

**EFFECTO DE UN PRE-TRATAMIENTO ENZIMÁTICO EN LA EXTRACCIÓN DEL  
ACEITE ESENCIAL DE *Lippia origanoides***

**GUSTAVO ADOLFO RODRÍGUEZ CARREÑO**

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

**2014**

**EFFECTO DE UN PRE-TRATAMIENTO ENZIMÁTICO EN LA EXTRACCIÓN DEL  
ACEITE ESENCIAL DE *Lippia organoides***

**GUSTAVO ADOLFO RODRÍGUEZ CARREÑO**

**Tesis de grado para optar al título de Químico**

**DIRECTORES:**

**ELENA E. STASHENKO, Química, Ph.D.**

**JAIRO RENÉ MARTÍNEZ, Químico, Ph.D.**

**CO-DIRECTOR:**

**RODRIGO G. TORRES SÁEZ, Bioquímico, Ph.D.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE QUÍMICA**

**BUCARAMANGA**

**2014**

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar a mis padres José Vicente Y Martha Liliana, por brindarme todo su apoyo, comprensión y confianza durante este largo camino, y guiarme por buenos pasos.

A los Doctores Elena Stashenko y Jairo René Martínez, por todas sus enseñanzas que me permitieron crecer no solo como científico sino como persona.

A mis amigos más cercanos Laura, Giohanna, Eliza, Diana, Jesica, Eduard, Laura Joya, que han estado hay en todo momento para apoyarme y darme ánimos para continuar; con quienes he pasado muchos de los momentos más memorables y alegres de mi vida.

A mis compañeros de laboratorio, especialmente a Yuri, Cori y Silvita, por su apoyo incondicional y el conocimiento que me aportaron.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
1. INTRODUCCIÓN.....	15
2. MARCO REFERENCIAL .....	17
2.1 Aceites esenciales.....	17
2.1.1 Composición química de un aceite esencial.....	18
2.1.2 Terpenos .....	18
2.2 <i>Lippia origanoides</i> .....	19
2.2.1 Aceite esencial de <i>L. origanoides</i> .....	20
2.3 Enzimas.....	22
2.3.1 Mecanismo de acción de las enzimas .....	22
2.3.2 Factores que afectan la actividad de una enzima .....	23
2.4 Enzimas utilizadas.....	24
2.4.1 Celulasa .....	24
2.4.2 <i>endo</i> - $\beta$ -Glucanasa .....	26
2.5 Técnica de extracción.....	26
2.5.1 Hidrodestilación asistida por radiación de microondas.....	26
2.6 Técnicas instrumentales de análisis .....	27
2.6.1 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas .....	27
2.6.2 Cromatografía de gases con detector de ionización en llama .....	28
3. CIENCIOMETRÍA .....	29
4. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	32
4.1 Reactivos, materiales y equipos de laboratorio .....	32
4.2 Material vegetal .....	33
4.3 Pre-tratamiento enzimático.....	33

4.4 Obtención del aceite esencial.....	35
4.4.1 Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas .....	35
4.5 Preparación de la muestra para el análisis cromatográfico. ....	37
4.6 Análisis cromatográfico .....	37
4.6.1 Análisis por GC-MS .....	37
4.6.2 Análisis por GC-FID.....	40
5. ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	43
5.1 Análisis comparativo.....	43
5.1.1 Análisis de costos.....	50
5.2 Caracterización química de los aceites esenciales .....	50
5.2.1 Análisis de los componentes principales (PCA) del AE extraído bajo diferente tratamiento enzimático.....	67
6. CONCLUSIONES .....	70
7. RECOMENDACIONES.....	72
8. BIBLIOGRAFÍA.....	73

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> <i>Lippia origanoides</i> . Fuente: Fotografía tomada por el autor en el CENIVAM, UIS – Bucaramanga, el 16 de agosto de 2014. ....	19
<b>Figura 2.</b> Hidrólisis enzimática de la celulosa tomado de: [Nidetzky y Steiner, 1993].....	25
<b>Figura 3.</b> Gráfica representativa del número de publicaciones relevantes encontradas Vs año de publicación. Fuente: <i>Scopus (Elsevier)</i> . Periodo de observación: 1994 – 2014. Fecha de consulta: 15 de agosto de 2014. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (“ <i>Enzyme-assisted extraction</i> ” and “ <i>oil</i> ”) .....	30
<b>Figura 4.</b> Montaje de MWHD empleado en el laboratorio: A. Equipo completo; B. Balón con material vegetal; C. Reservorio tipo trampa <i>Dean – Stark</i> ; D. Condensadores de bolas y de espiral. Foto: tomada por el autor en el CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 16 de agosto de 2014 .....	36
<b>Figura 5.</b> Equipo de GC-MS utilizado en la investigación. Fotografía tomada por el autor en el Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas CROM-MASS, UIS – Bucaramanga, el 23 de agosto de 2014. ....	38
<b>Figura 6.</b> Equipo de GC-FID utilizado en el presente trabajo. Fotografía tomada por el autor en el Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas CROM-MASS, UIS – Bucaramanga, el 28 de agosto de 2014. ....	41
<b>Figura 7.</b> Rendimiento de extracción del aceite esencial para cada tratamiento enzimático. Superior: vista en tres dimensiones; inferior: vista del eje z. ....	49
<b>Figura 8.</b> Curva de calibración para el timol obtenida por GC-FID.....	52
<b>Figura 9.</b> Curva de calibración para el carvacrol obtenida por GC-FID.....	52
<b>Figura 10.</b> Perfil cromatográfico típico del aceite esencial de <i>L. origanoides</i> , quimiotipo Timol. Columna apolar (DB-5MS) por GC-MS.....	53

<b>Figura 11.</b> Variación en la concentración de los componentes mayoritarios en los aceites esenciales extraídos con tratamiento enzimático con Viscozyme <sup>®</sup> , con tiempos de incubación de 30 y 60 min. ....	62
<b>Figura 12.</b> Variación en la concentración de los componentes mayoritarios en los aceites esenciales extraídos con tratamiento enzimático de tiempo de incubación de 90, y variación de la concentración de timol a diferente tratamiento enzimático con Viscozyme <sup>®</sup> . ....	63
<b>Figura 13.</b> Variación en la concentración de los componentes mayoritarios en los aceites esenciales extraídos con tratamiento enzimático con Celluclast <sup>®</sup> , con tiempos de incubación de 30 y 60 min. ....	65
<b>Figura 14.</b> Variación en la concentración de los componentes mayoritarios en los aceites esenciales extraídos con tratamiento enzimático de tiempo de incubación de 90, y variación de la concentración de timol a diferente tratamiento enzimático con Celluclast <sup>®</sup> . ....	66
<b>Figura 15.</b> Análisis de los componentes principales (PCA) del AE extraído bajo diferente tratamiento enzimático. ....	67

## LISTADO DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Generalidades de la planta <i>Lippia origanoides</i> [Herbario Nacional, N° COL. 519799, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá].....	20
<b>Tabla 2.</b> Identificación y cuantificación de los componentes presentes en los aceites esenciales <i>L. origanoides</i> . [Stashenko <i>et al.</i> 2008].....	21
<b>Tabla 3.</b> Artículos relevantes en la selección de los parámetros del tratamiento enzimático.....	31
<b>Tabla 4.</b> Materiales, reactivos y equipos empleados en el presente estudio.....	32
<b>Tabla 5.</b> Diseño experimental $3^2$ con duplicado en cada punto. ....	34
<b>Tabla 6.</b> Factores y niveles en el diseño experimental $3^2$ .....	43
<b>Tabla 7.</b> Análisis de varianza para la respuesta del diseño experimental enzima Viscozyme®. A: Concentración de enzima; B: Tiempo de incubación; GL: Grados de libertad; CM: Cuadrado medio o varianza. El valor F umbral se calculó con un nivel de confianza del 95%. ....	44
<b>Tabla 8.</b> Análisis de varianza para la respuesta del diseño experimental enzima Celluclast®. A: Concentración de enzima; B: Tiempo de incubación; GL: Grados de libertad; CM: Cuadrado medio o varianza. El valor F umbral se calculó con un nivel de confianza del 95%.....	44
<b>Tabla 9.</b> Resultados del rendimiento de extracción del AE en cada tratamiento enzimático con Viscozyme® .....	45
<b>Tabla 10.</b> Resultados del rendimiento de extracción del AE en cada tratamiento enzimático con Celluclast® .....	47
<b>Tabla 11.</b> Producción de AE y ganancia por hectárea en los dos primeros años del cultivo.....	50
<b>Tabla 12.</b> Índices de retención en columnas polar y apolar, de los compuestos presentes en el aceite esencial de <i>L. origanoides</i> (quimiotipo timol), del experimento 1 al 5. ....	54

<b>Tabla 13.</b> Índices de retención en columnas polar y apolar, de los compuestos presentes en el aceite esencial de <i>L. origanoides</i> (quimiotipo timol), del experimento 6 al 10. ....	55
<b>Tabla 14.</b> Índices de retención en columnas polar y apolar, de los compuestos presentes en el aceite esencial de <i>L. origanoides</i> (quimiotipo timol), del experimento 11 al 15. ....	56
<b>Tabla 15.</b> Índices de retención en columnas polar y apolar, de los compuestos presentes en el aceite esencial de <i>L. origanoides</i> (quimiotipo timol), del experimento 16 al 20. ....	58
<b>Tabla 16.</b> Composición del aceite esencial de <i>L. origanoides</i> (quimiotipo timol), obtenido en los experimentos 21 y 22. ....	60

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

<b>AE</b>	Aceite(s) esencial(es)
<b>CENIVAM</b>	Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales
<b>D.I.</b>	Diámetro interno
<b>d<sub>f</sub></b>	Espesor de la fase estacionaria
<b><i>et al</i></b>	<i>Et alii</i> ( y otro)
<b>f.e.</b>	Fase estacionaria
<b>FID</b>	<i>Flame Ionization Detector</i> (Detector de ionización en llama)
<b>GC</b>	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases)
<b>IRL</b>	Índice de retención lineal
<b>Istd</b>	<i>Internal Standard</i> (Patrón interno)
<b><i>m/z</i></b>	Relación masa/carga
<b>MS</b>	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas)
<b>MWHD</b>	<i>Microwave-assisted hydrodistillation</i> ( Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas)
<b>TIC</b>	<i>Total Ion Current</i> (Corriente iónica total)
<b>t<sub>R</sub></b>	Tiempo de retención
<b>UIS</b>	Universidad Industrial de Santander

## RESUMEN

**TITULO:** EFECTO DE UN PRE-TRATAMIENTO ENZIMÁTICO EN LA EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE *Lippia origanoides*\*.

**AUTOR:** Gustavo Adolfo Rodríguez Carreño\*\*

**PALABRAS CLAVE:** Tratamiento enzimático, celulasa, *Lippia origanoides*, Celluclast, Viscozyme.

Con el fin de incrementar la producción (rendimiento) del aceite esencial al momento de su extracción, en los últimos años, se ha implementado el uso de enzimas capaces de degradar o hidrolizar la pared celular, ello permitió aumentar el rendimiento del aceite esencial, tal como lo reportan Hosni y colaboradores (2013) para el tomillo (*Thymus capitatus*).

En este trabajo de investigación, se evaluó el efecto del pretratamiento enzimático con la enzima Viscozyme® y Celluclast®, sobre el rendimiento y la composición química del aceite esencial (AE) de *Lippia origanoides*, quimiotipo timol; el tratamiento enzimático se llevó a cabo con el material vegetal seco y picado a un pH de 4,5 en una solución *buffer*, con una temperatura de incubación de 50 °C, variando la concentración de enzima (0,1 , 0,5 y 1%) y el tiempo de incubación ( 30, 60 y 90 minutos); posterior al tratamiento enzimático, se realizó la extracción del aceite esencial mediante hidrodestilación asistida por la radicación de microondas (MWHD). La caracterización de los aceites se llevó a cabo por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS); la cuantificación se realizó por cromatografía de gases con detector de ionización en llama (GC-FID).

Los resultados obtenidos evidenciaron que los tratamientos enzimáticos incrementaron el rendimiento de extracción del aceite esencial con respecto al blanco de extracción de 24%, para Viscozyme®, y 24,9%, para Celluclast®, en el tratamiento con la enzima en concentración de 0,1% y el tiempo de incubación 90 min. Con respecto a la composición química, con base en sus espectros de masas ( EI, 70eV) e índices de retención se identificaron y cuantificaron 24 compuestos; los mayoritarios fueron el timol, carvacrol y óxido de cariofileno, su concentración con respecto al blanco se incrementó hasta un 14,1%, 28,8% y 13,6%, respectivamente.

---

\* Trabajo de grado

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directores: Elena Stashenko, Química, Ph.D. y Jairo René Martínez, Químico, Ph.D.. Codirector: Rodrigo G. Torres Sáez, Bioquímico, Ph.D.

## ABSTRACT

**TITLE: EFFECT OF A ENZYMATIC PRETREATMENT ON THE EXTRACTION OF ESSENTIAL OIL FROM *Lippia organoides*\***.

**AUTHOR:** Gustavo Adolfo Rodríguez Carreño \*\*

**KEYWORDS:** Enzyme treatment, cellulase, *Lippia organoides*, Celluclast, Viscozyme.

In order to increase production (throughput) of the essential oil in the extraction process, it has been implemented the use of enzymes capable to degrade or hydrolyze the cell wall. This has increased the essential oil yield extraction as reported previously for thyme (*Thymus capitatus*) by Hosni *et al.* 2013.

The aim of this research was to evaluate the effect of an enzymatic pretreatment with two enzymes (Celluclast® and Vizcozyme®) on the yield and chemical composition of the essential oil (EO) from *Lippia organoides*, thymol chemotype. The enzymatic treatment was carried out in dried and grounded plant material dissolved in a buffer solution at pH 4.5. The solution was incubated to 50°C. The concentrations of enzyme evaluated were 0.1, 0.5 and 1% and the incubation times were 30, 60 and 90 min. After the enzyme treatment, the extraction of the EO was performed by microwave-assisted hydro-distillation (MWHD). The characterization of the EO was carried out by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The quantification was performed by gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID).

The results obtained showed that, comparing to the control treatment, the enzymes increased the extraction yield of the essential oil in 24% using Viscozyme®, and 24.9% for Celluclast®. This was obtained at concentration of 0,1% of enzyme and 90 min of incubation time. With regard to chemical composition, 24 compounds were identified and quantified based on their mass spectra (EI, 70eV) and linear retention indexes. The main compounds were thymol, carvacrol and caryophyllene oxide. Comparing to the control, the concentration of this substances increased 14.1, 28.8 and 13.6%, respectively.

---

\* College thesis

\*\* Science Faculty. School of Chemistry. Directed by Elena Stashenko, Química, Ph.D. y Jairo René Martínez, Químico, Ph.D.. Codirector: Rodrigo G. Torres Sáez, Bioquímico, Ph.D.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enzimas son catalizadores biológicos que actúan sobre una gran cantidad de reacciones, acelerándolas. Existe una gran variedad de enzimas y cada una de ellas ejerce su actividad sobre un sustrato específico [Tortora *et al.*, 2007], como es el caso de la enzima celulasa, que interviene en la hidrólisis enzimática de la celulosa, un biopolímero que se encuentra principalmente en las paredes celulares de las plantas y es el carbohidrato más ampliamente extendido [Beyer *et al.*, 1987]. La enzima *endo*- $\beta$ -glucanasa lleva a cabo su actividad sobre los enlaces glucosídicos (1-4 y 1-3) de los  $\beta$ -glucanos y ayuda a romper las fibras de celulosa.

Con el fin de incrementar la liberación del aceite esencial al momento de su extracción, se ha implementado el uso de enzimas capaces de degradar o hidrolizar la pared celular y algunas de ellas capaces de romper los enlaces glucosídicos, lo que incrementa notablemente el rendimiento del aceite esencial, como reportan Hosni y colaboradores para el estudio del tomillo (*Thymus capitatus*) [Hosni *et al.*, 2013]. Esta aplicación no sólo se ha realizado en hojas, también, se ha hecho el tratamiento enzimático en cáscaras de mandarina [Mishira *et al.*, 2005], ajo [Sowbhagya *et al.*, 2009] y semillas de comino [Sowbhagya *et al.*, 2011]: reportando un incremento considerable en la extracción del aceite esencial.

En esta investigación, se realizó un estudio de la influencia de un pre-tratamiento enzimático en el rendimiento y la composición química del aceite esencial (AE) de *Lippia origanoides* (quimiotipo timol). El AE se obtuvo del material vegetal seco (hojas y tallos), por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWH); la caracterización del AE se realizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y la cuantificación de los componentes mayoritarios por cromatografía de gases con detector de ionización en llama (GC-FID). El tratamiento enzimático se llevó a cabo con dos enzimas comerciales: Viscozyme<sup>®</sup> de Novozymes (*Sigma-Aldrich*, Bucaramanga,

Colombia), y Celluclast<sup>®</sup> de Novozymes (Coldanzimas, Bogotá, Colombia). Se establecieron las mejores condiciones del tratamiento enzimático, tomando como referencia el rendimiento de extracción del aceite esencial y se observó su influencia en la concentración de los componentes mayoritarios.

## **2. MARCO REFERENCIAL**

### **2.1 Aceites esenciales**

Un aceite esencial o esencia, es una mezcla de metabolitos secundarios de una planta aromática, compuesta generalmente por terpenos, que están asociados o no a otros componentes, la mayoría de ellos volátiles y que generan, en conjunto, el olor de dicho vegetal [Martínez, 2003].

El aceite esencial es una parte importante del metabolismo de una planta y su composición química varía permanentemente, por modificación de las proporciones de sus constituyentes o transformación de unos constituyentes en otros, según la parte de la planta (tallos, hojas, raíces, flores), el momento de su desarrollo o el momento del día [Hüsnü y Buchbauer, 2010].

Cuando se extrae el aceite esencial, debe tenerse en cuenta que dada su compleja composición, presenta una alta probabilidad de sufrir modificaciones fisicoquímicas por reacciones entre sus propios constituyentes o entre éstos y el medio (la luz, la temperatura, presencia de enzimas, los componentes del reservorio donde se almacena la esencia, etc.) [Bandoni, 2002].

**2.1.1 Composición química de un aceite esencial** Los aceites esenciales están fundamentalmente constituidos por terpenos, monoterpenos (diez carbonos) y sesquiterpenos (quince carbonos). Sin embargo, conviene saber que así como existen aceites esenciales compuestos exclusivamente por terpenos (como la trementina), existen aceites esenciales que carecen de ellos (la esencia de almendras, por ejemplo) y están compuestos por derivados bencénicos, fenoles (esencia de clavo), ésteres e hidrocarburos lineales (esencias de frutas), o hasta por componentes difícilmente relacionables con las esencias, como alcaloides, y una gran variedad de compuestos heterocíclicos tales como derivados piridínicos, pirazínicos, sulfuros, aminas, etc. [Bandoni, 2002].

**2.1.2 Terpenos** Los terpenos, o terpenoides, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios. La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas. Dentro de los metabolitos primarios, se encuentran hormonas, carotenoides, clorofilas y plastoquinonas, ubiquinonas y esteroides [Ávalos y Pérez-Urri, 2009].

Los terpenoides suelen ser insolubles en agua y derivan todos ellos de la unión de unidades de isopreno (5 átomos de carbono). De esta forma, los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno ( $C_5$ ) que contienen: los terpenos de  $C_{10}$  contienen dos unidades de isopreno y se llaman monoterpenos; los de  $C_{15}$ , tienen tres unidades de isopreno y se denominan sesquiterpenos, y los  $C_{20}$ , tienen cuatro unidades de isopreno y son los diterpenos. Los triterpenos son  $C_{30}$ , los tetraterpenos son  $C_{40}$  y se habla de politerpenos, cuando contienen más de 8 unidades de isopreno [Ávalos y Pérez-Urri, 2009].

## 2.2 *Lippia origanoides*

En la **Figura 1**, se pueden observar algunas fotos de la *L. origanoides*, en que se pueden apreciar su hoja y su flor.

**Figura 1.** *Lippia origanoides*. Fuente: Fotografía tomada por el autor en el CENIVAM, UIS – Bucaramanga, el 16 de agosto de 2014.



La *Lippia origanoides* H.B.K. es un arbusto delgado muy aromático, alcanza hasta 3 m de altura. Es originaria de algunos países de América Central y América del Sur, especialmente, en la región amazónica (Guayana, Venezuela, Brasil y Colombia). Esta planta se conoce popularmente en el norte de Brasil por los nombres de "Salva de Marajó" y "Alecrim d' Angola", en el estado de Para, donde se utiliza con fines culinarios y medicinales. En México, *L. origanoides* se llama el orégano y la Farmacopea mexicana lo reconoce como un sustituto para el orégano común [Oliveira *et al.*, 2007].

En la **Tabla 1**, se pueden apreciar algunas generalidades de la *L. origanoides*.)

**Tabla 1.** Generalidades de la planta *Lippia origanoides* [Herbario Nacional, N° COL. 519799, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá]

<b>Generalidades</b>	<i>Lippia origanoides</i>
<b>Reino</b>	Plantae
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Lamiales
<b>Familia</b>	Verbenaceae
<b>Género</b>	<i>Lippia</i>
<b>Epíteto específico</b>	<i>origanoides</i>
<b>Autor epíteto específico</b>	Kunth
<b>Determinador</b>	Fernández, J. L.
<b>Hábito</b>	Arbusto

**2.2.1 Aceite esencial de *L. origanoides*** El aceite esencial de *L. origanoides* posee un alto contenido de monoterpenos oxigenados (66,0 %) y bajo contenido de monoterpenos (20,7%), sesquiterpenos (9,0%), y sesquiterpenos oxigenados (1,1%) (Tabla 2). Los dos compuestos principales entre los monoterpenos oxigenados de naturaleza fenólica, son carvacrol (38,6%) y timol (18,5%). También, es importante mencionar a los monoterpenos: *p*-cimeno (10,3%) y  $\gamma$ -terpineno (4,1%), así como el sesquiterpeno *trans*- $\beta$ -cariofileno (5,9%).

El carvacrol se encuentra como el componente principal en los aceites de oréganos comerciales, pero algunas especies y quimiotipos pueden contener principalmente timol. Los monoterpenos *p*-cimeno y  $\gamma$ -terpineno, son precursores biogénicos (a través de la hidroxilación enzimática) de los dos monoterpenos

fenólicos, timol y carvacrol; siempre se encuentran como principales monoterpenos [Oliveira *et al.*, 2007].

**Tabla 2.** Identificación y cuantificación de los componentes presentes en los aceites esenciales *L. origanoides*. [Stashenko *et al.* 2008]

Compuesto	Índice de		Cantidad relativa, %					
	retención lineales		Col_1			Col_2		
	DB-5	DB-WAX	SD E	MWHD	SFE	SD E	MWHD	SFE
$\alpha$ -Tujeno	924	1023	6,9	5,4	5,9	1,5	1,3	1,1
$\alpha$ -Pino	934	1036	2,2	3,1	1,5	tr	tr	tr
Canfeno	952	1060	1,2	2,4	1,0	tr	tr	tr
$\beta$ -Mirreno	990	1164	0,8	2,0	1,0	2,4	2,2	1,5
$\alpha$ -Felandreno + $\Delta^3$ -Careno	1011	1146	5,9	8,7	6,1	tr	tr	tr
$\alpha$ -Terpino	1021	1178	tr	Tr	tr	2,7	2,6	2,2
$\rho$ -Cimeno	1031	1270	12,9	15,7	11,3	10,1	9,5	8,8
Limoneno	1034	1197	4,8	6,9	3,8	tr	Tr	tr
$\beta$ -Felandreno + Eucaliptol	1035	1205	8,0	6,8	10,9	tr	Tr	tr
$\gamma$ -Terpino	1066	1244	1,4	1,9	2,4	8,2	10,0	6,9
Linalol	1102	1545	1,9	2,9	1,6	tr	Tr	tr
Terpino-4-ol	1191	1606	2,9	1,1	0,8	1,6	0,8	0,5
Timol	1297	2181	1,0	2,2	1,2	7,3	14,3	8,8
Carvacrol	1316	2212	tr	Tr	tr	46,5	44,4	51,8
<i>trans</i> - $\beta$ -Cariofileno	1436	1610	7,4	9,4	16,0	3,4	2,7	3,5
$\alpha$ -Humuleno	1471	1683	4,7	5,7	7,6	2,0	1,5	1,8

SDE: *Simultaneous distillation-extraction* (Destilación extracción con solvente simultanea).

SFE: *Supercritical fluid extraction* (Extracción con fluido supercrítico)

MWHD: *Microwave-assisted hydrodistillation* (Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas)

## 2.3 Enzimas

Las sustancias, capaces de acelerar una reacción química sin experimentar alteraciones permanentes, se denominan catalizadores. En las células vivas, los catalizadores biológicos son las enzimas. Como compuestos catalizadores, las enzimas son específicas, cada enzima actúa sobre una sustancia específica denominada sustrato y cataliza exclusivamente una reacción. La molécula de enzima tridimensional posee un sitio activo, es decir, una región que interactúa con una sustancia química específica [Tortora *et al.*, 2007].

Algunas enzimas están compuestas exclusivamente por proteínas; la mayoría de ellas, consiste en una fracción proteica llamada apoenzima, y una fracción no proteica llamada cofactor; si el cofactor es una molécula orgánica, se denomina coenzima. Las apoenzimas no poseen actividad propia y deben ser activadas por cofactores. Las coenzimas pueden colaborar con la enzima mediante la aceptación de átomos provenientes del sustrato o a través de la donación de los átomos que necesita el sustrato. Algunas coenzimas actúan como transportadoras de electrones; estos compuestos extraen electrones del sustrato y los donan a otras moléculas en reacciones ulteriores [Tortora *et al.*, 2007].

**2.3.1 Mecanismo de acción de las enzimas** Las enzimas reducen el umbral de activación cinético de las reacciones químicas. La secuencia general del mecanismo de acción de las enzimas es la siguiente [Tortora *et al.*, 2007]:

- La superficie del sustrato entra en contacto con una región específica de la enzima, llamada sitio activo.
- Se forma un compuesto intermedio transitorio llamado complejo enzima-sustrato.

- La molécula de sustrato se transforma como consecuencia del reordenamiento de los átomos pre-existentes, la degradación del sustrato o la combinación con otras moléculas de sustrato.
- Las moléculas de sustrato transformadas, es decir, los productos de la reacción, son liberadas por la molécula de enzima, porque ya no encajan en el sitio activo de la enzima.
- La enzima inalterada queda en libertad para reaccionar con otra molécula de sustrato.

**2.3.2 Factores que afectan la actividad de una enzima** La actividad de una enzima depende de diversos factores; los más importantes son la temperatura, el pH, la concentración de sustrato y la presencia o ausencia de inhibidores.

**Temperatura:** la velocidad de la mayoría de las reacciones químicas aumenta a medida que aumenta la temperatura. Sin embargo, en el caso de las reacciones enzimáticas, todo aumento de temperatura, más allá de cierto valor, reduce significativamente la velocidad de reacción. Por ejemplo, la temperatura óptima para las enzimas presentes en el cuerpo humano está entre 25 y 40°C; la disminución de la actividad más allá de esta temperatura se debe a la desnaturalización de la enzima [Tortora *et al.*, 2007].

**pH:** para la mayoría de las enzimas existe un pH óptimo que se asocia con una actividad enzimática máxima. Por arriba o por debajo de este pH, la actividad enzimática disminuye y con esta, la velocidad de reacción. La concentración muy marcada de H<sup>+</sup> (pH) del medio altera la estructura tridimensional de la proteína; los cambios extremos de pH pueden desnaturalizar la proteína [Tortora *et al.*, 2007].

**Concentración de sustrato:** existe una velocidad máxima a la cual la enzima puede catalizar una reacción específica. Para que se pueda alcanzar esta velocidad máxima, se necesita que la concentración de sustrato sea elevada. En presencia de una concentración elevada de sustrato se considera que la enzima

se encuentra saturada, es decir, su sitio activo está ocupado en todo momento por moléculas de sustrato o de producto enzimático [Tortora *et al.*, 2007].

## 2.4 Enzimas utilizadas

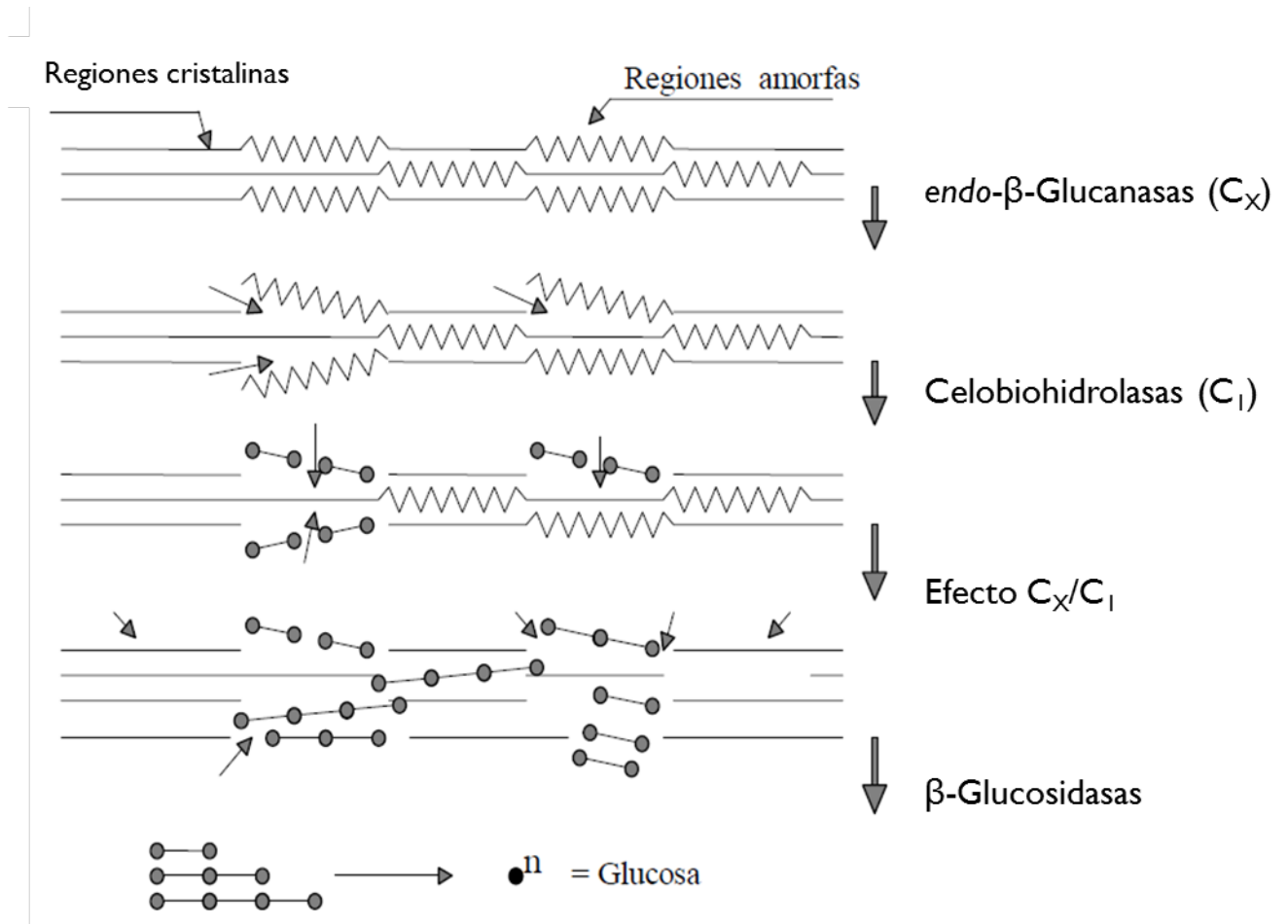
En el presente estudio, se emplearon dos enzimas, la primera, conocida comercialmente como Viscozyme<sup>®</sup> de Novozymes (*Sigma-Aldrich*, Bucaramanga, Colombia), en la cual la actividad enzimática es proporcionada por endo- $\beta$ -glucanasa. La segunda enzima, conocida comercialmente como Celluclast<sup>®</sup> de Novozymes (Coldanzimas, Bogotá, Colombia), en la cual la actividad enzimática se debe a la celulasa.

**2.4.1 Celulasa** El mecanismo propuesto en la literatura [Ovando-Chacón y Waliszewski, 2005] para la degradación de la celulosa puede resumirse en tres etapas: Primero, la endo- $\beta$ -1,4-glucanasa o endocelulasa (Cx) actúa al azar sobre los enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídicos internos presentes entre las unidades de glucosa que forman la molécula de la celulosa, y convierte las cadenas largas a oligosacáridos, los cuales mantienen la configuración  $\beta$  de su estructura. La acción de esta enzima se realiza sobre las regiones amorfas de la molécula de celulosa, y tiene como resultado la disminución de su longitud y la creación de nuevos extremos reactivos, que sirven de sustrato para la posterior acción de la celobiohidrolasa (C1).

En la segunda etapa, actúa la exo- $\beta$ -1,4-glucanasa o celobiohidrolasa (C1), la cual es una enzima que corta la cadena 1,4- $\beta$ -D-glucano a partir del extremo no reductor de la molécula de celulosa y de las celodextrinas, lo que provoca la remoción de unidades de celobiosa o glucosa. Ambas enzimas, endoglucanasa y exoglucanasa, se inhiben por uno de los productos de la hidrólisis enzimática, la celobiosa, lo que disminuye la eficiencia de la hidrólisis [Ovando-Chacón y Waliszewski, 2005]

Una vez degradadas las zonas amorfas de la celulosa, tiene lugar la tercera etapa de la hidrólisis, en donde la región cristalina comienza a ser hidrolizada, como resultado de la acción sinérgica de la endoglucanasa y la exoglucanasa. Finalmente, una etapa que limita la degradación de la celulosa es la hidrólisis de la celobiosa a glucosa mediante la acción de la  $\beta$ -1,4-glucosidasa o celobiasa Cb, porque las glucanastas son inhibidas por la celobiosa: a mayor concentración de celobiosa, la actividad enzimática es menor. [Ovando-Chacón y Waliszewski, 2005].

**Figura 2.** Hidrólisis enzimática de la celulosa tomado de: [Nidetzky y Steiner, 1993].



**2.4.2 endo- $\beta$ -Glucanasa** Comercializada con el nombre de Viscozyme<sup>®</sup>, la endo- $\beta$ -1,4-glucanasa o endocelulasa (Cx), actúa al azar sobre los enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos internos presentes entre las unidades de glucosa que forman la molécula de la celulosa, y convierte las cadenas largas a oligosacáridos, los cuales mantienen la configuración  $\beta$  de su estructura. La acción de esta enzima se realiza sobre las regiones amorfas de la molécula de celulosa, y tiene como resultado la disminución de la longitud de la cadena de celulosa.

## 2.5 Técnica de extracción

**2.5.1 Hidrodestilación asistida por radiación de microondas** La hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHD) se basa en el mismo principio de métodos de extracción como la destilación por arrastre con vapor o hidrodestilación simple; el equipo utilizado en el laboratorio es tipo *Clevenger* con reservorio de destilación *Dean-Stark* adaptado a un sistema de calentamiento por radiación de microondas en un horno de microondas doméstico con un orificio lateral; a través del orificio se conecta al reservorio *Dean-Stark* en el exterior un matraz de fondo redondo con el material vegetal y agua dentro del horno [Stashenko *et al.*, 2004].

El equipo *Clevenger* (Günther, 1948) es usado en muchos laboratorios y es considerado, en varios estándares internacionales, como el más adecuado para la extracción del aceite esencial de una planta aromática. Está compuesto de un balón, en el que se deposita la materia prima molida y una cantidad conocida de agua pura, que se somete a calentamiento; el aceite esencial con el agua presente se evapora continuamente. Un condensador va acoplado al balón y una conexión en forma de D, permite acumular y separar el aceite esencial de la mezcla condensada. El hidrolato condensado regresa al balón por el rebose de la conexión [Cerpa Chávez, 2007].

El rendimiento (p/p) se mide con relación al material vegetal seco utilizado en la extracción y el aceite esencial obtenido, empleando la ecuación N° 1:

$$\text{Rendimiento} = (P_{AE}/P_{mv}) * 100 \qquad \text{Ecuación N° 1}$$

Donde,  $P_{AE}$  es el peso del AE y  $P_{mv}$  es el peso del material vegetal

## 2.6 Técnicas instrumentales de análisis

Para la identificación y cuantificación de los metabolitos secundarios se requiere el uso de algunos métodos instrumentales de separación e identificación. En el presente estudio se utilizó la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) para llevar a cabo la caracterización del aceite esencial y la cromatografía de gases con un detector de ionización en flama (GC-FID) para realizar la cuantificación de los compuestos del aceite esencial.

**2.6.1 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas** La cromatografía es una potente técnica analítica que puede separar los componentes de una muestra y al mismo tiempo, determinar sus concentraciones. Las separaciones cromatográficas utilizan repartos selectivos de los componentes de la muestra entre una fase estacionaria que permanece inmobilizada en el interior de la columna y una fase móvil que atraviesa esta columna, los componentes van siendo retardados dentro de la columna dependiendo de la solubilidad o afinidad que estos tengan con la fase estacionaria y la fase móvil [Karasek y Clement, 1988].

El principio de operación de la espectrometría de masas (MS), se fundamenta en la generación de iones moleculares cargados positivamente y fragmentos de moléculas, provenientes de la columna GC, mediante diferentes métodos de ionización. Los iones fragmento producidos, entran al filtro de masas, donde se

separan según su relación masa/carga ( $m/z$ ). Después de la detección de los iones con un electromultiplicador, se obtiene la corriente iónica total (TIC), y con ésta el cromatograma, que suministra información sobre el tiempo de retención ( $t_R$ ) de cada compuesto, su abundancia y su espectro de masas, consistente con sus patrones de fragmentación únicos [Karasek y Clement, 1988].

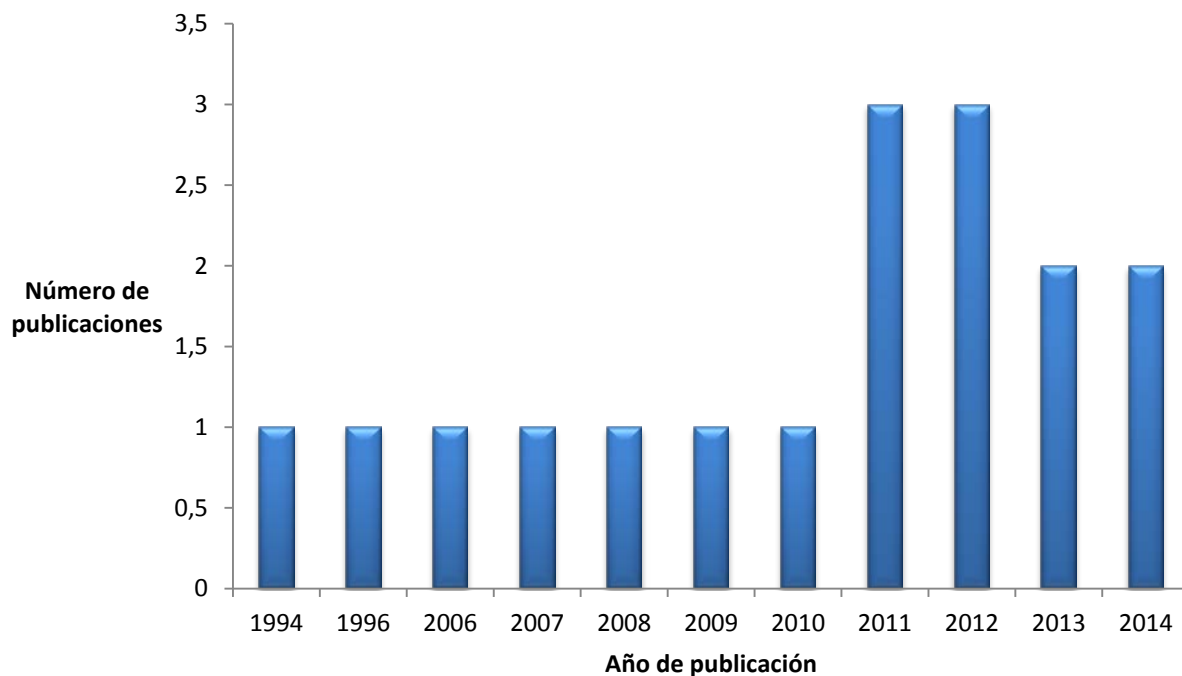
**2.6.2 Cromatografía de gases con detector de ionización en llama** El FID es el detector de GC más ampliamente usado, y es un ejemplo de los detectores de ionización inventado específicamente para GC. El efluente de la columna se mezcla con hidrógeno y conducido a una pequeña punta del quemador que está rodeado por un alto flujo de aire para mantener la combustión, los compuestos orgánicos desintegrados en la llama producen iones y electrones que pueden conducir electricidad a través de la llama; la corriente producida se mide y se usa para cuantificar los compuestos orgánicos presentes. La señal es aproximadamente proporcional al contenido de carbono, dando lugar a la denominada regla de carbono por igual, un factor de respuesta constante que puede ser debido a la conversión de todos los átomos de carbono en un soluto orgánico en el proceso de combustión. Este detector tiene la ventaja de ser altamente sensible, pues es capaz de dar una respuesta hasta cantidades de compuesto de 1 ng, tener alta relación señal/ruido y presentar un rango lineal de respuesta largo ( $10^7$  unidades) [McNair y Miller, 2009].

### 3. CIENCIOMETRÍA

La cienciometría es una herramienta que permite situar a un país, una institución, un área temática o un individuo en el contexto mundial de la productividad científica. Este proceso sistemático emplea, como herramientas bases de datos y buscadores de *internet* que ayudan en el proceso de investigación y organización de la información [Rossi y Delfino, 2005].

Con el fin de conocer y analizar el estado actual de las investigaciones sobre el estudio de la influencia de un pre-tratamiento enzimático, previo a la destilación, en el rendimiento y composición del aceite esencial, se realizó un estudio cienciométrico empleando la base de datos *Elsevier Scopus* (recursos disponibles dentro del *campus* de la UIS), se utilizó la ecuación de búsqueda TITLE-ABS-KEY ("*Enzyme-assisted extraction*" and "*oil*"), realizando la búsqueda en todos los años y todas la áreas. Se encontraron 17 publicaciones (**Figura 3**). Fecha de consulta fue el 15 de agosto de 2014.

**Figura 3.** Gráfica representativa del número de publicaciones relevantes encontradas Vs año de publicación. Fuente: *Scopus (Elsevier)*. Periodo de observación: 1994 – 2014. Fecha de consulta: 15 de agosto de 2014. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (“*Enzyme-assisted extraction*” and “*oil*”)



En la **Tabla 3**, se describen algunos estudios relacionados con la ecuación de búsqueda realizada en la base de datos *SciVerse Scopus*, en los que se observan el año de publicación y el autor principal, el título y el resumen del trabajo.

**Tabla 3.** Artículos relevantes en la selección de los parámetros del tratamiento enzimático.

Año de publicación y autor principal	Título	Resumen
<b>2005, Mishira</b>	Aqueous enzyme extraction of oil from mandarin peels	Las cáscaras fueron pre-tratadas con enzima xilnasa variando su concentración de 0,1% a 0,3%. El aceite esencial se recuperó de muestras tratadas con enzimas y el aumento en el rendimiento de aceite esencial, en comparación con las muestras control, fue de hasta un 15%.
<b>2009, Sowbhagya</b>	Evaluation of enzyme-assisted extraction on quality of garlic volatile oil	La aplicación de enzimas al ajo antes de la destilación, resultó en un incremento de dos veces del rendimiento del aceite. El rendimiento del aceite, en el caso del pre-tratamiento con celulasa, pectinasa, proteasa y viscozyme, estuvo en el rango de 0,39 a 0,51%, frente a 0,28%, en una muestra de control obtenida por arrastre con vapor.
<b>2011, Sowbhagya</b>	Enzyme-assisted extraction of volatiles from ( <i>Cuminum cyminum</i> L.) seeds.	El rendimiento de aceite, después del pre-tratamiento de las semillas de comino con celulasa, pectinasa, proteasa y viscozyme, estaba en el rango de 3,2 – 3,3% frente al 2,7% en una muestra de control.
<b>2012, Chandran</b>	Effect of enzyme assisted extraction on quality and yield of volatile oil from black pepper and cardamom.	El pre-tratamiento de las especias con la enzima, aumentó el rendimiento del aceite esencial. La GC y la evaluación GC-MS del aceite esencial mostraron que los principales componentes activos de las especias tales como $\beta$ -cariofileno, en pimienta negra, y del $\alpha$ -terpenilo en cardamomo, aumentaron marcadamente del 15,03 al 25,58% y del 38,91 al 48,6%, respectivamente, en comparación con las muestras patrón.
<b>2013, Hosni</b>	Enzyme-assisted extraction of essential oils from thyme ( <i>Thymus capitatus</i> L.) y rosemary ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.): impact on yield, chemical composition and antimicrobial activity.	En <i>T. capitatus</i> , la aplicación de celulasa, hemicelulasa y la combinación de las dos, produjo un incremento del rendimiento del aceite en 63,55, 23,72 y 109%, respectivamente. En <i>R. officinalis</i> , el tratamiento enzimático resultó en un incremento del rendimiento del aceite esencial en un 5, 50 y 20 %, respectivamente.

## 4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 4.1 Reactivos, materiales y equipos de laboratorio

En la **Tabla 4**, se encuentran los materiales, equipos, reactivos y sus especificaciones, que se emplearon en esta investigación.

**Tabla 4.** Materiales, reactivos y equipos empleados en el presente estudio.

Nombre	Especificaciones
<b>Reactivos</b>	
Celluclast <sup>®</sup>	De Novozymes, Coldanzimas, Bogotá, Colombia
Viscozyme <sup>®</sup>	De Novozymes , <i>Sigma-Aldrich</i> , Bucaramanga, Colombia
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Pureza: 99%; <i>Merck KGaA</i> , Darmstadt, Alemania
Ácido cítrico monohidratado	Pureza: 99%; <i>Merck KGaA</i> , Darmstadt, Alemania
NaOH	Pureza: 99%; <i>Merck KGaA</i> , Darmstadt, Alemania
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> anhidro	Pureza: 99,1%; <i>J. T. Baker</i> , Phillipsburg , NJ, EE.UU
Diclorometano	Analítico, <i>Emscience</i> , <i>Merck KgaA</i> , Darmstadt, Alemania
<i>n</i> -Tetradecano	Pureza: 99%; <i>Sigma Aldrich</i> , Milwaukee, Wisconsin, EE.UU
Timol	Pureza: 99%; <i>Sigma Aldrich</i> , St. Louis, MO, EE.UU.
Carvacrol	Pureza: 99%; <i>Sigma Aldrich</i> , St. Louis, MO, EE.UU.
<b>Materiales</b>	
Balones aforados	1 mL; Pyrex <sup>®</sup> , México
Equipo de hidroddestilación	Balón fondo redondo de 2 L, reductor de 45/50 a 24/40, alargadera 24/40, trampa <i>Dean – Stark</i> , condensador de bolas y condensador de espiral
Balón aforado	1 L, <i>Brand</i> , Wertheim, Alemania.
Pipetas Pasteur	230 mm, <i>Brand GMBH Co.</i> Wertheim, Alemania.
Viales para cromatografía	2 mL, <i>Agilent Technologies</i> , Santa Clara, California, EE.UU.
<b>Equipos auxiliares</b>	
Micropipetas	2 – 20, 25 – 250 y 100 – 1000 µL, <i>Brand</i> , Wertheim, Alemania
Balanza Analítica	<i>Mettler Toledo</i> PB1502-S, Nänicon, Suiza
pH-metro	MPC227, <i>Mettler Toledo</i> , Schwezenbach, Suiza
Baño refrigerante	Chiller 28L20K, <i>Phaber</i> , Colombia
Horno microondas doméstico	Modelo DH3009656, Whirlpool, Benton Harbor, MI, Estados Unidos.

## 4.2 Material vegetal

La especie estudiada, *L. origanoides*, quimiotipo Timol, se cosechó (hojas, tallos) en el Complejo Agroindustrial Piloto del Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM), en el *campus* principal de la Universidad Industrial de Santander (UIS). El material vegetal se secó a la sombra.

Para homogeneizar el material vegetal, se colocó en un picador PE800 (Penagos Hermanos & Cía, Bucaramanga, Colombia), donde el material vegetal quedó de un tamaño de partícula promedio de 5 cm (tallos); luego, se pasó por un molino de cuchillas Retsch SM100 (PC QUIMICA y CIA SAS, Bogotá, Cundinamarca, Colombia) acondicionado con un tamiz de 2 mm.

## 4.3 Pre-tratamiento enzimático

Previo a la obtención de los aceites esenciales, se llevó a cabo un pre-tratamiento enzimático, con el objetivo de incrementar el rendimiento en la extracción del aceite esencial. Con el fin de establecer las mejores condiciones del tratamiento enzimático, se aplicó un diseño experimental 3<sup>2</sup>. Las variables independientes fueron el tiempo de incubación (30, 60 y 90 min) y la concentración de enzima (0,1, 0,5 y 1%; porcentaje en peso: g de enzima/g de material vegetal); el pH (4,5) y la temperatura de incubación (50°C) se mantuvieron constantes, estas condiciones según Sowbhagya y colaboradores [Sowbhagya *et al.*, 2009], Hosni y colaboradores [Hosni *et al.*, 2013], con algunas modificaciones. En la **Tabla 5**, se presenta el número de experimentos y las condiciones de cada uno.

Para mantener el pH en 4,5, se preparó una solución *buffer* o solución amortiguadora de la siguiente forma: se elaboró una solución de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhidro (28,4 g y se llevó a un litro con agua destilada), una solución de ácido cítrico (21 g

y se llevó a un litro con agua destilada), se mezclaron 1L de la solución del ácido cítrico con 625 mL de solución de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , y se aforó a un volumen final de 2L; el pH de esta solución se ajustó a 4,5, con NaOH al 0,1% [Método Oficial 995.09 AOAC].

**Tabla 5.** Diseño experimental  $3^2$  con duplicado en cada punto.

N° de experimento	Concentración de enzima,	
	% (p/p)	
		Tiempo de incubación, min
1	0,1	30
2	0,1	30
3	0,5	30
4	0,5	30
5	1	30
6	1	30
7	0,1	60
8	0,1	60
9	0,5	60
10	0,5	60
11	1	60
12	1	60
13	0,1	90
14	0,1	90
15	0,5	90
16	0,5	90
17	1	90
18	1	90

El material vegetal (150 g), que se trató con la enzima, se depositó en un balón de fondo redondo de 2 L, que contenía la enzima disuelta en un litro de solución

*buffer*, y se introdujo en un baño de agua a 50°C. La concentración de enzima y el tiempo de incubación usados por cada experimento aparecen en la **Tabla 5**. Se realizaron 18 experimentos por enzima.

#### **4.4 Obtención del aceite esencial**

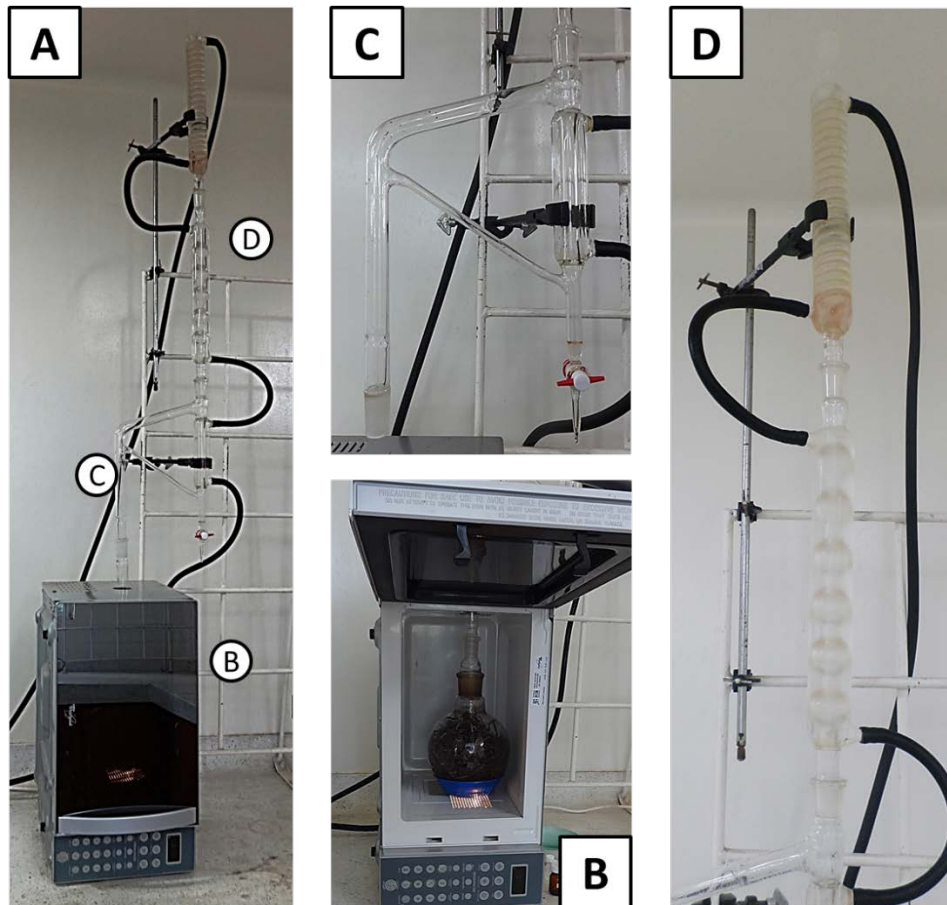
**4.4.1 Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas** Los aceites esenciales del material vegetal picado y del material que se trató con la enzima, se obtuvieron por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas, en un equipo *Clevenger*, con una trampa *Dean – Stark* como reservorio del destilado, usando como fuente de calentamiento un horno doméstico *Whirlpool*, Modelo WM1111D00, con una potencia de salida de 1350 W y una frecuencia de radiación de 2,5 GHz (Figura 4).

El material vegetal tratado con la enzima para su destilación, al completar el tiempo de incubación, se ingresó directamente al horno de microondas. El tiempo total de destilación fue de 45 min, dividido en tres sesiones de 15 min, con un tiempo de reposo entre sesión de 3 min. La potencia del horno se fijó al 60% de la potencia total del equipo.

Para determinar la influencia del tratamiento enzimático sobre el rendimiento de extracción del AE, se realizaron dos tipos de blancos. Los blancos denominados blancos A, fueron obtenidos por la destilación convencional, o sea, la que se realizó con agua destilada y sin incubación previa. El segundo tipo de blanco, se denominó blanco B; éste correspondió a los blancos del tratamiento enzimático, que se realizó por la destilación de material vegetal con la solución *buffer*, y se tuvieron en cuenta los tiempos de incubación, tal como se observa en la **Tabla 5**.

Los AE obtenidos, se secaron con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se pesaron en la balanza analítica y se calculó el rendimiento de la extracción con base en el peso inicial del material vegetal, según la **Ecuación 1**.

**Figura 4.** Montaje de MWHD empleado en el laboratorio: A. Equipo completo; B. Balón con material vegetal; C. Reservorio tipo trampa *Dean – Stark*; D. Condensadores de bolas y de espiral. Foto: tomada por el autor en el CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 16 de agosto de 2014



#### 4.5 Preparación de la muestra para el análisis cromatográfico.

La preparación de las muestras para GC-MS se llevó a cabo agregando 50  $\mu\text{L}$  de aceite esencial en un balón y se aforó con diclorometano a 1 mL.

Para el análisis de las muestras por GC-FID, se agregó aceite esencial (50  $\mu\text{L}$ ) en el balón aforado de 1 mL y se tomó la masa de este volumen de aceite, luego, se agregaron 4 mg de patrón interno (*n*-tetradecano) y se llevó hasta el aforo con diclorometano.

#### 4.6 Análisis cromatográfico

**4.6.1 Análisis por GC-MS** La caracterización química de los metabolitos secundarios presentes en el aceite esencial de *L. origanoides*, se realizó en un equipo GC *Agilent Technologies* 6890N (Palo Alto, California, EE.UU.), acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD* 5975 *Inert XL* (Figura 5), con inyector automático *Agilent Technologies* 7683B. Para realizar la separación de los compuestos se utilizaron dos columnas capilares, una, con fase estacionaria (f.e.) apolar de 5%-fenil-poli(metilsiloxano) (DB-5MS, *J & W Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.) de 60 m  $\times$  0,25 mm, D.I.  $\times$  0,25  $\mu\text{m}$ ,  $d_f$ , y la otra, con f.e. polar de poli(etilenglicol) (DB-WAX, *J & W Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.) de 60 m  $\times$  0,25 mm, D.I.  $\times$  0,25  $\mu\text{m}$ ,  $d_f$ . Como gas de arrastre se empleó helio (99.995%, gas AP, Linde, Bogotá, Colombia), con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 16,47 psi, y una velocidad volumétrica de flujo de 1 mL/min. La temperatura del puerto de inyección fue de 250  $^{\circ}\text{C}$ , el modo de inyección empleado fue *split* (relación 30:1) y un volumen de inyección de muestra de 2  $\mu\text{L}$ .

La temperatura del horno durante la separación cromatográfica se inició en 45  $^{\circ}\text{C}$  y se subió hasta 150  $^{\circ}\text{C}$ , a una velocidad de 4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , luego, se llevó hasta 250  $^{\circ}\text{C}$ , a una velocidad de 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , y se mantuvo por 5 min; finalmente, la temperatura se incrementó hasta 275  $^{\circ}\text{C}$ , con una velocidad de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

La velocidad lineal media del flujo del gas fue de 26 cm/s. la temperatura de la fuente de ionización se mantuvo a 230 °C, mientras que la del cuadrupolo a 150 °C. El tipo de ionización utilizada fue por impacto de electrones (EI) de 70 eV y se utilizó un rango de masas de 45 a 450 Da, con una velocidad de barrido de radiofrecuencia de 3,58 *scan/s*.

**Figura 5.** Equipo de GC-MS utilizado en la investigación. Fotografía tomada por el autor en el Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas CROM-MASS, UIS – Bucaramanga, el 23 de agosto de 2014.



El reconocimiento de los componentes principales presentes en el aceite esencial, se llevó a cabo mediante la comparación de los índices de retención lineales de cada compuesto con los valores reportados en la literatura científica [Stashenko *et al.*, 2013] [Szafranek *et al.*, 2005]. Los índices se calcularon teniendo en cuenta los tiempos de retención de una serie homóloga de patrones de hidrocarburos (C<sub>6</sub> – C<sub>25</sub>) analizados bajo las mismas condiciones cromatográficas que los AE. Para el respectivo cálculo se utilizó la siguiente ecuación [Adams, 2007]:

$$I = 100n + 100 \left[ \frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \right] \quad \text{Ecuacion N° 2}$$

I: índice de retención lineal del compuesto de interés x.

t<sub>Rx</sub>: Tiempo de retención del compuesto de interés x.

t<sub>Rn</sub> y t<sub>RN</sub>: Tiempos de retención de *n*-alcanos que eluyen antes (t<sub>Rn</sub>) y después (t<sub>RN</sub>) del compuesto de interés x.

También, se compararon los espectros de masas experimentales con los de las bases de datos disponibles (Adams, NIST y Wiley) y los reportados en el portal de internet [www.pherobase.com](http://www.pherobase.com). Se empleó el software *MSDCHEMSTATION* de Agilent Technologies Rev. G1701DA.

**4.6.2 Análisis por GC-FID** La cuantificación de los compuestos presentes en el aceite esencial, se realizó por medio del método de calibración interna, usando como patrón interno *n*-tetradecano y curva de calibración de los componentes mayoritarios (timol y carvacrol), en un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies* 6890N (Palo Alto, California, EE.UU.), acoplado a un detector de ionización en llama (FID), con inyector automático *Agilent Technologies* 7683B (Figura 6). La separación de los compuesto se llevó a cabo en una columna capilar con f.e. apolar de 5%-fenil-poli(metilsiloxano) (DB-5MS, *J & W Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.) de 60 m × 0,25 mm, D.I. × 0,25 μm, d<sub>f</sub>. Se empleó helio como gas de arrastre, con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 16,47 psi, una velocidad volumétrica de flujo de 1 mL/min.

La temperatura del inyector fue de 250 °C, modo de inyección *split* (relación 30:1) y un volumen de inyección de 1 μL. Se programó la misma temperatura del horno usada en el horno del GC-MS. La temperatura del detector fue de 280 °C. Los flujos de los gases se mantuvieron así: aire, 300 mL/min (99.995%, gas AP, Linde, Bogotá, Colombia); hidrógeno, 30 mL/min (99.995%, gas AP, Linde, Bogotá, Colombia) y nitrógeno, 30 mL/min (99.995%, gas AP, Linde, Bogotá, Colombia).

**Figura 6.** Equipo de GC-FID utilizado en el presente trabajo. Fotografía tomada por el autor en el Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas CROM-MASS, UIS – Bucaramanga, el 28 de agosto de 2014.



La cuantificación de cada uno de los compuestos del aceite esencial, se determinó teniendo en cuenta la siguiente ecuación:

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

**Ecuación 3**

$C_x$ : Concentración del compuesto de interés, pp.m

$C_A$ : Concentración del estándar interno, pp.m

$A_x$ : Área del compuesto de interés, cuentas

$A_A$ : Área del estándar interno, cuentas

## 5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 5.1 Análisis comparativo

En el presente trabajo, se realizó un diseño experimental  $3^2$  con réplica en todos los puntos, para determinar cuál o cuáles de los factores (Concentración de enzima y tiempo de incubación), tenían incidencia significativa sobre el rendimiento en la extracción del aceite esencial. En la **Tabla 6**, se observan las variables y niveles del diseño.

**Tabla 6.** Factores y niveles en el diseño experimental  $3^2$ .

Variables	Niveles		
Concentración de enzima, % (p/p)	1	0,5	0,1
Tiempo de incubación, min	90	60	30

El análisis de la varianza ANOVA, permitió evaluar estadísticamente las variables que tuvieron incidencia significativa sobre el rendimiento en la extracción del AE. Para llevar a cabo el análisis se usó el *software Microsoft Excel 2010*. En la **Tabla 7**, se muestran los resultados del análisis de varianza para enzima Viscozyme<sup>®</sup> y, en la **Tabla 8**, los resultados del análisis de varianza para la enzima Celluclast<sup>®</sup>.

**Tabla 7.** Análisis de varianza para la respuesta del diseño experimental enzima Viscozyme®. A: Concentración de enzima; B: Tiempo de incubación; GL: Grados de libertad; CM: Cuadrado medio o varianza. El valor F umbral se calculó con un nivel de confianza del 95%.

Fuente	Q	GL	CM	F. exp	F. umbral
<b>A</b>	0,07211	3	0,02404	66,31034	3,49029
<b>B</b>	0,00261	2	0,00130	3,59770	3,88529
<b>AB</b>	0,01433	6	0,00239	6,58621	2,99612
<b>Error</b>	0,00435	12	0,00036		
<b>Total</b>	0,09340	23			

**Tabla 8.** Análisis de varianza para la respuesta del diseño experimental enzima Celluclast®. A: Concentración de enzima; B: Tiempo de incubación; GL: Grados de libertad; CM: Cuadrado medio o varianza. El valor F umbral se calculó con un nivel de confianza del 95%.

Fuente	Q	GL	CM	F.Exp	F. umbral
<b>A</b>	0,09762	3	0,03254	125,95699	3,49029
<b>B</b>	0,00052	2	0,00026	1,01613	3,88529
<b>AB</b>	0,00981	6	0,00163	6,32796	2,99612
<b>Error</b>	0,00310	12	0,00026		
<b>Total</b>	0,11105	23			

Como se observa en las **Tablas 7 y 8**, se concluye que la concentración de enzima y la interacción entre los dos parámetros (concentración de enzima y tiempo de incubación), tuvieron una incidencia significativa en el incremento del AE.

En las **Tablas 9 y 10**, se observan los datos obtenidos para cada tratamiento enzimático; se calculó el promedio de cada medida, para determinar con cuál tratamiento se obtuvieron los mejores resultados.

**Tabla 9.** Resultados del rendimiento de extracción del AE en cada tratamiento enzimático con Viscozyme®.

<b>N° de experimento</b>	<b>Tiempo de incubación (min)</b>	<b>Concentración de enzima % (p/p)</b>	<b>Rendimiento %, (<math>\pm \sigma</math> ; n=2)</b>	<b>Incremento con respecto al blanco, %</b>
1	0	0	0,79 $\pm$ 0,01	0
2	30	0	0,77 $\pm$ 0,01	-3 $\pm$ 1
3	30	0,1	0,89 $\pm$ 0,005	13,3 $\pm$ 0,9
4	30	0,5	0,95 $\pm$ 0,015	20 $\pm$ 3
5	30	1	0,92 $\pm$ 0,01	16 $\pm$ 2
6	60	0	0,82 $\pm$ 0,025	3,16 $\pm$ 1
7	60	0,1	0,87 $\pm$ 0,01	10 $\pm$ 2
8	60	0,5	0,9 $\pm$ 0,01	14 $\pm$ 2
9	60	1	0,93 $\pm$ 0,01	17,7 $\pm$ 0,1
10	90	0	0,79 $\pm$ 0,015	0
11	90	0,1	0,98 $\pm$ 0,025	24 $\pm$ 4
12	90	0,5	0,94 $\pm$ 0,005	18,4 $\pm$ 0,9
13	90	1	0,91 $\pm$ 0,005	14,6 $\pm$ 0,9

Como se puede observar en la **Tabla 9**, el tratamiento enzimático incrementa el rendimiento de extracción con respecto a los blancos.

El blanco B, descrito anteriormente, corresponde, a los tratamientos, cuya concentración de enzima es 0%, los cuales fueron tratados con la solución *buffer* y tiempo de incubación; el blanco A corresponde al material destilado, sin ningún tratamiento enzimático previo.

El tratamiento enzimático con el cual se obtuvo el mayor rendimiento del AE, corresponde al tratamiento con una concentración de enzima de 0,1 % y un tiempo de incubación de 90 min **[Figura 7]**. Se observa, que al incrementar la concentración de enzima para tiempos de incubación de 30 y 60 min, el rendimiento de extracción del AE se incrementa. Esto se debe, a que la enzima Viscozyme<sup>®</sup>, como ya se mencionó, es una *endo*- $\beta$ -glucanasa, que actúa sobre las regiones amorfas de la celulosa, rompiendo el polímero, incrementando el tamaño de poro de la pared celular y permitiendo la liberación del aceite esencial [Converse y Optecar, 1993].

**Tabla 10.** Resultados del rendimiento de extracción del AE en cada tratamiento enzimático con Celluclast®.

N° de experimento	Tiempo de incubación, min	Concentración de enzima, % (p/p)	Rendimiento, % ( $\pm \sigma$ ; n=2)	Incremento con respecto al blanco, %
1	0	0	0,79 $\pm$ 0,01	0
2	30	0	0,77 $\pm$ 0,01	-3 $\pm$ 1
14	30	0,1	0,975 $\pm$ 0,005	23,4 $\pm$ 0,9
15	30	0,5	0,94 $\pm$ 0,01	19 $\pm$ 2
16	30	1	0,86 $\pm$ 0,05	14 $\pm$ 2
6	60	0	0,82 $\pm$ 0,03	3,16 $\pm$ 1
17	60	0,1	0,94 $\pm$ 0,01	19 $\pm$ 2
18	60	0,5	0,91 $\pm$ 0,01	15 $\pm$ 2
19	60	1	0,95 $\pm$ 0,01	20 $\pm$ 2
10	90	0	0,79 $\pm$ 0,02	0
20	90	0,1	0,99 $\pm$ 0,005	24,9 $\pm$ 0,9
21	90	0,5	0,91 $\pm$ 0,005	14,6 $\pm$ 0,9
22	90	1	0,89 $\pm$ 0,005	12,0 $\pm$ 0,9

En la **Tabla 10**, se observa que entre los blancos A y B no existe una diferencia significativa, lo que indica que la solución *buffer* no influye en la extracción del AE.

El tratamiento enzimático con el cual se obtuvo el mayor rendimiento del AE, corresponde al tratamiento con enzima en la concentración de 0,1%, y un tiempo de incubación de 30 o 90 min **[Figura 7]**.

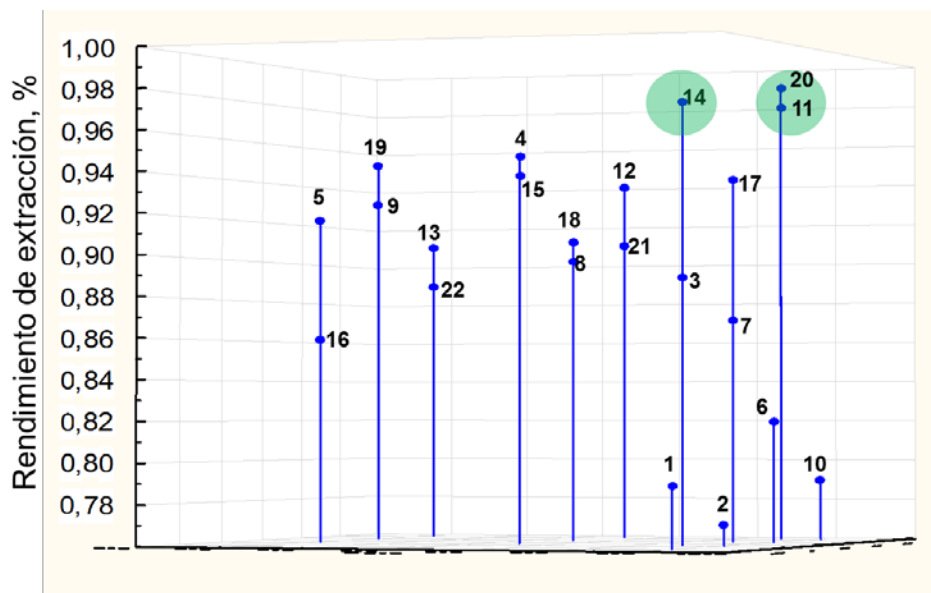
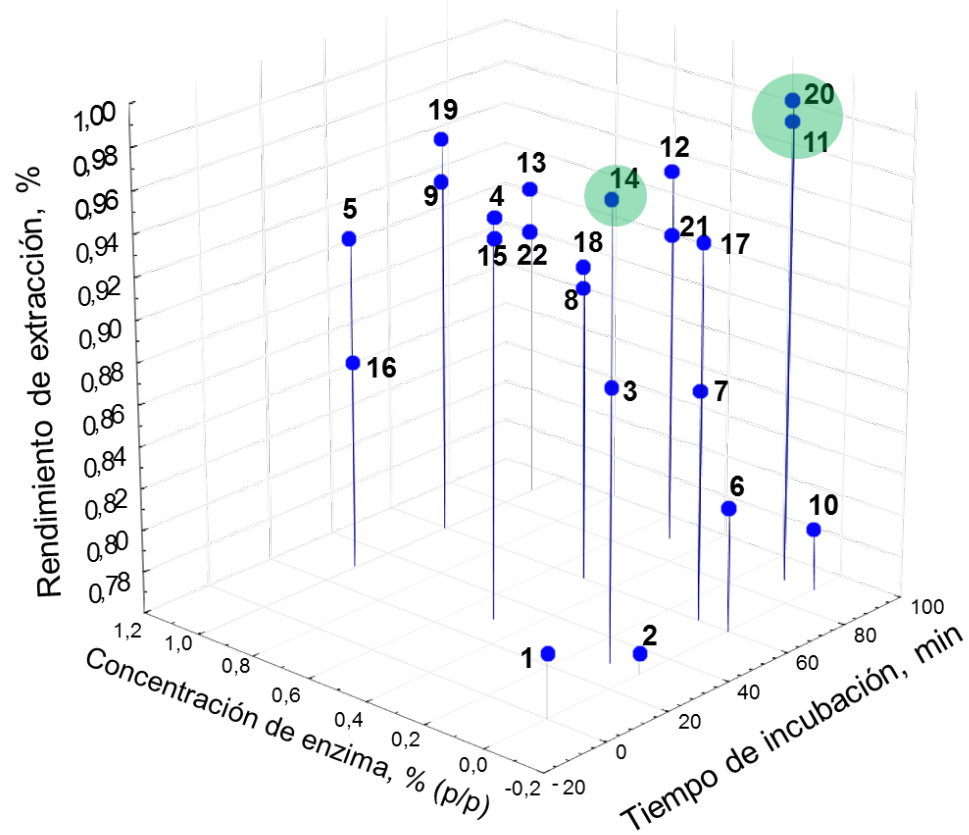
Se observa, que al incrementar la concentración de enzima, el rendimiento va disminuyendo. Esto se debe a que la enzima celulasa es un complejo de tres enzimas, las cuales trabajan juntas para llevar a cabo la hidrólisis enzimática, tal

como se mencionó en la **Sección 1.4.1**. La primera de las enzimas que actúa, *endo*- $\beta$ -glucanasa, rompe las cadenas de celulosa en las regiones amorfas, produciendo los sitios activos en los cuales actuará la siguiente enzima, celobiohidrolasa, produciendo la celobiosa, la cual inhibe la actividad de estas dos enzimas, aunque ésta no es la única forma de inhibición de la actividad enzimática. Converse y Optecar (1993) reportaron, que la actividad enzimática se ve disminuida al incrementar la concentración de enzima, debido a que las cadenas de celulosa tienden a absorber la celobiohidrolasa, que se encuentra en exceso, obstruyendo los sitios sobre los cuales actúa la *endo*-glucanasa.

El tratamiento enzimático influye positivamente en el incremento de extracción del aceite esencial, así como lo demostraron Hosni y colaboradores (2013) para el tomillo y el romero, en los cuales el tratamiento con celulasa resultó en un incremento del rendimiento de extracción de AE de 64%, para tomillo, y 5%, para el romero. Sowbhagya y colaboradores (2010) encontraron, que el tratamiento enzimático con celulasa y viscozyme, incrementa el rendimiento de extracción del AE de comino en 3,3%. Al aumentar el tiempo de incubación y la concentración de enzima, el rendimiento de extracción se disminuye. El tiempo de incubación depende de la enzima empleada.

El incremento del rendimiento de extracción del AE, fue afectado por la concentración de enzima y el tiempo de incubación. La efectividad de una enzima depende, en gran parte, de la planta o material vegetal tratado (cáscaras, semillas, tallos u hojas), como se muestra en los antecedentes mencionados, en los cuales el rendimiento se incrementó de 3 a 63%. Los diferentes estudios realizados por otros autores [Sowbhagya *et al.*, 2009] [Sowbhagya *et al.*, 2011] [Hosni *et al.*, 2013], demuestran que la enzima, con la cual se obtiene el mayor rendimiento de extracción, no siempre es la misma, por lo que solo experimentalmente se puede determinar cuál enzima hay que utilizar, su concentración y el tiempo de incubación

**Figura 7.** Rendimiento de extracción del aceite esencial para cada tratamiento enzimático. Superior: vista en tres dimensiones; inferior: vista del eje z.



**5.1.1 Análisis de costos** se llevó a cabo un estudio de los costos de producción de aceite esencial de *L. origanoides*, teniendo en cuenta la mano de obra, materiales, insumo, herramientas y administración. Se compararon las ganancias producidas en los dos primeros años por hectárea utilizando el tratamiento y sin usarlo.

En la **Tabla 11**, se observa que en los dos primeros años aún se está pagando la inversión realizada, mientras que al realizar el tratamiento enzimático en los dos primeros años ya se genera ganancia.

**Tabla 11.** Producción de AE y ganancia por hectárea en los dos primeros años del cultivo.

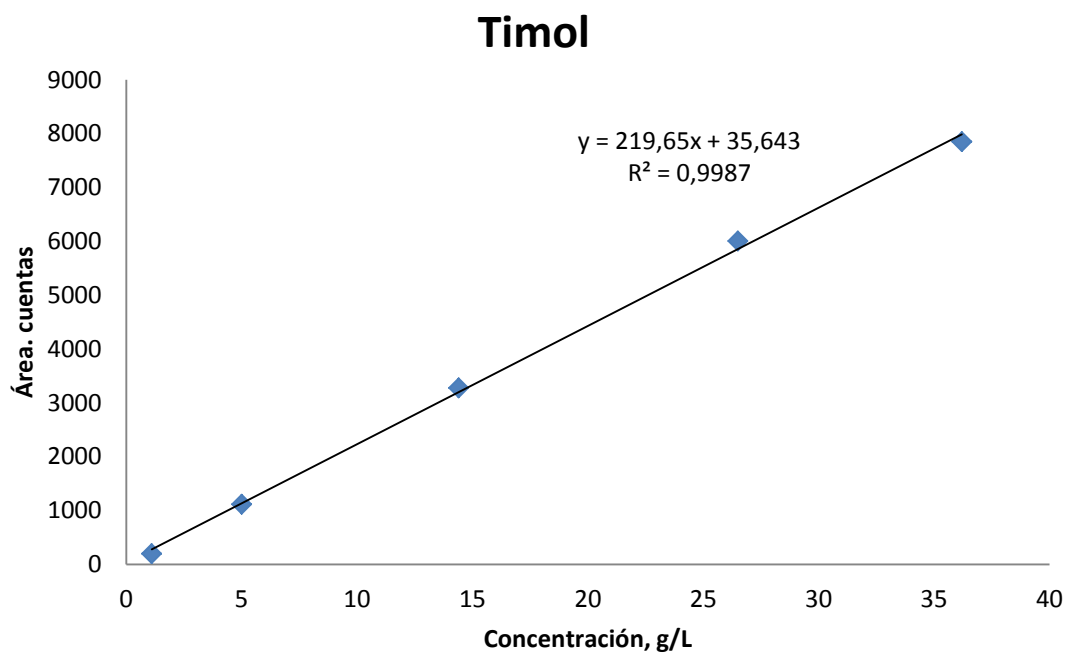
	Blanco (0,8%)	Con enzima (0,98%)
Cantidad de AE, kg	221,8	271,7
Precio por kg	\$135.000	\$135.000
Precio total	\$29.937.600	\$36.673.560
Ganancia (2 primeros años)	-\$2.944.750	\$947.138

## 5.2 Caracterización química de los aceites esenciales

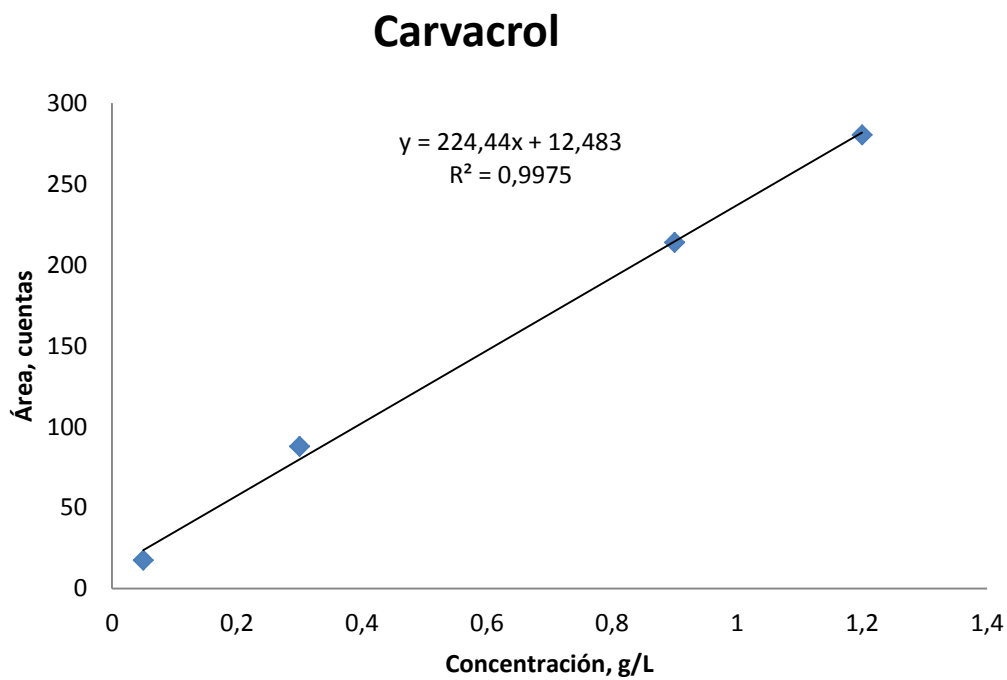
La identificación se realizó con base en sus espectros de masas (EI, 70eV), índices de retención lineales (IRL) y usando las sustancias de referencia certificadas (patrón interno: *n*-tetradecano; patrón externo: timol y carvacrol). Los espectros de masas e índices de retención lineales obtenidos se compararon con los de las bases de datos Adams, NIST, Wiley y la base de datos [www.pherobase.com](http://www.pherobase.com), lo que permitió realizar una identificación tentativa de los compuestos presentes en los aceites esenciales.

Para la cuantificación de los compuestos mayoritarios (timol y carvacrol), se realizó curva de calibración (**Figuras 8 y 9**). Para ello, se preparó una solución *stock* y a partir de ésta, se prepararon soluciones de trabajo, de diferente concentración, las cuales se analizaron bajo los mismos parámetros cromatográficos. Una vez se obtuvieron los datos, se construyeron las curvas de calibración (concentración Vs área) para los dos compuestos patrón empleados. Para los demás compuestos presentes en el aceite esencial, se realizó una cuantificación con patrón interno (Istd). En la **Figura 10**, se presenta un perfil cromatográfico típico de los metabolitos secundarios volátiles, aislados por MWHD, de hojas y tallos de *L. origanoides*, quimiotipo timol. En las **Tablas 12 – 16**, se reportan los compuestos identificados y su concentración expresada en gramos (g) de compuesto por litro (L) del aceite; en los aceites obtenidos con y sin tratamiento enzimático (Viscozyme, Celluclast), experimentos 1 a 22. Los índices de retención experimentales que no aparecen en las **Tablas 12 – 16** corresponden a compuestos cuyos tiempos de retención se encontraban por encima del tiempo de retención del hidrocarburo C25, o son compuestos que en columna polar coeluyen con otros compuestos, por lo cual no son detectados.

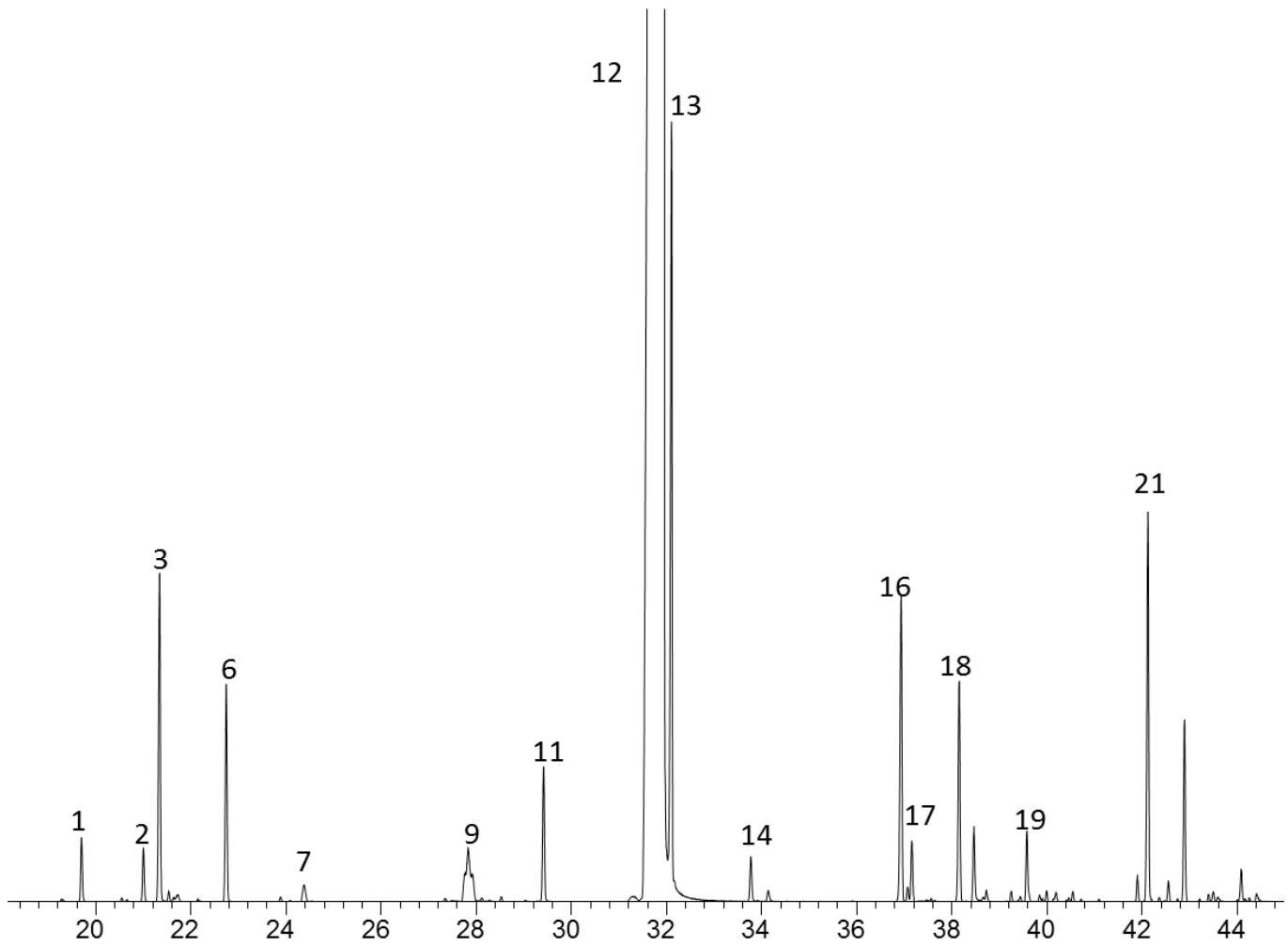
**Figura 8.** Curva de calibración para el timol obtenida por GC-FID.



**Figura 9.** Curva de calibración para el carvacrol obtenida por GC-FID.



**Figura 10.** Perfil cromatográfico típico del aceite esencial de *L. origanoides*, quimiotipo Timol. Columna apolar (DB-5MS) por GC-MS.



**Tabla 12.** Índices de retención en columnas polar y apolar, de los compuestos presentes en el aceite esencial de *L. origanoides* (quimiotipo timol), del experimento 1 al 5.

N°	Compuesto	IRL <sub>exp</sub>		*IRL <sub>lit</sub>		Concentración en g/L, n=2				
		DB-5MS	DB-WAX	DB-5MS	DB-WAX	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5
1	β-Mirceno	989	1164	988	1165	3,89 ± 0,05	3,8 ± 0,8	3,5 ± 0,2	3,3 ± 0,3	2,98 ± 0,05
2	α-Terpineno	1019	1182	1022	1181	2,19 ± 0,05	2,2 ± 0,4	2,12 ± 0,07	2,0 ± 0,2	1,80 ± 0,01
3	p-Cimeno	1027	1274	1029	1250	11,5 ± 0,3	12 ± 2	10,1 ± 0,2	10,3 ± 0,6	9,45 ± 0,05
4	Limoneno	1033	-----	1034	1200	0,67 ± 0,01	0,89 ± 0,01	0,62 ± 0,03	0,61 ± 0,05	0,56 ± 0,01
5	1,8-Cineol	1036	-----	1039	1224	0,48 ± 0,01	ND	0,60 ± 0,02	ND	0,48 ± 0,01
6	γ-Terpineno	1061	1249	1065	1250	8,4 ± 0,2	8 ± 1	8,4 ± 0,2	8,1 ± 0,7	7,3 ± 0,3
7	Linalol	1099	1548	1107	1551	1,02 ± 0,02	0,93 ± 0,09	1,40 ± 0,04	1,15 ± 0,07	0,96 ± 0,01
8	Umbelunona	1180	1651	1188	1652	1,7 ± 0,3	ND	ND	ND	1,48 ± 0,01
9	Terpinen-4-ol	1187	-----	1189	1577	4,6 ± 0,3	5,0 ± 0,7	6 ± 1	5 ± 2	3,5 ± 0,5
10	α-Terpineol	1204	-----	1203	1705	0,38 ± 0,01	ND	ND	ND	ND
11	Timol metil éter	1231	1598	1232	1599	4,1 ± 0,2	3,0 ± 0,1	6,8 ± 0,3	4,2 ± 0,3	3,9 ± 0,8
12	Timol	1295	2187	1290	2193	710 ± 53	665 ± 12	645 ± 25	728 ± 20	675 ± 46
13	Carvacrol	1301	2215	1304	2172	15 ± 1	15,4 ± 0,5	13,7 ± 0,8	15,8 ± 0,5	14,9 ± 0,9
14	Acetato de timol	1348	1855	1350	1858	1,7 ± 0,3	1,28 ± 0,02	1,6 ± 0,2	1,6 ± 0,2	1,50 ± 0,06
15	Eugenol	1358	-----	1358	2080	0,42 ± 0,01	ND	ND	ND	ND
16	trans-β-Cariofileno	1434	1611	1436	1606	11 ± 1	7,0 ± 0,9	16,8 ± 0,8	11 ± 1	11 ± 2
17	trans-α-Bergamoteno	1441	-----	1435		1,8 ± 0,2	1,2 ± 0,3	2,7 ± 0,2	1,9 ± 0,2	1,9 ± 0,3
18	α-Humuleno	1470	1684	1472	1674	7 ± 1	4,9 ± 0,8	10,3 ± 0,7	7,7 ± 0,7	7 ± 1
19	β-Bisaboleno	1513	1731	1515	1745	1,9 ± 0,4	1,5 ± 0,2	2,4 ± 0,3	2,0 ± 0,2	2,1 ± 0,2
20	Espatulenol	1591	2135	1595	2129	0,8 ± 0,3	0,85 ± 0,01	0,7 ± 0,1	0,79 ± 0,07	0,76 ± 0,01
21	Óxido de cariofileno	1598	1998	1600	2005	11 ± 3	9,53 ± 0,04	10 ± 2	10 ± 1	9,7 ± 0,2

22	Epóxido de humuleno II	1627	-----	1629	1964	5 ± 2	4,61 ± 0,08	4,5 ± 0,8	4,6 ± 0,5	4,5 ± 0,1
23	γ-Eudesmol	1644	-----	1647	2184	0,48 ± 0,01	ND	0,41 ± 0,01	ND	0,39 ± 0,02
24	α-Eudesmol	1672	-----	1674	2116	0,5 ± 0,2	0,71 ± 0,01	0,54 ± 0,01	0,50 ± 0,05	0,46 ± 0,01

\*Índices de retención lineales (IRL) reportados por otros autores: Högnadóttir y Rouseff, 2003; Bicchi *et al.*, 2003; Szafranek *et al.*, 2005; Choi, 2003; Stashenko *et al.*, 2013

**Tabla 13.** Índices de retención en columnas polar y apolar, de los compuestos presentes en el aceite esencial de *L. origanoides* (quimiotipo timol), del experimento 6 al 10.

N°	Compuesto	IRL		*IRL <sub>lit</sub>		Concentración en g/L, n=2				
		DB-5MS	DB-WAX	DB-5MS	DB-WAX	Exp. 6	Exp. 7	Exp. 8	Exp. 9	Exp. 10
1	β-Mirceno	989	1164	988	1165	5,1 ± 0,3	3,0 ± 0,4	2,92 ± 0,04	2,9 ± 0,4	4,0 ± 0,5
2	α-Terpineno	1019	182	1022	1181	2,8 ± 0,2	1,8 ± 0,2	1,80 ± 0,01	1,8 ± 0,3	2,3 ± 0,3
3	p-Cimeno	1027	1274	1029	1250	15,2 ± 0,7	10 ± 1	9,17 ± 0,04	9 ± 1	13 ± 2
4	Limoneno	1033	-----	1034	1200	0,8 ± 0,3	0,55 ± 0,05	0,55 ± 0,01	0,53 ± 0,07	ND
5	1,8-Cineol	1036	-----	1039	1224	ND	0,48 ± 0,01	0,46 ± 0,02	0,53 ± 0,09	ND
6	γ-Terpineno	1061	1249	1065	1250	9,9 ± 0,6	7,3 ± 0,5	7,17 ± 0,04	7,2 ± 0,9	8 ± 1
7	Linalol	1099	1548	1107	1551	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,08	1,10 ± 0,02	1,4 ± 0,2	0,9 ± 0,1
8	Umbelunona	1180	1651	1188	1652	ND	1,6 ± 0,2	1,85 ± 0,06	2,4 ± 0,4	1,25 ± 0,01
9	Terpinen-4-ol	1187	-----	1189	1577	5,4 ± 0,5	4,0 ± 0,2	4,6 ± 0,15	4,9 ± 0,5	4,4 ± 0,8
10	α-Terpineol	1204	-----	1203	1705	ND	0,41 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,39 ± 0,01	ND
11	Timol metil éter	1231	1598	1232	1599	3,4 ± 0,2	4,0 ± 0,7	3,8 ± 0,2	5,6 ± 0,8	3,1 ± 0,1
12	Timol	1295	2187	1290	2193	668 ± 21	728 ± 75	688 ± 12	677 ± 32	689 ± 23
13	Carvacrol	1301	2215	1304	2172	15 ± 2	16 ± 2	14,9 ± 0,8	15,2 ± 0,3	15,6 ± 0,9
14	Acetato de timol	1348	1855	1350	1858	1,15 ± 0,03	1,7 ± 0,2	1,59 ± 0,06	1,5 ± 0,1	1,26 ± 0,09
15	Eugenol	1358	-----	1358	2080	ND	0,54 ± 0,01	0,43 ± 0,02	0,43 ± 0,01	ND

16	<i>trans</i> - $\beta$ -Cariofileno	1434	1611	1436	1606	7,4 $\pm$ 0,6	12 $\pm$ 4	10,6 $\pm$ 0,2	15 $\pm$ 2	6,5 $\pm$ 0,1
17	<i>trans</i> - $\alpha$ -Bergamoteno	1441	-----	1435		1,28 $\pm$ 0,02	2,0 $\pm$ 0,7	1,76 $\pm$ 0,05	2,5 $\pm$ 0,3	1,1 $\pm$ 0,1
18	$\alpha$ -Humuleno	1470	1684	1472	1674	4,9 $\pm$ 0,3	8 $\pm$ 2	7,17 $\pm$ 0,01	10 $\pm$ 1	4,5 $\pm$ 0,2
19	$\beta$ -Bisaboleno	1513	1731	1515	1745	1,45 $\pm$ 0,08	2,2 $\pm$ 0,7	1,96 $\pm$ 0,01	2,4 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,2
20	Espatulenol	1591	2135	1595	2129	0,62 $\pm$ 0,01	0,8 $\pm$ 0,1	0,75 $\pm$ 0,02	0,73 $\pm$ 0,01	ND
21	Óxido de cariofileno	1598	1998	1600	2005	7,0 $\pm$ 0,8	10 $\pm$ 2	9,1 $\pm$ 0,2	9,6 $\pm$ 0,1	9,3 $\pm$ 0,3
22	Epóxido de humuleno II	1627	-----	1629	1964	3,4 $\pm$ 0,4	4,8 $\pm$ 0,7	4,19 $\pm$ 0,03	4,4 $\pm$ 0,1	4,6 $\pm$ 0,2
23	$\gamma$ -Eudesmol	1644	-----	1647	2184	ND	0,47 $\pm$ 0,01	0,37 $\pm$ 0,01	0,36 $\pm$ 0,01	ND
24	$\alpha$ -Eudesmol	1672	-----	1674	2116	ND	0,50 $\pm$ 0,05	0,46 $\pm$ 0,03	0,46 $\pm$ 0,01	0,74 $\pm$ 0,01

\*Índices de retención lineales (IRL) reportados por otros autores: Högnadóttir y Rouseff, 2003; Bicchi *et al.*, 2003; Szafranek *et al.*, 2005; Choi, 2003; Stashenko *et al.*, 2013

**Tabla 14.** Índices de retención en columnas polar y apolar, de los compuestos presentes en el aceite esencial de *L. origanoides* (quimiotipo timol), del experimento 11 al 15.

N°	Compuesto	IRL		*IRL <sub>lit</sub>		Concentración en g/L, n=2				
		DB-5MS	DB-WAX	DB-5MS	DB-WAX	Exp. 11	Exp. 12	Exp. 13	Exp. 14	Exp. 15
1	$\beta$ -Mirceno	989	1164	988	1165	3,5 $\pm$ 0,5	3,36 $\pm$ 0,09	2,6 $\pm$ 0,2	3,9 $\pm$ 0,8	3,6 $\pm$ 0,4
2	$\alpha$ -Terpineno	1019	1182	1022	1181	2,1 $\pm$ 0,3	2,06 $\pm$ 0,04	1,6 $\pm$ 0,1	2,2 $\pm$ 0,4	2,0 $\pm$ 0,2
3	<i>p</i> -Cimeno	1027	1274	1029	1250	10 $\pm$ 2	10,1 $\pm$ 0,4	8,3 $\pm$ 0,4	12 $\pm$ 2	10,8 $\pm$ 0,8
4	Limoneno	1033	-----	1034	1200	0,62 $\pm$ 0,08	0,61 $\pm$ 0,01	0,48 $\pm$ 0,03	0,89 $\pm$ 0,01	0,5 $\pm$ 0,1
5	1,8-Cineol	1036	-----	1039	1224	0,56 $\pm$ 0,06	0,50 $\pm$ 0,05	0,43 $\pm$ 0,04	ND	ND
6	$\gamma$ -Terpineno	1061	1249	1065	1250	8 $\pm$ 1	8,08 $\pm$ 0,07	6,5 $\pm$ 0,4	8,1 $\pm$ 0,9	7,2 $\pm$ 0,5

7	Linalol	1099	1548	1107	1551	1,4 ± 0,2	1,2 ± 0,2	1,0 ± 0,4	1,3 ± 0,1	1,06 ± 0,05
8	Umbelunona	1180	1651	1188	1652	2,2 ± 0,5	2,3 ± 0,3	2,9 ± 0,7	1,78 ± 0,05	1,56 ± 0,09
9	Terpinen-4-ol	1187	-----	1189	1577	5 ± 2	4,4 ± 0,9	4 ± 2	4,93 ± 0,07	3,9 ± 0,3
10	α-Terpineol	1204	-----	1203	1705	0,36 ± 0,01	ND	0,35 ± 0,06	ND	ND
11	Timol metil éter	1231	1598	1232	1599	6,2 ± 0,7	5 ± 2	4,4 ± 0,9	3,7 ± 0,1	3,05 ± 0,07
12	Timol	1295	2187	1290	2193	755 ± 78	687 ± 24	687 ± 30	814 ± 35	666 ± 31
13	Carvacrol	1301	2215	1304	2172	17 ± 2	14,9 ± 0,8	16,0 ± 0,5	19,2 ± 0,9	15,9 ± 0,1
14	Acetato de timol	1348	1855	1350	1858	1,6 ± 0,1	1,57 ± 0,06	1,5 ± 0,1	1,45 ± 0,07	1,19 ± 0,08
15	Eugenol	1358	-----	1358	2080	0,49 ± 0,02	0,48 ± 0,01	0,46 ± 0,01	ND	ND
16	<i>trans</i> -β-Cariofileno	1434	1611	1436	1606	17 ± 1	14 ± 3	12 ± 3	9,6 ± 0,1	7,8 ± 0,2
17	<i>trans</i> -α-Bergamoteno	1441	-----	1435		2,9 ± 0,2	2,2 ± 0,4	2,1 ± 0,5	1,78 ± 0,07	1,4 ± 0,2
18	α-Humuleno	1470	1684	1472	1674	9 ± 2	9 ± 1	8 ± 2	6,9 ± 0,4	5,6 ± 0,3
19	β-Bisaboleno	1513	1731	1515	1745	2,2 ± 0,5	2,3 ± 0,1	2,2 ± 0,3	2,2 ± 0,2	1,8 ± 0,2
20	Espatulanol	1591	2135	1595	2129	0,82 ± 0,03	0,8 ± 0,2	0,72 ± 0,03	1,12 ± 0,01	0,80 ± 0,01
21	Óxido de cariofileno	1598	1998	1600	2005	9,5 ± 0,5	11 ± 2	9,05 ± 0,92	13 ± 2	10,3 ± 0,6
22	Epóxido de humuleno II	1627	-----	1629	1964	4,34 ± 0,05	5 ± 1	2,42 ± 2,76	6 ± 1	5,1 ± 0,3
23	γ-Eudesmol	1644	-----	1647	2184	0,38 ± 0,03	0,4 ± 0,1	0,36 ± 0,02	0,57 ± 0,01	0,43 ± 0,04
24	α-Eudesmol	1672	-----	1674	2116	0,47 ± 0,01	0,5 ± 0,1	0,45 ± 0,02	0,8 ± 0,2	0,7 ± 0,1

\*Índices de retención lineales (IRL) reportados por otros autores: Högnadóttir y Rouseff, 2003; Bicchi *et al.*, 2003; Szafranek *et al.*, 2005; Choi, 2003; Stashenko *et al.*, 2013

**Tabla 15.** Índices de retención en columnas polar y apolar, de los compuestos presentes en el aceite esencial de *L. origanoides* (quimiotipo timol), del experimento 16 al 20.

N°	Compuesto	IRL		*IRL <sub>lit</sub>		Concentración en g/L, n=2				
		DB-5MS	DB-WAX	DB-5MS	DB-WAX	Exp. 16	Exp. 17	Exp. 18	Exp. 19	Exp. 20
1	β-Mirceno	989	1164	988	1165	4 ± 0,8	3,8 ± 0,6	4,71 ± 0,07	5 ± 1	4 ± 0,2
2	α-Terpineno	1019	1182	1022	1181	2,3 ± 0,4	2,1 ± 0,3	2,60 ± 0,02	2,5 ± 0,6	2,2 ± 0,1
3	p-Cimeno	1027	1274	1029	1250	12 ± 2	11 ± 2	13,8 ± 0,1	13 ± 3	11,6 ± 0,4
4	Limoneno	1033	-----	1034	1200	ND	0,49 ± 0,01	0,56 ± 0,01	0,5 ± 0,1	0,48 ± 0,01
5	1,8-Cineol	1036	-----	1039	1224	ND	ND	ND	ND	ND
6	γ-Terpineno	1061	1249	1065	1250	8 ± 1	7 ± 1	9,07 ± 0,03	9 ± 2	7,7 ± 0,3
7	Linalol	1099	1548	1107	1551	1,2 ± 0,2	1,03 ± 0,07	1,19 ± 0,06	1,14 ± 0,08	1,06 ± 0,07
8	Umbelunona	1180	1651	1188	1652	ND	ND	1,84 ± 0,01	1,84 ± 0,01	1,73 ± 0,01
9	Terpinen-4-ol	1187	-----	1189	1577	6 ± 1	4,7 ± 0,8	5,1 ± 0,5	4,9 ± 0,6	4,5 ± 0,7
10	α-Terpineol	1204	-----	1203	1705	ND	ND	ND	ND	ND
11	Timol metil éter	1231	1598	1232	1599	3,2 ± 0,6	2,9 ± 0,2	3,5 ± 0,2	3,2 ± 0,2	3,00 ± 0,08
12	Timol	1295	2187	1290	2193	732 ± 89	698 ± 46	759 ± 87	722 ± 49	668 ± 17
13	Carvacrol	1301	2215	1304	2172	18 ± 1	17 ± 1	18 ± 2	17 ± 2	15,8 ± 0,5
14	Acetato de timol	1348	1855	1350	1858	1,3 ± 0,2	1,17 ± 0,05	1,3 ± 0,1	1,1 ± 0,2	1,01 ± 0,03
15	Eugenol	1358	-----	1358	2080	ND	ND	ND	ND	ND
16	trans-β-Cariofileno	1434	1611	1436	1606	9 ± 1	8,4 ± 0,6	8,2 ± 0,6	7,4 ± 0,9	8,1 ± 0,8
17	trans-α-Bergamoteno	1441	-----	1435		1,7 ± 0,3	1,5 ± 0,1	1,51 ± 0,09	1,4 ± 0,2	1,6 ± 0,2
18	α-Humuleno	1470	1684	1472	1674	6,4 ± 0,9	6,1 ± 0,5	6,01 ± 0,4	5 ± 1	6,0 ± 0,7
19	β-Bisaboleno	1513	1731	1515	1745	2,1 ± 0,4	1,97 ± 0,09	2,0 ± 0,2	1,9 ± 0,5	2,0 ± 0,3
20	Espatuleno	1591	2135	1595	2129	0,83 ± 0,03	0,80 ± 0,03	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,2

21	Óxido de cariofileno	1598	1998	1600	2005	11 ± 1	11,2 ± 0,3	11,5 ± 0,4	11 ± 4	11 ± 2
22	Epóxido de humuleno II	1627	-----	1629	1964	5,5 ± 0,5	5,4 ± 0,2	5,6 ± 0,2	5 ± 2	5 ± 1
23	γ-Eudesmol	1644	-----	1647	2184	ND	0,47 ± 0,01	0,49 ± 0,01	0,56 ± 0,01	0,52 ± 0,01
24	α-Eudesmol	1672	-----	1674	2116	ND	0,6 ± 0,2	0,83 ± 0,01	0,57 ± 0,01	0,82 ± 0,01

\*Índices de retención lineales (IRL) reportados por otros autores: Högnadóttir y Rouseff, 2003; Bicchi *et al.*, 2003; Szafranek *et al.*, 2005; Choi, 2003; Stashenko *et al.*, 2013

**Tabla 16.** Composición del aceite esencial de *L. origanoides* (quimiotipo timol), obtenido en los experimentos 21 y 22.

N°	Compuesto	IRL		*IRL <sub>lit</sub>		Concentración en g/L, n=2	
		DB-5MS	DB-WAX	DB-5MS	DB-WAX	Exp. 21	Exp. 22
1	β-Mirceno	989	1164	988	1165	4,1 ± 0,1	4 ± 0,5
2	α-Terpineno	1019	1182	1022	1181	2,28 ± 0,07	2,2 ± 0,2
3	p-Cimeno	1027	1274	1029	1250	12,1 ± 0,7	12,4 ± 0,9
4	Limoneno	1033	-----	1034	1200	4,48 ± 0,02	0,87 ± 0,01
5	1,8-Cineol	1036	-----	1039	1224	ND	ND
6	γ-Terpineno	1061	1249	1065	1250	7,8 ± 0,3	7,7 ± 0,6
7	Linalol	1099	1548	1107	1551	1,04 ± 0,02	1,04 ± 0,03
8	Umbelunona	1180	1651	1188	1652	1,75 ± 0,01	1,52 ± 0,01
9	Terpinen-4-ol	1187	-----	1189	1577	4,5 ± 0,9	4 ± 1
10	α-Terpineol	1204	-----	1203	1705	ND	ND
11	Timol metil éter	1231	1598	1232	1599	2,95 ± 0,05	2,92 ± 0,01
12	Timol	1295	2187	1290	2193	644 ± 19	660 ± 12
13	Carvacrol	1301	2215	1304	2172	15,2 ± 0,5	15,7 ± 0,2
14	Acetato de timol	1348	1855	1350	1858	1,1 ± 0,1	0,98 ± 0,03
15	Eugenol	1358	-----	1358	2080	ND	ND
16	trans-β-Cariofileno	1434	1611	1436	1606	7,6 ± 0,3	6,5 ± 0,5
17	trans-α-Bergamoteno	1441	-----	1435		1,41 ± 0,05	1,2 ± 0,1
18	α-Humuleno	1470	1684	1472	1674	5,5 ± 0,3	4,7 ± 0,3
19	β-Bisaboleno	1513	1731	1515	1745	1,8 ± 0,2	1,6 ± 0,1
20	Espatuleno	1591	2135	1595	2129	0,8 ± 0,1	0,69 ± 0,01
21	Óxido de cariofileno	1598	1998	1600	2005	10 ± 1	9,3 ± 0,3
22	Epóxido de humuleno II	1627	-----	1629	1964	4,7 ± 0,7	4,6 ± 0,1
23	γ-Eudesmol	1644	-----	1647	2184	0,47 ± 0,01	0,42 ± 0,01
24	α-Eudesmol	1672	-----	1674	2116	0,79 ± 0,01	0,70 ± 0,01

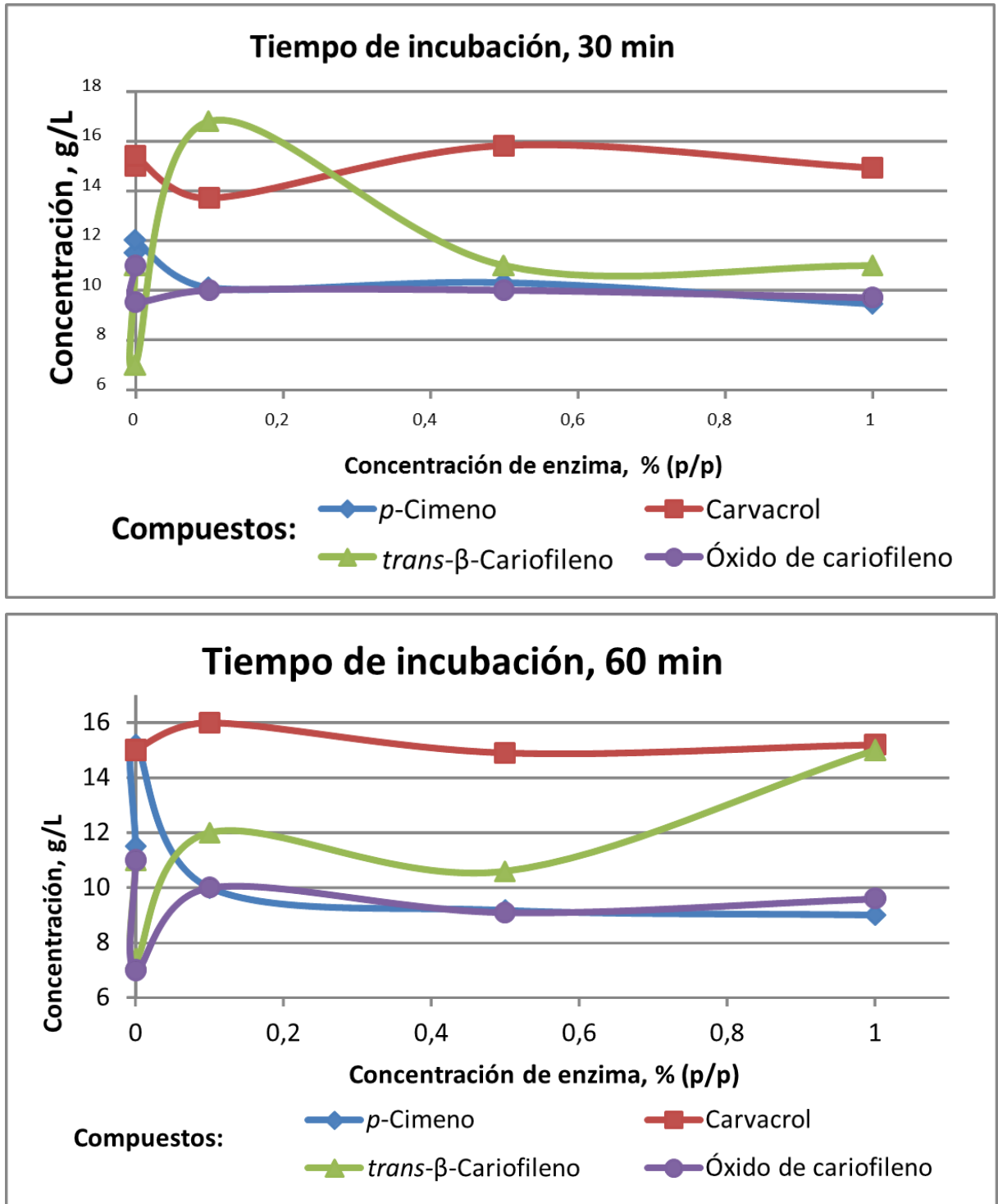
\*Índices de retención lineales (IRL) reportados por otros autores: Högnadóttir y Rouseff, 2003; Bicchi *et al.*, 2003; Szafranek *et al.*, 2005; Choi, 2003; Stashenko *et al.*, 2013.

Se identificaron y cuantificaron 24 metabolitos secundarios presentes en el aceite esencial; los compuestos mayoritarios fueron: el timol (643 - 814 g/L), carvacrol (15 - 19 g/L), p-cimeno (10 - 14 g/L), óxido de cariofileno (9 - 13 g/L) y trans-β-

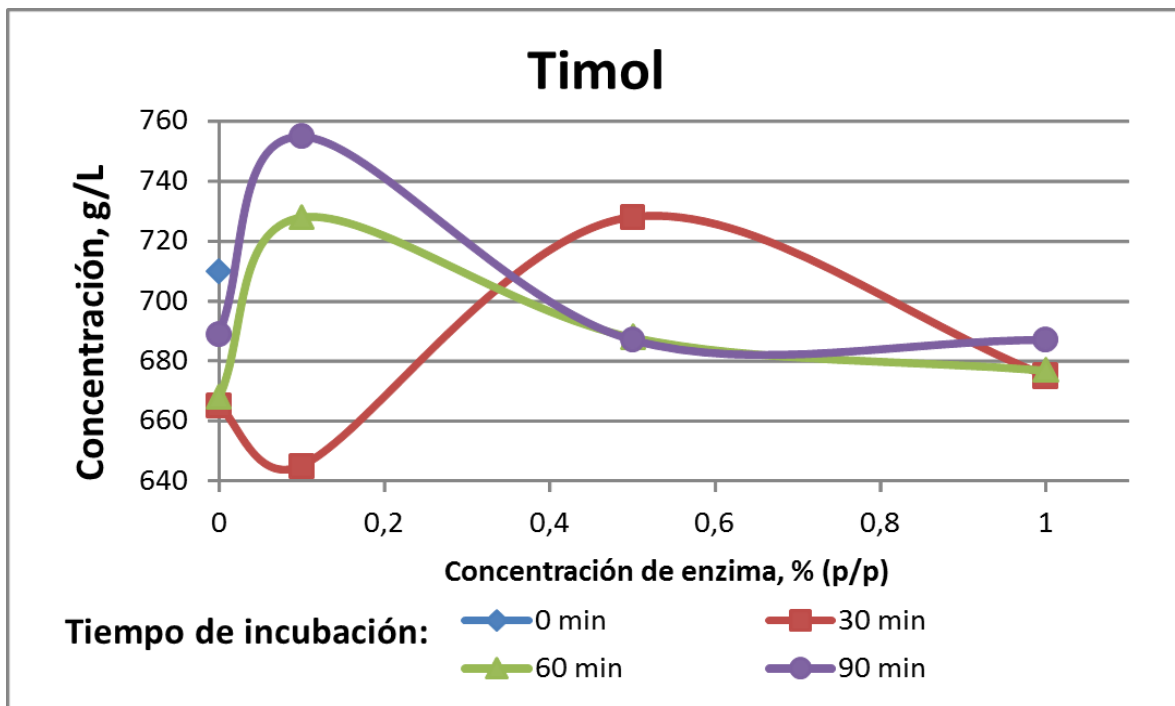
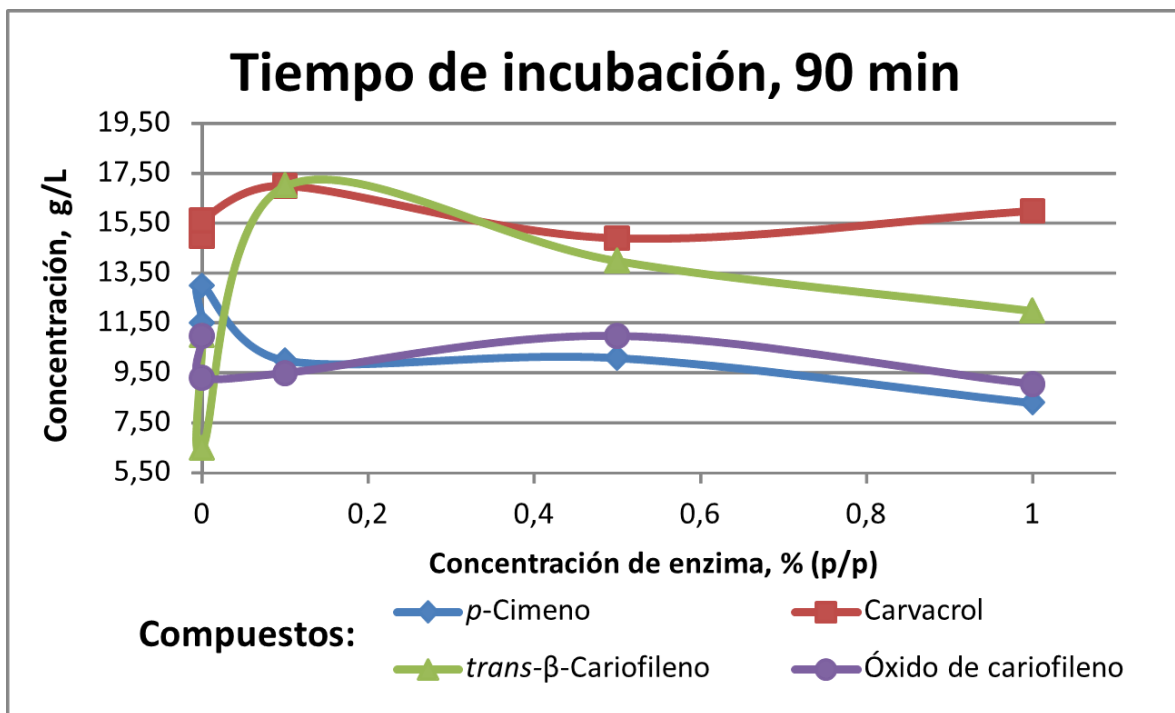
cariofileno (de 6 - 9 g/L); estos compuestos se encuentran en cantidades relativas mayores de 0,8% en el aceite esencial. Los demás compuestos identificados y cuantificados se encuentran en una concentración menor del 0,4%.

En las **Figuras 11 y 12**, se puede observar la variación de los compuestos mayoritarios del aceite esencial para cada tratamiento enzimático con Viscozyme®. El mayor contenido de timol, carvacrol y *trans*- $\beta$ -cariofileno, se obtuvo en el tratamiento con concentración de enzima 0,1% y tiempo de incubación 90 min. La concentración del *p*-cimeno y óxido de cariofileno disminuyó con el tratamiento enzimático, teniendo la mayor concentración en los blancos de extracción, sin tratamiento enzimático.

**Figura 11.** Variación en la concentración de los componentes mayoritarios en los aceites esenciales extraídos con tratamiento enzimático con Viscozyme®, con tiempos de incubación de 30 y 60 min.

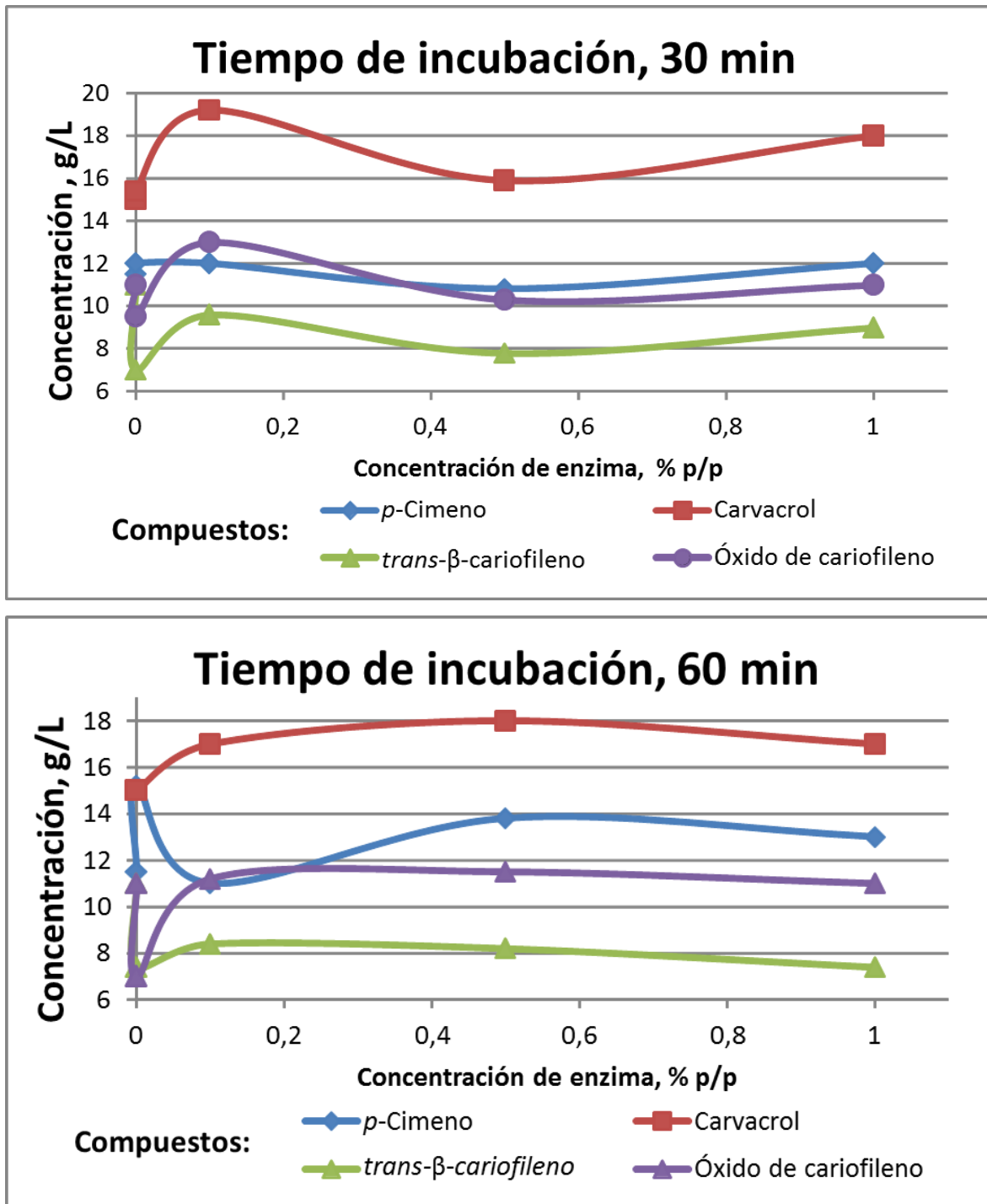


**Figura 12.** Variación en la concentración de los componentes mayoritarios en los aceites esenciales extraídos con tratamiento enzimático de tiempo de incubación de 90, y variación de la concentración de timol a diferente tratamiento enzimático con Viscozyme®.

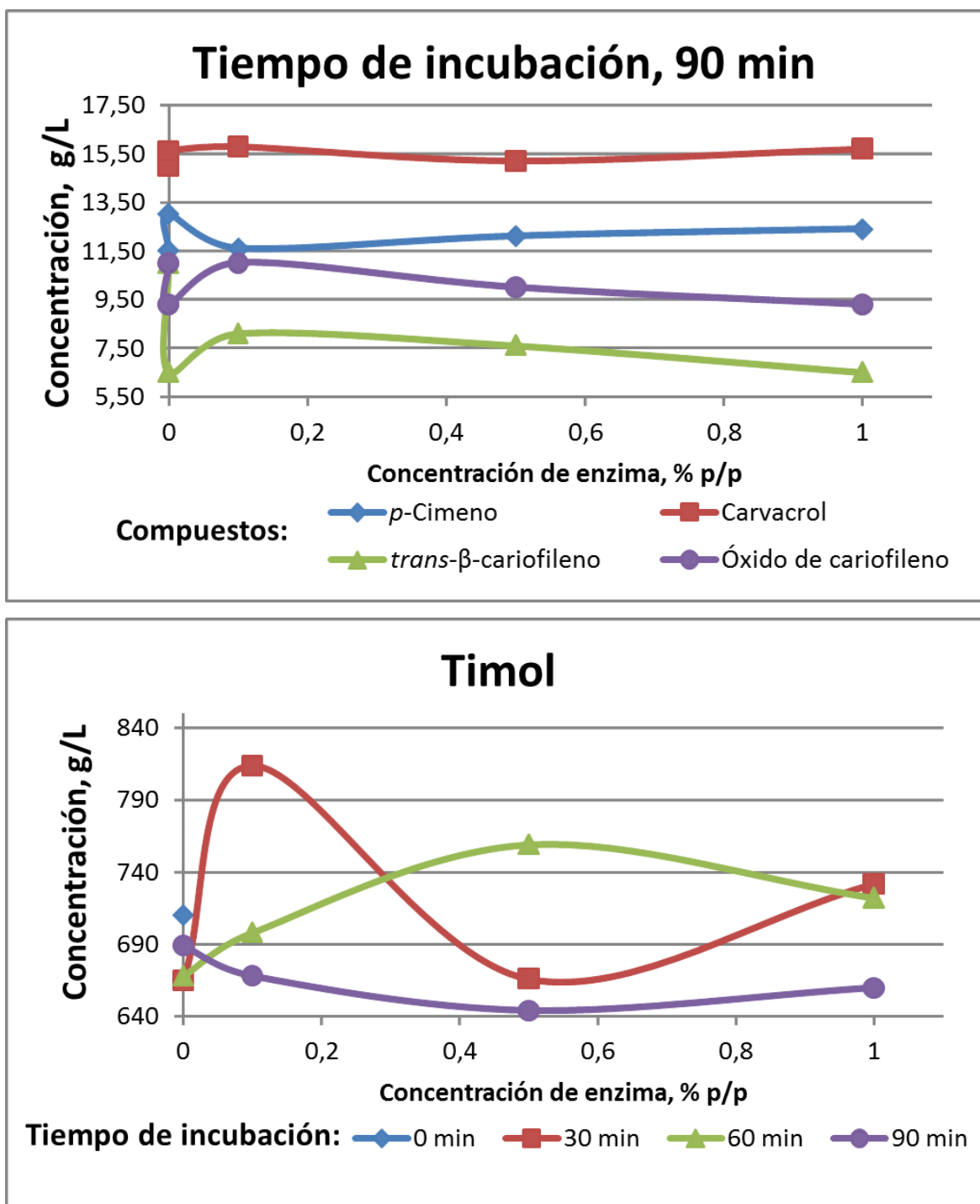


En las **Figuras 13 y 14**, se puede observar la variación de los compuestos mayoritarios del aceite esencial para cada tratamiento enzimático con Celluclast<sup>®</sup>, el mayor contenido de timol, carvacrol, óxido de cariofileno y *trans*- $\beta$ -cariofileno, se obtuvo en el tratamiento con concentración de enzima 0,1% y tiempo de incubación 30 min. En el tiempo de incubación de 30 min, los compuestos mayoritarios tienen a disminuir al aumentar la concentración de enzima. La concentración del *p*-cimeno disminuyó con el tratamiento enzimático, teniendo la mayor concentración en los blancos de extracción, los cuales no fueron tratados con enzima. Esto puede estar influenciado por la enzima, como se mencionó antes, al aumentar la concentración de enzima disminuye la actividad de la misma, lo cual puede producir que algunas células donde se almacenan estos compuestos no sean afectadas, manteniéndolos retenidos en el material vegetal.

**Figura 13.** Variación en la concentración de los componentes mayoritarios en los aceites esenciales extraídos con tratamiento enzimático con Celluclast®, con tiempos de incubación de 30 y 60 min.

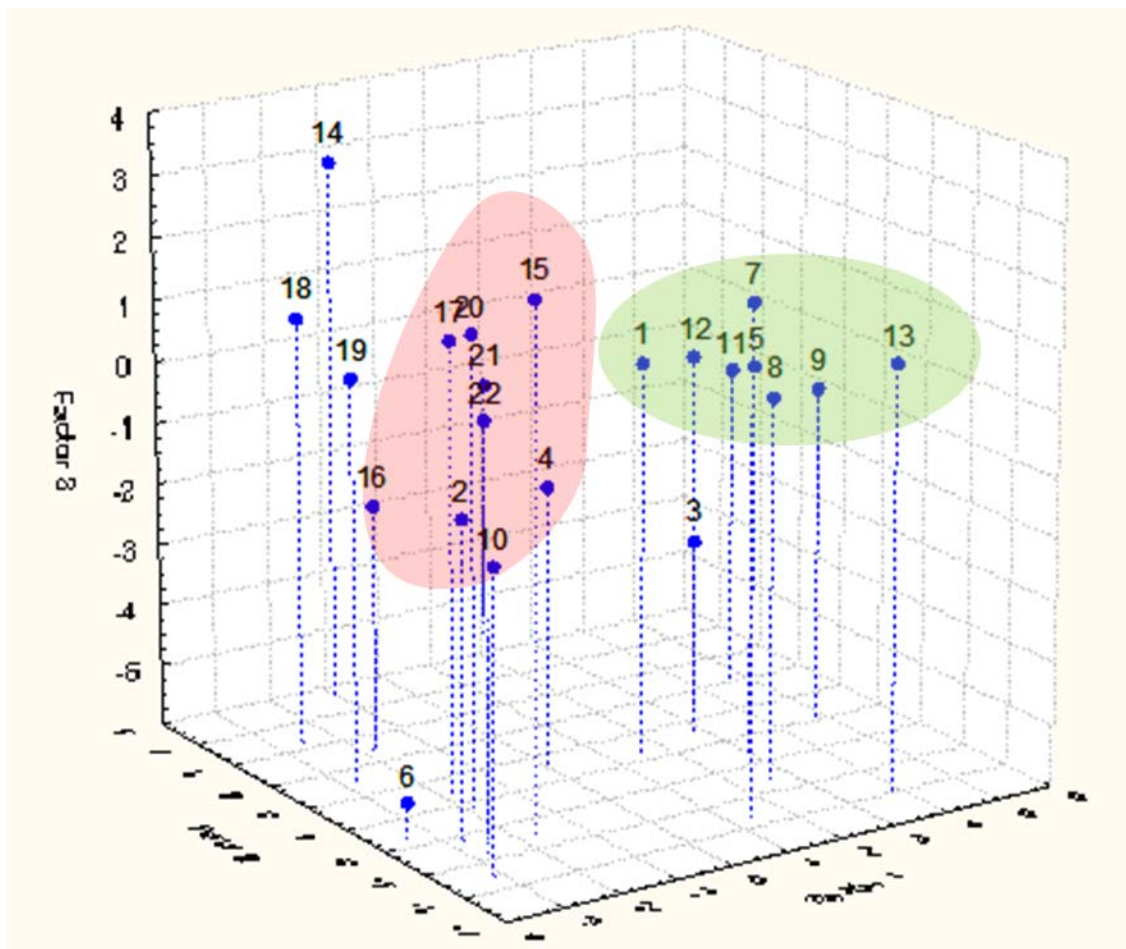


**Figura 14.** Variación en la concentración de los componentes mayoritarios en los aceites esenciales extraídos con tratamiento enzimático de tiempo de incubación de 90, y variación de la concentración de timol a diferente tratamiento enzimático con Celluclast®.



**5.2.1 Análisis de los componentes principales (PCA) del AE extraído bajo diferente tratamiento enzimático** Para establecer las comparaciones entre los tratamientos enzimáticos, se realizó el análisis de componentes principales (PCA, *STATISTICA* Versión 8), construido con base en las combinaciones lineales de las cantidades de los componentes presentes en los aceites esenciales (**Tablas 12 – 16**). Con estos datos, el análisis de componentes principales mostró que al utilizar los primeros tres componentes (factores 1 a 3), se representa el 65,4% de la información (el factor 1 representa el 34,22%, el factor 2 el 16,54% y el factor 3 el 14,74%)

**Figura 15.** Análisis de los componentes principales (PCA) del AE extraído bajo diferente tratamiento enzimático.



En la **Figura 15** se aprecia que el blanco de extracción y los aceites resultantes del tratamiento con la enzima Viscozyme<sup>®</sup>, con excepción del experimento 4, tuvieron una composición muy similar. Este grupo (Zona sombreada de color verde en la **Figura 15**) se distingue por tener un mayor contenido de *trans*- $\beta$ -cariofileno (13,3 g/L), *trans*- $\alpha$ -bergamoteno (2,2 g/L),  $\alpha$ -humuleno (8,4 g/L) y 1,8-cineol (0,5 g/L), en comparación con los demás aceites.

La zona sombreada de color rojo (**Figura 15**), hace referencia a algunos aceites resultantes del tratamiento enzimático con Celluclast<sup>®</sup>; estos aceites se caracterizan por tener un mayor contenido de Limoneno (1,36 g/L).

Los aceites resultantes de los experimentos 14, 18 y 19 tuvieron las cantidades más altas de timol (814, 759 y 722 g/L, respectivamente) y carvacrol (19,2, 18 y 17 g/L, respectivamente). En estos tres casos, se utilizó la enzima Celluclast<sup>®</sup>; para el experimento 14, se registró el mayor rendimiento de extracción del AE.

El experimento 3, tratado con Viscozyme<sup>®</sup>, y el experimento 6, un blanco de extracción, son los AE con el contenido de timol más bajo (645 g/L), aun así, difieren en su posición en la gráfica, debido a que el experimento 3 posee una cantidad de *trans*- $\beta$ -cariofileno, *trans*- $\alpha$ -bergamoteno,  $\alpha$ -humuleno y 1,8-cineol, similar a los experimentos de la Zona sombreada de color verde.

Se observó que, no solo el rendimiento de extracción del AE fue afectado por el tratamiento enzimático, también, la concentración de sus compuestos mayoritarios, así como lo reportaron Sowbhagya y colaboradores (2010), quienes observaron que el componente mayoritario del AE de comino fue afectado por el tratamiento enzimático, el  $\gamma$ -terpineno aumentó levemente del 25 al 29%, con celulasa, y del 25 al 27,5%, con Viscozyme<sup>®</sup>. Hosni y colaboradores (2013) observaron un fenómeno similar en el AE de romero, en el que el componente

mayoritario, 1,8-cineol, disminuyó su cantidad de 55,9 a 49,9%, en un tratamiento enzimático con celulasa, mientras que el alcanfor presente en el mismo AE, incrementó su cantidad de 10,6 a 12,6%.

La efectividad del tratamiento enzimático, puede variar para cada planta o material vegetal con el cual se trabaje, debido, en gran parte, a la forma en la cual se encuentre la celulosa (cristalina o amorfa), que forma la pared celular de las células vegetales, razón por la cual los resultados encontrados por otros autores no son comparables entre sí, debido a que estas enzimas solo actúan sobre la celulosa amorfa: entre más celulosa amorfa componga la pared celular en estas plantas mayor será su actividad.

## 6. CONCLUSIONES

1. El análisis de la varianza muestra que solo la concentración de enzima y el tiempo de incubación tuvieron una influencia significativa sobre el rendimiento de extracción del AE.
2. Los tratamientos enzimáticos se llevaron a cabo con dos enzimas, Celluclast<sup>®</sup> y Viscozyme<sup>®</sup>, los cuales presentaron un incremento máximo en el rendimiento de extracción del aceite esencial con respecto al blanco de extracción de 24%, para Viscozyme<sup>®</sup>, y 24,9%, para Celluclast<sup>®</sup>, en el tratamiento con la enzima en concentración de 0,1% y el tiempo de incubación 90 min.
3. En el tratamiento enzimático con Celluclast<sup>®</sup>, el rendimiento de extracción de AE fue influenciado por la concentración de enzima. Al aumentar la cantidad de enzima, el rendimiento de extracción disminuyó, para tiempos de incubación de 30 y 90 min. Con la enzima Viscozyme<sup>®</sup>, el rendimiento de extracción presentó la misma tendencia, solo en los tratamientos realizados a 60 min de tiempo de incubación.
4. La composición química de los aceites esenciales no presentó una variación en el número de compuestos, pero sí se observó, que la cantidad de los compuestos mayoritarios varió. Para los tratamientos realizados con Viscozyme<sup>®</sup>, el carvacrol, *p*-cimeno y óxido de cariofileno, no variaron significativamente con relación al blanco; caso contrario se presentó con el timol y *trans*- $\beta$ -cariofileno, los cuales disminuyeron al aumentar la concentración de enzima. En los tratamientos con Celluclast<sup>®</sup>, el timol, carvacrol, óxido de cariofileno y *trans*- $\beta$ -cariofileno tuvieron su máxima concentración en el tratamiento con enzima al 0,1% y tiempo de incubación

de 30 min, y se observó que la concentración de estos compuestos disminuyó al incrementar la concentración de enzima.

5. Los tratamientos que presentaron un mayor rendimiento de extracción del AE y en los cuales se obtuvieron las concentraciones más altas de sus compuestos mayoritarios son tiempo de incubación 90 min y concentración de enzima 0,1% (Viscozyme<sup>®</sup>) y tiempo de incubación 30 min y concentración de enzima 0,1% (Celluclast<sup>®</sup>).

## **7. RECOMENDACIONES**

Con base en los resultados obtenidos para cada tratamiento enzimático, se recomienda llevar a escala industrial el presente estudio para realizar un estudio de costos más detallado.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Cuarta edición. Carol Stream, Illinois, EE.UU. **2007**, Editorial Allured Publishing Corporation, pp. 6, 7.

AOAC Official Method 995.09, chlortetracycline, oxytetracycline and tetracycline in edible animal tissues.

ÁVALOS GARCÍA, A., PÉREZ-URRIA CARRIL, E. Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. **2009**, Vol. 2, N° 3, pp. 119 – 145.

BANDONI, A. (Ed.), Los recursos vegetales aromáticas en Latinoamérica, Editorial de la Universidad Nacional de la Plata. **2007**, Segunda edición. Argentina, pp. 29.

BEYER, A; WALTER, W. Manual de química orgánica. Editorial Reverté. Versión en español de la 19ª edición alemana. Barcelona. **1987**, pp. 248 – 249.

BICCHI, C., RUBIOLO, P., SARANZ CAMARGO, E. E., VILEGAS, W., DE SOUZA GRACIOSO, J., MONTEIRO SOUZA BRITO, A. R. Components of *Turnera diffusa* Willd. var *Af rodisiaca* (Ward) Urb. Essential Oil. Flavour and Fragrance Journal. **2003**, Vol. 18, pp. 59 – 61.

CERPA CHÁVEZ, M. G. Hidrodestilación de aceites esenciales: modelación y caracterización. Universidad de Valladolid, Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente, España, Tesis Doctoral. **2007**, pp. 14.

CHANDRAN, J., PADMAKUMARI AMMA, K. P., MENON, N., PURUSHOTHAMAN, J., NISHA, P. Effect of Enzyme-Assisted Extraction on Quality and Yield of Volatile Oil from Black Pepper and Cardamom. *Food Science and Biotechnology*. **2012**, Vol. 21, N° 6, pp. 1611 – 1617.

CHOI, H. S. Character Impact Odorants of Citrus Hallabong [(*C. unshiu* Marcov X *C. sinensis* Osbeck) X *C. reticulata* Blanco] Cold-Pressed Peel Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2003**, Vol. 51, N° 9, pp. 2687 – 2692.

CONVERSE, A. O., OPTEKAR, J. D. A synergistic kinetics model for enzymatic cellulose hydrolysis compared to degree-of-synergism experimental results. *Biotechnology and Bioengineering*. **1993**, Vol. 42, pp. 145 – 148.

HÖGNADOÓTTIR, Á., ROUSEFF, R. L. Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography–olfactometry and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **2003**, Vol. 998, pp. 201 – 211.

HOSNI, K., HASSEN, I., CHAÂBANE, H., JEMLI, M., DALLALI, S., SEBEI, H., CASABIANCA, H. Enzyme-assisted extraction of essential oils from thyme (*Thymus capitatus* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.): Impact on yield, chemical composition and antimicrobial activity. *Industrial Crops and Products*. **2013**, Vol. 47, pp. 291 – 299.

HÜSNÜ CAN BASER, K., BUCHBAUER, G. *Handbook of Essential oils: science, technology and applications*, Editorial Taylor & Francis Group, EE.UU. **2010**, pp. 91.

KARASEK, F. W., CLEMENT, R. E. Basic gas chromatography – mass spectrometry, principles and techniques. Elsevier Science Publishers B. V., primera edición, New York. 1988, pp. 5, 19 – 21, 41, 79 – 101.

MARTÍNEZ, A. Aceites esenciales. Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, **2003**, <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/esencias2001b.pdf>, fecha de consulta: octubre 14 de 2013.

MCNAIR, H., MILLER, J. Basic Gas Chromatography, Wiley, 2ª Edición, Canada. 2009, pp. 125.

MISHIRA, D., SHUKLA, A., DIXIT, A. K., SINGH, K. Aqueous enzymatic extraction of oil from mandarin peels. Journal of Oleo Science. **2005**, Vol. 54, N° 6, pp. 355 – 359.

NIDETZKY, B., STEINER, W. A new approach for modeling cellulase–cellulose adsorption and the kinetics of the enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose. Biotechnology and Bioengineering. **1993**, Vol. 42, pp. 469 – 479.

OLIVEIRA, D., LEITAO, G., BIZZO, H., LOPES, D., ALVIANO, S., ALVIANO, C., LEITAO, S. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. Food Chemistry. **2007**, Vol. 101, pp. 236 – 240.

OVANDO-CHACÓN, S. L., WALISZEWSKI, K. N. Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. Universidad y Ciencia. **2005**, Vol. 21, N° 42, pp. 111 – 120.

ROSSY, J. P., DELFINO, J. M. 'Cienciometría' Instrumentos de evaluación y crítica. Revista Ciencia Hoy en línea, Vol. 15, N° 89, pp. 24 – 29, **2005**. Disponible en <http://www.cienciahoy.org.ar/ch/ln/hoy89/cienciometria.htm>.

SOWBHAGYA, H., PURNIMA, K., FLORENCE, S., APP.U RAO, A. G., SRINIVAS, P. Evaluation of enzyme-assisted extraction on quality of garlic volatile oil. Journal of Food Chemistry. **2009**, Vol. 113, pp. 1234 – 1238.

SOWBHAGYA, H., SRINIVAS, P., PURNIMA, K. T., KRISHNAMURTHY, N. Enzyme-assisted extraction of volatiles from cumin (*Cuminum cyminum* L.) seeds. Journal of Food Chemistry. **2011**, Vol. 127, pp. 1856 – 1861.

STASHENKO, E. E., JARAMILLO, B. E., MARTÍNEZ, J. R. 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. Journal of Chromatography A. **2004** Vol. 1025, pp. 93 – 103.

STASHENKO, E. E., MARTÍNEZ, J. R., CALA, M. P., DURÁN, D. C., CABALLERO, D. Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants. Journal of Separation Science. **2011**, Vol. 36, pp. 192 – 202.

STASHENKO, E., RUÍZ, C., MUÑOZ, A., CASTAÑEDA, M., MARTÍNEZ, J. Composition and antioxidant activity of essential oils of *Lippia origanoides* H.B.K. grown in Colombia. Natural Product Communications. **2008**, Vol. 3, N° 4, pp. 563 – 566.

SZAFRANEK, B., CHRAPKOWSKA, K., PAWINÄ SKA, M., SZAFRANEK, J. Analysis of Leaf Surface Sesquiterpenes in Potato Varieties. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **2005**, Vol. 53, N°. 8, pp. 2817 – 2822.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. Introducción a la microbiología, Editorial Medica Panamericana. Novena edición, Buenos Aires. **2007**, pp. 116 – 129.

Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, <http://www.biovirtual.unal.edu.co>, fecha de consulta: diciembre 03 de 2013.