

**COMPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES
ESENCIALES DE LAS PLANTAS DE *Lippia alba* (Mill) N.E Brown,
PROVENIENTES DE DIFERENTES REGIONES DE COLOMBIA**

LUZ ADRIANA MONSALVE SALAMANCA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2007**

**COMPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES
ESENCIALES DE LAS PLANTAS DE *Lippia alba* (Mill) N.E Brown,
PROVENIENTES DE DIFERENTES REGIONES DE COLOMBIA**

LUZ ADRIANA MONSALVE SALAMANCA

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

Directora: Elena Stashenko, Química, Ph. D.

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2007**

DEDICATORIA

A mis padres, pues sin su infinita paciencia y apoyo, nada de esto habría sido posible.

A Fernandito, por estar siempre a mi lado cuando más lo necesitaba.

AGRADECIMIENTOS

De manera especial, quiero agradecer a la doctora Elena E. Stashenko por todas sus enseñanzas, consejos y confianza. Por servirme de guía en la culminación de mi formación profesional y por su apoyo incondicional.

Al doctor Jairo René Martínez, por tener siempre una respuesta a todas mis dudas e inquietudes.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Cromatografía por el apoyo y colaboración, que de alguna manera contribuyeron en la realización de este trabajo.

Con todo el corazón quiero agradecer a mis padres, que a pesar de las dificultades jamás dejan de brindarme su apoyo, y por tanto he llegado hasta este punto tan importante en mi vida. A mi papá le doy gracias por heredarme el amor por el trabajo, y a mi mamá, por enseñarme a creer en mi misma.

A Cecilia, mi nonita, por enseñarme que la fé es el único vehículo capaz de llevarme tan lejos como quiera, sin importar lo difícil que sea el camino. Igualmente agradezco a mis hermanas Carolina e Ingrid, quienes me han servido de ejemplo en lo personal y profesional.

Finalmente, quiero dar gracias a Fernando por invitarme al fascinante mundo de la Química, y quien le debo todo el amor a mi profesión.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	20
1. ESTADO DEL ARTE	23
1.1 <i>Lippia alba</i>	23
1.2 ACEITES ESENCIALES. GENERALIDADES	29
1.2.1 Definición	29
1.2.2 Biogénesis de los aceites esenciales	30
1.2.2.1 Metabolismo de las plantas	30
1.2.2.2 Ubicación de los aceites esenciales en las plantas	32
1.2.3 Composición química	33
1.2.4 Propiedades físico-químicas	35
1.2.5 Aplicaciones	35
1.2.6 Clasificación	36
1.3 EXTRACCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES	37
1.3.1 Destilación	38
1.3.1.1 Hidrodestilación	38
1.3.1.2 Destilación por arrastre con vapor	38
1.3.1.3 Destilación con vapor/agua	40
1.3.1.4 Hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHD)	41
1.4 ANÁLISIS Y CONTROL DE CALIDAD DE LOS ACEITES ESENCIALES	42
1.4.1 Cromatografía de gases	45
1.4.2 Cromatografía de gases-espectrometría de masas	47
1.5 PROCESAMIENTO INDUSTRIAL DE LOS ACEITES ESENCIALES	48
1.6 CARVONA	49
1.7 CITRAL	52

1.8 LIMONENO	54
1.9 MERCADO MUNDIAL DE LOS ACEITES ESENCIALES	55
1.10 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA)	57
2. METODOLOGÍA	59
2.1 CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA	59
2.2 RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	59
2.3 EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES	62
2.3.1 Hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHD)	62
2.3.2 Destilación vapor/agua	63
2.4 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA SU ANÁLISIS POR GC-MS	64
2.5 DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES FÍSICAS DE LOS AEs DE <i>Lippia alba</i>	65
2.6 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO	66
2.6.1 Columna apolar	66
2.6.2 Columna polar	67
2.6.3 Cuantificación de los metabolitos secundarios	69
2.7 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA) DE LOS AEs DE <i>Lippia alba</i>	69
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	71
3.1 ACEITES ESENCIALES OBTENIDOS DE DIFERENTES REGIONES DE COLOMBIA	71
3.1.1 Rendimiento de los aceites esenciales	71
3.1.2 Caracterización química de los aceites esenciales de <i>Lippia alba</i> , mediante GC-MS	73
3.1.3 Análisis de componentes principales (PCA) de los AEs de <i>L. alba</i> , extraídos por MWHD de plantas provenientes de diferentes regiones de Colombia	85
3.2 ACEITES ESENCIALES OBTENIDOS DE HOJAS JÓVENES Y	87

MADURAS DE DOS QUIMIOTIPOS DE <i>Lippia alba</i>	
3.2.1 Rendimiento de los aceites esenciales	87
3.2.2 Caracterización química de los AEs de <i>Lippia alba</i> , extraídos de hojas jóvenes y maduras por GC-MS	88
3.2.3 Relación estructura-olor	98
3.3 EXTRACCIÓN DE AEs DE <i>Lippia alba</i> MEDIANTE DESTILACIÓN VAPOR/AGUA	99
3.3.1 Análisis organoléptico y determinación de las constantes físicas de los AEs de <i>Lippia alba</i> , quimiotipo Carvona	108
3.3.2 Análisis de componentes principales (PCA) de los AEs de <i>Lippia alba</i> , empleando diferentes materiales de destilación	110
3.4 ANÁLISIS POR GC-MS DE LOS AEs DE <i>Lippia alba</i>	112
4. CONCLUSIONES	122
5. RECOMENDACIONES	125
6. BIBLIOGRAFÍA	126

LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1.	Variación química de los AEs de <i>L. alba</i> cultivada en diferentes regiones del mundo.	26
Tabla 2.	Aplicaciones de los aceites esenciales.	36
Tabla 3.	Clasificación de los aceites esenciales.	37
Tabla 4.	Ventajas y desventajas de los métodos de extracción de los AEs.	42
Tabla 5.	Clasificación de los parámetros analíticos utilizados para el control de calidad de los AEs.	43
Tabla 6.	AEs empleados en los países de la Unión Europea.	56
Tabla 7.	Números de <i>voucher</i> en el Herbario Nacional (COL) de las especies de <i>Lippia alba</i> bajo estudio.	59
Tabla 8.	Cantidad de material vegetal y número de plantas recolectadas en las 14 regiones de Colombia.	61
Tabla 9.	Rendimientos de los AEs obtenidos por MWHD, de plantas de <i>Lippia alba</i> provenientes de las diferentes regiones de Colombia.	73
Tabla 10.	Cantidad relativa (%) de los principales componentes de los aceites esenciales de <i>Lippia alba</i> (Quimiotipo <i>Carvona</i>), aislados por MWHD.	76
Tabla 11.	Cantidad relativa (%) de los principales componentes de los aceites esenciales de <i>Lippia alba</i> (Quimiotipo <i>Citral</i>), aislados por MWHD.	79
Tabla 12.	Composición química de los aceites esenciales de <i>Lippia alba</i> , provenientes de diferentes lugares geográficos.	84
Tabla 13.	Rendimientos de los AEs de <i>L. alba</i> , extraídos por MWHD, de	87

	hojas jóvenes y maduras.	
Tabla 14.	Concentración (μg de analito/kg de M.V.) de los principales componentes en los AEs aislados por MWHD de <i>Lippia alba</i> , quimiotipo Carvona, obtenidos de hojas jóvenes y maduras.	90
Tabla 15.	Concentración (μg de analito/kg de M.V.) de los principales componentes de los AEs de <i>Lippia alba</i> , aislados por MWHD, de hojas jóvenes y maduras (quimiotipo Citral).	94
Tabla 16.	Tiempos de extracción y rendimientos de los AEs de <i>Lippia alba</i> , empleando MWHD y destiladores fabricados en diferente material.	100
Tabla 17.	Concentración (μg de analito/kg de M.V.) de los principales componentes de los AEs de <i>Lippia alba</i> , obtenidos por MWHD y destilación vapor/agua, usando destiladores de cobre y acero inoxidable.	101
Tabla 18.	Propiedades físicas de los AEs extraídos de hojas de <i>Lippia alba</i> , quimiotipo Carvona.	109

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. <i>Lippia alba</i> (Mill) N.E Brown ex Britton & Wills.	23
Figura 2. Ubicación geográfica en el mundo de los quimiotipos de la especie <i>L. alba</i> estudiados.	27
Figura 3. Rutas de biosíntesis de los metabolitos secundarios y su relación con los metabolitos primarios.	31
Figura 4. Principales componentes de un equipo de extracción por arrastre con vapor.	40
Figura 5. Principales bloques de un cromatógrafo de gases.	46
Figura 6. Principales bloques de un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas.	48
Figura 7. Estructuras de los isómeros ópticos de la carvona: 7a-S-(+)- carvona, 7b-R(-)- carvona.	49
Figura 8. Estructuras de los isómeros 8a-geranial y 8b-neral .	53
Figura 9. Estructuras de los isómeros ópticos del limoneno: 9a-R-(+)- limoneno, 9b-S(-)- limoneno.	54
Figura 10. Sitios de muestreo de las plantas de <i>Lippia alba</i> en diferentes regiones de Colombia.	60
Figura 11. Clasificación del material vegetal (hojas jóvenes y maduras).	62
Figura 12. Destiladores semi-industriales. A. Destilador de cobre; B. Destilador de acero inoxidable.	64
Figura 13. Cromatógrafo de gases <i>Agilent Technologies 6890 Plus Serie GC System</i> acoplado a un detector selectivo de masas <i>Agilent Technologies 5973 Network</i> .	67

- Figura 14.** Cromatógrafo *Agilent Technologies 6890N Network Series* GC acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 5975*. 68
- Figura 15.** Perfiles cromatográficos típicos de los AEs de *Lippia alba*, obtenidos por MWHD. **A.** Quimiotipo *Carvona*, **B.** Quimiotipo *Citral*, **C.** Quimiotipo híbrido (carvona + citral). Columna DB-5MS (60 m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los compuestos se reportan en las **Tablas 10** y **11**. 74
- Figura 16.** Compuestos mayoritarios en los AEs de *Lippia alba*, obtenidos por MWHD, de plantas cultivadas en Saravena, Colorado y Turbaco. 82
- Figura 17.** Análisis de componentes principales (PCA) de los compuestos presentes en los AEs de *L. alba*, aislados por MWHD, de plantas provenientes de 14 regiones de Colombia. **A.** Quimiotipo *Carvona*; **B.** Quimiotipo híbrido (carvona + citral); **C.** Quimiotipo *Citral*. 86
- Figura 18.** Perfiles cromatográficos típicos de los AEs obtenidos por MWHD. **A.** Hojas jóvenes; **B.** Hojas maduras, de *Lippia alba*, quimiotipo *Carvona*. Columna DB-5MS (60 m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los compuestos se reporta en la **Tabla 14**. 89
- Figura 19.** Principales compuestos presentes en los AEs de *Lippia alba*, obtenidos por MWHD, de hojas jóvenes (**HJ**) y maduras (**HM**), quimiotipo *Carvona*. 92
- Figura 20.** Perfiles cromatográficos típicos de los AEs de *L. alba*, obtenidos por MWHD. **A.** Hojas jóvenes; **B.** Hojas maduras, quimiotipo *Citral*. Columna DB-5MS (60 m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los compuestos se reporta en la **Tabla 15**. 93

Figura 21.	Principales compuestos presentes en los AEs de <i>Lippia alba</i> , obtenidos por MWHD, de hojas jóvenes (HJ) y maduras (HM), quimiotipo Citral.	96
Figura 22.	Perfil cromatográfico típico del AE de <i>Lippia alba</i> , aislado por destilación vapor/agua (destilador de acero inoxidable). Columna DB-5MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los picos se reporta en la Tabla 17 .	101
Figura 23.	Estructuras químicas de los metabolitos secundarios volátiles extraídos de <i>Lippia alba</i> , quimiotipo <i>Carvona</i> . Los nombres químicos, según el número de pico, aparecen en la Tabla 17 .	104
Figura 24.	Distribución de las principales familias de los compuestos en los AEs de <i>Lippia alba</i> , obtenidos por MWHD, y en destiladores fabricados en cobre y en acero inoxidable.	107
Figura 25.	Análisis de componentes principales (PCA) de los AEs de <i>Lippia alba</i> , quimiotipo <i>Carvona</i> , aislados por MWHD y destilación vapor/agua empleando destiladores fabricados en diferentes materiales.	111
Figura 26.	Espectro de masas del β - mirceno.	113
Figura 27.	Espectro de masas del limoneno.	114
Figura 28.	Espectro de masas del linalool.	115
Figura 29.	Espectro de masas de la carvona.	117
Figura 30.	Espectro de masas del geranial.	118
Figura 31.	Espectro de masas de la piperitona.	119
Figura 32.	Espectro de masas del biciclosesquifelandreno.	121

LISTA DE ESQUEMAS

	Pág.
Esquema 1. Síntesis de la carvona vía oxidación del limoneno.	51
Esquema 2. Productos de reacciones de reducción de la carvona: 2a -carvomentol; 2b -carvomentona; 2c -dihidrocarvona; 2d -carveol y 2e -limoneno.	52
Esquema 3. Productos de la hidrogenación del neral (3a , nerol) y geranial (3b , geraniol).	54
Esquema 4 Posibles rutas de fragmentación del β -Mirceno.	113
Esquema 5. Posibles rutas de fragmentación del limoneno.	114
Esquema 6. Posibles rutas de fragmentación del linalool.	116
Esquema 7. Posibles rutas de fragmentación de la carvona.	117
Esquema 8 Posibles rutas de fragmentación del geranial.	118
Esquema 9. Posibles rutas de fragmentación de la piperitona.	120
Esquema 10. Posibles rutas de fragmentación del biciclosesquifelandreno.	121

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AE	Aceite esencial.
AEs	Aceites esenciales.
°C	Grado(s) <i>Celsius</i> .
CENIVAM	Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Tropicales Aromáticas y Medicinales.
CIBIMOL	Centro de Investigación en Biomoléculas.
cm	Centímetros.
d_f	Espesor de la fase estacionaria, μm .
D.I.	Diámetro interno, mm.
EI	<i>Electron Impact</i> (Impacto de electrones).
eV	Electrón-voltio.
e.g.	Por ejemplo.
f.e.	Fase estacionaria.
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> (Organización de la Agricultura y Alimentos).
FID	<i>Flame Ionisation Detector</i> (Detector de ionización en llama).
GC	<i>Gas Chromatograph, Gas Chromatography</i> (Cromatógrafo de gases o cromatografía de gases, según el contexto).
GC-MS	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas).
GHz	giga-Hertz.
h	Hora(s).
ha	Hectárea(s).
HD	<i>Hydrodistillation</i> (Hidrodestilación).

HRGC	<i>High Resolution Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases de alta resolución).
HRGC-MS	<i>High Resolution Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases de alta resolución acoplada a espectrometría de masas).
<i>i.e.</i>	Es decir, o sea.
I_k	Índices de Kovàts.
Istd	<i>Internal Standard</i> (Estándar interno).
J	Julios.
kg	Kilogramo(s).
L	Litros.
<i>L. alba</i>	<i>Lippia alba</i> .
m	Metro(s).
MD-GC	<i>Multidimensional Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases multidimensional).
mL	Mililitro(s).
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar.
min	Minuto(s).
mm	Milímetro(s).
M.V.	Material vegetal.
MWHD	<i>Microwave-Assisted Hydrodistillation</i> (Hidrodestilación asistida por radiación de microondas).
MSD	<i>Mass Selective Detector</i> (Detector selectivo de masas).
<i>m/z</i>	Relación masa/carga.
% (p/p)	Porcentaje peso a peso.
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> (Análisis de componentes principales).
PDMS	<i>Poly (dimetilsiloxane)</i> [Poli (dimetilsiloxano)].
SD	<i>Steam Distillation</i> (Destilación con vapor).
SDE	<i>Simultaneous Distillation-Solvent Extraction</i> (Destilación-

	extracción simultánea).
SFE	<i>Supercritical Fluid Extraction</i> (Extracción con fluido supercrítico).
TIC	<i>Total Ion Current</i> (Corriente iónica total).
ton	Tonelada.
µm	Micrómetro(s).
µL	Microlitro(s).
UIS	Universidad Industrial de Santander.
W	Vatio(s).

RESUMEN

TÍTULO: COMPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE LAS PLANTAS DE *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown, PROVENIENTES DE DIFERENTES REGIONES DE COLOMBIA*

Autor: Luz Adriana Monsalve Salamanca**

Palabras clave: Aceite esencial, hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHHD), *Lippia alba*.

La especie *Lippia alba*, familia *Verbenaceae*, llama la atención de los investigadores no solo por su amplia distribución, variables usos, sino también, por presentar cambios en la composición química de sus aceites esenciales (AEs) de acuerdo con la ubicación geográfica, características fisicoquímicas del suelo y clima, entre otras.

En el presente estudio se analizaron los metabolitos secundarios volátiles de plantas de *L. alba*, recolectadas en 14 localidades diferentes de Colombia. Adicionalmente, se realizó una comparación de la composición química de los AEs aislados de hojas jóvenes y maduras de dos quimiotipos (citrál y carvona) de *L. alba* sembradas en la zona de cultivos experimentales del CENIVAM, ubicado dentro de las instalaciones de la UIS, Bucaramanga (Santander). Finalmente, se emplearon dos destiladores semi-industriales de diferente material de fabricación (cobre y acero), con el fin de evaluar las composiciones químicas, propiedades fisicoquímicas y rendimientos de los AEs.

Los AEs fueron obtenidos por hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHHD) y analizados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). El análisis comparativo de los AEs obtenidos de las plantas de *L. alba*, exhibió la presencia de tres quimiotipos, a saber: Carvona (ca. 41%), Citral (neral + geranial) (ca.50%), y un quimiotipo Híbrido, no descrito previamente en la literatura, caracterizado por el alto contenido tanto de la Carvona (ca. 23%), como de Citral (ca. 20%). El material de fabricación de los destiladores semi-industriales (cobre y acero) no afectó las propiedades fisicoquímicas de los AEs de *L. alba*, sin embargo, las características organolépticas de éstos variaron de acuerdo con el equipo de extracción empleado, especialmente, con el de cobre, el cual exhibió un AE con un olor intenso y penetrante, dejando una sensación un poco desagradable.

* Tesis de grado.

** Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Directora, Elena E. Stashenko.

ABSTRACT

TITLE: COMPARISON OF THE CHEMICAL COMPOSITION OF THE ESSENTIAL OILS OF THE *Lippia alba* (MILL) N.E BROWN PLANTS, FROM DIFFERENT COLOMBIAN REGIONS

Author: Luz Adriana Monsalve Salamanca

Key words: Essential oils, microwave assisted hydro-distillations (MWHD), *Lippia alba*.

The *Lippia alba* specie, *Verbenaceae* family, captures the attention of researchers not only because of its wide distribution and variable uses, but also, because of showing changes in the chemical composition of its essential oils (EOs) according to its geographical location, physical-chemical characteristics of the ground and weather, among other things.

In the present research the volatile secondary metabolite of the *L. alba* plants were analyzed, collected in 14 different Colombian localities. In addition to this, a comparison was done of the isolated EOs of the young and mature leaves of two chemotypes (citral and carvone) of *L. alba* grown in the experimental cultivation zone of the CENIVAM, located inside the installations of UIS, Bucaramanga, (Santander). Finally two semi-industrial distillers made of different materials (copper and steel) were used to evaluate the chemical compositions, physical-chemical qualities and EOs performance.

The EOs were obtained by microwave assisted hydro-distillations (MWHD) and analyzed by gas chromatography joint to mass spectrometry (GC-MS). The comparative analysis of the EOs obtained of the *L. alba* plants, showed the presence of three chemotypes, as: Carvone (ca. 41%), Citral (neral + geranial) (ca. 50%), and a hybrid chemotype not previously described in books, characterized by the high contain of Carvone (ca. 23%), as well as Citral (ca. 20%). The material of which the semi-industrial distillers are made (copper and steel) didn't affect the physical-chemical qualities of the *L. alba* EOs, however, the sensory-perception qualities of these changed according to the extracting equipment used, especially, with copper, which showed an EO with an intense and penetrating smell, leaving an unpleasant sensation.

* Tesis de grado.

** Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química.
Directora, Elena E. Stashenko.

INTRODUCCIÓN

Históricamente, el hombre ha centrado su atención en los productos naturales, los cuales han sido empleados como fuente de sustancias con diversas actividades, e.g. antimicrobial, antioxidante y/o farmacéutica, entre otras [8, 13]. Entre las sustancias de origen natural de gran interés en las industrias de fragancias, sabores, cosméticos, alimentos y farmacéutica, principalmente, se encuentran los aceites esenciales (AEs), término introducido presumiblemente por Theophrastus Paracelsus en el siglo XVI, quien los consideraba el quinto principio vital [8, 40, 84].

La industria de los aceites esenciales nace en el siglo XIX en países como Francia y en los Estados Unidos. Los primeros estudios en el campo de aceites esenciales se deben a J.J. Houton de Labillardière, quien en 1818 realizó el análisis elemental del aceite de trementina. Seguidamente, los químicos famosos J. Berzelius, J.B. Dumas, J. von Liebig y F. Wöhler estudiaron las esencias aplicando diversos métodos para separar y analizar sus componentes [53, 84].

Los AEs son mezclas complejas de compuestos volátiles extraídos de plantas aromáticas [8, 105]. Aprovechando la gran biodiversidad que posee Colombia, estimada en 51.220 especies de plantas vasculares, el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Tropicales Aromáticas y Medicinales (CENIVAM), tiene como propósito realizar un estudio de especies aromáticas y medicinales promisorias, que incluye la caracterización de sus aceites esenciales, identificación de sus compuestos de interés, el estudio comparativo de la eficiencia de extracción, calidad del aceite y composición química, de tal manera, que la información obtenida pueda proveer a la comunidad agrícola en general y, particularmente, al sector campesino más necesitado, una

información más amplia acerca de los aceites esenciales, y propender el desarrollo de la industria química de las esencias en el país [112].

Dentro de las diferentes plantas, objeto de estudio del Centro de Investigación de Excelencia, CENIVAM, se encuentra la especie *Lippia alba* (Mill.) N.E Brown, familia *Verbenaceae*, un subarbusto que puede alcanzar hasta 2 m, y se encuentra distribuida desde México hasta América del Sur y el Caribe [6]. Las plantas de la familia *Verbenaceae* llaman la atención de los investigadores no sólo por su gran diversidad botánica, su abundante y amplia distribución en todo el mundo, sino también por sus variables usos. La *Lippia alba* presenta dentro de sus metabolitos secundarios volátiles la carvona y el limoneno [11, 42], compuestos aprovechados en las industrias farmacéutica y cosmética. La carvona es empleada como aromatizante en productos de consumo humano como lociones, pastas dentífricas, entre otros. El limoneno que se encuentra aproximadamente en más de 300 plantas, ha llamado la atención en los últimos años por presentar propiedades anticancerígenas [61].

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 y del Centro de Investigación de Excelencia, CENIVAM. En esta línea se han venido estudiando diferentes plantas tropicales con posible potencial para la extracción de AEs, incluyendo la especie *Lippia alba*. Esta especie suele presentar una notable variación en la composición de su aceite esencial, debido a la existencia de quimiotipos [8], los cuales son individuos de una misma especie botánica, morfológicamente idénticos, pero diferentes en la composición química de sus metabolitos secundarios volátiles, e.g. aceites esenciales, los cuales varían debido a factores ambientales y fisiológicos de las plantas [4, 113].

En esta investigación se realizó un estudio comparativo de la composición química de los aceites esenciales de *Lippia alba*, extraídos de plantas provenientes de 14 localidades de Colombia; también se verificó la variación en la composición química de los metabolitos secundarios volátiles aislados de hojas de *Lippia alba* de diferente edad (hojas jóvenes y maduras). Finalmente, empleando dos destiladores semi-industriales, fabricados en cobre y acero inoxidable, se evaluó la influencia del material de éstos sobre la composición química y la calidad de los aceites esenciales obtenidos.

Con en el desarrollo de este estudio se pretende contribuir al fortalecimiento de la creciente industria de los AEs en Colombia y abrir las puertas para la construcción y puesta en marcha de una planta para extraer el AE de *Lippia alba*, con miras a la comercialización de este producto.

Los resultados obtenidos en este proyecto fueron presentados bajo la modalidad de póster en el XIV Congreso Colombiano de Química, realizado en Armenia (Quindío), del 25 al 27 de mayo de 2006; asimismo, en el Congreso Internacional en Ciencias Analíticas (ICAS-06) que tuvo lugar en Moscú (Rusia) en junio de 2006, y donde el presente trabajo ocupó el primer lugar y premio en el concurso de mejor trabajo analítico.

1. ESTADO DEL ARTE

Lippia alba

Figura 1. *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown ex Britton & Wills.



La planta *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown ex Britton & Wills, conocida comúnmente como “Prontoalivio”, “Curalotodo”, “Salvia morada”, “Falsa melisa”, pertenece a la familia *Verbenaceae* y es frecuentemente cultivada como ornato en los jardines de todo Centro América, por su fuerte aroma y por sus

cualidades medicinales [78, 89, 122].

Es una hierba perenne, erecta, algunas veces arbusto o subarbusto, crece hasta 2 m y presenta un fuerte olor a limón, lima o menta. Presenta hojas pequeñas y opuestas, aromáticas, de color verde. Es originaria del bosque seco tropical y subtropical americano y se encuentra distribuida desde México hasta Suramérica y el Caribe y crece en alturas de hasta 1800 m.s.n.m [8, 9, 41]. Se puede encontrar en climas cálido húmedo, cálido seco y templado. Se desarrolla en regiones sin exceso de calor o frío, con temperaturas de hasta 32°C con alta intensidad lumínica. Debido a su rusticidad, responde a diversos tipos de suelos como arcillosos y limosos con pH de 5-6. Esta condición hace que sus principios activos y calidad del aceite cambien, presentando notables variaciones en el contenido de terpenos livianos y sesquiterpenos, de acuerdo con el origen de la planta y otros

factores (e.g. condiciones geobotánicas, edad de la planta y estado fenológico) [42, 78].

Debido a que la planta es originaria de las regiones secas, soporta fácilmente épocas sin lluvias de hasta 4-6 meses. En las condiciones bajas del Caribe, con mayor humedad, *L. alba* crece continuamente produciendo mayor cantidad de biomasa. En regiones de mayor altitud y frías, la planta crece con mayor dificultad y genera menor biomasa [8, 42].

En cuanto a las condiciones de cultivo, la planta *Lippia alba* se puede reproducir por semillas, estacas o acodos [10]. 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 [8]. En regiones secas es necesario esperar hasta 8 meses. Algunos de los cuidados que requieren después de la plantación son la poda, la cual se debe aplicar 2 meses después de la siembra para lograr una mejor forma y obtener mayor rendimiento, y debe realizarse la limpieza, por lo menos 4 veces al año durante el primer año de crecimiento [8].

La especie *L. alba* ha sido utilizada en Guatemala, Venezuela y Brasil para tratar resfriados, gripa, bronquitis, tos, asma [64], dolor estomacal e indigestión [7]. Se le atribuyen propiedades citostáticas [67], antiespasmódica [76], emenagoga [71], para tratar problemas digestivos [43]; se ha empleado para aliviar dolores de huesos, cólicos, gracias a que presenta propiedades analgésicas [83, 85, 119]. De igual forma, *L. alba* ha demostrado poseer actividades antimalaria, antiviral, citostática [9] y antimicrobiana destacables, habiéndose observado su acción sobre *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Salmonera typha* [14, 33, 89]. El AE de sus hojas presenta actividad *in vitro* contra algunos patógenos como *Trichopyton mentagrophytes*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa* [13] y también contra ciertos hongos como *Dreschlera oryzae* y *Fusariumi moniliforme*

[117]. Posee actividad antiulcerogénica y es utilizada en África, América del Sur y Centro América, para tratamientos gastrointestinales [11].

En Brasil, el té de sus hojas se emplea como tranquilizante y para aliviar problemas gastrointestinales [9, 122]. En Colombia, esta especie ha sido utilizada en infusión reiforme como antiespasmódico, también se ha usado contra la diabetes, como diaforética y para aliviar trastornos digestivos [35].

La especie *L. alba* se caracteriza por presentar cambios en la composición química de sus AEs de acuerdo con el estado de desarrollo de la planta, la parte empleada para la extracción, con la ubicación geográfica, también con las características fisicoquímicas del suelo y clima (humedad, concentración de oxígeno e intensidad lumínica), etc. [90, 91, 110]. El efecto de estos factores sobre la acumulación de distintos metabolitos secundarios en las especies de *Lippia* define sus quimiotipos, los cuales son individuos de una misma especie botánica, son idénticos morfológicamente, pero poseen diferente composición química de sus metabolitos secundarios volátiles, *i.e.* aceites esenciales, la cual varía debido a factores ambientales y fisiológicos de la planta [4, 113]. Esta variabilidad en la composición química de *L. alba* se ve reflejada en diversos estudios sobre esta especie cultivada en diferentes regiones del mundo (**Tabla 1**), en donde se encuentra que el tipo y la cantidad de los metabolitos secundarios volátiles dependen sensiblemente de las características geoambientales y fisiológicas mencionadas anteriormente.

Tabla 1. Variación química de los AEs de *L. alba* cultivada en diferentes regiones del mundo.

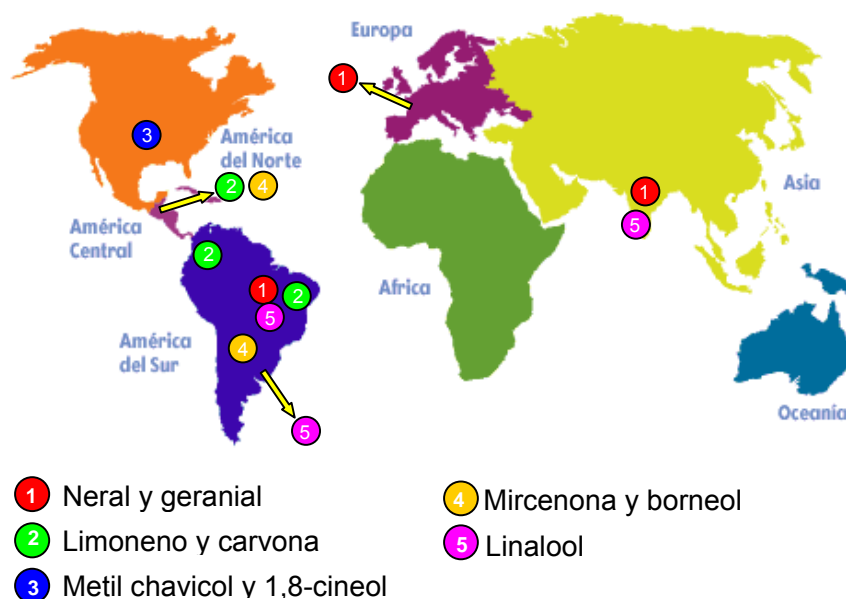
País	Principales componentes
Colombia	✓ Carvona (40-57%), limoneno (24-37%), biciclosesquifelandreno (2-22%), piperitenona (1-2%), piperitona (0.8-1.2%) y β -bourboneno (0.6-1.5%) [108, 109].
India	✓ Linalool (65%) [5, 6]. ✓ Mirceno (26.4%), geranial (9.8%) y neral (6.4%) [100].
Uruguay	Linalool (55%) [68].
Guatemala	✓ Limoneno (44%) y piperitona (31%) [97]. ✓ Se observó la presencia de dos quimiotipos [30]: • Mircenona (58%) y <i>cis</i> -ocimenona (13.1%). • 1,8-Cineol (25.4%), neral (18.9%) y geranial (27%).
Brasil	✓ Linalool (46.5-90.7%) [99]. ✓ Citral (neral+geranial) (37.1%) y mirceno (15%) [80]. ✓ Geranial (12.9%), β -cariofileno (24.3%), neral (9.6%) y 2-undecanona (9%) [19]. ✓ Limoneno (27.5%) y carvona (49.3%) [11]. ✓ Se observó la presencia de 2 quimiotipos [73]: • Neral (27.18-30.40%) y geranial (35.63-40.95%). • Carvona (42.30-54.69%). ✓ Linalool (50-79%) y 1,8-cineol (7.3-14.1%) [3]. ✓ Se presentaron 3 quimiotipos [123] en los siguientes tres municipios de Brasil: • Santa María: 1,8-cineol (35%), limoneno (18%) y carvona (8.6%). • Belterra: limoneno (32%), carvona (32%) y mirceno (11%). • Chaves: geranial (23%), neral (14%) y germacreno D (25%).
Cuba	✓ Carvona (40%), piperitenona (8.26%) y piperitona (3.62%) [85]. ✓ Limoneno (6.50%), carvona (28.95%), piperitenona (6.35%) y β -guaieno (11.53%) [86].
Argentina	Mircenona (65%) y borneol (12%) [90].
Estados Unidos	Metil chavicol (56.46%) y 1,8-cineol (12.62%) [114].
Perú	Carvona (50-79%), germacreno D (5.6%) y limoneno (5.1%) [45].

Continuación, **Tabla 1.**

Antillas Francesas	<p>Se analizó la composición química del AE de <i>L. alba</i>, extraído de hojas, de 4 localidades de las Antillas francesas [44]:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gourbeyre: neral (33.1%), geranial (20.8%), α-guaieno (6.3%) y <i>cis</i>-β-ocimeno(6.3%). • Capesterre: α-guaieno (6.3%), <i>cis</i>-β-ocimeno(13.3%), β-cariofileno (9.2%), geranial (9.1%) y neral (7.8%). • St. Pierre: limoneno (51.1%) y germacreno D (18.1%). • Cayenne: carvona (67.6%) y limoneno (18.4%).
--------------------	--

De acuerdo con la tabla anterior, es posible indicar la presencia de cinco quimiotipos, distribuidos de la siguiente forma (Véase **Figura 2**):

Figura 2. Ubicación geográfica en el mundo de los quimiotipos de la especie *L. alba* estudiados.



El quimiotipo I incluye todas las especies que presentan como metabolitos volátiles mayoritarios el neral y geranial. Este quimiotipo fue dividido por los autores [44] en tres subtipos, *i.e.* Ia, Ib y Ic, constituidos, junto con citral mayoritario, por mirceno, germacreno D y β -cariofileno, respectivamente. Estas plantas se encuentran cultivadas principalmente en el norte de India [100], Brasil

[19, 80] y en Antillas francesas [44]. Por otra parte, en Brasil se encontró que además del neral y geranial, el β -cariofileno (24.3%) fue otro de los principales compuestos presentes en el aceite esencial [19].

El quimiotipo II se encuentra en Colombia [108, 109], Guatemala [97], Brasil [11, 73, 123], Cuba [85, 86], Perú [45] y en Antillas francesas [44]. Contiene como compuestos mayoritarios la carvona y el limoneno. Al igual que en el caso anterior, este quimiotipo fue dividido por los autores [44] en cuatro subtipos, *i.e.* IIa, IIb, IIc y IId, compuestos, junto con la carvona y el limoneno, por mirceno, 1,8-cineol, piperitenona y piperitona, respectivamente. Los aceites esenciales fueron obtenidos por HD y MWHD, con rendimientos comprendidos entre 0.5-2.2%. En Guatemala [97], la composición química del AE estuvo caracterizada por la presencia del limoneno y la piperitona, los cuales se encuentran clasificados dentro del quimiotipo IId.

Los quimiotipos III, IV y V se caracterizan por la presencia de metil chavicol y 1,8-cineol (III); mircenona y borneol (IV) y linalool (V), respectivamente. El quimiotipo III se presenta en Estados Unidos [114], mientras que el quimiotipo IV se encuentra en Argentina [90] y Guatemala [30]. El quimiotipo V, caracterizado por el alto contenido de linalool, se encuentra principalmente en India [5,6], Uruguay [67] y Brasil [99, 123]. Cabe señalar, que en este último se han encontrado más de un quimiotipo, así, por ejemplo, Zoghbi y colaboradores [123] identificaron tres quimiotipos de *Lippia alba* en tres municipios. El primero, localizado en el municipio de Santa María, se caracterizó por un alto contenido de 1,8-cineol (35%), limoneno (18%) y carvona (8,6%); el segundo, en el municipio de Belterra, se destacó por una alta proporción de limoneno (32 %), carvona (32%) y mirceno (11%); y el tercero, en el municipio de Chaves, por geranial (23%), neral (14%) y germacreno D (25%). De acuerdo con la clasificación realizada, en los municipios de Santa María y Belterra se encuentran plantas dentro del quimiotipo II y, en el municipio de Chaves, dentro del quimiotipo I.

1.2 ACEITES ESENCIALES. GENERALIDADES

1.2.1 Definición

Si bien existen numerosas definiciones, algunas desde el punto de vista químico, otras desde la perspectiva del botánico, y aún otras desde el punto de vista industrial, ninguna de ellas abarca en su totalidad todas las esencias. Como una forma de generalizar al máximo este término, y tratando de no confundir conceptos, se define un aceite esencial o esencia como una parte del metabolismo de un vegetal, compuesto generalmente por terpenos que están asociados o no a otros componentes, la mayoría de ellos volátiles, que generan en conjunto el olor de dicho vegetal [8].

Los AEs se pueden encontrar en diferentes partes de la planta, tales como hojas, tallos, raíces, flores, cáscara de frutos, cuya composición puede variar a pesar de extraer el aceite de la misma planta [105].

La historia de los aceites esenciales tuvo sus inicios en el Oriente, específicamente, en Egipto, Persia e India, donde fue empleada la destilación simple como método de su extracción. A principios de la Edad Media, el comercio entre Oriente, Grecia y Roma aumentó, se comercializaban aceites odoríferos y ungüentos naturales que no eran exactamente aceites esenciales. Estas mezclas se guardaban en recipientes traslúcidos y se sometían a la luz solar o a calentamiento, logrando finalmente la separación de los aceites esenciales y los constituyentes sólidos. Algunas flores se maceraban con vino antes de adicionar grasas, y el producto de la digestión se filtraba y calentaba con el fin de obtener los aceites esenciales [57].

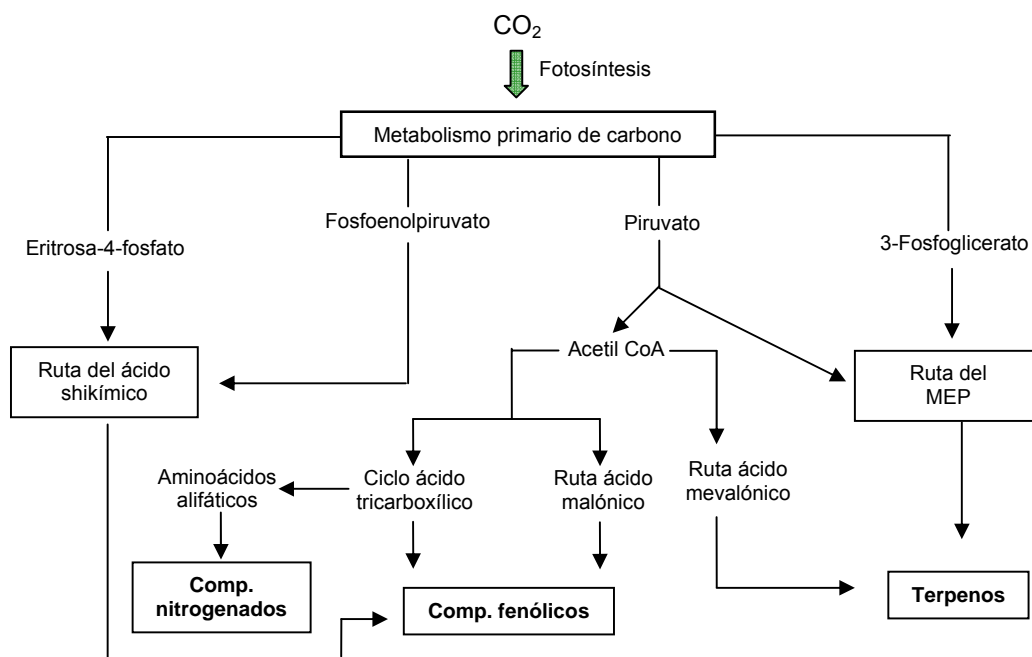
1.2.2 Biogénesis de los aceites esenciales

1.2.2.1 Metabolismo de las plantas: Las plantas producen diversos compuestos orgánicos que aparentemente no parecen tener una función directa en su crecimiento y desarrollo. Estas sustancias se conocen como metabolitos secundarios, productos secundarios o productos naturales. Estos compuestos no se relacionan directamente con el proceso de fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, síntesis de proteínas, asimilación de nutrientes, formación de carbohidratos, los cuales hacen parte del metabolismo primario de la planta. El metabolismo primario proporciona las moléculas de partida para las rutas del metabolismo secundario, entre las que se encuentran [4, 24, 113]:

- Ácido shikímico: da origen a muchos componentes aromáticos, *e.g.* aminoácidos aromáticos, ácido cinámico y ciertos polifenoles, y,
- Aminoácidos: precursores de los alcaloides y antibióticos peptídicos, que incluyen las penicilinas y cefalosporinas.

Los metabolitos secundarios de las plantas pueden dividirse según la estructura química en tres grupos, a saber: terpenos o terpenoides, fenoles y sus derivados, y alcaloides [105]. En la **Figura 3** se ilustra la relación que existe entre los metabolitos primarios y secundarios.

Figura 3. Rutas de biosíntesis de los metabolitos secundarios y su relación con los metabolitos primarios [113].



Durante varios años se ha considerado que los metabolitos secundarios en las plantas son un material de desecho de las mismas. Sin embargo, se ha demostrado que éstos cumplen importantes funciones ecológicas en las plantas como agentes atrayentes de polinizadores, sustancias de reserva de la planta, regulan los procesos de evaporación de agua, hacen parte del mecanismo de defensa contra depredadores y otros vegetales (alelopatía) [4, 24, 102].

La distribución de los metabolitos secundarios dentro de los grupos de las plantas presenta algunas características particulares, entre las que cabe mencionar las siguientes [4, 113]:

- Una planta contiene una mezcla de metabolitos secundarios con cantidades variables en diferentes células, tejidos y órganos;
- En el organismo individual o de tejido, las cantidades y tipos de productos del metabolismo secundario varían con la edad o con las condiciones ambientales de la planta, y;
- Especies de géneros afines o familias de plantas pueden presentar los mismos metabolitos secundarios.

Los terpenos o isoprenoides constituyen uno de los grupos más grandes de compuestos secundarios ampliamente presentes en el reino vegetal. Entre ellos, se encuentran los componentes de esencias, bálsamos y resinas. En las plantas, los isoprenoides pueden sintetizarse por dos rutas diferentes, a saber: la ruta del ácido mevalónico y/o la ruta de metileritriol fosfato (MEP) [4, 113].

Dependiendo del número de átomos de carbono, los terpenos se pueden clasificar en monoterpenos, C_{10} (e.g. limoneno, mentol, timol, alcanfor), sesquiterpenos, C_{15} (e.g. farnesol), diterpenos, C_{20} , etc, donde cada uno de ellos presenta una función característica, e.g. los monoterpenos mencionados anteriormente, que presentan acción antiséptica, o se emplean como expectorantes [8, 24, 105].

1.2.2.2 Ubicación de los aceites esenciales en las plantas: Los aceites esenciales se ubican en las diferentes partes de la planta, tales como hojas, tallos, flores y frutos, así como también en diferentes órganos celulares. Es así como los aceites de menta y lavanda se localizan en pelos glandulares, mientras que el aceite de la pimienta se ubica en las células modificadas del parénquima. De igual forma, el aceite de rosa y jazmín se encuentra en las flores; el aceite de menta y eucalipto en las hojas; el alcanfor en los leños; el de los cítricos en los frutos; el aceite de almendras en las semillas y el aceite esencial de *Lippia alba* se encuentra principalmente en las hojas [4, 24, 96].

1.2.3 Composición química

En cuanto a su composición química, los AEs contienen una buena proporción de hidrocarburos junto con compuestos oxigenados, tales como cetonas, alcoholes, acetatos, 1,3-benzodioxoles y furanocumarinas, entre otros, los cuales prevalecen en las partes aéreas de las plantas, mientras que los hidrocarburos se concentran básicamente en las raíces. Presentan una alta variación en la proporción de sus constituyentes, ya que en ocasiones se transforman unos en otros según la parte de la planta, el momento de su desarrollo o el momento del día de la recolección [8, 23, 25, 26, 105].

Es característico de las esencias la presencia de terpenos, fundamentalmente mono- y sesquiterpenos; sin embargo, no todas las esencias están compuestas exclusivamente por terpenos, existen algunas que carecen de éstos y están constituidas por derivados bencénicos, fenoles, ésteres e hidrocarburos lineales, hasta por componentes difícilmente relacionados con las esencias, como alcaloides, glicósidos y una gran variedad de compuestos heterocíclicos como derivados piridínicos, aminas, sulfuros, etc [8,105].

Existen diferentes factores que influyen sobre la composición química de un AE, entre ellos se pueden destacar los siguientes [8, 54, 105]:

- ✓ Condiciones geobotánicas del medio: clima, altitud, tipo de suelo, pluviosidad;
- ✓ Método del cultivo: fertilizantes, abonos y pesticidas;
- ✓ Época de recolección y parte de la planta;
- ✓ Modo de almacenamiento y manejo del material vegetal: fresco, seco, fermentado, tratamiento postcosecha;
- ✓ Modo de obtención del aceite: destilación (hidrodestilación, arrastre con vapor) y;

- ✓ Edad de la planta y su estado fenológico.

Uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta en la modificación 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 para una acumulación máxima de principios activos, que son función de su estado fenológico, y también puede deberse a variaciones 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 [8].
- **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 [8].
- **La exposición a la luz:** Influye por el hecho de 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, 8, 113].
- **Las condiciones del terreno:** Son importantes, pues los suelos arenosos, minerales, se calientan más fácilmente y permiten un crecimiento más rápido que los suelos arcillosos y pesados [8, 77].

1.2.4 Propiedades físico-químicas

Dentro de las propiedades fisicoquímicas más destacables de los AEs se encuentran la volatilidad, inestabilidad ante la luz y el oxígeno, ante la presencia de agentes oxidantes y reductores, medios con pH extremos, o trazas de metales que pueden catalizar reacciones de descomposición, etc. Otra propiedad de los constituyentes de una esencia son sus variabilidades estructurales, lo que permite generar por semisíntesis estructuras novedosas. En cuanto a sus solubilidades, tienen la particularidad de que, si bien son solubles en medio no polar, también suelen tener una solubilidad alta en etanol, lo que es ampliamente explotado en la elaboración de fragancias y extractos hidroalcohólicos para las industrias farmacéutica y cosmética [8, 16].

También se destaca la propiedad de refractar la luz polarizada, que es aprovechada para su control de pureza, ya que cada aceite presenta un índice de refracción característico. También los AEs presentan un poder rotatorio particular, debido a que algunos de sus compuestos químicos son ópticamente activos. En cuanto a la densidad, se caracterizan por ser menos densos que el agua, excepto algunas esencias, como la de clavo [8].

1.2.5 Aplicaciones

Las esencias se han utilizado desde tiempos remotos y tienen referencias en todas las culturas y religiones. En la antigüedad, 40 siglos a.C, los Egipcios hacían preparados con aceites esenciales que se utilizaban en medicina, cosmética y para baños. Los Egipcios iniciaron el arte de extraer las esencias de las plantas calentándolas en recipientes de arcilla, pero fueron los alquimistas quienes conservando la fragancia y las propiedades curativas, inventaron la destilación para obtener aceites esenciales [26, 48].

Actualmente, el uso de los aceites esenciales sigue vigente, éstos son aprovechados en diferentes industrias, entre ellas, la industria alimenticia, cosmética, farmacéutica, para la elaboración de ambientadores, perfumes, licores, etc. En la **Tabla 2** se describen, de forma resumida, algunas de las aplicaciones de los AEs.

Tabla 2. Aplicaciones de los aceites esenciales.

Industria	Aplicación
Cosmética	Elaboración de perfumes, pastas dentífricas, cremas, ungüentos.
Alimenticia	Preparación de sabores, salsas, aditivos, confitería, lácteos, condimentos.
Licorera	Para saborizar, e.g. lúpulo en la cerveza y anís en el aguardiente.
Farmacéutica	En veterinaria, como repelentes de insectos, antisépticos, efectos sobre el sistema nervioso central.
Química fina	Precusores químicos, e.g. limoneno, citral y pinenos.
Plásticos	Para enmascarar el mal olor que tienen algunos cauchos y plásticos.
Aseo y limpieza	Para otorgar fragancia a productos de limpieza para el piso, aromatizantes ambientales, limpieza de baños y cocina.

La volatilidad es una de las principales propiedades de las esencias que se aprovecha en el campo de la medicina y aromaterapia, lo que hace de AEs mezclas ideales para ser usados en nebulizaciones, baños de inmersión o simplemente inhalados por vía nasal. Además, son productos que se eliminan rápidamente del organismo haciendo que sus efectos fisiológicos sean suaves y temporales [8].

1.2.6 Clasificación

Los aceites esenciales se clasifican con base en diferentes criterios [105], según relacionado en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Clasificación de los aceites esenciales.

Consistencia	<ul style="list-style-type: none">• Fluidos: Líquidos muy volátiles a temperatura ambiente;• Bálsamos: Poco volátiles, consistencia más viscosa, tienden a polimerizarse y;• Oleorresinas: Muy viscosos, sustancias semisólidas.
Origen	<ul style="list-style-type: none">• Naturales: Son obtenidos directamente de la planta, sin ninguna modificación fisicoquímica;• Artificiales: Por enriquecimiento de la misma esencia con uno de sus componentes y;• Sintéticos: Mezclas de diversos productos obtenidos por medio de procesos Químicos
Estructura química	<ul style="list-style-type: none">• Monoterpenoides: Albahaca, salvia, menta;• Sesquiterpenoides: Copaiba, jengibre;• Compuestos oxigenados: Geranio, jazmín, ylang–ylang [8, 105].

1.3 EXTRACCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES

Desde tiempos inmemorables, el hombre ha centrado su atención en los productos naturales aprovechando el reino vegetal para la obtención de compuestos que puedan ser empleados como alimentos, sustancias curativas, o cosméticos, un ejemplo de ello son los AEs.

Existen diferentes métodos empleados para la obtención de los metabolitos secundarios de las plantas, entre los que se encuentran la destilación, hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHd), destilación-extracción simultánea (SDE) y extracción con fluido supercrítico (SFE), entre otros [106, 109]. A continuación, se describen algunas de las características que presentan estos métodos extractivos, pero se hará mayor énfasis en las técnicas que fueron utilizadas en este estudio para la extracción de los aceites.

1.3.1 Destilación

La destilación es uno de los procedimientos más empleados para la obtención de los aceites esenciales, gracias a su bajo costo y relativa simplicidad del 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 [25, 26, 40, 77].

1.3.1.1 Hidrodestilación: Este método consiste en llevar a estado de ebullición el agua, que 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 [40].

Los constituyentes oxigenados del aceite son más solubles en el agua hirviendo (unas 100 veces más) que los hidrocarburos análogos. Por esta razón, en las etapas iniciales, los componentes se liberan de acuerdo con su grado de solubilidad, antes que por 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 [25, 34, 40, 61].

1.3.1.2 Destilación por arrastre con vapor: Es el método más usado a nivel industrial y de laboratorio, permite obtener AEs con buen rendimiento, y además, se puede procesar grandes cantidades de material vegetal [22, 23]. El proceso

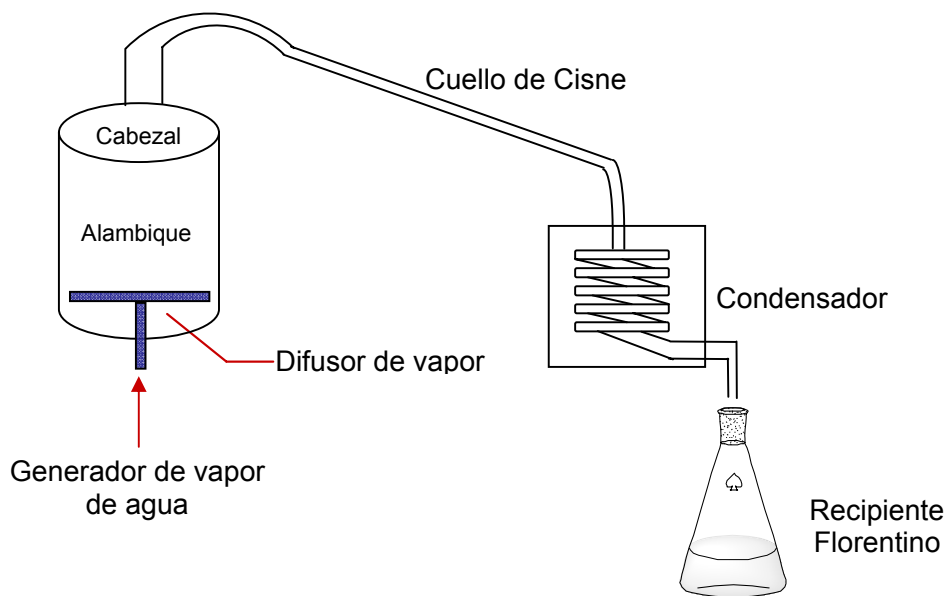
consiste en hacer pasar vapor de agua por un recipiente que contiene el material vegetal. El vapor de agua extrae la esencia de la planta y se forma una mezcla gaseosa homogénea. Al salir del recipiente, a una presión controlada, el vapor de agua enriquecido con aceites esenciales se enfría en un condensador donde regresa a la fase líquida. Estos dos líquidos (agua y aceite), finalmente, son separados gracias a sus diferencias de densidad, en un decantador o vaso Florentino. Algunas de las ventajas que presenta este método es que no requiere el uso de equipos muy sofisticados [8, 40].

Un equipo típico para la extracción de aceites esenciales mediante destilación por arrastre con vapor, se muestra en la **Figura 4**.

- **Alambique:** Es el componente principal de un equipo de extracción por arrastre con vapor, pues es en este sitio donde se lleva a cabo la extracción. Las condiciones de operación, tales como presión, temperatura, flujo de vapor y altura del lecho de material vegetal, son muy importantes para realizar una extracción adecuada [22].
- **Cuello de Cisne:** Es el conducto que comunica el alambique con el condensador. En la parte interior del cuello circula la mezcla de vapor de agua y aceite esencial. Algunos de los factores importantes a considerar durante su construcción son: forma y dimensiones; éstos deben diseñarse de tal manera que se reduzcan al mínimo las posibilidades de condensación de vapores dentro del alambique, permitiendo su rápida transferencia por el condensador del sistema.
- **Condensador:** Existen diferentes tipos de condensadores, dentro de los cuales se encuentra el condensador de espiras, que es uno de los más utilizados [8].

- **Recipiente recolector o Florentino:** La mezcla de agua-vapor y aceite esencial que atraviesa el condensador, se colecta en un recipiente conocido como Florentino, en donde el AE se separa por diferencias de densidad.

Figura 4. Principales componentes de un equipo de extracción por arrastre con vapor [8].



1.3.1.3 Destilación con vapor/agua: En este método, el vapor puede ser generado mediante una fuente externa o dentro del propio cuerpo del alambique, aunque separado del material vegetal. La diferencia más notoria que existe entre este método y la destilación por arrastre con vapor (**Sección 1.3.1.2**), es que el material vegetal se encuentra suspendido sobre un fondo falso que impide el contacto del material vegetal con el medio líquido en ebullición. Este sistema reduce la capacidad neta de carga de materia prima dentro del alambique, pero mejora la calidad del aceite obtenido [8].

1.3.1.4 Hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHD): La técnica de MWHD fue inicialmente patentada en Canadá por J. Paré y colaboradores, en 1991 [81, 82]. Para la extracción de los AEs mediante esta técnica, el material vegetal se sumerge en agua y se somete a la acción de la radiación de microondas, que al calentar el agua hasta ebullición produce vapores que atraviesan las estructuras celulares y permiten la expulsión del AE contenido en ellas, luego, el AE arrastrado por el vapor de agua, es condensado y colectado [59, 81, 82].

La aplicación de esta técnica a la extracción de AEs fue introducida por primera vez en 1992 por Jean F. I. y colaboradores [55], quienes estudiaron la composición de los extractos de eneldo, alcaravea, hinojo y perejil, de la familia *Umbelliferae*; estragón (fam. *Compositae*), mejorana, orégano, tomillo salsero, salvia y tomillo (fam. *Labiatae*).

Particularmente, en el caso de la MWHD, que se emplea 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* [109]. Por efecto de la radiación de microondas, obtenida en un horno doméstico, el agua se calienta hasta ebullición, de tal manera, que el vapor generado penetra y rompe las estructuras celulares que contienen la esencia. El AE es liberado y arrastrado por el vapor de agua, finalmente, se condensa y colecta. La destilación termina cuando todo el aceite es liberado de las glándulas que lo contienen.

El método de extracción asistida por radiación de microondas, presenta ventajas sobresalientes con respecto a las técnicas tradicionales de destilación: es un proceso muy rápido y relativamente económico y los aceites esenciales obtenidos se encuentran libres de los productos de descomposición térmica y de contaminantes [28, 55, 59, 109].

Algunas de las ventajas y desventajas de los métodos de extracción de AEs mencionados anteriormente, se reportan en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Ventajas y desventajas de los métodos de extracción de los AEs.

Técnica de extracción	Ventajas	Desventajas
Hidrodestilación	<ul style="list-style-type: none"> • Método económico; • AEs con notas más fuerte; • Útil cuando el material vegetal (M.V.) tiende a aglomerarse mientras el vapor pasa a través de él. 	<ul style="list-style-type: none"> • Calidad baja de los AEs; • Tiempos de destilación variables (largos).
Destilación por arrastre con vapor	<ul style="list-style-type: none"> • No requiere solventes orgánicos; • No requiere equipos muy sofisticados; • No se recalienta el AE por tiempos prolongados. 	<ul style="list-style-type: none"> • Tiempos relativamente largos de extracción.
MWHD	<ul style="list-style-type: none"> • Proceso muy rápido (10-40 min); • Relativamente económico; • No requiere solventes; • Buen rendimiento del AE; • Fácil construcción del equipo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Altas temperaturas pueden llegar a descomponer algunos compuestos de interés; • Compuestos oxigenados volátiles solubles en agua, pueden disolverse y retenerse en ella sin recuperación.

1.4 ANÁLISIS Y CONTROL DE CALIDAD DE LOS ACEITES ESENCIALES

Para la utilización de los aceites esenciales, además de los estudios de factibilidad para su producción y aplicación específica, es necesario conocer su composición química detallada. El control de calidad de un aceite esencial tiene como objetivo garantizar que posee unas determinadas características analíticas [8]. Los principales parámetros analíticos empleados para establecer la calidad de un aceite esencial se reportan en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Clasificación de los parámetros analíticos utilizados para el control de calidad de los AEs [8].

Características organolépticas	<ul style="list-style-type: none"> • Olor • Color • Apariencia • Textura
Determinaciones físicas	<ul style="list-style-type: none"> • Densidad • Poder rotatorio • Índice de refracción • Solubilidad en etanol • Punto de congelación • Punto de inflamación • Rango de destilación
Índices químicos	<ul style="list-style-type: none"> • Acidez • Éster • Saponificación • Fenoles
Características cromatográficas	<ul style="list-style-type: none"> • Perfil cromatográfico GC • Cuantificación de componentes principales • Índices de retención • Identificación por GC-MS

La calidad de un aceite esencial depende de varios factores como:

- ✓ Edad del cultivo: Se relaciona con la existencia y disponibilidad de nutrientes del cultivo;
- ✓ Condiciones climáticas: Luminosidad, temperatura, pluviosidad, altitud, latitud;
- ✓ Labores agrícolas: Distancias de siembra, abonos, podas;
- ✓ Postcosecha: Lavado, secado, empaque, almacenado, transporte y;
- ✓ Métodos de extracción: Depende del método empleado para la extracción del AE.

Entre los diferentes métodos existentes para el análisis de los aceites esenciales, se destacan los fisicoquímicos y los instrumentales. Los métodos fisicoquímicos incluyen la determinación de propiedades macroscópicas, tales como: solubilidad en varios solventes, densidad, rotación óptica e índice de refracción, entre otras [8]. A continuación, se discuten algunos aspectos de las propiedades físicas de los AEs.

- **Densidad:** La determinación de la densidad permite, algunas veces, hacer ciertas deducciones acerca de la composición de las esencias. Así, los AEs que presentan densidades menores de 0.9 g/cm^3 son ricos en hidrocarburos, alcoholes, ésteres y cetonas, algunos ejemplos son los AEs de naranja, limón, romero, trementina y coriandro, entre otros [40]. Por otra parte, aquellos aceites que tienen densidades mayores de 1.0 g/cm^3 contienen principalmente fenoles o sus derivados y ciertos ésteres aromáticos, por ejemplo, los AEs de anís, canela, clavo, mostaza, etc [23, 40].

La densidad de un AE no es constante porque depende de la planta de la cual se obtuvo, del método de extracción, purificación, tiempo y modo de almacenamiento.

- **Rotación óptica:** En general, el valor del poder rotatorio no permite hacer deducciones sobre la composición de una esencia; sin embargo, esta medición no debe omitirse, ya que sirve para juzgar sobre el grado de pureza del AE y para detectar algunas adulteraciones con sustancias inactivas como el alcohol, o con sustancias de poder rotatorio diferente del aceite examinado [23].

- **Índice de refracción:** Su valor para la mayoría de AEs es relativamente cercano y varía entre 1.43 y 1.61 a 20°C [23]. En general, los AEs que presentan índices de refracción menores de 1.47, poseen un alto porcentaje de hidrocarburos terpénicos o compuestos alifáticos. Por el contrario, un índice de refracción mayor de 1.47, indica la posible presencia de compuestos alifáticos oxigenados en la

esencia. En algunos casos, esta determinación puede revelar la presencia de impurezas [23].

- **Solubilidad en etanol:** La solubilidad de las esencias en alcohol da una idea de su contenido en monoterpenos: cuanto mayor sea la solubilidad, menor será el contenido de éstos en la esencia, o mayor será su contenido de compuestos oxigenados, como alcoholes o fenoles. Es además, un método muy sencillo para detectar adulteraciones provocadas por el agregado de aceites vegetales o minerales, que son insolubles en alcohol [8].

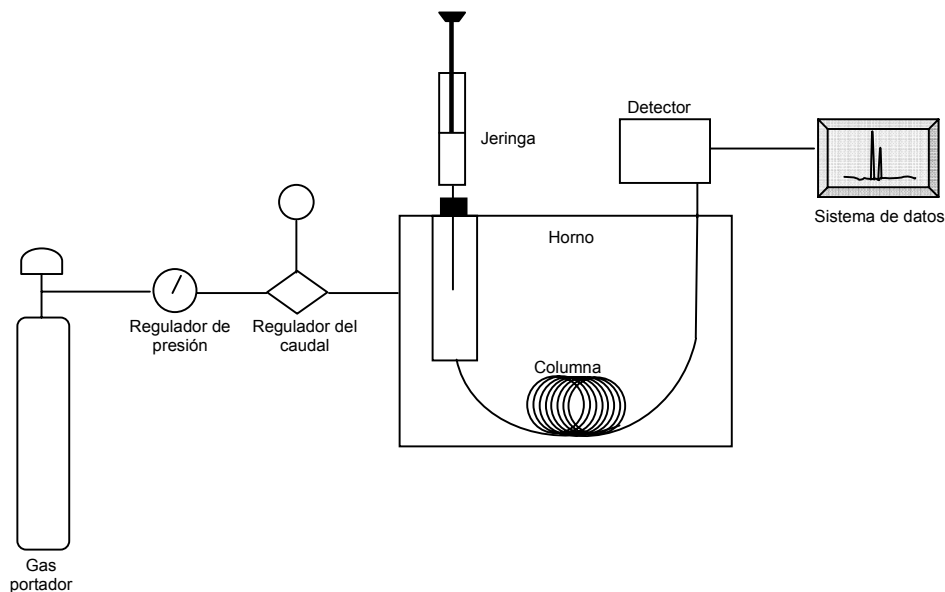
Por otra parte, los métodos instrumentales de análisis de AEs comprenden las espectroscopías de infrarrojo (IR), de RMN- H^1 y de RMN- C^{13} , la cromatografía de gases de alta resolución (HRGC) y cromatografía de gases de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HRGC-MS). Los últimos dos métodos son ampliamente utilizados en la actualidad para el análisis de los aceites esenciales y el establecimiento de su calidad [8, 20, 103, 106].

1.4.1 Cromatografía de gases

La cromatografía de gases (GC) se basa en la separación de analitos entre una fase móvil gaseosa (helio, argón, hidrógeno, nitrógeno) y una fase estacionaria. Esta última constituida por un sólido o líquido, soportado sobre las paredes de la columna. La columna se coloca en un horno, con temperatura regulable y programable, lo cual influye de forma decisiva en la separación de los componentes de la mezcla. Las columnas cromatográficas actualmente empleadas son de tipo capilar, las cuales están formadas por un tubo de cuarzo flexible (sílice fundida) de diámetro muy pequeño (estándar, 0.25 mm) y de longitud variable (de 25 a 60 m, hasta 100 m). Para el análisis de AEs suelen emplearse dos tipos de fases estacionarias, una polar, poli(etilenglicol) y otra apolar, poli(dimetilsiloxano) [39, 56, 87, 92, 95].

La GC se lleva a cabo en un cromatógrafo de gases (Véase **Figura 5**) que consta de diversos bloques tales como el gas portador, el sistema de inyección de la muestra, la columna, ubicada en un horno termostataado y el detector.

Figura 5. Principales bloques de un cromatógrafo de gases.



Para la identificación tentativa de los componentes de un AE mediante GC, se emplea la comparación de sus tiempos de retención con los de los patrones analizados bajo las mismas condiciones operacionales. Sin embargo, los tiempos de retención dependen de numerosas variables, por ejemplo, el modo de inyección, las variaciones de temperatura o flujo de los gases, el diseño del equipo, entre otras [95]. Por esta razón, ha sido necesaria la introducción de parámetros que sean más reproducibles, como los tiempos de retención relativos y los de índices de retención. Estos últimos se calculan a partir de los tiempos de retención y luego se comparan con los de sustancias a las que se les asignan valores arbitrarios de índices de retención, de los cuales los más utilizados son los índices de Kovàts, introducidos en 1958 por E. Kovàts, y que han sido definidos con respecto a los tiempos de retención de una serie de *n*-alcanos [62].

Los índices de retención proporcionan información valiosa respecto a la identidad de los componentes presentes en el aceite esencial; sin embargo, es necesario realizar su identificación confirmatoria. Por ello, se emplean otras técnicas, entre las cuales se destaca la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS).

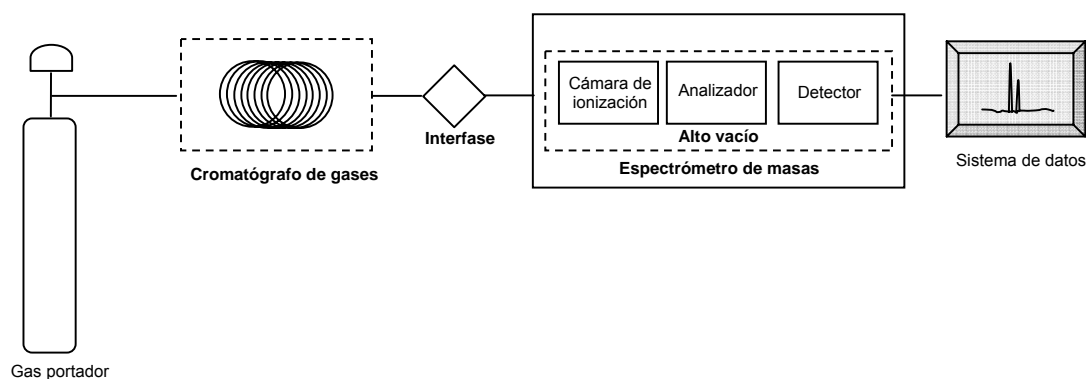
1.4.2 Cromatografía de gases – espectrometría de masas

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) ha demostrado durante los últimos 25 años, que es uno de los métodos más eficaces para el estudio de la composición de los AEs [103, 104, 106, 109]. Es una técnica adecuada para la identificación debido a que los componentes del aceite son compuestos volátiles y de bajo peso molecular. La esencia se inyecta directamente al cromatógrafo sin ningún tratamiento previo, lo cual elimina posibles modificaciones en su composición 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 [74, 101, 105].

La GC-MS permite realizar en una sola operación, para muestras del orden de 1 μ L, un análisis cualitativo junto con una indicación de las proporciones en las que se encuentran los componentes. Cuando se disponen de sustancias patrón, la calibración del equipo permite un análisis cuantitativo exacto de la muestra [75, 101].

En la **Figura 6** se observan los bloques de un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas.

Figura 6. Principales bloques de un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas.



1.5 PROCESAMIENTO INDUSTRIAL DE LOS ACEITES ESENCIALES

Los AEs que se ofrecen en el mercado, pueden ser sometidos a una serie de procesos industriales con el objetivo de mejorar sus características organolépticas, concentrar algunos compuestos de interés, facilitar su procesamiento industrial u homogeneizar su calidad. Los tratamientos más comúnmente utilizados se describen a continuación [8, 54].

- **Rectificación:** Este método se basa en el fraccionamiento del AE empleando una columna de rectificación, mediante el cual se obtienen porciones que son analizadas individualmente. En general, un AE se fracciona en tres partes, a saber: la cabeza o fracciones livianas, el corazón o la parte media de la esencia y las fracciones más pesadas. La finalidad de este método es eliminar los productos no deseables que aparecen durante el proceso de extracción, por descomposición térmica del material vegetal.
- **Fraccionamiento:** Es similar a la rectificación, pero en este caso se realiza una partición más específica, en función de la composición de la esencia.

- **Filtración:** Este método se emplea para eliminar las posibles impurezas presentes en el aceite esencial crudo (e.g. partes de plantas, restos de agua, sedimentos de las paredes de los envases empleados, etc).

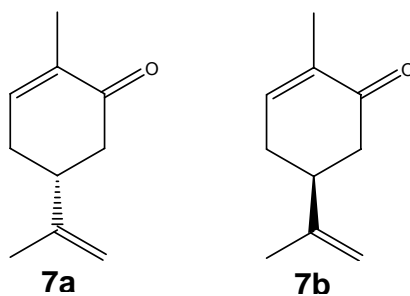
- **Lavado:** Proceso empleado para mejorar la calidad de ciertos AEs crudos que pueden presentar un olor desagradable por la presencia de ácidos o fenoles. Estos compuestos se forman por oxidación o hidrólisis de algunos metabolitos de las plantas, y suelen tener un fuerte olor a quemado, a rancio o medicamentoso.

- **Aislamiento de productos específicos:** Algunas esencias son comercializadas en grandes volúmenes para el aislamiento de algunos de sus componentes mayoritarios, como el eugenol de la esencia de clavo o el cedrol de la esencia de cedro. Algunos de los métodos físicos empleados para la separación de los compuestos son la destilación a presión reducida, la destilación fraccionada o la cristalización fraccionada, e.g. mentol, del aceite de menta.

1.6 CARVONA

La carvona, $C_{10}H_{14}O$, es una cetona de tipo terpenoide; presenta dos isómeros ópticamente activos, a saber: la forma enantiomérica S-(+)-carvona (**7a**), componente principal del aceite esencial de alcaravea (*Carum carvi* L.), y la forma enantiomérica R-(-)-carvona (**7b**), que se encuentra principalmente en el AE de esperminta (*Menta spicata*) [21, 46].

Figura 7. Estructuras de los isómeros ópticos de la carvona: **7a**-S-(+)-carvona, **7b**-R-(-)-carvona.



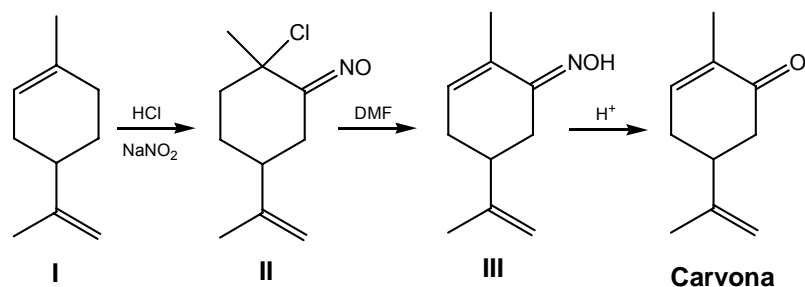
La alcaravea (*Carum carvi* L.) es una planta nativa de la región Oeste de Asia, se cultiva extensamente en la región mediterránea de Europa, Norte de África y Rusia. Es una de las especies más antiguas cultivadas en Europa. El principal exportador de la semilla de alcaravea es la Unión Europea. Las semillas de alcaravea se emplean como aromatizante de diversos productos como pan, queso, caramelos, productos cárnicos, bebidas alcohólicas y como fuente de la carvona. El AE obtenido de los frutos maduros de alcaravea contiene cerca de 50% de S-(+)-carvona. La semilla es empleada con fines culinarios y en la extracción del AE, para su posterior fraccionamiento y obtención de la carvona [21, 63].

La espermentina (*Menta spicata*) es una planta originaria de China. Presenta propiedades carminativas, antiespasmódicas y estimulantes. Los principales compuestos presentes en su aceite esencial son la carvona, en su forma R-(-)-carvona (70%), limoneno (8–15%), y como componentes minoritarios se encuentran el β -felandreno y el acetato de dihidrocarveol [21].

El AE de *L. alba* que crece en Colombia, es rico principalmente en la S-(+)-carvona, compuesto que puede ser aislado empleando la destilación fraccionada o la derivación química [107].

La carvona puede obtenerse a nivel de laboratorio, partiendo de la oxidación del limoneno (I). En el **Esquema 1** se observa que la adición de ácido clorhídrico al limoneno en presencia de nitrito de sodio, genera el cloruro nitroso de limoneno (II), el cual junto con dimetilformamida (DMF), se protona formando la carvoxima (III), que por hidrólisis se convierte a carvona [52].

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

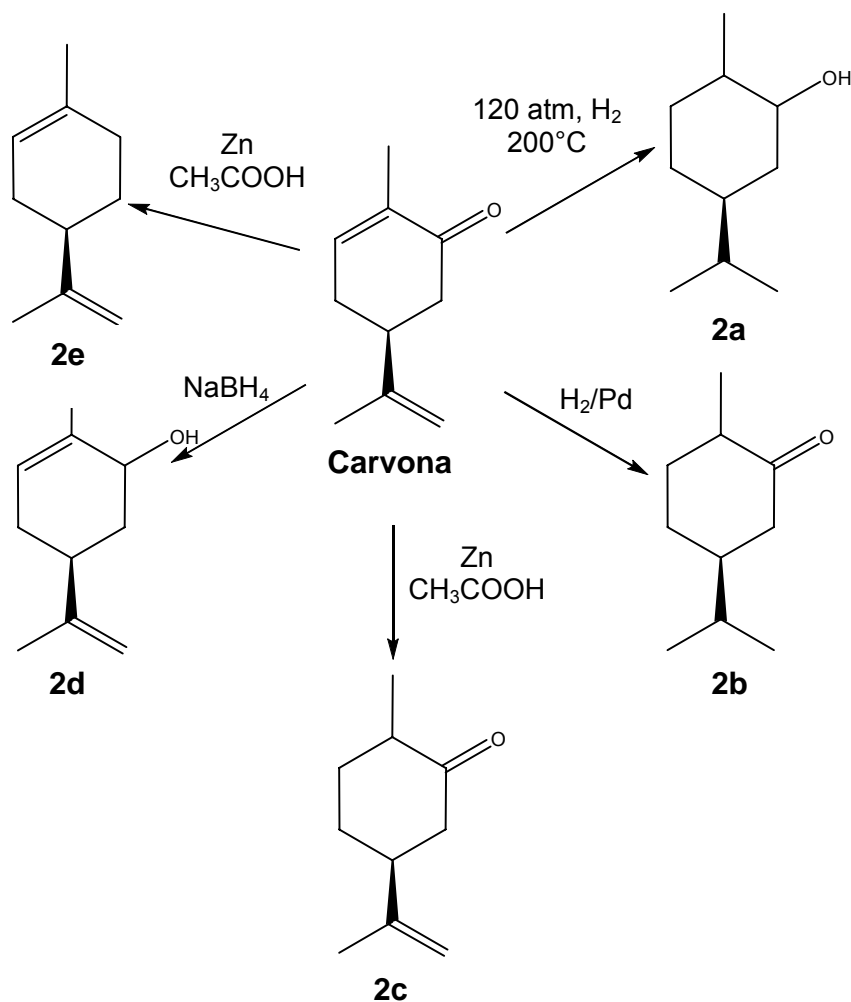


Debido a la presencia de enlaces dobles en su estructura, la carvona puede presentar reacciones de reducción, que dependen de las condiciones empleadas; así por ejemplo, en el **Esquema 2** se muestran los productos obtenidos utilizando diversas condiciones de reacción [49].

Los isómeros ópticos de la carvona se caracterizan por presentar propiedades antimicrobianas y antifúngicas; particularmente, el isómero R-(-)-carvona mostró la actividad contra *Campylobacter jejuni*, *Enterococcus faecium* y *Escherichia coli* [32]. Por otra parte, el isómero S-(+)-carvona fue activo contra *Listeria monocytogenes* [21, 31, 32].

La carvona se emplea 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) [118]. La (-)-R- y la (+)-S-carvona son utilizadas ampliamente en la elaboración de jabones, champúes, en la fabricación de pastas dentífricas y en la industria alimenticia. Particularmente, la S-(+)-carvona es aprovechada en la agricultura para prevenir la maduración prematura de las papas durante su almacenamiento [18, 37, 46].

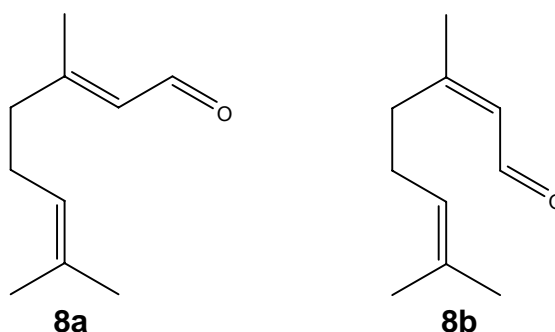
Esquema 2. Productos de reacciones de reducción de la carvona: **2a**-carvomentol; **2b**-carvomentona; **2c**-dihidrocarvona; **2d**-carveol y **2e**-limoneno.



1.7 CITRAL

El citral es una mezcla de dos monoterpenos (isómeros), de fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$. El isómero *trans* se conoce como geranial, o citral A (**Figura 8a**), y el isómero *cis* se conoce como neral, o citral B (**Figura 8b**) [51].

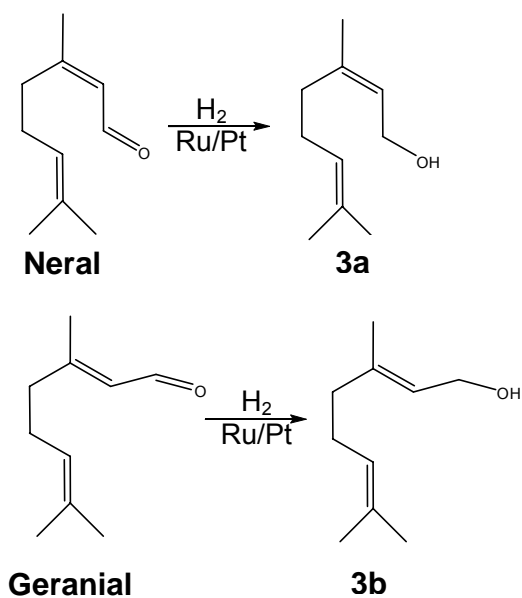
Figura 8. Estructuras de los isómeros **(8a)** geranial y **(8b)** neral.



El citral, cuya característica principal es el fuerte olor a limón, es el componente mayoritario del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (70-85%), planta ampliamente conocida como limonaria. El té de sus hojas se usa en Brasil como antiespasmódico, analgésico, antiinflamatorio, diurético y sedativo [88]. Los compuestos volátiles obtenidos de sus hojas se emplean ampliamente en la industria cosmética y de perfumes, así como también en la síntesis orgánica fina, debido al alto contenido de citral [88].

El citral es una molécula particularmente interesante, ya que por ser un compuesto α,β -insaturado, puede presentar reacciones de hidrogenación que conducen a la formación de los alcoholes insaturados, nerol y geraniol (Véase **Esquema 3**), los cuales son intermediarios importantes utilizados en industrias farmacéutica, de fragancias y sabores [66].

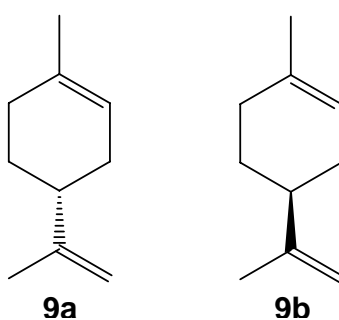
Esquema 3. Productos de la hidrogenación del neral (**3a**, nerol) y geranial (**3b**, geraniol).



1.8 LIMONENO

El limoneno, C₁₀H₁₆, es un monoterpene cíclico y componente mayoritario de los AEs de *Pinus pinea* (70-95%) y de frutas cítricas, e.g. la naranja. Presenta dos isómeros ópticos, a saber: R-(+)-limoneno (**9a**), extraído fácilmente de la cáscara de limón, y S-(-)-limoneno (**9b**), el cual se obtiene de la cáscara de naranja [79].

Figura 9. Estructuras de los isómeros ópticos del limoneno: **9a**-R-(+)-limoneno, **9b**-S-(-)-limoneno.



En los últimos años, el limoneno ha adquirido gran importancia debido a su demanda como disolvente biodegradable en procesos farmacéuticos (como componente aromático). Industrialmente se emplea para la producción de *p*-cimeno, el cual encuentra muchas aplicaciones en la industria química, incluyendo la producción de *p*-cresol y carvacrol, como intermediario en la síntesis de antioxidantes (e.g. BHT), en la producción de resinas sintéticas y en perfumería, así como para la obtención de la carvona [29]. El limoneno también presenta propiedades anticancerígenas [36].

1.9 MERCADO MUNDIAL DE LOS ACEITES ESENCIALES

Debido a sus diversas propiedades fisicoquímicas, el olor agradable y la bioactividad, los aceites esenciales hacen parte de dos grandes mercados. El primero corresponde a la industria de sabores y fragancias, que aprovecha principalmente las características organolépticas de los AEs, y el segundo mercado en donde está incluida muy seguramente la industria farmacéutica, aísla los componentes que presentan actividades específicas [8].

En los últimos 50 años, las industrias farmacéutica, alimenticia y cosmética aumentaron la demanda de los AEs, es así como cerca del 50% de la producción mundial de los aceites esenciales se usa en sabores (predominantemente bebidas), entre un 5 y 10% es empleado en fitoterapia y aromaterapia y entre un 20 y 25% en fragancias. En este último caso, el 70% se usa en productos domésticos, el 20% en artículos de tocador y cuidado personal, y el 10% remanente es aprovechado en fragancias (elaboración de perfumes), 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 [16].

Según la Asociación de Productores de Fragancias y Sabores [70], el mercado global estimado en los años 2003 y 2004 para las industrias alimenticia, cosmética y farmacéutica, fue de 799, 201 y 263 millardos de euros, respectivamente. Por otra parte, la Organización de la Agricultura y Alimentos (FAO) reportó en el año 2003 que la producción global de los aceites esenciales fue de 28 mil toneladas, siendo la Unión Europea (UE) la mayor productora de éstos. En la **Tabla 6** se presentan los principales AEs empleados por la Unión Europea con sus respectivas aplicaciones industriales.

Tabla 6. AEs empleados en los países de la Unión Europea.

Industria	Aceites esenciales	Área
Cosmética	Limón, <i>Menta piperita</i> , naranja, patchoulí, tallo de rosa, menta, eucalipto y derivados.	<ul style="list-style-type: none"> • Cuidado personal • Jabones y detergentes • Cuidado dental
Alimenticia	Cítricos, vainilla, aceites florales, oleorresinas y <i>Menta piperita</i> .	<ul style="list-style-type: none"> • Bebidas suaves • Confitería • Productos enlatados y procesados
Farmacéutica	Naranja, cítrico, patchoulí, lavanda y geranio.	<ul style="list-style-type: none"> • Homeopatía • Aromaterapia • Productos para el cuidado de la salud

El principal país productor de aceites esenciales en el mundo es los Estados Unidos (EE. UU), a él se suma un número importante de países en vía de desarrollo, *i.e.* Brasil, Indonesia, China e India, entre otros. En el 2003, la Unión Europea exportó el 55% del total de AEs en el mundo y los Estados Unidos el 15%. Los AEs con mayor incidencia económica en el mundo industrial son: menta, limón, rosa, jazmín, los AEs con alto contenido de citral, sándalo, vetiver, patchoulí, geranio, cedro, lavandina, esencias de citronela y cítricos [2, 70].

Actualmente, el AE de *Lippia alba* no está incorporado y reconocido como tal en el mercado mundial [70]. Sin embargo, teniendo en cuenta que éste se caracteriza

por la presencia de metabolitos de interés tales como la carvona y el limoneno, los cuales son ampliamente aprovechados a nivel industrial, se hace necesario llevar a cabo un estudio profundo de esta especie, con el fin de encontrar las condiciones más apropiadas que permitan la mayor acumulación de estos metabolitos en la planta, y, luego, en su aceite esencial.

1.10 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA)

El análisis de componentes principales es un método estadístico que fue desarrollado por Hotelling en 1933 [47]. Es uno de los métodos más comúnmente utilizados para proveer una descripción condensada, en conjuntos de datos con muchas variables, puesto que reduce la dimensionalidad de éstos [15, 98]. En este método, las variables no se consideran explicativas o de respuesta, sino que todas son tratadas de la misma manera.

Para examinar las relaciones entre un conjunto de p -variables correlacionadas, se transforma el conjunto original de las variables a un nuevo conjunto no correlacionado usando una rotación ortogonal en el espacio p -dimensional. Estas nuevas variables se denominan componentes principales (CP), y se obtienen en orden decreciente de importancia, de modo que las primeras CP resuman la mayor cantidad posible de variabilidad de los datos originales. Si un número pequeño de dichos CP resume la mayor parte de la variación de los datos, entonces podría pensarse que la dimensionalidad real de los datos es menor que p [15].

Este método tiene tres finalidades específicas:

1. Presentar óptimamente, en un espacio de dos dimensiones, pequeñas observaciones de un espacio general p -dimensional. En este sentido, los

componentes principales son el primer paso para identificar las posibles variables latentes, o no observadas, que generan los datos.

2. Transformar las variables originales, facilitando la interpretación de los datos.
3. Buscar un espacio vectorial de una dimensión más baja que la de los puntos originales, para que puedan ser proyectados.

El uso de este procedimiento es similar al de encontrar un nuevo sistema de coordenadas. Generalmente, 2 ó 3 componentes principales son necesarios para explicar la mayoría de la información presente en el conjunto de datos, siempre y cuando exista un número grande de variables intercorrelacionadas. Por medio del uso del análisis de componentes principales en un sistema de datos multivariantes, se puede realizar la reducción de dimensiones, la clasificación de muestras e identificación de grupos [109, 111, 120].

En este trabajo se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con el fin de establecer una relación entre las composiciones de los aceites esenciales de *Lippia alba* obtenidos por MWHD, de las plantas provenientes de las 14 regiones de Colombia. De igual forma, se realizó el mismo análisis para observar la influencia del material de fabricación de los destiladores semi-industriales, *i.e.* cobre y acero inoxidable, sobre la composición del AE de *Lippia alba* extraído por destilación vapor/agua.

2. METODOLOGÍA

2.1 CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA

La caracterización taxonómica de las plantas de *Lippia alba*, se realizó en el Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias, de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Los pliegos testigo de cada planta quedaron depositados como muestra permanente en el Herbario Nacional Colombiano (COL, Bogotá), así: *Lippia alba* (Mill) N.E.Br, los números de COL se presentan en la **Tabla 7**. Las plantas fueron clasificadas por el doctor J. L. Fernández.

Tabla 7. Números de *voucher* en el Herbario Nacional (COL) de las especies de *Lippia alba* bajo estudio.

Nº (Figura 10)	Especie	Nº <i>Voucher</i> Especimen	Procedencia de la planta	
			Departamento	Localidad
1	<i>Lippia alba</i>	512082 COL	Antioquia	Puerto Berrío
2	<i>Lippia alba</i>	512083 COL	Boyacá	Cubará
3	<i>Lippia alba</i>	484350 COL	Cundinamarca	Anolaima
4	<i>Lippia alba</i>	480750 COL	Santander	Bucaramanga
5	<i>Lippia alba</i>	512078 COL	Tolima	Flandes
6	<i>Lippia alba</i>	512078 COL	Valle del Cauca	Cali
7	<i>Lippia alba</i>	512077 COL	Valle del Cauca	Palmira
8	<i>Lippia alba</i>	512084 COL	Arauca	Saravena
9	<i>Lippia alba</i>	512272 COL	Bolívar	Colorado
10	<i>Lippia alba</i>	512077 COL	Bolívar	Turbaco
11	<i>Lippia alba</i>	517306 COL	Santander	Suaita
12	<i>Lippia alba</i>	480750 COL	Santander	Bolívar
13	<i>Lippia alba</i>	480750 COL	Quindío	Armenia
14	<i>Lippia alba</i>	480750 COL	Cesar	San Martín

2.2 RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Las plantas de *L. alba* provenientes de diferentes regiones de Colombia (**Tabla 7**) fueron recolectadas por personal adscrito al Centro de Investigación de

Excelencia, CENIVAM. En la **Figura 10** se indican los sitios de muestreo donde se recolectó el material vegetal.

Figura 10. Sitios de muestreo de las plantas de *Lippia alba* en diferentes regiones de Colombia.



Las cantidades y números de plantas recolectadas en cada una de las regiones, se registran en la **Tabla 8**.

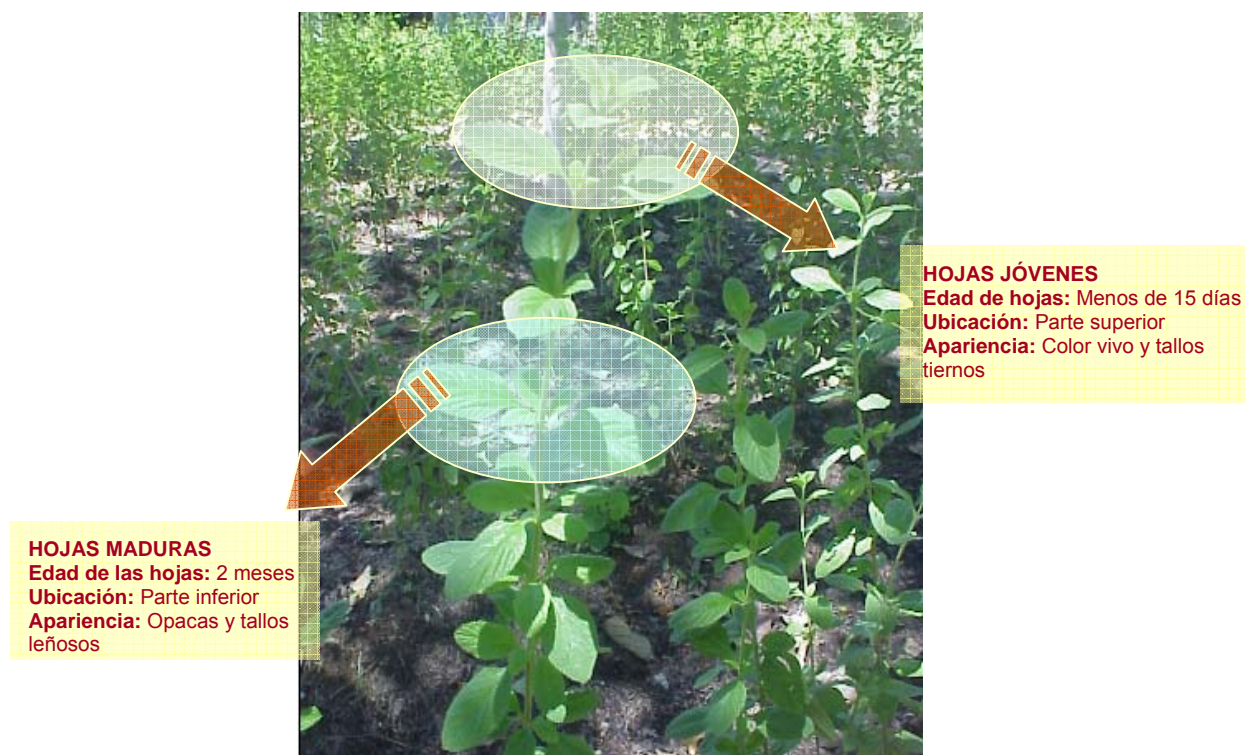
Tabla 8. Cantidad de material vegetal y número de plantas recolectadas en las 14 regiones de Colombia.

Localidad	Cantidad de material vegetal recolectado (g)	Número de plantas
Puerto Berrío	1000	5
Cubará	1000	5
Anolaima	2800	14
Bucaramanga	1500	8
Flandes	2100	11
Cali	4500	22
Palmira	1200	5
Saravena	1300	6
Colorado	1000	4
Turbaco	2400	12
Suaita	1000	4
Bolívar	1000	4
Armenia	1100	4
San Martín	20000	102

Por otra parte, se cultivó material vegetal proveniente de Colorado (Bolívar) en la zona de cultivos experimentales del Complejo Piloto de la Cadena Productiva de AEs (CENIVAM), que se encuentra dentro de las instalaciones de la UIS. El sistema de propagación empleado fue el de reproducción por esquejes. El material vegetal se clasificó como hojas jóvenes (<15 días) y maduras (2 meses), teniendo en cuenta que las hojas jóvenes se encontraban en la parte superior de la planta, y las hojas maduras se ubicaban a $\frac{3}{4}$ partes por debajo de las hojas jóvenes (Véase **Figura 11**). De igual forma, se recolectó y seleccionó el material vegetal

sembrado en la zona de cultivos experimentales del CENIVAM, ubicado en la UIS, Bucaramanga (Santander).

Figura 11. Clasificación del material vegetal (hojas jóvenes y maduras).



2.3 EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

Para la extracción de los aceites esenciales se empleó la hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHD) y la destilación vapor/agua.

2.3.1 Hidrodestilación asistida por radiación de microondas

La extracción de los AEs provenientes de diferentes regiones de Colombia se llevó a cabo empleando un equipo de destilación tipo *Clevenger*, con reservorio de destilación tipo *Dean-Stark* y la adaptación para calentamiento por radiación

mediante un horno de microondas convencional KENDO, modelo MO-124, con una potencia de salida de 800 vatios (W) y frecuencia de radiación de 2.5 giga-Hertz (GHz). Por otra parte, se empleó un horno de microondas LG *Intelowave* con potencia de salida de 720 W para la obtención de los aceites esenciales de hojas jóvenes y maduras.

Se emplearon hojas y tallos (300 g) picados en trozos de 1-2 cm, para la obtención de los AEs de las plantas provenientes de las diferentes regiones de Colombia. Para la extracción de los AEs de las hojas jóvenes y maduras, se emplearon 220 g. Para cada una de las diferentes extracciones se adicionaron 250 mL de agua destilada. Cada extracción duró 40 min, dividido en intervalos de 10 min (10 min X 4). Este procedimiento se repitió tres veces para obtener datos de reproducibilidad.

2.3.2 Destilación vapor/agua

Para la obtención de los AEs de plantas de *Lippia alba* cultivadas en las instalaciones del CENIVAM, ubicado en la UIS, Bucaramanga (Santander), se emplearon dos destiladores semi-industriales, uno de cobre y otro de acero inoxidable, empleando como fuente de calentamiento, gas y una resistencia eléctrica, respectivamente, con el fin de evaluar la influencia del material de los destiladores sobre la calidad de los aceites obtenidos. Para este fin, se tomaron 2 kg de material vegetal previamente identificado, seleccionado, cortado y pesado. El montaje fue conformado por un alambique (extractor) en el cual se sumergió el material vegetal, un condensador de serpentín, un cuello de Cisne o de Ganso, que permitió la unión entre el condensador y el destilador, y un recipiente recolector para separar el aceite del agua (Florentino) (Véase **Figura 12**). Se emplearon 10 L de agua, y el tiempo de extracción fue de 2 ½ h.

Figura 12. Destiladores semi-industriales. **A.** Destilador de cobre; **B.** Destilador de acero inoxidable.



2.4 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA SU ANÁLISIS POR GC-MS

Los aceites de *Lippia alba* obtenidos por MWHD y destilación vapor/agua, se separaron por decantación para su posterior análisis cromatográfico. Para esto, se agregó sulfato de sodio anhidro a los aceites extraídos, con el fin de secar el agua residual y se tomaron 50 μL del aceite, a los cuales se le adicionaron 4 μL de *n*-tetradecano (como estándar interno, *Istd*), y se aforaron a 1 mL con diclorometano.

2.5 DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES FÍSICAS DE LOS AEs de *Lippia alba*

Con el fin de verificar y evaluar la calidad de los AEs de *Lippia alba*, obtenidos por destilación vapor/agua, se determinaron algunas constantes físicas, a saber: densidad, índice de refracción y solubilidad en etanol. Estas determinaciones también se realizaron para los AEs extraídos por MWHD, y se realizó una comparación de los resultados, tomando como patrón de referencia las esencias obtenidas por MWHD.

- **Densidad:** La densidad de los AEs de *Lippia alba*, se determinó a 26°C empleando un picnómetro de 3 mL. Inicialmente, se realizó la calibración del picnómetro con agua destilada. Para esto, se pesó el picnómetro previamente limpio y seco, en una balanza METLER Toledo AG 285 (Suiza); posteriormente, se adicionó agua destilada y se pesó nuevamente. Con los valores obtenidos, y conociendo la densidad del agua a esta temperatura, se calculó el volumen real del picnómetro.

A continuación, se pesó el AE y, con el volumen del picnómetro anteriormente obtenido, se determinó la densidad de la esencia. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada uno de los AEs aislados por destilación vapor/agua y por MWHD.

- **Índice de refracción:** El índice de refracción se determinó a 19.4°C empleando un refractómetro ABBE Atago (Estados Unidos).

- **Solubilidad en etanol:** La solubilidad de los AEs de *Lippia alba*, se determinó empleando cuatro soluciones etanólicas de 20, 40, 60 y 80% v/v. Tomando 100 μ L de cada solución, se agregaron lentamente pequeños volúmenes (2 μ L) de aceite esencial, hasta que la solución se tornó turbia (punto de saturación).

2.6 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

Para la identificación de los metabolitos secundarios volátiles se empleó la técnica analítica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), y se usaron dos columnas capilares de fases estacionarias: apolar y polar.

2.6.1 Columna apolar

Para la identificación de los componentes químicos de los AEs de *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown se aplicó la técnica analítica GC, utilizando un cromatógrafo *Agilent Technologies 6890 Plus Series GC System*, y un detector selectivo de masas (MS) *Agilent Technologies 5973 Network* (Véase **Figura 13**), equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (250°C, relación de *split* 1:30).

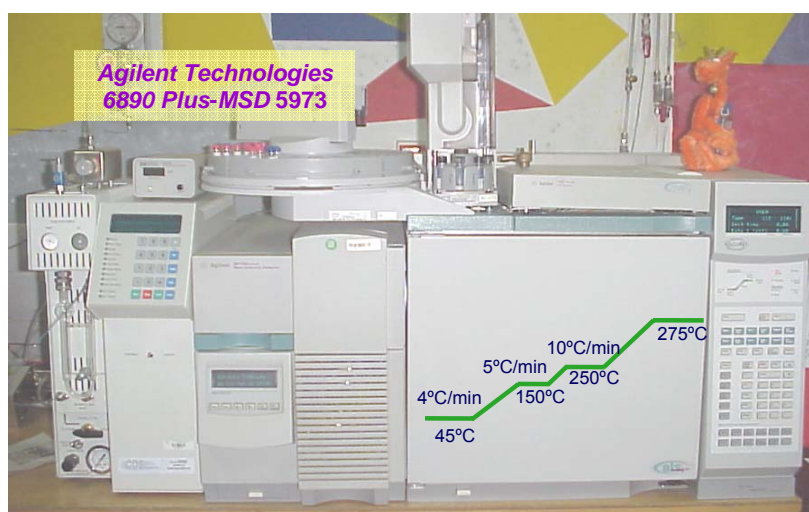
Para la separación de las mezclas se utilizó una columna capilar apolar DB-5MS (J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU) de 60 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25 μm , d_f , con fase estacionaria de 5% fenil-poli(metilsiloxano). La temperatura se programó desde 45°C (5 min) hasta 150°C (2 min) @ 4°C/min, luego, se incrementó hasta 250°C (5 min) @ 5°C/min, finalmente, la temperatura aumentó @ 10°C/min hasta alcanzar 275°C (15 min). Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia fueron de 230 y 285°C, respectivamente.

El gas de arrastre empleado fue helio, con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 16.47 psi y una velocidad lineal de 26 cm s^{-1} .

Los 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 identificación de los componentes presentes en cada aceite se realizó con base en sus espectros de masas, y

comparándolos con los de las bibliotecas, entre las que se encontraban NBS 75K, WILEY 138K, ADAMS y NIST 02.

Figura 13. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Plus Series GC System* acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 5973 Network*.



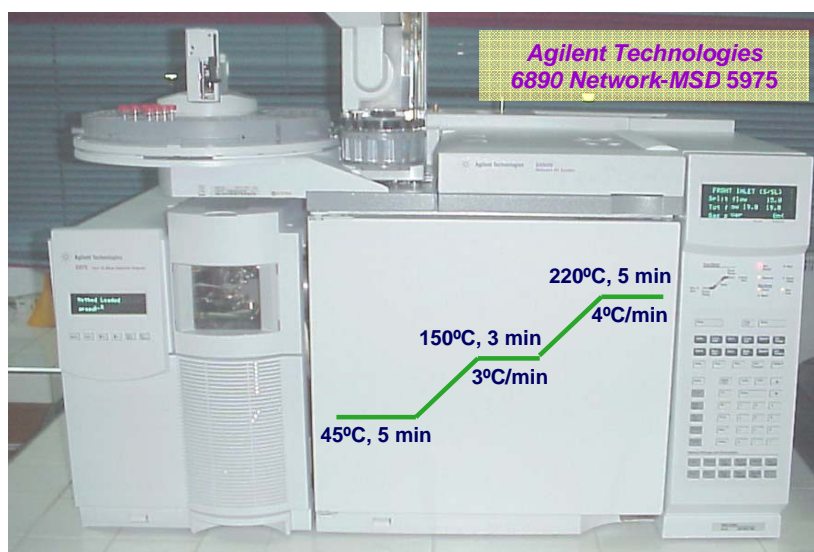
2.6.2 Columna polar

Para este análisis, se empleó un cromatógrafo *Agilent Technologies 6890N Network Series GC* acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 5975*, los espectros se obtuvieron por impacto de electrones; el cromatógrafo fue equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (250°C, relación *split* 50:1) y un inyector automático *Agilent Technologies 7683B Series Injector*. Los datos fueron adquiridos y procesados por el sistema de datos *HPChemStation* (Versión D.02.00.275).

El proceso de separación de los metabolitos se llevó a cabo en una columna capilar polar DB-WAX (*J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.*), con fase estacionaria entrecruzada e inmobilizada de poli(etilenglicol), de 60 m x 0.25 mm,

D.I. x 0.25 μm , d_f . El gas de arrastre empleado fue helio, con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 16.47 psi. La programación de la temperatura fue la siguiente: desde 45°C (5 min) hasta 150°C (3 min) @ 3°C/min, y hasta 220°C (5 min) @ 4°C/min (Véase **Figura 14**).

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



Para la identificación de los metabolitos volátiles también se emplearon espectros de masas e índices de retención de Kovàts. Los índices de Kovàts se calcularon teniendo en cuenta los tiempos de retención de una serie homóloga de patrones de hidrocarburos desde C_{10} hasta C_{25} , corridos en el GC bajo las mismas condiciones operacionales que los aceites esenciales, empleando las columnas DB-5MS y DB-WAX. Para su determinación, se empleó la siguiente fórmula:

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

Donde:

I_k : Índice de retención del compuesto de interés;

n : Número de átomos de carbono del n -alcano que eluye antes del compuesto de interés;

N : Número de átomos de carbono del n -alcano que eluye después del compuesto de interés;

t_{Rx} : Tiempo de retención del compuesto de interés;

t_{RN} y t_{Rn} : Tiempos de retención de n -alcanos que eluyen antes y después del compuesto x .

2.6.3 Cuantificación de los metabolitos secundarios

Para la cuantificación de los componentes presentes en los AEs se empleó como estándar interno n -tetradecano. La concentración de cada compuesto se calculó mediante la siguiente fórmula:

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

Ecuación 2

Donde:

C_x : Concentración del compuesto de interés;

C_A : Concentración del estándar interno (n -tetradecano);

A_x : Área del compuesto de interés;

A_A : Área del estándar interno (n -tetradecano).

2.7 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA) DE LOS AEs DE *Lippia alba*

Con el fin de establecer las comparaciones entre los AEs de *Lippia alba* obtenidos por MWHD, de las plantas provenientes de las 14 regiones de Colombia, se

realizó un análisis estadístico multivariable de tipo PCA (Análisis de componentes principales) (PCA, *STATISTICA Versión 6.0, StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, EE.UU.*). De igual forma, para apreciar de una manera más clara la influencia del material de elaboración de los dos destiladores semi-industriales (cobre y acero inoxidable), sobre la composición química del AE de *Lippia alba*, se aplicó el mismo análisis estadístico. Para esto, se tomaron las cantidades relativas y concentraciones de los metabolitos aislados e identificados en cada uno de los aceites. Los resultados se clasificaron en subconjuntos, según su distancia en el espacio formado por los componentes principales obtenidos del conjunto de los datos.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El proyecto fue dividido en tres etapas. En la primera, se extrajeron y analizaron los metabolitos secundarios volátiles de plantas de *Lippia alba* cultivadas en diferentes regiones de Colombia. En la segunda, se realizó una comparación de los AEs aislados de hojas jóvenes y maduras de plantas de *Lippia alba* cultivadas en el Complejo Piloto de la Cadena Productiva de AEs (CENIVAM), ubicado dentro de las instalaciones de la UIS, Bucaramanga (Santander) y, finalmente, se compararon y evaluaron los rendimientos y las composiciones químicas de los aceites esenciales obtenidos de *L. alba*, empleando dos destiladores semi-industriales, fabricados en cobre y en acero inoxidable. A continuación, se describen y se discuten los resultados obtenidos en cada una de las etapas.

3.1 ACEITES ESENCIALES OBTENIDOS DE DIFERENTES REGIONES DE COLOMBIA

Con el objetivo de evaluar la influencia de las condiciones geográficas y el lugar de procedencia, se realizó un estudio comparativo de la composición química de los AEs extraídos de plantas de *Lippia alba*, provenientes de 14 regiones de Colombia.

3.1.1 Rendimiento de los aceites esenciales

En la **Tabla 9** se registran los rendimientos de cada uno de los aceites esenciales de *Lippia alba* extraídos por MWHD, de las plantas cultivadas en las 14 regiones de Colombia, así como también las condiciones geográficas (altitud y temperatura) de estas localidades.

Los rendimientos de aceites más altos (2.50-3.17%) se alcanzaron en las plantas cultivadas en Armenia (Quindío), Suaita (Santander) y Bolívar (Santander), caracterizadas por el alto contenido de la carvona. Por el contrario, los rendimientos más bajos (0.30-0.36%) se obtuvieron en las plantas cultivadas en Colorado (Bolívar) y Saravena (Arauca), que presentaron el citral (neral + geranial) y la mezcla carvona + citral, respectivamente, como componente mayoritario en el aceite.

Fue evidente, que las plantas cultivadas en regiones de mayor altura presentaron un mayor rendimiento de AE; sin embargo, esta tendencia no fue directa, ya que en el caso de Anolaima (Cundinamarca), cuya altura es de 1650 m.s.n.m, el rendimiento obtenido fue inferior al alcanzado en los lugares mencionados inicialmente. Estos resultados difieren con los reportados por Guzmán [42], quien afirma que el mayor rendimiento se alcanza en condiciones de menor altitud y de temperaturas más altas. Por tanto, es posible afirmar, que las condiciones de cultivo en estas regiones (Armenia, Suaita y Bolívar) no favorecen el desarrollo vegetativo de la planta, provocando un estado de “estrés” que conduce a un aumento en la producción de AE, ya que, según Gottlier [38], el estado de “estrés” cumple una función fundamental en la defensa de la planta y su fisiología.

La especie *Lippia alba* se encuentra ampliamente distribuida en Colombia, en los departamentos de Bolívar, Amazonas, Guajira, Magdalena y Santander [8]. Con el objetivo de recolectar material vegetal de diferentes regiones del país, en busca de nuevas especies promisorias y quimiotipos, se encontró que esta planta también crece abundantemente en los departamentos del Cesar, Antioquia, Boyacá, Valle del Cauca, Arauca y Quindío.

Tabla 9. Rendimientos de los AEs obtenidos por MWHD, de plantas de *Lippia alba* provenientes de las diferentes regiones de Colombia.

Nº (Figura 10)	Localidad	Departamento	Condiciones geográficas*		Rendimiento, % (p/p)	Quimiotipo**
			Altitud (m.s.n.m)	Temperatura promedio (°C)		
1	Puerto Berrío	Antioquia	125	27	0.48	Carvona
2	Cubará	Boyacá	600	26	0.78	Carvona
3	Anolaima	Cundinamarca	1650	19	0.51	Carvona
4	Bucaramanga	Santander	960	25	0.43	Carvona
5	Flandes	Tolima	300	26	0.73	Carvona
6	Cali	Valle del Cauca	1000	25	0.60	Carvona
7	Palmira	Valle del Cauca	1000	27	0.55	Carvona
8	Saravena	Arauca	220	27	0.36	Citral + Carvona
9	Colorado	Bolívar	180	27	0.30	Citral
10	Turbaco	Bolívar	80	28	0.83	Citral
11	Suaita	Santander	1500	19	2.97	Carvona
12	Bolívar	Santander	2600	17	2.50	Carvona
13	Armenia	Quindío	1480	24	3.17	Carvona
14	San Martín	Cesar	120	30	1.41	Carvona

*Datos tomados del IDEAM.

** Ver Numeral 3.1.2.

3.1.2 Caracterización química de los aceites esenciales de *Lippia alba*, mediante GC-MS

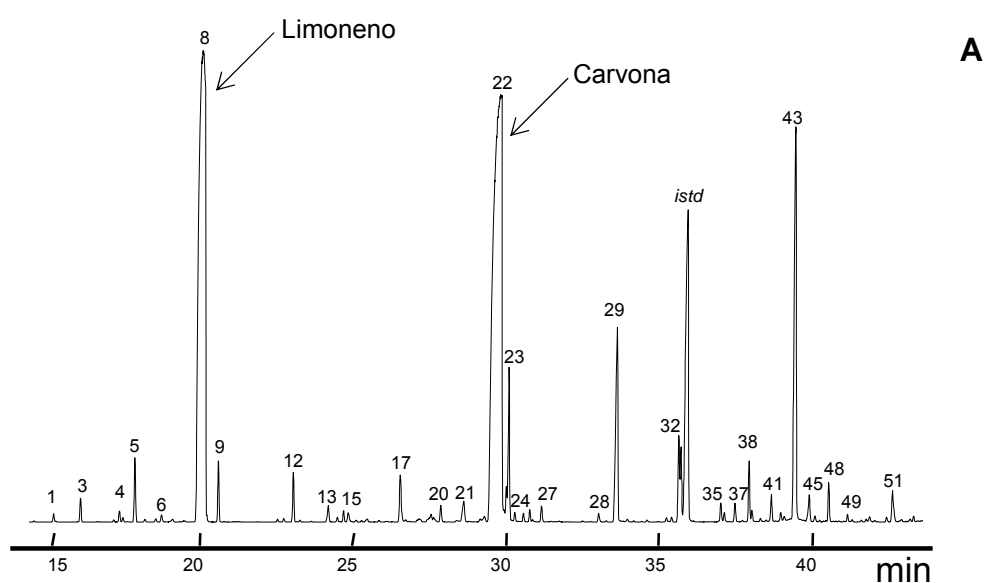
Los aceites esenciales se obtuvieron de los tallos y hojas de *Lippia alba* recolectadas en 14 localidades de Colombia, a saber: Puerto Berrío (Antioquia), Cubará (Boyacá), Anolaima (Cundinamarca), Bucaramanga, Suaita, Bolívar (Santander), Flandes (Tolima), Saravena (Arauca), Cali y Palmira (Valle del Cauca), Colorado y Turbaco (Bolívar), Armenia (Quindío) y San Martín (Cesar). Las condiciones de extracción empleadas fueron descritas en la **Sección 2.3.1** de la Parte Experimental.

En la **Figura 15** se ilustran los perfiles cromatográficos típicos, obtenidos bajo las condiciones operacionales descritas en la **Sección 2.6.1**, empleando la columna

DB-5MS (60 m), de metabolitos secundarios volátiles de *Lippia alba*, obtenidos por MWHD. Los compuestos identificados para cada uno de los aceites de las diferentes localidades, fueron agrupados teniendo en cuenta los compuestos mayoritarios comunes, a saber: carvona y citral (neral + geranial). En las **Tablas 10 y 11**, se registran los compuestos identificados y sus cantidades relativas (%). Se encontraron en el AE más de 50 sustancias en cantidades relativas >0.05%.

Con base en los índices de Kovàts calculados y los reportados en la literatura [1], así como en sus espectros de masas, se identificaron los metabolitos secundarios volátiles presentes en hojas y tallos de *Lippia alba*. La cuantificación de los compuestos de los AEs se realizó empleando la técnica de estandarización interna, siguiendo el procedimiento descrito en la **Sección 2.6.3**.

Figura 15. Perfiles cromatográficos típicos de los AEs de *L. alba*, obtenidos por MWHD: **A.** Quimiotipo *Carvona*, **B.** Quimiotipo *Citral*, **C.** Quimiotipo híbrido (carvona + citral). Columna DB-5MS (60 m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los compuestos se reporta en las **Tablas 10 y 11**.



Continuación, **Figura 15.**

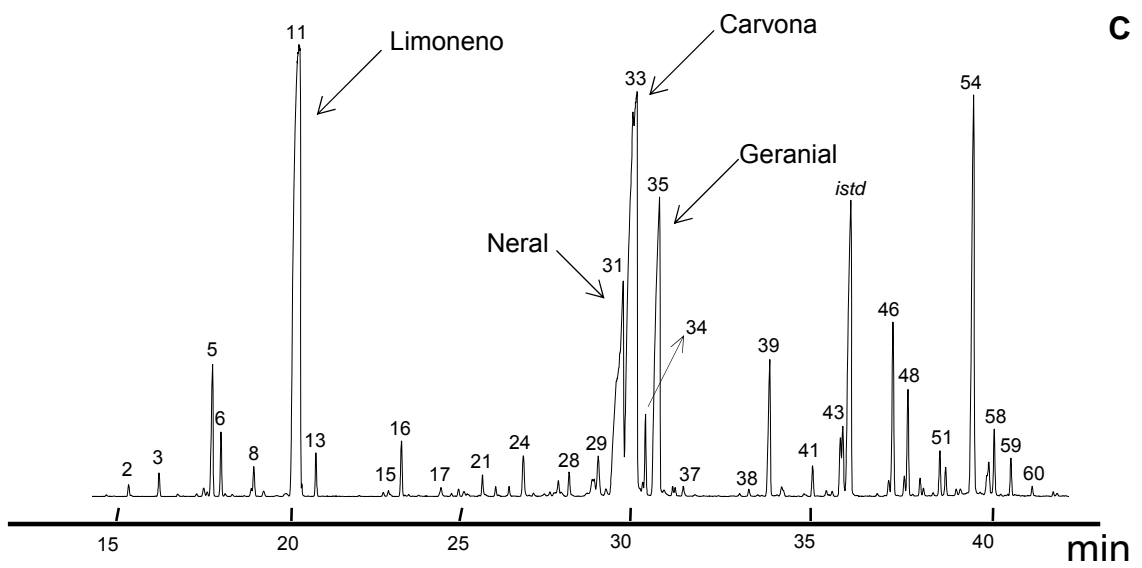
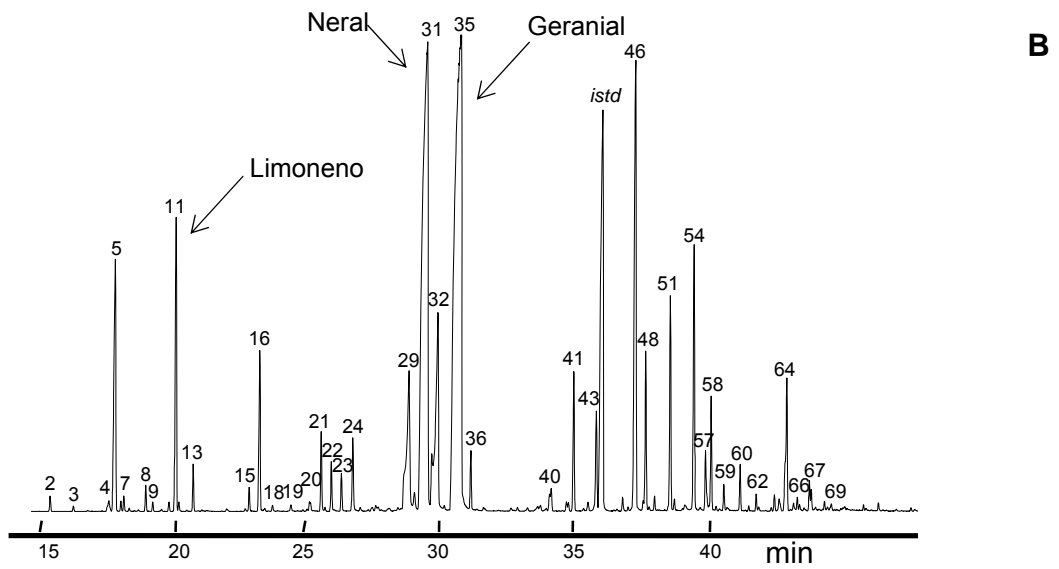


Tabla 10. Cantidad relativa (%) de los principales componentes de los aceites esenciales de *Lippia alba* (Quimiotipo *Carvona*), aislados por MWHD.

Nº Pico ^a	I _k ^b		Compuesto	Localidad, Cantidad relativa (%)					
	DB-5	DB-WAX		1	2	3	4	5	6
1	840	1289	<i>cis</i> -3-Hexenol	-	0.55	0.19	0.13	0.26	-
2	939	921	α -Pinoeno	0.07	0.09	-	0.11	0.05	0.13
3	954	965	Canfeno	0.26	0.17	0.07	0.29	0.14	0.33
4	979	1351	1-Octen-3-ol	-	0.12	0.14	0.14	0.08	-
5	991	1064	β -Mirceeno	0.92	0.88	0.48	0.79	0.87	1.05
6	1015	994	Isobutanoato de isopentilo	0.07	0.07	-	-	0.10	0.00
7	1028	1172	<i>p</i> -Cimeno	0.15	0.10	-	0.10	0.13	0.12
8	1034	1105	Limoneno	25.74	28.52	27.55	29.05	26.10	32.66
9	1047	1153	<i>trans</i> - β -Ocimeno	0.65	0.37	0.40	0.67	0.73	0.52
10	1089	1186	Terpinoleno	-	-	-	-	0.05	-
11	1093	1338	<i>p</i> -Cimenoeno	-	0.06	-	-	0.00	0.06
12	1100	1453	Linalool	0.38	0.39	0.65	0.58	0.54	0.66
13	1126	1580	<i>trans-p</i> -Menta-2,8-dien-1-ol	0.14	0.25	0.26	0.24	0.21	0.27
14	1133	1460	<i>trans</i> -Hidrato de pinoeno	-	-	0.07	0.07	0.06	0.06
15	1137	1350	<i>cis</i> -Óxido de limoneno	0.25	0.08	0.11	0.13	0.17	0.14
16	1141	1707	<i>cis-p</i> -Menta-2,8-dien-1-ol	-	0.18	0.23	0.17	0.13	0.19
17	1181	1613	Borneol	0.67	0.48	0.67	0.75	0.60	0.60
18	1203	1517	<i>cis</i> -Dihidrocarvona	0.20	0.18	0.15	0.20	0.23	0.18
19	1211	1537	<i>trans</i> -Dihidrocarvona	0.16	0.19	0.10	0.23	0.15	-
20	1228	1745	<i>trans</i> -Carveol	0.50	0.55	0.37	0.48	0.53	0.31
21	1244	1776	<i>cis</i> -Carveol	0.00	0.23	0.14	0.12	0.24	0.22
22	1258	1653	Carvona	37.21	37.88	31.86	34.96	36.09	35.03
23	1264	1641	Piperitona	2.25	2.29	2.70	2.38	1.73	2.03
24	1270	1798	<i>cis</i> -Óxido de carvona	0.13	0.12	0.13	0.14	0.11	0.11
25	1278	1754	Isopiperitona	0.15	0.11	0.08	0.10	0.14	0.07
26	1284	1745	<i>trans</i> -Óxido de carvona	0.22	0.19	0.16	0.14	0.15	0.19
27	1291	2092	Timol	0.37	0.20	0.17	0.21	0.15	0.11
28	1335	1678	<i>trans</i> -Acetato de carvilo	0.12	0.15	0.13	0.13	0.16	0.14
29	1349	1842	Piperitenona	4.95	4.09	2.82	4.01	3.80	1.55
30	1357	2080	Eugenol	0.08	-	0.08	-	0.09	0.00
31	1385	1399	α -Copaeno	0.06	0.08	0.12	0.07	0.11	0.15
32	1396	1428	β -Bourboneno	0.79	1.78	1.76	1.20	1.16	2.34
33	1397	1496	β -Elemeno	0.83	-	1.60	0.96	0.98	-
34	1432	1483	β -Ilangeno	0.25	0.26	0.36	0.26	0.31	0.34
35	1436	1506	<i>trans</i> - β -Cariofileno	0.17	0.15	0.68	0.13	0.85	0.19
36	1444	1447	β -Gurjuneno	0.27	0.25	0.40	0.24	0.34	0.41
37	1456	1570	<i>trans</i> - β -Farneseno	0.23	0.28	0.42	0.74	0.56	0.74
38	1459	1557	<i>allo</i> -Aromadendreno	0.11	0.15	0.20	0.14	0.16	0.17
39	1471	1580	α -Humuleno	-	-	0.05	-	0.07	-
40	1475	1587	γ -Gurjuneno	0.37	0.38	0.53	0.36	0.43	0.48
41	1483	1599	γ -Muuroleno	0.10	0.12	0.18	0.12	0.18	0.14
42	1486	1552	Germacreno D	0.09	0.10	0.15	0.08	0.13	0.17
43	1496	1624	Biciclosesquifelandreno	9.70	7.81	10.34	8.20	10.00	7.56

Continuación, **Tabla 10.**

44	1509	1608	Biciclogermacreno	0.67	0.45	0.71	0.46	0.76	0.52
45	1514	1667	δ -Amorfeno	0.11	0.08	0.10	0.09	0.11	0.09
46	1526	1671	γ -Cadineno	-	-	-	-	-	0.05
47	1528	1855	Cubebol	1.05	0.36	1.35	0.51	0.83	-
48	1547	1680	<i>trans</i> - γ -Bisaboleno	-	-	0.16	0.08	0.06	0.08
49	1565	1946	<i>trans</i> -Nerolidol	-	-	0.05	-	-	-
50	1591	1967-2043	Germacreno D-4-ol + Espatuleno	0.81	0.34	0.74	0.56	0.51	0.09
51	1600	1909	Óxido de cariofileno	-	-	0.22	-	0.10	-
52	1613	1970	Presilfiperfolan-8-ol*	0.09	-	0.06	0.07	0.06	-
53	1630	2272	<i>epoxi-allo</i> -Alloaromadendreno	-	-	0.18	0.13	-	-
54	1648	2314	<i>trans</i> -Asarona	0.05	-	0.08	0.05	-	-
55	1656	2116	α -Eudesmol	0.09	0.11	0.20	0.11	0.09	0.11
56	1670	2105	α -Cadinol	-	-	0.18	0.12	-	-
57	1700	2284	Kusinol*	0.15	0.16	0.24	0.25	0.15	-

^a Número de pico en la **Figura 15 (A)**

^b Índices de Kovats determinados experimentalmente

* Identificado tentativamente

Continuación, **Tabla 10.**

N ^o Pico ^a	I _k ^b		Compuesto	Localidad, Cantidad relativa (%)				
	DB-5	DB-WAX		7	11	12	13	14
1	840	1289	<i>cis</i> -3-Hexenol	-	0.13	0.16	-	0.07
2	939	921	α -Pineno	0.05	0.12	0.10	0.13	0.10
3	954	965	Canfeno	0.14	0.30	0.20	0.34	0.29
4	979	1351	1-Octen-3-ol	-	0.09	0.09	0.06	0.08
5	986	1241	6-Metil-5-hepten-2-ona	-	0.85	0.66	0.89	0.99
6	991	1064	β -Mirceno	0.61	-	-	-	-
7	1028	1172	<i>p</i> -Cimeno	0.10	0.12	0.11	0.15	0.18
8	1034	1105	Limoneno	30.89	29.97	30.85	30.17	26.16
9	1047	1153	<i>trans</i> - β -Ocimeno	0.54	0.34	0.61	0.63	0.61
10	1089	1186	Terpinoleno	-	0.04	0.03	0.05	0.06
11	1093	1338	<i>p</i> -Cimeneno	-	0.05	0.00	-	0.04
12	1100	1453	Linalool	0.51	0.58	0.69	0.59	0.36
13	1126	1580	<i>trans-p</i> -Menta-2,8-dien-1-ol	0.15	0.34	0.19	0.20	0.25
14	1133	1460	<i>trans</i> -Hidrato de pineno	-	0.06	0.05	0.06	0.07
15	1137	1350	<i>cis</i> -Óxido de limoneno	0.12	0.18	0.15	0.16	0.21
16	1141	1707	<i>cis-p</i> -Menta-2,8-dien-1-ol	0.11	0.20	0.13	0.12	0.12
17	1181	1613	Borneol	0.45	0.76	0.64	0.73	0.80
18	1203	1517	<i>cis</i> -Dihidrocarvona	0.19	0.11	0.17	0.22	0.40
19	1211	1537	<i>trans</i> -Dihidrocarvona	0.20	0.07	0.16	0.26	0.46
20	1228	1745	<i>trans</i> -Carveol	0.60	0.73	0.63	0.56	0.93
21	1244	1776	<i>cis</i> -Carveol	0.94	-	-	0.26	-
22	1258	1653	Carvona	32.13	41.88	38.89	34.34	42.19
23	1264	1641	Piperitona	3.18	3.34	3.58	2.54	2.92
24	1270	1798	<i>cis</i> -Óxido de carvona	0.12	0.26	0.20	0.16	0.29

Continuación, **Tabla 10.**

25	1278	1754	Isopiperitona	0.10	0.14	0.11	0.11	0.20
26	1284	1745	<i>trans</i> -Óxido de carvona	0.13	0.22	0.15	0.14	0.25
27	1291	2092	Timol	0.28	0.19	0.25	0.08	0.28
28	1335	1678	<i>trans</i> -Acetato de carvilo	0.08	0.20	0.16	0.05	0.17
29	1349	1842	Piperitenona	4.40	5.57	4.21	3.74	6.76
30	1357	2080	Eugenol	0.09	0.05	0.10	0.06	0.13
31	1385	1399	α -Copaeno	0.07	0.13	0.13	0.21	0.07
32	1396	1428	β -Bourboneno	1.73	2.40	1.24	2.99	1.49
33	1397	1496	β -Elemeno	-	0.05	1.51	0.08	-
34	1432	1483	β -Ilangeno	0.20	0.28	0.25	0.48	0.26
35	1436	1506	<i>trans</i> - β -Cariofileno	0.39	0.23	0.78	0.30	0.19
36	1444	1447	β -Gurjuneno	0.22	0.33	0.35	0.54	0.26
37	1456	1570	<i>trans</i> - β -Farneseno	0.20	0.31	0.64	0.74	0.31
38	1459	1557	<i>allo</i> -Aromadendreno	0.10	0.18	0.15	-	0.13
39	1471	1580	α -Humuleno	0.00	0.04	0.04	0.03	-
40	1475	1587	γ -Gurjuneno	0.32	0.30	0.35	0.65	0.33
41	1483	1599	γ -Muuroloeno	0.09	0.11	0.11	0.15	0.09
42	1486	1552	Germacreno D	0.09	0.07	0.11	0.18	0.08
43	1496	1624	Biciclosesquifelandreno	7.96	6.01	7.72	13.62	8.63
44	1509	1608	Biciclogermacreno	0.45	0.54	0.78	1.17	0.88
45	1514	1667	δ -Amorfenol	0.11	0.17	0.25	0.63	0.23
46	1528	1855	Cubebol	1.14	0.76	1.14	0.94	0.48
47	1547	1680	<i>trans</i> - γ -Bisaboleno	0.07	0.08	0.34	0.18	0.00
48	1591	1967-2043	Germacreno D-4-ol + Espatuleno	0.62	0.32	0.22	0.24	0.31
49	1600	1909	Óxido de cariofileno	0.11	0.08	0.10	-	-
50	1613	1970	Presilfiperfolan-8-ol*	-	-	-	-	0.05
51	1630	2272	<i>epoxi-allo</i> -Alloaromadendreno	0.09	-	-	-	-
52	1648	2314	<i>trans</i> -Asarona	0.13	0.10	0.09	-	-
53	1656	2116	α -Eudesmol	0.07	0.05	-	-	-
54	1670	2105	α -Cadinol	0.09	-	-	-	-
55	1700	2284	Kusinol*	0.30	0.42	0.23	-	0.36

^a Número de pico en la **Figura 15 (A)**

^b Índices de Kovàts determinados experimentalmente

*Identificado tentativamente

Tabla 11. Cantidad relativa (%) de los principales componentes de los aceites esenciales de *Lippia alba* (Quimiotipo *Citral*), aislados por MWHD.

Nº Pico ^a	I _k ^b		Compuesto	Localidad, Cantidad relativa (%)		
	DB-5	DB-WAX		8	9	10
1	840	1289	<i>cis</i> -3-Hexenol	0.11	0.05	-
2	939	921	α -Pineno	0.13	0.13	0.15
3	954	965	Canfeno	0.25	0.05	-
4	979	1351	1-Octen-3-ol	0.12	0.18	-
5	986	1241	6-Metil-5-hepten-2-ona	1.74	3.79	5.22
6	991	1064	β -Mirceno	0.65	0.08	0.07
7	992	1365	6-Metil-5-hepten-2-ol	-	0.13	0.19
8	1009	1066	α -Felandreno	0.43	0.22	0.09
9	1015	994	Isobutanoato de isopentilo	0.07	0.07	0.07
10	1028	1172	<i>p</i> -Cimeno	-	0.08	0.13
11	1034	1105	Limoneno	20.76	3.27	3.24
12	1036	1111	β -Felandreno	-	0.08	0.07
13	1047	1153	<i>trans</i> - β -Ocimeno	0.42	0.38	0.28
14	1089	1186	Terpinoleno	0.05	-	-
15	1092	1303	Rosafurano	0.08	0.21	0.36
16	1100	1453	Linalool	0.59	1.70	1.82
17	1126	1580	<i>trans-p</i> -Menta-2,8-dien-1-ol	0.13	-	-
18	1128	1491	<i>exo</i> -Fenchol	-	0.08	-
19	1137	1350	<i>cis</i> -Óxido de limoneno	0.07	-	-
20	1141	1707	<i>cis-p</i> -Menta-2,8-dien-1-ol	0.07	-	-
21	1154	1381	Citronelal	0.28	0.69	0.68
22	1162	1449	<i>cis</i> -Crisantenol	0.12	0.46	0.54
23	1171	1509	Epóxido de rosafurano	0.11	0.33	0.94
24	1181	1613	Borneol	0.57	0.76	0.79
25	1203	1517	<i>cis</i> -Dihidrocarvona	0.35	-	-
26	1211	1537	<i>trans</i> -Dihidrocarvona	0.30	-	-
27	1224	1673	Citronelol	-	-	0.10
28	1228	1745	<i>trans</i> -Carveol	0.56	-	-
29	1231	1708	Nerol	0.68	3.46	2.28
30	1236	1719	Isogeraniol	0.13	0.25	0.41
31	1248	1589	Neral	9.60	19.96	20.67
32	1252	1755	Geraniol	-	4.81	5.53
33	1258	1653	Carvona	23.43	-	-
34	1264	1641	Piperitona	0.98	-	0.09
35	1275	1643	Geranial	9.60	25.44	26.75
36	1278	1754	Isopiperitona	0.14	-	-
37	1284	1745	<i>trans</i> -Óxido de carvona	0.10	-	-
38	1291	2092	Timol	0.13	-	-
39	1349	1842	Piperitenona	2.07	-	-
40	1357	2080	Eugenol	0.19	0.40	0.28
41	1379	1662	Acetato de geraniol	0.33	1.39	0.60

Continuación, **Figura 11.**

42	1385	1399	α -Copaeno	0.10	-	-
43	1397	1496	β -Elemeno	1.58	1.12	0.78
44	1432	1483	β -Ilangeno	0.20	-	-
45	1436	1506	<i>trans</i> - β -Cariofileno	2.22	6.71	5.46
46	1444	1447	β -Gurjuneno	0.22	-	-
47	1447	1498	α -Guaieno	1.18	1.56	1.42
48	1456	1570	<i>trans</i> - β -Farneseno	0.19	0.12	0.07
49	1459	1557	<i>allo</i> -Aromadendreno	0.09	0-	-
50	1471	1580	α -Humuleno	0.50	2.15	1.64
51	1475	1587	γ -Gurjuneno	0.32	0.11	0.10
52	1483	1599	γ -Muuroleno	0.08	-	-
53	1486	1552	Germacreno D	0.12	0.13	-
54	1496	1624	Biciclosesquifelandreno	7.43	2.73	1.54
55	1508	1633	Isobutanoato de geranilo	-	-	0.59
56	1509	1608	Biciclogermacreno	0.67	0.65	-
57	1515	1627	α -Bulneseno	0.77	1.07	0.80
58	1528	1855	Cubebol	0.40	0.22	0.20
59	1547	1680	<i>trans</i> - γ -Bisaboleno	0.12	0.39	0.34
60	1565	1946	<i>trans</i> -Nerolidol	0.04	0.12	0.10
61	1586	1895	Sesquiterpenol, C ₁₅ H ₂₆ O	0.10	0.15	0.20
62	1591	1967-2043	Germacreno D-4-ol + espatulenol	0.30	0.17	0.14
63	1600	1909	Óxido de cariofileno	0.35	1.70	2.19
64	1613	1970	Presilfiperfolan-8-ol*	0.04	0.13	0.11
65	1616	1626	<i>cis</i> -Bisabolol-11-ol	-	0.07	0.07
66	1628	1964	Epóxido de humuleno II	-	0.26	0.54
67	1630	2272	<i>epoxi-allo</i> -Alloaromadendreno	0.12	0.19	-
68	1648	2314	<i>trans</i> -Asarona	-	0.10	0.09
69	1700	2284	Kusinol*	0.08	-	-

^a Número de pico en la **Figura 15 (B y C)**

^b Índices de Kovàts determinados experimentalmente

* Identificado tentativamente

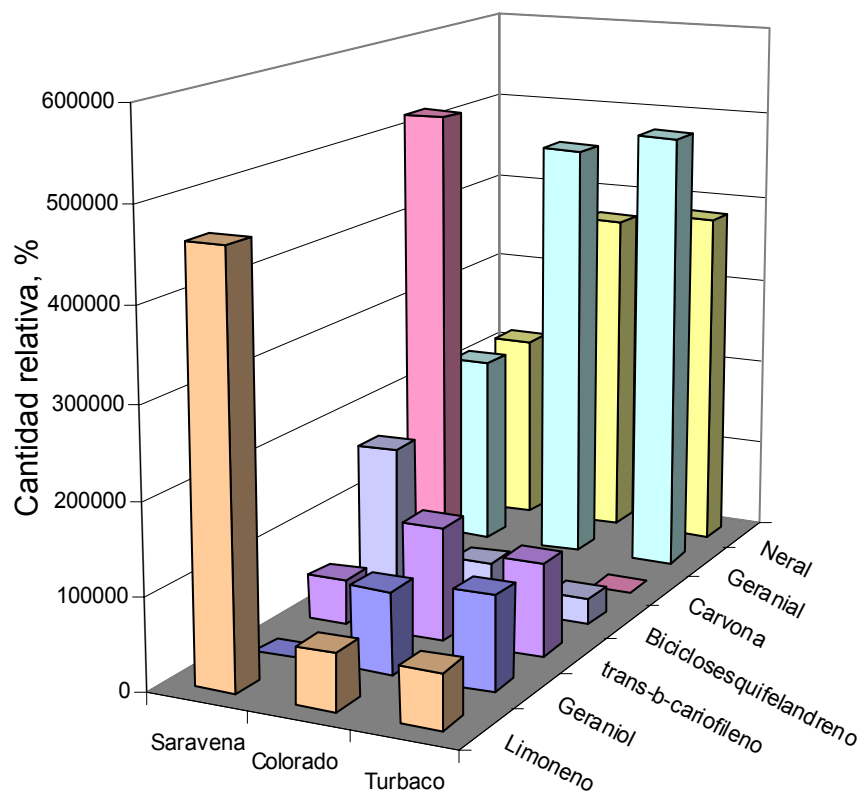
En general, la composición química de los AEs de *Lippia alba* extraídos por MWHD de las plantas provenientes de las 14 regiones de Colombia (**Tabla 9**), presentó una variación apreciable respecto a los principales compuestos en cada una de las regiones. Para el caso de Puerto Berrío (Antioquia), Bucaramanga (Santander), Cali y Palmira (Valle del Cauca), Cubará (Boyacá), Anolaima (Cundinamarca), Flandes (Tolima), Armenia (Quindío), Bolívar y Suaita (Santander) y San Martín (Cesar), la carvona (31-42%%) fue el componente

mayoritario en todos los aceites, seguido del limoneno (25-32%), el biciclosesquifelandreno (7-10%), la piperitenona (1-5%) y la piperitona (1-3%).

Para las plantas provenientes de Turbaco y Colorado (Bolívar), y Saravena (Arauca), el geranial (9-27%) y el neral (9-21%) fueron los principales metabolitos encontrados en los AEs de *Lippia alba*, seguidos del limoneno (3-26%), geraniol (4-5%), *trans*- β -cariofileno (2-6%), y biciclosesquifelandreno (1-7%). Sin embargo, el AE extraído de plantas cultivadas en Saravena tenía una alta cantidad de la carvona (23%), el cual no es un metabolito común en los AEs de quimiotipo citral aislados de las plantas provenientes de Turbaco y Colorado. De igual forma, en comparación con los aceites aislados de plantas de Turbaco y Colorado, el AE extraído de las plantas de *Lippia alba* de Saravena presentó una mayor cantidad de limoneno, y más baja de neral y geranial, lo que se aprecia más claramente en la **Figura 16**.

Esta variabilidad en la composición química pudo estar influenciada por diversos factores, tales como la temperatura, altitud, condiciones de cultivo, suelo, origen y edad de la planta, así como por cambios de tipo genético [90, 91, 110].

Figura 16. Compuestos mayoritarios en los AEs de *Lippia alba*, obtenidos por MWHD, de plantas cultivadas en Saravena, Colorado y Turbaco.



En cuanto a los efectos de tipo genético, cabe señalar que la biosíntesis de los compuestos volátiles está dada por enzimas específicas; para el caso de los terpenos, estas enzimas se denominan “*terpene synthases*”, e.g. *linalool synthase* (LIS), la cual es responsable por la síntesis del linalool. Estas enzimas son codificadas por un gran número de genes, que están relacionados estructuralmente. Así como las “*terpene synthases*”, también existen las *mono*, *di*, y *sesqui-terpen synthases*, encargadas de la síntesis de los correspondientes terpenos. Teniendo en cuenta que las plantas analizadas pertenecen a la misma especie, se supone que la información genética de éstas sea la misma. Sin

embargo, se han encontrado variaciones en la composición química de los metabolitos secundarios entre plantas de la misma especie; un ejemplo es la *C. breweri* para la cual, algunas plantas emiten tanto eugenol como metil eugenol, mientras que otras emiten únicamente eugenol [24]. Esto indica que las plantas que emiten metil eugenol expresan el gen que codifica la enzima *eugenol methyltransferase*, la cual convierte el eugenol a metil eugenol, mientras que la planta que no emite metil eugenol, no expresa este gen [24,50]. Particularmente, la variación en la composición química observada en las plantas de *Lippia alba* analizadas, indica, que a pesar de que estas plantas sean de la misma familia y presenten la misma información genética, no todas expresan los mismos genes encargados de codificar las enzimas que generan los terpenos característicos. Esto está directamente relacionado con las condiciones geográficas, de cultivo y de crecimiento de cada planta, puesto que cada una de éstas responde a las necesidades particulares, conduciendo a la activación o desactivación de las respectivas enzimas [4, 24, 113].

De acuerdo con lo anterior, se concluye que la especie *Lippia alba* colombiana presenta tres quimiotipos, a saber: carvona [108, 109], citral y un quimiotipo “mixto” o híbrido, no descrito previamente en la literatura, que se destaca por el alto contenido de la carvona y del citral (neral + geranial). En la **Tabla 12**, se comparan los principales compuestos encontrados en el aceite esencial de *Lippia alba* cultivada en Colombia y en otros países, a saber: Cuba [85, 86] y 4 localidades de Antillas Francesas (Bourbeyre, Capesterre, St. Pierre y Cayenne) [44].

Tabla 12. Composición química de los aceites esenciales de *Lippia alba*, provenientes de diferentes lugares geográficos.

Compuestos mayoritarios	Cantidad relativa, %							
	Colombia			Antillas Francesas				Cuba
	1	2	3	Gourbeyre	Capesterre	St. Pierre	Cayenne	
β -Mirceño	0.79	0.08	0.65	4.0	6.5	-	3.0	0.3
<i>p</i> -Cimeno	0.10	0.08	-	2.6	5.6	-	-	-
<i>trans</i> - β -Ocimeno	0.67	0.38	0.42	6.3	13.3	-	-	-
Limoneno	29.05	3.27	20.76	-	-	51.1	18.4	29-32
Linalool	0.58	1.70	0.59	1.6	1.4	2.1	1.3	-
Neral	-	19.96	9.60	33.1	7.8	-	-	-
Carvona	34.96	-	23.43	-	-	-	67.6	51-57
Piperitona	2.38	-	0.98	-	-	-	0.6	0.8-1.2
Geranial	-	25.44	9.60	20.8	9.1	-	-	0.1
Piperitenona	4.01	-	2.07	-	9.2	4.3	0.8	1-2
<i>trans</i> - β -Cariofileno	0.13	6.71	2.22	3.7	-	-	-	0.1-0.2
Biciclosquifelandreno	8.20	2.73	7.43	-	-	-	-	4-7

1-Quimiotipo *Carvona*; 2-Quimiotipo *Cítral*; 3-Quimiotipo híbrido (cítral + carvona).

El aceite esencial de Cuba se extrajo de las partes aéreas de la planta (hojas, tallos y flores), secas y molidas, empleando la hidrodestilación durante 3 horas. En Antillas francesas, también se emplearon las partes aéreas de las plantas secas recolectadas en las 4 localidades, y la extracción se llevó a cabo por el método de hidrodestilación, empleando un equipo tipo *Clevenger*. Los rendimientos alcanzados para cada uno de los AEs de estas 4 localidades fueron: 0.6% (Gourbeyre), 0.2% (Capesterre), 0.8% (Cayenne) y 1.6% (St. Pierre). En el presente trabajo, se emplearon hojas y tallos picados en trozos de 1-2 cm, y como método de extracción se empleó MWHD durante 40 min. Los rendimientos obtenidos para Bucaramanga, Colorado y Saravena fueron: 0.43, 0.30 y 0.36%, respectivamente.

Es evidente la marcada variabilidad en la composición química de los diferentes aceites esenciales extraídos en Colombia, Antillas Francesas y Cuba. Sin embargo, se observa la presencia de metabolitos comunes tales como el

β -mirreno para todos los casos, exceptuando la localidad de St. Pierre (Antillas Francesas). Las plantas cultivadas en Bucaramanga y Saravena (Colombia), Cayenne (Antillas Francesas) y Cuba se caracterizaron por el alto contenido de la carvona. De igual forma, el limoneno se presentó en altas concentraciones en las plantas cultivadas en Bucaramanga y Saravena (Colombia), Cayenne (Antillas Francesas), Cuba y, para el caso de St. Pierre (Antillas Francesas), fue el metabolito mayoritario. El neral y geranial, por su parte, predominaron en la composición química del AE extraído de *Lippia alba* cultivada en Gouyerbe (Antillas Francesas) y, en menor proporción, en las plantas de Saravena (Colombia).

Los datos obtenidos ilustran las diferencias en la composición química de los AEs de *Lippia alba*, lo cual corroboró una vez más la marcada dependencia de ésta del origen geográfico y de la edad de la planta, las condiciones de cultivo, y algunos otros factores de tipo geobotánica y, posiblemente, genético [89, 91, 110].

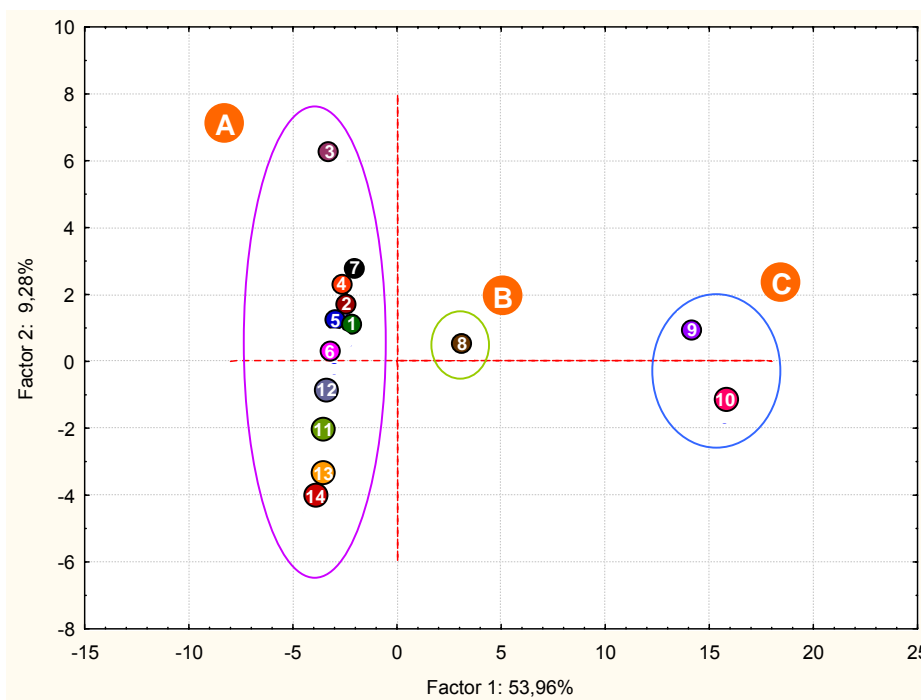
3.1.3 Análisis de componentes principales (PCA) de los AEs de *L. alba*, extraídos por MWHD de plantas provenientes de diferentes regiones de Colombia

Para establecer las comparaciones entre los aceites esenciales de *Lippia alba* obtenidos por MWHD, de las plantas provenientes de 14 regiones de Colombia, se realizó el análisis de componentes principales (PCA, *STATISTICA Versión 6.0, StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA*).

El resultado de aplicar PCA a los AEs de *Lippia alba* de plantas de diferentes regiones de Colombia, indica que más del 60% de la información de las **Tablas 10** y **11**, puede ser representada por un subespacio de dos coordenadas (componentes principales), construido con base en las combinaciones lineales de los porcentajes de los componentes presentes en los diferentes AEs (Véase

Figura 17). El *Factor 1* involucra el 54% de la información y está representado básicamente por monoterpenos oxigenados (*i.e.* geranial, neral, citronelal y carvona). Por el contrario, el *Factor 2* constituye el 9% de la información, y está caracterizado principalmente por monoterpenos (*i.e.* *p*-cimeno, α -pineno, terpinoleno).

Figura 17. Análisis de componentes principales (PCA) de los compuestos presentes en los AEs de *L. alba*, aislados por MWHD, de plantas provenientes de 14 regiones de Colombia. **A.** Quimiotipo Carvona; **B.** Quimiotipo Híbrido (carvona + citral); **C.** Quimiotipo Citral.



De acuerdo con la **Figura 17**, se observa la existencia de tres quimiotipos; **A.** Hallado en los departamentos de Antioquia, Santander, Valle del Cauca, Boyacá, Cundinamarca, Tolima, Quindío y Cesar se caracterizó por un alto contenido de carvona (37%), limoneno (32%), biciclosesquifelandreno (10%) y piperitenona (5%); **C.** Encontrado en los municipios de Colorado y Turbaco (Bolívar) se destacó por su alto contenido de geranial (27%), neral (21%) y *trans*- β -cariofileno (6%); **B.**

Presente en el departamento de Arauca, fue rico en carvona (23%), limoneno (21%), y citral, *i.e.* neral (9.6%) y geranial (9.6%). Este último es un quimiotipo híbrido (**B**), entre los quimiotipos carvona (**A**), y citral (**C**), no descrito previamente [44].

3.2 ACEITES ESENCIALES OBTENIDOS DE HOJAS JÓVENES Y MADURAS DE DOS QUIMIOTIPOS DE *Lippia alba*

3.2.1 Rendimiento de los aceites esenciales

En la **Tabla 13** se registran los rendimientos obtenidos de AEs (% p/p) de las hojas jóvenes y maduras de *Lippia alba*, de dos quimiotipos; *i.e.* citral (neral + geranial) y carvona. Se observa que, independientemente del quimiotipo analizado, se alcanza un poco más alto rendimiento del aceite esencial de hojas jóvenes, que de las hojas maduras.

Tabla 13. Rendimiento de los AEs de *L. alba*, extraídos por MWHD, de hojas jóvenes y maduras.

Hojas	Quimiotipo	Rendimiento, (% p/p)
Jóvenes	Carvona	0.53 ± 0.01
	Citral	0.50 ± 0.03
Maduras	Carvona	0.45 ± 0.02
	Citral	0.38 ± 0.02

Las hojas constituyen una de las partes más importantes de las plantas, puesto que son las encargadas de realizar más intensamente la fotosíntesis, proceso, mediante el cual las plantas capturan y utilizan la energía lumínica para transformar la materia inorgánica de su medio externo, mediante una serie de reacciones químicas, en materia orgánica que utilizan para su desarrollo [4, 113]. La fotosíntesis es un proceso fisiológico que está influenciado por factores

abióticos, tales como temperatura, humedad y luz, entre otros [94,113], Este proceso, hace parte del metabolismo primario de las plantas, pero se relaciona también con la biosíntesis de los metabolitos secundarios volátiles. Se ha encontrado que la síntesis de los compuestos volátiles se acelera proporcionalmente con la temperatura [113]. De esta manera, es posible afirmar, que las hojas jóvenes, las cuales se encuentran expuestas a una mayor cantidad de luz solar, presentan una mayor producción de metabolitos secundarios volátiles, mientras que las hojas maduras, son “cubiertas” por las hojas jóvenes, que disminuyen la intensidad lumínica que incide sobre ellas, lo cual se ve reflejado en los rendimientos de metabolitos secundarios volátiles alcanzados, (Véase **Tabla 13**). Sin embargo, para que esta hipótesis sea válida, se requiere realizar una comparación de los rendimientos de AEs de hojas jóvenes y maduras recolectadas en horas de la noche, o en condiciones de “estrés lumínico” en donde se reduce o se elimina el factor de la luz.

3.2.2 Caracterización química de los AEs de *Lippia alba*, extraídos de hojas jóvenes y maduras por GC-MS

Con el propósito de verificar si existe alguna variación tanto cualitativa como cuantitativa, en la composición química de los AEs extraídos de hojas jóvenes y maduras de dos quimiotipos de *Lippia alba*, se siguió el procedimiento descrito en la **Sección 2.3.1** de la Parte Experimental.

• Quimiotipo Carvona

En la **Figura 18** se observan los perfiles cromatográficos obtenidos de los AEs de *Lippia alba* de hojas jóvenes y maduras. En la **Tabla 14** se registran los componentes mayoritarios aislados e identificados por GC-MS según el orden de elución en la columna DB-5MS, junto con sus índices de retención, olores característicos y concentraciones (μg analito/kg de M.V.) determinadas utilizando

estandarización interna. Más de 40 sustancias en cantidades relativas >0.10% se encontraron en los AEs.

Figura 18. Perfiles cromatográficos típicos de los AEs obtenidos por MWHD. **A.** Hojas jóvenes; **B.** Hojas maduras, de *Lippia alba*, quimiotipo Carvona. Columna DB-5MS (60 m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los compuestos se reporta en la **Tabla 14**.

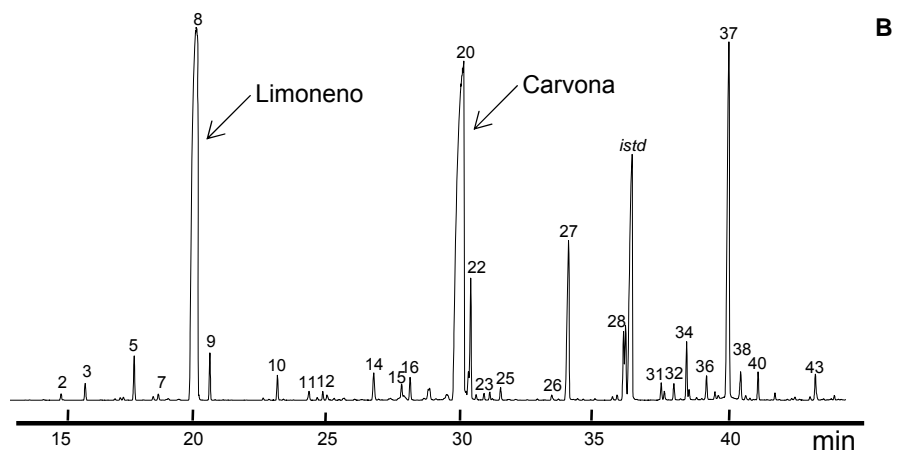
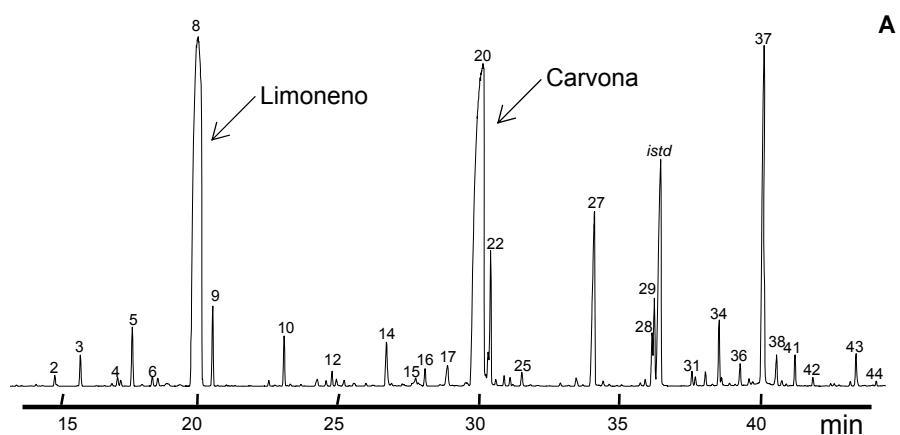


Tabla 14. Concentración (μg analito/kg de M.V.) de los principales componentes en los AEs aislados por MWHD de *Lippia alba*, quimiotipo Carvona, obtenidos de hojas jóvenes y maduras.

Nº Pico Fig. 18	I_k^a		Compuesto	Concentración, $\mu\text{g}/\text{kg}$ de M.V. ^b		Olor Característico ^c
	DB-5MS	DB-WAX		Edad de las hojas		
				Jóvenes	Maduras	
1	881	1122	2-Metil butil acetato	1160	-	
2	939	1019	α -Pinoeno	910	710	Pino, mentolado
3	954	1062	Canfeno	3130	2000	Ligero, alcanforado
4	979	1453	1-Octen-3-ol	840	-	Frutal, herbáceo
5	991	1164	β -Mirceeno	6420	5360	Herbáceo
6	1005	1319	(3Z)-Acetato de hexenilo	980	470	
7	1009	1681	Verbeneno	-	800	
8	1038	1202	Limoneno	230980	208090	Cítrico, frutal
9	1050	1252	<i>trans</i> - β -Ocimeno	7580	5240	Dulce, herbáceo
10	1101	1550	Linalool	5000	2890	Floral, dulce
11	1127	1637	<i>trans</i> - <i>p</i> -Menta-2,8-dien-1-ol	1040	1220	
12	1139	1453	<i>cis</i> -Óxido de limoneno	1400	1000	Frutal
13	1142	1948	<i>cis</i> - <i>p</i> -Menta-2,8-dien-1-ol	710	730	Alcanforado
14	1181	1716	Borneol	6270	4220	Dulce
15	12,04	1621	<i>cis</i> -Dihidrocarvona	1180	4110	A madera
16	1212	1641	<i>trans</i> -Dihidrocarvona	1840	3890	A alcaravea
17	1228	2001	Monoterpeno, C ₁₀ H ₁₆	-	1380	
18	1229	1845	<i>trans</i> -Carveol	3290	1470	Mentolado
19	1244	1876	<i>cis</i> -Carveol	-	1760	Picante
20	1259	1756	Carvona	241180	234530	A hierba fresca
21	1264	1748	<i>trans</i> -Epóxido de piperitona	3910	3760	
22	1266	1746	Piperitona	14800	15040	Mentolado
23	1277	1860	Isopiperitenona	960	780	
24	1282	1851	<i>trans</i> -Óxido de carvona	800	890	
25	1292	2287	Timol	1560	1600	Medicinal, agradable
26	1336	1965	<i>trans</i> -Acetato de carvilo	1110	780	Herbáceo
27	1350	1948	Piperitenona	34420	33160	
28	1396	1529	β -Bourboneno	6110	9360	Herbáceo
29	1398	1599	β -Elemeno	10420	10290	Herbáceo, fresco
30	1432	1586	β -Cedreno	1670	2270	
31	1435	1610	<i>trans</i> - β -Cariofileno	1040	1200	A madera
32	1444	1679	β -Copaeno	1490	2160	
33	1456	1671	<i>trans</i> - β -Farneseno	6910	7360	Cítrico, verde
34	1458	1662	<i>allo</i> -Aromadendreno	890	1270	
35	1475	1741	γ -Gurjuneno	2470	3220	
36	1483	1692	γ -Muuroleno	-	930	
37	1496	1728	Biciclosesquifelandreno	71560	80780	
38	1509	1708	Biciclogermacreno	3760	470	
39	1515	1656	γ -Cadineno	-	4360	
40	1528	1957	Cubebol	3020	710	

Continuación. **Tabla 14.**

42	1546	1782	<i>cis-α</i> -Bisaboleno	1530	800
43	1590	2069	Germacreno D-4-ol	3690	3840
44	1699	2231	Kusinol*	800	1220

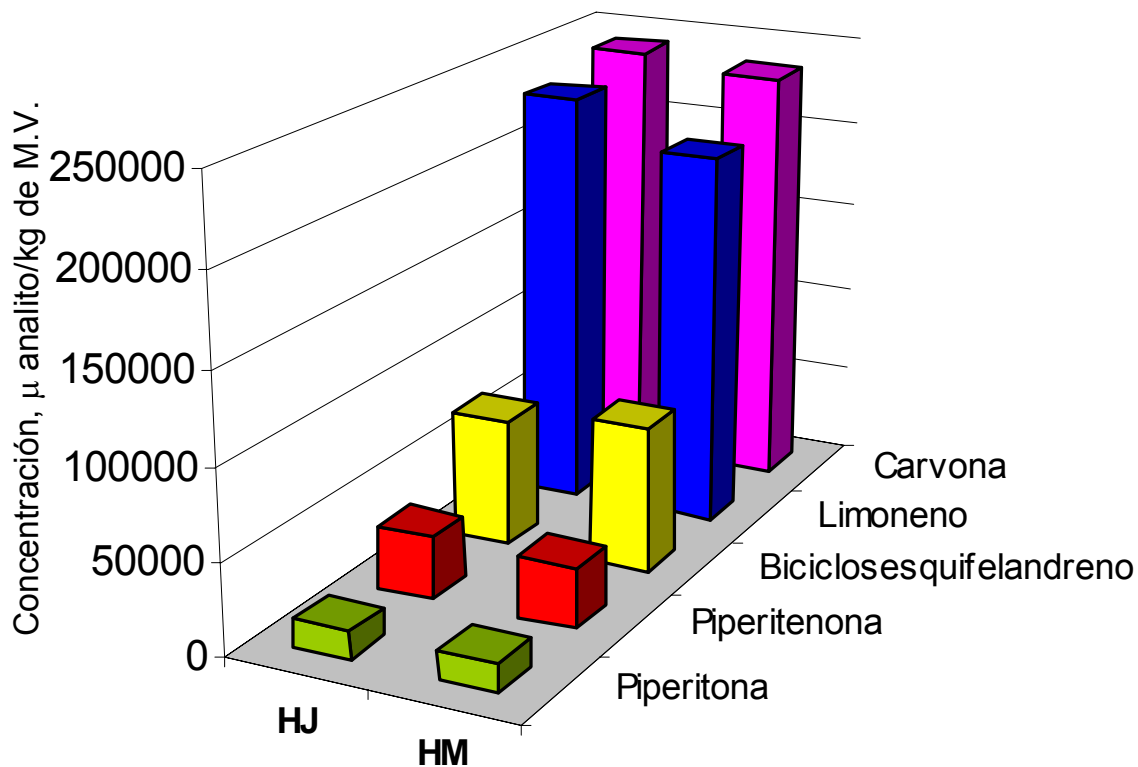
^a Índices de Kovàts determinados experimentalmente
^b Promedio de tres extracciones independientes, n=3
^c [12, 27, 60, 121]
* Identificado tentativamente

Los principales componentes presentes en los AEs de *Lippia alba*, extraídos de hojas jóvenes y maduras fueron: la carvona (30-32%), el limoneno (28-30%), el biciclosesquifelandreno (9-11%), la piperitenona (4-5%) y la piperitona (1-2%).

De acuerdo con los compuestos identificados en los aceites esenciales de *L. alba*, de hojas jóvenes y maduras, se observó que la composición química fue muy similar. Se presentó un aumento en la fracción sesquiterpénica (*i.e.* γ -muuroleno y γ -cadineno), como también en la fracción de monoterpenos oxigenados (*i.e.* *cis*-carveol) en los AEs extraídos de hojas maduras.

Cuantitativamente, se observó un ligero aumento en la concentración de metabolitos tales como la carvona, el limoneno y la piperitenona en las hojas jóvenes; mientras que en las hojas maduras, la piperitona y el biciclosesquifelandreno, se encontraron en mayor proporción. Este comportamiento se aprecia en la **Figura 19**.

Figura 19. Principales compuestos presentes en los AEs de *Lippia alba*, obtenidos por MWHD, de hojas jóvenes (HJ) y maduras (HM), quimiotipo Carvona.



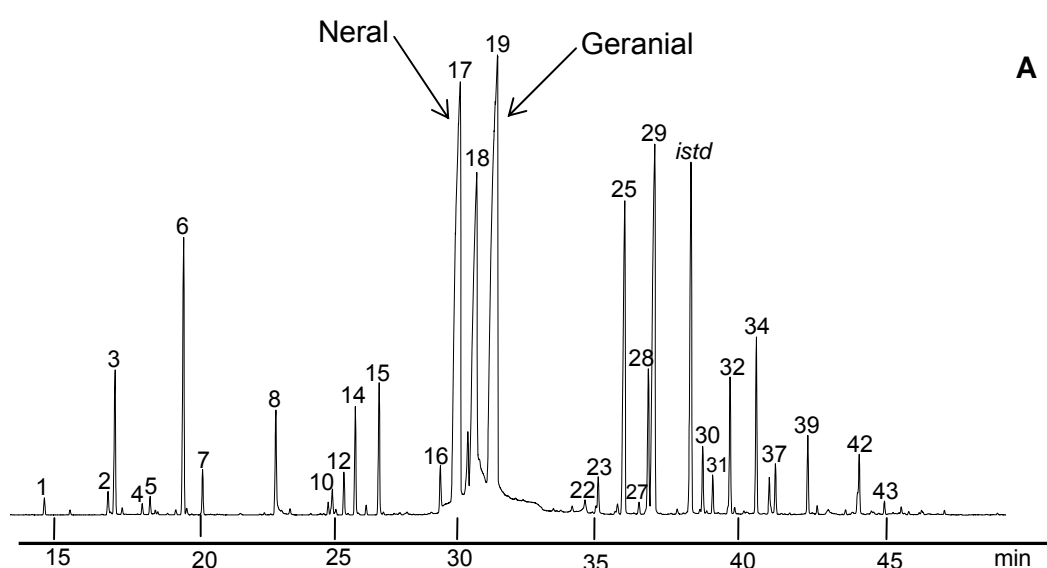
Estos resultados indican que los aceites esenciales de *Lippia alba*, extraídos de hojas jóvenes y hojas maduras, presentan los componentes mayoritarios en concentraciones similares. En hojas jóvenes, el limoneno (230980 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de M.V.), la carvona (241180 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de M.V.) y la piperitenona (34420 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de M.V.) se presentaron en mayor proporción que en las hojas maduras. Sin embargo, para estas últimas, la piperitona (15040 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de M.V.) y el bicyclosquifelandreno (80780 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de M.V.) estuvieron en mayor concentración en comparación con las hojas jóvenes. En este sentido, si se desea obtener el AE de *Lippia alba* con la mayor concentración de carvona, metabolito de interés por sus aplicaciones en la industria farmacéutica y cosmética, no es necesario que las hojas alcancen cierto

grado de madurez para realizar la extracción, puesto que la edad no influye significativamente en la concentración de este compuesto.

• Quimiotipo Citral

En la **Figura 20** se observan los perfiles cromatográficos obtenidos de los AEs de *Lippia alba* de hojas jóvenes y maduras. En la **Tabla 15** se registran los componentes mayoritarios aislados e identificados por GC-MS según el orden de elusión en la columna DB-5MS, junto con sus índices de retención, olores característicos y concentraciones determinadas empleando estandarización interna. Más de 40 sustancias en cantidades relativas >0.10% se encontraron en los AEs.

Figura 20. Perfiles cromatográficos típicos de los AEs de *L. alba*, obtenidos por MWHD. **A.** Hojas jóvenes; **B.** Hojas maduras; quimiotipo Citral. Columna DB-5MS (60 m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los compuestos se reporta en la **Tabla 15**.



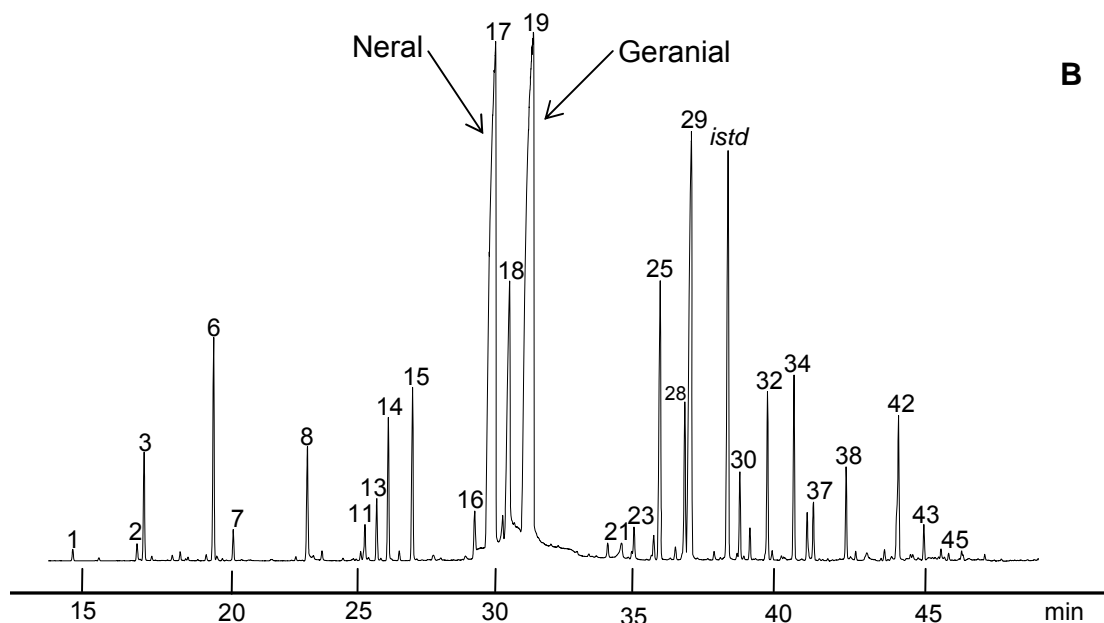


Tabla 15. Concentración (μg de analito/kg de M.V.) de los principales componentes de los AEs de *Lippia alba*, aislados por MWHD, de hojas jóvenes y maduras (quimiotipo Citral).

N° Pico Fig. 20	Ik ^a		COMPUESTO	Concentración, $\mu\text{g}/\text{kg}$ de M.V. ^b		Olor Característico ^c
	DB-5MS	DB-WAX		Edad de las hojas		
				Jóvenes	Maduras	
1	939	1019	α -Pinoeno	1410	990	A pino, menta
2	979	1453	1-Octen-3-ol	2820	1340	Frutal, herbáceo
3	986	1340	6-Metil-5-hepten-2-ona	13310	11010	Herbáceo
4	1003	1319	(3E)-Acetato de hexenilo	960	-	
5	1008	1164	α -Felandreno	1570	-	Cítrico, frutal
6	1033	1198	Limoneno	28320	16530	
7	1046	1252	<i>trans</i> - β -Ocimeno	3890	2150	Dulce, herbáceo
8	1100	1550	Linalool	11650	9840	Floral, dulce
9	1141	1391	(3Z)-Isobutanoato de hexenilo	980	-	
10	1144	1521	<i>epi</i> -Fotocitral A + C ₁₀ H ₁₆ O	2240	-	
11	1144	1490	<i>cis/cis</i> -Fotocitral + <i>epi</i> -Fotocitral	-	2820	
12	1153	1483/1515	Citronelal + Fotocitral A	3580	-	
13	1153	1483	Citronelal	-	5370	Notas de limón
14	1162	1548	<i>trans</i> -Verbenol	9780	11010	
15	1180	1577	<i>cis</i> -Crisantenol	11950	13850	
16	1230	1808	Nerol	10940	5861	Ligero a fruta
17	1246	1695	Neral	146330	173420	Floral
18	1259	1855	Geraniol	114500	58630	Suave, floral
19	1277	1747	Geranial	191570	212570	Rosa

Continuación, **Tabla 15.**

20	1337	1898	N.I.	-	1210	
21	1348		Nerolato de etilo	-	2730	
22	1348	1948	Piperitenona	2125	-	
23	1358	1735	Acetato de nerilo	3310	3110	
24	1374	2046	N.I.	1340	2300	
25	1379	1764	Acetato de geranilo	45610	26780	
26	1390	1428	β -Bourboneno	-	1100	Herbáceo
27	1391	1599	Isómero de β -Elemeno	1300	-	
28	1398	1599	β -Elemeno	16800	14340	Herbáceo, fresco
29	1436	1612	<i>trans</i> - β -Cariofileno	46620	42800	A madera
30	1497	1602	α -Guaieno	6930	7290	A madera
31	1456	1671	<i>trans</i> - β -Fameseno	3560	2350	Cítrico, verde
32	1471	1686	α -Humuleno	14610	13380	
33	1475	1662	<i>allo</i> -Aromadendreno	-	760	
34	1495	1726	Biciclosesquifelandreno	18120	14430	
35	1507	1817	Isobutanoato de geranilo	-	4250	
36	1507	1817	Isobutanoato de geranilo + Bicyclgermacreno	4030	-	
37	1513	1731	α -Bulneseno	5230	4450	
38	1546	1685	Sesquiterpenoide, C ₁₅ H ₂₆ O	-	7900	
39	1547	1783	<i>trans</i> - γ -Bisaboleno	7700	-	
40	1567	2044	<i>trans</i> -Nerolidol	-	1880	
41	1585	1913	Globulol	-	920	Ligeramente dulce
42	1599	2014	Óxido de cariofileno	7430	16950	
43	1628	2071	Epóxido de humuleno II	1140	2660	
44	1648	2314	<i>trans</i> -Asarona	920	1160	
45	1670	1949	N.I.	-	1270	
46	2116	2313	Terpenoide, C ₁₉ H ₂₆ O ₂	1520	-	

^a Índices de Kováts determinados experimentalmente

^b Promedio de tres extracciones independientes, n=3

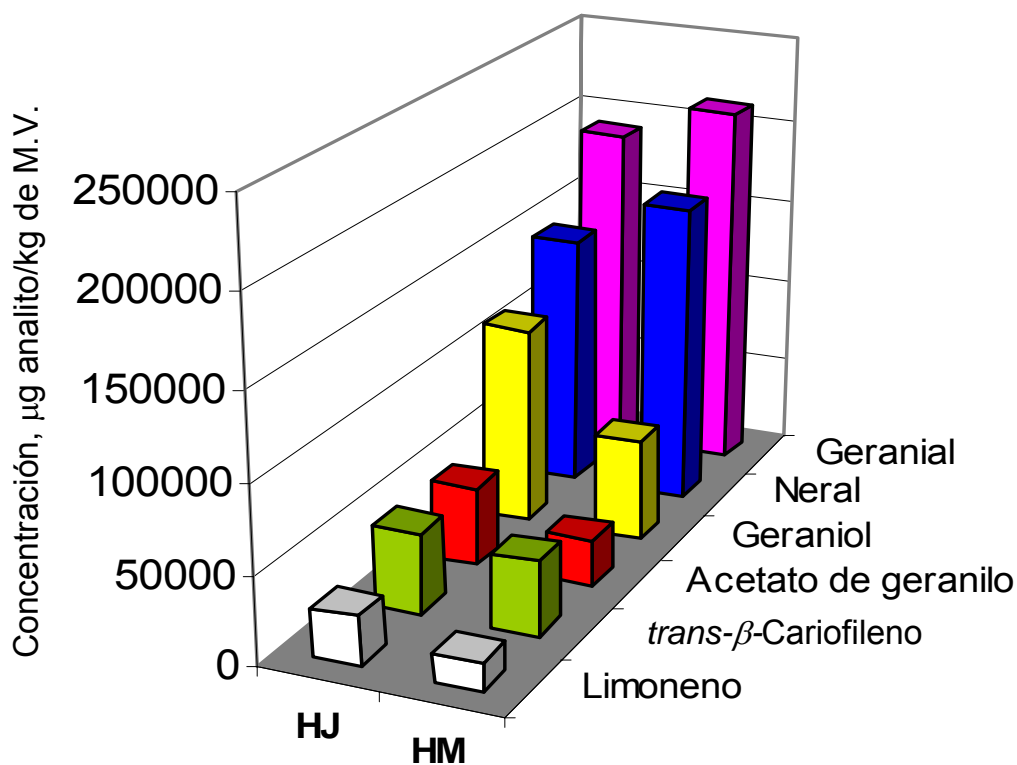
^c [58, 60, 121]

N.I. No identificado

La composición química de los aceites esenciales obtenidos de hojas jóvenes y maduras presentó una variación tanto cualitativa como cuantitativa. En hojas jóvenes se encontró una mayor acumulación de monoterpenos oxigenados, *e.g.* (3Z)-acetato de hexenilo, *epi*-fotocitral A y citronelal, y de sesquiterpenos, *e.g.* biciclosesquifelandreno. Por otra parte, en hojas maduras se observó una mayor concentración de sesquiterpenos oxigenados, *i.e.* C₁₅H₂₆O, y *trans*-nerolidol.

Los principales metabolitos secundarios volátiles identificados tanto en hojas jóvenes como en maduras, fueron: geranial (23-28%), neral (19-22%), geraniol (9-13%), acetato de geranilo (3-5%), *trans*- β -cariofileno (5-6%) y limoneno (2-3%). Los dos primeros fueron los principales constituyentes de las hojas maduras, mientras que los cuatro últimos se presentaron en mayor concentración en hojas jóvenes. En la **Figura 21**, se observan los principales metabolitos presentes en hojas jóvenes y maduras del aceite esencial de *L. alba* (quimiotipo Citral).

Figura 21. Principales compuestos presentes en los AEs de *Lippia alba*, obtenidos por MWH, de hojas jóvenes (**HJ**) y maduras (**HM**), quimiotipo Citral.



En la **Figura 21** se observa que los aceites esenciales de *Lippia alba*, obtenidos de hojas jóvenes y maduras, contienen los componentes principales en concentraciones diferentes. Se encontró, que el AE extraído de hojas jóvenes presentó una mayor concentración de geraniol (114500 µg/kg de M.V.), acetato de geranilo (45610 µg/kg de M.V.), *trans*-β-cariofileno (46620 µg/kg de M.V.) y limoneno (28320 µg/kg de M.V.), mientras que el geranial (212570 µg/kg de M.V.) y neral (173420 µg/kg de M.V.), (citral) se hallaron en mayor cantidad en el AE obtenido de hojas maduras. Estos resultados indican que si se desea obtener el AE con mayor concentración de citral (neral + geranial), compuesto de interés en la industria farmacéutica, de fragancias y sabores [66], es necesario, que las hojas de la planta alcancen cierta madurez, para lograr así una mayor acumulación de citral.

Al comparar los resultados obtenidos de los AEs extraídos de hojas jóvenes y maduras para los dos quimiotipos analizados, se observó que el rendimiento de AE fue mayor al emplear hojas jóvenes (Véase **Tabla 13**). Sin embargo, esto no mostró una relación directa con la concentración de los metabolitos de interés, tales como la carvona y el citral. Particularmente, el AE extraído de *Lippia alba*, quimiotipo Carvona, no exhibió una diferencia marcada entre la concentración de este analito al variar la edad de las hojas. Por el contrario, el AE correspondiente al quimiotipo Citral presentó una mayor concentración de este metabolito en hojas maduras, donde el rendimiento fue menor. Para este último caso, es recomendable realizar la recolección del material vegetal una vez la planta haya alcanzado un nivel de maduración apropiado, es decir, aproximadamente 2 meses después de su siembra.

La variabilidad en la concentración de los principales metabolitos volátiles, en los dos quimiotipos analizados de *Lippia alba*, se debe, posiblemente, a dos factores, a saber: genético y biológico. Para el primer caso, la expresión de los genes se ve afectada por la edad de las hojas; para el quimiotipo Citral, el gen que codifica la

enzima encargada de sintetizar el citral, se expresa con mayor pronunciación en las hojas maduras. Por el contrario, en el quimiotipo Carvona, la expresión del gen que sintetiza este compuesto, se mantiene aproximadamente constante durante el desarrollo de la planta. Biológicamente, los metabolitos que sintetizan las plantas, pueden ser utilizados, liberados o almacenados; particularmente, la especie *Lippia alba*, caracterizada por el alto contenido de citral, al parecer, tiende a almacenar este metabolito a lo largo de su desarrollo; mientras que la especie rica en carvona, al mismo tiempo que sintetiza este compuesto, lo emplea para su desarrollo metabólico [4, 94, 113]. Lo anterior se ve reflejado en los resultados reportados en las **Tablas 14 y 15**.

Por otra parte, se encontró que para los dos quimiotipos de la especie *Lippia alba*, se hallaron metabolitos comunes, a saber: α -pineno, limoneno, biciclosesquifelandreno y bicilogermacreno, entre otros. Esto se debe a que la combinación de los metabolitos secundarios en las plantas de géneros afines, pueden contener los mismos compuestos volátiles [4]. Sin embargo, la variabilidad en las cantidades de cada uno de estos compuestos se puede explicar, probablemente, porque a nivel del organismo individual, las cantidades de productos del metabolismo secundario varían con la edad de la planta (en las mismas condiciones de cultivo y crecimiento).

3.2.3 Relación estructura-olor

Para que un compuesto emita un olor detectable, se requiere que éste sea volátil a temperatura ambiente, propiedad que presentan los terpenos, los cuales se caracterizan por emanar fragancias particulares y generalmente agradables, razón por la cual son apetecidos y aprovechados en las industrias de fragancias y cosméticos [93, 116].

En las últimas seis décadas se han adelantado investigaciones con el propósito de establecer una relación entre el olor de los compuestos y su estructura. Sin embargo, esto no ha sido una tarea fácil, ya que las teorías propuestas sobre esta relación generan controversia y, además, se ha encontrado que moléculas de diferentes estructuras pueden presentar olores similares, un ejemplo es el sabor amargo de almendra, el cual está constituido por más de 75 moléculas, todas ellas de diferente estructura. Así mismo, se ha observado que pequeños cambios en la estructura de una molécula pueden generar un completo cambio en su olor, tal es el caso de los isómeros R- y S-carvona, los cuales presentan olores diferentes [115, 116, 121]. Además, la presencia de ciertos grupos funcionales como aldehídos, carbonilos, ésteres y éteres se relacionan frecuentemente con un particular olor [12, 27, 115], como se observa en los terpenos identificados en las esencias extraídas de *Lippia alba* (Véase **Tablas 14 y 15**).

3.3 EXTRACCIÓN DE AEs DE *Lippia alba* MEDIANTE DESTILACIÓN VAPOR/AGUA

Las plantas aromáticas son fuente de aceites esenciales, productos de alto valor agregado, empleados diariamente como aditivos alimenticios, agentes del “flavour”, fragancias, en industria farmacéutica, como colorantes, entre otros. El uso de estas plantas, a lo largo de la historia, ha conducido a la búsqueda de métodos de extracción de aceites esenciales que ofrezcan ventajas en cuanto a la eficiencia de extracción y calidad del aceite obtenido [69]. Por esta razón, en esta sección del proyecto, se evaluó la influencia del material de fabricación de dos destiladores semi-industriales, *i.e.* cobre y acero inoxidable, en la composición química de los AEs extraídos de hojas de *Lippia alba*. Para esto, se siguieron los procedimientos descritos en las **Secciones 2.3.2 y 2.5** de la Parte Experimental.

En la **Tabla 16** se presentan los tiempos de extracción y rendimientos obtenidos para cada una de las extracciones realizadas, empleando destiladores semi-

industriales de diferente material, y para MWHD, usada como el patrón de referencia.

Tabla 16. Tiempos de extracción y rendimientos de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo Carvona, empleando MWHD y destiladores fabricados en diferente material.

Material del destilador	Tiempo de extracción (min)	Rendimiento, % p/p
MWHD	40	0.85 ± 0.01
Destilador de cobre	160	0.56 ± 0.08
Destilador de acero inoxidable	160	0.52 ± 0.05

El mayor rendimiento se alcanzó con la técnica de MWHD. Este método presenta ventajas destacables en comparación con la destilación por arrastre con vapor o vapor/agua, en cuanto a disminución de tiempo y uso de solvente (agua), calentamiento efectivo y tamaño de equipo reducido [28, 69]. Sin embargo, la destilación vapor/agua es un método sencillo, reproducible, económico y sobre todo, ampliamente utilizado en la industria [17, 72].

En la **Figura 22** se observa el perfil cromatográfico obtenido del AE de *Lippia alba*, quimiotipo Carvona, extraído por destilación vapor/agua. La identificación de los compuestos y sus concentraciones (μg de analito/kg de M.V.) determinadas utilizando estandarización interna, junto con los índices de retención se reportan en la **Tabla 17**.

Figura 22. Perfil cromatográfico típico del AE de *Lippia alba*, aislado por destilación vapor/agua (destilador de acero inoxidable). Columna DB-5MS (60 m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los picos se reporta en la **Tabla 17**.

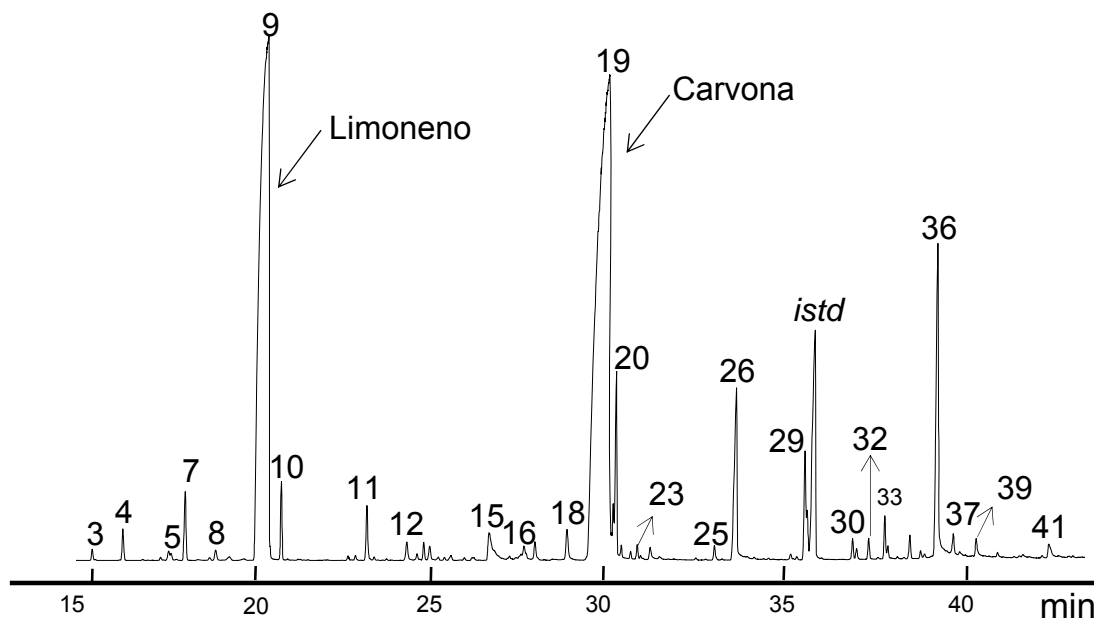


Tabla 17. Concentración (μ de analito/kg de M.V.) de los principales componentes de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo Carvona, obtenidos por MWHD y destilación vapor/agua, usando destiladores de cobre y acero inoxidable.

N° Pico Fig. 22	Compuesto	I_k^a		Concentración (μ g/kg de M.V.) ^b , Material del destilador		
		DB-5MS	DB-WAX	MWHD	Acero inoxidable	Cobre
1	(2E)-Hexenal + (3z)-Hexenal			2060	-	-
2	Acetato de 2-metilbutilo	881	1122	-	-	350
3	α -Pinenos + Tiglatos de etilo	939	1019	1280	2000	1890
4	Canfeno	954	1062	4260	4900	4840
5	β -Pinenos	979	1105	-	1470	-
6	Sabineno	975	1119	-	-	470
7	β -Miraceno	991	1164	10880	12180	11790
8	Verbeneno	1009	1681	1720	1990	2030
9	Limoneno + β -Felandreno	1041	1202	416080	448610	437420
10	<i>trans</i> - β -Ocimeno	1049	1252	9930	11360	10660
11	Linalool	1101	1550	6750	8170	8680
12	<i>trans-p</i> -Menta-2,8-dien-1-ol	1127	1637	4130	3550	3650
13	<i>cis</i> -Óxido de limoneno	1139	1453	1820	2030	2190

Continuación. **Tabla 17.**

14	<i>cis-p</i> -Menta-2,8-dien-1-ol	1143	1948	2800	2550	2850
15	Borneol	1181	1716	10360	11060	12480
16	<i>cis</i> -Dihidrocarvona	1204	1621	3640	4900	5430
17	<i>trans</i> -Dihidrocarvona	1212	1641	1890	4070	3280
18	<i>trans</i> -Carveol	1233	1845	6970	7080	6400
19	Carvona	1263	1756	518169	537910	539170
20	Piperitona	1268	1746	38230	35840	35040
21	<i>cis</i> -Óxido de carvona	1272	1812	3120	2690	2870
22	Isopiperitenona	1279	1860	2030	1280	1360
23	<i>trans</i> -Óxido de carvona	1284	1851	2660	1890	2140
24	Timol	1293	2287	2340	3390	2410
25	<i>trans</i> -Acetato de carvilo	1336	1965	1940	2270	2240
26	Piperitenona	1343	1948	60280	48970	43440
27	α -Copaeno	1387	1399	1520	-	-
28	β -Elemeno	1396	1599	-	-	27170
29	β -Bourboneno	1396	1529	34910	30820	-
30	β -Cedreno	1434	1583	4850	4090	3500
31	<i>trans</i> - β -Cariofileno	1437	1610	2550	2220	2050
32	β -Gurjuneno	1447	1447	4630	3950	3370
33	<i>trans</i> - β -Farneseno	1460	1671	9970	8660	-
34	<i>allo</i> -Aromadendreno	1462	1662	3040	2390	-
35	α -Guaieno	1480	1662	5760	4820	3640
36	Germacreno D	1489	1655	1800	1540	-
37	Biciclosesquifelandreno	1496	1728	126460	102720	82160
38	Biciclogermacreno	1509	1708	4880	7880	5600
39	γ -Cadineno	1515	1671	2920	2790	1400
40	Cubebol	1528	1955	5480	6490	3350
41	Germacreno D-4-ol	1590	2069	3380	3550	2850
42	Kusinol*	1702	2231	-	1860	1670
Familias de compuestos (%)						
	M: Monoterpenos			52	50	47
	M.O: Monoterpenos oxigenados			31	31	30
	S: Sesquiterpenos			13	12	13
	S.O: Sesquiterpenos oxigenados			3	3	2
	Otros			1	1	1

^a Índices de Kovàts determinados experimentalmente

^b Promedio de dos extracciones independientes; n=2

* Identificado tentativamente

En general, los metabolitos secundarios volátiles identificados en los AEs de *Lippia alba*, empleando los diferentes materiales de destilación, fueron los mismos, entre los principales se destacan: carvona, limoneno, biciclosesquifelandreno, piperitenona y piperitona. La concentración de estos compuestos se vio influenciada por el material de destilación empleado; la carvona (539170 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de

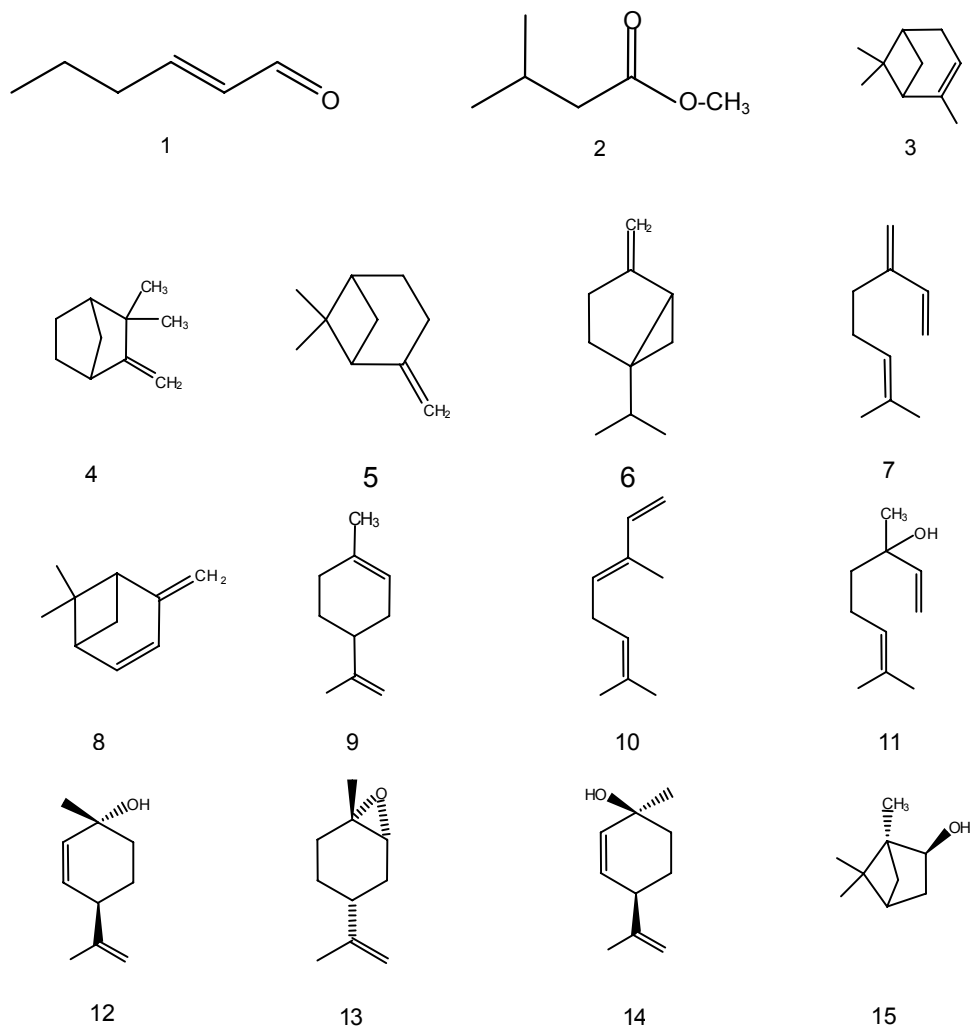
M.V.) se obtuvo en mayor concentración al emplear el destilador de cobre; el limoneno (448610 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de M.V.) se encontró en mayor cantidad al emplear el destilador de acero inoxidable, mientras que la piperitenona (60280 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de M.V.), el biciclosesquifelandreno (126460 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de M.V.), la piperitona (38230 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de M.V.) y demás sesquiterpenos, se hallaron en cantidades mayores empleando MWHD.

Estas diferencias fueron producidas, posiblemente, por dos factores. El primero está relacionado con el calentamiento del material vegetal. Al comparar los resultados obtenidos por MWHD y destilación vapor/agua, se observa que para MWHD se alcanza mayor rendimiento (0.85% p/p) debido, probablemente, a que la energía suministrada al material vegetal por la radiación de microondas es mayor en comparación con la generada en los destiladores. Esto también explica el alto contenido de sesquiterpenos obtenidos mediante esta técnica, respecto a la destilación vapor/agua (**Tabla 17**).

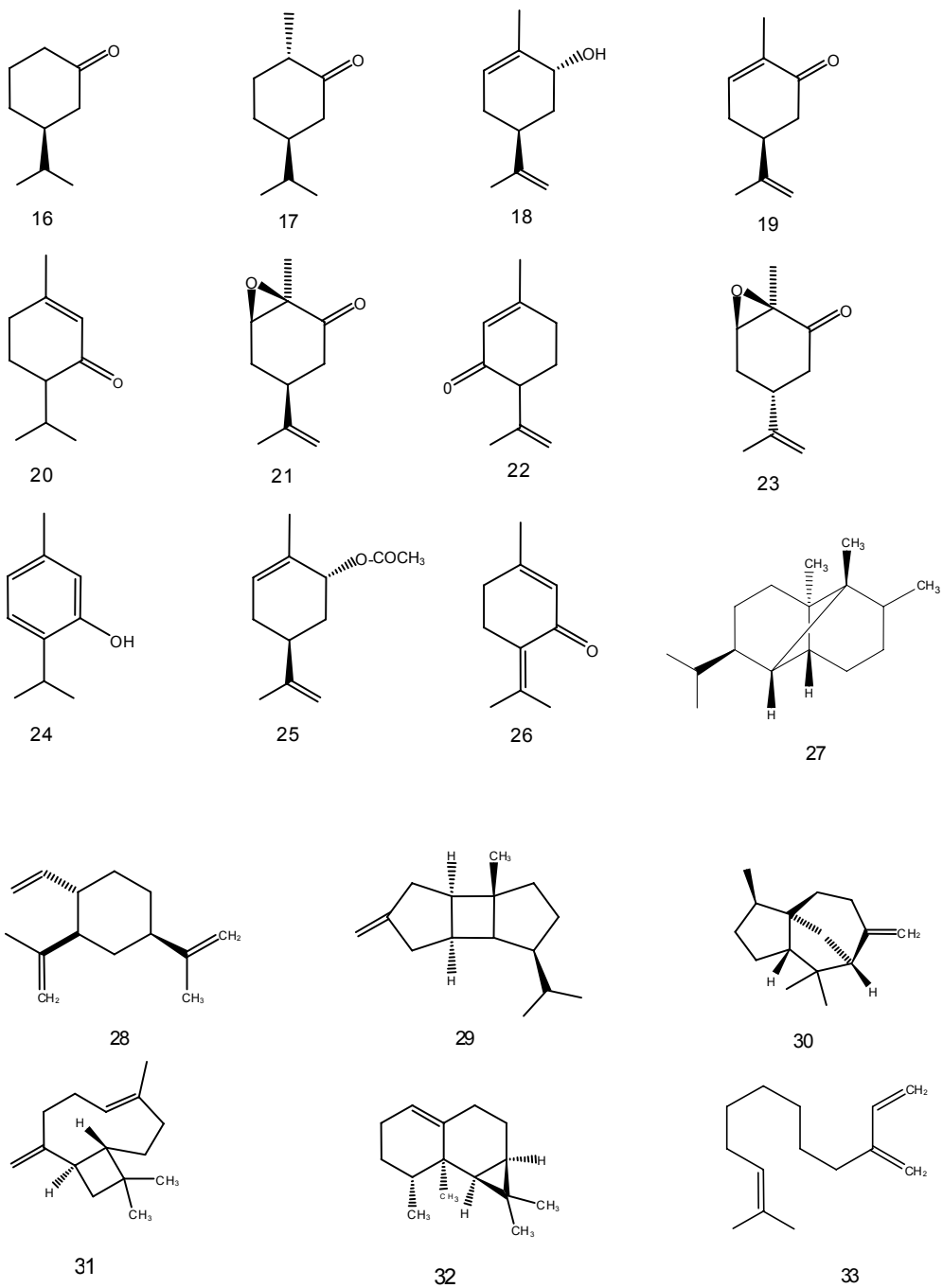
El segundo factor está dado por el sistema de refrigeración utilizado en cada equipo de destilación. Los destiladores semi-industriales presentan el mismo diseño (condensador de espiras), variando únicamente el material de fabricación. En este sentido, la conductividad térmica de los metales (cobre 401 $\text{J}/\text{m}\cdot\text{s}^\circ\text{C}$, acero 79.5 $\text{J}/\text{m}\cdot\text{s}^\circ\text{C}$) [65] juega un rol importante en la condensación de los metabolitos volátiles, puesto que gracias a que el cobre es un mejor conductor térmico, favorece la refrigeración, en comparación con el destilador de acero inoxidable, aspecto que se ve reflejado en los rendimientos obtenidos (**Tabla 16**).

En la **Figura 23** se observan las estructuras químicas de los metabolitos secundarios volátiles presentes en los AEs aislados, empleando los diferentes materiales de destilación.

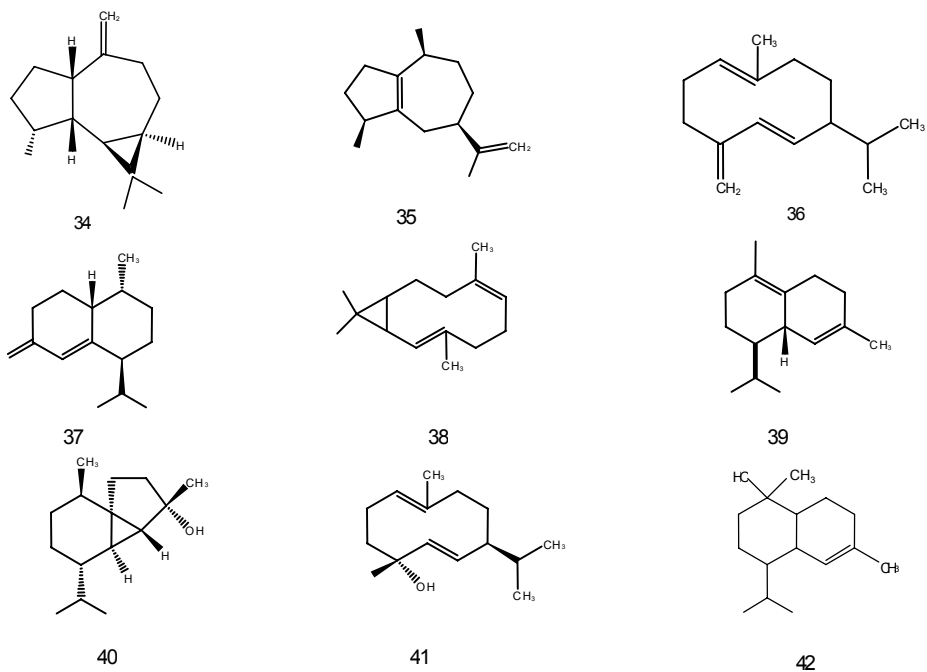
Figura 23. Estructuras químicas de los metabolitos secundarios volátiles extraídos de *L. alba*, quimiotipo Carvona. Los nombres químicos, según el número de pico, aparecen en la **Tabla 17**.



Continuación, **Figura 23.**

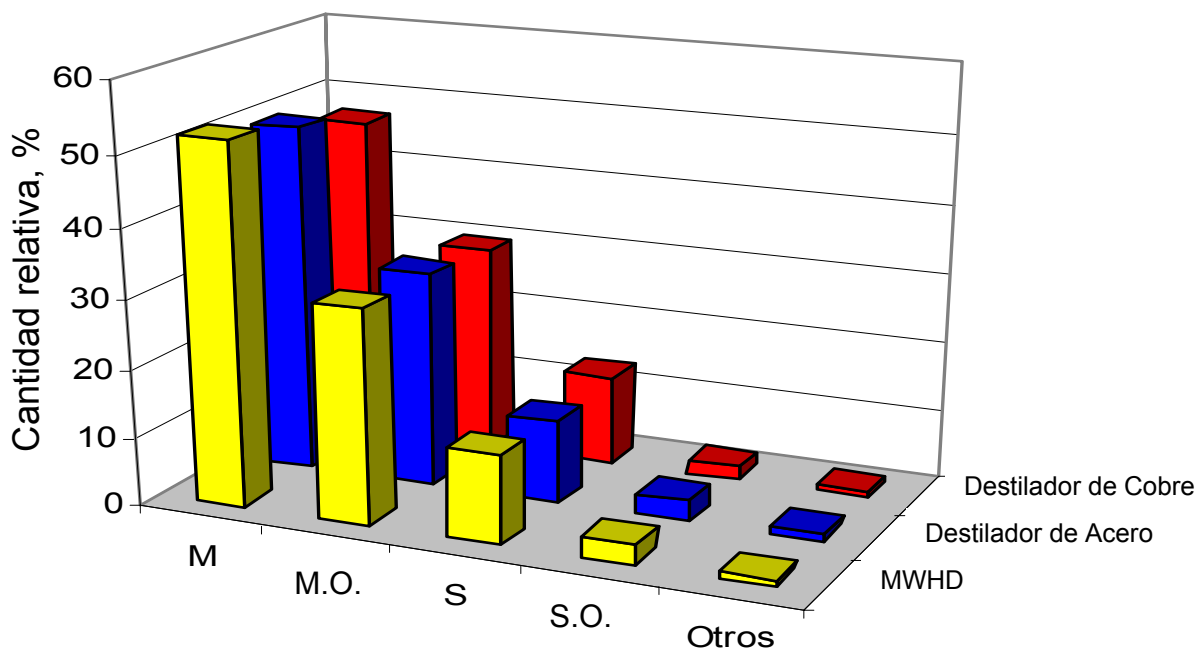


Continuación, **Figura 23.**



En la **Figura 24** se observan las principales familias de compuestos en cada uno de los aceites esenciales extraídos, a saber: M: Hidrocarburos monoterpénicos, M.O: Monoterpenos oxigenados, S: Hidrocarburos sesquiterpénicos y S.O: Sesquiterpenos oxigenados.

Figura 24. Distribución de las principales familias de los compuestos en los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo Carvona, obtenidos por MWHD, y en destiladores fabricados en cobre y en acero inoxidable.



De la **Figura 24** se observa que, en general, las familias de compuestos identificados en los AEs extraídos, empleando los diferentes materiales en destiladores, fueron similares, presentándose mayor contenido de hidrocarburos monoterpénicos (52%) al emplear MWHD. Los monoterpenos y sesquiterpenos oxigenados se presentaron en igual proporción (31% y 3%, respectivamente) en MWHD y usando el destilador de acero. Por el contrario, el porcentaje de hidrocarburos sesquiterpénicos (13%) en MWHD y usando el destilador de cobre fue el mismo.

3.3.1 Análisis organoléptico y determinación de las constantes físicas de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo Carvona

Para la aplicación industrial de los aceites esenciales y determinación de su calidad, es necesario conocer tanto su composición química, como las características fisicoquímicas y organolépticas, parámetros imprescindibles para la elaboración de fichas técnicas.

En el ámbito industrial se requiere que los métodos empleados para la obtención de los AEs sean eficientes, pero más importante aún, que éstos proporcionen esencias de buena calidad. En el control de calidad de los AEs por parte de la industria de fragancias y sabores, la evaluación organoléptica es prioritaria y excluyente, pues está justamente evaluando las propiedades por las que es utilizada dicha esencia [8]. La destilación vapor/agua es uno de los métodos más utilizados porque permite obtener AEs con buen rendimiento; sin embargo, la calidad de estos AEs debe verificarse. Por tanto, fueron determinadas tanto las constantes físicas como las propiedades organolépticas de los AEs de *Lippia alba*, obtenidos empleando MWHD y los destiladores semi-industriales.

Tomando como referencia el AE de *Lippia alba*, quimiotipo Carvona, extraído por MWHD, el cual presentó una ligera coloración amarilla y un olor intenso y penetrante, se realizó el análisis organoléptico a los AEs obtenidos por destilación vapor/agua en los dos destiladores semi-industriales. El AE aislado empleando el destilador de acero inoxidable presentó también un color ligeramente amarillo y un olor más suave, comparado con el obtenido por MWHD. Por su parte, el AE aislado en el destilador de cobre, exhibió un color amarillo más suave con relación al de MWHD y un olor semejante a los dos anteriores, dejando un olor un poco desagradable.

En la **Tabla 18** se registran las propiedades físicas de los AEs extraídos de hojas de *Lippia alba*, empleando los diferentes materiales de destilación.

Tabla 18. Propiedades físicas de los AEs extraídos de hojas de *Lippia alba*, quimiotipo Carvona

Propiedad física	Método		
	MWHD	Vapor/agua	
	Material de destiladores		
	Vidrio	Acero	Cobre
Densidad (g/mL)	0.88 ± 0.02	0.90 ± 0.02	0.87 ± 0.01
Índice de refracción (19.4°C)	1.4960 ± 0.0009	1.4960 ± 0.0004	1.4970 ± 0.0004
Solubilidad* (Etanol, % v/v)			
20	0.03	0.03	0.03
40	0.03	0.03	0.03
60	0.04	0.03	0.03
80	0.04	0.04	0.06

* mL de AE/mL de solución.

El AE de *Lippia alba* se caracteriza por presentar densidades comprendidas entre 0.88-0.90 g/mL, e índices de refracción entre 1.48–1.50 [89, 90]. De acuerdo con los resultados de la tabla anterior, los AEs extraídos empleando los diferentes destiladores coinciden con los reportados en la literatura [89, 90]. Estos resultados indican la presencia de monoterpenos, alcoholes y cetonas en los AEs [22]. Sin embargo, las pequeñas diferencias entre los valores de densidad se deben a las variaciones cuantitativas encontradas en los AEs por efecto del material de los destiladores, mencionado en la **Sección 3.3**.

La determinación de la solubilidad es un parámetro importante si se considera que el AE es extraído con el objeto de ser aplicado en la industria de perfumes, en la cual, generalmente, el etanol es el solvente más utilizado. Los datos reportados en la **Tabla 18** indican que el AE de *Lippia alba* es poco soluble en etanol, esto se

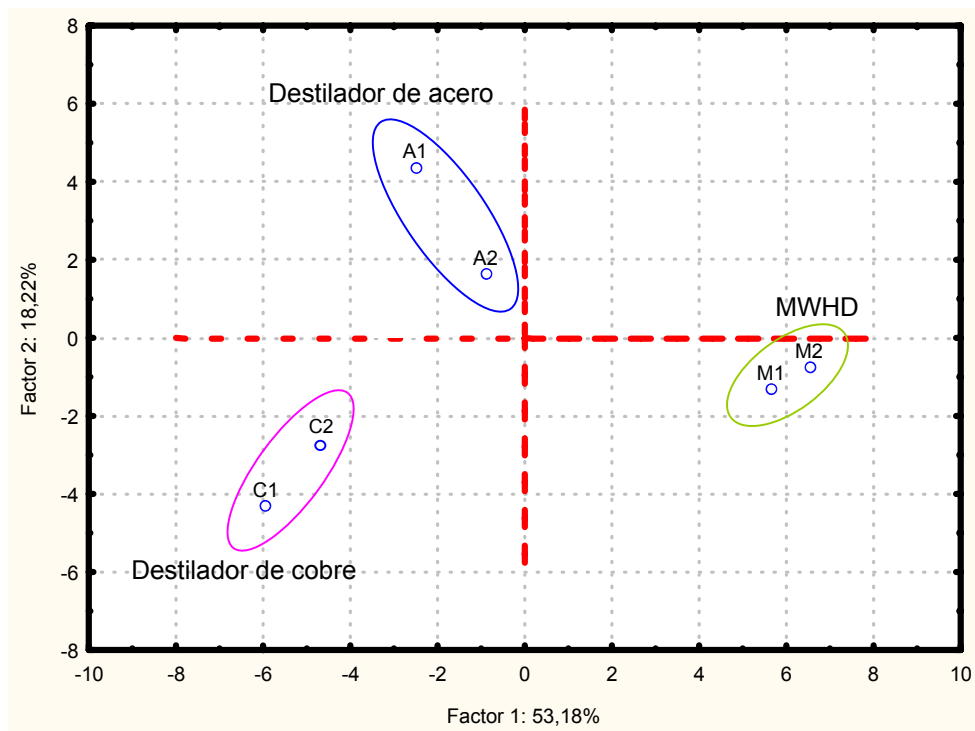
debe al alto contenido de compuestos apolares como los hidrocarburos mono- y sesquiterpénicos, los cuales predominan en el AE de *Lippia alba*.

Los resultados correspondientes a la determinación de propiedades físicoquímicas de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo Carvona, indican que el material de los destiladores empleados no ejerce una influencia notoria sobre éstas. Sin embargo, si se observa un cambio en las características organolépticas de los AEs, principalmente, al emplear el destilador de cobre. Esto se explica, probablemente, por la disminución en el contenido de monoterpenos oxigenados (30%) y sesquiterpenos oxigenados (2%), los cuales son los encargados de contribuir al olor fuerte y penetrante (Véase **Tabla 17**).

3.3.2 Análisis de componentes principales (PCA) de los AEs de *Lippia alba*, empleando diferentes materiales de destilación

Para apreciar de una forma más clara la influencia del material de destilación sobre la composición final de los AEs de *Lippia alba*, obtenidas empleando MWHD y los destiladores semi-industriales, se aplicó el análisis estadístico de componentes principales (PCA) de la misma forma que se llevó a cabo en la **Sección 3.1.3**. El análisis comparativo de las diferentes esencias de *L. alba* indica que el 71% de la información de la **Tabla 17**, puede ser representada por un subespacio de dos coordenadas (componentes principales), construido con base en las combinaciones lineales de las concentraciones (μg de analito/kg de M.V.) de los componentes presentes en los diferentes AEs, como se aprecia en la **Figura 25**. El *Factor 1* representa el 53% de la información y se encuentra representado por *cis*-dihidrocarvona, linalool, piperitona, piperitenona y *trans*- β -cariofileno. El *Factor 2* corresponde al 18% de la información y está conformado por *cis-p*-menta-2,8-dien-1-ol, β -pineno, timol, cubebol y germacreno-D-4-ol.

Figura 25. Análisis de componentes principales (PCA) de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo Carvona, aislados por MWHD y destilación vapor/agua empleando destiladores fabricados en diferentes materiales.



M1 y M2 réplicas de las extracciones por MWHD; A1 y A2 réplicas de las extracciones empleando el destilador de acero; C1 y C2 réplicas de las extracciones utilizando el destilador de cobre.

Como se puede observar en la **Figura 25**, la separación entre los conjuntos de puntos formados por las réplicas de extracción, correspondientes a los diferentes métodos, indican una diferencia en las concentraciones de los compuestos presentes en los diferentes AEs obtenidos mediante el uso de los destiladores semi-industriales y MWHD, debida posiblemente, al material de fabricación de los destiladores empleados.

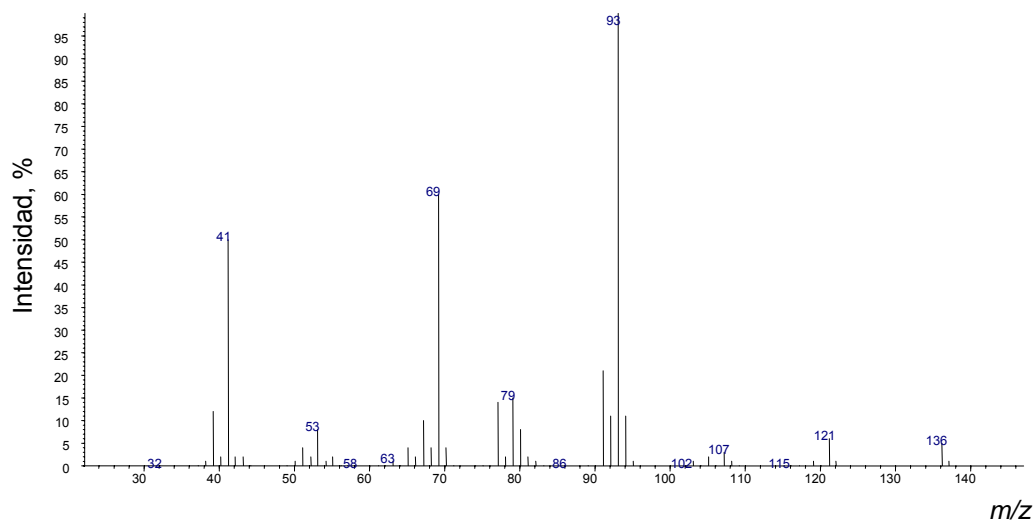
3.4 ANÁLISIS POR GC-MS DE LOS AEs DE *Lippia alba*

Los metabolitos aislados de hojas y tallos, de tres quimiotipos, a saber: carvona, citral y el quimiotipo híbrido (carvona + citral) de la especie *Lippia alba*, fueron identificados empleando los índices de retención de Kovàts. Para ello, se utilizaron sustancias patrón de hidrocarburos lineales (C₁₀ - C₂₅) y los espectros de masas (MS) obtenidos por impacto de electrones (70 eV), los cuales fueron comparados con los reportados en la literatura [1], y analizados “manualmente”.

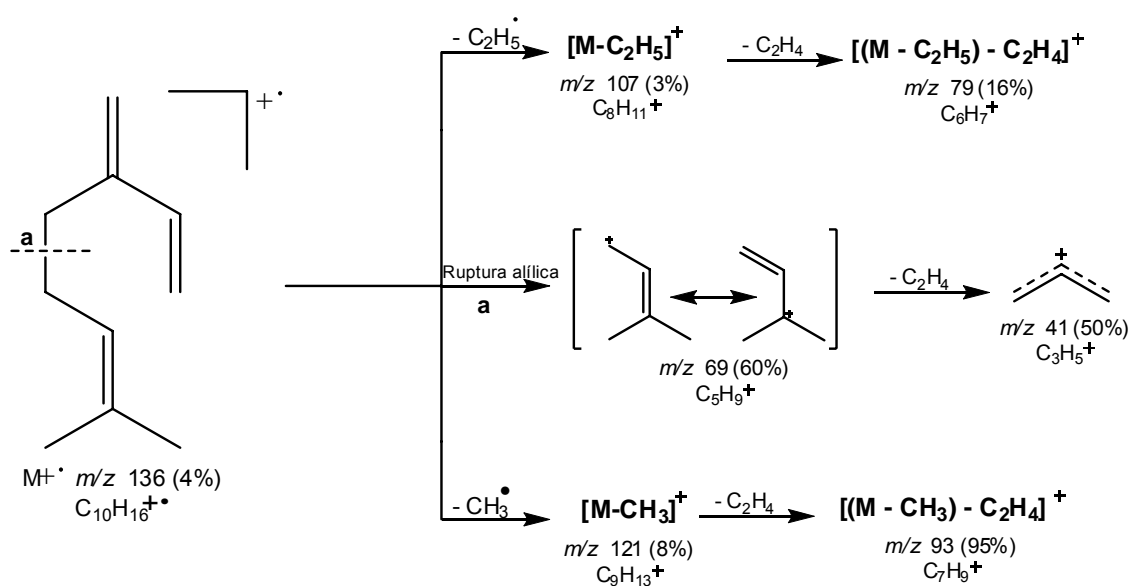
Los espectros de masas, obtenidos experimentalmente de cada compuesto presente en las mezclas, se compararon también con los de las bibliotecas, a saber: NBS 75K, WILEY 130K, NIST 2002 Y ADAMS. A continuación se presentan algunos espectros de masas típicos obtenidos experimentalmente, y su interpretación para los compuestos mayoritarios identificados en los AEs de *L. alba*.

- **β-Mirceno:** En la **Figura 26** se observa el espectro de masas del β-mirceno. Las rutas de la ionización disociativa por impacto de electrones a 70 eV, se muestran en el **Esquema 4**. El β-mirceno exhibe una fragmentación característica de monoterpenos. El ion molecular M⁺ (*m/z* 136) presenta una intensidad baja (4%). La fragmentación del β-mirceno conduce a la formación de iones característicos para monoterpenos, a saber: (M – CH₃)⁺ en *m/z* 121 con una intensidad baja (8%) y el fragmento (M – CH₃ – C₂H₄)⁺ en *m/z* 93, como el pico de base [8]. El ion *m/z* 69 (60%) se forma como resultado de una ruptura alílica a partir del M⁺; la posterior eliminación de una molécula de etileno a partir del fragmento *m/z* 69 conduce a la formación del ion alilo *m/z* 41 (50%). Los fragmentos de intensidad baja en *m/z* 107 y 79, provienen de la eliminación del radical C₂H₅[·] y de una molécula de etileno, respectivamente.

Figura 26. Espectro de masas del β -Mirceno.



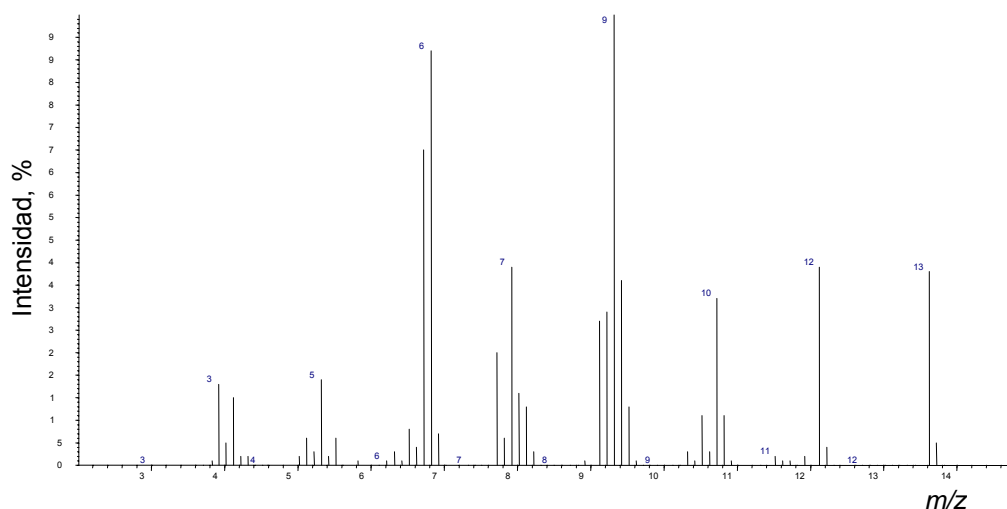
Esquema 4. Posibles rutas de fragmentación del β -Mirceno.



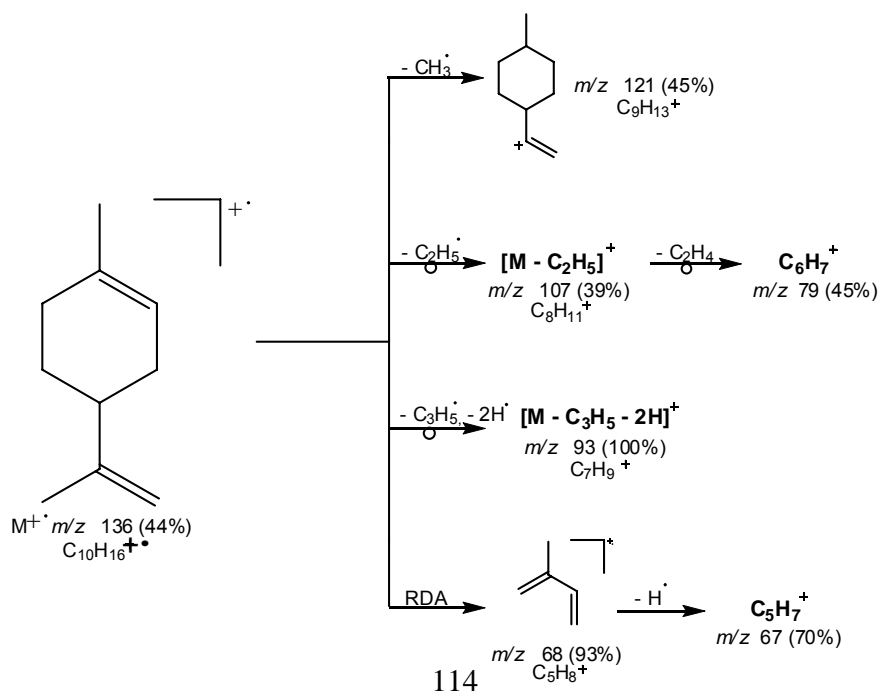
• **Limoneno:** El espectro de masas del limoneno, un monoterpene cíclico con dos dobles enlaces aislados, mayoritario en los aceites esenciales de cítricos [8], se muestra en la **Figura 27**. Las rutas de la ionización disociativa del limoneno se presentan en el **Esquema 5**. Se observa el ion molecular $M^{+\bullet}$ (m/z 136) con una intensidad media (44%). Su fragmentación se caracteriza por una ruptura tipo *retro Diels-Alder* (RDA), acompañada de la formación de un fragmento en m/z 68

(93%). Los iones $(M - \text{CH}_3)^+$ y $(M - \text{C}_3\text{H}_5 - 2\text{H})^+$ en m/z 121 (45%) y m/z 93 (100%), respectivamente, se producen a partir del ion $M^{+\bullet}$ por pérdida del radical $\text{CH}_3\dot{\text{C}}$ y del grupo isopropenílico, seguido de dos átomos de hidrógeno. Los iones de intensidad media en m/z 107 y m/z 79 provienen de la pérdida del radical $\text{C}_2\text{H}_5\dot{\text{C}}$ y de una molécula de etileno, respectivamente, a partir del ion molecular.

Figura 27. Espectro de masas del limoneno.

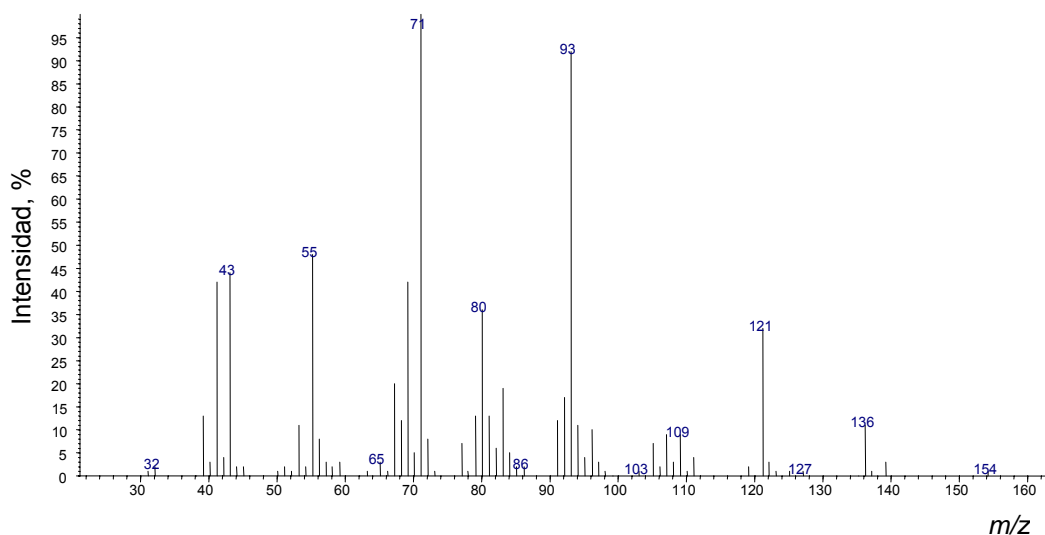


Esquema 5. Posibles rutas de fragmentación del limoneno.

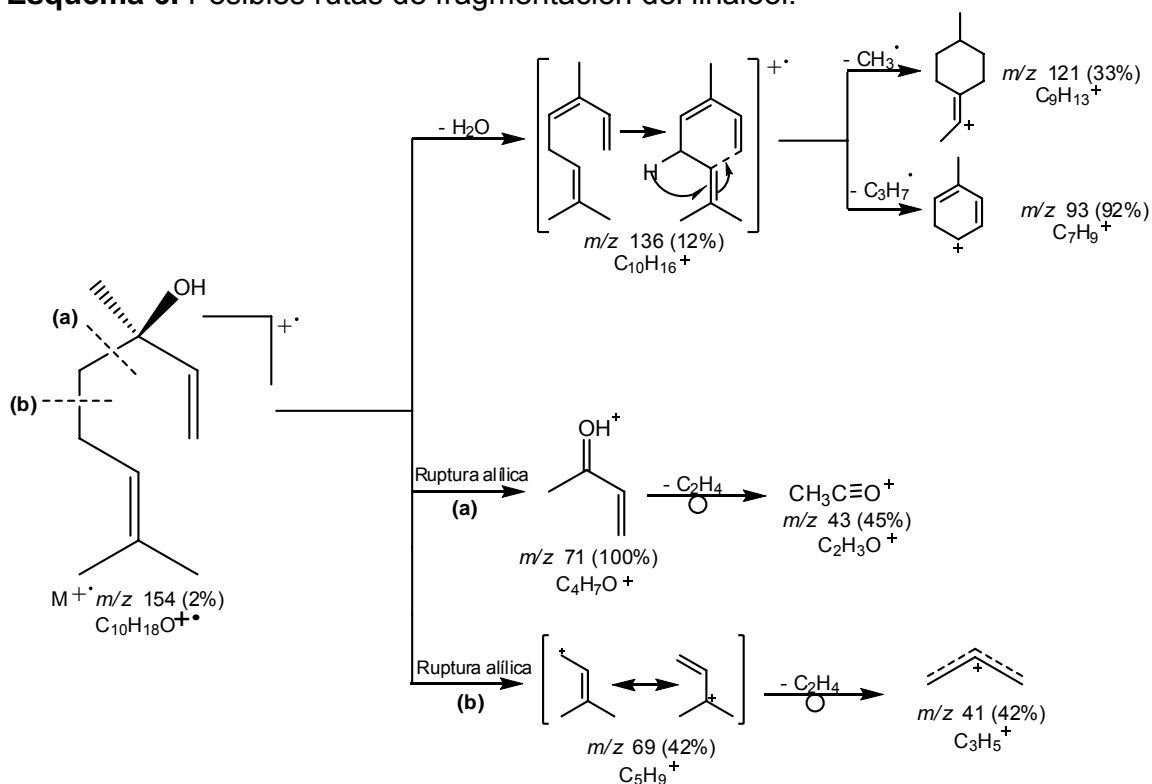


• **Linalool:** El espectro de masas del linalool se observa en la **Figura 28**, presenta el patrón de fragmentación típico de monoterpenoles. Las rutas de la ionización disociativa por impacto de electrones (70 eV) se observan en el **Esquema 6**. El ion molecular M^+ en m/z 154 muestra una intensidad baja (2%). Se presentan dos rupturas alílicas en el ion M^+ , **a** y **b**, que conducen a la formación de los fragmentos $C_4H_7O^+$ en m/z 71 (**a**), pico de base, y el ion $C_5H_9^+$ en m/z 69 (**b**). El ion 71, posteriormente, elimina una molécula de etileno conduciendo a la formación del ion CH_3CO^+ en m/z en 43 (45%), y el fragmento 69, también por pérdida de una molécula de C_2H_4 , forma el ion alílico $C_3H_5^+$ en m/z 41 (42%). Los iones $C_4H_7O^+$ (m/z 71), $C_5H_9^+$ (m/z 69), CH_3CO^+ (m/z 43) y $C_3H_5^+$ (m/z 41) constituyen los 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 [25].

Figura 28. Espectro de masas del linalool.

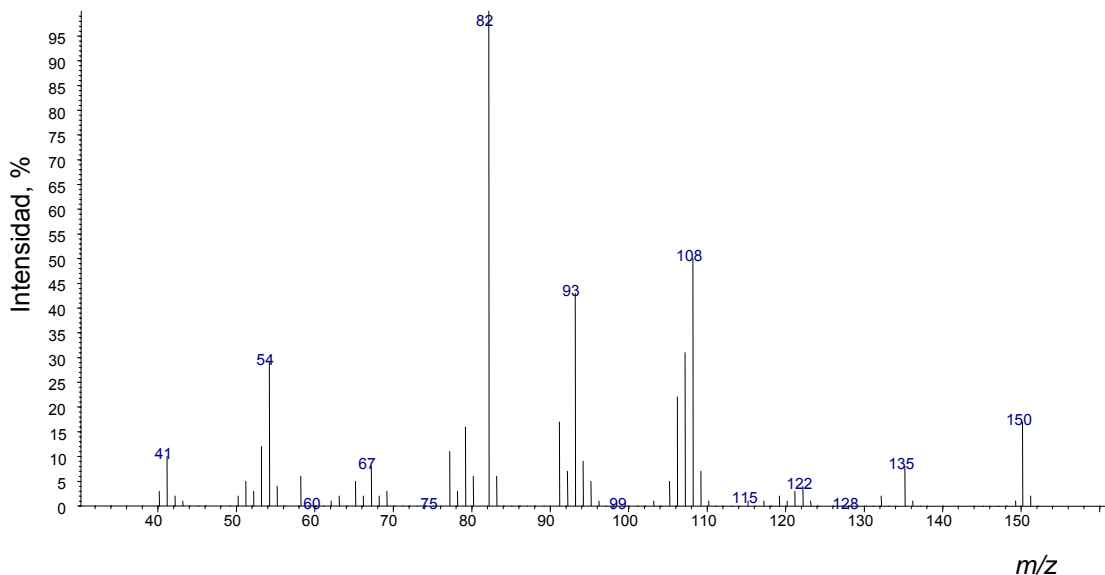


Esquema 6. Posibles rutas de fragmentación del linalool.

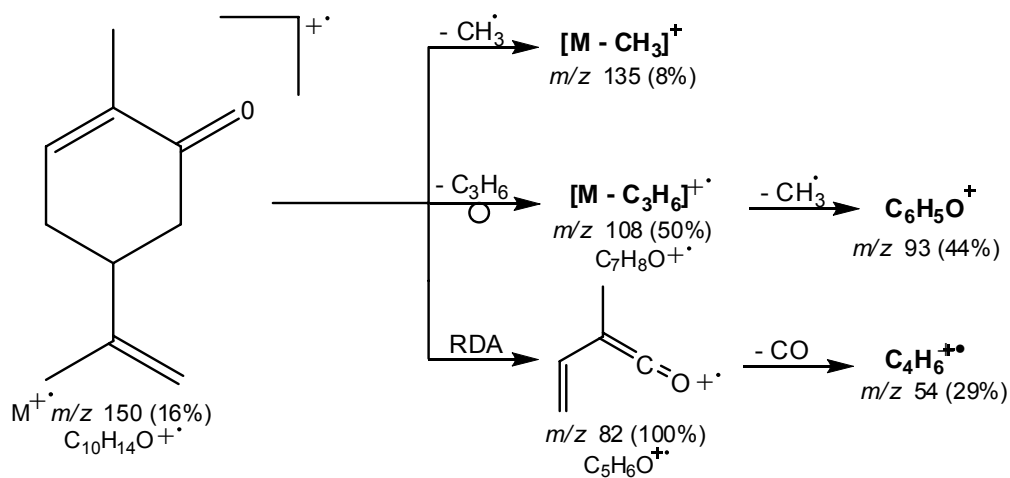


• **Carvona:** El espectro de masas de la carvona se presenta en la **Figura 29**. Las rutas de la ionización disociativa por impacto de electrones a 70 eV, se observan en el **Esquema 7**. Aparece en el espectro el $M^{+\bullet}$ en m/z 150, con una intensidad baja (19%), que sufre una ruptura tipo *retro Diels-Alder* (RDA), dando lugar a la formación del fragmento en m/z 82, el cual constituye el pico de base. Posteriormente, por pérdida de una molécula de CO, el ion $C_5H_6O^{+\bullet}$ (m/z 82) da origen al catión radical $C_4H_6^{+\bullet}$ en m/z 54 (29%). Otros fragmentos producidos a partir del ion $M^{+\bullet}$ son $(M-CH_3)^+$ en m/z 135 (9%) y $(M-C_3H_6)^+$ en m/z 108 (50%), los cuales se forman por pérdida del radical CH_3^{\bullet} y de una molécula de propeno, respectivamente. Por eliminación de un radical CH_3^{\bullet} a partir del fragmento $(M-C_3H_6)^+$, se origina el fragmento $C_6H_5O^+$ en m/z 93 (44%).

Figura 29. Espectro de masas de la carvona.



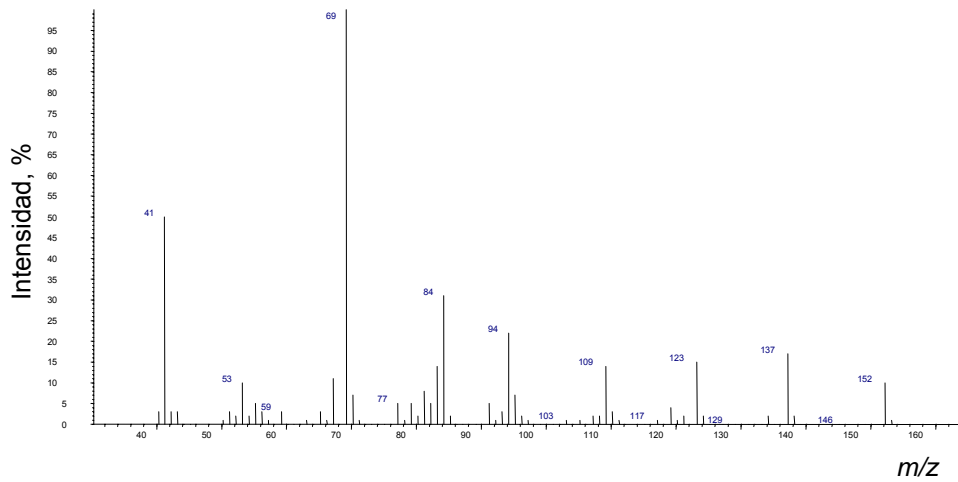
Esquema 7. Posibles rutas de fragmentación de la carvona.



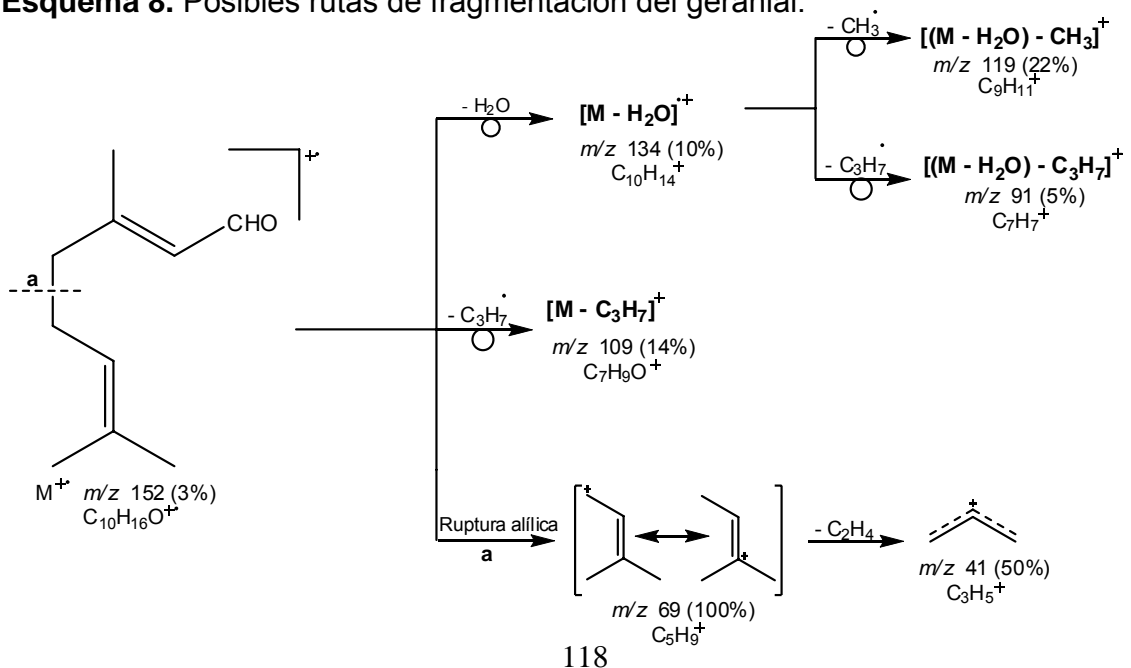
• **Geranial:** El espectro de masas del geranial, un aldehído monoterpénico acíclico, se presenta en la **Figura 30**. Las rutas de la ionización disociativa por impacto de electrones a 70 eV, se observan en el **Esquema 8**. Presenta el M^+ en m/z 152 con una intensidad baja (3%), que por pérdida de agua genera el fragmento en m/z 134 (10%), el cual, en su turno, por eliminación de los radicales

$\text{CH}_3\cdot$ y $\text{C}_3\text{H}_7\cdot$ genera los cationes $[(\text{M}-\text{H}_2\text{O})-\text{CH}_3]^+$ y $[(\text{M}-\text{H}_2\text{O})-\text{C}_3\text{H}_7]^+$ en m/z 119 y m/z 91, respectivamente. El ion molecular del geranial sufre una ruptura alílica, originando un fragmento hidrocarbonato en m/z 69, el cual constituye el ion pico de base, que, posteriormente, elimina una molécula de etileno (C_2H_4) para generar el fragmento alílico en m/z 41 con una intensidad de 50%. El ion de intensidad baja en m/z 109 (14%) se genera por pérdida del radical $\text{C}_3\text{H}_7\cdot$ a partir del M^+ .

Figura 30. Espectro de masas del geranial.

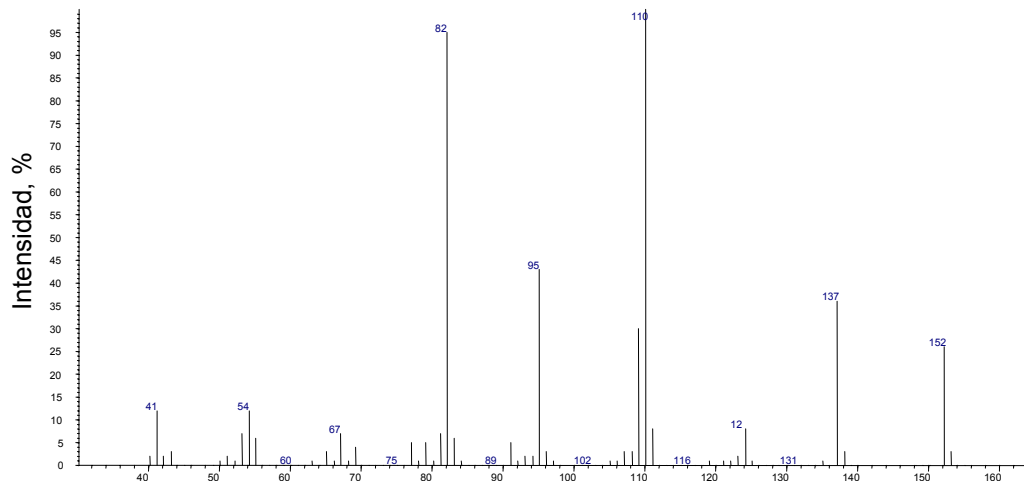


Esquema 8. Posibles rutas de fragmentación del geranial.

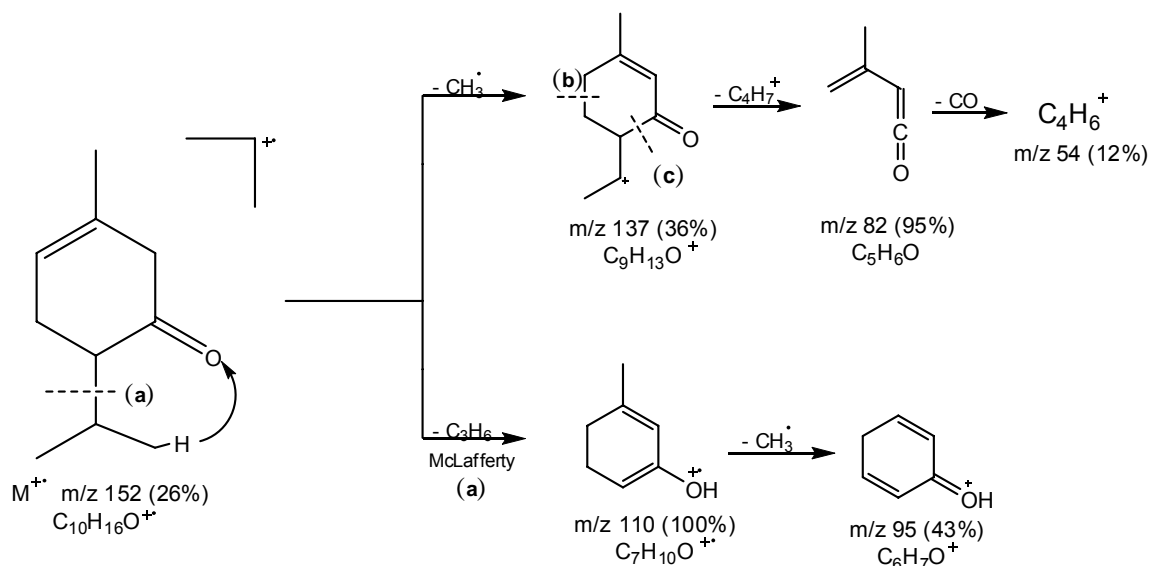


• **Piperitona:** El espectro de masas de la piperitona, una cetona terpenoide, se observa en la **Figura 31**. En el **Esquema 9** se presentan las rutas de su ionización disociativa por impacto de electrones, a 70 eV. La piperitona exhibe una ruta de fragmentación muy similar a la de la carvona (Véase **Esquema 7**). El ion molecular M^+ de la piperitona en m/z 152 (26%), presenta una ruptura *retro Diels-Alder* (RDA), dando origen a la formación del fragmento en m/z 82 (95%), el cual, posteriormente por eliminación de una molécula de CO, genera el fragmento $C_4H_6^+$ en m/z 54 (12%). A partir del ion molecular M^+ , también, se generan los iones $C_9H_{13}O^+$ en m/z 137 (36%) y $C_7H_{10}O^+$ en m/z 110 (100%), por la pérdida del radical CH_3^{\cdot} , y una molécula de propeno, después de un reordenamiento de hidrógeno, tipo McLafferty, respectivamente. El ion $C_6H_7O^+$ en m/z 95 (43%), se forma por eliminación de un radical CH_3^{\cdot} a partir del ion pico de base en m/z 110.

Figura 31. Espectro de masas de la piperitona.



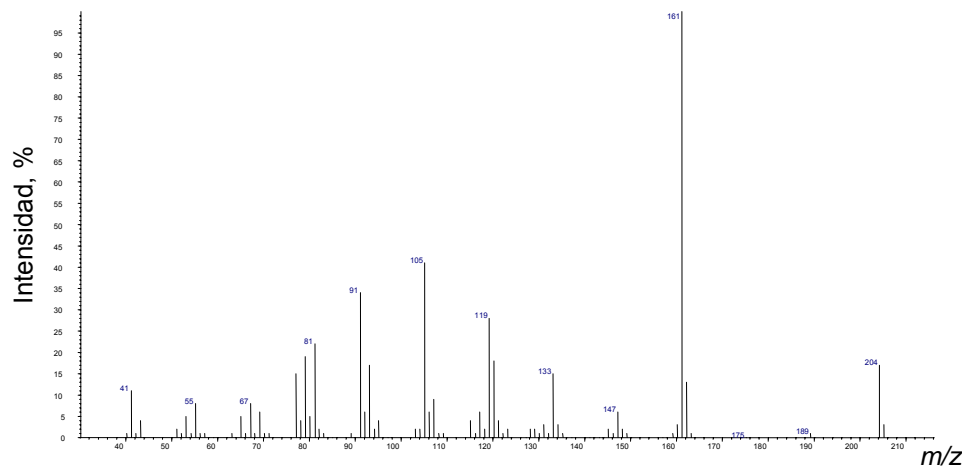
Esquema 9. Posibles rutas de fragmentación de la piperitona.



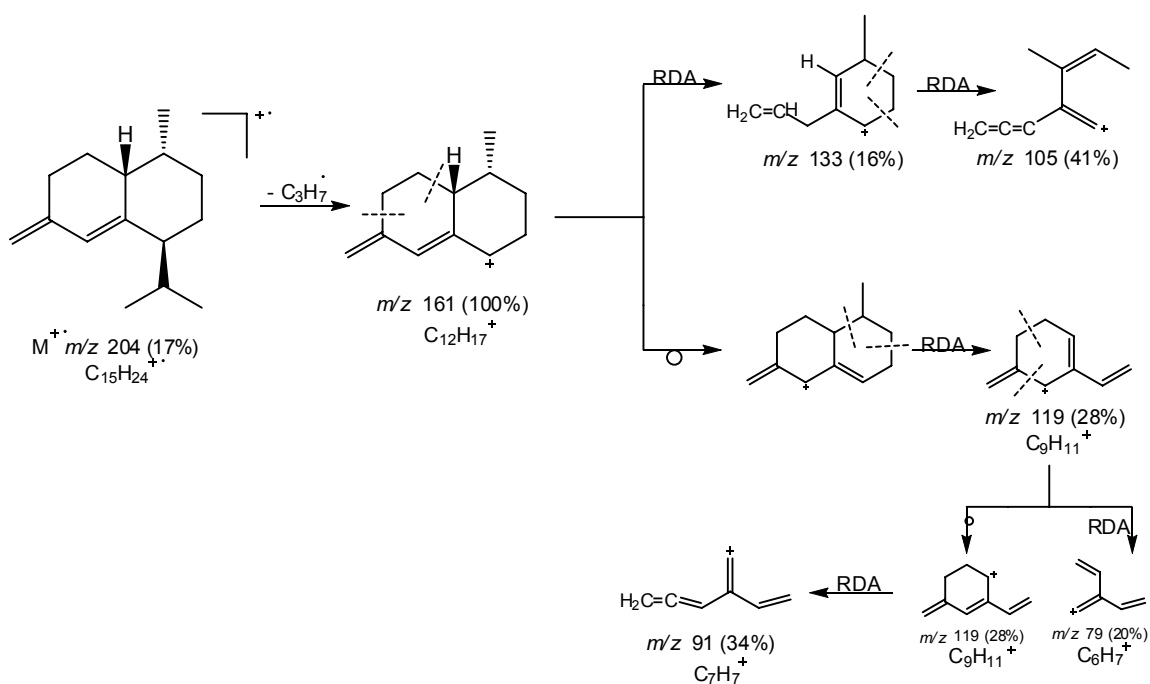
• **Biciclosesquifelandreno:** El espectro de masas del biciclosesquifelandreno, **Figura 32**, presenta el ion molecular $M^{+\bullet}$ en m/z 204 con una intensidad media (17%), el cual por pérdida del radical isopropílico, genera el ion pico de base $(M-C_3H_7)^+$ en m/z 161. A partir de éste, se generan los iones fragmento $C_{10}H_{13}^+$ y $C_8H_9^+$ en m/z 133 (16%) y m/z 105 (41%), respectivamente, como productos de dos reacciones monomoleculares consecutivas tipo *retro Diels-Alder* (RDA), tal como se puede observar en el **Esquema 10**.

El pico de base $(M-C_3H_7)^+$, sufre un reordenamiento por deslocalización de la carga, y reacciones RDA consecutivas, para generar los iones $C_9H_{11}^+$, en m/z 119 (28%), $C_7H_7^+$, en m/z 91 (34%) y $C_6H_7^+$, en m/z 79 (20%), los cuales son fragmentos “diagnóstico” en el MS del biciclosesquifelandreno.

Figura 32. Espectro de masas del bicicloesquifelandreno.



Esquema 10. Posibles rutas de fragmentación del bicicloesquifelandreno.



4. CONCLUSIONES

1. Se determinó la composición química usando criterios cromatográficos (I_k , t_R de sustancias patrón) y espectroscópicos (EI, 70 eV) de los aceites esenciales de plantas de *Lippia alba* de 14 localidades de Colombia.
2. Las plantas de *Lippia alba* recolectadas en las diferentes regiones de Colombia pueden ser clasificadas, según su composición química, en tres quimiotipos, a saber: Carvona, Citral y un quimiotipo Híbrido, no descrito previamente en la literatura, caracterizado por la presencia tanto de la carvona (ca. 23%), como del citral (ca. 20%).

Compuestos mayoritarios	Quimiotipo, Cantidad relativa (%)		
	Carvona	Citral	Híbrido*
6-Metil-5-hepten-2-ona	-	3.79	1.74
Limoneno	29.05	2.27	20.76
Neral	-	19.96	9.60
Carvona	34.96	-	23.43
Piperitona	2.38	-	0.98
Geranial	-	25.44	9.60
Piperitenona	4.01	-	2.07
Biciclosesquifelandreno	8.20	2.73	7.43
Localidad	Bucaramanga (Santander)	Colorado (Bolívar)	Saravena (Arauca)
Número de plantas	8	4	6
Rendimiento (% p/p)	0.43	0.30	0.36

* Citral + carvona

3. El rendimiento del aceite esencial de *Lippia alba* presentó variaciones de acuerdo con el quimiotipo y con las condiciones geográficas de su cultivo, siendo éste mayor para las plantas caracterizadas por el alto contenido de la carvona, cultivadas en Armenia (1480 m.s.n.m, 24°C) (Quindío), Suaita (1500 m.s.n.m, 19°C) (Santander) y Bolívar (2600 m.s.n.m, 17°C)

(Santander), cuyos rendimientos fueron 3.17%, 2.97% y 2.50%, respectivamente. Por el contrario, los menores rendimientos se alcanzaron en las plantas que presentaron como metabolito mayoritario el Citral en su aceite, cultivadas en Colorado (Bolívar) y Saravena (Arauca), cuyos valores son 0.30% y 0.36%, respectivamente.

4. La variabilidad observada en la composición química de los aceites esenciales extraídos de las plantas provenientes de las 14 regiones de Colombia, se debe a factores geobotánicos, condiciones de cultivo y, posiblemente, a la diversidad genética de la especie, que puede ser un factor determinante si se considera que los cultivos han existido en estas regiones durante un tiempo considerable, de manera tal, que la planta se ha adaptado a las condiciones específicas de acuerdo con sus necesidades.
5. El mayor rendimiento de los AEs de *Lippia alba*, se logró empleando hojas jóvenes (<15 días). Para el quimiotipo Carvona, la edad de las hojas no influyó de manera significativa sobre el contenido de los principales metabolitos (*i.e.* carvona, piperitona, piperitenona y biciclosesquifelandreno). Por el contrario, para el quimiotipo Citral, se obtuvo una mayor cantidad de neral + geranial en hojas maduras (2 meses).
6. Los materiales de los destiladores semi-industriales influyeron sobre la cantidad de los metabolitos secundarios volátiles aislados de *L. alba*, quimiotipo Carvona, encontrándose mayor concentración de la carvona en el AE extraído con el destilador de cobre, mientras que el limoneno se obtuvo en mayor cantidad usando el destilador de acero.
7. El material de fabricación de los destiladores semi-industriales (cobre y acero) no afectó las propiedades fisicoquímicas de los AEs de *Lippia alba*,

sin embargo, las características organolépticas de éstos variaron de acuerdo con el equipo de extracción empleado, especialmente, con el destilador de cobre. Los AEs obtenidos por MWHD y en el destilador de acero presentaron olores suaves, muy parecidos, mientras que el aceite obtenido en el destilador de cobre, se caracterizó por su olor muy intenso y penetrante, dejando una sensación un poco desagradable.

5. RECOMENDACIONES

1. Si se desea obtener un AE de *L. alba* (quimiotipo Carvona) con un alto contenido de este metabolito, la edad de las hojas empleadas para su extracción no es un factor determinante, por lo que no se hace necesario esperar que éstas alcancen cierto grado de madurez. Por el contrario, para conseguir el AE de *L. alba* con la mayor concentración de citral (neral + geranial), es necesario que las hojas de la planta alcancen un nivel de maduración apropiado, es decir, aproximadamente 2 meses después de la siembra, logrando, de esta manera, una mayor acumulación del citral en la esencia.
2. El hallazgo de un nuevo quimiotipo sugiere continuar el estudio de la especie *L. alba* en distintas regiones de Colombia, donde ésta se desarrolle, de manera que sea posible hallar plantas que posean diferentes metabolitos volátiles, la propagación y la estandarización de aquel quimiotipo cuyo aceite pueda tener un mayor interés industrial, e.g. quimiotipo carvona.
3. Teniendo en cuenta que a nivel industrial se requieren técnicas extractivas que sean reproducibles, y que además de ser económicas, no alteren la composición química y las propiedades fisicoquímicas y organolépticas de los AEs, con los resultados obtenidos en este proyecto, se recomienda el uso de destiladores de acero, puesto que cumple con las características mencionadas anteriormente.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. ADAMS, Robert. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Illinois. Allured Publishing Corporation, **1995**, 469 p.
2. Análisis de la tendencia del mercado internacional de aceites esenciales. Informe mensual de la Fundación Exportar. Secretaría de Comercio y Relaciones Económicas Internacionales, **2002**, 24 p.
3. ATTI-SERAFINI, L.; PANSERA, M.R.; ATTI-SANTOS, A.C.; ROSSATO, M.; PAULETTI, G.F.; PAROUL, N., and MOYNA, P. Variation in essential oil yield and composition of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. grown in Southern Brazil. *Rev. Bras. Plantas Med*, **2002**, 4:(2), p.p. 72-74.
4. AZCÓN, J., y TALÓN, M. Fundamentos de fisiología vegetal. 1ª Ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid: **2000**, 261 p.
5. BAHL, J.R.; GARG, S.N.; SINGH, S.C.; BANSAL, R.P.; NAQVI, A.A., and KUMAR, S. Composition of linalool-rich essential oil from *Lippia alba* grown in Indian plains. *Flav. Fragr. J*, **2000**, 15, p.p. 199-200.
6. BAHL, J.R.; SINHA.; NAQVI, A.A.; BANSAL, R.P.; GUPTA, A.K., and KUMAR, S. Linalool-rich essential oil quality variants obtained from irradiated stem nodes in *Lippia alba*. *Flav. Fragr. J*, **2002**, 17, p.p. 127-132.
7. BALLERO, M.; POLI, F., and SANTOS, M. Plants used in folk medicine of Monteleone (Northern Sardinia). *Fitoterapia*, **1998**, 69, p.p. 52.

8. 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, 94-96, 149-171, 197-232.
9. BARBOSA, F., LIMA, M., FILHO, R., and SILVEIRA, E. Iridoid and phenylethanoid glycosides from *Lippia alba*. *Biochem. System. Ecol*, **2006**, 34:(11), p.p. 319-321.
10. BIASI, L., and COSTA, G. Propagação vegetativa de *Lippia alba*. *Ciência rural*, Santa Maria, **2003**, 33:(3), p.p. 455-459.
11. BRAGA, M.; EHLERT, P.; MING, L., and MEIRELES, M. Supercritical fluid extraction from *Lippia alba*: global yields, kinetic data, and extract chemical composition. *J. Supercrit. Fluids*, **2005**, 34, p.p. 149 – 156.
12. BRENNAN, E., FUGANTI, C., and SERRA, S. Enantioselective perception of charal odorants. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2003**, 14, p.p. 1-42.
13. CÁCERES, A., GIRON, L. Actividad antimicrobiana de plantas usadas en el tratamiento de afecciones de la piel y mucosa. *Seminario Nacional de Medicina Tradicional – Mesoamericano de Etnofarmacología*, **1987**, III, p.p. 104-109.
14. CÁCERES, A.; ÁLVAREZ, V.A.; OVANDO, A., and SAMAYOA, B. Plants used in Guatemala for treatment of respiratory diseases. 1. Screening of 68 plants against gram-positive bacteria. *J. Ethnopharm.* **1991**, 31:(2), p.p. 193-208.

15. CALVO, R., PARTRIDGE, M., and JABRI, M. A comparative study of principal component analysis techniques. Department of Electrical Engineering. University of Sydney. Australia. **2006**, p.p. 1-5.
16. CENTER FOR THE PROMOTION OF IMPORTS FROM DEVELOPING COUNTRIES: Market survey on natural ingredients for cosmetics. **2004**. [Citada el 18 de enero de 2005]: Disponible en Internet, <http://www.cbi.nl/show.php?file=marketinforesults.htm&action>.
17. CHEMAT, F., LUCCHESI, M., FAURETTO, L., COLNAGHI, G., and VISIONI, F. Microwave-accelerated steam distillation of essential oil from lavender: A rapid, clean and environmentally approach. *Appl. Catal., A*, **2006**, 555, p.p.157-160.
18. CRAMAROSSA, M.; NADINI, A.; BONDI, M.; MESSI, P.; PAGNONI, U., and FORTI, L. Biocatalytic reduction of (+)- and (-)-carvone by bacteria. *C.R Chimie*, **2005**, 8, p.p. 849-852.
19. CRAVEIRO, J.; ALENCAR, W.; MATOS, F.J.; ANDRADE, C.H., and MACHADO, M.I. Essential oils from Brazilian *Verbenaceae*, genus *Lippia*; *J. Nat. Prod.*, **1981**, 44:(5), p.p. 598-601.
20. COMBARIZA, Y., BLANCO, C. Estudio comparativo de los aceites esenciales de hojas y frutos cítricos colombianos. Tesis de grado (Química), Universidad Industrial de Santander, **1995**, p.p. 15-20.
21. De CARVALHO, C., and De FONSECA, M.M. Carvone: why and how should one bother to produce this terpene. *J. Food Chem.*, **2005**, 95, p.p. 413-422.

22. DENNY, E. Hidro-distillation of oils from aromatic herbs. *Perfumer & Flavorist*. **1989**, 14, p.p. 57.
23. DOMÍNGUEZ, A. X., Métodos de investigación fotoquímica. Limusa: México D.F. **1988**, p.p. 229, 239, 281.
24. DUDAREVA, N., and PICHERSKY, E. Biology of Floral Scent. Taylor & Francis Group: New York: **2006**, p.p. 55-71.
25. DURÁN, D.C. Estudio del aceite esencial de *Lippia alba* (Verbenaceae) y de los aspectos fisiológicos en diferentes etapas de su crecimiento bajo tres niveles de luz, Tesis de Grado (Química), Universidad Industrial de Santander, **2005**, p.p. 22-25.
26. ENCICLOPEDIA SALVAT DE LAS CIENCIAS, Industria de las esencias y de los perfumes, Barcelona: Salvat, **1972**. 16: 315p.
27. EYRES, G., MARRIOTT, P., and DUFOUR, J. The combination of gas chromatography-olfactometry and multidimensional gas chromatography for the characterisation of essential oils. *J. Chromatogr., A*. **2006**. [Article in press].
28. FERHAT, M.; MEKLATI, B.; SMADJA, J., and CHEMAT, F. An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel. *J. Chromatogr. A*. **2006**, 1112, p.p 121-126.
29. FERNANDES, C., CATRINESCU, C., CASTILHO, P., RUSSO, P., CARROTT, M., and BREEN, C. Catalytic conversion of limonene over acid activated Serra de Dentro (SD) bentonite. *Appl. Catal., A*. **2007**, 318, p.p 108-120.

30. FISCHER, U., LÓPEZ, R., PÖLL, E., VETTER, S., NOVAK, J., and FRANZ, C. Two chemotypes within *Lippia alba* population in Guatemala. *Flav. Fragr. J.*, **2004**, 19, p.p. 333-335.
31. FRANZIOS, G., MIROTSOU, M., HATZIAPOSTOULOU, E., KRAL, J., SCOURAS, Z., and MAVRAGANI, T. Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, 45, p.p. 2690-2694.
32. FRIEDMAN, M.; HENIKA., and MANDRELL, R. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogens*, and *Salmonella enterica*. *J. Food Protec.*, **2002**, 65, p.p. 1545-1560.
33. FUN, C.E., SVENDSEN, A.B. The essential oil of *Lippia alba* (Mill.) N.E Br. *J. Essen. Oil Res.*, **1990**, 2, p.p. 265-267.
34. GALLETI, G. C., and BONAGA, G., Analytical methods in the study of essential oils extraction, separation and identification techniques. *Chim. Acta Turcia*, **1988**, 16, p.p. 291-296.
35. GARCÍA BARRIGA, H. Flora medicinal de Colombia. Tomo II. Botánica médica, 2a Ed., Tercer Mundo, Bogotá, **1992**, p.p. 557.
36. GARCÍA, G.A.; NAHON, L., and POWIS, I. Near-threshold photoionization spectroscopy of the mono-terpenes limonene and carvona. *J. Mass Spectrom.* **2003**, 225, p.p. 261-270.
37. GONZÁLEZ, M.A.; GHOSH, S., and RIVAS, F. Sintesis of (+)- and (-)-isocarvona. *Tetrahedron.*, **2004**, 45, p.p. 5039-5041.

38. GÖTTLIER, O. Phytochemistry and evolution of angiosperms. *Anal. Acad. Cienc.* **1984**, 56, p.p. 43-50.
39. GROB L. *Modern Practice of Gas Chromatography*. Ed. John Wiley & Sons, New York, **1985**, p.p. 267-288, 895-897.
40. GÜENTHER, E. *The Essential Oils. Volume I: History – Origin in plants production – Analysis*, Litton Educational, New York, **1948**, p.p. 241–244.
41. GUPTA, M. P., *270 Plantas medicinales Iberoamericanas*. CYTED – SECAB: Bogotá, **1995**, 617 p.
42. GUZMAN, S.P.; CARDOZO, R., and GARCÍA, V. Desarrollo agrotecnológico de *Lippia alba* (Miller) N.E.Br ex Britton y Wilson, *Guillermo de Ockham.*, **2004**. 7:(1), p.p. 201-215.
43. HEINRICH, M.; RIMOLER, H., and BARRERA, N.A. Indigenous phitotherapy of gastrointestinal disorders in a lowland mixe community (Oxaca México): Ethnopharmacologic evaluation. *J. Ethnopharm.*, **1992**, 36, p.p. 63-80.
44. HENNEBELLE, T., SAHPAZ, S., DERMONT, C., JOSEPH, H., and BAILLEUL, F. The essential oil of *Lippia alba*: Analysis of samples from French Overseas Departments and Review of Previous Works; *Chem. Biodiver.*, **2006**, 3, p.p. 1116-1125.
45. HIDALGO, J.E.; CERRUTI, T.; MESTANZA, M.; RÍOS, F.; NINA, E.; NONATO, L.; ALVARADO, R., and MENÉNDEZ, R. Aromatic plant oils of the Peruvian Amazon. Part 1. *Lippia alba* (Mill.) N.E Brown and *Cornutia odorata* (Poeppig) Poeppig ex Schauer, *Verbenaceae*. *J. Essen. Oil Res.* **1999**, 11: (6), p.p. 753-756.

46. HOFFMANN, G.G. Infrared, Raman and VCD spectra of (S)-(+)-Carvone-comparison of experimental *and ab initio* theoretical results. *J. Mol. Struct.* **2003**, 661, p.p. 525-539.
47. HOTELLING, H. Analysis of complex statistical variables into principal components. *J. Educ. Psychol.* **1933**, 24, p.p. 417-441.
48. <http://www.formarse.com.ar/aromaterapia/aromaterapia.htm> [Consultado 20 de noviembre de 2006].
49. <http://en.wikipedia.org/wiki/Carvone> [Consultado 12 de diciembre de 2006].
50. IJIMA, Y., DAVIDOVICH, R., and FRIDMAN, E. The biochemical and molecular basis for the divergent pattern in the biosynthesis of terpene and phenylpropenes in the peltate glands of three cultivars of sweet basil. *Plant Physiol.* **2004**, 136, p.p. 3724.
51. IJIMA, Y., WANG, G., FRIDMAN, E., and PICHERSKY, E. Analysis of the enzymatic formation of citral en the glands of sweet basil; *Arch. Biochem. Biophys.* **2006**, 448, p.p. 141-149.
52. IKAN R., Natural products: a laboratory guide. Academic Press: Boston. **1969**, p.p. 182-191.
53. Industria de las esencias y de los perfumes. Enciclopedia Salvat de las Ciencias, Tomo 16, Ed. Salvat S.A.: Barcelona. **1972**, 315 p.
54. INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN DE RECURSOS BIOLÓGICOS "ALEXANDER von HUMBOLDT. Informe final de estudio del mercado nacional de aceites esenciales. Bogotá: **2002**, p.p. 23, 43-54.

55. JEAN, F. I. COLLIN, G. LORD, D. Essential oil and microwave extracts of cultivated plants. *Perfumer & Flavorist*. **1992**, 17: (3), p.p. 35-41.
56. JENNINGS, W., Analytical Gas Chromatography. Academic Press: San Diego. **1987**. 259 p.
57. JIROVETZ, L.; BUCHBAVER, G. Processing, analysis and application of essential oils. *Recent Res. Devel. Agron. Horticulture*. **2005**. p.p. 21, 22 -28.
58. JIROVETZ, L. Chemical composition, antimicrobial activities and odor descriptions of some essential oils with characteristic floral-rosy scent. *Recent Res. Devel. Agron. Horticulture*. **2006**, 2, p.p. 1-12.
59. KINGSTON, H. M., JASSIE, L. B., Introduction to microwave sample preparation, theory and practice. Washington: American Chemical Society. **1988**, p.p. 7-31.
60. KJELDEN, F., CHRISTENSEN, L., and EDELENBOS, M. Changes in volatiles compounds of carrots (*Daucus carota* L.) during refrigerated and frozen storage. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, p.p. 5400-5407.
61. 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.
62. KOVÁTS, E. Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. *Advan. Chromatogr*, **1695**, p.p. 229-247.

63. LAWRENCE, B. Essential oils 1988-1991. New York: Allured Publishing Corporation. **1993**, p.p. 8, 47.
64. LEMOS, T.L.; MONTE, F.J.; ALENCAR, J.W.; CRAVEIRO, A.; BARBOSA, R.C., and LIMA, E.O. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Brazilian plants. *Fitoterapia*, **1992**, 63, p.p. 266.
65. LEVINE, Ira. Fisicoquímica. Volumen II. 5ª Ed. McGraw-Hill. Madrid: **2004**. 611 p.
66. LIU, R., ZHAO, F., FUJITA, S, and ARAN, M. Selective hydrogenation of citral with transition metal complexes in supercritical carbon dioxide. *Appl. Catal., A*. **2007**, 316, p.p. 127-133.
67. LÓPEZ, A.M.; ROJAS, H.N., and JIMENEZ, M.C. Plants extracts with cytostatic properties growing in Cuba. *Rev. Cub. Med. Tropical*. **1979**, 31, p.p. 105-111.
68. LORENZO, D.; PAZ, D.; DAVIES, P.; VILA, R.; CAÑIGUERAL, S., and DELLACASA, E. Composition of a new essential oil type of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown from Uruguay. *Flav. Fragr. J.* **2001**, 16, p.p. 356-359.
69. LUCCHESI, M., CHEMAT, F, and SMADJA, J. Solvent-free microwave extraction of essential oils from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *J. Chromatogr., A*. **2004**. 1043, p.p. 323-327.
70. Market of brief in the European Union for selected natural ingredients derived from native species. *Lippia alba*. The United Nation Conference on Trade and Development, **2005**.

71. MARTÍNEZ, M.C., and de PASCUAL, C. Medicinal plants used in some rural population of Oaxaca. *J. Ethnopharm.*, **1992**, 35, p.p. 229-257.
72. MASANGO, P. Cleaner production of essential oils by steam distillation. *J. Cleaner Production*. **2005**, 13, p.p. 833-839.
73. MATOS, F.J.; MACHADO, M.I.; CRAVEIRO, A.A., and ALENCAR, J.W. Essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in Northeast Brazil. *J. Essen. Oil Res.* **1996**, 8:(6), p.p. 695-698.
74. McLAFFERTY, F. W. and TURECEK, F., Interpretation of mass spectra. University Science Books: San Diego, **1993**. 374 p.
75. MESSAGE, G. M., Practical aspects of gas chromatography / mass spectrometry. John Wiley & Sons: New York, **1984**. 351 p.
76. MORTON. Atlas of Medicinal Plants of Middle America. **1981**, 1, p.p. 745-750.
77. MUÑOZ, F., Plantas medicinales y aromáticas, estudio, cultivo y procesado. Mundi Prensa: Madrid, **1987**. 365 p.
78. OCAMPO, R.A., VALVERDE, R. Manual de cultivo y conservación de plantas medicinales. Tomo I. Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical: Costa Rica, **2000**. p.p. 97-100.
79. OLIVEIRA, P., CERVANTES, M., RAMOS, A., FONSECA, I., DOREGO, A, and VITAL, J. Limonene oxidation over V_2O_5/TiO_2 catalysis. *Catal. Today*. **2006**, 118, p.p. 307-314.

80. OLIVEIRA, D.R.; LEITAO, G.G., and SANTOS, S.S. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oximiná. *J. Ethnopharm.* **2006**, 108:(2), p.p. 103-108.
81. PARÉ, J. R. J., SIGAMIN, M., LAPOINTE, J., US Patent. 5.002.784., **1991**.
82. PARÉ, J. R. J., European Patent Application 0485668A1., **1992**.
83. PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; MATA, S.D., and VILLAR, A. *Lippia* traditional uses, chemistry and pharmacology – a Review; *J. Ethnopharm.*, **2000**, 76, p.p. 201-214.
84. PEARCE, S. What are essential oils and how do they work? in: Milchard M (Editors). Essential Oils World. Ed. Cotswold Publishing Company: Seville, **1997**. 212 p.
85. PINO, J.A.; ARIEL, L.; PÉREZ, A.; RODRÍGUEZ, M., and BALUJA, R. Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. *Rev. Cub. Farm.* **1997**, 30:(1), p.p. 1-3.
86. PINO, J.A.; ORTEGA, A., and ROSADO, A. Chemical composition of the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown from Cuba. *J. Essen. Oil Res.* **1996**, 8:(4), p.p. 445-446.
87. POOLE, C. F., and POOLE S. K., Chromatography Today. Elsevier: Amsterdam **1991**. 1026 p.
88. RAUBER, C., GUTERRES, S., and SCHAPOVAL, E. LC determination of citral in *Cymbopogon citratus* volatiles oil. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**. 37, p.p. 597-601.

89. RICCIARDI, G.A.; VEGLIA, J.F., y RICCIARDI, A.I.; BANDONI, A.L. Examen comparado de la composición de los aceites esenciales de especies autóctonas de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*, **1999**, VIII, p.p. 103–106.
90. RICCIARDI, G.; VEGLIA, J.; RICCIARDI, A.; y BANDONI, A. Fitoquímica de Verbenáceas (*Lippias* y *Aloysias*) del Nordeste Argentino. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*, **2000**.
[online]:http://www.plantasmedicinales.org/archivos/fitoquimica_verbenaceas.pdf?PHPSESSID=1e496d3726b76699241f4d51c66e30d6.html.
[Consultado 10 de mayo 2006].
91. RICCIARDI, G.; y RICCIARDI, A. Efecto de las variaciones estacionales sobre la composición química del aceite esencial de plantas de “*Salvia morada*” de Sáenz Peña (Chaco). *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*, **2001**. [on–line]:<http://www.unne.edu.ar/cyt/2001/8-Exactas/E-011.pdf>. [Consultado de mayo 2006].
92. RÖDEL, W., WÖLM, G., A guide to gas chromatography. Huethig Verlag: New York, **1987**. 211 p.
93. ROSSITER, K. Structure-odor relationships. *Chem. Rev.* **1996**, 96, p.p. 3201-3240.
94. SALISBURY, F., ROSS, C. Fisiología vegetal. 4^a Ed, Iberoamérica C.V.: Mexico D.F. **1994**, p.p. 71-97, 280-287.
95. SANDRA, P., BICCHI C., Capillary gas chromatography in essential oil analysis. Ed. Huethig Verlag: New York, **1987**, 435 p.

96. SCHREIR, P. Chromatographic studies of biogenesis of plant volatiles. Ed. Huethig Verlag: Heidelberg, **1984**, 171 p.
97. SENATORE, F.; RIGANO, D. Essential oil of two *Lippia spp.* (Verbenaceae) growing wild in Guatemala. *Flav. Fragr. J.* **2001**, 16:(3), p.p. 169-171.
98. SHANMUGAN, R., and JOHNSON, C. At a crossroad of data envelopment and principal component analysis. *Omega.* **2007**, 35:(4), p.p. 351-364.
99. SIANI, A.; TAPPIN, M.; RAMOS, M.; MAZZEI, J.; RAMOS, M.C.; De AQUINO, F.; and FRIGHETTO, N. Linalool from *Lippia alba*: Study of the reproducibility of the essential oil profile and the enantiomeric purity. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, p.p. 3518-3521.
100. SINGH, G.; PANDEY, S.K.; LECLERCQ, P.A., and SPERKOVA, J. Studies on essential oils. Part 15. GC/MS analysis of chemical constituents of leaf oil of *Lippia alba* (Mill.) from North India. *J. Essen. Oil Res.* **1999**, 11:(2), p.p. 206-208.
101. SKOOG, D., LEARY J., Análisis instrumental. McGraw Hill: Madrid, **1994**, p.p. 491-527.
102. SMID, E.J.; WITTE, Y.; and GORRIS, L.G. Secondary plant metabolites as control agents of postharvest *Penicizzium* rot on tulip bulbs. *Biol. Technol*, **1995**, 6, p.p. 303.
103. STASHENKO, E.E.; BLANCO, C.; COMBARIZA, M.Y., and MARTÍNES, J.R. Comparative study of Colombian citrus oil by high-resolution gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **1995**, 697, p.p. 501-513.

104. 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, p.p. 353-358.
105. STASHENKO, E.E.; COMBARIZA, Y.; PUERTAS, A.M. Aceites esenciales, técnicas de extracción y análisis. Laboratorio de Fitoquímica y Cromatografía. Bucaramanga. Colombia: **1998**, 30 p.
106. 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, p.p. 343-349.
107. STASHENKO, E.; MARTÍNEZ, J.; DELGADO, W., and GUILLARD, M. Determination of the enantiomeric purity of carvona, main component of Colombian *Lippia alba* (Mill) oil by means of bidimensional gas chromatography. *VIII Latin American Chromatography Congress, COLACRO VIII*, Buenos Aires, Argentina, **2000**.
108. STASHENKO, E.E.; JARAMILLO, B.E., and MARTÍNEZ, J.R. Comparación de la composición química y de la actividad *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. *Rev. Acad. Col. Cienc.* **2003**, 27:(105), p.p. 579-597.
109. STASHENKO, E.; JARAMILLO, B., and MARTÍNEZ, J. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its *in vitro* antioxidant activity. *J. Chromatogr. A.* **2004**, 1025, p.p. 93-103.

110. STASHENKO, E.E.; MARTÍNEZ, J.R.; DURÁN, C.; MONSALVE, A.; CELIS, C.N., and GÓMEZ, G. Estudio comparativo del aceite esencial de *Lippia alba*, proveniente de diferentes regiones de Colombia. *Memorias del XIV Congreso Colombiano de Química*, Armenia, Mayo 27-27, **2006**.
111. STASHENKO, E.E.; MARTÍNEZ, J.R.; DURÁN, C.; MONSALVE, A.; CELIS, C.N., and GÓMEZ, G. Comparative study of composition and biological activity of essential oils of *Lippia alba*, growing in different regions of Colombia. *Memories of the International Congress on Analytical Sciences*, ICAS06, Moscú, Junio, **2006**.
112. STASHENKO, E.E. (Investigadora principal). Estudio integral de especies aromáticas y medicinas tropicales promisorias para el desarrollo competitivo y sostenible de la agroindustria de esencias, extractos y derivados naturales en Colombia. Contrato COLCIENCIAS RC 432, **2004**.
113. TAIZ, L., y ZEIGER, E. *Plant Physiology*. 3ª Ed. Sinauer Associates Inc, Publisers: Massachusetts. **2002**, 171-192, 285-291 p.
114. TUCKER, A.O., and MARCIARELLO, M.J. Volatile leaf oil of the liqueure verbena "*Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown ex Britton and P. Wils. Var carterae moldenke" from the North American herb trade. *J. Essen. Oil Res.* **1999**, 11:(3), p.p. 314-316.
115. TURIN, L. A spectroscopic mechanism for primary olfactory reception. *Chem. Senses.* **1996**, 21, p.p. 773-791.
116. TURIN, L. A method for the calculation of odor carácter from molecular structure. *J. Theor. Biol.* **2002**. 216. p.p. 367-385.

117. VALE, T.; MATOS, F.J.; De LIMA, T., and VIANA, G.S. Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown chemotypes. *J. Ethnopharm.*, **1999**, 167, p.p. 127–133.
118. VERSTEGEN, A.; SWARTS, H.; CANSEN, B., and GROOT, A., Total synthesis of (-)-Ambrox from S(+)-Carvone (Part 6). *Tetrahedron*. **1994**. 50 p.p. 10095-10097.
119. VIANA, G.; de VALE, T., RAO, V., and MATOS, F.J. Analgesic and antiinflammatory effects of two chemotypes of *Lippia alba*: A comparative study. *Pharm Biol.*, **1998**, 36:(5), p.p. 347-351.
120. VOELKEL, A., and STRZEMLECKA, B. Characterization of fillers used in abrasive articles by means of inverse gas chromatography and principal component analysis. *J. Intern. Adhes.* **2007**, 27:(3), p.p 188-194.
121. www.leffingwell.com/chirality/chirality.htm. [Consultado 10 de enero de 2007].
122. ZÉTOLA, M.; LIMA, T.C.; SONAGLIO, D., and GONZÁLEZ, G., LIMBERGER, R.P., PETROVICK, P.R., BASSANI, V.L. CNS activities of liquida and spray-dried extracts from *Lippia alba*-Verbenaceae Brazilian *false melissa*; *J. Ethnopharm.* **2002**, 82, p.p. 207-215.
123. ZOGHBI, M.; ANDRADE, E.H.; SANTOS, A.S., and SILVA, H. Essential oil of *Lippia alba* (Mill.) N.E Br. growing wild in the Brazilian Amazon. *Flav. Fragr. J.* **1998**, 13, p.p. 47-48.