

**ESTUDIO DEL CICLO CIRCADIANO DE LA CARVONA EN LAS HOJAS DE**  
*Lippia alba* (Fam. Verbenaceae)

**CAROL YORAINÉ CÁRDENAS MELGAREJO**  
**SAYDE DUARTE RUEDA**

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

**ESTUDIO DEL CICLO CIRCADIANO DE LA CARVONA EN LAS HOJAS DE  
*Lippia alba* (Fam. Verbenaceae)**

**CAROL YORAINÉ CÁRDENAS MELGAREJO  
SAYDE DUARTE RUEDA**

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

**Directora: Elena Stashenko, Química, Ph. D.  
Co-director: Jairo René Martínez, Químico, Ph.D.**

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

A Dios, esperanza de todos los hombres.

A mis padres Alonso y Graciela, ejemplo de lucha, amor y sacrificio; quienes construyeron la sólida base de mi vida, llenándome cada mañana de energía y de alegría, y sin ningún reparo consintieron todos mis caprichos y cubrieron todas mis necesidades con su trabajo y esfuerzo. Ustedes son MIS AMORES, la luz que nunca se apaga, son mi bendición, son un hermoso regalo de Dios.

A mi hermanita, mi nena hermosa, por ser mi compañera incondicional, mi cómplice, mi ayuda en todo momento y siempre ser la fuerza en mis momentos de debilidad. Eres un angelito, cada triunfo y cada derrota lo viviste como si fueran tuyos, compartiste cada segundo conmigo y a pesar de tus obligaciones nunca me dejaste sola, TE ADORO LINDA.

A mi futuro esposo, Jose Manuel, mi inspiración, mi amor, el motor que impulsa mi vida. Representas toda la seguridad que necesito; mi pasado, mi presente y mi futuro. Mi bizcochito, TE AMO PROFUNDAMENTE, quiero que me acompañes en cada momento de mi vida como lo has hecho hasta ahora.

SAYDE DUARTE RUEDA

A mi mami, mi inspiración, por ser mi ejemplo, por su gran amor incondicional y demostrarme que nunca es tarde para lograr nuestros sueños.

A mi padre y a mi hermano, por su sacrificio, apoyo y regaños oportunos, los cuales fueron valiosos para mi formación personal.

A tres mujeres maravillosas que estuvieron en esta etapa de mi vida, Martis, Geovana y Adri, con sus valiosos consejos en los momentos difíciles.

A Amner, ejemplo de vida, por su valiosa amistad y por demostrarme que a pesar de la adversidad con dedicación y disciplina se logran las metas trazadas.

Carol Cardenas

## **AGRADECIMIENTOS**

Las autoras expresan sus más sinceros agradecimientos:

A la Dra. Elena Stashenko, un verdadero ejemplo de excelencia, dedicación y conocimiento; por su tenacidad y continuos aportes a la ciencia. Por su trabajo incansable como pedagoga, por creer en nosotras, por brindarnos la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo y sobre todo ser nuestra escuela de formación profesional. Por su alegría, cariño y paciencia.

Al Dr. Jairo René Martínez, por los importantes aportes realizados a nuestro trabajo.

A nuestros compañeros del laboratorio quienes con su sonrisa, palabras de aliento, compañía, lograron hacer nuestro trabajo diurno y nocturno más ameno.

A Marthica, Edwin y Arrianita V. por su colaboración y su trabajo voluntario.

A Deyny, Olguis, Lucy, Adri, Andrea y Angelita, por los buenos momentos compartidos.

A Amner, Geovanay Matica Cervantes, por su ayuda en el desarrollo de nuestro trabajo.

Al Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM, al Laboratorio de Cromatografía y a COLCIENCIAS, por el soporte financiero para el desarrollo de nuestro trabajo.

Al Laboratorio de Física Óptica y Tratamiento de Señales de la Escuela de Física, por su colaboración.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>1. ESTADO DEL ARTE</b>	5
1.1. Los aceites esenciales y sus principios activos	5
1.1.1. Aceites esenciales usados como fármacos	8
1.2. Familia <i>Verbenaceae</i> y género <i>Lippia</i>	9
1.2.1. <i>Lippia alba</i> (Mill) N.E. Brown ex Britton & Wills	9
1.2.1.1. Usos etnofarmacológicos	10
1.2.1.2. Composición química	10
1.2.1.3. Actividades biológicas y farmacológicas del aceite esencial y extractos de <i>Lippia alba</i>	11
1.3. CARVONA	18
1.3.1. Fuentes naturales para la obtención de la carvona	18
1.3.2. Formas enantioméricas de la carvona	19
1.3.3. Aplicaciones de la carvona	20
1.3.4. Actividades biológicas de la carvona	21
1.3.5. Estudios clínicos de la carvona	22
1.3.6. Nuevos fármacos a partir de carvona	22
1.4. MECANISMOS DE EMISIÓN DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES DE LAS PLANTAS	23
1.4.1. Movimientos estomáticos	24
1.5. EFECTO DEL CLIMA SOBRE LAS PLANTAS MEDICINALES Y AROMÁTICAS	26
1.5.1. Variables ambientales (luz, temperatura, humedad)	27
1.6. ¿CÓMO LLEGA LA INFORMACIÓN DEL ESTADO DEL TIEMPO A LAS PLANTAS?	28
1.7. CRONOBIOLOGÍA	29

1.8.	RITMOMETRÍA	30
1.9.	RITMOS EXÓGENOS Y ENDÓGENOS	30
1.10.	RITMOS CIRCADIANOS	32
1.11.	MÉTODO DE OBTENCIÓN DEL EXTRACTO Y DEL ACEITE ESENCIAL	33
1.11.1.	Destilación – extracción con solvente simultánea	33
1.11.2.	Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas	34
1.12.	ANÁLISIS DE LOS ACEITES ESENCIALES Y LOS EXTRACTOS	35
1.13.	ANÁLISIS DE MERCADO	37
1.13.1.	Mercado mundial de las plantas aromáticas	37
1.13.2.	Mercado mundial de los aceites esenciales	39
1.13.3.	Mercado nacional de plantas aromáticas y aceites esenciales	40
1.13.3.1.	Mercado nacional de <i>Lippia alba</i>	41
1.13.3.1.1.	Precio de compra a proveedores	41
1.13.3.1.2.	Cantidades obtenidas por proveedor	42
<b>2.</b>	<b>ANÁLISIS CIENCIOMÉTRICO</b>	<b>43</b>
<b>3.</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>55</b>
3.1.	RECOLECCIÓN DE LAS HOJAS DE <i>Lippia alba</i>	56
3.2.	IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA ESPECIE <i>Lippia alba</i>	57
3.3.	EXTRACCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES DE LAS HOJAS DE <i>Lippia alba</i>	58
3.3.1.	Destilación - extracción con solvente simultánea para solvente de alta densidad	58
3.3.2.	Extracción con MWHHD de los metabolitos secundarios volátiles de las hojas de <i>Lippia alba</i>	60
3.4.	DETERMINACIÓN DE LAS FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO	62

3.4.1.	Evaluación de la repetibilidad del sistema de inyección	62
3.4.2.	Experimentos de reproducibilidad de la técnica de extracción SDE	62
3.4.3.	Experimentos de repetibilidad de la técnica de extracción SDE	63
3.5.	MEDICIÓN DE LAS VARIABLES AMBIENTALES	64
3.6.	ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS	65
3.6.1.	Columna apolar	66
3.6.2.	Columna polar	67
3.7.	IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES DE LAS HOJAS DE <i>Lippia alba</i>	70
3.8.	ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE LOS EXTRACTOS Y LOS ACEITES ESENCIALES DE LAS HOJAS DE <i>Lippia alba</i>	71
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>72</b>
4.1.	ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DE SUELO	72
4.2.	RESULTADOS DE LAS FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO	73
4.2.1.	Repetibilidad de los parámetros cromatográficos	73
4.3.	REPRODUCIBILIDAD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN (SDE)	74
4.3.1.	Repetibilidad de la técnica de extracción (SDE)	74
4.3.2.	Reproducibilidad de la técnica de extracción (SDE)	77
4.4.	CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS EXTRACTOS Y ACEITES DE <i>Lippia alba</i>	78
4.4.1.	Extractos de las hojas <i>Lippia alba</i> obtenidos por destilación-extracción con solvente simultánea mediante GC-MS	78
4.4.2.	Aceites esenciales de las hojas <i>Lippia alba</i> obtenidos por	84

	hidrodestilación asistida por radiación de microondas mediante GC-MS	
4.5.	ANÁLISIS POR GC-MS DE LOS EXTRACTOS Y AEs DE <i>Lippia alba</i>	95
4.6.	VARIACIÓN CIRCADIANA DE LA CARVONA PRESENTE EN EL EXTRACTO DE LAS HOJAS DE <i>Lippia alba</i> OBTENIDO POR SDE Y SEGUIMIENTO DE LOS PARÁMETROS AMBIENTALES	106
4.7.	VARIACIÓN CIRCADIANA DEL RENDIMIENTO DEL AE DE LAS HOJAS DE <i>Lippia alba</i> OBTENIDO POR MWHD Y SEGUIMIENTO DE LOS PARÁMETROS AMBIENTALES	113
4.8.	Análisis de componentes principales (PCA) de los extractos y aceites esenciales aislados por SDE y MWHD	118
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	127
<b>6.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	128
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	129

## LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Resultados del estudio realizado por Zoghi y colaboradores.
- Tabla 2.** Variación de la composición química de los aceites esenciales de *Lippia alba* provenientes de diferentes regiones geográficas y obtenidos por diferentes técnicas de extracción.
- Tabla 3.** Actividad biológica de los aceites esenciales y los extractos obtenidos de *Lippia alba*.
- Tabla 4.** Estudios farmacológicos de los enantiómeros (4R)-(-)-carvona y (S)-(+)-carvona.
- Tabla 5.** Medición de isopreno en varias especies vegetales.
- Tabla 6.** Medición de monoterpenos en varias especies vegetales.
- Tabla 7.** Emisiones a través de poros estomáticos.
- Tabla 8.** Ficha de búsqueda utilizada en el estudio cuantitativo de *Lippia alba*.
- Tabla 9.** Autores que reportan investigaciones sobre *Lippia alba*.
- Tabla 10.** Ficha de búsqueda utilizada en la metodología de la cuantificación de sobre carvona.
- Tabla 11.** Autores que reportan investigaciones sobre carvona.
- Tabla 12.** Cantidad de material vegetal utilizado para la SDE, a diferentes horas de recolección de la planta.
- Tabla 13.** Cantidad de material vegetal utilizado para el análisis por MWHD, a diferentes horas de recolección de la planta.
- Tabla 14.** Cantidad de material vegetal utilizado para el análisis de reproducibilidad de la técnica de extracción SDE, a diferentes horas de colecta de la planta.
- Tabla 15.** Cantidad de material vegetal utilizado para el análisis de repetibilidad de la técnica de extracción SDE.
- Tabla 16.** Parámetros operacionales del GC-MS para el análisis de metabolitos

secundarios extraídos por SDE y MWHD de las hojas de *Lippia alba*, en una columna cromatográfica apolar (DB-5 MS).

- Tabla 17.** Parámetros operacionales del GC-MS para el análisis de metabolitos secundarios extraídos por SDE y MWHD de las hojas de *Lippia alba*, en una columna cromatográfica polar (DB-WAX).
- Tabla 18.** Elementos presentes en el suelo del cultivo experimental de *Lippia alba*.
- Tabla 19.** Estudio de la repetibilidad del método analítico usando los  $t_R$ , obtenidos por GC-MS (Columna DB-5, 60m), de los compuestos principales extraídos por SDE de las hojas de *L. alba*.
- Tabla 20.** Estudio de la repetibilidad método analítico usando las áreas de picos cromatográficos obtenidos por GC-MS (Columna DB-5, 60m), de los compuestos principales extraídos por SDE de las hojas de *L. alba*.
- Tabla 21.** Estudio de la repetibilidad de la técnica de extracción, usando los  $t_R$ , obtenidos por GC-MS (Columna DB-5, 60m), de los compuestos principales extraídos por SDE de las hojas de *L. alba*.
- Tabla 22.** Estudio de la repetibilidad de la técnica de extracción usando las áreas de picos cromatográficos obtenidos por GC-MS (Columna DB-5, 60m), de los compuestos principales extraídos por SDE de las hojas de *L. alba*.
- Tabla 23.** Reproducibilidad de la técnica SDE, evaluando el contenido de carvona en cada una de las muestras obtenidas.
- Tabla 24.** Composición química y concentraciones (ppm), de los componentes en los extractos de *L. alba*, aislados por SDE.
- Tabla 25.** Composición química y concentraciones (ppm), de los componentes del AE de *Lippia alba*, obtenido por MWHD.
- Tabla 26.** Cantidad de analito por kilogramo de material vegetal (M.V.) de los AEs aislados de hojas de *L. alba*.
- Tabla 27.** Propiedades físico-químicas de R-carvona y S-carvona [78].
- Tabla 28.** Tiempo de retención e índice de Kovàts de la carvona.

- Tabla 29.** Tiempo de retención e índice de Kovàts del limoneno.
- Tabla 30.** Variación de la concentración de la carvona presente en las hojas de *L. alba*, recolectadas a diferentes horas y días.
- Tabla 31.** Temperatura del suelo (°C) registrada alrededor de las plantas de *L. alba*, recolectadas a diferentes horas y días.
- Tabla 32.** Humedad relativa (%) registrada alrededor de las plantas de *L.alba*, recolectadas a diferentes horas y días.
- Tabla 33.** Temperatura del ambiente (°C) registrada alrededor de las plantas de *L.alba*, recolectadas a diferentes horas y días.
- Tabla 34.** Temperatura del ambiente (°C) registrada alrededor de las plantas de *L.alba*, recolectadas a diferentes horas y días.
- Tabla 35.** Temperatura del suelo (°C) registrada alrededor de las plantas de *L.alba*, recolectadas a diferentes horas y días.
- Tabla 36.** Humedad relativa (%) registrada alrededor de las plantas de *L.alba*, recolectadas a diferentes horas y días.
- Tabla 37.** Variables ambientales correspondientes a los casos graficados en la **Figura 56.**
- Tabla 38.** Variables ambientales correspondientes a los casos graficados en la **Figura 57.**

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Rutas de biosíntesis de los metabolitos secundarios de las plantas y su relación con los metabolitos primarios. I. Ruta del acetato-malonato; II. Ruta del acetato-mevalonato; III. Ruta del ácido shikímico.
- Figura 2.** Ruta del ácido mevalónico.
- Figura 3.** Ruta del acetato-malonato.
- Figura 4.** Ruta del ácido shikímico.
- Figura 5.** Estructuras de los isómeros ópticos de la carvona.
- Figura 6.** Síntesis de la carona a partir de la R-(-)-carvona. **A.** R-(-)-Carvona; **C.** Dihidrocarvona; **E.** Carona.
- Figura 7.** Producto colateral formado durante la síntesis de la carona: **A.** R-(-)-Carvona; **F.**  $\alpha$ -Dicarvelona.
- Figura 8.** Respuesta estomática de las plantas a varias condiciones del medio.
- Figura 9.** Representación esquemática del sistema circadiano en plantas.
- Figura 10.** Experimento de Jean Jacques d'Ortous de Mairan.
- Figura 11.** Equipo de destilación – extracción con solvente simultánea (SDE).
- Figura 12.** Criterios para identificación de compuestos presentes en una mezcla.
- Figura 13.** Principales bloques de un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS).
- Figura 14.** Evolución del comercio mundial de plantas aromáticas.
- Figura 15.** Aceites esenciales exportados por Estados Unidos.
- Figura 16.** Principales países importadores de aceites esenciales.
- Figura 17.** Ciclo de la vigilancia tecnológica.
- Figura 18.** Dinámica de las publicaciones científicas relacionadas con la *Lippia alba*.

- Figura 19.** Principales revistas científicas donde se publica la mayor cantidad de trabajos científicos sobre *Lippia alba*.
- Figura 20.** Distribución de los trabajos científicos sobre *Lippia alba*, según el área de conocimiento.
- Figura 21.** Dinámica de las publicaciones científicas relacionadas con carvona.
- Figura 22.** Principales revistas científicas donde se publica la mayor cantidad de trabajos científicos sobre carvona.
- Figura 23.** Distribución de los trabajos científicos sobre carvona, según el área de conocimiento.
- Figura 24.** Dinámica de los números de registros de patentes de carvona.
- Figura 25.** Metodología general para el análisis de carvona en las hojas de *Lippia alba* durante el día y la noche.
- Figura 26.** Cultivo experimental de la especie *Lippia alba* ubicado en el complejo agroindustrial del Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM.
- Figura 27.** Distribución del cultivo experimental.
- Figura 28.** *Lippia alba* (Mill) N.E Brown ex Britton & Wills.
- Figura 29.** Partes del equipo destilación-extracción con solvente simultánea para solventes de alta densidad, empleado para la obtención de los extractos de *L. alba*.
- Figura 30.** Equipo de hidrodestilación asistida por la radiación de microondas, empleado para la obtención de los aceites esenciales de *Lippia alba* durante el día y la noche.
- Figura 31.** Condiciones de extracción y preparación de los AEs de *L. alba*.
- Figura 32.** Almacenamiento del material vegetal para los experimentos de repetibilidad para la técnica de extracción SDE.
- Figura 33.** Dispositivos utilizados en las mediciones de temperaturas del suelo, del ambiente y de la humedad.
- Figura 34.** Esquema general del procedimiento realizado para la calibración

de la foto-resistencia.

- Figura 35.** Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Plus Series GC System* acoplado a un detector selectivo de masas (MSD) *Agilent Technologies 5973 Network*.
- Figura 36.** Cromatógrafo *Agilent Technologies 6890N Network Series GC System* acoplado a un detector selectivo de masas (MSD) *Agilent Technologies 5975*.
- Figura 37.** Perfil cromatográfico típico del extracto de hojas de *L. alba* obtenido por SDE. Columna DB-5MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los picos se reporta en la **Tabla 24**.
- Figura 38.** Distribución de las principales familias de los compuestos en el extracto de hojas de *L. alba*, obtenido por SDE.
- Figura 39.** Perfil cromatográfico típico del AE de hojas de *L. alba* obtenido por MWHD. Columna DB-5MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los picos se reporta en la **Tabla 25**.
- Figura 40.** Distribución de las principales familias de los compuestos en el aceite esencial seleccionado de *L. alba*, obtenido por MWHD.
- Figura 41.** Estructuras químicas de los metabolitos secundarios volátiles presentes en las hojas de *L. alba*.
- Figura 42.** Corriente iónica del patrón certificado de la carvona, GC-MS. EI (70 eV). Columna DB-5 (60 m).
- Figura 43.** Espectro de masas de la carvona obtenido por EI (70 eV): **A.** Patrón de terpeno certificado de carvona, **B.** MS de la carvona presente en el extracto, obtenido por SDE, de las hojas de *L. alba*.
- Figura 44.** Corriente iónica del patrón certificado del limoneno, GC-MS. EI (70 eV). Columna DB-5 (60 m).
- Figura 45.** Espectro de masas del limoneno obtenido por EI (70 eV): **A.** Patrón de terpeno certificado del limoneno, **B.** MS del limoneno presente en el extracto, obtenido por SDE, de las hojas de *L. alba*.

- Figura 46.** Espectro de masas de la piperitona, presente en el extracto, obtenido por SDE, de las hojas de *L. alba*, EI (70 eV).
- Figura 47.** Espectro de masas de la piperitenona, presente en el extracto, obtenido por SDE, de las hojas de *L. alba*, EI (70 eV).
- Figura 48.** Espectro de masas del biciclosesquifelandreno, presente en el extracto, obtenido por SDE, de las hojas de *L. alba*, EI (70 eV).
- Figura 49.** Variación de la concentración (ppm) de la carvona presente en las hojas de *L. alba*, recolectadas a diferentes horas del día y la noche.
- Figura 50.** Curva de calibración de la foto-resistencia utilizada para la medición de la intensidad lumínica.
- Figura 51.** Intensidad lumínica (%) registrada alrededor de las plantas de *L.alba*, recolectadas a diferentes horas y días.
- Figura 52.** Rendimientos promedios de los AEs de las hojas de *L. alba*, recolectadas a diferentes horas del día y la noche.
- Figura 53.** Intensidad lumínica (%) registrada alrededor de las plantas de *L.alba* en diferentes horas y días de recolección de hojas.
- Figura 54.** Análisis de componentes principales (PCA) de los componentes mayoritarios presentes en el extracto obtenido por SDE, de hojas de *L. alba*, recolectadas a diferentes horas del día y la noche.
- Figura 55.** Análisis de componentes principales (PCA) de los componentes mayoritarios presentes en el AE obtenidos por MWHD de hojas de *L. alba*, recolectadas a diferentes horas del día y la noche.
- Figura 56.** Análisis de componentes principales (PCA) de los componentes mayoritarios presentes en el extracto obtenido por SDE de hojas de *L. alba*, recolectadas a diferentes horas del día y la noche.
- Figura 57.** Análisis de componentes principales (PCA) de los componentes mayoritarios presentes en el AE obtenido por MWHD de hojas de *L. alba*, recolectadas a diferentes horas del día y la noche.

## LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1.** Posibles rutas de fragmentación de la carvona.
- Esquema 2.** Posibles rutas de fragmentación del limoneno.
- Esquema 3.** Posibles rutas de fragmentación de la piperitona.
- Esquema 4.** Posibles rutas de fragmentación de la piperitenona.
- Esquema 5.** Posibles rutas de fragmentación del biciclosesquifelandreno.

## LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

a	Año(s).
AE(s)	Aceite(s) esencial(es).
BHA	<i>Butyated Hydroxyanisol</i> [2-( <i>ter</i> -Butil)-4-metoxifenol].
°C	Grado(s) <i>Celsius</i> .
CENIVAM	Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales.
CIBIMOL	Centro de Investigación en Biomoléculas.
<i>Circa (ca.)</i>	Aproximadamente.
CIPC	Isopropil-3-clorofenilcarbamato.
cm	Centímetro(s).
CNS	Sistema nervioso central.
d	Día(s).
<i>d.i.</i>	Diámetro interno.
<i>d.e.</i>	Diámetro externo.
$d_f$	Espesor de la fase estacionaria.
DMAPP	Difosfato de dimetilalilo.
<i>et al.</i>	otros (y colaboradores).
<i>e.g.</i>	Por ejemplo.
EI	<i>Electrón Impact</i> (Impacto de electrones)
EE.UU.	Estados Unidos de América.
eV	Electrón voltio.
f.e.	Fase estacionaria.
FID	<i>Flame Ionization Detector</i> (Detector de ionización en llama).
g	Gramo(s).
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases, Cromatógrafo de gases, según el contexto).

GC-MS	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas o cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas, según el contexto).
h	Hora(s).
HD	<i>Hydrodistillation</i> (Hidrodestilación).
HS	<i>Headspace</i> (Espacio de cabeza).
HS-SPME	<i>Headspace Solid-Phase Microextraction</i> (Microextracción en fase sólida en modo <i>headspace</i> ).
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta resolución).
<i>i.e.</i>	Es decir, o sea.
$I_k$	Índices de retención de <i>Kovàts</i> .
IL	Intensidad lumínica.
INVIMA	Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos.
<i>istd</i>	<i>Internal Standard</i> (Estándar interno).
IPC	Isopropilfenilcarbamato.
IPP	Difosfato de isopentilo.
kg	Kilogramo(s).
<i>L. alba</i>	<i>Lippia alba</i> .
m	Metro(s); mes(es), según el contexto.
m.s.m.n.	Metros sobre el nivel del mar.
MEP	Fosfato de metileritilo.
MWHD	<i>Microwave-Assisted Hydrodistillation</i> (Hidrodestilación asistida por radiación de microondas).
m <sup>2</sup>	Metro(s) cuadrado(s).
min	Minuto(s).
mL	Mililitro(s).
mm	Milímetro(s).

MS	<i>Mass Spectrometry; Mass Spectrum, Mass Spectra, Mass Spectrometer</i> (Espectrometría de masas; Espectro(s) de masas o espectrómetro de masas, según el contexto).
MSD	<i>Mass Selective Detector</i> (Detector selectivo de masas).
M.V.	Material vegetal.
<i>m/z</i>	Relación masa/carga.
Pa	Pascal (es).
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> (Análisis de componentes principales).
P&T	<i>Simultaneous Purge &amp; Trap</i> (Purga y trampa simultánea).
% p/p	Porcentaje peso a peso.
% v/v	Porcentaje volumen a volumen.
ppm	Partes por millón.
s	Segundo(s).
SDE	<i>Simultaneous Distillation–Solvent Extraction</i> (Destilación-extracción con solvente simultánea).
SFE	<i>Supercritical Fluid Extraction</i> (Extracción con fluido supercrítico).
S-HS	<i>Static Headspace</i> ( <i>Headspace</i> estático).
$t_R$	Tiempo(s) de retención (min).
UE	<i>European Union</i> (Unión Europea).
UIS	Universidad Industrial de Santander.
UN	Universidad Nacional de Colombia.
VT	Vigilancia Tecnológica.
WIPO	<i>World Intellectual Property Organization</i> (Organización Mundial de Propiedad Intelectual).
$\mu\text{L}$	Microlitro(s).
$\mu\text{m}$	Micrómetro(s).

## RESUMEN

**TÍTULO:** ESTUDIO DEL CICLO CIRCADIANO DE LA CARVONA EN LAS HOJAS DE *Lippia alba* (Fam. *Verbenaceae*)\*

**Autores:** Carol Yoraine Cardenas Melgarejo \*\*  
Sayde Duarte Rueda \*\*

**Palabras clave:** *Lippia alba*, carvona, destilación - extracción con solvente simultánea (SDE), hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHD).

En el presente trabajo se analizó la variación circadiana de la carvona presente en las hojas de *Lippia alba* cultivada en un jardín experimental ubicado en la región Nororiental de Colombia y el rendimiento de su aceite esencial. El material vegetal se recolectó a diferentes horas del día y la noche, su extracto y aceite esencial se obtuvieron por SDE y MWHD, respectivamente y se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Los resultados mostraron que la composición del extracto y aceite esencial de *Lippia alba* no varía significativamente con respecto a la hora de recolección del material vegetal. El contenido de carvona presente en los extractos fue 11700, 11600 y 12000 ppm registrados a las 6, 9 y 12 horas, respectivamente. La variación circadiana del rendimiento de la extracción del AE de las hojas de *Lippia alba* por MWHD no fue estadísticamente significativa. Los rendimientos altos fueron entre 0,7 y 0,8 % registrados a las 9, 12 y 15 horas y los rendimientos más bajos fueron 0,63; 0,64 y 0,67 %, registrados a las 21, 24 y 3 horas, respectivamente. Sin embargo, la producción biosintética de la carvona en la planta *L. alba* puede deberse a las variables ambientales, ya que en los momentos cuando las condiciones presentadas fueron: bajo porcentaje de humedad y altas temperaturas e intensidad lumínica, se obtuvieron contenidos altos de carvona.

\* Tesis de grado.

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

## ABSTRACT

**TITLE: STUDY OF THE CARVONE CIRCADIAN CYCLE IN *Lippia Alba* (Fam. Verbenaceae) LEAVES \***

Authors: Carol Yoraine Cardenas Melgarejo \*\*  
Sayde Duarte Rueda \*\*

Keywords: *Lippia alba*, carvone, simultaneous distillation-extraction solvent (SDE), microwave assisted hydro-distillation (MWHD).

In this work we analyzed the circadian variation of carvone present in the leaves of *Lippia alba* grown in a experimental garden located in Northeastern Colombia. The plant material was collected at different times of day and night, and extract and essential oil were obtained by means of simultaneous distillation-solvent extractio (SDE) and microwave-assisted hydrodistillation (MWHD), respectively, and were analyzed by gas chromatography - mass spectrometry.

The results showed that the composition of the extract and essential oils of *Lippia alba* did not vary significantly with time of plant material collection. The contents of carvone present in the extracts was 11.7, 11.6 and 12 g/kg at 6 am, 9 am and 12 m, respectively. The circadian variation of MWHD extraction yield was not statistically significant. Yields were high, between 0.7 and 0.8% at 9, 12 and 15 hours and low, at 0.63, 0.64 and 0.67%, recorded at 21, 24 and 3 hours respectively. However, biosynthetic production of carvone in the *Lippia alba* plant may be due to environmental variables. High carvone content was observed when conditions of low humidity, high temperature and high light intensity prevailed.

\* College thesis.

\*\* Industrial University of Santander, Science Faculty, School of Chemistry.  
Director, Elena E. Stashenko.

## INTRODUCCIÓN

Las plantas utilizan la información del entorno para coordinar sus funciones biológicas, a través de su reloj biológico. Los procesos naturales que ocurren con cierta periodicidad son de varios tipos: los procesos rítmicos cuyos períodos tardan menos de un día se denominan ritmos **infradianos**, mientras que los procesos rítmicos que tienen un período de unos cuantos días como los períodos menstruales, o ritmos que ocurren con periodicidad anual como la floración en una planta, se conocen como ritmos **ultradianos**; finalmente, y, quizás, los más importantes, son los ritmos que siguen el ciclo diario “luz – oscuridad”, denominados ritmos **circadianos** [32, 107].

Los ritmos circadianos, fueron descritos por primera vez en el siglo XVII por el científico francés Jean-Jacques d’Ortous de Mairan, cuando estudiaba el comportamiento de plantas de mimosa (*Mimosa pudica* L.). A partir de ese momento se inició el estudio de su efecto sobre el desarrollo de las plantas [32, 148, 155]. Después de casi un siglo de investigaciones se demostró que las observaciones de d’Ortous de Mairan, en las hojas de la mimosa, están controladas de forma endógena y no por la influencia del movimiento rotatorio de la tierra. Por tanto, el ritmo circadiano se define como aquel que en ausencia de estímulos externos es mantenido por el reloj endógeno por un período cercano a las 24 horas. Sin embargo, para mantener un ritmo con esta periodicidad en condiciones naturales, se necesitan estímulos externos que ajusten y actualicen la información del reloj; en el caso de las plantas son los ciclos naturales de “luz-oscuridad” y/o los cambios de la temperatura del exterior, percibidos a través de un oscilador central que les permite capturar las energías térmica y lumínica, factores determinantes para el crecimiento y desarrollo de las plantas y,

especialmente, para la producción y composición de los aceites esenciales en las plantas aromáticas [32, 70].

Actualmente, los AEs forman parte de un mercado de productos naturales y derivados muy amplio a nivel internacional, debido a sus múltiples aplicaciones y propiedades, entre las cuales se encuentra la posibilidad de atender problemas de salud en muchos países. Su comercialización presenta una buena posibilidad para Colombia, ya que se cuenta con los recursos de la biodiversidad y con las condiciones medioambientales para la adaptación de muchas especies vegetales, nativas e introducidas.

Sin embargo, la poca experiencia científica, tecnológica y comercial de los laboratorios naturistas de nuestro país se resume en los resultados de una encuesta desarrollada por Biocomercio Sostenible, con el apoyo del Ministerio del Medio Ambiente (a través del Grupo de Biodiversidad de la Dirección General de Ecosistemas), y la Federación Naturista Colombiana (FENAT), realizada en marzo, abril y mayo de 2001 a noventa (90) laboratorios naturistas, a saber [123]:

- En Colombia se comercializan cerca de 156 especies de plantas medicinales y aromáticas, de las cuales sólo 63 (40,4%) se encuentran reportadas en la lista básica de plantas permitidas por el INVIMA. El que una planta esté incluida allí, significa que ha sido validada su actividad biológica beneficiosa.
- Hay un gran desconocimiento de las plantas medicinales que se utilizan en Colombia, y de los usos que tradicionalmente la gente les otorga.
- A nivel comercial, se encontró muy poca información; lo joven del sector y el contexto informal en el que se ha desarrollado, han sido obstáculos para la consolidación de fuentes confiables de información.

- El sector que utiliza industrialmente las plantas medicinales y aromáticas es joven (el promedio de antigüedad de las empresas es inferior a 15 años). Se ha limitado a atender mercados locales y regionales del país, compitiendo en precios, con productos medicinales de origen sintético. Muy pocos laboratorios naturistas han exportado y pocos cumplen con los estándares de calidad exigidos en el exterior [123].

Finalmente, Colombia tiene un gran potencial ecológico para la comercialización de los AEs a nivel nacional e internacional que generaría importantes beneficios económicos y sociales, por lo que se necesita garantizar el aprovechamiento responsable y sostenible de nuestros recursos mediante la investigación de las diversas especies promisorias y sus aplicaciones en las diferentes industrias.

Una de las especies promisorias en nuestro país es la *Lippia alba* (Fam. Verbenaceae), que se caracteriza por su alto contenido de carvona (> 50%), el cual es un compuesto de alto valor, utilizado principalmente en la industria cosmética y como aromatizante en productos de uso personal (e.g. pastas dentífricas); también se usa en síntesis orgánica fina para la obtención de decalinas quirales, tales como el (-) poligodial (insecticida) y el ambrox (fijador en perfumería) [13, 20, 38, 56, 159]. Sin embargo, el contenido de carvona en la planta puede variar dependiendo de muchos factores edafoclimáticos, la edad de la planta y la hora de colecta. La calidad y el precio de un AE dependen principalmente de la presencia de compuestos activos de interés particular en el aceite. Abrir espacios de investigación en este campo permitirán el fomento y el mejoramiento de la nascente industria de los AEs en Colombia, con beneficios para pequeños y grandes productores.

Durante el presente trabajo se determinaron los cambios en la composición de extractos y aceites esenciales obtenidos de hojas de *Lippia alba* recolectadas a diferentes horas del día y de la noche.

El presente trabajo hace parte del conjunto de investigaciones desarrolladas en el Laboratorio de Cromatografía, a través del Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales, CENIVAM. Los resultados parciales se presentaron bajo la modalidad de póster en el XIV Congreso Colombiano de Química, organizado por ASQUIMCO, el cual se llevó a cabo en Armenia (Quindío) del 17 al 19 de mayo de 2006 (Véase **Anexo 1**), también fueron presentados en el *International Congress on Analytical Sciences (ICAS-2006)*, organizado por *Russian Academy of Sciences*, que se realizó en la ciudad de Moscú (Rusia) del 25 al 30 de junio de 2006, bajo la modalidad de póster (Véase **Anexo 2**). Asimismo, algunos resultados se divulgaron bajo la modalidad de Póster en el *International Congress on Medicinal and Aromatic Plants*, que se realizó en Marruecos del 22 al 24 de marzo de 2007 (Véase **Anexo 2**), igualmente bajo la modalidad de Póster en el IX Congreso Colombiano de Fitoquímica, que se llevó a cabo en Pereira del 8 al 11 de mayo de 2007, (Véase **Anexo 3**).

El trabajo presentado consta de 184 páginas, distribuidas en 7 capítulos, contiene 57 figuras, 38 tablas y 5 esquemas; asimismo, se reportan 184 referencias bibliográficas.

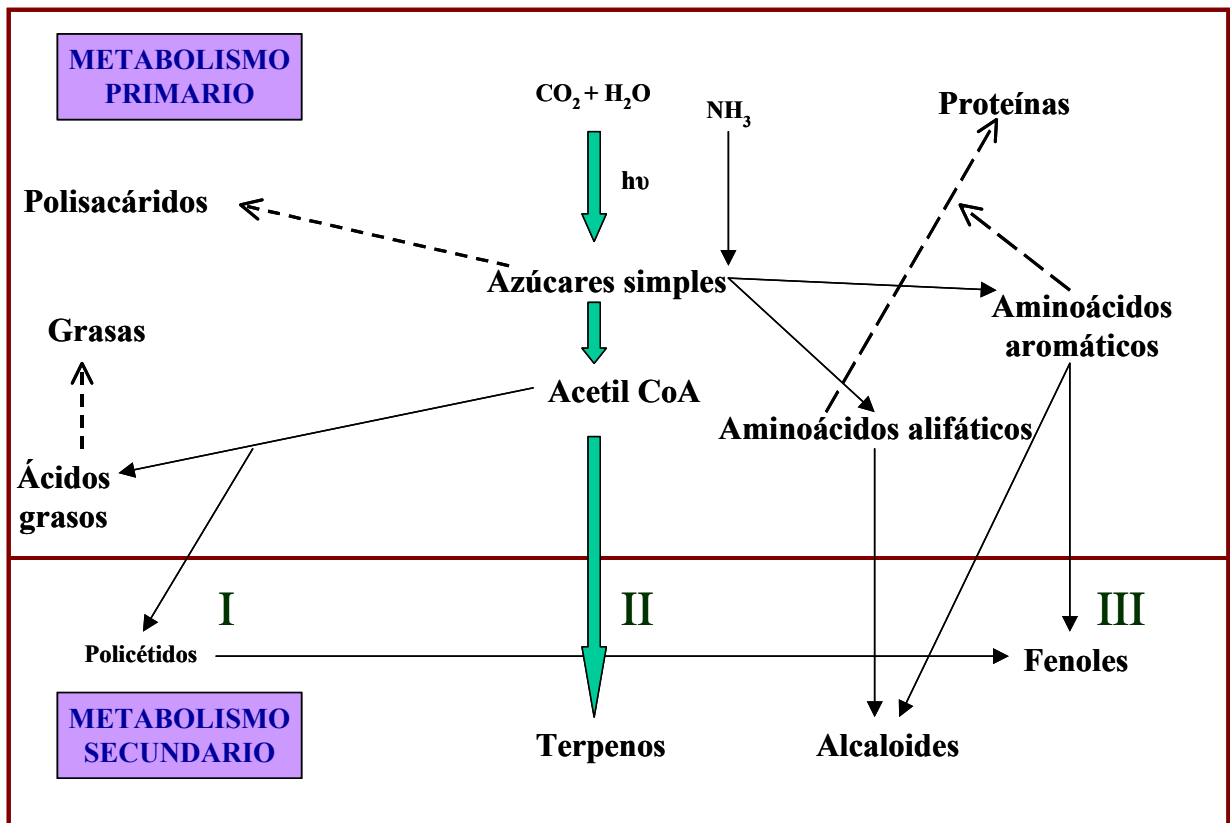
## 1. ESTADO DEL ARTE

### 1.1. LOS ACEITES ESENCIALES Y SUS PRINCIPIOS ACTIVOS

Los AEs son producidos por la mayoría de las plantas aromáticas; son mezclas orgánicas complejas, compuestas principalmente, por hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpénicos [26] de fórmula general  $(C_5H_8)_n$ , fenoles [33, 47] y sus derivados oxigenados [16, 23, 69, 112], y alcaloides [111, 170]. Este grupo de compuestos se llama “metabolitos secundarios volátiles” de las plantas y comprende una serie de compuestos responsables por los “olores característicos” [135], que también proporcionan a la planta sus propiedades culinarias, medicinales, y, a veces, venenosas [5, 60, 75, 82]. Las funciones de los AEs en las plantas están relacionadas con su metabolismo, fotosíntesis, transpiración y mecanismo de defensa. Los AEs son sintetizados por el citoplasma de la célula vegetal; luego, se transfieren a las vacuolas, las cuales los excretan al exterior originando una fragancia que posiblemente atraerá los insectos, facilitando así la polinización en la planta [60].

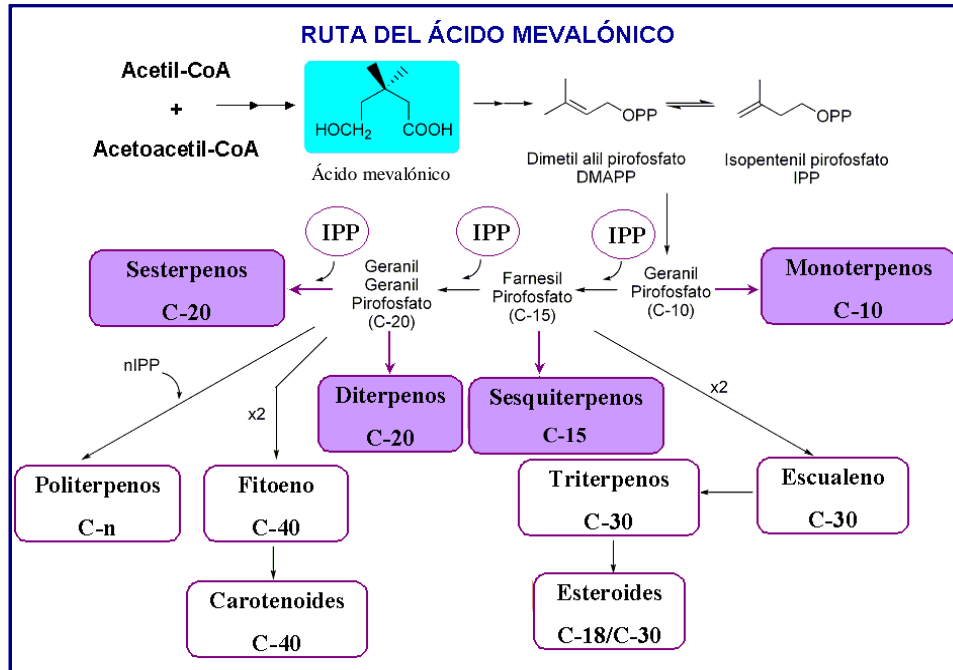
El olor característico de ciertas plantas se debe principalmente a sus componentes volátiles mayoritarios y su combinación única, pero no para todos los casos. Algunos compuestos a nivel de trazas, aún no identificados en algunos AEs, pueden incidir de manera significativa sobre el olor, el sabor y la actividad biológica de una planta [162]. Los terpenos constituyen un amplio grupo de los metabolitos secundarios; son biomoléculas formadas por unidades isoprénicas  $[CH_2=C(CH_3)CH=CH_2]$ , razón por la cual son a menudo llamados isoprenoides [25, 90, 158, 163, 165].

Para cada grupo de compuestos, que se encuentra entre los diferentes metabolitos secundarios hay varias rutas metabólicas (Véase **Figura 1**).



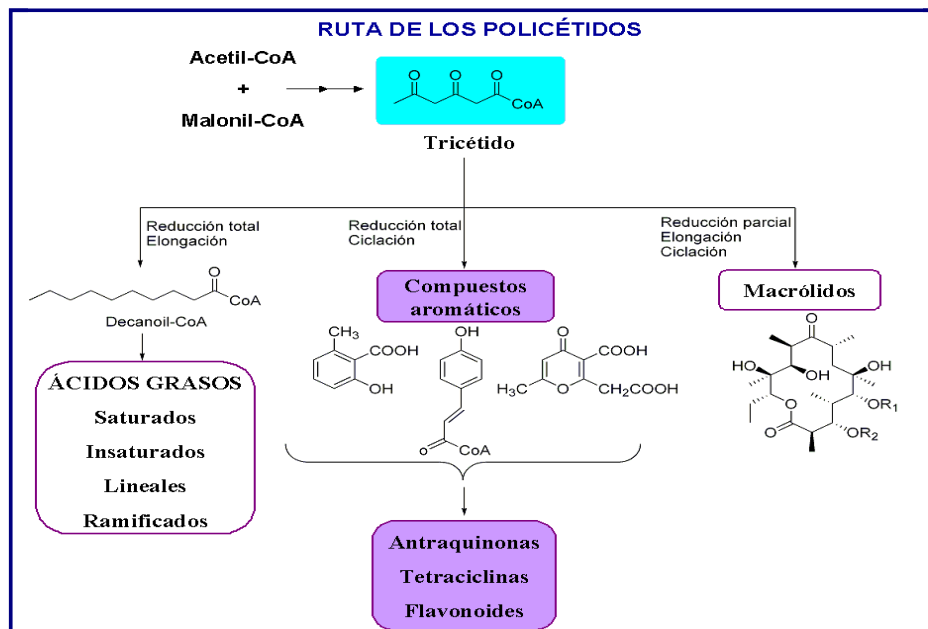
**Figura 1.** Rutas de biosíntesis de los metabolitos de las plantas. I. Ruta del acetato-malonato; II. Ruta del acetato-mevalonato; III. Ruta del ácido shikímico [16].

Para el caso de los terpenos, esteroides y carotenoides, está la ruta del ácido mevalónico. Tres moléculas de acetil-CoA se unen para formar el ácido mencionado, que tras sufrir fosforilación y descarboxilación, forma el pirofosfato de isopentenilo (Véase **Figura 2**) [16, 46, 111, 146].



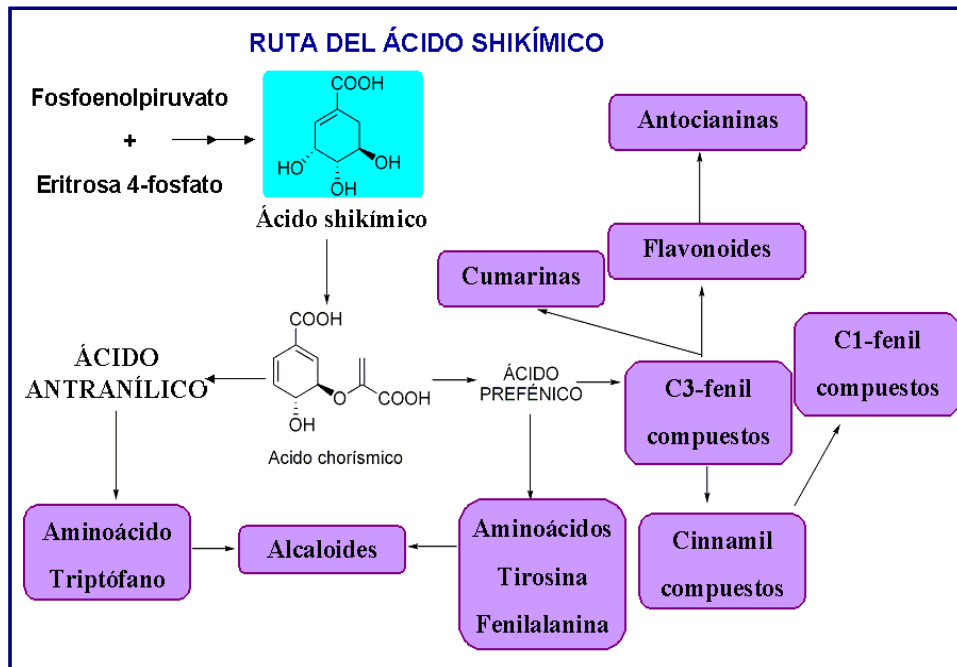
**Figura 2.** Ruta del ácido mevalónico [46]

En la ruta del acetato-malonato (ruta policética) se forman los policétidos (acetogeninas) y ácidos grasos a partir del malonato y acetato (Véase **Figura 3**) [16, 46, 146].



**Figura 3.** Ruta del acetato-malonato [46].

Finalmente, la ruta del ácido shikímico forma a partir de él los aminoácidos y desde ellos los otros compuestos aromáticos más complejos (fenilpropanoides, flavonoides, alcaloides) (Véase **Figura 4**) [16, 46, 146].



**Figura 4.** Ruta del ácido shikímico [46].

### 1.1.1. Aceites esenciales usados como fármacos

Una de las explicaciones para el uso de los AEs como fármacos, es que estas sustancias volátiles inhaladas o aplicadas sobre la piel actúan por medio de su fracción lipofílica con las partes lipídicas de las membranas celulares, y como resultado, pueden modificar la actividad de las emisiones del ión calcio [31], entre otros mecanismos de acción. A determinadas cantidades suministradas, los AEs saturan las membranas y muestran efectos similares a los analgésicos locales [31]. Estudios realizados por Buchbaver y Jirovetz (1994) [31], describen los efectos fisiológicos sobre el hombre, incluyendo estimulación cerebral, sedante para aliviar la ansiedad y depresión, así como el incremento del flujo sanguíneo cerebral. Los autores reportan también los posibles efectos de los AEs inhalados sobre la cognición, la memoria y el humor.

Los componentes de las fragancias son absorbidos por inhalación y son capaces de atravesar la barrera sanguínea cerebral e interactuar con los receptores del sistema nervioso central. Los bioensayos usados para la descripción y la explicación de la acción de los AEs, muestran generalmente, que éstos penetran la piel y actúan sobre las proteínas musculares, entre otros receptores [4, 63]. Los beneficios para salud promovidos por los monoterpenos, diterpenos y tetraterpenos, fueron recientemente revisados y discutidos por Wagner y Elmadfa [176]. Estos autores dedicaron especial atención a los diferentes modos de acción de los terpenos, particularmente, en prevenir el *stress* oxidativo, deficiencia carcinogénica y cardiovascular.

## **1.2. Familia *Verbenaceae* y género *Lippia***

Las plantas de la familia *Verbenaceae*, que incluye el género *Lippia* (con más de 300 especies de hierbas, arbustos y pequeños árboles), han sido estudiadas con insistencia, debido a la marcada variabilidad composicional que presentan sus AEs y, sobre todo, su muy diversa bioactividad. Además, la familia *Verbenaceae* constituye gran parte de la riqueza floral colombiana, y de Sur América [22, 90, 159, 184]. La aplicabilidad en diferentes industrias como aromatizantes, agentes de *flavour*, y/o principios activos en preparados farmacológicos, cosméticos, perfumes y aditivos en alimentos, entre otros, hace de la familia *Verbenaceae* un modelo de estudio químico, bioquímico y farmacológico [159]. Las plantas del género *Lippia* crecen de una forma nativa y salvaje en Suramérica, Centroamérica y, en algunos lugares de África tropical [29, 68, 129]; son utilizadas tradicionalmente como preparados gastrointestinales, remedios respiratorios, y alimentos [29, 50, 80]. Algunas especies de *Lippia* han mostrado actividades antimalarica, antiviral y citostática [129].

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

El “Prontoalivio” (nombre vernáculo de *Lippia alba*), es una planta de gran interés en el mercado nacional e internacional. La planta tiene una altura no superior de

1.5 m, sus hojas son opuestas y finamente dentadas, los tallos son leñosos, tiene ramas largas y arqueadas, y crece en lugares de alta luminosidad y altitudes entre 0 y 1100 m.s.n.m [20, 22]. Sobre esta especie se conocen sus aspectos botánicos y algunos agrotecnológicos [6], la planta presenta productividad alta de biomasa y suscita un creciente interés científico. Su AE ha sido caracterizado y se ha encontrado en uno de los quimiotipos de *L. alba* el contenido alto de carvona, particularmente, en las plantas cultivadas en Colombia [56, 159], donde se encuentra ampliamente distribuida en el sur de Bolívar, Amazonas, Guajira, Santander y Magdalena [22, 80, 159].

#### **1.2.1.1. Usos etnofarmacológicos**

La planta se utiliza en la preparación de infusiones de hojas y flores, maceraciones o como cualquier tipo de pasta para la hipertensión, para trastornos digestivos en Brasil [80]. También las hojas machacadas se usan en México para inducir el sueño, o acelerar la recuperación posparto [80]. En Panamá los extractos etanólicos de *L. alba* se emplean en fricciones contra el resfriado [80], mientras que en Costa Rica para la congestión de las vías respiratorias [20, 22]. También se usa en Colombia como medicamento para la diabetes y como diaforética y emenagoga [22, 80].

#### **1.2.1.2. Composición química**

La planta se caracteriza por un intenso y penetrante olor; contiene de 0.1 a 1.2% de aceite volátil [159]. La composición química del AE de *L. alba* depende sensiblemente del origen geográfico de la planta, de las condiciones de cultivo, la edad, la parte de la planta empleada para la extracción y de otros factores geobotánicos [85, 159]. La *L. alba* presenta gran variedad de quimiotipos en diferentes partes del mundo como Colombia [159], Guatemala [149], India [17, 18], Brasil [184] y Cuba [134].

Uno de los ejemplos más relevantes que muestra cómo incide el factor geográfico sobre la composición química del AE de *L. alba*, es el trabajo realizado por Zoghi y colaboradores (Véase **Tabla 1**), quienes identificaron 3 quimiotipos de *L. alba* en 3 municipios de Brasil [184].

**Tabla 1.** Resultados del estudio realizado por Zoghi y colaboradores [184].

Tipo de variedad	Municipio	Compuestos mayoritarios
QUIMIOTIPO I	Santa María	Cineol (35%) Limoneno (32%) Carvona (8.6%)
QUIMIOTIPO II	Belterra	Limoneno (32%) Carvona (32%) Mirceno (11%)
QUIMIOTIPO III	Chaves	Geranial (23%) Neral (14%) Germacreno D (25%)

En la **Tabla 2**, se presentan algunos de los reportes realizados sobre el AE de esta especie.

### 1.2.1.3. Actividades biológicas y farmacológicas del aceite esencial y los extractos de *Lippia alba*

Un gran número de estudios realizados confirman las múltiples aplicaciones biológicas, antioxidantes y farmacológicas de los AEs y extractos de *L. alba*. Uno de ellos es la evaluación de la actividad antiviral de *Herpes simple* tipo I, usando extractos de 12 plantas obtenidos en diclorometano y etanol. Los extractos de las plantas en etanol que presentaron mayor poder de inhibición fueron *Eugenia jambos*, *Cistus populifolius*, *Chiranthodendron entadactylon*, *Tuberaria lignosa* y *L. alba* [3]. La **Tabla 3**, reúne la información sobre las actividades biológicas que han sido determinadas en el aceite y extractos de esta planta.

**Tabla 2.** Variación de la composición química de los aceites esenciales de *Lippia alba* provenientes de diferentes regiones geográficas y obtenidos por diferentes técnicas de extracción.

País	Técnicas de extracción	Compuestos mayoritarios
Brasil	Destilación con vapor	Cariofileno (24.3%), geranial (12.9%), neral (9.6%) y 2-undecanona (9%) [50]. Tres quimiotipos: Quimiotipo I: Citral (55.1%), $\beta$ -mirceno (10.5%) y limoneno (1.5%). Quimiotipo II: Citral (63.0%) y limoneno (23.2%); Quimiotipo III: Carvona (54.7%) y limoneno (12.1%) [173].
	Hidrodestilación	Nuevo quimiotipo: En el AE se encontró alto contenido de linalool. Después de propagar esta planta por seis partes diferentes de Brasil, las composiciones químicas de los AE fueron las mismas en todas las muestras y el análisis quiral mostró la presencia de S-(+)-linalool [152].
	SFE, variando presión y temperatura	Los valores de presión y temperatura utilizados fueron: 80 bar/313 K, 80 bar/323 K, 120 bar/313 K, 120 bar/323 K y 100 bar/318 K. Los resultados para la carvona fueron: 6.0; 6.3; 6.0; 1.8 y 5.6%, respectivamente. Para el limoneno sólo se reportaron 0.5% y 1.3% para 80 bar/313 K y 100 bar/318 K, respectivamente [29].
	Extracción con solvente (etanol)	El limoneno y la carvona no se encontraron en el extracto etanólico y se registró la presencia de el <i>trans</i> -cariofileno (0.9%) [29].
	Extracción Soxhlet con etanol	Los compuestos registrados fueron carvona (0.9%), $\beta$ -bourboneno (0.3%) y $\gamma$ -muuroleno (0.5%) [29].
	Percolaciones con etanol (Extractos líquidos)	Los extractos líquidos registraron compuestos como $\beta$ -cariofileno (33.9%), óxido de cariofileno (18.1%), neral (4.9%), geranial (7.1%), curcumeno (7.1%) y linalool (4.4%) [182].
	Destilación con vapor	Limoneno (44%) y piperitona (31%) [149].

Continuación **Tabla 2.**

<b>País</b>	<b>Técnicas de extracción</b>	<b>Compuestos mayoritarios</b>
Colombia	Hidrodestilación	Limoneno (32.60%), carvona (51.0%), piperitona (0.93%), piperitenona (1.47%), y biciclosesquifelandreno (7.3%) [159]. Carvona (40-49%), limoneno (16-32%), biciclosesquifelandreno (8-13%), piperitenona (5-8%), piperitona (2-3%) y $\beta$ -bourboneno (1-2%) [56]. Limoneno (32.60%), carvona (51.03%), piperitona (0.93%), piperitenona (1.47%) y biciclosesquifelandreno (7.34%) [38].
	MWHD	Limoneno (29.58%), carvona (57.21%), piperitona (1.23%), piperitenona (1.81%), y biciclosesquifelandreno (4.79%) [159].
	SDE	Limoneno (36.90%), carvona (45.06%), piperitona (0.8%), piperitenona (1.1%), y biciclosesquifelandreno (8.9%) [159].
	SFE (condiciones sub-críticas)	Limoneno (23.90%), carvona (40.48%), piperitona (1.00%), piperitenona (1.6%), y biciclosesquifelandreno (21.75%) [159].
	S-HS	Limoneno (77.34%), carvona (13.9%), piperitona (0.39%), piperitenona (0.31%), y biciclosesquifelandreno (2.15%) [159].
	P&T	Limoneno (62.7%), carvona (29.8%), piperitona (0.55%), piperitenona (0.43%), y biciclosesquifelandreno (1.14%) [159].
	HS-SPME	Limoneno (26.70%), carvona (15.45%), piperitona (0.3%), piperitenona (0.40%), y biciclosesquifelandreno (32.8%) [159].
Guatemala	Hidrodestilación (Los AEs de 16 plantas de <i>L. alba</i> fueron recolectados en diferentes partes de Guatemala)	Los AEs de 14 plantas contienen mircenona y <i>trans</i> -ocimenona como compuestos principales, mientras que en dos plantas se encontraron 1,8-cineol, neral y geranial. Esta correlación de plantas muestra una posible existencia de dos subespecies de <i>L. alba</i> en Guatemala [62].

Continuación **Tabla 2.**

<b>País</b>	<b>Técnicas de extracción</b>	<b>Compuestos mayoritarios</b>
Argentina	Hidrodestilación	<p><math>\beta</math>-Miraceno (1%), linalool (1%), mircenona (65%), borneol (12%), <math>\alpha</math>-terpineol (1%) y copaeno (2%) [142].</p> <p>El AE de varias plantas de <i>L. alba</i> cultivadas en diferentes zonas de Presidencia Roque Sáenz Peña, Argentina, se caracteriza por la presencia de citral (neral + geranial); a medida que la planta crece va adquiriendo predominancia en el linalool [141].</p> <p>Se compararon las composiciones químicas de los AEs de diferentes zonas vecinas a la capital de Corrientes y Sáenz Peña (Chaco), Argentina. Algunos de los lugares seleccionados y los compuestos identificados fueron: Lugar Perichón (verano): <math>\alpha</math>-pineno, mirceno, limoneno, tagetenona. Lugar Santa Ana I (verano): <math>\alpha</math>-pineno, mirceno, limoneno, 1,8-cineol, felandreno, tagetenona [143].</p>
India	Destilación con vapor	Linalool (65%), citral 4.8% y 1,8-cineol 1.9% [18].
Uruguay	Destilación con vapor	Linalool (55%) [108].

**Tabla 3.** Actividad biológica de los aceites esenciales y los extractos de *Lippia alba*.

<b>Formas de uso de la planta</b>	<b>Actividad específica</b>
AE obtenido por hidrodestilación. El componente mayoritario del AE fue la carvona (40%).	Se evaluó la actividad antibacteriana contra: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853, <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883, <i>Serratia marcescens</i> ATCC 8100, <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13088, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228, <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 7001 y <i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 19433. El AE presentó actividad sobre los gérmenes Gram positivos [134].

Continuación **Tabla 3.**

<b>Formas de uso de la planta</b>	<b>Actividad específica</b>
<p>AE de <i>L. alba</i> cultivada en Bucaramanga, Santander, obtenido por hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHD).</p>	<p>Se evaluó la actividad antioxidante <i>in vitro</i> de <i>L. alba</i>, la cual mostró un efecto protector medido en un sistema lipídico modelo (emulsión del ácido linoleico). Se realizó un estudio comparativo de la actividad antioxidante de los AEs de <i>L. alba</i>, <i>Lantana camara</i> y <i>Aloysia tripillia</i>, encontrando que el AE de <i>L. alba</i> es el segundo más activo después del AE de <i>Lantana camara</i> [159].</p>
<p>AEs de tres quimiotipos de <i>L. alba</i>. Quimiotipo I: Citral (55.1%) y <math>\beta</math>-mirceno (10.5%); quimiotipo II: Citral (63,0%) y limoneno (23.2%); y quimiotipo III: Carvona (54.7%).</p>	<p>Se estudiaron los efectos de los AEs de tres quimiotipos de <i>L. alba</i> sobre la actividad locomotora de ratas; para los tres casos se presentaron efectos ansiolíticos y sedativos. La carvona y el limoneno fueron los compuestos activos y, probablemente, responsables por los efectos observados con el quimiotipo III [173].</p>
<p>AEs de las hojas y tallos de <i>L. alba</i>.</p>	<p>Los AEs presentaron actividad contra hongos fitopatógenos: <i>Dreschlera oryzae</i>, <i>Fusarium moniliforme</i> y contra insectos de granos almacenados [129].</p>
<p>AEs de hojas de dos quimiotipos de <i>L. alba</i>. Quimiotipo I: Citral y mirceno; Quimiotipo II: Carvona.</p>	<p>Se estudiaron los efectos antinociceptivos sobre ratas de los AEs de <i>L. alba</i>, los cuales presentaron efectos espasmolíticos y anticonvulsivos con dosis de 100 mg/kg. Ambos quimiotipos de <i>L. alba</i> mostraron efectos antinociceptivos similares [175].</p>
<p>Extractos etanólicos de <i>L. alba</i>.</p>	<p>Se evaluó en perros la actividad citotóxica sobre bacterias. Los extractos presentaron actividad contra <i>Trichophyton mentagrophytes</i>, <i>Candida albicans</i> y <i>Neurospora crassa</i> [129].</p>

Continuación **Tabla 3.**

<b>Formas de uso de la planta</b>	<b>Actividad específica</b>
<p>AEs de dos especies de <i>Lippia</i>; <i>Lippia alba</i> “erva-cidreira” y <i>Lippia alba</i> “carmelitana”, obtenidos por hidrodestilación.</p>	<p>Se evaluó de la actividad antimicrobiana de los hongos: <i>Candida albicans</i> Serotype BATCC 36802, <i>Candida albicans</i>, <i>Candida parapsilosis</i>, <i>Candida guilliermondii</i>, <i>Cryptococcus neoformans</i> T1-444 Serotype A, <i>Trichophyton rubrum</i> T544, <i>Fonsecaea pedrosoi</i> 5VPL y en las bacterias <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA. Los AEs de las dos especies fueron activos en todos los ensayos con los microorganismos estudiados [124].</p>
<p>Extractos etanólicos de las hojas de <i>L. alba</i>.</p>	<p>Los extractos de las hojas de <i>L. alba</i> (2.1 mg extracto/ mL etanol) fueron estudiados para el desarrollo de drogas contra deficiencias cognitivas ocasionadas por la enfermedad degenerativa de Alzheimer. Éstos inhibieron en 12% la actividad de la acetilcolinesterasa [169].</p>
<p>Extractos etanólicos de <i>L. alba</i>. Los componentes principales de los extractos etanólicos de <i>L. alba</i> fueron: <math>\beta</math>-cariofileno (33.9%), óxido de cariofileno (18.1%), citral (neral, 4.9% y geranial, 7.1%), curcumeno (7.1%) y linalool (4.4%).</p>	<p>La fracción no volátil de los extractos etanólicos de las hojas de <i>L. alba</i> se evaluó sobre el sistema nervioso central (CNS) de ratas. Las dosis suministradas por vía oral fueron de 200 mg por cada kilogramo de peso de la rata. Los extractos de <i>L. alba</i> se realizaron en 40, 60 y 80% (v/v) de etanol. El extracto al 80% (v/v) en etanol, presentó efectos sedantes y relajantes [182].</p>
<p>Infusiones de <i>L. alba</i>.</p>	<p>Los estudios farmacológicos realizados con las infusiones de <i>L. alba</i> no mostraron actividad sedante o hipnótica en ratones [129]. Se reportaron efectos anticonvulsantes y citostáticos [129]. Las infusiones de <i>L. alba</i> se suministraron oralmente a las ratas y no presentaron irritación gástrica durante cinco días consecutivos. Adicionalmente, las infusiones mostraron efectividad en la prevención de la úlcera gástrica inducida por la indometacina en las ratas [130].</p>

Continuación **Tabla 3.**

<b>Formas de uso de la planta</b>	<b>Actividad específica</b>
Maceración hidroalcohólica de las hojas de <i>L. alba</i> .	Estudios de la actividad antibacteriana <i>in vitro</i> , realizados en Guatemala demostraron que los extractos de <i>L. alba</i> tienen actividades antimicrobianas destacables, contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>S. Pyogenes</i> , <i>Salmonella typhi</i> y <i>Candida albicans</i> [129].
Extractos de seis plantas de la flora tropical brasilera, incluidos extractos <i>L. alba</i> en diferentes solventes.	Se estudiaron las actividades antivirales de: <i>Cuphea carthagenensis</i> , <i>Tillandsia usneoides</i> , <i>Bromelia antiacantha</i> , <i>Araucaria angustifolia</i> , <i>Wibbrandia ebracteata</i> y <i>L. alba</i> , en dos tipos de virus: <i>Herpes simple</i> Tipo I (HSV-1) y <i>Poliovirus</i> tipo II (PV-2). Los extractos de <i>L. alba</i> en <i>n</i> -butanol reportaron inhibición del HSV-1. Además, sólo los extractos de <i>L. alba</i> en acetato de etilo mostraron actividad anti- <i>Poliovirus</i> [10].
AEs de <i>L. alba</i> . Componentes mayoritarios: citral, mirceno y limoneno.	Se realizaron pruebas sobre las actividades locomotoras de las ratas y se encontró que el citral, mirceno y limoneno presentaron efectos sedativos y relajantes. Además, suministrados en dosis altas en ratas, éstas mostraron un aumento en su tiempo de descanso. Adicionalmente, no se observaron efectos ansiolíticos, pero en dosis bajas se pusieron de manifiesto efectos anxiogénicos leves [172].
Extractos etanólicos y AEs de hojas y tallos de 35 plantas cultivadas en Brasil, obtenidos por hidrodestilación. Los compuestos principales del AE de <i>L. alba</i> fueron linalool (76.6%), 1,8-cineol (2.3%) y <i>trans</i> - $\beta$ -cariofileno (1.9%).	Se evaluó la actividad anti- <i>Candida albicans</i> y se obtuvieron los siguientes resultados: los AEs de (13 plantas): <i>Aloysia triphylla</i> , <i>Anthemis nobilis</i> , <i>Cymbopogon martini</i> , <i>Cymbopogon winterianus</i> , <i>Cyperus articulatus</i> , <i>Cyperus rotundus</i> , <i>Mentha arvensis</i> , <i>Mikania glomerata</i> , <i>Mentha piperita</i> , <i>Mentha sp.</i> , <i>Stachys byzantina</i> , y <i>Solidago chilensis</i> , incluyendo <i>L. alba</i> , mostraron actividad anti- <i>Candida</i> . Los extractos etanólicos no mostraron actividad en ninguna de las concentraciones experimentales ensayadas [164].

### 1.3. Carvona

La carvona,  $C_{10}H_{14}O$ , es un monoterpeno oxigenado quiral de gran interés por sus diversas aplicaciones, entre las cuales se ha reportado su uso como ingrediente importante de fragancias y aromas, agente antimicrobial, indicador bioquímico ambiental, así como su empleo en el campo de la medicina, entre otros [34, 35, 78, 98].

Es un compuesto no-irritante, no-sensibilizante, no-hepatotóxico; algunos trabajos reportan que la dosis letal media ( $LD_{50}$ ) de este compuesto en ratas es 1,64 g/kg [91, 168]. La carvona puede obtenerse de formas sintética [83] y natural [38] por diferentes rutas. Algunos de los trabajos que reportan su producción fueron realizados por Carvalho C.C.R. *et al.* [36, 37], en los cuales utilizaron células *Rhodococcus opacus* PW4 en el metabolismo del limoneno, teniendo en cuenta el tipo y la concentración de carbono usado para el crecimiento de las células [37]; y células de *Rhodococcus erythropolis* DCL14 en la deshidrogenación de carveol para llevar a cabo la oxidación de (+)-*cis* y (-)-*trans*-carveoles a (+)- y (-)-carvonas, respectivamente [36].

#### 1.3.1. Fuentes naturales de la carvona

La fuente natural de la carvona son las semillas de alcaravea (*Carum carvi* L.), las cuales han sido usadas como saborizantes en panes (e.g. pan de centeno), quesos, salsas, licores (e.g. *German Kümmel*), en medicina alternativa (como laxantes, tratamientos menstruales). Además, la carvona aislada de esta planta se usa para cosméticos, pastas dentales, confiterías (e.g. chicles) y preparaciones farmacéuticas [35]. En los frutos de *Carum carvi* L. la actividad enzimática en la biosíntesis de los monoterpenos; limoneno y carvona, fue reportada por Bouwmeester, H.J. *et al.* [28]. Estudios sobre las limitaciones fisiológicas en la producción de carvona en el AE de esta planta, se realizaron en el fruto de la

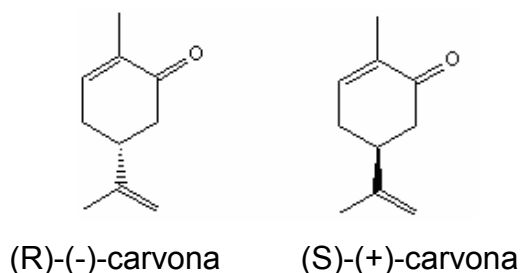
alcaravea midiendo el diámetro radial y tangencial de dos tipos de ductos en el pericarpio y estimando su longitud [30].

Otra de las fuentes de la carvona es eneldo (*Anethum graveolens*) [19, 35, 93], que presenta propiedades antiespasmódicas, carminativas, estomáticas y emenagogas y se usa como saborizante en tortas y pasteles, sopas, ensaladas, patatas, carnes y salmueras. Las semillas de eneldo tienen 2.3-3.5% de AE, con 40-60% de carvona [35]. Por su parte, la espermentina contiene un 60-70% de S-(+)-carvona y de 8-15% de limoneno [35].

Finalmente, la especie *Lippia alba*, quimiotipo colombiano, presenta como constituyentes principales carvona y limoneno [38, 56, 159]. Esta especie ha sido cultivada en diferentes regiones de nuestro país y se han reportado estudios de actividades biológicas y antioxidantes [159]. En el Laboratorio de Cromatografía de la UIS se realizó un trabajo de investigación en el cual se aisló la carvona presente en la planta de *L. alba* mediante derivación química selectiva del AE obtenido por hidrodestilación con un rendimiento del 0.39% [38].

### **1.3.2. Formas enantioméricas de la carvona**

En la **Figura 5** se presentan las dos formas enantioméricas de la carvona: la R-(-)-carvona, que se encuentra en el AE de espermentina (*Menta spicata*) [57, 78, 99, 116] y la S-(+)-carvona, constituyente principal de los AEs de alcaravea (*Carum carvi* L.) [78, 168] y eneldo (*Anethum graveolens*) [78, 93, 168]. Los dos enantiómeros poseen diferentes aromas y efectos fisiológicos [49, 78, 113, 115, 180]. Uno de los estudios más interesantes de estos enantiómeros en el desarrollo de nuevos fármacos contra el cáncer es el realizado por Carter R. *et al.* [34], quienes reportan la síntesis estereoselectiva de la eleuterobina (agente antitumoral de origen marino), siendo la (+)-carvona parte de los reactivos para su producción.

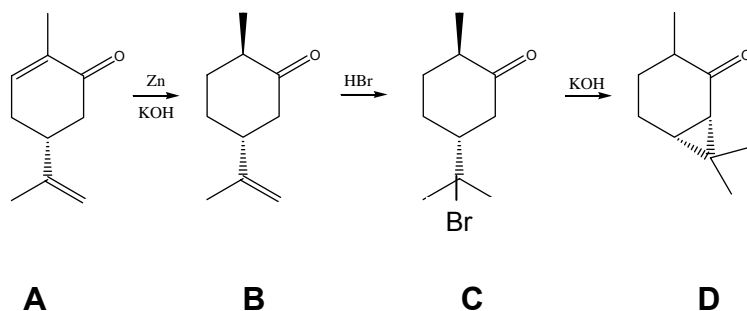


**Figura 5.** Estructuras de los isómeros ópticos de la carvona.

### 1.3.3 Aplicaciones de la carvona

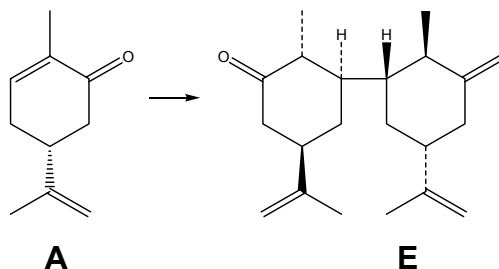
Su uso más amplio está en las aplicaciones culinarias y se reportan propiedades estimulantes, carminativas y antiespasmódicas [35]. La carvona es uno de los compuestos quimiopreventores que ha presentado interés para las industrias farmacéutica y alimenticia [121, 126].

La carvona se emplea industrialmente en la elaboración de la goma de mascar, fabricación de jabones y en la preparación de cremas dentales [20]. A nivel de laboratorio se ha usado en la síntesis de la carona (Véase **Figura 6**), por medio de su reducción con zinc, formando la dihidrocarvona **B**, que luego, en presencia de ácido bromhídrico, forma **C**; finalmente, por eliminación del bromo se obtiene la carona **D** [13].



**Figura 6.** Síntesis de la carona a partir de la R(-)-carvona. **A.** R(-)-Carvona; **B.** Dihidrocarvona; **D.** Carona.

En la **Figura 7** se presenta la reacción colateral que conduce a la síntesis de la  $\alpha$ -dicarvelona **E**, como subproducto en la reducción de la R-(-)-carvona **A** [13].



**Figura 7.** Producto colateral formado durante la síntesis de la carvona: **A.** R-(-)-Carvona; **E.**  $\alpha$ -Dicarvelona.

La carvona tiene aplicaciones interesantes como insecticida contra la mosca *Drosophila melanogaster* en las frutas, además, posee actividades antibacteriales, antimicrobianas y genotóxicas [8, 35, 65]. También se llevó a cabo el estudio de la percepción de olores en humanos, que involucró 6 micos y 10 personas para evaluar la habilidad de distinguir entre 10 pares de enantiómeros; ambos reconocieron claramente algunos isómeros ópticos. De este modo, se indica, que el reconocimiento quiral de enantiómeros volátiles es característico para algunas sustancias, e.g. en ambos grupos, la isomería óptica de la carvona fue nítidamente reconocida [97, 105].

#### 1.3.4. Actividad biológica de carvona

La S-(+)-carvona fue reportada como inhibidor de gérmenes en papas [98, 125]. También mostró actividad antifúngica contra *Fusarium sulphureum*, *Phoma exigua* var. *foveata* y *Helminthosporium solana* [98]. Además, estudios de bioactividad *in vitro* mostraron, que los dos isómeros ópticos de la carvona fueron efectivos contra un gran número de bacterias y hongos patógenos presentes en humanos [35]; la carvona muestra actividad inhibitoria contra *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* [84].

### 1.3.5. Estudios clínicos de carvona

Se han realizado estudios médicos con ratas, donde se evalúa el efecto de la carvona sobre el sistema nervioso central (CNS) [53] y en la percepción de olores [11, 154]. También se ha estudiado su influencia sobre las células LNCaP en personas con cáncer de próstata [42].

La carvona en cantidades grandes fue añadida a los alimentos y a formulaciones dentales, para investigar luego el camino metabólico en microsomas de ratas y de humanos [91]. Algunas aplicaciones de la carvona en productos dentales se reportan en la patente de Hiroshi *et al.*, quien describe una mezcla de ácido tranexámico con la carvona, mejorando con ello la composición de muchos productos dentales como pastas y enjuagues bucales, ya que con especies como mentol y eucalipto no se lograba eliminar el sabor amargo producido por el ácido tranexámico [87].

### 1.3.6. Nuevos fármacos a partir de carvona

El uso de la carvona en la síntesis orgánica está influenciado por la búsqueda sistemática de nuevos fármacos con estructura terpenoide, algunos con relevancia médica. El centro estereogénico de la carvona tiene un grupo isopropenilo como sustituyente, el cual puede ser oxidado a alcohol y grupos funcionales ácidos [35].

Algunos de los estudios reportados para los enantiómeros (4R)-(-)-carvona y (S)-(+)-carvona se presentan en la **Tabla 4**.

**Tabla 4.** Estudios farmacológicos de los enantiómeros (R)-(-)-carvona y (S)-(+)-carvona.

Autor	Tipo de estudio
Abad <i>et al.</i> [2]	Síntesis de compuestos a partir de (4R)-(-)-carvona.
Abad <i>et al.</i> [1]	Síntesis de compuestos a partir de (4R)-(-)-carvona.
González <i>et al.</i> [73]	Síntesis de compuestos a partir de (4R)-(-)-carvona.

Continuación **Tabla 4.**

Pinheiro <i>et al.</i> [133]	Biotransformaciones de (4R)-(-)-carvona con monooxigenasa.
Srikrishna <i>et al.</i> [157]	Síntesis de compuestos a partir de (4R)-(-)-carvona.
Srikrishna <i>et al.</i> [156]	Síntesis de compuestos a partir de (4R)-(-)-carvona.
Blay <i>et al.</i> [27]	Síntesis de compuestos a partir de (4R)-(-)-carvona.
Karmakar <i>et al.</i> [96]	Síntesis de compuestos a partir de (4R)-(-)-carvona.
Shing <i>et al.</i> [151]	Síntesis de compuestos a partir de (4R)-(-)-carvona.
García <i>et al.</i> [66]	Fotoionización de la R-(-)-carvona.
Pogrebnoi <i>et al.</i> [137]	Síntesis de compuestos a partir de la (S)-(+)-carvona.
Hoffmann, G.G. [88]	Estudios de los isómeros rotacionales de la (S)-(+)-carvona.
Chattopadhyay, <i>et al.</i> [41]	Síntesis de compuestos a partir de (4R)-(-)-carvona.

#### 1.4. MECANISMOS DE EMISIÓN DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES DE LAS PLANTAS

La importancia de los estomas en la emisión de monoterpenos presenta gran controversia ya que, mientras que en algunos ensayos de laboratorio se ha observado que existe relación entre las emisiones y la conductancia estomática, en otros, la respuesta ha sido opuesta [21, 145, 167]. Algunos autores realizaron la medición de isopreno (Véase **Tabla 5**) y monoterpenos (Véase **Tabla 6**) en varias especies, y encontraron que no hay una influencia significativa de la conductancia estomática en los niveles de emisión. Otros experimentos realizados en hojas de otras especies, mostraron una emisión significativa por el lado adaxial que contiene los poros estomáticos (Véase **Tabla 7**).

**Tabla 5.** Medición de isopreno en varias especies.

Especie	Autores
<i>Quercus virginiana</i>	Tingey <i>et al.</i> , 1980 [166]
<i>Populus tremuloides</i>	Monson y Fall, 1989 [117]
<i>Eucalyptus globulus</i>	Guenther <i>et al.</i> , 1991 [77]
<i>Quercus alba</i>	Fall y Monson, 1992 [61]

Continuación **Tabla 5.**

<i>Populus fremonlii</i>	Fall y Monson, 1992 [61]
<i>Pueraria lobata</i>	Sharkey y Loreto, 1993 [150]

**Tabla 6.** Medición de monoterpenos en varias especies.

<b>Especie</b>	<b>Autor</b>
<i>Pinus eliottii</i>	Tingey <i>et al.</i> , 1980 [166]
<i>Eucaliptus globulus</i>	Guenther <i>et al.</i> , 1991 [77]
<i>Quercus ilex</i>	Loreto <i>et al.</i> , 1996 [110]
<i>Picea abies</i>	Staudt, 1997 [160]
<i>Pinus pinea</i>	Staudt, 1997 [160]

**Tabla 7.** Emisiones a través de poros estomáticos.

<b>Especie</b>	<b>Autor</b>
<i>Quercus virginiana</i>	Tingey <i>et al.</i> , 1980 [166]
<i>Platanus occidentaliss</i>	Tingey <i>et al.</i> , 1980 [166]
<i>Quercus rubra</i>	Loreto y Sharkey, 1990 [109]
<i>Eucaliptus globulus</i>	Guenther <i>et al.</i> , 1991 [77]
<i>Populus tremuloides</i>	Fall y Monson, 1992 [61]
<i>Quercus alba</i>	Fall y Monson, 1992 [61]
<i>Populus fremonlii</i>	Fall y Monson, 1992 [61]

#### **1.4.1. Movimientos estomáticos**

Muchos factores influyen sobre la apertura de los estomas; los estomas de la mayoría de los vegetales se abren al amanecer y se cierran en la oscuridad (Véase **Figura 8**). Por la mañana, cuando el suministro de agua es abundante y la radiación solar favorece la actividad fotosintética, la demanda por el CO<sub>2</sub> en el

interior de la hoja es grande, y los poros estomáticos están muy abiertos, disminuyendo la resistencia estomática a la difusión de  $\text{CO}_2$ . Por la noche, cuando no hay fotosíntesis y, por tanto, no existe demanda por el  $\text{CO}_2$  en el interior de la hoja, las aberturas estomáticas se reducen, impidiendo la pérdida innecesaria de agua [16, 146].

Los estomas se cierran más rápido si la planta es expuesta a oscuridad repentina. En casi todas las plantas el nivel mínimo de luz que se requiere para apertura estomática es de 1/1000 a 1/30 de luz solar plena, apenas lo suficiente para provocar algo de fotosíntesis neta. Niveles de irradiación superiores causan aperturas estomáticas mayores. Algunas plantas “suculentas” de climas cálidos y secos hacen lo contrario: abren sus estomas en la noche, y cierran sus estomas durante el día. Ésta es una estrategia apropiada tanto para absorber  $\text{CO}_2$  por los estomas en la noche como para mantener agua durante el calor del día [146].

Las bajas concentraciones de  $\text{CO}_2$  en las hojas también hacen que los estomas se abran. Incluso en la oscuridad, si se hace circular aire libre de  $\text{CO}_2$  a través de las hojas, entonces, los estomas, un poco abiertos, se abrirán más. Por el contrario, una concentración elevada de  $\text{CO}_2$  en las hojas puede provocar que los estomas se cierren parcialmente, lo cual sucede tanto en presencia de luz como en la oscuridad [146].

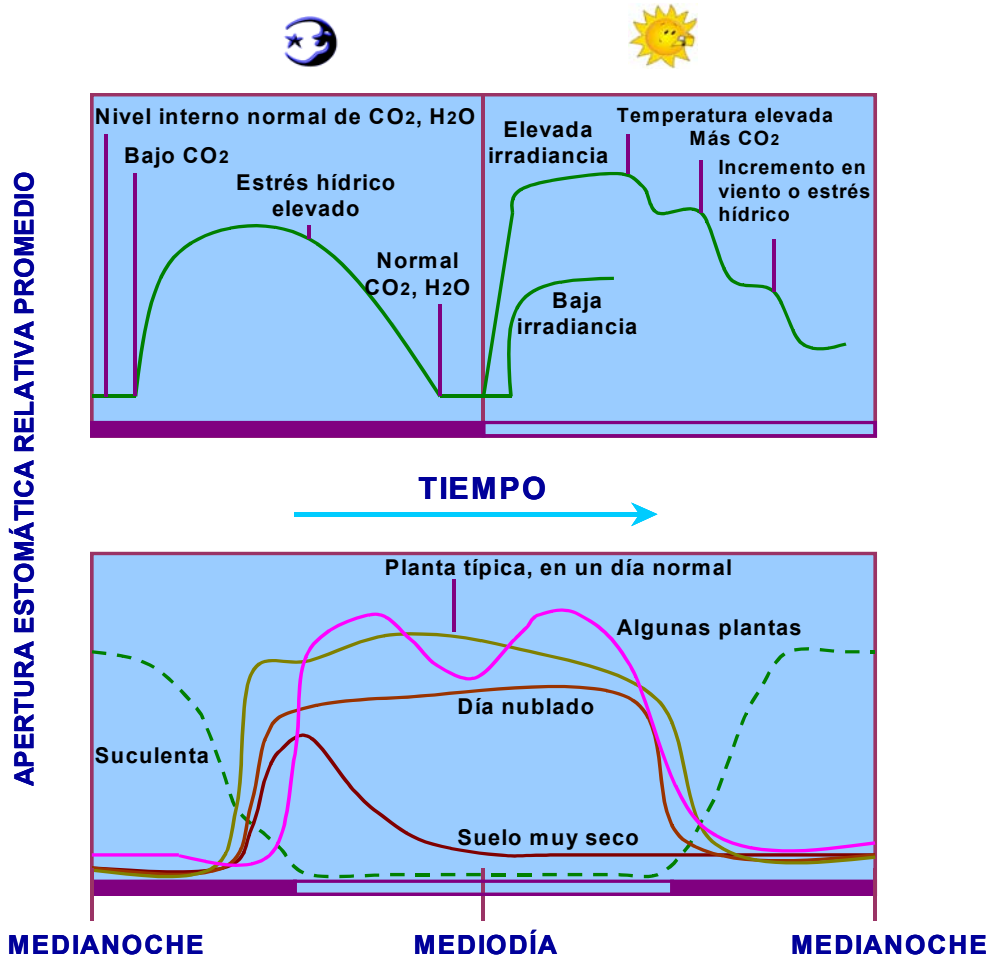


Figura 8. Respuesta estomática a varias condiciones del medio [146].

## 1.5. EFECTO DEL CLIMA SOBRE LAS PLANTAS MEDICINALES Y AROMÁTICAS

Las plantas crecen en un complejo ambiental, donde el factor de mayor impacto en la producción de metabolitos primarios y secundarios es el clima. Los siguientes factores influyen sobre la variación climática de una zona [32]: la intensidad lumínica, la temperatura, las precipitaciones, la velocidad y la intensidad del viento. La luz, es probablemente, el factor más importante, se relaciona estrechamente con la temperatura y depende de la estación del año y la hora del día [32].

### 1.5.1. Variables ambientales (luz, temperatura, humedad)

Muchos autores han encontrado que las emisiones de monoterpenos dependen solamente de la temperatura [76, 77, 79, 95, 104, 166]; en cambio, otros establecen la influencia de la luz y la temperatura [92, 118, 161]. En la actualidad, se acepta generalmente que el régimen de luz y temperatura experimentado por las hojas puede influenciar o incluso predeterminar su capacidad de emisión. Por ejemplo, en los bosques se ha observado que las hojas expuestas a niveles altos de radiación y temperatura tienen una mayor capacidad de emisión de monoterpenos que las hojas en la sombra [145]. En estudios realizados con plantas emisoras de isopreno, se ha demostrado, que el crecimiento bajo regímenes de luz-temperatura provoca un incremento en la capacidad de emisión [81, 106, 118, 150]. Asimismo, el crecimiento bajo condiciones de alta temperatura produce altas emisiones de isopreno. Algunas especies emisoras de isopreno mantenidas a baja temperatura no han emitido isopreno hasta que han sido expuestas a temperaturas más altas [102, 118, 150]. Para el caso de los monoterpenos, en un primer estudio reportaron que las temperaturas frías nocturnas incrementaban la emisión de los compuestos en la salvia (*Salvia officinalis*) [54].

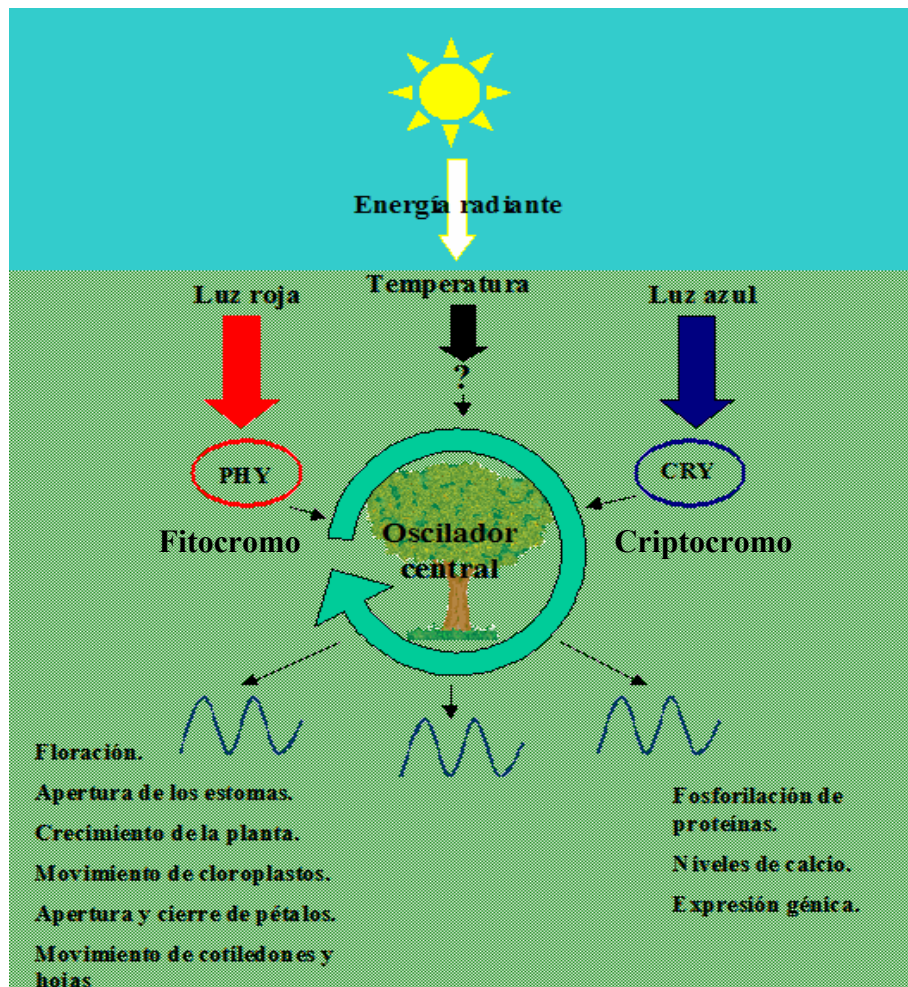
Con respecto a los monoterpenos, la independencia de la luz de sus emisiones es cuestionada por Yokouchi y Ambe [181] quienes demostraron que los cambios en emisión de *Pinus desinflora* en condiciones de temperatura constante, están íntimamente relacionados con la radiación solar. Juttner y Buffer [94] lograron mostrar, utilizando el  $^{13}\text{C}$ , una rápida proyección de los monoterpenos emitidos por los brotes de *Picea abies* durante el crecimiento y desarrollo de los nuevos brotes.

La humedad relativa del aire parece no afectar la emisión de monoterpenos, según concluyen en sus investigaciones Yokouchi y Ambe [181], Juuti *et al.* [95], Janson [92] y Guenther *et al.* [77], quienes estudiaron especies como el pino, picea y eucalipto. Sin embargo, otros estudios sugieren que la humedad ejerce leve pero

positiva influencia en la emisión, e.g. en la emisión de monoterpenos de salvia, menta y encina [51, 54, 110] y en la emisión de isopreno proveniente del eucalipto y del álamo [77, 117]. Se ha observado también un incremento significativo en la emisión de monoterpenos en el follaje húmedo de diversas coníferas y arbustos aromáticos [92, 160]. Este efecto puede estar relacionado con la hidratación de la cutícula de la hoja, aunque no se conoce el mecanismo exacto por el cual ocurre el aumento de la emisión.

## **1.6. ¿CÓMO LLEGA LA INFORMACIÓN DEL ESTADO DEL TIEMPO A LAS PLANTAS?**

La manera cómo las plantas distinguen la variación de la temperatura aún se desconoce a fondo [32, 183]. La energía luminosa es tomada por las células, la luz que se percibe por el reloj biológico de todos los sistemas biológicos, incluidas las plantas, pertenece a la región azul del espectro, sin embargo, los relojes circadianos vegetales también tienen la capacidad de percibir la energía luminosa del rojo al rojo lejano [32, 147]. La energía luminosa del exterior se recibe por los fotorreceptores como fitocromos (PHY) y criptocromos (CRY); la información del exterior es transmitida al oscilador central que es el encargado de medir la longitud del período de diversos procesos (tiempo de floración, movimiento de las plantas, etc) a través del control de otros (control de la expresión génica, etc) (Véase **Figura 9**) [32].



**Figura 9.** Representación esquemática del sistema circadiano en plantas [32].

## 1.7. CRONOBIOLOGÍA

La cronobiología es una ciencia joven que se ocupa de cuantificar e investigar los mecanismos de la estructura temporal biológica. Estos conceptos comenzaron a formalizarse sólo a mediados del siglo XX, comprobando lo que se sospechaba desde la antigüedad: todas las funciones fisiológicas, bioquímicas y comportamentales son periódicas [72, 139, 140].

El término cronobiología, es un neologismo que procede de los vocablos “*chronos*” (tiempo), “*bio*” (vida) y “*logie*” (ciencia). Esta ciencia incluye, entre otras, las siguientes disciplinas: cronofisiología, cronopatología y cronofarmacología, la cual, a su vez, comprende cronotoxicología y cronoterapia, siendo la cronofisiología una de las más importantes. Estas disciplinas, requieren métodos que pueden ser validados; la metodología empleada es la **ritmometría** [139].

## 1.8. RITMOMETRÍA

Un **ciclo** es una sucesión de acontecimientos que se dan de forma repetitiva, conservando el mismo orden sin tener en cuenta el tiempo en que tienen lugar. Cuando los ciclos ocurren de manera constante y previsible en un intervalo de tiempo, se habla de **ritmo** [107]. Los ritmos se clasifican en **endógenos** y **exógenos**, dependiendo si son o no generados por el propio organismo; y **circadianos**, **ultradianos** e **infradianos**, según su tiempo de duración [15, 48, 72, 107, 139].

Un ritmo se caracteriza por los siguientes parámetros [107, 139]:

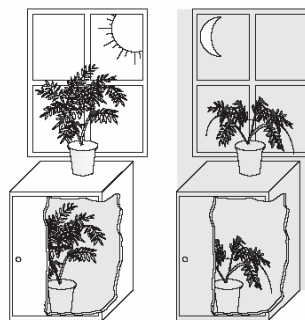
- **Período:** duración de un ciclo completo;
- **Frecuencia:** número de ciclos por unidad de tiempo;
- **Nivel medio (o mesor):** valor medio de la variable estudiada;
- **Amplitud:** diferencia entre el mesor y el valor máximo alcanzado por la variable durante el período;
- **Fase:** describe la relación entre dos o más ritmos.

## 1.9. RITMOS EXÓGENOS Y ENDÓGENOS

Desde muy temprano, en la historia, se reconocía en los seres vivos la existencia de ritmos de 24 h que se relacionan con los períodos de luz y oscuridad del ambiente. Los ritmos biológicos pueden haber surgido como respuesta a

determinadas variables ambientales cíclicas (exposición a la luz, variación de la temperatura, humedad, etc), que actúan como temporizadores o *zeitgebers* (del alemán “*Zeit*”, tiempo; “*Geber*”, dador) modelando en los organismos una representación endógena del tiempo externo [136, 139, 148].

Aproximadamente en el año 400 A.C., Andróstenes dio una de las primeras descripciones de ritmos biológicos, describiendo el movimiento de las hojas de *Tamarindos indicus*, que al igual que las hojas de muchas especies, presentaban una posición durante las horas del día (en general, casi horizontal) y otra hacia la mitad de la noche (casi vertical). En 1729, el astrónomo francés Jean Jacques d’Ortous de Mairan publicó sus observaciones sobre la actividad foliar de *Mimosa* sp., en plantas aisladas del ciclo luz-oscuridad, lo cual constituyó la primera descripción formal de un ritmo en ausencia de variaciones ambientales, sugiriendo su posible naturaleza endógena [43, 146, 148]. En la **Figura 10**, se observa la planta en su ciclo normal, sobre el mueble, turgente de día y flácida de noche, pero al colocarla al interior del mueble igualmente mantiene el mismo ciclo. Como estos movimientos no requerían de luz solar intensa durante parte del ciclo de 24 horas, se concluyó, que los movimientos eran controlados endógenamente [146, 148].



**Figura 10.** Experimento de Jean Jacques d’Ortous de Mairan [148].

Pasaron 30 años antes de que se confirmara su experimento, y 250 años antes de que se reconociera en general la existencia de un reloj endógeno. Para determinar las

causas endógenas de los ritmos, éstos se estudian en ausencia de variaciones ambientales, o sea, en condiciones constantes de exposición a la luz, oscuridad, temperatura, humedad, etc [146].

Colin Pittendrigh plantea el problema de la naturaleza exógena vs. endógena de los ritmos biológicos desde la perspectiva evolutiva, de modo que en sus orígenes los seres vivos se someterían al orden temporal impuesto por el ambiente, y, conforme evolucionaron "asimilando" el tiempo externo, dieron origen a su propia organización temporal. Así el correlato biológico-geofísico se explica por la impresión original del ambiente, mientras que sus diferencias se deben a las características particulares de las especies para adaptarse al medio ambiente [43].

Otra propiedad importante de los ritmos son los fenómenos fotoperiódicos, que ocurren especialmente en zonas donde las estaciones climáticas son muy marcadas. Ante la ocurrencia de un ambiente predecible, los organismos pueden realizar ajustes en sus funciones para anticiparse a períodos de condiciones desfavorables [43].

#### **1.10. RITMOS CIRCADIANOS**

Un ritmo circadiano es aquél que persiste con una periodicidad de aproximadamente 24 h bajo condiciones constantes, es decir, en ausencia de la señal externa originaria. El reloj se ajusta mediante señales ambientales tales como las variaciones de luz-oscuridad o temperatura que tienen lugar tanto al amanecer como al oscurecer y prepara a los organismos regulares en su ambiente, de manera que puedan anticipar su respuesta a unas condiciones que tendrán lugar en un momento concreto del día [32, 43].

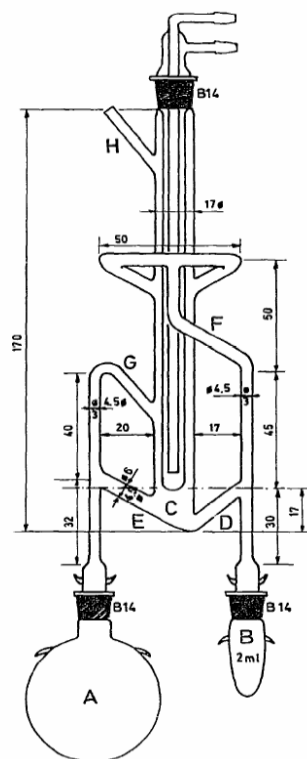
El reloj circadiano de las plantas controla un gran número de procesos biológicos. Los análisis realizados utilizando el genoma de *Arabidopsis thaliana* (planta modelo) muestran que el 11% de los genes presentan regulación diurna, mientras que entre un 2 y 6% de los genes de *Arabidopsis thaliana* presentan oscilación circadiana de los transcritos. Estos resultados sugieren que la expresión de un gran número de genes pudiera estar bajo control del reloj circadiano [32].

El reloj circadiano es vital para la sincronización de distintos procesos de desarrollo como la floración, donde el papel del reloj circadiano en el control de la floración está siendo exhaustivamente estudiado en la actualidad. Procesos tales como el movimiento de los cloroplastos, movimiento de las hojas y cotiledones, apertura de los estomas y la elongación del hipocotilo muestran todos ritmicidad circadiana en *Arabidopsis thaliana*. A nivel celular, las concentraciones citosólicas de calcio libre muestran ritmicidad circadiana [32, 43].

## **1.11. MÉTODOS DE OBTENCIÓN DEL EXTRACTO Y ACEITE ESENCIAL**

### **1.11.1. Destilación – extracción con solvente simultánea**

Este método fue introducido en 1966 por Likens y Nickerson [122], combinando simultáneamente la destilación con arrastre de vapor y la extracción con solvente. El diseño original de Likens y Nickerson ha sido sometido a varias modificaciones; Maarse y Kepner (1970, citado por Nuñez [122]) añadieron una camiseta de vacío al conducto de la matriz y un condensador con hielo seco; Groenen (1976, citado por Nuñez [122]) modificó los brazos laterales en “U” e introdujo “dientes” Vigreux en el conducto del solvente. Finalmente, Godefroot y colaboradores reportaron un método de análisis cuantitativo para AEs, basado en el sistema modificado de destilación - extracción con solvente simultánea, a microescala [71]. Este equipo, está diseñado de tal manera, que permite extraer cantidades considerables de componentes usando cantidad mínima de solvente.



**Figura 11.** Equipo de destilación – extracción con solvente simultánea [71].

En la **Figura 11** se muestra el equipo de destilación-extracción con solvente simultánea, que consta de dos balones separados y conectados por vías diferentes a un condensador. El primer balón (A) contiene el material vegetal y agua destilada, y el segundo (B), el solvente. El balón que contiene la muestra se calienta hasta 100°C en un baño con aceite durante dos horas, simultáneamente el balón que contiene el solvente se calienta a baño María a 70°C (en el caso del diclorometano) [122, 159].

### 1.11.2. Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas

La destilación es uno de los procedimientos más empleados para la obtención de AEs. Industrialmente la destilación se realiza en varias formas tales como destilación con agua o hidrodestilación, destilación con agua y vapor, y destilación con vapor directo. En Canadá, J. Paré y colaboradores [127, 128] patentaron la técnica de hidrodestilación asistida por microondas MWHD, utilizada para la

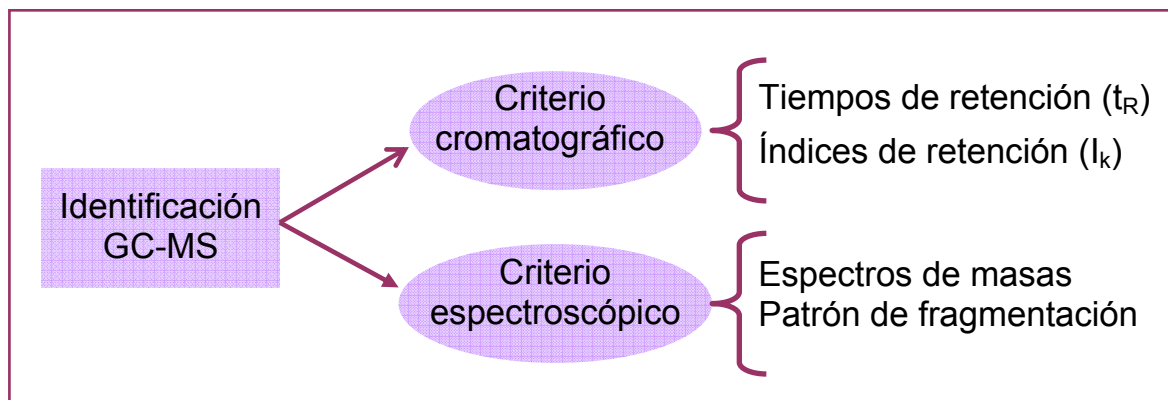
extracción de AEs. En el método modificado [159], el material vegetal se sumerge en agua (aproximadamente una tercera parte del material) en un equipo de destilación tipo *Clevenger* y se somete a la acción de la radiación de microondas, que al calentar el agua hasta ebullición produce vapores que atraviesan 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. La destilación termina cuando todo el aceite es liberado de las glándulas que lo contienen. Las ventajas con respecto a las técnicas de destilación tradicionales son la rapidez del proceso, economía y además, los AEs obtenidos se encuentran libres de productos de descomposición térmica y de contaminantes [56].

## 1.12. ANÁLISIS DE LOS ACEITES ESENCIALES Y LOS EXTRACTOS

La cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS) es una de las herramientas analíticas más importantes para el estudio de la composición de mezclas complejas obtenidas a partir de las plantas. Es un método adecuado para la identificación debido a que los componentes del aceite y extractos son compuestos volátiles y de bajo peso molecular (< 300 Da) [158, 159]. Los componentes de la esencia se separan en la columna cromatográfica y luego entran a la cámara de ionización del MS. Se registra el espectro de masas de cada uno de los compuestos separados. Los constituyentes del aceite se identifican con base en patrones de fragmentación, que se observan en sus MS [158].

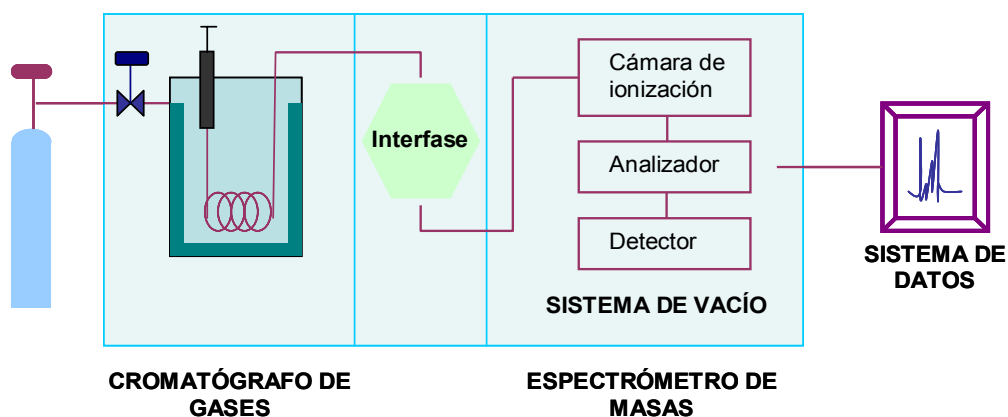
Para la identificación de los componentes de los aceites y extractos mediante GC-MS se emplean dos criterios tal como se describe en la **Figura 12** [74, 144]. Los  $t_R$  pueden ser “afectados” por diferentes variables, tales como: la técnica de inyección, las variaciones de temperatura o flujo de los gases, el diseño del equipo, entre otros. Por ello, ha sido necesaria la introducción de parámetros más

“reproducibles” como son los tiempos de retención relativos y los índices de retención de Kovàts (introducidos por E. Kovàts en 1958) [100, 138, 153, 158].



**Figura 12.** Criterios para la identificación de compuestos presentes en una mezcla.

El método GC-MS permite realizar en una sola operación, un análisis cualitativo junto con una indicación de las proporciones en las que se encuentran los componentes en un aceite, utilizando una muestra del orden de 1  $\mu\text{L}$ . Cuando se dispone de sustancias patrón, la calibración del equipo permite un análisis cuantitativo exacto de la muestra. La forma como las dos técnicas se acoplan, se puede observar en la **Figura 13** [114, 153].



**Figura 13.** Principales bloques de un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS).

### 1.13. ANÁLISIS DE MERCADO

El mercado mundial de productos y servicios provenientes de la biodiversidad está en un continuo crecimiento; en 1998 los productos naturales no maderables generaron US\$ 60 billones de dólares anuales, los extractos vegetales medicinales aportaron US\$ 16.5 billones de dólares y las drogas provenientes de plantas unos US\$ 30 millones de dólares [11]. El uso de la flora con fines comerciales es una interesante alternativa de desarrollo para Colombia. Sin embargo, su manejo debe garantizar sostenibilidad social, económica, ambiental, biológica y cumplimiento del derecho de propiedad intelectual. Para evaluar la viabilidad de comercialización de estos productos, se revisan comportamientos históricos de consumo, con los cuales, se construyen proyecciones a corto y mediano plazo, para obtener estimaciones de demanda de determinados productos [131]. La gran mayoría de las empresas colombianas que pertenecen al sector naturista podrían calificarse dentro del grupo de pequeñas y medianas empresas, pero, éste es uno de los sectores con mayores perspectivas de crecimiento [58].

#### 1.13.1. Mercado mundial de las plantas aromáticas

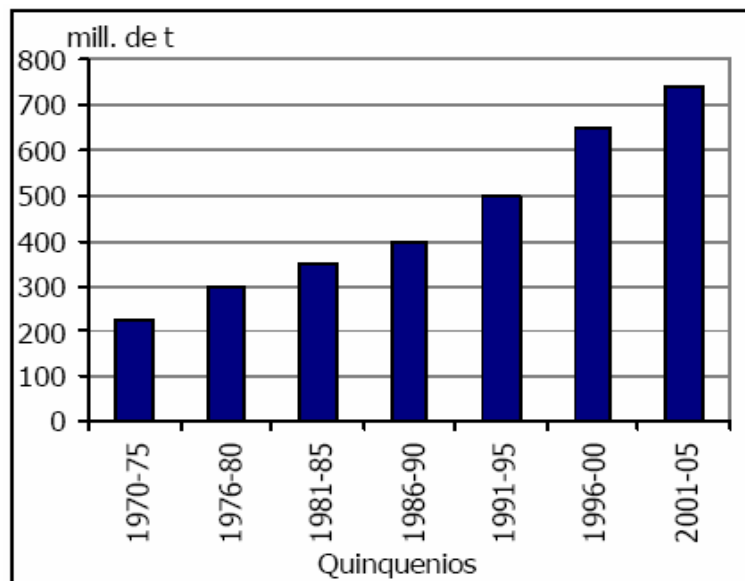
Tradicionalmente, la mayor parte de la producción de plantas aromáticas y medicinales ha estado concentrada en regiones con clima moderado o semitropical. Los principales mercados consumidores de plantas medicinales son: Alemania, China, Japón, Estados Unidos, Francia, Italia, Reino Unido y España. Dentro de los principales productores y exportadores de plantas medicinales se encuentran China, India, Indonesia, Nepal, Sri Lanka, Alemania, Brasil, Chile y Argentina [9, 58, 86, 132].

El comercio internacional de productos aromáticos ha venido experimentando un constante crecimiento a partir de los años 70 (Véase **Figura 14**). Esta expansión de la demanda se debe a diversos factores, entre los cuales figuran: **1.** Los

productos sintéticos no pueden sustituir satisfactoriamente todos los AEs; **2.** Los costos para la manufactura sintética de algunos AEs o sus componentes son más elevados que su obtención a partir de las fuentes naturales, y **3.** Los consumidores cada vez más prefieren ingredientes naturales en la composición de diversos productos de consumo [5, 14, 67].

Algunos factores de impacto social relevante son:

- Moda: el énfasis en tener una apariencia joven y bella, aumenta la demanda por los AEs usados en la industria cosmética;
- Homeopatía/Aromaterapia: durante los últimos años, el uso de AEs en medicina alternativa y terapias ha incrementado la demanda por los mismos;
- Comida sana: los consumidores cada día son más concientes de los aspectos de salud en la comida. Esto estimula la utilización de sustitutos naturales de las grasas, endulzantes, antioxidantes y otros ingredientes, en donde los AEs y oleorresinas entran a jugar un papel importante.

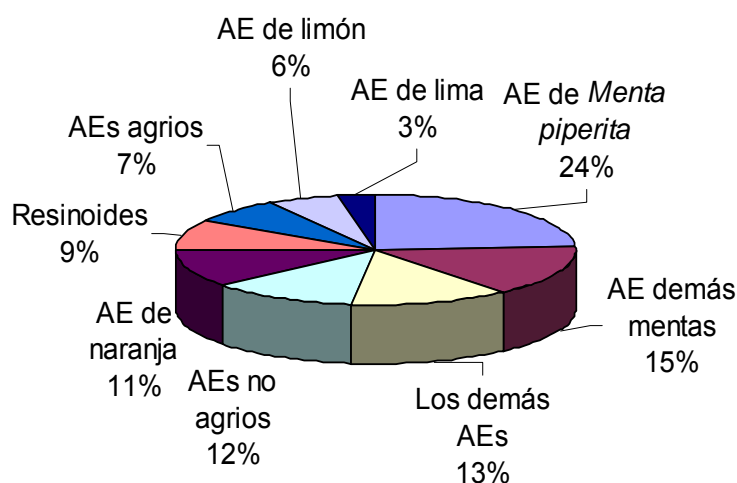


**Figura 14.** Evolución del comercio mundial de plantas aromáticas (En millones de toneladas por quinquenios desde 1970 hasta 2001) [14].

### 1.13.2. Mercado mundial de los aceites esenciales

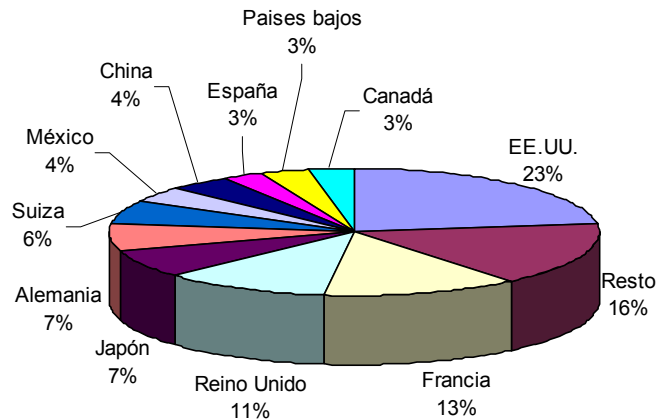
Cerca del 50% de la producción mundial de AEs es utilizada en saborizantes, predominantemente, en bebidas no alcohólicas y dietéticas. El restante de la producción se usa en fragancias (25%), aromaterapia (10%), fitoterapia (5%) y para el fraccionamiento y la obtención de sustancias químicas de mayor valor agregado (e.g. citral, eugenol, anetol, carvona, etc), empleados como materia prima en la síntesis orgánica fina [39, 59, 64, 171]. En los últimos años las exportaciones mundiales de AEs superan los mil millones de dólares anuales. EE.UU. es el principal exportador de AEs, seguido de Francia, Reino Unido, Brasil, Argentina y China, que en conjunto concentran el 70% de las exportaciones mundiales [40].

EE.UU. se ha convertido en un gran productor de *Menta piperita* (Véase **Figura 15**). Sus principales centros productivos son Michigan, Indiana, Oregon y al sur de Washington, donde el cultivo de la menta está confinado a los valles de Columbia y Yakima. La menta cultivada en este país, es del tipo de la “Menta Negra”, que fue importada desde Inglaterra en 1816 [40].



**Figura 15.** Aceites esenciales exportados por Estados Unidos [40].

El flujo de importaciones mundiales de AEs es de alrededor de 1300 millones de dólares. Los cinco primeros países importadores de AEs concentran el 63% de las importaciones mundiales (**Figura 16**).



**Figura 16.** Principales países importadores de aceites esenciales [40].

El principal país importador de AEs a nivel mundial son los EE.UU., que ostenta el mismo rol en las exportaciones del sector; esto mismo se repite con los otros dos principales importadores, Francia y Reino Unido, que, a su vez, también son grandes exportadores de AEs. Los últimos dos son comercializadores de AEs y de aceites redestilados (refinados). Estos países son grandes productores y exportadores de determinados AEs (*mentas*), pero no de otros, dependiendo del clima y suelo que requiera cada especie silvestre o cultivada, por lo que participan, a su vez, como importadores de aquellos aceites para los cuales tengan demanda insatisfecha [40].

### 1.13.3. Mercado nacional de plantas aromáticas y aceites esenciales

Colombia es un país tropical privilegiado por su posición geográfica, cuenta con gran variedad de climas y topografía. El cultivo de plantas aromáticas y la posterior obtención de sus AEs, surgen como una posibilidad de aprovechamiento, generando una agroindustria de tecnología relativamente barata con escasa

producción de desechos, poca demanda de insumos y un valor agregado importante [55].

Según el Instituto de Recursos Biológicos “Alexander von Humboldt”, Colombia es un país importador de productos naturales no maderables y se está tratando de revertir este hecho, substituyendo importación con producción nacional. Durante el año 2000, Colombia importó AEs por un valor superior a los 6.9 millones de dólares; monto muy superior a los 2.1 millones de dólares que exportó durante ese mismo año. Los principales AEs importados por Colombia son los aceites de cítricos (naranja, limón, lima) y los aceites de mentas (*Menta piperita*) [55].

#### **1.13.3.1. Mercado nacional de *Lippia alba***

Por el reciente desarrollo y la informalidad del sector, no se conoce el número exacto de empresas que producen o comercializan productos naturales. Según un sondeo realizado a empresarios del sector, en Colombia existen actualmente cerca de 100 laboratorios naturistas, y 2500 establecimientos que comercializan sus productos. Entre ellos, se encuentran las tiendas naturistas, los centros médicos, y médicos independientes, que usan aromaterapia y otras homeopatías en sus prácticas [123].

##### **1.13.3.1.1. Precio de compra a proveedores**

Los precios de compra de *L. alba* que reportan los comercializadores en las plazas de mercado presentan rangos muy variables. La mínima cantidad que se compra es el atado, el cual equivale aproximadamente a 400 g del material en fresco y su precio mínimo varía en cada ciudad: mientras que en Bogotá y en Medellín la mayoría consigue el atado desde \$500 pesos, en el resto de las ciudades el mínimo es de \$1.000 [123].

#### **1.13.3.1.2. Cantidades obtenidas del proveedor**

La cantidad de planta, que compran por semana, los comercializadores de los puestos de venta en las plazas de mercado es poco significativa. De acuerdo con los proveedores no existe una preferencia clara por alguna parte de la planta, se comercializan igualmente hojas, ramas y tallos, sin indicar en caso alguno el empleo de raíces o flores, la cantidad puede ir desde 1 a 7 paquetes [123].

Finalmente, la carvona, componente mayoritario de la *L. alba* y en general, la industria de los AEs, representa importantes beneficios económicos; en este proceso de crecimiento y de diversificación agroindustrial de nuestro país, es importante crear espacios de investigación. El presente trabajo tiene como objetivo comparar el contenido de la carvona en los extractos de hojas de *L. alba*, obtenidos a diferentes horas de colecta; así mismo se busca determinar la hora del día cuando se obtenga mayor rendimiento del AE. Para el cumplimiento de dichos objetivos se determinaron las condiciones adecuadas de operación del equipo de destilación – extracción con solvente simultánea (SDE), así como su reproducibilidad y repetibilidad; también se midieron las condiciones climáticas para determinar su influencia en la producción de la carvona. Los resultados ofrecerán información importante a las comunidades campesinas y a las asociaciones de productores del país, para un mejor manejo de los recursos y generación de mayores ingresos.

## 2. ANÁLISIS CIENCIOMÉTRICO

La ciencia y los científicos, como toda actividad humana, requieren ser evaluados para poder confiar en sus conclusiones y establecer una escala de prioridades y jerarquías en las investigaciones [44, 89]. La evaluación de las actividades científicas y tecnológicas tiende a ser una práctica habitual en la mayoría de los países destacados en Ciencia y Tecnología, que se plantean como reto evaluar y rendir cuentas de los programas de gasto público en investigación en forma “habitual, sistematizada y comparable” [103, 174].

La Vigilancia Tecnológica (VT) es un proceso sistemático en el que se capta, analiza y difunde información de diversa índole —económica, tecnológica, política, social, cultural, legislativa—, mediante métodos legales, con el ánimo de identificar y anticipar oportunidades o riesgos, para mejorar la formulación y ejecución de la estrategia de las organizaciones.

Dentro de las actividades de la VT se analizan principalmente las publicaciones técnicas y científicas; patentes, proyectos de investigación y desarrollo (I+D), ofertas tecnológicas, tesis doctorales, eventos, e información no estructurada, entre otras fuentes. En la **Figura 17**, se presenta un esquema básico sobre el ciclo de la VT.



**Figura 17.** Pasos de la vigilancia tecnológica.

La Cienciometría dentro de la Vigilancia Tecnológica está dirigida al estudio cuantitativo de la investigación científica, reflejada principalmente en artículos y patentes [24, 45]. Su interés es aportar elementos de valor sobre el grado de actualidad o desarrollo de un campo científico o área de conocimiento. Mediante esta metodología se pueden identificar:

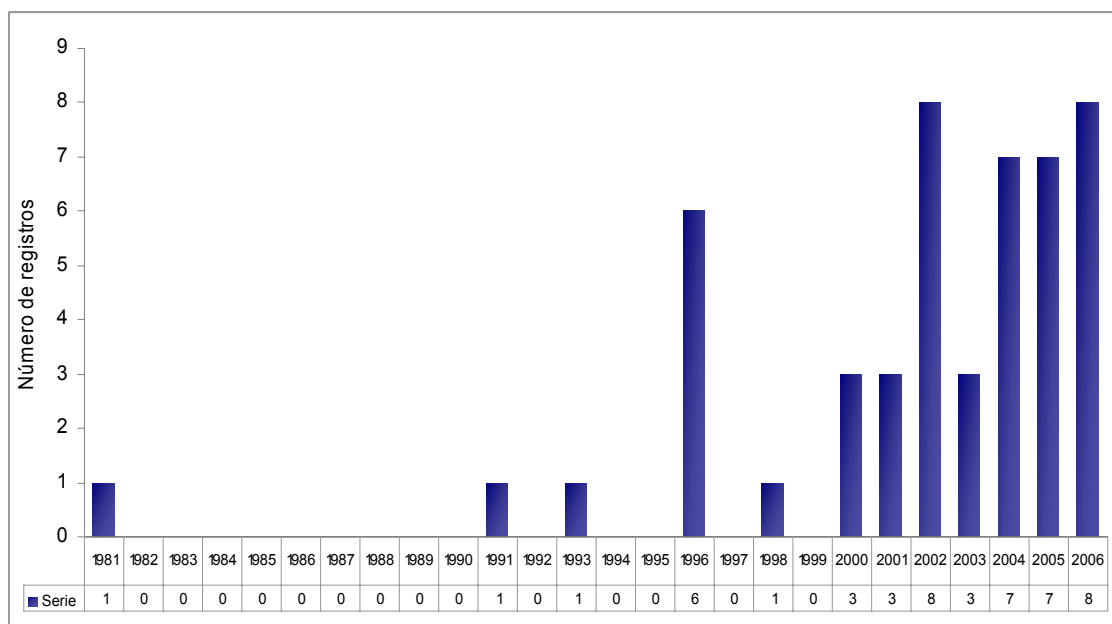
- Períodos de crecimiento o declive de una disciplina (desde el interés por publicar o patentar);
- Redes colaborativas de investigación en el campo;
- Principales fuentes de información en las que se divulga determinada actividad científica;
- Líneas de investigación a partir de la relación de términos encontrados en artículos y patentes y las capacidades científicas de los grupos que participan.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, en el presente trabajo se aplicó la metodología de la cienciometría de estudios sobre la *Lippia alba* y la carvona, objetos de investigación del proyecto de grado. La ficha de búsqueda para *Lippia alba* se muestra en la **Tabla 8**.

**Tabla 8.** Ecuación de búsqueda utilizada en el estudio cienciométrico de *Lippia alba*.

<b>Base de datos consultada</b>	<i>Elsevier a través de Scopus</i>
<b>Período de observación</b>	1980 – 2007
<b>Ecuación de búsqueda</b>	title-abs-key-auth( <i>lippia alba</i> ) and (exclude(subjarea, "phys") or exclude(subjarea, "mate") or exclude(subjarea, "mult") or exclude(subjarea, "heal"))
<b>Fecha de consulta</b>	9 de febrero de 2007
<b>Número de resultados obtenidos</b>	<b>49</b>

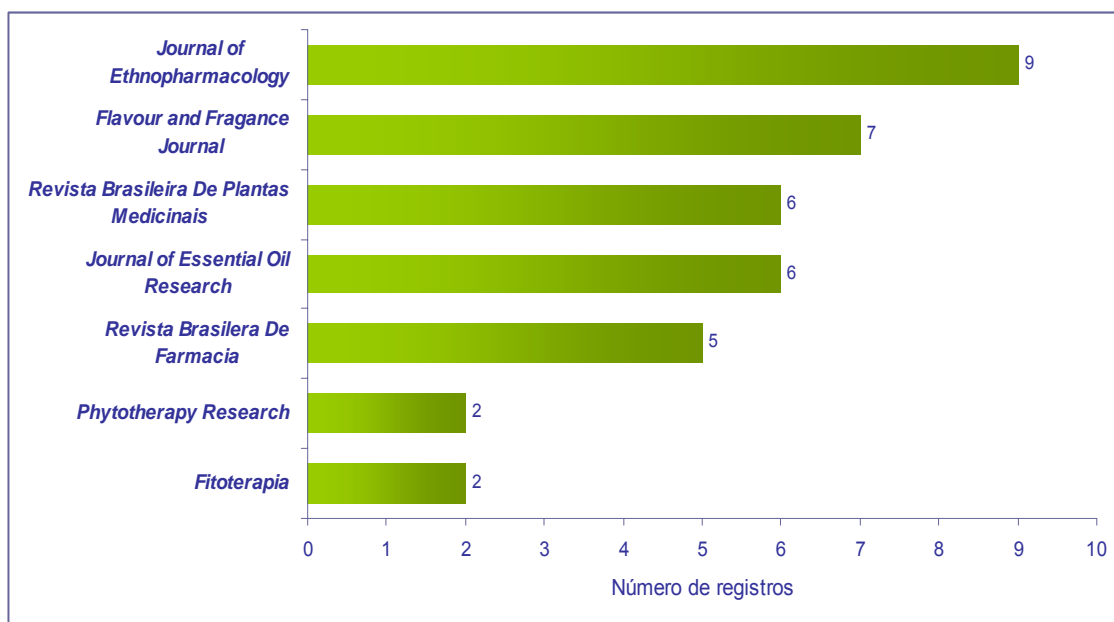
De acuerdo con el período consultado, 1980 – 2006, se presentan 49 registros. Entre 1980 y 1990, tan sólo se encuentra 1 artículo científico, a partir de 1991 y 1999 se nota un esporádico interés en el tema. A partir del 2000, se aprecia una tendencia creciente en el número de trabajos de investigación, en los años 2002 y 2006 se presentan 8 registros (**Ver Figura 18**), según la base de datos de *Elsevier (Scopus)*.



**Figura 18.** Dinámica de las publicaciones científicas relacionadas con la *Lippia alba*.

Fuente: Base de datos *Elsevier (Scopus)*. Fecha de consulta: 9 de febrero de 2007. Ecuación de búsqueda: <title-abs-key-auth(*lippia alba*) and (exclude(subjarea, "phys") or exclude(subjarea, "mate") or exclude(subjarea, "mult") or exclude(subjarea, "heal"))). Número de registros: 49.

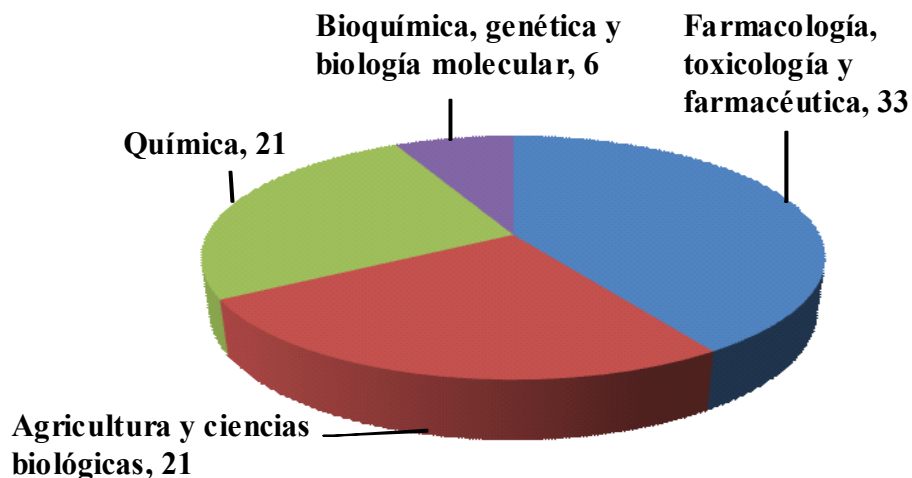
Se identificaron también las principales revistas científicas indexadas en la base de datos de *Elsevier*, a través de *Scopus*, empleando como criterio de evaluación el número de artículos científicos relacionados con *L. alba* publicados en las diferentes revistas. Teniendo en cuenta este factor, se encuentra que en el “*Journal of Ethnopharmacology*” se encuentra la mayoría de registros (9), tal y como se presenta en la **Figura 19**. Esta revista, contiene información sobre plantas medicinales, observaciones e investigaciones de actividades biológicas de plantas, y sustancias de origen animal, usados en la medicina tradicional.



**Figura 19.** Principales revistas científicas donde se publica la mayor cantidad de trabajos científicos sobre *Lippia alba* (registros mayores de 2).

Fuente: Base de datos Elsevier (Scopus). Fecha de consulta: 9 de febrero de 2007. Ecuación de búsqueda: <title-abs-key-auth(lippia alba) and (exclude(subjarea, "phys") or exclude(subjarea, "mate") or exclude(subjarea, "mult") or exclude(subjarea, "heal")) . Número de registros: 49.

Las actividades de investigación relacionadas con *Lippia alba*, en las áreas de farmacología, toxicología y farmacéutica son el reflejo del alto potencial biológico y farmacológico que pueden llegar a presentar los compuestos mayoritarios del aceite esencial de esta planta. En cuanto a las áreas de biología y agricultura, también muestran una alta aplicación de *L. alba*, posiblemente debido a las propiedades químicas y biológicas que poseen las diferentes variedades y quimiotipos de esta planta. La distribución de las áreas de conocimiento consultada en la base de datos de Elsevier (Scopus) se presenta en la **Figura 20**, donde se observa que el rango de aplicabilidad de esta planta es muy amplio, el cual va desde agentes de *flavour*, y/o principios activos en preparados farmacológicos, perfumes hasta aditivos en alimentos, entre otros. En conclusión, se puede afirmar que la planta *Lippia alba* es un modelo de estudio biológico, químico, bioquímico y farmacológico.



**Figura 20.** Distribución de los trabajos científicos sobre *Lippia alba*, según el área de conocimiento.

Fuente: Base de datos *Elsevier (Scopus)*. Fecha de consulta: 9 de febrero de 2007. Ecuación de búsqueda: <title-abs-key-auth(*lippia alba*) and (exclude(subjarea, "phys") or exclude(subjarea, "mate") or exclude(subjarea, "mult") or exclude(subjarea, "heal")) . Número de registros: 49 .

Según los datos encontrados en la base de datos de *Elsevier (Scopus)*, la relación de autores y el número de publicaciones muestran que la mayor actividad en investigación sobre *L. alba* es realizada por autores brasileños; debido, posiblemente, al enfoque comercial que dedica este país a la explotación de sus recursos naturales, seguida de investigadores latinoamericanos pertenecientes a países como Cuba, Uruguay, Colombia y Argentina, que presentan climas tropicales donde el cultivo de la planta es totalmente apto para el desarrollo de su cultivo e investigación. La gran variedad de trabajos realizados por científicos de diferentes partes de Latinoamérica demuestran la capacidad de adaptación de la planta a cualquier tipo de variación ambiental. Por otra parte, autores que trabajan con plantas cultivadas en la India reportan actividad en investigación sobre *L. alba*, las cuales tienen características químicas y biológicas similares a las anteriormente mencionadas (Véase **Tabla 9**).

**Tabla 9.** Autores que reportan investigaciones sobre *Lippia alba*.

<b>Autores principales</b>	<b>Número de registros</b>
De Abreu Matos, F.J.	3
Silveira, E.R.	2
Craveiro, A.A.	2
Leitão, S.G.	2
Bizzo, H.R.	2
Lima, M.A.S.	2
Barbosa, F.G.	2
Bansal, R.P.	2
Lopes, D.	2
Bahl, J.R.	2
De Lima, T.C.M.	2
Viana, G.S.B.	2
Do Vale, T.G.	2
Viccini, L.F.	2
Alencar, J.W.	2
Matos, F.J.A.	2
Stashenko, E.	1

Fuente: Base de datos *Elsevier (Scopus)*, fecha de consulta: 9 de febrero de 2007. Ecuación de búsqueda <title-abs-key-auth(*lippia alba*) and (exclude(subjarea, "phys") or exclude(subjarea, "mate") or exclude(subjarea, "mult") or exclude(subjarea, "heal"))). Número de registros: 49.

Otros datos consultados son algunas patentes sobre *L. alba* y sus derivados, las cuales han sido registradas en oficinas como *Japanese Patent Office* y *US Patent Office*. Las patentes muestran estudios de variación genética de la planta; una de ellas, es la reportada por Kumar *et al.* [101], la cual muestra la modificación de la variación de aroma y composición química de una especie de *L. alba* originaria de Uruguay y trasladada a la India.

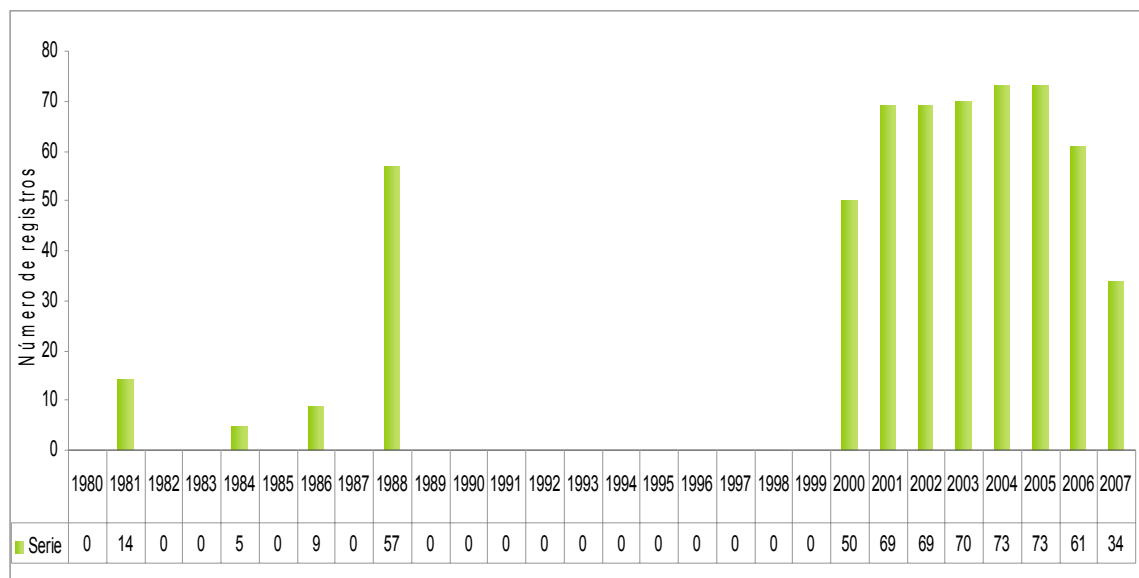
En la **Tabla 10** se muestra la ficha técnica utilizada para la búsqueda de carvona en su estudio cuantitativo.

**Tabla 10.** Ecuación de búsqueda utilizada en la metodología de la bibliometría sobre carvona.

<b>Base de datos consultada</b>	<b><i>Elsevier a través de Scopus</i></b>
<b>Período de observación</b>	1980 – 2007
<b>Ecuación de búsqueda</b>	<title-abs-key-auth (carvone) and (exclude(pubyear, 1976) or exclude(pubyear, 1973) or exclude(pubyear, 1972) or exclude(pubyear, 1970) or exclude(pubyear, 1977) or exclude(pubyear, 1974) or exclude(pubyear, 1979) or exclude(pubyear, 1969) or exclude(pubyear, 1980) or exclude(pubyear, 1968) or exclude(pubyear, 1975) or exclude(pubyear, 1978) or exclude(pubyear, 1971)) and (exclude(subjarea, "eart") or exclude(subjarea, "phys") or exclude(subjarea, "soci") or exclude(subjarea, "ener") or exclude(subjarea, "mate") or exclude(subjarea, "ceng") or exclude(subjarea, "engi") or exclude(subjarea, "psyc") or exclude(subjarea, "mult")) and (exclude(pubyear, 1967) or exclude(pubyear, 1966) or exclude(pubyear, 1949) or exclude(pubyear, 1962) or exclude(pubyear, 1951) or exclude(pubyear, 1963) or exclude(pubyear, 1981) or exclude(pubyear, 1958) or exclude(pubyear, 1964) or exclude(pubyear, 1953) or exclude(pubyear, 1957) or exclude(pubyear, 1961) or exclude(pubyear, 1954) or exclude(pubyear, 1965)) and (exclude(pubyear, 1947) or exclude(pubyear, 1944) or exclude(pubyear, 1929) or exclude(pubyear, 1945) or exclude(pubyear, 1937) or exclude(pubyear, 1911) or exclude(pubyear, 1912)
<b>Fecha de consulta</b>	11 de julio de 2007
<b>Número de resultados obtenidos</b>	<b>624</b>

De acuerdo con el período consultado, 1980 – 2007 (Véase **Figura 21**), se presentan 624 registros sobre la carvona. En el año 1981 y en el período de 1982 y 1987 se encontraron 14 artículos científicos sobre carvona. En 1988 se presentó un incremento notable en la producción científica de este compuesto con un total de 57 resultados. Lo contrario se observa en el período entre 1989-1999, donde la investigación sobre carvona fue totalmente inactiva. Entre el año 2000 y 2006, el nivel de investigación se mantuvo constante, ratificando el amplio campo de

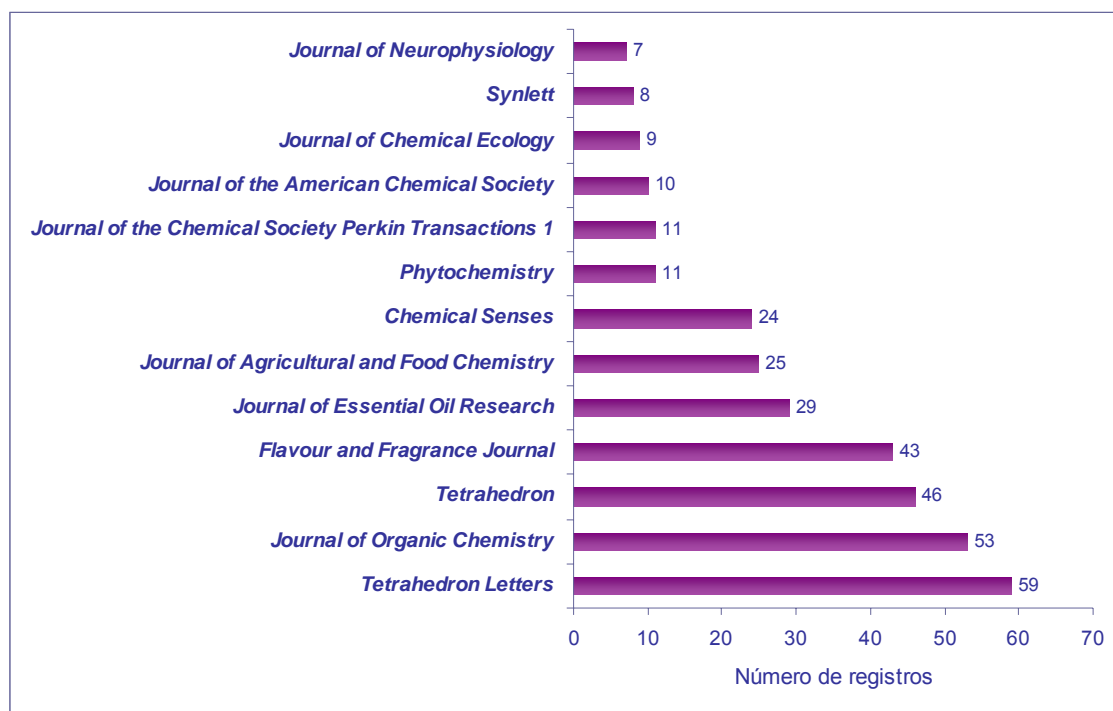
aplicación de la carvona y el interés de búsqueda de fuentes naturales y sintéticas a partir de sus formas de enantioméricas.



**Figura 21.** Dinámica de las publicaciones científicas relacionadas con carvona.

Fuente: Base de datos *Elsevier (Scopus)*. Fecha de consulta: 11 de julio de 2007. La ecuación de búsqueda utilizada es la registrada en la Tabla 10. Número de registros: 624.

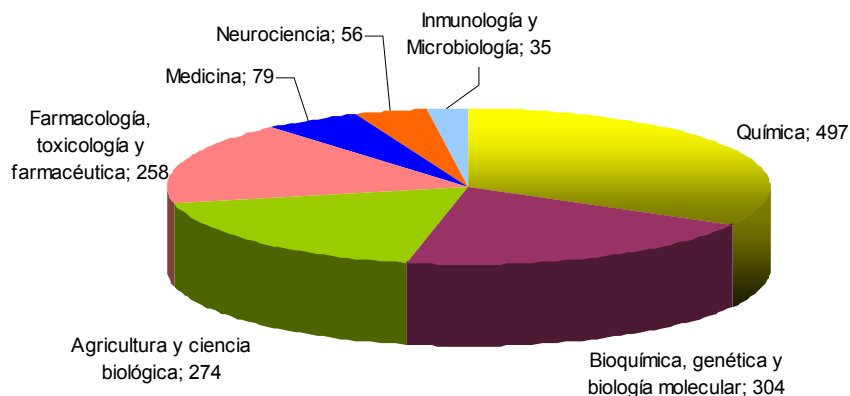
Los trabajos encontrados en la búsqueda realizada para carvona incluyen investigaciones relacionadas con la síntesis química de productos derivados de carvona, los cuales presentan interés farmacológico, biológico, usos ambientales, en alimentos y hasta como ingredientes en productos odontológicos. Las revistas científicas que lideran los estudios relacionados con carvona son *Tetrahedron Letters* y *Journal of Organic Chemistry* con 59 y 53 registros, respectivamente (Véase **Figura 22**). En estas revistas fueron encontradas nuevas metodologías sintéticas a partir de las diferentes formas enantioméricas de este compuesto. Para la revista *Flavour and Fragrance Journal* se reportaron 43 resultados de búsqueda, que confirman la utilidad y aplicación de la carvona en diversos tipos de estudio.



**Figura 22.** Principales revistas científicas donde se publican la mayor cantidad de trabajos científicos sobre carvona (registros mayores de 7).

Fuente: Base de datos *Elsevier (Scopus)*, fecha de consulta: 11 de Julio de 2007. Fuente: base de datos *Elsevier (Scopus)*. Fecha de consulta: 11 de julio de 2007. La ecuación de búsqueda utilizada es la registrada en la Tabla 10. Número de registros: 624.

En cuanto a las actividades de investigación relacionadas con la carvona, las áreas de química, bioquímica, genética y biología molecular presentan un mayor número de registros, demostrando las propiedades químicas y biológicas que posee este compuesto (Véase **Figura 23**). El amplio rango de áreas de investigación de carvona que va desde agricultura, farmacología, toxicología hasta medicina, neurociencia, inmunología y microbiología, es el reflejo de las diversas aplicaciones que puede tener este compuesto.



**Figura 23.** Distribución de los trabajos científicos sobre carvona, según el área de conocimiento.

Fuente: Base de datos *Elsevier (Scopus)*. Fecha de consulta: 11 de julio de 2007. La ecuación de búsqueda utilizada es la registrada en la Tabla 10. Número de registros: 624.

En la **Tabla 11** se reportan los autores y números de registros encontrados para carvona. Se observa, que el profesor A. Srikrishna, Ph.D. de la Universidad de Hyderabad (G. Mehta), tiene la máxima producción científica relacionada con carvona, quien reporta trabajos de la síntesis de nuevos fármacos a partir de la carvona. La importancia de la carvona en la síntesis orgánica se debe al gran interés para encontrar nuevos fármacos con estructura de terpenoides.

**Tabla 11.** Autores que reportan investigaciones sobre carvona.

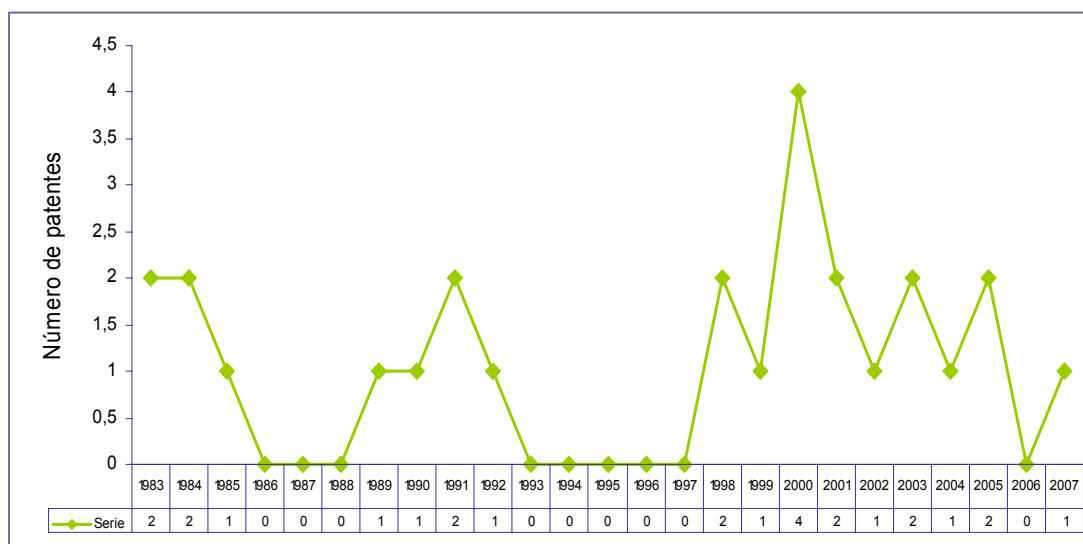
Autores principales	Número de registros
Srikrishna, A.	55
De Groot, A.	17
Jansen, B.J.M.	16
Abad, A.	12
Agullo, C.	12
Cunat, A.C.	12
Shing, T.K.M.	11
Buchbauer, G.	10
Gharpure, S.J.	9

**Tabla 11.** Continuación

Reddy, T.J.	8
Krishnaiah, Y.S.R.	7
Anebousevly, K.	7
Demirci, B.	7
Croteau, R.	7
Laska, M.	6

Fuente: Base de datos *Elsevier (Scopus)*. Fecha de consulta: 11 de julio de 2007. La ecuación de búsqueda utilizada es la registrada en la Tabla 10. Número de registros: 624.

En cuanto a las patentes reportadas sobre carvona, su número es de 26, en el período consultado, 1983-2007, y su distribución entre los años es menor de 4 patentes, así como se observa en la **Figura 24**. La fuente de información utilizada fue el software Matheo Patent ([www.matheo-patent.com](http://www.matheo-patent.com)) y la fecha de consulta fue el 9 de septiembre de 2007. Algunas de las patentes encontradas están enfocadas en la producción sintética de la carvona, por ejemplo, las realizadas por Mulder, P *et al* [120] y Davey, P.N. *et al.* [52] y otras, se relacionan con el uso de algunos de sus isómeros como captador de mosquitos o como saborizantes en goma de mascar [177-179].

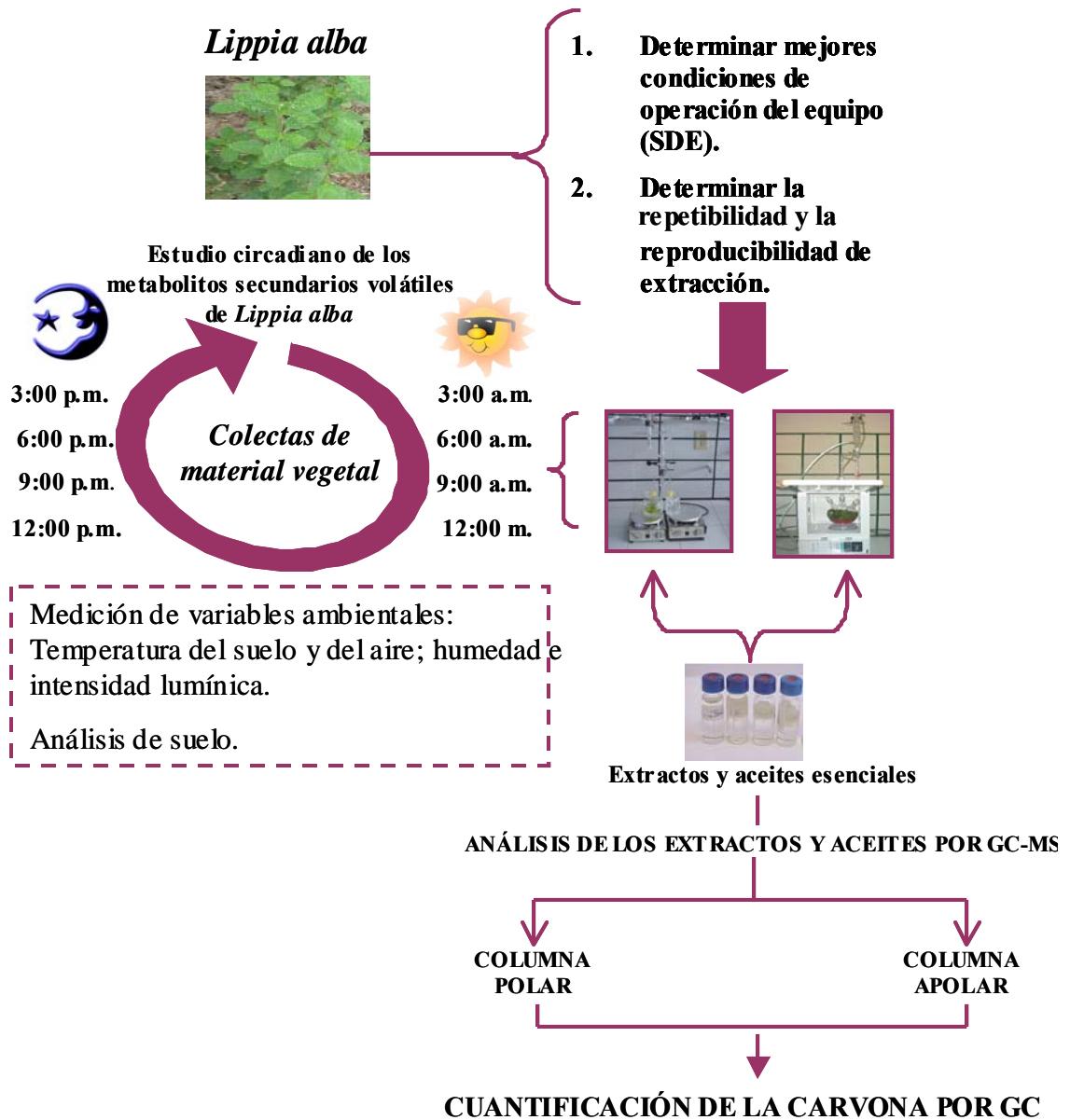


**Figura 24.** Dinámica de registros de patentes sobre la carvona.

Fuente: Base de datos *Matheo Patent*. Fecha de consulta: 9 de septiembre de 2007. La ecuación de búsqueda: carvone. Número de registros: 26.

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

La metodología general que se empleó en el estudio del ciclo circadiano de la carvona presente en las hojas de *Lippia alba*, se ilustra en la **Figura 25**.



**Figura 25.** Metodología general aplicada en la determinación de la carvona presente en las hojas de *Lippia alba* durante el día y la noche.

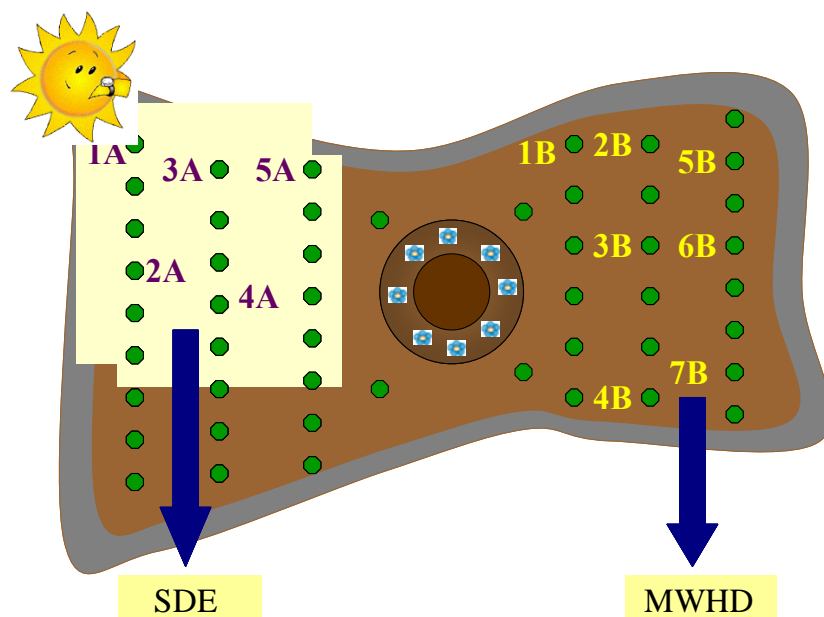
### 3.1. RECOLECCIÓN DE LAS HOJAS DE *Lippia alba*

Las hojas de *L. alba*, se recolectaron de un cultivo experimental ubicado en el complejo agroindustrial del Centro de Investigación de Excelencia, CENIVAM, de la Universidad Industrial de Santander (UIS) (Véase **Figura 26**). Para todas las extracciones, se utilizaron hojas sin deterioro, maduras, de tamaño similar, recién recolectadas y enteras. El área de la parcela experimental fue de ca. 4,83 m<sup>2</sup> y las plantas tenían 18 meses de edad. La recolección del material vegetal (MV) se realizó en época de floración de la plantas (3 meses después del último corte).



**Figura 26.** Diferentes vistas del cultivo experimental de la especie *Lippia alba* ubicado en el complejo Agroindustrial del CENIVAM.

La parcela experimental se dividió en dos zonas, así como se muestra en la **Figura 27** (una para cada técnica de extracción empleada). Se seleccionaron 5 plantas (Denominadas: 1A, 2A, 3A, 4A y 5A) para la recolección del material vegetal (MV) utilizado en las extracciones por SDE y 7 plantas (Denominadas: 1B, 2B, 3B, 4B, 5B, 6B y 7B) para las extracciones por MWHD.



**Figura 27.** Distribución de las plantas en el cultivo experimental.

Se realizó un análisis del suelo, con el fin de determinar la calidad del mismo usando como criterio la cantidad de elementos menores (Ca, Mg, Na, Al), azufre y otros elementos importantes como N, P y K. La muestra se tomó de varios puntos de la parcela experimental de *L. alba*. El análisis fue realizado en el Laboratorio Químico de Suelos, de la Escuela de Química de la UIS, bajo la dirección del Qco. Jaime Camargo Hernández.

### 3.2. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA ESPECIE *Lippia alba*



La caracterización taxonómica de la planta *L. alba* (Véase **Figura 28**), se realizó en el Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias, de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. El pliego testigo quedó depositado como muestra permanente en el Herbario Nacional de Colombia, (COL, Bogotá) así: *Lippia alba* (Mill) N.E.Br, COL N° 512078. La planta fue clasificada por el doctor José Luís Fernández.

**Figura 28.** *Lippia alba* (Mill) N.E Brown ex Britton & Wills.

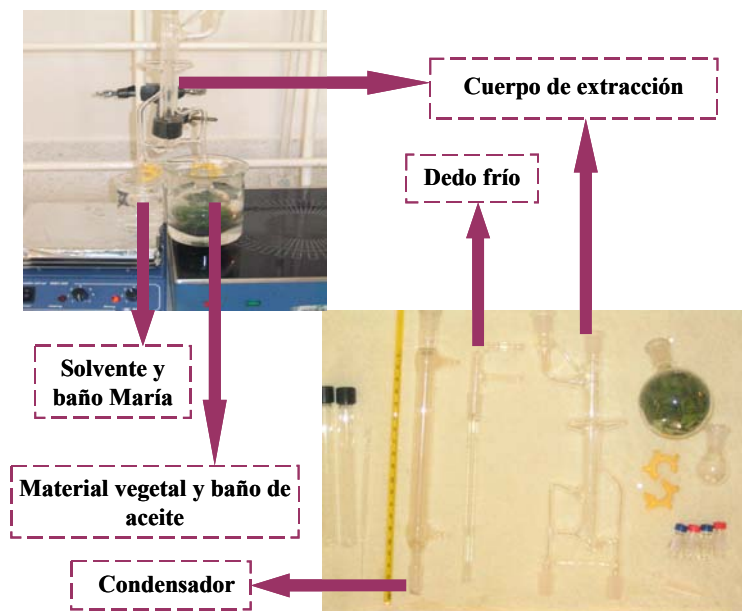
### 3.3. EXTRACCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES DE LAS HOJAS DE *Lippia alba*

La metodología experimental se dividió en dos partes:

1. La variación circadiana de la carvona presente en el extracto de las hojas de *L. alba*, obtenido por la técnica de destilación-extracción con solvente simultánea.
2. Determinación de la variación del rendimiento del AE extraído de las hojas de *L. alba* por MWHD.

#### 3.3.1. Destilación - extracción con solvente simultánea

Para la obtención de los extractos se emplearon dos equipos de SDE, los cuales se diseñaron teniendo en cuenta las dimensiones reportadas por Godefroot *et al.* [71] (Véase **Figura 29**).



**Figura 29.** Equipo de SDE empleado para la obtención de los extractos de *L. alba*.

El MV se pesó en una balanza Mettler Toledo PB1502-5 con una precisión de  $\pm 0,01$  g. Para todas las extracciones, se obtuvo una porción de MV de cada una de las 5 plantas seleccionadas (zona de extracción señalada para SDE), se

homogeneizó la muestra y se tomaron  $10,05 \pm 0,02$  g. Las extracciones de los metabolitos secundarios volátiles de las hojas de *L. alba* por SDE, recolectadas durante 24 horas, se realizaron por quintuplicado (en cinco días diferentes, en los que no se presentaron precipitaciones) y en intervalos de tres horas, comenzando a las 3 a.m. En la **Tabla 12**, se indica la cantidad de MV utilizado en cada uno de los muestreos y para cada hora de análisis.

**Tabla 12.** Cantidad de material vegetal utilizado para el análisis por SDE a diferentes horas de recolección de la planta.

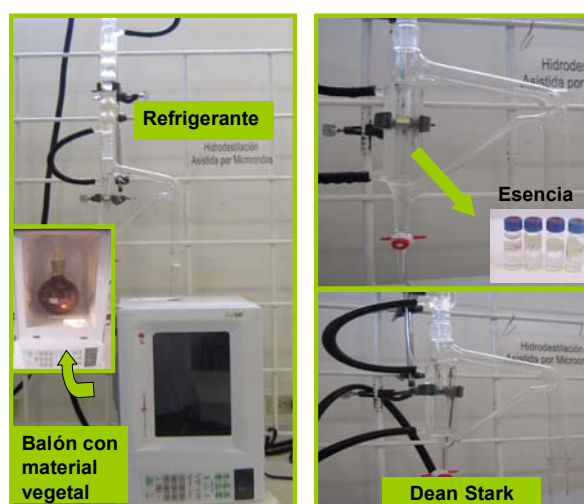
Hora de recolección	CANTIDAD DE MATERIAL VEGETAL, g							
	Muestreo					$\bar{x}$	S	CV, %
	1	2	3	4	5			
3	10,08	10,07	10,07	10,01	10,05	10,06	$\pm 0,03$	0,28
6	10,04	10,01	10,06	10,01	10,06	10,04	$\pm 0,03$	0,25
9	10,07	10,06	10,06	10,08	10,06	10,07	$\pm 0,01$	0,09
12	10,04	10,05	10,08	10,06	10,03	10,05	$\pm 0,02$	0,19
15	10,07	10,09	10,08	10,05	10,06	10,07	$\pm 0,02$	0,16
18	10,01	10,01	10,04	10,02	10,09	10,03	$\pm 0,03$	0,34
21	10,08	10,03	10,07	10,07	10,07	10,06	$\pm 0,02$	0,19
24	10,05	10,07	10,05	10,04	10,06	10,05	$\pm 0,01$	0,11

Para todas las muestras, el procedimiento y las condiciones de extracción fueron las siguientes: el MV previamente pesado se colocó dentro de un balón de 100 mL con 40 mL de agua; en un balón de 10 mL se adicionaron 3 mL de diclorometano (grado HPLC) y en el cuerpo de extracción se adicionaron 3,3 mL de diclorometano y 1,5 mL de agua. Las temperaturas de los baños de aceite y agua al iniciar la extracción fueron 140 y 62 °C, respectivamente. El tiempo de extracción fue de 1 h y 20 min de recirculación del diclorometano en el cuerpo de extracción, según la metodología planteada por Godefroot *et al.* [71] e implementada en el Laboratorio de Cromatografía. Los extractos obtenidos se concentraron a 0,5 mL con un flujo constante de nitrógeno, se adicionó 1  $\mu$ L del patrón interno (*n*-tetradecano) y se

aforó a 1 mL con diclorometano. Posteriormente, las muestras fueron inyectadas al GC-MS.

### 3.3.2. Extracción por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas

Se utilizó la técnica de hidrodestilación asistida por la radiación de microondas, de acuerdo con el procedimiento descrito por Stashenko, E.E. *et al.* [159]. El montaje constó de un equipo de destilación tipo *Clevenger* con reservorio de destilación *Dean-Stark* y adaptación para calentamiento por radiación de microondas a través de un horno doméstico marca *LG-Intelowave* con potencia de salida de 1200 W, empleado al 70% de la potencia (840 W), como se muestra en la **Figura 30**.



**Figura 30.** Equipo de hidrodestilación asistida por la radiación de microondas, empleado para la obtención de los aceites esenciales de *Lippia alba*.

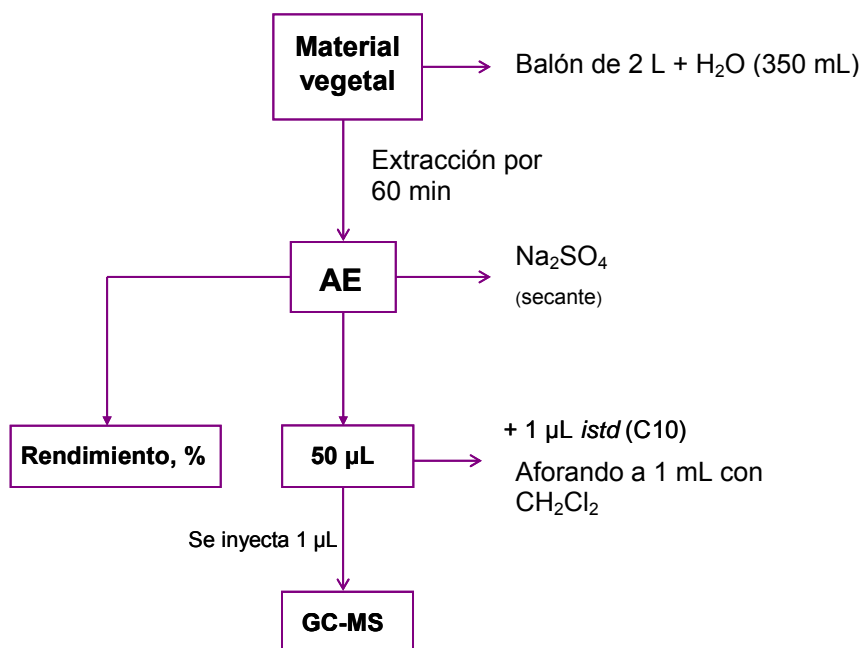
Para todas las extracciones se obtuvo una porción de MV de cada una de las plantas seleccionadas (zona para MWHD, 1B, 2B, 3B, 4B, 5B, 6B y 7B), la muestra se homogeneizó y se tomaron  $200,14 \pm 0,03$  g. Las extracciones durante 24 horas se realizaron por triplicado (en tres días diferentes, sin precipitaciones) y en intervalos de tres horas, comenzando a las 3 a.m. En la **Tabla 13**, se indica la

cantidad de material vegetal en cada uno de los muestreos realizados por MWHD en las diferentes horas.

**Tabla 13.** Cantidad de material vegetal utilizado para el análisis por MWHD a diferentes horas de recolección de la planta.

Hora de recolección	CANTIDAD DE MATERIAL VEGETAL, g					
	Muestreo			$\bar{x}$	S	CV, %
	1	2	3			
3	200,13	200,12	200,15	200,13	± 0,02	0,01
6	200,16	200,15	200,19	200,17	± 0,02	0,01
9	200,13	200,19	200,13	200,15	± 0,03	0,02
12	200,17	200,17	200,08	200,14	± 0,05	0,03
15	200,18	200,13	200,18	200,16	± 0,03	0,01
18	200,14	200,13	200,14	200,14	± 0,01	0,00
21	200,10	200,13	200,14	200,12	± 0,02	0,01
24	200,11	200,13	200,13	200,12	± 0,01	0,01

El procedimiento y las condiciones experimentales se muestran en la **Figura 31**.



**Figura 31.** Condiciones de extracción y preparación de los AEs de *L. alba*.

### 3.4. DETERMINACIÓN DE LAS FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO

#### 3.4.1. Evaluación de la repetibilidad del sistema de inyección

Para evaluar la repetibilidad del sistema de inyección se inyectó una misma muestra tres veces, y se determinaron los siguientes parámetros:  $t_R$  y áreas.

#### 3.4.2. Experimentos de reproducibilidad de la técnica de extracción SDE

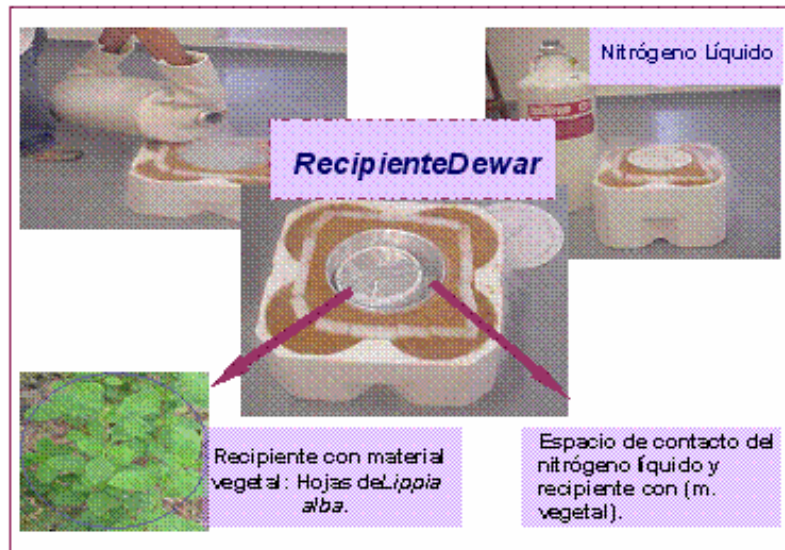
Para los experimentos de reproducibilidad se escogió un punto de referencia (o planta) sobre la zona delimitada para SDE del cultivo experimental de *L. alba*. Según el procedimiento descrito en el **Numeral 3.3.1**, fueron realizadas las extracciones por tres analistas y equipos de extracción diferentes. En las extracciones, los tres analistas obtuvieron una porción de MV del punto de referencia seleccionado, pesando  $10,04 \pm 0,02$  g de hojas. En la **Tabla 14** se muestra la cantidad de material vegetal recogido por cada uno de los analistas en las diferentes horas. Posteriormente, se realizaron las extracciones de los metabolitos secundarios volátiles de las hojas de *L. alba* por SDE durante 24 horas, en intervalos de tres horas.

**Tabla 14.** Cantidad de material vegetal utilizado para el estudio de reproducibilidad de la técnica de extracción SDE a diferentes horas de colecta de la planta.

Hora de recolección	CANTIDAD DE MATERIAL VEGETAL, g					
	Analista			$\bar{x}$	S	CV, %
	1	2	3			
3	10,02	10,01	10,07	10,03	$\pm 0,03$	0,32
6	10,06	10,07	10,01	10,05	$\pm 0,03$	0,32
9	10,02	10,02	10,06	10,03	$\pm 0,02$	0,23
12	10,04	10,07	10,05	10,05	$\pm 0,02$	0,15
15	10,04	10,04	10,09	10,06	$\pm 0,03$	0,29
18	10,01	10,08	10,01	10,03	$\pm 0,04$	0,40
21	10,02	10,06	10,03	10,04	$\pm 0,02$	0,21
24	10,01	10,04	10,07	10,04	$\pm 0,03$	0,30

### 3.4.3. Experimentos de repetibilidad de la técnica de extracción SDE.

Los experimentos de repetibilidad para el método de extracción SDE, se realizaron manteniendo el MV dentro de un vaso tipo *Dewar* casero, con el objetivo de conservar las hojas en el nitrógeno líquido (Aga Fano S.A) durante el mayor tiempo posible (Véase **Figura 32**).



**Figura 32.** Almacenamiento del material vegetal para los experimentos de repetitividad para la técnica de extracción SDE.

Se utilizó un recipiente de aluminio para depositar las hojas y el nitrógeno líquido, el aislamiento se realizó con varias capas de aserrín prensado con pegante para madera e icopor. El MV se recolectó de un solo punto de referencia (o planta) y a una misma hora (3:00 p.m.), a la cual se midieron variables ambientales como: temperatura del suelo y del aire, humedad e intensidad lumínica. El procedimiento de extracción se realizó como se describe en el **Numeral 3.3.1**. Para las extracciones, se recolectó una porción de MV del punto de referencia seleccionado, de la cual se tomaron  $10,07 \pm 0,02$  g de hojas de *L. alba*. En la **Tabla 15** se muestra la

cantidad de MV utilizado para tres extracciones realizadas con hojas conservadas en nitrógeno líquido.

**Tabla 15.** Cantidad de material vegetal utilizado para el análisis de repetibilidad de la técnica de extracción SDE.

Hora de recolección	CANTIDAD DE MATERIAL VEGETAL, g					
	MB <sup>a</sup>	MCN1 <sup>b</sup>	MCN2 <sup>c</sup>	$\bar{x}$	S	CV, %
15	10,07	10,05	10,09	10,07	± 0,02	0,20

a: Muestra blanco, b: Primera muestra con nitrógeno, c: Segunda muestra con nitrógeno.

### 3.5. MEDICIÓN DE LAS VARIABLES AMBIENTALES.

En todos los muestreos se realizaron mediciones de temperatura del suelo y del aire, intensidad lumínica y humedad del suelo en la parcela y en las plantas seleccionadas, tomando 5 puntos constantes para cada registro. Para la temperatura del suelo se utilizó un termómetro digital de punzón KEX-50 y para la humedad y temperatura ambiente se empleó un termohidrómetro, que registraba las variables ambientes con ayuda de un sensor; ambos dispositivos fueron proporcionados por el Centro de Investigación de Excelencia, CENIVAM, y se muestran en la **Figura 33**.



Dispositivo para temperatura del suelo



Termohidrómetro

**Figura 33.** Dispositivos utilizados en las mediciones de temperaturas del suelo y del aire y de la humedad.

Por otra parte, las mediciones de la intensidad lumínica se realizaron con una foto-resistencia acoplada en circuito a un multímetro, la cual fue suministrada por el grupo de investigación en Electrónica Recreativa y Aplicada de la Escuela de Ingeniería Electrónica de la UIS. La foto-resistencia registra valores inversamente proporcionales a la cantidad de radiación solar. En la **Figura 34** se observa la calibración de la foto-celda, la cual se realizó en el Laboratorio de Óptica y Tratamiento de Señales (Escuela de Física, Universidad de Industrial de Santander, colaboración del Dr. Arturo Plata).



**Figura 34.** Esquema general del procedimiento realizado para la calibración de la foto-resistencia (Laboratorio de Óptica y Tratamiento de Señales, UIS).

### 3.6. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

La identificación de la carvona y de los metabolitos secundarios volátiles presente en las hojas de *L. alba* se realizó empleando la técnica analítica de cromatografía

de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), usando dos columnas capilares de fases estacionarias diferentes, polar y apolar.

### 3.6.1 Columna apolar

El análisis se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Plus Series GC System*, y un detector selectivo de masas (MSD) *Agilent Technologies 5973 Network* (Véase **Figura 35**), ubicado en el Laboratorio de Cromatografía de la UIS.



**Figura 35.** Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Plus*, y un detector selectivo de masas (MSD) *Agilent Technologies 5973 Network*.

Los parámetros operacionales definidos para la identificación de los componentes separados en la columna cromatográfica DB-5MS, se muestran en la **Tabla 16**.

**Tabla 16.** Parámetros operacionales del GC-MS para el análisis de metabolitos secundarios extraídos por SDE y MWHD de las hojas de *Lippia alba*, usando la columna cromatográfica DB-5 MS.

**Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Plus Series GC System* y un detector selectivo de masas (MSD) *Agilent Technologies 5973 Network***

**Tabla 16.** Continuación

➤ <u>Sistema de inyección :</u>
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Inyector <i>split/splitless</i> (250°C, relación de <i>split</i> 1:30).</li><li>▪ Gas de arrastre: He (99,9995%, Aga Fano S.A), presión de entrada en la cabeza de la columna de 16,47 psi y una velocidad lineal de 26 cm s<sup>-1</sup>.</li></ul>
➤ <u>Sistema de separación:</u>
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Columna capilar apolar: DB-5MS (J &amp; W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.) de 60 m x 0.25 mm, d.i. x 0.25 μm, d<sub>f</sub>.</li><li>▪ Fase estacionaria: 5% fenil–poli(metilsiloxano).</li><li>▪ Programación de la temperatura del horno: 45°C (5 min) hasta 150°C (2 min) @ 4°C/min, luego, hasta 250°C (5 min) @ 5°C/min, finalmente, @ 10°C/min hasta alcanzar 275°C (15 min).</li><li>▪ Temperatura de la cámara de ionización: 230 °C.</li><li>▪ Temperatura de la línea de transferencia: 280 °C.</li><li>▪ Flujo constante de He: 1 mL/min.</li><li>▪ Energía de electrones: 70 eV.</li><li>▪ Rango de masas: <i>m/z</i> 40-350.</li><li>▪ Barrido automático de frecuencia (<i>full scan</i>) a 4,75 scan s<sup>-1</sup>.</li><li>▪ Analizador de masas cuadrupolar (150 °C).</li></ul>
➤ <u>Procesamiento de datos:</u>
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Sistemas de datos: <i>HPMSChemStation</i> (Version 1.05).</li><li>▪ Bases de datos: NBS 75K, ADAMS, WILEY 138K y NIST 02.</li></ul>

### 3.6.2. Columna polar

Para este análisis, se empleó un cromatógrafo *Agilent Technologies 6890N Network Series GC System*, y un detector selectivo de masas (MS) *Agilent Technologies 5975K*, ubicado en el Laboratorio de Cromatografía de la UIS (Véase **Figura 36**).



**Figura 36.** Cromatógrafo *Agilent Technologies 6890N Network*, y un detector selectivo de masas (MSD) *Agilent Technologies 5975*.

Los parámetros operacionales definidos para la identificación en la columna cromatográfica DB-WAX se muestran en la **Tabla 17**.

**Tabla 17.** Parámetros operacionales del GC-MS para el análisis de metabolitos secundarios extraídos por SDE y MWHD de las hojas de *Lippia alba*, usando la columna cromatográfica DB-WAX.

<b>Cromatógrafo <i>Agilent Technologies 6890N Network Series GC System</i>, y un detector selectivo de masas (MSD) <i>Agilent Technologies 5975</i>.</b>	
➤	<b><u>Sistema de inyección :</u></b>
▪	Inyector automático <i>Agilent Technologies 7683B Series Injector split/splitless</i> (250°C, relación <i>split</i> 50:1).
▪	Gas de arrastre: He (99,9995%, Aga Fano S.A), presión de entrada en la cabeza de la columna de 16,47 psi y una velocidad lineal de 26 cm s <sup>-1</sup> .
➤	<b><u>Sistema de separación:</u></b>
▪	Columna capilar polar: DB-WAX ( <i>J &amp; W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.</i> ), de 60 m x 0,25 mm, D.I. x 0,25 μm, d <sub>f</sub> .
▪	Fase estacionaria: entrecruzada e inmovilizada de poli(etilenglicol).
▪	La programación de la temperatura fue la siguiente: desde 45°C (5 min)

**Tabla 17.** Continuación

hasta 150°C (3 min) @ 3°C/min, y hasta 220°C (5 min) @ 4°C/min.
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Temperatura de la cámara de ionización: 230 °C.</li><li>▪ Flujo constante de He: 1 mL/min.</li><li>▪ Los espectros fueron obtenidos por impacto de electrones.</li><li>▪ Energía de electrones: 70 eV.</li><li>▪ Temperatura de la línea de transferencia: 250 °C.</li><li>▪ Rango de masas: <math>m/z</math> 40-350.</li><li>▪ Barrido automático de frecuencia (<i>full scan</i>) a 4,75 scan s<sup>-1</sup>.</li><li>▪ Analizador de masas cuadrupolar (150 °C).</li></ul>
➤ <b>Procesamiento de datos:</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Sistemas de datos: <i>HPChemStation</i> (Versión D.02.00.275).</li><li>▪ Bases de datos: ADAMS, WILEY 138K y NIST 02.</li></ul>

### 3.7. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES DE LAS HOJAS DE *Lippia alba*.

Para la identificación de los metabolitos secundarios volátiles de *L. alba* se emplearon espectros de masas e índices de retención [7]. Los índices de Kovats [100] se calcularon teniendo en cuenta los tiempos de retención de una serie homóloga de patrones de hidrocarburos desde C<sub>10</sub> hasta C<sub>25</sub>, corridos bajo las mismas condiciones operacionales que las de los AEs y los extractos, empleando las columnas DB-5MS y DB-WAX. Para su determinación, se empleó la siguiente fórmula:

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

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  $x$ .

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

$$C_x = C_A \times \frac{A_x}{A_A} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde:

$C_x$ : Concentración (ppm) del compuesto de interés;

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

$A_x$ : Área del compuesto de interés;

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

### **3.8. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA) DE LOS EXTRACTOS Y ACEITES ESENCIALES DE LAS HOJAS DE *Lippia alba***

Con el fin de establecer la relación entre la variación composicional de los extractos y AEs de las hojas *L. alba* obtenidos por SDE y MWHD y la hora del día, 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 tener un análisis más claro de la influencia de la hora de colecta sobre la composición química de las hojas de *L. alba*, se relacionó cada una de las variables ambientales registradas (temperatura del suelo, temperatura ambiente, humedad e intensidad lumínica) con los componentes principales obtenidos mediante las dos técnicas de extracción empleadas. Los resultados se clasificaron en subconjuntos, según su distancia en el espacio formado por los componentes principales obtenidos del conjunto de los datos.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se hace una discusión de los resultados obtenidos, acorde con los objetivos de investigación planteados. Como ya se ha mencionado, para alcanzar los objetivos, el trabajo se ha dividido en dos partes. En la primera, se analizó el contenido de carvona presente en las hojas de *L. alba*, recolectadas durante el día y la noche, y su relación con los parámetros ambientales. En la segunda parte, se estudió la variación del rendimiento del AE obtenido en diferentes etapas del ciclo circadiano de la planta.

### 4.1. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DEL SUELO

El análisis físico-químico del suelo del cultivo experimental de *Lippia alba*, que se presenta en la **Tabla 18**, muestra que se trata de un terreno franco-arcillo arenoso; con niveles no detectables de cobre; bajo contenido de materia orgánica, nitrógeno, fósforo, magnesio, boro, manganeso y zinc; niveles medios de calcio, potasio y azufre; contenido normal de sodio y pH ligeramente ácido (pH=6,2). En este terreno las plantas presentaron un desarrollo foliar y características físicas adecuadas.

**Tabla 18.** Elementos presentes en el suelo del cultivo experimental de *Lippia alba*.

Elementos analizados	meq/100g suelo	Elementos analizados	ppm
Ca	5,70	S	11,9
Mg	0,71	B	0,27
Na	0,07	Fe	32,0
K	0,38	Mn	0,52
Al	-	Cu	N.D*
		Zn	0,96

\*N.D: No detectable por debajo de la concentración mínima determinada por el método usado.

## 4.2. FIGURAS ANALÍTICAS DE MÉRITO

### 4.2.1. Repetibilidad de los parámetros cromatográficos

Para la evaluación de la precisión (expresada como repetibilidad) del método analítico utilizado, se tomó una muestra (extracto obtenido a las 15 h, del día 3 de extracción) y se inyectó tres veces en el GC-MS bajo las mismas condiciones de operación usadas durante toda la investigación, las cuales se describen en el **Numeral 3.6** de la Parte Experimental. Se calcularon la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación de los  $t_R$  y las áreas de los cinco compuestos principales, que representan más del 80% de la composición, en el extracto seleccionado, obtenido por SDE de las hojas de *L. alba*. Los resultados se presentan en las **Tablas 19 y 20**.

**Tabla 19.** Estudio de la repetibilidad del método analítico usando los  $t_R$ , obtenidos por GC-MS (Columna DB-5, 60m), de los compuestos principales extraídos por SDE de las hojas de *L. alba*.

Compuestos*	Tiempos de retención, min			$\bar{X}$	S	CV, %
	N° de inyecciones					
	1	2	3			
Carvona	30,704	30,680	30,696	30,69	± 0,01	0,04
Limoneno	21,942	21,966	21,942	21,95	± 0,01	0,06
Piperitona	30,895	30,876	30,884	30,89	± 0,01	0,03
Piperitenona	33,972	33,975	33,965	33,971	± 0,005	0,02
Biciclosesquifelandreno	39,100	39,098	39,089	39,096	± 0,006	0,01

\*Los compuestos escogidos representan más del 80 % de la composición de las hojas de *L. alba*.

Tal como se muestra en la **Tabla 19**, se obtuvieron coeficientes de variación por debajo de 0,06 %. Estos valores son muy por debajo del valor máximo permitido

que establecen las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP, **ACS Professional Reference Book**), i.e. de 2 %; con ello, se evidencia la alta repetibilidad en las inyecciones.

**Tabla 20.** Estudio de repetibilidad de las áreas de picos cromatográficos obtenidos por GC-MS (Columna DB-5, 60m), de los compuestos principales extraídos por SDE de las hojas de *L. alba*.

Compuestos*	ÁREA, cuentas					
	N° de inyecciones			$\bar{X}$	S	CV, %
	1	2	3			
Carvona	1345495248	1316120097	1380156285	1,35E+09	± 3,21E+07	2,38
Limoneno	1164405868	1180194166	1193212386	1,18E+09	± 1,44E+07	1,22
Piperitona	109577709	105644923	112147967	1,09E+08	± 3,28E+06	3,00
Piperitenona	227690665	222117057	245743595	2,32E+08	± 1,24E+07	5,33
Biciclosesquifelandreno	142183795	136097019	156544832	1,45E+08	± 1,05E+07	7,24

\*Los compuestos escogidos representan más del 80 % de la composición de las hojas de *L. alba*.

Los resultados, que aparecen en la **Tabla 20**, muestran una alta repetibilidad en las mediciones de las áreas de picos cromatográficos, ya que cumplen con las exigencias de Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP), que recomiendan valores inferiores al 10 % para las áreas de los picos cromatográficos.

### 4.3. REPRODUCIBILIDAD Y REPETIBILIDAD DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN

#### 4.3.1. Repetibilidad de la técnica de extracción

Con el fin de evaluar la repetibilidad de la técnica de extracción SDE, se realizaron tres extracciones siguiendo el procedimiento descrito en el **Numeral 3.4.3** de la

Parte Experimental; la muestra representativa, de la cual se realizaron tres extracciones, se recolectó a las 15 h y se conservó dentro de un frasco tipo *Dewar* fabricado caseramente.

Se evaluó la precisión (expresada como repetibilidad) de la técnica de extracción, inyectando los tres extractos obtenidos en el GC-MS, bajo los mismos parámetros operacionales, los cuales están descritos en el **Numeral 3.6** de la Parte Experimental. Se calcularon la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación de  $t_R$  y de las áreas de los cinco compuestos principales, que representan más del 80% de la composición, en los tres extractos obtenidos por SDE de las hojas de *L. alba*. Los resultados se presentan en las **Tablas 21 y 22**.

**Tabla 21.** Estudio de la repetibilidad de la técnica de extracción, usando los  $t_R$ , obtenidos por GC-MS (Columna DB-5, 60m), de los compuestos principales extraídos por SDE de las hojas de *L. alba*.

Compuestos*	Tiempos de retención, min			$\bar{x}$	S	CV, %
	N° de extracción					
	1	2	3			
Carvona	30,599	30,643	30,625	30,62	± 0,02	0,07
Limoneno	21,786	21,802	21,808	21,805	± 0,004	0,02
Piperitona	30,891	30,876	30,869	30,88	± 0,01	0,04
Piperitenona	33,923	33,960	33,945	33,94	± 0,02	0,05
Biciclosesquifelandreno	39,076	39,080	39,078	39,079	± 0,001	0,004

\*Los compuestos escogidos representan más del 80 % de la composición de las hojas de *L. alba*.

Tal como se muestra en la **Tabla 21**, se obtuvieron coeficientes de variación por debajo de 0,07 %. Estos valores no sobrepasan el valor máximo permitido que establecen las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP), *i.e.* de 2 %.

**Tabla 22.** Estudio de la repetibilidad de la técnica de extracción usando las áreas de picos cromatográficos obtenidos por GC-MS (Columna DB-5, 60m), de los compuestos principales extraídos por SDE de las hojas de *L. alba*.

Compuestos*	ÁREA, cuentas			$\bar{X}$	S	CV, %
	N° de extracción					
	1	2	3			
Carvona	1337703522	1228671951	1199728082	1,26E+09	± 7,28E+07	5,8
Limoneno	937571631	906023883	867315626	9,04E+08	± 3,52E+07	3,9
Piperitona	137026798	130640233	127699409	1,32E+08	± 4,77E+06	3,6
Piperitenona	193429601	221026044	194097154	2,03E+08	± 1,57E+07	7,8
Biciclosesquifelandreno	132338946	91835404	91847648	1,05E+08	± 2,34E+07	22,2

\*Los compuestos escogidos representan más del 80 % de la composición de las hojas de *L. alba*.

Los resultados, que aparecen en la **Tabla 22**, muestran una alta repetibilidad en las mediciones de las áreas de picos cromatográficos, ya que cumplen con las exigencias de Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP), que recomiendan valores inferiores al 10 % para las áreas de los picos cromatográficos. Solo, el biciclosesquifelandreno reportó un valor superior al permitido.

Con los resultados obtenidos en el análisis de repetibilidad de la técnica de extracción SDE, mostrados en las **Tablas 21 y 22**, se puede concluir, que para las extracciones que se realizaron durante el ciclo circadiano de la planta, las variaciones en el contenido de la carvona presente en el extracto de las hojas de *L. alba*, no se debían a la técnica de extracción.

### 4.3.2. Reproducibilidad de la técnica de extracción (SDE)

La reproducibilidad de la SDE se determinó realizando las extracciones por triplicado, con tres analistas diferentes. En la **Tabla 23** se muestran los resultados de estos experimentos.

**Tabla 23.** Reproducibilidad de la técnica SDE, evaluando el contenido de carvona en cada una de las muestras obtenidas.

Hora de recolección	Concentración, ppm			$\bar{X}$	S	CV, (%)
	Analista					
	1	2	3			
3	8786	10231	11248	10000	± 1237	12,3
6	10102	10995	11065	10700	± 536	5
9	11444	10770	11191	11100	± 340	3,1
12	10753	10247	11574	10900	± 669	6,2
15	10435	12058	12817	12000	± 1217	10,3
18	9771	10099	10145	10000	± 203	2
21	11323	10295	6621	9000	± 2472	26,3
24	9753	9555	11234	10200	± 917	9

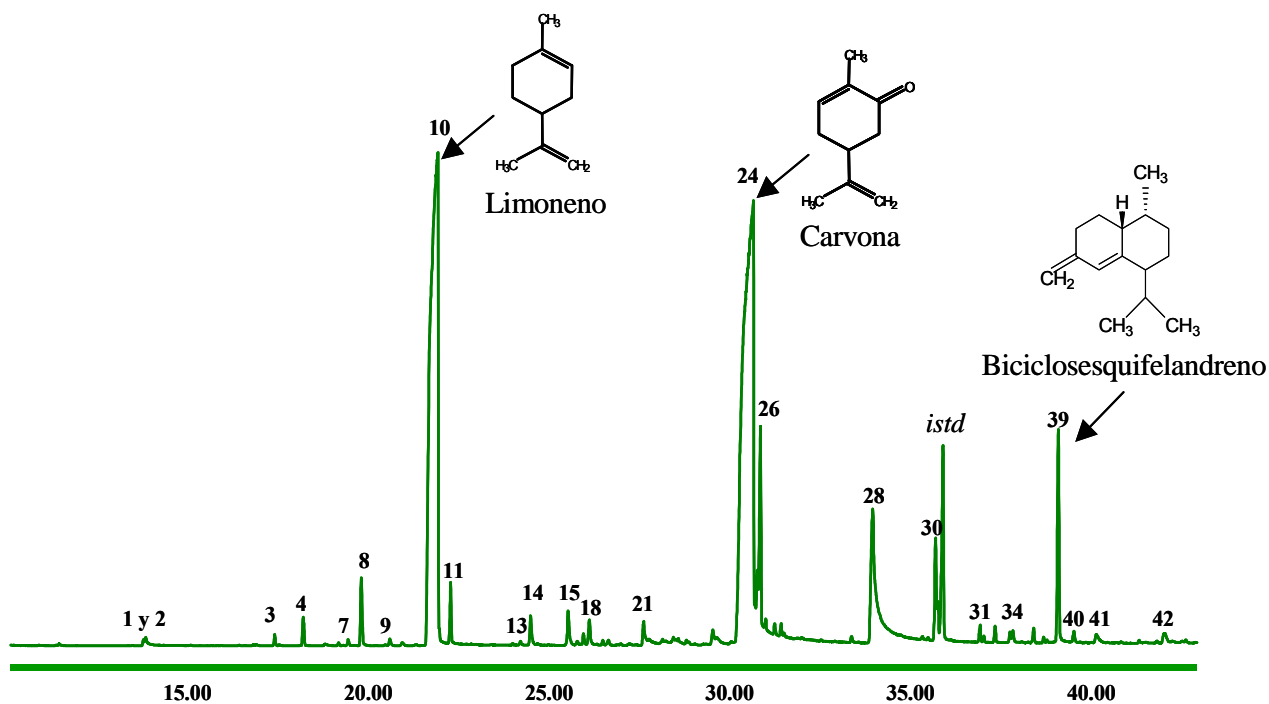
Los resultados, que aparecen en la **Tabla 23**, muestran una alta reproducibilidad en la medición de la carvona, a una misma hora de recolección, con excepción para las mediciones realizadas a las 3, 15 y 21 h (12,3; 10,3 y 26,3 %, respectivamente), cuyos valores altos, posiblemente, se deben a las pequeñas diferencias en las dimensiones de diferentes equipos de extracción empleados para los experimentos. Las mediciones de las 6, 9, 12, 18 y 24 horas cumplen con las exigencias de las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP), que recomiendan valores inferiores al 10%.

#### 4.4. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS EXTRACTOS Y ACEITES DE *Lippia alba*

##### 4.4.1. Extractos de las hojas de *Lippia alba* obtenidos por destilación-extracción con solvente simultánea

Los extractos se obtuvieron de las hojas de *L. alba* recolectadas de un cultivo experimental a diferentes horas del día y la noche. La metodología y condiciones de extracción fueron descritas en el **Numeral 3.3.1** de la Parte Experimental.

En la **Figura 37**, se ilustra el perfil cromatográfico típico, obtenido bajo las condiciones operacionales descritas en el **Numeral 3.6.1**, de metabolitos secundarios volátiles de las hojas de *L. alba*, aislados por SDE.



**Figura 37.** Perfil cromatográfico típico del extracto de hojas de *L. alba* obtenido por SDE. Columna DB-5MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los picos se reporta en la **Tabla 24**.

En la **Tabla 24**, se registran los compuestos aislados e identificados por GC-MS según el orden de elución en la columna DB-5MS, para cada uno de los extractos correspondientes a las diferentes horas de recolección junto con sus índices de retención y sus concentraciones (ppm).

En el extracto obtenido por SDE se detectaron, por GC-MS, 47 compuestos en concentraciones >2 ppm; se identificaron positivamente 46 compuestos que constituyen alrededor del 97,9 % de las muestras analizadas, usando índices de Kovàts (en columnas polar y apolar) y espectros de masas (EI, 70 eV), bajo los parámetros de integración aplicados (umbral de integración, *Thshd* = 16, y área de rechazo del pico en la base = 1). La identificación de los compuestos carvona y limoneno, fue confirmada utilizando patrones certificados de R-carvona y R-limoneno, índices de Kovàts y sus espectros de masas. La cuantificación de los compuestos de los extractos se realizó empleando la técnica de estándar interno, siguiendo el procedimiento descrito en el **Numeral 3.7** de la Parte Experimental.

Los siguientes fueron los principales componentes presentes en los extractos de hojas de *L. alba*: carvona (40,7 - 39,25 %), limoneno (33,40 - 32,40 %), piperitenona (7,18 - 7,50 %), piperitona (3,55 - 3,24 %) y biciclosesquifelandreno (4,08 - 3,20 %). De acuerdo con los compuestos mostrados en la **Tabla 24**, se observó, que la composición química concuerda con la reportada por Stashenko *et al.* [159] en cuanto a los componentes mayoritarios, aislados por la misma técnica de extracción. Sin embargo, el número de compuestos identificados en la planta fue mayor en el presente trabajo.

**Tabla 24.** Composición química y concentraciones (ppm), de los componentes en los extractos de *L. alba*, aislados por SDE.

N° Pico Fig. 37	I <sub>k</sub>		Compuesto	Concentración (ppm), Hora de recolección, (n = 5)							
	DB-5	DB-WAX		3	6	9	12	15	18	21	24
				X <sup>(1)</sup> ± S	X <sup>(1)</sup> ± S	X <sup>(1)</sup> ± S	X <sup>(1)</sup> ± S	X <sup>(1)</sup> ± S	X <sup>(1)</sup> ± S	X <sup>(1)</sup> ± S	X <sup>(1)</sup> ± S
1	801	1024	Hexanal	8*	10 *	0	12 *	0	0	2 *	6 *
2	844	1081	<i>trans</i> -3-Hexenol	60 ± 26	60 ± 13	30 ± 6	50 ± 24	70 ± 7	70 ± 30	60 ± 25	50 ± 24
3	939	1161	α-Pineno	40 ± 6	40 ± 3	40 ± 6	40 ± 9	40 ± 7	40 ± 9	40 ± 5	30 ± 4
4	954	1178	Canfeno	100 ± 15	110 ± 12	110 ± 14	110 ± 26	110 ± 17	100 ± 22	100 ± 13	90 ± 12
5	959	1199	Benzaldehído	10*	15 *	0	19 *	16 *	0	11 *	10*
6	969	1130	Sabineno	8 *	13 *	0	13 ± 2	11 *	0	10 *	9 *
7	979	1205	β-Pineno	6 ± 6	6 ± 3	8 ± 9	10 ± 12	10 ± 10	4 ± 4	4 ± 3	4 ± 6
7	979	1203	Octen-3-ol	24 ± 6	24 ± 3	32 ± 9	20 ± 12	20 ± 12	16 ± 4	16 ± 3	16 ± 6
8	991	1212	Mirceno	270 ± 39	290 ± 25	270 ± 18	290 ± 45	280 ± 30	260 ± 51	270 ± 31	240 ± 21
9	1009	1172	<i>p</i> -Cimeno	40 ± 8	40 ± 10	40 ± 10	40 ± 11	40 ± 6	40 ± 12	40 ± 10	30 ± 6
10	1040	1256	Limoneno <sup>a</sup>	9000 ± 1264	9500 ± 566	9200 ± 555	10000 ± 1070	9500 ± 938	9000 ± 1427	9000 ± 1040	8100 ± 480
11	1049	1265	<i>trans</i> -β-Ocimeno	220 ± 26	230 ± 19	220 ± 9	230 ± 28	230 ± 31	210 ± 50	220 ± 29	190 ± 14
12	1090	1302	Terpinoleno	5 *	0	13 *	13 *	0	0	9 *	5 *
13	1095	1338	<i>p</i> -Cimeneno	20 ± 2	20 ± 1	20 ± 4	20 ± 3	20 ± 2	20 ± 2	20 ± 2	20 ± 3

\* Compuestos que se detectaron en un sólo día de extracción, a una hora de recolección. <sup>1</sup>Promedio de cinco extracciones por SDE.

<sup>a</sup>Confirmado por espectrometría de masas, usando sustancia patrón. <sup>b</sup>Identificado tentativamente.

**Tabla 24.** Continuación

14	1102	1312	Linalool	140 ± 20	150 ± 22	150 ± 19	160 ± 26	150 ± 15	130 ± 27	140 ± 19	130 ± 16
15	1128	1574	<i>endo</i> -Fenchol	30 ± 21	30 ± 13	30 ± 14	40 ± 23	40 ± 17	40 ± 19	40 ± 18	30 ± 23
15	1128	1334	<i>trans-p</i> -Menta-2,8-dien-1-ol	130 ± 21	130 ± 21	130 ± 21	130 ± 21	140 ± 21	130 ± 21	130 ± 21	130 ± 21
16	1134	1340	<i>trans</i> -Hidrato de pineno	20 ± 3	20 ± 1	20 ± 2	20 ± 2	20 ± 1	20 ± 2	20 ± 1	20 ± 2
17	1139	1344	<i>cis</i> -Óxido de limoneno	40 ± 5	40 ± 3	40 ± 2	40 ± 8	40 ± 3	40 ± 8	40 ± 7	40 ± 6
18	1143	1348	<i>cis-p</i> -Menta-2,8-dien-1-ol	40 ± 14	40 ± 11	40 ± 12	50 ± 15	50 ± 17	70 ± 12	40 ± 14	40 ± 11
18	1143	1356	<i>trans</i> -Óxido de limoneno	60 ± 14	60 ± 11	60 ± 12	70 ± 15	80 ± 17	100 ± 12	70 ± 14	60 ± 11
19	1156	1360	Alcanfor	30 ± 3	30 ± 2	30 ± 2	30 ± 4	30 ± 2	30 ± 4	30 ± 2	30 ± 3
20	1165	1356	Hidrato de canfeno	6 *	0	0	0	0	0	10 *	9 *
21	1181	1381	Borneol	200 ± 70	210 ± 65	210 ± 63	190 ± 62	190 ± 36	160 ± 24	180 ± 61	190 ± 72
22	1212	1406	<i>trans</i> -Dihidrocarvona	30 *	0	40 ± 7	20 ± 21	10 ± 1	20*	20 ± 14	40 *
23	1232	1842	<i>trans</i> -Carveol	80 ± 44	90 ± 50	80 ± 49	100 ± 23	100 ± 64	70 ± 46	70 ± 39	60 ± 67
23	1232	----	Cumin aldehído <sup>b</sup>	70 ± 44	70 ± 50	70 ± 49	90 ± 23	80 ± 64	70 ± 46	80 ± 39	70 ± 67
24	1262	1442	Carvona <sup>a</sup>	11000 ± 1503	11700 ± 900	11600 ± 892	12000 ± 1469	11400 ± 781	11000 ± 1159	11000 ± 988	11000 ± 1109
25	1265	1448	<i>trans</i> -Epóxido de piperitona	300 ± 44	300 ± 13	300 ± 47	300 ± 54	300 ± 66	200 ± 46	200 ± 115	300 ± 30
26	1267	1448	Piperitona	1000 ± 234	920 ± 76	920 ± 67	1000 ± 109	940 ± 90	900 ± 116	800 ± 332	900 ± 131
27	1283	1453	<i>trans</i> -Óxido de carvona	50 ± 18	50 ± 18	50 ± 23	60 ± 11	60 ± 22	50 ± 17	50 ± 20	60 ± 28

\* Compuestos que se detectaron en un solo día de extracción, a una hora de recolección. <sup>1</sup>Promedio de cinco extracciones por SDE.

<sup>a</sup> Confirmado por espectrometría de masas, usando sustancia patrón. <sup>b</sup> Identificado tentativamente.

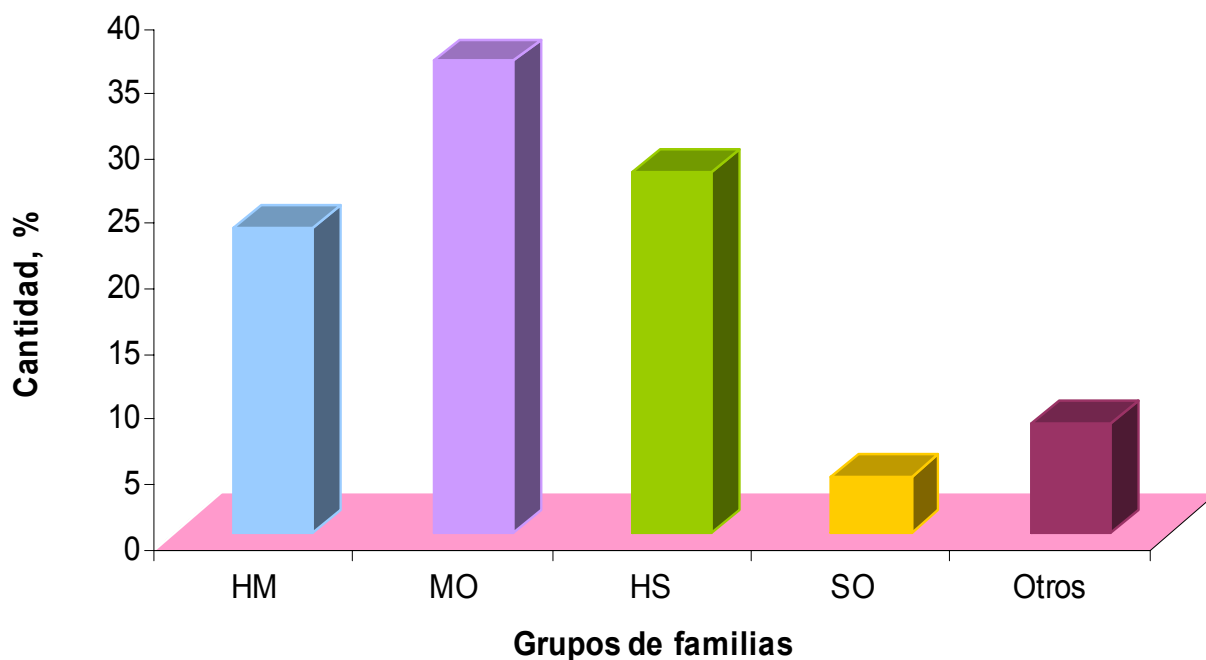
**Tabla 24.** Continuación

28	1350	1517	Piperitenona	2100± 354	2000 ± 327	2100 ± 289	2100± 346	2100 ± 400	2000 ± 218	1900 ± 198	1900 ± 281
29	1385	1549	$\alpha$ -Copaeno	30 ± 10	20± 11	30 ± 14	30 ± 14	30 ± 12	30 ± 9	30 ± 10	40 ± 3
30	1395	1556	$\beta$ -Bourboneno	330 ± 57	340 ± 39	350 ± 92	400 ± 74	400 ± 98	330 ± 98	340 ± 16	320 ± 71
30	1395	1596	$\beta$ -Elemeno	180 ± 57	190 ± 39	190 ± 92	230 ± 74	230 ± 98	190 ± 98	190 ± 16	170 ± 71
31	1430	1491	$\beta$ -Ylangeno	60 ± 8	60 ± 5	60 ± 12	70 ± 9	70 ± 11	60 ± 14	60 ± 5	60 ± 9
32	1433	1585	<i>trans</i> -Cariofileno	20 ± 4	30 ± 3	30 ± 6	30 ± 4	30 ± 4	20 ± 6	30 ± 3	20 ± 4
33	1443	1592	$\beta$ -Copaeno	60 ± 8	60 ± 7	60 ± 14	70 ± 10	70 ± 12	50 ± 14	50 ± 5	50 ± 11
34	1455	1600	<i>trans</i> - $\beta$ -Farnaseno	40 ± 16	40 ± 14	40 ± 19	50 ± 11	60 ± 21	40 ± 21	40 ± 4	40 ± 18
35	1457	1617	<i>allo</i> -Aromadendreno	50 ± 5	50 ± 7	50 ± 5	60 ± 6	60 ± 8	50 ± 7	50 ± 4	40 ± 10
36	1474	1624	$\alpha$ -Guaineno	60 ± 15	60 ± 13	60 ± 19	70 ± 12	70± 15	50 ± 17	60 ± 12	50 ± 15
37	1485	1660	$\gamma$ -Muuroleno	20 ± 3	20 ± 6	20± 5	20 ± 4	20 ± 7	20 ± 7	20± 4	20 ± 6
38	1494	1603	Germacreno D	10 ± 3	0	10 *	0	20 *	0	0	10 ± 2
39	1494	1634	Biciclosesquifelandreno	1000 ± 251	1100 ± 212	1100 ± 307	1200 ± 167	1100 ± 199	900 ± 320	1000 ± 205	900 ± 244
40	1508	1645	Biciclogermacreno	60 ± 16	60 ± 17	70 ± 25	70 ± 14	70 ± 16	50 ± 21	60 ± 17	50 ± 16
41	1529	1671	$\gamma$ -Cadineno	10 ± 18	10 ± 18	10 ± 29	10 ± 31	10 ± 26	10 ± 28	10 ± 8	10 ± 17
41	1529	1855	Cubebol	50 ± 18	60 ± 18	70 ± 29	60 ± 31	50 ± 26	50 ± 28	60 ± 8	50 ± 17
42	1593	2069	Germacreno D-4-ol	70 ± 19	0	70 ± 24	60 ± 26	50 ± 10	0	50 ± 30	60 ± 19

\* Compuestos que se detectaron en un solo día de extracción, a una hora de recolección. <sup>1</sup>Promedio de cinco extracciones por SDE.

<sup>a</sup> Confirmado por espectrometría de masas, usando sustancia patrón. <sup>b</sup> Identificado tentativamente.

En la **Figura 38** se registran las principales familias de compuestos en uno, ya que no se presentó variación cualitativa, de los extractos de hojas de *L. alba*, recolectadas a las 3 h y obtenidos por SDE, a saber: HM: Hidrocarburos monoterpénicos, MO: Monoterpenos oxigenados, HS: Hidrocarburos sesquiterpénicos y SO: Sesquiterpenos oxigenados.

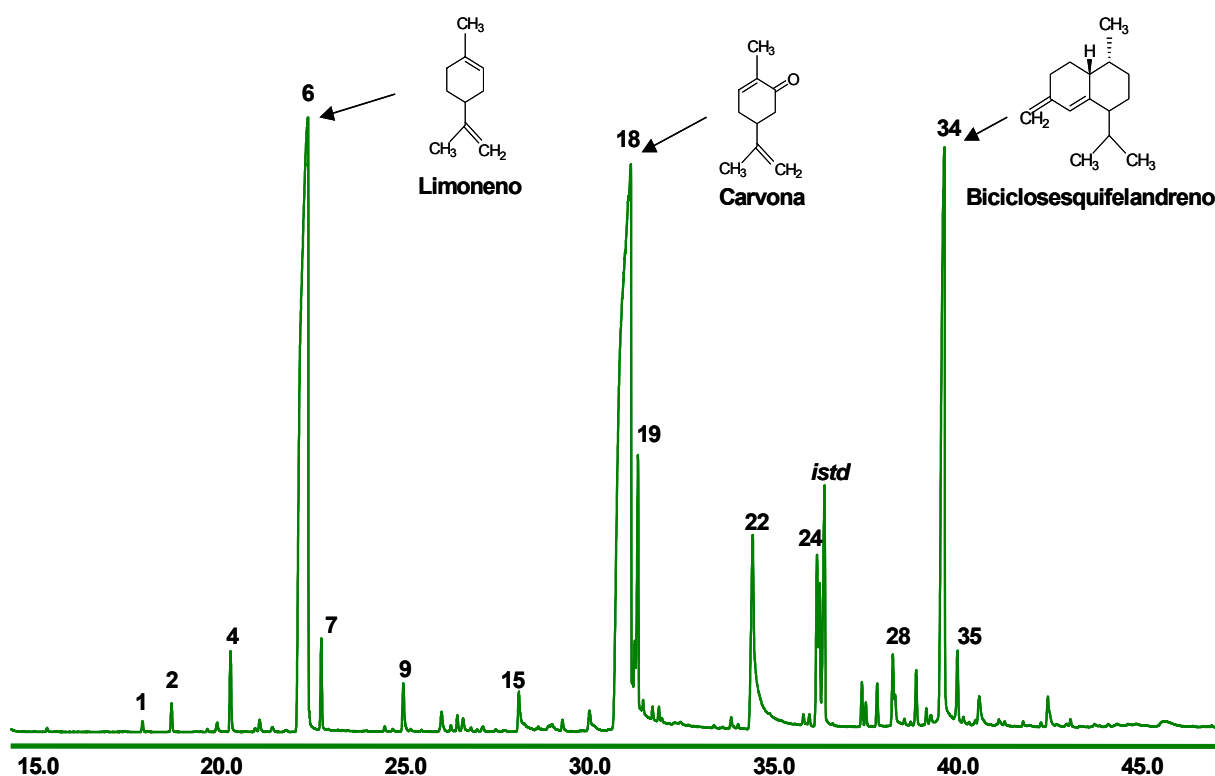


**Figura 38.** Distribución de las principales familias de los compuestos en el extracto de hojas de *L. alba*, obtenido por SDE.

El extracto de las hojas de *L. alba* puede clasificarse como de tipo monoterpenoide; según la **Figura 38**, donde se ilustra la composición del extracto de acuerdo con las familias de compuestos presentes, se observa que la mayor proporción corresponde a la familia de monoterpenos oxigenados (36,2%). Los hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpénicos presentan una proporción de 23,4 y 27,7%, respectivamente. Por último, el contenido de sesquiterpenos oxigenados es bajo (4,3%).

#### 4.4.2. Aceites esenciales obtenidos de las hojas *Lippia alba*, por hidrodestilación asistida por radiación de microondas

En la **Figura 39**, se ilustra el perfil cromatográfico típico, obtenido por MWHD bajo las condiciones operacionales descritas en el **Numeral 3.6.1** de la Parte Experimental, de metabolitos secundarios volátiles de las hojas de *L. alba*.



**Figura 39.** Perfil cromatográfico típico del AE de hojas de *L. alba* obtenido por MWHD. Columna DB-5MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los picos se reporta en la **Tabla 25**.

En la **Tabla 25**, se registran los compuestos identificados por GC-MS según el orden de elución en la columna DB-5MS, para cada uno de los AEs

correspondientes a las diferentes horas de recolección junto con sus índices de retención y concentraciones (ppm).

En el AE obtenido por MWHD se detectaron, por GC-MS 41 compuestos en concentraciones >10 ppm; se identificaron positivamente 40 compuestos que constituyen alrededor del 97,9 % de las muestras analizadas, usando índices de Kovàts (en columnas polar y apolar) y espectros de masas (EI, 70 eV), bajo los parámetros de integración aplicados (umbral de integración, *Thshd* = 16, y área de rechazo del pico en la base = 1). La identificación de los compuestos carvona y limoneno, fue confirmada utilizando patrones certificados de R-carvona y R-limoneno, índices de Kovàts y sus espectros de masas. La cuantificación de los compuestos de los AEs se realizó empleando la técnica de estándar interno, siguiendo el procedimiento descrito en el **Numeral 3.7** de la Parte Experimental.

Los siguientes fueron los principales componentes presentes en los AEs de las hojas de *Lippia alba*, extraídos por MWHD: carvona (38,2 - 39,0 %), limoneno (30,2 - 28,9 %), biciclosesquifelandreno (10,8 - 9,8 %), piperitenona (6,0 - 5,6 %) y piperitona (3,4 - 3,2 %).

De acuerdo con los compuestos registrados en la **Tabla 25**, se observó, que la composición química concuerda con la reportada por Stashenko *et al.* [159] y Durán, D.C. [56], en cuanto a los componentes mayoritarios, aislados por la misma técnica de extracción. Sin embargo, el número de compuestos detectados en el AE, reportado por Durán, D.C. [56], fue más alto, con 65 compuestos.

**Tabla 25.** Composición química y concentraciones (ppm), de los componentes del AE de *Lippia alba*, obtenido por MWHD.

N° Pico Fig. 39	I <sub>k</sub>		Compuesto	Concentración (ppm), Hora de recolección, (n=3)							
	DB-5	DB-WAX		3	6	9	12	15	18	21	24
				X <sup>(1)</sup> ± S	X <sup>(1)</sup> ± S	X <sup>(1)</sup> ± S	X <sup>(1)</sup> ± S	X <sup>(1)</sup> ± S	X <sup>(1)</sup> ± S	X <sup>(1)</sup> ± S	X <sup>(1)</sup> ± S
1	939	1161	α-Pineno	20 ± 3	30 ± 2	30 ± 4	20 ± 8	30 ± 4	30 ± 4	30 ± 4	30 ± 3
2	954	1178	Canfeno	70 ± 6	70 ± 9	70 ± 12	60 ± 23	80 ± 13	70 ± 12	70 ± 12	70 ± 11
3	979	1205	β-Pineno	6 ± 2	30 ± 13	30 ± 11	6 ± 17	30 ± 16	6 ± 12	30 ± 19	30 ± 18
3	979	1203	Octen-3-ol	24 ± 2	9 ± 13	9 ± 11	24 ± 17	9 ± 16	24 ± 12	9 ± 19	9 ± 18
4	991	1212	Mirceno	200 ± 1	210 ± 2	200 ± 12	170 ± 60	220 ± 16	210 ± 19	210 ± 12	200 ± 6
5	1009	1172	p-Cimeno	30 *	40 ± 1	30 ± 3	20 ± 9	40 ± 3	40 ± 3	40 ± 1	30 ± 1
6	1040	1256	Limoneno <sup>a</sup>	7000 ± 200	7500 ± 493	6700 ± 353	6000 ± 1724	7600 ± 189	7200 ± 337	7300 ± 537	6900 ± 634
7	1049	1265	<i>trans</i> -β-ocimeno	190 ± 1	210 ± 17	200 ± 20	180 ± 63	230 ± 32	220 ± 32	210 ± 24	210 ± 14
8	1090	1302	Terpinoleno	10*	0	14 *	10 ± 2	0	11*	14 *	14*
9	1102	1312	Linalool	140 ± 1	140 ± 24	130 ± 19	120 ± 43	140 ± 25	140 ± 17	140 ± 20	140 ± 24
10	1128	1574	<i>endo</i> -Fenchol	80 *	80 ± 5	70 ± 2	60 ± 18	70 ± 3	70 ± 3	70 ± 2	80 ± 5
11	1134	1340	<i>trans</i> -Hidrato de pineno	10 *	20 ± 3	20 ± 3	10 ± 6	20 ± 2	20 ± 2	20 ± 3	20 ± 4
12	1139	1348	<i>cis-p</i> -Menta-2,8-dien-1-ol	40 ± 1	40 ± 6	40 ± 5	40 ± 14	40 ± 6	40 ± 6	40 ± 8	40 ± 13
13	1143	1681	<i>cis</i> -Verbenol	40 ± 1	50 ± 5	40 ± 2	40 ± 11	40 ± 1	40 ± 2	40 ± 1	50 ± 5
14	1181	1660	Isoborneol	150 ± 1	150 ± 27	160 ± 12	170 ± 73	150 ± 3	160 ± 20	140 ± 27	130 ± 95
15	1185	1381	Borneol	50 ± 2	40 ± 1	30 ± 7	30 ± 11	50 ± 1	30 ± 2	40 ± 2	20 ± 0
16	1212	1406	<i>cis</i> -Dihidrocarvona	40 ± 1	40 ± 2	60 ± 21	50 ± 20	50 ± 6	40 ± 13	50 ± 4	40 ± 5
17	1232	1842	<i>trans</i> -Carveol	91 ± 9	50 ± 60	80 ± 52	80 ± 73	70 ± 75	80 ± 51	70 ± 76	80 ± 89
17	1232	1356	<i>cis-p</i> -Menta-1(7),8-dien-2-ol	29 ± 9	18 ± 60	20 ± 52	20 ± 73	20 ± 75	20 ± 51	20 ± 76	30 ± 89

\* Compuestos que se detectaron en un solo día de extracción a una hora de recolección. <sup>1</sup>Promedio de tres extracciones por MWHD.

<sup>a</sup> Confirmado por espectrometría de masas, usando sustancia patrón. <sup>b</sup> Identificado tentativamente.

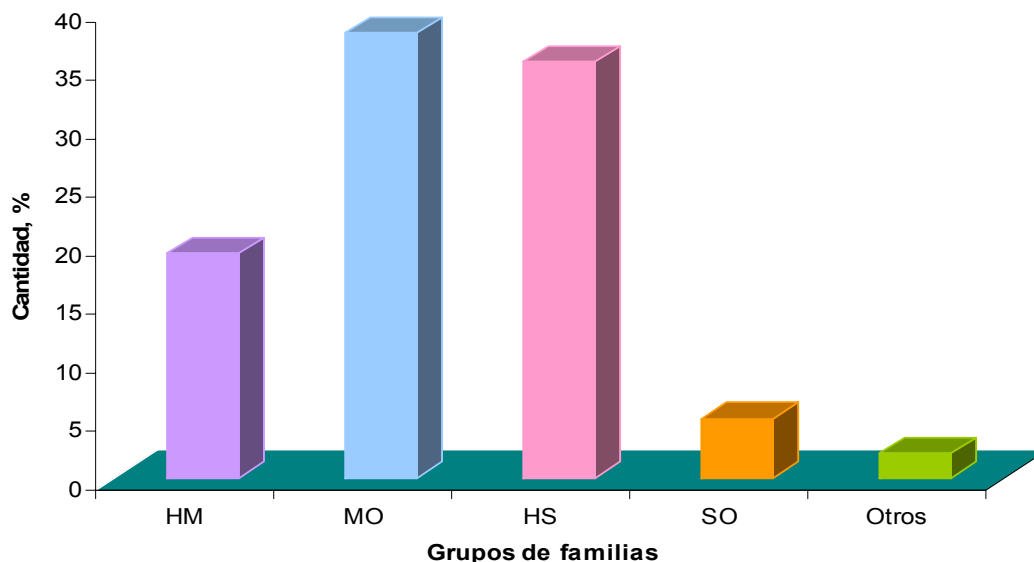
**Tabla 25.** Continuación

18	1262	1442	Carvona <sup>a</sup>	9200 ± 561	9500 ± 446	8900 ± 334	8000 ± 2502	9300 ± 484	9100 ± 225	9400 ± 207	8900 ± 360
19	1268	1448	Piperitona	660 ± 17	800 ± 131	700 ± 100	700 ± 317	800 ± 164	800 ± 167	800 ± 130	800 ± 117
20	1278	----	6-Hidroxi-carvotanacetona <sup>b</sup>	40 ± 1	50 ± 7	40 ± 6	40 ± 16	50 ± 9	60 ± 30	50 ± 9	70 ± 18
21	1335	1965	<i>trans</i> -Acetato de carvilo	30 *	30 ± 4	30 ± 4	30 ± 10	30 ± 1	30 ± 1	30 ± 5	30 ± 8
22	1350	1517	Piperitenona	1300 ± 39	1400 ± 111	1300 ± 254	1300 ± 502	1400 ± 122	1400 ± 119	1400 ± 250	1400 ± 282
23	1386	1549	α-Copaeno	20 ± 2	20 ± 4	40 ± 23	20 ± 11	30 ± 4	30 ± 3	30 ± 3	40 ± 24
24	1395	1556	β-Bourboneno	420 ± 33	420 ± 31	420 ± 19	360 ± 115	400 ± 42	420 ± 16	520 ± 197	430 ± 44
25	1397	1596	β-Elemeno	280 ± 36	300 ± 20	300 ± 13	300 ± 108	300 ± 21	320 ± 27	310 ± 53	300 ± 30
26	1431	1491	β-Ylangeno	90 ± 9	50 ± 5	90 ± 1	80 ± 29	90 ± 5	90 ± 8	90 ± 6	90 ± 7
27	1434	1585	<i>trans</i> -β-Cariofileno	50 ± 2	90 ± 6	50 ± 3	40 ± 16	50 ± 6	50 ± 7	50 ± 5	50 ± 5
28	1443	1592	β-Copaeno	90 ± 5	80 ± 7	80 ± 3	70 ± 26	80 ± 5	90 ± 11	90 ± 6	80 ± 6
29	1455	1600	<i>trans</i> -β-Farnaseno	150 ± 12	180 ± 11	210 ± 11	210 ± 12	180 ± 96	210 ± 79	190 ± 10	210 ± 9
30	1456	1617	<i>allo</i> -Aromadendreno	0	80 ± 4	90 ± 4	0	60 ± 4	80*	80 *	70 *
31	1474	1624	γ-Gurjuneno	110 ± 5	110 ± 10	120 ± 6	100 ± 37	110 ± 11	120 ± 16	110 ± 10	110 ± 10
32	1482	1660	γ-Muuroleno	30 ± 4	30 ± 2	40 ± 4	30 ± 11	30 ± 1	30 ± 1	40 ± 3	30 ± 4
33	1486	1603	Germacreno D	30 ± 7	30 ± 5	30 ± 10	30 ± 13	30 ± 1	30 ± 2	30 ± 6	30 ± 7
34	1496	1634	Biciclosesquifelandreno	2400 ± 141	2400 ± 236	2600 ± 91	2300 ± 816	2600 ± 234	2500 ± 328	2500 ± 197	2300 ± 177
35	1508	1645	Biciclogermacreno	170 ± 17	170 ± 35	130 ± 43	180 ± 78	170 ± 10	170 ± 37	190 ± 27	170 ± 34
36	1525	1671	γ-Cadineno	0	0	0	0	0	13 *	0	0
37	1528	1855	Cubebol	120 ± 4	120 ± 12	130 ± 3	110 ± 47	120 ± 2	120 ± 16	120 ± 16	120 ± 14
38	1546	1784	δ-Cadineno	19 *	0	26 *	21 *	0	23 *	0	21 *
39	1591	2069	Germacreno D-4-ol	100 ± 6	100 ± 7	100 ± 27	90 ± 43	90 ± 20	100 ± 13	100 ± 20	100 ± 26

\* Compuestos que se detectaron en un solo día de extracción a una hora de recolección. <sup>1</sup>Promedio de tres extracciones por MWHD.

<sup>a</sup> Confirmado por espectrometría de masas, usando sustancia patrón. <sup>b</sup> Identificado tentativamente.

En la **Figura 40** se registran las principales familias de compuestos en uno, ya que no se presentó variación cualitativa, de los AEs de hojas de *L. alba*, recolectadas a las 3 p.m. y obtenidos por MWHD, a saber: HM: Hidrocarburos monoterpénicos, MO: Monoterpenos oxigenados, HS: Hidrocarburos sesquiterpénicos y SO: Sesquiterpenos oxigenados.

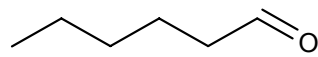


**Figura 40.** Distribución de las principales familias de los compuestos en el aceite esencial seleccionado de *L. alba*, obtenido por MWHD.

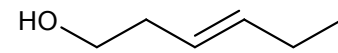
El AE de las hojas de *L. alba* puede clasificarse como de tipo monoterpenoide; según la **Figura 40**, donde se ilustra la composición del AE de acuerdo con las familias de compuestos presentes; se observa que la mayor proporción corresponde a la familia de monoterpenos oxigenados (38%). Los hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpénicos representan 19,2 y 35,6%, respectivamente. Por último, el contenido de sesquiterpenos oxigenados es de 5,1%.

Las estructuras químicas de los metabolitos secundarios volátiles identificados en los aceites y en los extractos presentes en las hojas de *L. alba*, aislados por MWHD y SDE, respectivamente, organizados según su orden de elución en la columna DB-5MS (60 m), véase **Figura 41**.

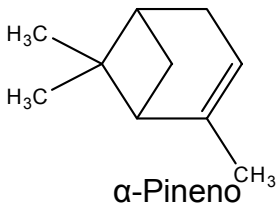
**Figura 41.** Estructuras químicas de los metabolitos secundarios volátiles presentes en las hojas de *L. alba*.



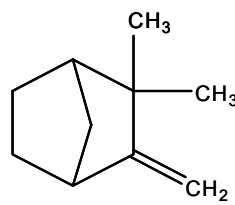
Hexanal



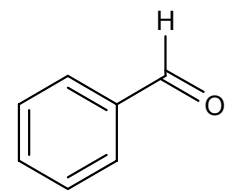
*trans*-3-Hexenol



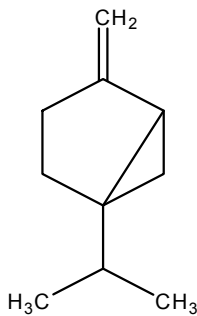
$\alpha$ -Pineno



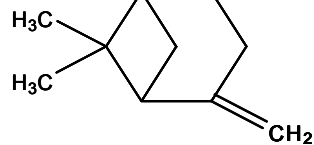
Carfeno



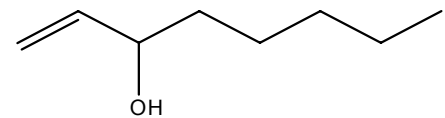
Benzaldehído



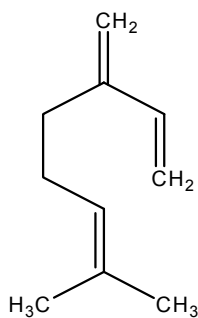
Sabineno



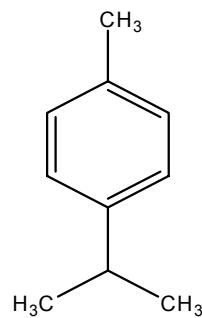
$\beta$ -Pineno



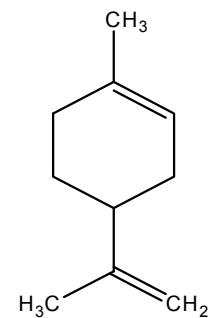
1-Octen-3-ol



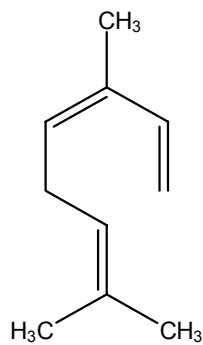
Mirceno



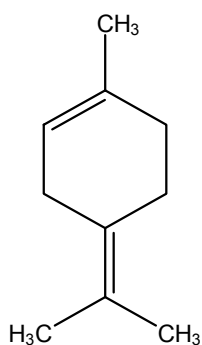
*p*-Cimeno



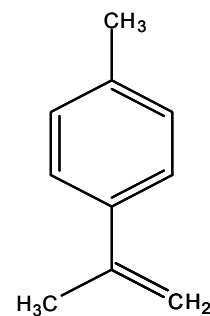
Limoneno



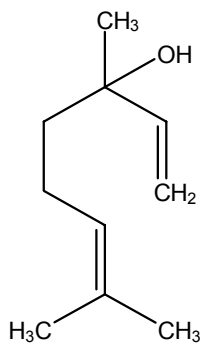
*trans*- $\beta$ -Ocimeno



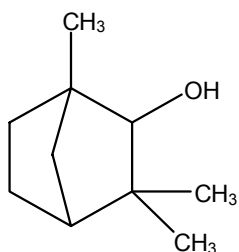
Terpinoleno



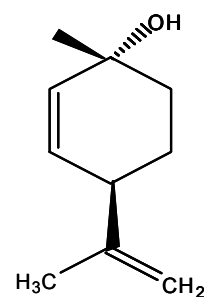
*p*-Cimeno



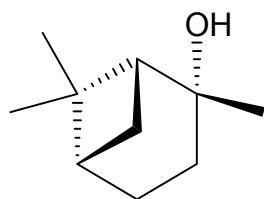
Linalool



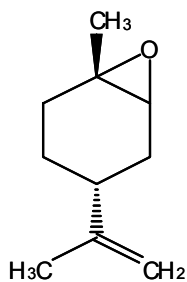
*endo*-Fenhol



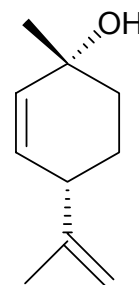
*trans-p*-Menta-2,8-dien-1-ol



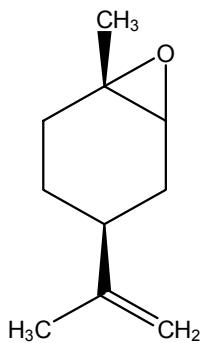
*trans*-Hidrato de pineno



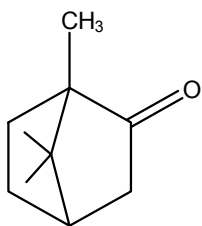
*cis*-Óxido de limoneno



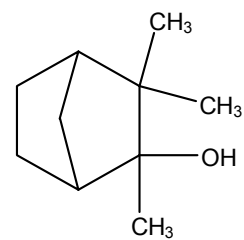
*cis-p*-Menta-2,8-dien-1-ol



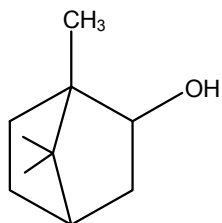
*trans*-Óxido de limoneno



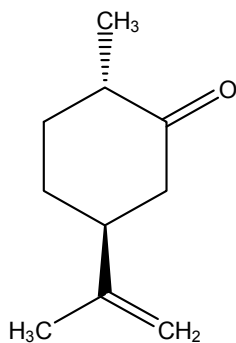
Alcanfor



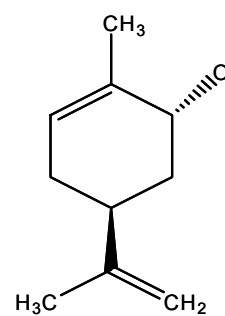
Hidrato de canfeno



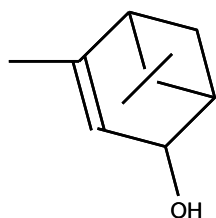
Borneol



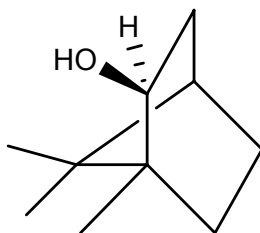
*trans*-Dihidrocarvona



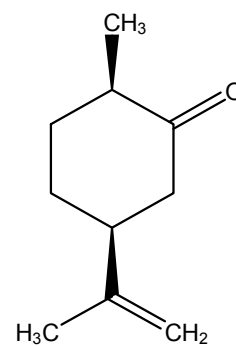
*trans*-Carveol



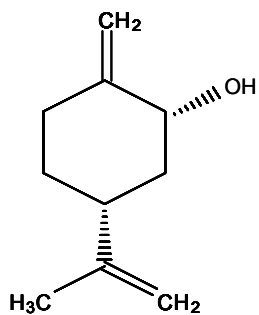
*cis*-Verbenol



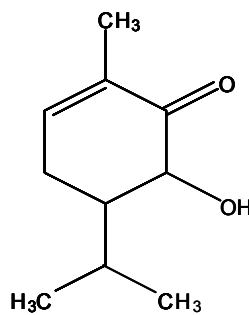
Isoborneol



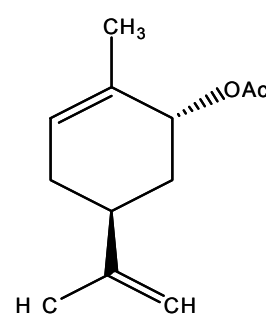
*cis*-Dihidrocarvona



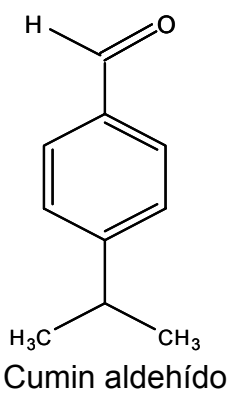
*cis-p*-Menta-1(7),8-dien-2-ol



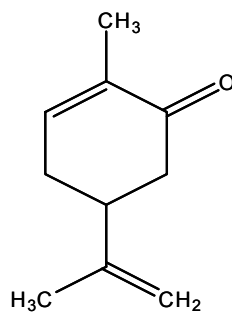
6-hidroxi-Carvotanacetona



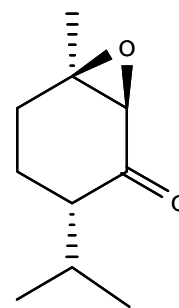
*trans*-Acetato de carvilo



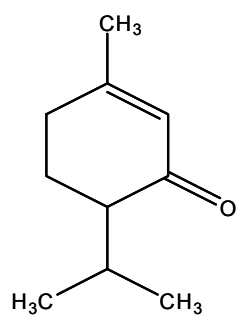
Cumin aldehído



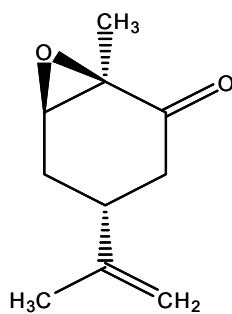
Carvona



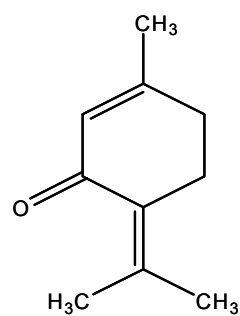
*trans*-Epóxido de piperitona



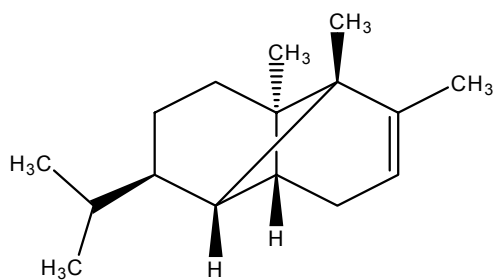
Piperitona



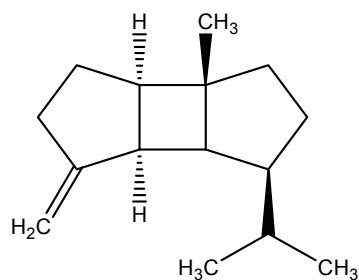
*trans*-Óxido de carvona



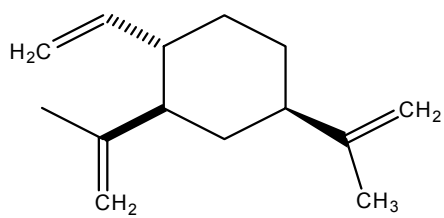
Piperitenona



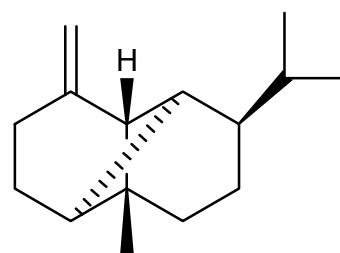
$\alpha$ -Copaeno



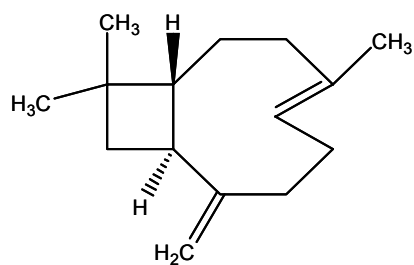
$\beta$ -Bourboneno



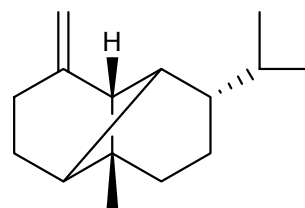
$\beta$ -Elemeno



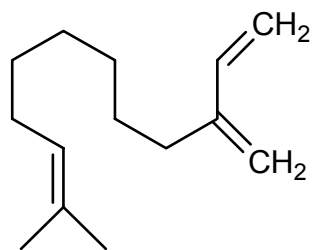
$\beta$ -Ylangeno



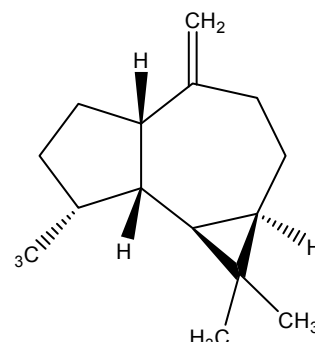
*trans*- $\beta$ -Cariofileno



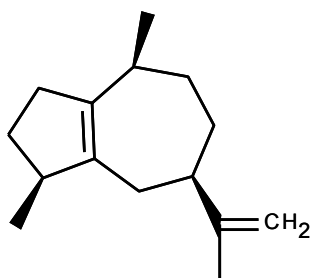
$\beta$ -Copaeno



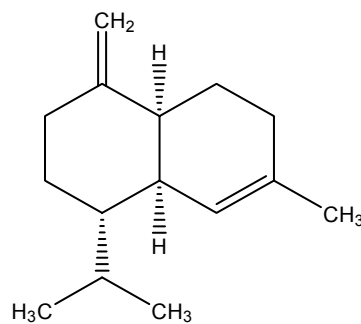
*trans*- $\beta$ -Farnaseno



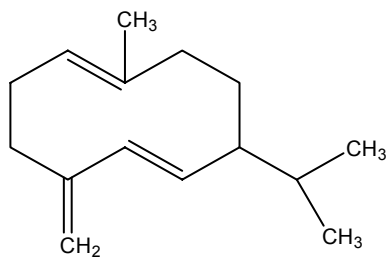
*allo*-Aromadendreno



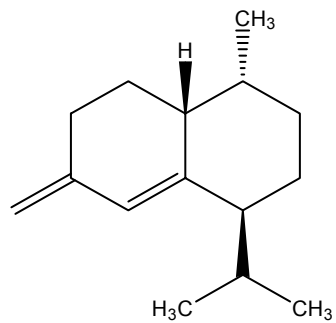
$\alpha$ -Guaieño



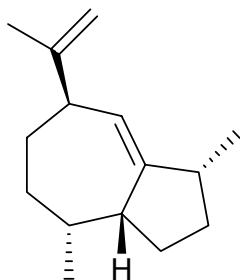
$\gamma$ -Muurelone



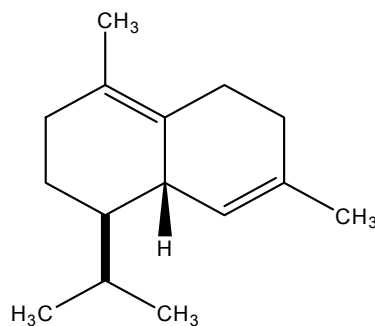
Germacreño D



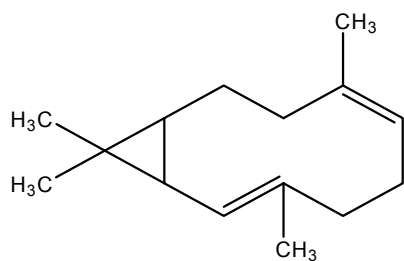
Biciclosesquifelandreno



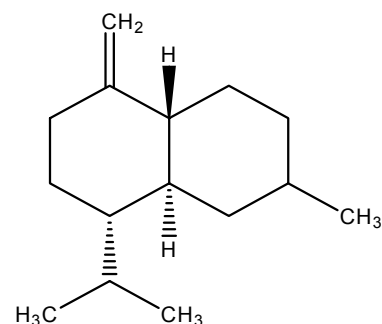
$\gamma$ -Gurjuneno



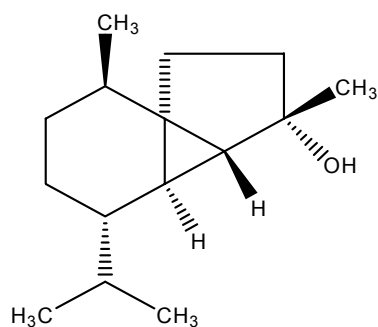
$\delta$ -Cadineno



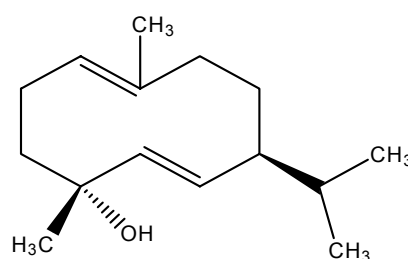
Bicyclogermacreno



$\gamma$ -Cadineno



Cubebol



Germacreno D-4-ol

En la **Tabla 26** se registra la cantidad de analito por kilogramo de material vegetal, calculada para los componentes mayoritarios de los AEs de hojas de *L. alba*, obtenidos por MWHD, recolectadas a diferentes horas del día y la noche.

**Tabla 26.** Cantidad de analito por kilogramo de material vegetal (M.V.) de los AEs aislados de hojas de *L. alba*

Compuesto	Concentración (g/kg de M.V.) <sup>b</sup> , hora de recolección							
	3	6	9	12	15	18	21	24
Limoneno	0,70	0,74	0,66	0,58	0,76	0,72	0,73	0,69
Carvona	0,92	0,95	0,89	0,78	0,93	0,91	0,94	0,89
Piperitona	0,07	0,08	0,07	0,07	0,08	0,08	0,08	0,08
Piperitenona	0,13	0,14	0,13	0,13	0,14	0,14	0,14	0,14
Biciclosquifelandreno	0,24	0,24	0,26	0,23	0,26	0,25	0,25	0,23

<sup>b</sup> Promedio de tres extracciones.

#### 4.5. ANÁLISIS POR GC-MS DE LOS EXTRACTOS Y AEs DE *Lippia alba*.

Los metabolitos aislados de las hojas de la especie *L. alba*, fueron identificados empleando los índices de retención de Kovàts, espectros de masas y patrones de terpenos certificados para los dos compuestos mayoritarios, carvona y limoneno. Para los Índices de retención se utilizaron sustancias patrón de hidrocarburos lineales (C<sub>10</sub>-C<sub>25</sub>) y los espectros de masas (MS) obtenidos por impacto de electrones (70 eV), los cuales fueron comparados con los reportados en la literatura [7], con los de las bases de datos, así como analizando “manualmente espectros” estudiando patrones de fragmentación de compuestos.

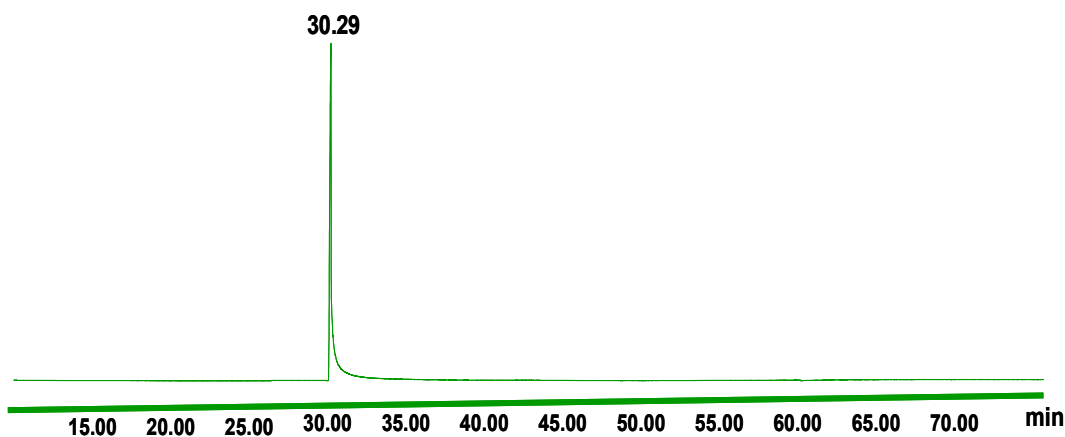
Los espectros de masas, obtenidos experimentalmente de cada compuesto presente en las mezclas, se compararon también con los de las bibliotecas, a saber: NBS 75K, WILEY 130K, NIST 2002 y ADAMS. A continuación, se presentan los espectros de masas típicos, obtenidos experimentalmente, de los componentes mayoritarios (en orden descendente de abundancia), y su interpretación.

- **Carvona:** Algunas de las propiedades físico-químicas que se reportan de los isómeros de carvona presentes en algunas especies se muestran en la **Tabla 27** [78]. La distinción entre los isómeros ópticos de carvona, R-carvona y S-carvona, que pueden encontrarse en la planta, se debe realizar por cromatografía quiral; este objetivo no fue planteado en esta investigación. Sin embargo, los espectros de masas de R-carvona y S-carvona son idénticos.

**Tabla 27.** Propiedades físico-químicas de R-carvona y S-carvona [78].

Propiedades físico-químicas	R-Carvona	S-Carvona
Estado físico y apariencia	Líquido de color verde paja	Líquido de color amarillo pálido
Punto de ebullición	231 °C	230 °C
Índices de refracción	1,495 - 1499 a 20 °C	1,496 - 1,499 a 20 °C
Solubilidad	Propilenglicol - Alcohol	Propilenglicol - Alcohol
Insoluble	Glicerina	Glicerina
Gravedad específica	0,956 - 0,960 a 25 °C	0,955 - 0,960 a 25 °C
Rotación óptica	[+50]° - [+60°]	[-57°] - [-62°]

Para la confirmación de la carvona presente en *L. alba*, se utilizó un patrón certificado del isómero R-carvona, para el cual se registraron el tiempo de retención y su índice de retención de Kovàts, así como se muestra en la **Figura 42** y la **Tabla 28**.

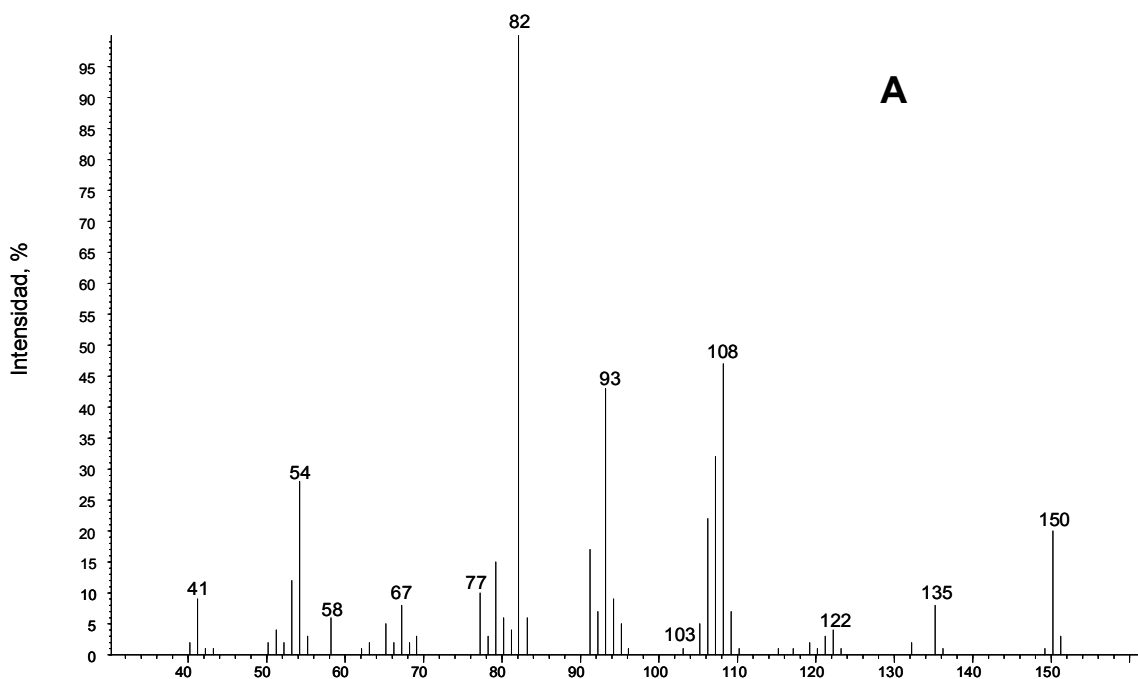


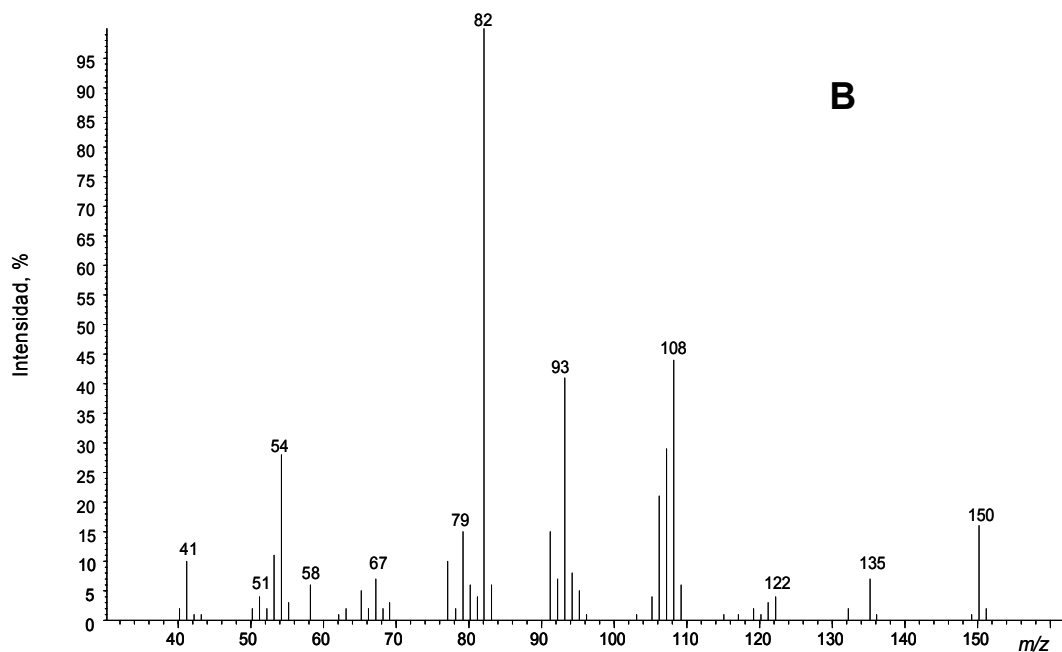
**Figura 42.** Corriente iónica del patrón certificado de la carvona, GC-MS. EI (70 eV). Columna DB-5 (60 m).

**Tabla 28.** Tiempo de retención e índice de Kovàts de la carvona.

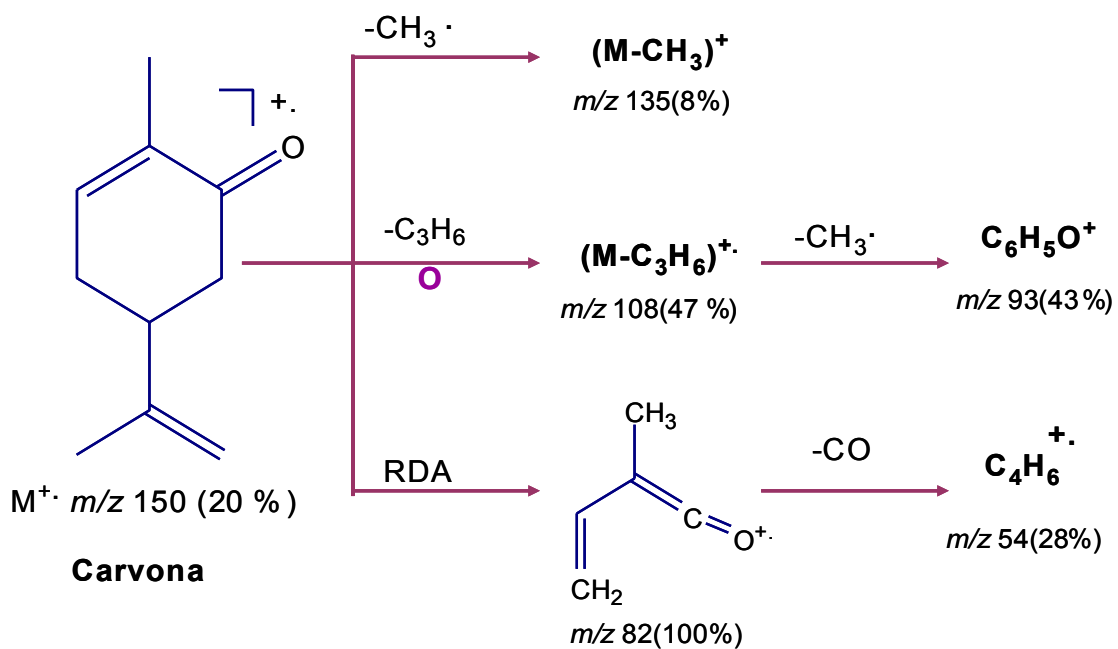
Compuesto	$t_R$ (DB-5, 60 m), min		$I_k$ (tº program, DB-5, 60 m)		
	Patrón certificado	Extracto	Literatura [7]	Patrón certificado	Extracto
Carvona	30,29	30,30	1243	1249	1262

El espectro de masas de la carvona, el componente mayoritario tanto en los extractos como en los AEs de *L. alba* y del patrón certificado, se presentan en la **Figura 43**. La ionización disociativa de la carvona, por impacto de electrones, se muestra en el **Esquema 1** [38, 56, 114]. El ion molecular  $M^+$ , en  $m/z$  150 (20%), sufre una ruptura de tipo *retro-Diels-Alder* (RDA), dando origen a la formación del fragmento pico de base, en  $m/z$  82 (100%). Otros iones importantes producidos a partir de ion  $M^+$  por pérdida del radical  $CH_3\cdot$ , y de una molécula de propeno, después de un reordenamiento de hidrógeno, son:  $(M-CH_3)^+$  en  $m/z$  135 (8%) y  $(M-C_3H_6)^+$  en  $m/z$  108 (47%), respectivamente. Este último,  $(M-C_3H_6)^+$ , elimina posteriormente un radical  $CH_3\cdot$ , originando el fragmento en  $m/z$  93 (43%), tal como aparece en el **Esquema 1**. El fragmento, pico de base, en  $m/z$  82, sufre pérdida de una molécula de CO, dando origen al catión-radical  $(C_4H_6^+)$  en  $m/z$  54 (28%).



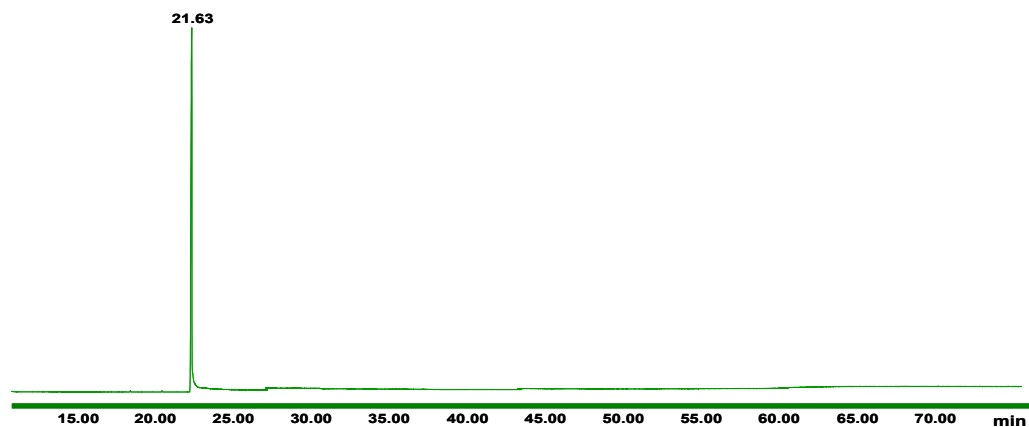


**Figura 43.** Espectro de masas de la carvona obtenido por EI (70 eV): **A.** Patrón de terpeno certificado de carvona, **B.** MS de la carvona presente en el extracto, obtenido por SDE, de las hojas de *L. alba*



**Esquema 1.** Posibles rutas de fragmentación de la carvona.

- **Limoneno:** Al igual que para la carvona, la confirmación del limoneno presente en *L. alba*, se realizó con un patrón certificado del isómero R-limoneno, para el cual se registraron el tiempo de retención y su índice de retención de Kovàts, así como se muestra en la **Figura 44** y la **Tabla 29**.



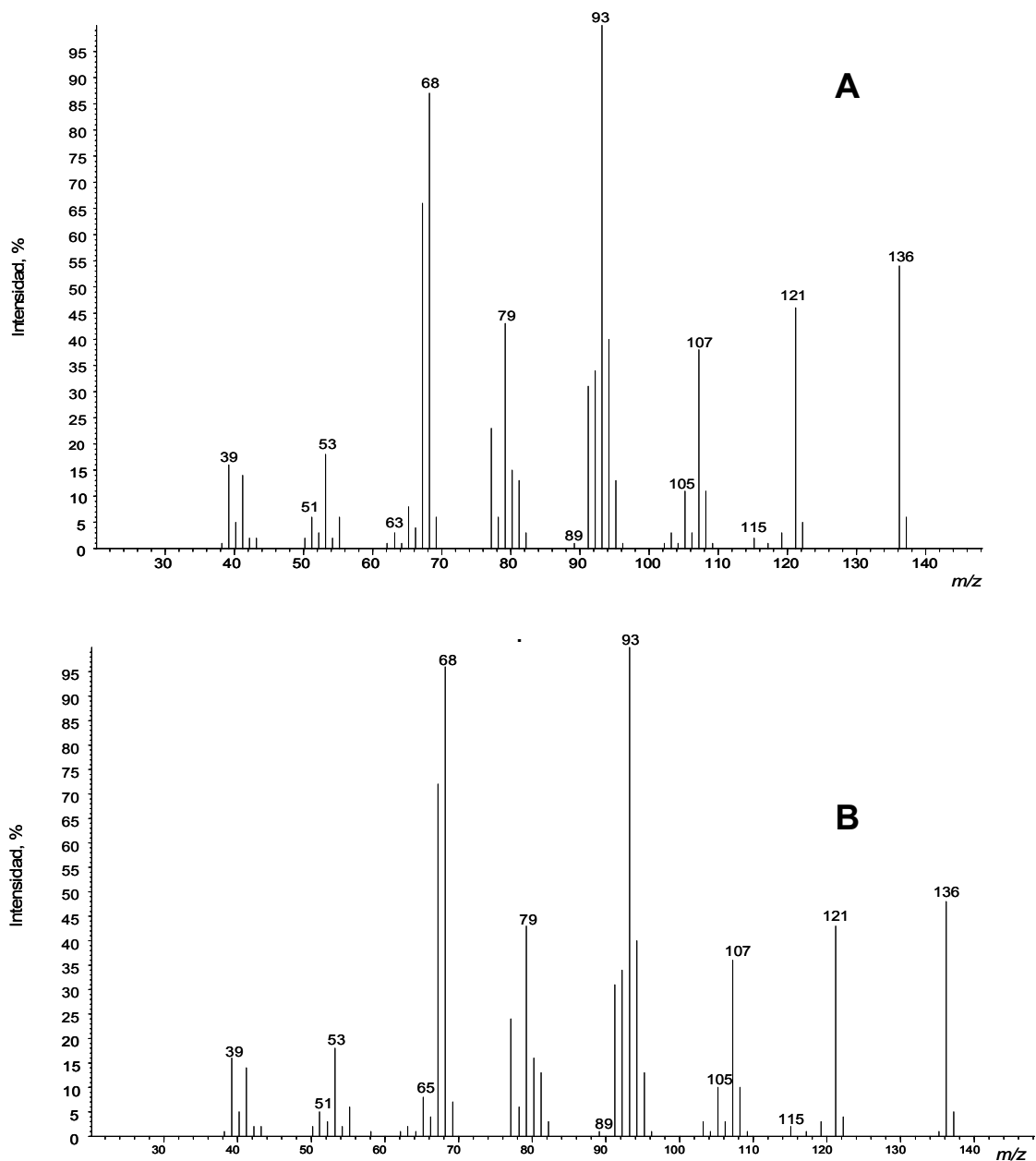
**Figura 44.** Corriente iónica del patrón certificado del limoneno, GC-MS. EI (70 eV). Columna DB-5 (60 m).

**Tabla 29.** Tiempo de retención e índice de Kovàts del limoneno.

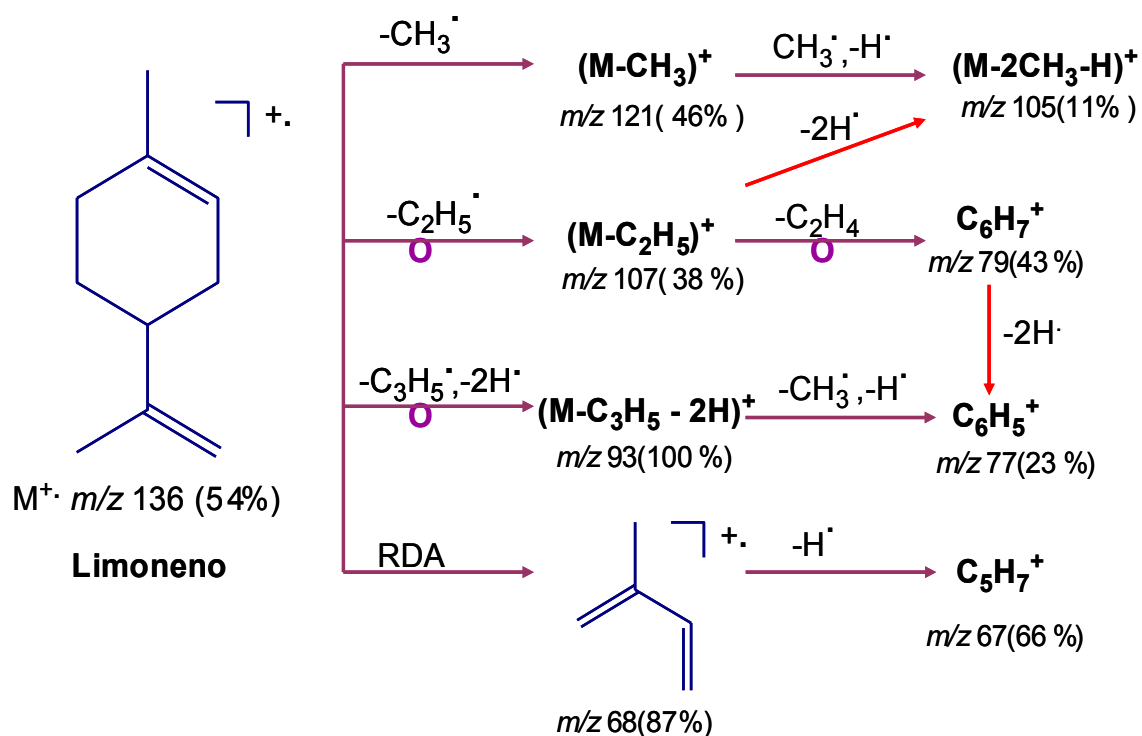
Compuesto	$t_R$ (DB-5, 60 m), min		$I_k$ (t° program, DB-5, 60 m)		
	Patrón certificado	Extracto	Literatura [7]	Patrón certificado	Extracto
Limoneno	21,68	21,63	1029	1035	1040

El espectro de masas del limoneno, el segundo componente mayoritario tanto en los extractos como en los AEs de *L. alba* y del patrón certificado utilizado, se presentan en la **Figura 45**. La ionización disociativa del limoneno se presenta en el **Esquema 2** [38, 56, 114]. Se observa el ion molecular  $M^+$  en  $m/z$  136 (54%). Su fragmentación se caracteriza por una ruptura *retro-Diels-Alder* (RDA), acompañada de la formación de un fragmento, pico de base, en  $m/z$  68 (87%). Los iones  $(M-CH_3)^+$  y  $(M-C_3H_5-H_2)^+$  en  $m/z$  121 (46%) y  $m/z$  93 (100%), se producen a partir del  $M^+$  por

pérdida del radical  $\text{CH}_3\cdot$  y del grupo isoprenílico, seguido de dos átomos de hidrógeno. Los iones de intensidad media en  $m/z$  107 (38%) y  $m/z$  79 (43%) provienen de la pérdida del radical  $\text{C}_2\text{H}_5\cdot$  y de una molécula de etileno, respectivamente, a partir del ion molecular.

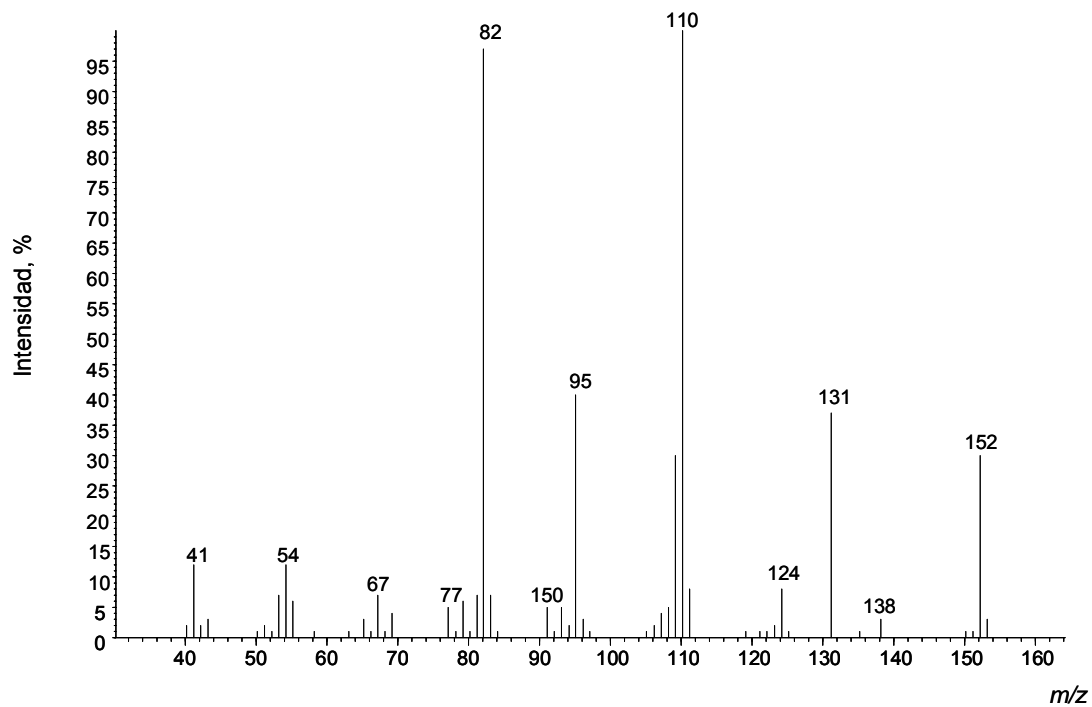


**Figura 45.** Espectro de masas del limoneno obtenido por EI (70 eV): **A.** Patrón de terpeno certificado del limoneno, **B.** MS del limoneno presente en el extracto, obtenido por SDE, de las hojas de *L. alba*.

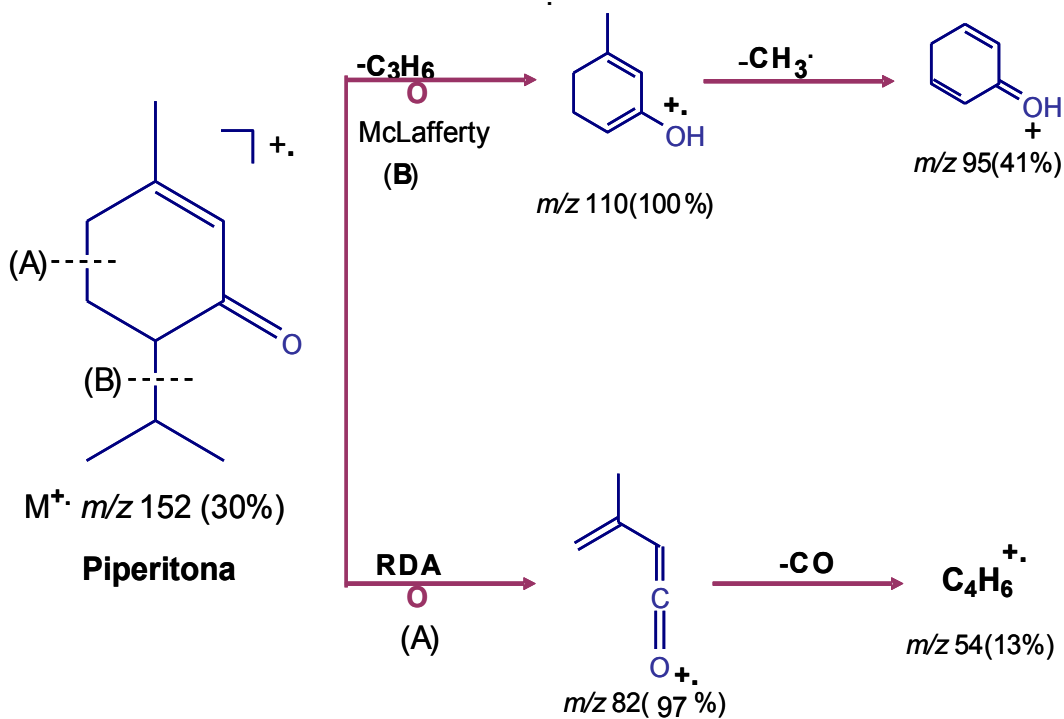


**Esquema 2.** Posibles rutas de fragmentación del limoneno.

- **Piperitona:** El espectro de masas de la piperitona, una cetona monoterpénica, se presenta en la **Figura 46**. La ruta de fragmentación es muy similar a la de la carvona. En el **Esquema 3**, se presenta la ionización disociativa de la piperitona por impacto de electrones, a 70 eV [38, 56, 114]. El ion molecular  $M^+$  de la piperitona en  $m/z 152$  (30 %), que sufre una ruptura *retro-Diels-Alder* (RDA), da origen a la formación del pico de base en  $m/z 82$  (97 %), que luego sufre descarbonilación generando el catión-radical ( $C_4H_6^+$ ) en  $m/z 54$  (13%). Otro fragmento, que se forma a partir del ion molecular  $M^+$  por la pérdida de una molécula de propeno, después de un reordenamiento de hidrógeno, tipo McLafferty intramolecular, es  $(M-C_3H_6)^+$  en  $m/z 110$  (100 %). El catión-radical  $(M-C_3H_6)^+$ , elimina posteriormente un radical  $CH_3^\bullet$ , dando origen al ion  $C_6H_7O^+$  en  $m/z 95$  (41%), tal como aparece en el **Esquema 3**.

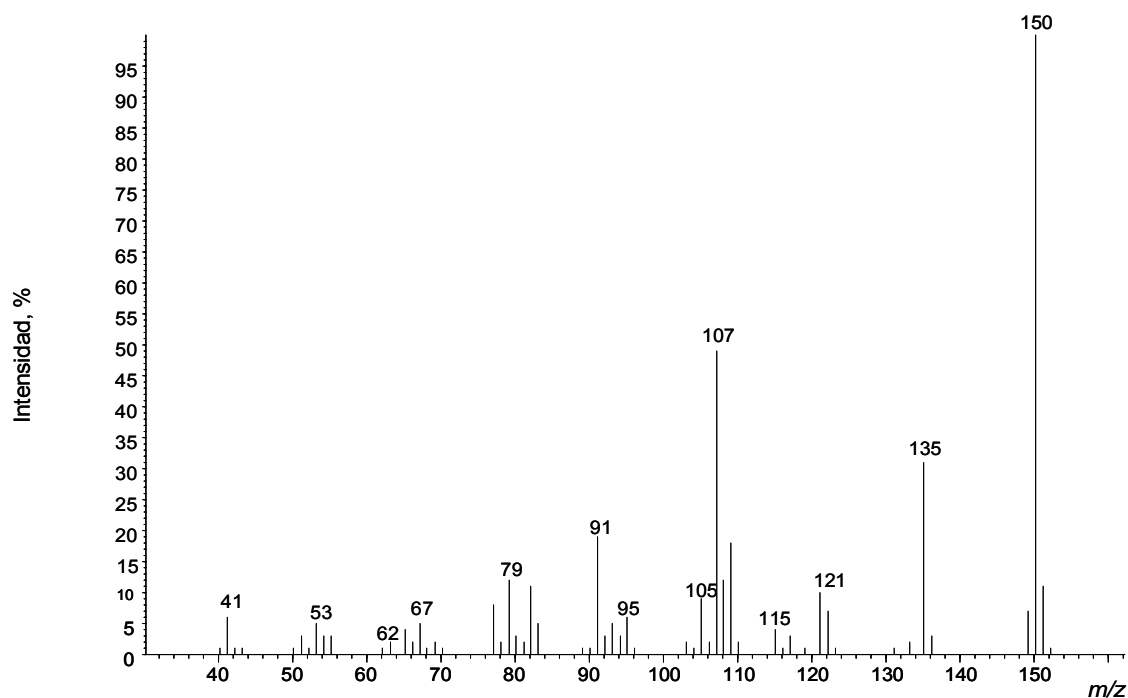


**Figura 46.** Espectro de masas de la piperitona, presente en el extracto, obtenido por SDE, de las hojas de *L. alba*, EI (70 eV).

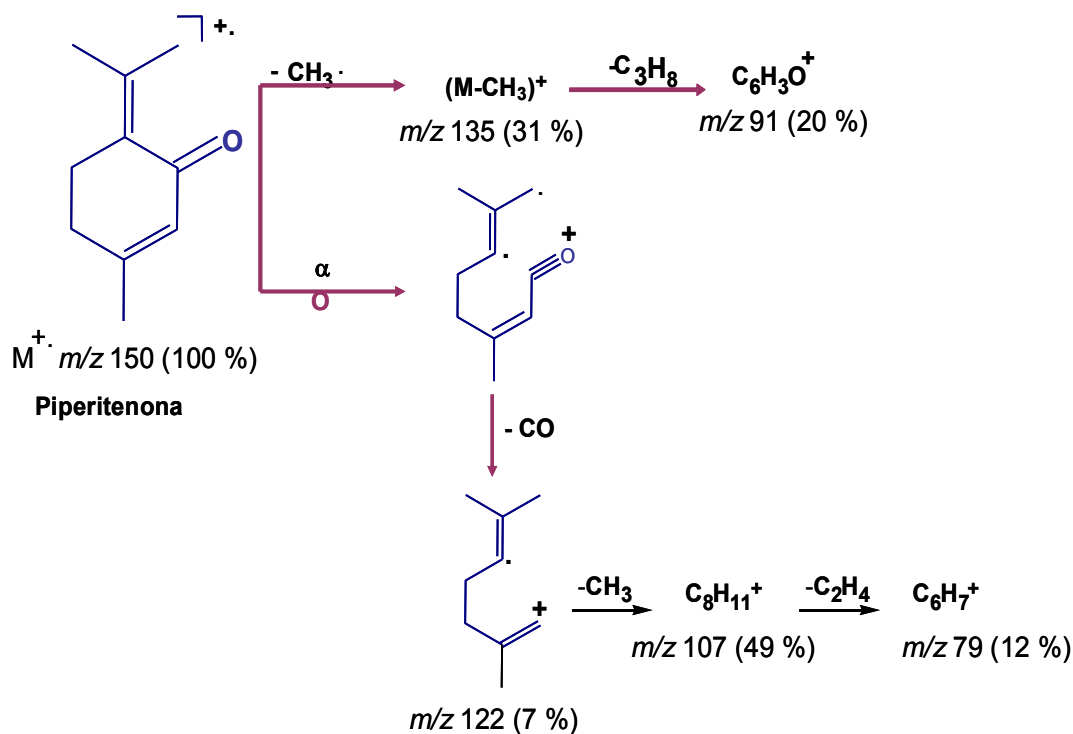


**Esquema 3.** Posibles rutas de fragmentación de la piperitona.

- **Piperitenona:** El espectro de masas de la piperitenona, una cetona cíclica con dos enlaces dobles aislados, aparece en la **Figura 47**. La ionización disociativa de la piperitenona se presenta en el **Esquema 4** [38, 56, 114]. El ion molecular,  $M^+$  en  $m/z$  150 (100%), pico de base, posee una alta estabilidad debido al sistema conjugado de dobles enlaces; su fragmentación se caracteriza por una ruptura  $\alpha$ , con posterior pérdida de una molécula CO, que origina el catión-radical ( $C_9H_{14}^+$ ) en  $m/z$  122 (7%), éste, a su vez, elimina un radical  $CH_3\cdot$ , generando el fragmento en  $m/z$  107 (49%), que al eliminar una molécula de eteno, da origen al ion en  $m/z$  79 (12%). La eliminación de un radical metilo ( $CH_3\cdot$ ), a partir del ion molecular  $M^+$ , produce el fragmento  $(M-CH_3)^+$  en  $m/z$  135 (31%), que, a su vez, elimina una molécula de propano, después de un reordenamiento, originando el ión  $(C_6H_3O)^+$  en  $m/z$  91 (20%) [38, 56, 114].

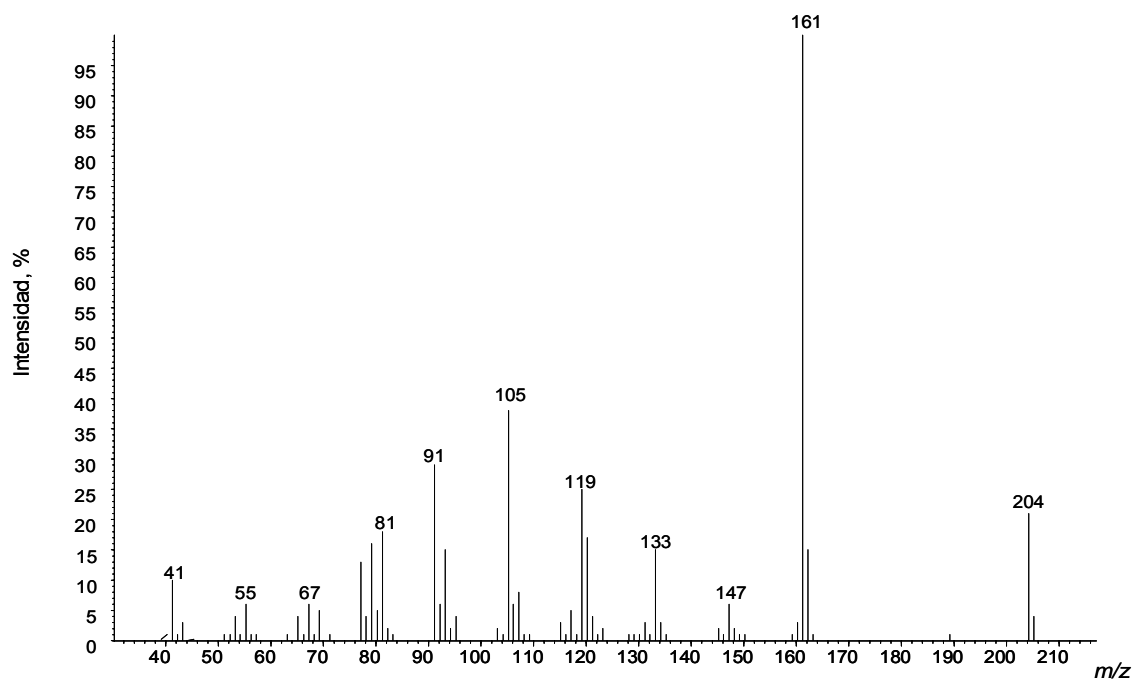


**Figura 47.** Espectro de masas de la piperitenona, presente en el extracto, obtenido por SDE, de las hojas de *L. alba*, EI (70 eV).

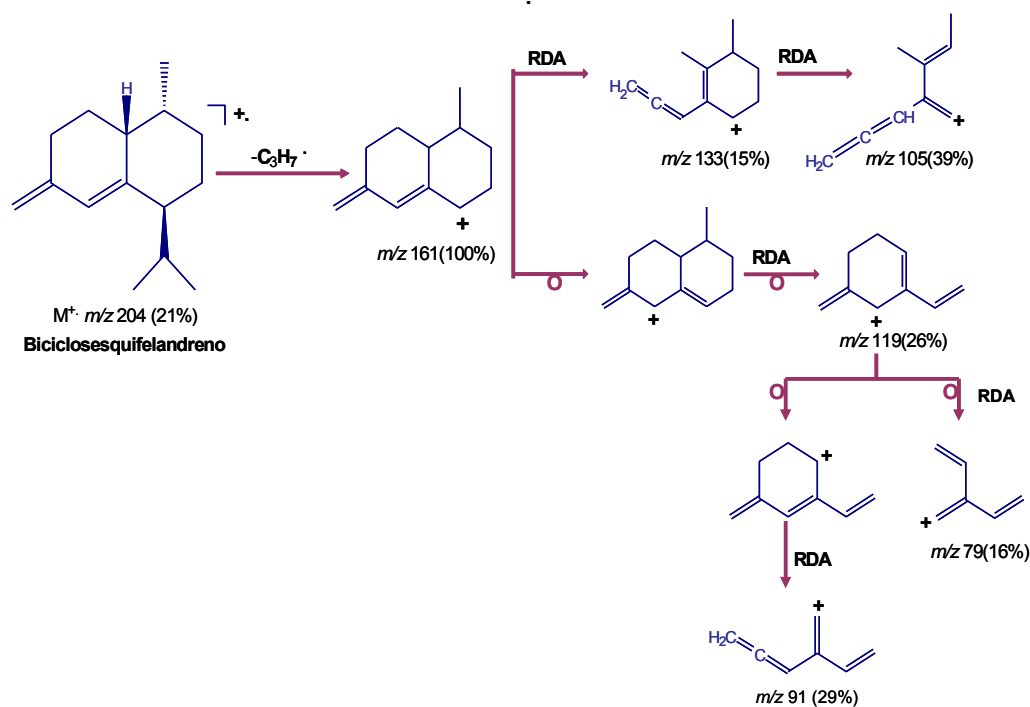


**Esquema 4.** Posibles rutas de fragmentación de la piperitenona.

- **Biciclosesquifelandreno:** En el espectro de masas del biciclosesquifelandreno (Véase **Figura 48**) se observa el ion molecular  $M^+$  en  $m/z$  204 de intensidad media (21%), que decae por la pérdida del radical isopropílico, de la molécula ionizada, con formación del ion pico de base,  $(M-C_3H_7)^+$ , en  $m/z$  161 (100%). Éste genera los iones fragmento en  $m/z$  133 y 105 (15 y 39%, respectivamente), productos de dos reacciones monomoleculares consecutivas de tipo *retro-Diels-Alder* (RDA), tal como se puede observar en el **Esquema 5** [38, 56, 114]. El pico de base  $(M-C_3H_7)^+$ , sufre reordenamiento por deslocalización de la carga positiva, y reacciones RDA consecutivas, para generar los iones  $C_9H_{11}^+$  en  $m/z$  119 (26%),  $C_7H_7^+$  en  $m/z$  91 (29%) y  $C_6H_7^+$  en  $m/z$  79 (16 %), que son fragmentos “diagnóstico” en el MS del biciclosesquifelandreno.



**Figura 48.** Espectro de masas del bicyclosesquifelandreno, presente en el extracto, obtenido por SDE, de las hojas de *L. alba*, EI (70 eV).

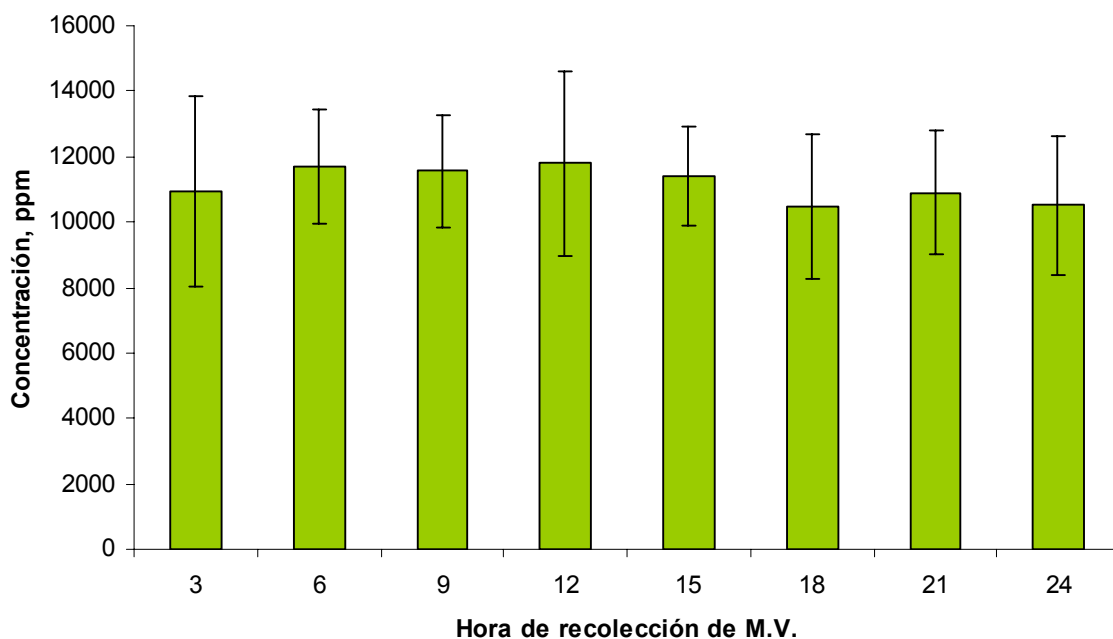


**Esquema 5.** Posibles rutas de fragmentación del bicyclosesquifelandreno.

#### 4.6. VARIACIÓN CIRCADIANA DE LA CARVONA PRESENTE EN LOS EXTRACTOS DE LAS HOJAS DE *Lippia alba*, AISLADOS POR SDE, Y SEGUIMIENTO DE LOS PARÁMETROS AMBIENTALES

Para el estudio de la variación circadiana de la carvona presente en las hojas de *L. alba*, se siguió el procedimiento descrito en el **Numeral 3.3.1** de la Parte Experimental. La cuantificación de la carvona en los extractos de las hojas de *L. alba*, recolectadas a diferentes horas, se realizó empleando la técnica de estándar interno, siguiendo el procedimiento descrito en la **Numeral 3.7** de la Parte Experimental.

En la **Figura 49**, se muestran los valores promedio de la concentración (ppm) de carvona presente en los extractos de las hojas de *L. alba*, obtenidos a diferentes horas del día y la noche.



**Figura 49.** Variación de la concentración (ppm) de la carvona presente en las hojas de *L. alba*, recolectadas a diferentes horas del día y la noche.

En la **Figura 49**, no se observa una variación significativa en el contenido de la carvona en los diferentes extractos obtenidos durante el ciclo circadiano de la planta, debido a que los corredores de error determinados para las réplicas de las concentraciones se superponen entre ellos, indicando que los valores promedios evaluados permanecen relativamente constantes, a diferentes horas de recolección y extracción de hojas.

Para estudios realizados con otras especies, *e.g. Brugmansia suaveolens*, Molina, J.L. [119] observó una clara tendencia al aumento de la emisión de metabolitos secundarios volátiles, en horas de la noche, y su desaparición prácticamente completa durante las horas del día.

En la **Tabla 30**, se muestran las concentraciones (ppm) de la carvona presente en los extractos de las hojas de *L. alba*, aislados por SDE, en cada uno de los días de extracción y hora de recolección, con los cuales se calculó el valor promedio para la construcción de la **Figura 49**.

**Tabla 30.** Variación de la concentración de la carvona presente en las hojas de *L. alba*, recolectadas a diferentes horas y días.

Concentración de carvona, ppm					
Hora de recolección	Días de recolección y extracción				
	1	2	3	4	5
3	11616	12730	10203	8786	11380
6	12026	11983	12169	10102	12231
9	10446	12166	12697	11444	11045
12	12934	13777	10454	10753	11067
15	12122	11650	12097	10434	10738
18	12207	11020	10076	9771	9282
21	10246	10564	9972	11323	12424
24	9517	12124	9963	9753	11184

A continuación, se presenta un análisis detallado de las 40 extracciones realizadas por SDE para la carvona presente en las hojas de *L. alba* y su relación con los parámetros ambientales medidos. Teniendo en cuenta, que la variable controlada era la hora de recolección de hojas, las conclusiones que se tuvieron a partir de la relación contenido de carvona y parámetros ambientales requerirán otros estudios que esclarecen e interpretan mejor los resultados obtenidos.

La medición de los parámetros como temperaturas del ambiente, del suelo, humedad relativa e intensidad lumínica alrededor de las plantas seleccionadas fueron realizadas por medio de los dispositivos descritos en el **Numeral 3.5** de la Parte Experimental. Los resultados que arrojó cada una de estas mediciones se muestran a continuación.

La temperatura del suelo alrededor de las plantas seleccionadas para las extracciones realizadas por SDE, se muestra en la **Tabla 31**; se observa que los coeficientes de variación son inferiores al 10 %. De acuerdo con esto, la temperatura del suelo a una misma hora de extracción se mantuvo constante para los diferentes días.

**Tabla 31.** Temperatura del suelo (°C) registrada alrededor de las plantas de *L. alba*, recolectadas a diferentes horas y días.

Temperatura del suelo alrededor de las plantas, °C								
Hora de recolección	Días de recolección y extracción					$\bar{X}$	S	CV, %
	1	2	3	4	5			
3	25,58	25,22	25,30	24,64	25,26	25,2	± 0,3	1,36
6	25,44	24,74	24,76	24,34	25,20	24,9	± 0,4	1,73
9	25,46	24,98	24,98	24,14	24,88	24,9	± 0,5	1,91
12	26,52	27,56	25,80	25,34	25,54	26,2	± 0,9	3,46
15	27,22	27,70	26,80	26,80	26,78	27,1	± 0,4	1,49
18	27,00	27,22	26,64	26,14	27,18	26,8	± 0,5	1,68
21	25,90	26,60	26,20	25,60	25,96	26,1	± 0,4	1,43
24	25,94	25,56	25,84	24,84	25,62	25,6	± 0,4	1,69

Si se relaciona la temperatura del suelo de la **Tabla 31** con el contenido de carvona, en la **Tabla 30**, se puede observar que para los días de recolección extracción 1 y 2 a las 12 y 15 h se registraron los valores altos de temperatura (27,22 y 27,56 °C), cuando se presentó también alto contenido de carvona (12122 y 13777 ppm).

Dentro de la revisión bibliográfica realizada, no se encontraron trabajos que relacionen temperatura del suelo con la producción de metabolitos en la planta.

En la **Tabla 32** se observa que para las mediciones de humedad relativa (%) alrededor de las plantas seleccionadas, para los diferentes días de recolección y extracción por SDE, los coeficientes de variación fueron inferiores al 10 %, excepto para las 9, 12 y 15 h, los cuales fueron 13,35; 23,52 y 15,90 %.

**Tabla 32.** Humedad relativa (%) registrada alrededor de las plantas de *L.alba*, recolectadas a diferentes horas y días.

Humedad relativa alrededor de las plantas, %								
Hora de recolección	Días de recolección y extracción					$\bar{X}$	S	CV, %
	1	2	3	4	5			
3	66,20	69,00	69,60	69,20	66,60	68	± 2	2,34
6	67,00	66,20	66,00	71,00	65,40	67	± 2	3,34
9	60,80	59,80	59,80	59,00	78,80	64	± 8	13,35
12	61,20	34,20	63,20	59,20	69,20	57	± 13	23,52
15	42,60	48,00	63,00	58,60	59,60	54	± 9	15,90
18	58,40	68,40	65,00	71,00	71,40	67	± 5	8,03
21	74,60	71,20	77,20	78,20	67,60	74	± 4	5,94
24	67,20	68,00	68,60	74,80	66,20	69	± 3	4,91

Los valores mínimos de humedad relativa fueron 34,20 y 42,60 %, los cuales se tomaron en los días de recolección y extracción 1 y 2 a las 12 y 15 h, respectivamente. A estas horas y días de extracción, las concentraciones de carvona fueron las más altas 12934, 13777, 12122 y 11650 ppm. En conclusión, se observó una posible influencia de la humedad relativa en condiciones de *stress*

sobre la variación de contenido de carvona en la planta de *L. alba*, resultados que no concuerdan con los obtenidos por Yokouchi y Ambe (1984) [181]; Juuti *et.al.* (1990) [95], Janson (1993) [92] y Guenther *et.al.* (1991) [77], para aceites con composición química diferente de la del aceite de *L. alba*, como pino, picea y eucalipto, los cuales no presentaron una correlación entre sus compuestos mayoritarios y la humedad.

En la **Tabla 33** se observa que para las mediciones de temperatura ambiente (°C) alrededor de las plantas seleccionadas para los diferentes días de recolección y extracción realizados por SDE, los coeficientes de variación fueron inferiores al 10 %, excepto para las 12 h (16,37%).

**Tabla 33.** Temperatura del ambiente (°C) registrada alrededor de las plantas de *L.alba*, recolectadas a diferentes horas y días.

Temperatura del ambiente alrededor de las plantas, °C								
Hora de recolección	Días de recolección y extracción					$\bar{X}$	S	CV, %
	1	2	3	4	5			
3	21,74	21,12	20,88	21,28	22,06	21,4	± 0,5	2,23
6	21,34	21,00	20,42	19,92	20,84	20,7	± 0,5	2,65
9	24,54	26,20	26,20	25,24	21,30	25	± 2	8,19
12	30,22	39,72	27,42	28,76	28,22	31	± 5	16,37
15	31,28	30,88	28,74	27,14	28,86	29	± 2	5,79
18	24,46	23,90	23,28	22,90	23,40	23,6	± 0,6	2,56
21	22,58	23,48	22,30	20,78	23,26	22	± 1	4,73
24	22,06	21,66	22,46	21,06	21,96	21,8	± 0,5	2,39

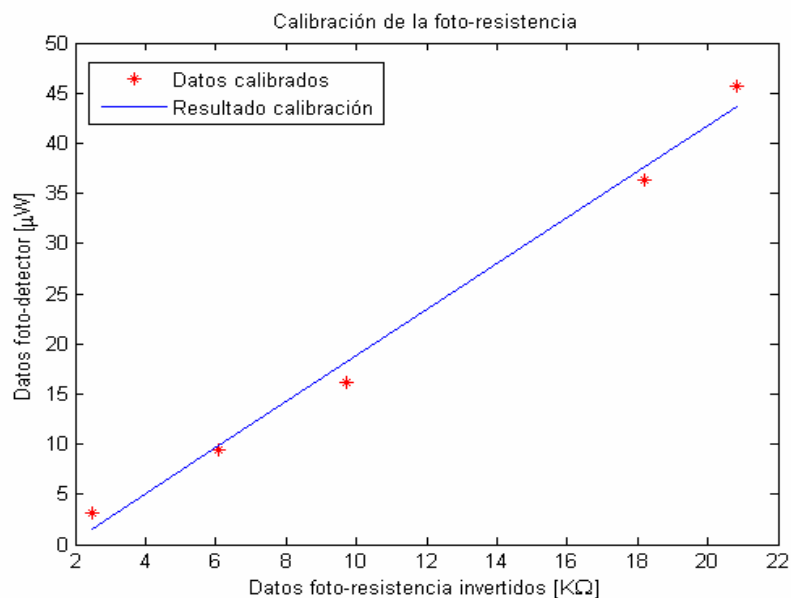
El valor más alto de temperatura ambiente fue 39,72 °C, el cual se presentó a las 12 h durante el día de extracción 2, hora y día a la que el contenido de carvona fue 13777 ppm, el más alto de las 40 extracciones mostradas en la **Tabla 30**.

Los resultados obtenidos para el contenido de carvona presente en las hojas de *L. alba*, se pueden comparar con los trabajos realizados por Kuzma y Fall, 1993

[102]; Monson *et.al.* [118], 1995; Sharkey y Loreto, 1993 [150]; quienes realizaron estudios con plantas emisoras de isopreno, cuyo crecimiento a temperaturas altas producían mayores emisiones de este compuesto. Para el caso de los monoterpenos, contrariamente, Dement *et al.* (1975) [54] encontraron que a las temperaturas nocturnas más bajas, se incrementaba la emisión de los compuestos presentes en la salvia (*Salvia officinalis*).

Para la medición de la intensidad lumínica se utilizó una foto-resistencia, que se calibró (**Numeral 3.5** de la Parte Experimental) en el Laboratorio de Óptica y Tratamiento de Señales, de la Escuela de Física – UIS. Para la calibración se utilizó un medidor de luz; los resultados obtenidos con la foto-resistencia se compararon con los de un Radiómetro (*Newport*, Modelo 1815-C y Serie 2728).

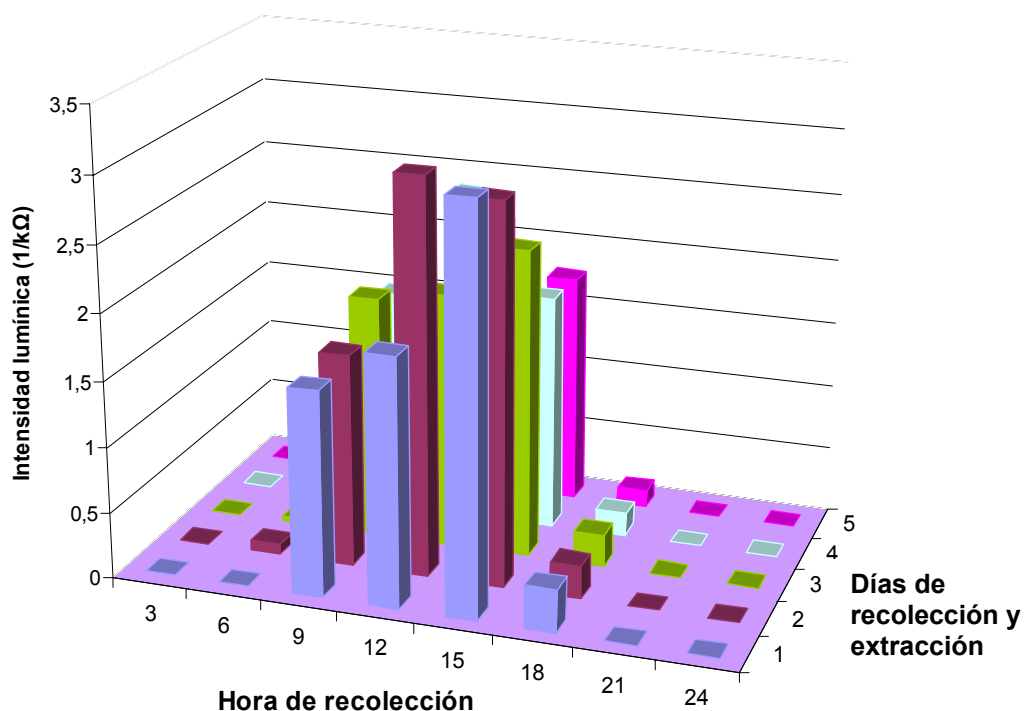
La **Figura 50** muestra que la foto-resistencia empleada para los monitoreos presenta un comportamiento lineal para el intervalo de valores de  $1/R$  comprendido entre 1.9071 y 20700  $1/k\Omega$ .



**Figura 50.** Curva de calibración de la foto-resistencia utilizada para la medición de la intensidad lumínica.

Los valores medidos con la foto-resistencia, son inversamente proporcionales a la intensidad lumínica, por lo cual en todas las gráficas se presenta la inversa de la respuesta obtenida en las mediciones, lo cual se evidencia en la **Figura 50**.

Los resultados de medición de la intensidad lumínica se muestran en la **Figura 51**, para los cuales los coeficientes de variación de los datos obtenidos fueron relativamente altos, debido a que la incidencia de la luz solar alrededor de la parcela experimental no era completamente homogénea, lo que influyó sobre la reproducibilidad baja de los datos.



**Figura 51.** Intensidad lumínica (%) registrada alrededor de las plantas de *L.alba*, recolectadas a diferentes horas y días.

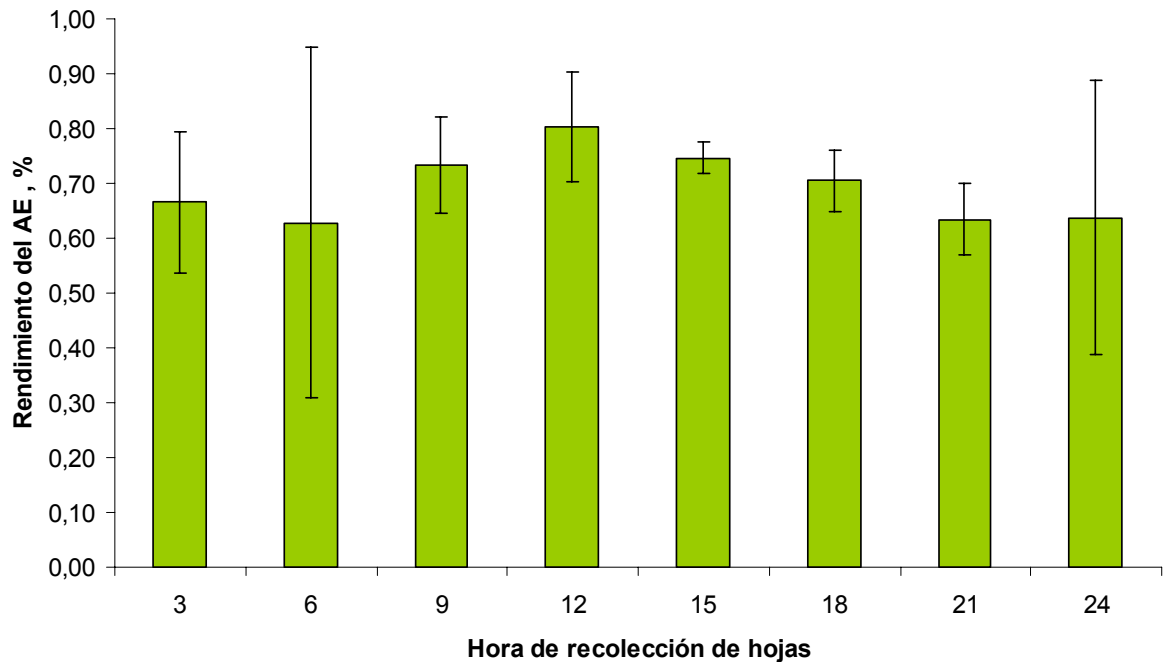
En la **Figura 51**, se observan los datos de intensidades lumínicas obtenidos en los monitoreos. Para todos los casos, los valores máximos de intensidad lumínica se presentaron a las 9, 12 y 15 h, y los más bajos entre 21 y 24 h. Estos valores concuerdan (para los días de recolección de hojas 1, 2 y 3) con las concentraciones máximas, 12122, 12697 y 13777 ppm y mínimas, 9517 y 9972 ppm, de la carvona, por lo cual intensidad lumínica sí es un factor importante en la producción biosintética de la carvona en la planta.

En un estudio realizado en el Laboratorio de Cromatografía de la UIS, Durán, D.C. [56] encontró una ampliación directa de la capacidad fotosintética de la planta (*L.alba*), al incrementar el área foliar y grosor de la hoja con la reducción en la intensidad lumínica.

#### **4.7. VARIACIÓN CIRCADIANA DEL RENDIMIENTO DEL AE DE LAS HOJAS DE *Lippia alba* OBTENIDO POR MWHD, Y SEGUIMIENTO DE LOS PARÁMETROS AMBIENTALES**

En la **Figura 52** se registran los promedios de los rendimientos (3 extracciones en días diferentes) de los AEs obtenidos por MWHD, de hojas de *L. alba*, recolectadas durante el día y la noche, de las plantas cultivadas en el complejo agroindustrial de CENIVAM.

Para el estudio circadiano del rendimiento de AE de las hojas de *L. alba*, se siguió el procedimiento descrito en el **Numeral 3.3.2** de la Parte Experimental.



**Figura 52.** Rendimientos promedios de los AEs obtenidos de las hojas de *L. alba*, recolectadas a diferentes horas del día y la noche.

Los rendimientos de los AEs más altos se obtuvieron en las plantas recolectadas a las 12 y 15 horas (0,8 y 0,75%, respectivamente), horas en las cuales se presentaron las temperaturas del suelo (26,93 y 27,13 °C) y del aire (35 y 30 °C) más altas y los porcentajes de humedad más bajos, tal como se muestra en las **Tablas 34, 35 y 36**. Por el contrario, los rendimientos más bajos se presentaron a las 6 y 21 horas (0,63% cada uno).

Estos resultados se pueden comparar con los del trabajo realizado por Alves Dos Santos *et al.* [12], quienes encontraron que los rendimientos más altos de AE de *L. alba* en época de lluvia y época seca, se presentaron a las 11, 12 y 15 horas (siendo a las 15 el valor máximo); sin embargo, ellos realizaron los muestreos sólo en horas del día (7, 9, 11, 15 y 17 horas).

**Tabla 34.** Temperatura del ambiente (°C) registrada alrededor de las plantas de *L.alba*, recolectadas a diferentes horas y días.

Temperatura del aire alrededor de las plantas, (°C)						
Hora de recolección	Días de recolección y extacción			— X	S	CV, %
	1	2	3			
3	26	24	27,2	26	± 2	6,3
6	25	24	24	24,3	± 0,6	2,4
9	24	29	28,3	27	± 3	10,0
12	43	28	33,4	35	± 8	21,8
15	31	27,8	29,8	30	± 2	5,5
18	27	26	28	27	± 1	3,7
21	26	25,4	27	26,1	± 0,8	3,1
24	26	24	27,2	26	± 2	6,3

Los coeficientes de variación para las mediciones de temperatura del ambiente (°C) son inferiores al 10 %, excepto para lo reportado a las 12 h (21,8 %) debido a que la temperatura registrada en el día de recolección 1 fue alta (43 °C) como se observa en la **Tabla 34**.

**Tabla 35.** Temperatura del suelo (°C) registrada alrededor de las plantas de *L.alba*, recolectadas a diferentes horas y días.

Temperatura del suelo alrededor de las plantas, °C						
Hora de recolección	Días de recolección y extracción			— X	S	CV, %
	1	2	3			
3	25,7	25,2	26	25,6	± 0,4	1,58
6	25,2	24,9	24,7	24,9	± 0,2	1,01
9	25,2	24,8	25	25,0	± 0,2	0,80
12	27,2	26	27,6	26,9	± 0,8	3,09
15	26,3	26,9	28,2	27,1	± 0,9	3,58
18	26,5	26,9	28	27,1	± 0,7	2,86
21	26,3	26,1	26,8	26,4	± 0,3	1,37
24	26,3	25,4	26	25,9	± 0,4	1,77

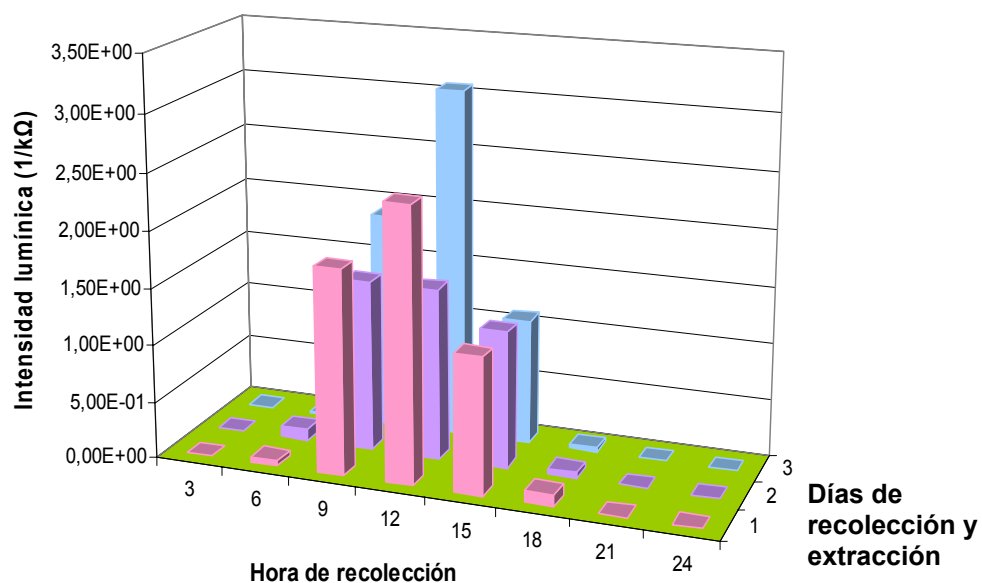
Para el caso de las temperaturas del suelo (°C) alrededor de las plantas, los valores de los coeficientes de variación fueron inferiores al 10 %. De acuerdo con esto, las temperaturas del suelo (°C) a una hora de recolección se mantuvieron constantes durante los días de recolección (Véase **Tabla 35**).

**Tabla 36.** Humedad relativa (%) registrada alrededor de las plantas de *L.alba*, recolectadas a diferentes horas y días.

Humedad relativa alrededor de las plantas, %						
Hora de recolección	Días de recolección y extracción			$\bar{X}$	S	CV, %
	1	2	3			
3	76,2	70	58,2	68	± 9	13,4
6	69	67,8	60	66	± 5	7,4
9	78,4	67,6	46,6	64	± 16	25,2
12	33	66	56,6	52	± 17	32,8
15	57,2	65,8	61,8	62	± 4	7,0
18	71,4	69	71,4	71	± 1	2,0
21	76,2	74,4	71,4	74	± 2	3,3
24	76,2	73	66	72	± 5	7,3

Los coeficientes de variación para las mediciones de las humedades relativas (Véase **Tabla 36**) fueron en general, inferiores al 10 %, excepto para las horas 3, 9 y 12, los cuales fueron altos, 13,4; 25,2 y 32,8 %, respectivamente.

Los valores de intensidades lumínicas altas, registrados para las plantas de *L.alba*, fueron 2,4 (día de recolección 1), 1,5 (día de recolección 2) y 3,07 (día de recolección 3) 1/kΩ presentas a las 12 h como se observa en la **Figura 53**. Los coeficientes de variación fueron superiores al 10% para la mayoría de las horas de recolección de hojas, por las mismas razones presentadas para las extracciones por SDE, anteriormente descritas.



**Figura 53.** Intensidad lumínica (%) registrada alrededor de las plantas de *L. alba* en diferentes horas y días de recolección de hojas.

El rendimiento de AE más alto, obtenido de las hojas de *L. alba*, se registró a las 12 h, posiblemente como consecuencia de la humedad baja en las hojas y la alta temperatura del ambiente.

Otros parámetros ambientales como la velocidad del viento o las precipitaciones no fueron tenidos en cuenta para los experimentos. Sin embargo, los días en los cuales se realizaron los muestreos no se presentaron precipitaciones; los experimentos se realizaron durante la misma época del año, con el fin, en lo posible, de no introducir otras variables.

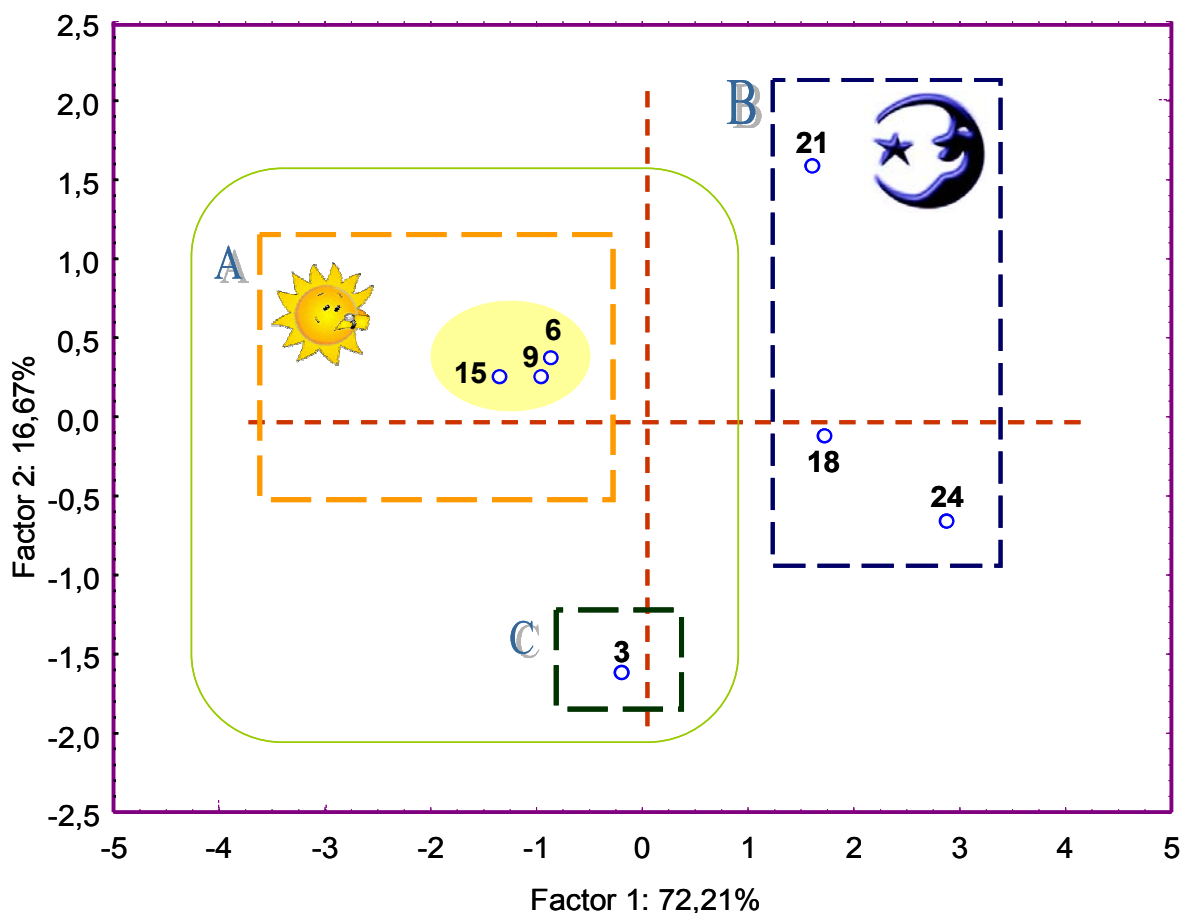
#### **4.8. Análisis de componentes principales (PCA) de los extractos y aceites esenciales aislados por SDE y MWHD**

Con el objetivo de apreciar de una forma más clara la influencia de la hora de recolección y condiciones ambientales sobre la composición química de los extractos y AEs, se realizó el análisis estadístico de componentes principales (PCA, STATISTICA Versión 6.0, StatSoft Inc., Oklahoma, USA).

El resultado de aplicar PCA a los resultados de composición química de los extractos de hojas de *L. alba* obtenidos por SDE, indica que más del 88% de la información puede ser representada por un subespacio de dos coordenadas (componentes principales), construido con base en las combinaciones lineales de las concentraciones de los cinco compuestos mayoritarios (carvona, limoneno, piperitenona, piperitona y biciclosesquifelandreno) del extracto de *L. alba* obtenido a diferentes horas de recolección (Véase **Figura 54**). El *Factor 1* involucra el 72% de la información y está representado básicamente por carvona, limoneno y biciclosesquifelandreno. Por otra parte, el *Factor 2* constituye el 17% de la información, y está caracterizado principalmente por la piperitona.

De acuerdo con la **Figura 54**, se observa la existencia de tres grupos: **A**. Los extractos obtenidos de la hojas recolectadas en las horas del día (6, 9, 12 y 15 h), que se caracterizaron por tener el mayor contenido de carvona, limoneno y biciclosesquifelandreno, igualmente; se presentan los valores de intensidad lumínica más altos (a las 12 h, el valor máximo); para las 9, 12 y 15 h se presentan los porcentajes de humedad más bajos (a las 12 h, el valor mínimo) y valores de temperatura del suelo y del aire más altos (a las 12 h, las temperaturas máximas), contrario a lo que sucede a las 6 h, cuando se presentan temperaturas bajas y porcentajes de humedad altos (sin ser los valores extremos); **B**. Los extractos obtenidos durante la noche (18, 21 y 24 h), que se caracterizaron por presentar el contenido más bajo de carvona, limoneno, piperitenona, piperitona y

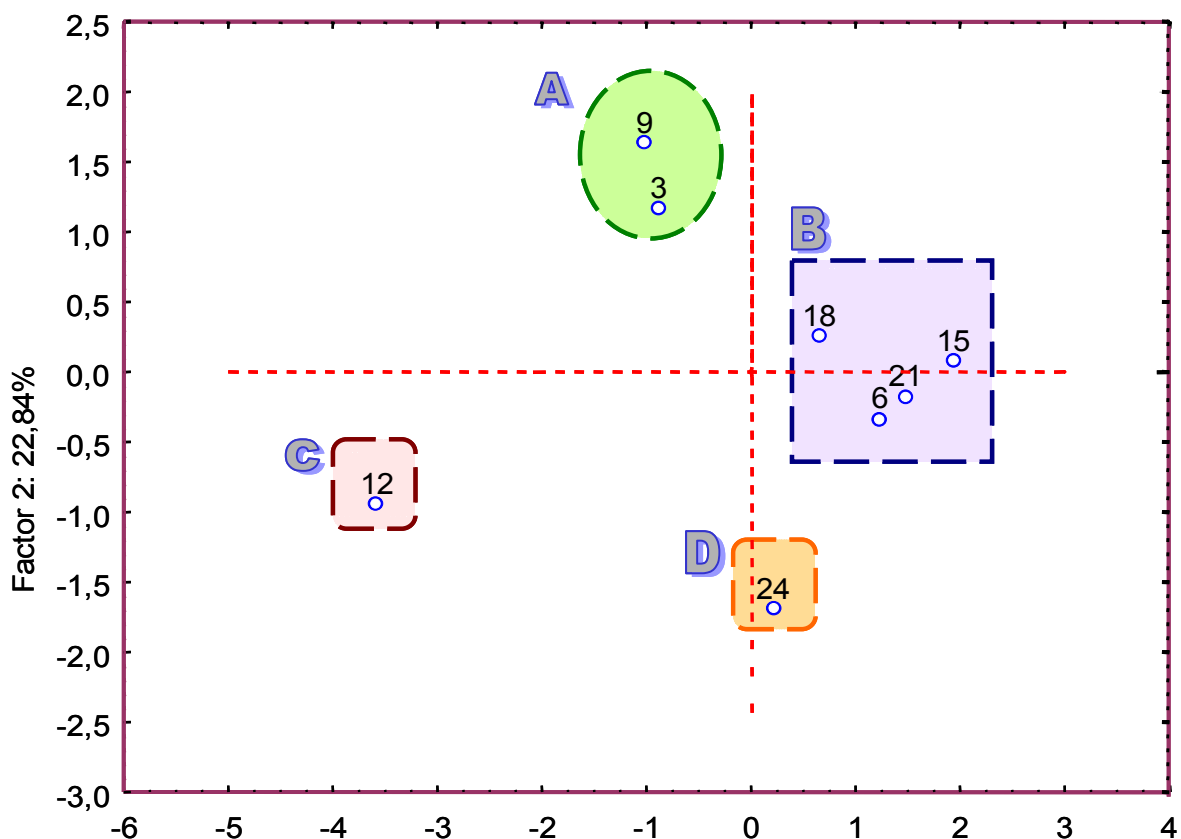
biciclosesquifelandreno. A diferencia del grupo **A**, se observan los valores de intensidad lumínica bajos (a las 21 h, se registró el valor mínimo), también se presentaron los porcentajes de humedad más altos (a las 21 h, el valor máximo) y los valores de temperatura del suelo más bajos y del aire (sin incluir los valores mínimos que se presentaron a las 3 h, grupo **C**). **C**. Un solo caso, que corresponde a las 3 h, caracterizado por el contenido más alto de piperitenona, con la temperatura del suelo y del aire mínima, porcentaje de humedad alto e intensidad lumínica baja.



**Figura 54.** Análisis de componentes principales (PCA) de los componentes mayoritarios presentes en el extracto obtenido por SDE, de hojas de *L. alba*, recolectadas a diferentes horas del día y la noche.

El resultado de aplicar PCA a los resultados de composición química de los AEs de hojas de *L. alba* obtenido por MWHD, indica que más del 87% de la información puede ser representada por un subespacio de dos coordenadas (componentes principales), construido con base en las combinaciones lineales de las concentraciones de los cinco compuestos mayoritarios (carvona, limoneno, piperitenona, piperitona y biciclosesquifelandreno) del AE de *L. alba* correspondiente a diferentes horas de recolección (Véase **Figura 55**). El *Factor 1* involucra el 64% de la información y está representado básicamente por carvona y limoneno. El *Factor 2* constituye el 23% de la información, y está caracterizado principalmente por piperitona y biciclosesquifelandreno.

De acuerdo con la **Figura 55**, se observa la existencia de cuatro grupos: **A**. Los casos 3 y 9, que se caracterizaron por tener el menor contenido de piperitona y piperitenona, respectivamente, y no presentan características ambientales similares; **B**. Los AEs obtenidos a las 6, 15, 18 y 21 h, que se caracterizaron por presentar el contenido de carvona más alto (a las 6 h, el valor máximo), limoneno (a las 15 h, el valor máximo), piperitenona (a las 21 h, el valor máximo), piperitona (aunque se presentaron valores muy altos, el máximo contenido de piperitona se alcanzó a las 24 h, grupo **D**) y biciclosesquifelandreno (a las 15 h, el valor máximo). Las características ambientales para los casos 6 y 21, fueron muy similares: temperaturas bajas y porcentajes bajos de humedad, sin llegar a ser valores máximos. Sin embargo, los casos 6 y 15 presentan características ambientales muy diferentes; **c**. El AE obtenido a las 12 h, se caracteriza por tener el menor contenido de carvona, limoneno y biciclosesquifelandreno, además fue a la hora cuando se presentó mayor rendimiento de AE. En cuanto a las características ambientales, es la hora que registró el porcentaje menor de humedad, la intensidad lumínica mayor y las temperaturas más altas. **D**. El AE obtenido a las 24 h; a esta hora no se presentaron características ambientales distintivas.



**Figura 55.** Análisis de componentes principales (PCA) de los componentes mayoritarios presentes en el AE obtenidos por MWHD de hojas de *L. alba*, recolectadas a diferentes horas del día y la noche.

Luego de relacionar la composición química de los extractos y aceites con la hora de recolección de las hojas, se aplicó PCA a todas las extracciones de hojas de *L. alba* realizadas por SDE, para relacionar cada caso particular de extracción con la composición química del extracto (carvona, limoneno, piperitona, piperitenona y biciclosquifelandreno).

La gráfica se construyó con base en la composición química (Var1 = Carvona; Var2 = Limoneno; Var3 = Piperitona; Var4 = Piperitenona; Var5 = Biciclosquifelandreno) de las cuarenta extracciones realizadas experimentalmente por la técnica SDE (8 extracciones/día X 5 días = 40 extracciones). Cada caso comprende una serie de variables ambientales que

fueron medidas a la hora de recolección de la muestra, los cuales se muestran la **Tabla 37**.

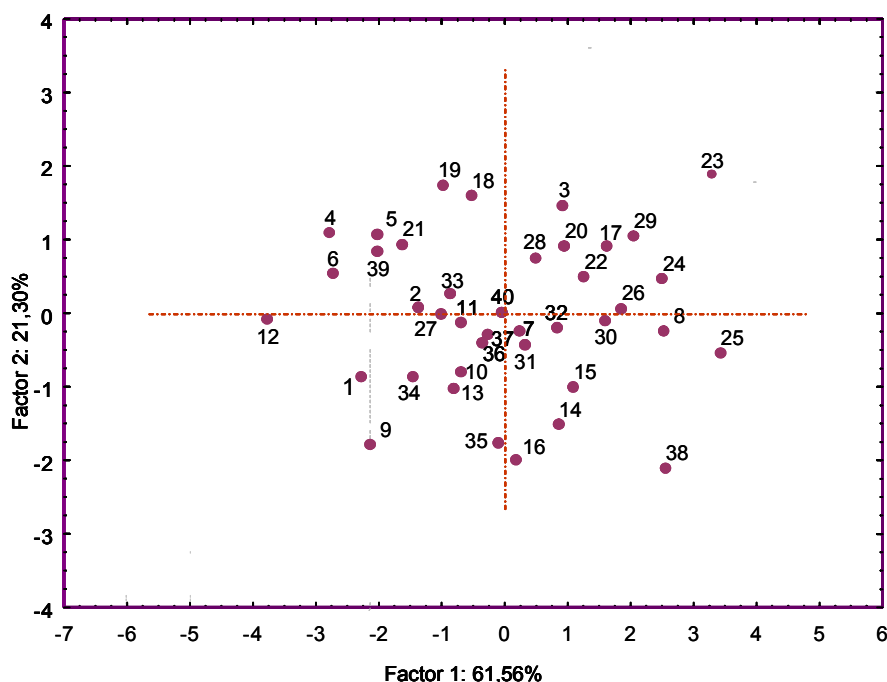
**Tabla 37.** Variables ambientales correspondientes a los casos graficados en la **Figura 56**.

Caso	Hora de recolección	Temperatura ambiente, °C	Temperatura del suelo, °C	Intensidad lumínica, 1/kΩ	Humedad del suelo, %
1	3	21,74	25,58	5,79E-05	66,20
2	6	21,34	25,44	1,22E-03	67,00
3	9	24,54	25,46	1,56E+00	60,80
4	12	30,22	26,52	1,88E+00	61,20
5	15	31,28	27,22	3,05E+00	42,60
6	18	24,46	27,00	3,26E-01	58,40
7	21	22,58	25,90	3,66E-05	74,60
8	24	22,06	25,94	9,56E-05	67,20
9	3	21,12	25,22	1,00E-04	69,00
10	6	21,00	24,74	8,04E-02	66,20
11	9	26,20	24,98	1,62E+00	59,80
12	12	39,72	27,56	3,00E+00	34,20
13	15	30,88	27,70	2,87E+00	48,00
14	18	23,90	27,22	2,52E-01	68,40
15	21	23,48	26,60	8,14E-05	71,20
16	24	21,66	25,56	5,41E-05	68,00
17	3	20,88	25,30	4,63E-05	69,60
18	6	20,42	24,76	3,66E-02	66,00
19	9	26,20	24,98	1,85E+00	59,80
20	12	27,42	25,80	1,94E+00	63,20
21	15	28,74	26,80	2,34E+00	63,00
22	18	23,28	26,64	2,43E-01	65,00
23	21	22,30	26,20	5,92E-05	77,20
24	24	22,46	25,84	2,26E-01	68,60
25	3	21,28	24,64	8,00E-05	69,20
26	6	19,92	24,34	1,81E-03	71,00
27	9	25,24	24,14	1,70E+00	59,00
28	12	28,76	25,34	2,53E+00	59,20
29	15	27,14	26,80	1,80E+00	58,60
30	18	22,90	26,14	1,81E-01	71,00
31	21	20,78	25,60	6,39E-05	78,20
32	24	21,06	24,84	8,27E-05	74,80
33	3	22,06	25,26	1,22E-04	66,60
34	6	20,84	25,20	2,24E-02	65,40
35	9	21,30	24,88	1,43E+00	78,80
36	12	28,22	25,54	2,12E+00	69,20

Continuación. **Tabla 37**

37	15	28,86	26,78	1,76E+00	59,60
38	18	23,40	27,18	1,26E-01	71,40
39	21	23,26	25,96	8,12E-05	67,60
40	24	21,96	25,62	1,61E-04	66,20

El resultado de aplicar PCA a cada una de las extracciones de hojas de *L. alba* realizadas por SDE, indica que más del 82% de la información puede ser representada por un subespacio de dos coordenadas (componentes principales), construido con base en las combinaciones lineales de las concentraciones de los cinco compuestos mayoritarios (carvona, limoneno, piperitenona, piperitona y biciclosesquifelandreno) del extracto de *L. alba* obtenido a diferentes horas de recolección (Véase **Figura 56**) y durante diferentes días de extracción. El *Factor 1* involucra el 62% de la información y está representada básicamente por carvona y limoneno. El *Factor 2* constituye el 21% de la información, y está caracterizado principalmente por el biciclosesquifelandreno.



**Figura 56.** Análisis de componentes principales (PCA) de los componentes mayoritarios presentes en el extracto obtenido por SDE de hojas de *L. alba*, recolectadas a diferentes horas del día y la noche.

De acuerdo con la **Figura 56**, no se observa la formación clara de grupos en este subespacio; se trata de una distribución sin estructura aparente, por lo cual no se podría hablar de una relación aparente entre los diferentes casos (cada uno con sus respectivos parámetros ambientales presentados en la **Tabla 37**).

Para el caso de los AEs, también se aplicó PCA a todas y cada una de las extracciones de hojas de *L. alba* realizadas por MWHD, para relacionar cada caso particular de extracción con la composición química del extracto (carvona, limoneno, piperitenona, piperitona y biciclosesquifelandreno).

La gráfica se construyó con la composición química (Var1 = Carvona; Var2 = Limoneno; Var3 = Piperitona; Var4 = Piperitenona; Var5 = Biciclosesquifelandreno) de las 24 extracciones realizadas experimentalmente por la técnica MWHD (8 extracciones/día X 3 días = 24 extracciones). Cada caso comprende una serie de variables ambientales que fueron medidas a la hora de recolección de la muestra, las cuales se muestran la **Tabla 38**.

**Tabla 38.** Variables ambientales correspondientes a los casos graficados en la **Figura 57**.

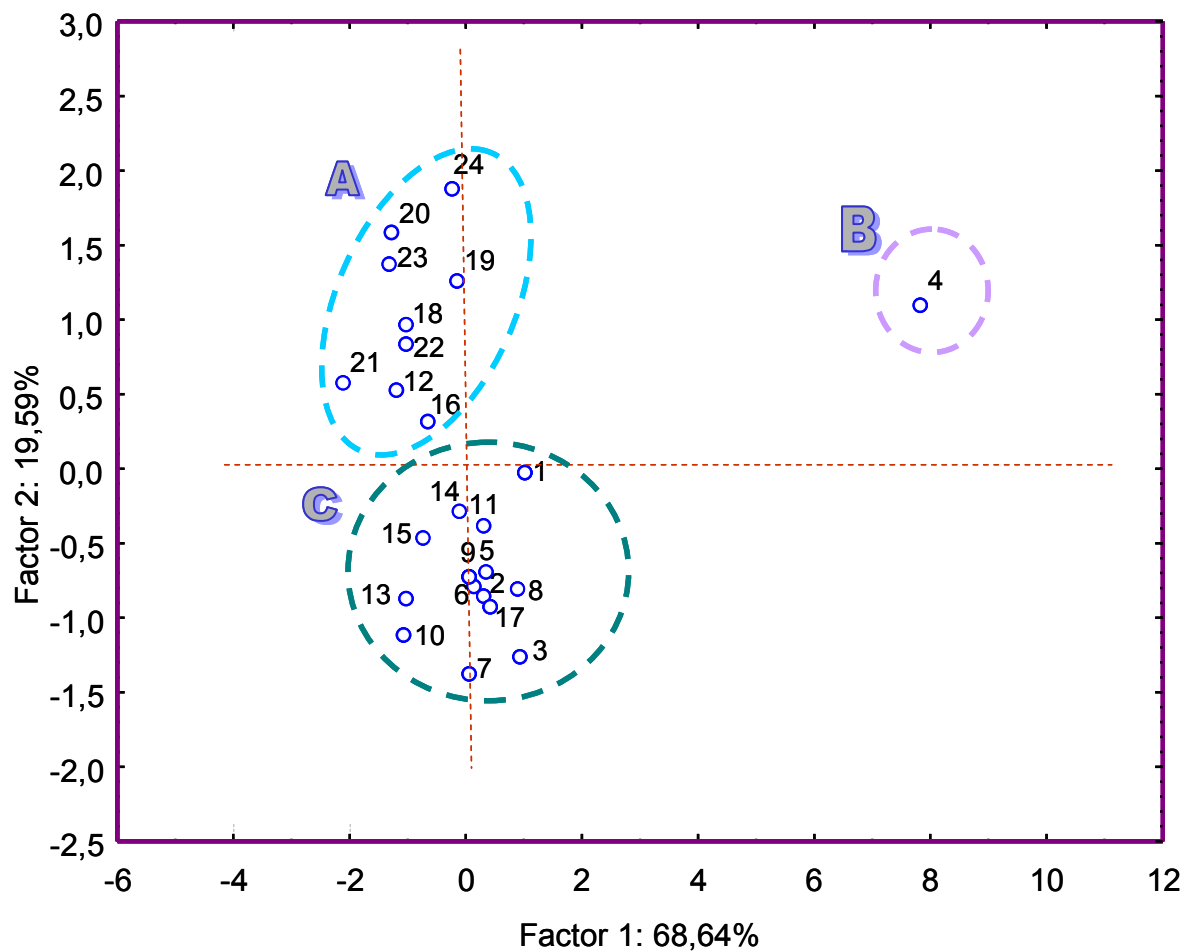
Caso	Hora de recolección	Temperatura ambiente, °C	Temperatura del suelo, °C	Intensidad lumínica, 1/kΩ	Humedad del suelo, %
1	3	20,2	25,7	9,90E-05	76,2
2	6	20,0	25,2	4,79E-02	69,0
3	9	20,5	25,2	9,89E-02	78,4
4	12	38,2	27,2	2,76E+00	33,0
5	15	27,0	26,3	1,19E+00	57,2
6	18	23,0	26,5	1,01E-01	71,4
7	21	22,0	26,3	8,54E-05	76,2
8	24	22,0	26,3	8,54E-05	76,2
9	3	25,2	25,2	1,14E-04	70,0
10	6	24,9	24,9	1,01E-01	67,8
11	9	24,8	24,8	1,45E+00	67,6
12	12	26,0	26,0	1,46E+00	66,0
13	15	26,9	26,9	1,19E+00	65,8

Continuación. **Tabla 38**

14	18	26,9	26,9	5,29E-02	69,0
15	21	26,1	26,1	1,02E-04	74,4
16	24	25,4	25,4	1,19E-04	73,0
17	3	19,9	26,0	8,10E-05	58,2
18	6	19,7	24,7	1,80E-02	60,0
19	9	36,4	25,0	1,85E+00	46,6
20	12	33,7	27,6	3,07E+00	56,6
21	15	28,2	28,2	1,15E+00	61,8
22	18	23,9	28,0	3,25E-02	71,4
23	21	21,9	26,8	5,45E-05	71,4
24	24	21,9	26,0	1,15E-04	66,0

El resultado de aplicar PCA a cada una de las extracciones de hojas de *L. alba* realizadas por MWHD, indica que más del 88% de la información puede ser representada por un subespacio de dos coordenadas (componentes principales), construido con base en las combinaciones lineales de las concentraciones de los cinco compuestos mayoritarios (carvona, limoneno, piperitenona, piperitona y biciclosesquifelandreno) del AE de *L. alba* obtenido a diferentes horas de recolección (Véase **Figura 57**) y durante diferentes días de extracción. El *Factor 1* involucra el 69% de la información y representa básicamente carvona y biciclosesquifelandreno. El *Factor 2* constituye el 21% de la información, y está caracterizado principalmente por limoneno y piperitona.

A diferencia de las extracciones realizadas por SDE, en la **Figura 57**, se observa la formación de tres grupos: **A**. Los casos 12, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24 (sombra rosa en la **Tabla 38**) que no presentan características ambientales distintivas; **B**. El caso 4 (sombra verde en la **Tabla 38**) que se caracteriza por tener los contenidos de carvona, limoneno, piperitenona, piperitona y biciclosesquifelandreno más bajos. También se presentaron temperaturas muy altas y como consecuencia los porcentajes de humedad fueron bajos; estos factores pudieron influir sobre la composición de la muestra recolectada, situando el caso 4 como un punto aislado; **C**. Los casos restantes (sin sombra en la **Tabla 38**) que se caracterizan por tener los contenidos de carvona, limoneno, piperitenona, piperitona y biciclosesquifelandreno altos.



**Figura 57.** Análisis de componentes principales (PCA) de los componentes mayoritarios presentes en el AE obtenido por MWHD de hojas de *L. alba*, recolectadas a diferentes a horas del día y la noche.

## CONCLUSIONES

- La recolección del material vegetal de la especie de *Lippia alba* con contenido alto de carvona puede realizarse a cualquier hora del día y la noche, debido a que el contenido de este compuesto mayoritario no presenta grandes fluctuaciones durante el ciclo circadiano.
- La producción biosintética de la carvona en la planta *L. alba* puede deberse a las variables ambientales, ya que en los momentos cuando las condiciones presentadas fueron: bajo porcentaje de humedad y altas temperaturas e intensidad lumínica, se obtuvieron contenidos altos de carvona.
- La variación circadiana del rendimiento de la extracción del AE de las hojas de *Lippia alba* por MWHD no fue estadísticamente significativa. Los rendimientos altos fueron entre 0,7 y 0,8 % registrados a las 9, 12 y 15 horas y los rendimientos más bajos fueron 0,63; 0,64 y 0,67 %, registrados a las 21, 24 y 3 horas, respectivamente.
- Los análisis de componentes principales (PCA) mostraron para las extracciones por MWHD, que en condiciones ambientales de *stress*, (tales como 38,2 °C y 27,2 °C de temperatura ambiente y del suelo, respectivamente), pueden influir sobre el comportamiento fisiológico de la planta, disminuyendo la producción de metabolitos secundarios.

## RECOMENDACIONES

- Someter un cultivo experimental de *Lippia alba* con alto contenido de carvona a temperaturas de suelo y ambiente, humedad e intensidad lumínica de *stress* controladas, con el objetivo de determinar su influencia en la producción de carvona.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. ABAD, A.; AGULLÓ, C.; CASTELBLANQUE, L.; CUÑAT, A.C.; NAVARRO, I.; and RAMÍREZ, C. Synthesis of Terpenoid Unsaturated 1,4-Dialdehydes.  $\delta$ -Facial Selectivity in the Diels-Alder Reaction of the 1-Vinyl-2-methylcyclohexene Moiety of Polycyclic Systems with DMAD. *J. Org. Chem.*, **2000**, 65, p.p. 4189-4192.
2. ABAD, A.; AGULLÓ, C.; CUÑAT, A.C.; and GARCÍA, A.B. Syntheses of oxygenated spongiane diterpenes from carvone. Synthesis of dorisenone C. *Tetrahedron*, **2005**, 61, p.p. 1961–1970.
3. ABAD, M.J.; VILLAR, P.B.; PALOMINO, S.S.; and CARRASCO, L., Antiviral activity of medicinal plant extracts. *Phytother. Res.*, **1997**, 2, p.p 198-202.
4. ABDULLAH, D.; PING, Q.N.; and LIU, G.J., Enhancing effect of essential oils on the penetration of 5-fluorouracil through rat skin. *Acta Pharm. Sin.*, **1996**, 31, p.p. 214-222.
5. ACOSTA, L., Proporciónese de salud, cultive plantas medicinales. Editorial Científico - Técnica. Ciudad de la Habana, **1993**, p.p. 13-25.
6. ACOSTA DE LA LUZ, L.L., La producción agrícola de plantas medicinales en Cuba garantía de calidad en la producción de fitofármacos. La Habana, Cuba, **2006**. [Citada en febrero de 2007]: Disponible en Internet, [www.herbotecnia.com.ar/c-public.html](http://www.herbotecnia.com.ar/c-public.html).
7. ADAMS, R.P., Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Carol Stream, Allured Plubishing Corporation, Illinois, **2004**, 456p.

8. AGGARWAL, K.K.; KHANUJA, S.P.S.; AHMAD, A.; KUMAR, T.R.S.; GUPTA, V.K.; and KUMAR, S., Antimicrobial activity profile of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and *Anethum sowa*. *Flav. Fragr. J.*, **2002**, 17, p.p. 59–63.
9. Análisis de la tendencia del mercado internacional de aceites esenciales. Informe mensual EXPORT.AR [Citada en febrero de 2007]: Disponible en Internet, <http://www.exportar.org.ar/modules/Publicaciones/aceitesesenciales.pdf>.
10. ANDRIGHETTI-FROHNER, C.R. ; SINCERO, T.C.M. ; DA SILVA, A.C. ; SAVI, L.A. ; GAIDO, C.M. ; BETTEGA, J.M.R. ; MANCINI, M. ; DE ALMEIDA, M.T.R. ; BARBOSA, R.A. ; FARIAS, M.R. ; BARARDI, C.R.M. ; and SIMO, C.M.O. ; Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. *Fitoterapia*, **2005**, 76, p.p 374-378.
11. Antecedentes de Biocomercio Sostenible. [Citada en febrero de 2007]: Disponible en Internet, [http://www.humboldt.org.co/biocomercio/institucional/biocomercio\\_antecedentes.htm](http://www.humboldt.org.co/biocomercio/institucional/biocomercio_antecedentes.htm).
12. ALVES DOS SANTOS, M.R.; INNECCO, R.; e SOARES A.A. Anatomic characterization of secretory structures and essential oil production of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown in relation to harvest times in the dry and rainy seasons. *Revista Ciencia Agronómica*, **2004**, 76(2), p.p. 377-389.
13. ARMSTEAD, D.E.F., A centenary synthesis of carvone and dicarvelone. *J. Chem. Educ.*, **1995**, 72(6), p.p. 550-552.

14. Aromáticas. Agroalimentos argentinos II. [Citada en febrero de 2007]: Disponible en Internet en, [http://www.aacrea.org.ar/economia/articulos/pdf/aaii\\_29\\_aromaticas.pdf](http://www.aacrea.org.ar/economia/articulos/pdf/aaii_29_aromaticas.pdf).
15. ARREAZA-CARDIER, R.; y ARREAZA, R., El ritmo circadiano. Base molecular. Aspectos clínicos y laborales. *Gac. Méd. Caracas*, **2002**, 110(1), p.p. 31-34.
16. AZCÓN-BIETO, J.; y TALÓN, M., Fundamentos de fisiología vegetal. 1 ed. Ed. McGraw-Hill Interamericana. España, **2000**, Cap 3, p.p. 31-43 y Cap 17, p.p. 261-283.
17. 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. *Flavour. Fragr. J.*, **2000**, 15, p.p. 199-200.
18. BAHL, J.R.; SINHA, S.; NAQVI, A.A.; BANSAL, R.P.; GUPTA, A.K.; KUMAR, S. Linalool-rich essential oil quality variants obtained from irradiated stem nodes in *Lippia alba*, *Flavour. Fragr. J.*, **2002**, 17, p.p. 127-132.
19. BAILER, J.; AICHINGER, T.; HACKL, G.; DE HUEBER, K.; and DACHLER, M. Essential oil content and composition in commercially available dill cultivars in comparison to caraway. *Industr. Crops Prod.*, **2001**, 14, p.p. 229–239.
20. BANDONI, A., Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica; su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Editorial de la Universidad Nacional de la Plata, La Plata, 1ª Ed., **2000**, p.p.124, 285-298.

21. BARCELÓ, J., RODRIGO, N., GARCÍA, B., TAMÉ, R., Fisiología vegetal. Cuarta Edición. 1987, Ediciones Pirámide S.A. Madrid, en: SABILLÓN R., Danelia. Determinación de los factores de emisión de monoterpenos en tres especies típicas de la vegetación terrestre mediterránea: *Pinus pinea*, *Pinus halepensis* y *Quercus ilex*. Universidad Politécnica de Cataluña. Barcelona, Tesis Doctoral, **2001**.
22. BARRIGA G.H., Flora Medicinal de Colombia, Tomo II. 2 Ed. Editorial Tercer Mundo, Colombia. **1992**, p. 495.
23. BEDOUKIAN's, P.P., Perfumery & flavouring materials. 50 Years of annual review articles 1945-1994, Ed. Allured Publishing Corporation, Danbury, **1995**, p. 680.
24. Bibliometría. Importancia de los indicadores bibliométricos [Citada en julio de 2007]: Disponible en Internet, <http://www.ricyt.org/interior/difusion/pubs/elc/10.pdf>.
25. Biogénesis de terpenos. Página del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Granada, España, 2004. [Citada en enero de 2007]: Disponible en Internet, <http://www.ugr.es/~quiorred/pnatu/terpenoides.htm>.
26. Bioquímica, terpenos. Máster en Ciencia Tecnología y Sociedad. Universidad de Salamanca. **2001-2002**. [Citada en enero de 2007]: Disponible en Internet, <http://www.guia-digital.com/infociencia/arbol/arbol-ficha.cfm?rama=3&ID=230230>.

27. BLAY, G.; COLLADO, A.M.; GARCÍA, B.; and PEDRO, J.R. Silicon guided rearrangement of epoxydecalines to spirocyclic compounds. Synthesis of gleenol and axenol from carvona. *Tetrahedron*, **2005**, 61, p.p. 10853-10860.
28. BOUWMEESTER, H.J.; GERSHENZON, J.; KONINGS, M.C.J.M.; and CROTEAU R. Biosynthesis of the Monoterpenes Limonene and Carvone in the Fruit of Caraway. I. Demonstration of Enzyme Activities and their Changes with Development. *Plant Physiol.*, **1998**, 117, p.p. 901–912.
29. BRAGA, M.E.M.; EHLERT, A.D.P.; MING, L.C.; and MEIRELES., Supercritical fluid extraction from *Lippia alba*: global yields, kinetic data, and extract chemical composition. *J. Supercrit. Fluids*, **2005**, 34, p.p. 149-156.
30. BROWMEESTER, H.; DAVIES, J.A.R.; SMID, H.G.; and WELTEN, R.S.A. Physiological limitations to carvone yield in caraway (*Carum cawi L.*). *Industr. Crops Prod.* **4**, **1995**, p.p. 39-51.
31. BUCHBAVER, G.; and JIROVETZ, L., Aromatherapy-use of fragrances and essential oil medicaments. *J. Flavour. Frag.*, **1994**, 9, p.p. 217-222.
32. CAPEL, J.; LOZANO, R.; MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M.; y JARILLO, J.A., Ritmos y relojes circadianos de las plantas. *Revista Científica y Técnica de Ecología y Medio Ambiente (Ecosistemas)*, **2003**, enero-abril.
33. CARRETERO, M.E., Compuestos fenólicos. *Panorama Actual Med.*, **2000**, 24 (232), p.p. 340-344.
34. CARTER, R.; HODGETTS, K.; McKENNA, J.; MAGNUS, P.; and WREN, S. Studies on the Stereoselective Synthesis of the Marine Antitumor Agent Eleutherobin. *Tetrahedron*, **2000**, 56, p.p. 4367-4382.

35. CARVALHO, C.C.R; and DA FONSECA, M.R, Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene. *Food Chem.*, **2006**, 95, p.p. 413–422.
36. CARVALHO, C.C.R. and DA FONSECA, M.R. Maintenance of cell viability in the biotransformation of (-)-carveol with whole cells of *Rhodococcus erythropolis*. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2002**, p.p. 389–398.
37. CARVALHO, C.C.R. and DA FONSECA M. Towards the bio-production of *trans*-carveol and carvone from limonene: induction after cell growth on limonene and toluene. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2003**, 14, p.p. 3925–3931.
38. CASTRO, H.T., Aislamiento de R-(-)-carvona por derivación química selectiva del aceite esencial de *Lippia alba*. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Proyecto de Grado, **2002**.
39. Centre for the promotion of imports from developing countries: Market survey on natural ingredients for cosmetics. **2004**. [Citada en diciembre de 2006]: Disponible en Internet, <http://www.cbi.nl/show.php?file=marketinforesults.html&action>.
40. Centro de Altos Estudios, CAE. [Citada en enero de 2007]: Disponible en Internet en, [http://www.arroyito.net/cae/menta\\_piperita.htm](http://www.arroyito.net/cae/menta_piperita.htm).
41. CHATTOPADHYAY, S. and UMARYE, J. A New Carvone Based Construction of the Ring-A of Taxoids. *Tetrahedron Lett.*, **1999**, 40, p.p. 4881-4884.

42. CHEN, J.; LU, M.; JING, Y.; and DONG, J. The synthesis of L-carvone and limonene derivatives with increased antiproliferative effect and activation of ERK pathway in prostate cancer cells. *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, 14, p.p. 6539–6547.
43. CHIESA, J.J., Patrones del ritmo de actividad motora como expresión de la plasticidad del sistema circadiano. Universidad de Barcelona, Barcelona, Tesis Doctoral, **2005**.
44. Cienciometría: instrumentos de evaluación y crítica [Citada en julio de 2007]: Disponible en Internet, [http://www.ffyb.uba.ar/asesoria/carr\\_doc/home/cienciometria.pdf](http://www.ffyb.uba.ar/asesoria/carr_doc/home/cienciometria.pdf).
45. Cienciometría: Midiendo la productividad. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. [Citada en julio de 2007]: Disponible en Internet, <http://www.med.uchile.cl/noticias/2006/agosto/pdf/cienciometria.pdf>.
46. Clasificación de los productos naturales basada en la biogénesis. Página del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Granada, España, **2004**. [Citada en julio de 2007]: Disponible en Internet, <http://www.ugr.es/~quiorred/pnatu/biogenesis.htm>.
47. Compuestos fenólicos derivados de plantas y sintéticos y extractos de plantas, efectivos en el tratamiento y prevención de infecciones clamidiales. Patente número 04-02-2004. Boletín de Patentes. Instituto de la Propiedad Industrial. Febrero 04 de 2004, Número 195. Argentina.
48. CÓRDOVA, A.; y ESQUINCA, J.L., Cronobiología. Ritmos biológicos. Programa de actualización continua en psiquiatría. Ed. Neurociencias, S.A., **2002**, p.p. 489-493.

49. CRAMAROSSA, M.R.; NADINI, A.; BONDI, M.; MESSI, P.; PAGNONI, U.M.; and FORTI, L. Biocatalytic reduction of (+)- and (-)-carvone by bacteria. *C. R. Chimie* **8**, **2005**, p.p. 849–852, Preliminary communication / Communication.
50. CRAVEIRO, A.A.; ALEXCAR, J.W., MATOS, F.J.A.; ANDRADE, C.H.S.; and, MACHADO, M.I.L. Essential oils from Brazilian Verbenaceae genus *Lippia*. *J. Nat. Prod.*, **1981**, 44, p.p. 598-601.
51. CROTEAU, R. Effect of irrigation method on essential oil yield and rate of oil evaporation in mint grown under controlled conditions. *Hortscience*, **1977**, 12, p.p. 563-565.
52. DAVEY, P.N.; NEWMAN, C.P.; THIAM, W.A.; and TSE, CHI-LAM. US Patent. 6.500.989., **2002**.
53. DE SOUSA, D.P.; DE FARIAS, N.; and FERREIRA, F. Influence of the chirality of (R)-(-)- and (S)-(+)-carvone in the central nervous system: A comparative study. *Chirality*, **2007**, 19(4). p.p. 264-268.
54. DEMENT, W.A.; TYSON, B.J.; and MOONEY, H.A. Mechanism of monoterpene volatilization in *Salvia mellifera*. *Phytochem.*, **1975**, 14, p.p. 2555-2557. en: SABILLÓN R., Danelia. Determinación de los factores de emisión de monoterpenos en tres especies típicas de la vegetación terrestre mediterránea: *Pinus pinea*, *Pinus halepensis* y *Quercus ilex*. Universidad Politécnica de Cataluña. Barcelona, Tesis Doctoral. **2001**.
55. DÍAZ, J.A.; OYOLA, J.L.; y, ÁVILA, L.M., Análisis del Mercado Internacional de Aceites Esenciales y Aceites Vegetales. Biocomercio Sostenible.

Instituto de Investigación de Recursos Biológicos “Alexander von Humboldt”. **2002**.

56. DURÁN, D.C., Estudio del aceite esencial de *Lippia alba* (Fam. Verbenaceae) y de los aspectos fisiológicos en diferentes etapas de su crecimiento bajo tres niveles de luz. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Proyecto de Grado, **2005**.

57. EGAWA, T.; KACHI, Y.; TAKESHIMA, T.; TAKEUCHI, H.; and KONAKA, S. Structural determination of carvone, a component of spearmint, by means of gas electron diffraction augmented by theoretical calculations. *J. Mol. Structure*, **2003**, 658, p.p. 241–251.

58. Estudio de oferta y demanda del sector de productos naturales. Latinpharma **2003**. [Citada en febrero de 2007]: Disponible en Internet, <http://www.intracen.org/sstp/Survey/pharma03/Colombia03.pdf>.

59. Estudio del mercado colombiano de aceites esenciales Biocomercio Sostenible. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos “Alexander von Humboldt”. **2003**.

60. EVAS, W.C., Farmacognosia. Ed. Interamericana. McGraw - Hill, México. D.F., **1991**, p.p. 454-455.

61. FALL, R.; and MONSON, R.K. Isoprene emisión rate in relation to stomatal distribution and stomatal conductance. *Plant Physiol.*, **1992**, 100, p.p. 987-992.

62. FISCHER, U.; LOPÉZ, R.; POLL, E.; VETTER, S.; NOVAK, J.; and FRANZ, C.M., Two chemotypes within *Lippia alba* populations in Guatemala. *Flavour. Fragr. J.* **2004**; 19, p.p. 333-335.
63. FOGACA, R.T.H.; CAVALCANTE, A.D.A.; SERPA, A.K.L.; and SOUSA, P.J.C., The effects of essential oil of *Mentha villosa* on skeletal muscle of the toad. *Physiother. Res.*, **1997**, 11(8), p.p. 552-555.
64. Found for research into industrial development, growth and equito (fridge). Essential oils industry and market analysis. South Africa; **2004**. [Citada en noviembre de 2006]: Disponible en Internet, <http://www.nedlac.org.2a/research/fridge/aroma/part4/essential.pdf>.
65. FRANZIOS, G.; MIROTSOU, M.; HATZIAPOSTOULOU, E.; KRAL, J.; SCOURAS, Z.; and MAVRAGANI-TSIPIDOU, P. Insecticidal and Genotoxic Activities of Mint Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, 45, p.p. 2690-2694.
66. GARCÍA, G.A.; NAHON, L.; and POWIS, I., Near-threshold photoionization spectroscopy of the mono-terpenes limonene and carvone. *Inter. J. Mass Spectrom.*, **2003**, 225, p.p. 261–270.
67. GARCÍA-NIETO, L.P., Las plantas medicinales y aromáticas. Una alternativa de futuro para el desarrollo rural. Boletín Económico ICE, **2000**, 2652, p.p. 29-40.
68. GENTRY, A.H., Woody plants of northwest South America, Ed. Consevation Internacional, Washington, **1993**, p.p. 833-837.

69. GIL, E. y SÁENZ A., Evaluación a escala de planta piloto del proceso industrial para la obtención de aceite esencial de cardamomo, bajo la filosofía “cero emisiones”. Universidad EAFIT, **2005**, Medellín, p.p. 3-11.
70. Gobierno de Chile, Fundación para la innovación agraria, Boletín de plantas medicinales y aromáticas. ISSN 0718-0.357 No. 8, Santiago de Chile, correspondiente a junio de **2003**.
71. GODEFROOT, M.; SANDRA, P.; and VERZELE, M. New method for quantitative essential oil analysis. *J. Chromatogr.*, **1981**, 203, p.p. 325-335.
72. GOLOMBEK, D., Cronobiología. La máquina del tiempo. [Citada en noviembre de 2006]: Disponible en Internet, <http://www.cientec.or.cr/exploraciones/ponencias 2006/DiegoGolombek.pdf>.
73. GONZÁLEZ, M.A.; GHOSH, S.; RIVAS, F.; FISCHER, D.; and THEODORAKIS, E. Synthesis of (+)- and (-)-isocarvone. *Tetrahedron Lett.*, **2004**, 45, p.p. 5039–5041.
74. GROB, R. L., Modern practice of gas chromatography. New York: John Wiley & Sons, **1985**, p.p. 895-897.
75. GROS, E.; Introducción al estudio de los productos naturales. Washington: Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, **1985**, p.p. 1-11, 79-100.
76. GUENTHER, A.B.; HEWITT, C.N.; ERICKSON, D.; FALL, R.; GERON, C.; GRAEDEL, T.; HARLEY, P.; KLINGER, L.; LERDAU, M.; MCKAY, W.A.; PIERCE, T.; SCHOLLES, B.; STEINBRECHER, R.; TALLAMRAJU, R.; TAYLOR, J.; and ZIMMERMAN, P. A global model of natural volatile organic

compound emissions. *J. Geophys. Res.*, **1995**, 100, p.p. 8873-8892. en: SABILLÓN R., Danelia. Determinación de los factores de emisión de monoterpenos en tres especies típicas de la vegetación terrestre mediterránea: *Pinus pinea*, *Pinus halepensis* y *Quercus ilex*. Universidad Politécnica de Cataluña. Barcelona. Tesis Doctoral, **2001**.

77. GUENTHER, A.B.; MONSON, R.; and FALL, R. Isoprene and monoterpene emission rate variability: observations and emission rate algorithm development. *J. Geophys. Res.*, **1991**, 96, p.p. 10799-10808. en: SABILLÓN R., Danelia. Determinación de los factores de emisión de monoterpenos en tres especies típicas de la vegetación terrestre mediterránea: *Pinus pinea*, *Pinus halepensis* y *Quercus ilex*. Universidad Politécnica de Cataluña. Barcelona, Tesis Doctoral. **2001**.

78. GUENTHER, E. The essential oils, Vol II, Ed. Van Nostrand Reinhold, New York, **1975**, p.p. 412-415.

79. GUENTHER, A.B.; ZIMMERMAN, P.R.; and HARLEY, P.C. Isoprene and monoterpene variability: Model evaluations and sensitivity analysis. *J. Geophys. Res.*, **1993**, 98, p.p. 609-617. en: SABILLÓN R., Danelia. Determinación de los factores de emisión de monoterpenos en tres especies típicas de la vegetación terrestre mediterránea: *Pinus pinea*, *Pinus halepensis* y *Quercus ilex*. Universidad Politécnica de Cataluña. **2001**. Barcelona. Tesis Doctoral.

80. GUPTA, M., 270 Plantas medicinales Iberoamericanas. Bogotá. CYTED-SECAB, **1995**, p.p. 558.

81. HARLEY, P.C.; LITVAK, M.E.; SHARKEY, T.D.; and MONSON, R.K. Isoprene emissions from velvet bean leaves. Interactions among nitrogen

availability, growth photon flux density, and leaf development. *Plant Physiol.*, **1994**, 105, p.p. 279-285.

82. HARBORNE, J., *Phytochemical Methods*. 2 ed. Chapman and Hall, London, **1984**, p.p. 100-107, 116, 120-124, 129-131.

83. HAREAU, G.P.J.; KOIWA, M.; HIKICHI, S.; and SATO, F. Synthesis of Optically Active 5-(*tert*-Butyldimethylsiloxy)-2-cyclohexenone and Its 6-Substituted Derivatives as Useful Chiral Building Blocks for the Synthesis of Cyclohexane Rings. Syntheses of Carvone, Penienone, and Penihydrone. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, p.p. 3640-3650.

84. HELANDER, I.M.; ALAKOMI, H.L.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POL, I.; SMID, E.J.; GORRIS, L.G.M.; and WRIGHT, A.T. Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. *J. Agric. Food Chem.*, **1998**, 46, p.p. 3590-3595.

85. HERNÁNDEZ, H.; BONILLA, C.; y SÁNCHEZ, M., Efecto de la fertilización nitrogenada en la producción de biomasa y calidad de aceite esencial en *Lippia alba* (Mill.), *Pronto alivio*, **2004**, 53(1).

86. Hierbas aromáticas. [Citada en enero de 2006]: Disponible en Internet, [http://www.ecuadorexporta.org/productos\\_down/perfil\\_producto\\_hierbas\\_aromaticas551.pdf](http://www.ecuadorexporta.org/productos_down/perfil_producto_hierbas_aromaticas551.pdf).

87. HIROSHI, WATANNABE, SUGANUMA. Oral composition of tranexamic acid and carvone. Patent Number: 4'465.662. United State Patent. August 14, **1984**.

88. HOFFMANN, G.G. Infrared, Raman and VCD spectra of (S)-(+)-Carvone-comparison of experimental and initio theoretical results. *J. Mol. Structure*, **2003**, p.p. 661-662.
89. Indicadores cuenciométricos. [Citada en julio de 2007]: Disponible en Internet, <http://eprints.rclis.org/archive/00001875/01/sci07100.pdf>.
90. IKAN, R., *Natural Products: A Laboratory Guide*. 2 Ed., San Diego, Academic Press, Inc. **1998**, p.p. 168-181.
91. JAGER, W.; MAYER, M.; PLATZER, P.; REZNICEK, G.; DIETRICH, H.; and BUCHBAUER, G., Stereoselective metabolism of the monoterpene carvone by rat and human liver microsomes. *J. Pharm. Pharmacol.*, **2000**, 52, p.p. 191–197.
92. JANSON, R.W. Monoterpene emissions from scots pine and Norwegian spruce. *J. Geophys. Res.*, **1993**, 98, p.p. 2839-2850. en: SABILLÓN R., Danelia. Determinación de los factores de emisión de monoterpenos en tres especies típicas de la vegetación terrestre mediterránea: *Pinus pinea*, *Pinus halepensis* y *Quercus ilex*. Universidad Politécnica de Cataluña. **2001**. Barcelona. Tesis Doctoral.
93. JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; STOYANOVA, A.S.; GEORGIEV, E.V.; and DAMIANOVA, S.T. Composition, quality control, and antimicrobial activity of the essential oil of long-time stored dill (*Anethum graveolens* L.) seeds from Bulgaria. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, p.p. 3854-3857.
94. JUTNER, F. and BUFLER, U. Physiologische and biochemische Prozesse der Terpen-Emission in *Picea abies*. *Europaisches Forschungszentrum fur mabnahmen zur Luftrinhaltung*, KFK-PEF 35 Karlsruhe, p.p. 197-207.

en: SABILLÓN R., Danelia. Determinación de los factores de emisión de monoterpenos en tres especies típicas de la vegetación terrestre mediterránea: *Pinus pinea*, *Pinus halepensis* y *Quercus ilex*. Universidad Politécnica de Cataluña. Barcelona, Tesis Doctoral. **2001**.

95. JUUITI, S.; AREY, J.; and ATKINSON, R. Monoterpene emissions rate measurements from a Monterey pine. *J. Geophys. Res.*, **1990**, 95, p.p. 7515-7519. en: SABILLÓN R., Danelia. Determinación de los factores de emisión de monoterpenos en tres especies típicas de la vegetación terrestre mediterránea: *Pinus pinea*, *Pinus halepensis* y *Quercus ilex*. Universidad Politécnica de Cataluña. Barcelona, Tesis Doctoral. **2001**.

96. KARMAKAR, S. and CHATTOPADHYAY. Grob-type fragmentation of a carvone derived b-hydroxymesylate: application to the synthesis of chiral lavandulol derivatives. *Tetrahedron*, **2004**, 60, p.p. 5013–5017.

97. KIRNER, A.; DEUTSCH, S.; WEILER, E.; POLAK, E.H.; and APFEL, R. A application to the olfactory epithelium reveals different sensory neuron populations for the odour pair D- and L-carvone. *Behaviour. Brain Res.*, **2003**, 138, p.p. 201- 206.

98. KLAASJE, J.; HARTMANS; DIEPENHORST, P.; BAKKER, W.; and GORRIS, L.G.M. The use of carvone in agriculture: sprout suppression of potatoes and antifungal activity against potato tuber and other plant diseases. *Indust. Crops and Prod.* **4**, **1995**, p.p. 3-13.

99. KOKKINI, S.; KAROUSOU, R.; and LANARAS, T. Essential Oils of Spearmint (Carvone-rich) Plants from the Island of Crete (Greece). *Biochem. Syst. Ecol.*, **1995**, 23 (4), p.p. 425-430.

100. KOVÁTS, E., Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. *Advan. Chromatogr.*, **1965**, 1, p.p. 229-247.
101. KUMAR. *Lippia alba* plant Named "Bhurakshak". United States Plant Patent. Patent Number U.S.PP13,110P2.
102. KUZMA, J. and FALL, R. Leaf isoprene emission rate is dependent on leaf development and level of isoprene synthase. *Plant Physiol.*, **1993**, 101, p.p. 435-440.
103. La evaluación de la actividad científica mediante indicadores bibliométricos. [Citada en julio de 2007]: Disponible en Internet: <http://www.una.ac.cr/bibliotecologia/boletinbiblioteca/2006/MariaLuisa.pdf>.
104. LAMB, B.; GUENTHER, A.; GAY, D., and WESTBERG, H. A national inventory of biogenic hydrocarbon emissions. *Atmos. Environ.*, **1987**, 31, p.p. 145-156. en: SABILLÓN R., Danelia. Determinación de los factores de emisión de monoterpenos en tres especies típicas de la vegetación terrestre mediterránea: *Pinus pinea*, *Pinus halepensis* y *Quercus ilex*. Universidad Politécnica de Cataluña. Barcelona, Tesis Doctoral, **2001**.
105. LASKA, M.; LIESEN, A.; and TEUBNER, P., Enantioselectivity of odor perception in squirrel monkeys and humans. *A. J. Phys. Regul. Integr. Compar. Physiol.*, **1999**, 277.
106. LITVAK, M.E.; LORETO, F.; HARLEY, P.C.; SHARKEY, T.D.; and MONSON, R.K. The response of isoprene emission rate and photosynthetic rate to photon flux and nitrogen supply in aspen and white oak trees. *Plant, Cell Environment*, **1996**, 19, p.p. 549-559. en: SABILLÓN R., Danelia.

Determinación de los factores de emisión de monoterpenos en tres especies típicas de la vegetación terrestre mediterránea: *Pinus pinea*, *Pinus halepensis* y *Quercus ilex*. Universidad Politécnica de Cataluña. Barcelona, Tesis Doctoral. **2001**.

107. LOCATELLI, L., Análisis cronobiopsicológico del futbolista. Tesis Doctoral, **2005**, p.p. 33-41.
108. 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. *J. Flavour. Fragr.*, **2001**, 16, p.p. 356-359.
109. LORETO, F. and SHARKEY T.D. A gas exchange study of photosynthesis and isoprene emission in *Quercus rubra* L. *Planta*, **1990**, 182, p.p. 523-531. en: SABILLÓN R., Danelia. Determinación de los factores de emisión de monoterpenos en tres especies típicas de la vegetación terrestre mediterránea: *Pinus pinea*, *Pinus halepensis* y *Quercus ilex*. Universidad Politécnica de Cataluña. Barcelona, Tesis Doctoral. **2001**.
110. LORETO, F.; CICCIOLO, P.; CECINATO, A.; BRANCALEONI, E., FRATTONI, M.: and TRICOLI, D. Influence of environmental factors and air composition on the emission of  $\alpha$ -pinene from *Quercus ilex* leaves. *Plant Physiol.*, **1996**, 110, p.p. 276-275.
111. LOYOLA-VARGAS, V.; SÁNCHEZ-ITURBE, P.; CANTO-CANCHÉ, B.; GUTIÉRREZ-PACHECO, L.C.; GALAZ-ÁVALOS, R.M.; and MORENO-VALENZUELA, O., Biosíntesis de los alcaloides indólicos. Una revisión crítica. *Rev. Soc. Quím. Méx.* **2004**, 48, p.p. 67-94.

112. MARTÍNEZ, J.; SULBARÁN DE FERRER, B.; OJEDA DE RODRÍGUEZ, G.; FERRER, A.; and NAVA, R., Antibacterial activity of mandarin essential oil. *Rev. Fac. Agron.*, **2003**, 4(20), p.p. 502-512.
113. McBRIDE, K. and SLOTNICK, B. Discrimination between the enantiomers of Carvone and of Terpinen-4-ol Odorants in Normal Rats and those with Lesions of the Olfactory Bulbs. *J. Neurosci.*, **2006**, 26(39), p.p. 9892–9901.
114. McLAFFERTY, F. W. and TURECEK, F., Interpretation of mass spectra. California: University Science Books, **1993**, 374p.
115. MEULEMANS, T.M.; GERRIT, A.S.; MACAEV, F.Z.; JANSEN, B.J.M. and GROOT, A. Total synthesis of dihydroclerodin from R-(-)-carvone. *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, p.p. 9178-9188.
116. MINEVAMA, M. and EGAWA, T. Conformational property of carvone as studied by laser-jet spectroscopy and theoretical calculations. *J. Mol. Structure*, **2005**, 734, p.p. 61–65.
117. MONSON, R.K. and FALL, R. Isoprene emission from aspen leaves: Influence of environment and relation to photosynthesis and photorespiration. *Plant Physiol.*, **1989**, 90, p.p. 267-274.
118. MONSON, R.K.; LERDAU, M.T.; SHARKEY, T.D.; SCHIMEL, D.S.; and FALL, R. Biological aspects of construction volatile organic compound emissions inventories. *Atmos. Environ.*, **1995**, 29, p.p. 2989-3002. in: SABILLÓN R., Danelia. Determinación de los factores de emisión de monoterpenos en tres especies típicas de la vegetación terrestre

mediterránea: *Pinus pinea*, *Pinus halepensis* y *Quercus ilex*. Universidad Politécnica de Cataluña. Barcelona, Tesis Doctoral. **2001**.

119. MOLINA, J.L. Estudio de la variación composicional de la fragancia de las flores de *Brugmansia suaveolens* durante el día y la noche. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Tesis de grado, **2005**.
120. MULDER, P.; VAN HAVEREN, J.; and HIJHUIS, H. WIPO, WO 99/12880, **1999**.
121. NOKHODCHI, A.; SHARABIANI, K.; RASHIDI, M.R.; and GHAFOURIAN, T. The effect of terpene concentrations on the skin penetration of diclofenac sodium. *Int. J. Pharm.*, **2007**, p.p. 97-105.
122. NÚÑEZ, A., Aislamiento y concentración de trazas orgánicas volátiles en cromatografía gaseosa capilar. CENIC, Ciudad de la Habana, **1986**, p.p. 4-20.
123. OCHOA, F., Caracterización del mercado colombiano de plantas medicinales y aromáticas. Instituto de Investigación de Recursos. 17 de abril de **2005**.
124. OLIVERIA, D.R., LEITAO, G.G., SANTOS, S.S., BIZZO, H.R., LOPES, D., ALVIANO, C.S., ALVIANO, D.S., and LEITAO, S.G. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximina, Brasil. *J. Ethnopharm.*, **2006**, 108, p.p. 103-108.
125. OOSTERHAVEN, K.; POOLMAN, B. and SMID, E.J. S-Carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteristatic compound. *Indust. Crops and Prod.* **4**, **1995**, p.p. 23-31.

126. PALENCIA, M.Y, Sustancias bioactivas en los alimentos. [Citada en julio de 2007]: Disponible en Internet, [http://www.unizar.es/med\\_naturista/bioactivos%20en%20alimentos.pdf](http://www.unizar.es/med_naturista/bioactivos%20en%20alimentos.pdf).
127. PARÉ, J.R.J. US Patent, 5.002.752, **1991**.
128. PARÉ, J.R.J. European Patent Application, **1992**.
129. PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ MATA, D.; and VILLAR, A., *Lippia*: tradicional uses, chemistry and pharmacology. *J. Ethnopharm.*, **2001**, 75, p.p. 201-14.
130. PASCUAL, M.E., SLOWING, K. CARRETERO, M.E. and VILLAR, A, Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). *// Farmaco*, **2001**, 56, p.p. 501–550.
131. PATIÑO, M.I., Los Bionegocios: Perspectivas del sector privado. [Citada en febrero de 2006]: Disponible en Internet, <http://www.humboldt.org.co/chmcolombia/servicios/jsp/indice/biocomercioC ontenidoDetalle.jsp?codigo=19&>.
132. Perspectivas del mercado de plantas medicinales y fitoterapéuticos. Biocomercio Sostenible Instituto Alexander von Humboldt. [Citada en febrero de 2007]: Disponible en Internet, <http://www.humboldt.org.co/download/pmedicin.pdf>.
133. PINHEIRO, L. and MARSALOLI, A. Microbial monooxygenases applied to fragrance compounds. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2007**, 44, p.p. 78–86.

134. PINO, J.A.; ORTEGA, A.G.; ROSADO, A.; RODRÍGUEZ, M.; y BALUJAR, R., Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. *Rev. Cubana Farm.*, **1997**, 30 (1), p.p. 445-446.
135. PIQUERAS, C., Metabolitos secundarios de las plantas. Revista virtual Número 6.1. Escuela Superior de Técnicas y Estudios Avanzados. Barcelona, España. [Citada en enero de 2007]: Disponible en Internet, <http://www.psicostasia.com/Rev07.htm>.
136. PITTENDRIGH, C.S. (1981) Circadian systems: Entrainment. In: CHIESA, J.J., Patrones del ritmo de actividad motora como expresión de la plasticidad del sistema circadiano. Universidad de Barcelona. Barcelona, Tesis Doctoral, **2005**.
137. POGREBNOI, S.; SARABER, F.C.E.; JANSEN B.J.M.; and DE GROOT, A., Synthesis of a chiral steroid ring D precursor starting from carvone. *Tetrahedron*, **2006**, 62, p.p. 1743-1748.
138. POOLE, C. F., and POOLE S. K., Chromatography today. Amsterdam: Elsevier, **1991**, 1026 p.
139. PORTELA, A., Contribución al estudio de la cronofisiología: aspectos experimentales. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, Tesis Doctoral, **1993**, 198 p.
140. REFINETTI, R., Circadian Physiology. CRC Press, Boca Ratón, **1999**, In: LOCATELLI, L., Análisis cronopsicológico del futbolista. Tesis Doctoral, **2005**, p.p. 33-41.

141. 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**. [Consultado en febrero 2006]: Disponible en Internet, <http://www.unne.edu.ar/cyt/2001/8-Exactas/E-011.pdf>.
142. RICCIARDI, G.; RICCIARDI, A.; y BANDONI, A., Fitoquímica de Verbenáceas (*Lippias* y *Aloysias*) del Nordeste Argentino. *Rev. Ciencia y Técnica*, Univesidad Nacional del Nordeste, Argentina, **2000**. [Consultado en febrero 2006]: Disponible en internet, [http://www.plantasmedicinales.org/archivos/fitoquimica\\_verbenaceas.pdf?PHPSESSID=1e496d3726b76699241f4d51c66e30d6.html](http://www.plantasmedicinales.org/archivos/fitoquimica_verbenaceas.pdf?PHPSESSID=1e496d3726b76699241f4d51c66e30d6.html).
143. RICCIARDI, G.; VEGLIA, J.F.; RICCIARDI, A.I.A.; y BANDONI, A.L., Examen comparado de la composición química de los aceites esenciales de especies autóctonas de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*, **1999**, 8, p.p. 103–106.
144. RÖDEL, W.; WÖLM, G., A guide to gas chromatography. Huethig Verlag, New York, **1987**, 211p.
145. SABILLÓN, R., Danelia. Determinación de los factores de emisión de monoterpenos en tres especies típicas de la vegetación terrestre mediterránea: *Pinus pinea*, *Pinus halepensis* y *Quercus ilex*. Universidad Politécnica de Cataluña. Barcelona, Tesis Doctoral. **2001**.
146. SALISBURY, F. and ROSS, C. Fisiología vegetal. Grupo Editorial Iberoamérica. **1994**, México, D.F. p.p. 71-98; 515-535.

147. SAMACH, A.; and WIGGE, P.A., Ambient temperature perception in plants. *Curr. Opinion in Plant Biol.*, **2005**, 8, p.p. 483-486.
148. SANDOVAL, M., Sueño normal. Centro de Ergonomía del trabajo humano en altitud (CETHA-ACHS), Capitulo 13, p.p. 239-272. [Citado en noviembre de 2006]: Disponible en Internet, <http://www.cetha.cl/pdf/16.pdf>.
149. SENATORE, F.; and RIGANO, D., Essential oil of two *Lippia* spp. (Verbenaceae) growing wild in Guatemala, *Flavour. Fragr. J.*, **2001**, 16, p.p.169-171.
150. SHARKEY, T. and LORETO, F. Water stress, temperature and light effects on the capacity for isoprene emission and photosynthesis of kudzu leaves. *Oecologia*, **1993**, 95, p.p. 328-333. en: SABILLÓN R., Danelia. Determinación de los factores de emisión de monoterpenos en tres especies típicas de la vegetación terrestre mediterránea: *Pinus pinea*, *Pinus halepensis* y *Quercus ilex*. Universidad Politécnica de Cataluña. Barcelona, Tesis Doctoral. **2001**.
151. SHING, T.K.M.; LO, H.Y.; and MAKT T.C.W. Diels-Alder Reaction of R-(-)-Carvone with Isoprene. *Tetrahedron Lett.*, **1999**, 55, p.p. 4643-4648.
152. SIANI, A.C.; TAPPIN, M.R.R.; RAMOS, M.F.S.; MAZZEL, J.L.; RAMOS, M.C.; DE AQUINO NETO, F.R.; and FRIGHETTO, N., Linalool from *Lippia alba*: Study of reproducibility of the essential oil profile and the enantiomeric purity. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, p.p. 3518-3521.
153. SKOOG, D.; LEARY J., Análisis instrumental. España: McGraw - Hill, **1994**, p.p 491-527.

154. SLOTNICK, B. and BISULCO, S. Detection and discrimination of carvone enantiomers in rats with olfactory bulb lesions. *Neurosci.*, **2003**, 121, p.p. 451–457.
155. SOMERS, D.E., The physiology and molecular bases of the plant circadian clock. *Plant Physiol.*, **1999**, 121, p.p. 9–19.
156. SRIKRISHNA, A.; PARDESHI, V.H.; and SATYANARAYANA, G. A rapid enantiospecific synthesis of the (6,6,5)-tricyclic ring system of the elisabethane diterpenes. *Tetrahedron Lett.*, **2007**, 48 (23), p.p. 4087-4090.
157. SRIKRISHNA, A.; RAVI, G.; and SATYANARAYANA, G. The first enantiospecific total synthesis of (+)-seychellene. *Tetrahedron Lett.*, **2007**, 48, p.p. 73–76.
158. STASHENKO, E.E; COMBARIZA, Y.; y PUERTAS, M.A., Aceites esenciales: técnicas de extracción y análisis. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, **1998**.
159. STASHENKO, E.E.; JARAMILLO, B.E.; y MARTÍNEZ, J.R., Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, **2003**, 27, p.p. 579-597.
160. STAUDT, M.; BERTIN, N.; HANSEN, U.; SEUFERT, G.; FOSTER, P.; FRENZEL, B.; FUGIT, J-L.; and TORRES, L. Seasonal and diurnal patterns of monoterpene emissions from *Pinus pinea* (L). *Atmos. Environ.*, **1997**, 31, p.p. 145-156. en: SABILLÓN R., Danelia. Determinación de los factores de emisión de monoterpenos en tres especies típicas de la

vegetación terrestre mediterránea: *Pinus pinea*, *Pinus halepensis* y *Quercus ilex*. Universidad Politécnica de Cataluña. Barcelona, Tesis Doctoral. **2001**.

161. STAUDT, M. and SEUFERT, G. Light-dependent emission of monoterpenes from Holm Oak (*Quercus ilex* L.). *Naturwissenschaften*, **1995**, 82, p.p. 89-92. en: SABILLÓN R., Danelia. Determinación de los factores de emisión de monoterpenos en tres especies típicas de la vegetación terrestre mediterránea: *Pinus pinea*, *Pinus halepensis* y *Quercus ilex*. Universidad Politécnica de Cataluña, **2001**, Barcelona. Tesis Doctoral.
162. SVOBODA, K.P.; and DEANS, S.G., Biological activities of essential oils from selected aromatic plants, *Acta Hort.*, **1995**, p.p. 203-209.
163. TAIZ, L.; y ZEIGER, E., *Plant Physiology*. 3ed., Sunderland: Sinauer Associates, Inc., Publishers, **2002**, p.p. 283-290.
164. TEIXEIRA, M.C., FIGUEIRA, G.M., SARTORATTO, A., REHDER, V.L., and DELARMELINA, C., Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.*, **2005**, 97, p.p. 305-311.
165. Terpenos. Revista del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. [Citada en febrero de 2007]: Disponible en Internet, [http://www.portalfarma.com/pfarma/taxonomia/general/gp000011.nsf/voDocumentos/4DE2A2030B26B6F0C1256A790048D68C/\\$File/web\\_terpenos.htm](http://www.portalfarma.com/pfarma/taxonomia/general/gp000011.nsf/voDocumentos/4DE2A2030B26B6F0C1256A790048D68C/$File/web_terpenos.htm).
166. TINGEY, D.T.; MANNING, M.; GROTHAUS, L.C.; and BURNS, W.F. Influence of light and temperature on monoterpene emissions from slash pine. *Plant Physiol.*, **1980**, 65, p.p. 797-807.

167. TINGEY, D.T.; TURNER, D.P.; and WEBER, J.A. Factors controlling the emissions of monoterpenes and other volatile organic compounds. *Trace Gas Emissions by Plants*. **1992**. en: SABILLÓN R., Danelia. Determinación de los factores de emisión de monoterpenos en tres especies típicas de la vegetación terrestre mediterránea: *Pinus pinea*, *Pinus halepensis* y *Quercus ilex*. Universidad Politécnica de Cataluña. Barcelona, Tesis Doctoral. **2001**.
168. TISSERAND, R.; BALACS, T.; and CLOWELL, J., *Essential oil safety: A guide for health care professionals*, Churchill Livingstone, London, **1999**, p. 186.
169. TREVISAN, M.T.S.; y MECADO, F.V.V., Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer, *Quim. Nova*, **2003**, 26, p.p. 301.
170. TROIANI. R.M., Metabolitos Secundarios. Alcaloides. Universidad Nacional de La Pampa. Facultad de Agronomía.
171. UNITED NATIONS CONFERENCE ON TRADE AND DEVELOPMENT. Market Brief in the European Union for selected natural ingredients derived from native species. *Lippia alba*, Prontoalivio, *Erva cidreira*, juanilama, Melissa. [Citada en julio de 2007]: Disponible en Internet, <http://www.biotrade.org/docs/biotradebrief-lippiaalba.pdf>.
172. VALE, D.T.; FURTADO, C.E.; SANTOS, J.B.; and VIANA, G.S.B., Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. *Phytomed.*, **2002**, 9, p.p. 709-714

173. VALE, T.G.; MATOS, F.J.A.; DE LIMA, T.C.M; and VIANA, G.S.B., Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown chemotypes. *J. Ethnopharm.*, **1999**, 67, p.p. 127-133.
174. VARGAS, P.; ORTIZ, I.; y ROJAS, V. Vigilancia tecnológica aplicada a Nanociencia y Nanotecnología en países de Latinoamérica. *J. Technol. Manag. Innov.*, **2006**, 1(4), p.p. 84-94.
175. VIANA, G.S.B., VALE, T.G., RAO, V.S.N., and MATOS, F.J.A. Analgesic and antiinflammatory effects of two chemotypes of *Lippia alba*: A comparative study. *Pharm. Biol.*, **1998**, 36(5), p.p. 347-351.
176. WAGNER, K. H.; and ELMADFA, I., Biological relevance of terpenoids – overview focusing on mono-, di- and tetraterpenes. *Annal. Nutr. Metabol.*, **2003**, 47, p.p. 95–106.
177. WILSON, R.A.; BUTLER, J.F.; WITHYCOMBE, D.; MOOKHERJEE, B.D.; KATZ, I.; and SCHRANKEL, K.R. US Patent, 4.970.068, **1990**.
178. WILSON, R.A.; BUTLER, J.F.; WITHYCOMBE, D.; MOOKHERJEE, B.D.; KATZ, I.; and SCHRANKEL, K.R. US Patent, 4.988.508, **1991**.
179. WITKEWITIZ, D.L.; RICHEY, L.C.; and THOMAS, S.D. US Patent, 5.158.790, **1992**.
180. WOJTASIAK, Z. Chirality and the nature of food authenticity of aroma. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* **2006**, 5(1), p.p. 21-36.

181. YOKOUCHI, Y. and AMBE, Y. Factors affecting the emission of monoterpenes from red pine (*Pinus desiniflora*) – Long-term effects of light, temperature and humidity. *Plant Physiol.*, **1984**, 75, p.p. 1009-1012.
182. ZÉTOLO, M.; DE LIMA, T.C.M.; SONAGLIO, D.; GONZÁLEZ-ORTEGA, G.; LIMBERGER, R.P.; PETROVICK, P.R.; and BASSANI, V.L., CNS activities of liquid and spray-dried extracts from *Lippia alba*-Verbenaceae (Brazilian *False melissa*). *J. Ethnopharm.*, **2002**, 82, p.p. 207-215.
183. ZOBAYED, S.M.A.; AFREEN, F.; AND KOZAI, T. Temperature stress can alter the photosynthetic efficiency and secondary metabolite concentrations in St. John's Wort. *Plant Phys. Biochem.*, **2005**, 43, p.p. 977–984.
184. ZOGHI, M.; ANDRADE, E.; SANTOS, A.S.; SILVA, H.L.; and MAIA, J.G., Essential oils of *Lippia alba* (Mill). N.E. Brown wild in the Brazilian Amazon, *Flavour. Fragr. J.*, **1998**, 13, p.p. 47-48.

## ANEXOS

**ANEXO 1.** Congreso Colombiano de Química, organizado por ASQUIMCO, Armenia (Quindío) del 17 al 19 de mayo de 2006.

### **ESTUDIO DEL CAMBIO DE LA COMPOSICIÓN DEL EXTRACTO DE *Lippia alba* (VERBENACEA) A DIFERENTES HORAS DE COLECTA**

**S. Duarte, C. Cárdenas, M. Leyva, E. Stashenko\* & J. Martínez**

Laboratorio de Cromatografía, CIBIMOL, Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM, Universidad Industrial de Santander, Carrera 27 calle 9. Bucaramanga, Colombia. Tel: 57(7)6456737, Fax: 57(7)6358210.

e-mail: [elena@tucan.uis.edu.co](mailto:elena@tucan.uis.edu.co)

#### **Resumen**

En este trabajo se estudió la variación cuantitativa de los metabolitos secundarios volátiles del extracto de *Lippia alba*, cultivada en la región Nororiental de Colombia. La fracción volátil a diferentes horas de colecta, se obtuvo por destilación-extracción simultánea con solvente (DES) y fue analizada por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Se supervisó la variación en las cantidades relativas de los compuestos mayoritarios carvona, limoneno, biciclosesquifelandreno, piperitenona,  $\beta$ -bourboneno, piperitona, mirceno, *trans*- $\beta$ -ocimeno y borneol. Los resultados obtenidos indican que la composición del extracto de *Lippia alba* es dependiente de la hora de recolección del material vegetal.

**Palabras claves:** *Lippia alba*, Aceite esencial, DES, GC-MS, circadiano.

**ANEXO 2.** *International Congress on Analytical Sciences (ICAS-2006)*, organizado por *Russian Academy of Sciences*, Moscú (Rusia) del 25 al 30 de junio de 2006; *International Congress on Medicinal and Aromatic Plants*, que se realizó en Marruecos del 22 al 24 de marzo de 2007.

**HRGC-MS STUDY OF THE CIRCADIAN VARIATION OF ALDEHYDES AND OTHER SECONDARY METABOLITES FROM DIFFERENT PARTS OF *Lippia alba* (VERBENACEAE)**

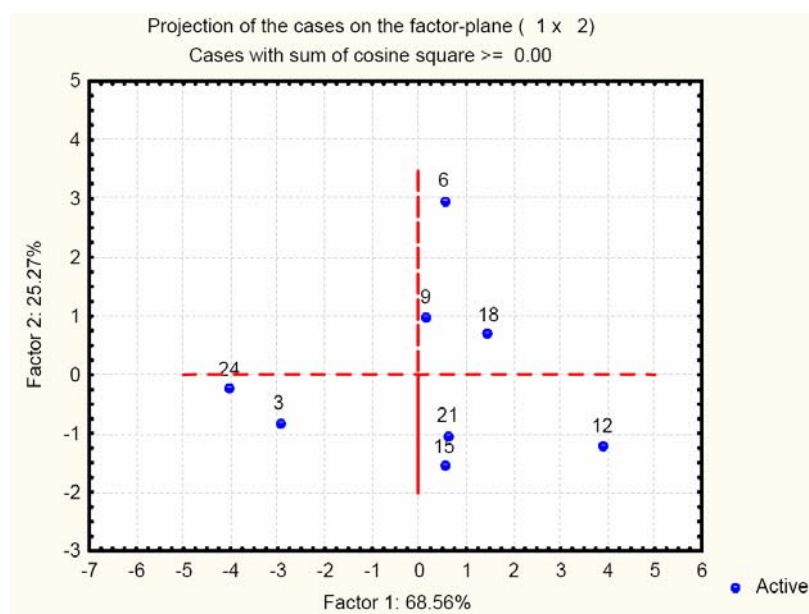
*Chromatography Laboratory, Research Centre for Biomolecules, CIBIMOL, Centre of Excellence CENIVAM, Industrial University of Santander. Bucaramanga, Colombia.*

e-mail: [elena@tucan.uis.edu.co](mailto:elena@tucan.uis.edu.co)

*Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, also known as *Lippia geniculata* HBK or *Lantana alba* (Mill.), is a shrub about 0.8 m tall that belongs to the Verbenaceae family. *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown has been used in folk medicine against intestinal and gastric illnesses [1]. Large variations have been observed in the composition of *Lippia alba* essential oils, depending on the part of the plant employed in this distillation and the plant's state of development. In this work, the technique of simultaneous distillation-solvent extraction was used to obtain extracts from leaves collected every 3 h from an university experimental garden. The extracts were obtained in dichloromethane and their composition was determined by means of high resolution gas chromatography coupled to mass spectrometry (Agilent Technologies, 6890-5973N EI, 70 eV). Compound identification was based on Kovats indices and the mass spectra or the comparison with mass spectral databases (Wiley 138, NBS 75k, NIST 98, QakLib 1607). Aldehydes were sampled in vivo by means of solid-phase microextraction (SPME) with their simultaneous on-fiber derivatization to pentafluorophenylhydrazones, which were quantified by

means of GC-ECD after their thermal desorption from the SPME fiber in the gas chromatograph injection port [2].

The main extract constituents, in decreasing order of abundance, were carvone, limonene, bicyclosesquiphellandrene, piperitenone,  $\beta$ -bourbonene, piperitone, myrcene, trans- $\beta$ -ocimene, and borneol. The figure corresponds to the representation of the extracts on the space formed by the first 2 axes that resulted from principal component analysis. The samples collected at midnight and noon were the most different. During the 24 h period, the aldehydes found in fresh leaves (mmol/g) changed by up to three-fold: ethanal: 5.4-3.5; pentanal; 2.0-0.5; hexanal: 3.9-1.9; octanal: 2.1-0.7; nonanal: 3.1-0.9.



#### References:

1. Pino, J.A, Ortega, I., Ariel G, Rosado, p.; Aristides *et al.* Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. Rev. Cubana Farm, 1996.
2. Stashenko, E.E., Puertas, M.A., Martínez, J.R. Solid-phase microextraction with on-fiber derivatization applied to the analysis of volatile carbonyl compounds. *J. Chromatogr. A.*, 2000 886(1-2), 175-181.

**ANEXO 3.** IX Congreso Colombiano de Fitoquímica, Pereira del 8 al 11 de mayo de 2007.

**ESTUDIO DE LA VARIACIÓN CIRCADIANA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES OBTENIDOS POR DESTILACIÓN – EXTRACCIÓN CON SOLVENTE SIMULTÁNEA, DE HOJAS DE *Lippia alba* (Fam. Verbenaceae)**

**S. Duarte, C. Cárdenas, M. Leyva, E. Stashenko\* & J. Martínez**

Laboratorio de Cromatografía, CIBIMOL, Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM, Universidad Industrial de Santander, Carrera 27 calle 9. Bucaramanga, Colombia. Tel: 57(7)6456737, Fax: 57(7)6358210.

e-mail: [elena@tucan.uis.edu.co](mailto:elena@tucan.uis.edu.co)

**RESUMEN**

Se estudió la variación circadiana de los metabolitos secundarios volátiles del extracto de hojas de *Lippia alba*, cultivada en una parcela experimental del complejo Piloto de CENIVAM, UIS, Bucaramanga. El material vegetal se recolectó a diferentes horas, su extracto se obtuvo por destilación-extracción con solvente simultánea (SDE) y se analizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Los resultados mostraron que la composición del extracto de *Lippia alba* varía con respecto a la hora de colecta del material vegetal, presentando mayor concentración de la carvona en horas de la noche.

**PALABRAS CLAVES:** *Lippia alba*, Aceite esencial, SDE, GC-MS, ciclo circadiano.