

**AISLAMIENTO Y DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE UN
SESQUITERPENO MAYORITARIO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Lippia alba*
(Mill.) N.E.Br.**

INGRID JOHANNA MIRANDA CARVAJAL

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2008**

**AISLAMIENTO Y DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE UN
SESQUITERPENO MAYORITARIO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Lippia*
alba (Mill.) N.E.Br**

INGRID JOHANNA MIRANDA CARVAJAL

**Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de
Magister en Química**

Directores

**ELENA E. STASHENKO, QUÍMICA, Ph.D.
JAIRO RENÉ MARTÍNEZ, QUÍMICO, Ph.D.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2008**

El conocimiento no es más que un accidente de la representación y no un atributo necesario y esencial de ella, y que lo que llamamos conciencia, lejos de ser la conciencia misma, no es más que una condición de nuestra naturaleza intelectual y moral.

LEIBNITZ

(Tomado de "La Gaya Ciencia" Friedrich Nietzsche)

El placer y el dolor están tan fuertemente atados uno al otro, que quien quiera gozar del primero hasta donde quepa, tendrá por fuerza que gustar también el último en proporción semejante.

FRIEDRICH NIETZSCHE

La Gaya Ciencia

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elena E. Stashenko, un verdadero ejemplo de progreso a nivel profesional, institucional, personal y de la comunidad. Por su incansable trabajo y obra, por permitirme avanzar en mi formación profesional y personal.

Al Dr. Jairo R. Martínez, por sus acertados aportes y por los medios proporcionados en la realización de este trabajo de investigación.

A la Universidad Industrial de Santander, al Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM, al Laboratorio de Cromatografía y a COLCIENCIAS por proporcionar los recursos para el desarrollo de este trabajo.

Al M.Sc José Carlos Gutiérrez y al Laboratorio de Química Industrial por su valiosa orientación y colaboración.

A mi madre por su apoyo incondicional de toda la vida y a quien le debo todo.

A mis compañeros del laboratorio, quienes con sus palabras de aliento, humor y compañerismo, hicieron mi trabajo más divertido, y especialmente a Toto, Natalia, Adri, Olga, Martha O., Lucía, Andrea, Carol, Sayde, Geovana, Amner, Martha C., Ángela y Mónica por los buenos momentos compartidos y la colaboración recibida. A Monili, July, Owen y Hernán por su apoyo en la parte final del proyecto, y a Cirulin por ser como es.

TABLA DE CONTENIDO

| | | Pág |
|---------|--|-----|
| | INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1. | MARCO CONCEPTUAL | 4 |
| 1.1 | ACEITES ESENCIALES | 4 |
| 1.2 | TERPENOIDES | 5 |
| 1.2.1 | Sesquiterpenoides | 6 |
| 1.3 | FAMILIA VERBENACEAE | 9 |
| 1.3.1 | <i>Lippia alba</i> (Mill.)N.E.Brown | 10 |
| 1.3.2 | <i>Lippia citriodora</i> H.B.K. | 11 |
| 1.3.3 | <i>Lippia dulcis</i> (Trev.) | 12 |
| 1.3.4 | <i>Lippia micromera</i> Schauer | 13 |
| 1.3.5 | <i>Lippia organoides</i> H.B.K | 13 |
| 1.4 | DESTILACIÓN FRACCIONADA A PRESIÓN REDUCIDA | 14 |
| 1.5 | DESTILACIÓN POR ARRASTRE CON VAPOR DE AGUA | 15 |
| 1.6 | CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA | 16 |
| 1.7 | CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA Y LOS ACEITES ESENCIALES | 17 |
| 1.8 | ROTACIÓN ÓPTICA | 18 |
| 2. | DESCRIPCIÓN DEL PROCESO EXPERIMENTAL | 19 |
| 2.1 | REACTIVOS Y EQUIPOS UTILIZADOS | 19 |
| 2.1.1 | Reactivos | 19 |
| 2.1.2 | Equipos | 20 |
| 2.2 | DESARROLLO EXPERIMENTAL | 21 |
| 2.2.1 | Identificación taxonómica de las especies de <i>Lippia</i> estudiadas | 21 |
| 2.2.2 | Extracción de los metabolitos secundarios volátiles de cada una de las especies de <i>Lippia</i> estudiadas | 22 |
| 2.2.2.1 | Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD) | 23 |
| 2.2.2.2 | Destilación – Extracción con Solvente (SDE) | 24 |
| 2.2.3 | Análisis por cromatografía de gases – espectrometría de masas | 25 |
| 2.2.3.1 | Parámetros operacionales utilizados en la identificación de los componentes separados por columna apolar (DB – 5 MS) | 25 |
| 2.2.3.2 | Parámetros operacionales utilizados en la identificación de | 27 |

| | | |
|----------------|--|-----------|
| | los componentes separados por columna polar (DB–WAX) | |
| 2.2.4 | Identificación y cuantificación de los componentes separados en los AE y en los extractos de las <i>Lippias</i> estudiadas | 29 |
| 2.2.5 | Determinación de algunas propiedades fisicoquímicas para los AE de las <i>Lippias</i> estudiadas | 31 |
| 2.2.5.1 | Determinación de la densidad | 31 |
| 2.2.5.2 | Determinación del índice de refracción | 31 |
| 2.2.5.3 | Determinación de la rotación específica | 31 |
| 2.2.6 | Destilación fraccionada a presión reducida | 32 |
| 2.2.7 | Destilación por arrastre con vapor de agua | 34 |
| 2.2.8 | Cromatografía de capa fina | 35 |
| 3. | CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES Y DE LOS EXTRACTOS DE LAS LIPPIAS ESTUDIADAS MEDIANTE GC –MS | 37 |
| 3.1 | ACEITE ESENCIAL OBTENIDO DE LAS HOJAS DE <i>LIPPIA ALBA</i> (QUIMIOTIPO CARVONA) POR MWHD | 37 |
| 3.2 | ACEITE ESENCIAL OBTENIDO DE LAS HOJAS DE <i>LIPPIA ALBA</i> (QUIMIOTIPO CITRAL) POR MWHD | 65 |
| 3.3 | ACEITE ESENCIAL OBTENIDO DE LAS HOJAS DE <i>LIPPIA CITRIODORA</i> H.B.K. POR MWHD | 73 |
| 3.4 | ACEITE ESENCIAL OBTENIDO DE LAS HOJAS DE <i>LIPPIA DULCIS</i> (Trev.) POR MWHD | 78 |
| 3.5 | ACEITE ESENCIAL OBTENIDO DE LAS HOJAS DE <i>LIPPIA MICROMERA</i> SCHAUER POR MWHD | 85 |
| 3.6 | ACEITE ESENCIAL OBTENIDO DE LAS HOJAS DE <i>LIPPIA ORIGANOIDES</i> H.B.K (QUIMIOTIPO CARVACROL) POR MWHD | 91 |
| 3.7 | ACEITE ESENCIAL OBTENIDO DE LAS HOJAS DE <i>LIPPIA ORIGANOIDES</i> H.B.K (QUIMIOTIPO <i>p</i> –C IMENO) POR MWHD | 97 |
| 3.8 | EXTRACTO SDE DE HOJAS DE <i>LIPPIA ALBA</i> (QUIMIOTIPO CARVONA) | 101 |
| 3.9 | EXTRACTO SDE DE HOJAS DE <i>LIPPIA ALBA</i> (QUIMIOTIPO CITRAL) | 104 |
| 3.10 | EXTRACTO SDE DE HOJAS DE <i>LIPPIA CITRIODORA</i> H.B.K | 107 |
| 3.11 | EXTRACTO SDE DE HOJAS DE <i>LIPPIA DULCIS</i> (Trev.) | 110 |
| 3.12 | EXTRACTO SDE DE HOJAS DE <i>LIPPIA MICROMERA</i> SCHAUER | 114 |
| 3.13 | EXTRACTO SDE DE HOJAS DE <i>LIPPIA ORIGANOIDES</i> | 117 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 3.14 | H.B.K (QUIMIOTIPO CARVACROL) EXTRACTO SDE DE HOJAS DE <i>LIPPIA ORIGANOIDES</i> | 120 |
| 3.15 | H.B.K (QUIMIOTIPO <i>p</i> -C IMENO) DETERMINACIÓN DE ALGUNAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS AE DE LAS ESPECIES DE <i>LIPPIA</i> ESTUDIADAS | 124 |
| 3.15.1 | Determinación de la densidad, el índice de refracción y la rotación específica | 124 |
| 4. | AISLAMIENTO Y DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE UN SESQUITERPENO MAYORITARIO DEL AE DE <i>L. ALBA</i> (Mill.)N.E.Br. | 128 |
| 4.1 | DESTILACION FRACCIONADA A PRESIÓN REDUCIDA (DFPR) | 128 |
| 4.1.1 | Destilación en el equipo de cobre | 128 |
| 4.1.2 | Destilación en el equipo de vidrio | 131 |
| 4.2 | DESTILACION POR ARRASTRE CON VAPOR DE AGUA | 136 |
| 4.3 | CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (TLC) | 140 |
| 5. | CONCLUSIONES | 142 |
| 6. | RECOMENDACIONES | 144 |
| | BIBLIOGRAFÍA | 145 |

LISTA DE FIGURAS

| | | Pág. |
|-------------------|---|-------------|
| Figura 1. | Perfil cromatográfico del AE de <i>L. alba</i> , quimiotipo carvona obtenido por MWHD. Columna DB – 5 MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los componentes se encuentra reportada en la Tabla 5. | 38 |
| Figura 2. | Espectro de masas de la carvona. | 43 |
| Figura 3. | Espectro de masas del limoneno. | 45 |
| Figura 4. | Espectro de masas de la piperitenona. | 47 |
| Figura 5. | Espectro de masas del biciclosesquifelandreno. | 49 |
| Figura 6. | Espectro de masas de la piperitona. | 50 |
| Figura 7. | Perfil cromatográfico del AE de <i>L. alba</i> (quimiotipo citral) obtenido por MWHD. Columna DB – 5 MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los componentes se encuentra reportada en la Tabla 6. | 53 |
| Figura 8. | Estructura molecular de los isómeros geométricos del citral, Z y E | 56 |
| Figura 9. | Espectro de masas del neral. | 57 |
| Figura 10. | Espectro de masas del geranial. | 59 |
| Figura 11. | Perfil cromatográfico del AE de <i>L. citriodora</i> H.B.K. obtenido por MWHD. Columna DB – 5 MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los componentes se encuentra reportada en la Tabla 7. | 62 |
| Figura 12. | Perfil cromatográfico del AE de <i>L. dulcis</i> (Trev.) obtenido por MWHD. Columna DB – 5 MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los componentes se encuentra reportada en la Tabla 8. | 66 |
| Figura 13. | Espectro de masas del <i>trans</i> -β-cariofileno. | 69 |
| Figura 14. | Espectro de masas del δ-cadineno. | 70 |
| Figura 15. | Perfil cromatográfico del AE de <i>L. micrómera</i> Schauer obtenido por MWHD. Columna DB – 5 MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los componentes se encuentra reportada en la Tabla 9. | 74 |
| Figura 16. | Espectro de masas del timol. | 77 |
| Figura 17. | Espectro de masas del γ-terpineno. | 78 |

| | | |
|-------------------|--|-----|
| Figura 18. | Perfil cromatográfico del AE de <i>L. origanoides</i> (quimiotipo carvacrol) obtenido por MWHD. Columna DB – 5 MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los componentes se encuentra reportada en la Tabla 10. | 81 |
| Figura 19. | Espectro de masas del <i>p</i> -cimeno. | 84 |
| Figura 20. | Perfil cromatográfico del AE de <i>L. origanoides</i> (quimiotipo <i>p</i> -cimeno) obtenido por MWHD. Columna DB – 5 MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los componentes se encuentra reportada en la Tabla 11. | 87 |
| Figura 21. | Perfil cromatográfico del extracto de <i>L. alba</i> (quimiotipo carvona) obtenido por SDE. Columna DB – 5 MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los componentes se encuentra reportada en la Tabla 12. | 90 |
| Figura 22. | Perfil cromatográfico del extracto de <i>L. alba</i> (quimiotipo citral) obtenido por SDE. Columna DB – 5 MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los componentes se encuentra reportada en la Tabla 13. | 94 |
| Figura 23. | Perfil cromatográfico del extracto de <i>L. citriodora</i> H.B.K. obtenido por SDE. Columna DB – 5 MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los componentes se encuentra reportada en la Tabla 14. | 98 |
| Figura 24. | Perfil cromatográfico del extracto de <i>L. dulcis</i> (Trev.) obtenido por SDE. Columna DB – 5 MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los componentes se encuentra reportada en la Tabla 15. | 101 |
| Figura 25. | Perfil cromatográfico del extracto de <i>L. micrómera</i> Schauer obtenido por SDE. Columna DB – 5 MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los componentes se encuentra reportada en la Tabla 16. | 104 |
| Figura 26. | Perfil cromatográfico del extracto de <i>L. origanoides</i> H.B.K (quimiotipo carvacrol) obtenido por SDE. Columna DB – 5 MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los componentes se encuentra reportada en la Tabla 17. | 108 |
| Figura 27. | Perfil cromatográfico del extracto de <i>L. origanoides</i> H.B.K (quimiotipo <i>p</i> -cimeno) obtenido por SDE. Columna DB – 5 MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los componentes se | 111 |

| | | |
|-------------------|--|-----|
| | encuentra reportada en la Tabla 18. | |
| Figura 28. | Comparación de los perfiles cromatográficos de todas las especies de <i>Lippia</i> estudiadas para resaltar el pico correspondiente al biciclosesquifelandreno en <i>L. alba</i> (quimiotipo carvona). | 118 |
| Figura 29. | Perfil cromatográfico del AE de <i>L. alba</i> (quimiotipo carvona) obtenido por MWHD, antes (A) y después (B) de ser sometido DFPR en el equipo de cobre. Columna DB – 5 MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los componentes se encuentra reportada en la Tabla 22. | 120 |
| Figura 30. | Perfil cromatográfico del AE de <i>L. alba</i> (quimiotipo carvona), obtenido por MWHD, antes (A) de ser sometido a la DFPR en el equipo de vidrio, y sus cuatro fracciones recogidas (F1, F2, F3 y Ff). Columna DB – 5 MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los componentes se encuentra reportada en la Tabla 24. | 124 |
| Figura 31. | Representación estructural del biciclosesquifelandreno y un enantiómero. | 127 |
| Figura 32. | Perfil cromatográfico de la fracción de <i>L. alba</i> (quimiotipo carvona), extraída por destilación por arrastre con vapor de agua. Columna DB – 5 MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los componentes se encuentra reportada en la Tabla 25. | 129 |
| Figura 33. | Representación de las estructuras moleculares β -elemeno, β -bourboneno, <i>allo</i> – aromadendreno y epi – biciclosesquifelandreno. | 130 |
| Figura 34. | Espectros de masas de biciclosesquifelandreno en el AE <i>L. alba</i> (quimiotipo carvona) y el de la fracción obtenida por DAV, comparado con el de la base de datos. | 131 |

LISTA DE TABLAS

| | | Pág. |
|------------------|---|------|
| Tabla 1. | Clasificación de terpenos según Wallach (1887). | 6 |
| Tabla 2. | Clasificación de los sesquiterpenos. | 8 |
| Tabla 3. | No. de Voucher para cada una de las <i>Lippias</i> estudiadas correspondiente a la identificación taxonómica. | 22 |
| Tabla 4. | Condiciones de trabajo usadas en la MWHD. | 24 |
| Tabla 5. | Composición química, cantidad relativa (%) y concentración (ppm) de los componentes en el AE <i>L. alba</i> (quimiotipo carvona) aislado por MWHD. | 39 |
| Tabla 6. | Composición química, cantidad relativa (%) y concentración (ppm) de los componentes en el AE <i>L. alba</i> (quimiotipo citral) aislado por MWHD. | 54 |
| Tabla 7. | Composición química, cantidad relativa (%) y concentración (ppm) de los componentes en el AE <i>L. citriodora</i> H.B.K. aislado por MWHD. | 66 |
| Tabla 8. | Composición química, cantidad relativa (%) y concentración (ppm) de los componentes en el AE <i>L. dulcis</i> (Trev.) aislado por MWHD. | 79 |
| Tabla 9. | Composición química, cantidad relativa (%) y concentración (ppm) de los componentes en el AE <i>L. micrómera</i> Schauer aislado por MWHD. | 74 |
| Tabla 10. | Composición química, cantidad relativa (%) y concentración (ppm) de los componentes en el AE <i>L. origanoides</i> H.B.K (quimiotipo carvacrol) aislado por MWHD. | 83 |
| Tabla 11. | Composición química, cantidad relativa (%) y concentración (ppm) de los componentes en el AE <i>L. origanoides</i> H.B.K (quimiotipo <i>p</i> – cimeno) aislado por MWHD. | 88 |
| Tabla 12. | Composición química, cantidad relativa (%) y concentración (ppm) del extracto SDE <i>L. alba</i> (quimiotipo carvona). | 91 |
| Tabla 13. | Composición química, cantidad relativa (%) y concentración (ppm) del extracto SDE <i>L. alba</i> (quimiotipo citral). | 96 |
| Tabla 14. | Composición química, cantidad relativa (%) y concentración (ppm) del extracto SDE <i>L. citriodora</i> | 98 |

| | | |
|------------------|--|-----|
| | H.B.K. | |
| Tabla 15. | Composición química, cantidad relativa (%) y concentración (ppm) del extracto SDE <i>L. dulcis</i> (Trev.). | 102 |
| Tabla 16. | Composición química, cantidad relativa (%) y concentración (ppm) del extracto SDE <i>L. micrómera</i> Schauer. | 105 |
| Tabla 17. | Composición química, cantidad relativa (%) y concentración (ppm) del extracto SDE <i>L. origanoides</i> H.B.K. (quimiotipo carvacrol). | 109 |
| Tabla 18. | Composición química, cantidad relativa (%) y concentración (ppm) del extracto SDE <i>L. origanoides</i> H.B.K. (quimiotipo <i>p</i> – cimeno). | 112 |
| Tabla 19. | Densidades y rotaciones específicas para cada una de las especies de <i>Lippia</i> analizadas a 23 °C. | 115 |
| Tabla 20. | Índices de refracción para cada una de las especies de <i>Lippia</i> analizadas a 20 °C. | 115 |
| Tabla 21. | Datos obtenidos de la DFPR en el equipo de cobre. | 120 |
| Tabla 22. | Composición química, cantidad relativa (%) y concentración (ppm) de los componentes en el AE de <i>L. alba</i> (quimiotipo carvona), obtenido por MWHD, antes (A) y después (B) de ser sometido a la destilación fraccionada a presión reducida en el equipo de cobre. | 121 |
| Tabla 23. | Datos obtenidos de la DFPR en el equipo de vidrio. | 123 |
| Tabla 24. | Composición química, cantidad relativa (%) y concentración (ppm) de los componentes en el AE de <i>L. alba</i> (quimiotipo carvona), obtenido por MWHD, antes (A) de ser sometido a la destilación fraccionada a presión reducida en el equipo de vidrio, junto con las cuatro fracciones obtenidas. | 125 |
| Tabla 25. | Composición química, cantidad relativa (%) y concentración (ppm) de los componentes en la fracción de <i>L. alba</i> (quimiotipo carvona), extraído por destilación por arrastre con vapor de agua. | 129 |
| Tabla 26. | Índices de retención (I_k) experimental y teórico por columna apolar y polar para el biciclosesquifelandreno. | 132 |

LISTA DE GRÁFICAS

| | | Pág. |
|--------------------|--|-------------|
| Gráfica 1. | Distribución de los grupos de familias encontrados en el AE de <i>L. alba</i> (quimiotipo carvona) extraído por MWHD. | 41 |
| Gráfica 2. | Distribución de los grupos de familias encontrados en el AE de <i>L. alba</i> (quimiotipo citral) extraído por MWHD. | 55 |
| Gráfica 3. | Distribución de los grupos de familias encontrados en el AE de <i>L. citriodora</i> H.B.K. extraído por MWHD. | 64 |
| Gráfica 4. | Distribución de los grupos de familias encontrados en el AE de <i>L. dulcis</i> (Trev.) extraído por MWHD. | 68 |
| Gráfica 5. | Distribución de los grupos de familias encontrados en el AE de <i>L. micrómera</i> Schauer extraído por MWHD. | 76 |
| Gráfica 6. | Distribución de los grupos de familias encontrados en el AE de <i>L. origanoides</i> H.B.K. (quimiotipo carvacrol) extraído por MWHD. | 82 |
| Gráfica 7. | Distribución de los grupos de familias encontrados en el AE de <i>L. origanoides</i> H.B.K. (quimiotipo <i>p</i> -cimeno) extraído por MWHD. | 88 |
| Gráfica 8. | Distribución de los principales compuestos mayoritarios encontrados en el AE y extracto de <i>L. alba</i> (quimiotipo carvona) por MWHD y SDE. | 93 |
| Gráfica 9. | Distribución de los principales compuestos mayoritarios encontrados en el AE y extracto de <i>L. alba</i> (quimiotipo citral) por MWHD y SDE. | 95 |
| Gráfica 10. | Distribución de los principales compuestos mayoritarios encontrados en el AE y extracto de <i>L. citriodora</i> H.B.K. por MWHD y SDE. | 100 |
| Gráfica 11. | Distribución de los principales compuestos mayoritarios encontrados en el AE y extracto de <i>L. dulcis</i> (Trev.) por MWHD y SDE. | 103 |
| Gráfica 12. | Distribución de los principales compuestos mayoritarios encontrados en el AE y extracto de <i>L. micrómera</i> Schauer por MWHD y SDE. | 107 |
| Gráfica 13. | Distribución de los principales compuestos mayoritarios encontrados en el AE y extracto de <i>L. origanoides</i> H.B.K. (quimiotipo carvacrol) por MWHD y SDE. | 110 |
| Gráfica 14. | Distribución de los principales compuestos mayoritarios encontrados en el AE y extracto de <i>L. origanoides</i> | 113 |

| | | |
|--------------------|---|-----|
| Gráfica 15. | H.B.K. (quimiotipo <i>p</i> – cimeno) por MWHD y SDE. Distribución de las principales familias de compuestos en los AE de las especies de <i>Lippia</i> analizadas. | 116 |
|--------------------|---|-----|

LISTA DE FOTOGRAFÍAS

| | | Pág. |
|-----------------------|--|------|
| Fotografía 1. | Montaje del equipo de MWHD. | 23 |
| Fotografía 2. | Montaje del equipo SDE. | 24 |
| Fotografía 3. | Cromatógrafo de gases <i>Agilent Technologies 6890 Plus</i> y un detector selectivo de masas <i>Agilent Technologies MSD 5973 Network</i> . | 27 |
| Fotografía 4. | Cromatógrafo de gases <i>Agilent Technologies 6890N Network</i> y un detector selectivo de masas <i>Agilent Technologies MSD 5975 Inert XL</i> . | 29 |
| Fotografía 5. | (a) Equipo de destilación fraccionada en vidrio y (b) fuente de calentamiento (baño termostatado). | 33 |
| Fotografía 6. | Equipo de destilación fraccionada en cobre. | 34 |
| Fotografía 7. | Montaje del equipo de destilación por arrastre con vapor de agua. | 35 |
| Fotografía 8 | Equipo de cromatografía de capa fina | 36 |
| Fotografía 9. | <i>Lippia alba</i> (Mill.)N.E.Br., quimiotipo carvona. | 37 |
| Fotografía 10. | <i>Lippia alba</i> (Mill.)N.E.Br., quimiotipo citral. | 52 |
| Fotografía 11. | <i>Lippia citriodora</i> H.B.K. | 61 |
| Fotografía 12. | <i>Lippia dulcis</i> (Trev.) | 65 |
| Fotografía 13. | <i>Lippia micromera</i> (Schauer). | 73 |
| Fotografía 14. | <i>Lippia origanoides</i> H.B.K., quimiotipo carvacrol. | 80 |
| Fotografía 15. | <i>Lippia origanoides</i> H.B.K., quimiotipo <i>p</i> – cimeno. | 86 |

LISTA DE ESQUEMAS

| | | Pág. |
|--------------------|--|------|
| Esquema 1. | Posibles rutas de fragmentación de la carvona. | 44 |
| Esquema 2. | Posibles rutas de fragmentación del limoneno. | 46 |
| Esquema 3. | Posibles rutas de fragmentación de la piperitenona. | 47 |
| Esquema 4. | Posibles rutas de fragmentación del biciclosesquifelandreno. | 49 |
| Esquema 5. | Posibles rutas de fragmentación de la piperitona. | 51 |
| Esquema 6. | Posibles rutas de fragmentación del neral. | 58 |
| Esquema 7. | Posibles rutas de fragmentación del geraniol. | 60 |
| Esquema 8. | Posibles rutas de fragmentación del <i>trans</i> - β - cariofileno. | 69 |
| Esquema 9. | Posibles rutas de fragmentación del δ -cadineno. | 71 |
| Esquema 10. | Posibles rutas de fragmentación del timol. | 77 |
| Esquema 11. | Posibles rutas de fragmentación del γ -terpineno. | 79 |
| Esquema 12. | Posibles rutas de fragmentación del <i>p</i> -cimeno. | 85 |

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

| | |
|----------------------|--|
| AE | Aceite(s) esencial(es) |
| GC | <i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases) |
| FID | Detector de ionización en llama |
| MS | <i>Mass Spectrometry</i> (Espectro o Espectrometría de masas) |
| MSD | <i>Mass Selective Detector</i> (Detector Selectivo de masas) |
| GC – MS | <i>Gas Chromatography – Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas) |
| MWHD | <i>Microwave – Assisted Hydrodistillation</i> (Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas) |
| SDE | <i>Simultaneous Distillation – Solvent Extraction</i> (Destilación – extracción con solvente) |
| eV | Electrón – Voltio |
| d_f | Espesor de la fase estacionaria, μm |
| D.I. | Diámetro interno, mm. |
| istd | Estándar interno |
| Thshd | Umbral de integración |
| °C | Grado centígrado |
| DFPR | Destilación fraccionada a presión reducida |
| DAV | Destilación por arrastre con vapor de agua |
| CENIVAM | Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales |

| | |
|----------------------|---|
| | Aromáticas y Medicinales Tropicales |
| HM | Hidrocarburos monoterpénicos |
| MO | Monoterpenos oxigenados |
| HS | Hidrocarburos sesquiterpénicos |
| SO | Sesquiterpenos oxigenados |
| ca. | <i>Circa</i> (aproximadamente) |
| e.g. | <i>Exempli Gratia</i> (por ejemplo) |
| EI | Impacto de electrones |
| M⁺ | Ión molecular |
| m/z | Relación masa/carga |
| ppm | Partes por millón |
| % p/p | Porcentaje peso a peso |
| t_R | Tiempo de retención (min) |
| RDA | Retro Diels – Alder |
| UIS | Universidad Industrial de Santander |
| CIBIMOL | Centro de Investigación en Biomoléculas |
| R_f | Razón de avance |
| NI | No identificado(s) |

RESUMEN

TÍTULO: AISLAMIENTO Y DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE UN SESQUITERPENO MAYORITARIO DEL ACEITE ESENCIAL DE *LIPPIA ALBA* (Mill.)N.E.Br.

Autor: Ingrid Johanna Miranda Carvajal**

Palabras claves: Aceites esenciales, *Lippia alba* (quimiotipo carvona), destilación fraccionada a presión reducida, destilación por arrastre con vapor de agua, cromatografía de capa fina, biciclosesquifelandreno.

En la presente investigación se determinó la composición química y se caracterizaron por medio de sus propiedades fisicoquímicas (densidad, índices de refracción y rotaciones específicas), los aceites esenciales de diferentes especies del género *Lippia*: *L. alba*, *L. citriodora* H.B.K., *L. dulcis* (Trev.), *L. micromera* Schauer, *L. origanoides* H.B.K. Los aceites esenciales y los extractos se obtuvieron por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWH) y por destilación – extracción con solvente (SDE), respectivamente. La identificación de los metabolitos secundarios volátiles se realizó por cromatografía de gases – espectrometría de masas; así como también, se logró un pre – aislamiento del sesquiterpeno mayoritario del aceite de *Lippia alba*, quimiotipo carvona, por métodos fisicoquímicos.

Los componentes mayoritarios identificados en los aceites *L. alba* (quimiotipos carvona y citral), *L. citriodora* H.B.K., *L. micromera* Schauer, *L. origanoides* H.B.K. (quimiotipos carvacrol y *p* – cimeno), corresponden a monoterpenos oxigenados (53.05, 65.30, 54.24, 64.14, 63.32 y 45.07%, respectivamente). Se destacan como componentes mayoritarios, carvona (40,11%), limoneno (27,73%) y *epi* – biciclosesquifelandreno (4,92%) en el aceite de *L. alba* (quimiotipo carvona). Geranial y neral predominan en los aceites de *L. alba*, quimiotipo citral, (27,79 y 22,92%) y de *L. citriodora* (14,35 y 13,75%), respectivamente. Carvacrol y timol predominan en el aceite de *L. origanoides*, quimiotipo carvacrol. En tanto que, el timol fue el componente mayoritario para el aceite de *L. micromera* (34,19%) y del aceite de *L. origanoides*, quimiotipo *p* – cimeno (timol 29,84% y *p* – cimeno 12,05%). Por otro parte, en el aceite esencial de *L. dulcis* (Trev.), predominaron los hidrocarburos sesquiterpénicos: (*E*)- α -cariofileno (9,4 %) y α -cadineno (8,85 %), entre otros. El aceite esencial de *L. alba*, quimiotipo carvona, fue sometido a varios procesos, de los cuales, la destilación por arrastre con vapor de agua, logró el pre – aislamiento del *epi* – biciclosesquifelandreno.

*Tesis de Maestría en Química

**Facultad de ciencias, Escuela de química, Elena E. Stashenko.

ABSTRACT

TITLE: ISOLATION AND STRUCTURAL DETERMINATION OF THE MOST ABUNDANT SESQUITERPENE IN THE OF ESSENTIAL OIL OF *LIPPIA ALBA* (Mill.) N.E.Br.*

Author: Ingrid Johanna Miranda Carvajal**

Key words: Essential oils, *Lippia alba* (chemotype carvone), fractional distillation to reduced pressure, distillation for haulage with vapor of water, thin layer chromatography, bicyclosesquiphellandrene.

In the present investigation, the chemical composition was determined and characterized by means of its physiochemical properties (density, refraction indexes and specific rotations), the essential oils of different species of the gender *Lippia*: *L. alba*, *L. citriodora* H.B.K., *L. dulcis* (Trev.), *L. micromera* Schauer, *L. organoides* H.B.K. The essential oils and the extracts were obtained applying microwave assisted hydro – distillation (MWHD) and simultaneous distillation – solvent extraction (SDE), respectively. The identification of the volatile secondary metabolites was carried out by employing gas chromatography – mass spectrometry; moreover, the majority sesquiterpene of the essential oil of *L. alba*, chemotype carvone, was partially isolated for physiochemical methods.

The most components identified in the essential oils of *L. alba* (chemotypes carvone and citral), *L. citriodora* H.B.K., *L. micromera* Schauer, *L. organoides* H.B.K. (chemotypes carvacrol and *p* – cimene), correspond to oxygenated monoterpenes (53.05, 65.30, 54.24, 64.14, 63.32 and 45.07%, respectively). Carvone (40,11%), limonene (27,73%) and *epi* – bicyclosesquiphellandrene (4,92%) are present in more quantity in the oil of *L. alba* (chemotype carvone). Geranial and neral predominate in the oils of *L. alba*, chemotype citral, (27,79 and 22,92%) and of *L. citriodora* (14,35 and 13,75%), respectively. Carvacrol and thymol characterize the oil of *L. organoides*, chemotype carvacrol. As long as, the thymol was the majority component of the oil of *L. micromera* (34,19%) and of the oil of *L. organoides*, chemotype *p* – cimene (thymol 29,84% and *p* – cimene 12,05%). On the other hands, in the essential oil of *L. dulcis* (Trev.), is characterized for its high sesquiterpenic hydrocarbons content: (*trans*)– β –caryophyllene (9,4%) and δ –cadinene (8,85%), among others. The essential oil of *L. alba*, chemotype carvone, was subjected to several processes, of those which, the distillation for haulage with vapor of water, achieved the pre–isolation of the *epi* – bicyclosesquiphellandrene.

*Thesis of Chemistry Magister

**Science Faculty School Chemistry, Elena E. Stashenko.

INTRODUCCIÓN

Desde que el hombre existe, su gran preocupación ha sido la lucha por la supervivencia, por conseguir las curas de sus enfermedades y así extender su tiempo de vida. Las plantas medicinales han provisto diferentes materiales, alimentos y curas a través de los años a la raza humana, y así es que, los pueblos primitivos han adquirido información sobre las propiedades medicinales de las plantas, en un principio por casualidad y luego por necesidad, y de esta manera se han acumulado y transmitido en forma oral estas tradiciones hasta nuestros tiempos. Hoy en día se están aplicando métodos modernos de análisis, para comprobar las propiedades que los indígenas encontraron de un modo empírico. En los últimos años, ha recibido gran impulso el estudio de las plantas medicinales, tratando de aislar sustancias activas, para las industrias farmacéutica, perfumería y cosmética, de alimentos y de plásticos, principalmente [1].

En la actualidad se definen como “aceites esenciales” las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables con agua o en corriente de vapor, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas [1,8]. Colombia está situada geográficamente en una zona de gran biodiversidad; posee alrededor de 51220 especies de plantas vasculares.

La Familia Verbenaceae posee gran biodiversidad, una amplia distribución en todo el mundo, en zonas tropicales y subtropicales,

amplios usos en la medicina vernácula y diversidad en la composición de sus AE [8,10,28,99], por lo que son de gran interés para los investigadores. Dentro de esta familia se encuentra el género *Lippia*, que reúne alrededor de 200 especies. Aprovechando la diversidad botánica que posee nuestro país y la de la familia Verbenaceae, esta investigación se encaminó a la caracterización química de los AE y de los extractos de siete especies de *Lippia*: *L. alba*, quimiotipo carvona, *L. alba*, quimiotipo citral, *L. citriodora* H.B.K., *L. dulcis* (Trev.), *L. micromera* Schauer, *L. organoides*, quimiotipo carvacrol y *L. organoides*, quimiotipo *p* – cimeno. Los AE fueron aislados por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas y los extractos fueron obtenidos por destilación – extracción con solvente. La identificación se hizo con base en criterios cromatográficos y espectroscópicos. Se determinaron la densidad, los índices de refracción y las rotaciones específicas para los AE de cada una de las especies de *Lippia* estudiadas. Finalmente, por métodos fisicoquímicos, se hizo un aislamiento parcial del sesquiterpeno mayoritario del AE de *Lippia alba*, quimiotipo carvona, (biciclosesquifelandreno), usando para su separación destilación por arrastre con vapor de agua y para su aislamiento cromatografía de capa fina.

La presente investigación hace parte del desarrollo de los objetivos del Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM), principalmente, así como también hace parte de la línea de investigación del Laboratorio Cromatografía, adscrito al Centro de Investigación en Biomoléculas (CIBIMOL), de la Universidad Industrial de Santander, con el fin de beneficiar a la comunidad agrícola campesina y además impulsar el desarrollo de la industria química de los AE en Colombia.

Los resultados obtenidos en este proyecto, fueron presentados en el XV Congreso Colombiano de Química, que se llevó a cabo en Bogotá, 29 – 31 de octubre de 2008.

1. MARCO CONCEPTUAL

1.1 ACEITES ESENCIALES

En la actualidad se definen como “aceites esenciales” las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables con agua o en corriente de vapor, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en las industrias cosmética (perfumes y aromatizantes), alimentaria (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (principios activos). Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas de más de 100 componentes que pueden tener la siguiente naturaleza química: compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), terpenoides (monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos) y fenilpropanoides [1].

El conocimiento y la utilización de estos preparados se remontan a varios siglos antes de Cristo, por lo que no es de extrañar que desde su aparición hasta la aceptación que hoy en día se les reconoce, hayan sufrido grandes cambios. De hecho, a lo largo de la evolución, las plantas han ido adaptándose y especializándose en la producción de unos tipos de sustancias, y no otros, para su propio beneficio [1].

La idea generalizada de que los aceites esenciales sirven a las plantas para favorecer la polinización, es incompleta. Muchas de las especies que presentan aceite esencial lo utilizan en ese sentido [2,3], pero numerosas investigaciones llevadas a cabo durante los últimos veinte años han puesto de manifiesto otras utilidades. Se ha comprobado que numerosos compuestos que forman parte del aceite esencial sirven a la planta para repeler posibles depredadores, e incluso

agentes patógenos, debido a su actividad anti fúngica o antibacteriana [4,5]. También se ha probado la actividad alelopática de algunos compuestos que inhiben el crecimiento de especies competidoras [6,7] entre otras.

El interés suscitado por los aceites esenciales desde su conocimiento se puso de manifiesto a partir del siglo XIX cuando comenzaron los análisis de estas mezclas complejas que conducirían al aislamiento y caracterización de sus compuestos. Actualmente se ha comprobado que los aceites esenciales están constituidos por componentes volátiles o metabolitos secundarios sintetizados a partir de distintas rutas metabólicas [1]:

- ✓ Vía metabólica del **ácido mevalónico**: Terpenoides.
- ✓ Vía metabólica del **ácido siquímico**: Fenil propanoides.
- ✓ Vía metabólica de biosíntesis de **ácidos grasos**: Compuestos alicíclicos.

1.2 TERPENOIDES

Los isoprenoides, más conocidos como terpenoides o terpenos, son un grupo de productos naturales que incluyen todas aquellas sustancias químicas que derivan biosintéticamente del ácido mevalónico (AMV) y que origina el isopentenil pirofosfato [1]. Wallach (1887) [9] propuso la clasificación de este grupo de compuestos atendiendo al número de átomos de carbono de los mismos (**Tabla 1**). Actualmente esa clasificación es reconocida a nivel mundial y seguida por cuantos trabajan con terpenoides. La etimología de esta palabra también se debe a Otto Wallach que originariamente diferenció entre “terpene” y “campher” por sus fórmulas empíricas $C_{10}H_{16}$ y $C_{10}H_{16}O$ ó $C_{10}H_{18}O$ respectivamente [1]. Esta palabra inglesa, “terpene”, deriva de la palabra alemana “terpentin”, de la inglesa “terpentine” y la francesa “térebenthine” que en español equivaldría a “trementina”. Se cree que este nombre fue tomado al ser precisamente el aceite de trementina el primero del cual se tiene testimonio escrito [8].

La unidad estructural básica de los terpenoides es el isopreno, constituido por cinco átomos de carbono. Su unión sucesiva da lugar a los distintos tipos de terpenos conocidos. De esta forma, los compuestos con un sólo isopreno son los hemiterpenos (C5), monoterpenos los de dos (C10), sesquiterpenos los de tres (C15) y así sucesivamente.

Tabla 1. Clasificación de terpenos según Wallach (1887) [9].

| Grupo | Nº de átomos de carbonos | Nº de unidades de isopreno |
|-----------------------|--------------------------|----------------------------|
| Hemiterpeno | 5 | 1 |
| Homoterpenos | 10 | 2 |
| Sesquiterpenos | 15 | 3 |
| Diterpenos | 20 | 4 |
| Sesterterpenos | 25 | 5 |
| Triterpenos | 30 | 6 |
| Tetraterpenos | 40 | 8 |
| Politerpenos | 5n | n |

Los terpenos más comunes en los aceites esenciales son aquellos de menor peso molecular, y por lo tanto más volátiles, es decir, monoterpenos y sesquiterpenos [1].

1.2.1 Sesquiterpenos

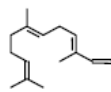
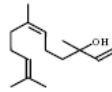
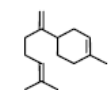
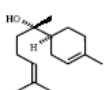
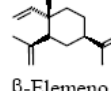
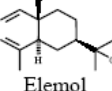
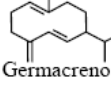
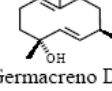
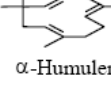
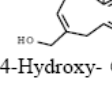
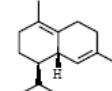
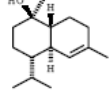
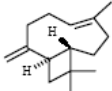
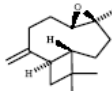
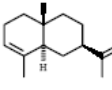
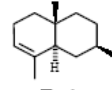
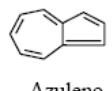
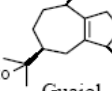
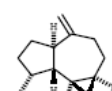
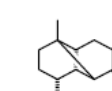
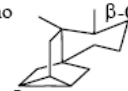
Muchos aceites esenciales en las fracciones semivolátiles de 250–280°C contienen hidrocarburos de fórmula molecular empírica, C₁₅H₂₄, a los cuales se les ha llamado **Sesquiterpenos**. Muchos de estos hidrocarburos tienen un olor débil, son más viscosos que los monoterpenos, poco solubles en alcohol, su punto de ebullición se encuentra entre 240 – 250°C, su densidad entre 0.84 – 0.93 g/mL [8].

Se caracterizan por poseer 15 átomos de carbono y por tanto tres unidades de isopreno. Aunque por regla general la mayoría de ellos presentan una unión regular “cabeza-cola”, existen algunos que son el resultado de transposiciones en esta estructura. Aparecen ampliamente distribuidos en la naturaleza, se encuentran en los aceites esenciales, al igual que los monoterpenos, pero con mayor frecuencia que éstos en hongos, plantas no vasculares e incluso en algunas bacterias como *Streptomyces*.

Este grupo presenta gran variabilidad natural pudiendo incluir hidrocarburos, alcoholes, cetonas y sus derivados, ésteres, glicósidos y alcaloides sesquiterpénicos.

Aunque se les han atribuido diversas funciones como hormonas vegetales (ácido abscísico o fitoalexinas) y como antibióticos de origen fúngico, al igual que los monoterpenos pueden actuar como alelopáticos [6,7]. Los sesquiterpenos, al contar con una unidad de isopreno más que los monoterpenos, presentan una mayor plasticidad en su construcción que se traduce en una mayor variabilidad estructural y funcional. Además, la presencia de isómeros geométricos de posición u ópticos es mucho mayor. Debido a esta plasticidad y según el número de anillos de la molécula, se pueden agrupar, según Semmler, Schreiner y Kremers [8], en acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos y tetracíclicos como aparece reflejado en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Clasificación de los sesquiterpenos [1].

| | | |
|-------------------------------|---|--|
| Sesquiterpenos acíclicos: | | |
| |  α -Farneseno |  Nerolidol |
| Sesquiterpenos monocíclicos: | | |
| 1.- Grupo Bisabolano: |  β -Bisaboleno |  α -Bisabolol |
| 2.- Grupo Elemeno: |  β -Elemeno |  Elemol |
| 3.- Grupo Germacrano: |  Germacreno D |  Germacreno D-4-ol |
| 4.- Grupo Humulano: |  α -Humuleno |  14-Hydroxy- α -humuleno |
| Sesquiterpenos bicíclicos: | | |
| 1.- Grupo Cadinano: |  δ -Cadineno |  α -Cadinol |
| 2.- Grupo Cariofileno: |  β -Cariofileno |  Oxido de cariofileno |
| 3.- Grupo Eudesmano: |  α -Selineno |  α -Eudesmol |
| 4.- Grupo Perhidroazuleno: |  Azuleno |  Guaiol |
| Sesquiterpenos tricíclicos: | | |
| |  Aromadendreno |  β -Copaen-4- α -ol |
| Sesquiterpenos tetracíclicos: | | |
| |  Iswareno | |

1.3 FAMILIA VERBENACEAE

La familia Verbenaceae reúne cerca de 100 géneros y alrededor de 3000 especies herbáceas o leñosas, repartidas principalmente en regiones tropicales, subtropicales y templadas del hemisferio austral, han sido estudiadas exhaustivamente debido a la marcada variabilidad composicional que presentan sus AE y, sobre todo, su diversa bioactividad. Por otra parte, la familia Verbenaceae constituye la gran mayoría de la riqueza floral colombiana y de Suramérica [10–14]. La aplicabilidad en diferentes industrias como aromatizantes, saborizantes, y/o principios activos en drogas farmacéuticas, en la industria cosmética y de perfumería, y también en aditivos para alimentos, entre otros, hace de la familia Verbenaceae un modelo de estudio químico, bioquímico y farmacológico [12].

En Argentina se encuentran 26 géneros con 191 especies, 54 son endémicas; para Corrientes están citados 11 géneros y 59 especies. En la familia se destacan géneros con especies ornamentales como *Glandularia* J.F. Gmel, *Lantana* L., *Durante* L, entre otros [14]. Algunas especies tienen aplicaciones en medicina popular como: *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. “salvia de campo”, *Aloysia citriodora* Palau “cedrón” y *A. polystachya* (Griseb.) Moldenke “burrito”, entre otras. En el Ecuador están representados 19 géneros. Cuatro géneros nativos con representantes arbóreos o arbustivos se encuentran en la zona andina [15]. Las especies suelen tener las flores bilabiadas, con el tubo a menudo largo, y encorvado, cuatro estambres, dos de ellos más largos, y un fruto que se descompone en cuatro, pequeñitos y por lo común un poco carnosos. Las hojas de las verbenáceas nacen enfrentadas o en número de más de dos en cada nudo [14–15].

Las plantas del género *Lippia*, particularmente, crecen de forma nativa y salvaje en Suramérica, Centroamérica y, en algunos lugares de África tropical [16–18]; son

utilizadas tradicionalmente para afecciones gastrointestinales, respiratorias y para alimentos [16,19 – 20]. Algunas especies de *Lippias* han mostrado actividades antimalárica, antiviral y citostática [18].

1.3.1 *Lippia alba* (Mill.)N.E. Brown

Lippia alba (Mill.) N.E.Br, es una planta aromática ampliamente distribuida en Centroamérica y Suramérica comúnmente conocida como *erva-cidreira*, *falsa melisa*, o *salvia morada*, *cidreira*, en Brasil, *cidrón*, *hierba Luisa*, en Venezuela, *prontoalivio* en Colombia, *Juanilama* o *Salvia sija* en Guatemala, entre otros; dentro de la medicina vernácula tiene mucho uso. Se utiliza para diferentes afecciones como: el té de sus hojas es muy usado como un tranquilizador, potente analgésico y también en problemas gastrointestinales. Puede actuar como carminativo, y en Centroamérica y la Amazonía Brasileira es empleada para tratar enfermedades hepáticas, sífilis, diarrea, y disentería. En Guatemala, Panamá, Costa Rica, Cuba, Venezuela y Brasil como un remedio para resfríos, gripes, bronquitis, asma, dolor de estómago e indigestión; se usa también para los cólicos, diarrea, dispepsia, estomatitis, indigestión, flatulencia, náusea, vómito, asma, catarro, laringitis, resfrío, tos, insomnio, enfermedades venéreas, afecciones de la piel y mucosas, flujo vaginal, goma, artritis, dolores musculares y de muelas, hipertensión y atención del parto [16, 21–25]. La infusión de las hojas y la inflorescencia se ha empleado como sedante gastrointestinal, sudorífico, expectorante y emenagogo; además el extracto alcohólico de la planta se usa en fricciones para los resfriados. En Colombia, sirve como sedante para la diabetes, como diaforética y emenagoga, y para trastornos digestivos y antiespasmódicos. En México, las ramas frescas se utilizan para acelerar la recuperación posparto. En Venezuela, la planta entera con *Plantago major* y lechuga se emplea para inducir sueño [18,20,26]. Trevisan *et al.*, reportaron el estudio de *Lippia alba* en el desarrollo de drogas para el tratamiento del déficit cognitivo de la enfermedad de Alzheimer [27].

Prontoalivio, es una planta de gran interés en el mercado nacional e internacional. La planta tiene una altura alrededor de 1.5 m, sus hojas opuestas y finamente dentadas, los tallos son leñosos, tiene ramas largas y arqueadas, y crece en lugares de alta luminosidad y altitudes entre 0 y 1100 m.s.n.m. [10,28]. La planta presenta alta productividad de biomasa y suscita un creciente interés científico. Su AE ha sido caracterizado y se ha encontrado en uno de los quimiotipos [12,29–30], un alto contenido de carvona, particularmente, en las plantas cultivadas en Colombia [13,16]. La composición química del AE de *L. alba* depende sensiblemente, del origen geográfico de la planta, de las condiciones de cultivo, la edad, la parte de la planta empleada para la extracción y de otros factores geobotánicos [12,31–33].

1.3.2 *Lippia citriodora* H.B.K.

Lippia citriodora H.B.K. o *Aloysia triphylla* (L'Her.) o *Aloysia citriodora* (Cav.), también conocida como *cedrón*, *lemon verbena*, *hierba Luisa*, *salvia limao*, *cidrinha*, *hierba cidreira* (Argentina) es una planta nativa y que crece espontáneamente en Suramérica (Chile, Argentina) y se cultiva en el Norte de África (Marruecos) y en Europa Meridional. En estas áreas, las hojas son bastante usadas como té de hierbas por sus propiedades aromática, estimulante, digestiva y diurética. Sus hojas en alcohol sirven como remedio febrífugo, antimalárico, y antiespasmódico [20,34–36]. La *Lippia citriodora* H.B.K. es un remedio popular para curar resfríos, fiebre y espasmos. Su uso tradicional explica la inocuidad generalmente reconocida del té. Un examen etnofarmacológico en Porto Alegre (Brasil) [35] ha demostrado que la infusión de *Lippia citriodora* H.B.K. fue uno de los remedios más comunes para el insomnio y la ansiedad pero los resultados de un ensayo clínico parecían indicar una carencia de las actividades sedativa y ansiolítica. Se han atribuido al aceite esencial algunas propiedades farmacológicas tales como espasmolítica y antimicrobiana [35]. Actualmente, esta planta se está estudiando ampliamente por su capacidad para prevenir el potencial

genotóxico de mutágenos específicos o carcinógenos de diferentes categorías que generan radicales libres en células no tumorales tanto *in vivo* como *in vitro* para prevenir daños en el DNA, debido a que la composición química de la infusión de esta planta revela una gran cantidad de compuestos polifenólicos, principalmente, flavonoides y ácidos fenólicos [34–36].

Respecto a la composición del aceite esencial de las hojas, citral (neral + geranial) representa el 41% del aceite esencial. Los otros constituyentes principales son limoneno, 1,8–cineol, citronelol, óxido de cariofileno y espatulenol; todos con una abundancia en el aceite menor del 5% [35].

1.3.3 *Lippia dulcis* (Trev)

Es una planta medicinal tradicional con una larga historia de uso en América tropical para el tratamiento de resfríos, bronquitis, retención urinaria y como inflamatorio [18–19]. En Guatemala se le conoce como *orozuz*, *hierba dulce*, en Panamá como *hierba dulce*, *orozuz*, *salvia santa*. Como usos medicinales populares se encuentran: en Guatemala, el cocimiento de las hojas se utiliza para el tratamiento de afecciones digestivas (diarrea, dolor de estómago, estreñimiento, gastritis, inflamación intestinal, parásitos intestinales, vómito), respiratorias (asma, bronquitis, catarro, gripe, resfrío, sedante de la tos, tos ferina), edema, fiebre, neuropatía, paludismo, cólicos y desórdenes menstruales; de igual manera sus hojas se emplean como saborizantes de medicamentos. A las hojas y tallos se les atribuyen propiedades antitusivas, balsámicas, diaforéticas, diuréticas, emenagogas, emolientes, espasmolíticas, estimulantes, expectorantes, febrífugas, pectorales, sedantes, sudoríficas y tónicas. En México, se utiliza como emenagoga en forma de baños vaginales, para la disentería y dolor abdominal. Ha sido reconocida por los aztecas como una planta dulce. También se le atribuyen propiedades abortivas y estimulantes de apetito. Es fuertemente aromática, hierba endémica con hojas y flores intensamente dulces [20,37].

Esta planta es intensamente dulce debido a su alto contenido del sesquiterpenoide bisaboleno hernandulcina, que es 1500 veces más dulce que la sacarosa [37–22]. Se conoce de esta planta que presenta dos quimiotipos: dulce y amarga. El segundo tipo es porque dentro de la composición química del aceite esencial se reporta una cantidad apreciable de alcanfor (ca. 53%) mientras que en el primero este compuesto (amargo) no se detecta [37,41].

1.3.4 *Lippia micromera* Schauer

Lippia micromera Schauer es una planta medicinal tradicional usada en Centroamérica subtropical, como anticatarral y antitusivo y para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales y como un antiséptico, digestivo y anti-inflamatorio. Es una hierba nativa fuertemente aromática de Texas y Nicaragua, pero su hábitat se extiende desde el sur de México a Panamá, Guatemala y Colombia; por sus propiedades suele confundirse con el orégano. En México, la planta entera en forma de decocción se emplea como emenagogo y expectorante, mientras que la decocción de hojas se usa para inducir la menstruación, y sirve también como condimento. En El Salvador es útil para inflamaciones, y dolor de estómago. Para espasmos e inflamaciones, se hierven las hojas con sal y se aplican localmente [18,42]. Según Tucker (1993), el AE de *L. micromera* está compuesto principalmente por carvacrol, 26.5 +/- 1.5%, α – terpineno, 22.5 +/- 0.2% y *p* – cimeno, 11.5 +/- 0.3% [43].

1.3.5 *Lippia origanoides* H.B.K

Es un arbusto o árbol delgado, muy aromático, que alcanza 3 m de alto. Esta especie es nativa de Centroamérica (México, Guatemala, Cuba) y del norte de Suramérica, especialmente, en la Región Amazona (Guiana, Venezuela, Brasil y Colombia). Esta planta es popularmente conocida en el norte de Brasil por “*Salva – de – Marajo*” y “*Alecrim – d’Angola*”, en el estado de Pará es usada para la

culinaria y para propósitos medicinales. En México, *Lippia origanoides* H.B.K. es llamada orégano, y la Farmacopeia Mexicana la reconoce como un sustituto para el orégano común, *Lippia graveolens* Kunth [44]. Maisch reporta la composición química del aceite esencial de *Lippia origanoides* H.B.K. con un alto contenido de monoterpenos oxigenados (66%), carvacrol (38.6%) y timol (18.5%), siendo éstos sus constituyentes mayoritarios, lo que sugiere la ocurrencia de un nuevo quimiotipo para esta especie [45]. Además, debido a su composición, *Lippia origanoides* H.B.K. puede considerarse como una especia y condimento [44]. También el uso extenso de esta planta como carminativa, antiséptico general (boca, piel, vagina) y para tratar las infecciones respiratorias, puede ser relacionado con su notoria actividad antimicrobiana [44–46].

1.4 DESTILACIÓN FRACCIONADA A PRESIÓN REDUCIDA

La destilación fraccionada es una operación básica de las industrias química y afines y se utiliza fundamentalmente en la separación de mezclas de componentes líquidos. La eficiencia de la separación depende de múltiples factores como la diferencia de los puntos de ebullición de los componentes de la mezcla, la presión de trabajo, y otros parámetros fisicoquímicos de los componentes; por una parte; y del diseño y construcción del equipo, por otra parte [47].

El corazón de un sistema de destilación fraccionada, es la columna de fraccionamiento, de cuyo diseño (tamaño, nº de platos, tipo de relleno, diámetro, etc.) depende en gran medida el éxito de la separación. Existen numerosos procesos industriales, donde la destilación fraccionada es una operación clave y de suma importancia para la obtención y calidad de los productos fabricados. Entre éstas están la industria petroquímica, de síntesis química y de materias primas (rectificación de aceites esenciales), entre otras [47].

Básicamente la destilación a presión reducida consiste en disminuir la presión a la que está sometido el líquido a destilar, de esta manera, su punto de ebullición también disminuye, y al destilar el material no se pierde por evaporación [48]. Así mismo hay que tener en cuenta que:

- a) La relación entre la presión aplicada y la temperatura de ebullición de un líquido está determinada por su comportamiento presión de vapor – temperatura.
- b) Muchos líquidos orgánicos no pueden ser destilados a presión atmosférica debido a que se descomponen al llegar a su punto de ebullición o por debajo de éste; esto es frecuente en compuestos que ebullicen por encima de los 200 °C.
- c) Estas sustancias se purifican o separan por una destilación a presión reducida para evitar su descomposición [48].

1.5 DESTILACIÓN POR ARRASTRE CON VAPOR DE AGUA

Las destilaciones sencilla, fraccionada y al vacío, se usan para compuestos miscibles. Si un líquido hierve cuando su presión de vapor equilibra la presión exterior, dos líquidos inmiscibles entre sí lo hacen conjuntamente cuando, por calefacción gradual, la suma de las presiones de vapor de ambos iguala la presión exterior [49].

Con base en este hecho, gran número de compuestos orgánicos pueden destilarse a temperaturas inferiores a su punto de ebullición normal sólo al someterlos a una corriente de vapor de agua. La sustancia puede recuperarse del destilado por simple decantación puesto que, al ser inmiscibles los dos líquidos, existe una neta separación entre fases. Esta técnica presenta la ventaja de que permite la destilación de muchas sustancias insolubles en agua y que mezcladas con ella, pueden destilar a temperaturas inferiores a 100° C. Por ello se puede

utilizar cuando se desea purificar un compuesto de alto punto de ebullición y que descompone a su temperatura de ebullición o a una temperatura inferior. En este sentido supone una alternativa a la destilación a vacío. Sin embargo, su mayor utilidad se presenta en el aislamiento de compuestos a partir de sus fuentes naturales [49].

1.6 CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

La expresión “Thin Layer Chromatography” (TLC) de los anglosajones y la “Diinnschichtchromatographie” de los germanos, consiste esencialmente en el empleo de capas finas y uniformes de adsorbentes normalizados sobre soportes rígidos (placas de vidrio, porta-objetos de microscopía, poliéster, etc.), en las que se depositan mezclas o sustancias puras, para que mediante el desarrollo con una fase móvil (disolventes) en una cubeta, puedan separarse e incluso identificarse por medida de la capacidad de adsorción [50].

El origen de TLC data hacia 1938 cuando dos investigadores rusos, IZMAILOV y SHRAIBER, utilizaron una técnica llamada *Cromatografía de goteo* sobre capas finas horizontales. El método fue desarrollado más adelante por MEINHARD y HALL y por KIRCHNER, MILLER y KELLER, y fue usado hasta entonces casi exclusivamente para la separación de terpenos. Tomó 20 años para que esta técnica llegara a ser una herramienta práctica, cuando STHAL describió el equipo y adsorbentes eficientes, y estandarizó el procedimiento para la preparación de las placas, en 1958 y demostró su amplia aplicabilidad [51–52].

La principal razón para el amplio uso de esta técnica es la calidad de la información suministrada en corto tiempo [50]. Es una de las más populares y ampliamente usadas técnicas de separación. Las razones para esto son muchas, e incluyen fácil uso, amplia aplicación para un gran número de diferentes muestras, alta sensibilidad, rapidez de separación y un costo relativamente bajo

[52]. TLC puede ser también usada como una técnica preparativa para aislamiento y purificación de compuestos de interés [50].

La TLC es un método de separación en el cual una capa fina uniforme de adsorbente o medio seleccionado y un eluyente son usados para la separación de mezclas. El adsorbente es aplicado como una cubierta para obtener una capa estable de tamaño adecuado. El soporte más común es una placa de vidrio. Los cuatro adsorbentes más comúnmente usados son el gel de sílice, la alúmina, tierras diatomáceas y la celulosa [52].

1.7 CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA Y LOS ACEITES ESENCIALES

Los terpenos y los aceites esenciales pueden generalmente ser detectados usando tricloruro de antimonio, pentacloruro de antimonio, reacción de fluoresceína / bromo o una solución al 1% de vainillina en ácido sulfúrico concentrado. Las cetonas son localizadas con una solución saturada de 2,4 – dinitrofenilhidrazina en ácido clorhídrico 2 N y peróxidos por la reacción de yodo [53].

Las capas de alúmina o gel de sílice son usadas para cromatografiar terpenos. Los hidrocarburos terpenos y azulenos débilmente adsorbidos, son cromatografiados sobre capas activas de gel de sílice, usando hidrocarburos parafínicos tales como pentano, hexano o heptano como eluyentes. Eluyentes más poderosos, tales como: benceno o mezclas de benceno / metanol, son usados para terpenos más polares como el mentol. La cromatografía de capa fina es el método más importante para el análisis de aceites esenciales, aparte de la cromatografía de gases [53 – 54].

1.8 ROTACIÓN ÓPTICA

Muchos AE, cuando son expuestos a un rayo de luz polarizada, poseen la propiedad de rotar el plano de polarización a la derecha (dextrógiro) o la izquierda (levógiro). Esta propiedad se determina por un polarímetro y se mide en grados de rotación. El ángulo de rotación es dependiente de la naturaleza del líquido, la longitud de la columna a través de la cual la luz pasa, la longitud de onda de la luz usada y de la temperatura. Tanto el grado de rotación como su dirección son importantes como criterio de pureza [8].

Para muchos AE el cambio en la rotación óptica con variaciones de temperatura normalmente encontrada en el laboratorio, es muy pequeño; por lo tanto, las lecturas para este análisis de rutina, son usualmente tomadas a temperatura ambiente, en un cuarto oscuro y con luz de sodio monocromada [8].

2. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO EXPERIMENTAL

En esta sección se presenta el desarrollo experimental de la caracterización taxonómica de las siete especies de *Lippia* a saber: *L. alba*, quimiotipo carvona, *L. alba*, quimiotipo citral, *L. citriodora*, *L. dulcis*, *L. micromera*, *L. organoides*, quimiotipo carvacrol y *L. organoides*, quimiotipo *p* – cimeno; extracción de los aceites esenciales y extractos e identificación de la composición química de los mismos, determinación de la densidad, rotación específica e índices de refracción para los aceites; y por último el aislamiento y la caracterización del sesquiterpeno mayoritario del aceite esencial de *L. alba*, quimiotipo carvona.

2.1 REACTIVOS Y EQUIPOS UTILIZADOS

2.1.1 Reactivos

- ◆ Material vegetal: *L. alba* (carvona), *L. alba* (citral), *L. citriodora*, *L. dulcis*, *L. micromera*, *L. organoides* (carvacrol - timol) y *L. organoides* (timol), (Complejo Agroindustrial del Centro de Investigación de Excelencia, CENIVAM, de la Universidad Industrial de Santander, UIS).
- ◆ *n* – Tetradecano (SIGMA–Aldrich, 99% pureza).
- ◆ Sulfato de sodio anhidro (MERK, 99% pureza).
- ◆ Diclorometano (Riedel–de–Haën, SIGMA–Aldrich, 99.8% pureza).
- ◆ Nitrógeno gaseoso, N₂ (AGA fano S.A, 99.999% pureza).
- ◆ Helio, H₂ (AGA fano S.A, 99.999% pureza).
- ◆ Celulosa Microcristalina (Disproalquímicos).
- ◆ Yeso grado 3 de odontología.
- ◆ Hexano (Fluka, SIGMA–Aldrich, 95% pureza).
- ◆ Benceno (J.T.Baker, 99.5% pureza).

- ◆ Yodo (MERK, 99% pureza).
- ◆ Yoduro de potasio (MERK, 99,5% pureza).
- ◆ Aceite mineral.
- ◆ Parafina.
- ◆ Agua destilada.

2.1.2 Equipos

- ◆ Balanza (Mettler Toledo PB1502-5 con precisión +/- 0,01 g).
- ◆ Refractómetro (Abbe Refractometer ATAGO, NAR – 1T cat. No. 1210).
- ◆ Polarímetro (SR – 6 Full Circle Scale +/- 0.1°, POLYSCIENCE)
- ◆ Plancha de calentamiento (CERAN – SCHOT, 1600 W, 120 V).
- ◆ Plancha de calentamiento y agitación (Magnetic stirrer MSH 300, BOECO, 110 V/550 W/50–60 Hz).
- ◆ Criostato (Cole–Parmer, digital Polystat temperature controler, Model 12108-20, 120 V, 60/12 Hz/A).
- ◆ Bomba de vacío (Franklin Electric CIT Alcatel 2004 A)
- ◆ Cromatógrafo de Gases – Detector selectivo de masas (*Agilent Technologies 6890 Plus Series GC System* acoplado a un MSD *Agilent Technologies MSD 5973 Network*), para columna apolar.
- ◆ Cromatógrafo de Gases – Detector selectivo de masas (*Agilent Technologies 6890 Network GC System* acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 5975 Inert XL*), para columna polar.
- ◆ Cromatógrafo de gases (*Agilent Technologies 6890 Network GC System* acoplado a FID y un inyector automático *Hewlet–Packard 7689 Series injector*), para análisis quiral.
- ◆ Cámara ultravioleta (CAMAG UV – CABINET II, a 254 y 366 nm.)
- ◆ Equipo de destilación – extracción con solvente (equipo de Godefroot [55]).

- ◆ Equipo de hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (equipo modificado de J. Paré [56] y horno microondas LG – *Intelowave*, Model 1242ZK, 120 V, 13,3ª, 250 MHz).
- ◆ Equipo de destilación fraccionada en vidrio a presión reducida (diseñado en el laboratorio).
- ◆ Equipo de destilación fraccionada en cobre a presión reducida (diseñado en el laboratorio).
- ◆ Baño de aceite termostataado (diseñado en el Laboratorio).
- ◆ Equipo de destilación con arrastre de vapor de agua (diseñado en el laboratorio).
- ◆ Nevera (Industrial).
- ◆ Microtubos (BRAND, 1.5 mL / 20 °C)
- ◆ Transferpipeta (Transferpette, BRAND, 0 – 20 □L)
- ◆ Transferpipeta (Transferpette, BRAND, 25 – 250 □L)
- ◆ Transferpipeta (Transferpette, BRAND, 20 – 250 □L)
- ◆ Pipetas Pasteur (BRAND)

El laboratorio de Cromatografía, el Centro de Investigación de Excelencia, CENIVAM, y el laboratorio de Físicoquímica facilitaron la consecución y utilización de los reactivos y equipos requeridos.

2.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.2.1 Identificación taxonómica de las especies de *Lippia* estudiadas

El material vegetal fue recolectado en el cultivo experimental del complejo agroindustrial del Centro de Investigación de Excelencia, CENIVAM, ubicado en el ala nororiental de la Universidad Industrial de Santander, UIS, para cada una de las especias a saber: *L. alba* (carvona), *L. alba* (citral), *L. citriodora*, *L. dulcis*, *L. micromera*, *L. origanoides* (carvacrol - timol) y *L. origanoides* (timol).

Las muestras de cada una de las *Lippias*, se enviaron al Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias, de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, al Herbario Nacional de Colombia. El pliego testigo quedó depositado como muestra permanente en el Herbario Nacional de Colombia (COL, Bogotá), con el No. Voucher, como se registra en la **Tabla 3**:

Tabla 3. No. de Voucher para cada una de las *Lippias* estudiadas correspondiente a la identificación taxonómica.

| Nombre planta | FAMILIA | No. Voucher |
|---|-------------|-------------|
| <i>Lippia alba</i> (Mill.)N.E.Br., quimiotipo carvona | Verbenaceae | 512078 |
| <i>Lippia alba</i> (Mill.)N.E.Br., quimiotipo citral | Verbenaceae | 512077 |
| <i>Lippia citriodora</i> H.B.K. | Verbenaceae | 519798 |
| <i>L. dulcis</i> (Trev.) | Verbenaceae | 512079 |
| <i>L. micromera</i> Schauer | Verbenaceae | 519797 |
| <i>Lippia organoides</i> H.B.K., quimiotipo carvacrol | Verbenaceae | 512075 |
| <i>Lippia organoides</i> H.B.K., quimiotipo <i>p</i> – cimeno | Verbenaceae | 519799 |

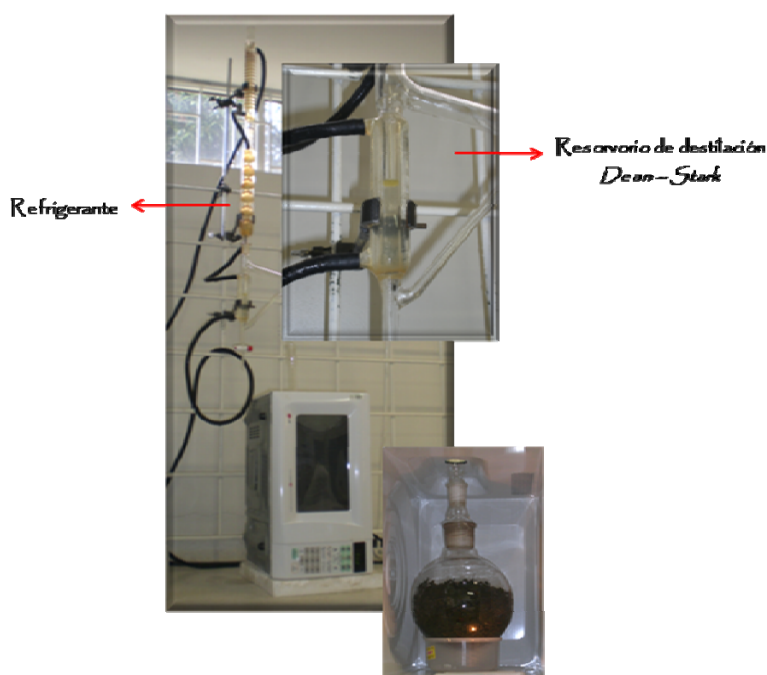
2.2.2 Extracción de los metabolitos secundarios volátiles de cada una de las *Lippias* estudiadas.

La recolección del material vegetal se tomó del cultivo experimental del complejo agroindustrial de CENIVAM. Para cada una de las extracciones de cada *Lippia* estudiada, el material vegetal se recolectó de la misma parcela y de la misma zona de la parcela escogida, de hojas maduras en buen estado y de un tamaño similar, recién recolectadas a la misma hora (6:00 a.m). Las extracciones se hicieron con dos tipos de técnicas:

1. Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD)
2. Destilación – extracción con solvente (SDE).

2.2.2.1 Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD)

Esta técnica se utilizó de acuerdo con el procedimiento descrito por Stashenko *et al.* (1993 – 1994) [55–56]. Todo el montaje consta de un equipo de destilación tipo *Clevenger* con reservorio de destilación *Dean–Stark* y adaptación para calentamiento a través de un horno de radiación de microondas, el cual tiene una potencia de salida de 1200 W; además cuenta con un sistema de refrigeración y un balón de fondo redondo de 2 L, donde se ubica el material vegetal con la cantidad de agua suministrada, para así llevar a cabo satisfactoriamente la extracción del AE. El montaje se puede observar en **Fotografía 1**.



Fotografía 1. Montaje del equipo de MWHD.

Una vez se tiene listo el montaje de MWHD, se procede a hacer la extracción de los AE bajo las condiciones de trabajo que se registran en la **Tabla 2**.

Tabla 4. Condiciones de trabajo usadas en la MWHD.

| Condiciones | Descripción |
|------------------------------------|--------------------|
| Cantidad material vegetal | 300 g |
| Cantidad de agua | 250 mL |
| Potencia usada | 70% |
| Tiempo de extracción | 10 min |
| Tiempo de intervalos de extracción | 2 min |
| Periodicidad de la extracción | 4 |

Una vez se obtiene el aceite esencial en el *Dean–Stark* se separa del agua y se le agrega sulfato de sodio, Na_2SO_4 , anhidro, para secar el AE. Luego se toma una alícuota de 50 μL en un microtubo y se adiciona 4 μL del estándar interno (*n* – tetradecano) y se afora a 1 mL con diclorometano y por último se transvasa a un vial para el análisis cromatográfico tanto por columna apolar como por columna polar.

2.2.2.2 Destilación – Extracción con Solvente (SDE).

Para la obtención de los extractos de las *Lippias* se usó un equipo a micro – escala descrito por Godefroot [57–58]; ver **Fotografía 2**.



Fotografía 2. Montaje del equipo SDE.

La obtención de los extractos se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones de trabajo: se usaron 10 g del material vegetal en un balón de 100 mL con 40 mL de agua destilada; por otra parte, en un balón de 10 mL se adicionaron 3 mL de diclorometano (grado HPLC), y en el cuerpo de extracción se adicionaron 5.5 mL de agua destilada. La temperatura del baño de aceite (material vegetal) fue de 120 °C y la temperatura del baño de agua (diclorometano) fue de 65 °C. El tiempo de extracción fue de 1 h y 30 min, como lo describen Stashenko *et al.* [59–62]. Los extractos que se obtuvieron de cada una de las especies de *Lippia* estudiadas, se concentraron a 0,5 mL con un flujo constante de nitrógeno y después a cada uno de ellos se les adicionó 1 µL del patrón interno (*n* – tetradecano), y se aforaron a 1 mL con diclorometano. Finalmente, cada una de estas muestras fue inyectada al GC – MS para su respectivo análisis composicional. Cada uno de los extractos fue analizado por dos columnas: apolar y polar.

2.2.3 Análisis por cromatografía de gases – espectrometría de masas.

La identificación de los metabolitos secundarios volátiles de cada uno de los AE y de los extractos, se realizó empleando la técnica analítica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC–MS), usando dos columnas capilares de fase estacionaria diferente: apolar y polar.

2.2.3.1 Parámetros operacionales utilizados en la identificación de los componentes separados por columna apolar (DB–5 MS).

El análisis por columna apolar se llevó a cabo en una cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Plus* acoplado a un detector selectivo de masas (MSD) *Agilent Technologies MSD 5973 Network* (ver **Figura 3**); ubicado en el Laboratorio de Cromatografía de la UIS.

El sistema de inyección está equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (250°C, relación de *split* 30:1), un inyector automático *Agilent Technologies 7863* y un *autosampler Agilent Technologies 7863 Series*. El gas de arrastre empleado fue helio, con una presión de entrada en la cabeza de columna de 16,47 psi y una velocidad lineal de 26 cm s⁻¹.

En el sistema de separación se empleó una columna capilar apolar DB-5 MS (J & W *Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.) de 60 m x 0,25 mm., D.I. x 0,25 µm, d_f, con fase estacionaria de 5% fenil-poli(metilsiloxano). La programación de la temperatura del horno fue inicialmente 45 °C durante 5 min, @ 4 °C/min hasta 150 °C, por 2 min, @ 5 °C/min hasta 250°C (5 min). Luego @ 10 °C/min hasta llegar a 275 °C (15 min). En el análisis por espectrometría de masas se usó impacto de electrones con una energía de 70 eV. La temperatura de la cámara de ionización fue 230 °C y la de la línea de transferencia fue 280 °C. El flujo constante de He fue de 1 mL/min. Los espectros de masas y las corrientes iónicas reconstituidas (TIC) se obtuvieron en un analizador cuadrupolar (150 °C), por medio de barrido automático de frecuencia (*full scan*) a 4,75 scan s⁻¹, en el rango de masas de *m/z* 40 – 350.

Finalmente, en el procesamiento de datos, los datos cromatográficos fueron adquiridos y procesados en un sistema de datos HP-MS *ChemStation* (Versión 1.05), que incluye las bases de datos NBS 75K, WILEY 138K, NIST 02 y ADAMS.



Fotografía 3. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Plus* y un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5973 Network*.

2.2.3.2 Parámetros operacionales utilizados en la identificación de los componentes separados por columna polar (DB-WAX).

El análisis por columna polar se llevó a cabo en una Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890N Network GC System* acoplado a un detector selectivo de masas (MSD) *Agilent Technologies 5975 Inert XL* (ver **Figura 4**); ubicado en el Laboratorio de Cromatografía de la UIS.

El sistema de inyección está equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (250 °C, 50:1), un inyector automático *Agilent Technologies 7683B Series Inyector* y un *autosampler Agilent Technologies 7863 Series*. El gas de arrastre empleado

fue helio, con una presión de entrada en la cabeza de columna de 16,47 psi y una velocidad lineal de 26 cm s⁻¹.

En el sistema de separación se usó una columna de sílice fundida polar DB-WAX (J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.), de 60 m x 0,25 mm. D.I. x 0,25 µm, d_f, con fase estacionaria entrecruzada e inmovilizada de poli(etilenglicol). La programación de la temperatura de horno fue: 45 °C (5 min) @ 3 °C/min 150 °C (3 min) @ 4 °C/min 220 °C (5 min). En el análisis por espectrometría de masas se usó impacto de electrones con una energía de 70 eV. La temperatura de la cámara de ionización fue 230 °C y la de la línea de transferencia fue 250 °C. El flujo constante de He fue de 1 mL/min. Los espectros de masas y las corrientes iónicas reconstituidas (TIC) se obtuvieron en un analizador cuadrupolar (150 °C), por medio de barrido automático de frecuencia (*full scan*) a 4,75 scan s⁻¹, en el rango de masas de *m/z* 40 – 350.

Finalmente, en el procesamiento de datos, los datos cromatográficos fueron adquiridos y procesados en un sistema de datos *Agilent ChemStation G1701DA* (Versión D.02.00, 2005 SP1 MSD Productivity).



Fotografía 4. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890N Network* y un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5975 Inert XL*.

2.2.4 Identificación y cuantificación de los componentes presentes en los AE y en los extractos de las *Lippias* estudiadas.

Para la identificación de los metabolitos secundarios volátiles de los AE de hojas de las *Lippias* estudiadas y de sus extractos se emplearon espectros de masas e índices de retención [63]. Los índices de Kováts [64] se calcularon con base en los tiempos de retención de los analitos problema y de los tiempos de retención de una serie homóloga de patrones de hidrocarburos desde C₁₀ hasta C₂₅, corridos bajo las mismas condiciones operacionales que los AE y los extractos, empleando las columnas DB5-MS y DB-WAX [65]. Para su determinación se empleó la siguiente fórmula:

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

(Ecuación 1)

Donde:

I_k : Índice de retención del compuesto de interés;

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

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

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

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

La cuantificación de los componentes presentes en los AE y los extractos, se realizó utilizando como estándar interno (istd), el n -tetradecano (SIGMA, Aldrich, 99% pureza) y relacionando las áreas del *istd* y del compuesto con las concentraciones de los dos. En este caso la relación existente entre el estándar interno y el compuesto a cuantificar es la siguiente:

$$\frac{A_{istd}}{C_{istd}} = \frac{A_x}{C_x}$$

(Ecuación 2)

Donde:

A_{istd} : Área del pico cromatográfico del estándar interno;

C_{istd} : Concentración del estándar interno;

A_x : Área del pico cromatográfico del compuesto que se cuantificará;

C_x : Concentración del compuesto que se cuantificará.

2.2.5 Determinación de algunas propiedades fisicoquímicas para los AE de las *Lippias* estudiadas.

2.2.5.1 Determinación de la densidad

La densidad se determinó utilizando un picnómetro (1 mL), previamente calibrado con agua. Se procedió a pesar el aceite correspondiente al volumen del picnómetro, teniendo en cuenta la temperatura a la que se estaba haciendo la determinación. Este procedimiento se realizó tres veces para poder obtener reproducibilidad en el resultado.

2.2.5.2 Determinación del índice de refracción

El refractómetro que fue usado para la toma de los índices fue un Abbe Refractometer ATAGO, tiene la ventaja de poseer un sistema de enfriamiento, el cual se aprovechó para acoplarlo a un criostato y éste a su vez permitió seleccionar digitalmente la temperatura deseada. La temperatura seleccionada fue $T=20^{\circ}\text{C}$. Por otro lado, el refractómetro incluye un blanco que es H_2O HPLC para calibrar el refractómetro. Esta toma se hizo y el valor que arrojó fue bastante acertado con el reportado en la literatura.

2.2.5.3 Determinación de la rotación específica

La rotación específica se determinó en un polarímetro, SR – 6 Full Circle Scale $\pm 0.1^{\circ}$, que posee como fuente una lámpara de sodio (589 nm) y un portamuestra de longitud 2 dm. Según la literatura [66], la longitud ideal para un portamuestra es 1 dm, por tal motivo se quiso reducir la cantidad de muestra (ya que no se podía disminuir la longitud) reduciendo el volumen, acondicionando otro portamuestra dentro del original. Para verificar si el polarímetro está calibrado, se debe tomar una muestra que no desvíe el plano de la luz polarizada, por lo que se escogió

agua. Para hallar la rotación específica hay que inicialmente tomar el ángulo de rotación (α) y luego aplicar la siguiente ecuación para calcularla:

$$[\alpha]_D^t = \frac{\alpha}{l \times d}$$

(Ecuación 3)

Donde:

$[\alpha]_D^t$: rotación específica

α : ángulo de rotación

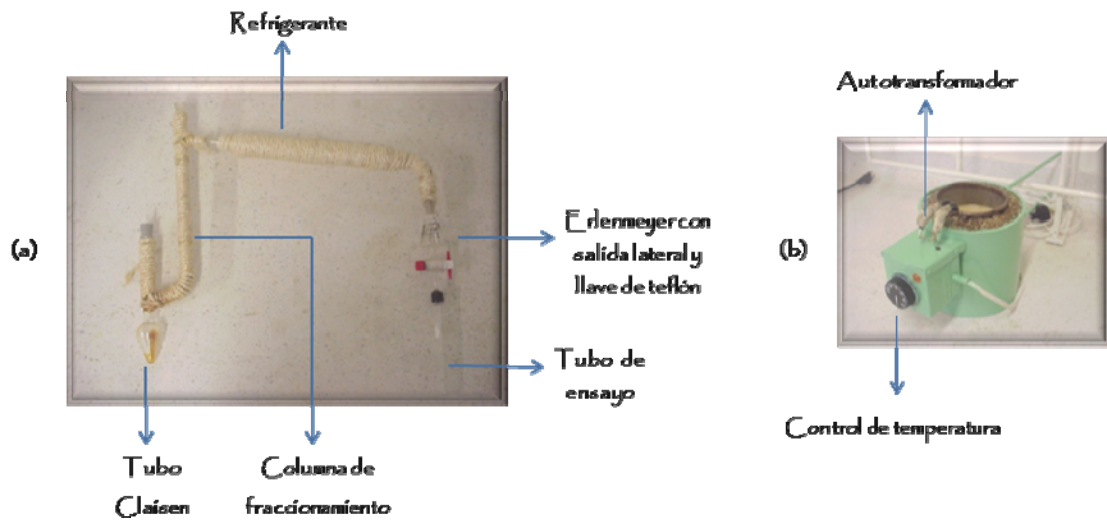
l: longitud del portamuestra (dm)

d: concentración de la muestra (g/mL)

2.2.6 Destilación fraccionada a presión reducida

La destilación fraccionada a presión reducida se escogió para hacer el aislamiento del sesquiterpeno presente en el A.E *L. alba* (carvona) por reportes en literatura (GUENTHER, E. The essential Oils. Volume two) [51], el cual indicaba que por medio de esta técnica y aplicando una presión de 15 mm Hg reducía el punto de ebullición de los sesquiterpenos de un rango de 240 – 280 °C a 150 °C.

Teniendo en cuenta lo anterior, se procedió a diseñar un equipo en vidrio que se ajustara a las condiciones en las que se iba a trabajar. Este equipo, básicamente, consta de un tubo Claisen de 25mL con una modificación: a la salida de este tubo se acondicionó la columna de fraccionamiento (20cm de longitud); un refrigerante, un erlenmeyer de 25mL con salida lateral con llave de teflón y un tubo de ensayo para la recolección de la muestra; cada parte va una a continuación una de la otra, en el orden en que se nombraron (ver **Fotografía 5**).



Fotografía 5. (a) Equipo de destilación fraccionada en vidrio y (b) Fuente de calentamiento (baño termostataado).

Como se muestra en la **Fotografía 5**, el equipo de vidrio está recubierto de cabuya, este recubrimiento se hizo por dos razones: para darle protección al operario y para mantener la refrigeración en el sistema, como una chaqueta termostataada, para disminuir errores sistemáticos.

Este mismo equipo se hizo también en tubo de cobre (**Figura 6**) previendo un accidente con el de vidrio. El relleno que se usó para la columna de fraccionamiento fue tubos de vidrio de 1 cm de longitud por 5 mm de diámetro, aproximadamente. La fuente de calentamiento que se usó fue fabricada en el laboratorio (**Figura 5**). Para este sistema de calentamiento se hizo un baño termostataado, en el cual se usó como aislante una mezcla de engrudo y aserrín y se le acondicionó una resistencia de 500 W junto con el control de temperatura. El medio que se usó para calentar fue inicialmente aceite mineral y luego se cambió por parafina para aumentar la temperatura del baño. Para el enfriamiento del refrigerante se usó un criostato.

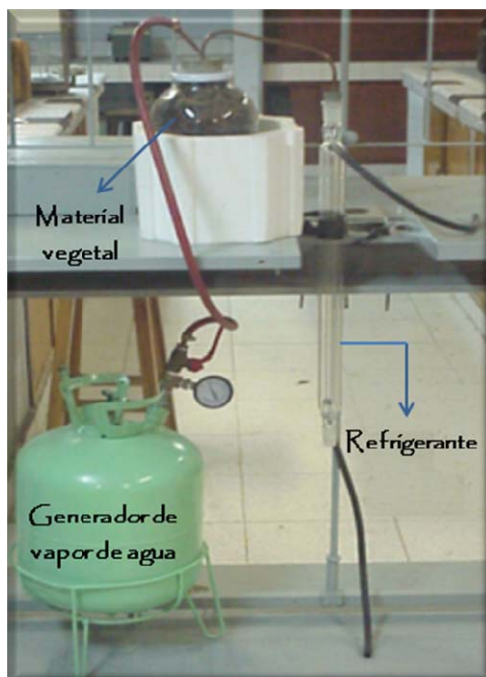
Las muestras que se recogieron de estas destilaciones, se analizaron por GC – MS, tomando una alícuota de 50 μ L, adicionando 1 μ L de *n* – tetradecano y aforando a 1 mL con diclorometano.



Fotografía 6. Equipo de destilación fraccionada en cobre.

2.2.7 Destilación por arrastre con vapor de agua

La destilación por arrastre con vapor de agua se realizó con el montaje que se observa en la **Fotografía 7**, hecho en el laboratorio; el cual consta de un generador de vapor de agua, un recipiente de vidrio para depositar el material vegetal, un refrigerante y recipiente de vidrio para recoger el destilado.



Fotografía 7. Montaje del equipo de destilación por arrastre con vapor de agua.

2.2.8 Cromatografía de capa fina

Para este análisis se usó el equipo de Desaga (**Fotografía 8**), aplicador “spreader” con regulador de espesor; placas de vidrio de 10,5 * 5,25 cm. Para la preparación de las placas de vidrio (con espesor de 250 μ m) se tomó en cuenta el medio en el que se iba a hacer la separación, por el tipo de compuesto que se iba a aislar; se escogió un medio neutro ya que por reportes de literatura [67], este compuesto es lábil en medios ácidos, y se prefirió que el soporte fuera neutro. La fase absorbente que se escogió entonces, fue celulosa microcristalina/yeso grado 3 de odontología/agua. Este soporte se preparó usando una relación de 1/1/2, respectivamente. Con respecto a la fase móvil se usaron varios eluyentes: hexano, ciclohexano, benceno, tolueno y yodo.

Una vez se tenían las placas se “picaron” con una micropipeta a 1 cm del borde inferior de la placa y luego se introdujeron en una cámara de vidrio de 25*20*10 cm, saturada de los vapores de los solventes utilizados, a una profundidad de 0,5 cm. El solvente se dejó correr sobre cada placa cromatográfica hasta una distancia entre 8 – 9.5 cm. Se dejaban secar y posteriormente se procedió al revelado que se hizo en cámara ultravioleta, con vapores de yodo y en una solución de yoduro de potasio. Estos dos últimos reveladores también se hicieron pasar por la cámara ultravioleta.

La razón de avance, R_f , de la muestra en cada uno de los solventes se halló por medio de la siguiente ecuación:

$$R_f = \frac{\text{Distancia del compuesto desde el origen}}{\text{Distancia del frente de solvente desde el origen}} \quad (\text{Ecuación 4})$$



Fotografía 8. Equipo de cromatografía de capa fina.

3. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES Y DE LOS EXTRACTOS DE LAS ESPECIES DE *LIPPIA* ESTUDIADAS MEDIANTE GC – MS.

3.1 ACEITE ESENCIAL OBTENIDO DE LAS HOJAS DE *LIPPIA ALBA* (QUIMIOTIPO CARVONA) POR MWHD.

El aceite esencial de *L. alba* (carvona) (ver **Fotografía 9**) obtenido de las partes aéreas (hojas e inflorescencias), presenta un olor bastante intenso pero agradable (“aromático”) y su color fue ligeramente amarillo y translúcido.



Fotografía 9. *Lippia alba* (Mill.)N.E.Br., quimiotipo carvona.

El rendimiento de extracción del aceite fue 0,75% (%p/p) siendo éste un poco mayor que el que se había reportado en la literatura [67]. Esta diferencia puede explicarse dado que el contenido de aceite en el material vegetal depende no sólo del estado de madurez de la planta, condiciones en que se recolecta el material vegetal (temperatura y hora del día) [68], sino también del estrés al que esté sometida ya sea por las condiciones del suelo y/o por las condiciones ambientales.

En la **Figura 1** se presenta el perfil cromatográfico de los metabolitos secundarios volátiles del AE de *L. alba* (quimiotipo carvona), extraído por MWHD bajo las condiciones operacionales descritas en el **Numeral 2.2.2.1**, del desarrollo experimental. En la **Tabla 5** se registran los componentes identificados por GC – MS, según el orden de elución en la columna DB – 5 MS (cantidad relativa, ≥ 0.1 %), junto con sus índices de retención, cantidades relativas y concentraciones que se determinaron por el método del estándar interno, de acuerdo con el **Numeral 2.2.4**.

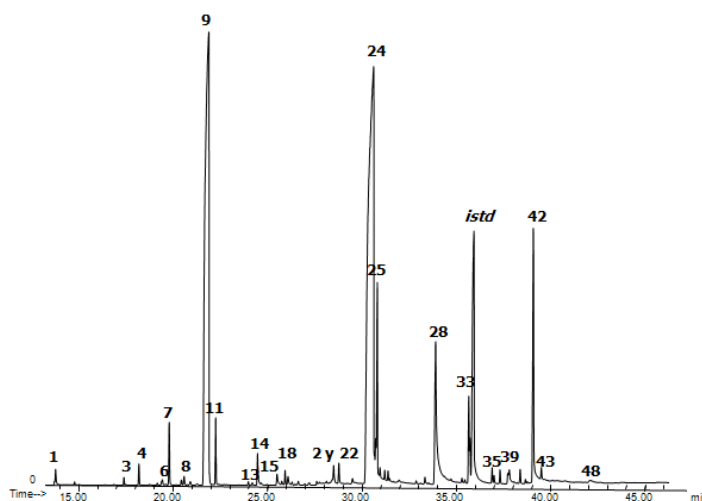


Figura 1. Perfil cromatográfico del AE de *L. alba*, quimiotipo carvona, obtenido por MWHD. Columna DB – 5 MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los componentes se encuentra reportada en la Tabla 5.

Tabla 5. Composición química, cantidad relativa (%) y concentración (ppm) de los componentes en el AE *L. alba* (carvona) aislado por MWHD.

| Nº pico | I _k | | Nombre del Compuesto | Cantidad Relativa % | Concentración (ppm) |
|---------|----------------|--------|---|---------------------|---------------------|
| | DB-5 | DB-WAX | | | |
| 1 | 855 | | <i>trans</i> -2-Hexenal | 0,04 | 7,79 |
| 2 | 859 | 1289 | <i>cis</i> -3-Hexen-1-ol | 0,25 | 45,68 |
| 3 | 939 | 1161 | α -Pinoeno | 0,10 | 18,12 |
| 4 | 954 | 1061 | Canfeno | 0,28 | 50,24 |
| 5 | 975 | 1115 | Sabineno | 0,06 | 1,42 |
| 6 | 979 | 1205 | β -Pinoeno | 0,12 | 22,07 |
| 7 | 979 | 1283 | 1-Octen-3-ol | 0,15 | 8,23 |
| 8 | 990 | 1156 | β -Mirceno | 0,87 | 157,27 |
| 9 | 1029 | 1200 | Limoneno | 29,48 | 5347,78 |
| 10 | 1037 | 1238 | <i>cis</i> - β -Ocimeno | 0,81 | 23,80 |
| 11 | 1050 | 1251 | <i>trans</i> - β -Ocimeno | 1,05 | 147,80 |
| 12 | 1088 | 1287 | Terpinoleno | 0,08 | 7,97 |
| 13 | 1091 | - | <i>p</i> -Ocimeneno | 0,09 | 8,23 |
| 14 | 1096 | 1547 | Linalool | 0,52 | 94,13 |
| 15 | 1122 | 1634 | <i>trans</i> - <i>p</i> -2,8-Mentadien-1-ol | 0,25 | 30,21 |
| 16 | 1136 | 1451 | <i>cis</i> -Óxido de limoneno | 0,19 | 34,09 |
| 17 | 1137 | 1873 | <i>cis</i> - <i>p</i> -2,8-Mentadien-1-ol | 0,17 | 42,03 |
| 18 | 1142 | 1476 | <i>trans</i> -Óxido de limoneno | 0,40 | 2,01 |
| 19 | 1146 | 1518 | Alcanfor | 0,14 | 8,51 |
| 20 | 1177 | 1601 | Terpineno-4-ol | 0,03 | 3,94 |
| 21 | 1169 | 1698 | Borneol | 1,23 | 155,06 |
| 22 | 1192 | 1618 | <i>cis</i> -dihidrocarvona | 0,90 | 93,95 |
| 23 | 1200 | 1639 | <i>trans</i> -dihidrocarvona | 0,65 | 117,89 |
| 24 | 1214 | 1713 | <i>iso</i> -Dihidrocarveol | 0,20 | 8,86 |
| 25 | 1216 | 1842 | <i>trans</i> -Carveol | 0,63 | 73,98 |
| 26 | 1229 | 1820 | <i>cis</i> -Carveol | 0,60 | 2,99 |
| 27 | 1243 | 1715 | Carvona | 39,78 | 7215,74 |
| 28 | 1252 | 1739 | Piperitona | 2,86 | 518,60 |
| 29 | 1256 | - | <i>trans</i> -Epóxido de piperitona | 1,23 | 111,63 |
| 30 | 1276 | 1805 | <i>trans</i> -Óxido de carvona | 0,31 | 30,47 |
| 31 | 1290 | 2092 | Timol | 0,08 | 7,91 |
| 32 | 1342 | 1706 | <i>trans</i> -Acetato de carvilo | 0,12 | 20,86 |
| 33 | 1343 | 1945 | Piperitenona | 5,17 | 937,25 |
| 34 | 1376 | 1519 | α -Copaeno | 0,07 | 12,17 |

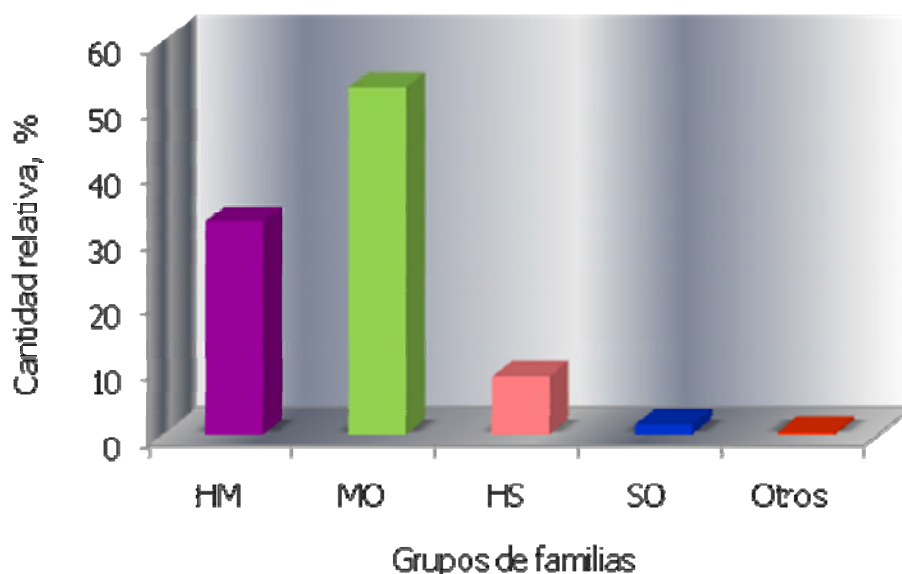
| | | | | | |
|----|------|------|---|------|--------|
| 35 | 1388 | 1546 | β -Bourboneno | 1,26 | 228,30 |
| 36 | 1388 | 1560 | β -Cubebeno | 0,06 | 22,88 |
| 37 | 1390 | 1598 | β -Elemeno | 0,61 | 111,18 |
| 38 | 1420 | 1491 | β -Ylangeno | 0,22 | 39,71 |
| 39 | 1439 | 1610 | <i>trans</i> - β -Cariofileno | 0,12 | 21,31 |
| 40 | 1432 | 1626 | β -Copaeno | 0,19 | 34,67 |
| 41 | 1456 | 1669 | <i>trans</i> - β -Farneseno | 0,49 | 89,74 |
| 42 | 1460 | 1661 | <i>allo</i> -Aromadendreno | 0,21 | 37,27 |
| 43 | 1477 | 1739 | γ -Gurjuneno | 0,24 | 4,69 |
| 44 | 1484 | 1701 | γ -Muuroloeno | 0,09 | 2,97 |
| 45 | 1485 | 1654 | Germacreno D | 0,05 | 9,03 |
| 46 | 1487 | 1727 | <i>epi</i> - Biciclosesquifelandreno | 4,88 | 885,60 |
| 47 | 1500 | 1705 | Biciclogermacreno | 0,22 | 39,57 |
| 48 | 1507 | 1740 | <i>cis</i> - α -Bisaboleno | 0,35 | 1,54 |
| 49 | 1513 | 1766 | γ -Cadineno | 0,34 | 44,05 |
| 50 | 1575 | 2066 | Germacreno D-4-ol | 0,89 | 88,93 |
| 51 | 1578 | 2153 | Espatuleno | 0,06 | 2,84 |
| | | | NI | 0,83 | |

Continuación de la **Tabla 5**.

Se logró identificar 51 componentes, que constituyen el 98,1 % de la composición química del AE, por medio de los índices de Kòvats, tanto en columna apolar como polar y los espectros de masas (EI, 70 eV), bajo los parámetros de integración aplicados: umbral de integración, *Thshd* = 16, y área de rechazo del pico en la base = 1.

En la tabla se puede observar que la planta es rica en: carvona (39,78%), limoneno (29,48%), piperitenona (5,17%), *epi*-biciclosesquifelandreno (4,88%) y piperitona (2,86%); además, se identificaron principalmente metabolitos característicos de cuatro grupos de compuestos: Hidrocarburos monoterpénicos, HM, (32,48 %), Monoterpenos oxigenados, MO, (53,06 %), Hidrocarburos sesquiterpénicos, (8,78 %) y Sesquiterpenos Oxigenados, SO, (1,54 %), por lo que se puede determinar que el AE de *L. alba* (carvona) es de tipo monoterpénoide. En la **Gráfica 1** se representan estas familias de compuestos.

Teniendo en cuenta que el AE de *L. alba* (quimiotipo carvona) fue la base para el desarrollo de este trabajo experimental, se tomaron algunas constantes fisicoquímicas (tres mediciones por cada una) como la densidad, $d^{23^{\circ}\text{C}} = 0,90 \pm 0.02$ g/mL, el índice de refracción, $n^{20^{\circ}\text{C}} = 1,489 \pm 0.003$, y la rotación específica $[\alpha]_D^{23^{\circ}\text{C}} = (+) 58,4 \pm 0.29$.



Gráfica 1. Distribución de los grupos de familias encontrados en el AE de *L. alba* (quimiotipo carvona) extraído por MWHD.

Los resultados obtenidos de estos parámetros son útiles en el control de calidad de un aceite esencial, lo que garantiza que posee unas características analíticas específicas, lo que posibilita la detección de impurezas y/o adulteraciones [28].

Los datos de densidad e índice de refracción pueden en cierta forma ayudar a determinar, indicar la composición química de un AE. Según reportes en la literatura [8, 69–70], los aceites que tienen densidad entre 0,9 – 1,0 g/mL e índices de refracción mayores de 1,47 tienen un alto contenido de compuestos oxigenados; estos datos determinados experimentalmente para el AE de *L. alba*

(quimiotipo carvona) corresponden a los de la literatura, y esto se puede comprobar con la cantidad de MO que se encontraron para este aceite, 53,06 %. Según la literatura [8,71] la densidad y el índice de refracción para AE se encuentran entre: 0,84 – 1,17 g/mL y 1,43 – 1,61 a 20 °C, respectivamente. Además, el valor de la rotación específica hallado, también hace referencia a la semejanza de este aceite con reportes previos encontrados [72–73].

Es importante resaltar que el valor de la rotación óptica de un AE no permite elucidar la composición química de éste; sin embargo, este valor es necesario en el control de calidad del mismo, porque se pueden detectar adulteraciones o impurezas en el AE [70].

También cabe anotar que la densidad en un aceite no es constante porque depende de la planta, de su estado de maduración, de su ubicación, del método de extracción, purificación, tiempo y modo de almacenamiento.

A continuación se presentan los espectros de masas (**Figuras 2–6**) y las posibles rutas de fragmentación (**Esquemas 1–5**) de los compuestos mayoritarios del AE *L. alba* (carvona), a saber: carvona, limoneno, piperitenona, biciclosesquifelandreno y piperitona.

- **Carvona:** el espectro de masas se presenta en la **Figura 2** y las posibles rutas de fragmentación [29,74–75] por EI, 70 eV se observan en el **Esquema 1**, donde se aprecia que el ion molecular M^+ en m/z 150 (14 %) sufre una ruptura retro-Diels-Alder (RDA), debido a que presenta una insaturación en el ciclo, lo que conduce a la formación del ion pico base m/z 82 (100%), el cual por pérdida de monóxido de carbono CO da origen al catión radical $C_4H_6^+$ en m/z 54 (30 %) . Otros iones que se presentan a partir del M^+ debido a la pérdida de un radical metilo CH_3 y de una

molécula de propeno son: $(M-CH_3)^+$ en m/z 135 (7 %) y $(M-C_3H_6)^+$ en m/z 108 (45 %), respectivamente. El catión radical $(M-C_3H_6)^+$ a su vez, pierde un radical CH_3 dando origen al catión $C_6H_5O^+$ en m/z 93 (25 %).

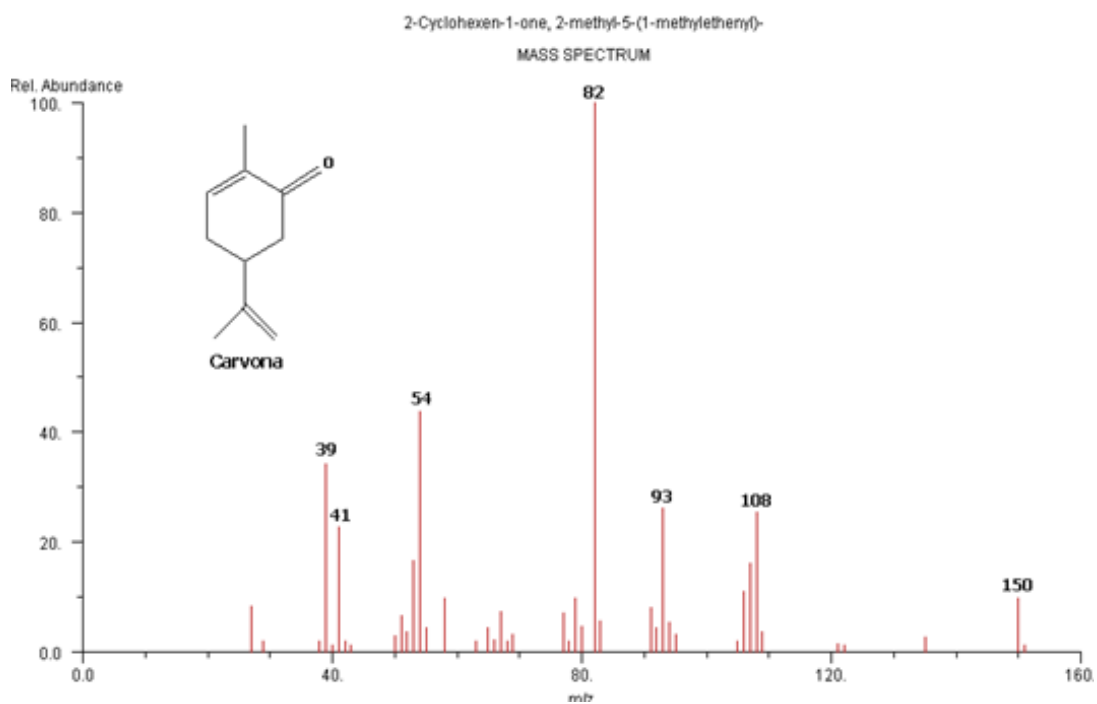
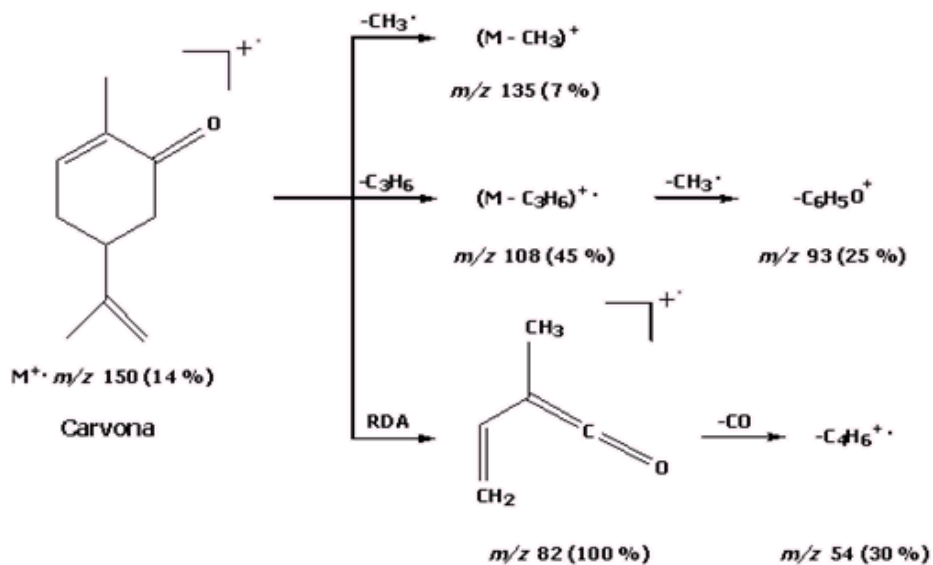


Figura 2. Espectro de masas de la carvona.



Esquema 1. Posibles rutas de fragmentación de la carvona.

- Limoneno:** el espectro de masas se presenta en la **Figura 3** y en el **Esquema 2** se presenta la ionización disociativa por impacto de electrones [29,74–75]. En la fragmentación del limoneno se puede observar que el M^+ en $m/z 136 (23 \%)$ se puede disociar de cuatro formas posibles: por ruptura RDA se obtiene el pico base, en $m/z 68 (100 \%)$, que a su vez por pérdida de una molécula de etileno se produce el fragmento en $m/z 41 (19 \%)$. El M^+ por pérdida del radical isopropenílico da lugar al catión en $m/z 93 (59 \%)$, y de éste por pérdida de un radical metilo se obtiene el fragmento $C_6H_7^+$, en $m/z 79 (23 \%)$. Por otro lado, del M^+ por transposición 1,5 de H se obtiene el catión en $m/z 67 (45 \%)$; pero también al hacer esta transposición seguida de la pérdida de un radical etilo se obtiene el catión $C_8H_{11}^+$ en $m/z 107 (17 \%)$. Finalmente, el M^+ también por pérdida de un radical metilo se puede dar el catión en $m/z 121 (11 \%)$.

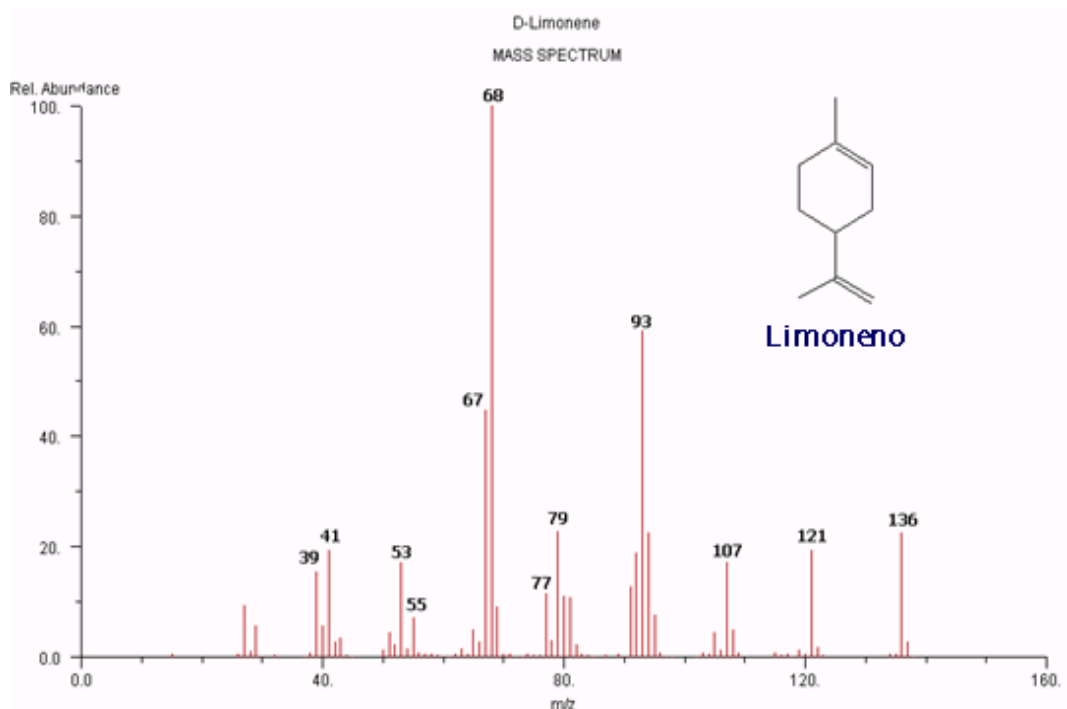
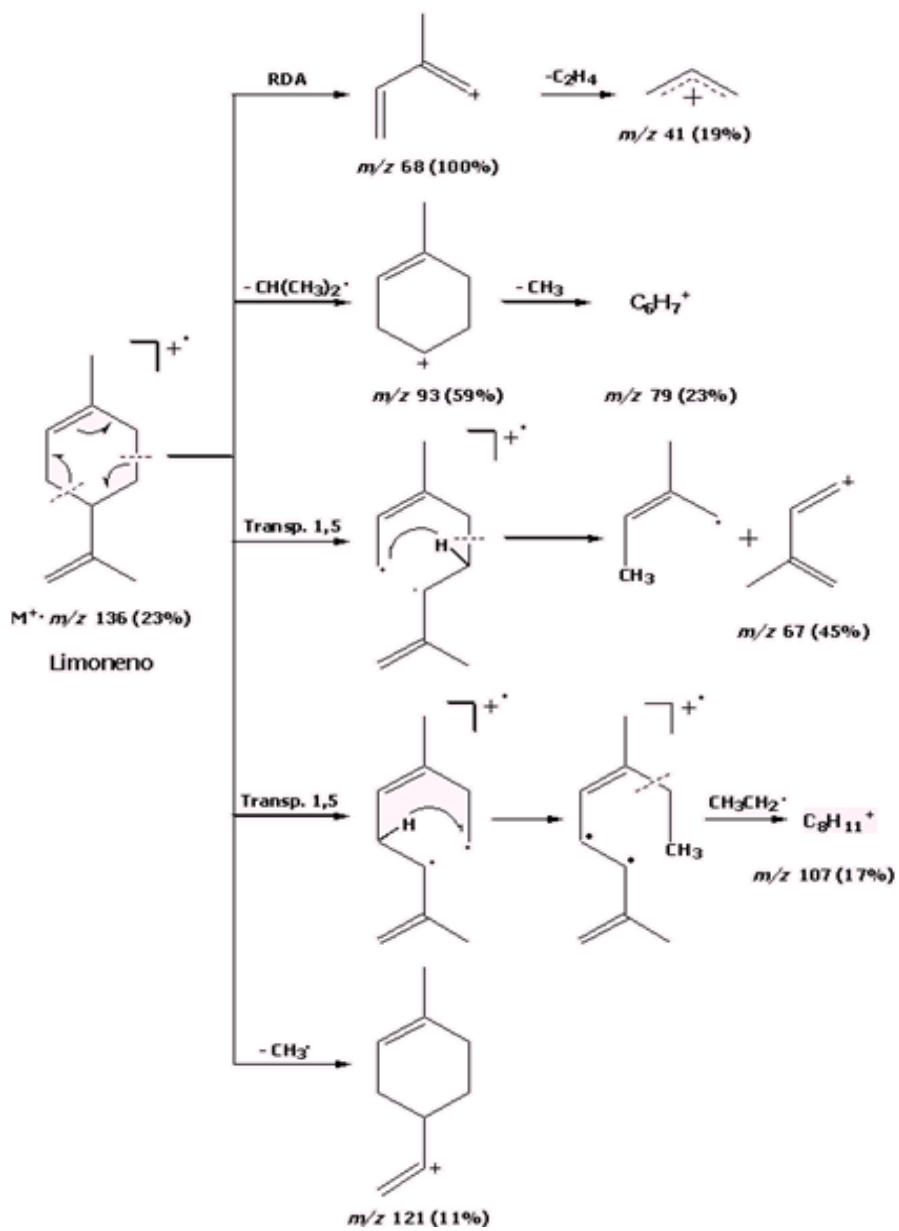


Figura 3. Espectro de masas del limoneno.

- **Piperitenona:** el espectro de masas y las posibles rutas de fragmentación [29,74–75], para la piperitenona se presentan en la **Figura 4** y en el **Esquema 3**, respectivamente.

En la ionización disociativa se puede observar que el M^+ en m/z 150 (100 %), que es a su vez el pico base, por pérdida del radical metilo, se produce el fragmento $(M-CH_3)^+$ en m/z 135 (31 %), y éste por pérdida de una molécula de propeno da el catión $C_6H_3O^+$ en m/z 91 (23 %). Por otro lado, del M^+ por ruptura alfa y subsecuente pérdida de CO se obtiene el catión en m/z 122 (8 %), y este catión por pérdida de un radical metilo entrega el catión $C_8H_{11}^+$ en m/z 107 (52 %), el cual pierde una molécula de etileno y produce el radical $C_6H_7^+$ en m/z 79 (52 %).



Esquema 2. Posibles rutas de fragmentación del limoneno.

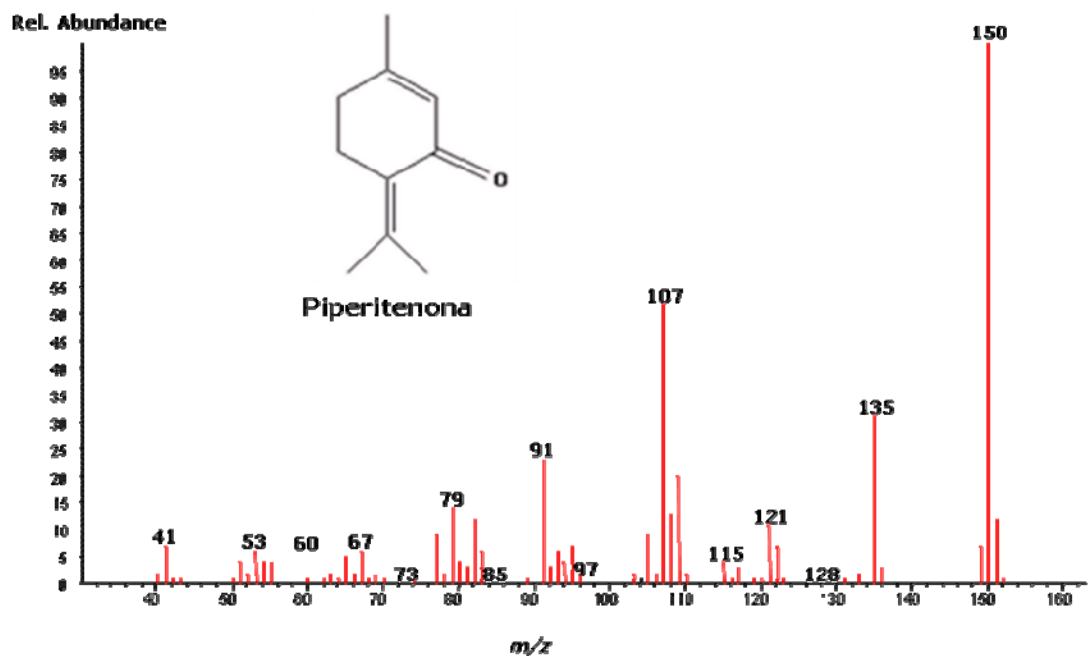
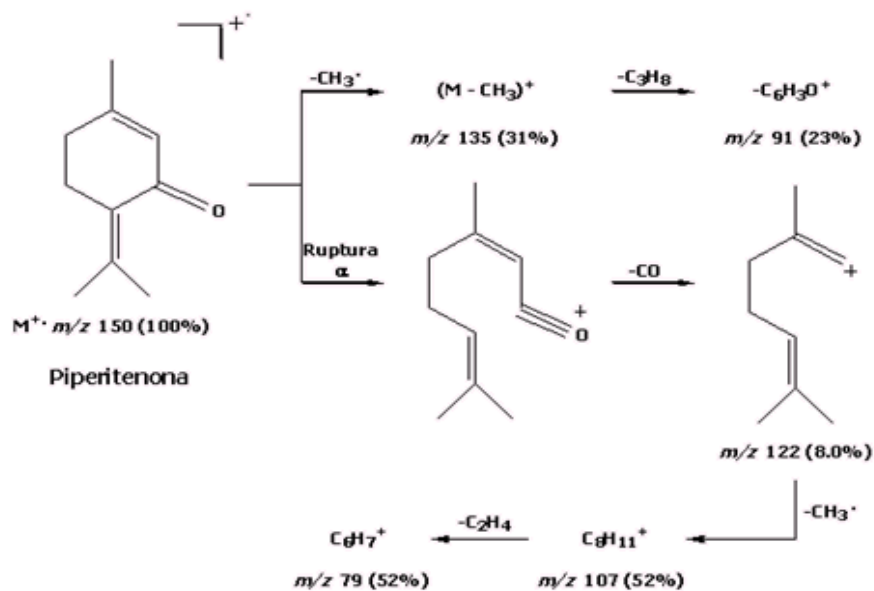


Figura 4. Espectro de masas de la piperitenona.



Esquema 3. Posibles rutas de fragmentación de la piperitenona.

- **Biciclosesquifelandreno:** de los hidrocarburos sesquiterpénicos, el biciclosesquifelandreno es el principal representante de este grupo en el AE de *L. alba* (carvona). Su espectro de masas se presenta en la **Figura 5**. Este terpeno tiene por nombre IUPAC: 1- (H), 7 (H), 10 (H)-4(14), 5-diene, es un compuesto termolábil que se encuentra principalmente en el AE de *Piper cubeba* y su epímero en *Ocimum basilicum* [66]. El esqueleto del cadeleno, es considerado la base de la estructura hidrocarbonada de la cual se deriva este sesquiterpeno [76–77].

En la ionización disociativa [29,74–75], (ver **Esquema 4**), este metabolito presenta un ion molecular M^+ de intensidad baja en m/z 204 (19 %). Éste al perder un radical isopropílico $C_3H_7\cdot$ produce el ion pico base en m/z 161 (100 %) y a partir de éste se obtienen los diferentes fragmentos que constituyen el espectro de masas: por ruptura RDA se obtiene el catión en m/z 133 (17 %), el cual a su vez, también por RDA produce el catión en m/z 105 (41 %). Por otro lado, el pico base sufre un reordenamiento por deslocalización de la carga positiva y seguida de una RDA produce el fragmento en m/z 119 (30 %), el cual por fragmentación RDA produce el catión m/z 79 (20 %); y por reordenamiento de la deslocalización de la carga positiva y subsecuente RDA produce el fragmento en m/z 91 (35 %).

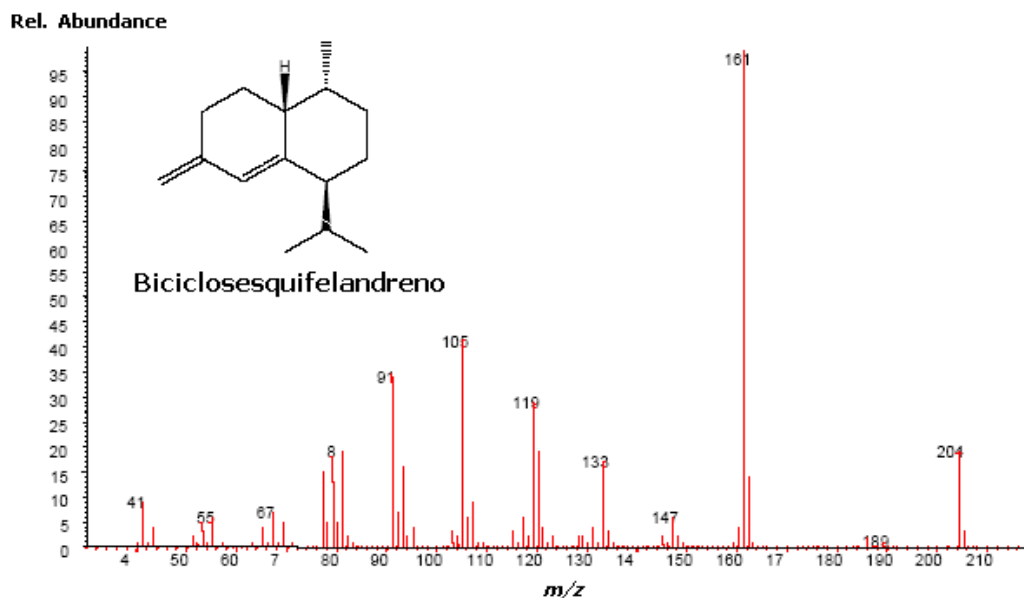
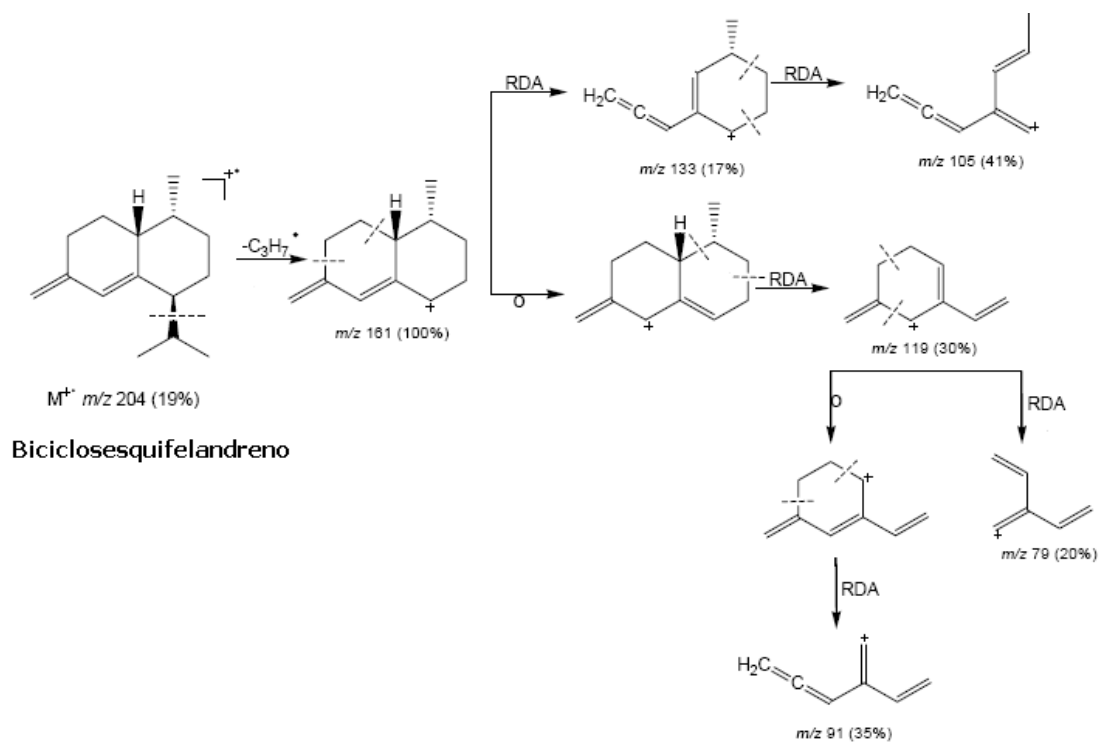


Figura 5. Espectro de masas del biciclosquifelandreno.



Esquema 4. Posibles rutas de fragmentación del biciclosquifelandreno.

- Piperitona:** el espectro de masas se presenta en la **Figura 6** y la ionización disociativa [29,74–75], se registra en el **Esquema 5**. En éste se puede observar el M^+ en m/z 152 (23 %), el cual sufre ruptura RDA produciendo el ion pico base, en m/z 82 (100 %) que a su vez pierde una molécula de CO y produce el catión radical $C_4H_6^+$ en m/z 54 (30 %). El M^+ por reordenamiento McLafferty, pierde una molécula de propeno para producir el catión radical en m/z 110 (94 %), y éste al perder un radical metilo, produce el catión $C_6H_6O^+$ en m/z 95 (40 %). Finalmente el M^+ puede perder un radical metilo para producir el catión en m/z 137 (31 %), el cual al perder una molécula de C_3H_8 produce el catión $C_6H_3O^+$ en m/z 91 (5 %).

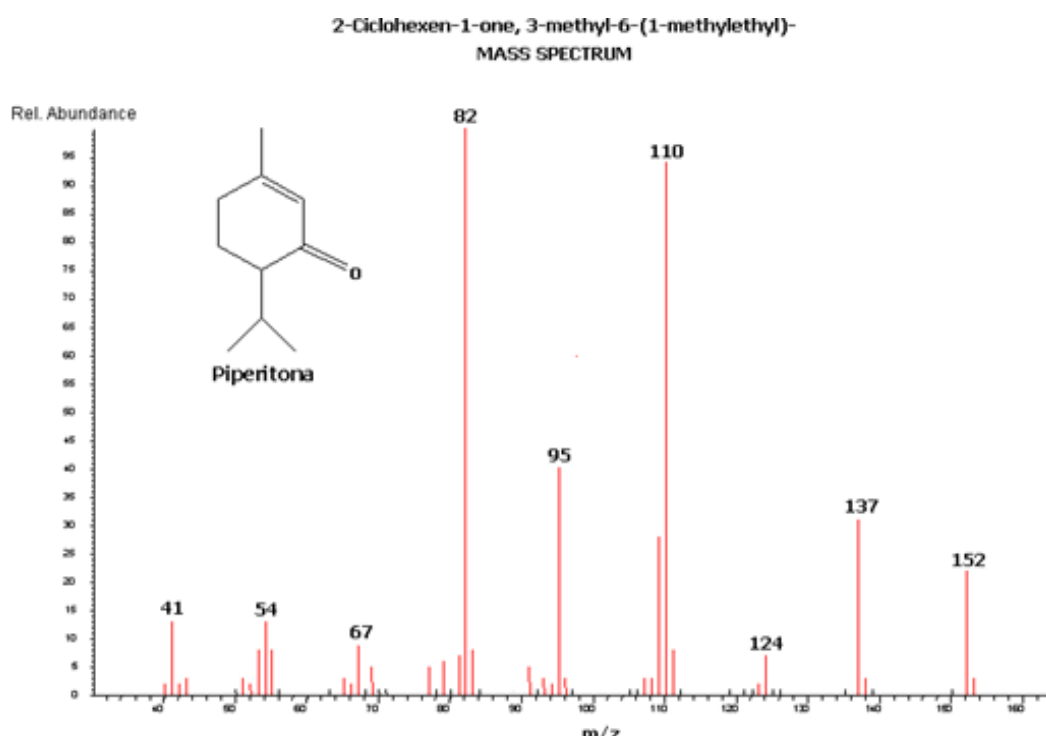
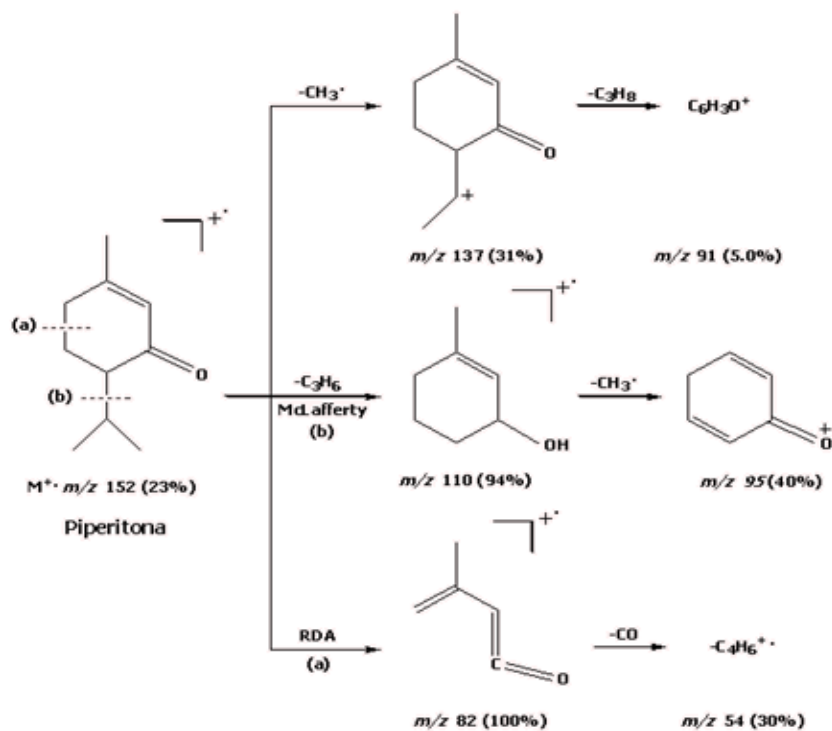


Figura 6. Espectro de masas de la piperitona.



Esquema 5. Posibles rutas de fragmentación de la piperitona.

3.2 ACEITE ESENCIAL OBTENIDO DE LAS HOJAS DE *LIPPIA ALBA* (QUIMIOTIPO CITRAL) POR MWHD.

El aceite esencial de *L. alba*, quimiotipo citral, (ver **Fotografía 10**) obtenido de las partes aéreas (hojas e inflorescencias), presenta un olor cítrico intenso y su color fue amarillo y traslúcido.

El rendimiento de extracción del aceite fue 0,79% (% p/p). Estudios previos [13,78], habían reportado rendimientos mucho menores, 0,2–0,3 %; diferencia que puede deberse no sólo al estado de madurez de la planta, condiciones en que se recolecta el material vegetal (temperatura y hora del día) [79], sino también del

estrés al que esté sometida, ya sea por las condiciones del suelo, condiciones del cultivo y/o por las condiciones ambientales.



Fotografía 10. *Lippia alba* (Mill.)N.E.Br., quimiotipo citral.

En la **Figura 7** se presenta el perfil cromatográfico de los metabolitos secundarios volátiles del AE de *L. alba* (quimiotipo citral), extraído por MWHD bajo las condiciones operacionales descritas en el **Numeral 2.2.2.1**, del desarrollo experimental. En la **Tabla 6** se registran los componentes identificados por GC – MS, según el orden de elución en la columna DB – 5 MS (cantidad relativa, ≥ 0.1 %), junto con sus índices de retención, cantidades relativas y concentraciones que se determinaron por el método del estándar interno, de acuerdo con el **Numeral 2.2.4** del desarrollo experimental.

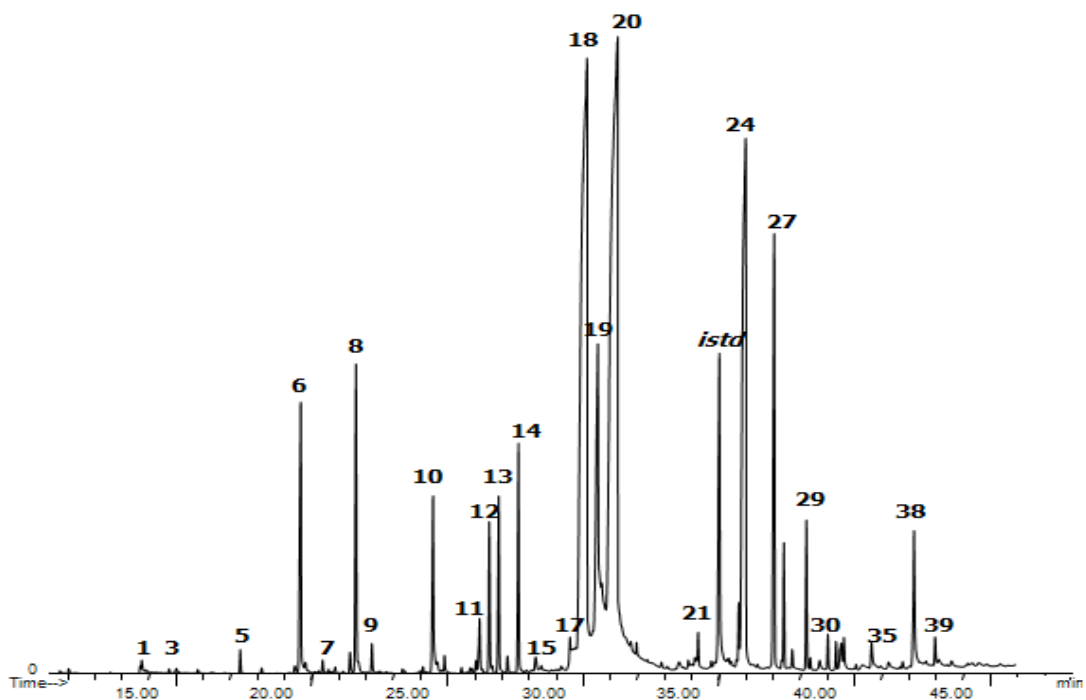


Figura 7. Perfil cromatográfico del AE de *L. alba* (quimiotipo citral) obtenido por MWHD. Columna DB – 5 MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los componentes se encuentra reportada en la Tabla 6.

Se logró identificar 38 componentes, que constituyen el 97,5 % de la composición química del AE, por medio de los índices de Kòvats, tanto en columna apolar como polar y los espectros de masas (EI, 70 eV), bajo los parámetros de integración aplicados: umbral de integración, *Thshd* = 16, y área de rechazo del pico en la base = 1.

En la tabla se puede observar que la planta es rica en: neral (26,18%), geranial (31,75%), geraniol (7,87 %), (*trans*)- β -cariofileno (5,0%) y acetato de geraniol (4,21%); además, se identificaron principalmente metabolitos característicos de monoterpenos oxigenados (65,3 %), a los cuales se les atribuyen principalmente las distintas notas fragantes en los productos naturales [80–81]; 18,25 % de

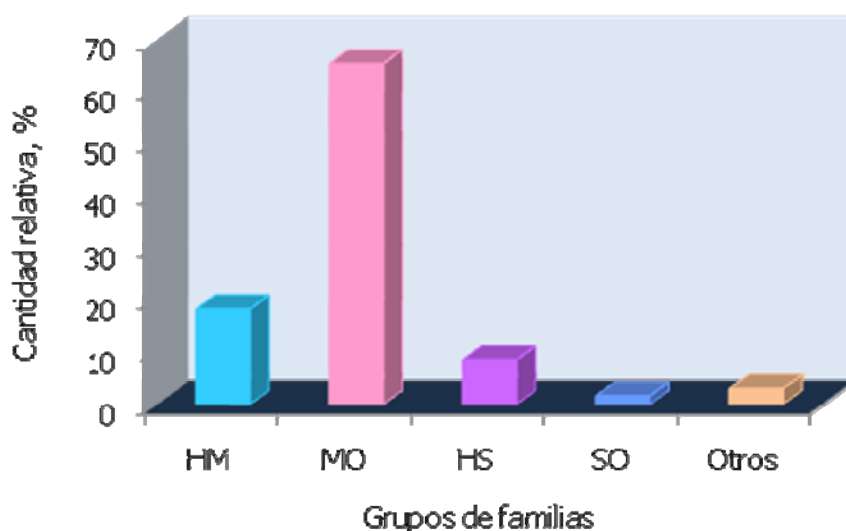
monoterpenos y en menor proporción sesquiterpenos (8,56 %) y sesquiterpenos oxigenados (1,67%).

Tabla 6. Composición química, cantidad relativa (%) y concentración (ppm) de los componentes en el AE *L. alba* (quimiotipo citral) aislado por MWHD.

| Nº pico | I _k | | Nombre del Compuesto | Cantidad Relativa % | Concentración (ppm) |
|---------|----------------|--------|-------------------------------------|---------------------|---------------------|
| | DB-5 | DB-WAX | | | |
| 1 | 855 | - | <i>trans</i> -2-Hexenal | 0,05 | 5,56 |
| 2 | 859 | 1289 | <i>cis</i> -3-Hexen-1-ol | 0,11 | 11,80 |
| 3 | 939 | 1161 | α -Pinoeno | 0,19 | 20,09 |
| 4 | 979 | 1283 | 1-Octen-3-ol | 0,10 | 10,36 |
| 5 | 985 | 1338 | 6-Metil-5-Hepten-2-ona | 3,25 | 347,85 |
| 6 | 979 | 1205 | β -Pinoeno | 0,09 | 10,02 |
| 7 | 986 | 1365 | 6-Metil-5-Hepten-2-ol | 0,10 | 11,68 |
| 8 | 1026 | 1272 | <i>o</i> -Cimeno | 0,20 | 21,30 |
| 9 | 1029 | 1200 | Limoneno | 2,97 | 318,16 |
| 10 | 1030 | - | Silvestreno | 0,14 | 14,63 |
| 11 | 1050 | 1251 | <i>trans</i> - β -Ocimeno | 0,26 | 28,04 |
| 12 | 1092 | 1303 | Rosafurano | 0,05 | 5,53 |
| 13 | 1096 | 1548 | Linalool | 2,19 | 234,46 |
| 14 | 1154 | 1381 | Citronelal | 0,06 | 6,86 |
| 15 | 1144 | 1548 | <i>trans</i> -Verbenol | 1,64 | 175,76 |
| 16 | 1177 | 1509 | Epóxido de Rosafurano | 0,15 | 15,63 |
| 17 | 1229 | 1805 | Nerol | 0,14 | 14,23 |
| 18 | 1238 | 1692 | Neral | 26,18 | 2801,55 |
| 19 | 1252 | 1852 | Geraniol | 7,87 | 841,05 |
| 20 | 1267 | 1744 | Geranial | 31,75 | 1483,42 |
| 21 | 1282 | 1663 | Formiato de nerilo | 0,09 | 9,70 |
| 22 | 1348 | 1481 | α -Cubebeno | 0,11 | 11,55 |
| 23 | 1358 | 1732 | Acetato de nerilo | 0,30 | 37,18 |
| 24 | 1381 | 1761 | Acetato de geranilo | 4,21 | 450,26 |
| 25 | 1388 | 1546 | β -Bourboneno | 0,05 | 5,68 |
| 26 | 1390 | 1598 | β -Elemeno | 0,59 | 62,98 |
| 27 | 1431 | 1611 | <i>trans</i> - β -Cariofileno | 5,00 | 534,95 |
| 28 | 1439 | 1601 | α -Guaieno | 1,03 | 110,04 |
| 29 | 1442 | 1636 | <i>cis</i> - β -Farneseno | 0,18 | 19,23 |

| | | | | | |
|----|------|------|----------------------------|------|--------|
| 30 | 1454 | 1686 | α -Humuleno | 1,32 | 141,16 |
| 31 | 1460 | 1661 | <i>allo</i> -Aromadendreno | 0,11 | 11,79 |
| 32 | 1485 | 1654 | Germacreno D | 0,30 | 31,61 |
| 33 | 1490 | 1756 | β -Selineno | 0,25 | 26,31 |
| 34 | 1498 | 1759 | α -Selineno | 0,45 | 48,40 |
| 35 | 1509 | 1730 | α -Bulneseno | 0,36 | 38,17 |
| 36 | 1564 | 2043 | <i>trans</i> -Nerolidol | 0,11 | 12,08 |
| 37 | 1590 | 2068 | Germacreno D-4-ol | 0,06 | 7,59 |
| 38 | 1583 | 2001 | Óxido de Cariofileno | 1,72 | 184,09 |
| | | | NI | 6,27 | |

Continuación **Tabla 6.**



Gráfica 2. Distribución de los grupos de familias encontrados en el AE de *L. alba* (quimiotipo citral) extraído por MWHD.

El nombre que se le da a este quimiotipo de *L. alba*, se debe a que su AE posee en mayor proporción el componente citral, que es una mezcla de dos isómeros geométricos (ver **Figura 8**): geranial (27,79 %) y neral (22,92 %). Particularmente, el citral es empleado en la industria para la obtención de vitamina A [82].

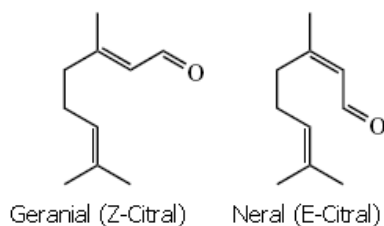


Figura 8. Estructura molecular de los isómeros geométricos del citral, Z y E.

En la **Figura 9** y en el **Esquema 6** se presenta el espectro de masas y las posibles rutas de fragmentación [82–83] para el neral y en éste se puede observar su ion molecular M^+ en m/z 152 (4 %), el cual por ruptura alílica produce el catión $C_5H_9^+$ m/z 69 (96 %) y éste a su vez por pérdida de una molécula de etileno produce el ion pico base $C_3H_5^+$ en m/z 41 (100 %); también el M^+ por pérdida de radical metilo produce el catión $C_5H_9^+$ en m/z 137 (7 %), el cual por ruptura alílica produce el fragmento m/z 83 (11 %) por pérdida del radical $C_3H_7^+$ produce el catión $(M-C_3H_7)^+$ en m/z 109 (9 %); por último, el ion molecular pierde una molécula de agua produciendo el catión radical $(M-H_2O)^+$ en m/z 134 (2 %), y éste produce dos fragmentos más: uno por pérdida de radical metilo, en m/z 119 (3 %); y el otro por pérdida del radical propílico, en m/z 91 (5 %).

Con respecto al geranial, el espectro de masas es muy similar al neral; sólo cambian cuantitativamente en las intensidades de los iones, por ejemplo el pico base cambia de m/z 41 en el neral a m/z 69 en el geranial.

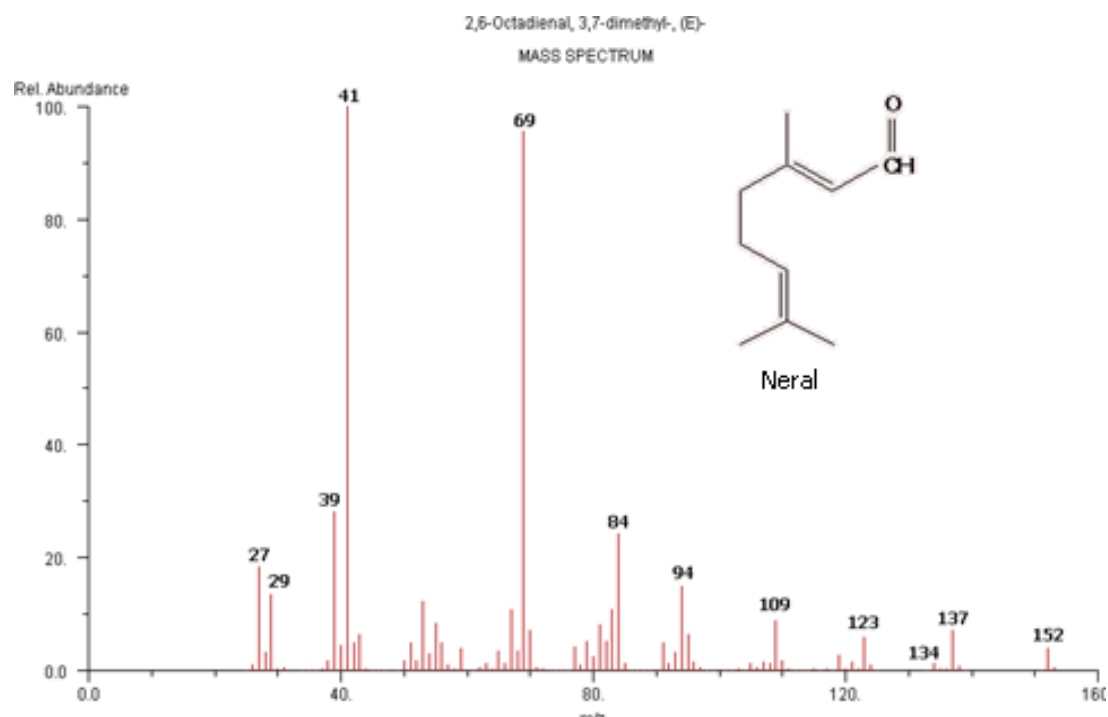
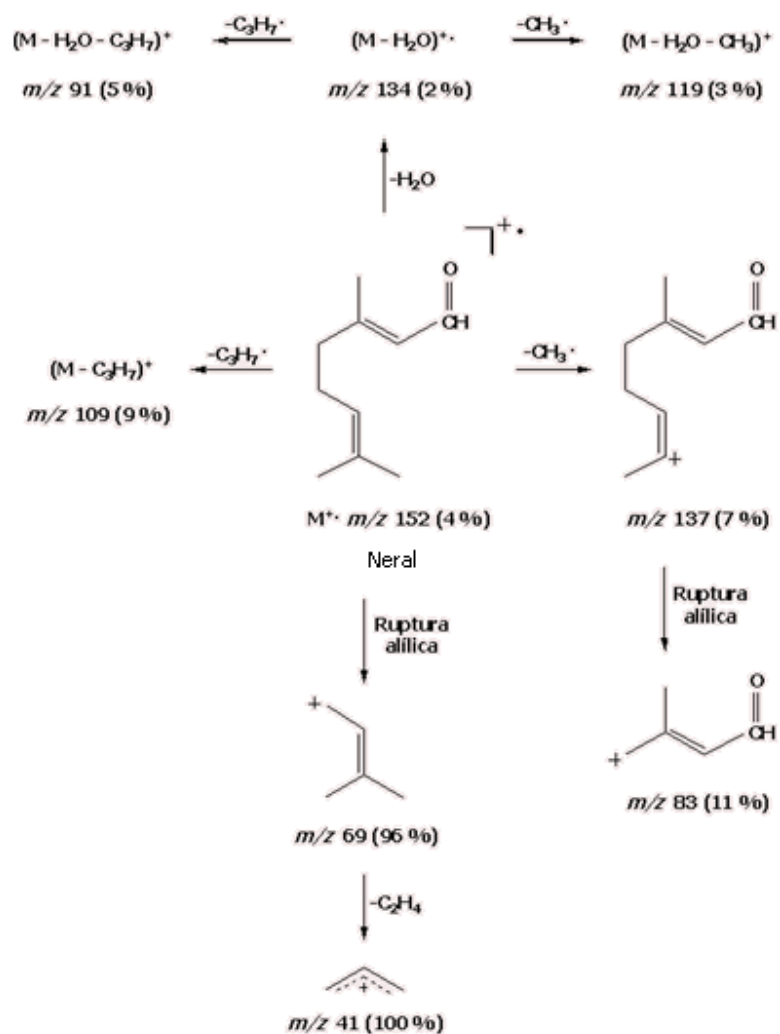


Figura 9. Espectro de masas del neral.

Así mismo, en la **Tabla 6** se puede observar que los análogos alcohólicos del citral, nerol y geraniol, se encuentran en 7 %, y presentan rutas de fragmentación [83–84] similares. El espectro de masas y la ionización disociativa del geraniol se presentan en la **Figura 10** y el **Esquema 7**, respectivamente.

El ion molecular para el geraniol produce el ion pico base por ruptura alílica, en m/z 69 (100 %), y éste por pérdida de una molécula de etileno produce el catión en m/z 41 (70 %); El M^+ por pérdida de una molécula de agua y subsecuente pérdida de un radical metilo produce los fragmentos en m/z 136 (3 %) y en m/z 121 (4 %), respectivamente. Por último, el M^+ por pérdida de un radical metilo produce el fragmento en m/z 139 (2 %), que a su vez, por pérdida de una molécula de etileno y posterior ruptura alílica produce los iones en m/z 111 (6 %) y en m/z 84 (7 %), respectivamente.



Esquema 6. Posibles rutas de fragmentación del neral.

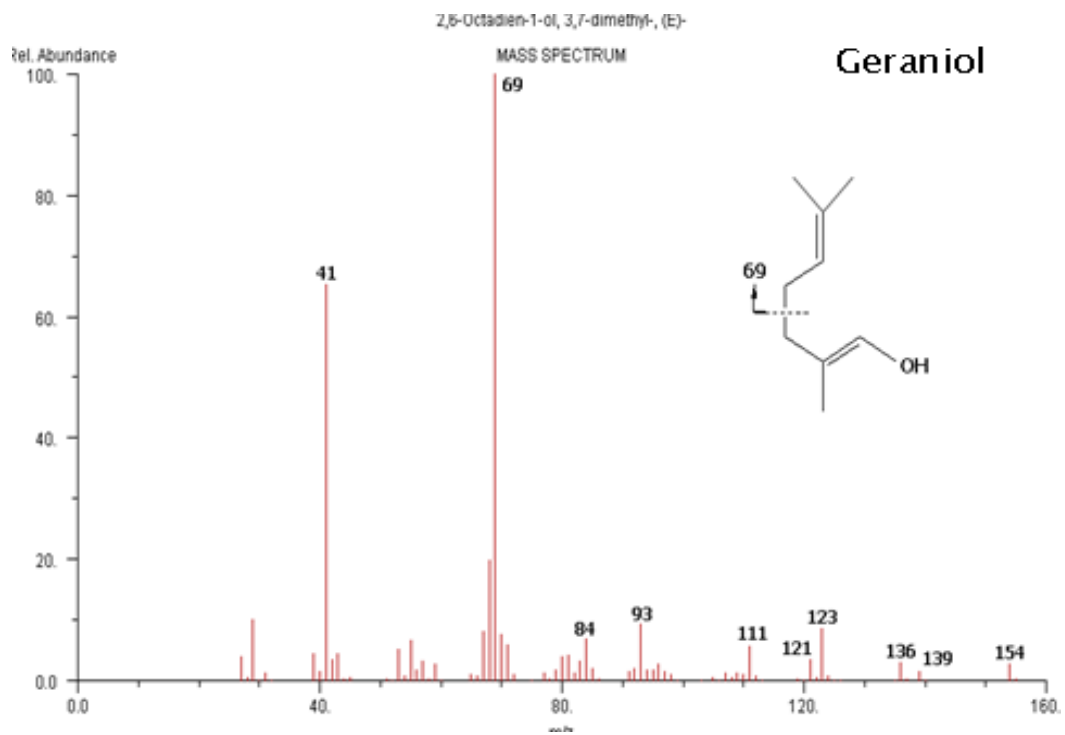
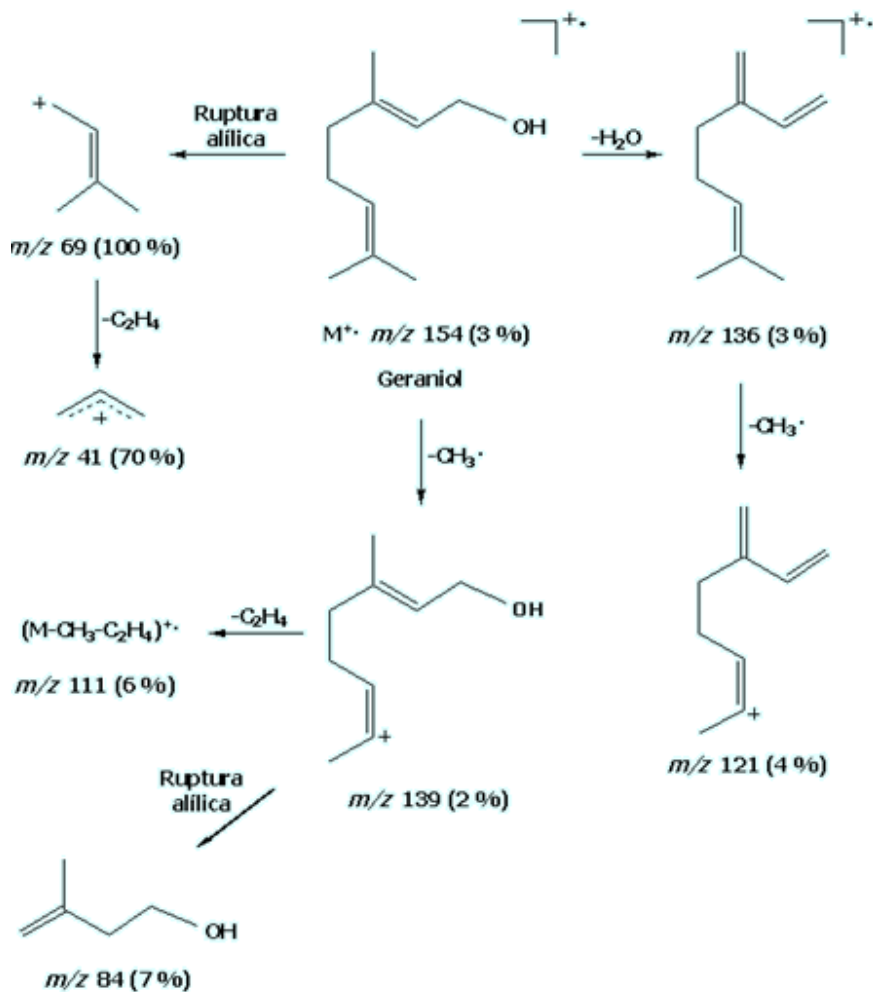


Figura 10. Espectro de masas del geraniol.



Esquema 7. Posibles rutas de fragmentación del geraniol.

3.3 ACEITE ESENCIAL OBTENIDO DE LAS HOJAS DE *LIPPIA CITRIODORA* H.B.K. POR MWHD.

El aceite esencial de *L. citriodora* (ver **Fotografía 11**) obtenido de las partes aéreas (hojas e inflorescencias), presenta un olor cítrico intenso con un color

“amarillo – verdoso” fuerte y traslúcido. El rendimiento de extracción del aceite fue 0,15% (% p/p), así como lo reportan estudios previos [12,85].



Fotografía 11. *Lippia citriodora*.

El perfil cromatográfico para el AE de *L. citriodora*, extraído por MWHD bajo las condiciones operacionales descritas en el **Numeral 2.2.2.1**, del desarrollo experimental, se presenta en la **Figura 11**. En la **Tabla 7** se registran los componentes identificados por GC – MS, según el orden de elución en la columna DB – 5 MS (cantidad relativa, ≥ 0.1 %), junto con sus índices de retención, cantidades relativas y concentraciones que se determinaron por el método del estándar interno.

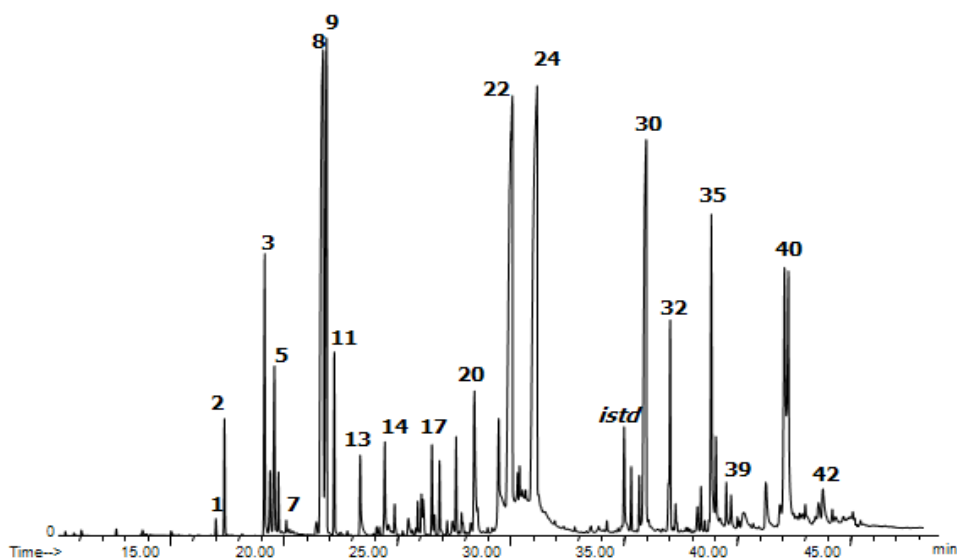


Figura 11. Perfil cromatográfico del AE de *L. citriodora* H.B.K. obtenido por MWHD. Columna DB – 5 MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los componentes se encuentra reportada en la Tabla 7.

Tabla 7. Composición química, cantidad relativa (%) y concentración (ppm) de los componentes en el AE *L. citriodora* H.B.K. aislado por MWHD.

| Nº pico | I _k | | Nombre del Compuesto | Cantidad Relativa % | Concentración (ppm) |
|---------|----------------|--------|---------------------------------|---------------------|---------------------|
| | DB-5 | DB-WAX | | | |
| 1 | 930 | 1038 | α -Tujeno | 0,14 | 22,61 |
| 2 | 939 | 1161 | α -Pinenos | 0,98 | 158,96 |
| 3 | 979 | 1283 | 1-Octen-3-ol | 0,74 | 120,45 |
| 4 | 986 | 1338 | 6-Metil-5-hepten-2-ona | 1,95 | 315,43 |
| 5 | 990 | 1156 | β -Mirceno | 0,50 | 80,62 |
| 6 | 991 | - | 3-Octanol | 0,11 | 17,74 |
| 7 | 1026 | 1272 | o-Cimeno | 0,22 | 35,37 |
| 8 | 1029 | 1200 | Limoneno | 12,86 | 2074,50 |
| 9 | 1031 | 1228 | Eucaliptol | 7,17 | 1152,05 |
| 10 | 1037 | 1251 | <i>cis</i> - β -Ocimeno | 1,58 | 255,91 |
| 11 | 1070 | - | <i>cis</i> -Hidrato de sabineno | 1,08 | 175,60 |

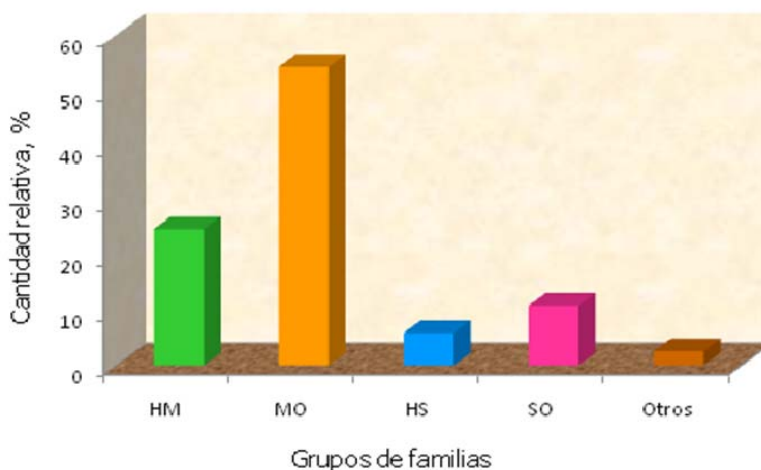
| | | | | | |
|----|------|------|-------------------------------------|-------|---------|
| 12 | 1075 | 1463 | <i>trans</i> -Hidrato de sabineno | 0,91 | 180,64 |
| 13 | 1096 | 1548 | Linalool | 1,10 | 178,09 |
| 14 | 1110 | 1451 | <i>cis</i> -Óxido de limoneno | 0,31 | 58,42 |
| 15 | 1111 | 1476 | <i>trans</i> -Óxido de limoneno | 0,34 | 62,81 |
| 16 | 1140 | 1515 | Fotocitral A | 0,74 | 78,93 |
| 17 | 1156 | - | Geraniato de metilo | 0,05 | 8,81 |
| 18 | 1177 | 1509 | Epóxido de rosefurano | 0,13 | 20,91 |
| 19 | 1177 | 1601 | Terpinen-4-ol | 0,29 | 32,65 |
| 20 | 1186 | 1731 | α -Terpineol | 2,65 | 428,93 |
| 21 | 1229 | 1805 | Nerol | 2,67 | 404,64 |
| 22 | 1238 | 1692 | Neral | 15,10 | 2436,34 |
| 23 | 1249 | 1852 | Geraniol | 2,75 | 230,76 |
| 24 | 1264 | 1744 | Geranial | 16,79 | 2541,34 |
| 25 | 1381 | 1761 | Acetato de geranilo | 1,31 | 212,51 |
| 26 | 1376 | 1519 | α -Copaeno | 0,60 | 97,20 |
| 27 | 1388 | 1546 | β -Bourboneno | 0,52 | 84,85 |
| 28 | 1411 | 1600 | α -Cedreno | 0,43 | 69,33 |
| 29 | 1431 | 1611 | <i>trans</i> - β -Cariofileno | 2,25 | 346,13 |
| 30 | 1388 | 1560 | β -Cubebeno | 0,28 | 51,36 |
| 31 | 1457 | 1669 | <i>trans</i> - β -Farneseno | 0,05 | 8,55 |
| 32 | 1480 | 1701 | γ -Muuroleno | 0,03 | 5,92 |
| 33 | 1460 | 1661 | <i>allo</i> -Aromadendreno | 0,42 | 68,61 |
| 34 | 1482 | - | γ -Curcumeno | 0,11 | 17,29 |
| 35 | 1480 | 1779 | <i>ar</i> -Curcumeno | 3,82 | 619,04 |
| 36 | 1523 | 1761 | δ -Cadinene | 0,06 | 9,19 |
| 37 | 1533 | 1961 | <i>cis</i> -Nerolidol | 1,01 | 189,02 |
| 38 | 1563 | 2043 | <i>trans</i> -Nerolidol | 1,07 | 173,01 |
| 39 | 1582 | - | <i>ar</i> -Turmerol | 0,44 | 70,78 |
| 40 | 1578 | 2153 | Espatulenol | 4,95 | 794,04 |
| 41 | 1583 | 2001 | Óxido de cariofileno | 4,43 | 717,36 |
| | | | NI | 4,81 | |

Continuación **Tabla 7**.

Se logró identificar 41 componentes, que constituyen el 97,6 % de la composición química del AE, por medio de los índices de Kòvats, tanto en columna apolar como polar y los espectros de masas (EI, 70 eV), bajo los parámetros de integración aplicados: umbral de integración, *Thshd* = 16, y área de rechazo del pico en la base = 1.

En la tabla de composición (**Tabla 7**) se puede observar que la planta es rica en: geranial (16,79%), neral (15,10%), limoneno (12,86%), eucaliptol (7,17%) y Espatulenol (4,95%). Además, la composición química concuerda con la reportada en la literatura [12,85–87]. El AE de *L. citriodora* resultó también ser muy rico en monoterpenos oxigenados (54,24 %), y también rico en hidrocarburos monoterpenos (24,75 %); en cambio, resultó pobre en hidrocarburos sesquiterpenos (5,89 %) y en sus respectivos análogos oxigenados (10,86 %), ver **Gráfica 3**.

El AE de *L. citriodora* al igual que el de *L. alba* (quimiotipo citral) es también rico en citral, neral y geranial (ver **Esquema 6**). Estudios previos [88–89] habían reportado el citral, como un componente minoritario. El que el quimiotipo colombiano sea rico en citral, convierte a esta planta en una especie aromática promisoría para su cultivo industrial y al AE, en un producto comercialmente muy atractivo, como fuente de este aldehído. El citral es usado ampliamente en química orgánica fina, ya que éste es un compuesto α,β – insaturado y presenta reacciones de hidrogenación que conducen a la formación de sus análogos alcohólicos, nerol y geraniol (ver **Esquema 7**), los cuales son intermediarios importantes en las industria farmacéutica, fragancias y sabores [82].



Gráfica 3. Distribución de los grupos de familias encontrados en el AE de *L. citriodora* H.B.K. extraído por MWHD.

3.4 ACEITE ESENCIAL OBTENIDO DE LAS HOJAS DE *LIPPIA DULCIS* (TREV). POR MWHD.



Fotografía 12. *Lippia dulcis* (Trev.).

El aceite esencial de *L. dulcis* (Trev.) (ver **Fotografía 12**) obtenido de las partes aéreas (hojas e inflorescencias), presenta un olor agradable, como dulce y un color ligeramente amarillo. El rendimiento de extracción del AE fue de 0,13 %.

El perfil cromatográfico para el AE de *L. citriodora*, extraído por MWHD, se presenta en la **Figura 12**. Los componentes identificados por GC – MS, según el orden de elución en la columna DB – 5 MS (cantidad relativa, ≥ 0.1 %), junto con sus índices de retención, cantidades relativas y concentraciones que se determinaron por el método del estándar interno, se registran en la **Tabla 8**. La identificación se realizó por medio de índices de Kòvats, tanto en columna apolar como polar y los espectros de masas (EI, 70 eV), bajo los parámetros de integración aplicados: umbral de integración, $Thshd = 16$, y área de rechazo del pico en la base = 1. Se identificaron 40 componentes correspondientes al 89 % del total del aceite.

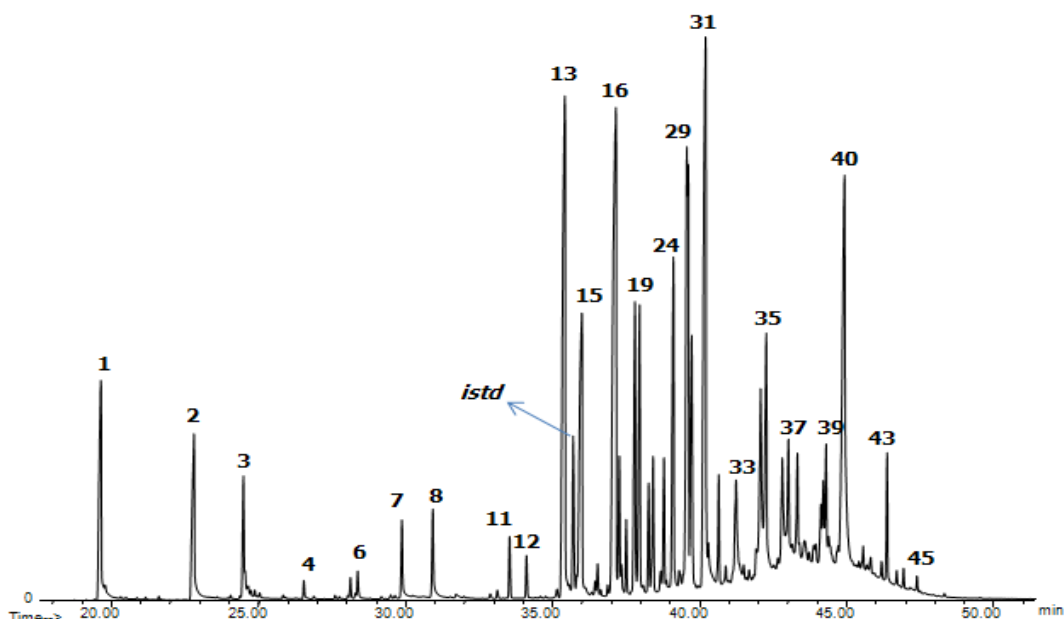


Figura 12. Perfil cromatográfico del AE de *L. dulcis* (Trev.) obtenido por MWHD. Columna DB – 5 MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los componentes se encuentra reportada en la Tabla 8.

Tabla 8. Composición química, cantidad relativa (%) y concentración (ppm) de los componentes en el AE *L. dulcis* (Trev.) aislado por MWHD.

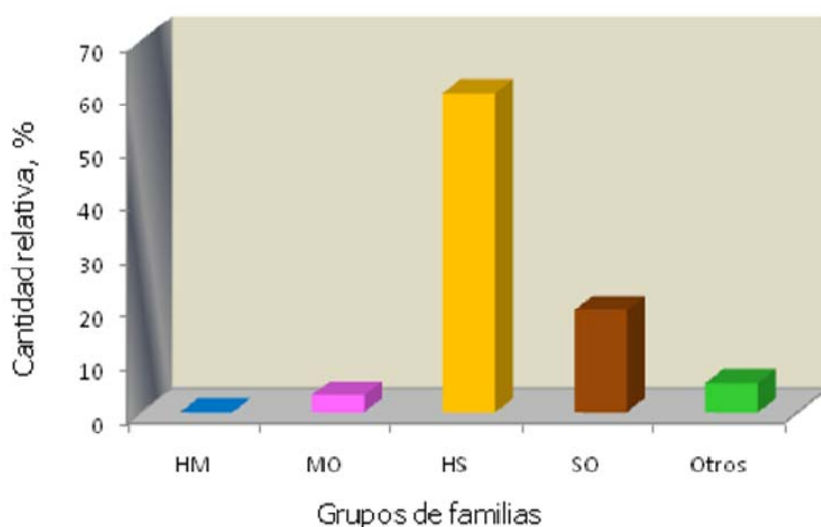
| Nº pico | I _k | | Nombre del Compuesto | Cantidad Relativa % | Concentración (ppm) |
|---------|----------------|--------|----------------------------|---------------------|---------------------|
| | DB-5 | DB-WAX | | | |
| 1 | 986 | 1338 | 6-Metil-5-hepten-2-ona | 3,30 | 1015,97 |
| 2 | 1029 | 1200 | Limoneno | 0,02 | 6,58 |
| 3 | 1039 | 1613 | 3-Metil-2-ciclohexen-1-ona | 3,50 | 768,05 |
| 4 | 1096 | 1548 | Linalool | 1,41 | 433,31 |
| 5 | 1110 | - | 4-Acetil-1-meticiclohexeno | 0,03 | 8,76 |
| 6 | 1154 | 1381 | Citronelal | 0,14 | 41,59 |
| 7 | 1191 | - | Salicilato de metilo | 0,04 | 13,20 |
| 8 | 1226 | 1575 | Citronelol | 0,24 | 85,21 |

| | | | | | |
|----|------|------|--|-------|---------|
| 9 | 1238 | 1692 | Neral | 0,73 | 223,95 |
| 10 | 1264 | 1744 | Geranial | 0,89 | 274,44 |
| 11 | 1338 | 1487 | δ -Elemeno | 0,50 | 155,13 |
| 12 | 1348 | 1481 | α -Cubebeno | 0,35 | 106,29 |
| 13 | 1376 | 1519 | α -Copaeno | 9,55 | 2628,57 |
| 14 | 1388 | 1546 | β -Bourboneno | 1,67 | 513,15 |
| 15 | 1466 | 1778 | Isocariofileno | 0,13 | 40,03 |
| 16 | 1409 | 1541 | α -Gurjuneno | 0,27 | 82,96 |
| 17 | 1457 | 1669 | <i>trans</i> - β -Farneseno | 1,05 | 16,75 |
| 18 | 1442 | 1636 | <i>cis</i> - β -Farneseno | 0,08 | 25,50 |
| 19 | 1431 | 1611 | <i>trans</i> - β -Cariofileno | 10,86 | 3034,54 |
| 20 | 1434 | 1594 | <i>trans</i> - α -Bergamoteno | 1,14 | 349,71 |
| 21 | 1433 | 1593 | β -Gurjuneno | 0,26 | 81,13 |
| 22 | 1459 | 1652 | Sesquisabineno | 0,57 | 1058,34 |
| 23 | 1522 | 1676 | β -Sesquifelandreno | 3,92 | 898,51 |
| 24 | 1454 | 1686 | α -Humuleno | 0,88 | 272,02 |
| 25 | 1460 | 1661 | <i>allo</i> -Aromadendreno | 1,22 | 375,32 |
| 26 | 1500 | 1730 | α -Muuroleno | 1,11 | 340,35 |
| 27 | 1482 | - | γ -Curcumeno | 0,05 | 16,83 |
| 28 | 1485 | 1654 | Germacreno D | 4,42 | 1051,58 |
| 29 | 1500 | 1705 | Biciclogermacreno | 8,43 | 2285,45 |
| 30 | 1505 | 1737 | β -Bisaboleno | 2,94 | 903,87 |
| 31 | 1523 | 1761 | δ -Cadinene | 10,29 | 2856,29 |
| 32 | 1547 | 1782 | <i>trans</i> - α -Bisaboleno | 0,90 | 277,10 |
| 33 | 1545 | 1935 | α -Calacoreno | 0,19 | 58,78 |
| 34 | 1563 | 2043 | <i>trans</i> -Nerolidol | 1,97 | 604,68 |
| 35 | 1575 | 1978 | β -Calacoreno | 0,15 | 45,76 |
| 36 | 1578 | 2153 | Espatulenol | 3,96 | 910,81 |
| 37 | 1583 | 2001 | Óxido de cariofileno | 3,58 | 1101,35 |
| 38 | 1631 | - | Muurola-4,10(14)-dien- 1- β -ol | 1,48 | 454,58 |
| 39 | 1676 | 2111 | <i>cis</i> -Atlantona | 1,71 | 527,35 |
| 40 | 1685 | 2022 | α -Bisabolol | 9,52 | 2622,35 |
| | | | NI | 6,55 | |

Continuación **Tabla 8.**

De acuerdo con lo reportado en la tabla de composición química del AE de *L. dulcis*, la planta es rica en: *trans*- β -cariofileno (10,86%), δ -cadineno (10,29%), α -copaeno (9,55%), α -bisabolol (9,52%) y biciclogermacreno (8,43%), de esta manera se puede observar que el AE de *L. dulcis* es predominantemente de tipo

sesquiterpénico, que representan el 60,12 % del total del AE extraído; además, los sesquiterpenos oxigenados contienen el 19,28 % del total del aceite. En menor proporción están los monoterpenos oxigenados que alcanzaron un 3,26 % del total del aceite. Por otro lado, se puede decir que los hidrocarburos monoterpenos están ausentes; sólo representaron un 0,02 % del total del aceite. En la **Gráfica 4** se presenta la distribución por familias del contenido del aceite.



Gráfica 4. Distribución de los grupos de familias encontrados en el AE de *L. dulcis* (Trev.) extraído por MWHD.

Los dos componentes mayoritarios en el AE fueron los sesquiterpenos *trans*- β -cariofileno y δ -cadineno, por lo que a continuación se presentan sus espectros de masas, **Figuras 13** y **14**, y también sus posibles rutas de fragmentación, **Esquemas 8** y **9**.

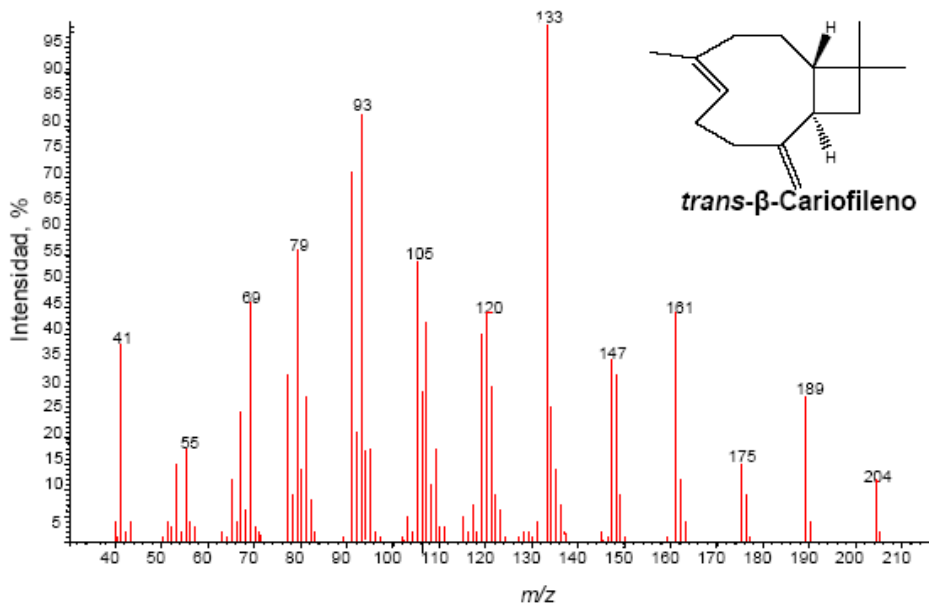
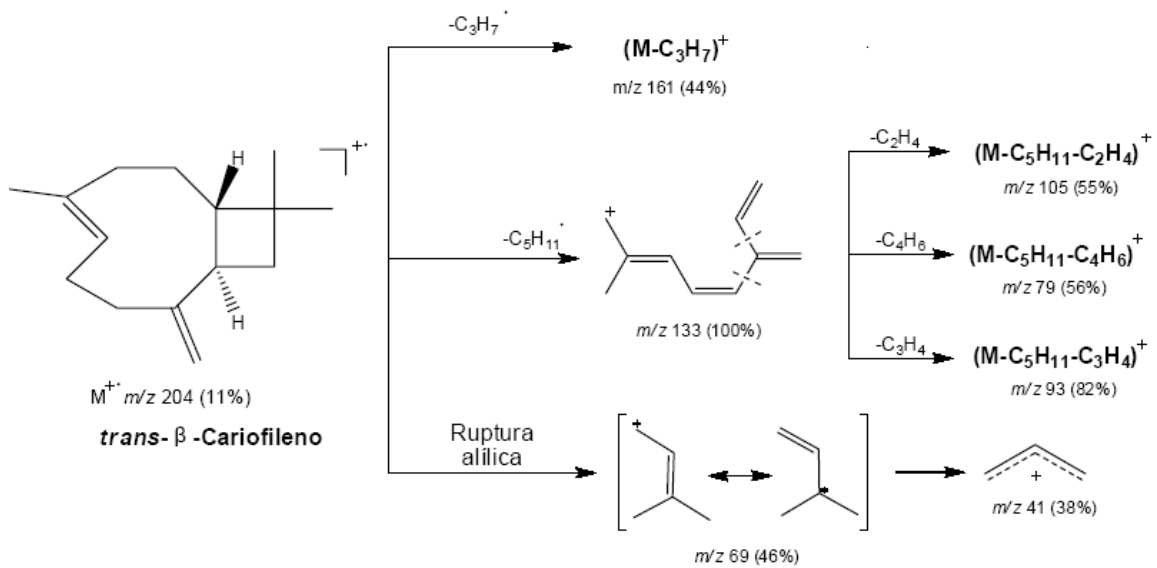


Figura 13. Espectro de masas del *trans*-β-cariofileno.



Esquema 8. Posibles rutas de fragmentación del *trans*-β-cariofileno.

En la ionización disociativa del *trans*- β -cariofileno, el ion molecular M^+ en m/z 204 (11 %), puede fragmentarse por tres diferentes caminos: primero, por pérdida de un radical propilo se obtiene el catión en m/z 161 (44 %); segundo, por pérdida del radical C_5H_{11} , produce el ion pico base en m/z 133 (100 %), que a su vez puede perder tres moléculas neutras, C_2H_4 , C_4H_6 y C_3H_4 , y dar tres fragmentos más: en m/z 105 (55 %), m/z 79 (56 %) y m/z 93 (82 %), respectivamente. Finalmente, el M^+ por ruptura alílica, produce el catión en m/z 69 (46 %) y fragmento alílico en m/z 41 (38 %).

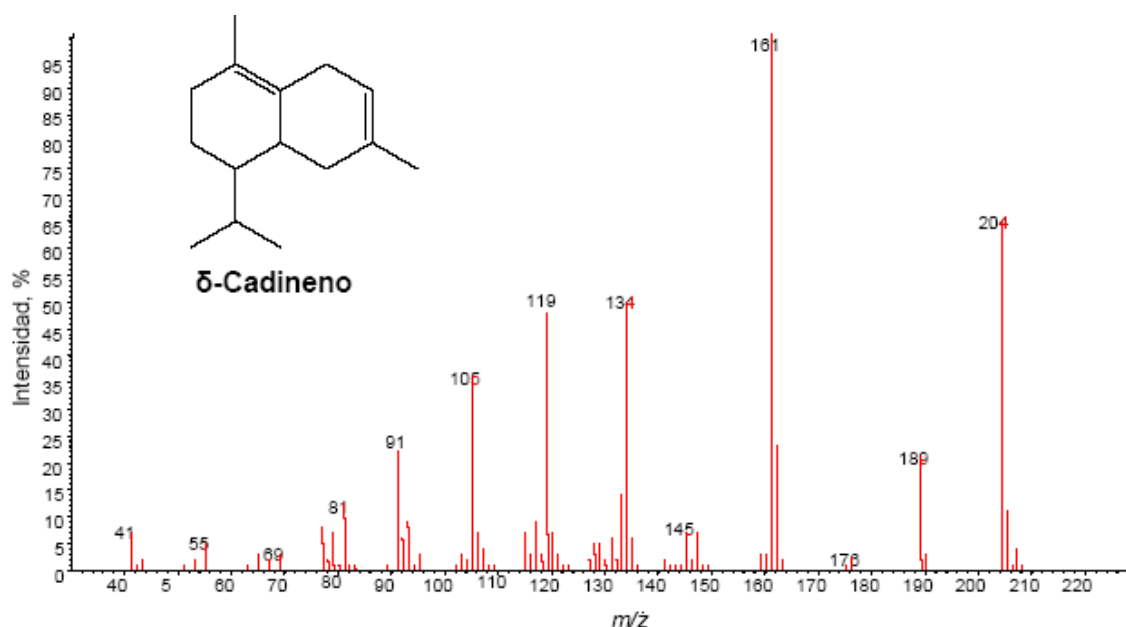
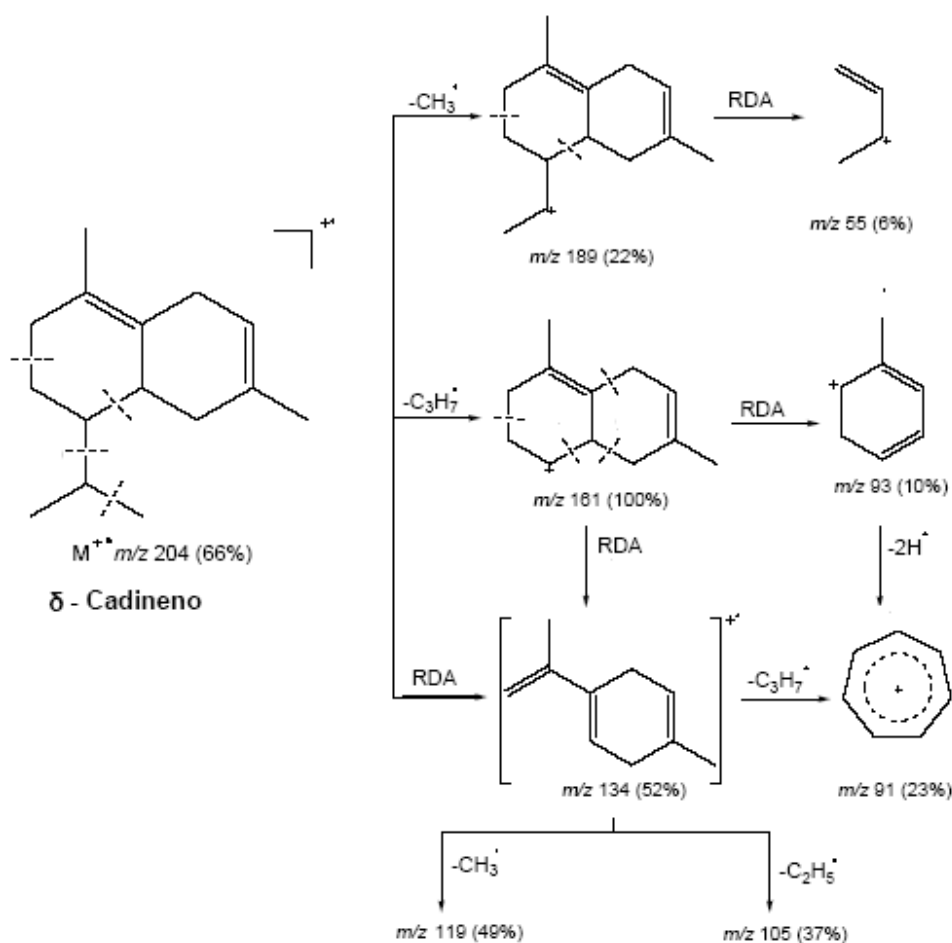


Figura 14. Espectro de masas del δ -cadineno.

Para el δ -Cadineno, el ion molecular en m/z 204 (66 %) presenta una intensidad relativamente alta, que es poco común para el M^+ . El pico base, en m/z 161 (100 %) es producido por pérdida del radical propilo. Así mismo, tanto el pico base, como el ion molecular sufren ruptura RDA y producen los fragmentos en m/z 93 (10 %) y 134 (52 %), respectivamente. Estos dos fragmentos a su vez, llegan al

mismo catión: el primero por eliminación de dos radicales hidrógeno y segundo por ruptura RDA, producen el ion tropilio, en m/z 91 (23 %). El ion m/z 134 también produce otros fragmentos por eliminación de un radical metilo y otro etilo produce los iones en m/z 119 (49 %) y 105 (37 %), respectivamente. Por otro parte, el $M^{+\cdot}$ produce los fragmentos en m/z 189 (22 %) y 55 (6 %), por eliminación de radical metilo y posterior ruptura RDA, respectivamente.



Esquema 9. Posibles rutas de fragmentación del δ -cadineno.

Según reportes de la literatura [37,41,90], existen dos quimiotipos para *L. dulcis*, una tipo amarga, debido a que en su composición se encuentran como

componente mayoritario el alcanfor. Y está la tipo dulce que es debido al sesquiterpeno hernandulcina, que la hace 1500 veces más dulce que la sacarosa. El quimiotipo estudiado es el segundo, dulce, pero como se puede observar en la **Tabla 8** no se reporta este componente, hernandulcina ni tampoco sus análogos 4 β -hidroxihernandulcina y *epi*-hernandulcina. Esto se debe a que estos compuestos son termolábiles y se descomponen en el puerto de inyección; pero, en la tabla composicional si se reportan sus productos de descomposición: 6-Metil-5-hepten-2-ona (3,15 %) y 3-Metil-2-ciclohexen-1-ona (2,38 %). Estos componentes indican que el quimiotipo estudiado es el dulce.

3.5 ACEITE ESENCIAL OBTENIDO DE LAS HOJAS DE *LIPPIA MICROMERA* (SCHAUER) POR MWHD.

El aceite esencial de *L. micromera* (Schauer) (ver **Fotografía 13**) obtenido de las partes aéreas (hojas e inflorescencias), presenta un olor poco agradable, es picante y se alcanza a percibir un olor a especia y en cuanto a su color, es translúcido y ligeramente verde – amarillo. El rendimiento de extracción del AE fue de 1,01 %, se han reportado rendimientos para esta planta mucho menores 0,21 % [42–43].



Fotografía 13. *Lippia micromera* (Schauer).

El perfil cromatográfico para el AE de *L. micromera*, extraído por MWHD, se presenta en la **Figura 15**. En la **Tabla 9** se registran los componentes identificados por GC – MS, según orden de elución de la columna DB – 5 MS (cantidad relativa, ≥ 0.1 %), junto con sus índices de retención, cantidades relativas y concentraciones que se determinaron por el método del estándar interno.

La identificación se realizó por medio de índices de Kòvats, tanto en columna apolar como polar y los espectros de masas (EI, 70 eV), bajo los parámetros de integración aplicados: umbral de integración, *Thshd* = 16, y área de rechazo del pico en la base = 1. Se identificaron 34 componentes correspondientes al 89,5 % del total del aceite.

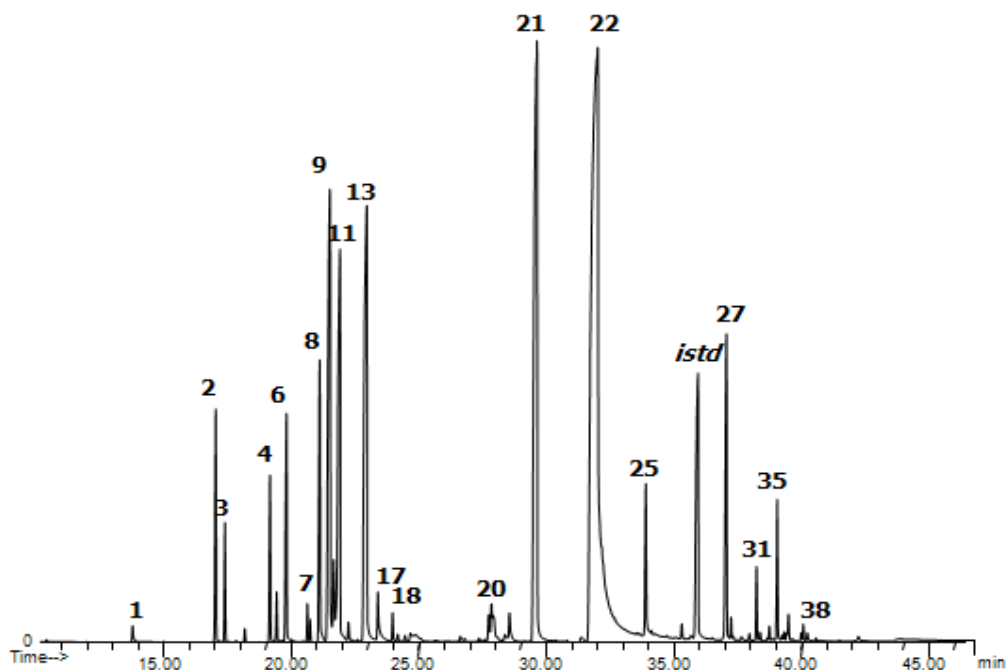


Figura 15. Perfil cromatográfico del AE de *L. micromera* (Schauer) obtenido por MWHD. Columna DB – 5 MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los componentes se encuentra reportada en la Tabla 9.

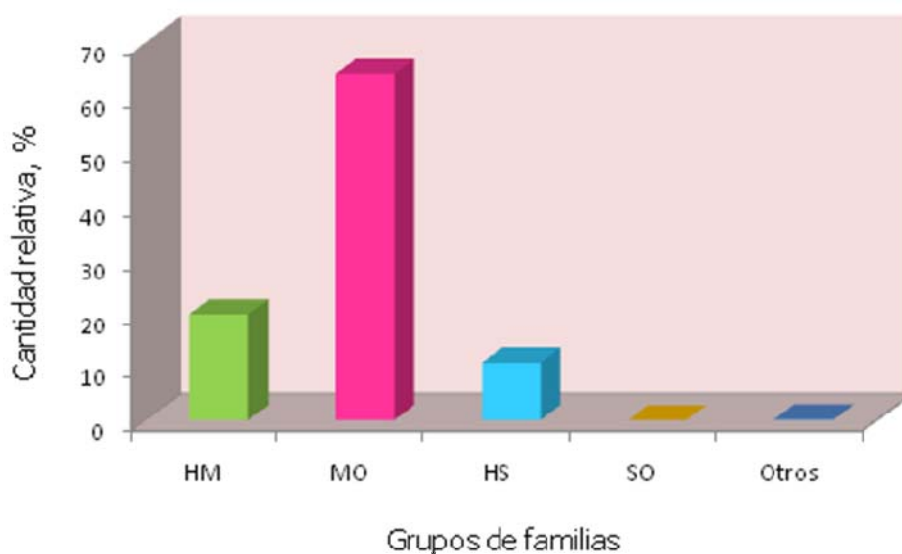
Tabla 9. Composición química, cantidad relativa (%) y concentración (ppm) de los componentes en el AE *L. micromera* (Schauer) aislado por MWHD.

| Nº pico | I _k | | Nombre del Compuesto | Cantidad Relativa % | Concentración (ppm) |
|---------|----------------|--------|--------------------------|---------------------|---------------------|
| | DB-5 | DB-WAX | | | |
| 1 | 859 | 1289 | <i>cis</i> -3-Hexen-1-ol | 0,18 | 55,43 |
| 2 | 939 | 1205 | α -Pinoeno | 0,93 | 295,59 |
| 3 | 954 | 1061 | Canfeno | 0,11 | 34,11 |
| 4 | 975 | 1115 | Sabineno | 1,44 | 455,00 |
| 5 | 979 | 1205 | β -Pinoeno | 0,40 | 125,91 |
| 6 | 1011 | 1178 | α -Felandreno | 0,31 | 97,12 |
| 7 | 1013 | 1147 | δ -3-Careno | 0,18 | 57,67 |

| | | | | | |
|----|------|------|--------------------------------------|-------|----------|
| 8 | 1022 | 1178 | α -Terpineno | 3,03 | 958,08 |
| 9 | 1032 | 1272 | <i>p</i> -Cimeno | 7,97 | 2522,26 |
| 10 | 1029 | 1200 | Limoneno | 1,03 | 327,36 |
| 11 | 1031 | 1228 | Eucaliptol | 7,15 | 2261,80 |
| 12 | 1037 | 1238 | β - <i>cis</i> -Ocimeno | 0,17 | 52,93 |
| 13 | 1066 | 1248 | γ -Terpineno | 9,80 | 3099,76 |
| 14 | 1070 | - | <i>cis</i> -Hidrato de sabineno | 0,64 | 202,76 |
| 15 | 1088 | 1287 | Terpinoleno | 0,22 | 70,91 |
| 16 | 1091 | 1338 | <i>p</i> -Cimeneno | 0,06 | 20,44 |
| 17 | 1075 | 1463 | <i>trans</i> -Hidrato de sabineno | 0,31 | 98,83 |
| 18 | 1146 | 1518 | Alcanfor | 0,13 | 38,68 |
| 19 | 1171 | - | Umbellona | 0,32 | 103,38 |
| 20 | 1177 | 1601 | Terpinen-4-ol | 0,87 | 273,64 |
| 21 | 1235 | 1597 | Timil metil éter | 15,13 | 4788,43 |
| 22 | 1290 | 2187 | Timol | 35,84 | 11341,05 |
| 23 | 1352 | 1856 | Acetato de timilo | 1,59 | 503,26 |
| 24 | 1376 | 1519 | α -Copaeno | 0,13 | 39,80 |
| 25 | 1431 | 1611 | <i>trans</i> - β -Cariofileno | 3,66 | 1520,00 |
| 26 | 1434 | 1594 | <i>trans</i> - α -Bergamoteno | 0,18 | 1157,72 |
| 27 | 1454 | 1684 | α -Humuleno | 0,60 | 58,08 |
| 28 | 1460 | 1661 | <i>allo</i> -Aromadendreno | 0,07 | 191,06 |
| 29 | 1485 | 1654 | Germacreno D | 1,22 | 23,55 |
| 30 | 1500 | 1705 | Biciclogermacreno | 0,24 | 385,67 |
| 31 | 1513 | 1766 | γ -Cadineno | 0,06 | 77,06 |
| 32 | 1512 | - | δ -Amorfeno | 0,14 | 19,68 |
| 33 | 1529 | 1842 | <i>cis</i> -Calameneno | 0,09 | 42,96 |
| 34 | 1534 | 1786 | <i>trans</i> -Cadina-1,4-dieno | 0,02 | 29,16 |
| | | | NI | 5,78 | |

Continuación de la **Tabla 9**.

En la tabla de composición química de los metabolitos secundarios volátiles para el A.E de *L. micromera* se observa que sus principales componentes mayoritarios son: timol (35,84%), timil metil éter (15,13%) γ -terpineno (9,80%), *p*-cimeno (7,97%) y eucaliptol (7,15%). El AE es muy rico en monoterpenos oxigenados (64,14 %), en menor proporción se encuentran los hidrocarburos monoterpenos (19,61 %) y los hidrocarburos sesquiterpenos (10,69 %), pero no presenta sesquiterpenos oxigenados (ver **Gráfica 5**).



Gráfica 5. Distribución de los grupos de familias encontrados en el AE de *L. micromera* Schauer extraído por MWHD.

Por sus componentes mayoritarios, *L. micromera* recibe como nombre vernáculo oreganito y falso orégano; además por su alto contenido en timol es una potencial fuente en las preparaciones alimenticias como especia.

El timol es un compuesto fenólico que se encuentra en el AE de tomillo y orégano; tiene un isómero estructural, el carvacrol; se caracteriza por su poder desinfectante y fungicida. Por su sabor agradable, está presente en la formulación de diversos enjuagues bucales, pastas de dientes, entre otros, y también se encuentra como aditivo en ungüentos para resfriados como VICK vaporub [44,91]. En la **Figura 16** se presenta el espectro de masas para el timol y la posible ruta de fragmentación se encuentra en el **Esquema 10**.

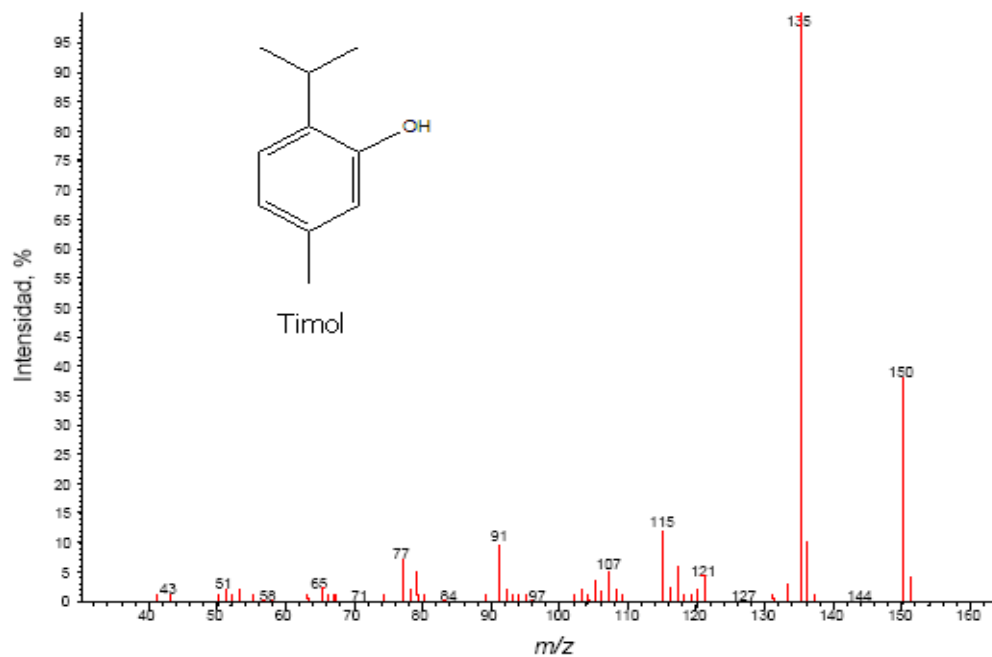
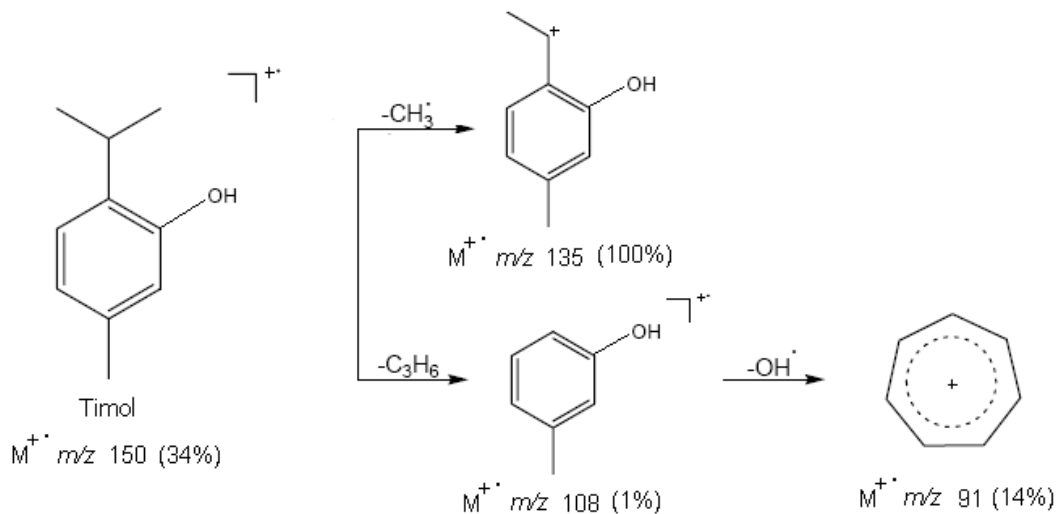


Figura 16. Espectro de masas del timol.



Esquema 10. Posibles rutas de fragmentación del timol.

El timol es un compuesto tipo aromático, lo que hace que su estructura sea muy estable y su ionización disociativa más bien sea escasa, así que el ion molecular

M^+ en m/z 150 (34 %), se disocia por dos posibles rutas: la primera conduce a la formación del ion pico base, en m/z 135 (100 %), debida a la pérdida de radical metilo; y la segunda conduce a un catión radical en m/z 108 (1 %), por pérdida de una molécula de propeno, el cual por eliminación de un radical hidroxilo conduce a la formación del ion tropilio, que es un fragmento característico para estructuras aromáticas.

Otro compuesto importante en el AE de *L. micromera*, es el γ -terpineno, ya que éste es un precursor de compuestos fenólicos en el metabolismo vegetal (carvacrol, timol). En el **Esquema 10** se encuentran las posibles rutas de fragmentación para γ -terpineno, en concordancia con su espectro de masas que se presenta en la **Figura 17**.

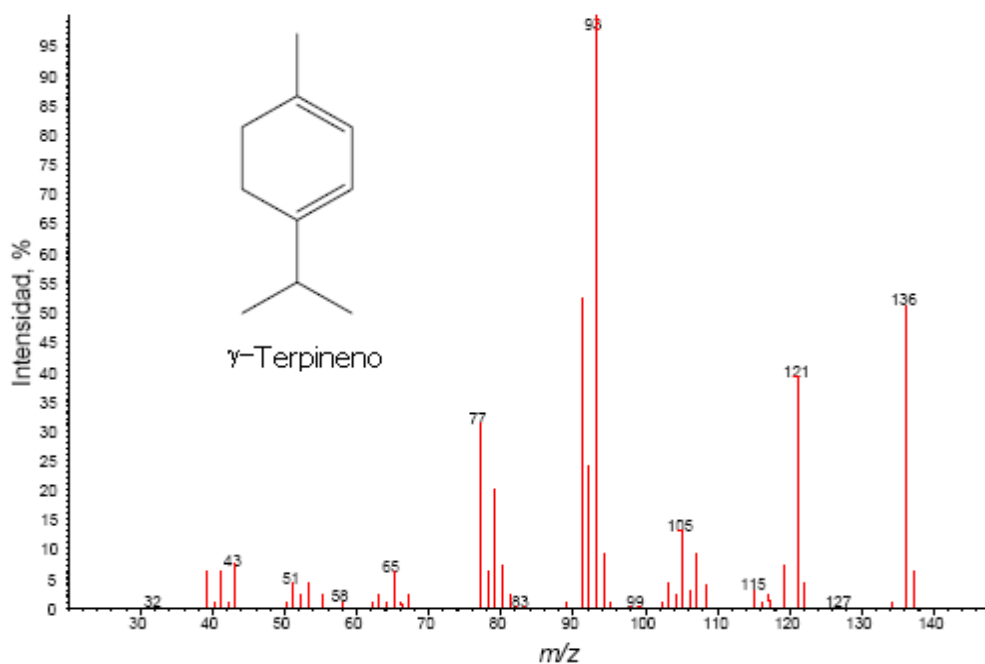
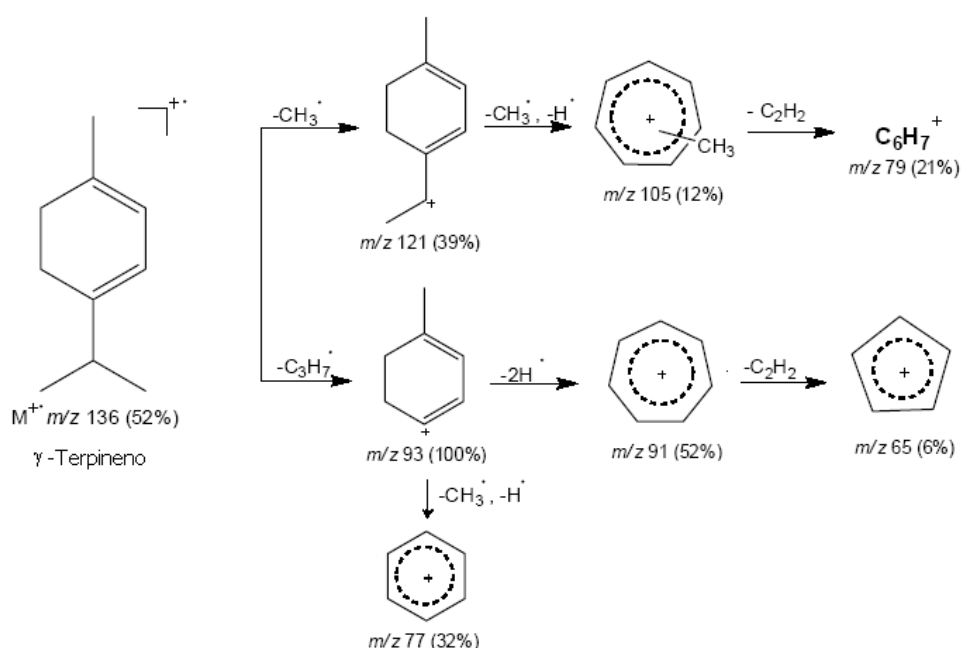


Figura 17. Espectro de masas del γ -terpineno.

En la ruta disociativa para γ -terpineno se observa el ion molecular en m/z 136 (52 %), genera la formación del ion pico base en m/z 93 (100 %), por pérdida del radical propilo; a su vez el ion pico base por pérdida de dos radicales $H\cdot$ produce el ion tropilio en m/z 91 (52 %), el cual genera el catión en m/z 65 (6 %) por eliminación de una molécula de etileno. Por otra parte, el ion pico base también genera el fragmento en m/z 77 (32 %) por pérdida subsecuente de un radical metilo y un $H\cdot$. El ion molecular también genera otro fragmento en m/z 121 (39 %) por eliminación de un radical metilo; éste por pérdida sucesiva de radical metilo y $H\cdot$, genera el catión en m/z 105 (12 %), el cual produce el fragmento en m/z 79 (21 %) por eliminación de una molécula de etileno.



Esquema 11. Posibles rutas de fragmentación del γ -terpineno.

3.6 ACEITE ESENCIAL OBTENIDO DE LAS HOJAS DE *LIPPIA ORIGANOIDES* H.B.K (QUIMIOTIPO CARVACROL) POR MWHD.

El aceite esencial de *L. origanoides* H.B.K. (típica) (ver **Fotografía 1**) obtenido de las partes aéreas (hojas e inflorescencias), presenta un olor muy similar al AE de *L. micromera*, pero más concentrado y de color amarillo. El rendimiento de extracción del AE fue de 1,4 %, siendo más alto que el encontrado por Oliveira *et al.*, 1 % [44], y menor que el encontrado por Dos Santos *et al.*, 4,6 % [92].



Fotografía 14. *Lippia origanoides* H.B.K., quimiotipo carvacrol.

El perfil cromatográfico de los metabolitos secundarios volátiles extraídos por MWHD de *L. origanoides* (quimiotipo carvacrol), se presenta en la **Figura 18**. Los componentes aislados e identificados por GC – MS, con base en criterios cromatográficos y espectroscópicos, se reportan en la **Tabla 10**, junto con sus

índices de retención (apolar y polar), cantidades relativas y concentraciones que se determinaron por el método del estándar interno.

Según los parámetros de integración aplicados, el umbral de integración, $Thshd = 16$, y el área de rechazo del pico en la base = 1, se identificaron satisfactoriamente 32 componentes correspondientes al 94,11 % del total del aceite. El AE de *L. origanoides* (típica) mostró un alto contenido de monoterpenos oxigenados (63,32 %) y contenidos bajos de hidrocarburos monoterpenos (28 %), hidrocarburos sesquiterpénicos (4,54 %) y sesquiterpenos oxigenados (0,05 %) (ver **Gráfica 6**). Los compuestos mayoritarios fueron carvacrol (34,64 %), timol (24,10 %), p-cimeno (10,84 %), γ -terpineno (9,21 %) y α -terpineno (3,67 %).

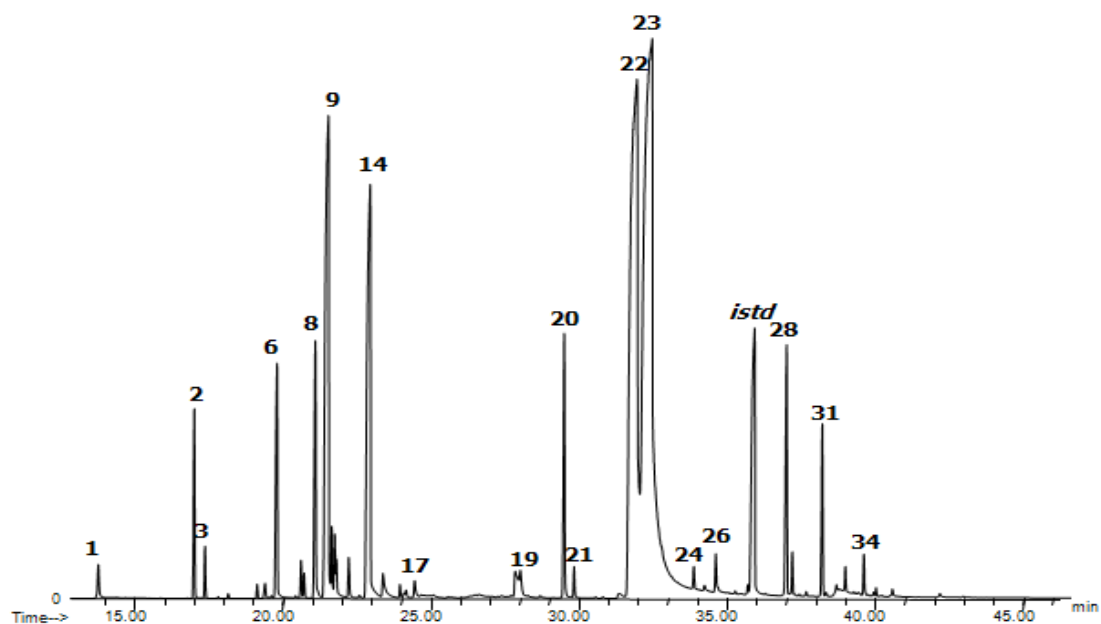
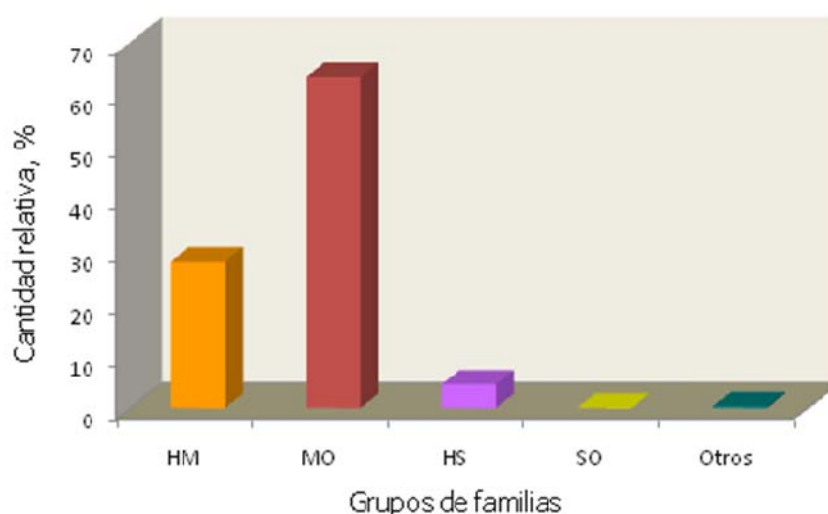


Figura 18. Perfil cromatográfico del AE de *L. origanoides* H.B.K. (quimiotipo carvacrol) obtenido por MWHD. Columna DB – 5 MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los componentes se encuentra reportada en la Tabla 10.

En México, *L. origanoides*, quimiotipo carvacrol, es llamado orégano, y la Farmacopeia Mexicana lo reconoce como un sustituto del orégano común, *L. graveolens* Kunth. Según reportes de literatura [44,93–95] el carvacrol se encontró como el principal componente en el aceite de orégano comercial, pero algunas especies y quimiotipos contienen timol principalmente. Además, se ha encontrado que al menos 39 especies en 16 géneros, son usados por todo el mundo para condimentos o medicinas y son llamados orégano [96–97].

Los hidrocarburos monoterpenos p -cimeno y γ -terpineno, los precursores biogénicos (vía hidroxilación enzimática) de los dos terpenos fenólicos, carvacrol y timol, se encuentran siempre como los hidrocarburos monoterpenos mayoritarios. La misma variabilidad en composición fue verificada en el AE *L. origanoides* (quimiotipo carvacrol).



Gráfica 6. Distribución de los grupos de familias encontrados en el AE de *L. origanoides* (quimiotipo carvacrol) extraído por MWHD.

Tabla 10. Composición química, cantidad relativa (%) y concentración (ppm) de los componentes en el AE *L. origanoides* H.B.K. (quimiotipo carvacrol) aislado por MWHD.

| Nº pico | I _k | | Nombre del Compuesto | Cantidad Relativa % | Concentraci ón (ppm) |
|------------|----------------|------------|--------------------------------------|---------------------------|-------------------------|
| | DB-5 | DB- WAX | | | |
| 1 | 859 | 1289 | <i>cis</i> -3-Hexen-1-ol | 0,38 | 104,86 |
| 2 | 930 | 1038 | α -Tujeno | 1,56 | 426,09 |
| 3 | 939 | 1205 | α -Pino | 0,38 | 103,93 |
| 4 | 954 | 1061 | Canfeno | 0,04 | 9,88 |
| 5 | 975 | 1115 | Sabineno | 0,11 | 29,32 |
| 6 | 1011 | 1178 | α -Felandreno | 0,29 | 78,18 |
| 7 | 1013 | 1147 | δ -3-Careno | 0,19 | 51,47 |
| 8 | 1022 | 1178 | α -Terpineno | 3,67 | 728,62 |
| 9 | 1032 | 1272 | <i>p</i> -Cimeno | 10,84 | 2959,15 |
| 10 | 1029 | 1200 | Limoneno | 0,55 | 150,95 |
| 11 | 1031 | 1228 | Eucaliptol | 0,38 | 102,74 |
| 12 | 1037 | 1238 | β - <i>cis</i> -Ocimeno | 0,38 | 103,57 |
| 13 | 1050 | 1251 | β - <i>trans</i> -Ocimeno | 0,03 | 7,01 |
| 14 | 1066 | 1248 | γ -Terpineno | 9,21 | 2513,39 |
| 15 | 1070 | - | <i>cis</i> -Hidrato de sabineno | 0,44 | 127,97 |
| 16 | 1088 | 1287 | Terpinoleno | 0,10 | 27,16 |
| 17 | 1091 | 1338 | <i>p</i> -Cimeno | 0,08 | 20,66 |
| 18 | 1096 | 1547 | Linalool | 0,19 | 51,78 |
| 19 | 1145 | - | Ipsdienol | 0,04 | 10,70 |
| 20 | 1177 | 1601 | Terpinen-4-ol | 0,92 | 251,84 |
| 21 | 1235 | 1597 | Timil metil éter | 0,25 | 70,63 |
| 22 | 1290 | 2187 | Timol | 24,10 | 6578,85 |
| 23 | 1299 | 2219 | Carvacrol | 34,64 | 9455,50 |
| 24 | 1352 | 1856 | Acetato de timilo | 0,19 | 51,70 |
| 25 | 1290 | 2187 | Acetato de carvacrilo | 0,37 | 101,16 |
| 26 | 1431 | 1611 | <i>trans</i> - β -Cariofileno | 2,53 | 691,26 |
| 27 | 1434 | 1594 | <i>trans</i> - α -Bergamoteno | 0,32 | 87,43 |
| 28 | 1431 | 1611 | α -Humuleno | 1,47 | 401,92 |
| 29 | 1434 | 1594 | β -Bisaboleno | 0,32 | 87,01 |
| 30 | 1460 | 1661 | δ -Cadineno | 0,06 | 16,66 |
| 31 | 1534 | 1766 | <i>trans</i> - γ -Bisaboleno | 0,08 | 22,29 |
| 32 | 1583 | 2001 | Óxido de cariofileno | 0,05 | 13,21 |
| | | | NI | 5,84 | |

Continuación **Tabla 10.**

El AE de *L. origanoides* (quimiotipo carvacrol) es rico en carvacrol como ya se había mencionado; éste y el timol son compuestos fenólicos isoméricos con masa molecular 150; sus espectros de masas son muy similares, el posible patrón de fragmentación que presentan los dos isómeros son similares; difieren ligeramente en las intensidades de los picos (ver **Figura 16** y **Esquema 10**).

Al igual que el γ -terpineno, el *p*-cimeno, también es un precursor del carvacrol y del timol, su espectro de masas y su ionización disociativa se presentan en la **Figura 19** y el **Esquema 12**, respectivamente.

El ión molecular M^+ de *p*-cimeno se encuentra en m/z 134 (33 %), del cual se desprende el ion pico base en m/z 119 (100 %), y el fragmento característico para aromáticos, catión tropilio en m/z 91 (21 %). Su fragmentación es más bien pobre debido a su estabilidad estructural, por ser aromático.

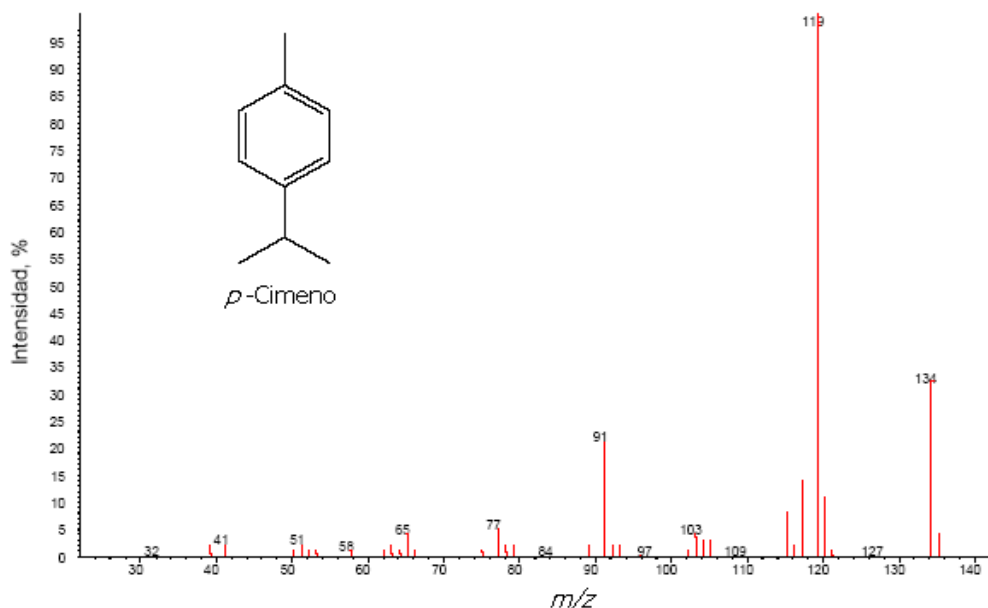
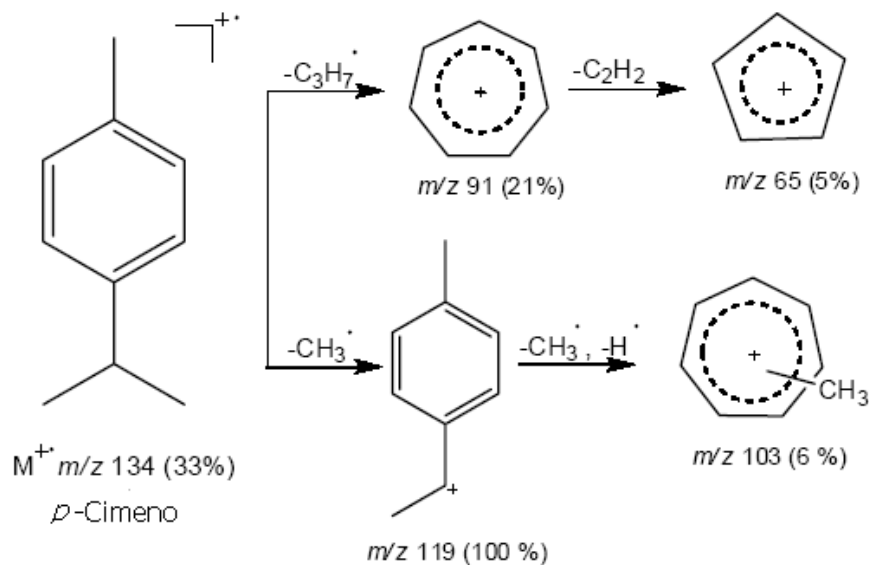


Figura 19. Espectro de masas del *p*-cimeno.



Esquema 12. Posibles rutas de fragmentación del *p*-cimeno.

3.7 ACEITE ESENCIAL OBTENIDO DE LAS HOJAS DE *LIPPIA ORIGANOIDES* H.B.K (QUIMIOTIPO *p* – CIMENO) POR MWHD.

El aceite esencial de *L. origanoides* H.B.K. (ver **Fotografía 15**) obtenido de las partes aéreas (hojas e inflorescencias), presenta un olor muy similar al AE de *L. micromera*, pero más suave su aroma y de color amarillo. El rendimiento de extracción del AE fue de 1,1 %.



Fotografía 15. *Lippia origanoides* H.B.K., quimiotipo *p* – cimeno.

El perfil cromatográfico del AE de *L. origanoides* (quimiotipo *p* – cimeno) extraído por MWHD, se presenta en la **Figura 20** y en la **Tabla 11** se registran los componentes aislados e identificados por GC – MS, con base en los criterios cromatográficos y espectroscópicos, junto con sus índices de retención (apolar y polar), cantidades relativas y concentraciones que se determinaron por el método del estándar interno.

Según los parámetros de integración aplicados, el umbral de integración, $Thshd = 16$, y el área de rechazo del pico en la base = 1, se identificaron 34 componentes correspondientes al 94,4 % del total del aceite.

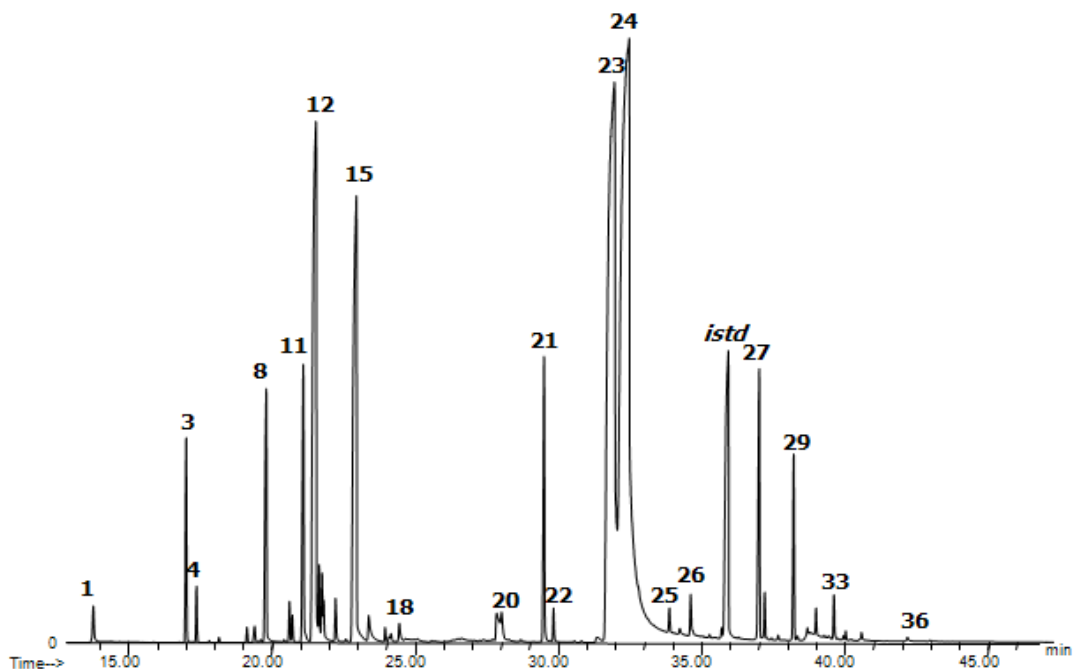
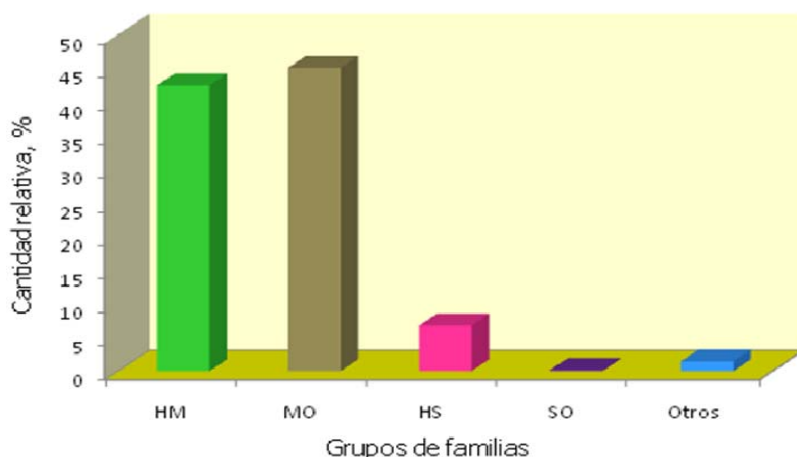


Figura 20. Perfil cromatográfico del AE de *L. organoides* H.B.K. (quimiotipo *p* – cimeno) obtenido por MWHD. Columna DB – 5 MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los componentes se encuentra reportada en la Tabla 11.

Los compuestos mayoritarios fueron timol (30,48 %), *p*-cimeno (13,05 %), γ -terpineno (9,81 %), β -pineno (5,24 %) y timil metil éter (3,42 %). El AE de *L. organoides* (atípica) mostró un alto contenido de monoterpenos oxigenados (45,96 %) y de hidrocarburos monoterpénicos (42,32 %) y contenidos bajos de hidrocarburos sesquiterpénicos (6,04 %) y sesquiterpenos oxigenados (0,18 %) (ver **Gráfica 7**).



Gráfica 7. Distribución de los grupos de familias encontrados en el AE de *L. origanoides* (quimiotipo *p* – cimeno) extraído por MWHD.

Tabla 11. Composición química, cantidad relativa (%) y concentración (ppm) de los componentes en el AE *L. origanoides* H.B.K. (quimiotipo *p* – cimeno) aislado por MWHD.

| Nº pico | I _k | | Nombre del Compuesto | Cantidad Relativa % | Concentración (ppm) |
|---------|----------------|--------|-------------------------------|---------------------|---------------------|
| | DB-5 | DB-WAX | | | |
| 1 | 859 | 1289 | <i>cis</i> -3-Hexen-1-ol | 0,77 | 116,72 |
| 2 | 930 | 1038 | α -Tujeno | 0,02 | 4,21 |
| 3 | 939 | 1205 | α -Pineno | 2,08 | 369,34 |
| 4 | 960 | - | Tuja-2,4-(10)-dieno | 0,93 | 138,26 |
| 5 | 954 | 1061 | Canfeno | 0,17 | 22,91 |
| 6 | 975 | 1115 | Sabineno | 0,14 | 21,84 |
| 7 | 979 | 1283 | 1-Octen-3-ol | 0,5 | 69,02 |
| 8 | 979 | 1205 | β -Pineno | 5,24 | 713,64 |
| 9 | 1011 | 1178 | α -Felandreno | 0,58 | 76,77 |
| 10 | 1013 | 1147 | δ -3-Careno | 0,4 | 67,09 |
| 11 | 1022 | 1178 | α -Terpineno | 2,64 | 527,46 |
| 12 | 1032 | 1272 | <i>p</i> -Cimeno | 13,05 | 1547,88 |
| 13 | 1029 | 1200 | Limoneno | 1,07 | 140,82 |
| 14 | 1037 | 1238 | β - <i>cis</i> -Ocimeno | 1,44 | 202,74 |
| 15 | 1066 | 1248 | γ -Terpineno | 9,81 | 1374,05 |

| | | | | | |
|----|------|------|--------------------------------------|-------|---------|
| 16 | 1070 | - | <i>cis</i> -Hidrato de sabineno | 0,47 | 90,15 |
| 17 | 1088 | 1287 | Terpinoleno | 0,30 | 43,25 |
| 18 | 1091 | 1338 | <i>p</i> -Cimeno | 0,45 | 50,15 |
| 19 | 1096 | 1547 | Linalool | 0,68 | 92,27 |
| 20 | 1132 | 1392 | <i>allo</i> -Ocimeno | 0,04 | 4,28 |
| 21 | 1177 | 1601 | Terpinen-4-ol | 1,36 | 295,26 |
| 22 | 1171 | - | Umbellona | 0,92 | 125,44 |
| 23 | 1235 | 1597 | Timil metil éter | 5,42 | 479,47 |
| 24 | 1290 | 2187 | Timol | 30,48 | 4100,07 |
| 25 | 1299 | 2219 | Carvacrol | 2,11 | 435,01 |
| 26 | 1352 | 1856 | Acetato de timilo | 1,52 | 213,75 |
| 27 | 1431 | 1611 | <i>trans</i> - β -Cariofileno | 3,41 | 454,50 |
| 28 | 1434 | 1594 | <i>trans</i> - α -Bergamoteno | 1,7 | 98,44 |
| 29 | 1431 | 1611 | α -Cariofileno | 1,08 | 245,02 |
| 30 | 1434 | 1594 | β -Bisaboleno | 0,3 | 51,17 |
| 31 | 1512 | 1763 | α -Aleskeno | 0,07 | 12,09 |
| 32 | 1484 | 1691 | α -Amorfenol | 0,08 | 11,33 |
| 33 | 1460 | 1661 | δ -Cadineno | 0,2 | 24,26 |
| 34 | 1583 | 2001 | Óxido de cariofileno | 0,2 | 25,36 |
| | | | NI | 5,44 | |

Continuación **Tabla 11**.

Con lo reportado en la tabla de composición química de los metabolitos secundarios volátiles del AE. *L. origanoides*, quimiotipo *p* – cimeno, es evidente la similitud con el otro quimiotipo, carvacrol. Una de las diferencias está en los componentes mayoritarios donde difieren las cantidades en que se encuentran; para el quimiotipo carvacrol, carvacrol y timol son los componentes mayoritarios y en el quimiotipo *p* – cimeno, los componentes mayoritarios son el timol y el *p*-cimeno. Aunque el compuesto carvacrol se encuentra también en este aceite, su contenido no es significativo. Mientras que, los componentes *p*-cimeno, γ -terpineno y α -terpineno se encuentran en ambos aceites en casi la misma proporción. La composición encontrada para este aceite, está de acuerdo con lo reportado en la literatura [43].

A continuación se expondrá el análisis composicional de cada una de las plantas bajo estudio por la técnica Destilación – Extracción con Solvente, SDE.

3.8 EXTRACTO SDE DE LAS HOJAS DE *LIPPIA ALBA* (QUIMIOTIPO CARVONA).

En la **Figura 21** se presenta el perfil cromatográfico para el extracto de *L. alba* (carvona), obtenido según las condiciones operacionales descritas en el **Numeral 2.2.2.2** del desarrollo experimental, así como también se reportan en la **Tabla 12** los componentes aislados e identificados por GC – MS, según el orden de elución en la columna DB – 5 MS (cantidad relativa, ≥ 0.1 %), junto con sus índices de retención, cantidades relativas y concentraciones que se determinaron por el método del estándar interno, de acuerdo con el **Numeral 2.2.4** del desarrollo experimental.

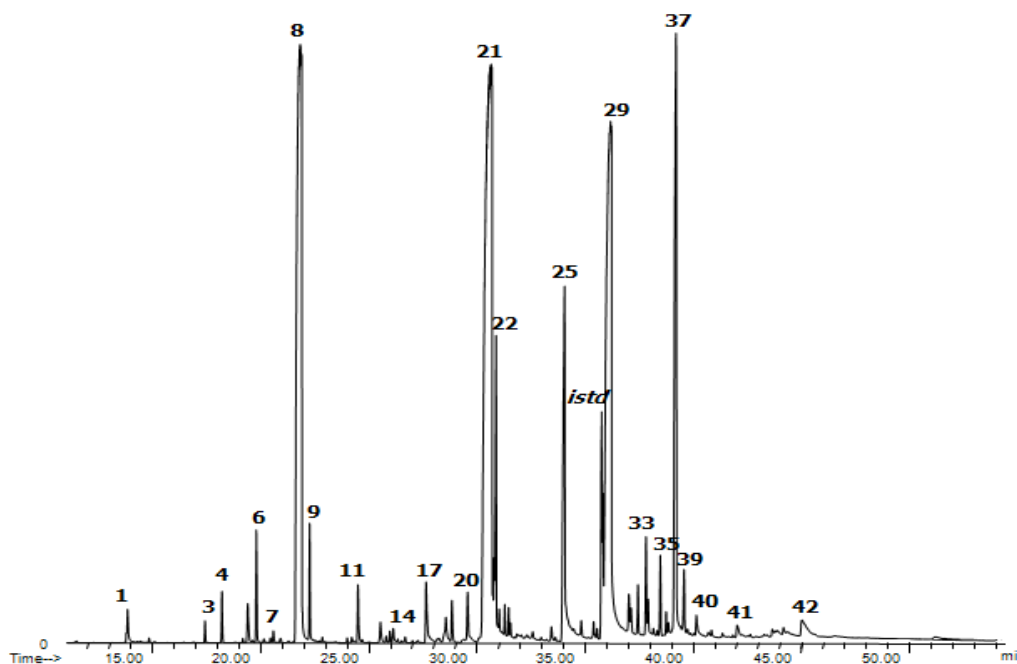


Figura 21. Perfil cromatográfico del extracto de *L. alba* (quimiotipo carvona) obtenido por SDE. Columna DB – 5 MS (60m). Detector electivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los componentes se encuentra reportada en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Composición química, cantidad relativa (%) y concentración (ppm) del extracto SDE de *L. alba* (quimiotipo carvona).

| Nº pico | I _k | | Nombre del Compuesto | Cantidad Relativa % | Concentración (ppm) |
|---------|----------------|--------|---|---------------------|---------------------|
| | DB-5 | DB-WAX | | | |
| 1 | 855 | | <i>trans</i> -2-Hexenal | 0,06 | 3,12 |
| 2 | 859 | 1289 | <i>cis</i> -3-Hexen-1-ol | 0,38 | 21,71 |
| 3 | 939 | 1161 | α -Pineno | 0,17 | 9,69 |
| 4 | 954 | 1061 | Canfeno | 0,42 | 23,98 |
| 5 | 979 | 1205 | β -Pineno | 0,48 | 27,05 |
| 6 | 990 | 1156 | β -Mirceno | 0,96 | 54,04 |
| 7 | 1110 | - | <i>p</i> -1,3,8-Mentatrieno | 0,12 | 6,86 |
| 8 | 1029 | 1200 | Limoneno | 25,33 | 1430,97 |
| 9 | 1050 | 1251 | <i>trans</i> - β -Ocimeno | 0,89 | 50,22 |
| 10 | 1066 | 1248 | γ -Terpinene | 0,05 | 2,55 |
| 11 | 1088 | 1287 | Terpinoleno | 0,04 | 2,06 |
| 12 | 1091 | - | <i>p</i> -Ocimeneno | 0,05 | 2,75 |
| 13 | 1096 | 1547 | Linalool | 0,58 | 32,71 |
| 14 | 1122 | 1634 | <i>trans</i> - <i>p</i> -2,8-Mentadien-1-ol | 0,17 | 5,23 |
| 15 | 1136 | 1451 | <i>cis</i> -Óxido de limoneno | 0,09 | 9,77 |
| 16 | 1146 | 1518 | Alcanfor | 0,07 | 4,09 |
| 17 | 1169 | 1698 | Borneol | 0,72 | 40,58 |
| 18 | 1192 | 1618 | <i>cis</i> -dihidrocarvona | 0,52 | 29,11 |
| 19 | 1200 | 1639 | <i>trans</i> -dihidrocarvona | 0,46 | 26,06 |
| 20 | 1216 | 1842 | <i>trans</i> -Carveol | 0,62 | 34,99 |
| 21 | 1243 | 1715 | Carvona | 36,50 | 1763,09 |
| 22 | 1252 | 1739 | Piperitona | 2,55 | 144,12 |
| 23 | 1276 | 1805 | <i>trans</i> -Óxido de carvona | 0,22 | 12,55 |
| 24 | 1271 | - | Perilla aldehído | 0,10 | 5,89 |
| 25 | 1343 | 1945 | Piperitenona | 6,61 | 373,42 |
| 26 | 1376 | 1519 | α -Copaeno | 0,17 | 9,63 |
| 27 | 1388 | 1546 | β -Bourboneno | 2,22 | 125,42 |
| 28 | 1388 | 1560 | β -Cubebeno | 0,09 | 5,16 |
| 29 | 1390 | 1598 | β -Elemeno | 1,28 | 72,27 |
| 30 | 1420 | 1491 | β -Ylangeno | 0,55 | 31,06 |
| 31 | 1439 | 1610 | <i>trans</i> - β -Cariofileno | 0,29 | 16,64 |
| 32 | 1432 | 1626 | β -Copaeno | 0,47 | 26,51 |
| 33 | 1456 | 1669 | <i>trans</i> - β -Farneseno | 0,91 | 51,39 |

| | | | | | |
|----|------|------|---|-------|--------|
| 34 | 1460 | 1661 | <i>allo</i> -Aromadendreno | 0,69 | 39,16 |
| 35 | 1485 | 1654 | Germacreno D | 0,20 | 11,09 |
| 36 | 1484 | 1701 | γ -Muuroleno | 0,16 | 9,31 |
| 37 | 1487 | 1727 | <i>epi</i> - Biciclosesquifelandreno | 10,68 | 603,33 |
| 38 | 1500 | 1705 | Biciclogermacreno | 0,68 | 38,67 |
| 39 | 1523 | 1761 | δ -Cadineno | 0,30 | 17,15 |
| | | | NI | 3,15 | |

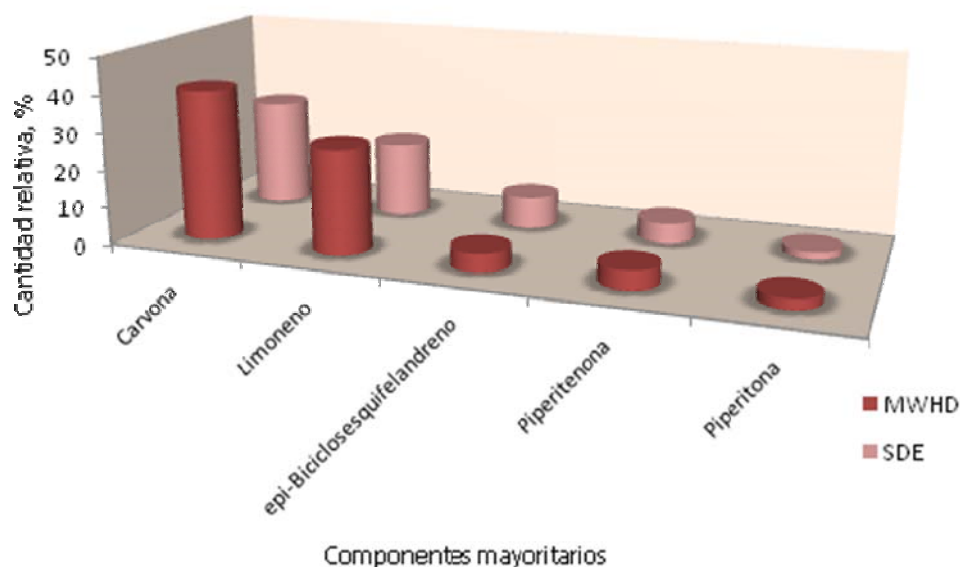
Continuación de la **Tabla 12**.

Según los parámetros de integración aplicados (umbral de integración, *Thshd* = 16, y área de rechazo del pico en la base = 1) y usando los índices de Kòvats, tanto en columna apolar como polar y los espectros de masas (EI, 70 eV), se logró identificar 39 componentes, que constituyen el 95,12 % de la composición química del AE, siendo sus principales componentes mayoritarios: carvona (36,50%), limoneno (25,33%), *epi* – biciclosesquifelandreno (10,68 %), piperitenona (6,61 %) y piperitona (2,55 %).

De acuerdo con lo anterior, se identificaron principalmente metabolitos característicos de tres grupos de compuestos: hidrocarburos monoterpénicos (27,52 %), monoterpenos oxigenados (43,85 %) e hidrocarburos sesquiterpénicos, (19,77 %); por esta técnica de extracción no se logró identificar sesquiterpenos oxigenados.

Al comparar los resultados de composición química para *L. alba* (quimiotipo carvona) obtenidos por MWHD y SDE (ver **Gráfica 8**), se nota que los componentes mayoritarios son los mismos pero cambian sus proporciones, siendo más bajo el contenido de cada uno de ellos por SDE, y también se observa que el orden se vio alterado, debido a que el único componente que en vez de disminuir su concentración aumentó, fue el *epi* – biciclosesquifelandreno.

También se observa que la identificación para SDE es relativamente diferente a la hecha para MWHD. Por otro lado, hay que resaltar que las dos técnicas extractivas se complementan y se puede dar una mejor aproximación de la composición química total de los metabolitos secundarios volátiles de la planta.



Gráfica 8. Distribución de los principales compuestos mayoritarios encontrados en el AE y extracto SDE de *L. alba* (quimiotipo carvona).

3.9 EXTRACTO SDE DE LAS HOJAS DE *LIPPIA ALBA* (QUIMIOTIPO CITRAL).

El perfil cromatográfico típico para el extracto obtenido de hojas *L. alba* (quimiotipo citral) se ilustra en la **Figura 22** y el reporte de la composición química, junto con los índices de Kováts, la concentración (ppm) determinada por el método del estándar interno, y la cantidad relativa se registran en la **Tabla 13**.

Con los parámetros de integración aplicados (umbral de integración, *Thshd* = 16, y área de rechazo del pico en la base = 1) y usando los índices de Kòvats (columna apolar y polar), y los espectros de masas (EI, 70 eV), se identificaron 33 componentes, que constituyen el 91,66 % de la composición química del AE.

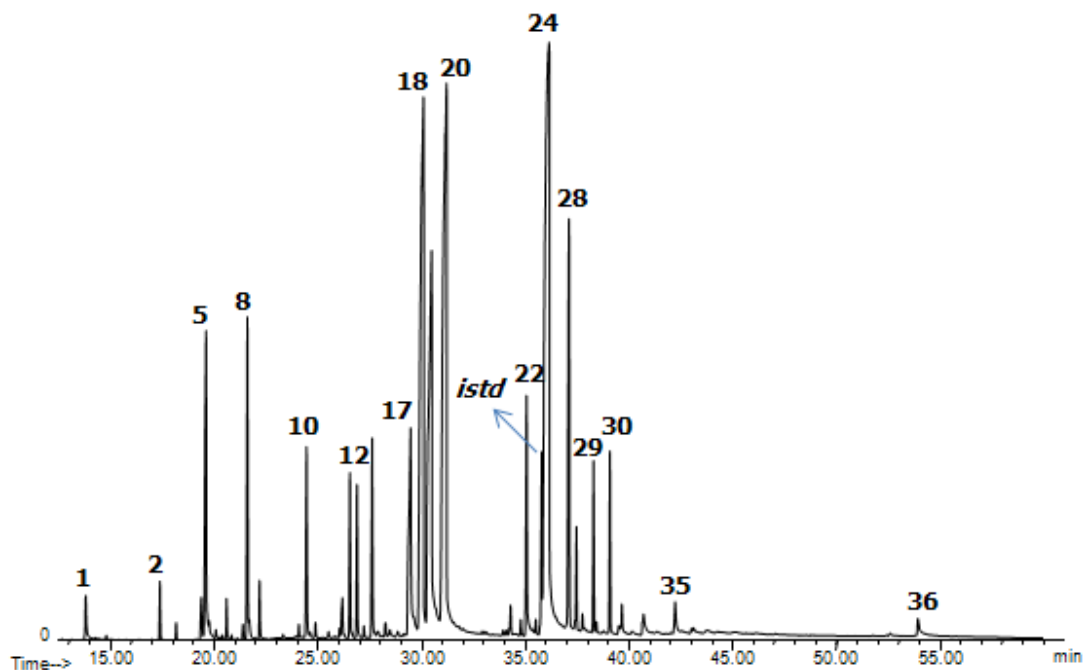
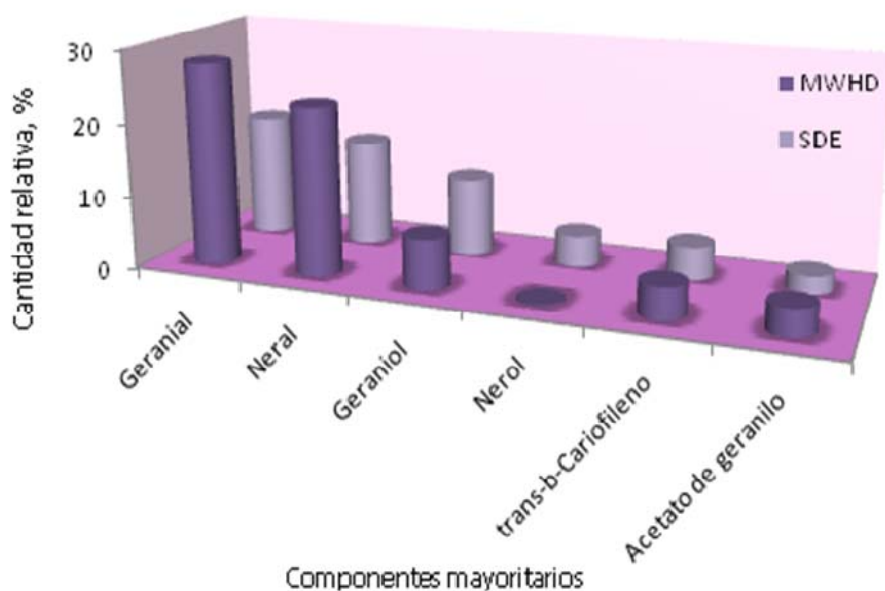


Figura 22. Perfil cromatográfico del extracto de *L. alba* (quimiotipo citral) obtenido por SDE. Columna DB – 5 MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los componentes se encuentra reportada en la Tabla 13.

Por medio de esta técnica extractiva se ratifica el contenido composicional del aceite, ya que se identificaron principalmente metabolitos característicos de monoterpenos oxigenados (58,25%) como geranial (21,68%), neral (18,74%), geraniol (13,71%) y nerol (5,49%) y en menor proporción se encuentran los hidrocarburos monoterpénicos (10,52%), como el limoneno (3,54%) los hidrocarburos sesquiterpénicos (9,73 %) como el *trans*- β -cariofileno (5,80%),

siendo el más representativo de este grupo; y están también los sesquiterpenos oxigenados (0,44 %).

En la **Gráfica 9** se puede observar la comparación de los componentes mayoritarios por ambas técnicas de extracción. Por SDE la composición varió con respecto a la concentración y también en un componente mayoritario. También la identificación de los compuestos hallados por SDE varía ligeramente con respecto a la encontrada por MWHD.



Gráfica 9. Distribución de los principales compuestos mayoritarios encontrados en el AE y extracto SDE de *L. alba* (quimiotipo citral).

Tabla 13. Composición química, cantidad relativa (%) y concentración (ppm) del extracto SDE de *L. alba* (quimiotipo citral).

| Nº pico | I _k | | Nombre del Compuesto | Cantidad Relativa % | Concentración (ppm) |
|---------|----------------|--------|-------------------------------------|---------------------|---------------------|
| | DB-5 | DB-WAX | | | |
| 1 | 859 | 1289 | <i>cis</i> -3-Hexen-1-ol | 0,66 | 100,39 |
| 2 | 939 | 1161 | α -Pinoeno | 0,52 | 78,26 |
| 3 | 954 | 1061 | Canfeno | 0,16 | 24,01 |
| 4 | 979 | 1283 | 1-Octen-3-ol | 0,66 | 99,63 |
| 5 | 985 | 1338 | 6-Metil-5-Hepten-2-ona | 4,93 | 749,00 |
| 6 | 1011 | 1178 | α -Felandreno | 0,38 | 58,28 |
| 7 | 1026 | 1272 | <i>o</i> -Cimeno | 0,17 | 26,08 |
| 8 | 1029 | 1200 | Limoneno | 3,54 | 537,96 |
| 9 | 1030 | - | Silvestreno | 0,31 | 47,49 |
| 10 | 1050 | 1251 | <i>trans</i> - β -Ocimeno | 0,57 | 86,56 |
| 11 | 1092 | 1303 | Rosafurano | 0,11 | 5,83 |
| 12 | 1096 | 1548 | Linalool | 2,20 | 334,37 |
| 13 | 1154 | 1381 | Citronelal | 1,64 | 249,10 |
| 14 | 1144 | 1548 | <i>trans</i> -Verbenol | 1,59 | 242,02 |
| 15 | 1177 | 1509 | Epóxido de Rosafurano | 0,12 | 17,60 |
| 16 | 1140 | - | 4(8)- <i>p</i> -Menteno | 0,05 | 10,15 |
| 17 | 1229 | 1805 | Nerol | 5,49 | 833,54 |
| 18 | 1238 | 1692 | Neral | 18,74 | 2844,75 |
| 19 | 1252 | 1852 | Geraniol | 13,71 | 2081,18 |
| 20 | 1267 | 1744 | Geranial | 21,68 | 3292,14 |
| 21 | 1358 | 1732 | Acetato de nerilo | 0,28 | 42,75 |
| 22 | 1381 | 1761 | Acetato de geranilo | 3,06 | 464,85 |
| 23 | 1390 | 1598 | β -Elemeno | 1,98 | 300,25 |
| 24 | 1431 | 1611 | <i>trans</i> - β -Cariofileno | 5,80 | 881,19 |
| 25 | 1433 | 1593 | β -Gurjuneno | 0,08 | 11,87 |
| 26 | 1439 | 1601 | α -Guaiano | 0,92 | 139,23 |
| 27 | 1442 | 1636 | <i>cis</i> - β -Farneseno | 0,15 | 22,41 |
| 28 | 1454 | 1686 | α -Humuleno | 1,61 | 244,72 |
| 29 | 1460 | 1661 | <i>allo</i> -Aromadendreno | 0,11 | 16,08 |
| 30 | 1485 | 1654 | Germacreno D | 1,73 | 262,26 |
| 31 | 1490 | 1756 | β -Selineno | 0,12 | 17,75 |
| 32 | 1509 | 1730 | α -Bulneseno | 0,38 | 58,01 |
| 33 | 1583 | 2001 | Óxido de cariofileno | 0,56 | 85,62 |
| | | | NI | 5,99 | |

3.10 EXTRACTO SDE DE LAS HOJAS DE *LIPPIA CITRIODORA* H.B.K.

En la **Figura 23** se presenta el perfil cromatográfico para el extracto de *L. citriodora* H.B.K., y se reportan en la **Tabla 12** los componentes aislados e identificados por GC – MS, según el orden de elución en la columna DB – 5 MS (cantidad relativa, ≥ 0.1 %), junto con sus índices de retención, cantidades relativas y concentraciones que se determinaron por el método del estándar interno.

Usando los índices de Kòvats (columna apolar y polar) y los espectros de masas (EI, 70 eV), y de acuerdo con los parámetros de integración aplicados (umbral de integración, $Thshd = 16$, y área de rechazo del pico en la base = 1) se identificaron 39 componentes, que constituyen el 97,5 % de la composición química del AE, siendo sus principales componentes mayoritarios: geranial (22,37%), neral (19,20%), limoneno (8,37%), eucaliptol (5,67%) y geraniol (4,76%).

Se encontraron metabolitos característicos de cuatro grupos de compuestos: monoterpenos oxigenados (56,01 %), hidrocarburos sesquiterpénicos, (13,64 %), hidrocarburos monoterpénicos (12,97 %) y sesquiterpenos oxigenados (4,15).

En la **Gráfica 10** se comparan los resultados de composición química para fracciones de *L. citriodora* H.B.K., obtenidas por MWHD y SDE; los componentes mayoritarios cambian en un solo componente, pero cambian sus proporciones, siendo más bajo el contenido de cada uno de ellos por DES.

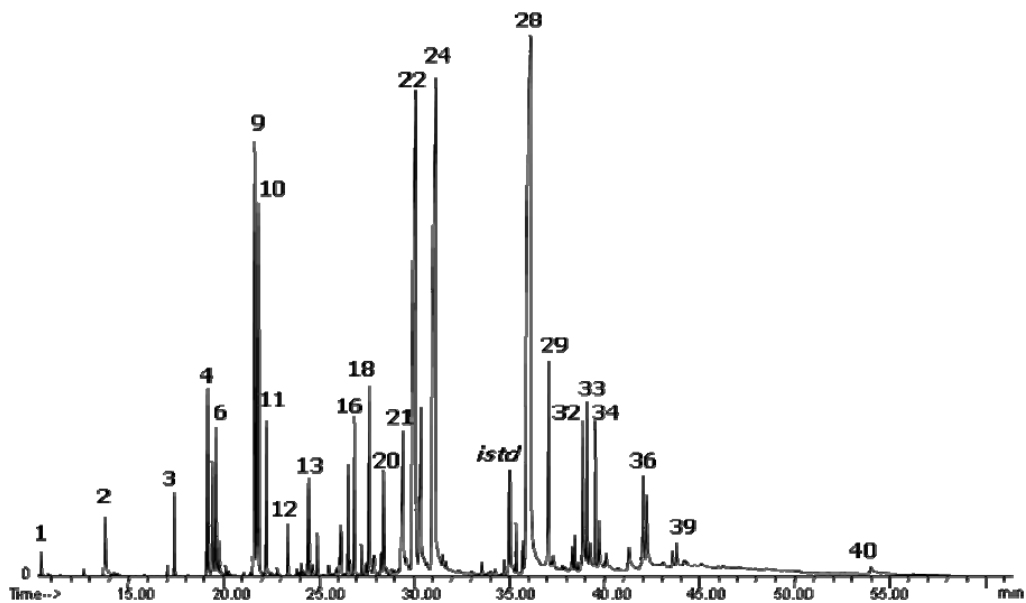


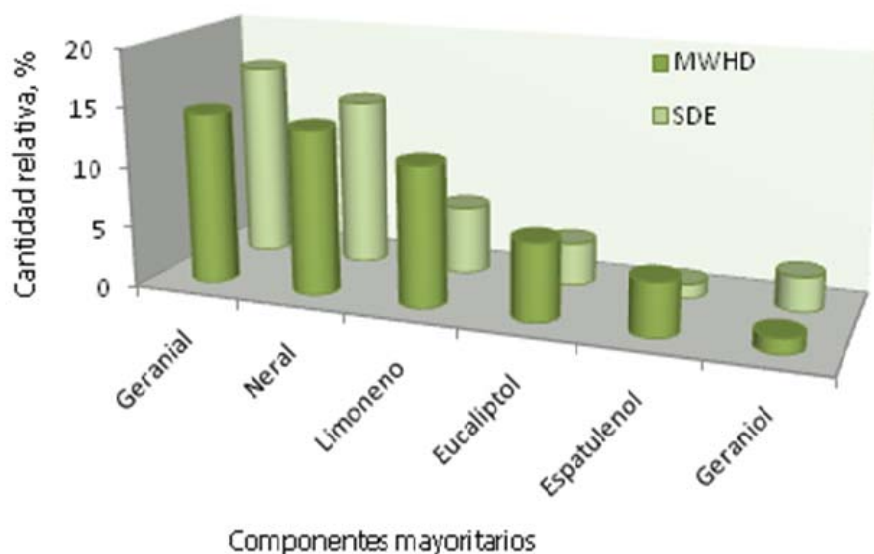
Figura 23. Perfil cromatográfico del extracto de *L. citriodora* H.B.K. obtenido por SDE. Columna DB – 5 MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los componentes se encuentra reportada en la Tabla 14.

Tabla 14. Composición química, cantidad relativa (%) y concentración (ppm) del extracto SDE de *L. citriodora* H.B.K.

| Nº pico | I _k | | Nombre del Compuesto | Cantidad Relativa % | Concentración (ppm) |
|---------|----------------|--------|--------------------------|---------------------|---------------------|
| | DB-5 | DB-WAX | | | |
| 1 | 855 | - | 2- <i>cis</i> -Hexenal | 0,08 | 3,93 |
| 2 | 859 | 1289 | <i>cis</i> -3-Hexen-1-ol | 0,86 | 44,18 |
| 3 | 930 | 1038 | α -Tujeno | 0,10 | 5,24 |
| 4 | 939 | 1161 | α -Pino | 0,84 | 42,90 |
| 5 | 979 | 1283 | 1-Octen-3-ol | 1,70 | 87,23 |
| 6 | 986 | 1338 | 6-Metil-5-hepten-2-ona | 1,79 | 91,55 |
| 7 | 990 | 1156 | β -Mirceno | 0,33 | 16,78 |
| 8 | 991 | - | 3-Octanol | 0,10 | 5,19 |
| 9 | 1029 | 1200 | Limoneno | 8,37 | 378,00 |

| | | | | | |
|----|------|------|-------------------------------------|-------|---------|
| 10 | 1031 | 1228 | Eucaliptol | 5,67 | 239,63 |
| 11 | 1037 | 1238 | <i>cis</i> - β -Ocimeno | 1,61 | 82,59 |
| 12 | 1066 | 1248 | γ -Terpinene | 0,08 | 4,07 |
| 13 | 1070 | - | <i>cis</i> -Hidrato de sabineno | 0,60 | 30,83 |
| 14 | 1096 | 1548 | Linalool | 1,15 | 59,10 |
| 15 | 1110 | 1451 | <i>cis</i> -Óxido de limoneno | 0,06 | 3,04 |
| 16 | 1140 | 1515 | Fotocitral A | 0,84 | 42,91 |
| 17 | 1177 | 1509 | Epóxido de rosefurano | 0,32 | 16,50 |
| 18 | 1180 | - | <i>trans</i> -Isocitral | 2,20 | 112,83 |
| 19 | 1177 | 1601 | Terpinen-4-ol | 0,22 | 11,47 |
| 20 | 1186 | 1731 | α -Terpineol | 1,53 | 78,43 |
| 21 | 1229 | 1805 | Nerol | 3,32 | 170,39 |
| 22 | 1238 | 1692 | Neral | 19,20 | 933,52 |
| 23 | 1249 | 1852 | Geraniol | 4,76 | 192,82 |
| 24 | 1264 | 1744 | Geranial | 22,37 | 1095,98 |
| 25 | 1381 | 1761 | Acetato de geranilo | 1,37 | 70,21 |
| 26 | 1376 | 1519 | α -Copaeno | 0,56 | 28,48 |
| 27 | 1388 | 1546 | β -Bourboneno | 0,38 | 19,27 |
| 28 | 1431 | 1611 | <i>trans</i> - β -Cariofileno | 3,07 | 157,32 |
| 29 | 1420 | 1633 | β -Cedreno | 0,09 | 4,66 |
| 30 | 1460 | 1661 | <i>allo</i> -Aromadendreno | 0,37 | 19,18 |
| 31 | 1482 | - | γ -Curcumeno | 0,09 | 4,80 |
| 32 | 1480 | 1779 | <i>ar</i> -Curcumeno | 2,20 | 113,03 |
| 33 | 1485 | 1654 | Germacreno D | 1,92 | 98,20 |
| 34 | 1500 | 1705 | Biciclogermacreno | 1,65 | 84,38 |
| 35 | 1515 | 1776 | β -Curcumeno | 0,87 | 44,71 |
| 36 | 1563 | 2043 | <i>trans</i> -Nerolidol | 0,70 | 35,85 |
| 37 | 1578 | 2153 | Espatulenol | 1,56 | 79,91 |
| 38 | 1583 | 2001 | Óxido de cariofileno | 1,43 | 73,27 |
| 39 | 1654 | 2224 | α -Cadinol | 0,40 | 20,66 |
| | | | NI | 5,24 | |

Continuación **Tabla 14.**



Gráfica 10. Distribución de los principales compuestos mayoritarios encontrados en el AE y extracto SDE de *L. citriodora* H.B.K.

La identificación del extracto SDE es prácticamente la misma que la del aceite; sólo difieren en la concentración de los componentes y es relativo, para algunos compuestos es menor y para otros mayor su proporción.

3.11 EXTRACTO SDE DE LAS HOJAS DE *LIPPIA DULCIS* Trev.

El perfil cromatográfico típico de los metabolitos secundarios volátiles aislados de *L. dulcis* Trev., se ilustra en la **Figura 24** y la identificación de los analitos, realizada con base en criterios cromatográfico (índices de retención en columna apolar y polar), y espectroscópico (espectros de masas, El 70 eV) se registra en la **Tabla 15**, junto con las cantidades relativas (%) y concentraciones (ppm), determinadas por el método del estándar interno. Se identificaron 34

componentes que constituyen el 92 % del aceite, bajo los parámetros de integración aplicados, el umbral de integración, $Thshd = 17$ y el área de rechazo del pico en la base = 1.

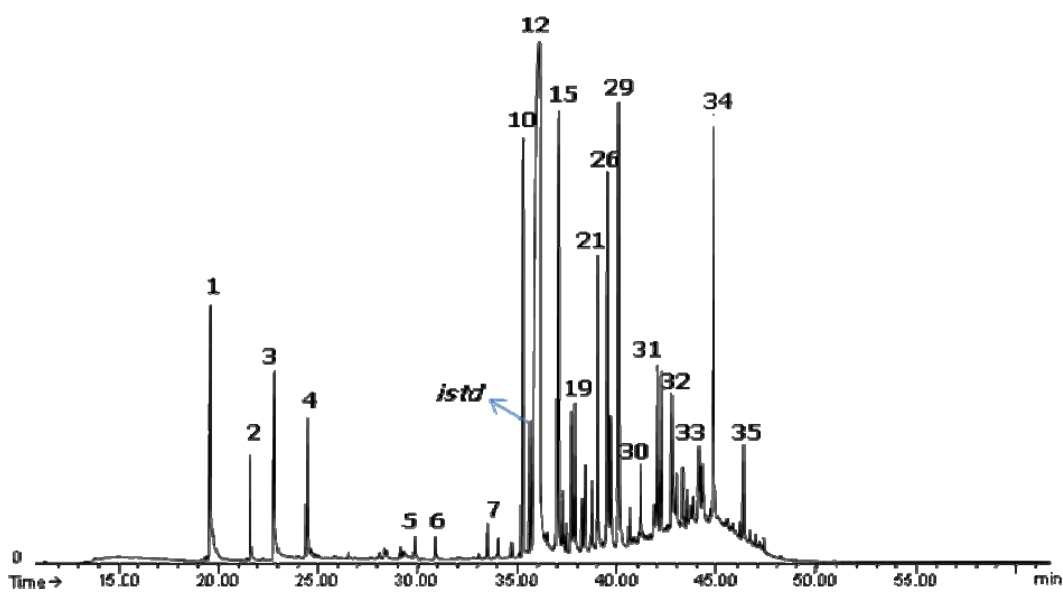


Figura 24. Perfil cromatográfico del extracto de *L. dulcis* Trev. obtenido por SDE. Columna DB – 5 MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los componentes se encuentra reportada en la Tabla 15.

El extracto contiene 56,77 % de hidrocarburos sesquiterpénicos, tal como se había elucidado para el AE; de sesquiterpenos oxigenados contiene 15,32 %, en menor proporción se encuentran los hidrocarburos monoterpénicos, que constituyen el 5,45 % y 1,06 % de sus análogos oxigenados.

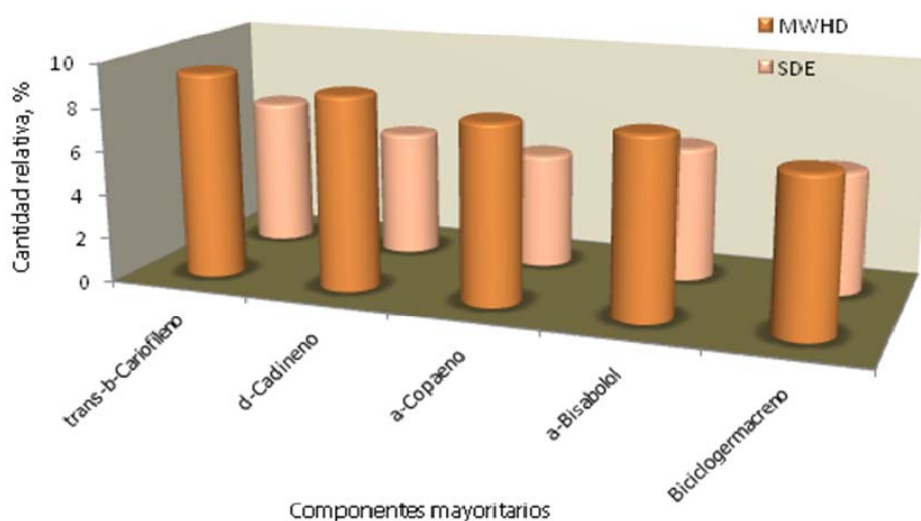
De acuerdo con la tabla composicional para el extracto de *L. dulcis* Trev., los componentes mayoritarios obtenidos por DES son los mismos que los obtenidos por MWHD, sólo que cambiaron el orden de éstos y sus concentraciones.

Tabla 15. Composición química, cantidad relativa (%) y concentración (ppm) del extracto SDE de *L. dulcis* Trev.

| Nº pico | I _k | | Nombre del Compuesto | Cantidad Relativa % | Concentración (ppm) |
|---------|----------------|--------|------------------------------|---------------------|---------------------|
| | DB-5 | DB-WAX | | | |
| 1 | 986 | 1338 | 6-Metil-5-hepten-2-ona | 6,87 | 281,17 |
| 2 | 1029 | 1200 | Limoneno | 2,46 | 59,54 |
| 3 | 1039 | 1613 | 3-Metil-2-ciclohexen-1-ona | 6,22 | 213,57 |
| 4 | 1096 | 1548 | Linalool | 3,28 | 93,21 |
| 5 | 1154 | 1381 | Citronelal | 0,08 | 3,24 |
| 6 | 1196 | | p-alil-Anisol | 0,12 | 4,93 |
| 7 | 1226 | 1575 | Citronelol | 0,10 | 3,89 |
| 8 | 1238 | 1692 | Neral | 0,41 | 16,66 |
| 9 | 1264 | 1744 | Geranial | 0,37 | 15,33 |
| 10 | 1338 | 1487 | δ-Elemene | 1,47 | 19,17 |
| 11 | 1348 | 1481 | α-Cubebeno | 0,28 | 11,56 |
| 12 | 1376 | 1519 | α-Copaeno | 8,19 | 294,22 |
| 13 | 1388 | 1546 | β-Bourboneno | 1,84 | 75,48 |
| 14 | 1409 | 1541 | α-Gurjuneno | 0,19 | 7,95 |
| 15 | 1431 | 1611 | <i>trans</i> -β-Cariofileno | 10,31 | 381,01 |
| 16 | 1434 | 1594 | <i>trans</i> -α-Bergamoteno | 0,84 | 34,38 |
| 17 | 1432 | | β-Copaeno | 0,27 | 10,92 |
| 18 | 1459 | 1652 | Sesquisabineno | 0,36 | 14,55 |
| 19 | 1442 | 1636 | <i>cis</i> -β-Farneseno | 1,89 | 77,33 |
| 20 | 1457 | 1669 | <i>trans</i> -β-Farneseno | 0,21 | 8,59 |
| 21 | 1522 | 1676 | β-Sesquifelandreno | 2,03 | 82,89 |
| 22 | 1454 | 1686 | α-Humuleno | 0,67 | 27,23 |
| 23 | 1471 | | Dhidrosesquicineol | 0,30 | 12,37 |
| 24 | 1460 | 1661 | <i>allo</i> -Aromadendreno | 2,23 | 50,32 |
| 25 | 1484 | 1691 | α-Amorphene | 0,95 | 38,80 |
| 26 | 1485 | 1654 | Germacreno D | 5,54 | 185,62 |
| 27 | 1500 | 1705 | Biciclogermacreno | 8,66 | 313,30 |
| 28 | 1505 | 1737 | β-Bisaboleno | 2,32 | 94,73 |
| 29 | 1523 | 1761 | δ-Cadinene | 8,87 | 322,00 |
| 30 | 1563 | 2043 | <i>trans</i> -Nerolidol | 1,44 | 58,85 |
| 31 | 1578 | 2153 | Espatulenol | 3,00 | 122,68 |
| 32 | 1583 | 2001 | Óxido de cariofileno | 3,11 | 127,36 |
| 33 | 1631 | - | Muurola-4,10(14)-dien-1-β-ol | 0,96 | 39,45 |

| | | | | | |
|----|------|------|---------------------|------|--------|
| 34 | 1685 | 2022 | α -Bisabolol | 9,38 | 342,85 |
| | | | NI | 4,78 | |

Éstos son el *trans*- β -cariofileno (10,31%), α -bisabolol (69,38%), δ -cadineno (8,87%), biciclogermacreno (8,66%) y α -copaeno (8,19%). Como se ha observado para las otras plantas estudiadas, por medio de la técnica SDE se pueden encontrar otros compuestos que por MWHD son en menor proporción. De la misma forma, se observa que la tablas composicionales son muy similares; se confirma que la planta es altamente rica es sesquiterpenos no oxigenados y en menor proporción sesquiterpenos oxigenados, monoterpenos oxigenados e hidrocarburos monoterpénicos. Esto se ilustra mejor en la **Gráfica 11**.



Gráfica 11. Distribución de los principales compuestos mayoritarios encontrados en el AE y extracto SDE de *L. dulcis* Trev.

Por otro lado, su compuesto característico, la hernandulcina, tampoco pudo ser detectada luego de aplicar esta técnica de extracción, debido a que es un

compuesto termolábil, pero sus componentes de degradación si fueron identificados: 6-metil-5-hepten-2-ona y 3-metil-2-ciclohexen-1-ona.

3.12 EXTRACTO SDE DE LAS HOJAS DE *LIPPIA MICROMERA* SCHAUER.

La **Figura 25** ilustra el perfil cromatográfico de los metabolitos secundarios volátiles del extracto de *L. micromera* Schauer. La composición química de los analitos analizados e identificados por GC – MS y los índices de retención, la cantidad relativa (%) y las concentraciones (ppm), determinadas por el método del estándar interno, se registran en la **Tabla 16**.

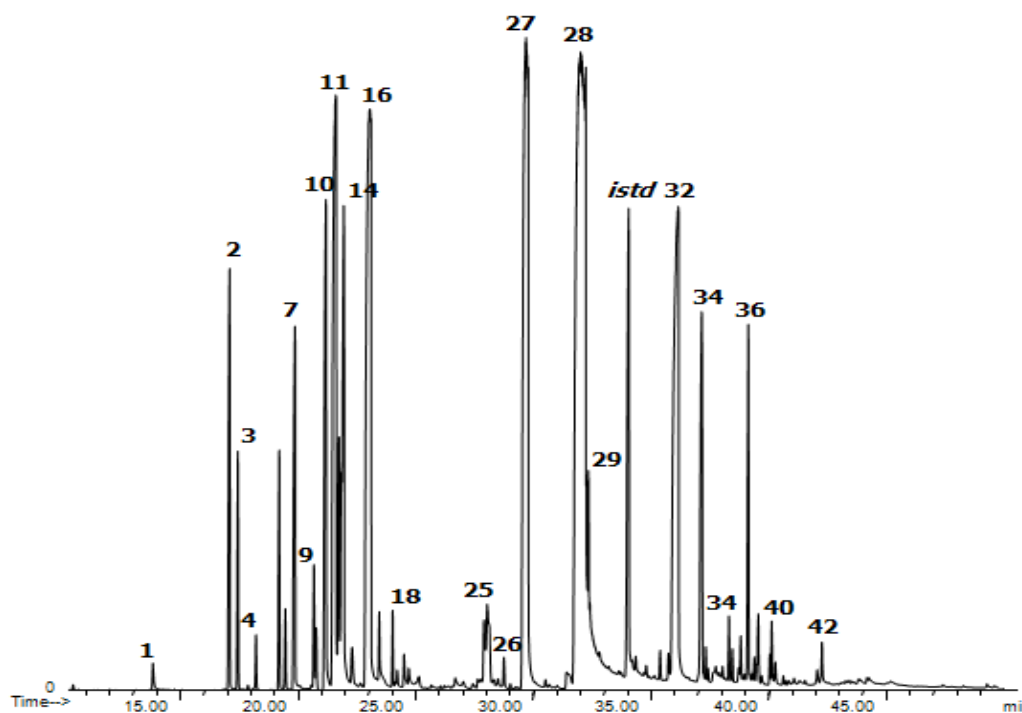


Figura 25. Perfil cromatográfico del extracto de *L. micromera* Schauer obtenido por SDE. Columna DB – 5 MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los componentes se encuentra reportada en la **Tabla 16**.

Según los parámetros de integración aplicados (umbral de integración, $Thshd = 16$, y área de rechazo del pico en la base = 1), usando los índices de Kòvats (columna apolar y polar) y los espectros de masas (EI, 70 eV), se identificaron 41 componentes que constituyen el 97,62 %, porcentaje al cual corresponden 52,63 % de monoterpenos oxigenados, 38,65 % de hidrocarburos monoterpénicos, 6,37 % de hidrocarburos sesquiterpénicos y 0,31 % de su análogos oxigenados.

Tabla 16. Composición química, cantidad relativa (%) y concentración (ppm) del extracto SDE *L. micromera* Schauer.

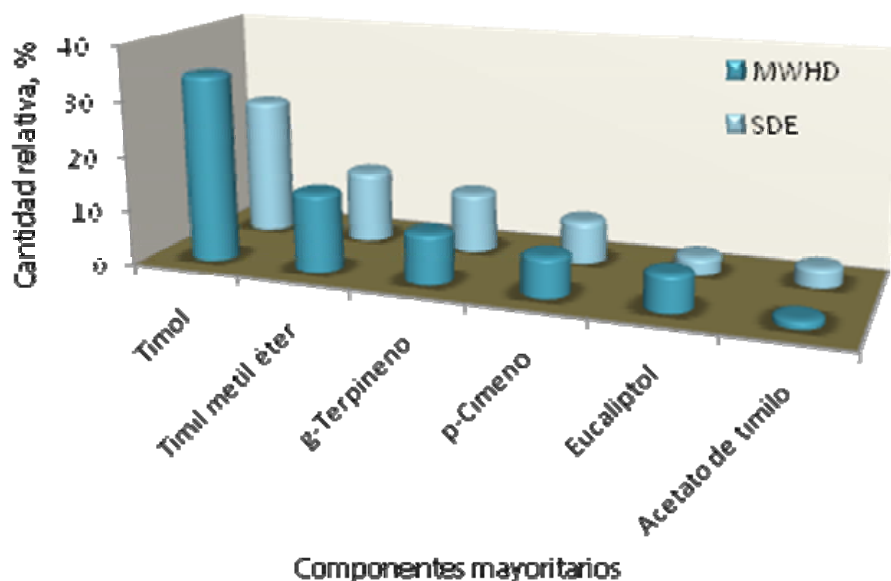
| Nº pico | I _k | | Nombre del Compuesto | Cantidad Relativa % | Concentración (ppm) |
|---------|----------------|--------|-----------------------------------|---------------------|---------------------|
| | DB-5 | DB-WAX | | | |
| 1 | 859 | 1289 | <i>cis</i> -3-Hexen-1-ol | 0,18 | 25,89 |
| 2 | 930 | 1038 | α -Tujeno | 2,69 | 393,11 |
| 3 | 939 | 1205 | α -Pineno | 1,08 | 157,64 |
| 4 | 954 | 1061 | Canfeno | 0,25 | 35,91 |
| 5 | 975 | 1115 | Sabineno | 1,21 | 177,29 |
| 6 | 979 | 1205 | β -Pineno | 0,37 | 53,94 |
| 7 | 990 | 1156 | β -Mirceno | 2,74 | 399,28 |
| 8 | 1011 | 1178 | α -Felandreno | 0,64 | 93,06 |
| 9 | 1013 | 1147 | δ -3-Careno | 0,29 | 42,94 |
| 10 | 1022 | 1178 | α -Terpineno | 4,08 | 595,94 |
| 11 | 1032 | 1272 | <i>p</i> -Cimeno | 8,67 | 1266,24 |
| 12 | 1029 | 1200 | Limoneno | 1,52 | 221,61 |
| 13 | 1037 | 1209 | β -Felandreno | 1,07 | 155,55 |
| 14 | 1031 | 1228 | Eucaliptol | 3,86 | 563,95 |
| 15 | 1037 | 1251 | <i>trans</i> - β -Ocimeno | 0,35 | 51,48 |
| 16 | 1066 | 1248 | γ -Terpineno | 12,10 | 1766,91 |
| 17 | 1070 | - | <i>cis</i> -Hidrato de sabineno | 0,59 | 86,42 |
| 18 | 1088 | 1287 | Terpinoleno | 0,31 | 45,10 |
| 19 | 1091 | 1338 | <i>p</i> -Cimeneno | 0,09 | 12,58 |
| 20 | 1096 | 1547 | Linalool | 0,21 | 30,59 |
| 21 | 1075 | 1463 | <i>trans</i> -Hidrato de sabineno | 0,19 | 28,00 |
| 22 | 1121 | 1560 | <i>cis-p</i> -Ment-2-en-1-ol | 0,03 | 4,01 |
| 23 | 1146 | 1518 | Alcanfor | 0,08 | 11,95 |

| | | | | | |
|----|------|------|--------------------------------------|-------|---------|
| 24 | 1171 | - | Umbellona | 0,04 | 5,34 |
| 25 | 1177 | 1601 | Terpinen-4-ol | 0,52 | 76,02 |
| 26 | 1186 | 1731 | α -Terpineol | 0,16 | 22,73 |
| 27 | 1235 | 1597 | Timil metil éter | 14,56 | 2126,64 |
| 28 | 1290 | 2187 | Timol | 27,78 | 4055,80 |
| 29 | 1352 | 1856 | Acetato de timilo | 4,20 | 612,20 |
| 30 | 1376 | 1519 | α -Copaeno | 0,14 | 21,04 |
| 31 | 1388 | 1546 | β -Bourboneno | 0,15 | 22,54 |
| 32 | 1431 | 1611 | <i>trans</i> - β -Cariofileno | 3,16 | 461,63 |
| 33 | 1434 | 1594 | <i>trans</i> - α -Bergamoteno | 0,15 | 22,19 |
| 34 | 1454 | 1684 | α -Cariofileno | 0,28 | 40,92 |
| 35 | 1460 | 1661 | allo-Aromadendreno | 0,14 | 20,98 |
| 36 | 1485 | 1654 | Germacreno D | 1,94 | 282,57 |
| 37 | 1500 | 1730 | α -Muuroleno | 0,47 | 68,22 |
| 38 | 1523 | 1761 | δ -Cadineno | 0,46 | 67,67 |
| 39 | 1529 | 1842 | <i>cis</i> -Calameneno | 0,13 | 19,13 |
| 40 | 1578 | 2153 | Espatulenol | 0,10 | 14,54 |
| 41 | 1583 | 2001 | Óxido de cariofileno | 0,24 | 35,60 |
| | | | NI | 2,78 | |

Continuación **Tabla 16**.

Los principales compuestos que caracterizan esta planta y por ende sus usos son: timol (27,78%), timil metil éter (14,56%), γ -terpineno (12,10%), *p*-cimeno (8,67%) y acetato de timilo (4,20%). Se observa que los componentes mayoritarios obtenidos por la técnica de extracción SDE son muy similares a los obtenidos por la técnica MWHD, cambian ligeramente, se conservan la mayoría y cambian sus proporciones (ver **Gráfica 12**).

En forma general, los componentes identificados por ambas técnicas extractivas, son similares y por la técnica SDE se identificaron algunos más.



Gráfica 12. Distribución de los principales compuestos mayoritarios encontrados en el AE y extracto SDE de *L. micromera* Schauer.

3.13 EXTRACTO SDE DE LAS HOJAS DE *LIPPIA ORIGANOIDES* (QUIMIOTIPO CARVACROL).

El perfil cromatográfico de los analitos presentes en el extracto de *L. organoides* (quimiotipo carvacrol), se presenta en la **Figura 26**. La composición química obtenida con base en los criterios cromatográfico (índices de retención) y espectroscópico (espectros de masas, El 70 eV) se reporta en la **Tabla 17**, junto con sus cantidades relativas (%) y concentraciones (ppm), determinadas por el método del estándar interno.

30 componentes identificados constituyen el 96,77 % de la muestra analizada, según los parámetros de integración aplicados (umbral de integración, *Thshd* =

16, y área de rechazo del pico en la base = 1), usando los índices de Kòvats (columna apolar y polar) y los espectros de masas (EI, 70 eV).

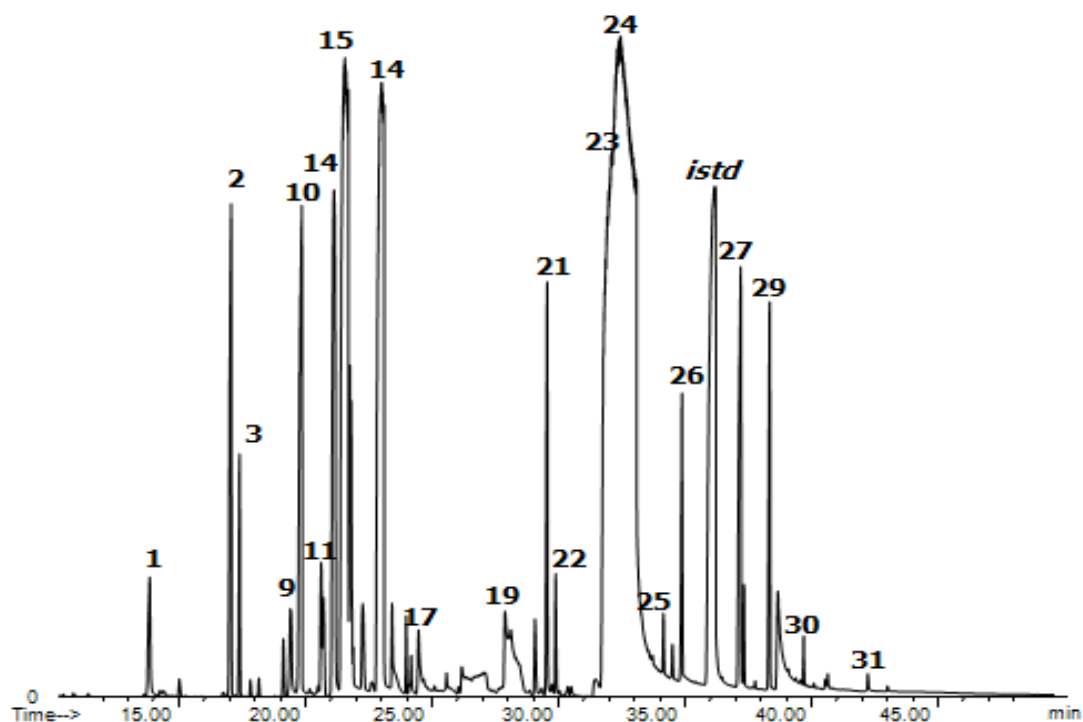


Figura 26. Perfil cromatográfico del extracto de *L. origanoides* (quimiotipo carvacrol) obtenido por SDE. Columna DB – 5 MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los componentes se encuentra reportada en la Tabla 17.

El extracto obtenido, al igual que el AE, presentó una riqueza en monoterpenos oxigenados 50,24 % e hidrocarburos monoterpénicos 43,1 %, y en menor proporción los hidrocarburos sesquiterpénicos 9,37 %, sus análogos oxigenados no fueron detectables.

De acuerdo con los resultados de la tabla de composición química para el extracto de *L. origanoides* (quimiotipo carvacrol), sus principales componentes mayoritarios son: carvacrol (48,16%), *p*-Cimeno (12,76%) timol (5,17%), *trans*- β -cariofileno

(3,39%) y α -tujeno (3,21%). En relación con el AE, difiere ligeramente de sus componentes mayoritarios, así como también en las proporciones; algunos compuestos como el carvacrol se encontraron en mayor concentración, mientras otras, que como el timol disminuyen en abundancia.

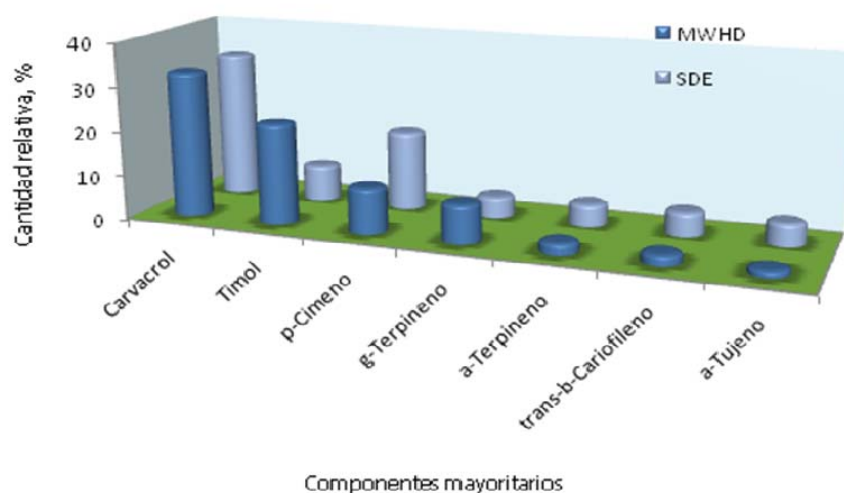
En forma general, las tablas composicionales de los analitos identificados por ambas técnicas son similares y entre ambas se logra dar una composición química más acertada.

Tabla 17. Composición química, cantidad relativa (%) y concentración (ppm) del extracto SDE *L. organoides* (quimiotipo carvacrol).

| Nº pico | I _k | | Nombre del Compuesto | Cantidad Relativa % | Concentración (ppm) |
|---------|----------------|--------|---------------------------------|---------------------|---------------------|
| | DB-5 | DB-WAX | | | |
| 1 | 859 | 1289 | <i>cis</i> -3-Hexen-1-ol | 0,92 | 458,96 |
| 2 | 930 | 1038 | α -Tujeno | 3,21 | 1600,91 |
| 3 | 939 | 1205 | α -Pino | 0,98 | 487,60 |
| 4 | 954 | 1061 | Canfeno | 0,08 | 37,42 |
| 5 | 975 | 1115 | Sabineno | 0,27 | 135,60 |
| 6 | 979 | 1205 | β -Pino | 0,85 | 423,76 |
| 7 | 1011 | 1178 | α -Felandreno | 0,75 | 373,07 |
| 8 | 1013 | 1147 | δ -3-Careno | 0,50 | 248,68 |
| 9 | 1022 | 1178 | α -Terpineno | 3,20 | 1594,47 |
| 10 | 1032 | 1272 | <i>p</i> -Cimeno | 12,76 | 6365,52 |
| 11 | 1029 | 1200 | Limoneno | 0,99 | 493,31 |
| 12 | 1037 | 1238 | <i>cis</i> - β -Ocimeno | 1,01 | 505,70 |
| 13 | 1031 | 1228 | Eucaliptol | 0,34 | 169,24 |
| 14 | 1050 | 1251 | β - <i>trans</i> -Ocimeno | 0,65 | 325,01 |
| 15 | 1066 | 1248 | γ -Terpineno | 2,98 | 1480,80 |
| 16 | 1070 | - | <i>cis</i> -Hidrato de sabineno | 0,30 | 151,35 |
| 17 | 1088 | 1287 | Terpinoleno | 0,27 | 132,36 |
| 18 | 1091 | 1338 | <i>p</i> -Cimeno | 0,22 | 111,00 |
| 19 | 1096 | 1547 | Linalool | 0,42 | 209,95 |
| 20 | 1177 | 1601 | Terpinen-4-ol | 0,30 | 148,85 |
| 21 | 1171 | - | Umbellona | 0,42 | 210,77 |

| | | | | | |
|----|------|------|--------------------------------------|-------|----------|
| 22 | 1235 | 1597 | Timil metil éter | 2,37 | 1182,44 |
| 23 | 1290 | 2187 | Timol | 5,17 | 2571,04 |
| 24 | 1299 | 2219 | Carvacrol | 48,16 | 24023,34 |
| 25 | 1352 | 1856 | Acetato de timilo | 0,23 | 113,85 |
| 26 | 1290 | 2187 | Acetato de carvacrilo | 1,30 | 646,47 |
| 27 | 1431 | 1611 | <i>trans</i> - β -Cariofileno | 3,39 | 1688,99 |
| 28 | 1434 | 1594 | <i>trans</i> - α -Bergamoteno | 0,37 | 186,58 |
| 29 | 1454 | 1684 | α -Humeleno | 1,95 | 973,55 |
| 30 | 1434 | 1594 | β -Bisaboleno | 0,16 | 81,85 |
| | | | NI | 5,48 | |

Continuación **Tabla 17**



Gráfica 13. Distribución de los principales compuestos mayoritarios encontrados en el AE y extracto SDE de *L. origanoides* (quimiotipo carvacrol).

3.14 EXTRACTO SDE DE LAS HOJAS DE *LIPPIA ORIGANOIDES* (QUIMIOTIPO *p* – CIMENO).

El cromatograma típico para el extracto obtenido de hojas e inflorescencias de *L. origanoides* (quimiotipo *p* – cimeno), se ilustra en la **Figura 27**. El registro de la

identificación de sus componentes, junto con los índices de retención, la cantidad relativa y concentración se presentan en la **Tabla 18**.

La identificación de los analitos se basó en criterios cromatográficos (columna apolar y polar), y espectroscópicos (espectros de masas, EI 70 eV). Los parámetros de integración aplicados a los picos cromatográficos en el análisis fueron: área de rechazo del pico en la base = 1 y umbral de integración, *Thshd* = 17, por medio de los cuales fueron identificados 37 componentes correspondientes al 97,37 % del total del extracto.

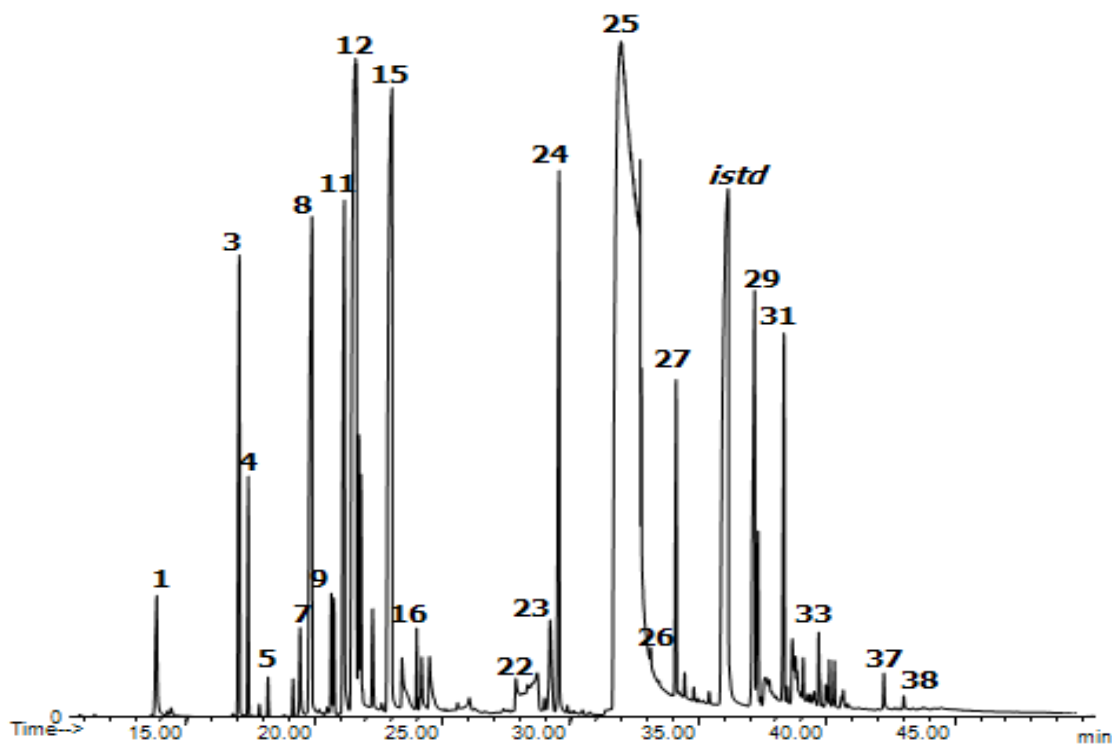


Figura 27. Perfil cromatográfico del extracto de *L. origanoides* (quimiotipo *p* – cimeno) obtenido por SDE. Columna DB – 5 MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los componentes se encuentra reportada en la **Tabla 18**.

Con base en la tabla composicional para el extracto de *L. origanoides* (atípica), la planta presenta un contenido alto de monoterpenos oxigenados (44,24 %) y de hidrocarburos monoterpénicos (42,47 %); en menor proporción se encuentran los hidrocarburos sesquiterpénicos (6,88 %) y sus análogos oxigenados (0,18 %).

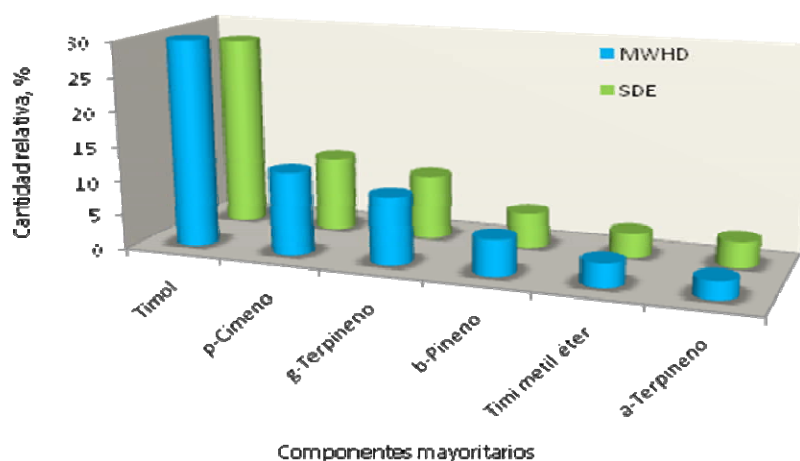
El extracto de *L. origanoides* (atípica), tiene como sus principales componentes mayoritarios: timol (31,04%), *p*-cimeno (12,24%), γ -terpineno (10,44%), β -pineno (5,63%) y α -terpineno (4,31 %). Al igual que en las otras plantas estudiadas en relación con el AE, se observa una variación en la concentración de los componentes por SDE, además, la identificación del extracto SDE fue un poco mayor que la de MWHD.

Tabla 18. Composición química, cantidad relativa (%) y concentración (ppm) del extracto SDE *L. origanoides* (quimiotipo *p* – cimeno).

| Nº pico | I _k | | Nombre del Compuesto | Cantidad Relativa % | Concentración (ppm) |
|---------|----------------|--------|---------------------------------|---------------------|---------------------|
| | DB-5 | DB-WAX | | | |
| 1 | 859 | 1289 | <i>cis</i> -3-Hexen-1-ol | 1,09 | 136,17 |
| 2 | 930 | 1038 | α -Tujeno | 0,06 | 7,72 |
| 3 | 939 | 1205 | α -Pineno | 3,12 | 389,76 |
| 4 | 960 | - | Tuja-2,4-(10)-dieno | 1,16 | 145,26 |
| 5 | 954 | 1061 | Canfeno | 0,18 | 22,43 |
| 6 | 975 | 1115 | Sabineno | 0,18 | 22,93 |
| 7 | 979 | 1283 | 1-Octen-3-ol | 0,55 | 68,85 |
| 8 | 979 | 1205 | β -Pineno | 5,63 | 703,13 |
| 9 | 1011 | 1178 | α -Felandreno | 0,61 | 76,42 |
| 10 | 1013 | 1147 | δ -3-Careno | 0,54 | 67,98 |
| 11 | 1022 | 1178 | α -Terpineno | 4,31 | 537,75 |
| 12 | 1032 | 1272 | <i>p</i> -Cimeno | 12,24 | 1527,08 |
| 13 | 1029 | 1200 | Limoneno | 1,12 | 140,20 |
| 14 | 1037 | 1238 | β - <i>cis</i> -Ocimeno | 1,62 | 201,65 |
| 15 | 1066 | 1248 | γ -Terpineno | 10,44 | 1304,65 |
| 16 | 1070 | - | <i>cis</i> -Hidrato de sabineno | 0,75 | 94,10 |
| 17 | 1088 | 1287 | Terpinoleno | 0,35 | 43,17 |

| | | | | | |
|----|------|------|--------------------------------------|-------|---------|
| 18 | 1091 | 1338 | <i>p</i> -Cimeno | 0,39 | 49,09 |
| 19 | 1096 | 1547 | Linalool | 0,69 | 86,07 |
| 20 | 1132 | 1392 | <i>allo</i> -Ocimeno | 0,04 | 5,26 |
| 21 | 1075 | 1463 | <i>trans</i> -Hidrato de sabineno | 0,19 | 23,89 |
| 22 | 1177 | 1601 | Terpinen-4-ol | 2,19 | 275,71 |
| 23 | 1171 | - | Umbellona | 1,01 | 126,44 |
| 24 | 1235 | 1597 | Timil metil éter | 3,84 | 479,47 |
| 25 | 1290 | 2187 | Timol | 31,04 | 3874,68 |
| 26 | 1299 | 2219 | Carvacrol | 3,65 | 445,91 |
| 27 | 1352 | 1856 | Acetato de timilo | 1,75 | 218,20 |
| 28 | 1376 | 1519 | α -Copaeno | 0,07 | 8,56 |
| 29 | 1431 | 1611 | <i>trans</i> - β -Cariofileno | 3,78 | 472,50 |
| 30 | 1434 | 1594 | <i>trans</i> - α -Bergamoteno | 0,77 | 96,38 |
| 31 | 1431 | 1611 | α -Humuleno | 2,20 | 275,02 |
| 32 | 1460 | 1661 | <i>allo</i> -Aromadendreno | 0,07 | 10,08 |
| 33 | 1500 | 1705 | Biclogermacreno | 0,13 | 20,78 |
| 34 | 1434 | 1594 | β -Bisaboleno | 0,42 | 52,11 |
| 35 | 1512 | 1763 | α -Aleskeno | 0,10 | 12,44 |
| 36 | 1484 | 1691 | α -Amorfenol | 0,09 | 10,81 |
| 37 | 1460 | 1661 | δ -Cadineno | 0,21 | 26,26 |
| 38 | 1583 | 2001 | Óxido de cariofileno | 0,20 | 25,24 |
| | | | NI | 3,22 | |

Continuación **Tabla 18**.



Gráfica 14. Distribución de los principales compuestos mayoritarios encontrados en el AE y extracto SDE de *L. origanoides* (quimiotipo *p*-cimeno).

Es de notar que aunque ambos quimiotipos poseen los dos componentes que los caracterizan, para este quimiotipo, carvacrol se encuentra pero en muy bajas cantidades con respecto a los componentes mayoritarios. Por otro lado, los componentes principales cambiaron ligeramente para este quimiotipo. Y en cuanto a la identidad química de los metabolitos en forma general, es muy similar para ambos quimiotipos.

3.15 DETERMINACIÓN DE ALGUNAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS PARA LOS AE DE LAS ESPECIES DE *LIPPIA* ESTUDIADAS

3.15.1 Determinación de la densidad, el índice de refracción y la rotación específica

La densidad, el índice de refracción y la rotación específica para cada uno de los AE analizados correspondientes a cada especie de *Lippia*, se determinaron bajo las condiciones operacionales descritas en el **Numeral 2.2.5** del desarrollo experimental. Las densidades y la rotación específica se reportan en la **Tabla 19**.

Para determinar los índices de refracción se les tomó a muestras de AE con una semana de extracción, y a una de ellas, *L. alba* (quimiotipo carvona), también se le tomó con cuatro meses de almacenamiento. Los resultados se muestran en la **Tabla 20**.

Según reportes encontrados en la literatura, los AE que tienen densidades entre 0,9 – 1 g/mL e índices de refracción mayores de 1,47 son ricos en compuestos oxigenados aromáticos o alifáticos [8,69–70]. De acuerdo con lo anterior, los datos experimentales de las constantes fisicoquímicas determinadas para las especies de *Lippia* estudiadas en el presente trabajo, corresponden a los de la

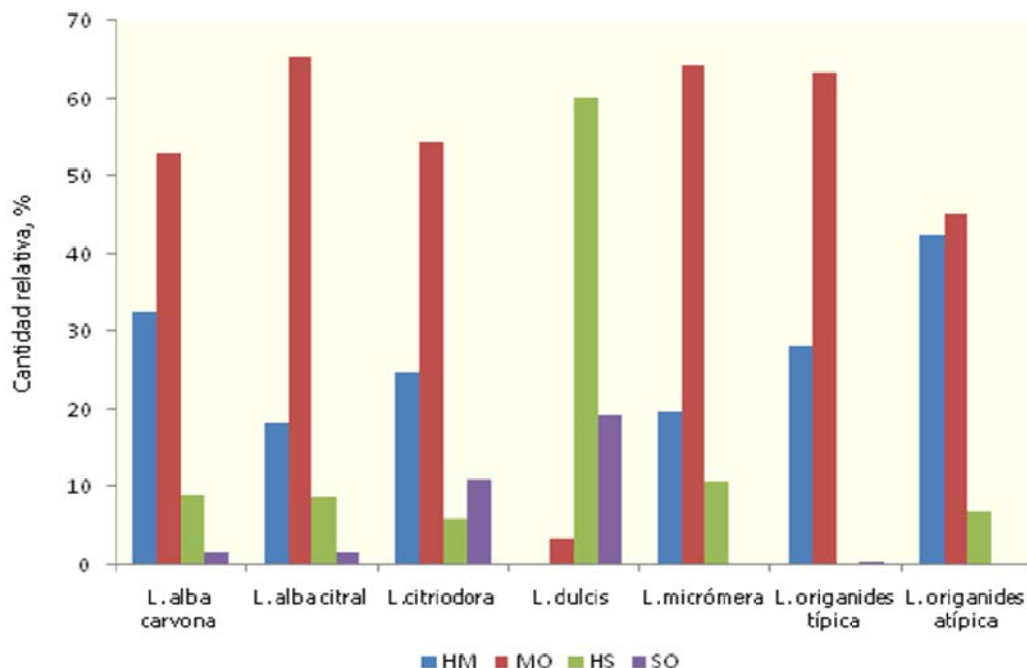
literatura; esto se puede observar mejor en la **Gráfica 15**, donde se presentan las principales familias de compuestos para cada una de las *Lippias* analizadas.

Tabla 19. Densidades y rotaciones específicas para cada una de las especies de *Lippia* analizadas a 23 °C.

| Nombre planta | d (g/mL) | $[\alpha]_D^{23}$ (°.mL/g.dm) |
|--|--------------|----------------------------------|
| <i>Lippia alba</i> (Mill.)N.E.Br. (quimiotipo carvona) | 0,899 ± 0,02 | (+) 58,40 ± 0,29 |
| <i>Lippia alba</i> (Mill.)N.E.Br. (quimiotipo citral) | 0,892 ± 0,03 | (-) 46,00 ± 0,13 |
| <i>Lippia citriodora</i> H.B.K. | 0,904 ± 0,02 | (+) 53,30 ± 0,21 |
| <i>Lippia dulcis</i> (Trev.) | 0,925 ± 0,02 | (+) 4,10 ± 0,06 |
| <i>Lippia micrómera</i> Schauer | 0,936 ± 0,02 | (+) 0,42 ± 0,18 |
| <i>Lippia origanoides</i> H.B.K. (quimiotipo carvacrol) | 0,930 ± 0,01 | (+) 0,41 ± 0,17 |
| <i>Lippia origanoides</i> H.B.K. (quimiotipo <i>p</i> -cimeno) | 0,942 ± 0,03 | (+) 0,46 ± 0,04 |

Tabla 20. Índices de refracción para cada una de las especies de *Lippia* analizadas a 20°C.

| Nombre planta | η |
|--|-----------------|
| Blanco H ₂ O HPLC reportado | 1,3330 |
| Blanco H ₂ O HPLC tomado | 1,3333 |
| <i>Lippia alba</i> (Mill.)N.E.Br. (quimiotipo carvona) | 1,4894 ± 0,0007 |
| <i>Lippia alba</i> (Mill.)N.E.Br. (quimiotipo citral) | 1,4854 ± 0,0005 |
| <i>Lippia citriodora</i> H.B.K. | 1,4844 ± 0,0003 |
| <i>Lippia dulcis</i> (Trev.) | 1,5039 ± 0,0006 |
| <i>Lippia micrómera</i> Schauer | 1,4994 ± 0,0005 |
| <i>Lippia origanoides</i> H.B.K. (quimiotipo carvacrol) | 1,5537 ± 0,0004 |
| <i>Lippia origanoides</i> H.B.K. (quimiotipo <i>p</i> -cimeno) | 1,5837 ± 0,0007 |



Gráfica 15. Distribución de las principales familias de compuestos en los AE de las especies de *Lippia* analizadas.

Se observó que los monoterpenos oxigenados son la principal familia para *L. alba* (quimiotipo carvona), *L. alba* (citral), *L. citriodora*, *L. micromera*, *L. organoides* (quimiotipo carvacrol) y *L. organoides* (quimiotipo *p* – cimeno), y los sesquiterpenos en el aceite *L. dulcis*. Lo que confirma las aproximaciones que ofrecen estas constantes físicas, sobre la homogeneidad de un aceite.

Por otro lado, las rotaciones específicas para cada aceite, se relacionan con los compuestos que pueden rotar el plano de la luz polarizada. Así, en los aceites que presentaron rotación óptica como *L. alba* (quimiotipo carvona), que se debe principalmente a sus componentes mayoritarios: carvona, limoneno y biciclosesquifelandreno, su valor es apreciable. Mientras que otros aceites como el de *L. micromera*, presentó una rotación casi nula, hecho que se explica debido a que sus compuestos mayoritarios no presentan quiralidad; sin embargo,

compuestos en menor proporción en el aceite como α -pineno, β -pineno y alcanfor, son responsables del valor de rotación exhibida.

La **Tabla 20** presenta los índices de refracción, los cuales están en concordancia con lo reportado en la literatura [69–70] y la composición exhibida por cada planta. Además, los índices de refracción difieren entre sí, lo que es indicativo que cada una de ellas posee una composición química diferente.

Con respecto a las dos muestras de *L. alba* (quimiotipo carvona), almacenadas a la oscuridad y a 4 °C, con una semana y cuatro meses, respectivamente; el índice es el mismo, lo que puede significar tres cosas:

1. el A.E de *L. alba* (carvona) es estable químicamente en el tiempo,
2. el A.E de *L. alba* (carvona) pudo sufrir cambios que pudieran compensarse, y por tanto, dar el mismo índice de refracción, y
3. la refractometría no es una técnica lo suficientemente sensible para detectar estos pequeños cambios.

Además, cabe resaltar que el compuesto de interés –biciclosesquifelandreno– se encontró sólo en el AE y extracto de *L. alba* (quimiotipo carvona), lo que se puede observar en la **Figura 28**.

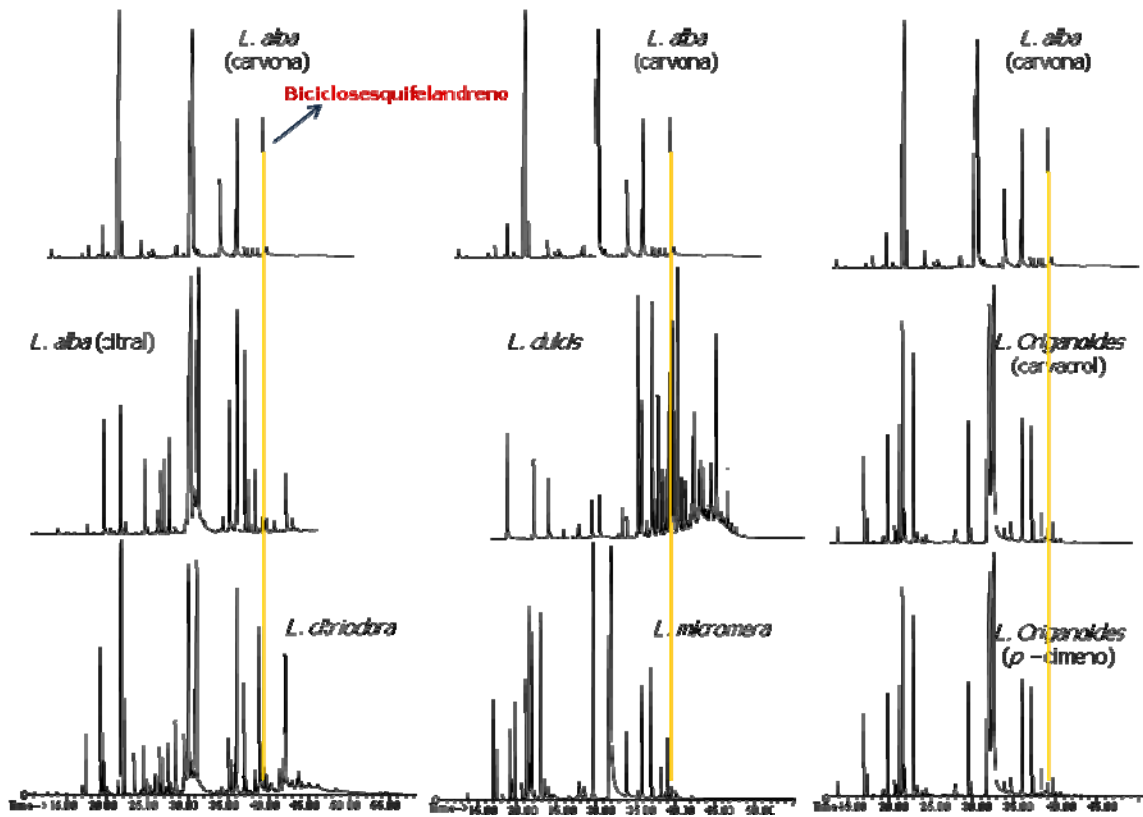


Figura 28. Comparación de los perfiles cromatográficos de todas las especies de *Lippia* estudiadas para resaltar el pico correspondiente al bicyclosesquifelandreno en *L. alba* (quimiotipo carvona).

4. AISLAMIENTO Y DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE UN SESQUITERPENO MAYORITARIO DEL AE *L. ALBA* (Mill.)N.E.Br.

4.1 DESTILACIÓN FRACCIONADA A PRESIÓN REDUCIDA (DFPR)

Como se había expresado en el **Numeral 2.2.6** del desarrollo experimental, este procedimiento se realizó en dos equipos, que a continuación se exponen.

4.1.1 Destilación en el equipo de cobre

Se tomaron 5 g de AE de *L. alba* (quimiotipo carvona) y el experimento inicial duró aproximadamente 5 h, al cual se le monitoreó la temperatura y la presión como se muestra en la **Tabla 21**. Para el final de la última hora, no se había logrado destilar ninguna fracción, y, debido a que ya se llevaba un tiempo largo y la temperatura estaba a 200°C y el medio de calentamiento era aceite mineral, por precaución se dio por terminado el experimento para así evitar un accidente por el flash point del aceite mineral. Por otro lado, a pesar que no se pudo observar un fraccionamiento, se tomó una muestra de este A.E de *L. alba* (carvona) usado en la destilación, para analizar por GC – MS y los resultados se compararon con la muestra A.E de *L. alba* (quimiotipo carvona) previo a la destilación.

La identificación de cada una de las muestras se realizó de acuerdo con lo descrito en el **Numeral 2.2.4** del desarrollo experimental. En la **Figura 28** se muestran los perfiles cromatográficos para estas dos muestras y en la **Tabla 22** se muestra la composición química para las dos muestras. Los parámetros de integración aplicados a los picos cromatográficos en el análisis fueron: área de rechazo del pico en la base = 1 y umbral de integración, $Thshd = 17$.

Tabla 21. Datos obtenidos de la DFPR en el equipo de cobre.

| Temperatura (°C) | Presión (mm Hg) | Tiempo (min) | Cambios |
|------------------|-----------------|--------------|------------------------------|
| 25 | 44 | - | - |
| 122 | 39 | 95 | Bajó la presión sin destilar |
| 124 | 39 | 120 | Sin destilar aún |
| 165 | 28 | 150 | Sin destilar aún |
| 200 | 28 | 270 | No destiló |

*La temperatura registrada corresponde a la del baño termostatado.

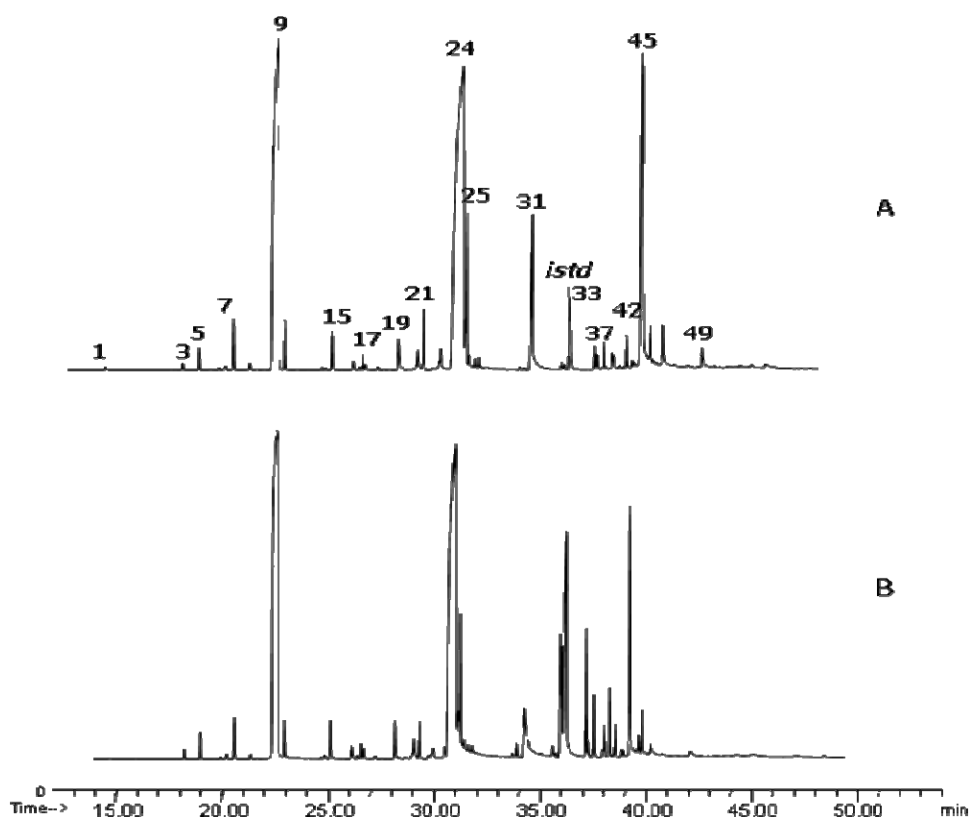


Figura 29. Perfil cromatográfico del AE de *L. alba* (quimiotipo carvona) obtenido por MWHD, antes (A) y después (B) de ser sometido DFPR en el equipo de cobre. Columna DB – 5 MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los componentes se encuentra reportada en la Tabla 22.

Tabla 22. Composición química y cantidad relativa (%) de los componentes en el AE de *L. alba* (quimiotipo carvona), obtenido por MWHD, antes (A) y después (B) de ser sometido a la destilación fraccionada a presión reducida en el equipo de cobre.

| Nº pico | I _k | | Nombre del Compuesto | A | B |
|---------|----------------|--------|-------------------------------------|---------------------|-------|
| | DB-5 | DB-WAX | | Cantidad Relativa % | |
| 1 | 855 | - | <i>trans</i> -2-Hexenal | 0,04 | - |
| 2 | 859 | 1289 | <i>cis</i> -3-Hexen-1-ol | 0,25 | - |
| 3 | 939 | 1161 | α-Pineno | 0,10 | 0,15 |
| 4 | 954 | 1061 | Canfeno | 0,28 | 0,40 |
| 5 | 975 | 1115 | Sabineno | 0,06 | - |
| 6 | 979 | 1205 | β-Pineno | 0,12 | 0,10 |
| 7 | 979 | 1283 | 1-Octen-3-ol | 0,15 | - |
| 8 | 990 | 1156 | β-Mirceno | 0,87 | 0,70 |
| 9 | 1029 | 1200 | Limoneno | 29,48 | 30,38 |
| 10 | 1050 | 1251 | <i>trans</i> -β-Ocimeno | 1,86 | 0,86 |
| 11 | 1088 | 1287 | Terpinoleno | 0,08 | - |
| 12 | 1091 | - | <i>p</i> -Cimeno | 0,09 | 0,08 |
| 13 | 1096 | 1547 | Linalool | 0,52 | 0,66 |
| 14 | 1122 | 1634 | <i>trans-p</i> -2,8-Mentadien-1-ol | 0,25 | 0,22 |
| 15 | 1136 | 1451 | <i>cis</i> -Óxido de limoneno | 0,19 | - |
| 16 | 1137 | 1873 | <i>cis-p</i> -2,8-Mentadien-1-ol | 0,17 | - |
| 17 | 1146 | 1518 | Alcanfor | 0,14 | 0,08 |
| 18 | 1177 | 1601 | Terpineno-4-ol | 0,03 | - |
| 19 | 1169 | 1698 | Borneol | 1,23 | 0,76 |
| 20 | 1192 | 1618 | <i>cis</i> -dihidrocarvona | 0,90 | - |
| 21 | 1200 | 1639 | <i>trans</i> -dihidrocarvona | 0,65 | 0,69 |
| 22 | 1214 | 1713 | <i>iso</i> -Dihidrocarveol | 0,20 | - |
| 23 | 1216 | 1842 | <i>trans</i> -Carveol | 0,63 | 0,36 |
| 24 | 1243 | 1715 | Carvona | 39,78 | 36,63 |
| 25 | 1252 | 1739 | Piperitona | 2,86 | 3,55 |
| 26 | 1256 | - | <i>trans</i> -Epóxido de piperitona | 1,23 | - |
| 27 | 1276 | 1805 | <i>trans</i> -Óxido de carvona | 0,27 | - |
| 28 | 1299 | 2219 | Carvacrol | 0,08 | - |
| 29 | 1342 | 1706 | <i>trans</i> -Acetato de carvilo | 0,06 | - |
| 30 | 1338 | 1469 | δ-Elemeno | 0,04 | - |

| | | | | | |
|----|------|------|-------------------------------------|------|------|
| 31 | 1343 | 1945 | Piperitenona | 5,17 | 3,72 |
| 32 | 1376 | 1519 | α -Copaeno | 0,07 | 0,23 |
| 33 | 1388 | 1546 | β -Bourboneno | 1,26 | 2,35 |
| 34 | 1390 | 1598 | β -Elemeno | 0,61 | 1,89 |
| 35 | 1420 | 1491 | β -Ylangeno | 0,22 | - |
| 36 | 1439 | 1610 | <i>trans</i> - β -Cariofileno | 0,12 | 0,29 |
| 37 | 1433 | 1656 | β -Gurjuneno | 0,21 | - |
| 38 | 1432 | 1626 | β -Copaeno | 0,19 | - |
| 39 | 1456 | 1669 | <i>trans</i> - β -Farneseno | 0,49 | - |
| 40 | 1454 | 1686 | α -Humuleno | 0,03 | - |
| 41 | 1460 | 1661 | <i>allo</i> -Aromadendreno | 0,21 | 0,62 |
| 42 | 1477 | 1739 | γ -Gurjuneno | 0,24 | - |
| 43 | 1495 | - | γ -Amorfeno | - | 0,12 |
| 44 | 1485 | 1654 | Germacreno D | 0,05 | - |
| 45 | 1487 | 1727 | <i>epi</i> -Biciclosesquifelandreno | 4,88 | 6,26 |
| 46 | 1500 | 1705 | Biciclogermacreno | 0,22 | - |
| 47 | 1513 | 1766 | γ -Cadineno | 0,34 | 1,02 |
| 48 | 1575 | 2066 | Germacreno D-4-ol | 0,89 | - |
| | | | NI | 2,19 | 5,63 |

Continuación **Tabla 22**.

Todos los cambios observados por medio del análisis cromatográfico y espectroscópico evidencian que hubo un cambio en la composición del A.E de *L. alba* (quimiotipo carvona), producto del sometimiento del aceite al calentamiento y a una baja presión inicialmente. Además, los cambios de presión que se presentaron durante el experimento, indicaban que la bomba estaba absorbiendo algo de la parte volátil del aceite, lo que puede dar respuesta al cambio en la composición del aceite de partida. Y con respecto a los compuestos que aparecieron, pueden ser producto de isomerización o también que se pudieron concentrar y ser detectables para el análisis cromatográfico.

4.1.2 Destilación en el equipo de vidrio

Para este experimento también se tomaron 5 g de AE de *L. alba* (carvona), y con un tiempo de duración de 3 h, aproximadamente. Se monitorearon la temperatura y la presión como se muestra en la **Tabla 23**. El medio de calentamiento se

cambió por parafina, para elevar en 100°C más la temperatura del baño termostatado. En este experimento se pudieron observar resultados tangibles, debido a que en éste si se logró destilar y se recogieron cuatro fracciones.

A estas muestras se les hizo un análisis GC–MS y se compararon con el aceite de partida. En la **Figura 29** y en la **Tabla 24** se presentan los perfiles cromatográficos y se reportan la composición de los metabolitos secundarios volátiles, respectivamente, para las cuatro fracciones y para el aceite de partida.

Tabla 23. Datos obtenidos de la DFPR en el equipo de vidrio.

| Temperatura* (°C) | Presión (mm Hg) | Tiempo (min) | Cambios |
|------------------------------|----------------------------|-------------------------|----------------------------|
| 25 | 50 | - | - |
| 100 | 50 | 60 | Sin cambios |
| 200 | 50 | 120 | Sin cambios |
| 300 | 50 | 180 | Se recogieron 4 fracciones |

*La temperatura registrada corresponde a la del baño termostatado.

Las fracciones obtenidas se nombraron así: primera fracción F1, segunda fracción F2, tercera fracción F3, y última fracción Ff.

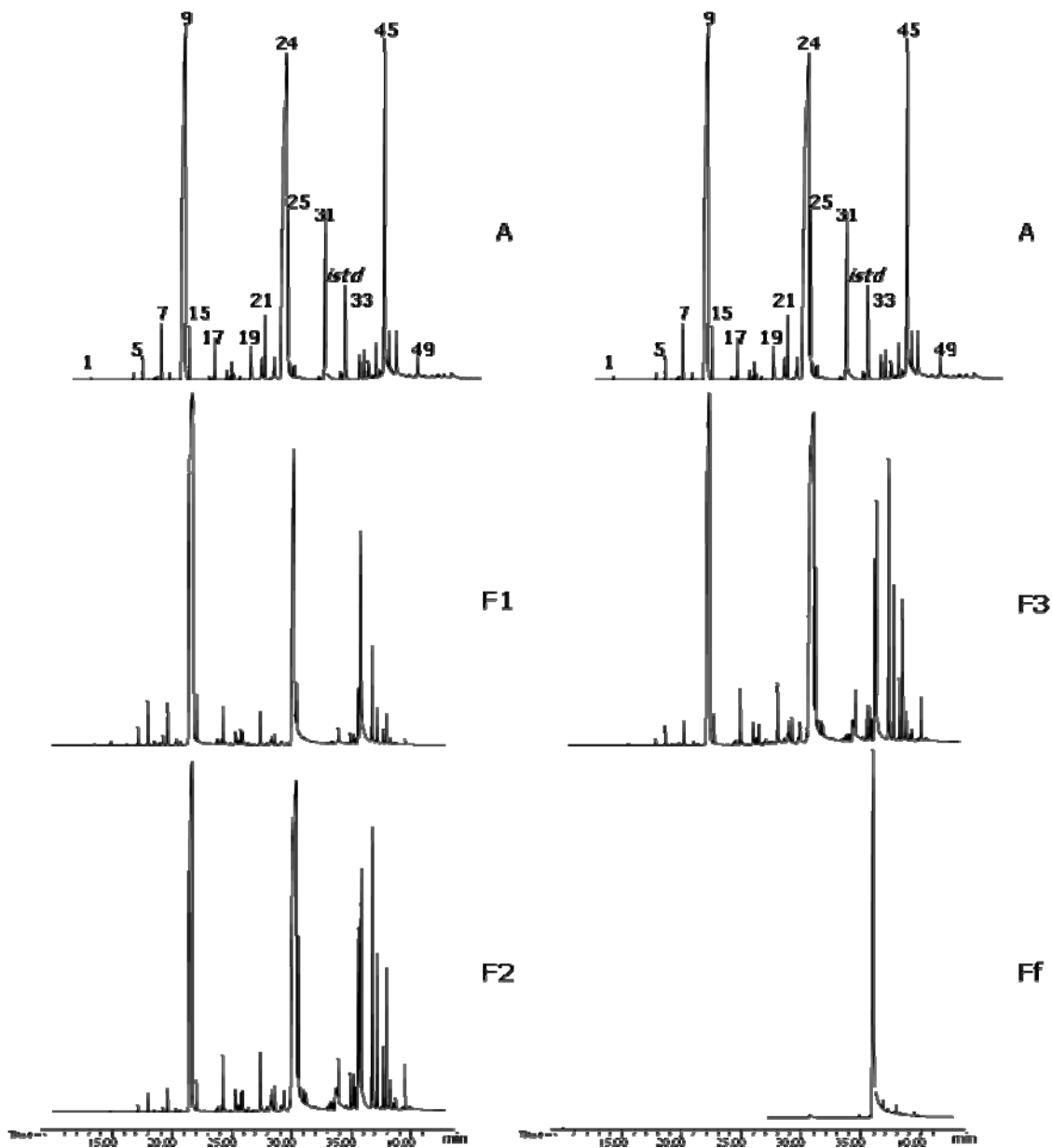


Figura 30. Perfil cromatográfico del AE de *L. alba* (quimiotipo carvona), obtenido por MWHD, antes (A) de ser sometido a la DFPR en el equipo de vidrio, y sus cuatro fracciones recogidas (F1, F2, F3 y Ff). Columna DB – 5 MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los componentes se encuentra reportada en la Tabla 24.

Tabla 24. Composición química, cantidad relativa (%) y concentración (ppm) de los componentes en el AE de *L. alba* (quimiotipo carvona), obtenido por MWHD, antes (A) de ser sometido a la destilación fraccionada a presión reducida en el equipo de vidrio, junto con las cuatro fracciones obtenidas.

| Nº pico | Nombre del Compuesto | A | Cantidad Relativa % | | | | Ff |
|------------|---|-------|---------------------|-----------|-------|-------|----|
| | | | F1 | F2 | F3 | Ff | |
| 1 | <i>trans</i> -2-Hexenal | 0,04 | - | - | - | - | |
| 2 | <i>cis</i> -3-Hexen-1-ol | 0,25 | - | - | - | - | |
| 3 | α -Pino | 0,10 | 0,43 | 0,39 | 0,09 | - | |
| 4 | Canfeno | 0,28 | 1,07 | 0,96 | 0,25 | - | |
| 5 | Sabineno | 0,06 | 0,08 | 0,07 | - | - | |
| 6 | β -Pino | 0,12 | 0,28 | 0,24 | 0,07 | - | |
| 7 | 1-Octen-3-ol | 0,15 | - | - | - | - | |
| 8 | β -Mirceno | 0,87 | 1,19 | 1,06 | - | - | |
| 9 | Limoneno | 29,48 | 58,80 | 56,4 2 | 39,62 | - | |
| 10 | <i>trans</i> - β -Ocimeno | 1,86 | 1,08 | 0,97 | 0,42 | - | |
| 11 | Terpinoleno | 0,08 | 0,13 | 0,12 | 0,06 | - | |
| 12 | <i>p</i> -Cimeneno | 0,09 | 0,15 | 0,15 | 0,09 | - | |
| 13 | Linalool | 0,52 | 0,95 | 0,91 | 0,90 | - | |
| 14 | <i>allo</i> -Ocimeno | - | 0,17 | 0,16 | - | - | |
| 15 | <i>trans</i> - <i>p</i> -2,8- Mentadien-1-ol | 0,25 | 0,35 | 0,08 | 0,35 | - | |
| 16 | <i>cis</i> -Óxido de limoneno | 0,19 | - | - | - | - | |
| 17 | <i>cis</i> - <i>p</i> -2,8-Mentadien- 1-ol | 0,17 | - | - | - | - | |
| 18 | Alcanfor | 0,14 | 0,08 | - | 0,10 | - | |
| 19 | Terpineno-4-ol | 0,03 | - | 0,73 | - | - | |
| 20 | Borneol | 1,23 | 0,69 | - | 1,18 | - | |
| 21 | <i>cis</i> -dihidrocarvona | 0,90 | - | - | - | - | |
| 22 | <i>trans</i> -dihidrocarvona | 0,65 | 0,25 | 0,62 | 0,45 | - | |
| 23 | <i>iso</i> -Dihidrocarveol | 0,20 | - | - | - | - | |
| 24 | <i>trans</i> -Carveol | 0,63 | - | - | 0,56 | - | |
| 25 | Carvona | 39,78 | 23,54 | 25,6 4 | 38,24 | 23,96 | |
| 26 | Piperitona | 2,86 | 2,04 | 2,49 | 3,74 | - | |
| 27 | <i>trans</i> -Epóxido de piperitona | 1,23 | - | - | - | - | |

| | | | | | | |
|----|---|------|------|------|------|-------|
| 28 | <i>trans</i> -Óxido de carvona | 0,27 | - | - | - | - |
| 29 | Carvacrol | 0,08 | - | - | - | - |
| 30 | <i>trans</i> -Acetato de carvilo | 0,06 | - | - | - | - |
| 31 | δ -Elemeno | 0,04 | - | - | - | - |
| 32 | Piperitenona | 5,17 | - | - | - | - |
| 33 | α -Cubebeno | - | 0,34 | 0,49 | 1,30 | - |
| 34 | Ylangeno | - | 0,19 | 0,22 | 0,55 | - |
| 35 | α -Copaeno | 0,07 | 0,22 | 0,26 | 0,67 | - |
| 36 | β -Bourboneno | 1,26 | 1,61 | 1,94 | 4,92 | - |
| 37 | β -Elemeno | 0,61 | - | - | - | - |
| 38 | β -Ylangeno | 0,22 | - | - | - | - |
| 39 | <i>trans</i> - β -Cariofileno | 0,12 | 0,13 | - | 0,29 | 13,87 |
| 40 | β -Gurjuneno | 0,21 | - | - | - | - |
| 41 | β -Copaeno | 0,19 | - | - | - | - |
| 42 | <i>trans</i> - β -Farneseno | 0,49 | - | - | - | - |
| 43 | α -Humuleno | 0,03 | - | - | - | - |
| 44 | <i>allo</i> -Aromadendreno | 0,21 | 0,12 | 0,14 | 0,55 | - |
| 45 | γ -Muuroleno | - | - | - | 0,08 | - |
| 46 | γ -Gurjuneno | 0,24 | - | - | - | - |
| 47 | γ -Amorfeno | - | - | - | 0,08 | - |
| 48 | Germacreno D | 0,05 | - | - | - | - |
| 49 | <i>epi</i> - Biciclosesquifelandreno | 4,88 | - | - | - | - |
| 50 | Biciclogermacreno | 0,22 | - | - | - | - |
| 51 | γ -Cadineno | 0,34 | 0,14 | 0,19 | - | 11,60 |
| 52 | Germacreno D-4-ol | 0,89 | - | - | - | - |
| | NI | 2,19 | 5,96 | 5,75 | 5,44 | 50,57 |

Continuación **Tabla 24.**

Comparando la composición química de los metabolitos secundarios volátiles de la primera fracción destilada con respecto al aceite de partida, los componentes mayoritarios cambian ligeramente, con la observación que los componentes piperitenona y *epi*-biciclosesquifelandreno no se encontraron para la primera fracción; las proporciones también cambiaron, así mismo, en forma general se redujo el número de componentes, lo que es indicativo que si hubo un fraccionamiento del aceite de partida.

Al analizar los resultados de la tabla de composición química de los metabolitos secundarios volátiles para la tercera fracción, los componentes mayoritarios difieren de las otras dos fracciones como del aceite de partida, en las proporciones también varió y algunos compuestos nuevos aparecieron y otros desaparecieron, con respecto a las otras dos fracciones, esto se debe principalmente a que los compuestos desaparecidos se recogieron en las fracciones anteriores y los compuestos que aparecieron fueron aquellos que se concentraron en el aceite y pudieron ser entonces detectados y analizados por GC – MS.

Recordando el objetivo principal de esta destilación fraccionada, que era prefaccionar el aceite de *L. alba* (carvona), para tener el componente biciclesquifelandreno en una porción con muchos menos componentes, resultó que éste en la configuración que se conoce (**Figura 30**) es inestable, ya sea al medio en el que se encuentra, por los otros componentes que lo rodean, y/o las condiciones a las que fue sometido en la destilación, temperatura alta y presión baja; todo lo anterior junto, o alguno de estos factores, pudo isomerizar el compuesto.

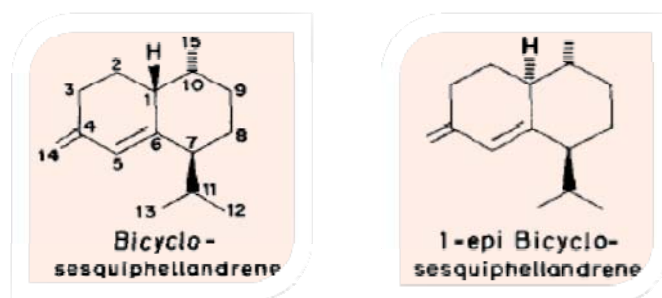


Figura 31. Representación estructural del biciclesquifelandreno y un enantiómero.

4.2 DESTILACIÓN POR ARRASTRE CON VAPOR DE AGUA, DAV

El procedimiento llevado a cabo para esta destilación se describe en el **Numeral 2.2.7** del desarrollo experimental. La cantidad de material vegetal de partida fueron 800 g, la cantidad de agua del generador de vapor fueron ~15 L y la presión del generador no pasó de 1 lb/pulg².

En esta extracción el aceite se recogió con agua, formando una emulsión y era muy poco el aceite que se podía apreciar en ésta. Estas condiciones se mantuvieron así por un tiempo aproximado de tres horas después de iniciada la destilación; pero después se notó un cambio tanto en el destilado como también en el aroma que se desprendía, pasó de ser agradable a desagradable, era un olor fuerte, intenso, concentrado. El destilado ya no era sólo una emulsión, se podía apreciar una capa gruesa de aceite espumosa, la cual se recogió aparte y se dejó hasta que ya no destiló más de esta muestra. Esta recolección duró ~1 h.

La cantidad de muestra recogida se dejó decantar para hacer la separación de la emulsión y se tomó una muestra para analizar por GC-MS. La muestra se preparó tomando una alícuota de 50 µL, 4 µL de *n*-tetradecano y se aforó a 1 mL con diclorometano.

Los resultados de este análisis: el perfil cromatográfico de la muestra y su respectiva composición química, junto con los índices de retención, cantidad relativa (%) y concentración (ppm) se registran en la **Figura 31** y en la **Tabla 25**, respectivamente. La identificación se basó en los criterios cromatográfico (columna apolar y polar) y espectroscópico (espectros de masas, EI 70 eV) y los parámetros de integración aplicados a los picos cromatográficos en el análisis fueron: área de rechazo del pico en la base = 1 y umbral de integración, *Thshd* = 17.

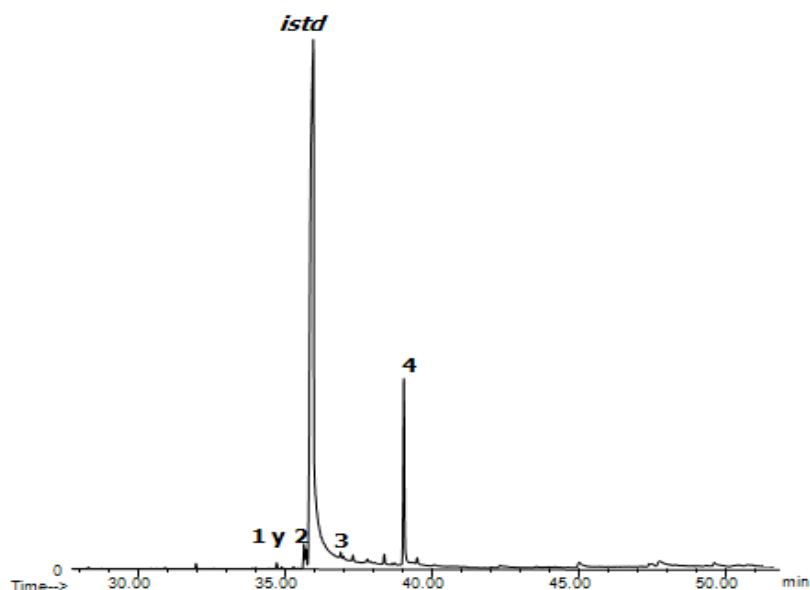


Figura 32. Perfil cromatográfico de la fracción de *L. alba* (quimiotipo carvona), extraída por destilación por arrastre con vapor de agua. Columna DB – 5 MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los componentes se encuentra reportada en la Tabla 25.

Tabla 25. Composición química, cantidad relativa (%) y concentración (ppm) de los componentes en la fracción de *L. alba* (quimiotipo carvona), extraída por destilación por arrastre con vapor de agua.

| Nº pico | I _k DB-5 | DB-WAX | Nombre del Compuesto | Cantidad Relativa % | Concentración (ppm) |
|---------|---------------------|--------|-------------------------------------|---------------------|---------------------|
| 1 | 1388 | 1546 | β-Bourbuneno | 7,68 | 36,32 |
| 2 | 1390 | 1598 | β-Elemeno | 6,12 | 28,92 |
| 3 | 1460 | 1661 | <i>allo</i> -Aromadendreno | 4,13 | 19,51 |
| 4 | 1487 | 1727 | <i>epi</i> -Biciclosesquifelandreno | 78,85 | 363,25 |
| | | | NI | 3,22 | |

Los resultados muestran, se logró hacer el fraccionamiento del AE de *Lippia alba* (quimiotipo carvona). Se llevó al biciclosesquifelandreno, de una mezcla de ~ 50 componentes, a una mezcla de sólo 4 componentes, en la **Figura 32** se pueden observar sus estructuras moleculares.

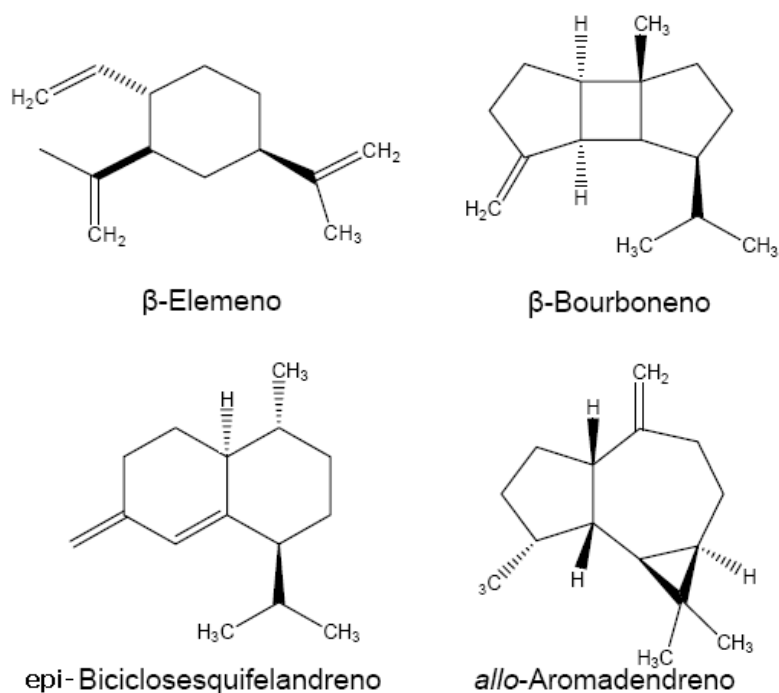


Figura 33. Representación de las estructuras moleculares del β -Elemeno, β -Bourboneno, *allo*-Aromadendreno y *epi*-Biciclosesquifelandreno.

Por otro lado, se confirma a partir del espectro de masas y por los índices de retención (**Tabla 26**), que el compuesto hallado es el biciclosesquifelandreno. En la **Figura 34** se puede observar los espectros de masas del biciclosesquifelandreno en el AE de *L. alba* (quimiotipo carvona) y el de la fracción obtenida por destilación por arrastre con vapor de agua, comparado con el de la base de datos.

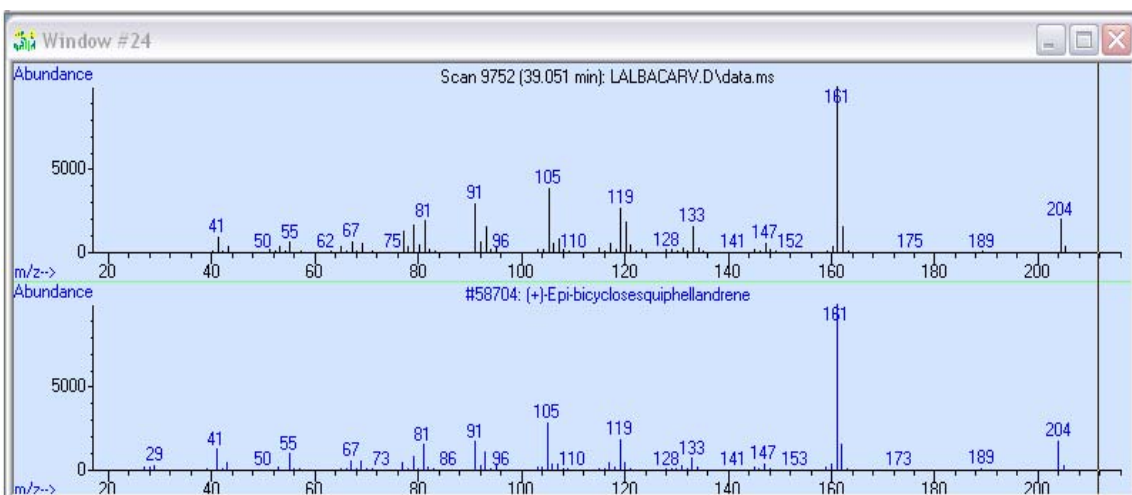
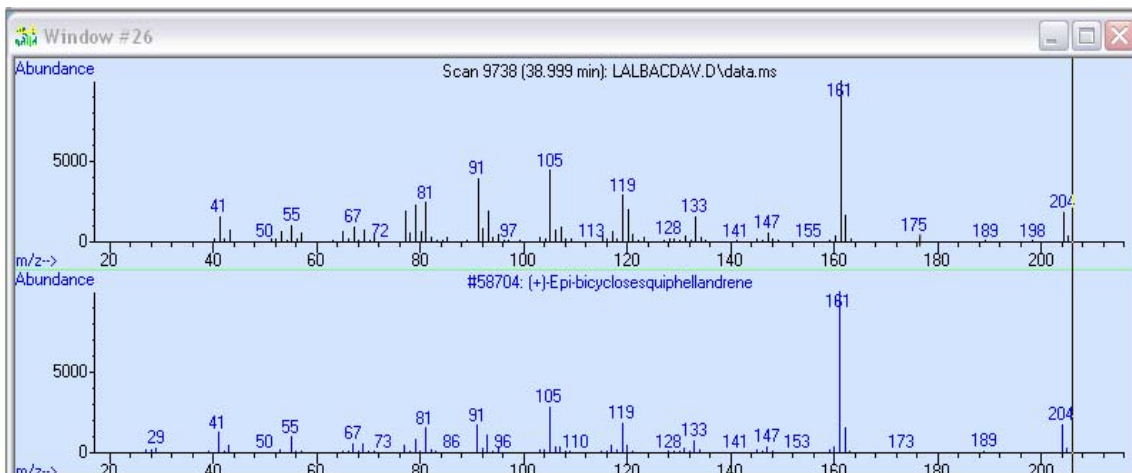


Figura 34. Espectros de masas del biciclosesquifelandreno en el AE *L. alba* (quimiotipo carvona) y el de la fracción obtenida por DAV, comparado con el de la base de datos.

Tabla 26. Índices de retención (I_k) experimental y teórico por columna apolar y polar para el biciclosesquifelandreno.

| Descripción | I_k (apolar) | I_k (polar) |
|--------------|----------------|---------------|
| Experimental | 1491 | 1698 |
| Teórico | 1487 | 1727 |

4.3 CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (TLC)

El procedimiento se realizó como se describió en el **Numeral 2.2.8** del desarrollo experimental.

La muestra obtenida de la destilación por arrastre con vapor de agua, se analizó en placas de celulosa microcristalina – yeso grado 3 de odontología (1:1) y se corrieron en dos eluyentes: hexano y benceno. Después del secado de las placas se sometieron a tres reveladores: cámara UV, vapores de yodo y solución de yodo – yoduro de potasio (I-KI).

Las razones de avance determinadas para las placas cromatográficas corridas en hexano y benceno, dio un valor de $R_f = 1$. Este valor indica que la muestra corrió con el eluyente y además, la fase estacionaria no discriminó entre los compuestos presentes en la mezcla, lo que se confirmó al exponerlas en cámara UV. Razones por las cuales no se logró una separación.

El hexano se escogió por ser apolar y ser el más indicado para muestras de este tipo, aceites esenciales [52–54], y el benceno por tener cierta polaridad, ya que el compuesto de interés, biciclosesquifelandreno, no tiene grupos polares pero si dos dobles enlaces que lo hacen ligeramente polar.

La muestra en vapores de yodo y en solución de I – KI, también tuvo el mismo comportamiento que con los otros solventes, el valor de la razón de avance fue el mismo, $R_f = 1$. Los vapores de yodo hicieron visible el frente del solvente, pero no se observaron manchas de la muestra sobre la placa, ni tampoco con el revelado en cámara UV.

Es importante resaltar en esta investigación que se logró prefraccionar el AE de *L. alba*, quimiotipo carvona, así como también se contribuyó al conocimiento de nuevas plantas aromáticas y medicinales tropicales, como el género *Lippia*, con el fin de beneficiar a la comunidad agrícola campesina y además, impulsar el desarrollo de la industria química de los AE en Colombia.

5. CONCLUSIONES

- ♣ En la identificación de los componentes aislados para cada planta por la técnica extractiva SDE, se encontró que varía ligeramente de la técnica extractiva MWHD; la técnica SDE permitió elucidar, por lo general, compuestos que no se extrajeron por MWHD, lo que fue una ventaja, debido a que las dos técnicas extractivas se complementaron satisfactoriamente, para lograr una identificación más acertada para cada una de las plantas estudiadas.
- ♣ De todas las especies de *Lippia* estudiadas, sólo en el AE y extracto de *L. alba* (quimiotipo carvona) estuvo presente el sesquiterpeno biciclosesquifelandreno.
- ♣ A pesar que las siete plantas estudiadas pertenecen a un mismo género, *Lippia*, el rendimiento del aceite esencial varía considerablemente de una especie a otra, siendo el rendimiento más alto, el correspondiente al de *L. organoides* con un 1,4 %, y el más bajo a *L. dulcis* con 0,13 %.
- ♣ El compuesto común en todas las composiciones de las especies de *Lippia* estudiadas fue el *trans*- β -cariofileno.
- ♣ Todos los aceites se caracterizaron por presentar en mayor concentración monoterpenos oxigenados, a excepción de *L. dulcis*, que tuvo en mayor proporción hidrocarburos sesquiterpénicos (60,12 %), siendo: *trans*- β -cariofileno, δ -cadineno, α -copaeno, los más representativos. Aunque el grupo de monoterpenos oxigenados caractericen a la mayoría de las plantas analizadas en la presente investigación, no tienen en común los

mismos compuestos oxigenados: *L. alba* (quimiotipo carvona) está caracterizada por cetonas cíclicas como carvona, piperitenona y piperitona; el quimiotipo citral está caracterizado por aldehídos α,β -insaturados, neral (22,92 %) y geranial (27,79 %); *L. citriodora* está caracterizada por aldehídos α,β -insaturados, neral (13,75 %) y geranial (14,35 %) y por alcoholes como el eucaliptol (6,51 %); *L. micromera* se caracteriza por compuestos fenólicos y éteres, timol (34,19 %) y timil metil éter (14,44 %), respectivamente; *L. origanoides* (quimiotipo carvacrol) se caracteriza por compuestos fenólicos, carvacrol (32,82 %) y timol (22,83 %); y finalmente para el quimiotipo *p*-cimeno, los hidrocarburos monoterpénicos están casi en la misma proporción que los monoterpenos oxigenados, caracterizándose por tener representantes de ambos grupos: timol (29,84 %) y *p*-cimeno (12,05 %).

- ♣ *L. origanoides* (quimiotipo carvacrol) y *L. micrómera*, poseen características similares, e.g., poseen un olor muy fuerte e intenso, picante. Al analizar sus composiciones químicas, se observa que también son similares en sus compuestos mayoritarios: carvacrol, timol, γ -terpineno y *p*-cimeno.
- ♣ Se logró adecuar la destilación por arrastre con vapor de agua de escala laboratorio a un equipo semindustrial para implementarlo no sólo como técnica de extracción del aceite esencial sino también como un técnica de separación.
- ♣ Se logró por medios físicos, no destructivos, separar al biciclosesquifelandreno de una mezcla de ~50 componentes a una mezcla de sólo 4 componentes, donde el biciclosesquifelandreno fue el mayoritario (76,85 %).

6. RECOMENDACIONES

- ♠ Una ventaja de la destilación por arrastre con vapor de agua es que se obtiene una misma clase de compuestos, pero el tiempo es extenso, con lo que eventualmente se podría disminuir haciendo el arrastre, no con vapor de agua sino con un solvente apolar como hexano, heptano, ciclohexano, o también con una mezcla de algunos de estos solventes con uno más polar.
- ♠ También sería importante a la destilación por arrastre con vapor de agua adecuarle una columna de fraccionamiento, en un principio, con columna *Vigreux*.

BIBLIOGRAFÍA

1. PALÁ, J. Contribución al conocimiento de los aceites esenciales del género “Eryngium” L, en la Península Ibérica. Madrid, Tesis doctoral, 2002, Universidad Complutense de Madrid, pp. 21, 33 – 34.
2. HARBORNE, J. B. Introduction to Ecological Biochemistry. 4 ed. *Academic Press*, **1991**, London.
3. SCHIEST, F. P.; AYASSE, M.; PAULUS, H. F.; LÖFSTEDT, C.; HASSON, B. S.; IBARRA, F. & FRANCKE, W. Sex pheromone mimicry in the early spider orchid (*Ophrys sphegodes*): Patterns of hydrocarbons as the key mechanism pollination by sexual deception. *Journal of Comparative Physiology A* **2000** 186 pp. 567-574.
4. BANERJI, A.; LUTHRIA, D. L. & KOKATE, S. D. Toxicity of Capillin, the insecticidal principle of *Artemisia nilagirica* Clarke. *Indian Journal of Experimental Biology* **1990** 28 pp. 588- 589.
5. YANO, K. & TAKANA, N. Antifeedant activity toward larvae of *Pieris rapae* curivora of aromatic carbonyl compounds related to Capillin isolated from *Artemisia capillaris*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **1995** 59 pp. 1130-1132.
6. ABRAHIM, D.; BRAGUINI, W. L.; KELMER, B. A. M. & ISHII, I. E. L. Effects of four monoterpenes on germination, primary root growth, and mitochondrial respiration of maize. *Journal of Chemical Ecology*, **2000** 26 pp. 611-624.

7. KOBASISY, M.; TELLEZ, M. R.; WEBBER, C. L.; DAYAN, F. E.; M SCHRADER, K. K. & WEDGE, D. E.. Phytotoxic and fungitoxic activities of the essential oil of Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) leaves and its composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001** 49 pp. 3768-3771.

8. GUENTHER, E. The essential Oils. Volume I: History – Origin in plants production – Analysis, 1948, Litton Educational, New York, pp. 241 – 244.

9. WALLACH, O. Zur kenntnis der terpepe und ätherischen öle. Liebigs Annalen der Chemie, **1887** 239 pp. 1-54.

10. BARRIGA, G. Flora Medicinal de Colombia, Tomo II. 2ed., Tercer Mundo, Colombia. **1992**, pp. 495.

11. IKAN, R. Natural Products: A Laboratory Guide. 2ed., Academic Press, Inc., San Diego. **1998**, pp. 168 – 181.

12. STASHENKO, E.E.; JARAMILLO, B.; y MARTÍNEZ, J.R. Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, **2003**, 27, pp. 579 – 597.

13. ZOGHBI, M., ANDRADE, E., SANTOS, A.S., SILVA, H.L., and MAIA, J.G., Essential oils of *Lippia alba* (Mill.). N.E. Brown wild in the Brazilian Amazon. *Flavour. Fragr. J.*, **1998**, 13, pp. 47 – 48.

14. MARTÍNEZ, W.; and FERRUCCI, M. Estudio florístico del Parque Nacional Mburucuyá con énfasis en Verbenáceas. *Comunicaciones Científicas y*

Tecnológicas, UNNE, Argentina, **2005**, [on – line]: [Revisado el 25 de mayo 2006].

15. P. FONT QUER. *Plantas Medicinales, El Dioscórides Renovado*, 1993, Labor, 8 ed., España, pp. 634.
16. BRAGA, M.; EHLERT, A.; MING, L.; and MEIRELES. Supercritical fluid extraction from *Lippia alba*: global yields, kinetic data, and extract chemical composition. *J. Supercrit. Fluids*, **2005**, 34, pp. 149 – 156.
17. GENTRY, A. *Woody plants of northwest South America*. Ed. Conservation International, Washington, **1993**, pp. 833 – 837.
18. PASCUAL, M.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ, D.; and VILLAR, A. *Lippia*: tradicional uses, chemistry and pharmacology. *J. Ethnopharm.*, **2001**, 75, pp. 201 – 214.
19. CRAVEIRO, A.; AÑEXCAR, J.; MATOS, F.; ANDRADE, C.; and MACHADO, M. Essential Oils from Brazilian Verbenaceae genus *Lippia*. *J. Nat. Prod.*, **1981**, 44, pp. 598 – 601.
20. GUPTA, M. P. 270 *Plantas Medicinales Iberoamericanas*, CYTED – SECAB, Bogotá, **1995**, pp. 553 – 554, 557 – 558, 561 – 562, 565.
21. RAMOS, A.; VISOZO, A.; PILOTO, J; GARCÍA, A.; RODRÍGUEZ, C.A.; and RIVERO, R. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. *J. Ethnopharm.*, **2003**, 87, pp. 241 – 246.
22. VALE, T., *et al.* Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown chemotypes. *J. Ethnopharm.*, **1999**, 167, pp. 127 – 133.

23. SIANI, A.; TAPPIN, M.; RAMOS, M.; MAZZEI, J.; RAMOS, M.C.; De AQUINO, F.; and FRIGHETTO, N. Linalool from *Lippia alba*: Study of the reproducibility of the essential oil profile and the enantiomeric purity. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, pp. 3518-3521.
24. SCHROEDER, M.; LÓPEZ, A.; and MARTÍNEZ, G. Resultados preliminares del análisis foliar de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br, *Pluchea sagittalis* (Lamb) Cab., *Petiveria alliacea* L. y *Ocimum selloi* Benth. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*, **2004**, UNNE, Argentina.
25. VIT, P.; SILVA, B.; y MELÉNDEZ, P. *Lippia alba* N.E.Br. Ficha botánica de interés apícola en Venezuela, No. Cidrón. *Revista de la Facultad de Farmacia*, **2002**, 43, pp. 13 – 14.
26. PASCUAL, M.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ, D.; y VILLAR, A. Efectos farmacológicos de la infusión de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown Verbenaceae. II Congreso de Fitoterapia. [on-line]: <http://www.medicina-naturista.ent.html>. [Revisado 19 de abril 2006].
27. TREVISIAN, M.; and MECADO, F. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. *Quim. Nova*, **2003**, 26, pp. 301.
28. BANDONI, A. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica; su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Universidad Nacional de la Plata, La Plata, 1ed., **2000**, pp. 29 – 43, pp. 94 – 96, pp. 149 – 171, pp. 197 – 232, pp. 285 – 298.

29. DURÁN, D. Estudio del aceite esencial de *Lippia alba* (Fam. Verbenaceae) y de los aspectos fisiológicos en diferentes etapas de su crecimiento bajo tres niveles de luz. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Proyecto de Grado, **2005**.
30. GURGEL do VALE, T.; COUTO, E.; SANTOS, J.; and VIANA, G. Central effects of citral, Myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. *Phytomed.*, **2002**, 9, pp. 709 – 714.
31. RICCIARDI, G.; VEGLIA, J.; RICCIARDI, A.; y BANDONI, A. Fitoquímica de Verbenáceas (*Limpias y Aloysias*) del Nordeste Argentino. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*, **2000**. [on–line]:
http://www.plantasmedicinales.org/archivos/fitoquimica_verbenaceas.pdf?HPSESSID=1e496d3726b76699241f4d51c66e30d6.html. [Revisado 10 de mayo 2006].
32. RICCIARDI, G.; y RICCIARDI, A. Efecto de las Variaciones Estacionales sobre la Composición Química del Aceite Esencial de plantas de “*Salvia morada*” de Sáenz Peña (Chaco). *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*, **2001**. [on–line]:
<http://www.unne.edu.ar/cyt/2001/8-Exactas/E-011.pdf>. [Revisado 10 de mayo 2006].
33. HERNÁNDEZ, H.; BONILLA, C.; y SÁNCHEZ, M. Efecto de la fertilización nitrogenada en la producción de biomasa y calidad de aceite esencia en *Lippia alba* (Mill.), *Pronto alivio*, **2004**, 53(1).

34. ZAMORANO, E.; FERNÁNDEZ, J.; VARGAS, G.; RIVERA, P.; and CARBALLO, M. Protective activity of cedron (*Aloysia triphylla*) infusion over genetic damage induced by cisplatin evaluated by the comet assay technique. *Toxicol. Lett.*, **2004**, 152, pp. 85 – 90.
35. CARNAT, A.; CARNAT, P.; FRAISSE, D.; and LAMAISONU, J. The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea. *Fitoterapia*, **1999**, 70, pp. 44 – 49.
36. ZAMORANO, E.; MORALES, C.; RAMOS, D.; SEPÚLVEDA, C.; CARES, S.; RIVERA, P.; FERNÁNDEZ, J.; and CARBALLO, M. Anti-genotoxic effect of *Aloysia triphylla* infusion against acrylamide-induced DNA damage as shown by the comet assay technique. *Mutation Res.*, **2006**, 603, 145 – 150.
37. SOUTO, F.; ECHEVARRÍA, M.; CÁRDENAS, O.; ACUÑA, M.; MELÉNDEZ, P.; and ROMERO, L. Terpenoid composition of *Lippia dulcis*. *Phytochem.*, **1997**, 44(6), pp. 1077 – 1086.
38. PÉREZ, S.; MECKES, M.; PÉREZ, C.; SUSUNAGA, A.; and ZAVALA, M. Anti – inflammatory activity of *Lippia dulcis*. *J. Ethnopharm.*, **2005**, 102, pp. 1 – 4.
39. DOUGLAS, A.; ITO, A.; KENNELLY, E.; KIM, N.; and WESTENBURG, H. Studies on Some Edible and Medicinal Plants of Mesoamerica. *Proc. West. Pharmacol*, **1998**, 41, pp. 253 – 258.
40. DOUGLAS, A.; and DJENDOEL, D. Discovery of terpenoid and phenolic sweeteners from plants. *Pure Appl. Chem.* **2002**, 74(7), pp. 1169 – 1179.

41. GRACIA, A. Perfil Químico de Yerba Dulce (*Lippia dulcis*) In – vitro Aclimatada a Tierra. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, **2002** [on-line]: http://www.prlsmp.org/what_is_prlsmp/Major_Events/PRISM/2002/Abstract/chemistry.htm#GRACIA%20LUGO,%20ALEXIS%20J. [Revisado 18 de mayo 2006].
42. BEYRA, A.; LEÓN, M.; IGLESIAS, E.; FERRÁNDIZ, D.; HERRERA, R.; VOLPATO, G., GODÍNEZ, D.; GUIMARAIS, M.; and ÁLVAREZ, R. Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales en la provincia de Camagüey (Cuba). *Anales del Jardín Botánico de Madrid*. **2004**, 61(2), pp. 185 – 203.
43. TUCKER, A.O.; MACIARELLO, M.J.; ESPAILLAT, J.R.; and FRENCH, E.C. The essential oil of *Lippia micromera* Schauer in DC. (Verbenaceae). *J. Essent. Oil Res.* **1993**, 5(6), pp. 683 – 685.
44. OLIVEIRA, D.; LEITÃO, G.; BIZZO, H.; LOPES, D.; ALVIANO, D.; ALVIANO, C.; and LEITÃO, S. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. *Food Chem.*, **2006**, *in press*.
45. MAISH, J.M. On some useful plants of the natural order of Verbenaceae. *Amer. J. Pharmacy*, **1885**, 57(7), pp. 189 – 199.
46. LEMOS, T.; MATOS, F.; ALENCAR, J.; CRAVEIRO, A.; CLARK, A.; and MCCHESENEY, J. Antimicrobial activity of essential oil of Brazilian plants. *Phytochem. Res.*, **1990**, 4(2), pp. 82 – 84.
47. FIGMAY S.R.L. Columna de destilación fraccionada. Argentina, 6 pp. [on-line]: http://www.figmay.com.ar/pdf/11_columna_de_destilacion_fraccionada.pdf [Revisado el 3 de agosto de 2008].

48. PBS Team Group. Petróleo y gas: destilación por presión reducida. *Colegio Carmen Arriola de Marín*. 2002 [on–line]:
http://www.oni.escuelas.edu.ar/2002/BUENOS_AIRES/pertoleo-y-gas/html/destppr.htm [Revisado el 3 de agosto de 2008].
49. Anónimo, Manual de Prácticas de Laboratorio de Química Orgánica. Universidad de Alcalá, Facultad de Farmacia, Departamento de Química Orgánica. España. [on – line]: http://www2.uah.es/quimicaorganica/docencia/practicas/practicas_quimica_organica_farmacia.pdf. [Revisado el 3 de junio de 2006].
50. AREAL, R., y BESSA, J. La cromatografía de capa fina y sus aplicaciones en el campo textil. Laboratorio de Química Textil, E.T.S.I.I. Tarrasa. Francia. [on – line]:
<http://upcommons.upc.edu/revistes/bitstream/2099/5544/1/Article02.pdf>.
51. GUENTHER, E. The essential Oils. Vol II, 1975, Van Nostrand Reinhold, New York, pp. 113 – 116.
52. TOUCHSTONE, J. Practice of Thin Layer Chromatography. 1992, John Wiley and Sons, Inc. 3 ed., Estados Unidos, pp. 1 – 4, p. 9, pp. 14 – 15, pp. 18 – 19, pp. 28 – 32 y p. 264.
53. RANDEKATH, K. Thin Layer Chromatography. 1964, Verlag Chemie, Academic Press, 2 ed., Alemania, p. VII, pp. 4 – 5, pp. 21 – 24 y pp. 220 – 222.
54. STHAL, E. Thin Layer Chromatography. A laboratory handbook. 1965, Academic Press, única edición, Alemania, pp. 188 – 189.

55. STASHENKO, E.E.; MARTÍNEZ, J.R.; MACKU, C.; y SHIBAMOTO, T. HRGC and GS –MS analysis of essential oil from Colombian ylang- ylang (*Cananga odorata* Hook Fil. Et. Thomso, forma genuine). *J. High Resolt. Chromatogr.*, **1993**, 16, pp. 441 – 444.
56. COMBARIZA, M.Y.; BLANCO, C.; STASHENKO, E.E., and SHIBAMOTO, T. “Limonene concentrations in lemon (*Citrus volcameriana*) peel oil as a function of ripeness”. *J. High Resolt. Chromatogr.*, **1994**, 17, pp. 643 – 646.
57. GODEFROOT, M; SANDRA, P. and VERSALE, M. “New method for quantitative essential oil analysis”. *J. Chromatogr., A*, **1981**, 203, pp. 325 – 335.
58. PARÉ, J.R.J. US Patent, 5.002.752, **1991**.
59. STASHENKO, E.E.; COMBARIZA, Y.; PUERTAS, A.M. Aceites esenciales técnicas de extracción y análisis. Laboratorio de fitoquímica y cromatografía. Bucaramanga. Colombia: **1998**, 30 p.
60. STASHENKO, E.E.; QUIROZ, N. and MARTÍNEZ, J.R. “HRGC/FID/NPD and HRGC/MSD study of Colombian ylang – ylang (*Cananga odorata*) oils obtained by different extraction techniques”. *J. High Resol. Chromatogr.* **1996**, 19, pp. 359 – 362.
61. STASHENKO, E.E.; CERVANTES, M.; COMBARIZA, Y.; FUENTES, H., and MARTÍNEZ, J.R. “HRGC/FID and HRGC/MSD Analysis of the secondary metabolites obtained by different extraction methods from *Lepechinia schiedeana*, and *in vitro* evaluation of its antioxidant activity”. *J. High Resol. Chromatogr.*, **1999**, 22, pp. 343 – 349.

62. STASHENKO, E.E.; PUERTAS, M.A. and COMBARIZA, M.Y. "Volatile secondary metabolites from *Spilanthes americana* obtained by simultaneous steam distillation-solvent extraction and supercritical fluid extraction". *J. Chromatogr. A*, 1996, 752, pp. 223-232.
63. ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Carol Stream, Allured Publishing Corporation, Illinois, **2004**, 456p.
64. KOVÁTS, E. Gas chromatography characterization of organic substances in the retention index System. *Advan. Chromatogr.*, **1965**, 1, pp. 229 – 247.
65. DAVIES, N.W. Gas chromatographic retention indices of monoterpenos and sesquiterpenos on methyl silicone and Carbowax 20M phases. *J. Chromatogr.* **1990**, 503, pp. 1 – 24.
66. Anónimo, BIBLIOTECA DIGITAL DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE. Capítulo 7: Estereoquímica, Sistemas de Servicios de Información y Bibliotecas, SISIB. pp. 219–221. [on–line]:
http://mazinger.sisb.uchile.cl/repositorio/ap/ciencias_quimicas_y_farmacenticas/m20029101320estereoquimica.doc. [Revisado el 3 de junio 2006].
67. TERHUNE, S.T.; HOGG, J.W.; and LAWRENCE, B.M. Bicyclosesquiphellandrene and 1 – epiBicyclosesquiphellandrene: two new dienes based on the cadalene skeleton. *Phytochem.*, **1974**, 13, pp. 1183 – 1185.

68. STASHENKO, E.E; JARAMILLO, B.E.; MARTÍNEZ, J.R. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its *in vitro* antioxidant activity. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1025, pp. 93 – 103.
69. DENNY, E. Hidro–destillation of oil from aromatic herbs. *Perfumer & Flavorist*. **1989**, 14, p. 57.
70. DOMÍNGUEZ, A.X. Métodos de investigación fotoquímica. Limusa: México D.F. **1988**, p. 229, p. 239, p. 281.
71. OLADIMEJI, F.A.; ORAFIDIYA, L.O.; and OKEKE, I.N. Physical properties and antimicrobial activities of leaf essential oil of *Lippia multiflora* Moldenke. *Int. J. Aromather.*, **2004**, 14, pp. 162 – 168.
72. PINO, J.A.; ORTEGA, A.G.; PÉREZ, A.; RODRÍGUEZ, M.; and BALUJA, R. Composición y propiedades del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown. *Rev. Cub. Farm.*, **1997**, 30(1), 30p.
73. PINO, J.A.; ORTEGA, A.G.; and ROSADO, A. Chemical composition of the essential oil of *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown from Cuba. *J. Essent. Oil Res.* **1996**, 8(4), pp. 445 – 446.
74. CASTRO, H.T. Aislamiento e R–(–)–carvona por derivación química selectiva del aceite esencia de *Lippia alba*. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga. Bucaramanga, Proyecto de Grado, **2002**.
75. McLAFFERTY, F.W.; and TURECEK, F. Interpretation of mass spectra. California: University Science Books, **1993**, 374p.

76. MELTCHING, S.; BÜLOW, N.; WIHSTUTZ, K.; JUNG, S.; and KÖNIG W.A. Natural occurrence of both enantiomers of cadina-3,5-diene and α -amorphene. *Phytochem.*, **1997**, 44(7), pp. 1291–1296.
77. LAWRENCE, B.M.; TERHUNE, S.J.; and HOGG, J.W. Widespread occurrence of two heteroannular dienes of the cadalane skeleton. *Phytochem.*, **1973**, 12, pp. 827 – 833.
78. TAVARES, E.S.; JULIÃO, L.S.; LOPES, D.; BIZZO, H.R.; LAGE, C.L.; and LEITÃO, S.G. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes; *Revista Brasileira de Farmacognosia*; **2005**, 15(1), pp. 1 – 5.
79. CÁRDENAS, C.Y.; and DUARTE, S. Estudio del ciclo circadiano de la carvona en la hojas de *Lippia alba* (Fam. Verbenaceae). Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Proyecto de Grado, **2007**, 184 p.
80. ROSSITE, K.J. Structure–odor relationships. *Chem. Rev.* **1996**, 96, pp. 3201 – 3240.
81. DEWICK, P.M. Medicinal natural products a biosynthetic approach. **2002**, John Wiley & Sons, Ltd, 2ed, England, p. 174, pp. 181 – 182.
82. LIU, R.; ZHAO, F.; FUJITA, S.; and ARAI, M. Selective hydrogenation of citral with transition metal complexes in supercritical carbon dioxide. *Appl. Cat. A*, **2007**, 316, pp. 127 – 133.

- 83.** CELIS, C.N. Estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de *Lippia alba*, *Lippia origanoides* y *Phyla (Lippia) dulcis*, especies de la familia Verbenaceae. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Proyecto de Grado, **2007**, pp. 84 – 108.
- 84.** MONSALVE, L.A. Comparación de la composición química de los aceites esenciales de las plantas de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, provenientes de diferentes regiones de Colombia. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Proyecto de Grado, **2007**, pp. 76 – 80, pp. 88 – 95, pp. 112 – 121.
- 85.** CRABAS, N.; MARONGIU, B.; PIRAS, A.; PIVETTA, T.; and PORCEDDA, S. Extraction, Separation and Isolation of volatiles and dyes from *Calendula officinalis* L. and *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton by Supercritical CO₂. *J. Essent. Oil Res.* **2003**, 15, pp. 350 – 355.
- 86.** SANTOS, P.C.; and FERNANDES, M. Composition of the Essential Oils from Flowers and Leaves of Vervain [*Aloysia triphylla* (L'Herit.) Britton] Grown in Portugal. *J. Essent. Oil Res.* **2005**, 17, pp. 73 – 78.
- 87.** CARNAT, A.; CARNAT, A.P.; FRAISSE, D.; and LAMAISON, J.L. The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea. *Fitoterapia.* **1999**, 70, pp. 44 – 49.
- 88.** BELLAKHDAR, J.; IDRISSE, A.; IGLESIAS, J.; and VILA, R. Composition of lemon verbena (*Aloysia triphylla* (L'Herit.) Britton) oil of Moroccan origin. *J. Essent. Oil Res.* **1994**, 6, pp. 523 – 526.

89. ZYGADLO, J.A.; LAMARQUE, A.L.; MAESTRI, M.D.; GUZMÁN, C.A.; ÑICOMO, E.I.; GROSSO, N.R.; and ARIZA-ESPINAR, R. Volatile constituents of *Aloysia triphylla* (L'Herit.) Britton. *J. Essent. Oil Res.* **1994**, 6, pp. 407 – 409.
90. PÉREZ, S.; MECKES, M.; PÉREZ, C.; SUSUNAGA, A.; and ZAVALA, M.A. Anti – inflammatory activity of *Lippia dulcis*. *J. Ethnopharm.* **2005**, 102, 1 – 4.
91. HUDAIB, M.; SPERONI, E.; Di PIETRA, A.M.; and CAVRINI, V. GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2002**, 29, pp. 691 – 700.
92. DOS SANTOS, F.J.B.; LOPES, J.A.; GRAÇAS, A.M.; OLIVEIRA, E.; LIMA, S.; and REIS A.M. Composition and Biological Activity of Essential Oils from *Lippia origanoides* H.B.K. *J. Essent. Oil Res.*, **2004**, 16, pp.504 – 506.
93. POULOSE, A.J.; and CROTEAU, R. Biosynthesis of aromatic monoterpenos. Conversion of α -terpinene to p-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **1978**, 187, pp.307 – 314.
94. TAINTER, D.R.; and GRENIS, A.T. *Spices and seasonings*. New York: VCH Publishers, Inc., **1993**, p. 251.
95. JARVIS, A.; ARCOS, A.; RODRÍGUEZ, H.J.; OBERTHÜ, T.; PATERNINA, M.J.; and MELO, N. Phenotypic variation in important economic species of medicinal plants and its implications for product quality management high value chains. *International Centre for Tropical Agriculture, CIAT, Annual Report*, **2006**, pp. 18 – 30.

96. FLEISHER, A.; and SNEER, N. Oregano spices and *Origanum* chemotypes. *Journal Science Food Agriculture*. **1982**, 33, 441 – 446.
97. LAWRENCE, B.M. The botanical and chemical aspects of oregano. *Perfumer and Floavorist*. **1984**, 9, 41 – 51.
98. STASHENKO, E.E.; *et al.* Estudio integral de especies aromáticas y medicinales tropicales promisorias para el desarrollo competitivo y sostenible de la agroindustria y de esencias, extractos y derivados naturales en Colombia. Contrato COLCIENCIAS RC 432, **2004**.
99. GUZMÁN, S.P.; CARDOZO, R.; and GARCÍA, V. Desarrollo agrotecnológico de *Lippia alba* (Miller) N.E.Br ex Britton y Wilson. *Gillermo de Ockham*, **2004**, 7(1), pp. 201 – 215.