, que en la etapa inicial de crecimiento de las plantas de *Lippia alba*, para los tres tratamientos de luz, no existió variación en la composición de sus esencias. A medida que las plantas alcanzaron un mayor

desarrollo, se observaron diferencias significativas entre T3 (20% IL) y los tratamientos T1 (100% IL) y T2 (50% IL) entre los días 100 a 130. Estos últimos presentaron similitud en la composición química de sus aceites esenciales en el estado de floración, lo que se evidenció en la proximidad de los puntos. Hacia el día 160 se observó que las esencias se parecieron a las extraídas en el día 70, debido a que las plantas en este punto comenzaron un nuevo ciclo reproductivo.

3.3. ASPECTOS ECOFISIOLÓGICOS DE *Lippia alba*

La determinación de parámetros de crecimiento, e índices fotosintéticos como área foliar y acumulación de biomasa son muy importantes, ya que permiten verificar si existe una relación directa entre la capacidad fotosintética de la planta (acumulación de biomasa) y la producción de metabolitos secundarios (AE) durante su desarrollo. En esta parte, se evaluó la asignación de biomasa en las plantas de *L. alba* según los parámetros fisiológicos descritos en los **Numerales 2.8.2. a 2.8.4** de la Parte Experimental.

3.3.1. Variables climáticas

Temperatura e irradiancia solar: En la **Figura 26** se presentan los promedios diarios de temperatura y radiación solar. El experimento inició el 20 de abril de 2004 y finalizó el 9 de septiembre de 2004. La temperatura promedio diaria fue de 23°C y, en general, no se presentaron fluctuaciones de temperatura significativas durante este periodo.

La intensidad lumínica a lo largo del experimento presentó fluctuaciones diarias y, entre periodos, en un rango de 382 a 401 W/m², para un promedio general de 395 W/m². Las plantas del cultivo T1, T2 y T3 recibieron en total durante el periodo de estudio 57639, 28820 y 11528 W/m² de irradiancia solar respectivamente .

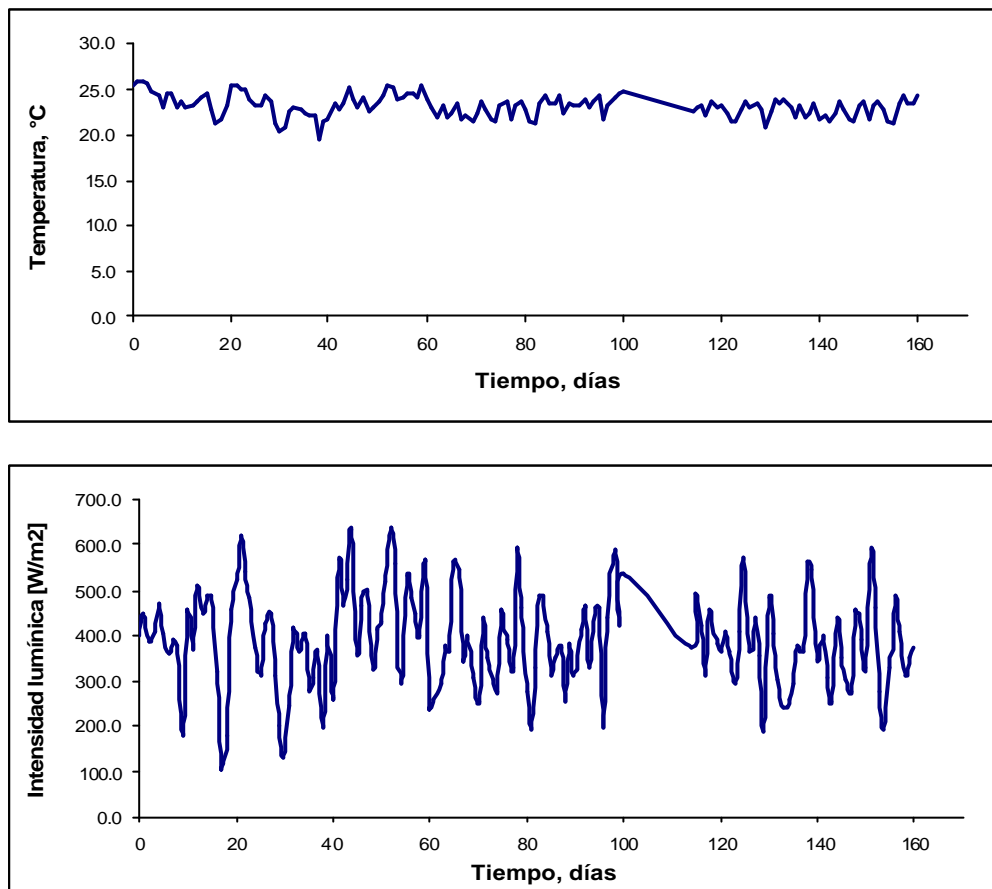


Figura 26. Promedios diarios de temperatura (°C) y radiación solar (W/m^2) durante el periodo del experimento (días). Datos obtenidos por la Estación Meteorológica de la CDMB, UIS.

3.3.2. Parámetros de crecimiento y acumulación de biomasa

Masa seca: La producción de masa seca total y la de sus componentes, *i.e.* tallos, hojas y ramas, para los tres tratamientos de intensidad lumínica, presentaron, en general, una tendencia creciente durante el periodo del experimento. La **Tabla 5** muestra que las plantas de *L. alba* durante el periodo de floración, en los cultivos T1 y T2, no presentaron diferencias significativas en la acumulación de biomasa. Por el contrario, durante el periodo de postfloración, si se observaron diferencias

significativas ($P < 0.001$) entre los tratamientos 1 y 2, mostrando mayor producción, el nivel intermedio de sombra (Véase **Figura 27**).

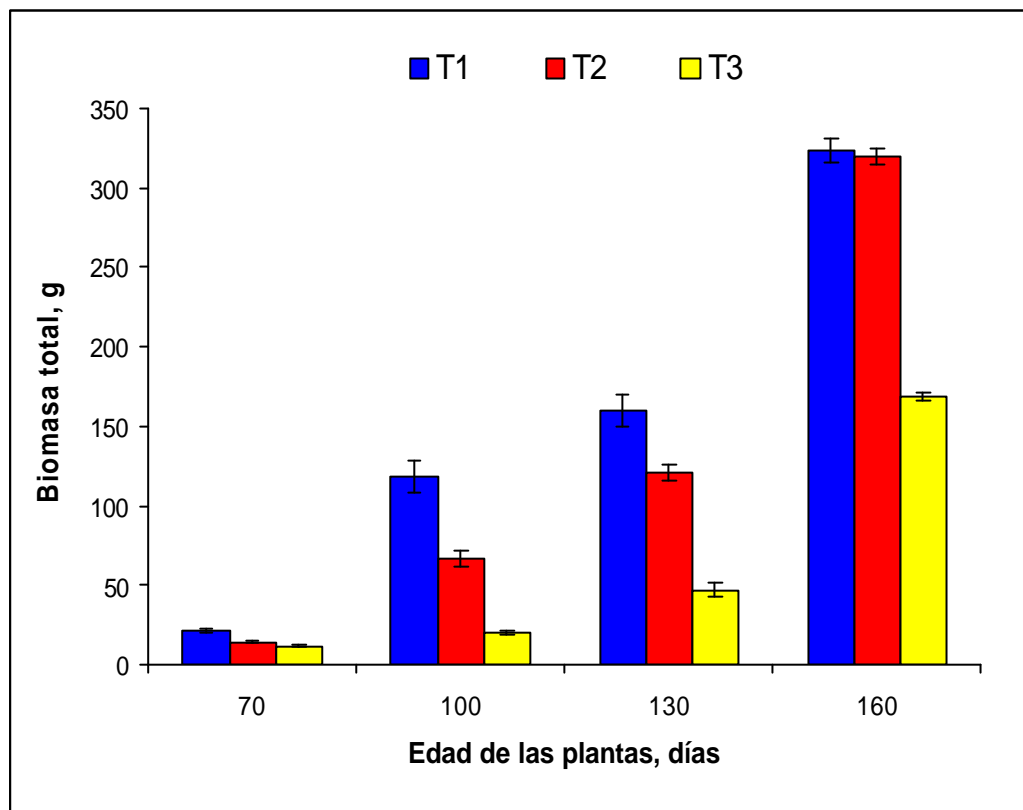


Figura 27. Variación del peso seco total (g) de *Lippia alba* en cuatro épocas de muestreo, bajo tres niveles de intensidad lumínica (T1= 100% IL; T2= 50% IL; T3= 20% IL).

Estos resultados corroboran la hipótesis planteada, la cual establece, que al reducir la radiación incidente, se debe disminuir la producción de masa seca total durante las diferentes etapas fenológicas de las plantas de *Lippia alba*. La producción de biomasa a lo largo del experimento, cumple con lo planteado en la hipótesis inicial, puesto que el mayor rendimiento de biomasa, lo presentó el

cultivo T1=100% IL, seguido de T2 =50% IL y T3=20% IL, respectivamente. Este comportamiento, muestra que el estado fenológico de las plantas de *L. alba*, es determinante en la producción de biomasa de las mismas. Otro aspecto a tener en cuenta, es el manejo del contenido de agua en la plantas (transpiración). Esto último, explicaría la mayor acumulación de biomasa en las plantas del cultivo T2, ya que, al estar expuestas a una menor irradiancia solar, poseen una temperatura foliar más baja, lo que, a su vez, se traduce en una menor transpiración, y, por ende, en un manejo más eficaz de la apertura estomática, presentando una mayor eficiencia fotosintética.

Tabla 5. Valores promedios del peso seco total de plantas de *Lippia alba*, en función del periodo de crecimiento (días), bajo tres niveles de intensidad lumínica.

Edad (días)	T1 (100% IL)			T2 (50% IL)			T3 (20% IL)		
	Peso seco total, g	s	CV (%)	Peso seco total, g	s	CV (%)	Peso seco total, g	S	CV (%)
70	22	1.4	6.1	15	0.91	6.2	12	0.69	5.7
100	118*	9.9	8.4	67	5.2	7.8	21	1.2	5.9
130	160	9.5	6.0	121*	5.1	4.2	47	4.6	9.6
160	323	18	5.4	320	5.1	1.6	170	2.8	1.7

* Periodo de floración.

Área foliar: La **Figura 28** muestra el comportamiento del área foliar (AF) de *Lippia alba* en función del tiempo e indica que este parámetro aumentó progresivamente para los tres niveles de irradiancia solar. Para resaltar, el aumento significativo del AF ($P < 0.001$), después del día 130, para los tratamientos T2=50% IL y T3=20% IL, comparados con T1=100% IL, fue una respuesta al sombreado, lo que indica una alta plasticidad de este órgano. Es decir, a bajos niveles de luz, las plantas de *Lippia alba*, respondieron al estrés lumínico, expandiendo al máximo su superficie foliar, para captar con mayor eficiencia la luz disponible.

Para el caso del tratamiento T1=100% IL, el AF presentó una disminución en la velocidad de crecimiento, comparada con los tratamientos T2 y T3, después del día 130, debido a la senescencia (amarillamiento y caída de hojas) de las plantas, lo cual correspondió al periodo de postfloración.

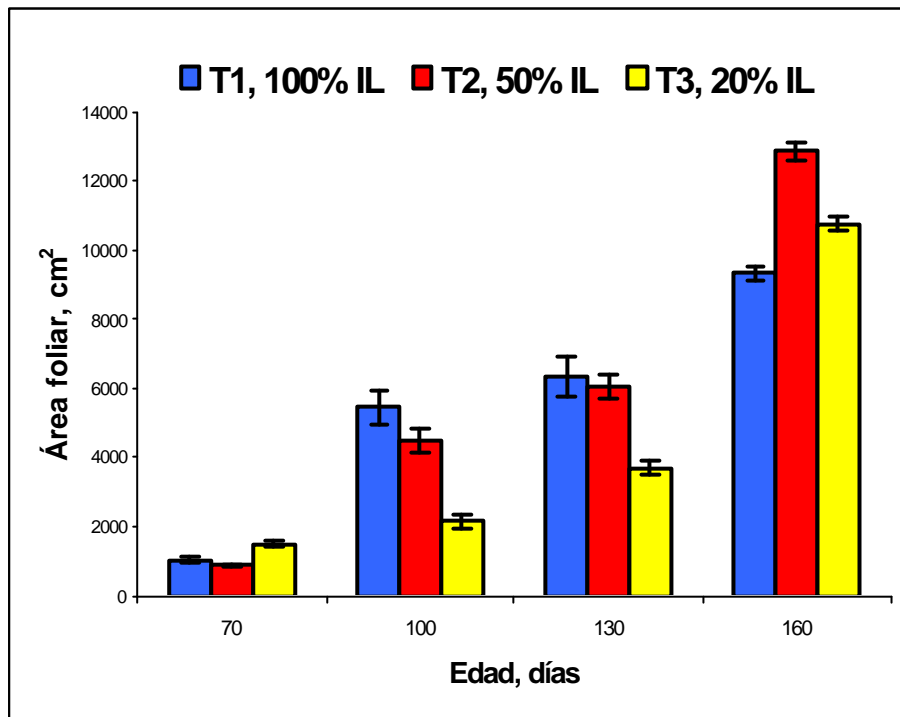


Figura 28. Área foliar de *Lippia alba* bajo tres niveles de intensidad lumínica (IL), T1 (100% IL), T2 (50% IL) y T3 (20% IL), en función del crecimiento (días).

Tasa de asimilación neta (TAN): La tasa de asimilación neta (TAN) es un indicador de la eficiencia del cultivo en la producción de materia seca por unidad de área foliar. La **Figura 29** muestra el comportamiento de este parámetro, en función del estado fenológico de las plantas de *Lippia alba*, bajo tres niveles de intensidad lumínica. Los resultados obtenidos para el día 100, muestran que existe una variación significativa ($P < 0.001$) entre los tratamientos T1 (100% IL) y T2

(50% IL) en el comportamiento de la TAN. Para ambos tratamientos, se presentó un incremento en la TAN hacia el día 100, estado de floración para T1 y una marcada disminución hacia el día 130, lo cual correspondió al estado de postfloración. Las plantas de *Lippia alba* mostraron adaptación al estrés lumínico, ya que, en diferentes estados fenológicos de las plantas, los tratamientos con sombra, no presentaron diferencias significativas a los 130 y 160 días.

Hacia el día 160, estado de postfloración para T1 y T2, las plantas presentaron un nuevo incremento en la TAN, debido a que estas comenzaron un nuevo ciclo reproductivo hacia floración. El mayor valor en la TAN, para T1 y T2 se alcanzó para el periodo de floración.

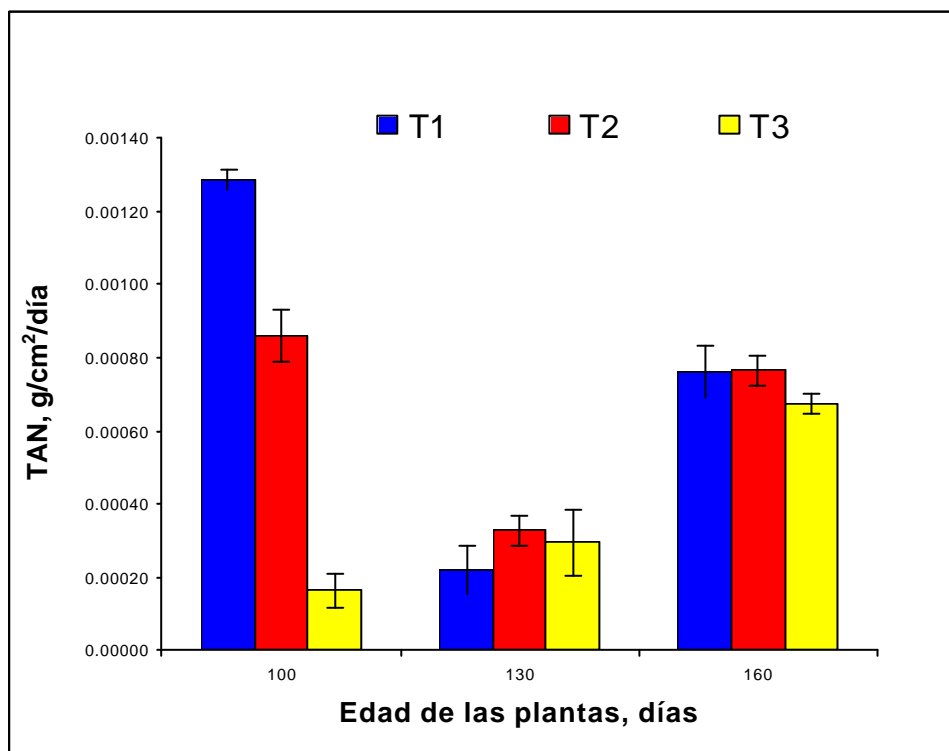


Figura 29. Tasa de asimilación neta de *Lippia alba*, bajo tres niveles de radiación incidente, en función del crecimiento (días) de la planta.

El valor de la TAN de las plantas, cultivadas bajo el tratamiento T1, fue un 33% más alto, que el obtenido para las plantas del cultivo con reducción en la intensidad lumínica del 50%, hacia el día 100, lo cual indica una mayor eficiencia fotosintética por unidad de área foliar en la etapa inicial de crecimiento.

La TAN de las plantas de *Lippia alba*, cultivadas bajo condiciones T3, no presentaron disminución en la velocidad de crecimiento, debido fundamentalmente, a que estas plantas no alcanzaron el periodo de floración, momento después del cual, se presenta la disminución en la TAN.

Tasa de crecimiento relativo (TCR): En la **Figura 30**, se presenta el comportamiento de la TCR, en los diferentes periodos de crecimiento e intensidad lumínica, de las plantas de *Lippia alba*. Los resultados indican un comportamiento similar para las condiciones de luz alta (T1) y media (T2), debido a que coinciden, en las fluctuaciones de los valores de la TCR, para los diferentes periodos de crecimiento. Para ambos cultivos, se presentó un aumento en la producción de materia seca total hacia el día 100, con posterior disminución hacia el día 130, cuando se observaron diferencias significativas ($P < 0.01$), entre los dos tratamientos. Después de este periodo las plantas comenzaron un nuevo ciclo reproductivo hacia el día 160, cuando se observó un nuevo incremento en los valores de la TCR y nuevamente diferentes significativas ($P < 0.002$) entre ellos.

Los mayores valores en la TCR, para *Lippia alba*, se alcanzaron durante el periodo de floración e independiente de la radiación incidente. Este comportamiento se debe, a que, durante esta etapa, las plantas logran un máximo en su metabolismo primario, lo que hace aumentar la velocidad de crecimiento en las plantas.

Las plantas con mayor sombrero (T3, 20% IL), presentaron un comportamiento diferente, ya que la TCR siempre aumentó con el tiempo, debido a que las plantas no alcanzaron la floración.

Los valores de TCR observados para T1 y T2, son acordes con lo observado por Wallace y Monger en 1965 [21], quienes afirmaron que la TCR en las etapas iniciales del cultivo presentaron valores altos, que iban disminuyendo con la edad, ya que a medida que las plantas, alcanzaban una mayor madurez se aumentaban gradualmente los tejidos no asimilatorios; en el caso de *Lippia alba*, aumentaba el grosor de los tallos, que se volvían más leñosos.

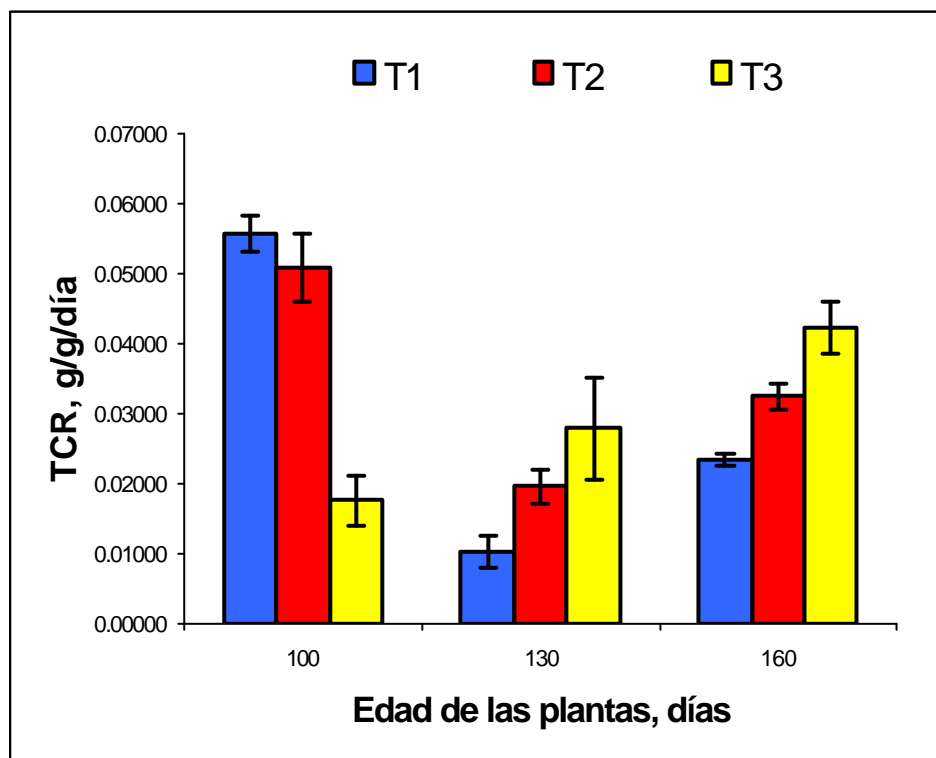


Figura 30. Tasa de crecimiento relativo de *Lippia alba*, bajo tres niveles de radiación incidente, en función del crecimiento (días) de la planta.

Área foliar específica (AFE): Es la medida de la foliosidad de la planta, determinada con base en el peso seco. La importancia de la utilización de este índice, se refiere a consideraciones relativas al espesor de las hojas en cada periodo de crecimiento. La **Figura 31**, muestra el comportamiento del AFE para los tres tratamientos de luz incidente en función del periodo de crecimiento de la planta.

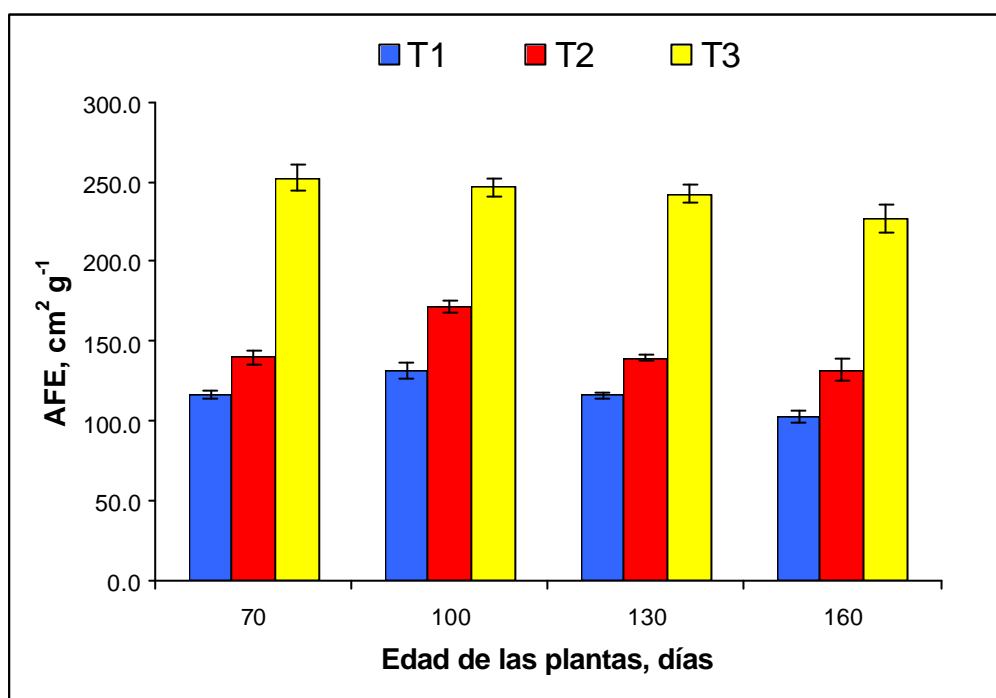


Figura 31. Área foliar específica de *Lippia alba*, bajo tres niveles de intensidad lumínica, en función del crecimiento (días) de la planta .

Los resultados obtenidos para este parámetro, muestran la plasticidad de las plantas de *Lippia alba*, cultivadas bajo los tratamientos T2 y T3, o sea, al incrementar el nivel de sombreado, se aumenta el AFE. Esta variable fue siempre superior en los niveles sombreados respecto al tratamiento T1, siendo

mayor para el tratamiento T3. Este comportamiento obedece a una respuesta de las plantas de *Lippia alba*, para captar al máximo la energía solar disponible para la asimilación de CO₂.

En la **Figura 31**, también se puede observar, que el AFE para los tratamientos T1 y T2, decreció con el desarrollo de las plantas, alcanzándose un mayor espesor en las hojas de *Lippia alba*, en las primeras etapas de su cultivo (día 100). El AFE del tratamiento T3, por el contrario, no presentó variaciones significativas, lo cual indica que el espesor de las hojas fue el mismo en las diferentes épocas de muestreo.

3.4. Relación entre el rendimiento de AE de *Lippia alba* y su biomasa total

En un cultivo experimental con fines de proyección agroindustrial, es importante establecer la producción de AE por superficie cultivada. La **Figura 32**, muestra el comportamiento de la relación entre el rendimiento de extracción del aceite esencial de *Lippia alba* y la biomasa acumulada por las plantas durante su desarrollo fenológico. Se puede observar, que esta relación aumentó con el crecimiento de las plantas, encontrándose que dentro de un mismo ciclo reproductivo, se alcanzan picos en los periodos de floración, en el caso de las plantas, cultivadas bajo condiciones T1 y T2. Esta relación fue mayor en un 50%, para el tratamiento T2 comparada con la obtenida para T1, con la diferencia en el tiempo de desarrollo, ya que las plantas del tratamiento 2 tardaron 30 días más en lograr el mismo estado fenológico (floración). Con base en los resultados obtenidos, se podría sugerir la siembra de *Lippia alba*, bajo condiciones de media sombra, ya que bajo estas condiciones se logró obtener una mayor cantidad del AE.

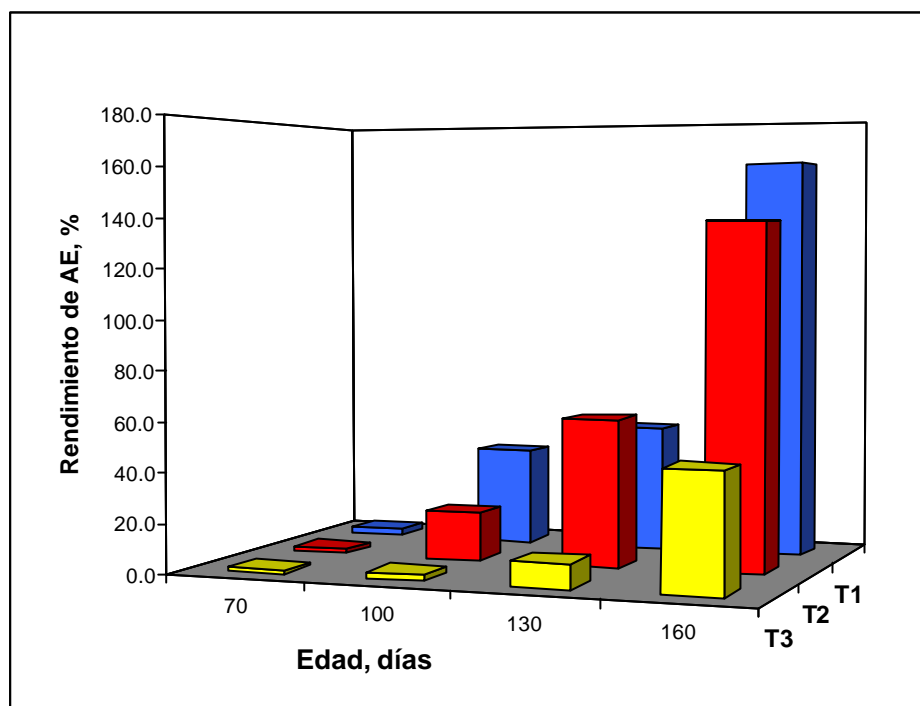


Figura 32. Relación del rendimiento de aceite esencial Vs biomasa de las plantas de *Lippia alba*, cultivadas bajo tres niveles de intensidad lumínica, en función del periodo de su crecimiento (días).

4. CONCLUSIONES

- El rendimiento del AE de *Lippia alba*, varió con el desarrollo de la planta, encontrándose, que durante el periodo de floración, fue el momento en el cual se logró obtener la mayor cantidad de AE. Para este periodo, las plantas cultivadas bajo condiciones T2 (media sombra), fueron las que presentaron el mayor rendimiento de AE, durante el primer ciclo reproductivo de *Lippia alba*.
- Todas las esencias obtenidas de tallos y hojas de *Lippia alba*, por MWHD, presentaron como componentes mayoritarios la carvona (40-49%), el limoneno (16-32%), el biciclosesquifelandreno (8-13%), la piperitenona (5-8%), la piperitona (2-3%) y el β -bourboneno (1-2%).
- El mayor efecto de la época de cosecha e intensidad lumínica, sobre la composición química de los aceites esenciales de *Lippia alba*, extraídos por MWHD, fue de tipo cuantitativo, ya que la concentración ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de MV) de los componentes principales en el aceite, varió con el desarrollo de las plantas y la cantidad de luz incidente. El cultivo T2 (50% IL), mostró ser el más eficiente, puesto que las plantas de *L. alba*, bajo estas condiciones, lograron una mayor acumulación de metabolitos secundarios volátiles de interés (i.e. carvona), en sus órganos (hojas y tallos) y una aceptable producción de biomasa.
- La producción de biomasa en las plantas de *Lippia alba*, se vio afectada por la cantidad de luz recibida y por el estado fenológico de las mismas. Este comportamiento mostró, que existe una relación directa, entre la capacidad fotosintética de la planta y la producción de metabolitos secundarios volátiles (AE), puesto que al disminuir la intensidad lumínica, recibida por las plantas, se decrecen la biomasa seca y el rendimiento de aceite esencial.

- Las plantas de *Lippia alba*, cultivadas bajo los niveles de sombra T2 y T3, modificaron sus características fisiomorfológicas, comparadas con las plantas “testigo” (T1), ampliando su capacidad fotosintética, al incrementar el área foliar y grosor de la hoja con la reducción en la intensidad lumínica, es decir, presentaron plasticidad positiva en respuesta al estrés lumínico.

- La tasa de crecimiento relativo (TCR) y la tasa de asimilación neta (TAN) dependieron del estado fenológico de las plantas de *Lippia alba*. En las primeras etapas del ciclo vegetativo y hasta floración, los valores de TCR y TAN fueron mayores comparados con los obtenidos en las demás etapas fenológicas, ya que a medida que las plantas de *Lippia alba* se desarrollan, se incrementa gradualmente la cantidad de los tejidos no asimilatorios, los cuales no contribuyen en la fijación de CO₂ por parte de las plantas.

- Las plantas de *Lippia alba*, cultivadas bajo condiciones T2 (50% IL), resultaron ser las más productivas durante el periodo floración, ya que durante esta etapa, se logró obtener el mayor rendimiento de AE, con una buena producción de biomasa. Una de las razones por las cuales este cultivo presentó el comportamiento observado, se basa en un manejo más eficaz del contenido de agua en las plantas, como consecuencia de la sombra proporcionada. Con este trabajo se pudo establecer que *Lippia alba* presenta una amplia adaptación a niveles intermedios de sombra y habilidad para ser cultivada en asociación.

5. RECOMENDACIONES

- Establecer cultivos experimentales tecnificados a escala piloto, para la extracción de aceite esencial de *Lippia alba*, junto con otras especies promisorias y realizar el estudio de factibilidad económica de su industrialización.
- Para obtener AE de *Lippia alba* de buena calidad a partir de hojas, se recomienda tomar plantas en estado de floración y las hojas con mayor madurez (parte inferior).
- Dado que el aceite esencial de *Lippia alba* colombiano posee un alto contenido de carvona, sería conveniente estudiar la posibilidad de aislar este compuesto mediante técnicas de separación adecuadas (e.g. destilación fraccionada) y, de esta manera, obtener un producto con mayor valor agregado.
- Realizar estudios fisiológicos más rigurosos, con mediciones en intervalos de tiempo más cortos, para lograr una mejor interpretación de los datos, teniendo en cuenta otras variables de estudio (e.g. grado de fertilización, estrés hídrico).
- Estudiar organolépticamente el aceite esencial de *Lippia alba* por parte de diferentes expertos internacionales, con el fin de obtener su opinión acerca del producto y su potencial uso en diferentes industrias, i.e. cosmética, de perfumes y/o de alimentos.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. ADAMS, Robert. Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectroscopy. USA: Allured Publishing Corporation, **1995**. 469p.
2. 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.
3. 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.
4. BANDONI, Arnaldo (Ed). Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Argentina: Red de editoriales universitarias, **2000**. p.p. 29-43, 149-171, 197-232.
5. BUCHBAVER, G., et al., Therapeutic properties of essential oils and fragrances, in: TERANISHI, R., BUTTERY, R. G., and SUGISAWA, H., Bioactive volatile compounds from plants. Washington: American Chemical Society Symposium Series, **1993**. p.p. 159-165.
6. CABRA, E., Los aceites esenciales: panorama internacional y el mercado colombiano, Bogotá: Tecnología, Int. Inv. Tec, **1988**. 5: 175.

7. CASTRO H., Aislamiento de R(-)- carvona por derivación química selectiva del aceite esencial de *Lippia alba*. Bucaramanga: Tesis de grado (Química). Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, **2002**. 71p.
8. CENTRE FOR THE PROMOTION OF IMPORTS FROM DEVELOPING COUNTRIES: Market survey on natural ingredients for cosmetics. **2004**. [citada en 18 de enero de 2005]: Disponible en Internet, <http://www.cbi.nl/show.php?file=marketinforesults.html&action>.
9. DOMÍNGUEZ, A. X., Métodos de investigación fitoquímica, México: Limusa, **1988**. p.p. 229, 239, 281.
10. ENCICLOPEDIA SALVAT DE LAS CIENCIAS, Industria de las esencias y de los perfumes, Barcelona: Salvat, **1972**. 16: 315p.
11. FUND FOR RESEARCH INTO INDUSTRIAL DEVELOPMENT, GROWTH AND EQUITY (FRIDGE), Essential oils industry and market analysis. South Africa: **2004**. [citada en 20 de enero de 2005]: Disponible en Internet, <http://www.nedlac.org.za/research/fridge/aroma/part4/essential.pdf>
12. GALLETI, G. C. and BONAGA, G., Analytical methods in the study of essential oils extraction, separation and identification techniques. *Chimica Acta Turcia*, **1988**. 16: p.p. 291-296.
13. GARCÍA BARRIGA, H. Flora medicinal de Colombia. Botánica médica, 2a Ed., Tercer Mundo, Bogotá. **1992**.
14. GODEFROOT, M. SANDRA P. VERZELE M., New method for quantitative essential oil analysis. *J. Chromatogr.* **1981**. p.p. 203, 325.

15. GROB, R. L., Modern practice of gas chromatography. New York: John Wiley & Sons, **1985**. p.p. 895-897.
16. GÜENTHER, E., The essential oils , New York: Van Nostrand, 1948. 1: 427p.
17. GUPTA, M. P., 270 Plantas medicinales Iberoamericanas. Bogotá: CYTED – SECAB, **1995**. 617p.
18. HUNT, R. Plant growth curves. The functional approach to plant growth analysis. Scotland: Thompson Little, **1982**. 325p.
19. IKAN R., Natural products: a laboratory guide. Boston: Academic Press, **1969**. p.p. 182-191.
20. INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN DE RECURSOS BIOLÓGICOS “ALEXANDER von HUMBOLDT. Biocomercio sostenible: estudio del mercado colombiano de aceites esenciales. Bogotá: **2003**. p.p. 23, 43-54.
21. JARMA, A., BUITRAGO C., GUTIÉRREZ S., Respuesta del crecimiento de la habichuela (*Phaseolus vulgaris*) a tres niveles de radiación incidente. *Revista Comalfi*. **1996**. 26: (3), 62-73.
22. JEAN, F. I. COLLIN, G. LORD, D., Essential oil and microwave extracts of cultivated plants. *Perfumer & Flavorist*. **1992**. 17: (3), 35-41.
23. JENNINGS, W., Analytical gas chromatography. San Diego: Academic Press, **1987**. 259p.

24. JENNINGS, W., SHIBAMOTO, T., Qualitative analysis of flavour and fragrance volatile by capillary glass chromatography. New York: Academic Press, **1980**. 472p.
25. JENSSEN, W., SALISBURY, F. Botánica. México: McGraw Hill 2^a ed, **1988**. p.p. 270-273.
26. KARASEK, F. W., and VIAV, A. C., Topics in chemical instrumentation. GC-MS data system. *J. Chem. Educ.* **1984**. 61: (9), 233A.-236A.
27. KESSLER, A., and BALDWIN, 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.
28. KINGSTON, H. M., JASSIE, L. B., Introduction to microwave sample preparation, theory and practice. Washington: American Chemical Society. **1988**. p.p. 7-31.
29. KOEDAM, A., The influence of some distillation conditions on essential oil composition, in: MARGARIS, N., KOEDAM, A., and VOKOV, D., Aromatic plants: basic and applied aspects. London: Martinus Nijhoff Publishers, **1982**. p.p. 229-236.
30. KOVÁTS, E., Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. *Advan. Chromatogr.* **1965**. 1: 229-247.
31. LAZO, W., Acción antimicótica de algunas plantas chilenas. Boletín Micológico, **1987**. 3: (3), 191.

- 32.LICHTENTHALER, H.K. The 1-Deoxy-(D)-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosíntesis in plants , in: TAIZ L., ZEIGER, E. Plant physiology. Massachusetts: Sinauer Associates, **2002**. p. 288.
- 33.LIKENS, S. T. and NICKERSON, G. B., Detection of certain hop oil constituents in brewing products, in: SANDRA, P., BICCHI C., Capillary gas chromatography in essential oil analysis. New York: Huethig Verlag, **1987**. p. 89.
- 34.LORENZO, D., PAZ, D., DAVIES, P., VILA, R., CAÑIGUERAL, 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.
- 35.LAWRENCE, B., Essential oils 1988-1991. USA: Allured Publishing Corporation, **1993**. p.p. 8, 47.
- 36.McLAFFERTY, F. W. and TURECEK, F., Interpretation of mass spectra. California: University Science Books, **1993**. 374p.
- 37.MEDINA E., Introducción a la ecofisiología vegetal. Washington: Organización de Estados Americanos, **1977**. p.p. 51-59.
- 38.MEMORIAS DEL SEMINARIO TALLER SOBRE ACEITES ESENCIALES. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, **1992**. p.p. 5, 27, 41, 48.
- 39.MESSAGE, G. M., Practical aspects of gas chromatography / mass spectrometry. New York: John Wiley & Sons, **1984**. 351p.
- 40.MUÑOZ, F., Plantas medicinales y aromáticas, estudio, cultivo y procesado. Madrid: Mundi Prensa, **1987**. 365p.

41. NAGASAWA, T., UNEMOTO, K., TSUNEYA, T., and SHIGA, M., A component of peculiar odor in Japanese Spearmint oil, *Koryo*. **1974**. 108: p.p. 45-50.
42. PARÉ, J. R. J., European Patent Application 0485668A1., **1992**.
43. PARÉ, J. R. J., SIGAMIN, M., LAPOINTE, J., US Patent. 5.002.784., **1991**.
44. 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.
45. POOLE, C. F., and POOLE S. K., Chromatography today. Amsterdam: Elsevier, **1991**. 1026p.
46. RÖDEL, W., WÖLM, G., A guide to gas chromatography. New York: Huethig Verlag, **1987**. 211p.
47. SALISBURY, F., ROSS, C. Fisiología vegetal. México: Iberoamérica C.V. 4ª ed, **1994**. p.p. 71-97, 280-287.
48. SANDRA, P., BICCHI C., Capillary gas chromatography in essential oil analysis. New York: Huethig Verlag, **1987**. 435p.
49. SENATORE, F., RIGANO, D. Essential oil of two *Lippia* spp. (Verbenaceae) growing wild in Guatemala, *Flavour Fragr. J.*, **2001**. 16: (3), 169-171.
50. SKOOG, D., LEARY J., Análisis instrumental. España: McGraw Hill, **1994**. p.p 491-527.

51. STASHENKO, E., COMBARIZA, Y., PUERTAS, M. A., Aceites esenciales: técnicas de extracción y análisis. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, **1998**.
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. STASHENKO, E., QUIROZ, N., MARTINEZ, J. R. HRGC/FID/NPD and HRGC/MSD study of Colombian ylang-ylang (*Cananga odorata*) oils obtained by different extraction techniques. *J. High Resol. Chromatogr.* **1996**. 19: 353-358.
54. STASHENKO, E.E., CERVANTES, M., COMBARIZA, M.Y., FUENTES, H., MARTÍNEZ, J.R. HRGC/FID and HRGC/MSD analysis of the secondary metabolites obtained by different extraction methods from *Lepechinia schiedeana*, and *in vitro* evaluation of its antioxidant activity. *J. High Resol. Chromatogr.* **1999**. 22: 343-349.
55. STASHENKO, E.E., TORRES, W., MARTÍNEZ, J.R. A study of the compositional variation of the essential oil of ylang-ylang (*Cananga odorata* Hook Fil. Et Thomson, *forma genuina*) during flower development. *J. High Resol. Chromatogr.* **1995**. 18: 101-104.
56. TAIZ L., ZEIGER, E. Plant physiology. Massachusetts: Sinauer Associates, **2002**. p.p. 171-192, 285-290.
57. THE CHEMICAL MARKETING REPORTER. New York: 80 Broad Street, **2002**. 100004-2203.

58. TISSERAND, R., BALACS T. and CLOWELL, J., Essential oil safety, a guide for health care professionals. London: Churchill Livingstones, **1999**. p.p. 186.
59. TRAPP, S., and CROTEAU, R. Defensive resin biosynthesis in conifers. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **2001**. 52: 689-724.
60. VERSTEGEN, A., SWARTS, H., CANSEN, B. And GROOT, A., Total synthesis of (-)-Ambrox from S(+)-Carvone (Part 6). *Tetrahedron*. **1994**. 50: 10095.
61. 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.