

**ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA
DE LOS ACEITES ESENCIALES DE 2 QUIMIOTIPOS DE *Lippia alba* (Mill.)
N.E.Br., EN FUNCIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN Y SECADO
DE LA PLANTA.**

GERMÁN AUGUSTO GÓMEZ RÍOS

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

2007

**ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA
DE LOS ACEITES ESENCIALES DE 2 QUIMIOTIPOS DE *Lippia alba* (Mill.)
N.E.Br., EN FUNCIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN Y SECADO
DE LA PLANTA.**

GERMÁN AUGUSTO GÓMEZ RÍOS

**Trabajo de Grado presentado como requisito
parcial para optar el Título de Químico**

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

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

2007

DEDICATORIA

A Dios, por la vida que me ha regalado y las oportunidades que me ha ofrecido

A mis padres, Germán y Carmen Cecilia, por la formación que me han dado

A mi tías, Helena, Rosalba y Beatriz por cuidarme siempre como a un hijo

A mi hermana, Viviana, por siempre la niña de mis ojos

A Diana, mi chiquita, por su amor desinteresado

AGRADECIMIENTOS

Seguramente ni siquiera todas las páginas de éste texto escritas únicamente con la palabra “gracias” alcanzarían para gratificarle a la Dra. Elena Stashenko por sus enseñanzas, orientaciones y recomendaciones durante el desarrollo de éste proyecto. Además, alguien que con su carisma, perseverancia y desarrollo cultural, ha sido y será fundamental en el desarrollo de mi formación personal.

Al Dr. Jairo René Martínez Morales, por haber estado siempre disponible, aún cuando no lo estaba, brindándonos su orientación y apoyo en la solución de cualquier dificultad. Y por ser un óptimo ejemplo de vida científica y social.

A toda mi familia, por haber confiado siempre en mí y haberme permitido alcanzar este logro, por apoyarme todos los días de mi vida, y enseñarme que la única persona que hay que superar, es a uno mismo. Por haber instituido en mí la confianza en Dios, y por haberme formado como soy. Gracias por que ustedes son los mejores padres, hermana, tíos y primos que pude haber tenido.

A mi chiquita, por haber estado conmigo durante estos dos años, y como dice Gabo: "Puedes ser solamente una persona para el mundo, pero para mi tú eres el mundo."

A mis compañeros y amigos de la Universidad, Nelson, Gregory, Mónica, Rosdany, Carito, Baycast, María Jimena, el chamo, Néstor, Tato, y en especial, a los tres angelitos que me cuidaron siempre: Totico, Natica y Camilita, por su apoyo incondicional, su compañía y cariño, y por las bellas experiencias en ésta etapa de mi vida.

A los mejores amigos del mundo, Juank, Sheby, el Negro y Jairo, que han estado en las buenas y las malas desde siempre, para que estén conmigo en este constante caminar por siempre.

A todos mis compañeros y amigos del Laboratorio Cromatografía y CENIVAM, por su compañía, soporte y consejos durante mi permanencia, en especial, a Deya, Willi, Geobis, Barichara, Elkin, Amanda, Martha y Camilo por su exclusiva atención e incontables asesorías técnicas ante cualquier duda. A Kate, Goyo, Teto, Lala y Víctor por su apoyo en las últimas instancias. A Cesar y Lucho por su incondicional e instantánea colaboración en el desarrollo experimental de la tesis.

Al pueblo colombiano que ha luchado por la existencia de universidades públicas de alto nivel académico, como la Universidad Industrial de Santander, y a esta, por realizar mi sueño de formarme como químico. Así como a cada uno de los profesores que dieron lo mejor de si mismos para que yo lo alcanzara.

A todos los grupos de investigación que estudiaron la bioactividad de los aceites esenciales obtenidos: CINTROP (Universidad Industrial de Santander), Grupo de Infección y Cáncer (Universidad de Antioquia), Grupo de Polifenoles (Universidad Tecnológica de Pereira), y el Grupo de Química Computacional y Ambiental (Universidad de Cartagena).

RESUMEN:

TÍTULO: ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE 2 QUIMIOTIPOS DE *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br., EN FUNCIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN Y SECADO DE LA PLANTA.*

Autor: Germán Augusto Gómez Ríos**

Palabras clave: *Lippia alba*, aceite esencial, hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHD), secado en horno, análisis de componentes principales (PCA), actividad biológica.

La especie *Lippia alba*, familia *Verbenaceae*, ha sido de gran interés por la diversidad de los metabolitos secundarios volátiles presentes en sus aceites esenciales, y la variedad de usos botánicos y etnofarmacológicos.

En el presente estudio se realizó un análisis comparativo de la composición química de los AEs de los quimiotipos “Carvona” y “Citral” de *Lippia alba*, en función de diferentes condiciones de secado de la planta en horno (tiempo y temperatura), y su extracción (tiempo) por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD), y su incidencia sobre el rendimiento y la actividad biológica de los AEs obtenidos.

Los AEs fueron caracterizados por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS). Los compuestos mayoritarios identificados en los AEs del quimiotipo “Citral” son: geranial, neral, geraniol, *trans*- β -cariofileno y nerol, y para el quimiotipo “Carvona” son: carvona, limoneno, biciclosesquifelandreno, piperitona y piperitenona. El aumento de la temperatura y el tiempo de secado están relacionados con el incremento en el rendimiento de los AEs de ambos quimiotipos de *Lippia alba*. A mayor tiempo de extracción para hojas frescas del quimiotipo “Citral”, incrementó el rendimiento de los AEs. En ambos quimiotipos disminuyó el contenido de sus componentes principales a medida que aumentaba el tiempo de extracción para plantas frescas. Conforme aumentó el tiempo y temperatura de secado, se observó un acrecentamiento en el contenido de neral y geranial, y la disminución de nerol y geraniol. No hubo efecto significativo de la temperatura y duración del secado sobre la composición química de los AEs del quimiotipo “Carvona”.

Los AEs del quimiotipo “Citral” fueron activos contra *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, y epimastigotes y promastigotes de *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania chagasi*, respectivamente. Los AEs del quimiotipo “Carvona” no fueron tóxicos en células VERO.

*Trabajo de grado

** Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Directores: Elena Stashenko, Jairo René Martínez.

ABSTRACT:

TITLE: ANALYSIS OF THE CHEMICAL COMPOSITION AND THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OILS FROM 2 CHEMOTYPES OF *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br., DEPENDING AS A FUNCTION OF EXTRACTION AND DRYING CONDITIONS.*

Author: Germán Augusto Gómez Ríos**

Key Words: *Lippia alba*, essential oil, microwave assisted hydro-distillation (MWHD), oven drying, principal components analysis (PCA), biological activity.

The *Lippia alba* species, of the *Verbenaceae* family, have received great attention because of the diversity of their volatile secondary metabolites, and the wide range of biological and ethnopharmacological uses.

Essential oils (EOs) of the “Carvone” and “Citral” chemotypes, were obtained under different oven drying conditions (temperature and time) and extraction times (microwave assisted hydro-distillation). The composition, extraction yield and biological activities of these oils were compared.

The EOs were characterized by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The main compounds identified in the “Citral” chemotype oils were: geranial, neral, geraniol, *trans*- β -caryophyllene and nerol. Those found in the “Carvone” chemotype were: carvone, limonene, bicyclosesquiphellandrene, piperitone and piperitenone. The increase in drying temperature and time were related to the boost in the yield from both *Lippia alba* chemotypes. Higher extraction times led to higher yields from fresh leaves of the “Citral” chemotype. For fresh leaves of both chemotypes, the main component concentrations decreased when longer extraction times were used. The increase in drying time and temperature resulted in higher concentrations of neral and geranial, and lower concentrations of nerol and geraniol. No significant effect was observed on the “Carvone” chemotype EOs composition, when drying time and temperature were varied.

The “Citral” chemotype EOs have showed inhibitory activity against *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, and epimastigotes and promastigotes of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania chagasi*, respectively. The “Carvone” chemotype EOs were not toxic towards VERO cells.

*College thesis

**Science Faculty, School of Chemistry. Directed by Elena Stashenko, Jairo René Martínez.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	16
1. ESTADO DEL ARTE	21
1.1 GENERALIDADES DE LOS ACEITES ESENCIALES	21
1.1.1 Definición	21
1.1.2 Composición química	21
1.1.3 Biogénesis de aceites esenciales	22
1.1.3.1 Metabolitos secundarios volátiles	22
1.1.4 Propiedades físico-químicas	26
1.1.5 Aplicaciones	27
1.2 SECADO DEL MATERIAL VEGETAL	28
1.2.1 Objetivos	28
1.2.2 Parámetros del secado	29
1.2.3 Variables del secado	30
1.2.4 Humedad	31
1.2.5 Métodos de secado	32
1.3 EXTRACCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS	35
1.3.1 Hidrodestilación asistida por la radiación del microondas (MWHD)	36
1.4 ANÁLISIS Y CONTROL DE CALIDAD DE LOS ACEITES ESENCIALES	38
1.4.1 Cromatografía de gases	39
1.4.2 Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas	41

1.5	<i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E. Brown	42
1.6	ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE <i>Lippia alba</i> (Mill). N.E. Brown	53
1.7	CIENCIOMETRÍA	55
1.7.1	Base de datos <i>Elservier (Scopus)</i>	56
1.7.1.1	Relación país – número de publicaciones	56
1.7.1.2	Relación año – número de publicaciones	57
1.7.1.3	Relación área de estudio – número de publicaciones	58
1.7.1.4	Relación revista – número de publicaciones	59
1.7.2	Base de datos <i>Web of Science (ISI Web of Knowledge, Thomson)</i>	60
1.7.2.1	Relación año – número de publicaciones	60
1.7.2.2	Relación país – número de publicaciones	61
1.7.2.3	Relación revista – número de publicaciones	61
1.7.2.4	Relación área de estudio – número de publicaciones	62
1.8	MERCADO MUNDIAL DE ACEITES ESENCIALES	63
1.9	ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES	69
2.	METODOLOGÍA	71
2.1	CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA	71
2.2	SECADO DEL MATERIAL VEGETAL	71
2.3	EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES	72
2.4	ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO	73
2.4.1	Análisis GC en columna apolar	74
2.4.2	Análisis GC en columna polar	74
2.4.3	Identificación	76
2.4.4	Cuantificación	77
2.5	RESULTADOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA	77
3.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	79

3.1	DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE LAS PLANTAS	79
3.1.1	<i>Lippia alba</i> (Mill) N.E. Brown, quimiotipo “Citral”	80
3.1.2	<i>Lippia alba</i> (Mill) N.E. Brown, quimiotipo “Carvona”	80
3.2	ACEITES ESENCIALES OBTENIDOS VARIANDO EL TIEMPO Y LA TEMPERATURA DE SECADO DE LA PLANTA, Y DURACIÓN DE EXTRACCIÓN POR MWHD	80
3.2.1	<i>Lippia alba</i> (Mill) N.E. Brown, quimiotipo “Citral”	81
3.2.1.1	Curvas de secado de plantas de <i>Lippia alba</i> , quimiotipo “Citral”	81
3.2.1.2	Derivadas de las curvas de secado, quimiotipo “Citral”	82
3.2.1.3	Rendimiento de los aceites esenciales del quimiotipo “Citral”	85
3.2.1.4	Caracterización química por GC-MS de los aceites esenciales de <i>Lippia alba</i> , quimiotipo “Citral”	90
3.2.2	<i>Lippia alba</i> (Mill) N.E. Brown, quimiotipo “Carvona”	102
3.2.2.1	Curvas de secado de plantas de <i>Lippia alba</i> , quimiotipo “Carvona”	102
3.2.2.2	Derivadas de las curvas de secado, quimiotipo “Carvona”	104
3.2.2.3	Rendimiento de los aceites esenciales del quimiotipo “Carvona”	106
3.2.2.4	Caracterización química por GC-MS de los aceites esenciales de <i>Lippia alba</i> , quimiotipo “Carvona”	111
3.3	ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE LOS AEs DE <i>Lippia alba</i> , OBTENIDOS EN FUNCIÓN DEL TIEMPO Y LA TEMPERATURA DE SECADO DE LA PLANTA, Y LA DURACIÓN DE EXTRACCIÓN POR MWHD	122
3.4	IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LOS AEs DE <i>Lippia alba</i>	126
3.4.1	Limoneno	127
3.4.2	Carvona	128
3.4.3	Geranial	130

3.4.4	Geraniol	131
3.4.5	<i>trans</i> - β -Cariofileno	133
3.5	EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE <i>Lippia alba</i>	135
3.5.1	Actividad anti- <i>Candida</i> y anti- <i>Aspergillus</i>	135
3.5.2	Ensayo de toxicidad frente <i>Artemia franciscana</i>	135
3.5.3	Ensayos de actividad antibacterial	136
3.5.3.1	<i>Bacillus cereus</i>	137
3.5.3.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	138
3.5.3.3	<i>Salmonella tiphymurium</i>	139
3.5.3.4	<i>Salmonella gallinarium</i>	140
3.5.4	Ensayos de actividad anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> y anti- <i>Leishmania chagasi</i> en sus formas extracelulares y citotoxicidad en células VERO	141
3.5.4.1	Citotoxicidad de células VERO	141
3.5.4.2	Actividad de los AEs en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	143
3.5.4.3	Actividad de los AEs en promastigotes de <i>Leishmania chagasi</i>	144
4.	CONCLUSIONES	147
5.	RECOMENDACIONES	150
6.	BIBLIOGRAFÍA	152

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Principales rutas en la biosíntesis de metabolitos secundarios de plantas y su relación con el metabolismo primario.	24
Figura 2. Estructura de un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS).	40
Figura 3. Ubicación geográfica de los 7 quimiotipos básicos de la especie <i>Lippia alba</i> estudiados.	49
Figura 4. Relación entre los países y el número de publicaciones de <i>Lippia alba</i> .	56
Figura 5. Relación entre el año y el número de publicaciones de <i>Lippia alba</i> .	57
Figura 6. Relación entre el área de estudio y el número de publicaciones de <i>Lippia alba</i> .	58
Figura 7. Relación entre revistas científicas y el número de publicaciones sobre <i>Lippia alba</i> .	59
Figura 8. Relación entre el año y el número de publicaciones de <i>Lippia alba</i> .	60
Figura 9. Relación entre el país y el número de publicaciones de <i>Lippia alba</i> .	61
Figura 10. Relación entre revistas científicas y el número de publicaciones sobre <i>Lippia alba</i> .	62
Figura 11. Relación entre el área de estudio y el número de publicaciones de <i>Lippia alba</i> .	63
Figura 12. Importadores líderes de la UE y proveedores más importantes de aceites esenciales, porcentaje del valor total de importaciones en el 2003.	66
Figura 13. Exportadores líderes de la UE y destinatarios más importantes	67

de aceites esenciales, porcentaje del valor total de exportaciones en el 2003.

- Figura 14.** Importaciones en Colombia de mezclas odoríferas y aceites esenciales por país de origen (1998-2002). 68
- Figura 15.** Exportaciones de Colombia de mezclas odoríferas y aceites esenciales (1998-2002). 68
- Figura 16.** Estufa de secado marca *Indumegas* (Bucaramanga, Colombia). 72
- Figura 17.** Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Plus Series GC System* acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 5973 Network*, equipado con un puerto de inyección *split/splitless* y un inyector automático *Agilent 7863*. Se indica la programación de la temperatura del horno para análisis en columna apolar. 75
- Figura 18.** Cromatógrafo *Agilent Technologies 6890N Network, Series GC*, acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 5975*, ionización por impacto de electrones, un puerto de inyección *split/splitless* y un inyector automático *Agilent Technologies 7683B Series injector*. Se indica la programación de la temperatura del horno para análisis en la columna polar. 76
- Figura 19.** Plantas de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral” (izquierda) y “Carvona” (derecha). 80
- Figura 20.** Curvas de secado del quimiotipo “Citral”, utilizando temperaturas entre 30 y 80°C. 81
- Figura 21.** Derivadas de las curvas de secado del quimiotipo “Citral” utilizando temperaturas entre 30 y 80°C. 83
- Figura 22.** Nomenclatura empleada en los experimentos de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”. 85
- Figura 23.** Comparación de los máximos rendimientos de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”, obtenidos en el rango de temperaturas 87

de 30 a 80°C.

- Figura 24.** Comparación de los rendimientos de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”, obtenidos en el rango de temperaturas de 40 a 80°C, con 1 h de secado, y la planta fresca, empleando 45 min de extracción. 87
- Figura 25.** Comparación de los rendimientos de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”, obtenidos de plantas frescas, empleando diferentes tiempos de extracción. 88
- Figura 26.** Comparación de los rendimientos de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”, obtenidos bajo diferentes tiempos de secado en el rango de temperaturas de 40 a 80°C. 89
- Figura 27.** Perfil cromatográfico típico de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”, obtenidos por MWHD. Columna DB-5MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los compuestos se reporta en la **Tabla 9**. 97
- Figura 28.** Relación “Área del compuesto”-“Área del estándar interno”, de los compuestos mayoritarios de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”, reportados en la **Tabla 8**. 98
- Figura 29.** Relación “Área del compuesto”-“Área del estándar interno”, de los compuestos mayoritarios de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”, obtenidos de plantas frescas bajo diferentes tiempos de extracción. 99
- Figura 30.** Relación “Área del compuesto”-“Área del estándar interno”, de los compuestos mayoritarios de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”, obtenidos bajo diferentes tiempos de secado en el rango de temperaturas de 40 a 80°C. 99
- Figura 31.** Curvas de secado del quimiotipo “Carvona” utilizando temperaturas de 30 a 80°C. 102
- Figura 32.** Derivadas de las curvas de secado del quimiotipo “Carvona” 104

utilizando temperaturas de 30 a 80°C.

- Figura 33.** Nomenclatura empleada en los experimentos de *Lippia alba*, 106
quimiotipo “Carvona”.
- Figura 34.** Comparación de los máximos rendimientos de los AEs de *Lippia* 108
alba, quimiotipo “Carvona”, obtenidos en el rango de
temperaturas de 30 a 80°C.
- Figura 35.** Comparación de los rendimientos de los AEs de *Lippia alba*, 108
quimiotipo “Carvona”, obtenidos en el rango de temperaturas de
40 a 80°C, con 1 h de secado, y la planta fresca, empleando 45
min de extracción.
- Figura 36.** Comparación de los rendimientos de los AEs de *Lippia alba*, 109
quimiotipo “Carvona”, obtenidos de plantas frescas, empleando
diferentes tiempos de extracción.
- Figura 37.** Comparación de los rendimientos de los AEs de *Lippia alba*, 110
quimiotipo “Carvona”, obtenidos bajo diferentes tiempos de
secado en el rango de temperaturas de 40 a 80°C.
- Figura 38.** Perfil cromatográfico típico de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo 117
“Carvona”, obtenidos por MWHD. Columna DB-5MS (60m).
Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los
compuestos se reporta en la **Tabla 13**.
- Figura 39.** Relación “Área del compuesto”-“Área del estándar interno”, de 119
los compuestos mayoritarios de los AEs de *Lippia alba*,
quimiotipo “Carvona”, con los mayores rendimientos reportados
en la **Tabla 12**.
- Figura 40.** Relación “Área del compuesto”-“Área del estándar interno”, de 119
los compuestos mayoritarios de los AEs de *Lippia alba*,
quimiotipo “Carvona”, obtenidos de plantas frescas bajo
diferentes tiempos de extracción.
- Figura 41.** Relación “Área del compuesto”-“Área del estándar interno”, de 120

los compuestos mayoritarios de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Carvona”, obtenidos bajo diferentes tiempos de secado en el rango de temperaturas de 40 a 80°C.

- Figura 42.** Análisis de componentes principales (PCA) de los compuestos presentes en los AEs de dos quimiotipos de *Lippia alba*, según su relación “Área de compuesto”-“Área del estándar interno”, aislados por MWHD, variando las condiciones de secado y extracción. 123
- Figura 43.** Análisis de componentes principales (PCA) de los compuestos presentes en los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”, según su relación “Área de compuesto”-“Área del estándar interno”, aislados por MWHD, variando las condiciones de secado y extracción. 125
- Figura 44.** Análisis de componentes principales (PCA) de los compuestos presentes en los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Carvona”, según su relación “Área de compuesto”-“Área del estándar interno”, aislados por MWHD, variando las condiciones de secado y extracción. 126
- Figura 45.** Espectro de masas del limoneno (EI, 70eV). 127
- Figura 46.** Espectro de masas de la carvona (EI, 70eV). 129
- Figura 47.** Espectro de masas del geranial (EI, 70eV). 130
- Figura 48.** Espectro de masas del geraniol (EI, 70eV). 132
- Figura 49.** Espectro de masas del *trans*- β -cariofileno (EI, 70eV). 133
- Figura 50.** Porcentajes de inhibición de los AEs contra *Bacillus cereus*. 138
- Figura 51.** Porcentajes de inhibición de los AEs contra *Staphylococcus aureus*. 139
- Figura 52.** Porcentajes de inhibición del AE LAC454009 contra *Salmonella tiphymurium* y *Salmonella gallinarium*. 140

LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1.	Clasificación de los parámetros analíticos utilizados para el control de la calidad de los AEs.	38
Tabla 2.	Variación química de los AEs de <i>Lippia alba</i> de diferentes regiones del planeta.	48
Tabla 3.	Principales usos de los aceites esenciales en países de la UE.	64
Tabla 4.	Pruebas de actividad biológica realizadas en los grupos de investigación adscritos al CENIVAM.	78
Tabla 5.	Números de <i>voucher</i> COL de los quimiotipos de <i>Lippia alba</i> .	79
Tabla 6.	Porcentaje final del peso del material vegetal a cada temperatura, quimiotipo "Citral".	82
Tabla 7.	Tiempos de secado para cada temperatura, escogidos para realizar las extracciones de los aceites esenciales de <i>Lippia alba</i> , quimiotipo "Citral".	84
Tabla 8.	Rendimientos de los AEs obtenidos por MWHD, de plantas de <i>Lippia alba</i> , quimiotipo "Citral", bajo diferentes condiciones de extracción y secado.	86
Tabla 9.	Cantidad relativa (%) de los principales componentes de los aceites esenciales de <i>Lippia alba</i> , quimiotipo "Citral", aislados por MWHD.	91
Tabla 10.	Porcentaje final del peso del material vegetal a cada temperatura, quimiotipo "Carvona".	103
Tabla 11.	Tiempos de secado para cada temperatura, escogidos para realizar las extracciones de los aceites esenciales de <i>Lippia alba</i> , quimiotipo "Carvona".	105

Tabla 12.	Rendimientos de los AEs obtenidos por MWHD, de plantas de <i>Lippia alba</i> , quimiotipo “Carvona”, bajo diferentes condiciones de extracción y secado.	107
Tabla 13.	Cantidad relativa (%) de los principales componentes de los aceites esenciales de <i>Lippia alba</i> , quimiotipo “Carvona”, aislados por MWHD.	112
Tabla 14.	Concentración mínima inhibitoria de los AEs de <i>Lippia alba</i> , quimiotipos “Citral” y “Carvona”, obtenidos variando las condiciones de extracción y secado, de los hongos <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Aspergillus fumigatus</i> .	136
Tabla 15.	Toxicidad aguda (CL ₅₀) de los AEs, de dos quimiotipos de <i>Lippia alba</i> , obtenidos variando las condiciones de extracción y secado.	137
Tabla 16.	Datos de inhibición de los AEs contra <i>Bacillus cereus</i> .	138
Tabla 17.	Datos de inhibición de los AEs contra <i>Staphylococcus aureus</i> .	139
Tabla 18.	Datos de inhibición del AE LAC454009 contra <i>Salmonella tiphymurium</i> .	139
Tabla 19.	Datos de inhibición del AE LAC454009 contra <i>Salmonella gallinarium</i> .	140
Tabla 20.	Citotoxicidad de los AEs de <i>Lippia alba</i> , quimiotipo “Citral”, en células VERO.	142
Tabla 21.	Actividad de los AEs de <i>Lippia alba</i> , quimiotipo “Citral”, en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	144
Tabla 22.	Actividad de los AEs de <i>Lippia alba</i> , quimiotipo “Citral”, en promastigotes de <i>Leishmania chagasi</i> .	145

LISTA DE ESQUEMAS

	Pág.
Esquema 1. Principales rutas en la biosíntesis de los compuestos mayoritarios de los diferentes quimiotipos de <i>Lippia alba</i> .	47
Esquema 2. Posibles rutas de fragmentación del limoneno.	128
Esquema 3. Posibles rutas de fragmentación de la carvona.	129
Esquema 4. Posibles rutas de fragmentación del geranial.	131
Esquema 5. Posibles rutas de fragmentación del geraniol.	132
Esquema 6. Posibles rutas de fragmentación del <i>trans</i> - β -cariofileno.	134

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AE	Aceite esencial.
AEs	Aceites esenciales.
°C	Grado(s) <i>Celsius</i> .
ca.	Cantidad aproximada
CENIVAM	Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Tropicales.
CIBIMOL	Centro de Investigación en Biomoléculas.
CI₅₀	Concentración inhibitoria media.
CIM	Concentración mínima inhibitoria.
CINTROP	Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales.
CL₅₀	Concentración letal media.
COLCIENCIAS	Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología.
d_f	Espesor de la fase estacionaria, μm .
D.I.	Diámetro interno, mm.
EI	<i>Electron Impact</i> (Impacto con electrones).
eV	Electrón – voltio.
e.g.	<i>Exempli gratia</i> (Por ejemplo).
f.e.	Fase estacionaria.
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> (Organización de la Agricultura y Alimentos).
g	Gramo(s).
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases), o <i>Gas</i>

	<i>Chromatograph</i> (Cromatógrafo de gases), según el contexto.
GC-MS	<i>Gas Chromatography/Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas).
GHz	Giga-Hertz.
h	Hora(s).
ha	Hectárea(s).
<i>i.e.</i>	<i>In exempli</i> (es decir, o sea).
I_k	Índice de Kovàts.
<i>istd</i>	<i>Internal Standard</i> (Estándar interno).
kg	Kilogramo(s).
<i>L. alba</i>	<i>Lippia alba</i> .
LC	Límite de confianza.
m	Metro(s).
M^{+}	Ion molecular.
min	Minuto(s).
mL	Mililitro(s).
mm	Milímetro(s).
msnm	Metros sobre el nivel del mar.
MSD	<i>Mass Selective Detector</i> (Detector selectivo de masas).
MWHD	<i>Microwave-Assisted Hydro-Distillation</i> (Hidrodestilación asistida por radiación de microondas).
m/z	Relación masa/carga.
nm	Nanómetro.
ppm	Partes por millón.
% (p/p)	Porcentaje peso a peso.
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> (Análisis de componentes

principales).

PDMS	<i>Poly (dimethyl siloxane)</i> [Poli (dimetilsiloxano)].
RDA	Retro Diels-Alder.
SD	<i>Steam Distillation</i> (Destilación al vapor).
SDE	<i>Simultaneous Distillation-Solvent Extraction</i> (Destilación extracción con solvente simultánea).
SFE	<i>Supercritical Fluid Extraction</i> (Extracción con fluido supercrítico).
TIC	<i>Total Ion Current</i> (Corriente iónica total).
t_R	Tiempo de retención (min).
UdeA	Universidad de Antioquia.
UdeC	Universidad de Cartagena
UE	Unión Europea.
UIS	Universidad Industrial de Santander.
UN	Universidad Nacional.
UTP	Universidad Tecnológica de Pereira.
W	Vatios(s).
µm	Micrómetro(s).
µL	Microlitro(s).

INTRODUCCIÓN

El concepto de biodiversidad hace referencia a la cantidad y variedad de los organismos vivos que hay en el planeta, y que han sido el resultado de 3 mil millones de años de evolución. Sin embargo, el menosprecio del hombre hacia ella, y el avance de la ganadería, los cultivos ilícitos y la ignorancia del pueblo hacia estos recursos naturales, demuestran una situación patética en Colombia, siendo nuestro país el segundo más rico del mundo en diversidad biológica, que cuenta con más de 55.000 especies vegetales, de las cuales una tercera parte son endémicas [17, 77]. Además, los recursos biológicos han sido y serán fundamentales para el desarrollo de la humanidad, puesto que son la fuente de nuestra alimentación y de muchos bienes y servicios que nos mantienen y garantizan el desarrollo y el bienestar económico y social.

Valiéndose del concepto de diversidad biológica, el Centro Nacional de Investigación de Excelencia para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Tropicales, CENIVAM, auspiciado por COLCIENCIAS, se presenta como un grupo multidisciplinario encaminado al estudio de especies aromáticas y medicinales promisorias, para el desarrollo competitivo y sostenible de la agroindustria de esencias, extractos y derivados naturales en Colombia, que busca una solución viable para las comunidades campesinas, colonos involucrados en los cultivos ilícitos y directa o indirectamente en el narcotráfico, que buscan un auge idóneo del campo, los microempresarios interesados en invertir en agroindustria, el sector farmacéutico que requiere nuevos principios activos para el tratamiento de enfermedades tropicales, teniendo en cuenta la poca iniciativa de las multinacionales en encontrar y producir medicamentos en países en desarrollo, y la concepción de nuevos campos de acción para los profesionales en Colombia, el progreso de la agroindustria en nuestra

nación, rama que en la actualidad es un piñón más en el motor de la economía global.

Por ello, es importante recordar cómo los aceites esenciales, mezclas de componentes volátiles productos del metabolismo secundario de las plantas [14], han sido importantes en el desarrollo integral del comportamiento humano, y aunque en ocasiones, éstos se encuentren imperceptibles a la vista, siempre han llevado una íntima relación con el hombre, de tal forma, que reconocer la virtud de un aroma se convirtió en un principio que determinó su hábitat, su conducta e incluso sus costumbres. El sabor y el olor de una planta se convirtieron en piezas fundamentales y detonantes del desarrollo cultural de diferentes etnias, tal como lo datan los primeros testimonios escritos en India, Arabia, Persia y Grecia, entre otros, que demostraron sus conocimientos en el cultivo de plantas aromáticas, su rudimentaria producción, así como su valor agregado y religioso, evidenciados en diferentes apartes del Antiguo Testamento [92].

El desarrollo en la producción de aceites esenciales ha sido constante desde el siglo XVI, inicialmente, con técnicas que distan mucho de las tecnologías actuales, pero que desde entonces no han cesado en la investigación para la obtención de nuevas fragancias y distintos métodos de extracción para obtener mejores rendimientos [92]. Paralelamente a estos avances, se desarrollaron otras tres ramas de esta industria; las dos primeras corresponden al fraccionamiento y caracterización; esta última, inició con el planteamiento de hipótesis sobre la naturaleza de las sustancias que componían estas mezclas y la forma de separarlas para conseguir su identificación. Fue precisamente J. J. Houton, quien en 1818 detectó por primera vez la relación carbono/hidrógeno del aceite de trementina, aunque no fue hasta 1887 cuando O. Wallach sentó las bases sobre los mismos y su clasificación [39, 60, 92]. A partir de entonces, las investigaciones de los aceites esenciales se han centrado en la separación e identificación de sus compuestos.

Una tercera rama se desarrolló en ocasiones por casualidad y en otros casos por múltiples experimentos, como los de Arnald de Villanova (1235-1311) con sus “aguas destiladas de propiedades curativas” en la Edad Media, o, Paracelsus von Hohenheim (1493-1541), quien ratificó el uso de sustancias vegetales y propuso como principal objetivo para la farmacia, su caracterización [53, 92]. Y aunque como fuente medicinal nació del conocimiento tradicional empírico, que incluso hoy la población mundial utiliza como preparados de plantas y/o extractos naturales para el tratamiento de problemas de salud [14, 53, 89], el descubrimiento de estas cualidades de las plantas abrió un amplio abanico de posibilidades a la industria farmacéutica, hacia la búsqueda de los compuestos responsables de las mismas.

El presente trabajo hace parte de la línea de investigación sobre aceites esenciales del Laboratorio de Cromatografía del Centro de Investigación en Biomoléculas, CIBIMOL, de la Universidad Industrial de Santander y del Centro de Investigación de Excelencia, CENIVAM, sobre especies promisorias tropicales y potencialmente aplicables a la extracción de AEs, en este caso, la especie *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br, conocida popularmente como “Pronto alivio”, un subarbusto aromático, de hasta 2 m de altura, que se distribuye desde el Caribe Mexicano, pasando por el Amazonas, hasta Argentina. Sin lugar a dudas, ha sido una especie de gran interés, por diferentes razones, entre ellas se encuentran: la diversidad en los metabolitos secundarios volátiles presentes en sus aceites esenciales [56, 89, 119-124] tales como la carvona, el limoneno, el citral y el linalol, entre otros, los cuales presentan un alto valor agregado, por su amplio uso en la industria cosmética; y son los que han definido los diferentes quimiotipos de la planta, es decir, individuos de una misma especie botánica, que son idénticos morfológicamente, pero poseen diferente composición química de sus metabolitos secundarios, y que dependen de condiciones genéticas, geobotánicas y agrícolas de cultivo [11, 14, 53, 56]. Además de la variedad de usos etnomédicos, e.g. como sedante, emenagogo y antiespasmódico, se suman los resultados de actividad

biológica hasta ahora reportados, tanto para los aceites de *Lippia alba*, como para algunos de sus componentes [14, 44, 51, 56, 89], lo cual los hace bastante atractivos para la industria farmacéutica.

Por ello, cumpliendo con el compromiso del Centro de Investigación, previamente ha adelantado otros trabajos sobre esta especie, a saber: el estudio del aceite esencial y de los aspectos fisiológicos en diferentes etapas de su crecimiento bajo tres niveles de luz [39]; la evaluación de la actividad antioxidante [60, 124]; el estudio de los aceites esenciales de 14 plantas de *Lippia alba* provenientes de diferentes regiones del país [80, 121, 123]; el efecto del acero inoxidable y el cobre, materiales de construcción usados en dos destiladores a escala piloto, sobre la composición química de los aceites esenciales de dos quimiotipos de *Lippia alba* [80], y la incidencia de la edad de las hojas de dos quimiotipos de *Lippia alba* sobre la composición química de sus aceites esenciales, obtenidos en destiladores a escala piloto [80, 122]; además, se ha participado en los congresos nacionales e internacionales, y se ha reportado sobre los tres quimiotipos Colombianos de *Lippia alba*, “Carvona”, “Citral” y el “hibrido” “Carvona-Citral” [121-123]. Estas investigaciones hacen del presente trabajo un fragmento importante para cumplir con los objetivos de CENIVAM respecto a las investigaciones sobre esta especie, ya que se ha dirigido hacia el estudio comparativo de la composición química de los aceites esenciales de los quimiotipos “Citral” y “Carvona” de *Lippia alba*, en función de diferentes condiciones de secado de la planta en horno (tiempo y temperatura), y su extracción (tiempo) por hidrodestilación asistida por radiación de microondas, MWHD (sigla en Inglés), y su incidencia sobre el rendimiento y la actividad biológica de aceites obtenidos.

Para los aceites esenciales obtenidos, se evaluaron diferentes ensayos de actividad biológica por los grupos de investigación adscritos al Centro de Excelencia, CENIVAM, tales como: pruebas de citotoxicidad en *Artemia franciscana*, por el grupo de Química Computacional y Ambiental, de la

Universidad de Cartagena; actividad citotóxica en células Vero (MTT), actividad anti-*Leishmania chagasi* en promastigotes y actividad anti-*Trypanosoma cruzi* en epimastigotes, por el Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, CINTROP, de la Universidad Industrial de Santander; actividad antibacterial contra *Salmonella gallinarium*, *Salmonella tiphymurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* por el grupo de Polifenoles, de la Universidad Tecnológica de Pereira; actividad antimicótica contra *Candida albicans*, *Candida krusei* y *Candida parapsilosis*, por el grupo de Infección y Cáncer, de la Universidad de Antioquia.

Los resultados obtenidos en este estudio permitieron encontrar buenas condiciones para las extracciones de los aceites esenciales de los quimiotipos “Citra” y “Carvona” de la especie *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br., bajo un sistema de secado controlado. Por ello, se proyectó a contribuir al desarrollo y fortalecimiento de la naciente industria de AEs de *Lippia alba* en Colombia, cumpliendo con los criterios de sostenibilidad ecológica, económica y social [96, 116], que les permitirá tanto a los campesinos como a los productores de aceites esenciales satisfacer las exigencias de Buenas Prácticas de Manufactura y Calidad en los mercados nacional e internacional, con una distribución justa y equitativa de los beneficios que se derivan de dicha producción.

El trabajo de 170 páginas contiene 6 capítulos, 22 tablas, 52 figuras y 6 esquemas. Los resultados parciales de ésta investigación han sido presentados en congresos nacionales [122, 123] e internacionales [121]. Conciencias y el Laboratorio de Cromatografía de la UIS financiaron el presente estudio, que forma parte de las investigaciones desarrolladas en CENIVAM.

1. ESTADO DE ARTE

1.1 GENERALIDADES DE LOS ACEITES ESENCIALES

1.1.1 Definición

El aceite esencial es una mezcla de componentes volátiles producto del metabolismo secundario de las plantas, compuesto generalmente por terpenos y compuestos oxigenados, que asociados o no a otros componentes, generan en conjunto el olor vegetal [14].

1.1.2 Composición química

Como parte del intrincado metabolismo de las plantas, las esencias abarcan una gama muy variada de constituyentes, normalmente asociados a los mono- y sesquiterpenos; aparecen también en su composición ésteres, alcoholes, ácidos grasos, alcaloides, cumarinas, esteroides, derivados bencénicos, hidrocarburos lineales, y, cada vez más, una heterogénea variedad de compuestos heterocíclicos a medida que se avanza en el conocimiento de su composición [11, 14, 53, 127]. Esta riqueza estructural se acrecienta aún más si se considera la reconocida especificidad isomérica en toda biosíntesis natural, algo mucho más complejo de lograr por síntesis químicas tradicionales.

Una planta puede generar una gran variedad de mezclas de sustancias aromáticas, dependiendo de diversos factores, algunos intrínsecos de la especie vegetal, y otros dependientes del medio ambiente o de los procesos extractivos empleados, que en definitiva son los que le dan la unicidad a la composición química [14]. Por tanto, siendo los AEs parte del metabolismo de una planta, su composición química está constantemente en cambio, modificándose las

proporciones de sus constituyentes o transformándose unos constituyentes en otros, según la parte de la planta empleada (hojas, tallos, raíces, flores y frutos), el momento de su desarrollo o el momento del día [11, 14, 53].

Además, por ser de origen natural, la composición química de los aceites es inconsistente, y depende, entre otras, de las siguientes variables: la edad de la planta y su estado fenológico, el método de extracción (e.g. hidrodestilación, arrastre con vapor, etc.), su duración y la temperatura empleada, el estado y procedencia de la planta (fresco, seco, fermentado, tipo de tratamiento postcosecha), y las condiciones geobotánicas (clima, altitud, tipo de suelo, pluviosidad) y agrícolas de su cultivo (fertilizantes, abonos y pesticidas) [14, 24, 69, 120, 124, 138]. Más aún, debe tenerse en cuenta que dada su normalmente compleja composición, presentan una significativa probabilidad de sufrir modificaciones, ya sea por reacciones entre sus propios constituyentes, o, entre éstos y el medio (e.g. la luz, la temperatura, presencia de enzimas, los componentes del material en el cual se almacenan, etc.) [14].

En resumen, es evidente que un AE está en permanente cambio, no solamente mientras forma parte del metabolismo de la planta, sino también después de extraído, lo cual permite la obtención de distintos productos aromáticos [14], y con grandes diferencias en cuanto a sus características físico-químicas, organolépticas y de costos.

1.1.3 Biogénesis de los aceites esenciales

1.1.3.1 Metabolitos secundarios: Consisten en una amplia y variada selección de compuestos orgánicos producidos por las plantas, los cuales aparentemente no tienen una función directa en el crecimiento y desarrollo de éstas, pues no se ha encontrado una relación entre los metabolitos secundarios y los diferentes procesos de fotosíntesis, transporte de solutos, respiración, síntesis de proteínas, asimilación de nutrientes, y la diferenciación de carbohidratos, lípidos y proteínas

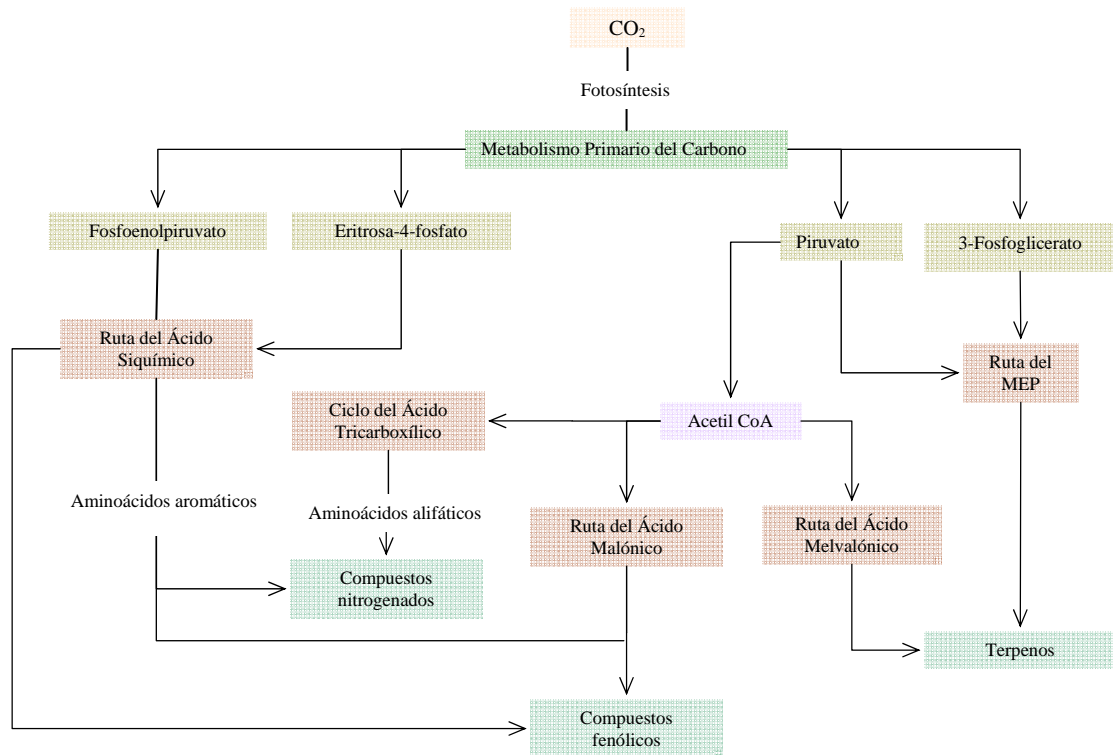
[11, 127]. Sin embargo, los metabolitos secundarios han demostrado tener importantes funciones ecológicas en las plantas, tales como: servir de atrayentes para polinizadores y animales dispersores de semillas, así como mecanismos de defensa (aleloquímicos) contra herbívoros, microbios patógenos, por sus actividades antifúngica y antibacterial, y la relación con otros vegetales (alelopatía). Esta defensa, sin lugar a dudas, ha hecho parte de cambios evolutivos en las rutas metabólicas, creando compuestos que no fueran excesivamente tóxicas para éstas y que no implicaran un costo energético lo suficientemente elevado para su desarrollo, permitiendo así que las plantas con estas características y mediante mecanismos de selección natural continuaran existiendo [11, 35, 127]. Desde el punto de vista fisiológico, y gracias a su alta volatilidad, pueden actuar como reguladores del potencial hídrico evitando la deshidratación. Esta función podría explicar lo diverso de su localización y su posible variación durante un ciclo fenológico [92].

Otra disimilitud importante, es que los metabolitos secundarios, a diferencia de los primarios, tienen una restringida distribución y no se encuentran en todo el reino vegetal, sino en un género, o en grupo de especies determinado, y en ocasiones en una especie en particular [127].

La biosíntesis y la acumulación de aceite esencial ocurren, por norma general, en células epidérmicas modificadas, aunque dependiendo de la familia o género, también pueden acumularse en otras estructuras como tallos, raíces, flores y frutos.

Los metabolitos secundarios pueden dividirse básicamente, según su estructura en 3 grupos químicos, a saber: terpenos o terpenoides, fenoles y sus derivados fenilpropanoides, y alcaloides [11, 127]. En la **Figura 1** se ilustran en forma simplificada las rutas que envuelven la biosíntesis de los metabolitos secundarios y su relación con el metabolismo primario.

Figura 1. Principales rutas en la biosíntesis de metabolitos secundarios de plantas y su relación con el metabolismo primario.



Los terpenos o terpenoides constituyen una clase amplia de compuestos, que generalmente son insolubles en agua y pueden ser sintetizados por intermediarios de la acetil-CoA, o, glicosídicos, bajo dos rutas metabólicas ampliamente estudiadas, *i.e.* la ruta del ácido mevalónico y/o la ruta del metileritriol fosfato (MEP, por sus siglas en Inglés, *Methylerythritol phosphate*).

La estructura básica que compone a los terpenos son las unidades de isopreno (C_5H_8), y los terpenos se clasifican dependiendo del número de unidades isoprenicas que contengan. Por ejemplo, los monoterpenos se caracterizan por presentar 10 átomos de carbono y, por lo tanto, dos unidades de isopreno. Presentan gran variabilidad de hidrocarburos, alcoholes, aldehídos y otros compuestos oxigenados que, en conjunto, engloban muchos isómeros, no solo

funcionales, sino también de posición y geométricos. Están considerados como una de las familias más grandes de productos naturales. Se han identificado como productos del metabolismo secundario de los vegetales, aunque no exclusivos de ellos [11, 92, 127].

Los sesquiterpenos, por otra parte, se caracterizan por poseer 15 átomos de carbono y, por tanto, tres unidades de isopreno. 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* [11, 92, 118, 127]. Este grupo presenta gran variabilidad natural, en la cual se pueden encontrar 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 [11, 66, 92, 127]. Además, no son metabólicamente inertes, se sintetizan y catabolizan rápidamente con papel dinámico en el metabolismo vegetal. La producción y la acumulación de este tipo de compuestos, en cantidades considerables, suelen estar relacionados con la presencia de estructuras secretoras especializadas [92, 127]. Por otra parte, 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, los sesquiterpenos se pueden agrupar en acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos y tetracíclicos.

Los diterpenos son otra gran familia de terpenoides que, según las circunstancias, pueden aparecer en los aceites esenciales junto con los monoterpenos y sesquiterpenos. Se trata de compuestos con 20 átomos de carbono (cuatro unidades de isopreno), por lo que su peso molecular es superior al de

monoterpenos y sesquiterpenos, y su volatilidad es mucho más baja. Sus características moleculares y estructurales dificultan la extracción de los mismos. Por este motivo no suelen considerarse componentes del aceite volátil, porque no todos los diterpenos se extraen, y los extraídos no lo son al 100% [92, 118, 127].

1.1.4 Propiedades físico-químicas: Se les llaman “aceites esenciales” (AEs) por su apariencia física y consistencia, que es bastante parecida a los aceites vegetales o de cocina. El olor de un aceite esencial no es el mismo que el de una planta viva; ésto se debe principalmente a la diferencia de volatilidad y solubilidad de los componentes de la fragancia, a los factores metabólicos de la planta, y a la ubicación en los tejidos de la misma [14].

Los AEs son generalmente líquidos a temperatura ambiente, incoloros cuando están puros y frescos, pero se colorean cuando se exponen al aire. Poseen una densidad menor que la del agua, excepto algunas esencias como la de clavo. En general, son volátiles y una de sus principales características es la inestabilidad frente a la luz y el oxígeno, a la presencia de oxidantes, reductores, medios con pH extremos, o trazas de metales que puedan catalizar reacciones de descomposición. Esta inestabilidad, que resulta un problema para la conservación y formulación de las esencias, es también un factor determinante en su utilización como precursores en la síntesis orgánica fina y para la fabricación de polímeros [14, 53].

En cuanto a sus solubilidades, tienen la particularidad de que si bien son solubles en medio no polar (son más liposolubles cuanto mayor contenido de hidrocarburos terpénicos tengan), también suelen tener alta solubilidad en etanol, lo que es ampliamente explotado en la elaboración de fragancias y extractos hidroalcohólicos para las industrias farmacéutica y cosmética [14, 53, 63, 69].

Otra propiedad intrínseca de los AEs es la refracción de la luz polarizada, la cual es aprovechada para su control de pureza, puesto que cada aceite presenta un índice de refracción característico. Además, los AEs presentan un poder rotatorio particular debido a que algunos de sus compuestos químicos son ópticamente activos, permitiendo el uso de este parámetro como un estándar en la evaluación de la calidad de los AEs.

1.1.5 Aplicaciones: Todos los días, sin saberlo, estamos haciendo uso de algún producto o material derivado de aceites esenciales. Es por tal razón que los aceites esenciales tienen dos grandes mercados, a saber: la industria de sabores y fragancias, gracias a las características organolépticas de esencias, y la posibilidad de su uso como materia prima en química sintética. El reconocimiento de una estructura química, como generadora de una propiedad organoléptica, es la guía para que otras estructuras similares sean explotadas, buscadas o modificadas para lograr el mismo efecto, con una posible ventaja comparativa [14, 53, 69].

Otras importantes aplicaciones de esencias son: en la industria cosmética, para la elaboración de perfumes, pastas dentífricas, cremas, ungüentos, etc.; en la industria licorera, como saborizantes, y aromatizantes en la industria tabacalera; en la industria alimenticia, como saborizantes, colorantes, aromatizantes en bebidas, sopas, adobos, así como en concentrados y piensos animales, etc.; en química farmacéutica, como principios activos, saborizantes, colorantes; en veterinaria, como repelentes de insectos, antisépticos, etc.; en la industria de aseo y limpieza, como aromatizantes de productos para pisos, baños, cocinas, limpiavidrios y ambientadores de autos, etc., además, se reconoce su importante uso en medicina terapéutica y aromaterapia, en inhalaciones, nebulizaciones, baños de inmersión, entre otros [14].

1.2 SECADO DEL MATERIAL VEGETAL

Las plantas aromáticas pueden ser comercializadas frescas, enteras, o cortadas; pero en la mayoría de los casos se las somete a un proceso de secado, dado que esta operación representa una de las mejores alternativas de estabilización y conservación del material vegetal [14, 19, 63].

1.2.1 Objetivos

Los principales objetivos del secado son:

- Inhibir la destrucción enzimática, fenómeno que puede alterar sustancialmente la calidad del material vegetal por descomposición de sus componentes. Sin embargo, debe estar claro que el secado inhibe el proceso enzimático pero no lo elimina; por lo tanto, al re-hidratarse la planta, el proceso puede restablecerse;
- Estabilizar el olor, color, textura, sabor, y/o la composición química. Ha de notarse que uno de los procesos más críticos es el amarronamiento de las partes verdes, provocado por la destrucción de la clorofila y numerosas reacciones de oxidación generadas por las fenol-oxidasas presentes en las plantas;
- Reducir fletes, costos de embalaje y almacenaje;
- Reducir tiempos y costos de destilación, cuando el material va a ser empelado para este fin;

Para conservar las plantas, es indispensable reducir la actividad enzimática en ellos, y para ello, se reduce el contenido acuoso hasta valores que corresponden a una humedad entre 5 y 14%, según cada caso. Normalmente, las plantas en la cosecha presentan humedades superiores al 70%, por lo que es necesario encontrar medios eficientes de secado, que no perjudiquen la calidad del material vegetal, ni reduzcan el contenido de componentes volátiles presentes en el mismo [14, 19, 63].

1.2.2 Parámetros del secado: La elección del método de secado depende, fundamentalmente, de la calidad de producto que se quiere lograr, de los medios económicos disponibles, y de las condiciones climatológicas estimadas. De allí la importancia de elegir un momento óptimo para la cosecha, cuando la calidad del producto lo permite, con el fin de aprovechar el momento de menor contenido hídrico en los tejidos celulares, o días de baja humedad relativa del ambiente [14, 19].

Los parámetros más importantes que se deben tener en cuenta para optimizar un sistema de secado son:

- Tipo de producto: las semillas y raíces tienen mucho menor contenido de humedad (70-75%), comparado con las frutas y flores (75-85%), y su estabilidad suele ser mucho mayor.
- Tamaño del material vegetal: cuando las partes del material vegetal a secar son muy pequeñas, deben emplearse sistemas que otorguen una gran superficie de evaporación y, a su vez, el producto deberá dispersarse sobre una capa mucho más fina, facilitando el secado de los estratos inferiores.
- Grado de homogeneidad: se refiere a la dimensión y la calidad del material a secar. En ocasiones, los tallos pueden obstaculizar el paso del aire de secado, retardando el proceso para las hojas e inflorescencias. En estos casos es apropiado hacer un zarandeo del material vegetal y secar las partes por separado.
- Estabilidad de los principios activos: cuando el material posee una esencia muy volátil (e.g. eucalipto), el proceso se hace crítico, y para llegar a la humedad final requerida, puede ser mejor prolongar el proceso, pero usando aire menos caliente. Es probable apreciar variaciones en la calidad del AEs en materiales desecados, debido, tal vez, a la descomposición de los terpenos oxigenados, originalmente presentes en la planta en forma de glicósidos.

- Influencia de la luz en la estabilidad vegetal: normalmente, para la obtención de un buen producto, es necesario trabajar con bajos niveles de luminosidad, evitando así el factor lumínico como un generador de descomposiciones del producto.
- Higiene del secadero a utilizar: se debe hacer todo lo posible para que las instalaciones de secado no sean utilizadas para diferentes materiales vegetales a la vez, evitando así la contaminación cruzada.
- Costo de instalación: que será función de las dimensiones, la tecnología elegida, y de la infraestructura aprovechable [14].

1.2.3 Variables del secado: Las variables que por norma regulan el proceso de secado son: la circulación del aire secante, para lo cual es común hacer que el aire caliente transite de abajo hacia arriba, por donde sale, aprovechando su menor densidad respecto al aire frío. El manejo del aire desecante, que puede dejarse que circule libremente o puede ser forzado y orientado con ventiladores. Las tomas de salida y entrada de aire caliente. La temperatura del aire de secado es un factor muy importante, pues aunque se ha visto que al aumentar la temperatura del aire secante en unos 10 °C, el tiempo de secado se reduce a la mitad, normalmente la temperatura usada es menor de 50 °C por razones de estabilidad del producto [14, 16, 133], y puede trabajarse en un sistema isotérmico o programado (30-50 °C). El flujo másico o caudal de aire secante: la ubicación del material a secar, pues es fundamental estimar el espesor adecuado de capa del material, y es conveniente también, separar las partes gruesas (raíces o tallos) de las finas (flores) si es posible. Aunque no siempre es posible o económicamente viable, el movimiento del material a secar, en contracorriente con el aire desecante, acelera en forma notable todo el proceso. El objetivo consiste en transportar el material de una zona más húmeda a una zona más seca, o a una zona más caliente. Esta rotación puede realizarse en forma sencilla, revolviendo manualmente o automáticamente el material en una bandeja o cama de secado. El tiempo de secado, que puede variar entre 8 y 20 días (dependiendo del material

vegetal) [14] y de 30 min a 16 h cuando se hace con aire forzado [14, 133]. También se deben tener en cuenta la humedad final exigida, valor que normalmente oscila en el intervalo de 8-15%, y la humedad ambiente, sobre todo, cuando se realizan procesos de secado en sombra.

1.2.4 Humedad: El concepto de base húmeda es el más comúnmente usado y se define como la relación de la masa de la humedad y la masa del material húmedo, que es igual a la suma del material seco y la humedad (ver **Ecuación 1**)

$$W_H = \frac{M_H}{M_H + M_S} = \frac{\text{kg de humedad}}{\text{kg de humedad} + \text{kg de material seco}} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde W_H representa la base húmeda, y M_H y M_S es la masa de la humedad y la masa del material seco, respectivamente. Para expresarlo como porcentaje, el valor obtenido debe multiplicarse por 100.

Cuando el material vegetal se pone en contacto con una corriente de aire de temperatura y humedad constantes, y el tiempo de exposición es lo suficientemente largo para que se alcance el equilibrio entre ambos, el material alcanzará un contenido de humedad definido y que no cambiará por posterior exposición a esta corriente de aire. A este contenido de humedad se le denomina contenido de humedad de equilibrio bajo las condiciones especificadas. Si el material contiene más humedad que la de equilibrio, se secará hasta alcanzar la humedad de equilibrio y viceversa. Debe notarse, que la humedad de equilibrio de un sólido disminuye al aumentar la temperatura [14].

Luego, si el material presenta un contenido de humedad igual o por encima de la concentración menor que está en equilibrio con el aire saturado, bajo estas condiciones, se le denomina agua ligada, debido a que ejerce una presión de vapor menor que la del agua líquida a la misma temperatura, y se dice que está

“ligada” al material por fuerzas mecánicas o físico-químicas que impiden su evaporación [14].

Por otra parte, se considera como humedad libre aquella contenida en el material y que está por encima del contenido de humedad de equilibrio, luego puede extraerse por el proceso de secado [14].

Además, se considera como agua no ligada aquella cuya presión de vapor en el equilibrio es igual a la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura, luego se comporta como un cuerpo de agua y no se ve afectada por el material, pudiendo así ser extraída por el proceso de secado [14].

1.2.5 Métodos de secado: Uno de los métodos de secado más drástico, consiste en el secado a campo. En realidad, es un proceso de oreado, es decir, se deja el material cortado en el lugar de cultivo por un tiempo, permitiendo que la mayoría del agua contenida en sus tejidos se evapore. Éste, en conjunto con el secado al aire libre, hacen parte de los sistemas más sencillos y económicos, pues actúan por simple radiación solar, pero son también los menos sugeridos por el deterioro en la calidad del material vegetal. Por su parte, el secado al aire libre consiste en esparcir el producto a secar sobre pisos de cemento, encima de catres, bandejas, o bolsas, a la intemperie y durante un tiempo determinado para cada especie. Sin embargo, es importante no poner el material en contacto directo con el suelo, sino permitir la circulación de aire a través del material vegetal, evitando, a la vez, su contaminación [14, 133]. Por ello, es un método aconsejable solo en regiones muy secas y con fuerte irradiación solar, y para productos resistentes al calor y no fotosensibles. Además, se debe tener cuidado de retirar el material vegetal por el peligro de la condensación de agua durante la noche, lluvias o rocío.

El secado a la sombra es un sistema que actúa por convección del aire, el cual debe estar más seco y en lo posible más caliente que el vegetal, para facilitar la

evaporación. Se realiza a temperatura ambiente, y se debe tener sumo cuidado en lo referente a la ubicación y dimensiones de las aberturas de entrada y salida de aire y la facilidad de carga, descarga y circulación interna del material. Normalmente, las entradas de aire caliente se ubican en las partes bajas y las salidas del aire frío, se ponen en la parte superior y en paredes opuestas; lo ideal es aprovechar las corrientes naturales del viento en la región; pero de no ser así, se deben instalar ventiladores que faciliten la convección del aire. Generalmente, es un proceso más lento que el anterior, pero el resultado es muy superior, por no tener la descomposición de los productos debido a temperaturas no controladas, o exceso de luminosidad. No obstante, el principal inconveniente del secado natural a la sombra es que no se pueden controlar las condiciones climáticas y así, si el momento de la cosecha ocurre en días de alta humedad, lluvia, baja temperatura, etc., no se obtendrá un buen secado y, por ende, una mala conservación [14, 16, 79, 133].

El secado con aire caliente es una alternativa muy eficaz e imprescindible si la humedad relativa ambiente de la región es demasiado alta, o la temperatura media demasiado baja. Además, es muy práctica pues se pueden manejar grandes volúmenes de material vegetal en corto tiempo. Sin embargo, su principal inconveniente es el costo que éste implica.

Algunas alternativas que se han planteado para la obtención de la energía necesaria para el calentamiento del aire de secado, van desde las más rústicas como atrapar el aire entre una cobertura transparente y una negra, favoreciendo el traspaso de los rayos solares, y luego orientar este aire calentado con ventiladores hacia el material a secar, hasta el uso de células o paneles solares para la generación de la energía necesaria por los desecadores [14].

No obstante, cuando la cantidad de material vegetal no es muy grande, suelen utilizarse los secaderos de bandeja y compartimientos. En este tipo de secaderos

el material vegetal es colocado sobre bandejas, éstas, a su vez, en carretillas móviles. El aire, forzado por un ventilador, pasa primero por un serpentín de calentamiento, y una vez caliente, se lo hace circular por las bandejas. Sin embargo, si la escala de producción lo permite, y/o la calidad del producto así lo exige, se utilizan sistemas de secado con aire caliente totalmente automáticos, llamados túneles de secado [14, 40, 125].

Además de los sistemas de secado tradicionales aquí nombrados, existen otros tales como: el liofilizado, secado con microondas y secado con luz infrarroja, que no son comunes en el tratamiento de materiales vegetales aromáticos, ya sea por consideraciones económicas o técnicas, o por estar aún en etapa de desarrollo.

Estudios comparativos sobre los diferentes métodos de secado han demostrado que según la calidad de producto exigido, un método y sus condiciones pueden ser más convenientes para una especie que para otras. Por ejemplo, Arabhosseini y colaboradores [7] encontraron que incrementos en la temperatura de secado en horno superior a 45 °C, influyen notablemente sobre el color de las hojas y el rendimiento del aceite esencial de la *Artemisia dracunculoides* L o estragón francés, después del almacenaje del material vegetal en periodos mayores de 30 días.

Por otra parte, el estudio realizado por Asekun y colaboradores [9] demostró, que el aceite esencial de *Mentha longifolia* L. subsp. *Capensis* puede experimentar grandes cambios químicos en su fracción de mono-terpenoides, cuando sus hojas son secadas por tres métodos diferentes. En su publicación, los autores reportan que los compuestos mayoritarios durante el secado al aire libre, y en el material no secado, son la mentona y la pulegona, respectivamente, entre tanto, durante el secado en horno fue el limoneno. La disminución en el contenido de dichos compuestos en el secado en horno, da relevancia a su uso para reducir la toxicidad del aceite [9].

Tal y como se comentó con anterioridad, la parte de la planta que se va a secar es un condicional muy importante en el momento de escoger el método de secado. Omidbaigi y colaboradores [85] encontraron que el rendimiento del aceite esencial de las flores de *Chamaemelum nobile* L. All. var. Flora Plena, o manzanilla romana, es mucho mayor cuando el secado se hace a la sombra que cuando se utiliza el secado en horno o con luz solar. Sin embargo, aunque el aceite esencial fue cualitativamente similar, observaron significativos cambios cuantitativos [85].

Orav y colaboradores [86], utilizando una liofilización de pimienta verde, encontraron que el rendimiento y la cantidad de monoterpenos fueron mucho más altos que los obtenidos con la metodología de secado en caliente. Sin embargo, esto es contrario a lo normalmente esperado, pues al ocurrir la sublimación del agua contenida en el producto inicial, ésta favorece la evaporación de buena parte de sus componentes volátiles. Respecto a esta metodología existen técnicas patentadas, donde el producto no sufre esta pérdida, lo que permite mantenerlo con sus propiedades organolépticas naturales casi intactas, durante un largo periodo de tiempo, a temperaturas cercanas a los -25°C [14, 34].

1.3 EXTRACCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS.

Existe una gran variedad de métodos empleados para la obtención de los metabolitos secundarios de las plantas, entre los cuales se encuentran la destilación convencional, la hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHd), extracción con fluido supercrítico (SFE) y destilación-extracción simultánea (SDE), entre otras [117, 124].

Se les llaman “extractos” y “fracciones volátiles”, a los componentes obtenidos de las plantas por técnicas extractivas y de *headspace*, respectivamente. A la mezcla

de sustancias obtenidas por hidrodestilación se le da el nombre de “aceite esencial” [14, 27, 39, 60, 80, 119, 120, 124].

En las plantas, los aceites esenciales se almacenan en glándulas aceitosas, venas, sacos de aceite o cabellos glandulares de donde pueden ser removidos utilizando el vapor de agua, el cual debe atravesar los tejidos vegetales de la superficie expuesta al mismo. Para facilitar este proceso y aumentar el rendimiento del aceite, a menudo se realiza un tratamiento físico previo a la destilación, el cual depende del tipo de material vegetal. Las hojas, las flores y otras partes delgadas y no fibrosas de la planta se someten al proceso de destilación sin ningún tratamiento previo, mientras que las raíces, los tallos y las plantas leñosas se deben cortar en trozos pequeños, aumentando así la superficie de contacto [14, 73, 117, 119, 120, 124].

Los aceites esenciales se obtienen de las plantas por diferentes procesos fisicoquímicos, de acuerdo con la naturaleza y propiedades de los mismos o del material vegetal que los contienen. El almacenamiento de material vegetal fresco antes del proceso de destilación no es muy recomendable, ya que ello está asociado con la pérdida y deterioro de la calidad y el rendimiento del aceite, por evaporación, oxidación enzimática, u otros procesos de degradación. Sin embargo, hay excepciones y en algunos casos, durante el proceso de almacenamiento y secado, tiene lugar una serie de reacciones bioquímicas acompañadas de la generación de compuestos volátiles de interés [14, 53, 63].

1.3.1 Hidrodestilación asistida por la radiación del microondas (MWHD): La técnica de MWHD fue patentada en los Estados Unidos de América y en Europa por *Paré* y colaboradores [87, 88] y tiene gran importancia puesto que reduce considerablemente el tiempo de los procesos y reacciones químicas. Esta técnica consiste en la extracción de productos solubles en un líquido que es transparente

a la radiación electromagnética de microondas, y permite la absorción de la radiación por el material vegetal. De manera que al encontrarse en contacto con la planta, el agua interna empieza a ebulir, arrastrar los compuestos volátiles y se acelera su difusión hacia el solvente transparente a la radiación. [14, 61, 63, 64].

En el presente trabajo, la muestra vegetal es sumergida en agua (solvente), que es calentada por la radiación de microondas hasta ebullición, generando el vapor que rompe las estructuras celulares que contienen la esencia, liberando los compuestos del aceite esencial en forma de una mezcla azeotrópica, los cuales, por efecto de su presión de vapor, ascienden hasta el montaje tipo Clevenger. Al condensarse, se forman dos capas, una rica en aceite y, otra, en agua, las cuales son separadas por decantación. El periodo de destilación por MWHD toma alrededor de 40 min, lo cual es una ventaja, pues es una técnica bastante rápida comparada con las convencionales [14, 63, 64, 120]. Se debe tener en cuenta que el tiempo de hidrodestilación influye tanto sobre la cantidad de aceite producido, como sobre su composición química. Además, las muestras, al alcanzar temperaturas cercanas a los 100 °C, pueden presentar cambios en sus componentes termolábiles, así como procesos colaterales indeseables, tales como la hidrólisis de ésteres, polimerización de aldehídos o descomposición de otros compuestos [14, 49, 63 73].

En resumen, MWHD presenta ventajas sobresalientes respecto a las otras técnicas de destilación empleadas; entre ellas, se encuentra que es un proceso rápido, relativamente económico, el único solvente utilizado es agua, se obtienen rendimientos altos, y la construcción del equipo es fácil [14, 49, 61, 64, 73, 119].

1.4 ANÁLISIS Y CONTROL DE CALIDAD DE LOS ACEITES ESENCIALES

Para el empleo de los aceites esenciales, además de estudiar la viabilidad de su producción para una aplicación específica, también se hace absolutamente necesario conocer su composición química. Este conocimiento, junto con las características físico-químicas y organolépticas del aceite, son parámetros imprescindibles para establecer la calidad según las exigencias del mercado mundial. Ésto se logra mediante diferentes métodos de separación, identificación y cuantificación, entre los cuales se encuentran métodos químicos de separación (obtención de derivados), destilación fraccionada, cromatografía de capa fina, cromatografía en columna, cromatografía líquida de alta eficiencia (obtención de fracciones), cromatografía de gases (separación de la mezcla, cuantificación de los constituyentes) [14, 53].

Tabla 1. Clasificación de los parámetros analíticos utilizados para el control de la calidad de los AEs [14].

Características organolépticas	Olor Color Sabor Apariencia Textura
Determinaciones físicas	Densidad Poder rotatorio Índice de refracción Solubilidad en etanol Punto de congelación Punto de inflamación
Índices químicos	Acidez Éster Saponificación Fenoles
Características cromatográficas	Perfil cromatográfico GC Cuantificación de componentes principales Índices de retención Identificación por GC-MS

Con el fin de determinar el cumplimiento de las normas de calidad de un aceite esencial, la detección de adulteraciones, la discriminación (entiéndase como la diferenciación de una esencia de otra) y normalización de calidades, y la determinación de que el producto es realmente natural, se han establecido ciertos parámetros analíticos que son reportados en la **Tabla 1**.

1.4.1 Cromatografía de gases

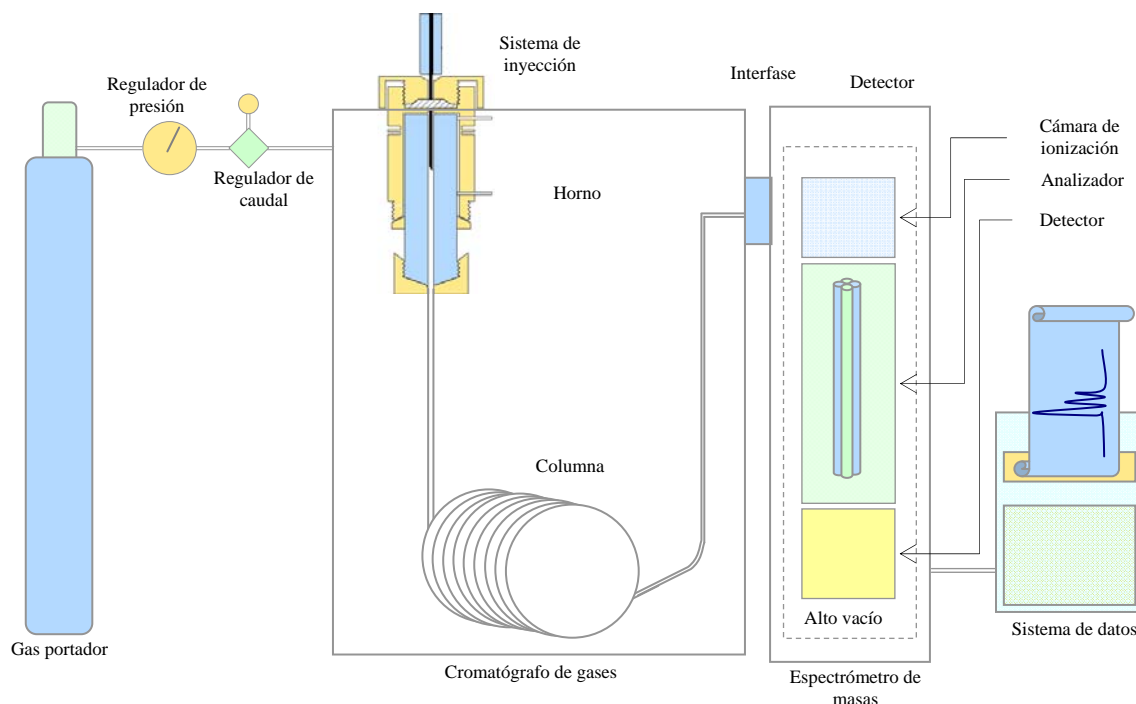
La cromatografía de gases es una técnica de separación basada principalmente en fenómenos de repartición entre una fase móvil gaseosa (helio, argón, hidrogeno, o nitrógeno) y una fase estacionaria, constituida por un sólido o líquido, soportada en las paredes de la columna [14, 50, 62, 95, 104, 106]. El cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (**Figura 2**) contiene un sistema de inyección, mediante el cual se introduce la muestra en la columna, un detector, que detecta las diferentes sustancias a medida que van saliendo de la columna, una vez separadas; para la identificación de los componentes de la mezcla se usa un detector de masas (espectrómetro de masas)

Las columnas cromatográficas empleadas en la actualidad son del tipo capilar, y constituyen un tubo de sílice fundido de diámetro muy pequeño (estándar, 0.25 mm) y de longitud variable (25 a 100 m).

Sin embargo, los tiempos de retención dependen de numerosas variables, a saber: la técnica de inyección, las variaciones de temperatura o flujo de los gases, el diseño del equipo, entre otras, que son ajustadas según los requerimientos del análisis [50]. Por ello, ha sido necesaria la introducción de parámetros más reproducibles, tales como los tiempos de retención relativos y los índices de retención. Éstos se calculan a partir de los tiempos de retención y por comparación con una serie de sustancias a las cuales se les asignan valores arbitrarios de índices de retención. Los más utilizados son los índices de Kovàts,

introducidos en 1958 por E. Kovàts [67] y definidos respecto a los tiempos de retención de una serie de *n*-alcanos.

Figura 2. Estructura de un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas.



La identificación de los componentes del aceite se realiza a través de comparación de los índices de retención experimentales con los de las sustancias patrón en dos fases estacionarias, polar y apolar. La información que proporcionan los índices de retención respecto a la identidad de los componentes de la esencia es muy valiosa, sin embargo, la identificación confirmatoria de los mismos no puede basarse exclusivamente en ellos, ya que muchos poseen valores muy cercanos en ambas columnas o a otros compuestos. Por ello, es necesario aplicar otras técnicas, entre las cuales se destaca la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS) [50, 106].

1.4.2 Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas

La combinación de la cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS por sus siglas en Inglés, *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) (**Figura 2**) es una de las herramientas analíticas más poderosas. En los últimos años, se ha demostrado que es uno de los métodos más eficientes para el estudio de la composición de los AEs [27, 60, 80, 89, 106, 117, 120, 124].

Es un método adecuado para la identificación debido a que los componentes del aceite son compuestos volátiles y de bajo peso molecular (< 300 Da). La esencia se inyecta directamente al cromatógrafo, sin ningún tratamiento previo, lo cual elimina posibles modificaciones en la composición de la muestra o en la estructura de sus constituyentes. En el cromatógrafo, los componentes de la esencia se separan, entran al espectrómetro de masas, que permite registrar el espectro de cada una de las sustancias separadas. Los constituyentes del aceite se identifican con base en patrones de su fragmentación, que se observan en los espectros de masas, obtenidos por impacto de electrones (EI, 70 eV) [76, 106].

Los componentes del aceite pueden ser simultáneamente separados e identificados con base en sus tiempos de retención, índices de Kovàts y los patrones de fragmentación, los cuales son únicos para cada sustancia. El método GC-MS permite realizar en una sola operación, para una muestra del orden de 1 μL , un análisis cualitativo, junto con una indicación de las proporciones en las que se encuentran los componentes. Cuando se dispone de sustancia patrón, la calibración del equipo permite un análisis cuantitativo exacto de la muestra [78, 114].

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

La especie *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown pertenece al grupo de plantas de la familia *Verbenaceae*, las cuales han llamado la atención de los investigadores no sólo por su alta diversidad botánica, su abundante y amplia distribución en todo el mundo, sino también por su variable uso. La familia comprende unos 75 géneros y alrededor de 3000 especies, distribuidas principalmente en los trópicos y subtrópicos, y algunas otras zonas templadas. Son plantas de interés económico, pues proporcionan maderas, aceites o frutos comestibles. Muchas especies son de gran valor ornamental y se utilizan en jardinería, y algunas de ellas tienen propiedades medicinales y son de uso común [105].

La planta es conocida por los siguientes sinónimos científicos: *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown; ex Britton & Wilson, *Lippia asperifolia* A Rich, *Lippia erenata* Sessé & Moe; *Lippia geminata microphylla* grises; *Lippia geminata* H.B.K.; *Lippia glabriflora* Kuntze; *Lantana alba* (Mill.) y *Lantana geminate*, etc.; entre sus nombres comunes están, “Falsa melissa” o “Erva cidreira” (Brasil), “Curalotodo” (Colombia), “Pronto alivio” (Antioquia, Colombia), “Jualinama” (Guatemala) y “Salvia morada” (Argentina) [14, 44, 51, 89, 107].

Es una planta no muy común en condiciones naturales, suele encontrarse cultivada en patios y jardines como ornato por su fuerte aroma y sus propiedades medicinales y culinarias [14]. Cuando es silvestre crece en laderas, a la orilla de caminos y en la ribera de los ríos.

Es una hierba perenne, erecta, algunas veces arbusto o subarbusto, crece hasta dos metros de altura, y presenta un fuerte olor a limón, lima o menta. Hojas opuestas o ternadas, aovadas u oblongas, de 2-7 cm de longitud, de agudas a obtusas en el ápice. Sus flores son pequeñas, de color rosado, lila a violeta,

algunas veces blancas o amarillentas en el interior [14, 56]. El fruto es pequeño, seco, e incluido en el cáliz.

La planta crece en alturas de hasta 1800 msnm. Se extiende en América desde el sur de Estados Unidos, pasando por el Caribe Mexicano, algunos países de las Antillas, el Amazonas, hasta Argentina, además en el África tropical, India (introducida) y Australia (introducida) [12, 20, 42, 56]. Se desarrolla en regiones sin exceso de calor o frío, con temperaturas de hasta 32 °C, alta intensidad lumínica y en bosques húmedo subtropical templado, seco subtropical, húmedo montañoso bajo subtropical y muy húmedo subtropical cálido [4, 14, 24, 44, 51].

Normalmente se desarrolla en varios tipos de suelos, de preferencia arenosarcillosos con pH de 5-6, alta humedad, y que no presenten encharcamientos. Se adapta fácilmente a diferentes condiciones ambientales, pero la temperatura adecuada para su crecimiento varía de 15 a 25 °C, con una precipitación entre 700-1500 mm anuales [14, 44, 51].

Debido a que la planta es originaria de regiones secas, soporta con facilidad periodos de sequía de 4 a 6 meses. Bajo las condiciones del Caribe (mayor humedad), el crecimiento de la *Lippia alba* es continuo y produce una mayor cantidad de biomasa, comparado con regiones de mayor altitud y más templadas, en las cuales crece con mayor dificultad [14, 44, 51, 89].

La *Lippia alba* es una planta ampliamente utilizada como: infusión tiforme, en extractos etanólicos, aplicación tópica, por decocción de la planta y en aceites esenciales, entre otras [14, 44, 51, 89]; en la medicina tradicional latinoamericana, para diversos usos etnobotánicos y algunos farmacológicos. Es usada como analgésico, antipirético, y antiinflamatorio [14, 53, 65, 75, 89, 115, 135, 136], sedante [4, 14, 65, 84, 131, 132, 136], en culinaria [28, 81], remedio para la diarrea y el disenterismo [14, 22, 44, 81, 91], tratamiento de enfermedades cutáneas [4,

14, 47, 84], desórdenes gastrointestinales [4, 14, 15, 44, 46, 55, 81, 84, 91, 132], tratamiento de enfermedades hepáticas y dolores de la vesícula [38, 43, 81, 136], remedio para desórdenes menstruales [14, 38, 43, 81, 84], como antiespasmódica [4, 14, 79, 84], en el tratamiento de enfermedades respiratorias [4, 14, 21, 38, 44, 70, 91], el tratamiento de la sífilis [4, 136], como antirreumática y contra la hipertensión [81] y como sudorífica [14, 44, 53, 58]. También, se conocen sus propiedades, antimicrobiales [21], antivirales [1, 6], citotóxicas [65, 71, 115], anticonvulsionantes [65], antiulcerogénicas [90, 91], antibacterianas [94], antioxidantes [97, 119, 120], anticándida [28] y sedantes [75, 115, 130, 132, 137].

Investigaciones sobre aceites esenciales y sus particularidades referentes a las variaciones fitoquímicas en plantas silvestres y cultivadas han demostrado que en una misma especie botánica pueden producirse cambios en la composición química, aún en plantas localizadas a distancias cortas [56, 101, 102, 121, 123]. Aparentemente, las Verbenáceas tienen tendencia a variaciones fitoquímicas, en particular, la especie *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br, que ante la ausencia de diferencias morfológicas significativas entre plantas de distintas procedencias, permita la admisión de una variedad botánica distinta [41, 89, 99-102].

En diferentes publicaciones, se ha referenciado la marcada variabilidad de la composición de los aceites esenciales de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br respecto al origen geográfico, las condiciones de cultivo, la edad, y la parte de la planta empleada para la extracción, además de otros factores geobotánicos [4, 12-14, 56, 72, 101, 102, 110, 119-123, 126]. Esta variabilidad fitoquímica que se mantiene en el transplante no está vinculada a las condiciones de suelo o clima, probablemente, obedezca a una variabilidad genética y/o a posibles influencias de tipo ecológico de la región donde crece la planta [56, 97].

Por su parte, Hennebelle y colaboradores [56] han propuesto hacer una clasificación de los diferentes quimiotipos reportados, basándose en una serie de

criterios, a saber: la identidad de los compuestos mayoritarios, pero característicos, es decir, aquellos que correspondan al menos 5% del total del aceite esencial. También, es necesario conocer las principales rutas biosintéticas de los compuestos mayoritarios (**Esquema 1**), y observar si existen relaciones entre ellos, siendo uno precursor de otro o que hayan sido sintetizados todos por un precursor común. También es oportuno conocer los posibles efectos causados por las estaciones y los datos geográficos donde se localizaron los quimiotipos, con el objetivo de determinar posibles regiones para un quimiotipo dado.

Según los autores [56], se pueden establecer aproximadamente un total de 7 quimiotipos. El primer quimiotipo, resaltado con color azul en el **Esquema 1**, incluye todos los aceites esenciales que presenten como compuestos mayoritarios en su composición **citral**, *i.e.* geranial (4) y neral (6), y/o **linalol** (5). Existen algunas razones para no separar los aceites esenciales que presentan estos compuestos como quimiotipos diferentes, entre ellas, se encuentran que: algunos aceites presentan ambos componentes a la vez [13, 68], y que en estudios realizados en plantas de *Lippia alba* en Argentina por Ricciardi y colaboradores [100], el AE presentaba citral como compuesto mayoritario en las estaciones de otoño y primavera, mientras que en el verano el compuesto mayoritario fue el linalol [100]. Tal y como se aprecia en el **Esquema 1**, estos tres compuestos provienen de 3 precursores comunes que pueden biotransformarse entre sí, a saber: el pirofosfato de geranilo (1), el pirofosfato de linalilo (2), y el pirofosfato de nerilo (3), lo cual podría explicar, en parte, la cercana relación entre estos compuestos [56].

La **tagetenona** (8), resaltada con el color rojo en el **Esquema 1**, al igual que el citral, es la mezcla de dos isómeros, ocimenona y mircenona (8), y precisamente éstos son los compuestos mayoritarios de un segundo quimiotipo. Sin embargo, la mircenona siempre está presente en mayor cantidad que la ocimenona. El AE de las plantas con dicha composición es propio de Guatemala, y se caracteriza por un

olor a rancio [42]. Este conjunto de compuestos provienen biosintéticamente a partir del mirceno (7) [37, 56].

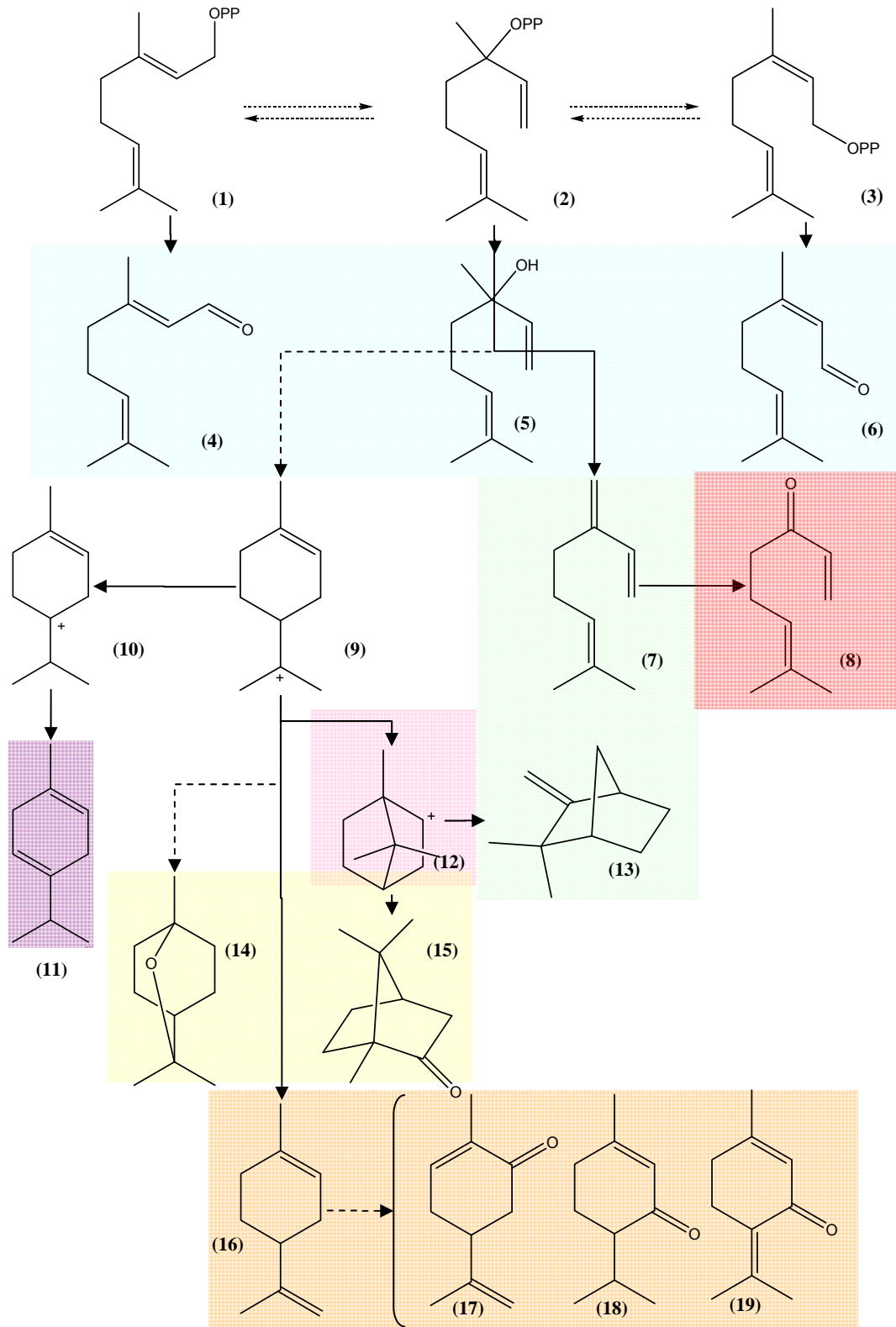
Un tercer quimiotipo está formado por los siguientes compuestos mayoritarios: **limoneno** (16), y/o alguna de estas 5 cetonas monoterpénicas con estructuras químicas relacionadas, todas derivadas del limoneno, y con rutas biosintéticas muy similares, a saber: la **carvona** (17), **dihidrocarvona**, **piperitona** (18), **piperitenona** (19), o **lippiona** (Resaltadas en color naranja en el **Esquema 1**). Como se aprecia en el **Esquema 1**, el limoneno proviene de un precursor común, que es el pirofosfato de linalilo (2), el cual es biotransformado en el catión α -terpenilo (9) y éste en limoneno (16) [37, 56].

El cuarto quimiotipo está conformado por aquellos AEs que contienen como mayor componente el **mirceno** (7) y **canfeno** (13) [100, 113], de los cuales el primero proviene del pirofosfato de linalilo (2), y el segundo del catión bornilo (12), al igual que el alcanfor. Éstos se encuentran subrayados en color verde en el **Esquema 1**.

Un quinto quimiotipo lo conforman los aceites esenciales cuyo mayor componente es el **γ -terpineno** (11), señalado con color violeta en el **Esquema 1** [48], y proviene del catión terpinen-4-ilo (10), con una ruta biosintética muy similar a la observada para el limoneno. En el sexto quimiotipo, resaltado de color amarillo, aparecen el **1,8-cineol** (14) y el **alcanfor** (15) [36]. El primero, sintetizado a partir del catión α -terpenilo (9), y el segundo a partir del catión bornilo (12).

Finalmente, el séptimo quimiotipo fue descrito por Tucker y colaboradores [129], con **estragol** como el compuesto mayoritario. Sin embargo, tal y como lo reportan Tucker y colaboradores, además de ser un quimiotipo diferente a todos los demás, presenta una variación morfológica respecto a otros quimiotipos, pues el color de las flores de *Lippia alba* es amarillo, mientras que el color usual de las flores de esta planta es violeta claro o rosado.

Esquema 1. Principales rutas en la biosíntesis de los compuestos mayoritarios de los diferentes quimiotipos de *Lippia alba* [37, 56].



Por su parte, Fischer y colaboradores también han descrito cambios en la forma, el ancho de las hojas y la longitud del pedúnculo de las flores entre los quimiotipos citral y mircenona, que han reportado [42]. Matos y colaboradores [75], han descubierto también cambios en la longitud y el ancho de las hojas y la inflorescencia de plantas de *Lippia alba* que crecen en Brasil, en especial, en un quimiotipo “Citral-Mirceno”.

En la **Tabla 2** se encuentra resumida la información sobre los diferentes quimiotipos reportados y su país de origen. Así mismo, en la **Figura 3**, se presenta la distribución de estos quimiotipos en el mundo.

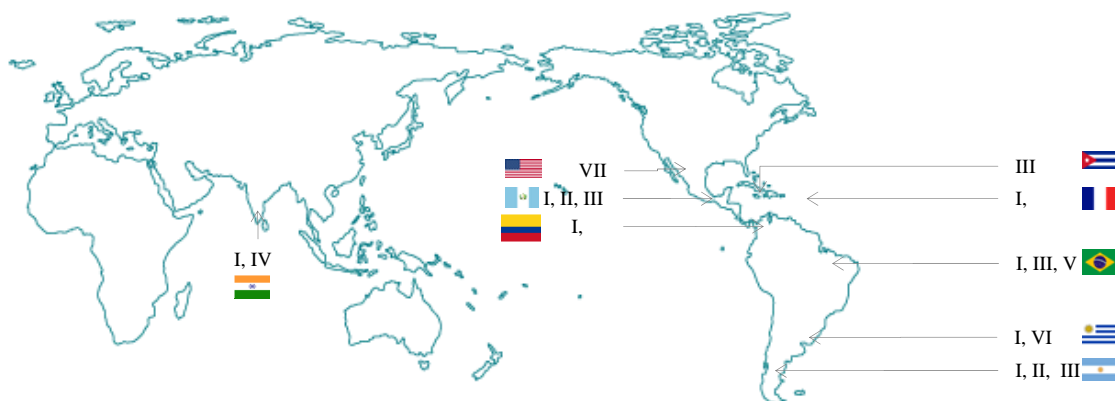
Tabla 2. Variación química de los AEs de *Lippia alba* de diferentes regiones del planeta.

Países	Componentes principales
Antillas Francesas	<ul style="list-style-type: none"> ▲ Neral (7.8%), geranial (9.1%), α-guaieno (6.3%), <i>cis</i>-β-ocimeno (13.3%) y β-cariofileno (9.2%). ▲ Neral (33.1%), geranial (20.8%), α-guaieno (6.3%) y <i>cis</i>-β-ocimeno (6.3%). ▲ Limoneno (51.1%) y germacreno D (18.1%). ▲ Carvona (67.6%) y limoneno (18.4%). [56]
Argentina	<ul style="list-style-type: none"> ▲ Mircenona (65%) y borneol (12%). [102] ▲ Citral y linalol * ▲ Citral * ▲ Limoneno y lippiona * ▲ Piperitona * ▲ Dihidrocarvona, alcanfor, linalol y citral. * [41, 99-102]
Brasil	<ul style="list-style-type: none"> ▲ Linalol (46.5%-90.7%) [4, 111] ▲ Linalol (50-79%) y 1,8-cineol (7.3-14.1%) [4, 10] ▲ Citral (37.1%) y mirceno (15%) [4, 84] ▲ Neral (9.6%), geranial (12.9%), β-cariofileno (24.3%) y 2-undecanona (9%) [4, 33] ▲ Limoneno (9-13%), neral (27.18%) y geranial (35.63-40.95%) [20] ▲ Citral (63-71%), limoneno (9-13%) [20] ▲ Carvona (42-55%), limoneno (23-30) [5, 20] ▲ Carvona (32%), limoneno (32%), y mirceno (11%) [138] ▲ Germacreno D (25%), neral (14%) y geranial (23%). [138] ▲ 1,8-cineol (35%), limoneno (18%) y carvona (8.6%). [138] ▲ Citral (70.6-79%) [112] ▲ γ-Terpineno (46%), <i>p</i>-cimeno(9%) y β-cariofileno (7%) [48]

Colombia	<ul style="list-style-type: none"> ▲ Carvona (40-57%), limoneno (24-37%), biciclosesquifelandreno (2-22%) [119, 120] ▲ Neral (19.96%), geranial (25.44%), 6-metil-5-hepten-2-ona(3.79%) [80,121, 123] ▲ Carvona (23.43%), limoneno (20.76%), geranial (9.60%), neral (9.60%) [80, 121, 123]
Cuba	<ul style="list-style-type: none"> ▲ Carvona (40%), piperitenona (8.26%) y piperitona (3.62%) [93, 94] ▲ Carvona (28.95%), limoneno (6.50%), piperitenona (6.35%) y β-guaieno [93, 94]
Estados Unidos de América	<ul style="list-style-type: none"> ▲ Metil chavicol (56.46%), y 1,8-cineol (12.62%) [129]
Guatemala	<ul style="list-style-type: none"> ▲ Limoneno (44%), y piperitona(31%) [110] ▲ Mircenona (58%) y <i>cis</i>-ocimenona (13.1%) [42] ▲ Geranial(27%), 1,8-cineol (25.4%) y neral (18.9%)[42]
India	<ul style="list-style-type: none"> ▲ Linalol (65%) [12, 13, 68, 74] ▲ Mirceno (26.4%), geranial (9.8%) y neral (6.4%) [33, 98, 113]
Perú	<ul style="list-style-type: none"> ▲ Carvona (50-79%), germacreno D (5.6%) y limoneno (5.1%) [57]
Uruguay	<ul style="list-style-type: none"> ▲ Linalol (55%) [72]

* Cantidades relativas no especificadas por los autores.

Figura 3. Ubicación geográfica de los 7 quimiotipos básicos de la especie *Lippia alba* estudiados.



Respecto a la obtención del aceite esencial de *Lippia alba*, se observó que los mejores rendimientos para un quimiotipo “Citral” se obtenían con la máxima intensidad lumínica [4]. Por otra parte Castro [25, 26], analizando el mismo quimiotipo, descubrió que la mayor producción de biomasa foliar y el rendimiento de los aceites esenciales ocurren durante la primavera y el verano brasileño, debido a que en estas épocas el área y el diámetro de los tricomas secretores de los aceites esenciales son mayores. Silva y colaboradores [112], además de observar que en el invierno el rendimiento era menor para un quimiotipo “Citral”, también detallaron que en el verano hubo una mayor producción de metabolitos secundarios, posiblemente por un aumento en el estrés de la planta a causa del calor que hizo en esta estación.

Desde el año 2003, algunos trabajos de Santos, Innecco y colaboradores [108] se han centrado en el estudio del secado en sombra, el efecto de las estaciones, y periodos de lluvia y sequía, así como la hora de cosecha sobre el aceite esencial de plantas de *Lippia alba*. Para el quimiotipo “Limoneno-Carvona” se encontró que el rendimiento de los aceites esenciales aumentaba al cuarto día de secado natural, en las dos temporadas (seca, que comprende de julio a diciembre, y lluviosa, de enero a junio), siendo mayor para la época seca, al parecer, por el aumento en la temperatura y la intensidad lumínica [108]. Estos factores ambientales están directamente relacionados con procesos primarios como la respiración y la fotosíntesis y, por ende, pueden influenciar el metabolismo secundario, que depende del metabolismo primario. Por ejemplo, la intensidad lumínica puede afectar la producción de aceite esencial a través de la activación de enzimas fotosensibles involucradas en la ruta del ácido mevalónico [11, 108, 127].

Además de un aumento en la producción del aceite esencial, también evidenciaron que el secado favorece la concentración de limoneno y carvona, especialmente, en la época seca en el cuarto día de secado. La época lluviosa, en vez de mostrar

aumentos considerables, presentó una disminución en la concentración de dichos componentes [108].

Nagao y colaboradores [83], en su trabajo sobre un quimiotipo “Citral-Limoneno” mostraron, que el rendimiento del aceite esencial era mayor en la temporada seca que durante la época lluviosa, así como la mejor hora de cosecha era las 3 de la tarde, para cualquiera de las dos temporadas. Asimismo, observaron que el mayor porcentaje relativo de los constituyentes mayoritarios, limoneno y citral, se obtiene a las 11 de la mañana y a las 3 de la tarde, para las dos épocas. Esto es debido a que muchas especies sincronizan la hora de emisión de estos compuestos aromáticos con la hora de actividad de los polinizadores [83]; los autores resaltaron que también los cambios climáticos durante el día podían producir cambios menores, pero muy rápidos en los constituyentes de un aceite esencial [83]. Al igual que Nagao, Santos y colaboradores reportaron [109], que la mayor concentración de limoneno y carvona en dicho quimiotipo se obtenían en la estación seca, y a las 3 de la tarde, para ambas temporadas.

Nagao y colaboradores [82] también realizaron el estudio de secado al ambiente con luz solar para el quimiotipo “Limoneno-Citral”, en el cual encontraron que en la temporada seca la humedad en la planta alcanzó un valor del 23% al segundo día de secado, la cual se mantuvo relativamente constante hasta el octavo día. Sin embargo, para la estación lluviosa obtuvieron una humedad en la planta del 19% hasta el octavo día. A partir del octavo día aumentó el peso del material vegetal en las dos estaciones, debido al crecimiento en la humedad del aire ambiente y la ruptura del equilibrio higroscópico [82]. Por ello, los autores recomiendan que el secado sea llevado a cabo hasta el octavo día, para obtener los rendimientos máximos tanto de aceite, que no difiere mucho del obtenido del cuarto día, en el cual se logra el máximo rendimiento, como del citral, el cual es el componente mayoritario en el aceite aislado, no sólo en el octavo día, sino también en las plantas recolectadas en la estación seca. Por su parte, el contenido del limoneno

no se vio afectado considerablemente por las épocas de cosecha. Finalmente, los autores consideran, que las estaciones pueden afectar considerablemente las condiciones del suelo, causando estrés osmótico a las plantas, y éstas, a su vez, presentan alteraciones en el rendimiento de los metabolitos secundarios [82].

Respecto al secado de *Lippia alba* con aire caliente, según diferentes autores, se ha recomendado el uso de temperaturas no superiores a 40°C, puesto que éstas proporcionan mejores rendimientos [14, 25]. No obstante, Barbosa y colaboradores [16], utilizando un secador de bandejas con flujo ascendente (aire caliente), en el rango de temperatura de 25 a 80°C, con el objetivo de evaluar los efectos, positivos o negativos, sobre el rendimiento de aceites. Los tiempos de secado empleados por estos autores fueron 1885 min (aproximadamente 31 h) para temperatura ambiente (25°C), y 205, 110, 70, 45, y 33 min para las temperaturas de 40, 50, 60, 70 y 80°C, respectivamente. El rendimiento obtenido para las plantas frescas fue del 0.66%, mientras que para las secas varió entre 0.55 y 0.58%. Luego, se apreció una reducción entre el 12 y el 17% en el rendimiento del aceite. Esto puede ocurrir porque el aceite esencial de *Lippia alba* es almacenado en los tricomas secretores presentes en la epidermis foliar, luego el calentamiento excesivo puede favorecer la volatilización del aceite esencial que está localizado en los tricomas más externos [16].

Sin embargo, uno de los efectos de mayor relevancia del secado en este estudio, fue el aumento de un 75.74% de citral (neral+geranial) en las plantas frescas a un 82 a 84% (aproximadamente un 6.89% mayor) en las plantas secadas a diferentes temperaturas, y la disminución de las cantidades relativas de nerol y geraniol. Al parecer, esto se debe a la oxidación de los alcoholes nerol y geraniol a sus respectivos aldehídos, neral y geranial, durante el proceso de secado. No obstante, dicha transformación no se vio marcada por una temperatura en especial y se presentó para todo el rango de temperaturas ensayado [16].

1.6 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE *Lippia alba* (Mill). N.E. Brown

Sin lugar a dudas, las actividades biológicas de los aceites esenciales dependen de sus componentes, sus estructuras y las concentraciones en que se hallen presentes. Por ejemplo, se ha observado que los aceites esenciales que contienen aldehídos alifáticos α,β -insaturados, presentan inhibición del desarrollo microbiano, aún en bajas concentraciones. Por otra parte, los sesquiterpenos, $C_{15}H_{24}$, aunque no son tan efectivos en la inhibición del desarrollo de microorganismos, suelen presentar actividad citotóxica y mutagénica. Respecto a la actividad antibacteriana, diferentes autores [70], han mostrado como los aceites esenciales con un elevado contenido de fenoles, son potentes microbicidas o inhibidores, la cual depende de sus composiciones químicas.

Como se había indicado anteriormente, la especie *Lippia alba* llama la atención de la comunidad por sus aplicaciones etnobotánicas, de allí la amplia variedad de estudios realizados. Por ejemplo, en Brasil, Viana y colaboradores [135], analizando los extractos de dos quimiotipos de *Lippia alba*, a saber: “Citral” y “Carvona”, encontraron efectos analgésicos y anti-inflamatorios; el quimiotipo “Citral” resultó ser más activo por presentar dosis efectivas menores que para el quimiotipo “Carvona”. Otros estudios con estos dos quimiotipos realizados por estos autores en 1997, demostraron efectos ansiolíticos en ratones [132].

Los estudios realizados por Costa y colaboradores [32], reportaron que el AE de *Lippia alba* presentó actividades analgésica, antiinflamatoria y antipirética. Extractos acuosos de la planta también han provocado disminución del ritmo cardíaco en ratones, al parecer por sus efectos antihipertensivos. Inclusive, la infusión de esta especie posee efectos antiulcerosos [45, 52, 89] y sedativos. Los efectos anteriormente nombrados pueden estar relacionados con la presencia de flavonoides en los extractos [2, 45, 137].

Cáceres y colaboradores [21] reportaron la inhibición de *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus pneumoniae*, bacterias gram-positivas responsables de la mayoría de afecciones respiratorias en el ser humano. Diferentes estudios reportan las actividades antifúngica y antibacterial de tres quimiotipos de *Lippia alba*, a saber: Oliveira y colaboradores [84], estudiaron la actividad del quimiotipo “Citral” (Brasil) contra *Candida albicans*, *parapsilosis* y *guilliermondu*, *Cryptococcus neoformans*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, Pino y colaboradores [94], para un quimiotipo “Carvona” (Cuba) que actuó contra *Streptococcus aureus*, *Staphylococcus faecalis* y *Bacillus subtilis*, y para el quimiotipo “Linalol” brasileño, Teixeira y colaboradores [128] también reportaron la actividad contra *Candida albicans*. El amplio rango de acción mostrado por el quimiotipo “Citral”, se debe, como se comentó anteriormente, al contenido de compuestos oxigenados, los cuales presentan un mayor rango de actividad contra los microorganismos que sus análogos hidrocarburos.

Vale y colaboradores [132], reportaron en su publicación que metabolitos aislados de AEs de *Lippia alba*, tales como limoneno, citral y β -mirceno, ejercían interacciones de tipo dopaminérgica, las cuales están implicadas en efectos sedativos, antidepresivos y de relajación muscular.

Los aceites esenciales de *Lippia alba* también han mostrado actividades antiviral y citoestática [2, 6, 71].

1.7 CIENCIOMETRÍA

La comunidad científica cuenta con mecanismos que evalúan la calidad y la confiabilidad de su producción intelectual. Asimismo, esa valoración es la que se utiliza, entre otras herramientas, para direccionar y planificar las investigaciones. Por ello, a través de la vigilancia tecnológica se realiza un proceso sistemático y organizado que consta de las siguientes etapas: observación, captación, análisis y difusión, lo que permite identificar oportunidades, tendencias, dificultades o amenazas y que permitan tomar decisiones, disminuir riesgos o anticiparse a los cambios [8, 103].

La vigilancia tecnológica permite determinar líneas de investigación, soluciones tecnológicas disponibles, tecnologías emergentes, la dinámica de las tecnologías, los centros de investigación, los líderes de proyectos identificando las empresas que compiten en el área de interés [8, 103, 134].

Algunas de las herramientas empleadas por la vigilancia tecnológica son las bases de datos de artículos y patentes, los buscadores de *Internet*, que son medios que permiten procesar gran cantidad de datos, que son objetos de la cienciometría.

La cienciometría estudia los aspectos “cuantitativos” de la ciencia como disciplina o actividad económica, forma parte de la sociología de la ciencia y encuentra aplicación en el establecimiento de las políticas científicas, donde incluye, entre otras, las de publicaciones. Ésta emplea técnicas métricas para la evaluación y examina el desarrollo de las políticas científicas de países y organizaciones [8].

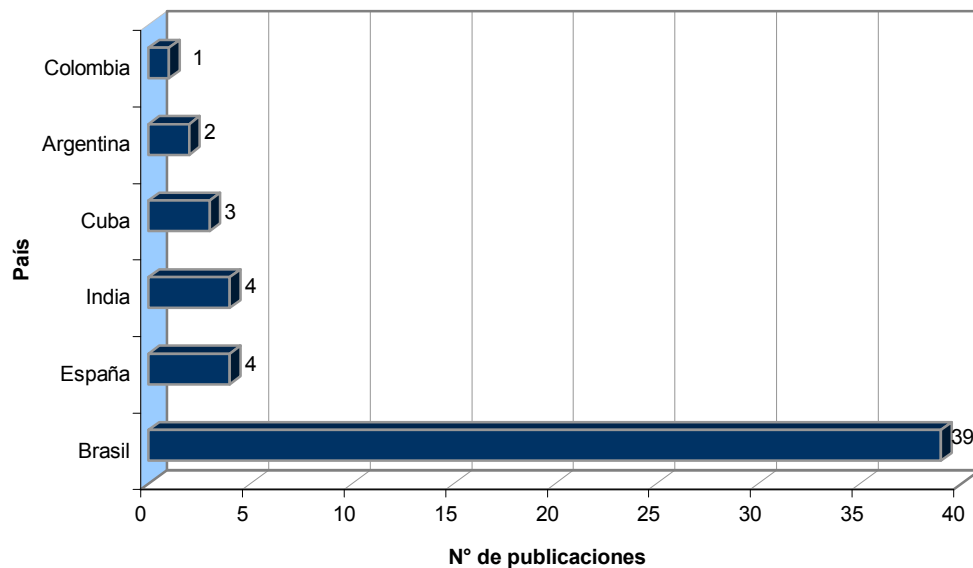
Por ello, con el objetivo de analizar y visualizar el estado actual y la dinámica experimentada en el estudio de la *Lippia alba* a través de los años, se realizó un estudio cienciométrico de la producción científica existente sobre esta especie con dos bases de datos, a saber: ***Elservier (Scopus)*** y ***Web of Science (ISI Web of***

Knowledge, Thomson, Versión 3.0), consultadas desde los años 1979 y 1975, respectivamente, hasta el 30 de marzo de 2007.

1.7.1 Base de datos *Elservier (Scopus)*

1.7.1.1 Relación país – número de publicaciones: En la **Figura 4** se presenta la relación entre los países y el número de publicaciones sobre *Lippia alba*, realizadas en el periodo de 1979 a 2006. Sin lugar a dudas, Brasil, con un total de 39 publicaciones, hace el mayor aporte en esta rama debido a su enfoque comercial en la explotación de sus recursos naturales. No obstante, aunque no fueron reportados en su totalidad en el gráfico, las investigaciones se han desarrollado también en 18 países, entre ellos, se encuentran: Italia, Holanda, México, Francia, Alemania, Australia, Uruguay, Guatemala, Croacia, Austria, Estados Unidos de América y Portugal (con 1 artículo c/u). El alto número de publicaciones se debe a la gran diversidad de quimiotipos de *Lippia alba*, la facilidad de su adaptación a diferentes condiciones geobotánicas y sus propiedades etnofarmacológicas.

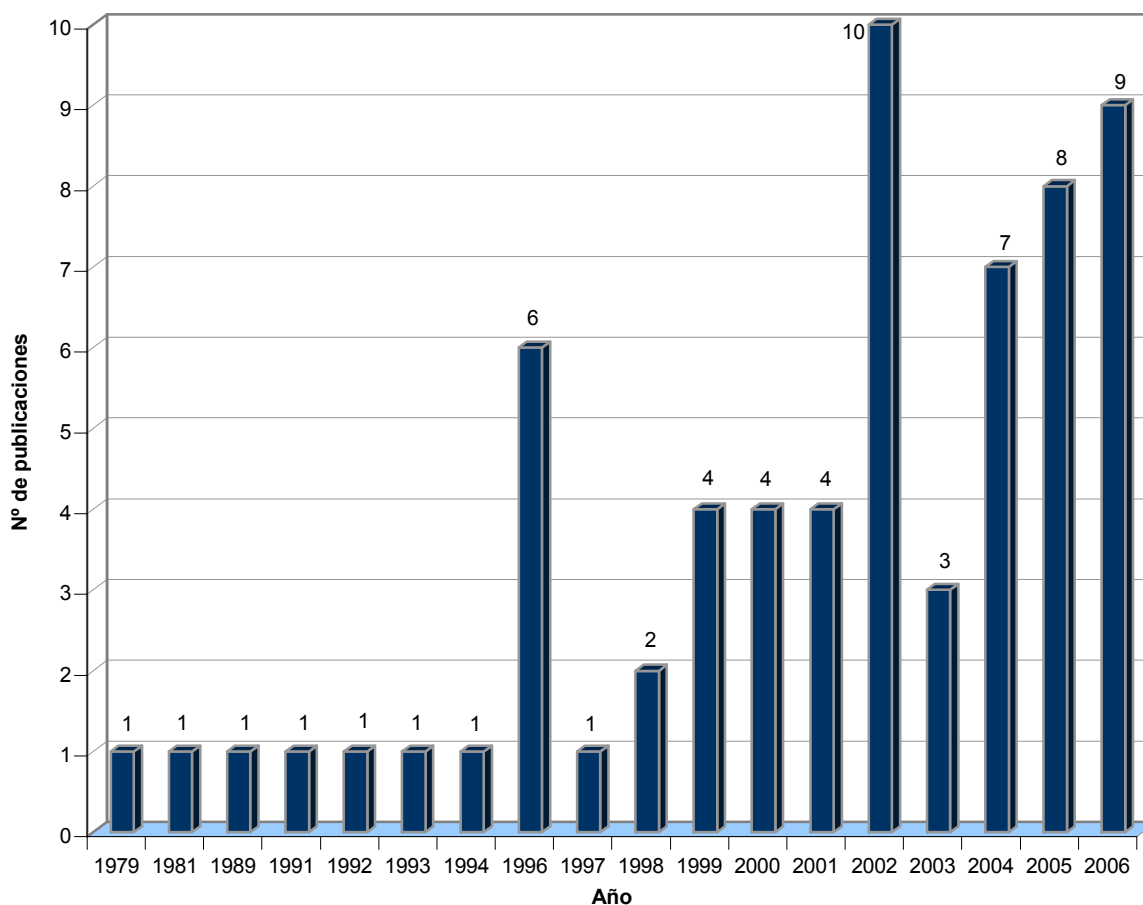
Figura 4. Relación entre los países y el número de publicaciones sobre *Lippia alba*.



Fuente: *Elservier (Scopus)*. Periodo de observación: desde el año 1979 hasta el 2006. Fecha de consulta: 30 de marzo de 2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH (lippia alba).

1.7.1.2 Relación año – número de publicaciones: La **Figura 5** representa la dinámica en la investigación de la especie *Lippia alba*, desde 1979 hasta la actualidad. Tal y como lo muestra la tendencia, desde el año 1996 se observa un aumento en la producción intelectual, con un tope máximo de 10 publicaciones en el año 2002. Sin embargo, contrario a lo esperado, hubo un descenso a 3 publicaciones en el año 2003, pero con un aumento en el año 2006. Esto puede ser debido a un re-enfoque en la dirección y planificación en las investigaciones sobre *Lippia alba* en los últimos años. También es importante resaltar, que Brasil ha dado el principal aporte en los últimos años, en parte, por su búsqueda de condiciones óptimas para el cultivo de esta especie.

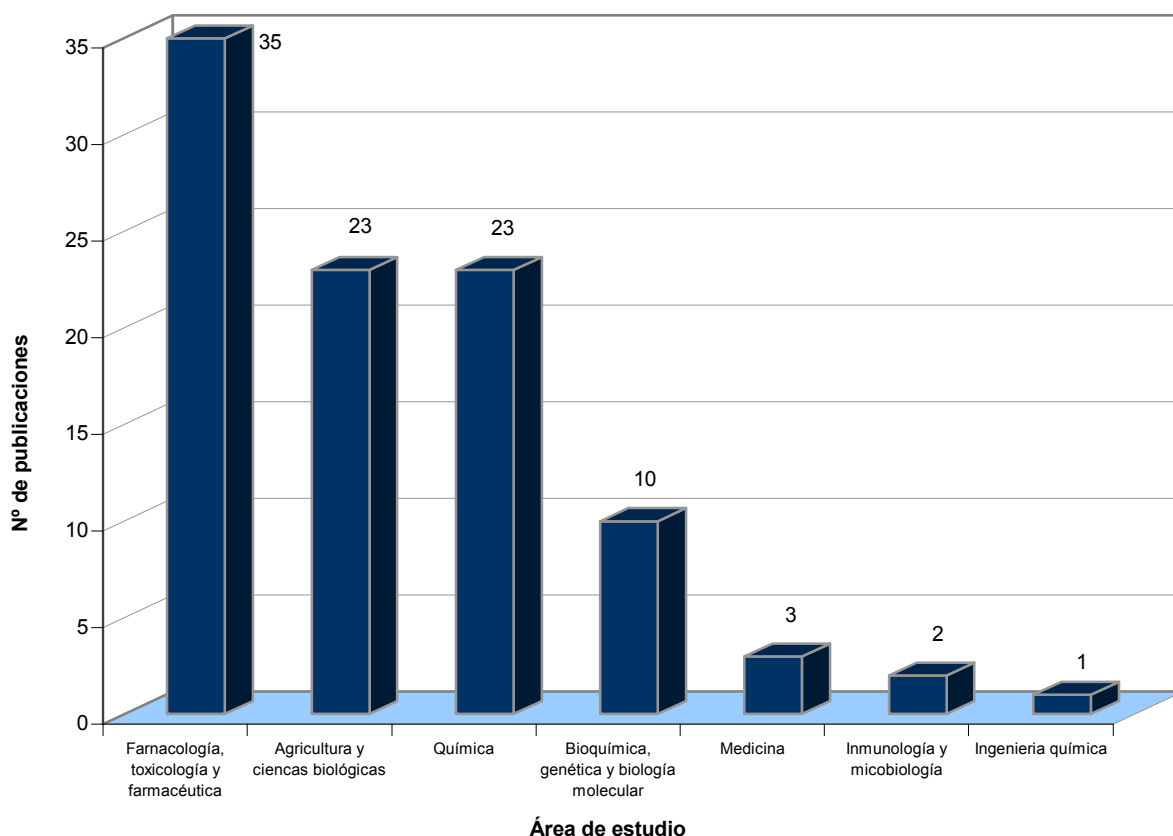
Figura 5. Relación entre el año y el número de publicaciones sobre *Lippia alba*.



Fuente: Elsevier (Scopus). Periodo de observación: desde el año 1979 hasta el 2006. Fecha de consulta: 30 de marzo de 2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH (lippia alba).

1.7.1.3 Relación área de estudio – número de publicaciones: En la **Figura 6** se presentan las principales áreas del estudio sobre *Lippia alba*. Como se aprecia, las áreas de farmacología, toxicología y farmacéutica presentan un total de 35 publicaciones, debido a la diversa actividad biológica, que presentan los diferentes quimiotipos de *Lippia alba*. En segundo lugar, se encuentran la agricultura y las ciencias biológicas, con 23 publicaciones, al igual que el área de química. Esto se debe al intenso estudio de las condiciones de cultivo, modificaciones genéticas y de tratamiento postcosecha, así como las múltiples aplicaciones de los constituyentes principales del aceite esencial.

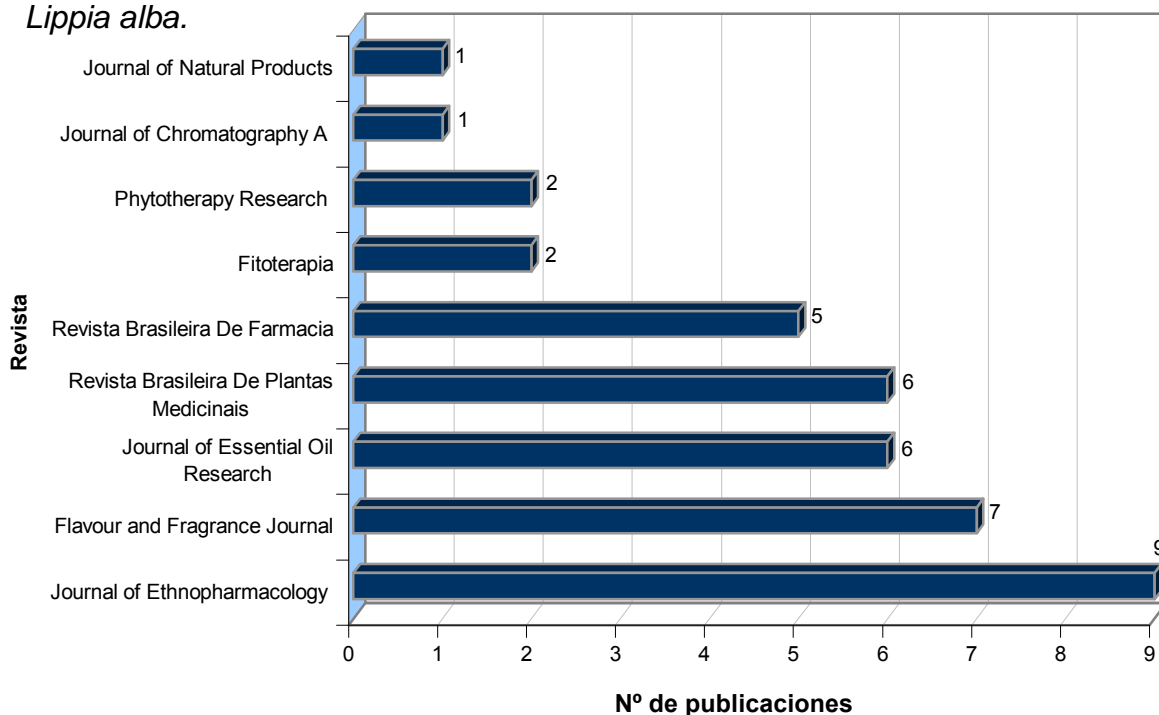
Figura 6. Relación entre el área de estudio y el número de publicaciones sobre *Lippia alba*.



Fuente: Elsevier (Scopus). Periodo de observación: desde el año 1979 hasta el 2006. Fecha de consulta: 30 de marzo de 2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH (lippia alba).

1.7.1.4 Relación revista – número de publicaciones: En la **Figura 7** se presentan las revistas internacionales en las cuales se reportaron los 65 artículos sobre *Lippia alba* reportados por **Scopus**. En total 5 revistas se encuentran con el mayor número de publicaciones sobre esta especie, a saber: *Journal of Ethnopharmacology* (9), *Journal of Flavour and Fragrance* (7), *Journal of Essential Oils Research* (6) y dos revistas brasileñas, *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* (6) y la *Revista Brasileira de Farmacia* (5). Además, 4 revistas también de origen brasileño, indexadas en **Scopus** presentan al menos una publicación cada una. Esto ratifica nuevamente, que en Brasil se lleva a cabo el mayor número de estudios sobre *Lippia alba*. Asimismo, es interesante ver cómo en acuerdo con el **Numeral 1.7.1.3**, las investigaciones se hallan dirigidas hacia estudios farmacológicos, toxicológicos y farmacéuticos. De ahí, que las revistas, que aparecen integradas en la gráfica, de acuerdo con su perfil, contienen 25 de las 35 publicaciones relacionadas con esta área de investigación.

Figura 7. Relación entre revistas científicas y el número de publicaciones sobre *Lippia alba*.

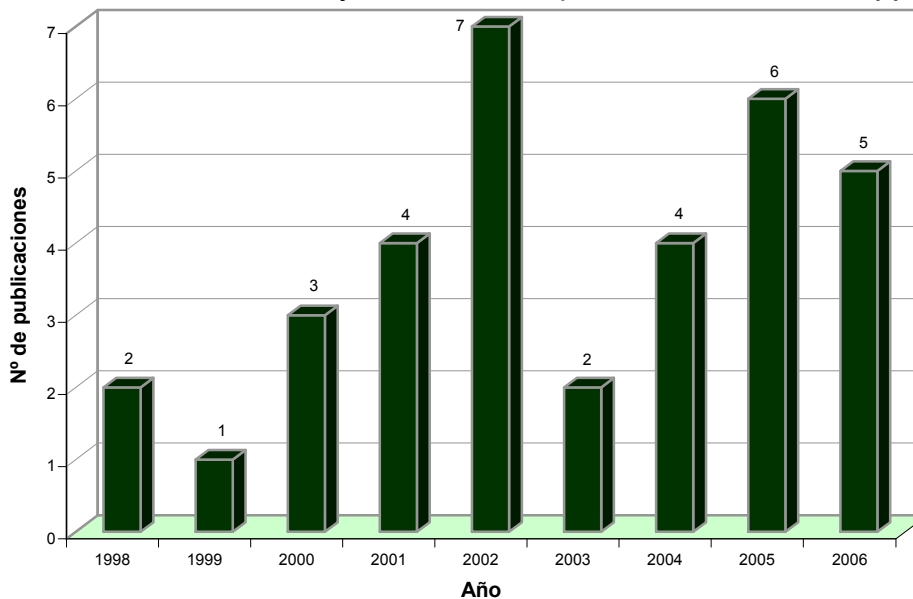


Fuente: Elsevier (Scopus). Periodo de observación: desde el año 1979 hasta el 2006. Fecha de consulta: 30 de marzo de 2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH(lippia alba) AND (LIMIT-TO(DOCTYPE, "ar"))).

1.7.2 Base de datos *Web of Science (ISI Web of Knowledge, Thomson)*

1.7.2.1 Relación año – número de publicaciones: Aunque esta base de datos, a diferencia de *Scopus*, puede recolectar información desde 1975, en la **Figura 8** se representaron las publicaciones encontradas, usando esta herramienta desde 1998. En el año 1991 fue realizada una publicación, sin embargo, no es presentada en el gráfico. Aunque la tendencia observada es similar hasta el año 2002, a la encontrada con *Scopus*, la publicación de artículos de los últimos 3 años ha sido mucho más incesante. También se encontró una diferencia de 26 artículos entre los analizados por este motor de búsqueda y el de *Scopus*. Igualmente, se puede observar que el año 2002 se ha caracterizado por poseer el número máximo de publicaciones sobre *Lippia alba*. En general, se puede concluir que el avance en la tecnología y de herramientas más precisas para el análisis, así como la diligente necesidad de encontrar sustancias químicas usadas en la industria farmacéutica y cosmética, y la optimización en la obtención de éstas han estimulado en los últimos años el estudio de especies promisorias como *Lippia alba*.

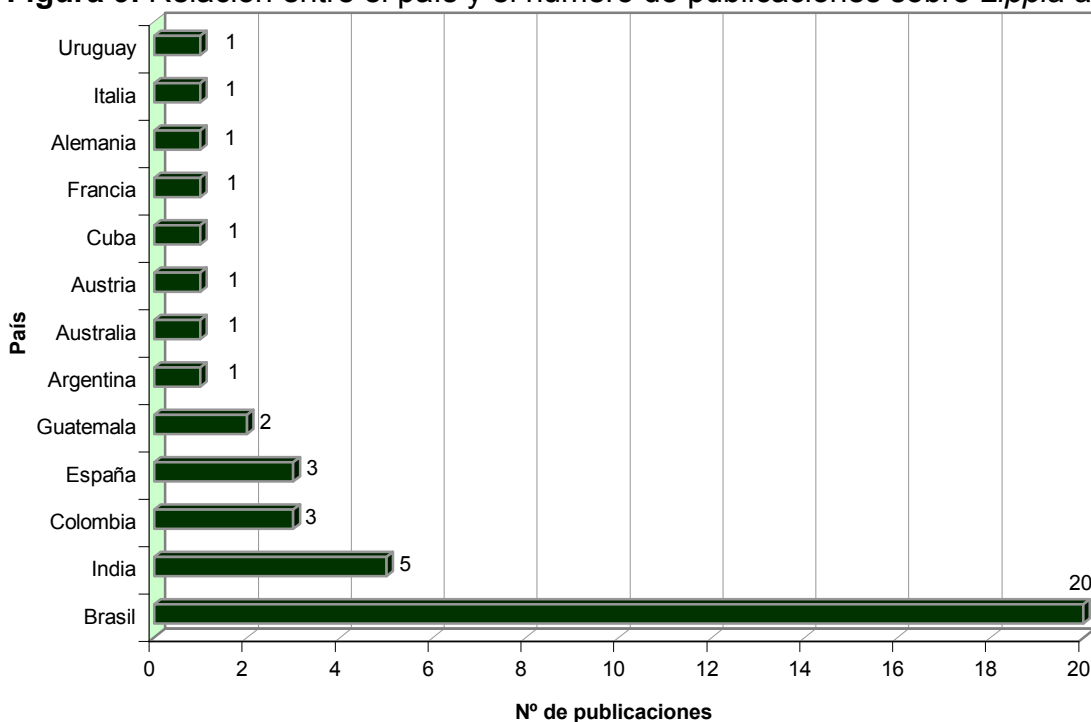
Figura 8. Relación entre el año y el número de publicaciones sobre *Lippia alba*.



Fuente: *Web of Science (ISI Web of Knowledge, Thomson, version 3.0)*. Periodo de observación: desde el año 1975 hasta el 2006. Fecha de consulta: 30 de marzo de 2007. Ecuación de búsqueda: TS=(*Lippia alba*) DocType=All document types; Language=All languages; Databases=SCI-EXPANDED, SSCI, A&HCI; Timespan=1975-2006.

1.7.2.2 Relación país – número de publicaciones: como se aprecia en la **Figura 9**, Brasil aparece como el país con la mayor producción intelectual en los estudios sobre *Lippia alba*. Al igual que lo reportado por **Scopus**, India es el segundo país en orden de artículos publicados, seguido por Colombia y España, desde 1975 hasta la actualidad. También se destaca que dos de los tres artículos publicados por investigadores colombianos fueron desarrollados en el Laboratorio de Cromatografía, en la Universidad Industrial de Santander [119].

Figura 9. Relación entre el país y el número de publicaciones sobre *Lippia alba*.

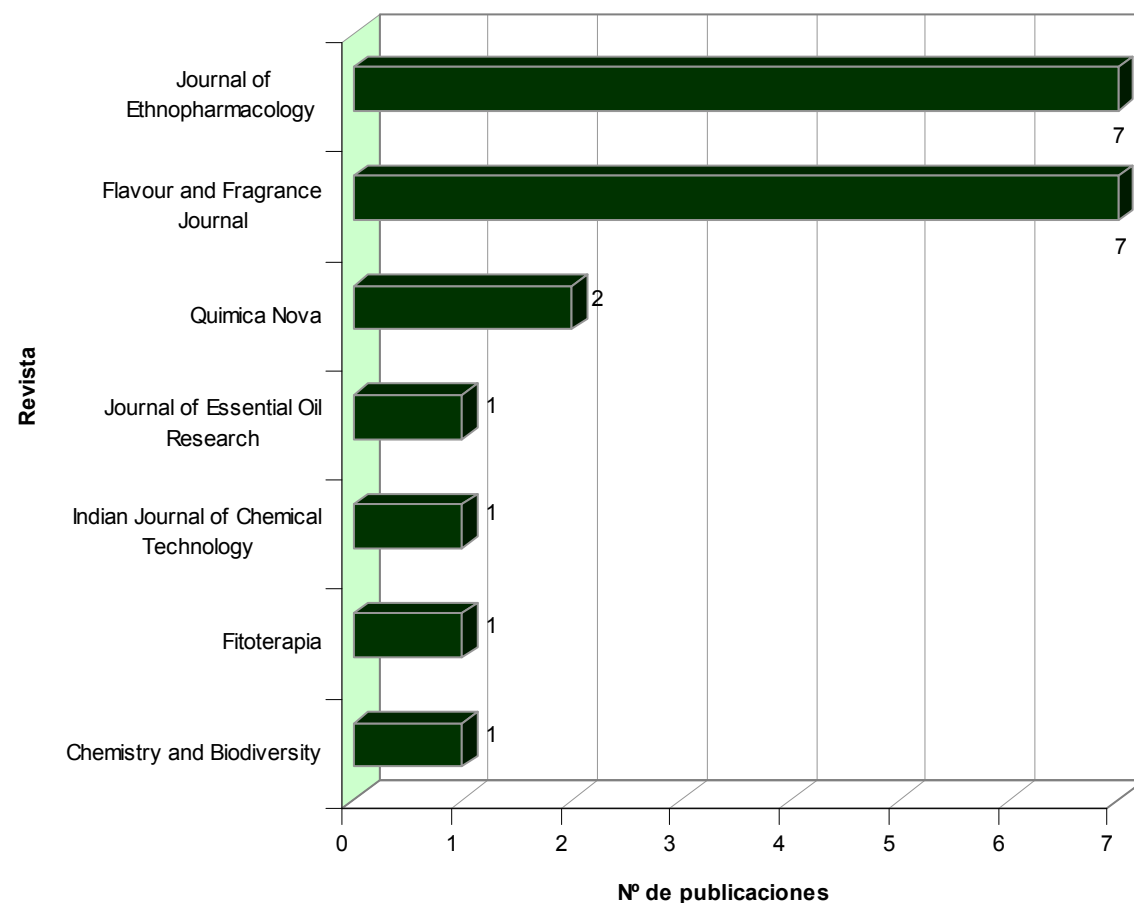


Fuente: (ISI **Web of Knowledge**, Thomson, version 3.0). Período de observación: desde el año 1975 hasta el 2006. Fecha de consulta: 30 de marzo de 2007. Ecuación de búsqueda: TS=(Lippia alba) DocType=All document types; Language=All languages; Databases=SCI-EXPANDED, SSCI, A&HCI; Timespan=1975-2006.

1.6.2.3 Relación revista – número de publicaciones: En la **Figura 10** se presentan algunas de las revistas internacionales en las cuales han sido reportadas las 36 publicaciones referenciadas en el **Web of Science**. Así como se indicó anteriormente, *Journal of Ethnopharmacology* (7) y *Flavour and*

Fragrance Journal (7), se encuentran como las revistas de mayor impacto respecto a la publicación de artículos sobre *Lippia alba*.

Figura 10. Relación entre revistas científicas y el número de publicaciones sobre *Lippia alba*.

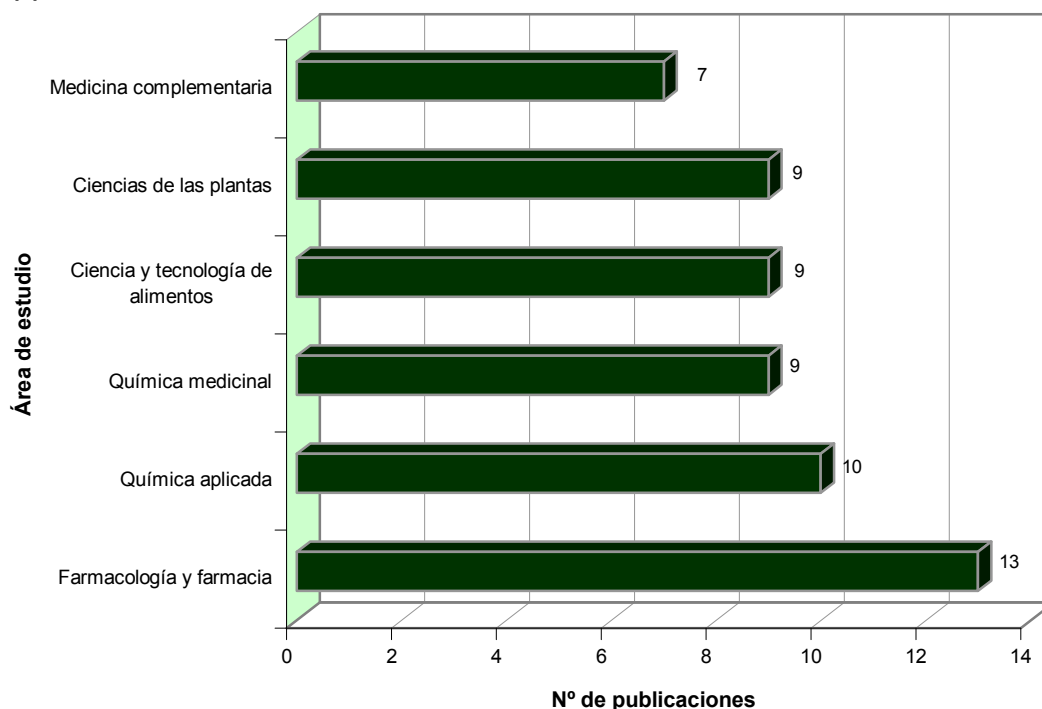


Fuente: (*ISI Web of Knowledge, Thomson, version 3.0*). Período de observación: desde el año 1975 hasta el 2006. Fecha de consulta: 30 de marzo de 2007. Ecuación de búsqueda: TS=(*Lippia alba*) DocType=All document types; Language=All languages; Databases=SCI-EXPANDED, SSCI, A&HCI; Timespan=1975-2006.

1.7.2.4 Relación área de estudio – número de publicaciones: con resultados muy similares a los obtenidos por *Scopus*, en la **Figura 11**, se presentan las principales áreas de estudio en las cuales han sido reportados los artículos sobre *Lippia alba*, analizados por *Web of Science*. Se resalta además de las publicaciones anteriormente mencionadas en los campos de química farmacéutica

(29), el área de ciencia y tecnología de alimentos (9), posiblemente, por el empleo de compuestos como la carvona, presentes en algunos quimiotipos de *Lippia alba* en dicha área.

Figura 11. Relación entre el área de estudio y el número de publicaciones de *Lippia alba*.



Fuente: (ISI *Web of Knowledge*, Thomson, versión 3.0). Período de observación: desde el año 1975 hasta el 2006. Fecha de consulta: 30 de marzo de 2007. Ecuación de búsqueda: TS=(Lippia alba) DocType=All document types; Language=All languages; Databases=SCI-EXPANDED, SSCI, A&HCI; Timespan=1975-2006.

1.8 MERCADO MUNDIAL DE ACEITES ESENCIALES

El comercio internacional de aceites esenciales está controlado por dos grandes sectores económicos que acopian la mayor parte de la producción mundial: las grandes empresas de sabores y fragancias y los grandes acopiadores o *brokers* de materias primas para estas industrias, y que al igual que la mayoría de las industrias de sabores y fragancias están establecidos en EE.UU., la Unión Europea (UE) y Japón [14].

A excepción de algunos casos esporádicos, la demanda de las esencias sigue la fuerte expansión del mercado de productos naturales. Dichos casos suelen presentarse cuando la esencia compite contra productos sintéticos de similar valor económico y organoléptico.

También se debe resaltar que el precio internacional de un aceite esencial depende de los factores políticos y climáticos de la región en la cual es producido. Conflictos internos, tales como los de Indonesia, que disminuyeron la producción del aceite de patchouli, lograron duplicar su valor. Por ello, también es importante mantener las exigencias de calidad, cantidad y continuidad [14].

El tipo de aceite esencial y la calidad de éste determinan en cuál clase de producto será empleado. Algunas de las principales aplicaciones dadas a los AEs en la UE se describen en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Principales usos de los aceites esenciales en países de la UE [96, 130].

Industria	Área	Aceites esenciales
Industria de cosméticos	Cuidado personal	Limón
	Jabón y detergente	Naranja
	Cuidado dental	Patchouli
		Palo de rosa
		Menta
		Eucalipto y sus derivados
Industria de alimentos	Bebidas refrescantes	Cítricos
	Confitería y caramelos	Vainillas
	Tabacos	Aceites saborizantes y florales
	Alimentos procesados y enlatados	Oleoresinas
Industria farmacéutica	Homeopatía	Cítricos
	Productos para el cuidado de la salud	Patchouli
	Aromaterapia	Lavanda
		Geranio

El uso de aceites esenciales en la industria de alimentos se ha incrementado en los últimos años y este sector parece ser muy prometedor para un crecimiento en

la demanda. Existen diversas estimaciones acerca de la industria de sabores y fragancias. Según la Asociación Holandesa de Productores de Sabores y Fragancias, las ventas totales para el 2004 fueron estimadas en 11 millones de Euros, mientras que otras fuentes dan estimaciones de alrededor de 15 millones de Euros [29, 96, 130].

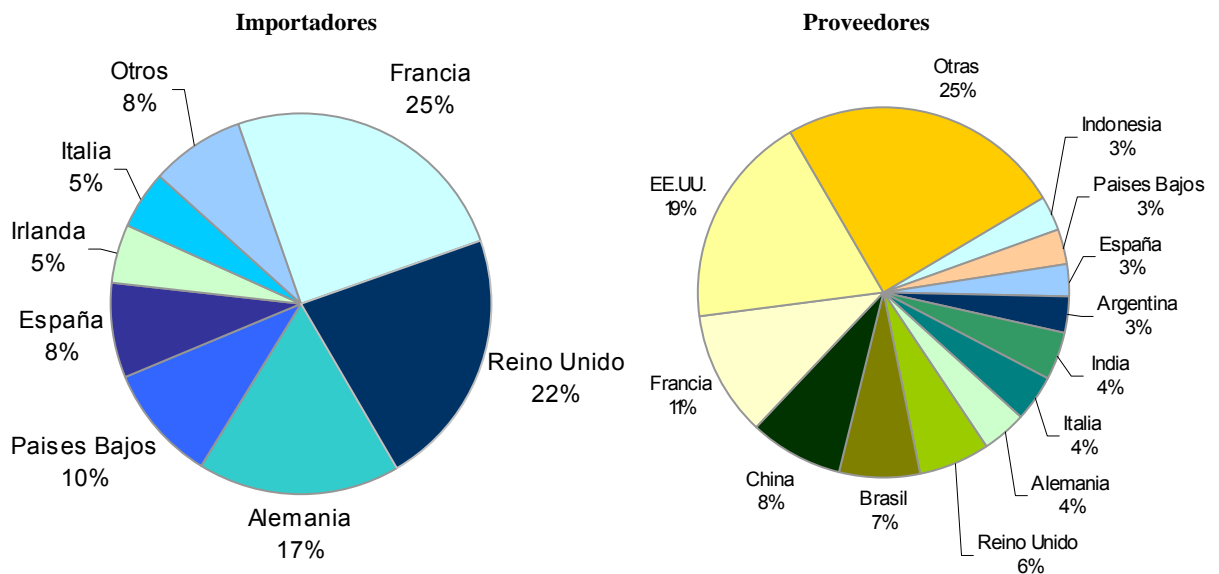
De acuerdo con los análisis realizados por la Unión Europea, el mercado de productos cosméticos estaba avaluado en 201 millones de Euros en el 2002, con una tendencia al alza en los siguientes años. Europa no es sólo el mayor consumidor de productos cosméticos, sino que también el mayor productor, seguido a distancia por EE.UU. y Japón. Los productores son compañías multinacionales como Unilever (Los Países Bajos/Reino Unido), L'Oréal (Francia), Wella (Alemania), Sanofi (Francia), y Beiersdorf (Alemania) [30, 130]. Muchos de ellos operan con un amplio espectro de productos entre los cuales figuran farmacéuticos, compuestos químicos, alimentos o productos para el hogar. De allí, que estas empresas estén monitoreando constantemente los intereses del consumidor, tales como: la sofisticación en el uso de productos naturales y más sanos, su actuación, y los beneficios que representan para la salud [96, 130], induciendo así el mayor usufructo de éstos, y cambiando la tendencia clásica del empleo de productos que tan solo realizan la belleza superficialmente, por productos con propiedades funcionales (e.g. cosmeceúticos) [30, 130].

Respecto al sector farmacéutico, alrededor del 42 % de las ventas de los 25 medicamentos más vendidos en el mundo son de origen biológico o productos naturales o sustancias derivadas de productos naturales. Según la OMS, la industria de plantas medicinales tiene un valor estimado de más de 45 millones de Euros y continúa con un crecimiento firme. El valor del comercio global de plantas medicinales es aproximadamente 10 millones de Euros anuales y tiene un crecimiento de un 10% anual. Los mercados más grandes de plantas aromáticas con fines farmacéuticos en la Unión Europea se encuentran en Alemania, Francia,

Italia, el Reino Unido y España, donde el mercado alemán es el más grande ya que un 10% del total de las ventas farmacéuticas son medicamentos naturales [31, 96, 130].

El total de importaciones de aceites esenciales en los 15 miembros originales de la UE en el 2003 sumó 490 millones de Euros, que representan una disminución de un 13% comparado con el año anterior. Otros 6.5 millones de Euros fueron importados por los nuevos miembros de la UE en total. En la **Figura 12** se presentan los principales importadores y proveedores de aceites esenciales en la UE, según datos de las Naciones Unidas para los años 2003/2004 [59, 130].

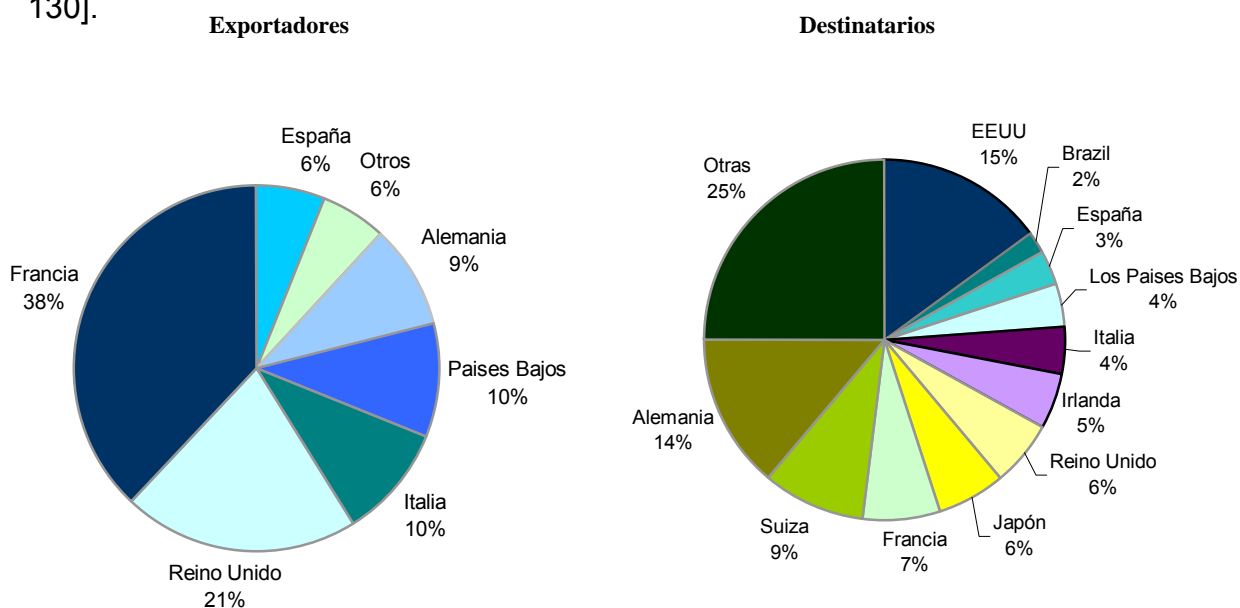
Figura 12. Importadores líderes de la UE y proveedores más importantes de aceites esenciales, porcentaje del valor total de importaciones en el 2003 [29-31, 130].



Las exportaciones de AEs por los miembros de la UE, sumaron un total de 373 millones de Euros en el 2003. En el periodo del 2001-2003, el total de las exportaciones permaneció relativamente estable, aunque a nivel de producto las exportaciones de la mayoría de aceites esenciales fluctuaron considerablemente.

Por ejemplo, las exportaciones de aceite de naranja crecieron sustancialmente, mientras que las del aceite de limón cambiaron en dirección opuesta. En la **Figura 13** se presentan los exportadores líderes y los destinatarios principales [130].

Figura 13. Exportadores líderes de la UE y destinatarios más importantes de aceites esenciales, porcentaje del valor total de exportaciones en el 2003 [29-31, 130].



Respecto a la situación de nuestro país, en la **Figura 14** se presentan las principales importaciones de sustancias odoríferas y de aceites esenciales hechas entre 1998 y 2002. Se debe resaltar tanto el aumento en la importación de aceites en general, así como el incremento en el ingreso de aceite de eucalipto que pasó de 197 mil dólares a casi 396 mil dólares en 4 años, y los AEs desterpenados, que pasaron de 155 mil dólares en 1998 a más de 1 millón 165 mil dólares en el 2002. Sin embargo, similar a lo observado en el mundo, las importaciones de aceites de cítricos disminuyeron considerablemente. [59].

En la **Figura 15** se reportan las exportaciones hechas por el país entre 1998 y 2002. El área más fuerte de exportación comprende las mezclas de sustancias odoríferas para las industrias de alimentos, bebidas sin alcohol y alcohólicas. Es

de notar la casi extinción de las exportaciones de aceite esencial de eucalipto y la disminución contundente en las de cítricos [59].

Figura 14. Importaciones en Colombia de mezclas odoríferas y aceites esenciales por país de origen (1998-2002) [59].

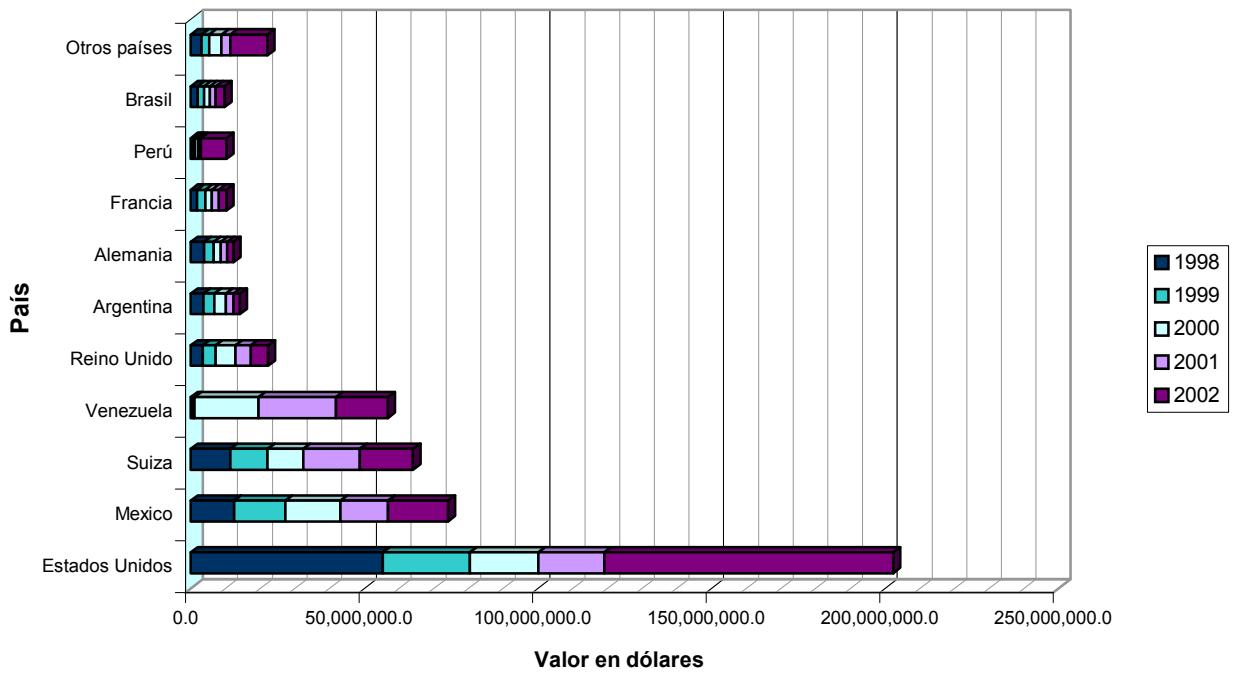
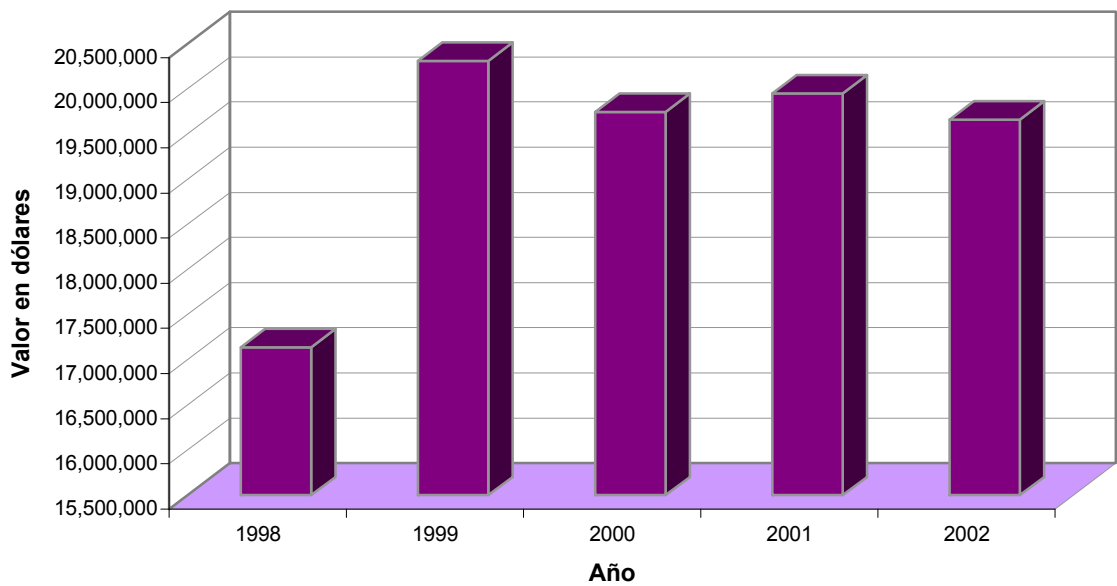


Figura 15. Exportaciones de Colombia de mezclas odoríferas y aceites esenciales (1998-2002) [59].



1.9 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

El análisis de componentes principales es una técnica estadística de vieja data, ya que fue propuesta a principios del siglo XIX por Karl Pearson como parte del análisis de factores [54]. Sin embargo, la complejidad de los cálculos retrasó su desarrollo hasta la aparición de los computadores y su utilización en la segunda mitad del siglo XX.

Se puede anotar, que el principal objetivo de PCA es la representación de las medidas numéricas de diferentes variables en un espacio de pocas dimensiones, donde nuestros sentidos puedan percibir relaciones, que de otra manera permanecerían ocultas en dimensiones superiores. Dicha representación debe ser tal, que al desechar dimensiones superiores (generalmente de la tercera o cuarta en adelante), la pérdida de información sea mínima. En este método, las variables no se consideran explicativas o de respuesta, sino que todas son tratadas de la misma manera [23].

Por lo tanto, el análisis de componentes principales es una técnica que transforma ciertas variables en otras incorrelacionadas, de media cero, que pueden escribirse como combinaciones lineales de las primeras y que se llaman factores o componentes principales, las cuales pueden ordenarse por la magnitud de su varianza u orden de importancia, de modo que los primeros componentes principales resuman la mayor cantidad posible de variabilidad de los datos originales, y faciliten la interpretación de los datos. Normalmente, un número pequeño de componentes principales r , basta para describir en alto porcentaje la variabilidad total de las variables originales. Con frecuencia, r vale 2 ó 3, siendo el primero de ellos el caso más deseable, siempre y cuando exista un gran número de variables intercorrelacionadas [54].

Solo cuando el porcentaje de variabilidad explicado por dos o más componentes principales es alto ($\geq 70\%$), se recomienda realizar una representación gráfica de las variables originales y de los individuos de la muestra, que presentan algunas relaciones de correlación o semejanza entre ellos, permitiendo observar las variables latentes, o no observadas, que generan los datos [54].

Aunque todas las variables originales entran en la composición de cada componente principal, algunas son más importantes que otras. Éstas, las más importantes, determinan la naturaleza de cada componente. Luego, mediante el uso del análisis de componentes principales en un sistema de datos multivariantes, se puede realizar la reducción de dimensiones, la clasificación de muestras e identificación de grupos [23, 119, 121].

En este trabajo se realizaron análisis de componentes principales (PCA) con el fin de establecer relaciones entre las composiciones de los aceites esenciales para dos quimiotipos de *Lippia alba*, que fueron obtenidos variando las condiciones de secado (tiempo y temperatura) y extracción (tiempo).

2. METODOLOGÍA

2.1 CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA

La identificación taxonómica de los dos quimiotipos de *Lippia alba* se realizó en el Herbario Nacional Colombiano del Instituto de Ciencias Naturales, de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. La clasificación botánica fue realizada por el Dr. José Luís Fernández, botánico-taxónomo, experto en Verbenáceas, a quien el autor le expresa sus más profundos agradecimientos.

2.2 SECADO DEL MATERIAL VEGETAL

El material vegetal empleado en las investigaciones fue colectado en las zonas de cultivo experimental del Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales, CENIVAM, en el campus principal de la Universidad Industrial de Santander. Los esquejes empleados para la propagación vegetal de los quimiotipos “Carvona” y “Citral”, identificados previamente, procedían de Bucaramanga (Santander) y Colorado (Bolívar), respectivamente.

El secado del material vegetal fue realizado en una estufa *Indumegas* (Bucaramanga, Colombia) (Véase **Figura 16**), en un intervalo de temperaturas de 30 a 80°C. Con el fin de determinar los puntos en los cuales se iban a realizar las extracciones, se elaboraron las curvas de desorción para cada temperatura. Por tanto, para obtener datos estadísticamente válidos se tomaron 10 racimos de aproximadamente 20 g de material vegetal de cada quimiotipo de *Lippia alba* y se pesaron tres veces cada hora para el intervalo de 30 a 50°C y cada media hora para el intervalo de 60 a 80°C hasta lograr el peso constante. De los resultados obtenidos para cada uno de los 10 experimentos de cada quimiotipo y

temperatura, se calcularon las pérdidas de peso porcentuales. Luego, éstas fueron promediadas, y a partir de ellas se graficaron las curvas de desorción, y las derivadas de éstas. Con las derivadas se evaluaron los puntos en los cuales las pérdidas de peso se hicieron constantes, y en éstos se realizaron las extracciones.

Figura 16. Estufa de secado marca *Indumegas* (Bucaramanga, Colombia).



2.3 EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

El aceite esencial fue extraído de las partes aéreas (hojas, tallos e inflorescencias) de los dos quimiotipos de *Lippia alba*. El método que se empleó fue la hidrodestilación asistida con radiación microondas (MWHd) para el cual se tomó el material vegetal previamente seleccionado, cortado y pesado (aproximadamente 200 g) y se introdujo en un balón de fondo redondo de 2000 mL. A continuación, se adicionó agua destilada al balón, de manera que cubriera aproximadamente una tercera parte del material vegetal, siguiendo la metodología descrita en [119].

El montaje consistió de un balón de fondo redondo, un reductor de 45/50 a 24/40, una alargadera 24/40, un trampa Clevenger, dos condensadores (bolas y espiras) y un horno microondas marca LG-*Intelowave* (Tianjin, China), con potencia de salida de 1200 W, y que se empleó experimentalmente al 60% de ésta.

Dado que el objetivo de esta investigación era evaluar diferentes tiempos de extracción, simultáneamente, con el proceso de secado de la planta, se emplearon tiempos de extracción en el microondas de 30, 45, 60 y 75 min. Para los experimentos, donde se estudió la variable de de secado de la planta, se emplearon únicamente 45 min de extracción.

Luego de la extracción del aceite esencial, éste se separó del agua por decantación en la trampa Clevenger, y se secó adicionando a la mezcla Na_2SO_4 anhidro. Del aceite obtenido, se tomó una alícuota de 50 μL que se depositó en un tubo de reacción, al cual se adicionaron 4 μL de estándar interno *istd* (*n*-tetradecano), luego, la mezcla se aforó a 1mL con diclorometano, para el análisis cromatográfico.

La extracción del AE en cada experimento se realizó por triplicado, para obtener datos de reproducibilidad, y todas las determinaciones másicas realizadas en el desarrollo del estudio se llevaron a cabo en una balanza analítica METTLER TOLEDO AG 285 (Greifensee, Suiza).

2.4 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

Con el objetivo de realizar una caracterización química completa de los metabolitos secundarios volátiles presentes en dos quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown, se empleó la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), usando dos columnas de diferente polaridad, así como se describe a continuación.

2.4.1 Análisis GC en columna apolar

El análisis cromatográfico y los espectros de masas de las muestras se obtuvieron en un equipo *Agilent Technologies 6890 Plus Series GC System* acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5973 Network, Mass Selectivity Detector*, y 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* (Véase **Figura 17**). La separación de los analitos se realizó en una columna capilar apolar DB5-MS (*J&W Scientific Folsom, CA, EE.UU.*) de 60m x 0,25 mm., D.I. x 0,25 µm, d_f, con fase estacionaria de 5%-fenil-poli(metilsiloxano). El gas de arrastre empleado en el análisis fue helio, con una presión de entrada en la cabeza de columna de 16,47 psi. La temperatura del horno se programó desde 45°C (5 min) @ 4°C/min hasta 150°C (2 min) y se incrementó a razón de 5 °C/min hasta llegar a 250°C, donde permaneció isotérmicamente 5 min y, finalmente, aumentó @ 10°C/min hasta 275°C, temperatura a la cual permaneció constante durante 15 min. Los espectros de masas se obtuvieron por impacto con electrones (EI) de energía de 70 eV. Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia se mantuvieron a 230 y 285°C, respectivamente. Los espectros de masas y las corrientes iónicas totales (TIC, por sus siglas en Inglés, *Total Ion Current*) se obtuvieron en un analizador cuadrupolar, por medio de barrido automático de frecuencia (*full scan*), en el rango de masas de *m/z* 40-350. Los datos cromatográficos fueron adquiridos y procesados con el sistema de datos *Hewlett-Packard MSChemStation G17001DA* (Versión D 00.01.27, 2002), que incluye las bases de datos NBS, Wiley, NIST y Adams 2004.

2.4.2 Análisis GC en columna polar

El análisis en columna polar de los aceites esenciales de dos quimiotipos de *Lippia alba*, se desarrolló en un equipo *Agilent Technologies 6890 Network GC System* acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 5975 Inert XL*

Mass Selective Detector y equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (250 °C, relación de *split* 50:1), un inyector automático *Agilent Technologies 7683B Series Injector* y un *autosampler Agilent Technologies 7863 Series* (Véase **Figura 18**). El proceso de separación de los metabolitos presentes en los aceites se llevó a cabo en una columna capilar polar DB-WAX (*J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.*), con fase estacionaria entrecruzada e inmobilizada de poli(etilenglicol) de 60 m x 0,25 mm, D.I. x 0,25 µm, d_f. El gas de arrastre que se empleó fue helio, con una presión de entrada en la cabeza de columna de 20.15 psi. La temperatura del horno se programó desde 45°C (5 min) @ 3°C/min hasta 150°C (3 min), luego @ 4°C/min hasta 220°C (4 min). Los espectros de masas se obtuvieron por impacto con electrones (EI) de energía de 70 eV. Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia se mantuvieron a 230 y 285°C, respectivamente. Los espectros de masas y las corrientes iónicas totales (TIC) se obtuvieron en un analizador cuadrupolar, por medio de barrido automático de frecuencia (*full scan*), en el rango de masas de *m/z* 40-350.

Figura 17. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Plus Series GC System* acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 5973 Network*, equipado con un puerto de inyección *split/splitless* y un inyector automático *Agilent 7863*. Se indica la programación de la temperatura del horno para análisis en la columna apolar.

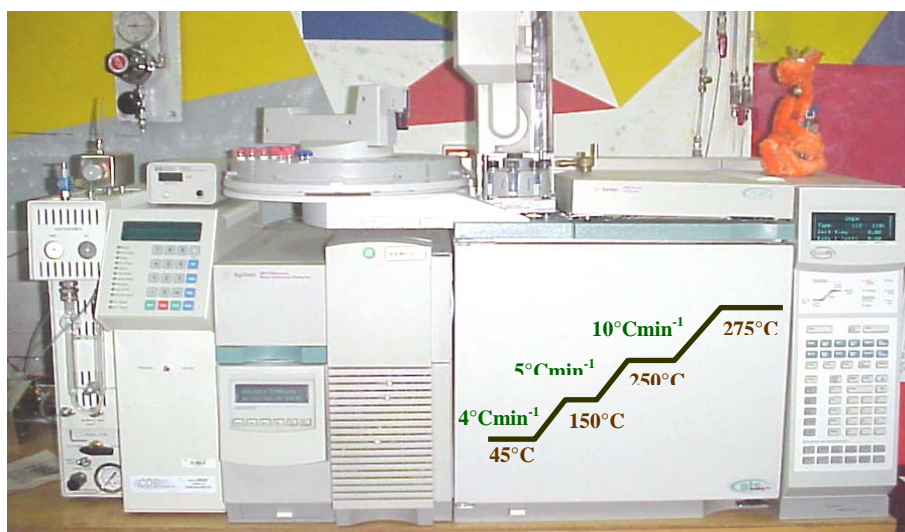
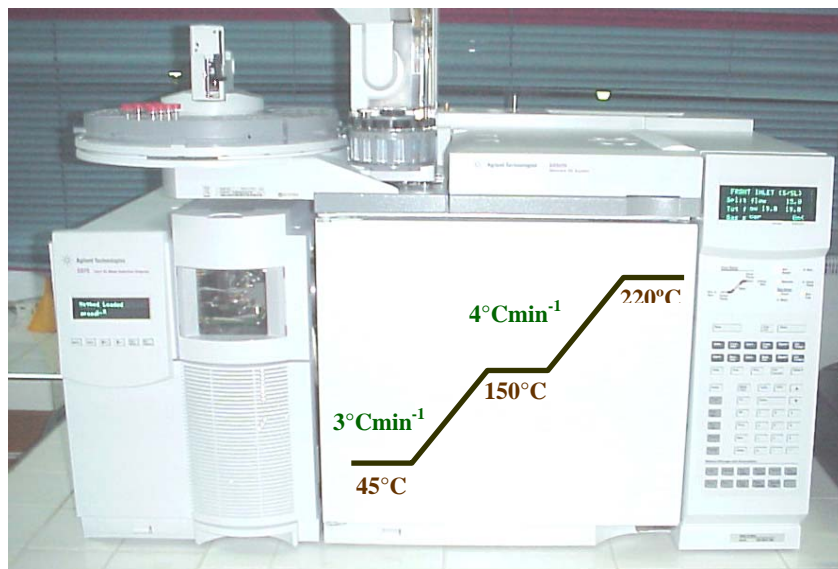


Figura 18. Cromatógrafo *Agilent Technologies 6890N Network, Series GC*, acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 5975*, ionización por impacto de electrones, un puerto de inyección *split/splitless* y un inyector automático *Agilent Technologies 7683B Series injector*. Se indica la programación de la temperatura del horno para análisis en la columna polar.



2.4.3 Identificación

La identificación de los analitos presentes en el aceite esencial se realizó por comparación de sus índices de Kovats y patrones de fragmentación en los espectros de masas obtenidos, con los existentes en las librerías de espectros, y/o en la literatura [3, 67].

Los índices de Kovats [67] se calcularon teniendo en cuenta los tiempos de retención de una serie homóloga de patrones de hidrocarburos desde C₁₀ hasta C₂₅, que se corrieron en el GC bajo las mismas condiciones operacionales que los aceites esenciales. Para su determinación se empleó la **Ecuación 2**.

$$I_k = 100n + 100 \left[\frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \right] \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

I_k : Índice de retención del compuesto de interés;

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

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

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

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

2.4.4 Cuantificación

La cuantificación de los metabolitos identificados se realizó mediante estandarización interna, empleando como patrón interno, n -tetradecano, $Istd$, según la **Ecuación 3**:

$$C_x = \frac{C_{istd} \times A_x}{C_{istd}} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

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

C_{Istd} : Concentración (g/L) de $Istd$;

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

A_{Istd} : Área del pico cromatográfico del $Istd$, *cuentas*.

2.5 RESULTADOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Las pruebas de actividad biológica desarrolladas por los grupos de investigación adscritos al Centro de Investigación de Excelencia, CENIVAM, de los aceites

esenciales de los dos quimiotipos de *Lippia alba*, obtenidos de plantas secadas en el intervalo de 30 a 50 °C, están reportadas en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Pruebas de actividad biológica realizadas en los grupos de investigación adscritos al CENIVAM.

UNIVERSIDAD	UTP ¹	UdeA ²	UIS ³	UdeC ⁴
GRUPO DE INVESTIGACIÓN	Polifenoles	Infección y Cáncer	CINTROP	Química Computacional y Ambiental
INVESTIGADORES	Dr. Hipólito Isaza	Dres. Ana Cecilia Mesa, Gabriel Bueno	Dra. Patricia Escobar	Dr. Jesús Olivero Verbel
ENSAYOS	Antibacterial y antifúngica	Antifúngica	Antiparasitaria y citotoxicidad	Citotoxicidad
MICROORGANISMOS Y CÉLULAS	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>Leishmania chagasi</i>	<i>Artemia franciscana</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	<i>Trypanosoma cruzi</i>	
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591	<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 204305	Células VERO	
	<i>Escherichia coli</i> N° 1 y N° 2	<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 204304		
	<i>Salmonella gallinarum</i>			
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778			

¹ Universidad Tecnológica de Pereira, UTP, Pereira.

² Universidad de Antioquia, U de A, Medellín.

³ Universidad Industrial de Santander, UIS, Bucaramanga.

⁴ Universidad de Cartagena, U de C, Cartagena.

3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

El Proyecto, para su desarrollo experimental, fue dividido en dos fases. En la primera, se compararon y evaluaron los rendimientos y las composiciones químicas de los aceites esenciales para cada uno de los quimiotipos de *Lippia alba*, obtenidos variando el tiempo y la temperatura de secado, con aire caliente en estufa, y el tiempo de extracción por MWHD. En la segunda fase, se realizaron los análisis de los resultados de actividad biológica, obtenidos para algunos de los experimentos de cada quimiotipo, realizados por los grupos de investigación integrantes de CENIVAM. A continuación, se presentan y se discuten los resultados obtenidos para cada una de las etapas.

3.1 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE LAS PLANTAS

Debido a que los dos quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown, cultivados en el área experimental del Centro de Investigación de Excelencia, CENIVAM, presentan algunas variaciones morfológicas, se hace aquí un breve recuento de dichas disimilitudes, tal y como lo han indicado otros autores [75, 129]. En la **Tabla 5** aparecen los números de *voucher* de la clasificación botánica hecha por el Dr. José Luís Fernández (UN, Bogotá), y cuyos pliegos testigo fueron depositados como muestra permanente en el Herbario Nacional Colombiano, Instituto de Ciencias Naturales, de la Universidad Nacional de Colombia.

Tabla 5. Números de *voucher* COL de los quimiotipos de *Lippia alba*.

ESPECIE	AUTOR	FAMILIA	No. COL
<i>Lippia alba</i> , quimiotipo "Carvona"	(Mill.) N. E. Br.	Verbenaceae	512078
<i>Lippia alba</i> , quimiotipo "Citral"	(Mill.) N. E. Br.	Verbenaceae	512077

3.1.1 *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown, quimiotipo “Citral”

Las plantas de este quimiotipo presentan hojas angostas y puntiagudas, con una coloración verde fuerte. Su altura no supera 1 m, y sus tallos suelen ser leñosos y arqueados, permitiendo así el enraizamiento de éste y el origen de una nueva planta. Las flores presentan una coloración violeta (Véase **Figura 19**, izquierda).

3.1.2 *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown, quimiotipo “Carvona”

A diferencia del otro quimiotipo, las hojas de éste son más grandes y redondas, y presentan una coloración verde-lima. La altura de estas plantas, luego de tres meses de cultivo, puede alcanzar 1.40 m, y sus tallos son menos leñosos y crecen ascendentemente. Las flores también son violetas (Véase **Figura 19**, derecha).

Figura 19. Plantas de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral” (izquierda) y “Carvona” (derecha)



3.2 ACEITES ESENCIALES OBTENIDOS VARIANDO EL TIEMPO Y LA TEMPERATURA DE SECADO DE LA PLANTA Y DURACIÓN DE EXTRACCIÓN POR MWHD

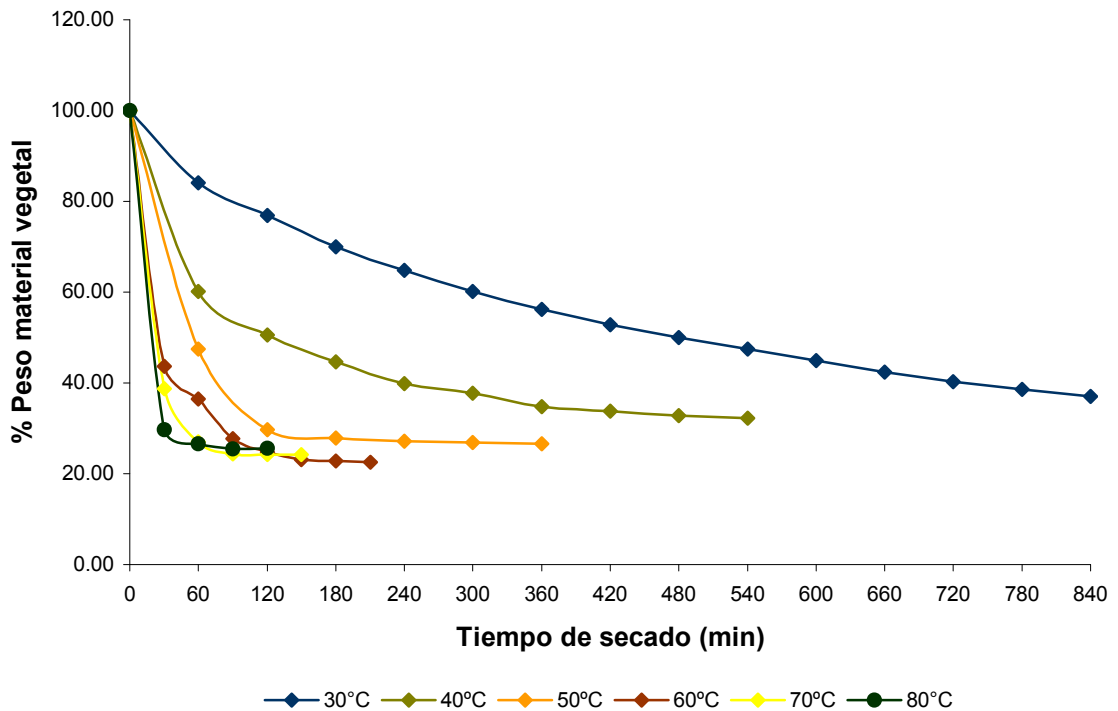
Con el objetivo de evaluar la influencia de la temperatura y el tiempo de secado, en un rango de 30 a 80°C, y el tiempo de extracción por MWHD (30 a 75 min), se realizó un estudio comparativo de la composición y los rendimientos de los AEs extraídos de dos quimiotipos de *Lippia alba*, bajo estas condiciones.

3.2.1 *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown, quimiotipo “Citral”

3.2.1.1 Curvas de secado de plantas de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”

En la **Figura 20** se presentan las curvas de secado para el quimiotipo “Citral” de *Lippia alba*, en el rango de 30 a 80°C. La gráfica representa el cambio a través del tiempo, del peso del material vegetal. Como se percibe en la figura, la planta, luego de 14 h (840 min), a una temperatura de 30°C, aún no consigue llegar al equilibrio; sin embargo, puede tomar solo 30 min conseguir el equilibrio con una temperatura de 80°C. Los resultados aquí encontrados son similares a los descritos por Barbosa y colaboradores [16], para un quimiotipo “Citral” de Viçosa, Brasil. Según este autor, conseguir el equilibrio con una temperatura de 25°C implicaría al menos 32 h de secado, lo cual, él considera, además de un tiempo excesivo, presenta un gasto de energía innecesario para un proceso optimizado del secado del material vegetal en el menor tiempo posible, sin deterioro enzimático de la planta.

Figura 20. Curvas de secado del quimiotipo “Citral”, utilizando temperaturas entre 30 y 80°C.



También se observó un ligero amarronamiento de las plantas que fueron secadas a 30°C; este efecto se disminuyó considerablemente a 40°C, y así, sucesivamente, hasta 80°C, cuando la coloración de las hojas no varió considerablemente.

Se observa en la gráfica, que a las temperaturas de 60, 70 y 80°C se presentaron valores muy similares a los del equilibrio. En la **Tabla 6** se presentan los porcentajes de peso promedio de material vegetal alcanzados con cada una de las temperaturas.

Tabla 6. Porcentaje final del peso del material vegetal a cada temperatura para el quimiotipo “Cital”.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	% Peso material vegetal
30	840	37 ± 5.46
40	540	32 ± 3.31
50	360	27 ± 2.54
60	210	25 ± 2.04
70	150	23 ± 2.12
80	120	27 ± 1.85

Aparentemente, a 70°C se retira la mayor cantidad de agua del material vegetal. Sin embargo, si se tienen en cuenta las desviaciones estándar, el intervalo de temperaturas de 50 a 80°C tiene un porcentaje de peso del material vegetal muy similar.

3.2.1.2 Derivadas de las curvas de secado de *Lippia alba*, quimiotipo “Cital”

A partir de los puntos de los experimentos de secado, para cada temperatura, se calcularon por regresión lineal las líneas de tendencia que representan estos puntos, y de éstas se calcularon sus derivadas. Como se sabe, la derivada de una función f en un punto x_0 no es otra cosa que la pendiente de la tangente a la curva (gráfica de la función) en $[x_0, f(x_0)]$. Además, se conoce, que la derivada de una constante siempre es cero. Así, luego de obtener las derivadas de cada curva de

secado, se reemplazaron en ella los puntos que dieron origen a ésta y se observó en qué punto o puntos era igual a cero. Esto nos indicó a qué tiempos la pérdida de peso se hizo constante, y, por ende, para este preciso momento se realizaron las extracciones. En la **Figura 21** se presentan las derivadas de las curvas de secado para cada uno de los experimentos.

Tal y como se observó en la **Figura 20**, la curva de secado a 30°C no presentó una pérdida de peso constante tras 14 h de secado; luego, como se esperaba, en la gráfica de la **Figura 21**, esta curva no “cortó” el eje de las abscisas. Por otra parte, los demás experimentos “cortaron” ésta en una o más puntos. Por ejemplo, para el experimento de secado a 40°C, se observó que la derivada tenía valores muy cercanos a cero tras 240 min de secado, y nuevamente “cortaba” el eje luego de c.a. 500 min de secado. Por tanto, para los experimentos de secado a 40°C se escogieron 4 y 9 h como tiempos de extracción. En la **Tabla 7** se especifican los tiempos determinados por la curva y escogidos para realizar las extracciones.

Figura 21. Derivadas de las curvas de secado del quimiotipo “Citral”, utilizando temperaturas de 30 a 80°C.

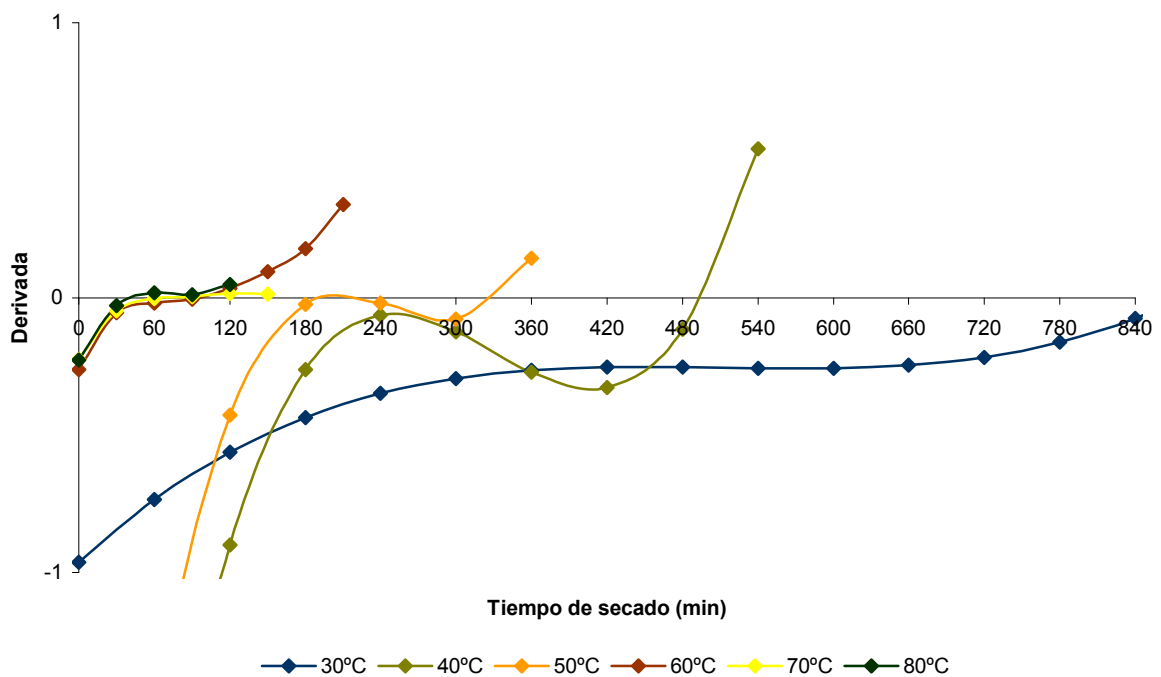


Tabla 7. Tiempos de secado para cada temperatura, escogidos para realizar las extracciones de los aceites esenciales de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Velocidad pérdida de peso (%peso/min)
30	900	0.049
40	60	-2.148
40	240	-0.064
40	540	0.542
50	60	-1.573
50	180	-0.024
50	300	-0.077
60	60	-0.056
60	180	-3.242
70	60	0.140
70	120	0.318
80	30	-0.029
80	60	0.018

Para la temperatura de secado de 30 °C, al observar que durante el experimento nunca se alcanzó un equilibrio, es decir, la derivada de la curva no fue igual a cero en ningún punto, se decidió continuar la tendencia de la gráfica obtenida por regresión lineal para la derivada, de manera que se encontró que el equilibrio se alcanzaba luego de 900 min (15 h) de secado bajo esta temperatura.

Aunque no todos los experimentos presentan una velocidad de pérdida de peso (derivada) cercana a cero luego de una hora, se escogió este tiempo con el objetivo de establecer una comparación entre las diferentes temperaturas, a excepción del secado a 30°C, para el cual la diferencia entre las plantas “secadas” y las dejadas al ambiente no es mucha, pero sí es considerable respecto a las demás. El menor tiempo de secado escogido correspondió a 30 min a una temperatura de secado de 80°C, el cual coincidió nuevamente con los resultados obtenidos por Barbosa y colaboradores [16], quienes emplearon un tiempo de 33 min. Para las demás temperaturas, como se indicó anteriormente, se escogieron los tiempos a los cuales la velocidad de pérdida de peso se hacía igual a cero, así como fueron indicados en la **Tabla 7**.

los rendimientos más bajos (0.2-0.6%) se obtuvieron con todos los experimentos en los cuales no se secaron las plantas. Se observa también que en los experimentos LAC454009 y LAC457002, se presentaron los mayores rendimientos, similares en sus valores. De acuerdo con lo observado y lo expresado por algunos autores [14, 16], respecto a no exceder temperaturas de secado de 40°C, las condiciones del experimento LAC 454009 sería las más indicadas. Ahora, si el objetivo es optimizar la obtención de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”, el experimento indicado sería LAC457002, pues el tiempo de secado es de 2 h.

Tabla 8. Rendimientos (%) de los AEs obtenidos por MWHD, de plantas de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”, bajo diferentes condiciones de extracción y secado.

Experimento	Tiempo de secado (h)	Temperatura de secado (°C)	Tiempo de extracción (min)	Rendimiento % (p/p)	
LAC300000	-	-	30	0.34	±0.040
LAC450000	-	-	45	0.2	±0.104
LAC600000	-	-	60	0.46	±0.091
LAC750000	-	-	75	0.61	±0.088
LAC453015	15	30	45	1.32	±0.091
LAC454001	1	40	45	0.77	±0.094
LAC454004	4	40	45	1.1	±0.125
LAC454009	9	40	45	1.7	±0.113
LAC455001	1	50	45	0.79	±0.091
LAC455003	3	50	45	1.6	±0.191
LAC455005	5	50	45	1.68	±0.066
LAC456001	1	60	45	1.10	±0.088
LAC456003	3	60	45	1.62	±0.032
LAC457001	1	70	45	1.11	±0.091
LAC457002	2	70	45	1.73	±0.043
LAC458001/2	0.5	80	45	1.03	±0.094
LAC458001	1	80	45	1.29	±0.079

En la **Figura 23**, se presentan los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”, obtenidos con los máximos rendimientos. Los experimentos fueron indicados en el gráfico con el mismo color con el cual fueron resaltados en la **Tabla 8**.

Figura 23. Comparación de los máximos rendimientos de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”, obtenidos en el rango de temperaturas de 30 a 80°C.

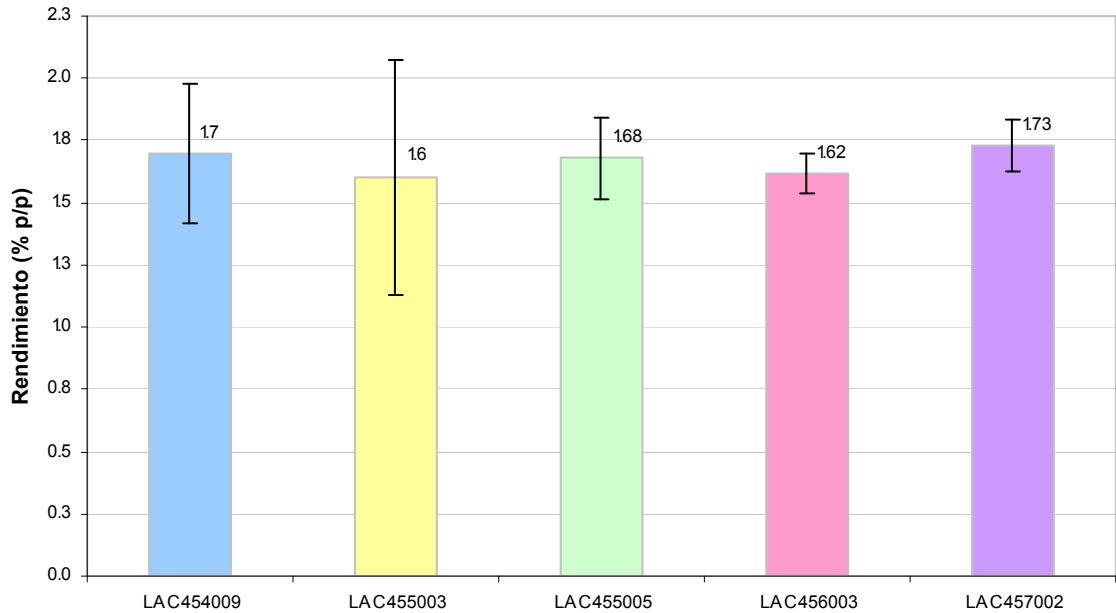
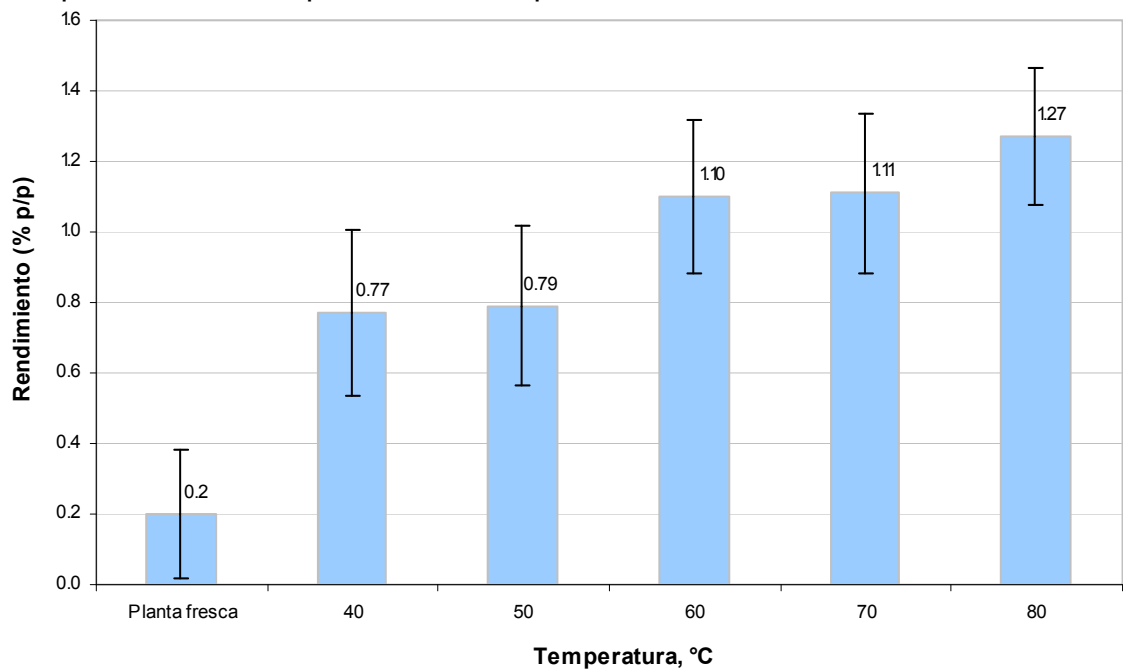


Figura 24. Comparación de los rendimientos de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”, obtenidos en el rango de temperaturas de 40 a 80°C, con 1 h de secado, y de la planta fresca, empleando 45 min para todas las extracciones.



En la **Figura 24**, se presenta la comparación de los rendimientos de AEs de plantas de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”, secadas en el rango de temperaturas de 40 a 80°C, durante 1 h, y de la planta fresca, empleando 45 min para todas las extracciones. Se observa, que a medida que se aumenta la temperatura, el rendimiento del aceite esencial incrementa. Se debe recordar, que sólo las plantas secadas en el intervalo de temperatura de 60 a 80°C, luego de 1 h de secado, tienen una derivada cercana a cero, y la cantidad de agua a retirar es mínima.

En la **Figura 25**, se observa, que a medida que aumenta el tiempo de extracción, la cantidad de AE obtenido de la planta fresca también incrementa, obteniéndose la máxima cantidad de aceite por MWHD empleando 75 min.

Se observa también un aumento en el rendimiento del AE de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”, a medida que aumenta la duración del secado a diferentes temperaturas (**Figura 26**).

Figura 25. Comparación de los rendimientos de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”, obtenidos de plantas frescas, empleando diferentes tiempos de extracción.

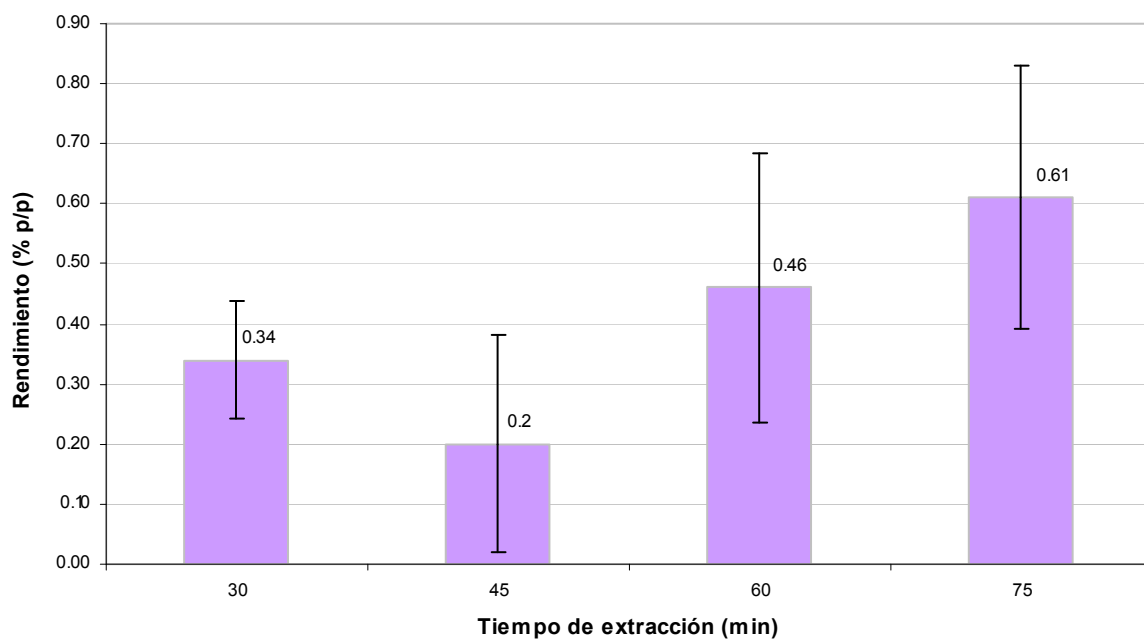
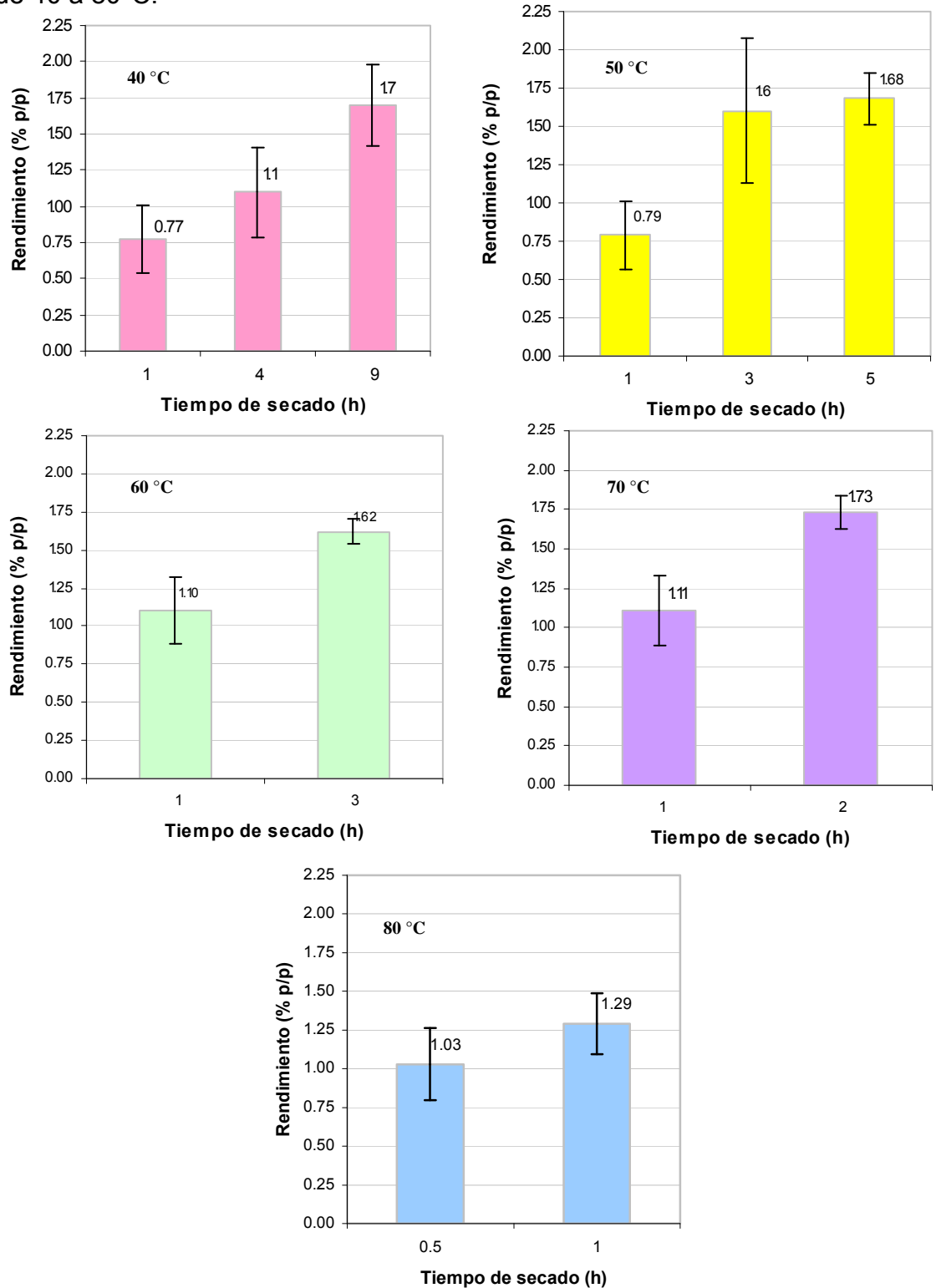


Figura 26. Comparación de los rendimientos de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”, obtenidos bajo diferentes tiempos de secado en el rango de temperaturas de 40 a 80°C.



Por ejemplo, para la temperatura de 40°C, se observa una diferencia de ca. 1% entre los AEs obtenidos de plantas secadas durante 1 y 9 h. También, en la **Figura 26**, se observa que para la temperatura de 50°C, no existe una diferencia marcada entre los AEs obtenidos luego de 3 ó 5 h de secado.

Por otra parte, aunque se obtiene el máximo rendimiento con plantas secadas durante 2h a 70°C, un aumento de 10°C representa una disminución significativa en el rendimiento. Por tanto, para los experimentos realizados a 80°C, se obtuvieron rendimientos significativamente menores a los observados para las temperaturas más bajas. No obstante, se observó que al aumentar la duración del secado, se acrecentó el rendimiento, siguiendo la tendencia presentada en los otros experimentos. Tal disminución en el rendimiento de los AEs de plantas de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”, secadas a 80°C, se debe, al parecer, a la volatilización de los metabolitos secundarios.

3.2.1.4 Caracterización química por GC-MS de los aceites esenciales de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”.

En la **Figura 27** aparece el perfil cromatográfico típico de los metabolitos secundarios volátiles obtenidos por MWHD de hojas, tallos e inflorescencias de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”. En la **Tabla 9** se registran los componentes mayoritarios aislados e identificados por GC-MS, según el orden de elución en la columna DB-5MS, junto con sus índices de retención y cantidades relativas (%) para cada uno de los experimentos.

La identificación de los metabolitos secundarios volátiles de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”, se efectuó con base en los índices de Kovàts calculados y los reportados en la literatura [3], así como con base en sus espectros de masas. La cuantificación se realizó empleando la técnica de estandarización interna, siguiendo el procedimiento descrito en **Sección 2.3.4**.

Tabla 9. Cantidad relativa (%) de los principales componentes de los aceites esenciales de *Lippia alba*, quimiotipo “Citrál”, aislados por MWHD.

Nº Pico ¹	Ik ²		Compuesto	AE, Cantidad relativa % ³			
	DB-5	DB-WAX		LAC300000	LAC450000	LAC600000	LAC750000
1	859	1289	<i>cis</i> -3-Hexenol + <i>cis</i> -2-hexenal	0.41	0.22	0.10	0.11
2	939	921	α-Pineno	0.06	0.07	0.15	0.10
3	954	965	Canfeno	-	-	0.05	-
4	979	1351	1-Octen-3-ol	0.24	0.26	0.11	0.11
5	986	1338	6-Metil-5-hepten-2-ona	1.90	3.02	1.92	2.00
6	991	1064	β-Mirceno	-	0.07	0.04	0.04
7	1004	1319	<i>cis</i> -3-Acetato de hexenilo	0.12	0.09	0.07	0.06
8	1010	1163	α-Felandreno	-	0.07	0.13	0.05
9	1016	994	Isobutanoato de isopentilo	-	0.05	-	0.05
10	1029	1172	<i>p</i> -Cimeno	-	0.05	0.10	0.14
11	1034	1197	Limoneno	1.59	1.68	2.15	1.94
12	1036	1111	β- Felandreno	-	0.06	0.08	0.06
13	1048	1251	<i>trans</i> -β-Ocimeno	0.20	0.26	0.32	0.24
14	1102	1548	Linalool	1.49	1.72	1.48	1.42
15	1106	-	Nonanal	0.11	0.07	0.07	0.08
16	1142	1391	<i>cis</i> -3-Isobutanoato de hexenilo	0.08	0.08	0.08	0.08
17	1146	1521	<i>epi</i> -Fotocitrál A + C ₁₀ H ₁₆ O (N.I.)	0.45	0.42	0.46	0.38
18	1155	1483	Citronellal	1.02	1.33	0.98	0.92
19	1164	1577	<i>trans</i> -Verbenol	1.46	1.42	1.43	1.02
20	1172	1509	Epóxido de rosafurano	0.13	0.17	0.14	0.13
21	1183	1577	<i>cis</i> -Verbenol	1.90	1.89	1.91	1.54
22	1235	1808	Nerol	4.61	4.02	2.44	2.11
23	1252	1692	Peral	22.52	19.15	20.96	20.00
24	1264	1852	Geraniol	14.19	15.16	10.31	9.42
25	1270	1747	Geranial	28.73	23.33	26.00	24.54
26	1359	1732 – 2177	Acetato de nerilo + Eugenol	0.32	0.49	0.43	0.40
27	1380	1761	Acetato de geranilo	2.87	3.83	2.75	2.94
28	1387	1399	α-Copaeno	-	-	0.07	0.08
29	1391	1599	β-Elemeno (isómero)	-	0.11	0.12	0.10
30	1391	1598	β-Elemeno	0.86	1.30	1.59	1.36
31	1419	1611	<i>trans</i> -β-Cariofileno	4.11	5.78	5.67	5.30
32	1440	1601	α-Guaieno	0.76	1.13	1.27	1.33
33	1457	1570	<i>trans</i> - β- Farneseno	0.13	0.27	0.27	0.29
34	1455	1580	α-Humuleno	1.03	1.66	1.73	1.67
35	1460	1557	<i>allo</i> -Aromadendreno	0.09	0.12	0.13	0.15

Continuación, **Tabla 9**

36	1480	1599	γ -Muuroleno	-	-	0.11	0.16
37	1495	1726	Biciclosesquifelandreno	0.92	1.79	1.99	1.24
38	1508	1817	Isobutanoato de geranilo	0.23	0.42	0.56	0.65
39	1513	1731	α -Bulneseno	0.36	0.53	0.62	0.58
40	1543	1783	<i>trans</i> - γ -Bisaboleno	0.26	0.62	1.03	1.21
41	1564	2044	<i>trans</i> -Nerodiol	-	0.12	0.20	0.32
42	1596	2001	Óxido de cariofileno	0.62	0.87	1.64	2.88
43	1608	2272	<i>epoxi-allo</i> -Alloaromadendreno	-	0.04	0.15	0.20
44	1613	1970	N.I.	-	-	0.08	0.12
45	1628	1964	Epóxido de humuleno	0.01	0.08	0.23	0.86
46	1648	-	N.I.	-	-	0.16	0.27
47	2114	-	C ₁₉ H ₂₆ O	-	0.34	0.50	0.65

¹Número de pico en la **Figura 27**.

²Índices de Kovats determinados experimentalmente.

³Promedio de tres extracciones independientes, n=3.

Continuación, **Tabla 9**

Nº Pico ¹	Ik ²		Compuesto	AE, Cantidad relativa % ³			
	DB-5	DB-WAX		LAC454001	LAC454004	LAC454009	LAC453015
1	859	1289	<i>cis</i> -3-Hexenol + <i>cis</i> -2-hexenal	0.27	0.22	0.12	0.39
2	939	921	α -Pineno	0.07	0.12	0.17	0.12
3	954	965	Canfeno	-	-	-	0.04
4	979	1351	1-Octen-3-ol	0.16	0.14	-	0.22
5	986	1338	6-Metil-5-hepten-2-ona	1.33	1.68	1.91	1.62
6	991	1064	β -Mirceno	0.03	0.07	-	0.04
7	1004	1319	<i>cis</i> -3-Acetato de hexenilo	0.07	0.06	0.09	0.05
8	1010	1163	α -Felandreno	0.09	0.15	0.14	0.22
9	1016	994	Isobutanoato de isopentilo	0.04	-	-	0.05
10	1029	1172	<i>p</i> -Cimeno	0.07	0.09	0.11	0.08
11	1034	1197	Limoneno	1.61	2.09	2.59	2.22
12	1036	1111	β - Felandreno	0.06	0.09	-	0.09
13	1048	1251	<i>trans</i> - β -Ocimeno	0.27	0.33	0.34	0.41
14	1102	1548	Linalool	1.39	1.50	1.48	1.43
15	1106	-	Nonanal	0.06	0.10	0.10	0.06
16	1142	1391	<i>cis</i> -3-Isobutanoato de hexenilo	0.08	0.08	0.07	0.07
17	1146	1521	<i>epi</i> -Fotocitral A + C ₁₀ H ₁₆ O (N.I.)	0.52	0.50	0.48	0.54

Continuación, **Tabla 9**

18	1155	1483	Citronellal	0.70	0.90	0.96	0.76
19	1164	1577	<i>trans</i> -Verbenol	1.78	1.86	1.81	2.02
20	1172	1509	Epóxido de rosafurano	0.11	0.15	0.21	0.12
21	1183	1577	<i>cis</i> -Verbenol	2.27	2.29	2.25	2.52
22	1235	1808	Nerol	1.87	1.46	1.22	1.33
23	1252	1692	Neral	22.77	23.10	23.09	22.19
24	1264	1852	Geraniol	10.41	8.04	6.69	8.71
25	1270	1747	Geranial	28.77	29.30	29.80	27.32
26	1359	1732 – 2177	Acetato de nerilo + Eugenol	0.39	0.43	0.39	0.52
27	1380	1761	Acetato de geranilo	3.23	3.38	3.23	3.27
28	1387	1399	α -Copaeno	0.10	-	-	0.08
29	1391	1599	β -Elemeno (isómero)	1.23	-	-	0.14
30	1391	1598	β -Elemeno	4.67	1.49	1.52	1.67
31	1419	1611	<i>trans</i> - β -Cariofileno	5.18	5.99	6.25	6.30
32	1440	1601	α -Guaieno	1.10	1.27	1.41	1.38
33	1457	1570	<i>trans</i> - β - Farneseno	0.20	0.23	0.25	0.23
34	1455	1580	α -Humuleno	1.57	1.67	1.65	1.82
35	1460	1557	<i>allo</i> -Aromadendreno	0.11	0.13	0.14	0.13
36	1480	1599	γ -Muuroleno	0.09	0.11	0.10	0.08
37	1495	1726	Biciclosesquifelandreno	1.75	1.83	1.61	2.24
38	1508	1817	Isobutanoato de geranilo	0.49	0.40	0.43	0.46
39	1513	1731	α -Bulneseno	0.52	0.57	0.57	0.57
40	1543	1783	<i>trans</i> - γ -Bisaboleno	0.74	0.57	0.61	0.82
41	1564	2044	<i>trans</i> -Nerodiol	0.16	0.16	0.15	0.14
42	1596	2001	Óxido de cariofileno	1.17	1.03	1.23	0.79
43	1608	2272	<i>epoxi-allo</i> -Alloaromadendreno	0.13	-	-	0.09
44	1613	1970	N.I.	0.14	-	0.13	-
45	1628	1964	Epóxido de humuleno	0.15	0.10	-	0.08
46	1648	-	N.I.	0.13	0.10	0.16	0.08
47	2114	-	C ₁₉ H ₂₆ O	0.28	0.17	-	0.21

¹Número de pico en la **Figura 27**.

²Índices de Kováts determinados experimentalmente.

³Promedio de tres extracciones independientes, n=3.

Continuación, **Tabla 9**

Nº Pico ¹	Ik ²		Compuesto	AE, Cantidad relativa % ³			
	DB-5	DB-WAX		LAC455001	LAC455003	LAC455005	LAC456001
1	859	1289	<i>cis</i> -3-Hexenol + <i>cis</i> -2-hexenal	0.28	0.22	0.10	0.07
2	939	921	α-Pineno	0.13	0.12	0.16	0.10
3	954	965	Canfeno	0.04	-	-	-
4	979	1351	1-Octen-3-ol	0.13	-	-	-
5	986	1338	6-Metil-5-hepten-2-ona	1.29	1.51	1.70	1.55
6	991	1064	β-Mirceno	0.04	0.05	0.09	0.08
7	1004	1319	<i>cis</i> -3-Acetato de hexenilo	0.05	-	-	-
8	1010	1163	α-Felandreno	0.13	0.12	0.10	0.13
9	1016	994	Isobutanoato de isopentilo	0.04	-	-	-
10	1029	1172	<i>p</i> -Cimeno	0.09	0.09	0.10	0.09
11	1034	1197	Limoneno	2.06	2.09	2.61	2.36
12	1036	1111	β- Felandreno	0.07	-	-	-
13	1048	1251	<i>trans</i> -β-Ocimeno	0.33	0.31	0.30	0.33
14	1102	1548	Linalool	1.36	1.41	1.45	1.44
15	1106	-	Nonanal	0.06	0.08	0.11	0.11
16	1142	1391	<i>cis</i> -3-Isobutanoato de hexenilo	0.08	0.07	0.07	0.08
17	1146	1521	<i>epi</i> -Fotocitral A + C ₁₀ H ₁₆ O (N.I.)	0.47	0.49	0.47	0.51
18	1155	1483	Citronellal	0.71	0.79	0.81	0.78
19	1164	1577	<i>trans</i> -Verbenol	1.63	1.74	1.79	1.86
20	1172	1509	Epóxido de rosafurano	0.13	0.15	0.23	0.17
21	1183	1577	<i>cis</i> -Verbenol	2.09	2.20	2.22	2.29
22	1235	1808	Nerol	1.94	1.68	1.23	-
23	1252	1692	Neral	22.30	22.72	23.05	24.21
24	1264	1852	Geraniol	10.11	6.69	8.42	7.76
25	1270	1747	Geranial	28.43	29.00	30.14	31.26
26	1359	1732 – 2177	Acetato de nerilo + Eugenol	0.42	0.40	0.28	0.40
27	1380	1761	Acetato de geranilo	3.08	3.18	3.15	3.59
28	1387	1399	α-Copaeno	0.07	-	-	-
29	1391	1599	β-Elemeno (isómero)	0.10	-	-	-
30	1391	1598	β-Elemeno	1.31	1.35	1.33	1.47
31	1419	1611	<i>trans</i> -β-Cariofileno	4.92	5.45	5.44	6.35
32	1440	1601	α-Guaieno	1.03	1.18	1.18	1.29
33	1457	1570	<i>trans</i> - β- Farneseno	0.21	0.22	0.18	0.21
34	1455	1580	α-Humuleno	1.50	1.57	1.41	1.62
35	1460	1557	<i>allo</i> -Aromadendreno	0.11	0.12	0.12	0.12

Continuación, **Tabla 9**

36	1480	1599	γ -Muuroleno	0.08	0.09	0.13	-
37	1495	1726	Biciclosesquifelandreno	1.62	1.66	1.19	1.46
38	1508	1817	Isobutanoato de geranilo	0.50	0.47	0.39	0.23
39	1513	1731	α -Bulneseno	0.50	0.53	0.49	0.52
40	1543	1783	<i>trans</i> - γ -Bisaboleno	0.78	0.71	0.56	0.44
41	1564	2044	<i>trans</i> -Nerodiol	0.18	0.16	0.19	-
42	1596	2001	Óxido de cariofileno	1.44	1.28	1.29	0.70
43	1608	2272	<i>epoxi-allo</i> -Alloaromadendreno	0.14	-	-	-
44	1613	1970	N.I.	0.07	-	-	-
45	1628	1964	Epóxido de humuleno	0.21	0.16	0.23	0.05
46	1648	-	N.I.	0.14	-	-	-
47	2114	-	C ₁₉ H ₂₆ O	0.22	0.22	0.18	0.10

¹Número de pico en la **Figura 27**.

²Índices de Kováts determinados experimentalmente.

³Promedio de tres extracciones independientes, n=3.

Continuación, **Tabla 9**

Nº Pico ¹	Ik ²		Compuesto	AE, Cantidad relativa % ³				
	DB-5	DB-WAX		LAC456003	LAC457001	LAC457002	LAC45801/2	LAC458001
1	859	1289	<i>cis</i> -3-Hexenol + <i>cis</i> -2-Hexenal	0.07	-	-	-	-
2	939	921	α -Pino	0.10	0.21	0.11	0.24	0.17
3	954	965	Canfeno	-	-	-	-	-
4	979	1351	1-Octen-3-ol	-	-	-	-	-
5	986	1338	6-Metil-5-hepten-2-ona	2.09	2.83	1.46	2.41	2.16
6	991	1064	β -Mirceno	0.09	0.13	0.09	0.11	0.10
7	1004	1319	<i>cis</i> -3-Acetato de hexenilo	-	-	-	-	-
8	1010	1163	α -Felandreno	0.10	0.20	0.13	0.11	0.08
9	1016	994	Isobutanoato de isopentilo	-	-	-	0.07	-
10	1029	1172	<i>p</i> -Cimeno	0.09	0.15	0.10	0.08	0.08
11	1034	1197	Limoneno	2.46	2.98	2.28	3.01	2.78
12	1036	1111	β -Phellandreno	-	0.18	-	0.09	-
13	1048	1251	<i>trans</i> - β -Ocimeno	0.33	0.41	0.33	0.30	0.26
14	1102	1548	Linalool	1.06	1.72	1.45	1.57	1.46
15	1106	-	Nonanal	0.13	0.12	0.10	0.16	0.13
16	1142	1391	<i>cis</i> -3-Isobutanoato de hexenilo	0.07	0.07	0.07	0.05	0.12

Continuación, **Tabla 9**

17	1146	1521	<i>epi</i> -Fotocitral A + C ₁₀ H ₁₆ O (N.I.)	0.39	0.53	0.53	0.50	0.44
18	1155	1483	Citronellal	0.96	0.92	0.79	0.89	0.85
19	1164	1577	<i>trans</i> -Verbenol	1.53	1.58	2.03	1.66	1.67
20	1172	1509	Epóxido de rosafurano	0.29	0.95	0.30	0.32	0.34
21	1183	1577	<i>cis</i> -Verbenol	1.91	1.99	2.50	2.03	2.07
22	1235	1808	Nerol	-	0.28	-	-	-
23	1252	1692	Neral	23.82	20.30	24.05	20.25	21.84
24	1264	1852	Geraniol	7.92	7.94	6.58	12.92	9.84
25	1270	1747	Geranial	31.52	25.96	31.84	26.02	28.64
26	1359	1732 – 2177	Acetato de nerilo + Eugenol	0.36	0.35	0.32	0.30	0.28
27	1380	1761	Acetato de geranilo	3.63	3.59	3.43	3.11	3.17
28	1387	1399	α-Copaeno	-	0.16	-	0.11	0.14
29	1391	1599	β-Elemeno (isómero)	-	-	-	-	-
30	1391	1598	β-Elemeno	1.38	2.20	1.46	1.47	1.51
31	1419	1611	<i>trans</i> -β-Cariofileno	5.81	7.72	6.08	6.55	6.64
32	1440	1601	α-Guaieno	1.22	1.69	1.25	1.58	1.53
33	1457	1570	<i>trans</i> -β- Farneseno	0.20	0.30	0.21	0.13	0.14
34	1455	1580	α-Humuleno	1.44	1.91	1.45	1.76	1.66
35	1460	1557	<i>allo</i> -Aromadendreno	0.12	0.15	0.12	0.17	0.16
36	1480	1599	γ-Muuroleno	-	-	-	0.08	-
37	1495	1726	Biciclosesquifelandreno	1.16	1.76	1.17	1.83	1.41
38	1508	1817	Isobutanoato de geranilo	0.28	0.34	0.23	0.48	0.41
39	1513	1731	α-Bulneseno	0.49	0.61	0.47	0.73	0.62
40	1543	1783	<i>trans</i> -γ-Bisaboleno	0.48	0.56	0.39	0.44	0.42
41	1564	2044	<i>trans</i> -Nerodiol	-	-	-	-	-
42	1596	2001	Óxido de cariofileno	0.86	1.05	0.74	1.14	1.28
43	1608	2272	<i>epoxi-allo</i> -Alloaromadendreno	-	-	-	-	-
44	1613	1970	N.I.	-	-	-	-	-
45	1628	1964	Epóxido de humuleno	0.07	0.10	0.05	0.08	0.11
46	1648	-	N.I.	-	-	-	-	-
47	2114	-	C ₁₉ H ₂₆ O	0.14	0.18	-	0.13	0.14

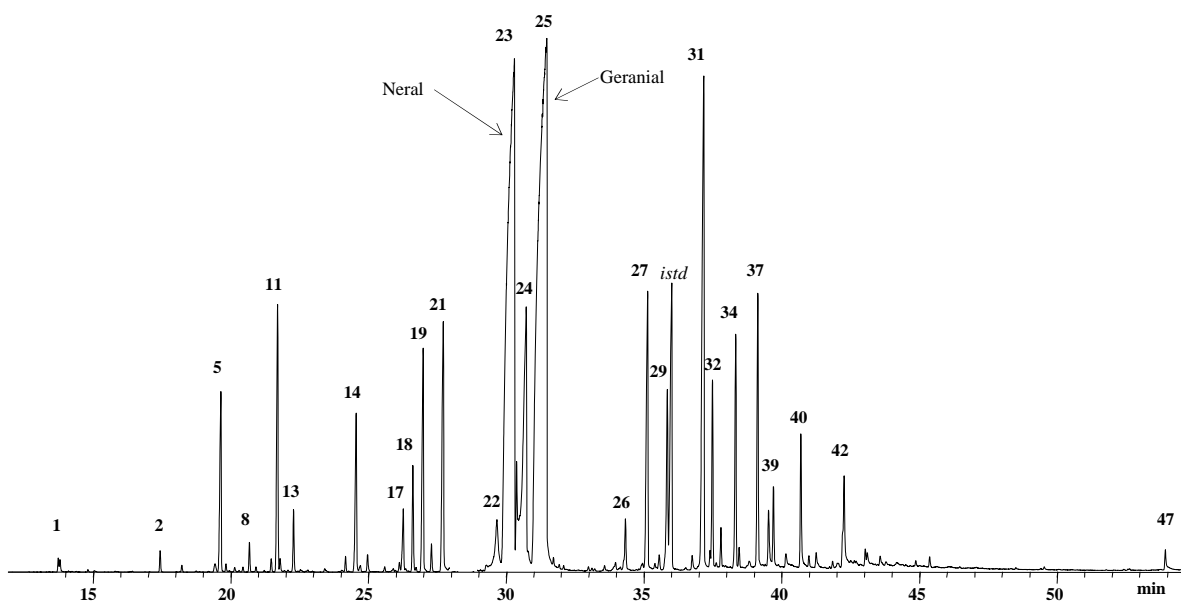
¹Número de pico en la **Figura 27**.

²Índices de Kovàts determinados experimentalmente.

³Promedio de tres extracciones independientes, n=3.

Positivamente, se identificaron 47 compuestos que constituyen alrededor del 98% de las muestras analizadas, bajo los parámetros de integración aplicados (umbral de integración, *Thshd* = 17 y área de rechazo del pico en la base = 0.1).

Figura 27. Perfil cromatográfico típico del AE de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”, obtenidos por MWHD. Columna DB-5MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los compuestos se reporta en la **Tabla 9**.



En general, la composición química de los AEs de *Lippia alba* quimiotipo “Citral” extraídos por MWHD, varió cuantitativamente, mas no cualitativamente. El citral (mezcla de los isómeros, neral y geranial) fue el constituyente mayoritario (42-56%), seguido de geraniol (7-16%), el *trans*- β -cariofileno (4-8%), la 6-metil-5-hepten-2-ona (1-3%), el nerol (0-5%), el limoneno (2-3%), el biciclosesquifelandreno (1-2%) y el α -humuleno (1-2%).

Los experimentos fueron realizados desde octubre del 2006 hasta febrero de 2007, e incluyeron dos periodos de corte de las plantas. El primero realizado en los meses de julio-agosto de 2006, y el segundo en noviembre-diciembre de 2006. Luego, la variación cuantitativa de la composición química de aceites extraídos puede estar influenciada, tanto por el mismo proceso de secado como por las

variables relacionadas con lluvias, temperatura y otros cambios medioambientales, que no fueron controladas en el presente trabajo. Sin embargo, durante el secado de las plantas se observó una tendencia en la disminución del nerol, de 4.6% (LAC300000), a nivel de trazas (<0.1%) y del geraniol que disminuyó de un 15 a un 7%, a la vez, que el contenido del citral aumentaba conforme el tiempo de extracción y/o la temperatura y la duración de secado.

En la **Figura 28**, se observa que la relación “Área del compuesto”/“Área del estándar interno”, de los compuestos mayoritarios de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”, obtenidos con los máximos rendimientos es bastante similar. Asimismo, se aprecia la disminución de nerol, y un ligero aumento de sus aldehídos análogos, neral y geranial, a medida que se incrementa la temperatura empleada para el secado. Prácticamente no se observan cambios en el contenido de *trans*- β -cariofileno y geraniol en los experimentos.

Figura 28. Relación “Área del compuesto”-“Área del estándar interno”, de los compuestos mayoritarios de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”, reportados en la **Tabla 8**.

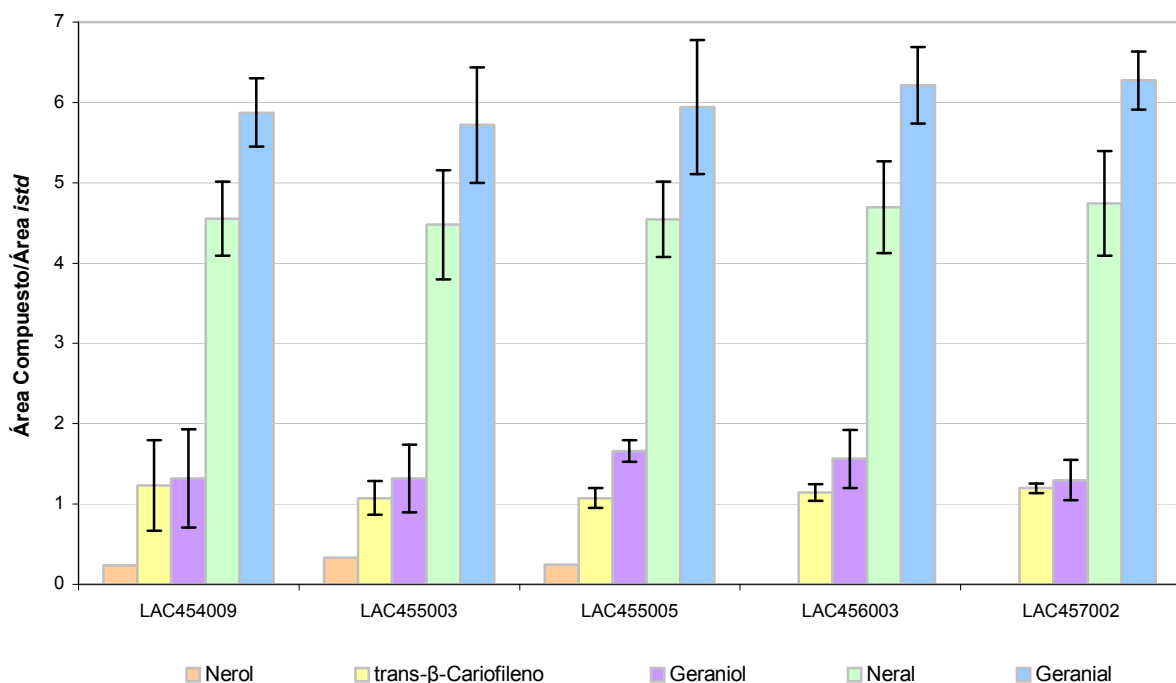


Figura 29. Relación “Área del compuesto”-“Área del estándar interno”, de los compuestos mayoritarios de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”, obtenidos de plantas frescas, usando diferentes tiempos de extracción.

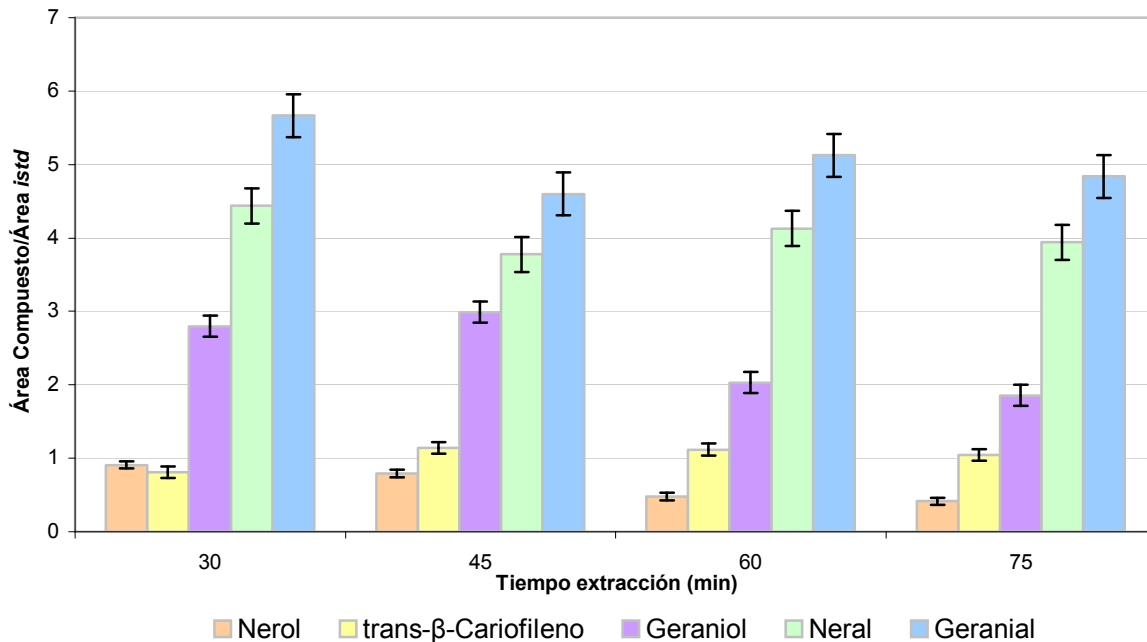
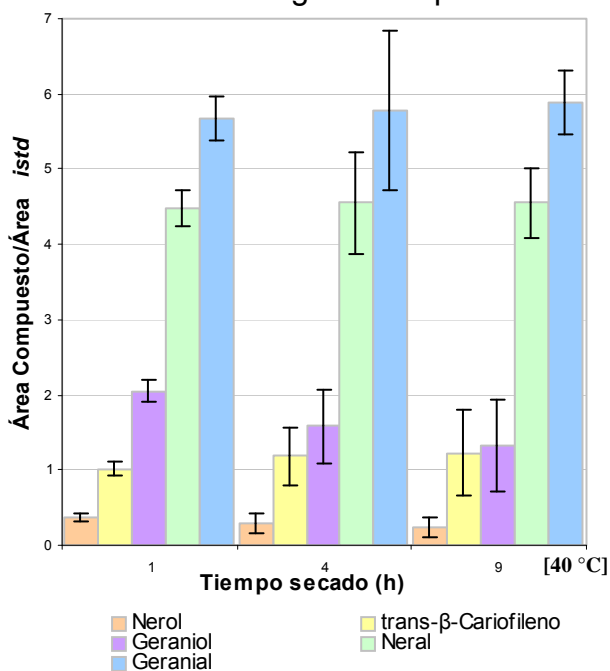
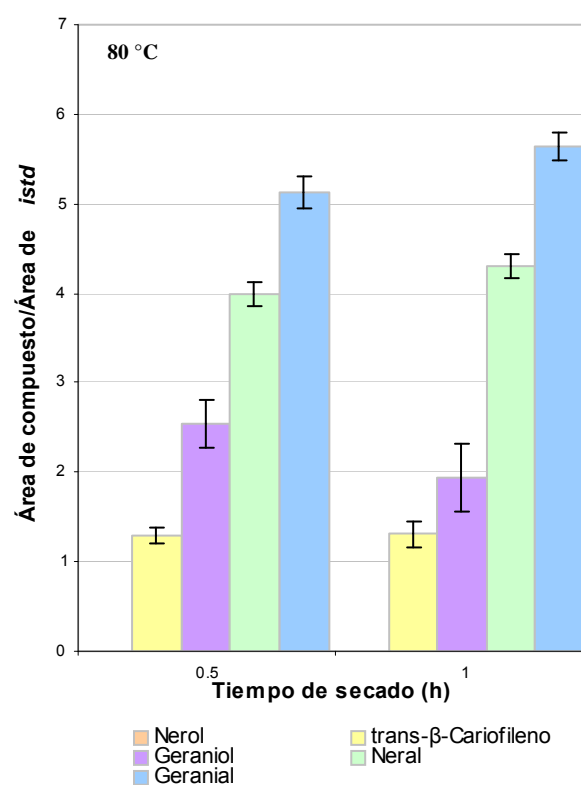
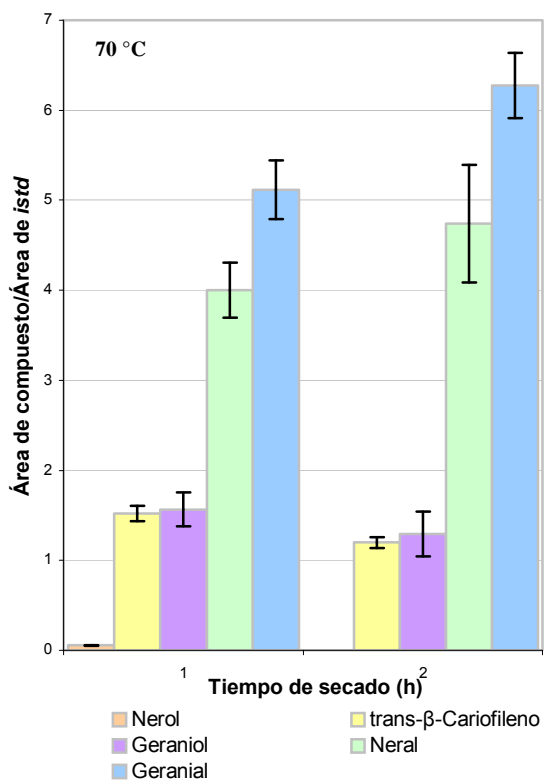
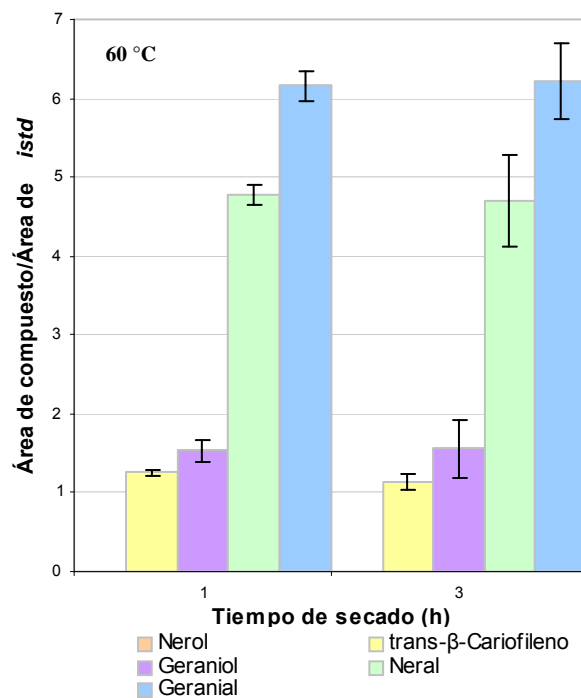
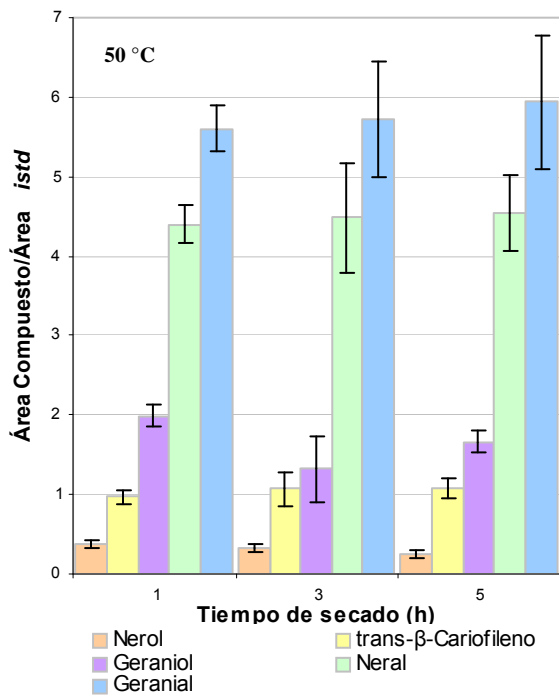


Figura 30. Relación “Área del compuesto”-“Área del estándar interno”, de los compuestos mayoritarios de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”, usando diferentes tiempos de secado en el rango de temperaturas de 40 a 80°C.



Continuación, **Figura 30**



También, se observó la disminución de nerol y geraniol, en los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”, obtenidos de plantas frescas, a medida que aumenta el tiempo de extracción por MWHD (**Figura 29**). Sin embargo, la disminución de nerol y geraniol no condujo a un notorio aumento de neral y geranial. La mayor relación “área del compuesto”-“área del estándar interno” de neral y geranial se observó para los AEs obtenidos con 30 min de extracción.

Para la temperatura de secado de 40°C, se observó la disminución de nerol y geraniol a medida que aumentaba el tiempo de secado de 1 a 9 h. De igual forma, se apreció un ligero aumento en el contenido de neral y geranial. Sin embargo, la cantidad de estos compuestos mayoritarios no se vio notoriamente afectada, si se tienen en cuenta los corredores de error calculados.

Los AEs de plantas de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”, que fueron secadas a 50°C, presentaron el contenido de nerol y geraniol más bajo que las secadas a 40°C, y su disminución, a medida que aumentaba el tiempo de secado, fue más acentuada. Además, aumentó el contenido de neral, geranial y *trans*- β -cariofileno.

Los AEs obtenidos de plantas que fueron secadas en el rango de 60 a 80 °C, contienen nerol a nivel trazas. Además, se visualiza en la **Figura 30**, que el contenido de geraniol en las plantas secadas a 80°C es mayor que a 60 ó 70°C. Por ejemplo, el AE extraído luego de media hora de secado a 80°C, presenta un contenido de geraniol similar, al de las plantas frescas. Sin embargo, luego de media hora de secado más, se observó la disminución del contenido de geraniol, y un ligero aumento en el contenido de neral y geranial.

En general, se observó que en los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”, obtenidos de plantas secas, disminuyó considerablemente la cantidad de nerol y geraniol presentes, a medida que se aumentaron la temperatura y la duración del

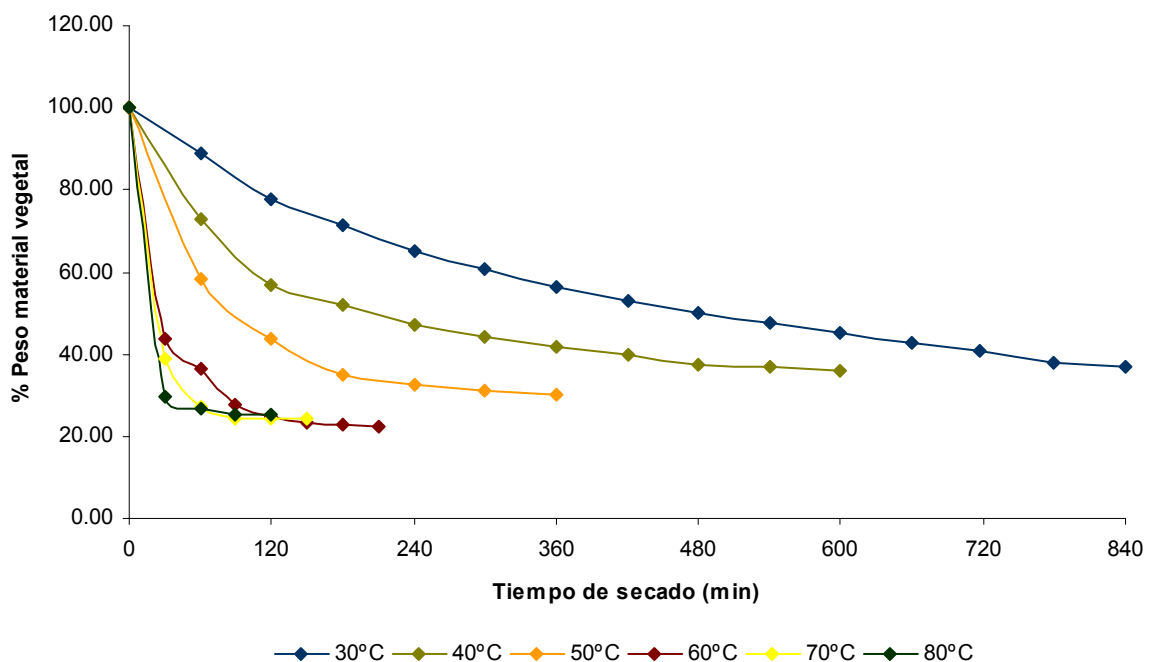
secado. Además, se observaron ligeros aumentos en el contenido de neral y geranial.

3.2.2 *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown, quimiotipo “Carvona”

3.2.2.1 Curvas de secado de plantas de *Lippia alba*, quimiotipo “Carvona”

En la **Figura 31** se presentan las curvas de secado en el rango de 30 a 80°C para el quimiotipo “Carvona” de *Lippia alba*. La gráfica representa el cambio en función del tiempo del peso del material vegetal. Como se observa en la figura, de igual manera que el quimiotipo “Citral”, las plantas del quimiotipo carvona, luego de 14 h (840 min) a una temperatura de 30°C, no lograron llegar al equilibrio. Sin embargo, a pesar de ser un quimiotipo diferente al otro, analizado en este Proyecto, y al estudiado por Barbosa y colaboradores [16], se aprecian similitudes en los tiempos a los cuales se alcanza el equilibrio; por ejemplo, para la temperatura de 80°C, también se fueron necesarios 30 min, para que la planta seca mantenga su peso constante.

Figura 31. Curvas de secado de *Lippia alba*, quimiotipo “Carvona” utilizando temperaturas de 30 a 80°C.



Respecto a la coloración de la planta, se aprecia amarronamiento ligero en las plantas secadas en el intervalo de 30 a 80°C, más acentuado, en comparación con las plantas de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”.

En la **Figura 31**, se observa que las curvas de secado a las diferentes temperaturas, presentan un comportamiento muy similar. A medida que incrementa la temperatura de secado, también aumenta la pendiente de la curva, y el tiempo al cual se observan valores de peso constante es menor. Además, para el intervalo de temperaturas de 60 a 80°C, se observó una tendencia análoga luego de 1 hora de secado. En la **Tabla 10** se presentan los porcentajes de peso promedio de material vegetal alcanzados con cada una de las temperaturas.

Tabla 10. Porcentaje final del peso del material vegetal, quimiotipo “Carvona”, secado a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	% Peso material vegetal
30	840	37 ± 5.81
40	540	36 ± 2.47
50	360	30 ± 1.21
60	210	23 ± 1.27
70	150	24.2 ± 0.94
80	120	25 ± 1.33

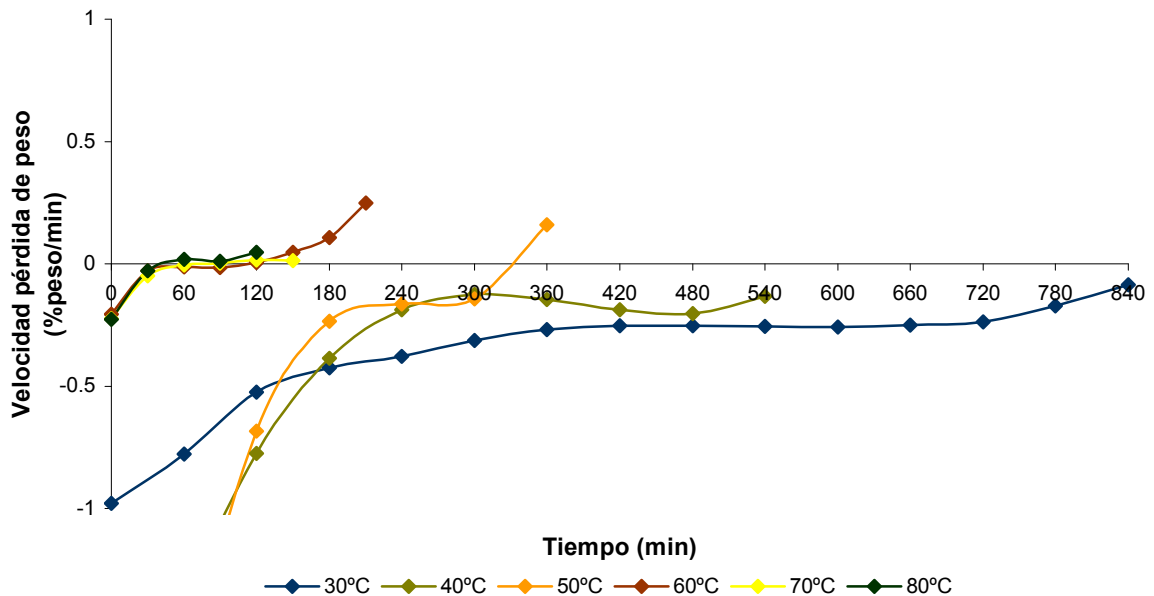
Al comparar los resultados obtenidos para el quimiotipo “Citral” (**Tabla 6**), con los obtenidos para el quimiotipo “Carvona”, se observa que de las plantas del quimiotipo “Carvona” se retiró una mayor cantidad de agua, a 60°C. No obstante, el quimiotipo “Citral” pierde una mayor cantidad de agua a la temperatura de 50°C.

En general, los experimentos realizados con los quimiotipos de *Lippia alba*, “Citral” y “Carvona” en el intervalo de temperatura de 30 a 80°C, presentaron curvas de secado y porcentajes finales del peso del material vegetal similares.

3.2.2.2 Derivadas de las curvas de secado, quimiotipo “Carvona”

A partir de las curvas de secado, se calcularon para cada temperatura por regresión lineal las líneas de tendencia que las representan, y de éstas, se calcularon sus derivadas. De igual forma, que para el quimiotipo “Citral”, éstas indicaron a qué tiempos la pérdida de peso se hizo constante, y es cuando se realizaron las extracciones. En la **Figura 32** se presentan las derivadas de las curvas de secado para cada uno de los experimentos.

Figura 32. Derivadas de las curvas de secado de *Lippia alba*, quimiotipo “Carvona”, utilizando temperaturas de 30 a 80°C.



Tal y como se observó en la **Figura 31**, la curva de secado a 30°C no presentó un peso constante después de 14 h de secado, luego el valor de la pendiente de esa curva es muy pequeño, y como se esperaba, la derivada de esta curva no “cortó” el eje de las abscisas, en la **Figura 32**. Por otra parte, en los demás experimentos, se observa, que las derivadas “cortaron” en varios puntos el eje y/o presentaron valores cercanos a cero después de media hora. Por ejemplo, las curvas de secado de las plantas de *Lippia alba*, quimiotipo “Carvona,” en el intervalo de temperatura de 60 a 80°C, presentaban una pendiente mayor que las secadas en

el intervalo de temperatura de 30 a 50°C. Si la pérdida de peso es mucho más rápida a medida que aumenta el valor de la pendiente, era de esperar que la derivadas de las curvas que representan las plantas secadas en el intervalo de temperatura de 60 a 80°C, presentaron valores cercanos a cero en un lapso de tiempo menor que para el intervalo de temperatura de 30 a 50°C. A continuación, en la **Tabla 11**, se especifican los tiempos establecidos para realizar las extracciones a cada temperatura, determinados, según los valores obtenidos a partir de las derivadas de las curvas de secado.

Tabla 11. Tiempos de secado para cada temperatura, escogidos para realizar las extracciones de los aceites esenciales de *Lippia alba*, quimiotipo “Carvona”.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Velocidad pérdida de peso (%peso/min)
30	900	0.059
40	60	-1.411
40	300	-0.131
40	540	-0.130
50	60	-1.838
50	300	-0.149
60	60	-0.012
60	180	0.107
70	60	-0.004
70	120	0.014
80	30	-0.029
80	60	0.018

Al igual que para el quimiotipo “Citral”, al observar que para la temperatura de secado de 30°C nunca se alcanzó un equilibrio, se decidió continuar la tendencia de la gráfica obtenida por regresión lineal para la derivada. También se encontró que el equilibrio se alcanzaba luego de 900 min de secado.

Aunque solo los experimentos desarrollados en el intervalo de 60 a 80°C presentan una velocidad de pérdida de peso (derivada) cercana a cero luego de una hora, se escogió este tiempo con el objetivo de establecer una comparación

Los rendimientos de aceites esenciales más altos (1.97-2.2%) se obtuvieron, en su totalidad, para las plantas que fueron secadas, entre ellas, se encuentran los experimentos LAA454009, LAC455005, LAC456003, LAC457001, LAC457002 y LAC458001 resaltados en la **Tabla 12**. Por el contrario, los rendimientos más bajos (0.49-0.67%) se obtuvieron, en su mayoría, para los experimentos en los cuales no se secaron las plantas.

Tabla 12. Rendimientos de los AEs obtenidos por MWHD, de plantas de *Lippia alba*, quimiotipo “Carvona”, bajo diferentes condiciones de extracción y secado.

Experimento	Tiempo de secado (h)	Temperatura de secado (°C)	Tiempo de extracción (min)	Rendimiento % (p/p)	
LAA300000	-	-	30	0.67	±0.090
LAA450000	-	-	45	0.57	±0.088
LAA600000	-	-	60	0.53	±0.094
LAA750000	-	-	75	0.70	±0.091
LAA453015	15	30	45	0.89	±0.088
LAA454001	1	40	45	0.49	±0.091
LAA454005	5	40	45	1.4	±0.182
LAA454009	9	40	45	2.12	±0.035
LAA455001	1	50	45	0.93	±0.094
LAA455005	5	50	45	2.2	±0.140
LAA456001	1	60	45	0.87	±0.091
LAA456003	3	60	45	2.1	±0.102
LAA457001	1	70	45	2.04	±0.088
LAA457002	2	70	45	2.10	±0.061
LAA45801/2	0.5	80	45	1.09	±0.094
LAA458001	1	80	45	1.97	±0.046

En la **Figura 34**, se presentan los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Carvona”, obtenidos con los máximos rendimientos. Los corredores de error calculados, muestran que los rendimientos de los AEs graficados en la **Figura 34**, son bastante similares entre si. El AE obtenido a una temperatura de 50°C y 5 h de secado (LAA455005), presentó el mejor rendimiento, mientras que los procesos de secado más cortos y con altos rendimientos, se observaron para los AEs obtenidos a una temperatura de 70°C durante 1 y 2 h de secado.

Figura 34. Comparación de los rendimientos más altos de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Carvona”, obtenidos en el rango de temperaturas de 40 a 80°C.

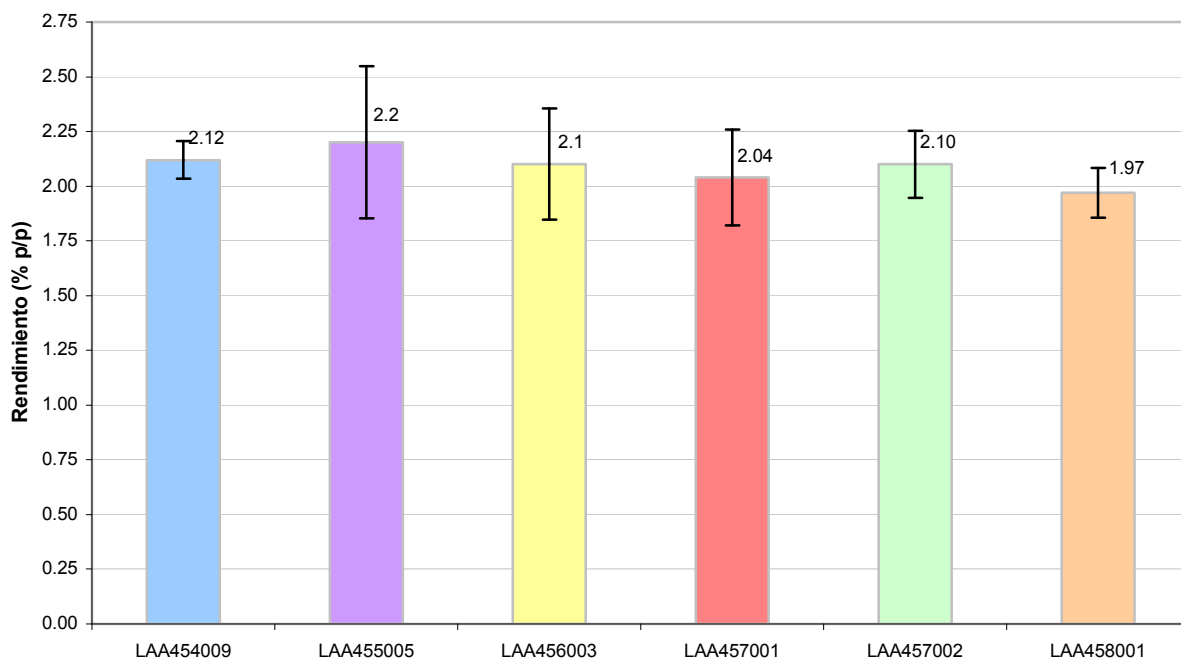


Figura 35. Comparación de los rendimientos de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Carvona”, obtenidos en el rango de temperaturas de 40 a 80°C, con 1 h de secado, y de la planta fresca, empleando 45 min para todas las extracciones.

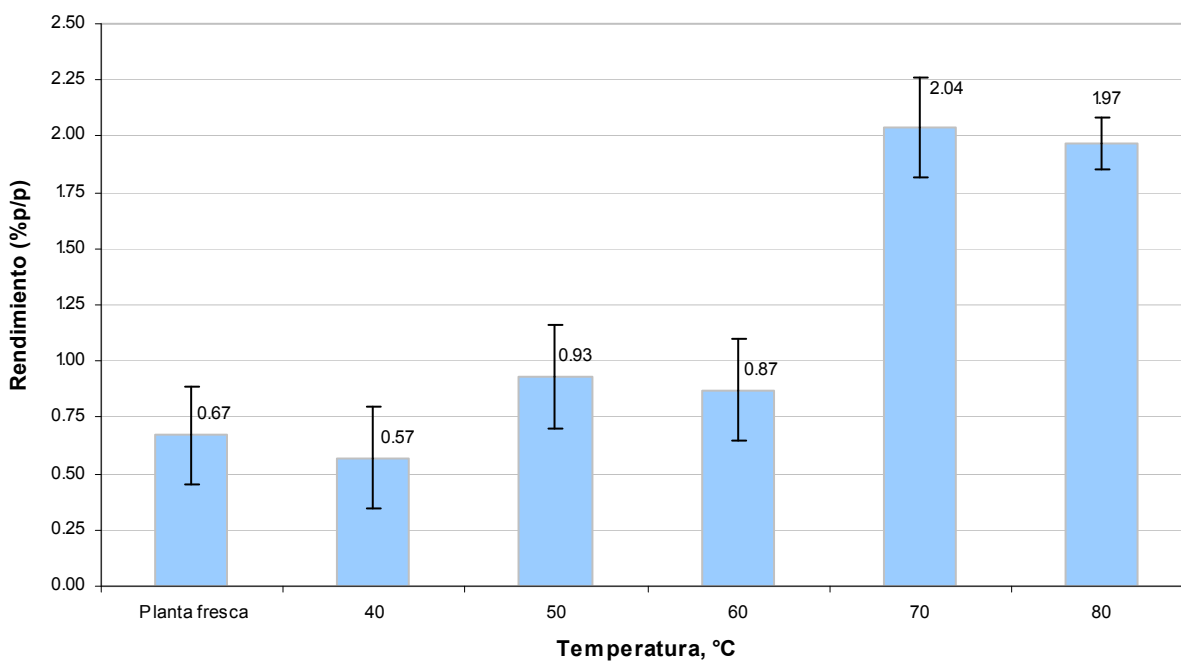
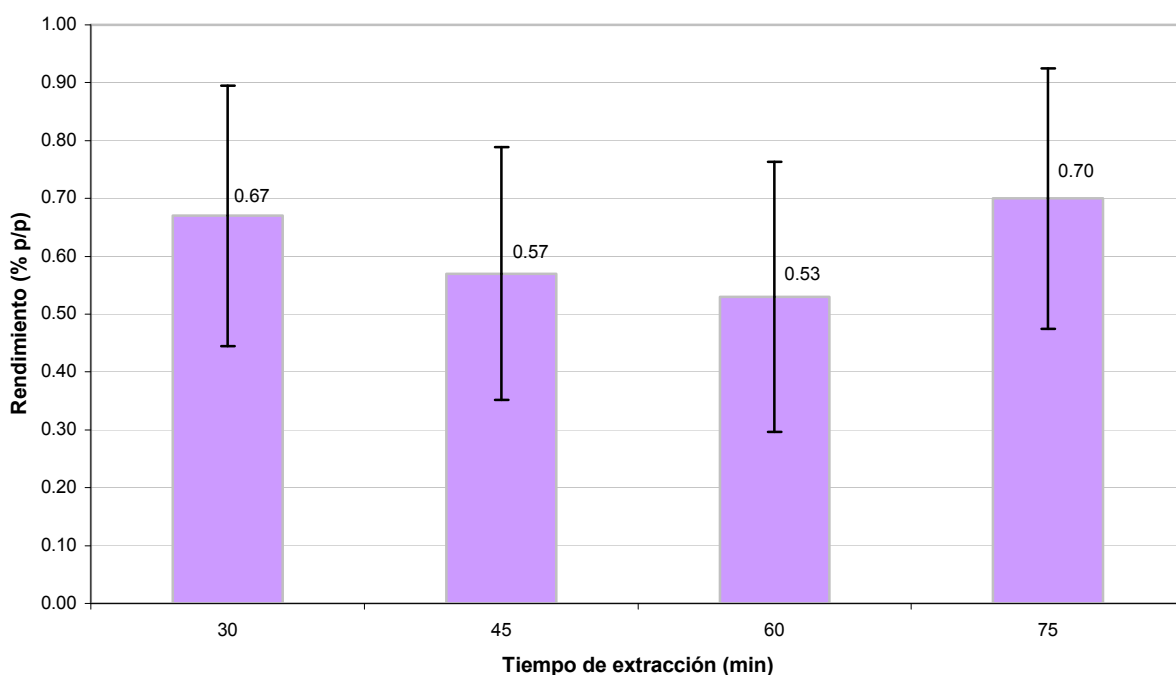


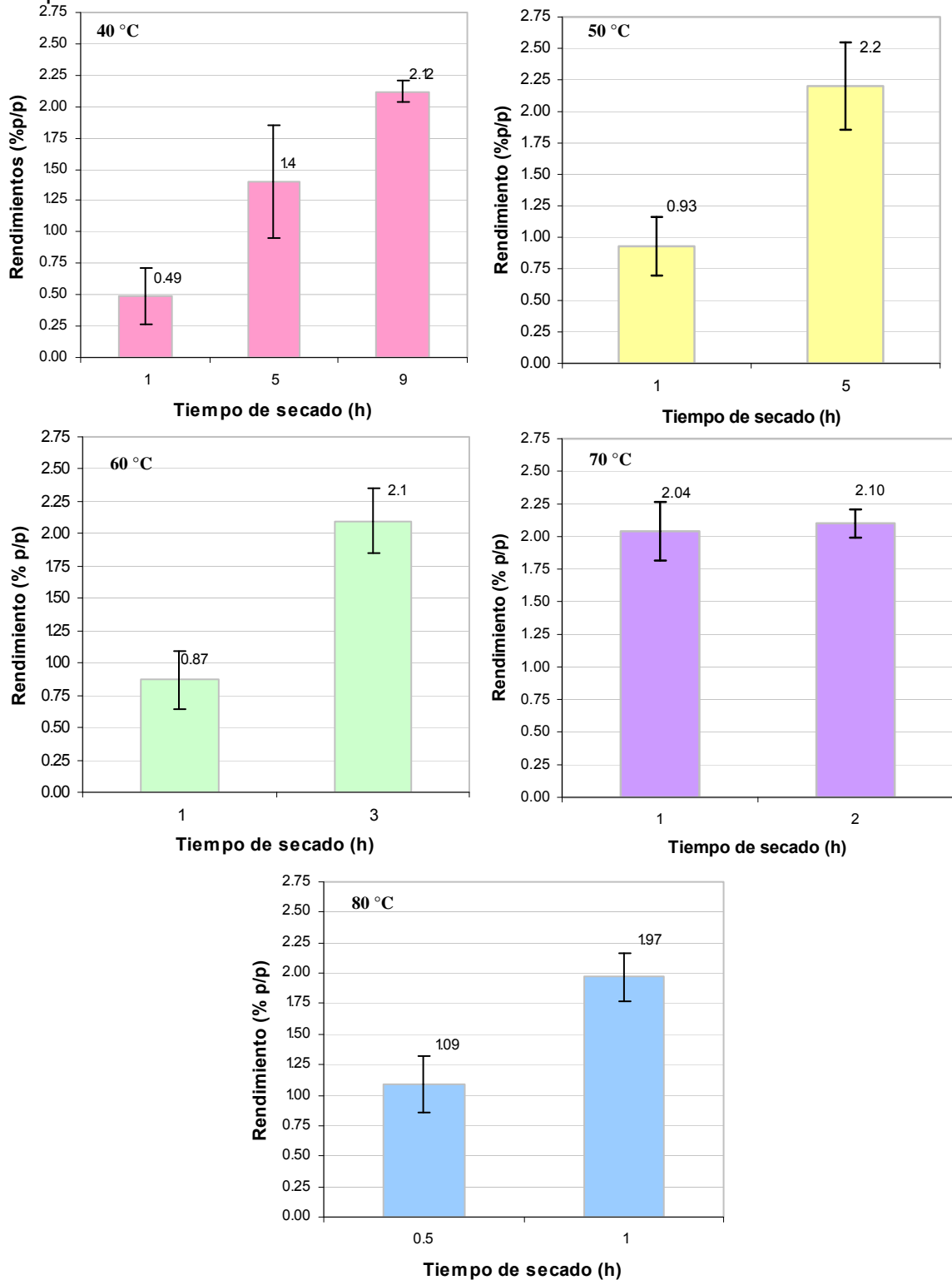
Figura 36. Comparación de los rendimientos de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Carvona”, obtenidos de plantas frescas, empleando diferentes tiempos de extracción.



En la **Figura 35**, se presenta la comparación de los rendimientos de AEs de plantas de *Lippia alba*, quimiotipo “Carvona”, secadas en el rango de temperaturas de 40 a 80°C, durante 1 h de secado, y de la planta fresca, empleando 45 min para todas las extracciones. Según los corredores de error calculados, el rendimiento de los AEs obtenidos en el intervalo de temperaturas de 40 a 60°C, y el de la planta fresca, son similares. Sin embargo, a diferencia del quimiotipo “Citral”, los AEs de plantas secadas a 70 y 80°C, tienen un rendimiento superior a los obtenidos a las otras temperaturas, y comparable a los AEs con rendimientos altos.

Por otra parte, en la **Figura 36**, los corredores de error muestran que no existe un efecto significativo del tiempo de extracción empleado, sobre el rendimiento del AE de plantas frescas de *Lippia alba*, quimiotipo “Carvona”. Se observa un rendimiento máximo para el AE obtenido por MWHD durante 75 min de extracción.

Figura 37. Comparación de los rendimientos de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Carvona”, obtenidos bajo diferentes tiempos de secado en el rango de temperaturas de 40 a 80°C.



El rendimiento de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Carvona”, secados en el intervalo de temperatura de 40 a 80°C, aumentó con la duración del secado (**Figura 37**).

Por ejemplo, se observa una diferencia de ca. 1.5% en el rendimiento de los AEs de plantas secadas a 40°C, durante 1 y 9 h. Un efecto similar se observa para las plantas secadas a 50, 60 y 80°C. Sin embargo, para los AEs de plantas de *Lippia alba*, quimiotipo “Carvona”, secados a 70°C durante 1 y 2 h, no se aprecia una discrepancia significativa en el rendimiento.

A diferencia del quimiotipo “Citral”, el AE obtenido de plantas secadas durante 1 h a 80°C, presentó un rendimiento alto. Esto quiere decir, que un aumento de 10°C en la temperatura de secado al experimento LAA457001 no genera una diferencia significativa en el rendimiento del AE, y por ende, sería innecesario el gasto de energía para elevar la temperatura del aire de secado.

En resumen, el AE con mayor rendimiento es el LAA455005. Sin embargo, LAA457001 que también tiene un rendimiento alto, se obtiene en un menor tiempo de secado de la planta, lo cual hace el proceso más eficiente energéticamente.

3.2.2.4 Caracterización química por GC-MS de los aceites esenciales de *Lippia alba*, quimiotipo “Carvona”

En la **Tabla 13** se registran los componentes mayoritarios aislados e identificados por GC-MS, según el orden de elución en la columna DB-5MS, junto con sus índices de retención y cantidades relativas (%) para cada uno de los experimentos. En la **Figura 38** se ilustra el perfil cromatográfico típico de los metabolitos secundarios volátiles obtenidos por MWHD de hojas, tallos e inflorescencias de *Lippia alba*, quimiotipo “Carvona”. La identificación de los metabolitos secundarios volátiles de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Carvona”, se efectuó con base en los índices de Kovàts calculados y los reportados en la

literatura [3], así como en sus espectros de masas (EI, 70 eV). La cuantificación se realizó empleando la técnica de estandarización interna, siguiendo el procedimiento descrito en la **Sección 2.3.4**.

Tabla 13. Cantidad relativa (%) de los principales componentes de los aceites esenciales de *Lippia alba*, quimiotipo “Carvona”, aislados por MWHD.

Nº Pico ¹	Ik ²		Compuesto	AE, Cantidad relativa % ³			
	DB-5	DB-WAX		LAA300000	LAA450000	LAA600000	LAA750000
1	855	1289	<i>cis</i> -3-Hexenol + <i>cis</i> -2-Hexenal	0.26	0.08	0.18	0.07
2	881	1122	Acetato de 2-metilbutilo	0.06	0.05	0.04	0.04
3	939	921	α -Pino	0.12	0.11	0.08	0.09
4	954	965	Canfeno	0.31	0.29	0.24	0.24
5	979	1351	1-Octen-3-ol	0.22	0.17	0.18	0.13
6	991	1064	β -Mirceno	0.87	0.86	0.71	0.70
7	1005	1319	(3Z)-Acetato de hexenilo	0.07	0.06	0.09	0.06
8	1008	1681	Verbeneno	0.14	0.14	0.13	0.12
9	1017	994	Isobutanoato de isopentilo	0.07	-	0.07	-
10	1041	1197	Limoneno	29.11	29.65	23.17	22.35
11	1049	1153	<i>trans</i> - β -Ocimeno	0.88	0.87	0.73	0.69
12	1090	1186	Terpinoleno	0.05	0.05	0.05	0.04
13	1102	1453	Linalol	0.62	0.53	0.54	0.45
14	1126	1580	<i>trans-p</i> -Mentha-2,8-dien-1-ol	0.29	0.25	0.23	0.20
15	1133	1460	<i>trans</i> -Hidrato de pino	0.09	0.07	0.07	0.06
16	1137	1350	<i>cis</i> -Óxido de limoneno	0.21	0.17	0.18	0.16
17	1141	1948	<i>cis-p</i> -Mentha-2,8-dien-1-ol	0.18	0.15	0.15	0.14
18	1180	1613	Borneol	0.94	0.78	0.90	0.76
19	1202	1517	<i>cis</i> -Dihidrocarvona	0.37	0.48	0.38	0.42
20	1210	1537	<i>trans</i> -Dihidrocarvona	0.32	0.42	0.38	0.56
21	1221	1745	<i>trans</i> -Carveol	0.57	0.46	0.67	0.59
22	1259	1654	Carvona	38.60	37.12	36.70	34.37
23	1265	1641	Piperitona	3.50	3.31	2.78	2.65
24	1269	1798	<i>cis</i> -Óxido de carvona	0.31	0.30	0.30	0.27
25	1275	1754	Isopiperitona	0.20	0.20	0.19	0.18
26	1280	1745	<i>trans</i> -Óxido de carvona	0.19	0.17	0.21	0.21
27	1291	2092	Timol	0.07	0.07	0.13	0.14
28	1333	1965	<i>trans</i> -Acetato de carvilo	0.15	0.12	0.17	0.16
29	1348	1948	Piperitenona	5.47	5.61	5.07	4.97
30	1384	1399	α -Copaeno	0.06	0.09	0.12	0.15
31	1388	1428	Isómero de β -Elemeno	-	-	0.08	0.09
32	1394	1428/1496	β -Bourboneno + β -Elemeno	1.60	1.89	2.73	3.05
33	1428	1483	β -Ilango	0.19	0.23	0.35	0.41

Continuación, **Tabla 13**

34	1432	1506	<i>trans</i> -β-Cariofileno	0.10	0.12	0.21	0.27
35	1441	1447	β-Gurjuneno	0.18	0.21	0.35	0.44
36	1453	1570	<i>trans</i> -β-Farneseno	0.65	0.76	1.21	1.36
37	1461	1557	<i>allo</i> -Aromadendreno	0.20	0.25	0.06	0.07
38	1471	1741	α-Guaieno	-	-	-	-
39	1481	1692	γ-Muuroleno	0.04	0.07	0.48	0.63
40	1483	1552	Germacreno D	-	0.05	0.15	0.22
41	1493	1624	Biciclosesquifelandreno	5.03	6.39	11.08	12.98
42	1506	1608	Biciclogermacreno	0.35	0.45	0.87	1.08
43	1512	1671	γ-Cadineno	0.12	0.13	0.25	0.26
44	1525	1855	Cubebol	0.23	0.25	-	0.66
45	1544	1680	<i>trans</i> -γ-Bisaboleno	-	-	0.11	0.12
46	1589	1967	Germacren-D-4-ol	0.24	0.27	0.34	0.47

¹Número de pico en la **Figura 38**

²Índices de Kovats determinados experimentalmente

³Promedio de tres extracciones independientes, n=3

Continuación, **Tabla 13**

Nº Pico ¹	Ik ²		Compuesto	AE, Cantidad relativa % ³			
	DB-5	DB-WAX		LAA453015	LAA450000	LAA600000	LAA750000
1	855	1289	<i>cis</i> -3-Hexenol + <i>cis</i> -2-Hexenal	0.41	0.12	0.25	0.17
2	881	1122	Acetato de 2-metilbutilo	0.09	0.05	-	-
3	939	921	α-Pineno	0.11	0.10	0.12	0.12
4	954	965	Canfeno	0.31	0.27	0.32	0.31
5	979	1351	1-Octen-3-ol	0.18	0.22	0.16	0.11
6	991	1064	β-Mirceno	0.95	0.80	0.91	0.95
7	1005	1319	(3Z)-Acetato de hexenilo	0.08	0.06	-	-
8	1008	1681	Verbeneno	0.15	0.14	0.15	0.16
9	1017	994	Isobutanoato de isopentilo	-	0.08	-	-
10	1041	1197	Limoneno	29.41	24.26	30.92	30.27
11	1049	1153	<i>trans</i> -β-Ocimeno	0.86	0.83	0.87	0.88
12	1090	1186	Terpinoleno	0.06	0.05	0.06	0.06
13	1102	1453	Linalol	0.52	0.63	0.52	0.54
14	1126	1580	<i>trans</i> - <i>p</i> -Mentha-2,8-dien-1-ol	0.26	0.24	0.22	0.25
15	1133	1460	<i>trans</i> -Hidrato de pineno	0.08	0.08	-	-
16	1137	1350	<i>cis</i> -Óxido de limoneno	0.21	0.20	0.17	0.19
17	1141	1948	<i>cis</i> - <i>p</i> -Mentha-2,8-dien-1-ol	0.19	0.16	0.15	0.17
18	1180	1613	Borneol	0.63	0.88	-	-
19	1202	1517	<i>cis</i> -Dihidrocarvona	0.19	0.36	0.21	0.20

Continuación, **Tabla 13**

20	1210	1537	<i>trans</i> -Dihidrocarvona	0.08	0.28	0.09	-
21	1221	1745	<i>trans</i> -Carveol	0.46	0.59	0.18	0.24
22	1259	1654	Carvona	36.23	36.39	35.15	36.43
23	1265	1641	Piperitona	3.34	3.29	3.34	3.50
24	1269	1798	<i>cis</i> -Óxido de carvona	0.33	0.26	0.40	0.40
25	1275	1754	Isopiperitona	0.21	0.18	0.21	0.20
26	1280	1745	<i>trans</i> -Óxido de carvona	0.23	0.19	0.21	0.21
27	1291	2092	Timol	-	0.16	-	-
28	1333	1965	<i>trans</i> -Acetato de carvilo	0.13	0.17	0.10	0.11
29	1348	1948	Piperitenona	6.30	6.07	5.41	5.45
30	1384	1399	α -Copaeno	0.07	0.09	0.10	0.11
31	1388	1428	Isómero de β -Elemeno		0.07	0.07	
32	1394	1428/1496	β -Bourboneno + β -Elemeno	1.93	2.19	2.24	2.24
33	1428	1483	β -Ilangeno	0.24	0.27	0.28	0.29
34	1432	1506	<i>trans</i> - β -Cariofileno	0.17	0.18	0.16	0.16
35	1441	1447	β -Gurjuneno	0.23	0.28	0.25	0.26
36	1453	1570	<i>trans</i> - β -Farneseno	0.71	0.91	0.63	0.41
37	1461	1557	<i>allo</i> -Aromadendreno	-	-	-	0.27
38	1471	1741	α -Guaieno	0.27	0.38	0.34	0.32
39	1481	1692	γ -Muuroleno		0.13	0.07	0.07
40	1483	1552	Germacreno D	0.06	0.14	0.06	0.07
41	1493	1624	Biciclosesquifelandreno	7.22	8.98	7.92	7.27
42	1506	1608	Biciclogermacreno	0.50	0.76	0.50	0.42
43	1512	1671	γ -Cadineno	0.06	0.22	0.15	0.12
44	1525	1855	Cubebol	0.21	-	-	0.24
45	1544	1680	<i>trans</i> - γ -Bisaboleno	-	-	-	-
46	1589	1967	Germacren-D-4-ol	0.23	0.36	0.18	0.26

¹Número de pico en la **Figura 38**

²Índices de Kovàts determinados experimentalmente

³Promedio de tres extracciones independientes, n=3

Continuación, **Tabla 13**

Nº Pico ¹	Ik ²		Compuesto	AE, Cantidad relativa % ³			
	DB-5	DB-WAX		LAA455001	LAA455005	LAA456001	LAA456003
1	855	1289	<i>cis</i> -3-Hexenol + <i>cis</i> -2-Hexenal	0.31	0.10	-	-
2	881	1122	Acetato de 2-metilbutilo	-	-	-	-
3	939	921	α -Pino	0.10	0.11	0.13	0.11
4	954	965	Canfeno	0.27	0.30	0.34	0.29
5	979	1351	1-Octen-3-ol	0.20	0.08	0.06	0.06

Continuación, **Tabla 13**

6	991	1064	β -Mirceno	0.82	0.91	0.94	0.88
7	1005	1319	(3Z)-Acetato de hexenilo	-	-	-	-
8	1008	1681	Verbeneno	0.12	0.14	0.15	0.15
9	1017	994	Isobutanoato de isopentilo	0.07	-	-	-
10	1041	1197	Limoneno	26.27	29.71	30.58	28.33
11	1049	1153	<i>trans</i> - β -Ocimeno	0.72	0.80	0.82	0.80
12	1090	1186	Terpinoleno	0.05	0.06	-	0.07
13	1102	1453	Linalol	0.51	0.49	0.43	0.41
14	1126	1580	<i>trans-p</i> -Mentha-2,8-dien-1-ol	0.31	0.26	0.19	0.22
15	1133	1460	<i>trans</i> -Hidrato de pineno	-	-	-	-
16	1137	1350	<i>cis</i> -Óxido de limoneno	0.17	0.18	0.15	0.16
17	1141	1948	<i>cis-p</i> -Mentha-2,8-dien-1-ol	0.22	0.17	0.14	0.15
18	1180	1613	Borneol	0.77	-	-	-
19	1202	1517	<i>cis</i> -Dihidrocarvona	0.28	-	-	-
20	1210	1537	<i>trans</i> -Dihidrocarvona	0.14	-	-	-
21	1221	1745	<i>trans</i> -Carveol	0.50	0.24	0.08	0.13
22	1259	1654	Carvona	33.93	35.00	36.32	35.08
23	1265	1641	Piperitona	3.30	3.45	3.29	3.32
24	1269	1798	<i>cis</i> -Óxido de carvona	0.25	0.38	0.48	0.41
25	1275	1754	Isopiperitona	0.16	0.21	0.22	0.22
26	1280	1745	<i>trans</i> -Óxido de carvona	0.17	0.23	0.25	0.24
27	1291	2092	Timol	0.13	-	-	-
28	1333	1965	<i>trans</i> -Acetato de carvilo	0.14	0.10	0.09	0.10
29	1348	1948	Piperitenona	5.99	5.67	4.89	5.29
30	1384	1399	α -Copaeno	0.11	0.14	0.11	0.16
31	1388	1428	Isómero de β -Elemeno	0.07	0.07	0.08	0.08
32	1394	1428/1496	β -Bourboneno + β -Elemeno	2.52	2.63	2.48	2.87
33	1428	1483	β -llangeno	0.32	0.37	0.30	0.41
34	1432	1506	<i>trans</i> - β -Cariofileno	0.20	0.18	0.16	0.21
35	1441	1447	β -Gurjuneno	0.32	0.33	0.27	0.37
36	1453	1570	<i>trans</i> - β -Farneseno	0.85	0.56	0.53	0.70
37	1461	1557	<i>allo</i> -Aromadendreno	0.05	0.46	-	0.21
38	1471	1741	α -Guaieno	0.44	0.38	0.34	0.47
39	1481	1692	γ -Muuroleno	0.14	0.09	0.07	0.11
40	1483	1552	Germacreno D	0.14	0.09	-	0.11
41	1493	1624	Biciclosesquifelandreno	9.79	8.65	8.68	10.46
42	1506	1608	Biciclogermacreno	0.84	0.63	0.42	0.78
43	1512	1671	γ -Cadineno	0.23	0.19	-	0.22
44	1525	1855	Cubebol	0.59	-	-	-
45	1544	1680	<i>trans</i> - γ -Bisaboleno	-	-	-	-
46	1589	1967	Germacren-D-4-ol	0.39	0.26	-	0.26

¹Número de pico en la **Figura 38**

²Índices de Kovats determinados experimentalmente

³Promedio de tres extracciones independientes, n=3

Continuación, **Tabla 13**

Nº Pico ¹	Ik ²		Compuesto	AE, Cantidad relativa % ³			
	DB-5	DB-WAX		LAA457001	LAA457002	LAA45801/2	LAA458001
1	855	1289	<i>cis</i> -3-Hexenol + <i>cis</i> -2-Hexenal	-	-	-	-
2	881	1122	Acetato de 2-metilbutilo	-	-	-	-
3	939	921	α -Pino	0.10	0.11	0.11	0.12
4	954	965	Canfeno	0.27	0.30	0.30	0.28
5	979	1351	1-Octen-3-ol	-	0.06	0.06	0.06
6	991	1064	β -Mirce	0.83	0.84	0.90	0.86
7	1005	1319	(3Z)-Acetato de hexenilo	-	-	-	-
8	1008	1681	Verbeno	0.14	0.15	0.15	0.14
9	1017	994	Isobutanoato de isopentilo	-	-	-	-
10	1041	1197	Limoneno	27.85	27.04	29.81	28.81
11	1049	1153	<i>trans</i> - β -Ocimeno	0.76	0.73	0.82	0.82
12	1090	1186	Terpinoleno	-	0.06	-	-
13	1102	1453	Linalol	0.41	0.41	0.41	0.43
14	1126	1580	<i>trans-p</i> -Mentha-2,8-dien-1-ol	0.20	0.22	0.19	0.19
15	1133	1460	<i>trans</i> -Hidrato de pino	-	-	-	-
16	1137	1350	<i>cis</i> -Óxido de limoneno	0.16	0.17	0.15	0.16
17	1141	1948	<i>cis-p</i> -Mentha-2,8-dien-1-ol	0.14	0.17	0.14	0.14
18	1180	1613	Borneol	-	-	-	-
19	1202	1517	<i>cis</i> -Dihidrocarvona	-	-	-	-
20	1210	1537	<i>trans</i> -Dihidrocarvona	-	-	-	-
21	1221	1745	<i>trans</i> -Carveol	0.10	0.10	0.08	0.09
22	1259	1654	Carvona	35.61	35.95	35.02	34.58
23	1265	1641	Piperitona	3.28	3.26	3.39	3.40
24	1269	1798	<i>cis</i> -Óxido de carvona	0.43	0.41	0.43	0.44
25	1275	1754	Isopiperitona	0.22	0.22	0.22	0.24
26	1280	1745	<i>trans</i> -Óxido de carvona	0.24	0.26	0.23	0.24
27	1291	2092	Timol	-	-	-	-
28	1333	1965	<i>trans</i> -Acetato de carvilo	0.10	0.09	0.10	0.10
29	1348	1948	Piperitenona	5.22	5.25	5.44	5.57
30	1384	1399	α -Copaeno	0.14	0.16	0.11	0.14
31	1388	1428	Isómero de β -Elemeno	0.08	0.08	0.08	0.08
32	1394	1428/1496	β -Bourboneno + β -Elemeno	2.81	2.86	2.64	2.78
33	1428	1483	β -Ilangeno	0.36	0.44	0.34	0.35
34	1432	1506	<i>trans</i> - β -Cariofileno	0.20	0.20	0.22	0.26

Continuación, **Tabla 13**

35	1441	1447	β -Gurjuneno	0.34	0.38	0.32	0.34
36	1453	1570	<i>trans</i> - β -Farneseno	0.83	0.58	0.26	0.48
37	1461	1557	<i>allo</i> -Aromadendreno		0.32	0.36	0.28
38	1471	1741	α -Guaieno	0.46	0.46	0.39	0.43
39	1481	1692	γ -Muuroleno	0.10	0.10	0.09	0.10
40	1483	1552	Germacreno D	0.08	0.12	0.08	0.09
41	1493	1624	Biciclosesquifelandreno	10.38	9.90	9.36	9.86
42	1506	1608	Biciclogermacreno	0.70	0.72	0.63	0.69
43	1512	1671	γ -Cadineno	0.10	0.19	0.09	0.16
44	1525	1855	Cubebol	-	-	-	-
45	1544	1680	<i>trans</i> - γ -Bisaboleno	-	-	-	-
46	1589	1967	Germacren-D-4-ol	0.27	0.28	0.30	0.29

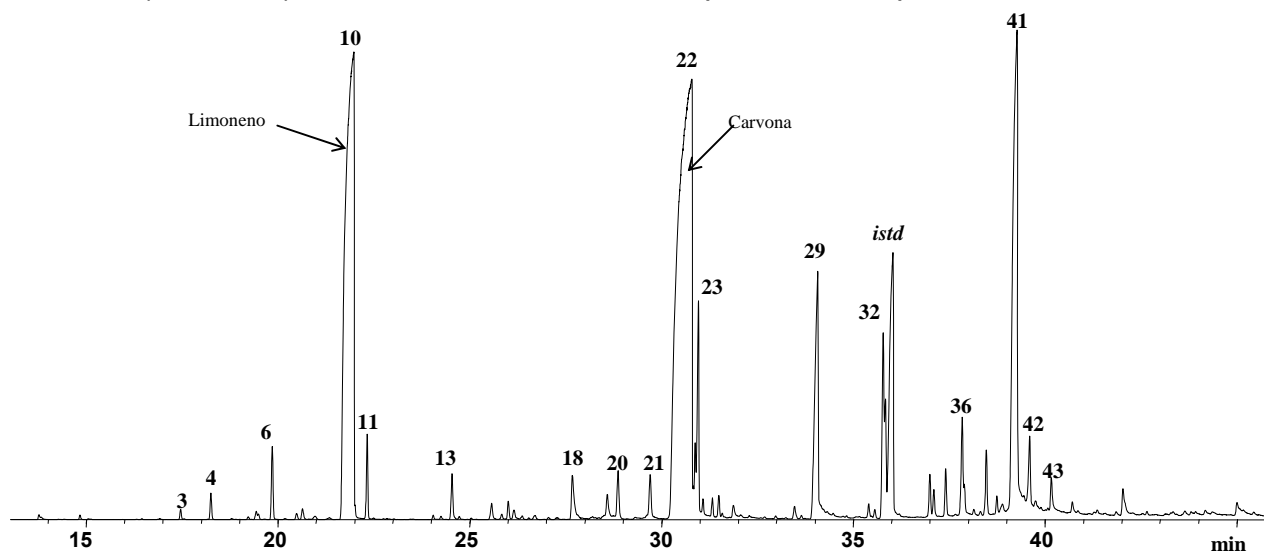
¹Número de pico en la **Figura 38**

²Índices de Kováts determinados experimentalmente

³Promedio de tres extracciones independientes, n=3

46 compuestos fueron identificados positivamente (>0.1%), que constituyen ca. el 96% de las muestras, bajo los parámetros de integración aplicados (umbral de integración, *Thshd* = 17 y área de rechazo del pico en la base = 0.1).

Figura 38. Perfil cromatográfico típico de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Carvona”, obtenidos por MWHD. Columna DB-5MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los compuestos se reporta en la **Tabla 13**.



En general, la composición química de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Carvona”, extraídos por MWHD, no presentó variaciones cualitativas, sólo cuantitativas. La carvona fue el compuesto mayoritario (34-39%), seguido del limoneno (22-31%), el biciclosesquifelandreno (5-13%), la piperitenona (5-6%), la piperitona (2-4%), y sesquiterpenos, β -bourboneno y β -elemeno (2-3%).

Los experimentos fueron realizados desde noviembre del 2006 a febrero de 2007, e incluyeron dos periodos de corte de las plantas. El primero realizado en el mes de julio-agosto de 2006, y el segundo en noviembre-diciembre de 2006. Sin embargo, a diferencia del quimiotipo “Citral”, no se observó ninguna tendencia marcada en la disminución de algún metabolito, como ocurrió con el nerol. Tres metabolitos secundarios cuya contenido no supera el 2%, a saber: las *cis*- y *trans*-dihidrocarvonas y el borneol, no fueron detectados en los AEs obtenidos de plantas que fueron secadas. No obstante, es de notar, que la variación cuantitativa de la composición química de *Lippia alba* quimiotipo “Carvona” está influenciada no sólo por el proceso de secado, sino también por las variables del suelo, lluvias, temperatura y otros cambios medioambientales que no fueron controlados en este trabajo.

En la **Figura 39**, se presentan los compuestos mayoritarios, mencionados anteriormente, de aquellos AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Carvona”, que presentaron el máximo rendimiento (**Tabla 12**), graficados según la relación “Área del compuesto” – “Área del estándar interno”. Los corredores de error calculados, muestran, que existe similitud en la composición química de estos AEs.

Si bien, no se observa una diferencia significativa entre los AEs del quimiotipo “Carvona”, obtenidos de plantas frescas usando diferentes tiempos de extracción, ocurre la disminución de carvona y limoneno, y el aumento de biciclosesquifelandreno a medida que aumenta el tiempo de extracción. Piperitona y piperitenona no se ven afectadas (**Figura 40**).

Figura 39. Relación “Área del compuesto”-“Área del estándar interno”, de los compuestos mayoritarios de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Carvona”, con los mayores rendimientos reportados en la **Tabla 12**.

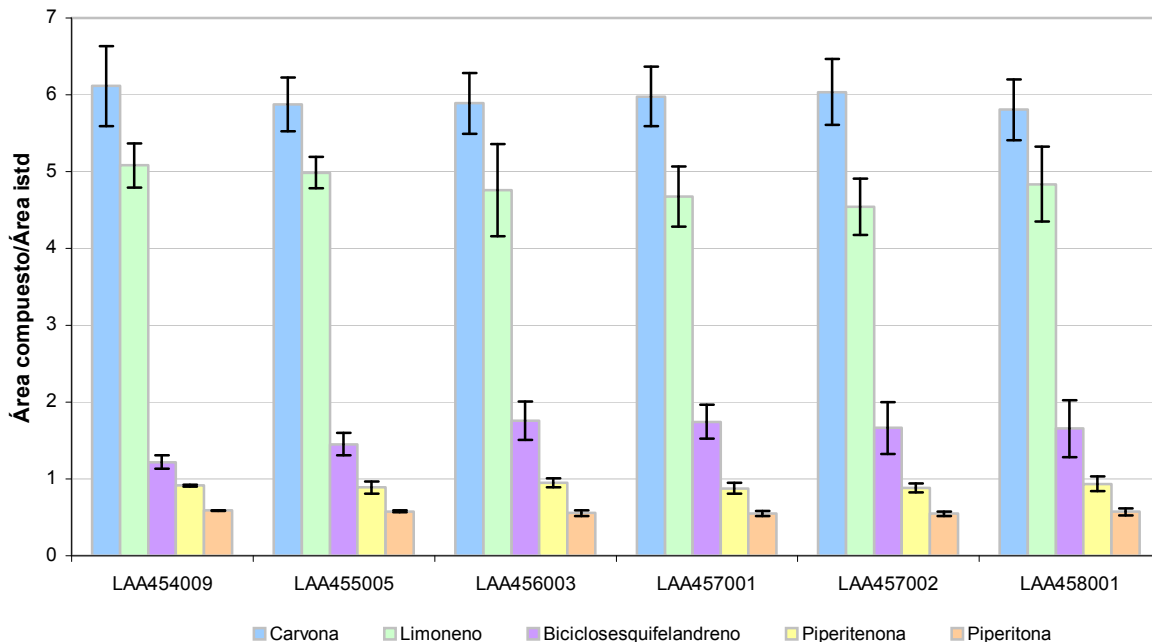


Figura 40. Relación “Área del compuesto”-“Área del estándar interno”, de los compuestos mayoritarios de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Carvona”, obtenidos de plantas frescas con diferentes tiempos de extracción.

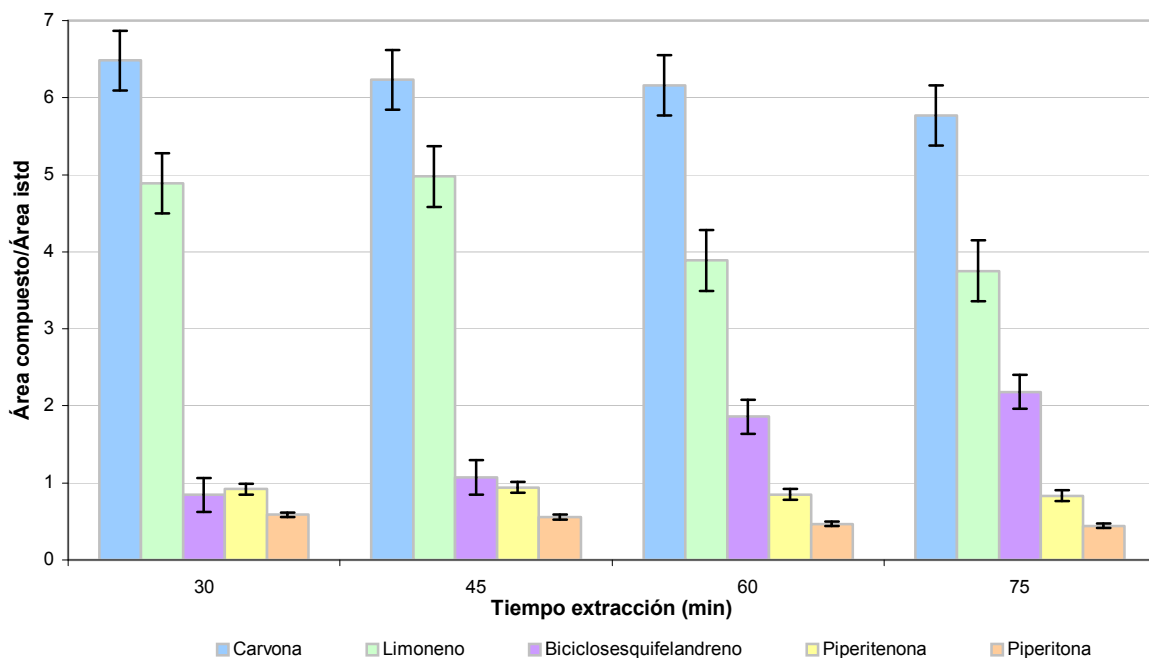
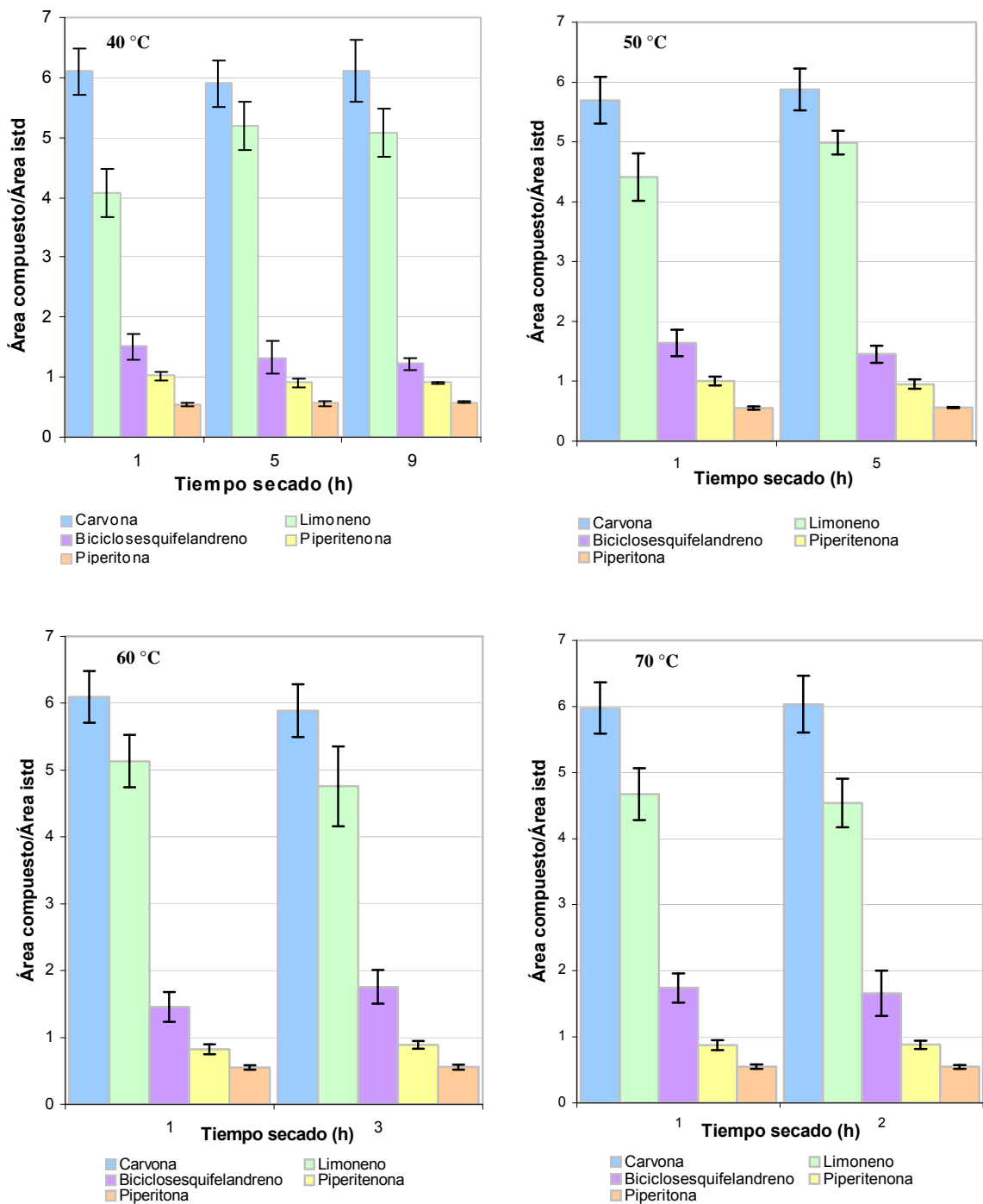
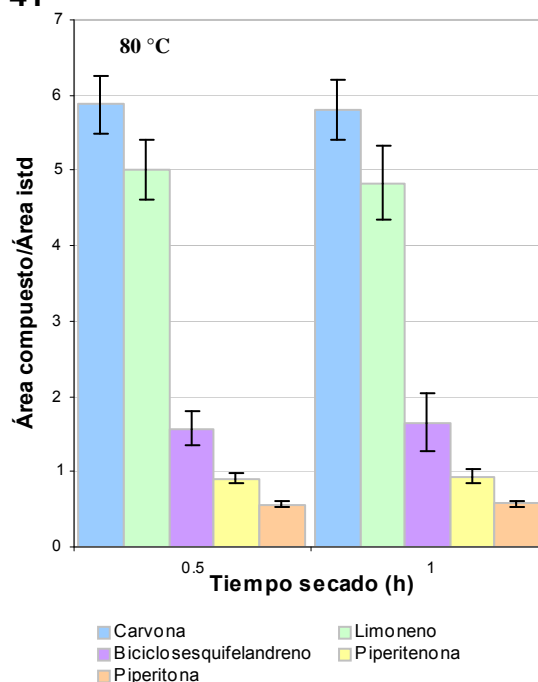


Figura 41. Relación “Área del compuesto”-“Área del estándar interno”, de los compuestos mayoritarios de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Carvona”, obtenidos bajo diferentes tiempos de secado en el rango de temperaturas de 40 a 80°C.



Continuación, **Figura 41**



Para la temperatura de secado de 40°C, se observó el aumento en la cantidad de limoneno, y la disminución de bicyclosesquifelandreno, a medida que aumentaba la duración del secado. Sin embargo, el contenido de las cetonas monoterpénicas, a saber: carvona, piperitenona y piperitona, permaneció constante (**Figura 41**). Un efecto similar se observó para los AEs de plantas de *Lippia alba*, quimiotipo “Carvona” secadas a 50°C.

Por otra parte, los AEs obtenidos de plantas secadas en el intervalo de temperatura de 60 a 80°C, presentaron una leve disminución en el contenido de limoneno y carvona, y un pequeño aumento en el contenido de bicyclosesquifelandreno.

A diferencia del quimiotipo “Citral”, no se observa un efecto significativo de la temperatura y la duración del secado sobre la composición química de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Carvona”. Luego, el tiempo y la temperatura de secados óptimos son determinados según la necesidad del comprador y el potencial de inversión.

3.3 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE LOS AEs DE *Lippia alba*, OBTENIDOS EN FUNCIÓN DEL TIEMPO Y LA TEMPERATURA DE SECADO DE LA PLANTA, Y LA DURACIÓN DE MWHD

Con el objetivo de presentar en una forma más clara la influencia tanto del tiempo y temperatura de secado, como del tiempo de extracción por MWHD, sobre la composición química de los AEs de dos quimiotipos de *Lippia alba*, se realizó el análisis estadístico de componentes principales (PCA, STATISTICA Versión 6.0, StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA).

El resultado de aplicar PCA a los resultados de la composición química de los aceites esenciales de dos quimiotipos de *Lippia alba*, mostró que aproximadamente el 100% de la información de las **Tablas 9 y 12**, puede ser representada por un subespacio de dos coordenadas (componentes principales), construido con base en las combinaciones lineales de las relaciones de las áreas de los compuestos del AE con el área del estándar interno. El *Factor 1* involucra el 99% de la información, y está representado por los metabolitos secundarios, a saber: carvona (31%), geranial (27%), limoneno (19%) y neral (16%). Mientras que el *Factor 2* constituye el 1% de la información y está representado por geraniol (55%), geranial (21%), nerol (8%), limoneno (6%) y neral (6%).

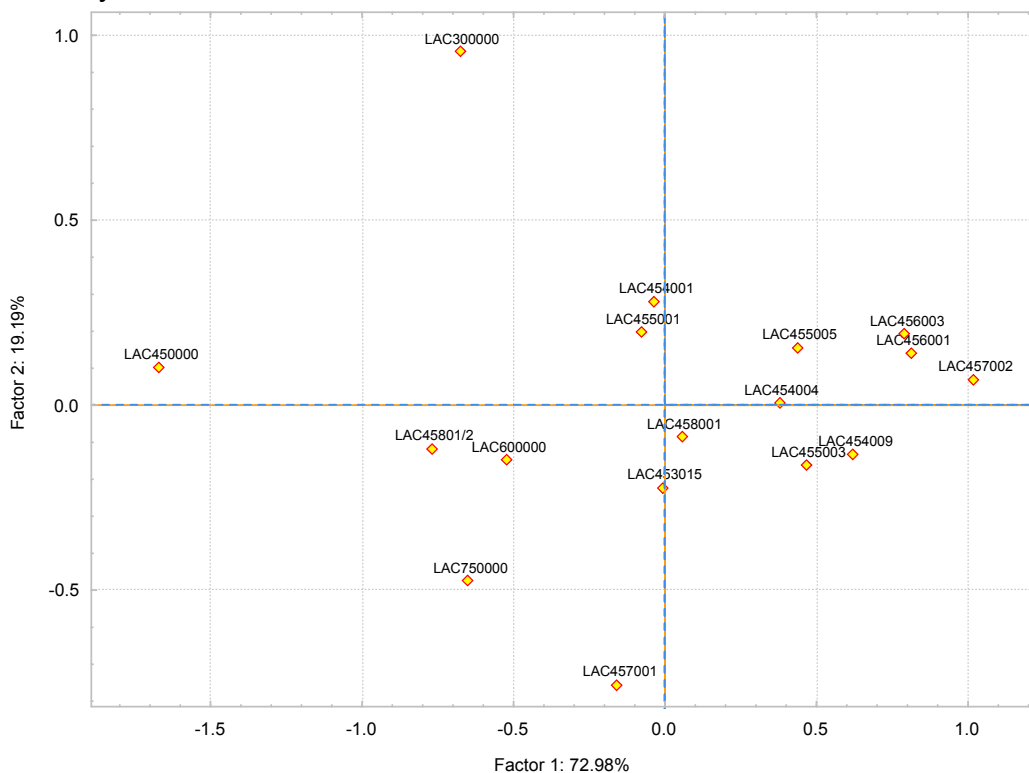
De acuerdo con la **Figura 42**, se observa la existencia de dos grupos bien definidos, correspondientes a los quimiotipos “Citral” (izquierda) y “Carvona” (derecha). El desplazamiento hacia la derecha corresponde a aquellos AEs que tienen una relación de “Área del compuesto”-“Área del estándar interno” de limoneno y carvona mayor. Mientras que altas concentraciones de neral y geranial, generan un desplazamiento a la izquierda en el gráfico. Además, debido a que el *Factor 2* es representado principalmente por compuestos mayoritarios del quimiotipo “Citral”, era de esperar que el grupo de la parte derecha del gráfico (quimiotipo “Carvona”) presentase un leve desplazamiento en el eje de las

El resultado de aplicar PCA a resultados de la composición química de los aceites esenciales de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”, indicó que aproximadamente un 92% de la información de la **Tabla 9**, puede ser representada por un subespacio de dos coordenadas (componentes principales), construido con base en las combinaciones lineales de las concentraciones relativas de los componentes presentes en éstos AEs (Véase **Figura 43**). El *Factor 1* involucra el 73% de la información, y está representado por los monoterpenos oxigenados, en orden de peso en las coordenadas, a saber: geraniol (40%), geranial (39%), neral (14%) y nerol (7%). Asimismo, el *Factor 2* constituye el 19% de la información y está representado por los metabolitos secundarios, geraniol (35%), geranial (30%), neral (13%), nerol (12%) y *trans*- β -cariofileno (11%).

En la **Figura 43**, los desplazamientos hacia la derecha, en el eje de las abscisas, se deben a un mayor contenido de neral y geranial. Mientras que los desplazamientos hacia la izquierda, se deben a un mayor contenido de sus alcoholes análogos, a saber: nerol y geraniol. Además, los desplazamientos hacia la parte superior, en el eje de las ordenadas, ocurre porque estos aceites tienen un mayor contenido de neral, nerol, geranial y geraniol. Mientras que los desplazamientos hacia abajo ocurren por una mayor relación del “Área del compuesto”-“Área del estándar interno” de *trans*- β -cariofileno.

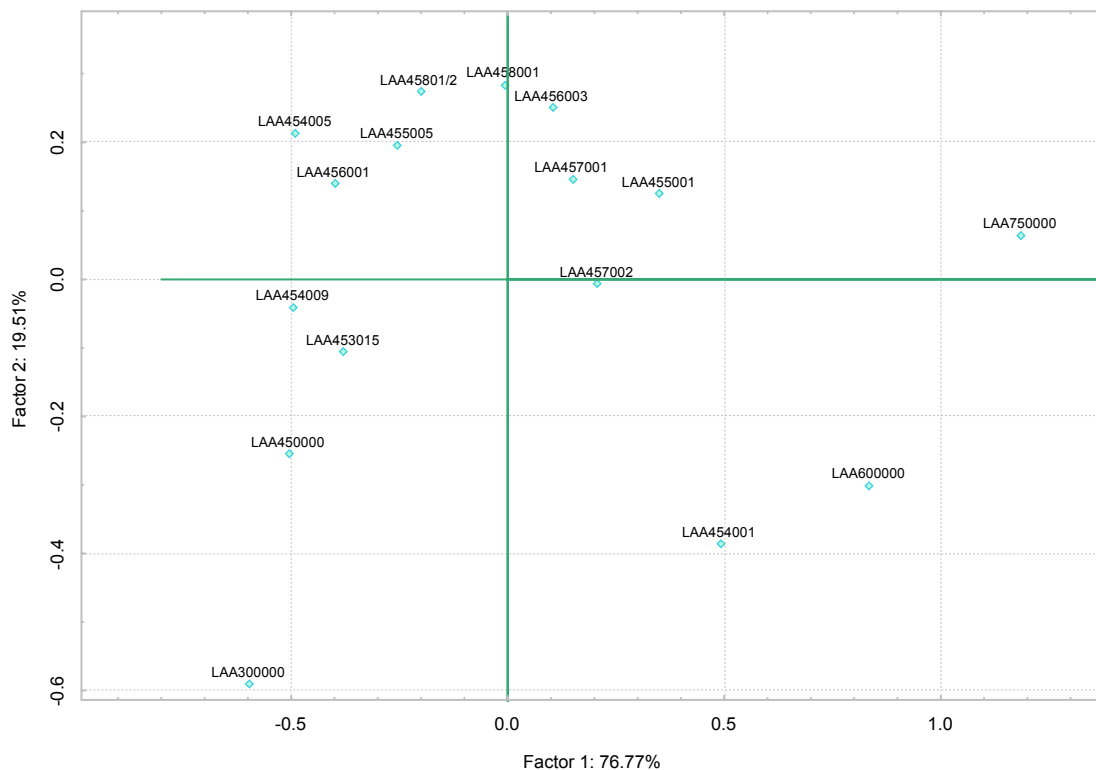
Por otra parte, el análisis comparativo de los aceites esenciales de *Lippia alba*, quimiotipo “Carvona”, indicó que aproximadamente un 97% de la información de la **Tabla 13** puede ser representada por un subespacio de dos coordenadas, construido con base en las combinaciones lineales de las concentraciones relativas de los componentes presentes en los diferentes AEs, como se aprecia en la **Figura 44**. El *Factor 1* involucra el 77% de la información y está representado, básicamente, por limoneno (67%), biciclosesquifelandreno (30%) y carvona (2%). El *Factor 2*, que constituye el 20% de la información, está caracterizado por la carvona (40%), el biciclosesquifelandreno (34%) y el limoneno (25%).

Figura 43. Análisis de componentes principales (PCA) según su relación “Área de compuesto”-“Área del estándar interno” de los compuestos presentes en los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Cital”, aislados por MWHD, variando las condiciones de secado y extracción.



Como se ha indicado anteriormente, la posición de cada experimento en el subespacio está determinada por su composición. Así, que a medida que aumenta la concentración de limoneno y disminuye la de biciclosesquifelandreno, se observa un desplazamiento de derecha a izquierda en el gráfico (*Factor 1*). Pero si el desplazamiento ocurre de arriba hacia abajo, éste se debe a un aumento en la concentración relativa de la carvona. De estas aseveraciones se puede deducir, por ejemplo, que el AE de LAA300000 presenta la máxima cantidad de carvona entre los experimentos aquí evaluados, que en efecto así lo es, y que contiene una cantidad de limoneno comparable con la de los AEs ubicados en la parte superior de la **Figura 44**.

Figura 44. Análisis de componentes principales (PCA) según su relación “Área de compuesto”-“Área del estándar interno” de los compuestos presentes en los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Carvona”, aislados por MWHD, variando las condiciones de secado y extracción.



En general, el análisis de componentes principales ha mostrado similitud en la composición química de los aceites esenciales seleccionados previamente en las **Tablas 8 y 12**, para cada uno de los quimiotipos, pero permitió vislumbrar mejor la correlación de diferentes variables y composiciones.

3.4 IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LOS AEs DE *Lippia alba*

Los metabolitos secundarios volátiles presentes en los AEs aislado de hojas, flores y tallos de los quimiotipos “Carvona” y “Citral” de *Lippia alba*, fueron identificados empleando los índices de retención de Kovàts, en columnas polar y apolar, para lo cual se utilizaron hidrocarburos lineales (C₁₀-C₂₅), y los espectros de masas (MS) obtenidos por impacto de electrones (70 eV), los cuales se compararon con los

reportados en la literatura [3], y se analizaron “manualmente” con base en su patrón de fragmentación.

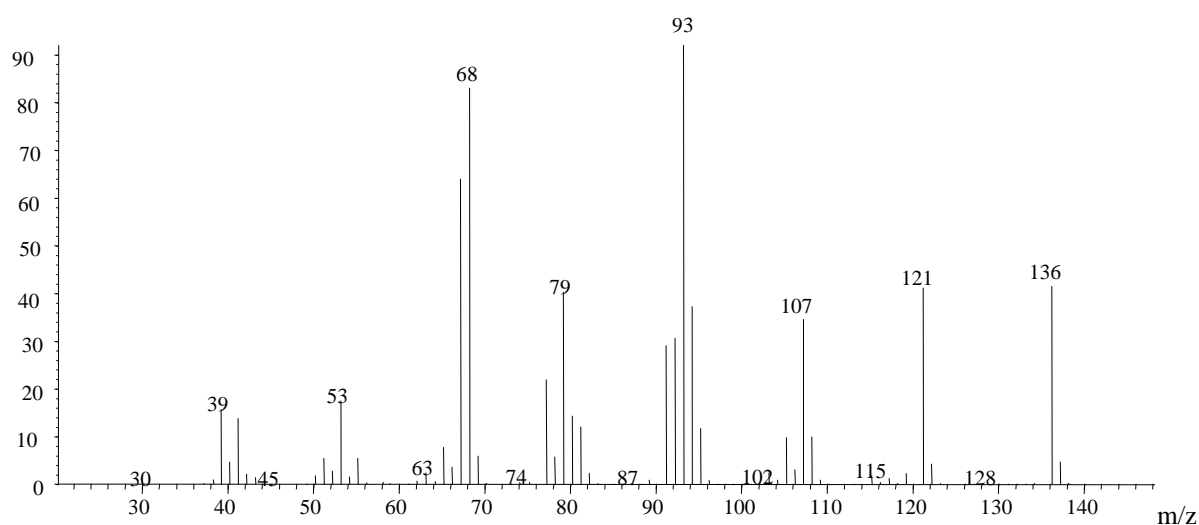
Los espectros de masas, obtenidos experimentalmente de los componentes presente en los AEs, fueron comparados con los de las bibliotecas, a saber: NBS 75K, WILEY 130K, NIST 2002, ADAMS. La homogeneidad de cada pico cromatográfico fue revisada, obteniendo fragmentogramas de masas de sus iones característicos para cada componente, e.g. para monoterpenos, señales en m/z 136 y 93; para sesquiterpenos, en m/z 204, 189 y 161, etc.

A continuación, se presentan los análisis de los espectros de masas de algunos compuestos mayoritarios presentes en los aceites esenciales de los dos quimiotipos de *Lippia alba*.

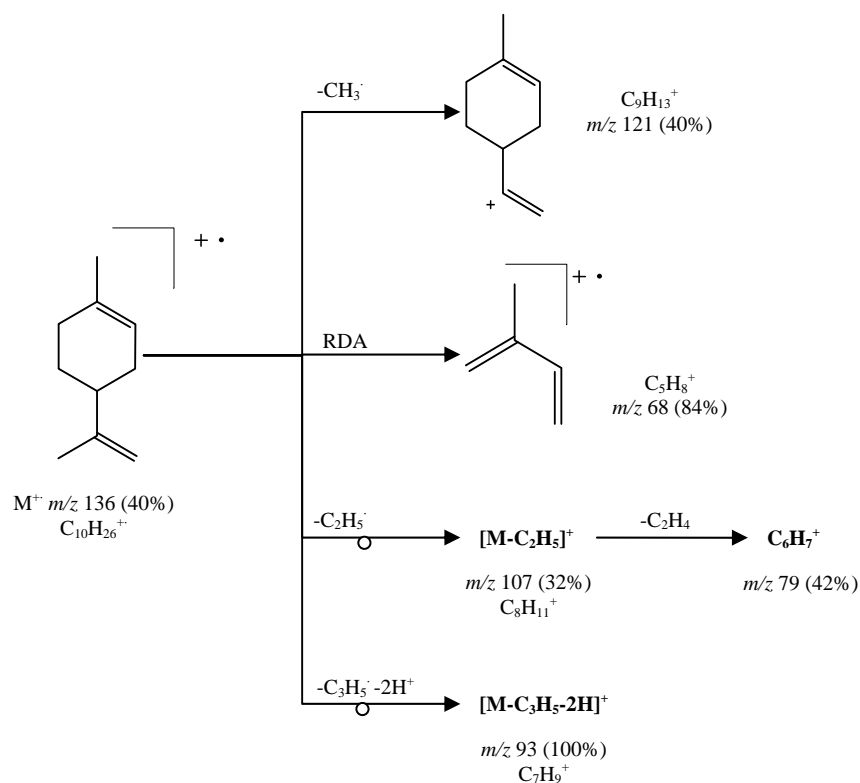
3.4.1 Limoneno

En la **Figura 34** se observa el espectro de masas del limoneno, un monoterpeno cíclico con dos dobles enlaces aislados, compuesto mayoritario en los AEs de cítricos [14]. La ionización disociativa del limoneno se presenta en el **Esquema 2**.

Figura 45. Espectro de masas del limoneno (EI, 70eV).



Esquema 2. Posibles rutas de fragmentación del limoneno.



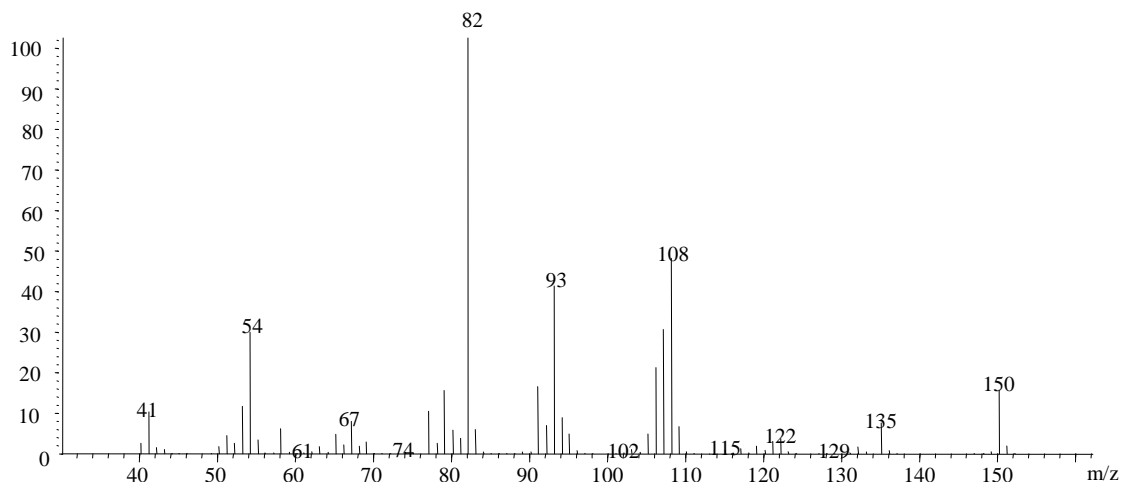
Se observa el ion molecular M^+ (m/z 136) con una intensidad media (40%). Su fragmentación se caracteriza por una ruptura tipo *retro-Diels-Alder* (RDA), acompañada de la formación de un fragmento en m/z 68. Los iones $(M-CH_3)^+$ y $(M-C_3H_5 - 2H^+)$ en m/z 121 (40%) y m/z 93 (100%), respectivamente, se producen a partir del ion M^+ , por pérdida del radical CH_3^\cdot y del grupo isopropenílico, seguido de la eliminación de dos átomos de hidrógeno. Los iones de intensidad media en m/z 107 y 79 provienen de la pérdida del radical $C_2H_5^\cdot$ y de una molécula de etileno, respectivamente, a partir del ion molecular.

3.4.2 Carvona

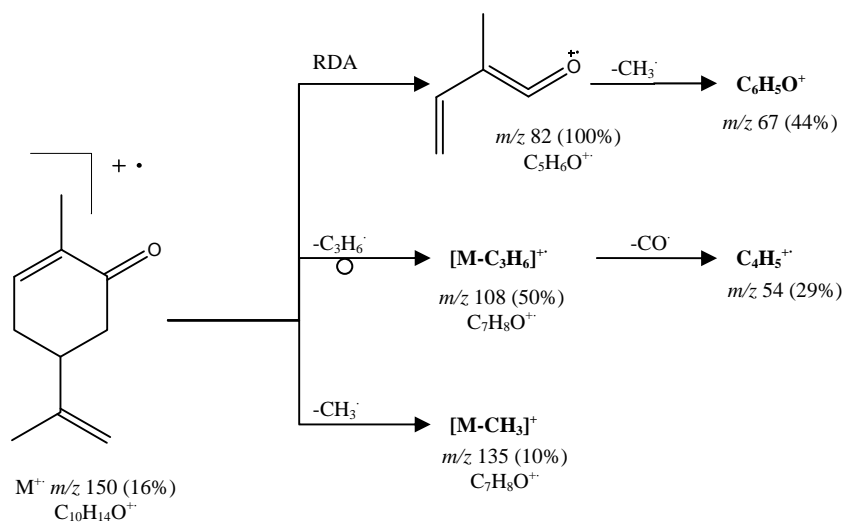
El espectro de masas de la carvona, componente mayoritario de los aceites esenciales de *Lippia alba*, quimiotipo "Carvona", extraídos de hojas, tallos e inflorescencias, se presenta en la **Figura 35**. La ionización disociativa de la carvona, por impacto de electrones (70 eV), se muestra en el **Esquema 3**.

El ion molécula $M^{+\cdot}$ en m/z 150, con una intensidad media (16%), también, como en el caso del limoneno, sufre una ruptura tipo *retro-Diels-Alder* (RDA), dando lugar a la formación del ion, pico de base, en m/z 82. Éste, a su vez, por pérdida de una molécula de CO, genera el catión-radical, $C_4H_6^{+\cdot}$, en m/z 54 (32%).

Figura 46. Espectro de masas de la carvona (EI, 70eV).



Esquema 3. Posibles rutas de fragmentación de la carvona.

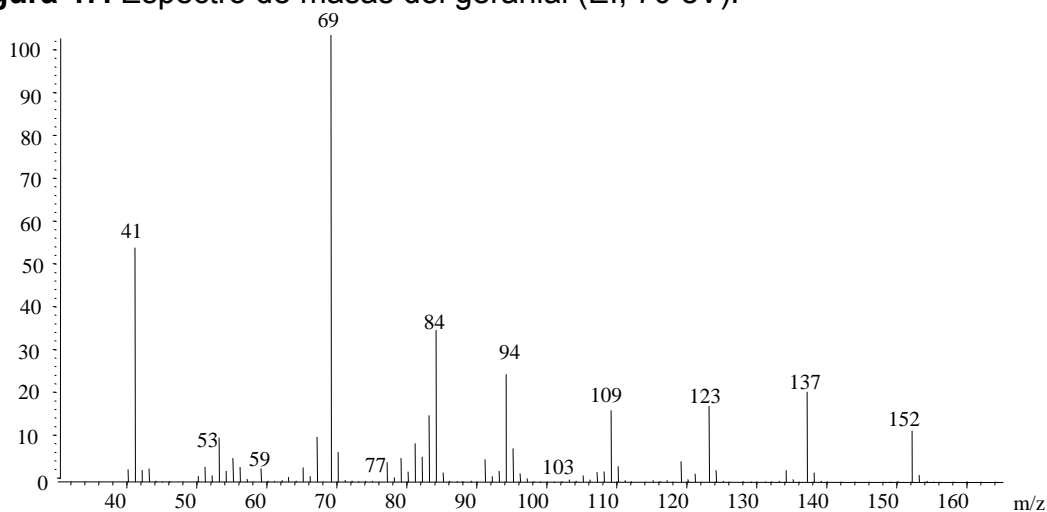


Otros fragmentos, que se producen a partir del ion molecular M^+ , son $(M-CH_3)^+$ en m/z 135 (8%) y $(M-C_3H_6)^+$ en m/z 108 (46%), los cuales se forman por pérdida del radical $CH_3\cdot$ y de una molécula de propeno, respectivamente. Luego de la eliminación de un radical $CH_3\cdot$ a partir del fragmento $(M-C_3H_6)^+$, se origina el fragmento $C_6H_5O^+$ en m/z 93 (42%).

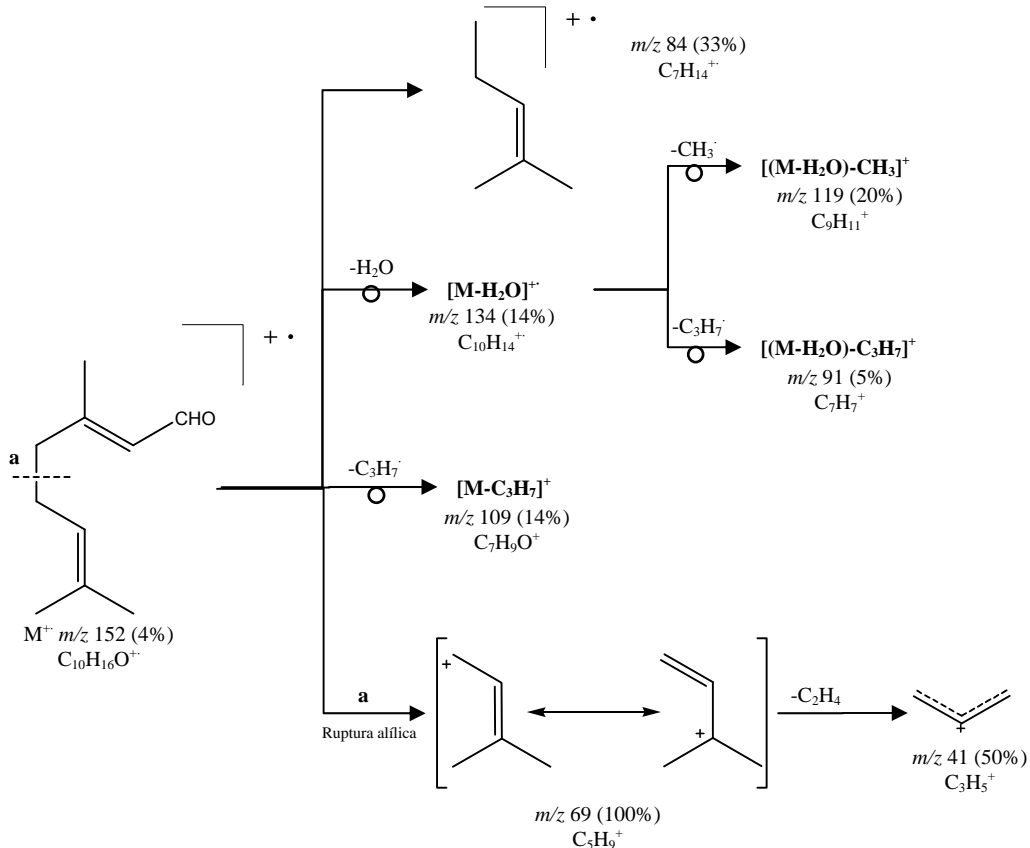
3.4.3 Geranial

El espectro de masas del geranial, un aldehído monoterpénico acíclico, se presenta en la **Figura 36**. Las rutas de su ionización disociativa, por impacto de electrones a 70 eV, se aprecian en el **Esquema 4**. El ion molecular M^+ en m/z 152, con una intensidad baja (3%), por pérdida de una molécula de agua, genera el fragmento en m/z 134 (10%), el cual, subsecuentemente, por eliminación de los radicales $CH_3\cdot$ y $C_3H_7\cdot$, genera los cationes $[(M-H_2O)-CH_3]^+$ y $[(M-H_2O)-C_3H_7]^+$ en m/z 119 y 91, respectivamente. El ion molecular del geranial sufre una ruptura alílica, originando un fragmento hidrocarbonato en m/z 69, el cual es el ion pico de base, que posteriormente, por eliminación de una molécula de etileno (C_2H_4) genera el fragmento alílico en m/z 41 con una intensidad de 54%. El ion de baja intensidad en m/z 109 (16%) se genera por pérdida del radical $C_3H_7\cdot$ a partir del ion molecular.

Figura 47. Espectro de masas del geranial (EI, 70 eV).



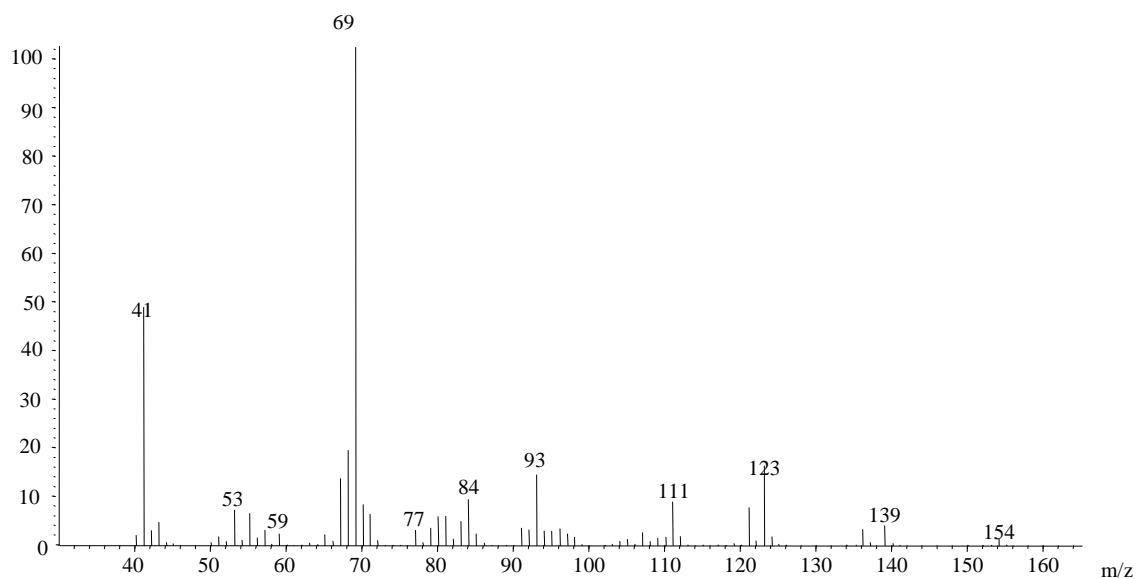
Esquema 4. Posibles rutas de fragmentación del geranial.



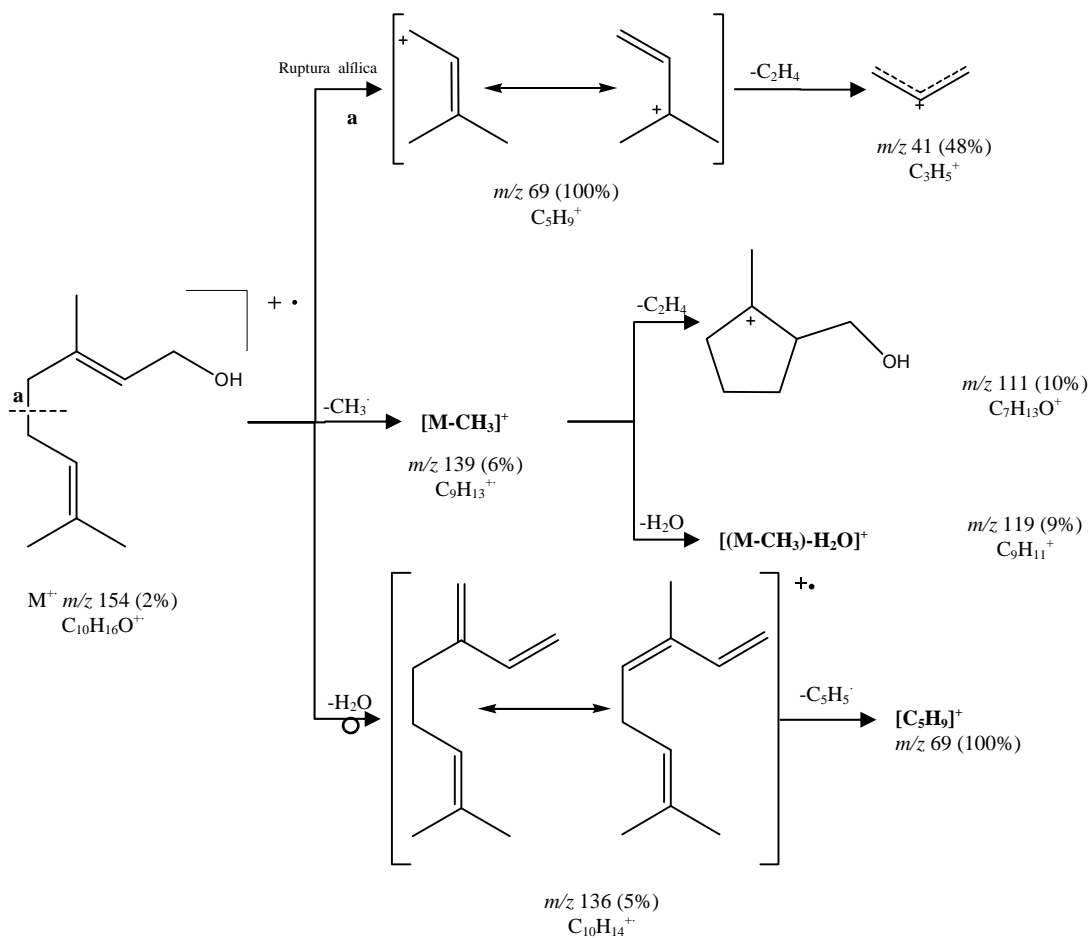
3.4.4 Geraniol

El espectro de masas del geraniol se presenta en la **Figura 37**. Las rutas de ionización disociativa de este alcohol, isómero de nerol, y precursor de geranial, se presentan en el **Esquema 5**. Los espectros de masas de nerol y geraniol, muestran picos de iones moleculares con intensidades bajas (2%) debido a su poca estabilidad y rápidas rupturas, entre ellas, alílica. El fragmento formado por esta escisión en m/z 69 (100%), tras la pérdida de una molécula de eteno, se forma el catión alilo en m/z 41 (44%). Además, para los dos isómeros, el patrón de fragmentación es similar: la pérdida de radical metilo con formación de un ion $(\text{M}-\text{CH}_3)^+$ en m/z 139 (6%), y la subsiguiente eliminación de eteno, que conduce a la formación del ion $(\text{M}-\text{CH}_3-\text{C}_2\text{H}_4)^+$ en m/z 111 (nerol, 8% y geraniol, 10%). Ambos isómeros presentan fragmentos correspondientes a la pérdida de H_2O , en m/z 136, a partir del ion molecular, lo que confirma la presencia de grupo OH en sus estructuras.

Figura 48. Espectro de masas del geraniol (EI, 70eV).



Esquema 5. Posibles rutas de fragmentación del geraniol.

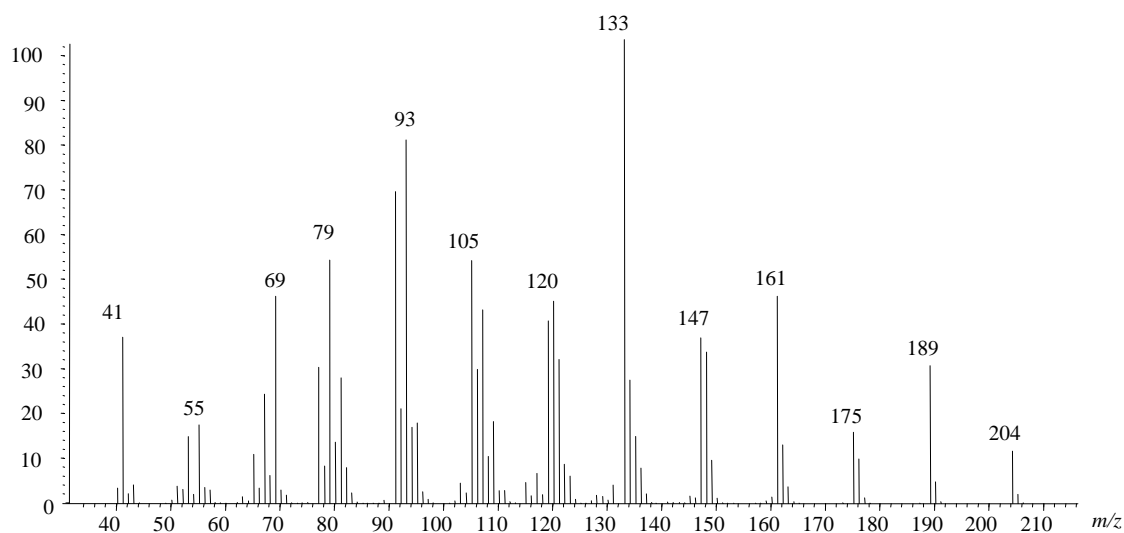


3.4.5 *trans*- β -Cariofileno

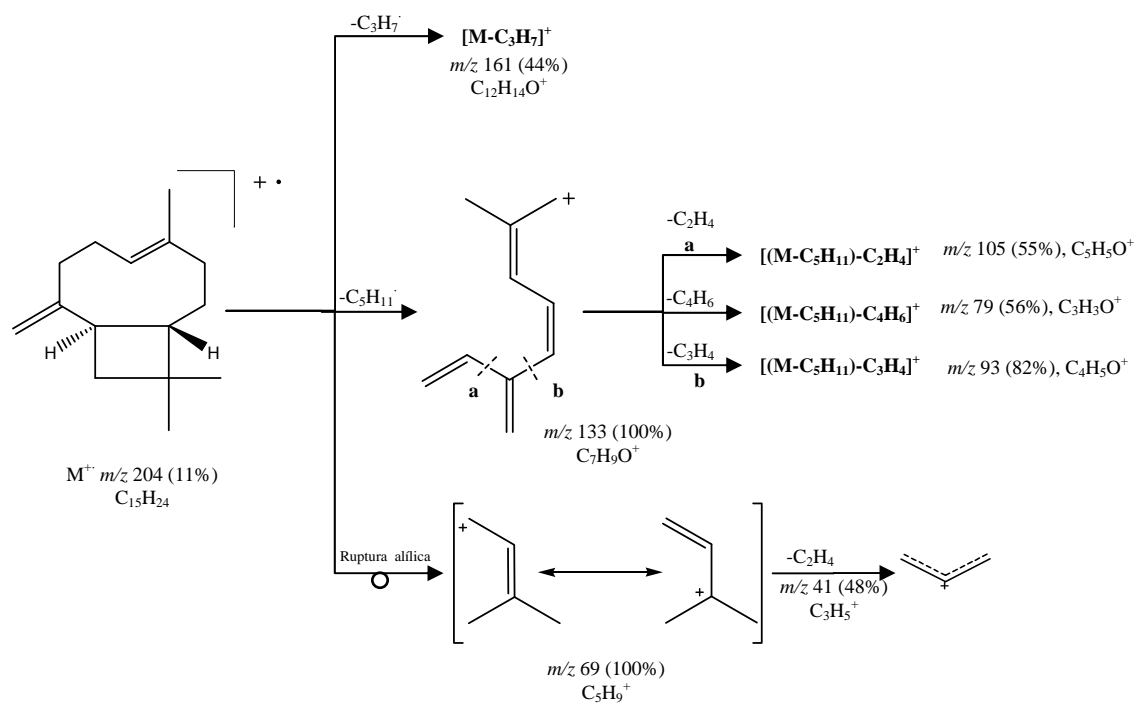
Este sesquiterpeno es uno de los compuestos mayoritarios del aceite esencial de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”, después de neral, geranial y nerol. Presenta un olor a madera y su fórmula condensada es $C_{15}H_{24}$. El espectro de masas de este compuesto aparece en la **Figura 38**. Las rutas de ionización disociativa se presentan en el **Esquema 6**.

El ion molecular del *trans*- β -cariofileno en m/z 204 presenta una intensidad media (11%), y se caracteriza por una fragmentación abundante. De allí, el ion M^{+} sufre reordenamientos del esqueleto y de hidrógeno, que conducen a la formación del ion pico de base en m/z 133 (100%). La sucesiva eliminación de moléculas neutras a partir de este fragmento, producen los iones en m/z 79(56%), 93 (82%) y 105 (55%), como se aprecia en el **Esquema 6**. La ruptura alílica del ion molecular produce iones en m/z 69 (46%) y $C_3H_5^+$ en m/z 41 (38%).

Figura 49. Espectro de masas del *trans*- β -cariofileno (EI, 70eV).



Esquema 6. Posibles rutas de fragmentación del *trans*- β -cariofileno.



3.5 EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Lippia alba*

3.5.1 Actividad anti-*Candida* y anti-*Aspergillus*

Las enfermedades infecciosas han sido un problema crítico de salud pública, y una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. Además, aunque las infecciones ocasionadas por hongos han incrementado notablemente con el aumento de personas inmunocomprometidas, el manejo de éstas se ha complicado por la resistencia de algunos hongos a los pocos antimicóticos disponibles. Por ello, los ensayos realizados por el grupo de Infección y Cáncer de la Universidad de Antioquia, en cepas de *Candida* spp. y *Aspergillus* spp. están dirigidos a la búsqueda de nuevos antimicóticos con amplio espectro de acción, mayor potencia y con diferentes mecanismos de acción. A continuación, en la **Tabla 14** se registran los resultados de concentración mínima inhibitoria anti-*Candida* y anti-*Aspergillus* de los AEs de dos quimiotipos de *Lippia alba*, extraídos variando las condiciones de extracción y secado.

Como se puede observar en la **Tabla 14**, ninguno de los AEs mostró actividad antimicótico apreciable a las concentraciones evaluadas, y la efectividad de los aceites es más baja que la de la sustancia de referencia (Itraconazol). Sin embargo, es de anotar, que los resultados aquí reportados no concuerdan con los presentados por Oliveira y colaboradores [84], en los cuales el AE de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”, sí era efectivo contra *Candida parapsilosis*.

3.5.2 Ensayo de toxicidad frente *Artemia franciscana*

La *Artemia franciscana* (*Brine shrimp*), al igual que otras especies de este mismo género, son crustáceos ampliamente utilizados en ecotoxicología gracias a la reproducibilidad, confiabilidad y viabilidad de los ensayos en los estudios de investigación.

Tabla 14. Concentración mínima inhibitoria de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipos “Citral” y “Carvona”, de los hongos *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus fumigatus*.

	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C krusei</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. fumigatus</i>
LAC750000	>500	>500	>500	>500
LAC600000	>500	>500	>500	>500
LAC455005	>500	>500	>500	>500
LAC455003	>500	>500	>500	>500
LAC454009	>500	>500	>500	>500
LAC454004	>500	>500	>500	>500
LAC453015	>500	>500	>500	>500
LAA750000	>500	>500	>500	>500
LAA600000	>500	>500	>500	>500
LAA454009	>500	>500	>500	>500
LAA454005	>500	>500	>500	>500
LAA455005	>500	>500	>500	>500
Itraconazol*	0.11±0.07	0.17±0.06	0.25	0.14±0.08

*Sustancia de referencia

En la **Tabla 15**, se reportan los resultados de citotoxicidad contra *Artemia franciscana* de los aceites esenciales de dos quimiotipos de *Lippia alba*, de plantas secadas en el rango de temperaturas de 30 a 50°C.

Los aceites esenciales de los dos quimiotipos de *Lippia alba*, presentaron valores de CL₅₀ después de 24 horas de exposición menores de 20 µg/mL, por lo que fueron considerados moderadamente tóxicos para los nauplios de *Artemia franciscana*. Además, no se observa una significativa diferencia en la toxicidad de los AEs del mismo quimiotipo, al parecer, por la similitud en su composición química.

3.5.3 Ensayos de actividad antibacterial

Debido al uso indiscriminado en las últimas décadas de los antibióticos contra las infecciones bacterianas, muchos microorganismos han desarrollado mecanismos

de resistencia, lo cual hace que las drogas pierdan su eficiencia contra algunas enfermedades. Luego existe la necesidad de investigar nuevas drogas, que puedan tener funciones y actividades útiles contra diferentes enfermedades. Por tanto, el grupo de Polifenoles, de la Universidad Tecnológica de Pereira, ha desarrollado los ensayos de actividad antibacterial frente a *Salmonella gallinarium*, *Salmonella tiphymurium*, *Escherichia coli* No1, *Escherichia coli* No 2, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Pseudomonas aeruginosa*, usando los aceites esenciales de dos quimiotipos de *Lippia alba*, obtenidos en la UIS, variando las condiciones de extracción y secado, y cuya composición fue descrita en los capítulos anteriores.

Tabla 15. Toxicidad aguda (CL₅₀) en pruebas con *Artemia franciscana* de los AEs, de dos quimiotipos de *Lippia alba*, obtenidos variando las condiciones de extracción y secado.

Experimento	Tiempo de exposición (h)	CL ₅₀ (µg/mL)	I.C. (95%)	CL ₅₀ (24h)/ CL ₅₀ (48h)
LAA455005	24	10.29	(9.38-11.29)	1.67
	48	6.17	(5.24-7.26)	
LAA454009	24	12.09	(11.13-13.13)	1.57
	48	7.69	(6.81-8.69)	
LAC453015	24	16.49	(15.49-17.56)	1.35
	48	12.21	(10.81-13.78)	
LAC454009	24	13.41	(12.69-14.16)	2.44
	48	5.48	(4.70-6.40)	
LAC455005	24	16.90	(15.65-18.26)	1.37
	48	12.30	(11.24-13.46)	

3.5.3.1 *Bacillus cereus*

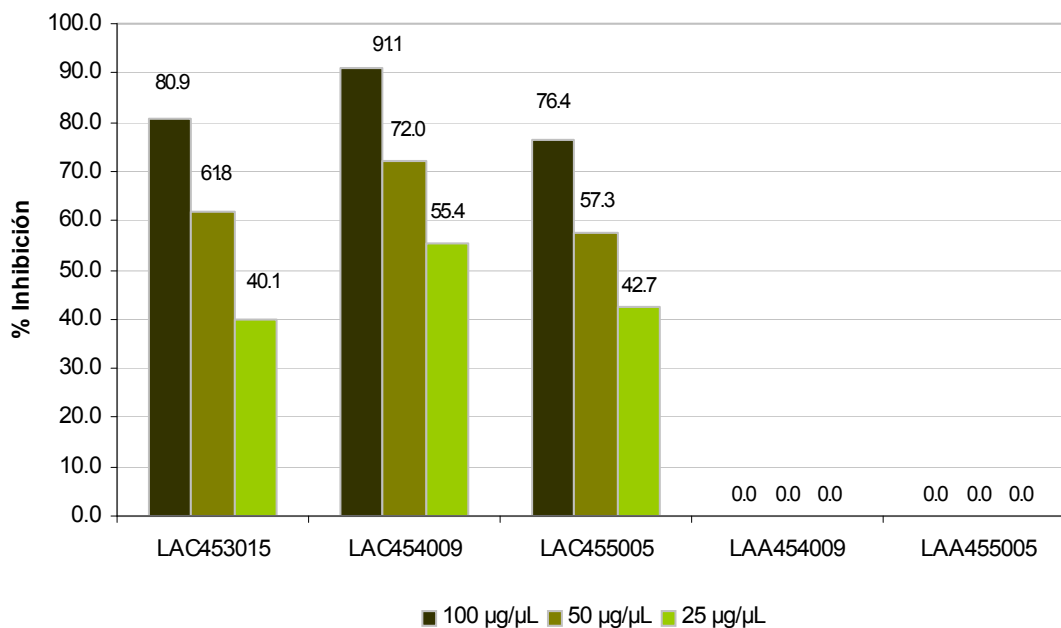
En la **Tabla 16** y en la **Figura 50** se registran los datos y porcentajes de inhibición de los aceites esenciales contra *Bacillus cereus*. Los datos de la siguiente tabla corresponden a los halos de inhibición medidos en mm.

Tabla 16. Datos de inhibición de los AEs contra *Bacillus cereus*.

Experimento	100 µg/µL	50 µg/µL	25 µg/µL
LAA454009	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00
LAA455005	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00
LAC453015	12.7 ± 0.58	9.7 ± 0.58	6.3 ± 0.58
LAC454009	14.3 ± 0.58	11.3 ± 0.58	8.7 ± 0.58
LAC455005	12.0 ± 0.00	9.0 ± 0.00	6.7 ± 0.58
Amoxicilina (5 µg/µL)*		15.7 ± 0.58	

*Sustancia de referencia

Figura 50. Porcentajes de inhibición de los AEs contra *Bacillus cereus*.



3.5.3.2 *Staphylococcus aureus*

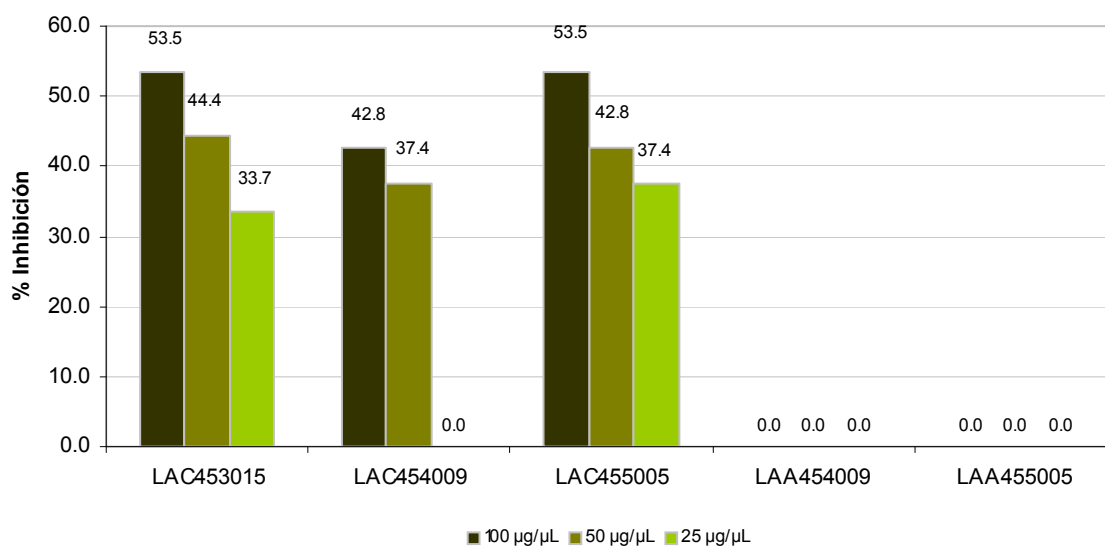
En la **Tabla 17** y la **Figura 51** se registran los datos y porcentajes de inhibición de los aceites esenciales contra *Staphylococcus aureus*. Los datos de la siguiente tabla corresponden a los halos de inhibición medidos en mm.

Tabla 17. Datos de inhibición de los AEs contra *Staphylococcus aureus*.

Experimento	100 µg/µL	50 µg/µL	25 µg/µL
LAA454009	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00
LAA455005	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00
LAC453015	10.0 ± 0.00	8.3 ± 0.58	6.3 ± 0.58
LAC454009	8.0 ± 0.00	7.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00
LAC455005	10.0 ± 0.00	8.0 ± 0.00	7.0 ± 0.00
Amoxicilina (5 µg/µL)*		18.7 ± 0.58	

*Sustancia de referencia

Figura 51. Porcentajes de inhibición de los AEs contra *Staphylococcus aureus*.



3.5.3.3 *Salmonella tiphymurium*

En la **Tabla 18** y la **Figura 52**, están registrados los datos y porcentajes de inhibición del AE LAC454009 frente a *Salmonella tiphymurium*. Los datos de la siguiente tabla corresponden a los halos de inhibición medidos en mm.

Tabla 18. Datos de inhibición del AE LAC454009 contra *Salmonella tiphymurium*.

Experimento	100 µg/µL	50 µg/µL	25 µg/µL
LAC454009	6.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00
Amoxicilina (5 µg/µL)*		24.7 ± 0.58	

*Sustancia de referencia

3.5.3.4 *Salmonella gallinarium*.

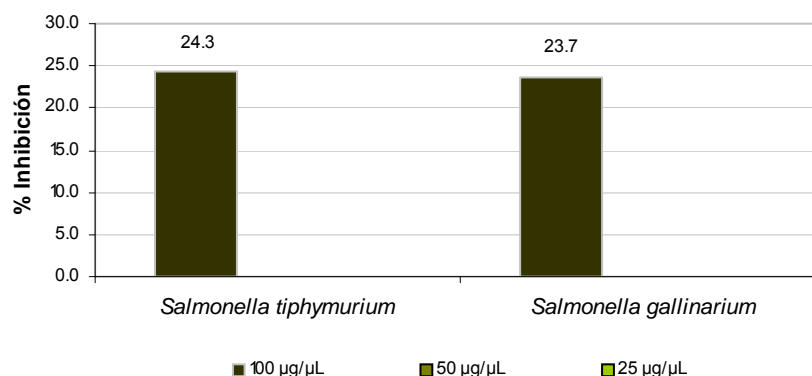
En la **Tabla 19** y **Figura 52**, se reportan los datos y porcentajes de inhibición del AE LAC454009 frente a *Salmonella gallinarium*. Los datos de la siguiente tabla corresponden a los halos de inhibición medidos en mm.

Tabla 19. Datos de inhibición del AE LAC454009 contra *Salmonella gallinarium*.

Experimento	100 µg/µL	50 µg/µL	25 µg/µL
LAC454009	6.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00
Amoxicilina (5 µg/µL)*		25.3 ± 0.58	

*Sustancia de referencia

Figura 52. Porcentajes de inhibición del AE LAC454009 contra *Salmonella tiphymerium* y *Salmonella gallinarium*.



Los resultados de actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* No 1, *Escherichia coli* No 2, *Salmonella tiphymerium*, *Salmonella gallinarium* y *Pseudomonas aeruginosa*, de los AEs LAC453015, LAC455005, LAA454009 y LAA455005, no se reportan, puesto que éstos no presentaron ninguna actividad. Asimismo, aunque el AE LAC454009 presentó un halo de inhibición de 6 mm a la concentración de 100 µg/µL de *Salmonella tiphymerium* y *Salmonella gallinarium*, el porcentaje de inhibición no superó el 30% (ver **Figura 41**). Por tanto, éste no es considerado un aceite promisorio contra estas bacterias *Gram* negativas.

Por otra parte, todos los AEs del quimiotipo “Citral” obtenidos variando las condiciones de extracción y secado, presentaron actividad inhibitoria a concentraciones de 100, 50 y 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ contra las bacterias *Gram* positivas *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*, lo que no sucede con las bacterias *Gram* negativas, las cuales poseen una membrana bilipídica y, por tanto, su permeabilidad por las sustancias se hace más complicada.

Con base en los resultados anteriores, los aceites esenciales de la especie *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”, LAC453015, LAC455005 y LAC454009, fueron elegidos como promisorios, debido a que presentaron una actividad inhibitoria superior al 30%, inclusive, a una concentración de 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, tomando como referencia el 100% del control positivo utilizado en cada caso, frente a dos especies bacterianas evaluadas, a saber: *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*. Por lo tanto, el grupo de Polifenoles realizará, posteriormente, la determinación de la concentración inhibitoria mínima (MIC) de estos aceites frente a las bacterias estudiadas.

Los AEs obtenidos de plantas de *Lippia alba*, quimiotipo “Carvona”, no presentaron actividad antibacterial. Esto se debe, posiblemente, al menor contenido de compuestos oxigenados, en comparación con los AEs del quimiotipo “Citral”.

3.5.4 Ensayos de actividad anti-*Trypanosoma cruzi* y anti-*Leishmania chagasi* en su forma extracelular y citotoxicidad en células VERO

3.5.4.1 Citotoxicidad de células VERO

Las células VERO son células epiteliales del mono africano verde *Cercopithecus aethiops*, y son empleadas para diferentes propósitos, entre ellos: como célula huésped, para la evaluación del crecimiento y replicación de un virus en presencia y ausencia de fármacos, y para la incubación y desarrollo de parásitos eucariotas, como el *Trypanosoma cruzi*.

En la **Tabla 20**, se registran la concentración letal media, CL₅₀, expresada en µg/mL con sus respectivos límites de confianza, en células VERO, de los AEs de dos quimiotipos de *Lippia alba*, obtenidos bajo diferentes condiciones de extracción y secado. Estos ensayos fueron realizados por el Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, CINTROP, adscrito a CENIVAM.

Tabla 20. Citotoxicidad de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”, en células VERO.

Experimento	Ensayo 1 (µg/mL)		Ensayo 2 (µg/mL)	
	CL ₅₀	LC	CL ₅₀	LC
LAC750000	80,67	64,64-96,71	87,89	85,30-90,49
LAC600000	27,28	22,25-32,32	16,14	14,42-17,86
LAC455005	30,12	29,08-31,16	22,80	17,08-28,53
LAC455003	50,58	47,61-53,55	72,59	51,28-93,90
LAC454009	25,18	23,29-27,07	32,34	30,51-34,16
LAC454004	29,98	24,89-35,08	31,18	30,82-31,54
LAC453015	30,80	29,64-31,96	31,16	29,78-32,53
LAA600000	>100	ND	>100	ND
LAA454009	>100	ND	>100	ND
LAA455005	>100	ND	>100	ND
<i>Nifurtimox*</i>	40,53	36,60-44,45	33,43	32,37-34,50

*Sustancia de referencia

Los resultados indicaron que dos AEs del quimiotipo “Citral”, a saber: LAC750000 y LAC455003, presentan valores de CL₅₀ mayores que el Nifurtimox, medicamento comúnmente prescrito para el tratamiento de la enfermedad del Chagas, el cual a pesar de su efectividad, ha mostrado ser tóxico. Los demás AEs presentaron valores de CL₅₀, registrados en su mayoría, dentro de los límites de confianza del fármaco. Sin embargo, aunque no se encontró una diferencia cuantitativamente significativa en la composición química de los AEs, por ejemplo, entre plantas secadas a una misma temperatura (LAC455005 y LAC455003), si se observó una

diferencia en su toxicidad. Ninguno de los AEs del quimiotipo “Carvona” presentó actividad citotóxica en células VERO.

3.5.4.2 Actividad de los AEs en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

Este parásito intra- y extra-celular, cuyo ciclo de vida involucra invertebrados y vertebrados, es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas. Básicamente presenta tres morfologías, a saber: amastigote, epimastigote y tripomastigote. La forma epimastigote es alargada y con el kinetoplasto localizado antes del núcleo; es la forma reproductiva en el tracto digestivo de los invertebrados y en medios de cultivo. La propagación de *Trypanosoma cruzi* se da por el contacto de las heces de insectos hematófagos con la herida causada por su picadura. Luego, se produce una hinchazón en el lugar de acceso de los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, los cuales viajan a través del torrente sanguíneo, multiplicándose principalmente en tejidos musculares y nerviosos. En la **Tabla 21**, se registran los resultados de concentración inhibitoria media de los AEs de dos quimiotipos de *Lippia alba*, obtenidos variando las condiciones de extracción y secado contra la forma epimastigote de *T. cruzi*.

Además, los parámetros para establecer la efectividad de un producto anti-*Leishmania* y/o anti-*Trypanosoma*, se basan en los valores de concentración inhibitoria ($\mu\text{g/mL}$), así: una sustancia es activa cuando su concentración inhibitoria media, CI_{50} , es menor de 50 y la concentración necesaria para inhibir el 90% de los microorganismos, CI_{90} , es menor de 100, parcialmente activa si su $\text{CI}_{50} < 50$ pero la $\text{CI}_{90} > 100$, y se consideran inactivas cuando los valores de CI_{50} y CI_{90} superan los 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Los resultados evidencian, que los aceites esenciales ensayados fueron activos contra la forma epimastigote del parásito, sin embargo, quedan sujetos a su evaluación por parte del CINTROP a concentraciones menores para determinar su

CI₅₀, debido a que ésta está por debajo de la concentración mínima probada indicando una mayor actividad del aceite.

3.5.4.3 Actividad de los AEs en promastigotes de *Leishmania chagasi*

Leishmania es un género de protozoos, responsable de la enfermedad conocida como leishmaniasis, y los mosquitos del género *Lutzomyia* son sus principales vectores de infección. Además, las células de *Leishmania* se encuentran en dos morfologías, a saber: promastigoste, en el insecto huésped, y amastigote en el vertebrado huésped. A continuación, en la **Tabla 22** se registran los resultados de concentración letal media, CL₅₀, para los aceites esenciales de los dos quimiotipos de *Lippia alba*, obtenidos variando las condiciones de extracción y secado contra la forma extra-celular de *L. chagasi*.

Tabla 21. Actividad de los AEs de dos quimiotipos de *Lippia alba*, en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

Experimento	Ensayo 1 (µg/mL)				Ensayo 2 (µg/mL)			
	CI ₅₀	LC	CI ₉₀	LC	CI ₅₀	LC	CI ₉₀	LC
LAC750000	<3,7	ND	9,62	8,41-10,83	<0,4	ND	>11,1	ND
LAC600000	4,13	3,63-4,63	26,21	23,20-29,22	<3,7	ND	14,12	13,65-14,60
LAC455005	3,97	3,82-4,11	10,23	9,38-11,08	<3,7	ND	6,02	5,39-6,66
LAC455003	<3,7	ND	8,70	8,47-8,93	<1,2	ND	>33,3	ND
LAC454009	<3,7	ND	6,26	5,73-6,78	<1,2	ND	13,14	12,27-14,00
LAC454004	<3,7	ND	6,72	6,59-6,86	0,68	0,59-0,69	18,28	11,38-25,17
LAC453015	<3,7	ND	5,87	5,75-5,99	<0,4	ND	22,56	9,62-35,50
LAA750000	12,45	11,06-13,85	>100	ND	14,17	13,55-14,80	>100	ND
LAA600000	8,64	8,46-8,82	>100	ND	22,61	19,83-25,39	>100	ND
LAA454009	25,94	21,51-30,38	>100	ND	40,46	38,92-41,99	>100	ND
LAA454005	13,87	12,68-15,05	>100	ND	15,49	14,76-16,22	>100	ND
LAA455005	23,36	22,54-24,18	>100	ND	16,03	12,62-19,44	>100	ND
<i>Nifurtimox</i> *	0,43	0,37-0,48	3,69	2,74-4,64	0,35	0,34-0,37	3,82	2,88-4,76

*Sustancia de referencia

Tabla 22. Actividad de los AEs de dos quimiotipos de *Lippia alba*, en promastigotes de *Leishmania chagasi*.

Experimento	Ensayo 1 (µg/mL)				Ensayo 2 (µg/mL)			
	CI ₅₀	LC	CI ₉₀	LC	CI ₅₀	LC	CI ₉₀	LC
LAC750000	<3,7	ND	<3,7	ND	0,77	0,72-0,82	>3,7	ND
LAC600000	<3,7	ND	18,13	17,55-18,72	2,53	2,41-2,62	28,23	25,43-31,03
LAC455005	3,71	ND	12,34	11,60-13,09	3,56	3,22-3,90	33,11	ND
LAC455003	6,69	6,02-7,36	19,56	17,70-21,42	4,37	4,06-4,68	19,21	18,81-19,60
LAC454009	4,67	4,61-4,72	11,83	11,65-12,00	<3,7	ND	10,13	9,96-10,30
LAC454004	5,95	5,23-6,67	14,19	13,57-14,82	<3,7	ND	11,04	10,93-11,15
LAC453015	7,95	7,27-8,64	29,22	27,93-30,50	<3,7	ND	16,91	16,50-17,33
LAA750000	55,50	49,44-61,56	>100	ND	27,00	26,56-27,44	>100	ND
LAA600000	71,81	59,90-83,73	>100	ND	46,95	46,06-47,84	>100	ND
LAA454009	99,07	ND	>100	ND	>100	ND	>100	ND
LAA454005	97,99	95,93-100,06	>100	ND	91,48	88,39-94,58	>100	ND
<i>Anfotericina B*</i>	0,008	0,007-0,008	0,01	0,01-0,01	0,008	0,008-0,008	0,01	0,01-0,01

*Sustancia de referencia

Según esto, todos los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”, son activos contra la forma promastigote de *Leishmania chagasi*, y pueden evitar la transformación del protozoo a su forma amastigote. Sin embargo, aunque el AE LAC750000 es el más activo, su actividad no es comparable a la sustancia control, anfotericina B. Por otro lado, los AEs del quimiotipo “Carvona”, fueron inactivos contra la forma extra-celular de *L. chagasi*.

Además, todos los AEs de *Lippia alba* evaluados, en especial los del quimiotipo “Carvona”, inhibieron el 90% de la población de protozoos de *Trypanosoma cruzi* a concentraciones menores que las determinadas como letales medias para las células VERO. Luego, estos aceites pueden ser considerados como promisorios para el tratamiento del mal de Chagas, pues el rango tóxico es mucho mayor que el rango al cual es activo.

La relación entre la actividad biológica y la composición química de los AEs evaluados no es muy clara. Por ejemplo, en el gráfico de componentes principales de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”, en la **Figura 43**, se observa la similitud existente entre los AEs evaluados, y como se indicó, los desplazamientos ocurren a pequeñas variaciones en la concentración de algunos de sus metabolitos secundarios principales. Un comportamiento similar se observa para los AEs del quimiotipo “Carvona”.

Sin embargo, la actividad puede estar sujeta a efectos sinérgicos o antagonísticos entre los metabolitos presentes en la mezcla, a determinadas combinaciones de los mismos. Así mismo, es posible que algunos metabolitos que se encuentren a nivel de trazas, y no son observables por PCA, puedan jugar un rol decisivo al determinar la bioactividad, ya sea por su acción directa o sinérgica.

4. CONCLUSIONES

- El análisis cuantitativo sobre *Lippia alba* muestra que Brasil lidera la investigación sobre esta planta, seguido de India, España, Argentina, Cuba y Colombia; que el número de investigaciones ha aumentado desde 1996, con un pico en el año 2006; que las principales áreas de estudio son: etnofarmacología, agricultura, ciencias biológicas y químicas y tecnología de alimentos, y que son publicados, en su mayoría, en las revistas *Journal of Ethnopharmacology*, *Journal of Flavour and Fragrance*, *Journal of Essential Oils Research*, *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* y *Revista Brasileira de Farmacia*.
- Se determinó la composición química usando criterios cromatográfico (t_R , t_R de sustancias patrón, I_k en columnas polar y apolar) y espectroscópico (espectros de masas, con EI de 70 eV) de los aceites esenciales de dos quimiotipos de *Lippia alba*, obtenidos variando el tiempo de extracción, y la temperatura y duración del secado. El AE de *Lippia alba*, quimiotipo "Citral", se caracteriza por la presencia de geranial (23-31%), neral (19-24%), geraniol (7-15%), *trans*- β -cariofileno (4-8%), nerol (0-5%) y 6-metil-5-hepten-2-ona (1-3%); mientras que el AE de *Lippia alba*, quimiotipo "Carvona", contiene los compuestos mayoritarios: carvona (34-39%), limoneno (27-31%), biciclosesquifelandreno (5-13%), piperitona (5-6%) y piperitenona (2-4%).
- El rendimiento de los AEs de plantas de *Lippia alba*, quimiotipo "Citral", frescas y secadas durante 1 h en el intervalo de temperatura de 40 a 80°C, evidenció que el aumento de la temperatura, está directamente relacionado con el aumento del rendimiento del aceite. También, los AEs obtenidos de

plantas frescas, empleando diferentes tiempos de extracción (30 a 75 min), mostraron, a medida que aumenta el tiempo de extracción, se incrementa el rendimiento. El uso de tiempos de secado mayores, a cualquier temperatura, también aumenta el rendimiento de los AEs.

- El rendimiento de los AEs de plantas de *Lippia alba*, quimiotipo “Carvona”, frescas y secadas a 1 h en el intervalo de temperatura de 40 a 80°C, mostró que existe una gran diferencia entre los AEs de plantas secadas a 70 y 80°C, y las plantas frescas y secadas de 40 a 60°C. El aumento de la temperatura ocasionó el aumento en el rendimiento del aceite, así como con el aumento del tiempo de secado para cada temperatura en el intervalo de 40 a 80°C, se observó el incremento del rendimiento de aceite.
- El análisis de la composición química de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”, extraídos de plantas frescas, mostró, que el contenido de neral, geranial, nerol y geraniol, a medida que aumenta el tiempo de extracción, disminuye. Por otra parte, las plantas secadas en el intervalo de temperatura de 40 a 70°C, presentaron un aumento de neral y geranial, y la disminución de geraniol y nerol, para cada temperatura, con el aumento de la duración del secado, lo que puede explicarse por la oxidación del nerol y geraniol a sus respectivos aldehídos. Los AEs obtenidos de plantas secadas a 80°C presentaron más geraniol, que las secadas a otras temperaturas, comparable con la planta fresca. Se observó un ligero aumento en la concentración relativa de neral y geranial, y la disminución de nerol, a medida que aumenta la temperatura de secado de las plantas.
- En los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Carvona”, extraídos de plantas frescas, se observa la disminución de carvona y limoneno, y el incremento

de biciclosesquifelandreno con el aumento del tiempo de extracción. No se observó un efecto significativo de la temperatura y la duración del secado, sobre el contenido de los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en el quimiotipo “Carvona”.

- La actividad antimicótica de los AEs de *Lippia alba*, de los dos quimiotipos, fue inferior al de la sustancia control, bajo las condiciones evaluadas. Los AEs evaluados no fueron activos contra las bacterias Gram negativas: *Escherichia coli* No 1, *Escherichia coli* No 2, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarium* y *Pseudomonas aeruginosa*, mientras que, los AEs del quimiotipo "Citral", si mostraron actividad contra *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* y fueron considerados promisorios.
- Todos los AEs de quimiotipo "Citral", fueron activos contra epimastigotes y promastigotes de *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania chagasi*, respectivamente. Por el contrario, los AEs del quimiotipo “Carvona” fueron parcialmente activos contra epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, e inactivos contra promastigotes de *Leishmania chagasi*.
- Las pruebas de citotoxicidad en *Artemia franciscana*, mostraron que los AEs de los dos quimiotipos son medianamente tóxicos y presentan valores similares entre quimiotipos. No obstante, los ensayos en células Vero revelaron que los AEs del quimiotipo “Carvona” no son tóxicos. Por su parte, los AEs del quimiotipo “Citral” presentaron niveles de toxicidad similares a los del medicamento de control Nifurtimox.

5. RECOMENDACIONES

- En vista que el proceso de secado ayuda a conservar la calidad del material vegetal y la de los constituyentes de sus aceites esenciales, y que los procesos tecnificados, aunque más costosos que los métodos tradicionales de secado, permiten estabilizar el material vegetal en menor tiempo y mejorar la calidad del AE respecto al obtenido para la planta fresca, se propone el uso de esta metodología como una variable de estudio obligatoria en las investigaciones a desarrollar por el CENIVAM.
- Teniendo en cuenta que la producción industrial de AEs requiere la optimización del rendimiento y el máximo contenido de los compuestos mayoritarios, de gran valor agregado, se sugiere la implementación de los resultados derivados del presente estudio, y los obtenidos previamente por la línea de investigación en aceites esenciales del Laboratorio de Cromatografía, sobre los dos quimiotipos de *Lippia alba*, con miras a evaluar posibles efectos sinérgicos de las variables, de manera, que se obtenga un AE de gran aceptación en el mercado nacional e internacional.
- Se recomienda no usar tiempos de extracción por MWHD muy largos - superiores a 60 min-, o temperaturas superiores a 80°C, que conducen a la pérdida de los metabolitos secundarios y la disminución del rendimiento de los AEs.
- Dada la actividad promisoriosa de los AEs de los dos quimiotipos de *Lippia alba*, contra la forma epimastigote de *Trypanosoma cruzi*, en especial, del quimiotipo “Carvona” que fue no tóxico en células VERO, y del quimiotipo “Citral” contra la

forma promastigote de *Leishmania chagasi*, se recomienda el estudio de estos AEs contra la forma intracelular de dichos parásitos por el CINTROP.

- Realizar los ensayos para determinar la concentración mínima inhibitoria de los AEs de *Lippia alba*, quimiotipo “Citral”, obtenidos en función de las condiciones de extracción y secado, contra las bacterias Gram positivas *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*.
- Se sugiere desarrollar ensayos de actividad biológica para los componentes individuales, y combinaciones de éstos, de los metabolitos mayoritarios de los dos quimiotipos, a saber: neral, geranial, nerol, geraniol, carvona, limoneno y *trans*- β -cariofileno, con el fin de identificar el impacto de éstos sobre la actividad de los AEs ensayados.

BIBLIOGRAFÍA

1. ABAD, M.J.; SÁNCHEZ, S.; BERMEJO, P.; VILLAR, A.; CARRASCO, L. Antiviral activity of some medicinal plants. *Methods and Findings*, **1995**, 17: (Supply. A), p.p. 108.
2. ABENA, A. A.; NGONDZO-KOMBEM, G. R.; BIOKA, D.; Psychopharmacologic properties of *Lippia multiflora*. *Encephale*, **1998**, 24, p.p. 449-454.
3. ADAMS, R.P., Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy, Ed. Allured Publishing Corporation, Illinois: **2004**, 469p.
4. AGUIAR, J.S.; COSTA, M.C.C.D. *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (*Verbenaceae*): levantamento de publicações nas áreas química, agronômica e farmacológica, no período de 1979 a 2004. *Rev. Bras. Plant. Med.*, **2005**, 8:(1), p.p. 79-84.
5. ALVES, D.S.M.R.; INNECCO, R. Influência de períodos de secagem de folhas no óleo essencial de erva-cidreira (quimiotipo limoneno-carvona). *Rev. Ciên. Agr.*, **2003**, 34:(1), p.p. 5-11.
6. ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C.R.; SINCERO, T.C.M; DA SILVA, A.C.; SAVI, L.A.; GAIDO, C.M.; BETTEGA, J.M.R; MANCINI, J.; DE ALMEIDA, M.T.R.; BARBOSA, R.A.; FARIAS, M.R.; BARARDI, C.R.M.; SIMÕES, C.M.O. Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. *Fitoterapia*, **2005**, 76, p.p. 374-378.
7. ARABHOSSEINI, A.; HUISMAN, W.; VAN BOXTEL, A.; MÜLLER, J. Long-term effects of drying conditions on the essential oil and color of tarragon leaves during storage. *J. Food. Eng.*, **2007**, 79:(2), p.p. 561-566.

8. ARAÚJO, J.A.R.; ARENCIBIA, R.J. Informetría, bibliometría y cienciometría: aspectos teórico-prácticos. **2002**. [Sitio en Internet]. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/aci/vol10_4_02/aci040402.htm. Acceso el 1 de abril de 2007.
9. ASEKUN, O.T.; GRIERSON, D.S.; AFOLAYAN, A.J. Effects of drying methods on the quality and quantity of the essential oil of *Mentha longifolia* L. subsp. *Capensis*. *J. Food. Chem.*, **2006**, 101:(3), p.p. 995-998.
10. ATTI-SERAFINI, L.; PANSERA, M.R.; ATTI-SANTOS, A.C.; ROSSATO, M.; PAULETTI, G.F.; PAROUL, N., and MOYNA, P. Variation in essential oil yield and composition of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. grown in Southern Brazil. *Rev. Bras. Plant. Med*, **2002**, 4:(2), p.p. 72-74.
11. AZCON-BIETO, J.; TALÓN, M. (Ed); Fundamentos de Fisiología Vegetal. 1ª Ed. McGraw Hill. Barcelona, España: **2000**, 261-274 p.
12. BAHL, J.R.; GARG, S.N.; SINGH, S.C.; BANSAL, R.P.; NAQVI, A.A.; KUMAR, S. Composition of linalool rich essential oil from *Lippia alba* grown in Indian Plants. *Flav. Fragr. J.*, **2000**, 15, p.p. 199-200.
13. BAHL, J.R.; SINHA, S.; NAQVI, A.A.; BANSAL, R.P.; GUPTA, A.K.; KUMAR, S. Linalool-rich essential oil quality variant obtained from irradiated stem nodes in *Lippia alba*. *Flav. Fragr. J.*, **2002**, 17, p.p 127-132.
14. BANDONI, Arnaldo (Ed). Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. 1ª Ed. La

- Plata, Argentina: Red de Editoriales Universitarias, **2000**, p.p. 29-39, 131-140, 380-382.
15. BANDONI, A.L.; MENDIONDO, M.E.; RONDINA, R.V.D.; COUSSIO, J.D. Survey of Argentine medicinal plants. I. Folklore and phytochemical screening. *J. Nat. Prod.*, **1972**, 35, p.p. 69-81.
 16. BARBOSA, F.D.F.; BARBOSA, L.C.A.; MELO, E.C.; MENDEZ, B.F.; SANTOS, R.H.S. Influência da temperatura do ar de secagem sobre o teor e a composição química do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown. *Quim. Nova*, **2006**, 29:(6), p.p. 1221-1225.
 17. Biodiversidad en Colombia [Sitio en Internet]. Disponible en <http://www.humboldt.org.co/biodiversidad/c-biodiversidad.htm>. Acceso el 19 de marzo de 2007.
 18. BLANCO, T.C.; STASHENKO, E.E.; COMBARIZA, M.Y.; MARTINEZ, J.R. Comparative study of Colombian citrus oil by high-resolution gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, **1995**, 697, p.p. 501-513.
 19. Boletín de plantas medicinales y aromáticas. Gobierno de Chile-Fundación para la innovación agraria. Santiago, Chile: **2003**, Boletín Trimestral N° 7.
 20. BRAGA, M.; EHLERT, P.; MING, L., and MEIRELES, M. Supercritical fluid extraction from *Lippia alba*: global yields, kinetic data, and extract chemical composition. *J. Supercrit. Fluids*, **2005**, 34, p.p. 149 – 156.

21. CÁCERES, A.; ALVAREZ, A.V.; OVANDO, A.E.; SAMAYOA, B.E. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 1. Screening of 68 plants against gram-positive bacteria. *J. Ethnopharm*, **1991**, 31, p.p. 193-208.
22. CÁCERES, A.; FLETES, L.; AGUILAR, L.; RAMÍREZ, O.; FIGUERIA, L.; TARACENA, A.M.; SAMAYOA, B. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 3. Confirmation of activity against enterobacteria of 16 plants. *J. Ethnopharm*, **1991**, 31, p.p. 31-38.
23. CALVO, R., PARTRIDGE, M., and JABRI, M. A comparative study of principal component analysis techniques. Department of Electrical Engineering. University of Sydney. Australia: **2006**, p.p. 1-5.
24. CARDOZO, R.; GUZMAN, S.P.; GARCIA, V. Desarrollo agrotecnológico de *Lippia alba* (Miller) N.E. Brown ex Britton & Wilson. *Revista Científica Guillermo de Ockham.*, **2004**, 7, p.p. 201-215.
25. CASTRO, D.M. Efeito da variação sazonal, colheita selecionada e diferentes temperaturas de secagem sobre a produção de biomassa, rendimento e composição de óleos essenciais das folhas *Lippia alba*. Sao Paulo, Brasil: Tesis de Doctorado (Agronomía-Horticultura). Universidad Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, **2001**. p.134.
26. CASTRO, D.M., MING, L.C., MARQUES, M.O.M. Composição fitoquímica dos óleos essenciais de folhas da *Lippia alba* (Mill) N.E.Br. em diferentes épocas de colheita e partes do ramo. *Rev. Bras. Plant. Med.* **2002**, 4:(2), p.p. 75-79.

27. CASTRO, H. Aislamiento de R(-)-carvona por derivación química selectiva del aceite esencial de *Lippia alba*. Bucaramanga: Tesis de Grado (Química), Universidad Industrial de Santander, **2002**. p.p. 71.
28. CEMAT-FARMAYA. Fichas sobre Plantas Medicinales. 2ª ed. Tomos I y II. Guatemala: **1996**.
29. CENTRE FOR THE PROMOTION OF IMPORTS FROM DEVELOPING COUNTRIES. EU Market Survey Food Ingredients for Industrial Use. **2004**. [Sitio en Internet]. Disponible en: <http://www.humboldt.com.co/biocomercio>. Acceso el 1 de abril de 2007.
30. CENTRE FOR THE PROMOTION OF IMPORTS FROM DEVELOPING COUNTRIES. EU Market Survey Natural Ingredients for Cosmetic. **2004**. [Sitio en Internet]. Disponible en: <http://www.humboldt.com.co/biocomercio>. Acceso el 1 de abril de 2007.
31. CENTRE FOR THE PROMOTION OF IMPORTS FROM DEVELOPING COUNTRIES. EU Market Survey Natural Ingredients for Pharmaceuticals. **2004**. [Sitio en Internet]. Disponible en: <http://www.humboldt.com.co/biocomercio>. Acceso el 1 de abril de 2007.
32. COSTA, M.; DI STASI, L. C.; KIRIZAWA, M.; MENDACOLLI, S. L.; GOMES, C.; TROLI, G., Screening in mice of some medicinal plants used for analgesic purposes in the State of São Paulo. Part II, *J. Ethnopharm.*, **1989**, 27, p.p. 25-33.
33. CRAVEIRO, A.A.; ALENCAR, J.W.; MATOS, F.J.A.; ANDRADE, C.H.S.; MACHADO, M.I.L. Essential oils from Brazilian *Verbenaceae* genus *Lippia*. *J. Nat. Prod.*, **1981**, 5, p.p. 599-601.

34. DARBONNE, L., US Patent. 5.383.396., 1993.
35. De CARVALHO, C., and De FONSECA, M.M. Biotransformation of terpenes. *Biotech. Adv.*, **2006**, 24, p.p. 134-142.
36. DELLACASA, E.; SOLER, E.; MENENDEZ, P.; MOYNA, P. 1990. *Flav. Fragr. J.*, 5, p. 106. Citado por: HENNEBELLE, T., SAHPAZ, S., DERMONT, C., JOSEPH, H., and BAILLEUL, F. The essential oil of *Lippia alba*: Analysis of samples from French Overseas Departments and Review of Previous Works; *Chem. Biodiver.*, **2006**, 3, p.p. 1116-1125.
37. DEWICK, P.M. Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach. John Wiley & Sons: Chichester, **2002**. 351 p.
38. DI STASI, L.C.; HIRUMA, C.A.; GUIMARAES, E.M.; SANTOS, C.M. Medicinal Plants popularly used in Brazilian Amazon. *Fitoterapia*, **1994**, 65, p.p. 529-540.
39. DURÁN, D.C. Estudio del aceite esencial de *Lippia alba* (Fam. *Verbenaceae*) y de los aspectos fisiológicos en diferente etapas de su crecimiento bajo tres niveles de luz. Bucaramanga: Tesis de Grado (Química), Universidad Industrial de Santander, **2005**. 122 p.
40. Esquemas y equipos de desecación. [Sitio en internet]. Disponible en <http://www.herbotecnia.com.ar/poscosecha-secadoMaquinas.htm>. Acceso el 24 de marzo de 2007.

41. FESTER, G.A.; MARTINUCCI, E.A.; RETAMAR, J.A.; RICCIARDI, A.J. Aceites esenciales de la República Argentina. Academia Nacional de Ciencias. Buenos Aires, Argentina. **1961**, p.p. 19, 33, 36:38, 56-113.
42. FISCHER, U.; LÓPEZ, R.; PÖLL, E.; VETTER, S.; NOVAK, J., and FRANZ, C. Two chemotypes within *Lippia alba* population in Guatemala. *Flav. Fragr. J.*, **2004**, 19, p.p. 333-335.
43. FORESTIERI, A.M.; MONFORTE, M.T.; RAGUSA, S.; TROVATO, A.; IAUK, L. Aintinfalamtory, analgesic and antipyretic activity in rodents of plant extracts used in African medicine. *Phytother. Res.*, **1996**, 10, p.p. 100-106.
44. GARCÍA, H.B. Flora medicinal de Colombia. Tomo II. Botánica médica, 2ª Ed., Tercer Mundo Editores, Bogotá, **1992**, p.p. 500-510.
45. GAZOLA, R.; MACHADO, D.; RUGGIERO, C.; SINGI, G.; MACEDO, M.A.; *Lippia alba*, *Melissa officinalis* and *Cymbopogon citratus*: effects of the aqueous extracts on the isolated hearts of rats, *Pharmacol. Res.*, **2004**, 50, p.p. 477-480.
46. GIRÓN, L.M.; CÁCERES, A. Técnicas básicas para el cultivo y procesamiento de plantas medicinales. CEMAT, Guatemala. **1994**. p.p 51-52.
47. GIRÓN, L.M.; FREIRE, V.; ALONZO, A.; CÁCERES, A. Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. *J. Ethnopharm.*, **1991**, 34, p.p 173-187.
48. GOMES, E.C.; MING, L.C.; MOREIRA, E.A.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D.; KERBER, V.A.; CONTIN, A.; FILHO, W.A. Constituintes do oleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) NE Br.(Verbenaceae). *Rev. Bras. Farm.*, **1993**, 74, p.p. 29.

49. GÓMEZ, N.E; WITTE, L. A simple method to extract essential oils from tissue samples by using microwave radiation. *J. Chem. Ecol.*, **2001**, 27, p.p. 2351-2359.
50. GROB, R. L. Modern practice of gas chromatography. New York: John Wiley & Sons, **1985**. p.p. 895-897.
51. GUPTA, P.M. 270 Plantas medicinales iberoamericanas. CYTED-SECAB, Editorial Presencia. Santafé de Bogotá, Colombia. **1995**. p.p. 554-555, 557-559, 561-563.
52. GUERRERO, M.F.; PUEBLA, P.; CARRON, R.; MARTIN, M.L.; ARTEAGA, L; SAN ROMAN, L., Assessment of the antihypertensive and vasodilator effects of ethanolic extracts of some Colombian medicinal plants, *J. Ethnopharm.*, **2002**, 80, p.p. 37-42
53. GÜENTHER, E. The Essential Oils. Volume I: History – Origin in plants production – Analysis, Litton Educational, New York, **1948**, p.p. 241–244.
54. HÄRDLE, W.; SIMAR, L. Applied Multivariate Statistical Analysis. MD*TECH- Methods and data technologies, **2003**. p.p. 233-274.
55. HEINRICH, M.; RIMPLER, H.; BARRERA, N.A. Indigenous phytotherapy of gastrointestinal disorders in a lowland mixer community (Oaxaca, Mexico): Ethnopharmacologic evaluation. *J. Ethnopharm.*, **1992** 34, p.p. 63-80.
56. HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; DERMONT, C.; JOSEPH, H., and BAILLEUL, F. The essential oil of *Lippia alba*: Analysis of samples from French Overseas Departments and Review of Previous Works; *Chem. Biodiver.*, **2006**, 3, p.p. 1116-1125.

57. HIDALGO, J.E.; CERRUTI, T.; MESTANZA, M.; RÍOS, F.; NINA, E.; NONATO, L.; ALVARADO, R., and MENÉNDEZ, R. Aromatic plant oils of the Peruvian Amazon. Part 1. *Lippia alba* (Mill.) N.E Brown and *Cornutia odorata* (Poeppig) Poeppig ex Schauer, *Verbenaceae*. *J. Essent. Oil Res.* **1999**, 11:(6), p.p. 753-756.
58. Industria de las esencias y los perfumes. Enciclopedia Salvat de las Ciencias, Tomo 16, Ed. Salvat S.A.: Barcelona. **1972**, 315 p.
59. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos "Alexander von Humboldt". Estudio del mercado colombiano de aceites esenciales. **2003**. [Sitio en Internet]. Disponible en: <http://www.humboldt.com.co/biocomercio>. Acceso el 1 de abril de 2007.
60. JARAMILLO, B.E. Estudio de la actividad antioxidante *in Vitro* de aceites esenciales de plantas tropicales y compuestos sintéticos nitrogenados. Tesis Doctoral (Química). Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, **2005**, 288 p.
61. JEAN, F.I., COLLIN, G., LORD, D. Essential oil and microwave extracts of cultivated plants. *Perfumer & Flavorist.*, **1992**, 17:(3), p.p. 35-41.
62. JENNINGS, W., Analytical Gas Chromatography. Academic Press: San Diego. **1987**. 259 p.
63. JIROVETZ, L., BUCHBAVER, G (Ed). Processing, analysis and application of essential oils. Ed. Har Krishan Bhala & Sons. Dehradun, India. **2005**. p. 21-28.

64. KINGSTON, H.M.; JASSIE, L.B. Introduction to microwave sample preparation, theory and practice. Ed. ACS. Washington. **1998**. p.p. 7-32.
65. KLUEGER, P.A.; DAROS, M.R; SILVA, R.M.; FARIAS, M.R.; DE LIMA, T.C.M. Neuropharmacological evaluation of crude and semipurified extracts from *Lippia alba* Mill. N.E. Br. (*Verbenaceae*). Abstracts. International Joint Symposium: *Chemistry, Biological and Pharmacological Properties of Medicinal Plants from the Americas*. **1997**. Poster Session, 2:B23.
66. 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. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49, p.p. 3768-3771.
67. KOVÁTS, E., Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. *Advan. Chromatogr.*, **1965**, 1, p.p. 229-247.
68. KUMAR, S., BAHL, J.R., BANSAL, R.P., GARG, S.N., NAQVI, A.A., KHANUJA, S.P.S., SHASANY, A.K., DAROKAR, M.P., SINGH, V., SINHA, S. US Patent. PP113,110 P2, 2002.
69. LAHLOU, M. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. Review Article. *Phytother. Res.*, **2004**,18, p.p. 435-448.
70. LEMOS, T.L.G.; MATOS, F.J.A; ALENCAR, J.W.; CRAVEIRO, A.A.; CLARK, A.M.; McCHESNEY, J.D. Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants. *Phytother. Res.*, **1990**, 4, p.p. 82-84.

71. LÓPEZ, A.A.M.; ROJAS, H.N.M.; JIMÉNEZ, M.C.A. Plants extracts with citostatic properties growing in Cuba. *Rev. Cub. Med. Trop.*, **1979**, 31, p.p. 105-111.
72. LORENZO, D.; PAZ, D.; DAVIES, P.; VILLA, R.; CAÑIGUERAL, S.; DELLACASA, E. Composition of a new essential oil type *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown from Uruguay. *Flav. Fragr. J.*, **2001**, 16, p.p. 356-359.
73. LUCHESSI, M.E.; CHEMAT, F.; SMADJA, J. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *J. Chromatogr. A.*, **2004**, 1043, p.p. 322-327.
74. MALLAVARAPU, G.R. Essential oil of *Lippia alba*, a rich source of linalool. *Med. Arom. Plant. Sci.*. **2000**, 22(1B), p.p. 765-767. Citado por: AGUIAR, J.S., COSTA, M.C.C.D. *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (*Verbenaceae*): levantamento de publicações nas áreas química, agrônômica e farmacológica, no período de 1979 a 2004. *Rev. Bras. Plant. Med.* **2005**, 8:(1), p.p 79-84.
75. MATOS, F.J.A.; LACERDA, M.I.; CRAVEIRO, A.; WILSON ALENCAR, J. Essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in Northeast Brazil. *J. Essent. Oil. Res.*, **1996**, 8, p.p. 695-698.
76. McLAFFERTY, F. W. and TUREK, F., Interpretation of mass spectra. California: University Science Books, **1993**. 374p.
77. Mecanismo de Facilitación del Convenio sobre diversidad Biológica. [Sitio en internet]. Disponible en <http://www.humboldt.org.co/chmcolombia/biodiversidad.htm>. Acceso el 19 de marzo de 2007.

78. MESSAGE, G. M., Practical aspects of gas chromatography / mass spectrometry. John Wiley & Sons: New York, **1984**. 351 p.
79. Métodos de secado de hierbas aromáticas y medicinales. [Sitio en internet]. Disponible en <http://www.herbotecnia.com.ar/poscosecha-secadoMetodos.htm>. Acceso el 24 de marzo de 2007.
80. 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. Bucaramanga: Tesis de Grado (Química). Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, **2007**.141 p.
81. MORTON. Atlas of Medicinal Plants of Middle America. Vol. I. Springfield, Illinois, United States of America. **1981**. p.p. 745-750.
82. NAGAO, E.O.; INNECO, R.; MATTOS, S.H.; MARCO, C.A. Influence of the drying period in the dry and rainy seasons on the essential oil of *Lippia alba* (Mill) N.E.Br., in the conditions of the State of Ceará. *Rev. Ciên. Agr.* **2005**, 36:(1), p.p. 53-59.
83. NAGAO, E.O., INNECO, R., MATTOS, S.H., MEDEIROS FILHO, S., MARCO, C.A. Effect of the harvest time on content and major constituent of essential oil of *Lippia alba* (Mill) N.E.Br., chemotype citral-limonene. *Rev. Ciên. Agr.* **2004**, 35:(2), p.p. 355-360.
84. OLIVEIRA D.R.; LEITAO, G.G.; SANTOS, S.S.; BIZZO, H.R.; LOPES, D.; ALVIANO, C.S; ALIVANO, D.S; LEITAO, S.G. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. *J. Ethnopharm.*, **2006**, 108:(1), p.p. 103-108.

85. OMIDBAIGI, R., SEFIDKON, F., KAZEMI, F. Influence of drying methods on the essential oil content and composition of Roman chamomile. *Flav. Fragr. J.* **2004**, 19:(3), p.p. 196-198.
86. ORAV, A.; STULOVA, I.; KAILAS, T.; MUURISEPP, M. Effect of storage on the essential oil composition of *Piper nigrum* L. fruits of different ripening states. *J. Agric. Food. Chem.*, **2004**, 52:(9), p.p. 2582-2586.
87. PARÉ, J. R. J., European Patent Application 0485668A1, **1992**.
88. PARÉ, J. R. J. ; SIGAMIN, M. ; LAPOINTE, J. ; US Patent. 5.002.784., **1991**.
89. PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SANCHEZ, D.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *J. Ethnopharm.*, **2001**, 76, p.p. 201-214.
90. PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.V.; CARRETERO, M.E.; VILLAR, A. Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (*Verbenaceae*). *IL Farmaco*, **2001**, 56, p.p. 501-504.
91. PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.V.; CARRETERO, M.E.; VILLAR, A. Efectos farmacológicos de la infusión de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (*Verbenaceae*). Resúmenes. II Congreso de Fitoterapia- XXII Reunión de la AEMN- II Reunión de la SEFIT. España. Disponible en: <http://medicinaturista.net>. Acceso el 6 de agosto de 2006.
92. PAÚL, P.J. Contribución al conocimiento de los aceites esenciales del género *Eryngium* L., en la península Ibérica, Tesis Doctoral (Biología). Facultad de Ciencias, Universidad Complutense de Madrid, **2002**. 269 p.

93. PINO, J.A.; ORTEGA, A., 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), p.p. 445-446.
94. PINO, J.A.; ORTEGA, A.G.; ROSADO, A.; RODRIGUEZ, M.; BALUJA, R.; BALUJA, J. Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. *Rev. Cub. Farm.*, **1997**, 30, p.p. 1-8.
95. POOLE, C. F., and POOLE S. K., Chromatography Today. Elsevier: Amsterdam **1991**. 1026 p.
96. Programa Nacional de Biocomercio Sostenible (PNBS) Bolivia-Quick Market Scan Essentials Oils. PROFOUND. Bolivia. **2005**. p. 44, [Sitio en internet]. Disponible en [www.biocomerciobolivia.org.bo/SacFan/public/LST MERCADOS 19 documento adjunto.pdf](http://www.biocomerciobolivia.org.bo/SacFan/public/LST_MERCADOS_19_documento_adjunto.pdf). Acceso el 19 de marzo de 2007.
97. [RAMOS, A.; VISOZO, J.; GARCÍA, A.; RODRÍGUEZ, C.A.; RIVERO, R. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. *J. Ethnopharm*, **2003**, 87, p.p. 241-246.
98. RAO, G.P. Studies on chemical constituents and antifungal activity of leaf of *Lippia alba* (Mill). *Ind. J. Chem. Techn.* **2000**, 7(6), p.p. 332-335. Citado por: AGUIAR, J.S., COSTA, M.C.C.D. *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (*Verbenaceae*): levantamento de publicações nas áreas química, agrônômica e farmacológica, no período de 1979 a 2004. *Rev. Bras. Plant. Med.* **2005**, 8:(1), p.p. 79-84.

99. RETAMAR, J.A. Aceites esenciales de especies vegetales diversas, sus posibilidades químicas. Vol. I, 2da. parte, Cáp. III. Santafé, Argentina: **1982**, p.p. 187,188.
100. RICCIARDI, G.A.; RICCIARDI, A.I. Efecto de las variaciones estacionales sobre la composición química del aceite esencial de plantas de "*Salvia morada*" de Sáenz Peña (Chaco). Universidad Nacional del Nordeste, *Comun. Cient. Tecnol.* **2002**. Corrientes, Argentina.
101. RICCIARDI, G.A.; RICCIARDI, A.I.; BANDONI, A.L. Fitoquímicas de Verbenáceas (*Lippias* y *Aloysias*) del Nordeste Argentino. Universidad Nacional del Nordeste, *Comun. Cient. Tecnol.* **2000**. Corrientes, Argentina.
102. RICCIARDI, G.A.; VEGLIA, J.F.; RICCIARDI, A.I.; BANDONI, A.L. Examen comparado de la composición de los aceites esenciales de especies autóctonas de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. Universidad Nacional del Nordeste, *Comun. Cient. Tecnol.* **2000**. Corrientes, Argentina.
103. ROSSI, J.P., DELFINO, J.M. Cienciometría, instrumentos de evaluación y crítica. Revista *Ciencia hoy en línea*. Universidad de Buenos Aires. **2005**. [Sitio en Internet]. Disponible en: <http://www.cienciahoy.org.ar/ln/hoy89/cienciometria.htm>. Acceso el 1 de abril de 2007.
104. RÖDEL, W., WÖLM, G., A guide to gas chromatography. Huethig Verlag: New York, **1987**. 211 p.
105. SÁNCHEZ, J.M. Familia *Verbenaceae* [Sitio en Internet] Árboles Ornamentales. Disponible en <http://www.arbolesornamentales.com/Verbenaceae.htm>. Acceso el 24 de marzo de 2007.

106. SANDRA, P.; BICCHI C., Capillary gas chromatography in essential oil analysis. Ed. Huethig Verlag: New York, **1987**, 435 p.
107. SANTOS, M.R.A.Dos, INNECO, R. Adubação orgânica e altura de corte da erva-cidreira brasileira. *Hortic. Bras.*, **2004**, 22:(2), p.p. 182-185.
108. SANTOS M.R.A.Dos, INNECO, R. Influence of drying periods of leaves on *Lippia alba* (limonene-carvone chemotype) essential oil. *Rev. Ciên. Agr.* **2003**, 34:(1), p.p. 19-25.
109. SANTOS M.R.A.Dos, INNECO, R., SOARES, A.A. Anatomic characterization of secretory structures and essential oil production of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown in relation to harvest times in the dry and rainy seasons. *Rev. Ciên. Agr.* **2004**, 35:(2), p.p. 377-383.
110. SENATORE, F.; RIGANO, D. Essential oil of two *Lippia spp.* (Verbenaceae) growing wild in Guatemala. *Flav. Fragr. J.*, **2001**, 16, p.p. 169-171.
111. SIANI, A.; TAPPIN, M.; RAMOS, M.; MAZZEI, J.; RAMOS, M.C.; De AQUINO, F.; and FRIGHETTO, N. Linalool from *Lippia alba*: Study of the reproducibility of the essential oil profile and the enantiomeric purity. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, p.p. 3518-3521.
112. SILVA, N.A., OLIVEIRA, F.F., COSTA, L.C.B, BIZZO, H.R., OLIVEIRA, R.A. Caracterização química do óleo essencial da vera cidreira (*Lippia alba* (Mill.) N.E. Br.) cultivada em Ilhéus na Bahia. *Rev. Bras. Plant. Med.*, Botucatu. **2006**, 8:(3), p.p 52-55.

113. SINGH, G.; PANDEY, S.K.; LECLERCQ, P.A., and SPERKOVA, J. Studies on essential oils. Part 15. GC/MS analysis of chemical constituents of leaf oil of *Lippia alba* (Mill.) from North India. *J. Essent. Oil Res.* **1999**, 11:(2), p.p. 206-208.
114. SKOOG, D., LEARY J., Análisis instrumental. España: McGraw Hill, **1994**. p.p. 491-527.
115. SLOWING K.V. Estudio de la actividad antiinflamatoria de diversas especies de la flora de Guatemala. Facultad de Farmacia. Memoria Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. España: **1992**.
116. Sostenibilidad. [Sitio en internet]. Disponible en <http://www.descentralizacion.com/tikiwiki/tikiindex.php?page=Sostenibilida>. Acceso el 19 de marzo de 2007.
117. STASHENKO, E.E.; CERVANTES, M.; COMBARIZA, Y.; FUENTES, H.; MARTÍNEZ, J.R. HRGC/FID and HRGC/MSD Analysis of the secondary metabolites obtained by different extraction methods from *Lepechinia schiedeana*, and *in vitro* evaluation of its antioxidant activity. *J. High Resol. Chromatogr.* **1999**, 22, p.p. 343-349.
118. 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.
119. STASHENKO, E.; JARAMILLO, B., and MARTÍNEZ, J. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its *in vitro* antioxidant activity. *J. Chromatogr. A.* **2004**, 1025, p.p. 93-103.

120. STASHENKO, E.E.; JARAMILLO, B.E., and 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. Col. Cienc.* **2003**, 27:(105) p.p. 579-597.
121. STASHENKO, E.E.; MARTÍNEZ, J.R.; DURÁN, C.; MONSALVE, A.; CELIS, C.N., and GÓMEZ, G. Comparative study of composition and biological activity of essential oils of *Lippia alba*, growing in different regions of Colombia. *Memories of the International Congress on Analytical Sciences, ICAS06, Moscú, junio, 2006.*
122. STASHENKO, E.E.; MARTÍNEZ, J.R.; DURÁN, C.; MONSALVE, A.; CELIS, C.N., and GÓMEZ, G. Efecto de la edad de las hojas y los tiempos de extracción y secado, sobre la composición química del aceite esencial de *Lippia alba*. *Memorias del XIV Congreso Colombiano de Química, Armenia, mayo 27-29, 2006.*
123. STASHENKO, E.E.; MARTÍNEZ, J.R.; DURÁN, C.; MONSALVE, A.; CELIS, C.N., and GÓMEZ, G. Estudio comparativo del aceite esencial de *Lippia alba*, proveniente de diferentes regiones de Colombia. *Memorias del XIV Congreso Colombiano de Química, Armenia, mayo 27-29, 2006.*
124. STASHENKO, E.E.; MARTÍNEZ, J.R.; JARAMILLO, B.E. Estudio de la actividad antioxidante *in vitro* de los aceites esenciales de tres plantas de la familia Verbenaceae. *Revista Arte y Ciencia Cosmética*, **2004**,15, p. 16-25.
125. Talleres Industriales Metalúrgicos Esperanza [Sitio en internet]. Disponible en <http://www.herbotecnia.com.ar/poscosecha-secadoMaquinas.htm>. Acceso el 24 de marzo de 2007.

126. TAVARES, E.S.; JULIÃO, L.S.; LOPES, D.; BIZZO, H.R.; LAGE, C.L.S; LEITÃO, S.G. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. (*Verbenaceae*) cultivados em condições semelhantes. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **2005**,15, p.p. 1-5.
127. TAZI, L., ZEIGER, E. Plant physiology. 3^a Ed. Sinaver Associates Inc. Publisher. Sunderland, Massachusetts. **2002** p.p. 283-307.
128. TEIXEIRA, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V.L.G.; DETARMELINA, C., Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants, *J. Ethnopharm.*, **2005**, 92, p.p. 305-311.
129. TUCKER, A.O., and MARCIARELLO, M.J. Volatile leaf oil of the liqueure verbena "*Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown ex Britton and P. Wils. Var *Carterae* Moldenke" from the North American herb trade. *J. Essent. Oil Res.* **1999**, 11:(3), p.p. 314-316.
130. UNITED NATIONS. *Lippia alba*: Market Brief in the European Union for selected natural ingredients derived from native species. United Nations Conference on trade and development. **2005**. p. 39. Disponible en <http://www.biotrade.org/docs/biotradebrief-lippiaalba.pdf>. Acceso: el 7 de agosto de 2006.
131. VALE, T.G. Antinociceptive and antiedematogenic effects of three chemotypes of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown from North-east Brazil. Abstrac. International Joint Symposium. *Chemistry, Biological and Pharmacological Properties of Medicinal Plants from the Americas*. **1997**. Poster Session 2: B24.
132. VALE, T.G.; FURTADO, E.C.; SANTOS Jr, J.G.; VIANA, G.S.B. Central effects of citral, myrcene and limonene constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. *Phytomed.*, **2002**, 9, p.p. 709-714.

133. VALENCIANO, H.P.; ACOSTA, D.L.L.L.; FAVELO, G.J.; Secador solar móvil de estructura metálica para plantas medicinales. *Rev. Cub. Plant. Med.*, **2002**, 7:(1), p.p. 23-26.
134. VARGAS, P.; ORTIZ, I.; y ROJAS, V. Vigilancia tecnológica aplicada a Nanociencia y Nanotecnología en países de Latinoamérica. *J. Technol. Manag. Innov.*, **2006**, 1:(4), p.p. 84-94.
135. VIANA, G.S.B.; VALE, T.G.; RAO, V.S.N.; MATOS, F.J.A. Analgesic and Antiinflammatory effects of two Chemotypes of *Lippia alba*: a comparative study. *Pharm. Biol.*, **1998**, 36, p.p. 347-351.
136. ZAMORA-MARTÍNEZ, M.C.; NIETO de PASCUAL, C. Medicinal Plants used in some rural populations of Oaxaca, Puebla and Veracruz, México. *J. Ethnopharm.*, **1992**, 35, p.p. 229-257.
137. ZÉTOLA, M.; LIMA, T.C.; SONAGLIO, D., and GONZÁLEZ, G., LIMBERGER, R.P., PETROVICK, P.R., BASSANI, V.L. CNS activities of liquid and spraydried extracts from *Lippia alba*-Verbenaceae Brazilian *False Melissa*; *J. Ethnopharm.* **2002**, 82, p.p. 207-215.
138. ZOGHBI, M.G.B, ANDRADE, E.H.A.A SANTOS, A.S., SILVA, M.H.L, MAIA, J.G.S. Essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. grown wild in the Brazilian Amazon. *Flav. Fragr. J.*, **1998** 13, p.p. 47-48.