

**ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS EXTRACTOS Y ACEITES  
ESENCIALES DE *Hyptis* sp. Y *Lippia alba* OBTENIDOS POR DIFERENTES  
TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN**

**MARIO ALBERTO LLINÁS VILORIA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA  
2011**

**ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS EXTRACTOS Y ACEITES  
ESENCIALES DE *Hyptis* sp. Y *Lippia alba* OBTENIDOS POR DIFERENTES  
TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN**

**MARIO ALBERTO LLINÁS VILORIA**

Tesis de grado presentada como requisito parcial para optar al título de Químico

**Directores:**

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

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

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA  
2011**

## DEDICATORIA

*A mi Dios, que siempre he sentido sus fuerzas y nunca he perdido ni perderé la FE en Él.*

*A mis padres, Lucy Viloría y Zahúl Llinás, por todo el amor, el apoyo y la confianza que depositaron en mí, sin nunca perder la esperanza de que podría llegar a ser un buen profesional.*

*A mis hermanos, Diego Armando y Jean Pierre, que son parte de mi vida y que siempre los tengo en mi mente. A mi sobrina hermosa, Natalia Sophia, una personita que ha alegrado nuestros días; a Diana Casanova, que ha sido una cuñada excelente y me ha brindado toda su ayuda; y a mi amorcito Angélica Silva, que siempre ha creído en mí, manteniendo la ilusión de que puedo llegar muy lejos.*

*Todo esto es por ustedes.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Elena E. Stashenko y al Dr. Jairo René Martínez, por la oportunidad brindada de poder realizar mi proyecto de grado a su lado y por la paciencia otorgada.

Al CENIVAM, al Laboratorio de Cromatografía, a la Escuela de Química y a la Universidad Industrial de Santander, por el apoyo científico y económico brindado.

A mis calificadores, Vladimir Kouznetsov y Gerardo Bautista, por su colaboración en el momento en que lo necesité y por la forma en que se comportaron.

A mis amig@s, Laura Castrillón y Marcela Domínguez, que siempre estuvieron a mi lado en todo momento. A Carlos Ruíz, que me enseñó muchas cosas a lo largo de mi estancia en el laboratorio. A Edwin Ramírez, Julián, Nathaly Gómez, Mónica, Néstor, Carlos Rueda, Ginna, Bathuel, Yaride, Sebastián, Vanessa, Eva, Martín, Paola, Gustavo y todos los demás amigos y compañeros, por hacer la estadía en el Laboratorio muy agradable al compartir con ellos en todo momento. A mis amigos de la universidad y de la casa, Cristian Leguízamo, Sergio Garrido, Johan Gallo, Rafael Niño y Andrés Martínez, Guillo, MaFer, Jesús y Sebas. A mis amigos de toda la vida y de infancia, Tatto, José Antonio, Edwin, Oswaldo, Juanjo, Iván, Lucho, Fabio, María C, Ilse, Mary Julieth.

A toda mi familia, que siempre me apoyó y nunca me dejó decaer, ni siquiera en los momentos más complicados, así como a Angélica Silva, por estar siempre a mi lado, creer en mí y apoyarme en todo momento.

Gracias a todos.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>24</b>
<b>1. ESTADO DEL ARTE</b>	<b>27</b>
1.1 <i>Hyptis</i> sp.	27
1.2 <i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E. Brown	31
1.3 METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS	37
1.3.1 Terpenos	38
1.3.2 Compuestos nitrogenados o alcaloides	39
1.3.3 Compuestos fenólicos	39
1.3.4 Glicósidos	39
1.4 ACEITES ESENCIALES	40
1.4.1 Comercio mundial de aceites esenciales	42
1.5 SECADO DEL MATERIAL VEGETAL	45
1.5.1 Métodos de secado	46
1.6 EXTRACTO	48
1.7 EXTRACCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS	48
1.7.1 Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas	50
1.7.2 Extracción con fluidos supercríticos	51
1.7.3 Destilación-extracción simultánea con solvente	53
1.8 CROMATOGRAFÍA DE GASES	55
1.9 CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS	57
<b>2. CIENCIOMETRÍA</b>	<b>59</b>

<b>3.</b>	<b>DESARROLLO EXPERIMENTAL</b>	<b>71</b>
3.1	Material vegetal	71
3.1.1	Caracterización taxonómica de las plantas	71
3.2	Secado del material vegetal	72
3.3	Obtención de metabolitos secundarios por MWHD	72
3.4	Obtención de metabolitos secundarios por SFE	74
3.5	Obtención de metabolitos secundarios por SDE	75
3.6	Análisis cromatográfico	77
3.7	Caracterización	78
3.8	Cuantificación	78
3.9	Identificación	78
<b>4.</b>	<b>ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>	<b>80</b>
4.1	Secado del material vegetal	80
4.2	Estudio de la reproducibilidad en los tiempos de retención, áreas de los picos cromatográficos e índices de retención experimentales.	82
4.3	Rendimiento del aceite esencial de <i>L. alba</i> .	87
4.4	Caracterización general de los aceites esenciales y extractos.	89
4.4.1	Identificación de los metabolitos secundarios volátiles de <i>L. alba</i> , aislados por MWHD.	89
4.4.2	Identificación de los metabolitos secundarios volátiles de <i>L. alba</i> , aislados por SFE.	91
4.4.3	Identificación de los metabolitos secundarios volátiles de <i>L. alba</i> , aislados por SDE.	93
4.4.4	Identificación de los metabolitos secundarios volátiles de <i>H. suaveolens</i> , aislados por SFE.	100

4.4.5	Identificación de los metabolitos secundarios volátiles de <i>H. suaveolens</i> , aislados por SDE.	102
4.4.6	Identificación de los metabolitos secundarios volátiles de <i>H. mutabilis</i> , aislados por SFE.	109
4.4.7	Identificación de los metabolitos secundarios volátiles de <i>H. mutabilis</i> , aislados por SDE.	111
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>118</b>
<b>6.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>120</b>
<b>7.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>121</b>
	<b>APÉNDICES</b>	<b>133</b>

## LISTA DE FIGURAS

		Pág.
<b>Figura 1</b>	<i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Poit.	27
<b>Figura 2</b>	<i>Hyptis mutabilis</i> (Rich.) Briq.	30
<b>Figura 3</b>	<i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E. Brown.	32
<b>Figura 4</b>	Esquema del montaje para obtención por MWHD de los AE de <i>H. suaveolens</i> , <i>H. mutabilis</i> y <i>L. alba</i>	50
<b>Figura 5</b>	Esquema del montaje para obtención por SFE de los extractos de <i>H. suaveolens</i> , <i>H. mutabilis</i> y <i>Lippia alba</i> .	52
<b>Figura 6</b>	Esquema del montaje para obtención por SDE del extracto de <i>H. suaveolens</i> , <i>H. mutabilis</i> y <i>L. alba</i>	54
<b>Figura 7</b>	Principales partes de un cromatógrafo de gases.	55
<b>Figura 8</b>	Principales partes de un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas.	58
<b>Figura 9</b>	Número de publicaciones, por año, sobre la especie <i>L. alba</i> . Periodo de observación: 1990-2010. Base de datos: <i>Science Direct</i> , <i>Elseiver (Scopus)</i> . Fecha de consulta: marzo 25 de 2011. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABSTR-KEY ( <i>Lippia alba</i> ).	60
<b>Figura 10</b>	Relación porcentual de publicaciones, por temas, sobre el género <i>L. alba</i> . Periodo de observación: 1990-2010. Base de datos: <i>Science Direct</i> , <i>Elseiver (Scopus)</i> . Fecha de consulta: marzo 25 de 2011. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABSTR-KEY ( <i>Lippia alba</i> ).	61

- Figura 11** Relación porcentual, según la modalidad, de publicación sobre la especie *L. alba*. Periodo de observación: 1990-2010. Base de datos: *Science Direct, Elseiver (Scopus)*. Fecha de consulta: marzo 25 de 2011. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABSTR-KEY (*Lippia alba*). 62
- Figura 12** Número de publicaciones, por países, sobre la especie *L. alba*. Periodo de observación: 1990-2010. Base de datos: *Science Direct, Elseiver (Scopus)*. Fecha de consulta: octubre 12 de 2011. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABSTR-KEY (*Lippia alba*). 63
- Figura 13** Número de publicaciones, por año, sobre la especie *H. suaveolens*. Periodo de observación: 1990-2010. Base de datos: *Science Direct, Elseiver (Scopus)*. Fecha de consulta: marzo 25 de 2011. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABSTR-KEY (*Hyptis suaveolens*). 64
- Figura 14** Relación porcentual de publicaciones, por áreas de investigación, sobre la especie *H. suaveolens*. Periodo de observación: 1990-2010. Base de datos: *Science Direct, Elseiver (Scopus)*. Fecha de consulta: marzo 25 de 2011. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABSTR-KEY (*Hyptis suaveolens*). 65
- Figura 15** Relación porcentual, según la modalidad, sobre la especie *H. suaveolens*. Periodo de observación: 1990-2010. Base de datos: *Science Direct, Elseiver (Scopus)*. Fecha de consulta: marzo 25 de 2011. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABSTR-KEY (*Hyptis suaveolens*). 66
- Figura 16** Número de publicaciones, por países, sobre la especie *H. suaveolens*. Periodo de observación: 1990-2010. Base de datos: *Science Direct, Elseiver (Scopus)*. Fecha de consulta: octubre 12 de 2011. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABSTR-KEY (*Hyptis suaveolens*). 67

<b>Figura 17</b>	Número de publicaciones, por año, sobre la especie <i>H. mutabilis</i> . Periodo de observación: 2000-2010. Base de datos: <i>Science Direct, Elseiver (Scopus)</i> . Fecha de consulta: marzo 25 de 2011. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABSTR-KEY ( <i>Hyptis mutabilis</i> ).	68
<b>Figura 18</b>	Relación porcentual de publicaciones, por temas, sobre la especie <i>H. mutabilis</i> . Periodo de observación: 2000-2010. Base de datos: <i>Science Direct, Elseiver (Scopus)</i> . Fecha de consulta: marzo 25 de 2011. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABSTR-KEY ( <i>Hyptis mutabilis</i> ).	69
<b>Figura 19</b>	Número de publicaciones, por países, sobre la especie <i>H. mutabilis</i> . Periodo de observación: 2000-2010. Base de datos: <i>Science Direct, Elseiver (Scopus)</i> . Fecha de consulta: octubre 12 de 2011. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABSTR-KEY ( <i>Hyptis mutabilis</i> ).	70
<b>Figura 20</b>	Porcentaje de peso perdido en el proceso de secado a temperatura ambiente.	72
<b>Figura 21</b>	Montaje de hidroddestilación asistida por la radiación de microondas.	73
<b>Figura 22</b>	Equipo Soxhlet de alta presión (J & W Scientific) para la SFE con CO <sub>2</sub> .	75
<b>Figura 23</b>	Montaje de destilación-extracción con solvente simultánea.	76
<b>Figura 24</b>	Ubicación del área de estudio de las especies <i>L. alba</i> , <i>H. mutabilis</i> e <i>H. suaveolens</i> , cultivadas en el Complejo Agroindustrial Piloto de CENIVAM.	80
<b>Figura 25</b>	Pérdida de peso en gramos de material vegetal mediante secado a temperatura ambiente y a la sombra durante 15 días de las plantas <i>H. suaveolens</i> , <i>H. mutabilis</i> y <i>L. alba</i> cultivadas en la ciudad de Bucaramanga, Departamento de Santander, Complejo Agroindustrial Piloto de CENIVAM.	81

<b>Figura 26</b>	Rendimientos de los aceites esenciales obtenidos por MWHD de <i>L. alba</i> de plantas cultivadas en el Complejo Agroindustrial Piloto de CENIVAM.	88
<b>Figura 27</b>	Perfil cromatográfico típico del AE de <i>L. alba</i> , obtenido por MWHD. Columna DB-5 (60 m), <i>split</i> 1:30.	90
<b>Figura 28</b>	Perfil cromatográfico típico del extracto de <i>L. alba</i> , obtenido por SFE. Columna DB-5 (60 m), <i>split</i> 1:30.	92
<b>Figura 29</b>	Perfil cromatográfico típico del extracto de <i>L. alba</i> , obtenido por SDE. Columna DB-5 (60 m), <i>split</i> 1:30.	94
<b>Figura 30</b>	Composición porcentual de los principales compuestos detectados en el aceite y los extractos obtenidos de <i>L. alba</i> por tres técnicas de extracción.	96
<b>Figura 31</b>	Relación $A_x/A_{istd}$ de los principales compuestos comunes en los extractos obtenidos de la especie <i>L. alba</i> , utilizando las tres diferentes técnicas de extracción (Istd= <i>n</i> -tetradecano).	97
<b>Figura 32</b>	Estructuras químicas de los principales compuestos presentes en los aceites esenciales y extractos obtenidos por MWHD, SDE y SFE de <i>L. alba</i> , respectivamente.	98
<b>Figura 33</b>	Perfil cromatográfico típico del extracto de <i>H. suaveolens</i> , obtenido por SFE. Columna DB-5 (60 m), <i>split</i> 1:30.	100
<b>Figura 34</b>	Perfil cromatográfico típico del extracto de <i>H. suaveolens</i> , obtenido por SDE. Columna DB-5 (60 m), <i>split</i> 1:30.	102
<b>Figura 35</b>	Composición porcentual de los principales compuestos comunes detectados en los extractos obtenidos por SDE y SFE de <i>H. suaveolens</i> .	104
<b>Figura 36</b>	Relación de $A_x/A_{istd}$ (Istd= <i>n</i> -tetradecano) de los principales compuestos comunes detectados en los extractos obtenidos por SDE y SFE de la especie <i>H. suaveolens</i> .	105

<b>Figura 37</b>	Estructuras químicas de los principales compuestos detectados en los extractos obtenidos de <i>H. suaveolens</i> .	106
<b>Figura 38</b>	Familias de compuestos químicos presentes en los extractos de <i>H. suaveolens</i> obtenidos por SDE y SFE.	107
<b>Figura 39</b>	Perfil cromatográfico típico del extracto de <i>H. mutabilis</i> , obtenido por SFE. Columna DB-5 (60 m), <i>split</i> 1:30.	109
<b>Figura 40</b>	Perfil cromatográfico típico del extracto de <i>H. mutabilis</i> , obtenido por SDE. Columna DB-5 (60 m), <i>split</i> 1:30.	111
<b>Figura 41</b>	Composición porcentual de los principales compuestos detectados en los extractos obtenidos por SFE y SDE de <i>H. mutabilis</i> .	113
<b>Figura 42</b>	Relación de $A_x/A_{istd}$ ( $I_{std}=n$ -tetradecano) de los principales compuestos comunes detectados en los extractos obtenidos por SDE y SFE de la especie <i>H. mutabilis</i> .	114
<b>Figura 43</b>	Estructuras químicas de los principales compuestos detectados en los extractos obtenidos de <i>H. mutabilis</i> .	115
<b>Figura 44</b>	Familias de compuestos químicos presentes en los extractos obtenidos por SFE y SDE de <i>H. mutabilis</i> .	116

## LISTA DE TABLAS

		Pág.
<b>Tabla 1</b>	Taxonomía de la <i>Hyptis</i> sp.	28
<b>Tabla 2</b>	Taxonomía de la <i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E. Brown	33
<b>Tabla 3</b>	Algunos quimiotipos identificados de <i>L. alba</i> (Mill.) N.E. Brown de acuerdo con su ubicación geográfica.	34
<b>Tabla 4</b>	Aceites esenciales empleados por los tres principales sectores industriales.	43
<b>Tabla 5</b>	Principales figurantes en la economía mundial de los AE.	45
<b>Tabla 6</b>	Reproducibilidad de los índices de retención, tiempos de retención, áreas cromatográficas y cantidades relativas (%) de algunos componentes del extracto de <i>L. alba</i> obtenido por SDE (n=3).	82
<b>Tabla 7</b>	Reproducibilidad de los índices de retención, tiempos de retención, áreas cromatográficas y cantidades relativas (%) de algunos componentes del extracto de <i>L. alba</i> obtenido por SFE (n=3).	83
<b>Tabla 8</b>	Reproducibilidad de los índices de retención, tiempos de retención, áreas cromatográficas y cantidades relativas (%) de algunos componentes del extracto de <i>L. alba</i> obtenido por MWHD (n=3).	83
<b>Tabla 9</b>	Reproducibilidad de los índices de retención, tiempos de retención, áreas cromatográficas y cantidades relativas (%) de algunos componentes del extracto de <i>H. suaveolens</i> obtenido por SDE (n=3).	84

<b>Tabla 10</b>	Reproducibilidad de los índices de retención, tiempos de retención, áreas cromatográficas y cantidades relativas (%) de algunos componentes del extracto de <i>H. suaveolens</i> obtenido por SFE (n=3).	85
<b>Tabla 11</b>	Reproducibilidad de los índices de retención, tiempos de retención, áreas cromatográficas y cantidades relativas (%) de algunos componentes del extracto de <i>H. mutabilis</i> obtenido por SFE (n=3).	85
<b>Tabla 12</b>	Reproducibilidad de los índices de retención, tiempos de retención, áreas cromatográficas y cantidades relativas (%) de algunos componentes del extracto de <i>H. mutabilis</i> obtenido por SDE (n=3).	86
<b>Tabla 13</b>	Rendimientos de los aceites esenciales de <i>L. alba</i> obtenidos de plantas colectadas en el Complejo Agroindustrial piloto de CENIVAM.	88
<b>Tabla 14</b>	Composición química del AE de <i>L. alba</i> , obtenido por MWHD.	90
<b>Tabla 15</b>	Composición química del extracto de <i>L. alba</i> , obtenido por SFE.	92
<b>Tabla 16</b>	Composición química del extracto de <i>L. alba</i> , obtenido por SDE.	94
<b>Tabla 17</b>	Valores de áreas cromatográficas relativas determinadas con respecto al patrón interno ( <i>n</i> -tetradecano).	97
<b>Tabla 18</b>	Composición química del extracto de <i>H. suaveolens</i> , obtenido por SFE.	101
<b>Tabla 19</b>	Composición química del extracto de <i>H. suaveolens</i> , obtenido por SDE.	103
<b>Tabla 20</b>	Valores de cada una de las áreas cromatográficas determinadas con respecto al patrón interno.	106
<b>Tabla 21</b>	Composición química del extracto de <i>H. mutabilis</i> , obtenido por SFE.	110

<b>Tabla 22</b>	Composición química del extracto de <i>H. mutabilis</i> , obtenido por SDE.	112
<b>Tabla 23</b>	Valores para cada una de las áreas cromatográficas determinadas con respecto al patrón interno.	114
<b>Tabla 24</b>	Información general de terpenos	134

## LISTA DE APÉNDICES

		Pág.
<b>Apéndice 1</b>	Información general del limoneno.	135
<b>Apéndice 2</b>	Información general del $\beta$ -mirceno.	135
<b>Apéndice 3</b>	Información general del <i>cis</i> - $\beta$ -ocimeno.	135
<b>Apéndice 4</b>	Información general del linalool.	135
<b>Apéndice 5</b>	Información general de la <i>trans</i> -ocimenona.	136
<b>Apéndice 6</b>	Información general de la <i>cis</i> -ocimenona.	136
<b>Apéndice 7</b>	Información general del $\beta$ -elemeno.	136
<b>Apéndice 8</b>	Información general del $\beta$ -farneseno.	136
<b>Apéndice 9</b>	Información general del germacreno D.	137
<b>Apéndice 10</b>	Información general del ipsdienol.	137
<b>Apéndice 11</b>	Información general del aromadendreno.	137
<b>Apéndice 12</b>	Información general del acetato de bornilo.	137
<b>Apéndice 13</b>	Información general del biciclogermacreno.	138
<b>Apéndice 14</b>	Información general del borneol.	138
<b>Apéndice 15</b>	Información general del $\alpha$ -terpineol.	138
<b>Apéndice 16</b>	Información general del $\alpha$ -tujeno.	138
<b>Apéndice 17</b>	Información general del $\alpha$ -terpineno.	139
<b>Apéndice 18</b>	Información general del $\alpha$ -pineno.	139
<b>Apéndice 19</b>	Información general del $\beta$ -pineno.	139
<b>Apéndice 20</b>	Información general del $\alpha$ -fencheno.	139

<b>Apéndice 21</b>	Información general del <i>cis</i> -cariofileno.	140
<b>Apéndice 22</b>	Información general del $\alpha$ -humuleno.	140
<b>Apéndice 23</b>	Información general del palustrol.	140
<b>Apéndice 24</b>	Información general del $\alpha$ -felandreno.	140
<b>Apéndice 25</b>	Información general del óxido de cariofileno.	141
<b>Apéndice 26</b>	Información general de la fenchona.	141
<b>Apéndice 27</b>	Información general del terpinen-4-ol.	141
<b>Apéndice 28</b>	Información general del $\alpha$ -gurjuneno.	141
<b>Apéndice 29</b>	Información general del sabineno.	142
<b>Apéndice 30</b>	Información general del <i>trans</i> - $\beta$ -ocimeno.	142
<b>Apéndice 31</b>	Información general del <i>cis</i> - $\beta$ -ocimeno.	142
<b>Apéndice 32</b>	Información general del $\alpha$ -copaeno.	142
<b>Apéndice 33</b>	Información general del $\alpha$ -guaieno.	143
<b>Apéndice 34</b>	Información general del $\alpha$ -bulneseno.	143
<b>Apéndice 35</b>	Información general del $\gamma$ -cadineno.	143
<b>Apéndice 36</b>	Información general del $\delta$ -cadineno.	143
<b>Apéndice 37</b>	Información general del curzereno.	144

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

<b>AE</b>	Aceite esencial o aceites esenciales.
<b>GC</b>	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases).
<b>GC/MS</b>	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas).
<b>CENIVAM</b>	Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales.
<b>FID</b>	<i>Field Ionization Detector</i> (Detector de ionización en llama).
<b>INVIMA</b>	Instituto Nacional de Vigilancia en Medicamentos y Alimentos.
<b>IR</b>	Índice(s) de retención lineal(es).
<b>MS</b>	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas).
<b>MWHD</b>	<i>Microwave-Assisted Hydro-Distillation</i> (Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas).
<b>MSD</b>	<i>Mass Selective Detector</i> (Detector Selectivo de Masas).
<b>m.s.n.m.</b>	Metros sobre el nivel del mar.
<b>PDMS</b>	Poli(dimetilsiloxano).
<b>PEG</b>	Poli(etilenglicol).
<b>ppm</b>	Partes por millón.
<b>ppb</b>	Partes por billón.
<b>SFE</b>	<i>Supercritical Fluid Extraction</i> (Extracción con fluido supercrítico)

<b>SDE</b>	<i>Simultaneous Distillation- Solvent Extraction</i> (Destilación - extracción con solvente simultánea).
<b>UIS</b>	Universidad Industrial de Santander.
<b>€</b>	Euros.

## RESUMEN

**TÍTULO:** ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS EXTRACTOS Y ACEITES ESENCIALES DE *Hyptis* sp Y *Lippia alba* OBTENIDOS POR DIFERENTES TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN.\*

**AUTOR:** Mario Alberto Llinás Viloría\*\*

**PALABRAS CLAVES:** *Lippia alba*, *Hyptis suaveolens*, *Hyptis mutabilis*, hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWH), destilación-extracción con solvente simultánea (SDE), extracción con fluido supercrítico (SFE).

Las aplicaciones biológicas, etnomédicas e industriales de los aceites esenciales están directamente relacionadas con su composición química, la cual varía según la especie vegetal en estudio y las condiciones de su cultivo.

En el presente estudio se aislaron por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas, extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico y destilación-extracción simultánea con solvente los metabolitos secundarios volátiles de plantas de *Lippia alba*, *Hyptis suaveolens* e *Hyptis mutabilis* cultivadas y recolectadas en la zona de siembra del CENIVAM, ubicado en el campus principal de la Universidad Industrial de Santander (UIS), Bucaramanga.

Los metabolitos secundarios se identificaron por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS), teniendo en cuenta los criterios cromatográficos y espectroscópicos.

Los compuestos mayoritarios en el aceite esencial y el extracto de *L. alba* fueron la mircenona, el mirceno, germacreno D y los isómeros de la ocimenona, manteniéndose una relación en sus cantidades relativas. En los extractos obtenidos de *H. suaveolens*, se detectaron los compuestos comunes fenchona, aromadendreno,  $\alpha$ -humuleno, germacreno D y óxido de cariofileno, sin embargo por SFE se aislaron también diterpenos, que no aparecieron en los extractos obtenidos por SDE. En la *H. mutabilis*, los compuestos mayoritarios fueron el *cis*-cariofileno, biciclogermacreno,  $\gamma$ -elemeno,  $\alpha$ -pineno y germacreno D.

\* Trabajo de grado

\*\* Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Directora, Elena E. Stashenko; Co-director: Jairo René Martínez

## ABSTRACT

**TITLE:** STUDY OF THE CHEMICAL COMPOSITIONS FROM THE EXTRACTS AND ESSENTIAL OILS OF *Hyptis sp.* AND *Lippia alba* OBTAINED BY DIFFERENTS EXTRACTION TECHNIQUES.

**AUTHOR:** Mario Alberto Llinás Viloría\*\*

**KEYWORDS:** *Lippia alba*, *Hyptis suaveolens*, *Hyptis mutabilis*, hydro-distillation assisted by microwave radiation (MWHM), distillation-extraction with simultaneously solvent (SDE), supercritical fluid extraction (SFE).

Biological applications ethnomedicinals and industrials from essential oils are directly related with his chemical composition, which varies depending vegetable species in study and the conditions of cultivation.

In the present study isolated by hydro-distillation assisted by the radiation of microwaves, extraction with CO<sub>2</sub> supercritical and distillation-extraction simultaneous with solvent the secondary volatil metabolites of plants of *Lippia alba*, *Hyptis suaveolens* and *Hyptis mutabilis* cultivated and gathered in the zone sowing of the CENIVAM, located in the principal campus of the universidad industrial de Santander, Bucaramanga.

The secondary metabolites identified by chromatography of gases connected to spectrometry of masses bearing in mind the chromatographic and spectrographic criteria.

The majority compounds in the essential oil and the extract of *L. alba* were the micenone, the  $\beta$ -micerone, germacrene D and the isomers of the ocimenone, being kept a relation in their relative quantities. In the extracts obtained of *H. suaveolens*, fenchone detected the common compounds, aromadendrene,  $\alpha$ -humulene, germacrene D and oxidize of caryophyllene, however by SFE were isolated also diterpenes, that do not appear in the extracts obtained by SDE. In the *H. mutabilis*, the common compounds were the trans- $\beta$ - caryophyllene, bicyclgermacrene and  $\gamma$ -elemene to  $\alpha$ -pinene and germacrene D.

\* Colleague thesis

\*\* Industrial University of Santander, Sciences Faculty, School of Chemistry. Director, Elena E. Stashenko; Co-director, Jairo René Martínez.

## INTRODUCCIÓN

El mercado mundial de los aceites esenciales (AE) en crecimiento constante, genera gran importancia para el ser humano debido a la utilidad y los beneficios que éstos brindan. Históricamente, el hombre ha centrado su atención en los productos naturales, los cuales han sido empleados como fuente de sustancias con diversas actividades, *e.g.*, antimicrobial, antioxidante y farmacéutica, entre otras [10, 18].

Entre los principales inconvenientes para el uso de compuestos naturales en diferentes productos finales se encuentran los bajos rendimientos de los AE, que las plantas poseen y que representa altos costos su extracción.

Dado el interés mundial que se ha despertado por el uso de ingredientes naturales y la necesidad de las diversas empresas de perfumería, cosméticos y productos de aseo de competir con base en la novedad, es deseable encontrar nuevos productos que ofrezcan diversas fragancias elaboradas con características olfativas diferentes. Para ello es evidente que los AE juegan un papel fundamental, no sólo como fuentes de nuevas características olorosas, sino como generadores de nuevas estructuras moleculares que permiten al químico elaborar nuevas rutas sintéticas para obtención de sustancias valiosas con diferentes propiedades.

Por otra parte, se sabe que debido a la variedad de condiciones climatológicas de crecimiento de las plantas, diferentes tipos de suelo, época de cultivo, de cosecha y, en general, todo lo referente al factor agrotecnológico, puede presentarse una gran variabilidad de metabolitos secundarios en las plantas. Mediante el presente

estudio se establecen las bases necesarias para conocer la viabilidad económica que le pueda traer al país el uso de aceite esencial de *L. alba* e *Hyptis* sp con el fin de convertirse, en unos años, en exportador, a nivel mundial, de sus aceites esenciales, donde los principales beneficiados serán los colombianos.

A pesar de que Colombia cuenta con una gran riqueza en cuanto a número de especies vegetales aromáticas, el mercado de los AE en el país, según un estudio realizado por el Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, se caracteriza por el alto volumen de importaciones de mezclas de sabores y fragancias, que son utilizadas por las industrias de consumo masivo, tanto nacionales como multinacionales (tales como las de perfumes, cosméticos, plásticos, textiles, pinturas, productos de aseo y limpieza, y la industria farmacéutica), lo que muestra que existen muy pocas empresas que están produciendo AE en el país [15, 51].

En el presente trabajo, el aislamiento de los metabolitos secundarios de *H. mutabilis*, *H. suaveolens* y *L. alba* se realizó mediante tres técnicas de extracción a escala laboratorio, las cuales fueron: (1) hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD), en el que la extracción del aceite se realiza beneficiándose del calentamiento y posterior ebullición del agua presente en el matraz volumétrico, que posibilita el arrastre de los metabolitos volátiles, que luego se separan por decantación, permitiendo extraer el aceite esencial del material vegetal; (2) la extracción con CO<sub>2</sub> como fluido supercrítico (SFE), que se basa en las propiedades que tiene el dióxido de carbono de atravesar el material vegetal, arrastrando así los metabolitos secundarios presentes, ello permite aislar también los componentes menos volátiles presentes en la muestra; (3) la destilación-extracción con solvente (SDE) es la técnica que permite el estudio de la

composición química del extracto vegetal debido a la solubilidad de sus componentes en un solvente (diclorometano).

La cuantificación e identificación de los metabolitos secundarios se realizó mediante cromatografía de gases con detector de ionización en llama (GC-FID) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) usando las fases estacionarias polar y apolar, respectivamente, y comparando los espectros de masas experimentales reportados en la base de datos ADAMS, NIST y Wiley, al igual que los tiempos de retención e índices de retención (IR) lineales experimentales de las bases de datos o de sustancias patrón.

Conocer la composición química de los metabolitos secundarios presentes en estas tres especies de plantas aromáticas nativas, y sus aplicaciones, puede permitir implementar a escala industrial diversos métodos de extracción con la finalidad de consolidar la participación regional y nacional en los mercados de ingredientes naturales para industria de cosméticos y productos de aseo.

Esto está de acuerdo también con unos de los principales objetivos del Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM), cuya labor está enfocada para desarrollar la industria nacional, empezando desde la selección de las plantas aromáticas más usadas, hasta la incorporación de especies nuevas y obtención de sus AE y productos refinados provenientes de los mismos.

## 1. ESTADO DEL ARTE

### 1.1 *Hyptis* sp.

El género *Hyptis* sp está compuesto de 400 especies aproximadamente, entre ellas se encuentran la *Hyptis mutabilis* y la *Hyptis suaveolens*. Este género pertenece a la familia Lamiaceae, que abarca cerca de 250 géneros y 6970 especies. Estas plantas son arbustos conocidos comúnmente como *bushmints*, su desarrollo es derecho, tienden a crecer en altura y anchura, dando origen a un arbusto redondeado, y se han extendido en las zonas tropicales y las regiones templadas más calientes de las Américas.



*H. suaveolens* es una planta de 2 m de altura, ramificada, los tallos son pilíferos blancos y muy largos. Las hojas son delgadas, ovadas y puntiagudas, se ven arrugadas. Sus flores son de color púrpura o blanco, la forma de la corola es tubular y termina en un labio [25].



**Figura 1.** *H. suaveolens* (L.) Poit. Fotos tomadas por Mario A. Llinás. Lugar: CENIVAM, UIS. Fecha: julio de 2011.

La *H. suaveolens* es originaria de América Austral. Habita en climas cálido, semicálido y templado entre los 50 y los 1600 m.s.n.m. Se le asocia a la vegetación perturbada de sabana, manglar, bosque tropical caducifolio, bosque espinoso, bosque mesófilo de montaña y bosque de encino [25].

El género es identificado taxonómicamente de la siguiente manera:

**Tabla 1.** Taxonomía de la *Hyptis* sp.

Dominio	Eucariota
Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Subfamilia	Nepetoideae
Tribu	Ocimeae
Género	<i>Hyptis</i>

En cuanto a la química de la *H. suaveolens*, de las ramas, se obtiene un aceite esencial en el que se han identificado los monoterpenoides borneol, canfeno, alcanfor, 1,8-cineol, ciclohexenol,  $\alpha$ -cimeno,  $\alpha$ -felandreno, limoneno, linalool, mirceno, *cis*- y *trans*- $\beta$ -ocimeno,  $\alpha$ -pineno, terpinén-4-ol,  $\alpha$ - y  $\gamma$ -terpinenos,  $\alpha$ -terpineol,  $\alpha$ -terpinoleno y tujano; los sesquiterpenoides, aromadendreno, octahidro-dimetil-azuleno,  $\beta$ -bourboneno,  $\alpha$ -cadinol,  $\alpha$ -cariofileno, su alcohol, *trans*-decahidro-trimetil-ciclopropil, azuleno, elemeno, germacreno C,  $\alpha$ -guaiano,  $\alpha$ -humuleno, entre otros [25].

En la raíz, se han detectado los triterpenos  $\alpha$ - y  $\beta$ -amirinas, ácido betulínico, friedelín, ácido 3- $\beta$ -hidroxi-lup-12-en-28-oico, lupeol, su acetato, ácidos oleanólico,  $\alpha$ -pelto-boykinólico, 3- $\beta$ -hidroxi-upenólico y ursólico; junto con los esteroides campesterol, daucosterol y  $\beta$ -sitosterol. Y en las hojas, se han encontrado los monoterpenos 1,8-cineol, felandreno y  $\alpha$ - y  $\beta$ -pinenos; así como los esteroides campesterol y fucosterol [25].

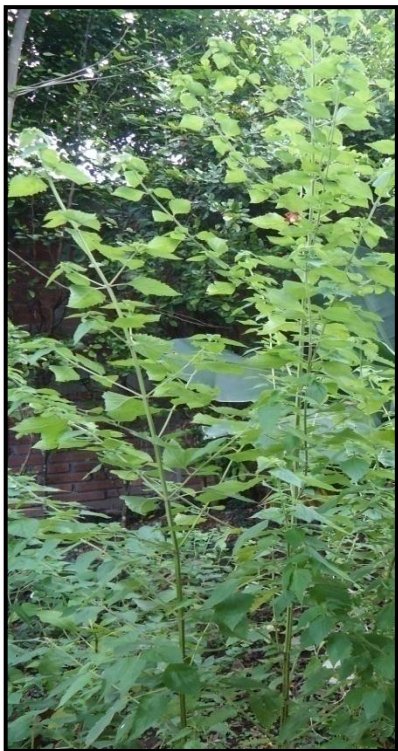
La actividad antibiótica de esta planta se ha demostrado frente a diversas especies de bacterias, levaduras y hongos, especialmente el aceite esencial obtenido de las partes aéreas de la misma. Así, se ha confirmado la actividad antibacteriana frente a más de 13 especies diferentes de bacterias, la levadura *Candida albicans* y el hongo *Aspergillus niger* [5].

Se observó un efecto de antiimplantación en ratas con un extracto etanólico de hojas administrado por vía oral a la dosis de 125 mg/kg, obteniéndose una efectividad de un 100 % en la inhibición de la implantación. Resultados similares se obtuvieron con la misma especie y por vía intraperitoneal; sin embargo, no se observó un efecto en la estimulación uterina al estudiar extractos acuosos y etanólico-acuoso, preparados a partir de las partes aéreas de la planta y evaluados en gatos por vía intravenosa y en útero aislado de ratas [5].

Se observó actividad hipoglicémica con extractos etanólico-acuoso (1:1) obtenidos de las partes aéreas de la planta, que se evaluaron en ratas por vía intragástrica a la dosis de 25 mg/kg de peso. Con este mismo extracto, se reportó una actividad antitumoral en ratones, administrado por vía intraperitoneal a la dosis de 15 mg/kg. Sin embargo, al evaluarse *in vitro* la actividad citotóxica de este extracto en un cultivo de células CA-9KB, a la dosis de 25  $\mu$ /ml, la respuesta fue negativa [5].

Otras actividades para las cuales se han obtenido resultados positivos, son la actividad espasmogénica de extractos acuosos y etanólicos (al 95%) evaluada en

roedores; y el efecto estrogénico de una fracción no saponificable preparada a partir de un extracto de flores y hojas, tratada en ratas por vía intragástrica [5].



*Hyptis mutabilis* (Rich.) Briq: sus plantas son arbustos. Su desarrollo es muy parecido a la *H. suaveolens*; las plantas tienden a crecer en altura o en anchura, dando origen a un arbusto redondeado. *H. mutabilis* normalmente es verde, sin embargo, durante verano algunas veces toma una coloración violeta.



**Figura 2.** *H. mutabilis* (Rich.) Briq. Fotos tomadas por Mario A. Llinás. Lugar: CENIVAM, UIS. Fecha: julio de 2011.

El aceite volátil de *H. mutabilis* (Rich.) Briq. fue investigado por su capacidad para prevenir o reducir la formación de ulceraciones en la mucosa gástrica de ratas macho. Sin embargo, el mecanismo de su acción aún se desconoce [14].

Entre los principales componentes, obtenidos de esta planta por MWHD, se encuentran limoneno + eucaliptol (17.4%), fenchona (17.1%), *trans*- $\beta$ -cariofileno (10.9%), biciclogermacreno (8.7%) y germacreno (6.2%), entre otros [94].

En otras investigaciones según diferentes autores, se encontraron en la planta otros compuestos, entre estos: betulinato de metilo, acetato del ácido oleanólico, ácido ursólico, ácido oleanólico, ácido maslínico, ácido 3a-19 $\alpha$ -dihidroxiurs-12-en-28-óico, 3 $\beta$ -acetóxi-oleanan-13 $\beta$ , 28-olídeo, alcanfor, mircenona,  $\beta$ -humuleno,  $\alpha$ -cubebeno,  $\alpha$ -copaeno,  $\beta$ -burbureno,  $\beta$ -elemeno, calameneno y curzereno [72, 103].

El género *Hyptis* sp, como se había mencionado anteriormente, comprende aproximadamente cerca de 400 especies distribuidas desde el sur de los EE.UU. hasta Argentina; es un género rico en especies de gran importancia económica y etnofarmacológica cuyas habilidades se transmiten de generación en generación hasta nuestros días, demostrando la justificación para seguir la línea investigativa sobre este tipo de plantas y sus extractos.

## **1.2 *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown**

La planta *L. alba* (Mill.) N.E. Brown, conocida comúnmente como “Prontoalivio”, “Curalotodo”, “Salvia morada”, “Falsa melisa”, se cultiva frecuentemente como ornato en los jardines de todo Centro y Sur América, por su fuerte aroma y por sus cualidades medicinales [68, 82, 104].

Es una planta herbácea perenne, erecta, algunas veces arbusto o subarbusto, crece hasta 2 m y presenta un fuerte olor a limón, lima o menta. Tiene hojas pequeñas y opuestas, aromáticas y de color verde. Es originaria del bosque seco tropical y subtropical americano y se encuentra distribuida desde México hasta Suramérica y el Caribe donde crece en alturas de hasta 1800 m.s.n.m [10, 13, 46].

Debido a que la planta es originaria de las regiones secas, soporta fácilmente épocas sin lluvias de hasta 4-6 meses. En las condiciones bajas del Caribe, con

mayor humedad, *L. alba* crece continuamente produciendo mayor cantidad de biomasa. En regiones de mayor altitud y frías, la planta crece con mayor dificultad y genera menor biomasa [10, 47].



*L. alba* pertenece a la familia Verbenáceae, que incluye géneros de hierbas, arbustos, árboles y lianas, todas caracterizadas por sus hojas opuestas (en espiral). Algunas especies de *L. alba* difieren de la *Lantana* en su cáliz dentado en lugar de truncado [19].



**Figura 3.** *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. Fotos tomadas por Mario A. Llinás. Lugar: CENIVAM, UIS. Fecha: julio de 2011.

La *L. alba* puede propagarse con estacas semileñosas con un par de hojas, o con estacas leñosas sin hojas, con tamaños desde 10 a 20 cm de longitud [15], para proporcionar en producción de raíces y retoños. Las plantas *Lippia spp.* se describen taxonómicamente de la siguiente manera:

**Tabla 2.** Taxonomía de la *L. alba* (Mill.) N.E. Brown.

---

Dominio	Eucariota
Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Lamiales
Familia	Verbenaceae
Género	<i>Lippia alba</i>

---

En cuanto a sus características etnomédicas, *L. alba*, se ha usado como antiespasmódico en cólico hepático, en trastornos digestivos, para la tos, es expectorante, sedante, se emplea para congestión de las vías respiratorias y afecciones de la piel [46].

Las diferencias en la composición química para las plantas de *L. alba* se debe a factores de orden genético endógeno [67], así como del origen geográfico y de la época vegetativa de la planta [81, 82]; la síntesis de los metabolitos secundarios está influenciada igualmente por factores externos y técnicos, entre ellos, climáticos, el suelo, la latitud y altitud, incluyendo forma de plantación, tiempo de corte y fertilización [66].

Esta variabilidad en la composición química de la *L. alba* se ve reflejada en diversos estudios sobre esta especie, cultivada en diferentes regiones del mundo, en donde se ha hallado que el tipo y la cantidad de los metabolitos secundarios volátiles dependen sensiblemente de las características geoambientales y fisiológicas mencionadas anteriormente, tal como se observa en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Algunos quimiotipos identificados de *L. alba* (Mill.) N.E. Brown de acuerdo con su ubicación geográfica.

PAÍS	COMPONENTES MAYORITARIOS
Uruguay	Linalool (55%) [63].
Guatemala	Limoneno (43.6%) y piperitona (30.6%) [87]. Mircenona (58%) y <i>cis</i> -ocimenona (13.1%)
India	Linalool (65%) [8, 9]. Mirceno (26.4%), geranial (9.8%) y neral (6.4%) [89].
Colombia	Carvona (40-57%), limoneno (24-37%), biciclosesquifelandreno (2-22%), piperitenona (1-2%), piperitona (0.8-1.2%) y $\beta$ -bourboneno (0.6-1.5%) [93, 95].
	1,8-cineol (34.9%), limoneno (18.4%), carvona (8.6%) y sabineno (8.2%) [105]. Limoneno (32.1%), carvona (31.8%) y mirceno (11.0%) [105].
Brasil	Neral (13.7%), geranial (22.5%), germacreno-D (25.4%) y $\beta$ -cariofileno (10.2%) [104]. Linalool (46.5-90.7%) [88]. Citral (neral + geranial) (37.1%) y mirceno (15%) [69]. Geranial (12.9%), $\beta$ -cariofileno (24.3%), neral (9.6%) y 2-undecanona (9%) [29]. Limoneno (27.5%) y carvona (49.3%) [17].
Cuba	Carvona (40%), piperitenona (8.26%) y piperitona (3.62%) [76]. Limoneno (6.50%), carvona (28.95%), piperitenona (6.35%) y $\beta$ -guaiano (11.53%) [75].

**Tabla 3,** Continuación.

PAÍS	COMPONENTES MAYORITARIOS
Argentina	Mircenona (65%) y borneol (12%) [81].
Estados Unidos	Metil chavicol (56.46%) y 1,8-cineol (12.62%) [101].
Perú	Carvona (50-79%), germacreno D (5.6%) y limoneno (5.1%) [50].  <u>Gourbeyre</u> : neral (33.1%), geranial (20.8%), $\alpha$ -guaieno (6.3%) y <i>cis</i> - $\beta$ -ocimeno (6.3%).
Antillas Francesas	<u>Capesterre</u> : $\alpha$ -guaieno (6.3%), <i>cis</i> - $\beta$ -ocimeno (13.3%), $\beta$ -cariofileno (9.2%), geranial (9.1%) y neral (7.8%) [49]. <u>St. Pierre</u> : limoneno (51.1%) y germacreno D (18.1%) [49]. <u>Cayenne</u> : carvona (67.6%) y limoneno (18.4%) [49].

Según los autores Hennebelle y colaboradores [49], se pueden establecer aproximadamente un total de 7 quimiotipos.

El **quimiotipo I** incluye todos los aceites esenciales que presenten como compuestos mayoritarios en su composición **citral**, *i.e.*, **geranial y neral**, y **linalool**. Existen algunas razones para no separar los aceites esenciales que presentan estos compuestos como quimiotipos diferentes, entre ellas, se encuentran que: algunos aceites presentan ambos componentes a la vez [9, 58], y que en estudios realizados en plantas de *L. alba* en Argentina por Ricciardi y colaboradores, el AE presentaba citral como compuesto mayoritario en las estaciones de otoño y primavera, mientras que en el verano, el compuesto mayoritario fue el linalool [80].

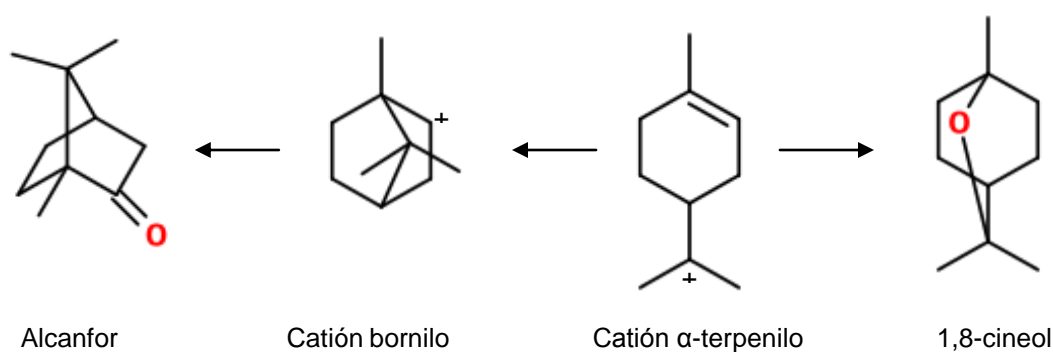
La **tagetenona**, es la mezcla de dos isómeros, **ocimenona** y **mircenona**, que son los compuestos mayoritarios del **quimiotipo II**. Sin embargo, la mircenona siempre se encuentra en mayor cantidad que la ocimenona [32].

El **quimiotipo III** se encuentra formado por los siguientes compuestos mayoritarios: **limoneno**, junto con alguna de estas 5 cetonas monoterpénicas que poseen estructuras químicas relacionadas; todas son derivadas del limoneno, con rutas biosintéticas muy similares, a saber: la **carvona**, **dihidrocarvona**, **piperitona**, **piperitenona** o **lippiona** [32, 49].

El **quimiotipo IV** está conformado por aquellos AE que contienen, como componentes principales, el **mirceno** y **canfeno** [80].

El **quimiotipo V** lo conforman los aceites esenciales cuyo componente mayoritario es el **γ-terpineno** [42].

El **quimiotipo VI**, en sus aceites, los componentes mayoritarios son: el **1,8-cineol** y el **alcanfor**. El primero, sintetizado a partir del catión α-terpenilo, y el segundo, a partir del catión bornilo [33].



Finalmente, el **quimiotipo VII** fue descrito por Tucker y colaboradores [100], con **estragol** como el compuesto mayoritario. Sin embargo, tal y como lo reportan

estos autores, además de ser un quimiotipo diferente a todos los demás, presenta una variación morfológica respecto a otros, puesto que el color de las flores de *L. alba* es amarillo, mientras que el color usual de las flores de esta planta es violeta claro o rosado.

El alto contenido de alcanfor en el AE del género *Lippia*, que ha sido utilizado como expectorante, podría explicar el fundamento de su uso popular en los trastornos respiratorios [46]. Ricciardi y colaboradores [82], atribuyen algunas de las propiedades de esta planta al alto contenido de terpenos livianos, como 1,8-cineol, limoneno,  $\beta$ -mirceno [82].

Extractos de *L. alba* en etanol y diclorometano, sugieren la presencia de compuestos antiproliferativos contra el herpes, siendo los segundos los más tóxicos [1]; en etilacetato, tienen actividad antipolivirus del herpes tipo II [86]. Extractos en etanol (80% v/v) de *L. alba*, tienen actividad sedativa, relacionada con la presencia de compuestos no volátiles en las hojas, posiblemente, los flavonoides [104]. Las propiedades cambian según el quimiotipo, como es de esperarse; mientras que la *L. alba* quimiotipo I, “linalool” (50.0-79.2%), presenta actividad antioxidante semejante a la de la vitamina E [83]; la *L. alba*, quimiotipo “carvona”, posee una actividad antirradicalaria más baja que la de esta vitamina y el Trolox [23].

### **1.3 METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS**

Las plantas producen diversos compuestos orgánicos que aparentemente no parecen tener una función directa en su crecimiento y desarrollo. Estas sustancias se conocen como “metabolitos secundarios” y no se relacionan directamente con el proceso de fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, síntesis de proteínas,

asimilación de nutrientes y formación de carbohidratos, los cuales hacen parte del metabolismo primario de la planta.

Los metabolitos primarios incluyen los azúcares simples, aminoácidos, grasas, proteínas y ácidos nucleicos, entre otros. El metabolismo primario proporciona las moléculas de partida para las rutas del metabolismo secundario, entre las que se encuentran las siguientes [7, 35, 96]:

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

Los metabolitos secundarios de las plantas pueden dividirse según su estructura química, en tres grupos, a saber: terpenos o terpenoides, fenoles y sus derivados, y alcaloides [91].

### **1.3.1 Terpenos**

Constituyen la clase más grande de metabolitos secundarios. Generalmente, son insolubles en agua. Pertenecen a la clase de lípidos sencillos y comprenden una amplia gama de compuestos como vitaminas, pigmentos vegetales y muchos otros productos naturales.

Todos los terpenos son derivados de la unión de cinco carbonos elementales que tienen ramificaciones en su esqueleto de isopentano. La estructura elemental de los terpenos se denomina, por lo general, unidad isoprénica, ya que a altas temperaturas los terpenos pueden descomponerse generando isopreno [7, 36, 60].

Dependiendo del número de átomos de carbono, los terpenos se pueden clasificar en monoterpenos,  $C_{10}$  (e.g., limoneno, mentol, timol, alcanfor); sesquiterpenos,  $C_{15}$  (e.g., farnesol); diterpenos,  $C_{20}$ , etc., donde cada uno de ellos presenta una función característica, e.g., los monoterpenos mencionados anteriormente, presentan acción antiséptica, o se emplean como expectorantes [10, 35, 91].

### **1.3.2 Compuestos nitrogenados o alcaloides.**

Se conocen alrededor de 12.000 alcaloides [6], que contienen uno o más átomos de nitrógeno, biosintetizados principalmente a partir de aminoácidos y poseen una gran diversidad de estructuras químicas [54].

Los alcaloides son fisiológicamente activos en los animales, aún en bajas concentraciones, por lo cual se usan ampliamente en medicina. La morfina, la atropina, la quinina y la estricnina son ejemplos de algunos alcaloides utilizados como fármacos.

### **1.3.3 Compuestos fenólicos**

Son compuestos orgánicos que contienen en su estructura química al menos un grupo fenólico, es decir, un anillo aromático unido por lo menos a un grupo hidróxilo. Muchos de estos compuestos se clasifican como metabolitos secundarios de las plantas, en otras palabras, aquellos productos biosintetizados en las plantas que poseen la característica biológica de ser productos secundarios de su metabolismo.

### **1.3.4 Glicósidos**

Su nombre hace referencia al enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se une con otra que contiene un grupo hidroxilo. Existen tres grupos de glicósidos de interés particular: saponinas, glicósidos cardíacos y glicósidos cianogénicos. Se incluye una cuarta familia, los glucosinolatos, cuya estructura es similar a la de los glicósidos [6].

## **1.4 ACEITES ESENCIALES**

Los aceites esenciales (AE) se encuentran almacenados en diferentes células vegetales. Son mezclas de varias sustancias químicas biosintetizadas por las plantas, que dan la fragancia característica de algunas flores, árboles, semillas, etc. Se les llama “aceites esenciales” porque poseen fragancia, olor, es decir, poseen compuestos volátiles que, por su estructura molecular, generan estímulos en el sistema olfativo del ser humano. Estos aceites son muy volátiles, y pueden sufrir degradación química con la luz, el calor, álcalis o ácidos fuertes [26].

Los AE generalmente son líquidos, en algunas ocasiones, semisólidos y, muy raras veces, sólidos; pocos solubles en agua, pero sí volatilizables con vapor, puesto que se evaporan a diferentes velocidades bajo presión atmosférica.

El término “aceite esencial” se utiliza, en general, para designar sustancias volátiles obtenidas por destilación. Con esta definición se hace una distinción entre los aceites fijos y los que son fácilmente volátiles. Las propiedades básicas que caracterizan estos aceites son la volatilidad y su origen vegetal. El término popular más común, con el que se conocen estas sustancias, es el de “esencias”, aunque también se utiliza el nombre de “aceites volátiles” o “aceites etéreos” [28].

Hay diversos factores que influyen sobre la composición y rendimiento de los aceites esenciales. Entre éstos, figuran los siguientes:

- Condiciones geobotánicas del medio: clima, altitud, tipo de suelo, cantidad de luz y lluvia.
- Método de cultivo: uso de fertilizantes, abonos, pesticidas, otros agentes químicos.
- Época de recolección y parte de la planta: raíz, tallo, hojas, semillas.
- Manejo y almacenamiento del material vegetal: fresco, seco, fermentado.
  
- Método de extracción: arrastre con vapor, hidrodestilación, hidrodestilación asistida con la radiación de microondas [91].

Dentro de las propiedades fisicoquímicas más destacables de los AE figuran su volatilidad, inestabilidad ante la luz y el oxígeno. En presencia de agentes oxidantes y reductores, pH extremos, o trazas de metales pueden ocurrir reacciones de descomposición, etc. Otra propiedad de los constituyentes de una esencia es la variabilidad de sus estructuras, a partir de las cuales se puede generar, por semisíntesis, nuevas estructuras. En cuanto a sus solubilidades, tienen la particularidad de que, si bien son solubles en medio no polar, también suelen tener una solubilidad alta en etanol, lo que es ampliamente utilizado en la elaboración de fragancias y extractos hidroalcohólicos en las industrias farmacéutica y cosmética [10, 24].

Generalmente, el deterioro de los AE se atribuye a reacciones de: oxidación, polimerización, hidrólisis de ésteres y a la interacción con grupos funcionales. Estos procesos parecen estar activados por el calor, aire, oxígeno, humedad, luz y, en algunos casos, posiblemente, por metales [48].

Todos los días, sin saberlo, estamos haciendo uso de algún producto o material derivado de aceites esenciales. Por tal motivo, los AE tienen dos grandes mercados, a saber: la industria de sabores y fragancias, gracias a las características organolépticas de esencias; y su uso como materia prima en química sintética. El reconocimiento de una estructura química como generadora de una propiedad organoléptica, es la guía para que otras estructuras similares sean explotadas, buscadas o modificadas para lograr el mismo efecto, con una posible ventaja comparativa [11, 45, 59].

Otras importantes aplicaciones de esencias son: en la industria cosmética, para la elaboración de perfumes, pastas dentífricas, cremas, ungüentos, etc.; en la industria licorera y tabacalera, como saborizantes y aromatizantes; en la industria alimenticia, como saborizantes, colorantes, aromatizantes en bebidas, sopas, adobos, así como en concentrados y alimentos para animales, etc.; en química farmacéutica, como principios activos, saborizantes, colorantes; en veterinaria, como repelentes de insectos, antisépticos, etc.; en la industria de aseo y limpieza, como aromatizantes de productos para pisos, baños, cocinas, limpiavidrios y ambientadores de autos, etc.; además, se reconoce su importante uso en medicina terapéutica y aromaterapia, en inhalaciones, nebulizaciones, baños de inmersión, entre otros [11].

#### **1.4.1 Comercio mundial de aceites esenciales**

El mercado de los AE comunes presenta una demanda restringida debido a que ésta ya se encuentra *grosso modo* satisfecha en el mundo. La tendencia se dirige, por ejemplo, hacia aceites de calidad homogénea y hacia variedades cada vez más sofisticadas [37]. En la **Tabla 4** se observan los principales sectores industriales, así como las distintas clases de aceites esenciales que tienen aplicación a nivel mundial.

**Tabla 4.** Aceites esenciales empleados por los tres principales sectores industriales [21, 22]

SECTOR	RENLÓN	ACEITES ESENCIALES
Industria cosmética	Cuidado personal	• Limón
	Detergentes y jabones	• Hierbabuena
	Cuidado dental	• Patchouli
		• Naranja
		• Palo de rosa
		• Eucalipto
		• Mentas
Industria de alimentos	Bebidas	• Cítricos
	Tabaco	• Vainilla
	Confitería	• Aceites florales
	Alimentos procesados y	• Hierbabuena
	Enlatados	• Tomillo
	Gomas de mascar	• Anís
Industria farmacéutica	Homeopatía	• Romero
	Cuidado de la salud	• Salvia
	Aromaterapia	• Manzanilla
		• Lavanda
		• Geranio
		• Eucalipto

En el mundo, los aceites esenciales de aproximadamente 160 especies han alcanzado reconocimiento comercial, pero de éstos apenas 18 especies constituyen el 75% del valor de la producción mundial. Dentro de los aceites comercialmente mejor posicionados en el mercado se encuentran los de naranja, eucalipto, citronela, limón, lavanda y mentas, con altos volúmenes de producción, y los AE de rosa, jazmín y vetíver, con precios considerablemente altos [22].

De acuerdo con la FAO, la producción mundial de aceites esenciales fue estimada en 28.2 millones de toneladas en 2003. Los países desarrollados controlan el 85% del comercio mundial, *e.g.*, en 2004, la Unión Europea (EU) importó €626 millones y exportó €375. Estos países también adquieren productos naturales de países en vía de desarrollo, los procesan y los reexportan, aumentando de esta manera el valor agregado de los productos finales.

China, Brasil, Argentina e India (véase **Tabla 5**) exportaron en 2004 entre 11.000 y 32.000 toneladas de AE hacia la EU. Los países en vía de desarrollo juegan un papel importante en la producción de AE de limón, lima, ylang-ylang, geranio, vetíver y jazmín en 2004 produjeron más del 50% de la demanda de la Unión Europea de estos productos-.

En ese mismo año (2004), las importaciones de AE por miembros de la Unión Europea correspondieron a €501 millones, presentando una disminución del 12% con respecto al monto respectivo de 2002. Sin embargo, el volumen de importaciones se mantuvo constante, *i.e.*, el precio de los AE se redujo en este período [21].

**Tabla 5.** Principales figurantes en la economía mundial de los AE [22].

EXPORTADORES	IMPORTADORES	PRODUCTORES
Estados Unidos	Estados Unidos	Brasil
Unión europea (EU)	Francia	China
China	Reino Unido	Egipto
Indonesia	Japón	Indonesia
India	Suiza	Irán
Argentina		Marruecos
Brasil		

Los precios de los AE, pueden variar ampliamente dependiendo de:

- **Factores de calidad:** determinados por el país de origen, el clima, la cosecha, la concentración de los metabolitos y el método de extracción;
- **Factores económicos:** basados en la oferta y la demanda.

## 1.5 SECADO DEL MATERIAL VEGETAL

Las plantas aromáticas pueden ser comercializadas frescas, enteras o cortadas, pero en la mayoría de los casos, éstas se someten a un proceso de secado, dado que esta operación representa una de las mejores alternativas de estabilización y conservación del material vegetal [11, 16, 53].

Los principales objetivos del secado son:

- Inhibir la actividad enzimática, fenómeno que puede alterar sustancialmente la calidad del material vegetal, por descomposición de sus componentes.
- Estabilizar el olor, color, textura, sabor y la composición química.
- Reducir fletes, costos de embalaje y almacenaje.
- Reducir tiempos y costos de destilación, cuando el material va a ser empleado para este fin.

Para conservar las plantas es indispensable reducir la actividad enzimática en ellos, y para ello, se reduce el contenido acuoso hasta valores que corresponden a una humedad entre 5 y 14%, según cada caso. Normalmente, las plantas en la cosecha presentan humedades superiores al 70%, por lo que es necesario encontrar medios eficientes de secado, que no perjudiquen la calidad del material vegetal, ni reduzcan el contenido de componentes volátiles presentes en el mismo [11, 16, 53].

### **1.5.1 Métodos de secado**

Uno de los métodos de secado consiste en el secado a campo. En realidad, es un proceso de oreado, es decir, se deja el material cortado en el lugar de cultivo por un tiempo, permitiendo que la mayoría del agua contenida en sus tejidos se evapore. Este método, en conjunto con el secado al aire libre, hace parte de los sistemas de secado más sencillos y económicos, pues actúan por simple radiación solar, pero estos métodos también son los menos sugeridos, por el deterioro en la calidad del material vegetal. Por su parte, el secado al aire libre consiste en

esparcir el producto a secar sobre pisos de cemento, encima de catres, bandejas, o bolsas, a la intemperie y durante un tiempo determinado para cada especie. Sin embargo, es importante no colocar el material en contacto directo con el suelo, sino permitir la circulación de aire a través del material vegetal, evitando, a la vez, su contaminación [11, 101]. Por ello, es un método aconsejable sólo en regiones muy secas y con fuerte irradiación solar, y para productos resistentes al calor y no fotosensibles. Además, se debe tener cuidado de retirar el material vegetal por el peligro de la condensación de agua durante la noche, lluvias o rocío. Este proceso se le aplicó a las plantas en estudio y se llevó a cabo en las instalaciones de CENIVAM.

El secado a la sombra es un sistema que actúa por convección del aire, el cual debe estar más seco y en lo posible más caliente que el vegetal, para facilitar la evaporación. Se realiza a temperatura ambiente y se debe tener sumo cuidado en lo referente a la ubicación y dimensiones de las aberturas de entrada y salida de aire y la facilidad de carga, descarga y circulación interna del material.

Normalmente, las entradas de aire caliente se ubican en las partes bajas y las salidas del aire frío se sitúan en la parte superior y en paredes opuestas. Lo ideal es aprovechar las corrientes naturales del viento en la región, pero de no ser así, se deben instalar ventiladores que faciliten la convección del aire. Generalmente, es un proceso más lento que el anterior pero el resultado es muy superior por no tener la descomposición de los productos, debido a temperaturas no controladas o exceso de luminosidad. No obstante, el principal inconveniente del secado natural a la sombra es que no se pueden controlar las condiciones climáticas y así, si el momento de la cosecha ocurre en días de alta humedad, lluvia, baja temperatura, etc., no se obtendrá un buen secado [11, 12, 101].

Algunas alternativas que se han planteado para la obtención de la energía necesaria para el calentamiento del aire de secado, van desde las más rústicas,

como atrapar el aire entre una cobertura transparente y una negra, favoreciendo el traspaso de los rayos solares, y luego orientar este aire calentado con ventiladores hacia el material a secar, hasta el uso de células o paneles solares para la generación de la energía necesaria por los desecadores [11].

## **1.6 EXTRACTO**

A diferencia del aceite esencial, que sólo posee compuestos más ligeros o volátiles, el extracto vegetal es una mezcla concentrada de principios activos de una determinada planta, que contiene las sustancias químicas que posee dicho vegetal, independientemente de su peso molecular.

En la industria farmacológica, los extractos vegetales tienen una gran aplicación y relevancia por la gran variedad de principios activos que puede poseer una misma planta, el grado de concentración y la minimización de efectos colaterales asociados a la contaminación del proceso de síntesis y la similitud de los compuestos sintetizados, característica que los convierte en elementos de menor actividad o que pueden tener algún tipo de actividad asociada a las diferencias estructurales.

## **1.7 EXTRACCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS**

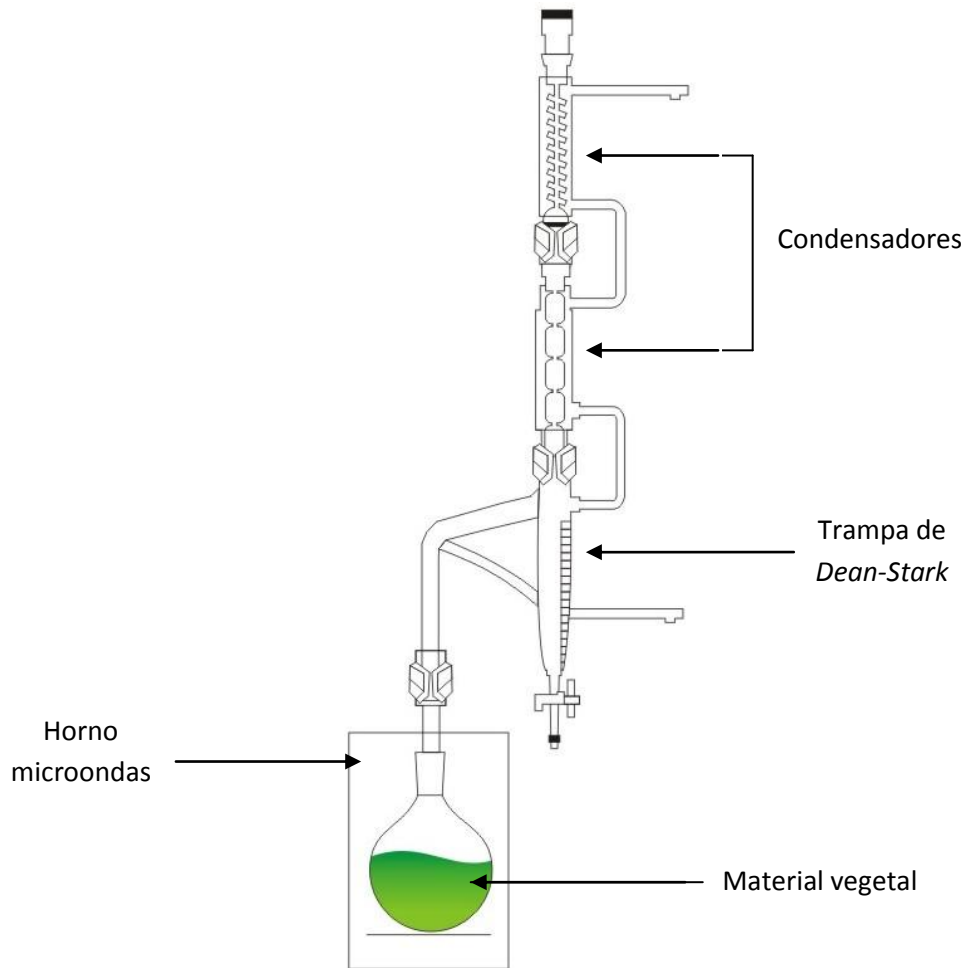
Existe una gran variedad de métodos empleados para la obtención de los metabolitos secundarios de las plantas, entre los cuales se encuentran la destilación convencional, la hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHD), extracción con fluido supercrítico (SFE) y destilación-extracción simultánea (SDE), entre otras [64, 92, 96].

En las plantas, los aceites esenciales se almacenan en glándulas aceitosas, venas, sacos de aceite o cabellos glandulares de donde pueden ser removidos utilizando el vapor de agua, el cual debe atravesar los tejidos vegetales de la superficie expuesta al mismo. Para facilitar este proceso y aumentar el rendimiento del aceite, a menudo se realiza un tratamiento físico previo a la destilación, el cual depende del tipo de material vegetal. Las hojas, las flores y otras partes delgadas y no fibrosas de la planta se someten al proceso de destilación sin ningún tratamiento previo, mientras que las raíces, los tallos y las plantas leñosas se deben cortar en trozos pequeños, aumentando así la superficie de contacto [11, 64, 92, 93, 95, 96].

Los aceites esenciales se obtienen de las plantas por diferentes procesos fisicoquímicos, de acuerdo con la naturaleza y propiedades de los mismos o del material vegetal que los contienen. El almacenamiento de material vegetal fresco antes del proceso de destilación no es muy recomendable, ya que ello está asociado con la pérdida y deterioro de la calidad y el rendimiento del aceite, por evaporación, oxidación enzimática u otros procesos de degradación. Sin embargo, hay excepciones y, en algunos casos, durante el proceso de almacenamiento y secado, tiene lugar una serie de reacciones bioquímicas acompañadas de la generación de compuestos volátiles de interés, por ejemplo, en patchouli o en vainilla [11, 45, 53].

### 1.7.1 Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas

La hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD) se basa en el mismo principio de métodos de extracción como la hidrodestilación por arrastre con vapor o hidrodestilación simple [39].



**Figura 4.** Esquema del montaje para obtención por MWHD de los AE de *H. suaveolens*, *H. mutabilis* y *L. alba* [39]. Imagen modificada de [79, p.54]

El principio de este sistema es el calentamiento dieléctrico [39], que aprovecha la radiación de microondas; la técnica fue inicialmente patentada en Canadá por

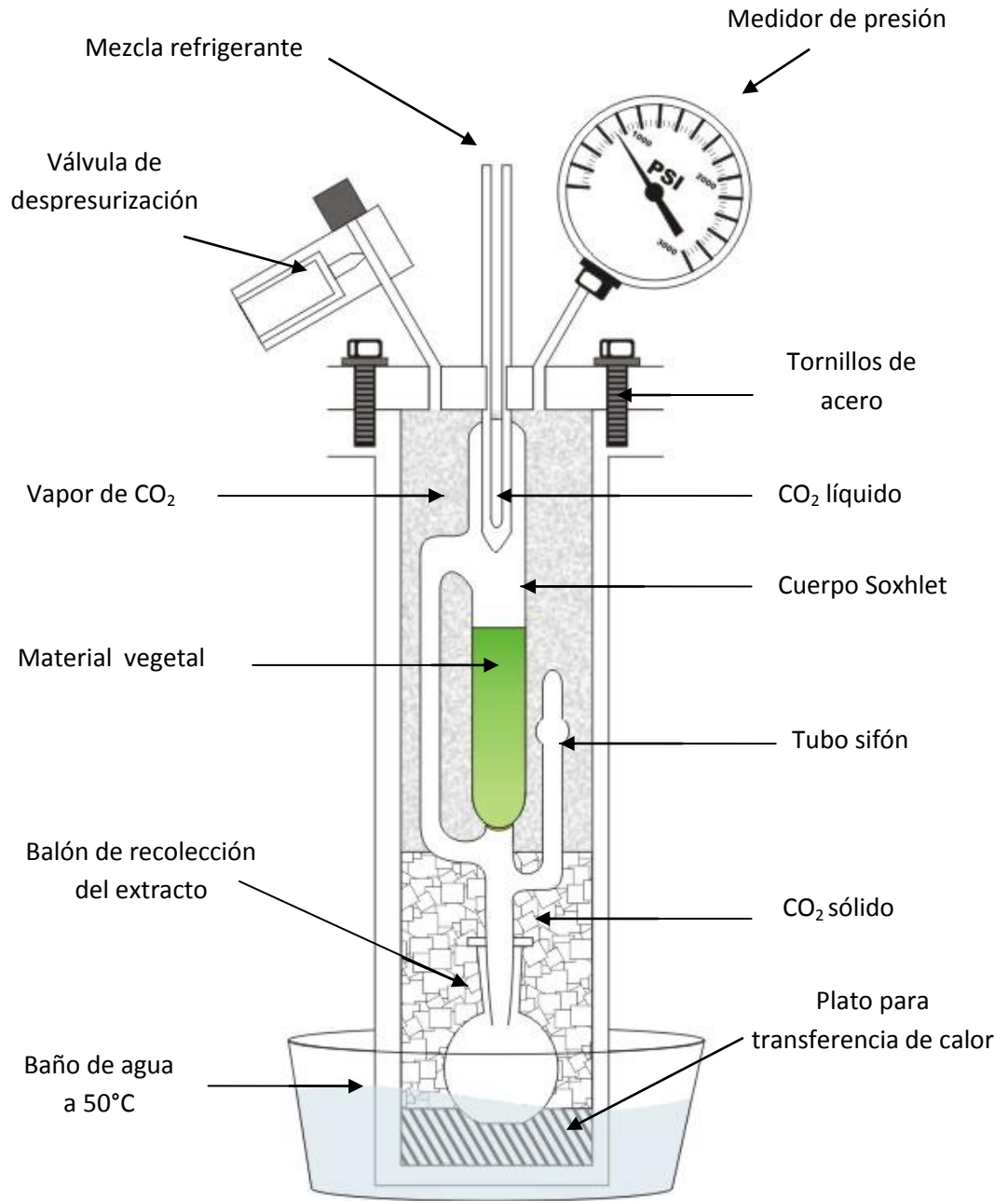
Paré y colaboradores en 1983 [70, 71]. Consiste en la transformación de la energía electromagnética de las microondas en energía calórica, que está en contacto con muestras sólidas, en este caso el material vegetal, rompiendo las estructuras celulares que contienen a la esencia, por efecto de su presión de vapor; la esencia es así liberada y se realiza la partición de los compuestos de interés en el solvente por difusión, estos son dirigidos con el vapor de agua al montaje tipo *Clevenger* donde se colectan, se condensan y se separan por decantación [39, 43, 56].

Las ventajas de usar la energía de microondas, y no una fuente de calor en contacto directo, incluyen un calentamiento más efectivo, una rápida transferencia de energía, reducción de gradientes térmicos, incremento en la producción y eliminación de pasos en el proceso [65]. Cuando se usa la energía de microondas, la extracción puede llevarse a cabo en recipientes cerrados o abiertos, usando solventes con una constante dieléctrica alta que la absorban [43, 62].

### **1.7.2 Extracción con fluido supercrítico**

La extracción con fluido supercrítico (SFE) consiste en el uso de un fluido en condiciones supercríticas como disolvente. Por lo general, se utiliza CO<sub>2</sub>, por presentar características ideales para la extracción (es gaseoso a temperatura ambiente, por lo cual se separa del analito fácilmente, es barato, de fácil consecución comercial, inerte y no tóxico) [79].

También presenta baja viscosidad, baja tensión superficial, alto coeficiente de difusión (10 veces más que un líquido normal), que conduce a un alto contacto con la superficie del material y puede penetrar a pequeños poros y rendijas del mismo lo que asegura una buena eficiencia en la extracción en un corto tiempo.



**Figura 5.** Esquema del montaje para obtención por SFE de los extractos de *H. suaveolens*, *H. mutabilis* y *Lippia alba* [97]. Imagen modificada de [79, p.54]

En el método de extracción con fluidos supercríticos, el material vegetal se corta en trozos pequeños, se licua o se muele, se empaqueta en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un fluido supercrítico, las esencias son así solubilizadas y arrastradas y el fluido supercrítico, que actúa como solvente extractor, se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente y, finalmente, se obtiene una esencia pura.

Aunque presenta algunas ventajas como rendimientos altos, SFE es ecológicamente compatible, el solvente se elimina fácilmente o inclusive se puede reciclar y las bajas temperaturas utilizadas para la extracción no cambian químicamente los componentes de la esencia; sin embargo, la inversión inicial para estos procesos es alta, aún para equipos a pequeña escala, debido a la tecnología involucrada, a los costos de materiales y de construcción. Los equipos se construyen en acero inoxidable, deben soportar altas presiones en su operación y deben ofrecer un manejo seguro. Por efecto mismo de la escala, para equipos más grandes, mayor debe ser la capacidad de la bomba de compresión; mayor el espesor de las paredes, de las bridas en los mismos, de los cierres y sellamientos muy herméticos [27].

### **1.7.3 Destilación extracción simultánea con solvente**

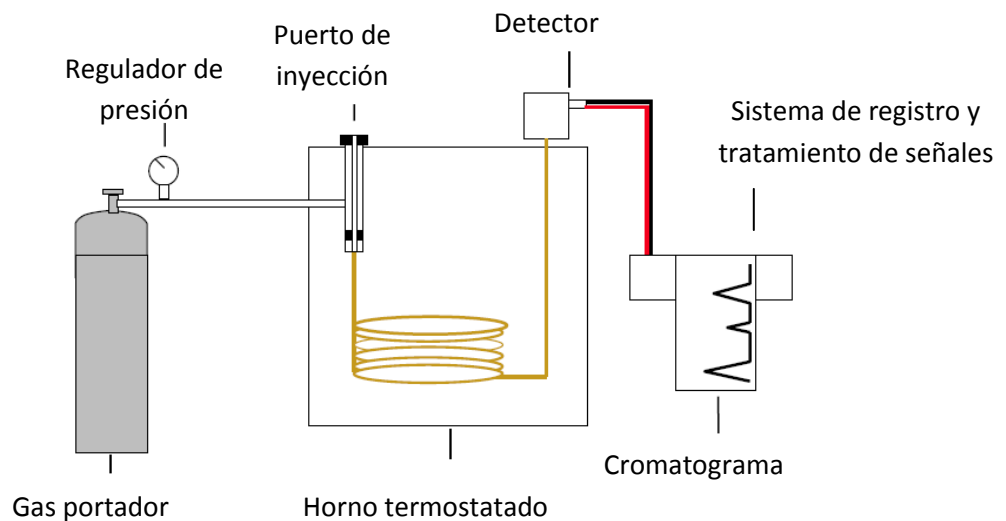
Los solventes orgánicos son sustancias que pueden suspender, extraer o disolver sustancias, sin reaccionar químicamente con ellas. La técnica requiere un extractor de destilación continua, que consiste en dos balones separados y conectados por vías diferentes a un condensador. Cada balón contiene un solvente con polaridad diferente; esta técnica permite obtener variedad de compuestos del extracto de la planta, por lo general, un solvente polar y otro apolar, con el fin de obtener componentes, según su polaridad [27].



## 1.8 CROMATOGRAFÍA DE GASES

Anteriormente, la caracterización de un AE se hacía identificando los componentes individuales mediante largas y costosas marchas analíticas, que incluían aislamiento y purificación, mediante cromatografía en capa fina y en columna, para su posterior determinación estructural por métodos químicos convencionales. En la actualidad, estos procedimientos han sido sustituidos por técnicas más precisas y funcionales, como la cromatografía de gases (GC) [10].

La cromatografía es una técnica analítica, que puede separar los componentes de una muestra y, al mismo tiempo, determinar sus concentraciones. Las separaciones cromatográficas utilizan repartos selectivos de los componentes de la muestra entre una fase estacionaria que permanece inmóvil en el interior de la columna y una fase móvil que atraviesa esta columna [55, 85].



**Figura 7.** Principales partes de un cromatógrafo de gases. Imagen tomada de [34, p. 28].

La columna se encuentra en el horno, donde la temperatura se ajusta según los requerimientos de análisis. La programación de la temperatura de la columna depende del punto de ebullición de los analitos en la muestra y del grado de separación requerido. Los analitos que eluyen de la columna pasan a un detector, el cual registra su salida y genera una señal proporcional a su cantidad [52, 77].

Las columnas cromatográficas empleadas en la actualidad son tubulares abiertas o capilares, y constituyen un tubo de sílice fundido de diámetro muy pequeño ( $\leq 0.32$  mm) y de longitud variable (15 a 100 m).

El proceso cromatográfico ocurre como el resultado de repetidos actos de absorción/desorción, durante el movimiento de los componentes de la muestra a través de la fase estacionaria; la separación ocurre gracias a las diferencias en la constante de distribución (K) de cada uno de los analitos [77].

Para la identificación tentativa de los componentes de un AE mediante GC, se emplea la comparación de sus tiempos de retención con los de los patrones analizados bajo las mismas condiciones operacionales. Sin embargo, estos tiempos de retención dependen de numerosas variables, a saber: la técnica de inyección, las variaciones de temperatura o flujo de los gases, el diseño del equipo, entre otras, que son ajustadas según los requerimientos del análisis [44].

Por ello, ha sido necesaria la introducción de parámetros más reproducibles, tales como los tiempos de retención relativos y los índices de retención. Éstos se calculan a partir de los tiempos de retención y por comparación con una serie de sustancias a las cuales se les asignan valores arbitrarios de índices de retención. Los más utilizados son los índices de Kovàts, introducidos en 1958 por E. Kovàts [57]. Los índices de Kovàts fueron empleados para la separación isotérmica. Actualmente, todas separaciones cromatográficas se hacen con programación de

temperatura, por ello, los índices de retención que se emplean, se llaman “lineales”, *i.e.*, “índices de retención lineales”.

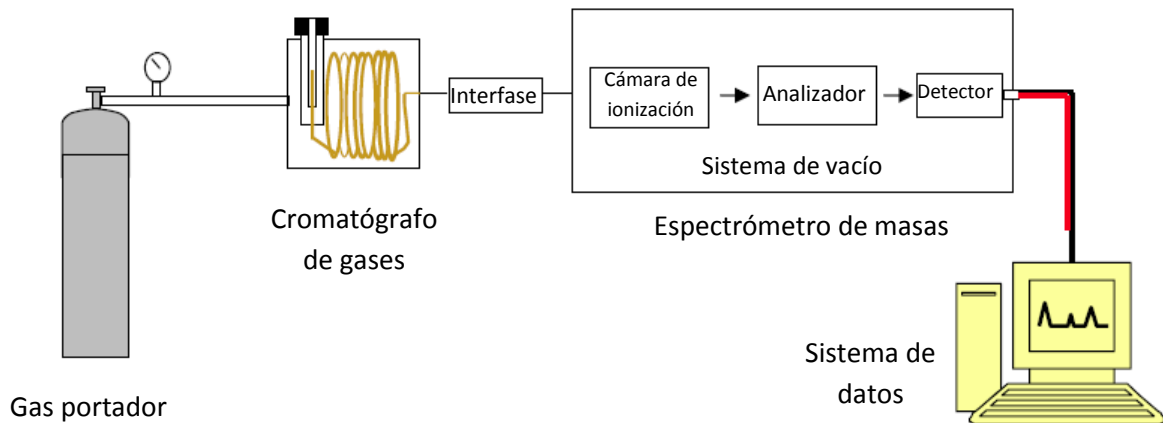
## **1.9 CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

El acoplamiento de un cromatógrafo de gases con un espectrómetro de masas (GC-MS) permite hacer un análisis rápido y seguro de mezclas complejas, determinando simultáneamente cuántos y cuáles son los constituyentes y en qué proporción se encuentran en la mezcla.

El principio de operación de la espectrometría de masas (MS), consiste en la generación de iones moleculares cargados positivamente (generalmente, se usa MS de iones positivos) y fragmentos de moléculas, provenientes de la columna GC, mediante el bombardeo con electrones. Los iones-fragmento producidos, entran al analizador de masas, *i.e.*, cuadrupolo (lo llaman también filtro de masas), donde se separan de acuerdo con su relación masa/carga ( $m/z$ ). Después de la detección de las corrientes iónicas parciales con un electromultiplicador, se construye la corriente iónica total, cromatograma. Se obtiene la información sobre los tiempos de retención ( $t_R$ ) de cada compuesto y sus espectros de masas, consistentes con sus patrones de fragmentación únicos. MS es un método de detección de alta sensibilidad con una cantidad mínima de muestra dentro del rango de 0.1 a 10 ng por compuesto, que puede incrementarse en el modo de monitoreo del ión seleccionado (*SIM*), en el cual, se escogen y se registran sólo los iones representativos de un compuesto en particular [99].

El sistema de ionización más frecuente es el de impacto o bombardeo de las moléculas con electrones de la energía de 70 eV (energía estándar), capaces de provocar la ionización y fragmentación de las moléculas.

En la **Figura 8** se observan las partes principales que conforman un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas.



**Figura 8.** Principales partes de un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas. Imagen tomada de [34, p. 29].

Dentro de las bondades de esta técnica se pueden mencionar las siguientes [40, p. 33]:

- Capacidad de identificación, ya que proporciona un espectro característico de cada molécula.
- Gran sensibilidad: habitualmente, se detectan concentraciones del orden de ppm o ppb y, en casos específicos, se puede llegar hasta ppt.
- Proporciona información estructural e isotópica sobre la molécula analizada.
- Es una técnica rápida: se puede obtener un espectro en décimas de segundo.

## 2. CIENCIOMETRÍA

La cienciometría es una herramienta que permite situar a un país, una institución, un área temática o un individuo en el contexto mundial de la productividad científica. Es, por lo tanto, una herramienta analítica que ayuda a determinar cuáles son las instituciones, qué están produciendo, cómo lo están haciendo, en qué campos de investigación, en qué revistas están publicando, cuáles son los autores más citados, cuáles son los principales países con los que se colabora y qué tipo de documentos se están publicando, entre otros [30, 73].

La comunidad científica cuenta con mecanismos que evalúan la calidad y la confiabilidad de su producción intelectual. Asimismo, esa valoración es la que se utiliza, entre otras herramientas, para direccionar y planificar las investigaciones. Por ello, a través de la vigilancia tecnológica se realiza un proceso sistemático y organizado que consta de las siguientes etapas: observación, captación, análisis y difusión, lo que permite identificar oportunidades, tendencias, dificultades o amenazas, para tomar decisiones, disminuir riesgos o anticiparse a los cambios [3, 84].

La vigilancia tecnológica permite determinar líneas de investigación, soluciones tecnológicas disponibles, tecnologías emergentes, la dinámica de las tecnologías, los centros de investigación y los líderes de proyectos, identificando las empresas que compiten en el área de interés [3, 84, 102].

La cienciometría estudia los aspectos “cuantitativos” de la ciencia como disciplina o actividad económica, forma parte de la sociología de la ciencia y encuentra aplicación en el establecimiento de las políticas científicas, donde incluye, entre otras, las de publicaciones. Ésta emplea técnicas métricas para la evaluación y examina el desarrollo de las políticas científicas de países y organizaciones [3, 84].

La *L. alba* pertenece al género de plantas que posee un nivel alto de estudios en gran parte del mundo, entre ellos sobresalen, los artículos. Se realizó un estudio cuantitativo en la Base de Datos *Science Direct, Elsevier (Scopus)*, y se obtuvieron los resultados resumidos a continuación:

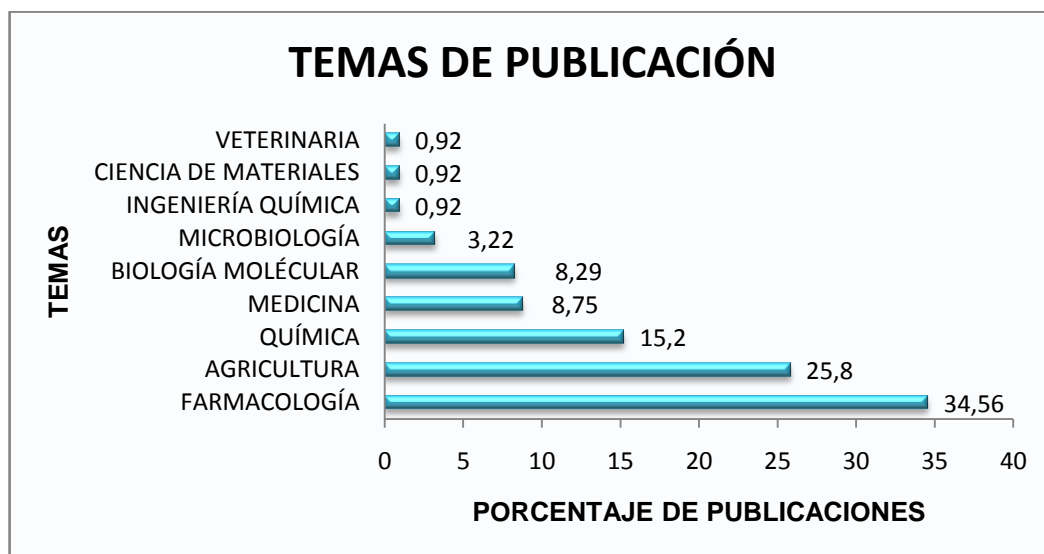
En la **Figura 9** se observa un incremento, en el transcurso de los años, del número de publicaciones referentes al género *Lippia spp.* La revisión se hizo para los últimos 20 años y mostró, lo que marcó una tendencia creciente de la actividad científica en este campo.



**Figura 9.** Número de publicaciones por año sobre la especie *L. alba*. Periodo de observación: 1990-2010. Base de datos: *Science Direct, Elsevier (Scopus)*. Fecha de consulta: marzo 25 de 2011. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABSTR-KEY (*Lippia alba*).

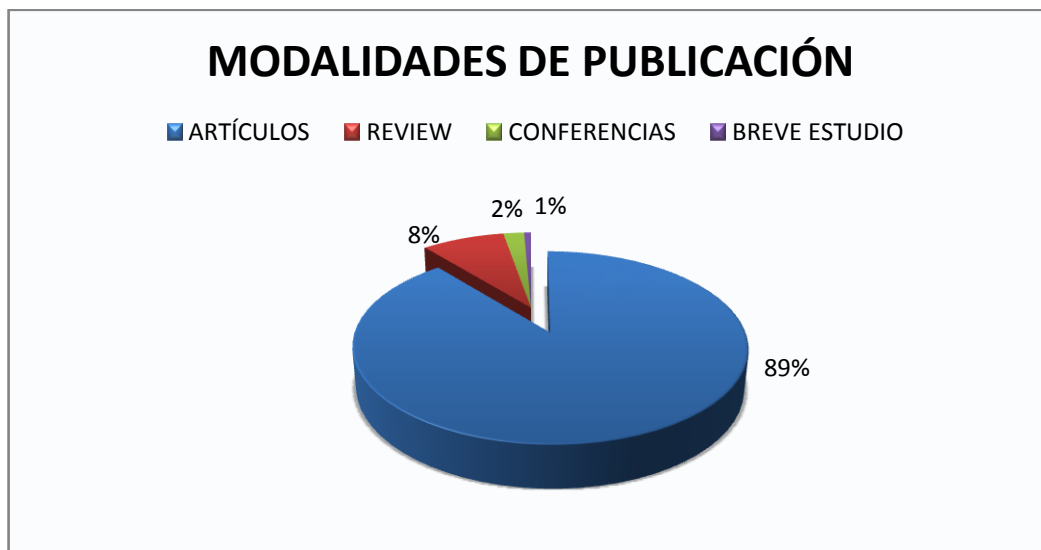
Mientras tanto, refiriéndose a los temas de publicación, en la **Figura 10**, se observa su relación en diferentes áreas de aplicación. Se observa, que la mayoría de estudios sobre esta especie se desarrollan en la farmacología, agricultura,

química, medicina y biología molecular. Sin embargo, no pasa desapercibido el tipo de publicaciones en otras áreas, por ejemplo, la microbiología, ciencias de los materiales y veterinaria.



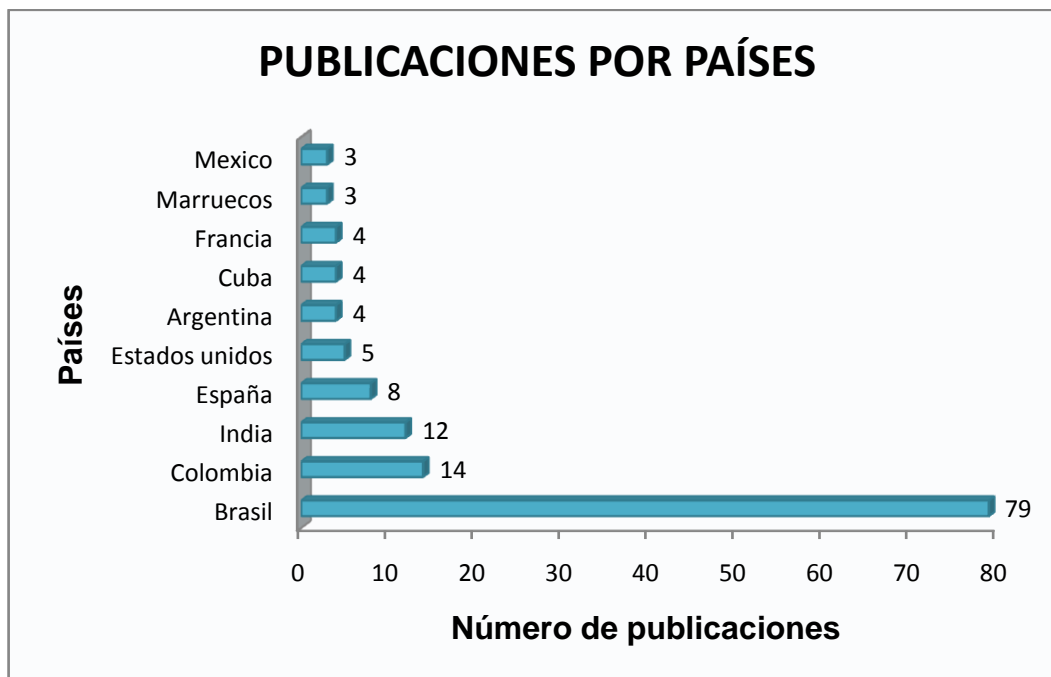
**Figura 10.** Relación porcentual de publicaciones por temas sobre el género *Lippia alba*. Periodo de observación: 1990-2010. Base de datos: *Science Direct, Elseiver (scopus)*. Fecha de consulta: marzo 25 de 2011. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABSTR-KEY (*Lippia alba*).

Las diversas modalidades de publicación se pueden observar en la **Figura 11**. Se vislumbra que la cantidad porcentual más alta, en cuanto a publicaciones, sobre la especie *L. alba* corresponde a artículos científicos, sin embargo, no dejan de publicarse otros documentos y estudios, por ejemplo, como son los *reviews* (artículos de revisión) y las conferencias.



**Figura 11.** Relación porcentual según la modalidad de publicación sobre la especie *L. alba*. Periodo de observación: 1990-2010. Base de datos: *Science Direct, Elseiver (Scopus)*. Fecha de consulta: marzo 25 de 2011. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABSTR-KEY (*Lippia alba*).

Es amplio el número de países donde se han hecho estudios sobre esta planta debido a las características y propiedades que esta posee. Como se aprecia en la **Figura 12**, los países donde más se ha investigado sobre esta especie, son los de Sur América, como: Brasil y Colombia como cabeza principal en cuanto a la investigación de *L. alba* se refiere, sin embargo, en la República de la India, país Asiático, así como España y Francia en el continente Europeo, también han contribuido con publicaciones realizadas sobre esta especie.



**Figura 12.** Número de publicaciones por países sobre la especie *L. alba*. Periodo de observación: 1990-2010. Base de datos: *Science Direct, Elseiver (Scopus)*. Fecha de consulta: octubre 12 de 2011. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABSTR-KEY (*Lippia alba*).

En el estudio cuantitativo efectuado, se encontró que los autores que más investigaron sobre *L. alba* son:

STASHENKO, E.; VICCINI, L.; LEITAO, S.; DELARMELINA, C.; DIAS FILHO, B.; DO VALE, T.; entre otros.

En cuanto al género *Hyptis* sp. se refiere, se desarrolló una búsqueda cuantitativa en la Base de Datos *Science Direct, Elseiver (Scopus)*, en la cual se encuentran las especies bajo estudio, *i.e.*, *H. suaveolens* e *H. mutabilis*.

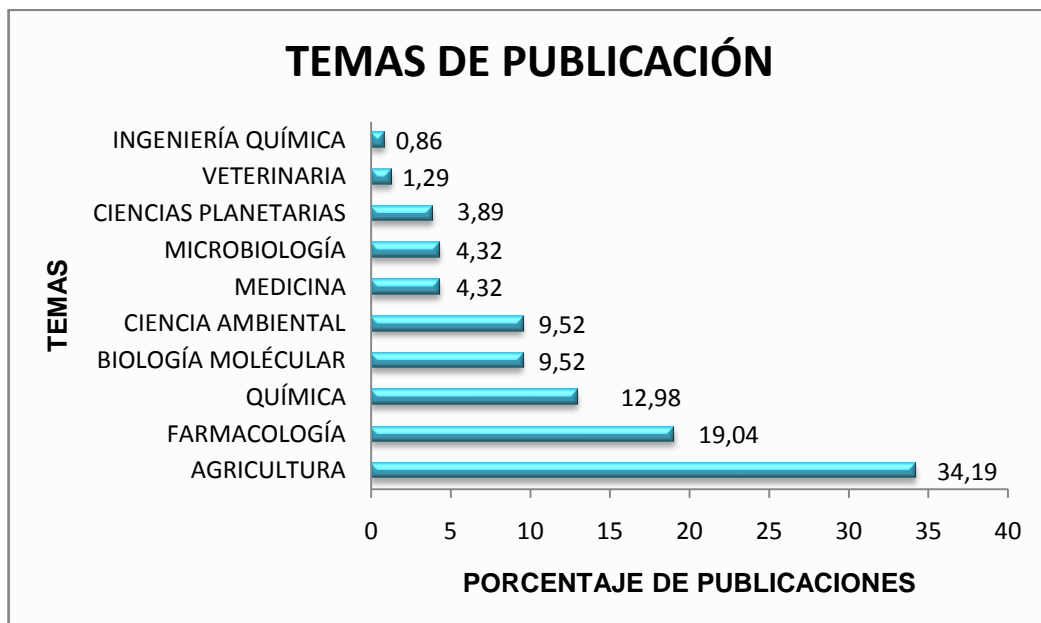
El número de publicaciones, haciendo una comparación entre la *Hyptis suaveolens* y la *L. alba*, no es tan significativo debido a que la *H. suaveolens* es una de las especies muy estudiadas en diferentes áreas.

En la **Figura 13** se observa un incremento en los últimos 20 años del número de publicaciones sobre esta especie. Se vislumbra una tendencia creciente en la línea investigativa sobre esta especie.



**Figura 13.** Número de publicaciones, por año, sobre la especie *H. suaveolens*. Periodo de observación: 1990-2010. Base de datos: *Science Direct, Elseiver (Scopus)*. Fecha de consulta: marzo 25 de 2011. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABSTR-KEY (*Hyptis suaveolens*).

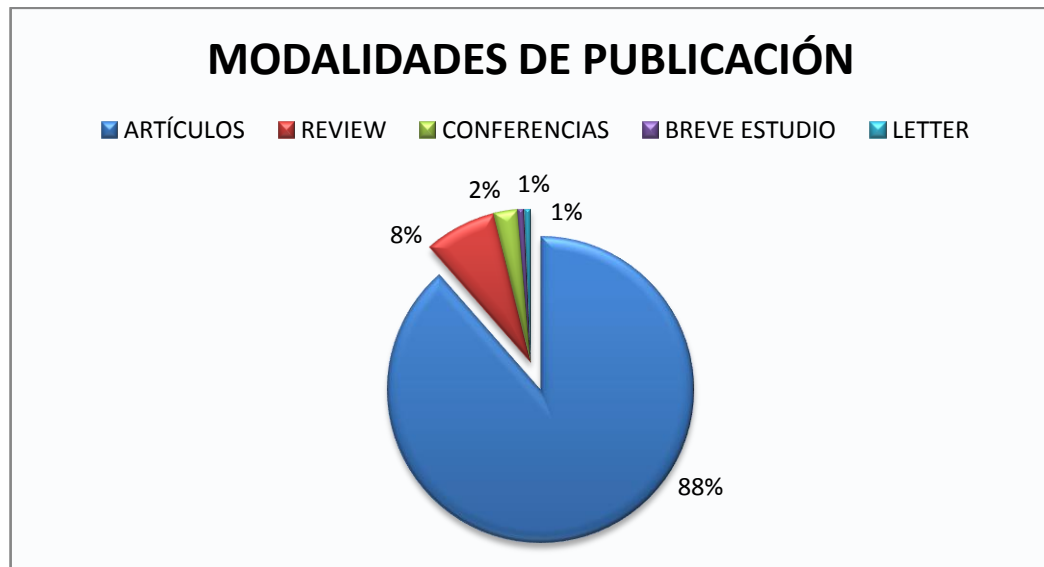
En la **Figura 14** se observa la relación de publicaciones en las diferentes áreas de aplicación. La mayoría de estudios sobre esta especie figura en la agricultura, farmacología y química.



**Figura 14.** Relación porcentual de publicaciones, por áreas de investigación, sobre la especie *H. suaveolens*. Periodo de observación: 1990-2010. Base de datos: *Science Direct, Elseiver (Scopus)*. Fecha de consulta: marzo 25 de 2011. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABSTR-KEY (*Hyptis suaveolens*).

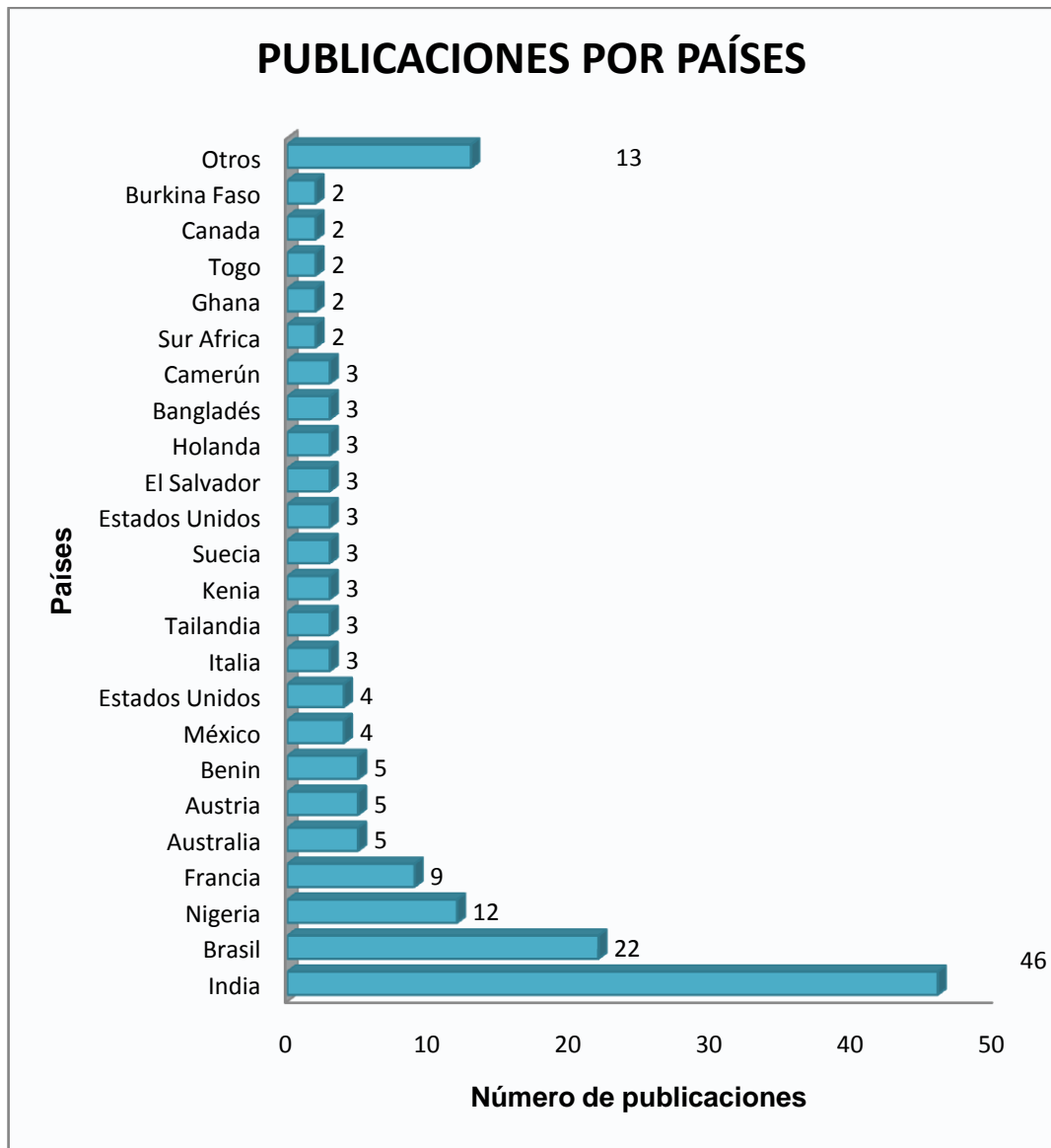
En la gráfica anterior, se observa que el porcentaje más alto, en cuanto a los temas de investigación, corresponde a la agricultura. La *H. suaveolens* (L.) Point., debido a que crece en forma silvestre en lugares húmedos y secos, se encuentra en los campos con maleza, frecuentemente, en suelos arenosos, por lo que es usual encontrarla en terrenos baldíos y hasta en alturas de hasta 1600 m.s.n.m., lo que facilita su siembra en diversas condiciones eco-agrícolas.

En la **Figura 15** se observan las diversas modalidades de publicación sobre la *H. suaveolens*. Éstas, corresponden a publicaciones en modalidad de artículos, sin faltar otro tipo de escritos como *reviews* (artículos de revisión) y conferencias, entre otras a considerar.



**Figura 15.** Relación porcentual según la modalidad sobre la especie *H. suaveolens*. Periodo de observación: 1990-2010. Base de datos: *Science Direct*, *Elseiver (scopus)*. Fecha de consulta: marzo 25 de 2011. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABSTR-KEY (*Hyptis suaveolens*).

La **Figura 16**, presenta la proporción de registros entre los que se incluyen artículos, resúmenes y revisiones en los diferentes países donde la especie *H. suaveolens* ha sido estudiada. Se encuentra un alto número de publicaciones en la República de la India, lo cual sugiere una gran cantidad de esta planta en la flora de su región. Sin embargo, Brasil en Sur América y Nigeria como país Africano, marcan el liderazgo en sus respectivos continentes como los más investigadores, así como Francia hace lo mismo en Europa.



**Figura 16.** Número de publicaciones por países sobre la especie *H. suaveolens*. Periodo de observación: 1990-2010. Base de datos: *Science Direct, Elseiver (Scopus)*. Fecha de consulta: octubre 12 de 2011. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABSTR-KEY (*Hyptis suaveolens*).

La línea investigativa sobre la *H. suaveolens* va en constante crecimiento debido a la importancia que posee esta especie en diferentes áreas, por lo que se espera,

en el transcurso de los años, que los estudios sigan con una línea investigativa mucho mayor.

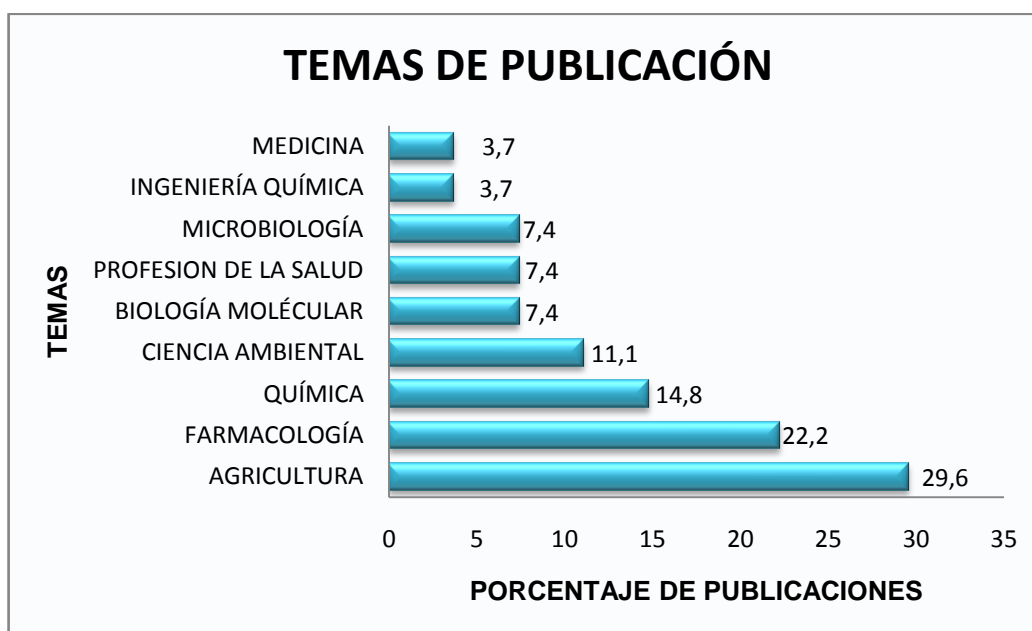
La *H. mutabilis* fue la segunda especie del género *Hyptis* sp, sometida al estudio cuantitativo en la Base de Datos *Science Direct, Elsevier (Scopus)*; sin embargo, de las tres plantas bajo estudio, es la que menos investigación científica recibe.

En la **Figura 17** se observa, que existen muy pocos estudios realizados sobre esta especie. La revisión se hizo en un periodo de tiempo de los últimos 10 años, lo que marcó una tendencia conservadora en cuanto a la poca actividad científica en este campo.



**Figura 17.** Número de publicaciones, por año, sobre la especie *H. mutabilis*. Periodo de observación: 2000-2010. Base de datos: *Science Direct, Elsevier (Scopus)*. Fecha de consulta: marzo 25 de 2011. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABSTR-KEY (*Hyptis mutabilis*).

En la **Figura 18**, se observa que, a pesar de que la *H. mutabilis* no cuenta con un número amplio de investigaciones, éstas, se han distinguido en los diversos temas y áreas, siendo la agricultura, farmacología y química, las más frecuentes.



**Figura 18.** Relación porcentual de publicaciones, por temas, sobre la especie *H. mutabilis*. Periodo de observación: 2000-2010. Base de datos: *Science Direct, Elseiver (Scopus)*. Fecha de consulta: marzo 25 de 2011. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABSTR-KEY (*Hyptis mutabilis*).

En la **Figura 19**, se muestra la distribución de estudios en los diferentes países con énfasis en los cinco, que publicaron. Argentina, es el país que más estudios presenta, seguido de Brasil y tres países más, *i.e.*, Estados Unidos, El Salvador y Perú.



**Figura 19.** Número de publicaciones por países sobre la especie *H. mutabilis*. Periodo de observación: 2000-2010. Base de datos: *Science Direct, Elseiver (Scopus)*. Fecha de consulta: octubre 12 de 2011. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABSTR-KEY (*Hyptis mutabilis*).

### 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

#### 3.1 Material vegetal

El material vegetal se cultivó, a pequeña escala, y fue recolectado (febrero de 2011) en el Complejo Agroindustrial Piloto del Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales (CENIVAM), en la Universidad Industrial de Santander, para los respectivos estudios investigativos en el laboratorio.

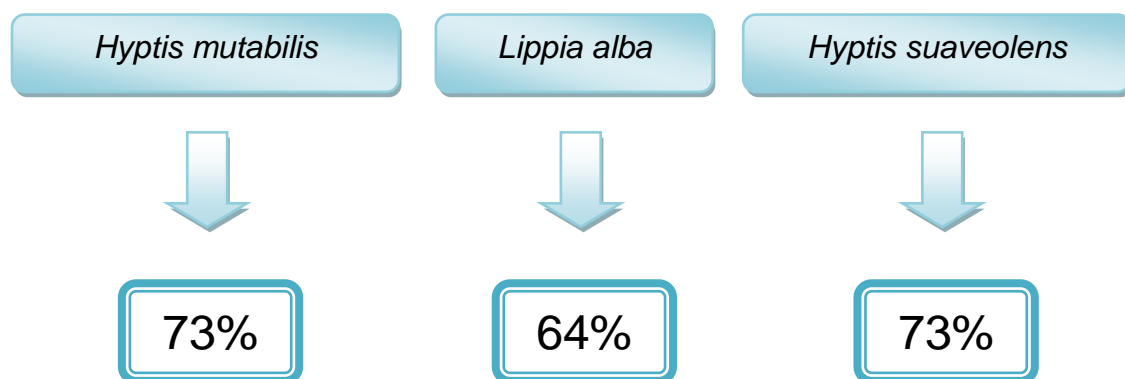
##### 3.1.1 Caracterización taxonómica de las plantas

La caracterización taxonómica de las plantas *L. alba*, *H. mutabilis* e *H. suaveolens* se realizó en el Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias, de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Los pliegos de cada planta quedaron depositados como muestra permanente en el Herbario Nacional Colombiano (COL, Bogotá). Las plantas fueron clasificadas por el doctor J. L. Fernández.

<i>Hyptis mutabilis</i>	Fam. Lamiaceae	Nº COL: 517326
<i>Hyptis suaveolens</i>	Fam. Lamiaceae	Nº COL: 516302
<i>Lippia alba</i>	Fam. Verbenaceae	Nº COL: Pendiente

### 3.2 Secado del material vegetal

Para la extracción, se empleó material vegetal seco, previamente seleccionado y pesado. El material vegetal cortado, se secó a temperatura ambiente, durante 15 días, midiendo su peso en el transcurso de ese periodo siempre a la misma hora, hasta la máxima pérdida de humedad (**Véase Figura 20**).



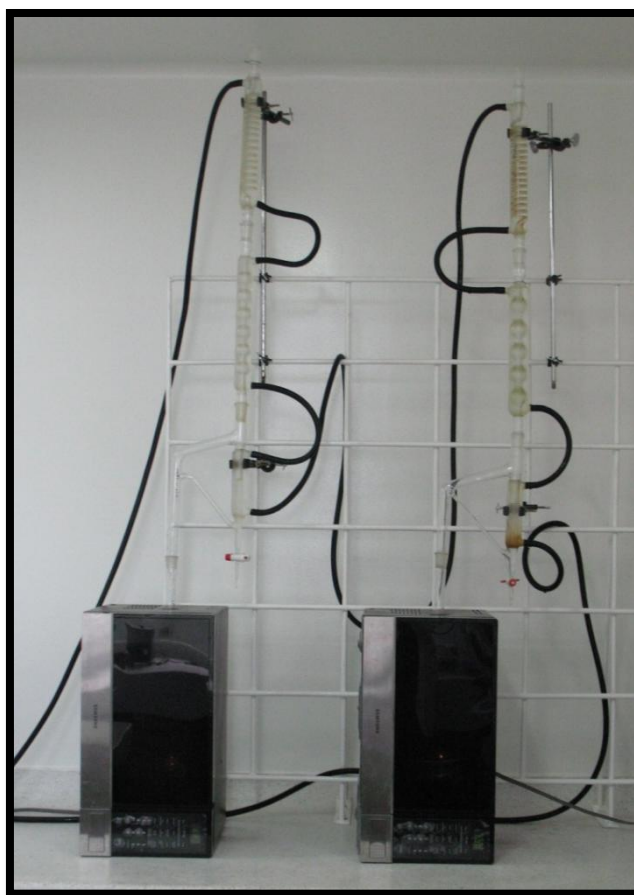
**Figura 20.** Porcentaje de peso perdido en el proceso de secado a temperatura ambiente.

### 3.3 Obtención de metabolitos secundarios por MWHD

Debido a que todas las pruebas se realizaron por triplicado, para obtener datos de reproducibilidad, se tomaron tres cantidades de material vegetal, cuyos pesos correspondientes variaron dependiendo del tipo de planta utilizada.

Determinada cantidad de cada material se depositó en un balón aforado distinto de 2 L, con 300 mL de agua, el cual se conectó a un equipo tipo *Clevenger* con reservorio de destilación *Dean-Stark*, adaptado a un sistema de calentamiento por

la radiación de microondas en un horno convencional (SAMSUNG, modelo MS-1242zk, 1200 W de potencia), en el que cada balón fue sometido a una radiación aproximada de 720 W en tres intervalos, cada uno de 15 min, con un tiempo de reposo de 2 min, entre estos. Al finalizar el proceso, el AE fue separado por decantación y la humedad se eliminó añadiendo sulfato de sodio anhidro,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Al retirar el agua, el aceite se filtró y se extrajo una alícuota de 50  $\mu\text{L}$  en un tubo cónico, a la que se le agregaron 3  $\mu\text{L}$  de *Istd* (*n*-tetradecano); la mezcla se aforó a 1 mL con diclorometano para su respectivo análisis cromatográfico. El montaje del equipo de destilación se observa en la **Figura 21**.



**Figura 21.** Montaje de hidrodestilación asistida por la radiación de microondas. Fotografía tomada por Mario A. Llinás. Lugar: CENIVAM, UIS. Fecha: Octubre de 2011.

El rendimiento de cada uno de los aceites esenciales se determinó mediante la **Ecuación 1**.

$$\text{Rendimiento, \%} = \frac{W_{AE}}{W_{MV}} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

$W_{AE}$ = Peso del aceite esencial (g);  $W_{MV}$ = Peso del material vegetal (g).

### 3.4 Obtención de metabolitos secundarios por SFE

El material vegetal, previamente picado se pesó, y se depositó en un equipo Soxhlet de alta presión (J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.). Se introdujo el balón en la parte inferior de éste, posteriormente, se adicionaron 330 g de hielo seco, se ajustó la temperatura del dedo frío y se colocó en el sistema de SFE, que se selló herméticamente (Véase **Figura 22**); se situó el extractor en un baño de agua tibia a 50°C, con una altura de 7 cm, hasta presión de 1100 psi, que se mantuvo constante durante 2 h; transcurrido dicho tiempo, se retiró el cilindro del agua tibia y se colocó en un baño refrigerante hasta que la presión llegó a 500 psi, para comenzar la despresurización completa; luego, ya sin presión alguna dentro del cilindro, éste se destapó y el balón aforado se lavó con diclorometano para obtener el extracto al que se le eliminó la humedad con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro; la mezcla se pasó a un vial, para su posterior análisis por GC-MS y GC-FID.



**Figura 22.** Equipo Soxhlet de alta presión (J & W Scientific) para la SFE con CO<sub>2</sub>. Fotografía tomada por Mario A. Llinás. Lugar: CENIVAM, UIS. Fecha: Octubre de 2011.

### 3.5 Obtención de metabolitos secundarios por SDE

En este procedimiento, el material vegetal, previamente secado y picado, se adicionó a un balón de fondo redondo, al cual se le agregaron 50 mL de agua y se instaló en el sistema SDE; posteriormente, se adicionaron 2 mL de diclorometano a una lágrima y se instaló en el montaje SDE; se añadió 1 mL de diclorometano al cuerpo del montaje para que éste hiciera sifón; luego, se calentaron tanto el balón (116°C), como la lágrima (66°C), simultáneamente, durante 2 h, desde el primer momento en que el agua presente en el material vegetal llegó a su punto de

ebullición; transcurrido dicho tiempo el sistema se dejó enfriar y el diclorometano encontrado en la lágrima se pasó a un tubo cónico en el que se concentró con nitrógeno gaseoso hasta 0.5 mL, al que se le agregaron 3  $\mu$ L de *Istd* (*n*-tetradecano), la mezcla luego se aforó a 1 mL con diclorometano, que fue transferido a un vial, para su respectivo análisis cromatográfico. En la **Figura 23** se observa el montaje del equipo para SDE.



**Figura 23.** Montaje de destilación-extracción con solvente simultánea. Fotografía tomada por Mario A. Llinás. Lugar: CENIVAM, UIS. Fecha: Octubre de 2011.

### 3.6 Análisis cromatográfico

Para la respectiva caracterización química de los aceites esenciales y extractos obtenidos, las muestras se sometieron a un proceso de separación cromatográfica usando dos columnas de diferente polaridad.

El análisis cromatográfico se llevó a cabo en un equipo *Agilent Technologies 6890 Plus* (Palo Alto, California, EE.UU.), acoplado a un detector selectivo de masas (MSD) *Agilent Technologies 5973 Plus*.

La separación de los analitos de la mezcla se realizó en una columna capilar apolar DB-5MS de 60 m x 0.25 mm (di) x 0.25  $\mu\text{m}$  ( $d_f$ ) con fase estacionaria apolar de 5%-fenil-poli(dimetilsiloxano) y una columna capilar polar DB-WAX de 60 m x 0.25 mm (di) x 0.25  $\mu\text{m}$  con fase estacionaria de poli(etilenglicol).

El gas de arrastre empleado en el análisis fue helio (99.995%, Linde, Bucaramanga), con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 113.3 kPa y una velocidad lineal de 26  $\text{cm s}^{-1}$ . La temperatura del horno del cromatógrafo de gases se programó así: el calentamiento inició a 45°C (5 min) y luego a 5°C/min, la temperatura se elevó a 250°C.

Los espectros de masas se obtuvieron por impacto de electrones con la energía de 70 eV. Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia permanecieron a 230 y 285°C, respectivamente. Los espectros de masas y corrientes iónicas reconstruidas (TIC) fueron obtenidos en un cuádruplo, por medio de barrido automático de radiofrecuencia (*full scan*), en el rango de masas de  $m/z$  40-350.

### 3.7 Caracterización

La identificación de los metabolitos presentes en los AE y extractos se llevó a cabo comparando sus espectros de masas con los registrados en las bases de datos (ADAMS, NIST02 y Wiley), o en reportes bibliográficos.

### 3.8 Cuantificación

La cuantificación de los metabolitos identificados se realizó mediante estandarización interna, empleando *n*-tetradecano, como patrón interno, según la **Ecuación 2**:

$$C_x = \frac{C_{istd} \times A_x}{A_{istd}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

$C_x$ : Concentración (g/L) del analito en la muestra;

$C_{istd}$ : Concentración (g/L) del patrón interno (*istd*);

$A_x$ : Área del pico cromatográfico del analito, cuentas;

$A_{istd}$ : Área del pico cromatográfico del patrón interno, cuentas.

### 3.9 Identificación

La identificación de los analitos presentes en el aceite esencial se realizó por comparación de sus índices de retención y patrones de fragmentación en los espectros de masas obtenidos, con los existentes en las librerías de espectros, y/o en la literatura [2].

Los índices de retención, 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>, que se corrieron en el GC bajo las mismas condiciones operacionales que los aceites esenciales. Para su determinación se empleó la **Ecuación 3**.

$$I_R = 100_n + 100 \left[ \frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \right] \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

$I_R$ : 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  $x$ .

## 4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Después del corte y secado del material vegetal, los AE y extractos se obtuvieron de los tallos y hojas de *L. alba*, *H. mutabilis* e *H. suaveolens* mediante las técnicas de MWHD, SFE y SDE, respectivamente. Se utilizaron plantas cultivadas y recolectadas en el Complejo Agroindustrial Piloto de CENIVAM, campus principal de la UIS, en la ciudad de Bucaramanga, Departamento de Santander.

### 4.1 Secado del material vegetal

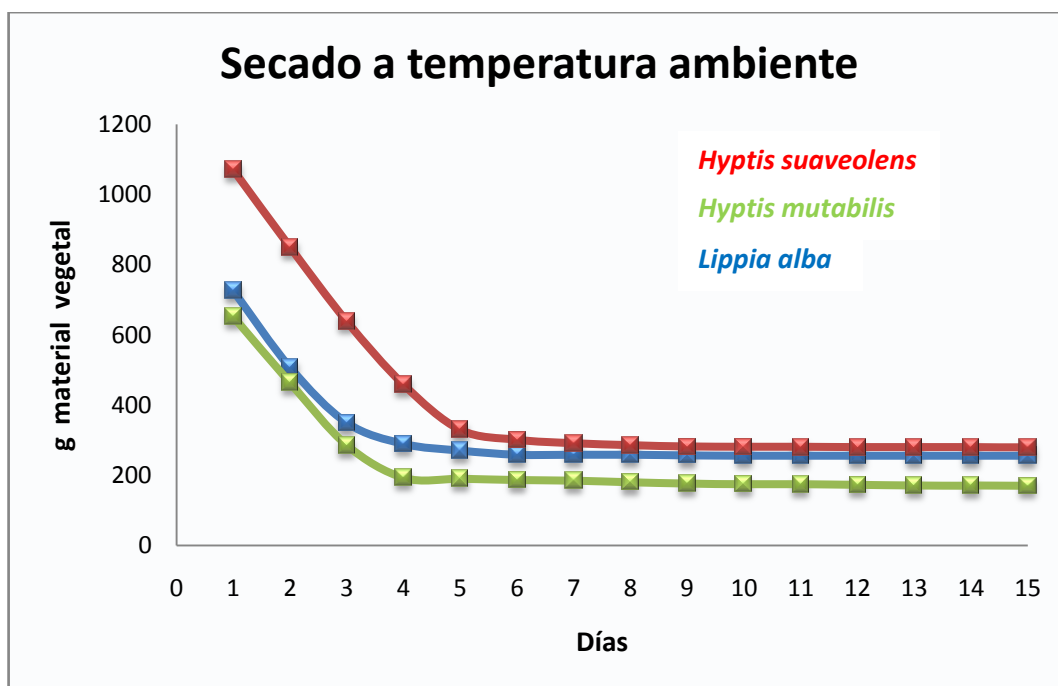
Las plantas *L. alba*, *H. mutabilis* e *H. suaveolens*, recolectadas de las parcelas experimentales del CENIVAM (Véase **Figura 24**), fueron cortadas después de 6 meses de cultivo, durante la etapa de su floración. Todo el material cortado se secó.



**Figura 24.** Ubicación del área de estudio de las especies *L. alba*, *H. mutabilis* e *H. suaveolens*, cultivadas en el Complejo Agroindustrial Piloto de CENIVAM. Fotografías tomadas por Mario A. Llinás. Lugar: CENIVAM, UIS. Fecha: Octubre de 2011.

El proceso de secado fue una buena opción, debido a que se logró evitar el desarrollo de hongos y microorganismos en las plantas. En este caso, el material vegetal se dejó secar durante un periodo de 15 días, a temperatura ambiente, bajo sombra y con buena aireación; sin embargo, este proceso se realizó también con la finalidad de que el experimento sea reproducible en el momento de hacer las destilaciones y extracciones mediante MWHD, SFE o SDE, para así obtener resultados confiables.

En la **Figura 25**, se observa la pérdida de humedad de cada una de las plantas con el transcurrir de los días hasta que ésta se seca.



**Figura 25.** Pérdida de peso (g) de material vegetal mediante secado a temperatura ambiente y a la sombra durante 15 días de las plantas *H. suaveolens*, *H. mutabilis* y *L. alba*, cultivadas en la ciudad de Bucaramanga, Departamento de Santander, Complejo Agroindustrial Piloto de CENIVAM, UIS.

## 4.2 Estudio de la reproducibilidad de los tiempos de retención, áreas de los picos cromatográficos e índices de retención experimentales.

Para estudiar la reproducibilidad en la integración de las áreas cromatográficas y tiempos de retención, se inyectó al cromatógrafo de gases cada muestra, obtenida por triplicado, de aceite esencial y extracto, para su análisis. Esta investigación permitió validar el método cromatográfico empleado. En las **Tablas 6-12** se resumen los resultados de este estudio.

**Tabla 6.** Reproducibilidad de los índices de retención, tiempos de retención, áreas cromatográficas y cantidades relativas (%) de algunos componentes del extracto de *L. alba* obtenido por SDE (n=3).

Compuesto	IR prom.	t <sub>R</sub> prom, min	Área* prom.	Cantidad relativa, %	σ		CV (%)	
					t <sub>R</sub> (min)	Área*	t <sub>R</sub>	Área*
β-Mirceno	993	21,868	3335	15,9	0,003	2	0,01	0
p-Cimeno	1020	22,962	240	1,1	0,001	2	0,00	1
Limoneno	1034	23,554	247	1,2	0,003	1	0,01	0
trans-β-Ocimeno	1050	24,188	201	0,4	0,002	1	0,01	1
p-Cimeno	1094	25,987	91	0,4	0,001	1	0,00	1
Linalool	1101	26,268	824	3,9	0,001	1	0,00	0
Mircenona	1153	28,227	8563	39,9	0,006	1	0,02	0
Borneol	1166	28,719	100	0,5	0,002	1	0,01	0
α-Terpineol	1198	29,952	72	0,3	0,000	1	0,00	1
Verbenona	1212	30,464	92	0,4	0,001	1	0,00	1
cis-Ocimenona	1235	31,331	1937	9,2	0,001	2	0,00	0
trans-Ocimenona	1243	31,658	2387	11,4	0,007	1	0,02	0
Acetato de bornilo	1280	33,010	119	0,6	0,000	1	0,00	1
β-Elemeno	1406	37,609	464	2,2	0,000	2	0,00	0
Aromadendreno	1442	38,765	295	1,4	0,001	1	0,00	0
trans-β-Farneseno	1462	39,400	89	0,4	0,001	1	0,00	2
γ-Muuroleno	1484	40,103	62	0,3	0,001	1	0,00	2
Germacreno D	1503	40,712	1623	7,7	0,006	1	0,02	0

\* Cuentas

**Tabla 7.** Reproducibilidad de los índices de retención, tiempos de retención, áreas cromatográficas y cantidades relativas (%) de algunos componentes del extracto de *L. alba* obtenido por SFE (n=3).

Compuesto	IR prom.	t <sub>R</sub> prom, min	Área* prom.	Cantidad relativa, %	σ		CV (%)	
					t <sub>R</sub> (min)	Área*	t <sub>R</sub>	Área*
β-Mirceno	992	21,813	174	9,4	0,001	1	0,00	0
p-Cimeno	1020	22,960	18	1,0	0,003	0	0,01	0
Limoneno	1034	23,547	13	0,7	0,002	0	0,01	1
Linalool	1100	26,247	3	1,8	0,001	1	0,01	2
Ipsdienol	1148	28,055	68	3,7	0,002	0	0,01	0
Mircenona	1151	28,178	940	50,7	0,002	0	0,01	0
cis-Ocimenona	1233	31,277	18	1,0	0,004	0	0,01	1
trans-Ocimenona	1237	31,425	17	0,9	0,002	0	0,01	0
β-Elemeno	1405	37,594	95	5,1	0,001	0	0,00	0
trans-β-Cariofileno	1439	38,666	13	0,7	0,001	0	0,00	2
Aromadendreno	1441	38,752	60	3,2	0,002	0	0,01	0
trans-β-Farneseno	1450	39,011	10	0,5	0,003	0	0,01	1
allo-Aromadendreno	1461	39,392	20	1,1	0,002	0	0,01	0
Germacreno D	1483	40,097	15	19,3	0,002	0	0,01	1
Biciclogermacreno	1502	40,677	358	0,8	0,001	0	0,00	0

\* Cuentas

**Tabla 8.** Reproducibilidad de los índices de retención, tiempos de retención, áreas cromatográficas y cantidades relativas (%) de algunos componentes del extracto de *L. alba* obtenido por MWHD (n=3).

Compuesto	IR prom.	t <sub>R</sub> prom, min	Área* prom.	Cantidad relativa, %	σ		CV (%)	
					t <sub>R</sub> (min)	Área*	t <sub>R</sub>	Área*
β-Mirceno	993	21,862	2879	11,2	0,00	41	0,01	1
p-Cimeno	1020	22,962	314	1,2	0,00	3	0,00	1
Limoneno	1034	23,551	235	0,9	0,00	1	0,01	0
trans- β-Ocimeno	1050	24,186	69	0,3	0,00	2	0,00	3
p-Cimeno	1094	25,985	114	0,4	0,00	1	0,00	1
Linalool	1101	26,274	795	3,1	0,00	1	0,00	0
Mircenona	1155	28,315	16696	63,1	0,00	16	0,00	0
cis-Ocimenona	1234	31,314	1224	4,8	0,00	2	0,00	0
trans-Ocimenona	1238	31,441	159	0,6	0,00	2	0,00	1
C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O**	1242	31,609	655	2,6	0,00	1	0,01	0
β-Elemeno	1406	37,608	352	1,4	0,00	0	0,00	0
trans-β-Farneseno	1442	38,761	219	0,9	0,00	1	0,00	1
Germacreno D	1503	40,705	1213	4,7	0,00	1	0,01	0

\* Cuentas

\*\* Identificado tentativamente

**Tabla 9.** Reproducibilidad de los índices de retención, tiempos de retención, áreas cromatográficas y cantidades relativas (%) de algunos componentes del extracto de *H. suaveolens* obtenido por SDE (n=3).

Compuesto	IR prom.	t <sub>R</sub> prom, min	Área* prom.	Cantidad relativa, %	σ		CV (%)	
					t <sub>R</sub> (min)	Área*	t <sub>R</sub>	Área*
α-Tujeno	931	19,167	95	1,2	0,0000	1	0,0000	1
α-Pineno	939	19,533	541	6,8	0,0007	2	0,0036	1
α-Fencheno	953	20,124	20	0,3	0,0007	0	0,0035	2
Canfeno	955	20,213	57	0,7	0,0007	0	0,0035	0
β-Pineno	978	21,230	217	2,7	0,0007	1	0,0033	1
α-Felandreno	1009	22,546	1069	13,5	0,0049	1	0,0220	0
α-Terpineno	1021	23,037	24	0,3	0,0007	0	0,0031	3
p-Cimeno	1029	23,343	89	1,1	0,0014	1	0,0061	1
Limoneno	1035	23,574	647	8,2	0,0049	1	0,0210	0
1,8-Cineol	1036	23,627	630	8,0	0,0049	1	0,0209	0
Fenchona	1096	26,089	2409	30,5	0,0049	1	0,0190	0
Alcanfor	1155	28,326	145	1,8	0,0007	0	0,0025	0
Borneol	1176	29,123	20	0,3	0,0000	0	0,0000	2
Terpinen-4-ol	1186	29,504	62	0,8	0,0007	0	0,0024	1
α-Terpineol	1203	30,127	24	0,3	0,0014	0	0,0047	2
α-Gurjuneno	1406	37,602	55	0,7	0,0000	0	0,0000	1
Aromadendreno	1442	38,779	736	9,3	0,0021	0	0,0055	0
α-Humuleno	1476	39,863	103	1,3	0,0007	1	0,0018	1
Germacreno D	1502	40,679	103	1,3	0,0000	1	0,0000	1
Óxido de cariofileno	1610	43,746	280	3,5	0,0000	0	0,0000	0

\* Cuentas

**Tabla 10.** Reproducibilidad de los índices de retención, tiempos de retención, áreas cromatográficas y cantidades relativas (%) de algunos componentes del extracto de *H. suaveolens* obtenido por SFE (n=3).

Compuesto	IR prom.	t <sub>R</sub> prom, min	Área* prom.	Cantidad relativa, %	σ		CV (%)	
					t <sub>R</sub> (min)	Área*	t <sub>R</sub> (min)	Área*
Fenchona	1095	26,034	58	6,4	0,0007	1	0,00	1
Aromadendreno	1441	38,753	81	9,0	0,0021	1	0,01	0
α-Humuleno	1476	39,852	12	1,3	0,0021	1	0,01	1
Germacreno D	1501	40,669	14	1,6	0,0014	1	0,00	2
Óxido de Cariofileno	1606	43,643	10	1,1	0,0007	1	0,00	3
Epóxido de humuleno II	1610	43,732	58	6,4	0,0028	1	0,01	0
C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O**	1637	44,432	9	0,9	0,0014	1	0,00	2
α-Cadinol	1680	45,521	18	1,9	0,0007	1	0,00	3
Diterpeno, C <sub>20</sub> H <sub>32</sub>	1956	51,674	7	0,8	0,0021	1	0,00	4
C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub> **	2055	53,640	14	1,5	0,0000	1	0,00	2
Abietatrieno**	2097	54,455	14	1,6	0,0035	1	0,01	3
Abieta-8(14),13(15)-dieno*	2176	56,149	44	4,9	0,0021	1	0,00	1
C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O**	2272	58,410	48	5,3	0,0014	1	0,00	1
C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O**	2306	59,201	23	2,6	0,0014	1	0,00	3
C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O**	2316	59,409	195	21,5	0,0778	1	0,13	0
C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O**	2410	61,352	132	14,6	0,0594	1	0,10	0
C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O**	2447	62,123	110	12,1	0,0665	1	0,11	1
C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub> **	2486	62,934	57	6,3	0,0672	1	0,11	1

\* Cuentas

\*\* Identificados tentativamente

**Tabla 11.** Reproducibilidad de los índices de retención, tiempos de retención, áreas cromatográficas y cantidades relativas (%) de algunos componentes del extracto de *H. mutabilis* obtenido por SFE (n=3).

Compuesto	IR prom.	t <sub>R</sub> prom, min	Área* prom.	Cantidad relativa, %	σ		CV (%)	
					t <sub>R</sub> (min)	Área*	t <sub>R</sub> (min)	Área*
α-Pineno	939	19,522	8	2,2	0,000	1	0,000	3
α-Copaeno	1393	37,141	6	1,9	0,002	1	0,006	8
trans- β-Cariofileno	1405	37,574	155	43,2	0,002	1	0,006	1
γ-Elemeno	1442	38,749	88	24,6	0,003	2	0,007	2
Aromadendreno	1455	39,185	6	1,9	0,004	1	0,009	7
α-Humuleno	1476	39,849	9	2,7	0,002	1	0,005	2

Continuación **Tabla 11.**

Compuesto	IR prom.	t <sub>R</sub> prom, min	Área* prom.	Cantidad relativa, %	σ		CV (%)	
					t <sub>R</sub> (min)	Área*	t <sub>R</sub> (min)	Área*
Germacreno D	1501	40,667	44	12,4	0,003	1	0,007	1
α-Bulneseno	1509	40,879	6	1,7	0,001	2	0,003	3
Biclogermacreno	1513	40,985	21	7,7	0,001	1	0,003	4
δ-Cadineno	1525	41,330	6	1,7	0,013	1	0,033	9

\* Cuentas

**Tabla 12.** Reproducibilidad de los índices de retención, tiempos de retención, áreas cromatográficas y cantidades relativas (%) de algunos componentes del extracto de *H. mutabilis* obtenido por SDE (n=3).

Compuesto	IR prom.	t <sub>R</sub> prom, min.	Área* prom.	Cantidad relativa, %	σ		CV (%)	
					t <sub>R</sub> (min)	Área*	t <sub>R</sub> (min)	Área*
α-Pineno	940	19,569	2734	20,5	0,001	79	0,0	3
Sabineno	979	21,240	150	1,1	0,001	1	0,0	1
β-Pineno	983	21,431	113	0,8	0,000	1	0,0	1
Limoneno	1034	23,551	69	0,5	0,000	1	0,0	1
cis- β-Ocimeno	1039	23,739	85	0,6	0,000	2	0,0	2
trans- β-Ocimeno	1050	24,192	40	0,3	0,001	2	0,0	5
α-Cubeneno	1351	35,642	126	0,9	0,002	1	0,0	1
C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> **	1364	36,095	99	0,7	0,001	1	0,0	1
α-Copaeno	1393	37,153	99	0,7	0,001	1	0,0	1
trans- β-Cariofileno	1406	37,621	1590	11,7	0,001	2	0,0	1
γ-Elemeno	1443	38,816	2258	16,6	0,003	1	0,0	0
α-Guaieno	1449	38,978	380	2,8	0,000	1	0,0	1
Aromadendreno	1455	39,198	89	0,7	0,001	2	0,0	2
α-Humuleno	1476	39,867	223	1,7	0,001	2	0,0	1
γ-Curcumeno	1495	40,471	197	1,5	0,002	2	0,0	1
Germacreno D	1503	40,722	1666	12,3	0,003	1	0,0	0
Curzereno	1509	40,895	134	1,0	0,001	2	0,0	1
Biclogermacreno	1515	41,046	1997	14,7	0,002	1	0,0	0
α-Bulneseno	1519	41,164	275	2,0	0,000	1	0,0	1
γ-Cadineno	1522	41,273	36	0,3	0,001	2	0,0	6
δ-Cadineno	1525	41,355	105	0,8	0,001	1	0,0	1

\* Cuentas

\*\* Identificados tentativamente

En las **Tablas 6-12** se muestran los valores de t<sub>R</sub> promedio, IR, área cromatográfica promedio, cantidad relativa (%) y desviación estándar (σ) de

algunos constituyentes del aceite esencial y extractos obtenidos de *L. alba*, *H. mutabilis* e *H. suaveolens* por cromatografía de gases con FID.

También, se presentan los coeficientes de variación (CV, %) para los tiempos de retención de algunos componentes del aceite y de los extractos. Como se puede observar, estos valores no exceden el 2%, valor máximo establecido por las normas GLP (*Good Laboratory Practice*; Buenas Prácticas de Laboratorio), por lo tanto, se mostró una reproducibilidad alta en el análisis cromatográfico empleado en esta investigación.

Así mismo, según las normas GLP, los coeficientes de variación (CV) para áreas de picos cromatográficos no deben superar el 10%; lo que se observó en este trabajo, en las **Tablas 6-12**, cuyos datos indican, una repetibilidad alta, en los análisis cromatográficos de los AE y extractos estudiados (CV<3%).

### **4.3 Rendimiento del aceite esencial de *L. alba*.**

Los rendimientos de los aceites esenciales obtenidos de plantas colectadas en el Complejo Agroindustrial Piloto de CENIVAM, permitieron estimar lo que se puede esperar, en cuanto a la rentabilidad, de esta especie vegetal.

El rendimiento del AE se halló dividiendo el peso del AE obtenido sobre el peso de material vegetal (MV) introducido en el balón de extracción. Los rendimientos se mantuvieron constantes a lo largo del estudio, tal como lo muestra la **Tabla 13**. Para calcular el rendimiento, se utilizó la siguiente **ecuación**:

$$\text{Rendimiento} = \frac{W_{AE}}{W_{MV}} \times 100\%$$

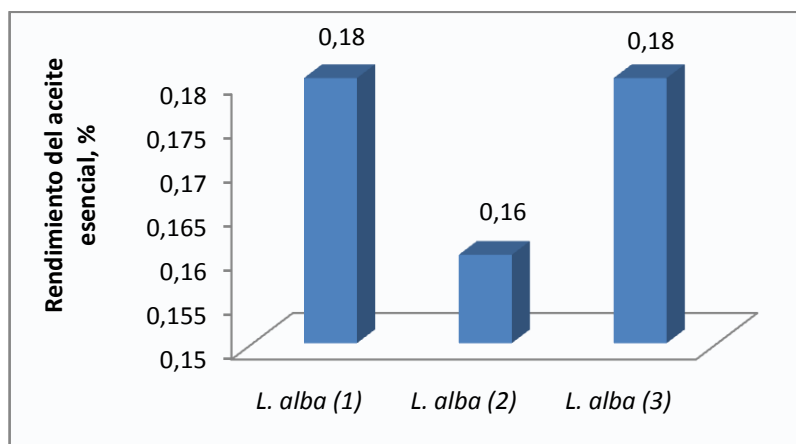
Donde:

$W_{AE}$ = Peso del aceite esencial (g);  $W_{MV}$ = Peso del material vegetal (g).

**Tabla 13.** Rendimientos de los aceites esenciales de *L. alba* obtenidos de plantas colectadas en el Complejo Agroindustrial Piloto de CENIVAM.

Planta bajo estudio	Parte de la planta	Material vegetal, g	Tiempo de extracción, min	AE obtenido, g	Rendimiento, %
<i>Lippia alba</i>	Hojas, flores y tallos	198	45	0.35	0.18
		197		0.31	0.16
		198		0.35	0.18

En la **Figura 26**, se observan los rendimientos del aceite esencial de *L. alba* obtenidos en tres experimentos independientes. La mircenona fue el compuesto mayoritario de este aceite. Se puede resaltar, que el rendimiento obtenido fue muy similar en las tres extracciones, que se hicieron mediante la técnica de MWHD.



**Figura 26.** Rendimientos de los aceites esenciales obtenidos por MWHD de *L. alba* de plantas cultivadas en el Complejo Agroindustrial Piloto de CENIVAM.

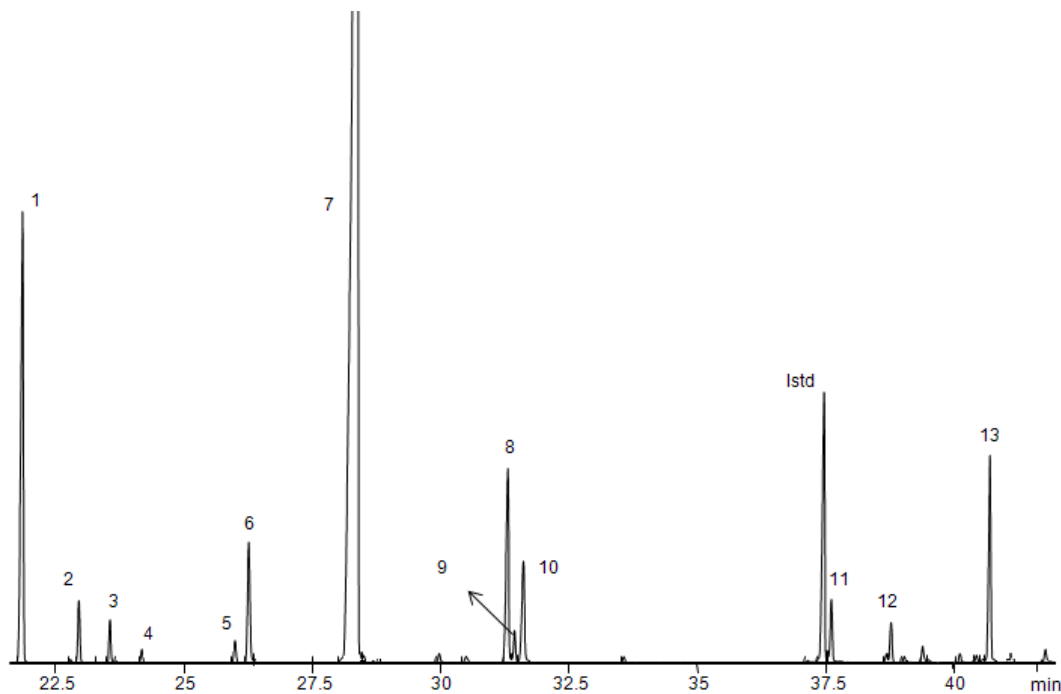
#### 4.4 Caracterización general de los aceites esenciales y extractos

La identificación preliminar de los componentes de los AE y extractos aislados de *L. alba*, *H. suaveolens* e *H. mutabilis* se realizó con base sus índices de retención lineales calculados experimentalmente y usando el criterio espectroscópico mediante la comparación de los espectros de masas experimentales y reportados en diferentes bases de datos (ADAMS, NIST y Wiley).

##### 4.4.1 Identificación de los metabolitos secundarios volátiles de *L. alba*, aislados por MWHD.

Los metabolitos secundarios encontrados en mayor proporción en la *L. alba* recolectada, secada y tratada, fueron los mismos aislados por cada una de las otras técnicas de extracción empleadas; entre los principales se encuentran el mirceno, mircenona, ocimenona y germacreno D. Una mezcla de isómeros, mircenona y *cis*- y *trans*-ocimenonas, conocida como tagetenona, compuesto mayoritario de *L. alba* estudiada en este trabajo, corresponde al quimiotipo de esta planta que se encuentra en Argentina y Guatemala.

En la **Figura 27**, se presenta el perfil cromatográfico típico del aceite esencial de *L. alba*, obtenido por el método de MWHD. La identificación de los compuestos presentes en el aceite se llevó a cabo utilizando los índices de retención lineales calculados en dos columnas, apolar (DB-5MS) y polar (DB-WAX). Los siguientes fueron los parámetros de integración aplicados: umbral de integración, *Thshd*=15, y “área de rechazo” del pico sobre la línea base igual a 0.1. En la **Tabla 14**, se presenta la composición química del AE de *L. alba*.



**Figura 27.** Perfil cromatográfico típico del AE de *L. alba*, obtenido por MWHD. Columna DB-5 (60 m). *Split* 1:30. La identificación de los picos aparece en la **Tabla 14.**

**Tabla 14.** Composición química del AE de *L. alba*, obtenido por MWHD.

Nº pico	$t_R$ , min <sup>a</sup>	IR			Área relativa, % <sup>c</sup>	Compuesto
		DB-5		DB-WAX		
		Lit. [2]	Exp. <sup>b</sup>	Exp.		
1	21,862	990	993	1064	11,0	$\beta$ -Mirceno
2	22,962	1020	1020	1172	1,2	<i>p</i> -Cimeno
3	23,551	1029	1034	1105	0,9	Limoneno
4	24,186	1044	1050	1250	0,3	<i>trans</i> - $\beta$ -Ocimeno
5	25,985	1088	1094	1338	0,4	<i>p</i> -Cimeno
6	26,274	1095	1101	1453	3,1	Linalool
7	28,315	1145	1155	1479	63,1	Mircenona
8	31,314	1226	1234	1568	4,8	<i>cis</i> -Ocimenona
9	31,441	1235	1238	1578	0,6	<i>trans</i> -Ocimenona
10	31,609	-	1242	-	2,3	**C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O
11	37,608	1391	1406	1580	1,3	$\beta$ -Elemeno
12	38,761	1443	1442	1668	0,8	<i>trans</i> - $\beta$ -Farneseno
13	40,705	1485	1503	1705	4,5	Germacreno D

\*\*Identificado tentativamente

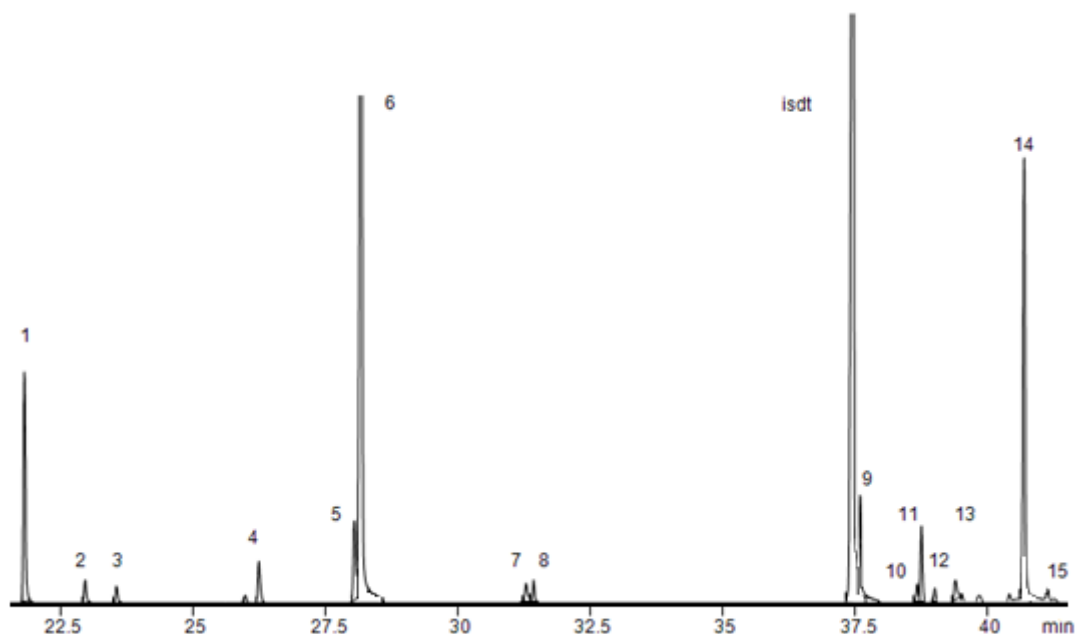
- a. Tiempos de retención, determinados experimentalmente en la columna apolar DB-5.
- b. Índices de retención lineales, determinados experimentalmente en la columna apolar DB-5.
- c. Porcentajes calculados con base en las áreas de los picos determinados en la columna apolar DB-5.

En la **Tabla 14**, se puede apreciar la cantidad relativa de los compuestos que se encuentran en cantidades mayores de 0.3%.

En el aceite esencial de *L. alba* se identificaron positivamente 13 compuestos, correspondientes al 94.3% del área cromatográfica total. Dentro de la totalidad de metabolitos secundarios volátiles, se encontraron 5 mayoritarios, a saber: la mircenona (63.1%), seguida de mirceno (11.0%), *cis*-ocimenona (4.8%), germacreno D (4.5%) y linalool (3.1%), que corresponden al 86.5% del área cromatográfica total.

#### 4.4.2 Identificación de los metabolitos secundarios volátiles de *L. alba*, aislados por SFE.

En la **Figura 28**, se presenta el perfil cromatográfico típico del extracto de *L. alba*, obtenido por el método de SFE. La identificación de los compuestos presentes en el extracto se llevó a cabo utilizando los índices de retención lineales, calculados en dos columnas, apolar (DB-5MS) y polar (DB-WAX). Los parámetros de integración aplicados fueron: umbral de integración,  $Thshd=15$ , y “área de rechazo” del pico sobre la línea base igual a 0.1. En la **Tabla 15**, se presenta la composición química del extracto de *L. alba* obtenido por SFE.



**Figura 28.** Perfil cromatográfico típico del extracto de *L. alba*, obtenido por SFE. Columna DB-5 (60 m). *Split* 1:30. La identificación de los picos aparece en la **Tabla 15**.

**Tabla 15.** Composición química del extracto de *L. alba*, obtenido por SFE.

Nº pico	$t_R$ , min <sup>a</sup>	IR			Área relativa, % <sup>c</sup>	Compuesto
		DB-5		DB-WAX		
		Lit. [2]	Exp. <sup>b</sup>	Exp.		
1	21,813	990	992	1065	9,4	$\beta$ -Mirceno
2	22,960	1020	1020	1172	1,0	<i>p</i> -Cimeno
3	23,547	1029	1034	1196	0,7	Limoneno
4	26,247	1095	1100	1452	1,8	Linalool
5	28,055	1140	1148	1469	3,7	Ipsdienol
6	28,178	1145	1151	1472	50,7	Mircenona
7	31,277	1226	1233	1560	1,0	<i>cis</i> -Ocimenona
8	31,425	1235	1237	1552	0,9	<i>trans</i> -Ocimenona
9	37,594	1391	1405	1578	5,1	$\beta$ -Elemeno
10	38,666	1419	1439	1597	0,7	<i>trans</i> - $\beta$ -Cariofileno
11	38,752	1439	1441	1642	3,2	Aromadendreno
12	39,011	1443	1450	1570	0,5	<i>trans</i> - $\beta$ -Farneseno
13	39,392	1466	1461	1657	1,1	<i>allo</i> -Aromadendreno
14	40,097	1485	1503	1704	19,3	Germacreno D
15	40,677	1500	1505	1740	0,8	Biclogermacreno

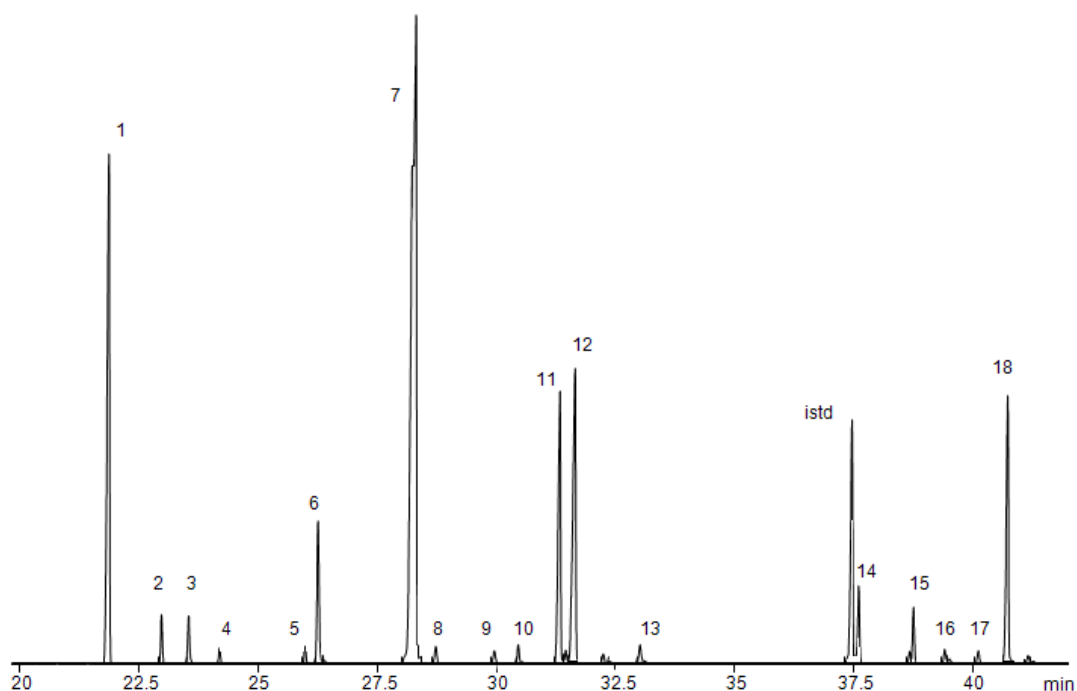
- a. Tiempos de retención, determinados experimentalmente en la columna apolar DB-5.
- b. Índices de retención lineales, determinados experimentalmente en la columna apolar DB-5.
- c. Porcentajes calculados con base en las áreas de los picos determinados en la columna apolar DB-5.

En la **Tabla 15**, se puede apreciar la cantidad relativa (%) de los compuestos que se encuentran en cantidades mayores de 0.3%.

Se identificaron positivamente 15 compuestos, correspondientes al 99% del área cromatográfica total. Dentro de la totalidad de metabolitos secundarios volátiles, se encontraron 5 mayoritarios, a saber: la mircenona (50.7%), seguida del germacreno D (19.3%), mirceno (9.4%),  $\beta$ -elemeno (5.1%) e ipsdienol (3.7%), que corresponden al 88.2% del área cromatográfica total.

#### 4.4.3 Identificación de los metabolitos secundarios volátiles de *L. alba*, aislados por SDE.

En la **Figura 29**, se presenta el perfil cromatográfico típico del extracto de *L. alba*, obtenido por el método de SDE. La identificación de los compuestos presentes en el extracto se llevó a cabo utilizando los índices de retención lineales, calculados en dos columnas, apolar (DB-5MS) y polar (DB-WAX). Los parámetros de integración aplicados fueron: umbral de integración,  $Thshd=15$ , y “área de rechazo” del pico sobre la línea base igual a 0.1. En la **Tabla 16**, se presenta la composición química del extracto de *L. alba* obtenido por SDE.



**Figura 29.** Perfil cromatográfico típico del extracto de *L. alba*, obtenido por SDE. Columna DB-5 (60 m). *Split* 1:30. La identificación de los picos aparece en la **Tabla 16**.

**Tabla 16.** Composición química del extracto de *L. alba*, obtenido por SDE.

Nº pico	$t_R$ , min <sup>a</sup>	IR			Área relativa, % <sup>c</sup>	Compuesto
		DB-5		DB-WAX		
		Lit. [2]	Exp. <sup>b</sup>	Exp.		
1	21,868	990	993	1064	15,9	Mirceno
2	22,962	1020	1020	1170	1,1	<i>p</i> -Cimeno
3	23,554	1029	1034	1196	1,2	Limoneno
4	24,188	1044	1050	1251	0,4	<i>trans</i> - $\beta$ -Ocimeno
5	25,987	1088	1094	1338	0,4	<i>p</i> -Cimeno
6	26,268	1095	1101	1450	3,9	Linalool
7	28,227	1145	1153	1482	39,9	Mircenona
8	28,719	1165	1166	1613	0,5	Borneol
9	29,952	1186	1198	1721	0,3	$\alpha$ -Terpineol
10	30,464	1204	1212	1725	0,4	Verbenona

Continuación, **Tabla 16.**

Nº pico	t <sub>R</sub> , min <sup>a</sup>	IR			Área relativa, % <sup>c</sup>	Compuesto
		DB-5		DB-WAX		
		Lit. [2]	Exp. <sup>b</sup>	Exp.		
11	31,331	1226	1235	1560	9,2	<i>cis</i> -Ocimenona
12	31,658	1235	1243	1587	11,4	<i>trans</i> -Ocimenona
13	33,010	1287	1280	1601	0,6	Acetato de bornilo
14	37,609	1391	1406	1575	2,2	β-Elemeno
15	38,765	1439	1442	1639	1,4	Aromadendreno
16	39,400	1443	1462	1672	0,4	<i>trans</i> -β-Farneseno
17	40,103	-	1484	1779	0,3	γ-Muuroleno
18	40,712	1485	1503	1705	7,7	Germacreno D

- Tiempos de retención, determinados experimentalmente en la columna apolar DB-5.
- Índices de retención lineales, determinados experimentalmente en la columna apolar DB-5.
- Porcentajes calculados con base en las áreas de los picos determinados en la columna apolar DB-5.

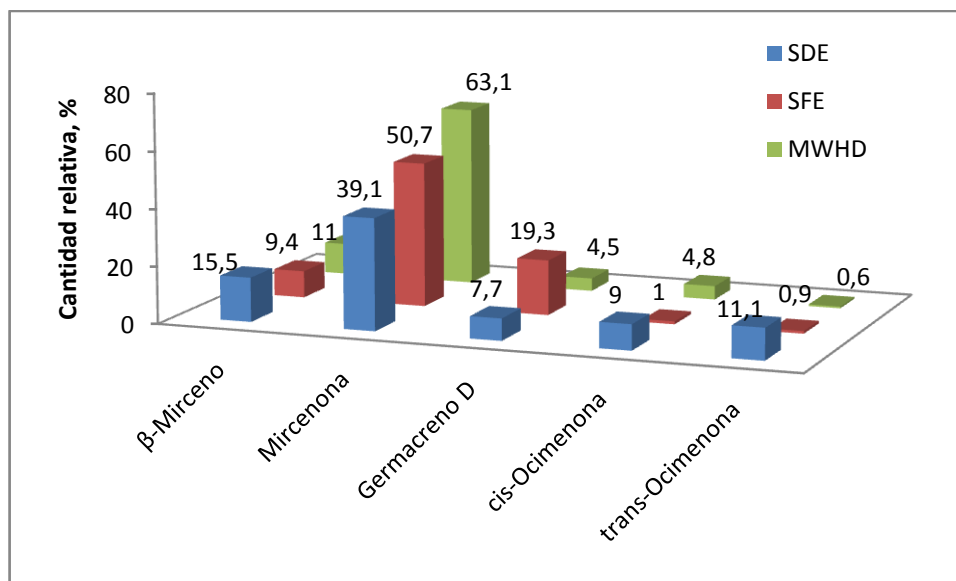
En la **Tabla 16**, se puede apreciar la cantidad relativa (%) de los compuestos que se encuentran en cantidades mayores de 0.3%.

Se identificaron positivamente 18 compuestos, correspondientes al 96.2% del área cromatográfica total. Dentro de la totalidad de metabolitos secundarios volátiles, se encontraron 5 mayoritarios, a saber: la mircenona (39.9%), seguida del mirceno (15.5%), *trans*-ocimenona (11.1%), *cis*-ocimenona (9.0%) y germacreno D (7.7%), que corresponden al 83.2% del área cromatográfica total.

Para la *L. alba* cultivada en Bucaramanga (Santander, Colombia), la mircenona fue el componente mayoritario aislado por las tres técnicas empleadas, seguida del mirceno, que también fue encontrado en alta proporción tanto en el AE como en los extractos obtenidos por SDE y SFE de esta planta.

Se encontró la mircenona en muy alta proporción (39.1%-63.1%). Este metabolito no es común en los AE y extractos aislados de *L. alba* cultivada en Colombia [15, 19, 20, 23, 93, 94]. En la literatura, este quimiotipo se encontró descrito, provenientes de plantas cultivadas o recolectadas en el campo en Guatemala y Argentina [81].

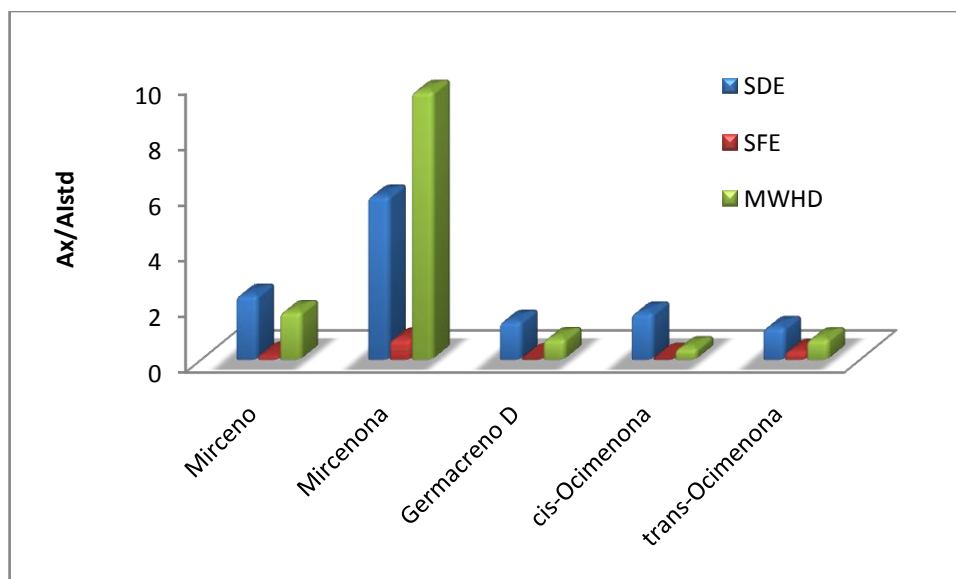
Otros de los compuestos mayoritarios detectados en el aceite y extractos obtenidos por tres técnicas de extracción fueron el germacreno D y los isómeros *cis*- y *trans*-ocimenonas. A continuación, se puede observar los componentes comunes aislados por las tres técnicas diferentes de extracción en la **Figura 30**.



**Figura 30.** Composición porcentual de los principales compuestos detectados en el aceite y los extractos obtenidos de *L. alba* por tres técnicas de extracción.

Los extractos SDE fueron ricos en monoterpenos, que son los más volátiles entre los metabolitos secundarios aislados, y, en general, ésta fue la técnica, con la cual se obtuvieron extractos con el número más alto de compuestos.

En la **Figura 31**, se comparan las áreas relativas ( $A_x/A_{istd}$ ) de compuestos aislados de la *L. alba* estudiada, por tres diferentes técnicas empleadas.



**Figura 31.** Relación  $A_x/A_{istd}$  de los principales compuestos comunes en los extractos obtenidos de la especie *L. alba*, utilizando las tres diferentes técnicas de extracción (Istd=*n*-tetradecano).

En la **Tabla 17** se encuentran los valores de cada una de las áreas determinadas con respecto al patrón interno, Istd= *n*-tetradecano.

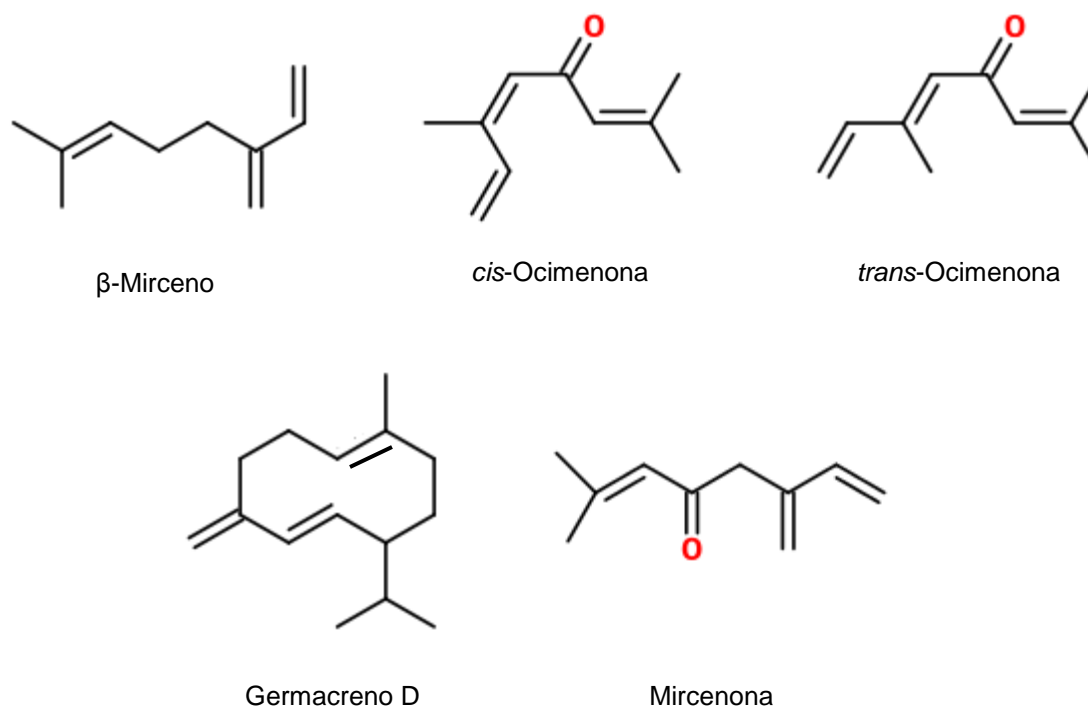
**Tabla 17.** Valores de áreas cromatográficas relativas determinadas con respecto al patrón interno (*n*-tetradecano).

	SDE	SFE	MWHD
<b>Mirceno</b>	2,26	0,12	1,67
<b>Mircenona</b>	5,82	0,69	9,59
<b>Germacreno D</b>	1,32	0,01	0,7
<b>cis-Ocimenona</b>	1,62	0,01	0,37
<b>trans-Ocimenona</b>	1,1	0,26	0,69

La mircenona, es el compuesto que se encontró en mayor proporción (39.1% - 63.1%) en el aceite (MWHD) y los extractos (SDE, SFE) obtenidos las tres técnicas diferentes de extracción.

El monoterpeno  $\beta$ -mirceno, fue el otro de los compuestos detectados que se encontró en proporción alta con respecto al patrón interno, sin embargo, en la técnica de SFE su cantidad aislada fue relativamente baja, en comparación con la obtenida por SDE o MWHD, lo cual puede ser atribuido a la volatilidad alta de este.

Las estructuras químicas de los principales compuestos presentes en el aceite y en los extractos de *L. alba* se muestran en la **Figura 32**.



**Figura 32.** Estructuras químicas de los principales compuestos presentes en los aceites esenciales y extractos obtenidos por MWHD, SDE y SFE de *L. alba*, respectivamente.

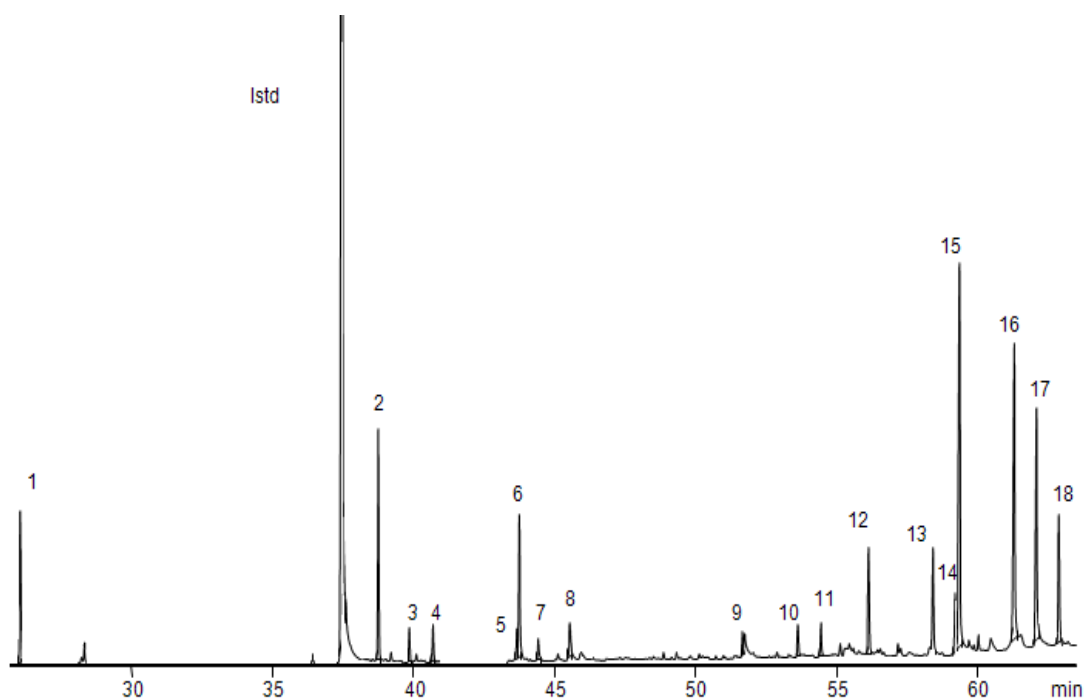
Ricciardi y sus colaboradores, en su publicación [81] sobre la composición química de los aceites esenciales de *L. alba* (Familia Verbenácea), realizados en Argentina, encontraron, como componentes mayoritarios, la mircenona (58%) y la *cis*-ocimenona (13.1%). El AE obtenido en el Laboratorio de Cromatografía de la UIS, por el autor de este trabajo, muestra también que el componente con cantidad relativa más alta fue la mircenona (63.1%), también acompañada de la *cis*-ocimenona (4.8%), pero en menor proporción que en el aceite de la *L. alba* cultivada en Guatemala.

A diferencia de los estudios realizados en Argentina [81], el  $\beta$ -mirceno fue (11.0%) es el segundo componente con mayor presencia en el aceite esencial de *L. alba*; este componente no aparece como mayoritario reportado por Senatore y colaboradores, pero sí se reportó como principal por Sing y colaboradores [89], en el aceite de *L. alba* cultivada en el Norte de la India [89].

En general, la composición química de los AE de *L. alba* extraídos por MWHD, de las plantas provenientes de las parcelas experimentales del CENIVAM, presentó una variación apreciable respecto a los principales compuestos encontrados en otros estudios realizados [15, 19, 20, 23, 93, 94]. Esta variabilidad de la composición, pudo haber sido influenciada por factores ecoagrícolas (condiciones de cultivo, altitud, temperatura, suelo, origen y edad de la planta) por cambios genético, la hipótesis, que habría que confirmar.

#### 4.4.4 Identificación de los metabolitos secundarios volátiles de *H. suaveolens*, aislados por SFE.

En la **Figura 33**, se presenta el perfil cromatográfico típico del extracto de *H. suaveolens*, obtenido por el método SFE. La identificación de los compuestos presentes en el extracto se llevó a cabo utilizando los índices de retención lineales, calculados en dos columnas, apolar (DB-5MS) y polar (DB-WAX). Los parámetros de integración aplicados fueron: umbral de integración, *Thshd*=15, y “área de rechazo” del pico sobre la línea base igual a 0.1. En la **Tabla 18**, se presenta la composición química del extracto de *H. suaveolens* obtenido por SFE.



**Figura 33.** Perfil cromatográfico típico del extracto de *H. suaveolens*, obtenido por SFE. Columna DB-5 (60 m). *Split* 1:30. La identificación de los picos aparece en la **Tabla 18**.

**Tabla 18.** Composición química del extracto de *H. suaveolens*, obtenido por SFE.

Nº pico	$t_R$ , min <sup>a</sup>	IR			Área relativa, % <sup>c</sup>	Compuesto
		DB-5		DB-WAX		
		Lit. [2]	Exp. <sup>b</sup>	Exp.		
1	26,034	1083	1095	1398	6,4	Fenchona
2	38,753	1439	1441	1640	9,0	Aromadendreno
3	39,852	1452	1476	1662	1,3	$\alpha$ -Humuleno
4	40,669	1485	1501	1708	1,6	Germacreno D
5	43,643	1582	1606	2008	1,1	Óxido de cariofileno
6	43,732	1608	1610	2006	6,4	Epóxido de humuleno II
7	44,432	N.I.	1637	2085	0,9	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O*
8	45,521	1676	1680	2221	1,9	$\alpha$ -Cadinol
9	51,674	1944	1956	-	0,8	Diterpeno hidrocarbonado I
10	53,640	2046	2055	-	1,5	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub> *
11	54,455	2082	2097	-	1,6	Abietatrieno*
12	56,149	2159	2176	-	4,9	Abieta-8(14),13(15)-dieno*
13	58,410	2269	2272	-	5,3	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O*
14	59,201	2285	2306	-	2,6	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O*
15	59,409	N.I.	2316	-	21,5	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O*
16	61,352	N.I.	2410	-	14,6	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O*
17	62,123	2428	2447	-	12,1	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O*
18	62,934	2493	2493	-	6,3	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub> *

\* Identificados tentativamente.

- Tiempos de retención mayores que el hidrocarburo lineal más pesado empleado, C<sub>25</sub>.

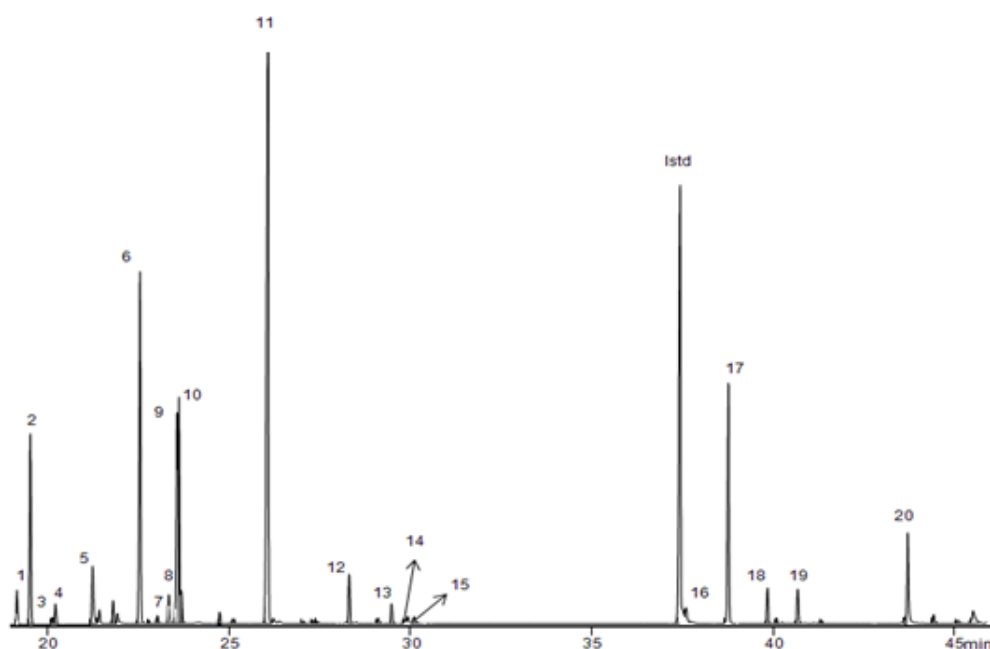
- Tiempos de retención, determinados experimentalmente en la columna apolar DB-5.
- Índices de retención lineales, determinados experimentalmente en la columna apolar DB-5.
- Porcentajes calculados con base en las áreas de los picos determinados en la columna apolar DB-5.

Se identificaron positivamente 18 compuestos, correspondientes al 98.9% del área cromatográfica total. Dentro de la totalidad de metabolitos secundarios volátiles, se encontraron 5 mayoritarios, de los cuales los tres principales (48.2%), en cuanto a su área relativa alta, se identificaron tentativamente como diterpenos, seguidos del

aromadendreno (9.0%) y la fenchona (6.4%), que correspondieron al 63.6% del área cromatográfica total.

#### 4.4.5 Identificación de los metabolitos secundarios volátiles de *H. suaveolens*, aislados por SDE.

En la **Figura 34**, se presenta el perfil cromatográfico típico del extracto de *H. suaveolens*, obtenido por el método SDE. La identificación de los compuestos presentes en el extracto se llevó a cabo utilizando los índices de retención lineales, calculados en dos columnas, apolar (DB-5MS) y polar (DB-WAX). Los parámetros de integración aplicados fueron: umbral de integración, *Thshd*=15, y “área de rechazo” del pico sobre la línea base igual a 0.1. En la **Tabla 19**, se presenta la composición química del extracto de *H. suaveolens* obtenido por SDE.



**Figura 34.** Perfil cromatográfico típico del extracto de *H. suaveolens*, obtenido por SDE. Columna DB-5 (60 m). *Split* 1:30. La identificación de los picos aparece en la **Tabla 19**.

**Tabla 19.** Composición química del extracto de *H. suaveolens*, obtenido por SDE.

Nº pico	t <sub>R</sub> , min <sup>a</sup>	IR			Área relativa, % <sup>c</sup>	Compuesto
		DB-5		DB-WAX		
		Lit. [2]	Exp. <sup>b</sup>	Exp.		
1	19,167	924	931	1023	1,2	α-Tujeno
2	19,533	932	939	1028	6,8	α-Pineno
3	20,124	945	953	1075	0,3	α-Fencheno
4	20,213	954	955	1083	0,7	Canfeno
5	21,230	974	978	1112	2,7	β-Pineno
6	22,546	1003	1009	1158	13,5	α-Felandreno
7	23,037	1014	1021	1164	0,3	α-Terpineno
8	23,343	1020	1029	1272	1,1	p-Cimeno
9	23,574	1029	1035	1196	8,2	Limoneno
10	23,627	1032	1036	1210	8,0	1,8-Cineol
11	26,089	1083	1096	1405	30,5	Fenchona
12	28,326	1141	1155	1496	1,8	Alcanfor
13	29,123	1165	1176	1718	0,3	Borneol
14	29,504	1174	1186	1628	0,8	Terpinen-4-ol
15	30,127	1186	1203	1695	0,3	α-Terpineol
16	37,602	1409	1406	1521	0,7	α-Gurjuneno
17	38,779	1439	1442	1641	9,3	Aromadendreno
18	39,863	1452	1476	1657	1,3	α-Humuleno
19	40,679	1485	1502	1708	1,3	Germacreno D
20	43,746	1582	1610	2008	3,5	Óxido de cariofileno

- Tiempos de retención, determinados experimentalmente en la columna apolar DB-5.
- Índices de retención lineales, determinados experimentalmente en la columna apolar DB-5.
- Porcentajes calculados con base en las áreas de los picos determinados en la columna apolar DB-5.

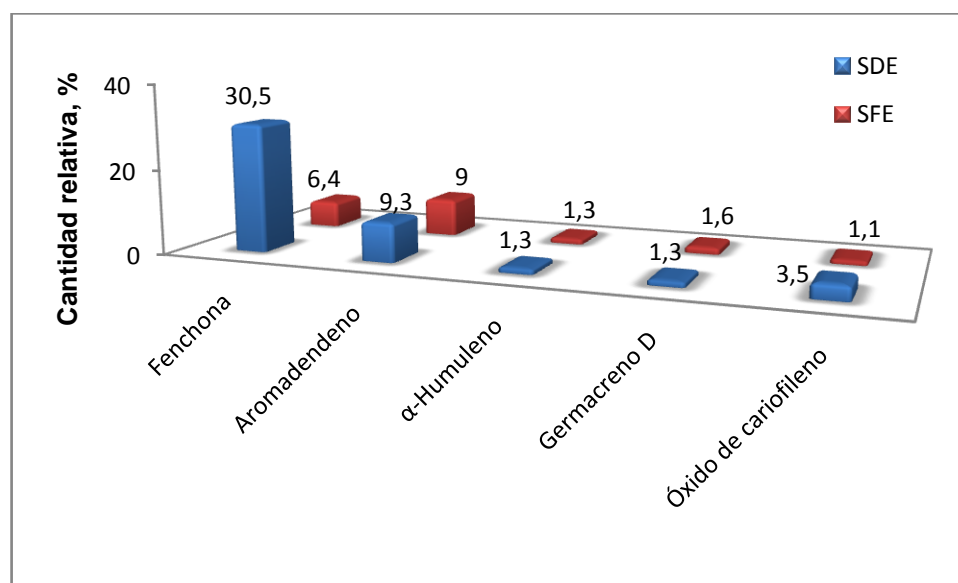
En la **Tabla 19** se puede apreciar la cantidad relativa de los compuestos que se encuentran en cantidades mayores de 0.3%.

Se identificaron positivamente 20 compuestos, correspondientes al 92.6% del área cromatográfica total. Dentro de la totalidad de metabolitos secundarios volátiles, se encontraron 5 mayoritarios, a saber: la fenchona (30.5%), seguida del α-

felandreno (13.5%), aromadendreno (9.3%), limoneno (8.2%) y 1,8-cineol (8.0%), que corresponden al 69.5% del área cromatográfica total.

Entre los compuestos comunes aislados por SFE y SDE, se encuentran la fenchona, presente en mayor cantidad relativa (%) aislada por las dos técnicas empleadas, seguida del aromadendreno. El  $\alpha$ -felandreno fue aislado por SDE en un alto porcentaje (13.5%), sin embargo, no se extrajo en cantidad detectable por SFE. El limoneno se aisló en cantidad relativa del 8.2%, por SDE, mientras que no se logró su extracción en cantidad detectable por la técnica SFE.

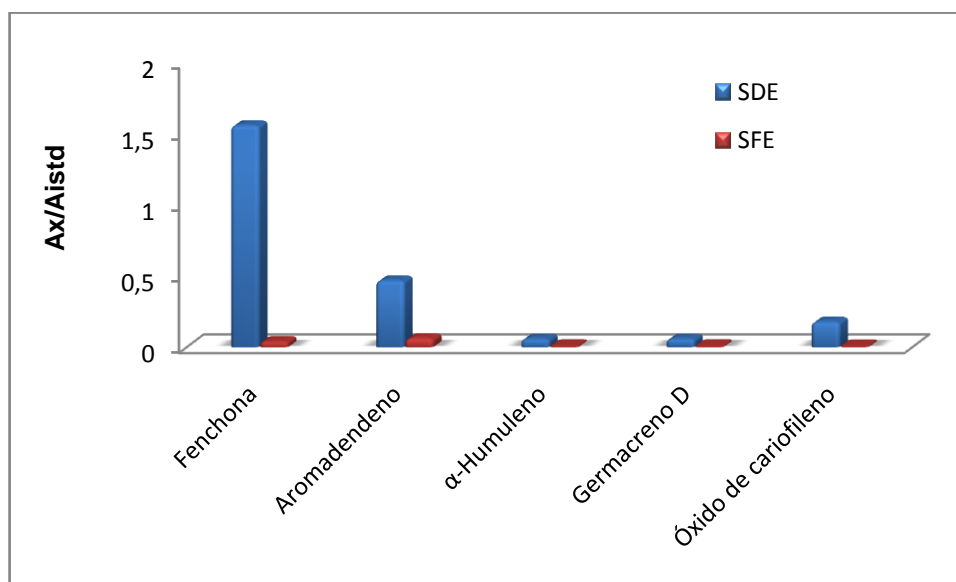
En la **Figura 35** se observan los principales componentes aislados por SFE y SDE de *H. suaveolens*.



**Figura 35.** Composición porcentual de los principales compuestos comunes detectados en los extractos obtenidos por SDE y SFE de *H. suaveolens*.

A diferencia de SDE, la técnica SFE permitió obtener extractos con alto contenido de compuestos semivolátiles como sesquiterpenos y diterpenos y sus derivados oxigenados, que no se encontraron en los demás extractos, pero estos se identificaron tentativamente.

En la **Figura 36**, se comparan las áreas cromatográficas relativas ( $A_x/A_{istd}$ ) de compuestos comunes presentes en los extractos obtenidos por SFE y SDE de *H. suaveolens*.



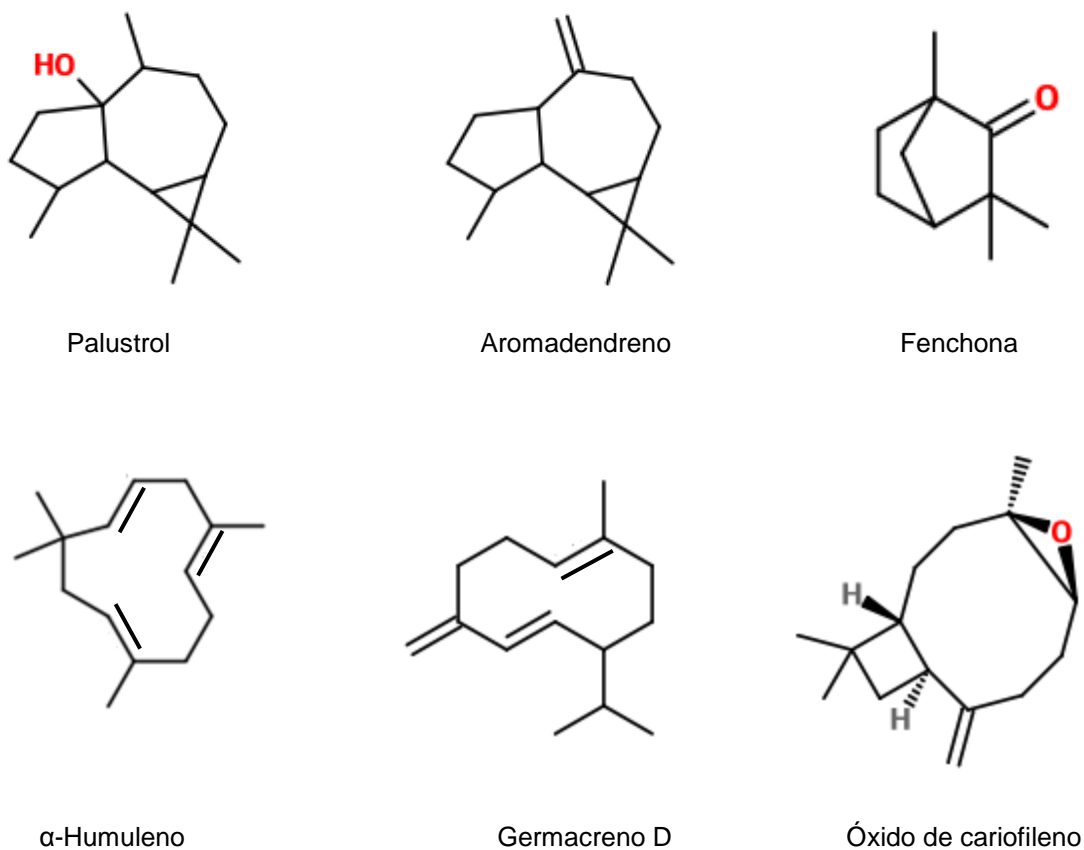
**Figura 36.** Relación de  $A_x/A_{istd}$  ( $Istd=n$ -tetradecano) de los principales compuestos comunes detectados en los extractos obtenidos por SDE y SFE de la especie *H. suaveolens*.

En la **Tabla 20**, se encuentran los valores de cada una de las áreas cromatográficas determinadas con respecto al patrón interno,  $Istd= n$ -tetradecano.

**Tabla 20.** Valores de cada una de las áreas cromatográficas determinadas con respecto al patrón interno.

	SDE	SFE
<b>Fenchona</b>	1,56	0,04
<b>Aromadendreno</b>	0,47	0,063
<b><math>\alpha</math>-Humuleno</b>	0,06	0,0092
<b>Germacreno D</b>	0,06	0,01
<b>Óxido de Cariofileno</b>	0,18	0,0081

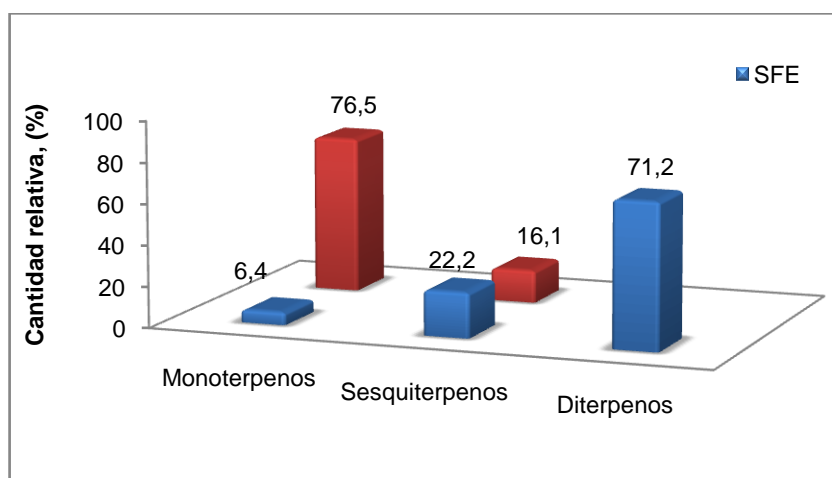
Las estructuras químicas de los principales compuestos detectados en los extractos aislados de *H. suaveolens* se muestran en la **Figura 37**.



**Figura 37.** Estructuras químicas de los principales compuestos detectados en los extractos obtenidos de *H. suaveolens*.

Los diterpenos y sus derivados oxigenados (71.2%) fueron la principal familia de compuestos aislados por SFE, tal como lo muestra la **Figura 38**; éstos se identificaron tentativamente. Uno de los motivos por lo que en los extractos SFE se detectaron compuestos más pesados, está relacionado con el tiempo de despresurización, que llegó a durar casi 8 horas, lo que hace que el gradiente alto de presión entre el interior del cilindro y la atmósfera genera la pérdida de compuestos más livianos, manifestada en la cantidad mínima de estos metabolitos secundarios volátiles en los extractos; La segunda familia con mayor número de compuestos detectados en los extractos SFE fue la de los sesquiterpenos (22.2%), seguida de la de los monoterpenos (6.4%).

En los extractos aislados por la técnica SDE, se cambió la proporción de diterpenos, que no se registraron en cantidades detectables; los monoterpenos y sesquiterpenos, en cambio, debido a su volatilidad relativamente alta prevalecieron en los extractos obtenidos. La composición porcentual de estas familias de compuestos aislados mediante las técnicas SDE y SFE se muestra en la **Figura 38**.



**Figura 38.** Familias de compuestos químicos presentes en los extractos de *H. suaveolens* obtenidos por SDE y SFE.

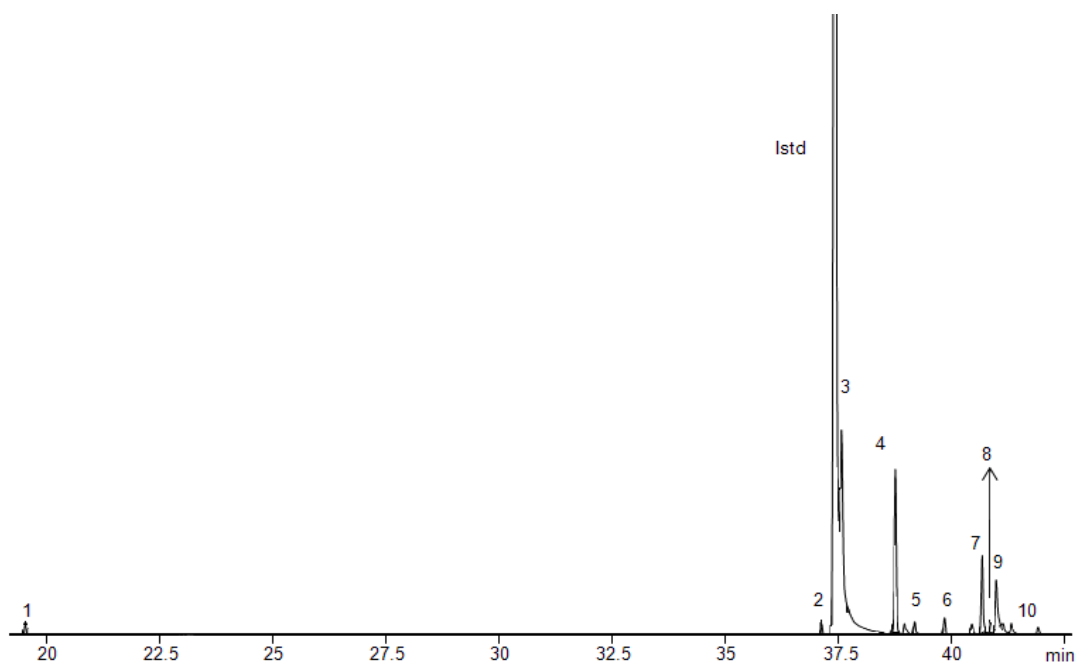
Para obtener mayor información sobre la composición química de los metabolitos secundarios presentes en las plantas de *H. suaveolens*, éstas fueron sometidas a extracción por 2 técnicas diferentes. Los extractos SDE fueron ricos en monoterpenos, que son los más volátiles entre los metabolitos secundarios estudiados y, en general, ésta fue la técnica, con la cual se obtuvieron extractos con el número más alto de compuestos.

La otra técnica utilizada fue SFE. Ésta permitió obtener extractos con alto contenido de compuestos semivolátiles como sesquiterpenos y diterpenos que no se encontraron en los demás extractos, pero, en general, por estas dos técnicas de extracción se detectaron menos compuestos.

Según Falcão y colaboradores [38], se han encontrado en el AE de las plantas de *H. suaveolens*, los mismos monoterpenos que se aislaron en este trabajo, por ejemplo, la fenchona (componente mayoritario en el extracto obtenido por SDE), canfeno, felandreno, tujano, 1,8-cineol,  $\beta$ -pineno, entre otros; también, se aislaron los siguientes sesquiterpenos: óxido de cariofileno,  $\alpha$ -humuleno y aromadendreno.

#### 4.4.6 Identificación de los metabolitos secundarios volátiles de *H. mutabilis*, aislados por SFE.

En la **Figura 39**, se presenta el perfil cromatográfico típico del extracto de *H. mutabilis*, obtenido por el método SFE. La identificación de los compuestos presentes en el extracto se llevó a cabo utilizando los índices de retención lineales, calculados en dos columnas, apolar (DB-5MS) y polar (DB-WAX). Los parámetros de integración aplicados fueron: umbral de integración, *Thshd*=15, y “área de rechazo” del pico sobre la línea base igual a 0.1. En la **Tabla 21**, se presenta la composición química del extracto de *H. mutabilis* obtenido por SFE.



**Figura 39.** Perfil cromatográfico típico del extracto de *H. mutabilis*, obtenido por SFE. Columna DB-5 (60 m). *Split* 1:30. La identificación de los picos aparece en la **Tabla 21**.

**Tabla 21.** Composición química del extracto de *H. mutabilis*, obtenido por SFE.

Nº pico	t <sub>R</sub> <sup>a</sup>	I <sub>R</sub>			Área relativa, % <sup>c</sup>	Compuesto
		DB-5		DB-WAX		
		Lit. [2]	Exp. <sup>b</sup>	Exp.		
1	19,522	932	939	1028	2,2	α-Pineno
2	37,142	1374	1393	1483	1,9	α-Copaeno
3	37,575	1408	1405	1610	43,2	<i>trans</i> -β-Cariofileno
4	38,751	1434	1442	1638	24,6	γ-Elemeno
5	39,187	1439	1455	1643	1,9	Aromadendreno
6	39,850	1452	1476	1669	2,7	α-Humuleno
7	40,669	1485	1501	1704	12,4	Germacreno D
8	40,880	1509	1509	1719	1,7	α-Bulneseno
9	40,986	1500	1513	1744	7,7	Biciclogermacreno
10	41,339	1522	1525	1788	1,7	δ-Cadineno

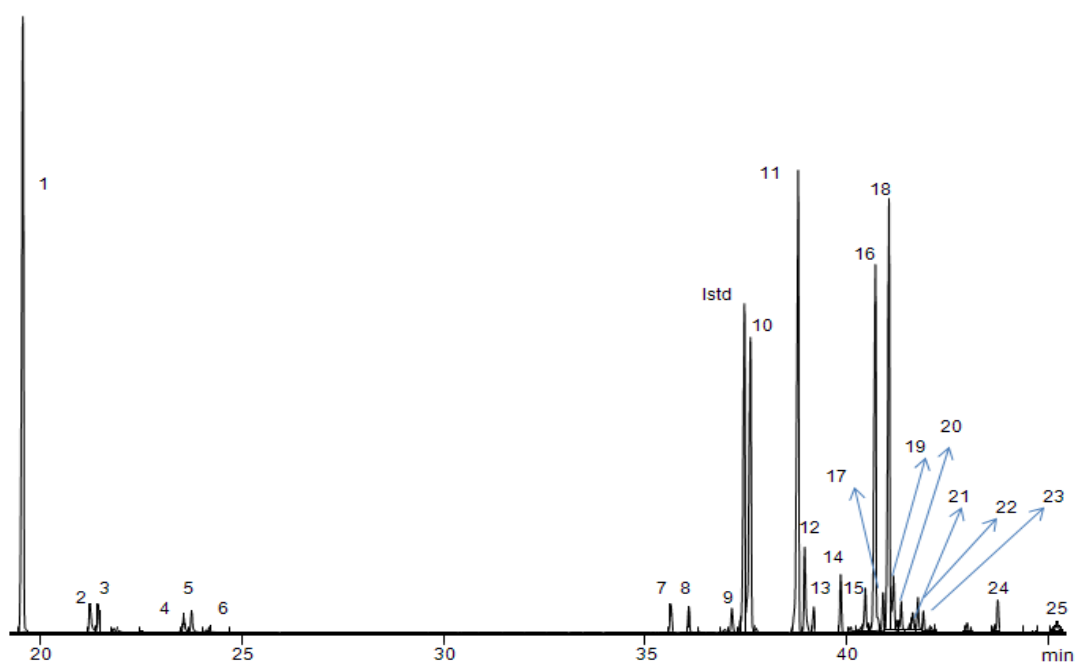
- Tiempos de retención, determinados experimentalmente en la columna apolar DB-5.
- Índices de retención lineales, determinados experimentalmente en la columna apolar DB-5.
- Porcentajes calculados con base en las áreas de los picos determinados en la columna apolar DB-5.

En la **Tabla 21** se puede apreciar la cantidad relativa (%) de los compuestos que se encuentran en cantidades mayores de 0.3%.

Se identificaron positivamente 10 compuestos, correspondientes a la totalidad del área cromatográfica. Los siguientes fueron los tres principales metabolitos secundarios volátiles, a saber: *trans*-β-cariofileno (44.1%), seguido del γ-elemeno (24.6%) y germacreno D (12.5%) que corresponden al 81.2% del área cromatográfica total.

#### 4.4.7 Identificación de los metabolitos secundarios volátiles de *H. mutabilis*, aislados por SDE.

En las **Figuras 40**, se presenta el perfil cromatográfico típico del extracto de *H. mutabilis*, obtenido por el método de SDE. La identificación de los compuestos presentes en el extracto se llevó a cabo utilizando los índices de retención lineales, calculados en dos columnas, apolar (DB-5MS) y polar (DB-WAX). Los parámetros de integración aplicados fueron: umbral de integración, *Thshd*=15, y “área de rechazo” del pico sobre la línea base igual a 0.1. En la **Tabla 22**, se presenta la composición química del extracto de *H. mutabilis* obtenido por SDE.



**Figura 40.** Perfil cromatográfico típico del extracto de *H. mutabilis*, obtenido por SDE. Columna DB-5 (60 m). *Split* 1:30. La identificación de los picos aparece en la **Tabla 22**.

**Tabla 22.** Composición química del extracto de *H. mutabilis*, obtenido por SDE.

Nº pico	t <sub>R</sub> , min <sup>a</sup>	IR			Cantidad relativa, % <sup>c</sup>	Compuesto
		DB-5		DB-WAX		
		Lit. [2]	Exp. <sup>b</sup>	Exp.		
1	19,569	932	940	1028	20,5	α-Pineno
2	21,240	969	979	1125	1,1	Sabineno
3	21,431	974	983	1112	0,8	β-Pineno
4	23,551	1024	1034	1195	0,5	Limoneno
5	23,739	1032	1039	1240	0,6	<i>cis</i> -β-Ocimeno
6	24,192	1044	1050	1242	0,3	<i>trans</i> -β-Ocimeno
7	35,642	1345	1351	1466	0,9	α-Cubeneno
8	36,095	-	1364	1482	0,7	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> *
9	37,153	1374	1393	1529	0,7	α-Copaeno
10	37,621	1408	1406	1627	11,7	<i>Trans</i> -β-Cariofileno
11	38,816	1434	1443	1640	16,6	γ-Elemeno
12	38,978	1437	1449	1641	2,8	α-Guaiene
13	39,198	1439	1455	1642	0,7	Aromadendreno
14	39,867	1452	1476	1671	1,7	α-Humuleno
15	40,471	1481	1495	1736	1,5	γ-Curcumeno
16	40,722	1485	1503	1706	12,3	Germacreno D
17	40,895	1499	1509	1732	1,0	Curzereno
18	41,046	1500	1515	1744	14,7	Biciclogermacreno
19	41,164	1509	1519	1720	2,0	α-Bulneseno
20	41,273	1513	1522	1754	0,3	γ-Cadineno
21	41,355	1522	1525	1788	0,8	δ-Cadineno

\* Identificados tentativamente

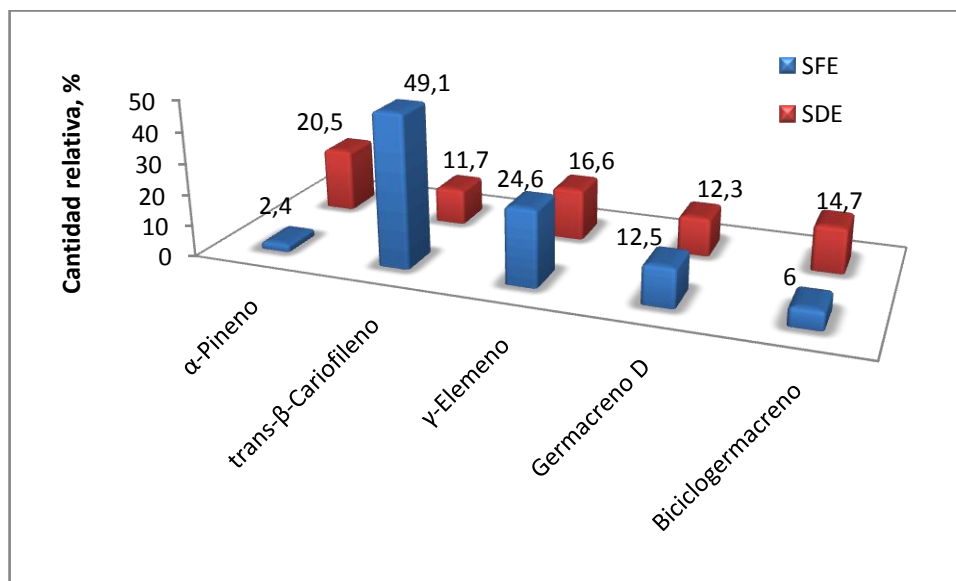
- Tiempos de retención, determinados experimentalmente en la columna apolar DB-5.
- Índices de retención lineales, determinados experimentalmente en la columna apolar DB-5.
- Porcentajes calculados con base en las áreas de los picos determinados en la columna apolar DB-5.

En la **Tabla 22** se puede apreciar la cantidad relativa de los compuestos que se encuentran en cantidades mayores de 0.3%.

Se identificaron positivamente 22 compuestos, correspondientes al 92.5% del área cromatográfica total. Dentro de la totalidad de metabolitos secundarios volátiles, se encontraron 5 mayoritarios, a saber: el  $\alpha$ -pineno (20.5%), seguido del  $\gamma$ -elemeno (16.6%), biciclogermacreno (14.7%), germacreno D (12.3%) y *trans*- $\beta$ -cariofileno (11.7%), que corresponden al 75.8% del área cromatográfica total.

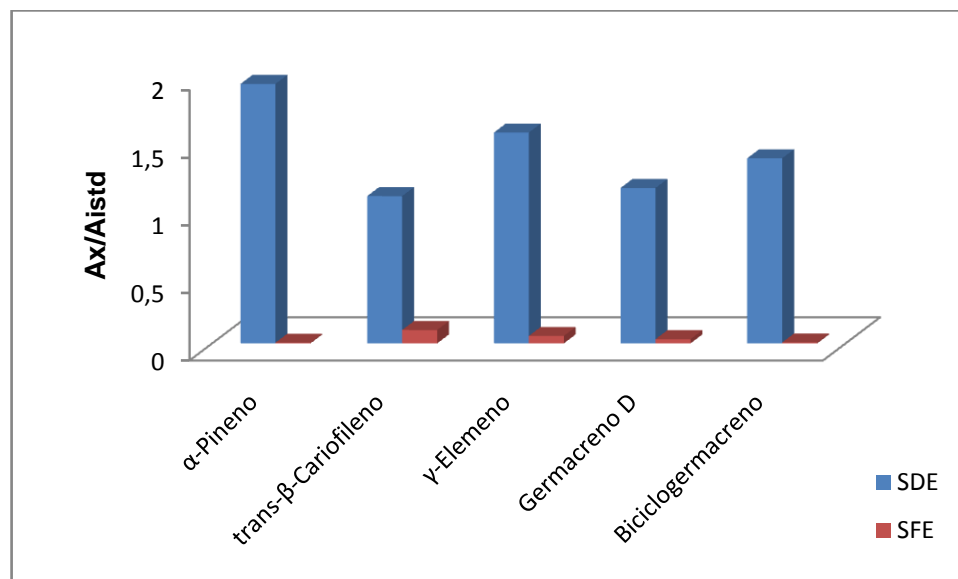
Hubo varios compuestos que no fueron detectados en extractos obtenidos, por una técnica, y, sí, por la otra, como por ejemplo: el  $\alpha$ -guaieno y el limoneno se detectaron en extractos aislados por SDE y no por SFE, mientras que el  $\gamma$ -cadineno que aparece en el extracto de SFE y no en el obtenido por destilación-extracción con solvente. Esto se debe, posiblemente, a la distinta volatilidad de los compuestos o al tiempo largo para despresurización del equipo SFE empleado.

En la **Figura 41**, se observan algunos componentes presentes en los extractos SFE y SDE obtenidos de *H. mutabilis*.



**Figura 41.** Composición porcentual de los principales compuestos detectados en los extractos obtenidos por SFE y SDE de *H. mutabilis*.

En la **Figura 42** se comparan las áreas relativas ( $A_x/A_{istd}$ ) de compuestos comunes presentes en extractos obtenidos por SFE y SDE de *H. mutabilis*.



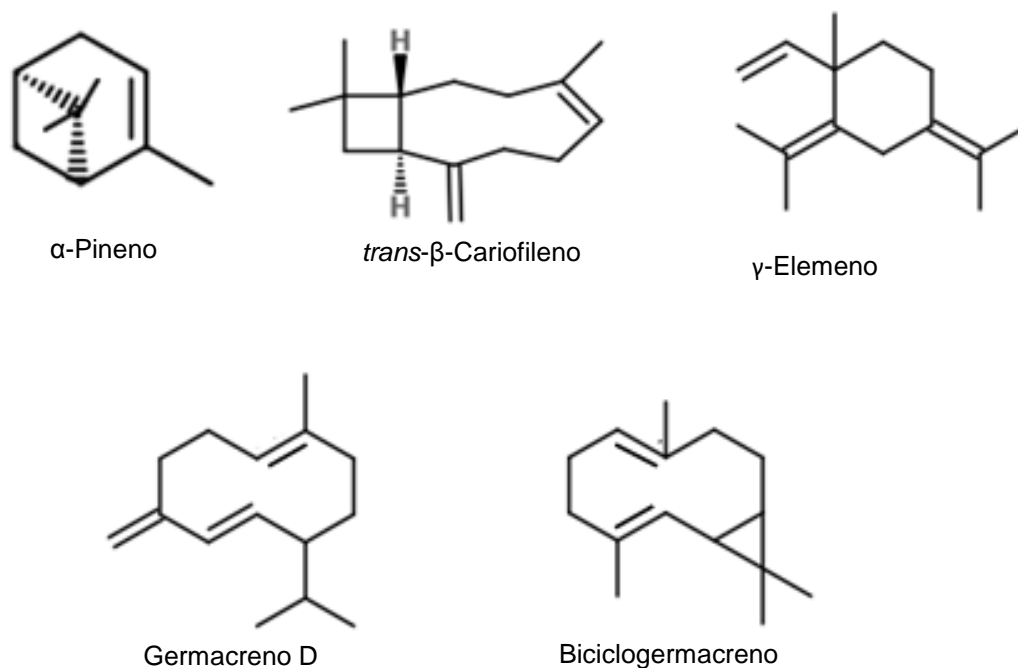
**Figura 42.** Relación de  $A_x/A_{istd}$  ( $Istd=n$ -tetradecano) de los principales compuestos comunes detectados en los extractos obtenidos por SDE y SFE de la especie *H. mutabilis*.

En la **Tabla 23** se encuentran los valores de cada una de las áreas cromatográficas determinadas con respecto al patrón interno,  $Istd= n$ -tetradecano.

**Tabla 23.** Valores para cada una de las áreas cromatográficas determinadas con respecto al patrón interno.

	SDE	SFE
$\alpha$ -Pineno	1.92	0.0053
<i>trans</i> - $\beta$ -Cariofileno	1.09	0.099
$\gamma$ -Elemeno	1.56	0.055
Germacreno D	1.15	0.031
Biciclogermacreno	1.37	0.0072

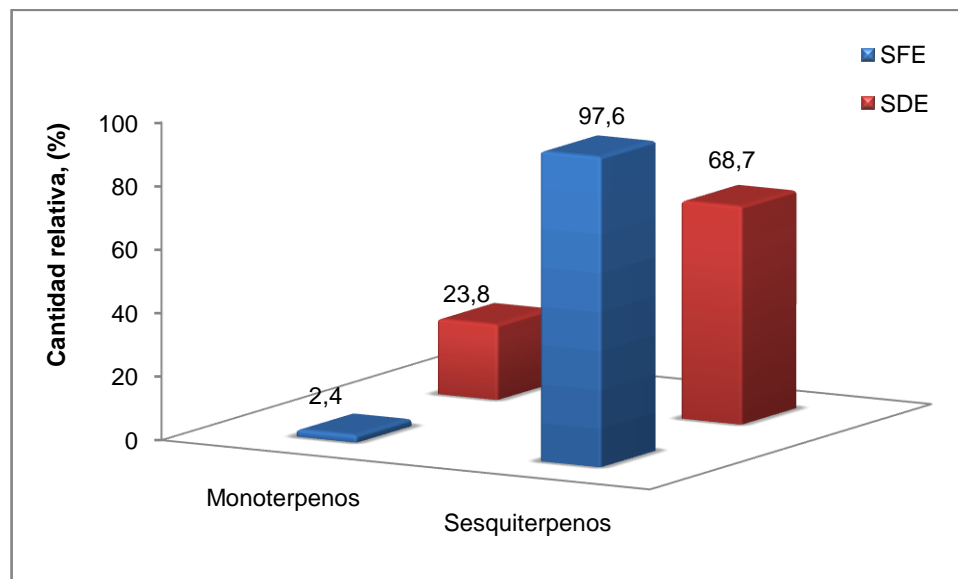
Las estructuras químicas de los principales compuestos detectados se muestran en la **Figura 43**.



**Figura 43.** Estructuras químicas de los principales compuestos detectados en los extractos obtenidos de *H. mutabilis*.

Entre las familias de compuestos aisladas por SDE, los sesquiterpenos se encontraron en mayor cantidad (68.7%) en comparación con los monoterpenos (23.8%). El bicyclgermacreno (14.7%) fue el componente mayoritario de esta primera familia, mientras que, por el lado de los monoterpenos, el  $\alpha$ -pineno (20.5%) resultó más abundante en la mezcla.

La composición porcentual de estas familias de compuestos obtenidos por dos técnicas, SFE y SDE, se muestra en la **Figura 44**.



**Figura 44.** Familias de compuestos químicos presentes en los extractos obtenidos por SFE y SDE de *H. mutabilis*.

En Brasil, Barbosa y colaboradores en su publicación [14] sobre la composición química de los aceites esenciales, obtenidos por MWHD, mostraron que el aceite de *H. mutabilis* posee biciclogermacreno (8.7%) y germacreno (6.2%), como componentes principales. Estas sustancias aparecen también en los extractos obtenidos por SDE y SFE en el Laboratorio de Cromatografía de la UIS, de las plantas cultivadas en las parcelas de CENIVAM.

A diferencia de los estudios realizados por Barbosa y colaboradores [14], Fãlcao & Menezes [38], en su publicación “The *Hyptis* genus: an ethnopharmacological and chemical review” [38], realizado también en el sur del continente, Brasil, muestra como este género posee una gran variedad de compuestos, entre las que se encuentran el germacreno D, biciclogermacreno, compuestos que se encuentran en cantidades más altas en los extractos obtenidos en este trabajo; también se aprecia que *H. mutabilis*, posee compuestos de la familia de los triterpenos, que no fueron aislados mediante las técnicas utilizadas en este estudio.

En la **Tabla 24** (Véase Apéndice), se encuentra la información general sobre algunos terpenos aislados por MWHD, SFE y SDE de las plantas *L. alba*, *H. suaveolens* e *H. mutabilis*.

## 5. CONCLUSIONES

- Usando criterios cromatográficos y espectroscópicos (espectros de masas), se determinó la composición química de los aceites esenciales (AE) y extractos de plantas de *L. alba*, *H. suaveolens* e *H. mutabilis*, cultivadas en el Complejo Agroindustrial Piloto de CENIVAM situado en el campus principal de la UIS, en la ciudad de Bucaramanga, Colombia.
- Los coeficientes de variación para los tiempos de retención y áreas cromatográficas de los componentes de aceites y extractos no superaron el 2% y el 10%, respectivamente, cumpliendo con lo reglamentado por GLP para muestras analizadas por GC. Esto valida resultados cromatográficos obtenidos en este trabajo que son confiables y reproducibles.
- El análisis de la composición química del AE y extractos de *L. alba*, aislados de las hojas y tallos, reveló que el compuesto mayoritario es la mircenona (39.1-63.1%). Este quimiotipo de *L. alba*, también conocido como quimiotipo tagetenona, es típico para plantas de esta especie que crecen en Argentina y Guatemala. En Colombia, este quimiotipo se describe por primera vez. Otros compuestos presentes en AE y extractos en esta planta fueron los isómeros *cis*- y *trans*-ocimenonas, así como el  $\beta$ -mirceno y el germacreno D.
- El rendimiento del AE obtenido por MWHD, de *L. alba* extraído de sus hojas y tallos, que se secaron previamente durante un periodo de 15 días hasta la pérdida de humedad, fue de 0.18%.

- Al comparar los metabolitos secundarios volátiles encontrados en los extractos de *H. mutabilis* e *H. suaveolens* con los reportados por otros autores, como Barbosa y colaboradores en Brasil [14], así como Peerzada en EEUU [74], respectivamente, se observa que hay similitudes en su composición química; se presume que sus AE pueden exhibir este tipo de metabolitos.
- El análisis de la composición química de los extractos de *H. mutabilis*, aislados de las hojas y tallos, reveló que el compuesto mayoritario, cambió respecto a la técnica empleada. Por SFE, se aisló en mayor proporción el *trans*- $\beta$ -cariofileno (44.1%), mientras que por SDE el compuesto mayoritario fue  $\alpha$ -pineno (20.5%). Otros compuestos principales aislados de *H. mutabilis* por las dos técnicas fueron:  $\gamma$ -elemeno (16.6-24.6%), germacreno D (12.3-12.5%) y biciclogermacreno (6-14.7%).
- El análisis de la composición química de los extractos de *H. suaveolens*, aislados de las hojas y tallos, reveló que el compuesto mayoritario aislado, por SDE fue la fenchona (30.5%). Ésta se extrajo también por SFE, pero no resultó ser compuesto mayoritario (6.4%), debido al aislamiento de diterpenos, como familia predominante de compuestos aislados (48.2%). Otros compuestos en alta proporción aislados de *H. suaveolens*, por las dos técnicas empleadas fueron: aromadendreno,  $\alpha$ -humuleno (1.3%), germacreno D (1.3-1.6%) y óxido de cariofileno (1.1-3.5%).

## 6. RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio económico sobre los cultivos, donde se tenga en cuenta variables como mantenimiento, costos de implantación, producción, entre otros, que sirva de referencia a agricultores y empresas interesados en el proceso de compostaje.
- Aislar los metabolitos secundarios de *L. alba*, *H. mutabilis* e *H. suaveolens* por la técnica SFE variando las presiones utilizadas en este trabajo de investigación, con el fin de identificar componentes más pesados.
- Se recomienda la evaluación organoléptica del AE de *L. alba* estudiada recientemente debido al agradable aroma que posee, el cual podría aprovecharse en aplicaciones perfumísticas.
- Se recomienda no usar tiempos de extracción por MWHD muy largos (superiores a 60 min) con el fin de obtener más aceite esencial; si el AE obtenido es de rendimiento muy bajo, usar pentanol debido a su densidad para poder extraer el aceite esencial del *Dean-Stark* sin pérdida de éste.
- Realizar pruebas de actividad antimicrobial, insecticida y antioxidante del AE de *L. alba*, *H. mutabilis* e *H. suaveolens*.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ABAD, M.; BERMEJO, P.; VILLAR, A.; SÁNCHEZ, S.; CARRASCO, L. Antiviral activity of medicinal plant extracts. *Phytother. Res.* **1996**, 11, pp. 198-202.
- [2] ADAMS, R. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy, Ed. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois. **2007**, pp. 125-830.
- [3] ARAÚJO, J.; ARENCIBIA, R. Infometría, bibliometría y cienciometría: aspectos teórico-prácticos. <http://bus.sld.cu/revistas/aci/> [Consulta: 20 de marzo de 2011].
- [4] ARIZA, O. Estudio de la composición química de la fragancia de las flores de *Posoqueria latifolia*, utilizando diferentes técnicas de extracción. Tesis de Grado, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander; Bucaramanga, Colombia. **2007**, pp. 27-30.
- [5] ASWAL, B.; FENG, C.; SALUYA, A. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx> [Consulta: 20 de abril de 2011].
- [6] ÁVALOS, A.; PÉREZ, E.; CARRIL, U. Metabolismo secundario de plantas; Universidad Complutense de Madrid; *R. educa (Biología). Serie Fisiología Vegetal.* **2009**, 2(3), pp. 119-145.
- [7] AZCÓN, J.; TALÓN, M. Fundamentos de fisiología vegetal. Madrid: 1ªEd. McGraw-Hill Interamericana. **2000**, 261 p.
- [8] BAHL, J.; GARG, S.; SINGH, S.; BANSAL, R.; NAQVI, A.; KUMAR, S. Composition of linalool-rich essential oil from *Lippia alba* grown in Indian plains. *Flavour. Fragr. J.* **2000**, 15, pp. 199-200.

- [9] BAHL, J.; SINHA, S.; NAQVI, A.; BANSAL, R.; GUPTA, A.; KUMAR, S. Linalool-rich essential oil quality variants obtained from irradiated stem nodes in *Lippia alba*. *Flav. Fragr. J.* **2002**, 17, pp. 127-132.
- [10] BANDONI, A (Ed). Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Argentina: La Plata. Red de Editoriales Universitarias. **2000**, pp. 29-43, 94-96, 149-171, 197-232.
- [11] BANDONI, A.; MENDIONDO, M.; RONDINA, R.; COUSSIO, J. Survey of Argentine medicinal plants. I. Folklore and phytochemical screening. *J. Nat. Prod.* **1972**, 35, pp. 69-81.
- [12] BARBOSA, F.; BARBOSA, L.; MELO, E.; MENDEZ, B.; SANTOS, R. Influência da temperatura do ar de secagem sobre o teor e a composição química do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown. *Quim. Nova*, **2006**, 29(6), pp. 1221-1225.
- [13] BARBOSA, F.; LIMA, M.; FILHO, R.; SILVEIRA, E. Iridoid and phenylethanoid glycosides from *Lippia alba*. *Biochem. System. Ecol.* **2006**, 34(11), pp. 319-321.
- [14] BARBOSA, P.; RAMOS, C. Studies on the antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis mutabilis* Briq. in Rats. *Departamento de Fisiologia, Centro de Ciências Biológicas. Phytother Res.* Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Alagoas, Brazil. **1992**, 6, pp. 114-115.
- [15] BLANCO, K.; AGUDELO, A. Estudio comparativo de los aceites esenciales de *Lippia alba* Mill N.E. Brown ex Britton & Wills cultivada con tres tipos de *compost*. Tesis de grado, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, **2007**.
- [16] Boletín de plantas medicinales y aromáticas. Gobierno de Chile-Fundación para la innovación agraria. Santiago, Chile. Boletín Trimestral N° 7. [www.fia.cl/difus/boletin/bpm/bpmdiciembre2003](http://www.fia.cl/difus/boletin/bpm/bpmdiciembre2003). [Consulta: 26 de abril de 2011].

- [17] BRAGA, M.; EHLERT, P.; MING, L.; MEIRELES, M. Supercritical fluid extraction from *Lippia alba*: global yields, kinetic data, and extract chemical composition. *J. Supercrit. Fluids*. **2005**, 34, pp. 149–156.
- [18] CÁCERES, A.; GIRÓN, L. Actividad antimicrobiana de plantas usadas en el tratamiento de afecciones de la piel y mucosa. *Seminario Nacional de Medicina Tradicional – Mesoamericano de Etnofarmacología*. **1987**, III, pp. 104-109.
- [19] CÁRDENAS, C.; DUARTE, S. Estudio del ciclo circadiano de la Carvona en las hojas de *Lippia alba* (Fam. *Verbenaceae*). Trabajo de grado, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. **2007**, 160 p.
- [20] CASTAÑEDA, M. Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas. Trabajo de grado, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. **2007**, 42 p.
- [21] Cbi EU Market Brief, Essential Oils, <http://www.cbi.nl/>. [Consulta: 9 de marzo de 2011]. **2005**, pp. 3-7, 13-14.
- [22] Cbi Market Survey, the market for natural ingredients for cosmetics in the EU. <http://www.cbi.nl/>. [Consulta: 8 de marzo de 2011]. **2008**, pp. 22, 31-32.
- [23] CELIS, N. Estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de *Lippia alba*, *Lippia organoides* y *Phyla (Lippia dulcis)*, especies de la familia *Verbenaceae*. Tesis de grado, Universidad Industrial de Santander, Escuela de Química, Bucaramanga, Colombia: **2007**, 131 p.
- [24] Center for the promotion of imports from developings countries: Market survey on natural ingredients for cosmetics. <http://www.cbi.eu/> [Consulta: 08 de marzo de 2011].

- [25] Centro Coordinador Indigenista de la Región del Istmo. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx> [Consulta: 8 de marzo de 2011]
- [26] CERPA, M. Hidrodestilación de aceites esenciales, modelado y caracterización. Memoria, Doctorado en Ing. Química, Universidad de Valladolid, Valladolid, España. **2007**.
- [27] CHACÓN, A.; GONZÁLEZ, N.; STASHENKO, E. Aceite esencial de hojas de *Hyptis umbrosa* salzm extraído por diferentes técnicas. Universidad Nacional Experimental de Táchira & Universidad Industrial de Santander, **2004**, 55(2), 39 P.
- [28] CHANJIN, N. Comparación del rendimiento de aceite esencial de *Lippia alba* extraído en el laboratorio y el extraído en la planta piloto y propuesta de escalonamiento a nivel industrial. Tesis de grado, Facultad de Ingeniería. Guatemala. **1999**, pp. 10-25.
- [29] CRAVEIRO, J.; ALENCAR, J.; MATOS, F.; ANDRADE, C.; MACHADO, M. Essential oils from Brazilian *Verbenaceae*, genus *Lippia*; *J. Nat. Prod.* **1981**, 44(5), pp. 598-601.
- [30] DE LA VEGA, I. Cienciometría y política científica en la periferia: el caso de Venezuela, *Rev. Espacios.* **2003**, 24(1), pp. 10-16.
- [31] DE RAFOLS, W. Aprovechamiento industrial de los productos agrícolas. Barcelona, Editorial Salvat S.A. **1981**, pp. 40-60.
- [32] DEWICK, P. Medicinal natural products. A biosynthetic approach. John Wiley & Sons: Chichester. **2002**, 351 p.
- [33] DELLACASA, E.; SOLER, E.; MENENDEZ, P.; MOYNA, P. Chemical composition of *Eucalyptus* essential oils grown in Uruguay. *Flavour. Fragr. J.* **1990**, 5, pp. 91-98.

- [34] DÍAZ, O. Estudio comparativo de la composición química y evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial *Aloysia triphylla* (L`Her) Britton, cultivada en tres regiones de Colombia. Trabajo de grado, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. **2007**, 28 p.
- [35] DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E. Biology of Floral Scent. Taylor & Francis Group: New York. **2006**, pp. 55-71.
- [36] DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. Biochemistry of Plant Volatiles. *Plant Physiol.* **2004**, 135, pp. 1893–1902.
- [37] ERKEKDJIAN, M. Análisis de la tendencia del mercado internacional de aceites esenciales. Informe mensual de la Fundación Exportar. Secretaría de Comercio y Relaciones Económicas Internacionales. **2002**, 24 p.
- [38] FALCÃO, D.; MENEZES, F. The *Hyptis* genus: an ethnopharmacological and chemical review. *Rev. Bras. Farm.* **2003**, 84(3), pp. 69-74.
- [39] FERHAT, M.; MEKLATI, B.; SMADJA, J.; CHEMAT, F. An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel, *J. Chromatogr. A.* **2006**, 1112, pp. 121-126.
- [40] GAITÁN, J. Estudio de metabolitos secundarios volátiles de *Salvia aratocensis*, aislados mediante diferentes técnicas de extracción. Trabajo de grado, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. **2010**, 33 p.
- [41] GODEFROOT, M.; SANDRA, P.; VERZELE, M. New method for quantitative Essentials oil analysis; *J. Chromatogr.* **1983**, 203(9), pp. 325 – 335.
- [42] GOMES, E.; MING, L.; MOREIRA, E.; MIGUEL, O.; MIGUEL, M.; KERBER, V.; CONTIN, A.; FILHO, W. Constituintes do oleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) NE Br.(Verbenaceae). *Rev. Bras. Farm.* **1993**, 74, 29 p.
- [43] GÓMEZ, N.; WITTE, L. A simple method to extract essential oils from tissue simples by using microwave radiation. *J. Chem. Ecol.* **2001**, 27, pp. 2351-2359.

- [44] GROB, R. Modern practice of gas chromatography. New York: John Wiley & Sons, **1985**, pp. 895-897.
- [45] GÜENTHER, E. The Essential Oils: History – Origin in plants production – Analysis, Litton Educational, New York. **1948**, Vol. I, pp. 241–244.
- [46] GUPTA, P. 270 Plantas medicinales iberoamericanas. CYTED - SECAB, Editorial Presencia. Bogotá, Colombia. **1995**, pp. 557-559, 561-563, 617.
- [47] GUZMAN, S.; CARDOZO, R.; GARCÍA, V. Desarrollo agrotecnológico de *Lippia alba* (Miller) N.E.Br ex Britton y Wilson, *Rev. Científica Guillermo de Ockham*. **2004**. 7(1), pp. 201-215.
- [48] HERNÁNDEZ, M. Comparación de los rendimientos de los métodos de arrastre con vapor directo y arrastre con vapor directo aplicando maceración a nivel de planta piloto, en la extracción de aceite esencial de Albahaca (*Ocimum basilicum* L.) en fresco. Tesis de grado, Facultad de Ingeniería. **2002**, pp. 7-30.
- [49] HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; DERMONT, C.; JOSEPH, H., BAILLEUL, F. The essential oil of *Lippia alba*: Analysis of samples from french overseas departments and review of previous works; *Chem. Biodiver.* **2006**, 3, pp. 1116-1125.
- [50] HIDALGO, J.; CERRUTI, T.; MESTANZA, M.; RÍOS, F.; NINA, E.; NONATO, L.; ALVARADO, R.; MENÉNDEZ, R. Aromatic plant oils of the Peruvian Amazon. Part 1. *Lippia alba* (Mill.) N.E Brown and *Cornutia odorata* (Poeppig) Poeppig ex Schauer, *Verbenaceae. J. Essen. Oil Res.* **1999**, 11(6), pp. 753-756.
- [51] Instituto de investigación de recursos biológicos Alexander von Humboldt. Estudio del mercado nacional de los aceites esenciales. Biocomercio sostenible. <http://www.humboldt.com.co/biocomercio> [Consulta: 22 de abril de 2011].
- [52] JENNINGS, W. Analytical gas chromatography. Academic Press: San Diego. **1987**. 259 p.

- [53] JIROVETZ, L.; BUCHBAVER, G. Processing, analysis and application of essential oils. Ed. Har Krishan Bhala & Sons. Dehradun, India. **2005**. pp. 21-28.
- [54] JUDD, W.; CAMPBELL, C.; KELLOGG, E.; STEVENS, P.; DONOGHUE. Plant systematics: a phylogenetic approach. *Structural and Biochemical Characters*. **2002**, 239(3-4), pp. 292-294.
- [55] KARASEK, F. Basic gas chromatography-mass spectrometry. 1<sup>a</sup> Ed. Amsterdam: *Elsevier*. **1988**, 201 p.
- [56] KINGSTON, H.; JASSIE L. Introduction to microwave sample preparation, theory and practice. Washington: American Chemical Society. **1988**, pp. 7-30.
- [57] KOVÁTS, E. Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. *Advan. Chromatogr.* **1965**, 1, pp. 229-247.
- [58] KUMAR, S.; BAHL, J.; BANSAL, R.; GARG, S.; NAQVI, A.; KHANUJA, S.; SHASANY, A.; DAROKAR, M.; SINGH, V.; SINHA, S. US Patent. PP113, 110 P2. **2002**.
- [59] LAHLOU, M. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. Review Article. *Phytother. Res.* **2004**, 18, pp. 435-448.
- [60] LINCOLN, T.; ZEIGER, E., Plant physiology. Massachusetts: Sinauer Associates. **2002**, pp. 248, 287-290.
- [61] LIPRONAT: Manual de operaciones, Metodología para la extracción de aceites esenciales por arrastre de vapor, usando Neoclevenger. Universidad de San Carlos, Guatemala. **2007**, pp. 23-38
- [62] LOPEZ, V.; BENEDICTO, J. Microwave-assisted extraction combined with gas chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay. *TRAC.* **1996**, 15(8), pp. 334-340.

- [63] LORENZO, D.; PAZ, D.; DAVIES, P.; VILLA, R.; CAÑIGUERAL, S.; DELLACASA, E. Composition of a new essential oil type of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown from Uruguay. *Flavour. Fragr. J.* **2001**, 16, pp. 356-359.
- [64] LUCHESSI, M.; CHEMAT., F.; SMADJA, J. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *J. Chromatogr. A.* **2004**, 1043, pp. 322-327.
- [65] METAXAS, A.; MEREDITH, R. Industrial microwave heating, Peregrinus Ltd., London. **1993**, pp. 151-167
- [66] MING, L.; STEFANINI, M.; RODRIGUES, S. Ação de fitorreguladores no crescimento da erva-cidreira-brasileira. *Horticult. Brasil.* **2002**, 20(1), pp. 18-23.
- [67] MING, L. Influência de diferentes níveis de adubação orgânica na produção de biomassa e teor de óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. - Verbenaceae. (Tese mestrado). Curitiba: *UFPr.* **1992**. 206 p.
- [68] OCAMPO, R.; VALVERDE, R. Manual de cultivo y conservación de plantas medicinales. Tomo I. Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical. Costa Rica. **2000**, pp. 97-100.
- [69] OLIVEIRA, D.; LEITAO, G.; SANTOS, S. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oximiná. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, 108(2), pp. 103-108.
- [70] PARÉ, J. European Patent Application 0485668<sup>a</sup>1, **1992**.
- [71] PARÉ, J. SIGAMIN., M and LAPONTE, J., US Patent 5.002.784, **1991**.
- [72] PEREDA, R.; GASCON, M. Chemistry of *Hyptis mutabilis* : New pentacyclic triterpenoids. *J. Nat. Prod.* **1988**, 51(5), 996-8.
- [73] PÉREZ, M. Usos y abusos de la cienciometría. México. **2006**, <http://www.cinvestav.mx/publicaciones/revista/enemar06/usos> [Consulta: 21 de marzo de 2011].

- [74] PEERZADA, N. Chemical Composition of the Essential Oil of *Hyptis suaveolens*. Faculty of Science, Northern Territory University, Casuarina, Darwin, Northern Territory. *Molecules*. **1997**, 2(11), pp. 165-168.
- [75] PINO, J.; ORTEGA, A.; ROSADO, A. Chemical composition of the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown from Cuba. *J. Essen. Oil Res.* **1996**, 8(4), pp. 445-446.
- [76] PINO, J.; ARIEL, L.; PÉREZ, A.; RODRÍGUEZ, M.; BALUJA, R. Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. *Rev. Cub. Farm.* **1997**, 30(1), pp. 1-3.
- [77] POOLE, C.; POOLE, S. Chromatography today, Amsterdam: *Elsevier*, **1991**, pp. 2, 92, 1026.
- [78] QUIROGA, O. Biodiversidad, una joya a conservar y un potencial económico para el desarrollo que el estado boliviano quiere estimular. Instituto Boliviano de Comercio Exterior. **2008**, 26 p.
- [79] REYES, J.; PATIÑO, J. Comparación de los metabolitos secundarios volátiles de dos especies de *Ocimum sp.* (Labiatae), en función del método de extracción y estudio de las actividades antioxidante, citotóxica y antifúngica; Trabajo de pregrado. Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. **2007**, 54 p.
- [80] RICCIARDI, G.; RICCIARDI, A. Efecto de las variaciones estacionales sobre la composición química del aceite esencial de plantas de “*Salvia morada*” de Sáenz Peña (Chaco). Corrientes, Argentina. Universidad Nacional del Nordeste. <http://www.plantasmedicinales.org/archivos/salviamorada>. [Consulta: 8 de abril de 2011].

- [81] RICCIARDI, G.; VEGLIA, J.; RICCIARDI, A.; BANDONI, A. Examen comparado de la composición de los aceites esenciales de especies autóctonas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. BR., Argentina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura. *Comun. Cient. Technol.* **1999**, VIII, pp. 103-106.
- [82] RICCIARDI, G.; RICCIARDI, A.; BANDONI, A. Fitoquímica de Verbenáceas (*Lippias* y *Aloysias*) del nordeste Argentino. Facultad de Ciencias Exactas y Agrimensura. *Comun. Cient. Technol.* **2000**, pp.104-108.
- [83] ROSSATO, M.; ATTI, A.; ATTI, S.; AGOSTINI, F.; PANSERA, M.; WASUM, R.; BARBIERI, R.; Avaliação do óleo essencial de *Aloysia sellowii* (Briquet) Moldenke (Verbenaceae) do Sul do Brasil, *Quim. Nova.* **2006**, 29(2), pp. 200-202.
- [84] ROSSI, J.; DELFINO, J. Cienciometría, instrumentos de evaluación y crítica. Revista ciencia hoy en línea. Universidad de Buenos Aires. **2005**. <http://www.cienciahoy.org.ar/ln/hoy89/cienciometria.htm> [Consulta: 20 de marzo de 2011].
- [85] SATINDER, A. Chromatography and separation science, Academic Press, EE.UU. **2003**, 4, pp. 1-9, 133-142.
- [86] SAVI, L.; SINCERO, T.; DA SILVA, A.; ANDRIGHETTI, C.; MANCINI, M.; DE ALMEIDA, M.; BARBOSA, R.; FARIAS, M.; BARARDI, C.; SIMOES, C., Antiviral evaluation of plants from Brazilian atlantic tropical forest, *Fitoter.* **2005**, 76, pp. 374–378.
- [87] SENATORE, F.; RIGANO, D. Essential oil of two *Lippia spp.* (Verbenaceae) growing wild in Guatemala. *Flavour. Fragr. J.* **2001**, 16(3), pp. 169-171.
- [88] SIANI, A.; TAPPIN, M.; RAMOS, M.; MAZZEI, J.; RAMOS, M.; DE AQUINO, F.; FRIGHETTO, N. Linalool from *Lippia alba*: Study of the reproducibility of the essential oil profile and the enantiomeric purity. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, pp. 3518-3521.

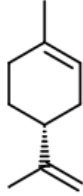
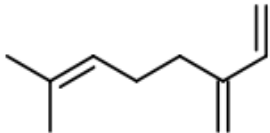
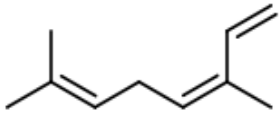
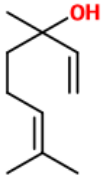
- [89] SINGH, G.; PANDEY, S.; LECLERCQ, P.; SPERKOVA, J. Studies on essential oils. GC/MS analysis of chemical constituents of leaf oil of *Lippia alba* (Mill.) from North India. *J. Essen. Oil Res.* **1999**, 11(2), pp. 206-208.
- [90] SKOOG, A.; HOLLER, J.; y NIEMAN, T. Principios de análisis instrumental; 5ª Edición. Madrid, España. Mc-Graw Hill, **2003**. Cap 29, pp. 754, 776-777.
- [91] STASHENKO, E.; COMBARIZA., Y.; PUERTAS, A. Aceites esenciales, técnicas de extracción y análisis. Laboratorio de Fitoquímica y Cromatografía. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. **1998**. pp. 1-23, 30.
- [92] STASHENKO, E.; CERVANTES, M.; COMBARIZA, Y.; FUENTES, H.; MARTÍNEZ, J. HRGC/FID and HRGC/MSD. Analysis of the secondary metabolites obtained by different extraction methods from *Lepechinia schiedeana*, and *in vitro* evaluation of its antioxidant activity. *J. High Resol. Chromatogr.* **1999**, 22, pp. 343-349.
- [93] STASHENKO, E.; JARAMILLO, B.; MARTÍNEZ, J. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its *in vitro* antioxidant activity. *J. Chromatogr. A.* **2004**, 1025, pp. 93-103.
- [94] STASHENKO, E. E; MARTÍNEZ., J. R; MUÑOZ, A y CASTAÑEDA, M. Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas. *Scientia et Technica.* **2007**, 33, pp. 1-2.
- [95] STASHENKO, E.; JARAMILLO, B.; MARTÍNEZ, J. Comparación de la composición química y de la actividad *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. *Rev. Acad. Col.Cienc.* **2003**, 27(105), pp. 579-597.

- [96] STASHENKO, E.; MARTÍNEZ., J.; y JARAMILLO, B. Estudio de la actividad antioxidante *in vitro* de los aceites esenciales de tres plantas de la familia *Verbenaceae*. *Revista Arte y Ciencia Cosmética*. **2004**, 15, pp. 16-25.
- [97] STASHENKO, E.; ACOSTA, R.; MARTÍNEZ., J.; High-resolution gas-chromatografic analysis of the secondary metabolites obtained by subcritical-fluid extraction from Colombian rue (*Ruta graveolens* L.); *J. Biochem. Biophys. Methods*; **2000**, 43 (1-3), pp. 379-390)
- [98] TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Plant Physiology*. 3<sup>a</sup> Ed. Sinauer Associates Inc, Publisers. Massachusetts: **2002**, pp. 171-192, 285-291.
- [99] TAYLOR and FRANCIS Group. *Biology of floral scent*, London: CRC Press, **2006**. pp. 14-15.
- [100] TUCKER, A.; MARCIARELLO, M. Volatile leaf oil of the liquore verbena “*Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown ex Brittoln and P. Wils. Var *Carterae* Moldenke” from the North American herb trade. *J. Essen. Oil Res.* **1999**, 11(3), pp. 314-316.
- [101] VALENCIANO, H.; ACOSTA., D.; FAVELO, G. Secador solar móvil de estructura metálica para plantas medicinales. *Rev. Cub. Plant. Med.*, **2002**, 7(1), pp. 23-26.
- [102] VARGAS, P.; ORTIZ, I.; ROJAS, V. Vigilancia tecnológica aplicada a nanociencia y nanotecnología en países de Latinoamérica. *J. Technol. Manag. Innov.* **2006**, 1(4), pp. 84-94
- [103] VELASCO, A.; PEREZ, M.; ESTEBAN, J.; GUZMAN, C.; ZYGADLO, J.; ESPINAR, L. A Volatile constituents of *Hyptis mutabilis* (Rich.) Briq. *J. Essent. Oil Res.*, **1995**, 7(1), 81-2.

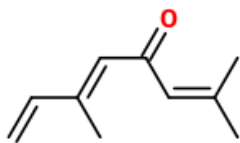
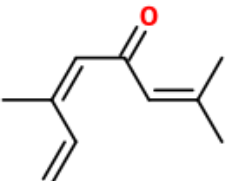
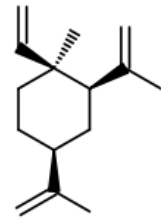
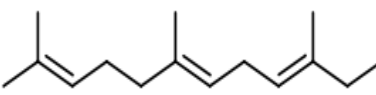
- [104] ZÉTOLA, M.; LIMA, T.; SONAGLIO, D.; GONZÁLEZ, G.; LIMBERGER, R.; PETROVICK, P.; BASSANI, V. Activities of liquida and spraydried extracts from *Lippia alba*-Verbenaceae Brazilian false melissa; *J. Ethnopharmacol.* **2002**, 82, pp. 207-215.
- [105] ZOGHBI, M.; ANDRADE, E.; SANTOS, A.; SILVA, H. Essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. growing wild in the Brazilian Amazon. *Flavour. Fragr. J.*, **1998**, 13(1), pp. 47-48.
- [106] <http://www.plantasmedicinales.org> [Consulta: 6 de marzo de **2011**].
- [107] [www.chemindustry.com](http://www.chemindustry.com) [Consulta: 13 de octubre de **2011**].
- [108] <http://www.thegoodscentcompany.com/> [Consulta: 12 de octubre de **2011**].
- [109] <http://www.leffingwell.com/> [Consulta: 13 de octubre de **2011**].

## **APÉNDICES**

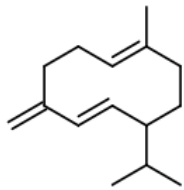
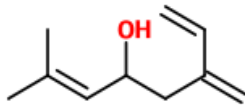
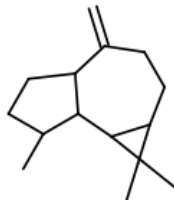
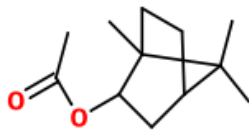
**Tabla 24.** Información general de terpenos [2, 107, 108, 109].

Nombre	Fórmula	Olor	Propiedades	Estructura
Limoneno	$C_{10}H_{16}$	(R)-(+)-limoneno: olor a cítricos frescos como naranja. (S)-(-)-limoneno: nota de limón.	Líquido incoloro o color amarillo claro. P. Congelación: $-96.00\text{ }^{\circ}\text{C}$ . P. Ebullición: $175\text{ a }177\text{ }^{\circ}\text{C}$ . P de vapor: $1.54000\text{ mm/Hg}$ $136.23\text{ g/mol}$	
$\beta$ -Mirceno	$C_{10}H_{16}$	Olor picante con alta intensidad.	Líquido incoloro P. Ebullición: $166\text{ a }167\text{ }^{\circ}\text{C}$ . P de vapor: $2.2900\text{ mm/Hg}$ $136.23\text{ g/mol}$	
<i>cis</i> - $\beta$ -Ocimeno	$C_{10}H_{16}$	Olor floral.	Líquido amarillo pálido P. Ebullición: $177\text{ }^{\circ}\text{C}$ . P de vapor: $1.56000\text{ mm/Hg}$ $136.23\text{ g/mol}$	
Linalool	$C_{10}H_{18}O$	Olor floral. Flores frescas, que recuerda el lirio del valle; sin embargo, los enantiómeros difieren un poco en el olor.	Líquido incoloro P. Ebullición: $194.00\text{ a }197.00\text{ }^{\circ}\text{C}$ . P de vapor: $0.090500\text{ mm/Hg}$ $154.24\text{ g/mol}$	

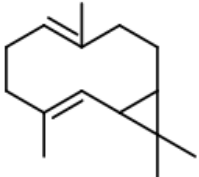
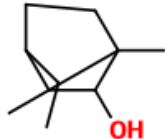
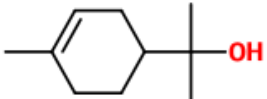

Continuación, **Tabla 24.**

Nombre	Fórmula	Olor	Propiedades	Estructura
<i>trans</i> -Ocimenona	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	N.D.	P. Ebullición 226.00 a 228.00 °C. P. de vapor: 0.078800 mm/Hg 150.21 g/mol	
<i>cis</i> -Ocimenona	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	N.D.	Soluble en : alcohol Insoluble en : agua P. Ebullición: 226 a 228 °C. P. de vapor: 0.078800 mm/Hg 150.21 g/mol	
β-Elemeno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	Olor hierba.	Líquido entre incoloro y amarillo claro. P. Ebullición: 251 a 253 °C. Presión de vapor :0.027600 mm/Hg 204.35 g/mol	
β-Farneseno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	Olor a hierbas cítricas.	Incoloro o de color amarillo claro Soluble en : alcohol Insoluble en : agua P. Ebullición: 272 a 273 °C. P. de vapor :0.010100 mm/Hg 204.35 g/mol	

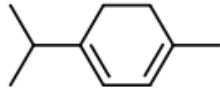
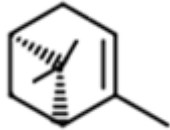

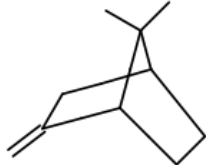
Continuación, **Tabla 24.**

Nombre	Fórmula	Olor	Propiedades	Estructura
Germacreno D	$C_{15}H_{24}$	Olor a madera de especias.	P. de Ebullición: 279 a 280 °C. P. de vapor : 0.006730 mm/Hg 204.35 g/mol	
Ipsdienol	$C_{10}H_{16}O$	Olor a pino balsámico.	Índice de Ref.: 1.48000 a 1.50000 Líquido transparente e incoloro P. de Ebullición: 233 a 235 °C. P. de vapor :0.010300 mm/Hg 152.23 g/mol	
Aromadendreno	$C_{15}H_{24}$	Olor madera.	Soluble en : alcohol Insoluble en : agua P. de vapor: 0.022600 mm/Hg 204.35 g/mol	
Acetato de bornilo	$C_{12}H_{20}O_2$	Olor balsámico. Madera de pino.	Líquido transparente e incoloro P. Fusión: 26 a 29 °C. Hg P. Ebullición: 228 a 231 °C. P. Congelamiento: 25.10 °C. P. de vapor: 0.228000 mm/Hg 196.28 g/mol	

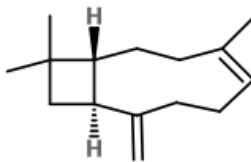
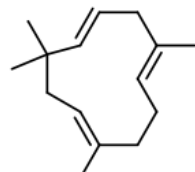
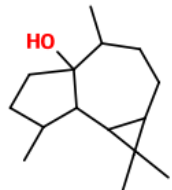
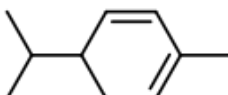
Continuación, **Tabla 24.**

Nombre	Fórmula	Olor	Propiedades	Estructura
Biclogermacreno	$C_{15}H_{24}$	Olor a leña verde.	Incoloro o líquido amarillo claro P. Ebullición: 267 a 268 °C. P. de vapor: 0.013200 mm/Hg 204.35 g/mol	
Borneol	$C_{10}H_{18}O$	Olor balsámico. Madera de pino.	P. Fusión: 206.00 a 208.00 °C. P. Ebullición: 212 a 213 °C. P. de vapor: 0.035000 mm/Hg 154.24 g/mol	
$\alpha$ -Terpineol	$C_{10}H_{18}O$	Olor floral, con un matiz de limón.	Líquido viscoso incoloro. P. Ebullición: 214 a 218 °C. P de vapor: 0.028300 mm / Hg 154.24 g/mol	
$\alpha$ -Tujeno	$C_{10}H_{16}$	Olor leñoso, como un pinar después de la lluvia.	Líquido incoloro. P. Ebullición: 150 a 152 °C. P. de vapor: 4.770000 mm/Hg 136.23 g/mol	

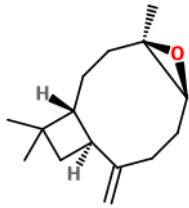
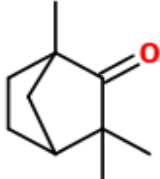
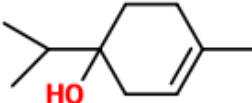
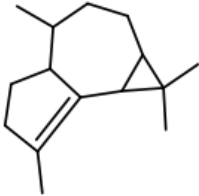
Continuación, **Tabla 24.**

Nombre	Fórmula	Olor	Propiedades	Estructura
$\alpha$ -Terpineno	$C_{10}H_{16}$	Olor fuerte a madera.	Soluble en: alcohol, aceites fijos Insoluble en: agua P. Ebullición: 173.00 a 175.00 °C. P. de vapor: 1.638000 mm/ 136.23 g/mol	
$\alpha$ -Pineno	$C_{10}H_{16}$	Olor a pino resinoso. Olor a trementina.	P. Congelación: -64 a -62 °C. P. Ebullición: 155 a 156 °C. P. de vapor: 3.489000 mm/Hg @ 25.00 ° 136.23 g/mol	
$\beta$ -Pineno	$C_{10}H_{16}$	Tipo de olor, terpénico. Madera de pino.	Líquido incoloro. P. Ebullición: 164 a 165 °C. P. de vapor: 2.399000 mm/Hg 136.23 g/mol	
$\alpha$ -Fencheno	$C_{10}H_{16}$	Olor a alcanfor.	Categoría: sustancias naturales y extractos P. Ebullición: 157 a 159 °C. P. de vapor: 3.380000 mm/Hg 136.23g/mol	

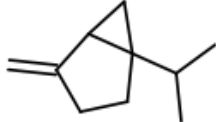
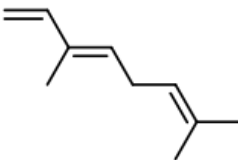
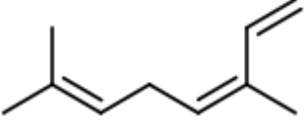
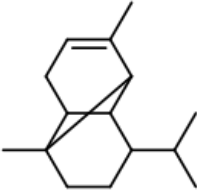
Continuación, **Tabla 24.**

Nombre	Fórmula	Olor	Propiedades	Estructura
<i>Trans-β</i> -Cariofileno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	Olor dulce a madera seca.	Líquido aceitoso claro	
α-Humuleno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	Olor leñoso.	Líquido amarillento claro. Verde pálido. P. Ebullición: 166 a 168 °C. P. de vapor: 0.008120 mm/Hg 204.356 g/mol	
Palustrol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	N.D.	P. Ebullición: 293 a 294 °C. P. de vapor :0.000179 mm/Hg 222.36 g/mol	
α-Felandreno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	Olor agradable, fresco, cítrico y picante leñoso, con una nota discreta de menta.	Incoloro o líquido amarillo claro. P. Ebullición: 175 a 176 °C. P. de vapor: 1.860000 mm/Hg 136.23 g/mol	

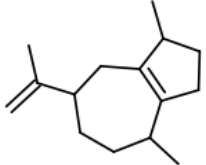
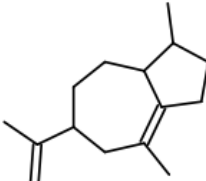
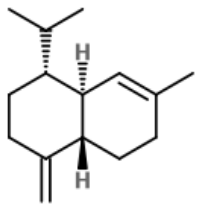
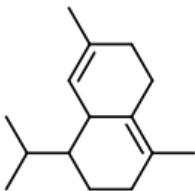
Continuación, **Tabla 24.**

Nombre	Fórmula	Olor	Propiedades	Estructura
Óxido de cariofileno	$C_{15}H_{24}O$	Olor dulce picante. Madera seca.	Líquido de color amarillo pálido. P. de fusión: 60 a 63 ° C. Presión de vapor: 0.006720 mm/Hg Vida útil: 24 meses, si se almacena correctamente. 220.35 g/mol	
Fenchona	$C_{10}H_{16}O$	Olor a hierbas leñosas.	P. de fusión: 5 a 6 ° C. P. de ebullición: 193 a 194 ° C. P. de vapor: 0.463000 mm / Hg 152.23 g/mol	
Terpinen-4-ol	$C_{10}H_{18}O$	Olor agradable, terroso, con una nota ligeramente picante.	Líquido amarillo pálido P. de ebullición: 212 °C. P. de vapor: 0.020000 mm/Hg 154.25 g/mol	
$\alpha$ -Gurjuneno	$C_{15}H_{24}$	Olor madera de bálsamo.	Líquido incoloro. P. de ebullición: 262 a 263 ° C. P. de vapor: 0.016400 mm/Hg 204.35 g/mol	

Continuación, **Tabla 24.**

Nombre	Fórmula	Olor	Propiedades	Estructura
Sabineno	$C_{10}H_{16}$	Olor madera de pino.	Líquido amarillo pálido P. de ebullición: 163 a 165 °C. P. de vapor: 2.630000 mm/Hg 136.23 g/mol	
<i>trans</i> -β-Ocimeno	$C_{10}H_{16}$	Olor dulce a hierbas.	Líquido incoloro o amarillo claro. P. de ebullición: 174 a 175 °C. P. de vapor: 1.560000 mm/Hg 136.23 g/mol	
<i>cis</i> -β-Ocimeno	$C_{10}H_{16}$	Olor a hierba floral dulce.	Líquido amarillo claro. P. de ebullición: 177 °C. P. de vapor: 1.560000 mm/Hg 136.23 g/mol	
α-Copaeno	$C_{15}H_{24}$	Olor a madera de especias.	Líquido incoloro viscoso. P. de ebullición: 246 a 251 °C. P. de vapor: 0.038100 mm/Hg 204.35 g/mol	

Continuación, **Tabla 24.**

Nombre	Fórmula	Olor	Propiedades	Estructura
α-Guaieno	$C_{15}H_{24}$	Olor dulce bálsamo de madera picante.	P. de ebullición: 281 a 282 °C. P. de vapor: 0.006200 mm/Hg 204.35 g/mol	
α-Bulneseno	$C_{15}H_{24}$	N.D.	P. de ebullición: 274 a 275 °C. P. de vapor: 0.009040 mm/Hg 204.35g/mol	
γ-Cadineno	$C_{15}H_{24}$	N.D.	P. de ebullición: 271 a 276 °C. P. de vapor: 0.010300 mm/Hg 204.35g/mol	
δ-Cadineno	$C_{15}H_{24}$	Olor a hierbas leñosas.	P. de ebullición: 279 a 280 °C. P. de vapor: 0.006690 mm/Hg 204.35g/mol	

Continuación, **Tabla 24.**

Nombre	Fórmula	Olor	Propiedades	Estructura
Curzereno	$C_{15}H_{20}O$	N.D.	216.32 g/mol	