

**ESTANDARIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE
Lippia origanoides, A PARTIR DE DESTILACIÓN FRACCIONADA A PRESIÓN
REDUCIDA**

**LUZ STELLA DIAZ PADILLA
SERGIO JOSÉ RINCÓN SOLANO**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2015

**ESTANDARIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE
Lippia origanoides, A PARTIR DE DESTILACIÓN FRACCIONADA A PRESIÓN
REDUCIDA**

LUZ STELLA DIAZ PADILLA

SERGIO JOSÉ RINCÓN SOLANO

Trabajo de grado para optar al título de ingeniero químico

Director

JAIRO RENÉ MARTÍNEZ MORALES

Químico. Ph.D

Codirector

Ing. ÁNDERSON JULIÁN ARIAS VELANDIA

Estudiante Doctorado

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS**

ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

BUCARAMANGA

2015

Dedicatoria

A mis padres:

Ignacio Ramón Díaz Meza

Luz Esther Padilla Montes

Porque con la ayuda de Dios me han dado la mejor herencia que se pueda
anhelar y recibir, la educación.

A mis hermanos Reinel David, Santiago y Estefanía.

Ya mi querida abuela Hortensia.

A Sergio Rincón por su amor y compañía.

Luz Stella Díaz Padilla

Dedicatoria

A Dios por ser mi guía, mi alegría y mi fuente de esperanza.

A mis padres, José Alvenis Rincón y Zoraída Solano, por su apoyo incondicional, amor y paciencia durante mi formación profesional.

A mis hermanos Andrés Felipe y Adriana Lucía, por ser el eje principal de motivación.

A mis abuelos que desde el cielo me cuidan.

A mi abuela Nidia Quintero, mi segunda madre.

A mis tías, en especial Aidé Rincón y Nimia Rincón.

A Luz Stella Díaz, por su amor y compañía.

A mis amigos y compañeros de universidad.

A la música mi fiel amiga, acompañante e inspiradora de buenas ideas.

Sergio José Rincón Solano

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Industrial de Santander, a la escuela de Ingeniería Química, al grupo de investigación CIBIMOL, CENIVAM, CROM-MASS, por permitirnos desarrollar esta etapa tan importante de nuestra carrera.

Al profesor Jairo Rene Martínez y a la profesora Helena Stashenko.

A todos los compañeros de CENIVAM que siempre estuvieron dispuestos a brindar su ayuda, compartir sus conocimientos y ocios. Julián Arias, Lady Sierra, Yuri Córdoba, Fausto Prada, Cristian Oliveros, Gustavo Rodríguez, Andrés Gonzáles, Andres Ramírez, Samir Torrenegra, Las comadres: Leydé K. Gualteros y Karol Carrillo, Juan camilo Henríquez, Leonardo Niño, Rogerio Saavedra, Anderson Paipa, Jeffer Correa, Luis Miguel Diaz, Diego Castiblanco, Andreita Gómez, Eduardo Núñez, Camilo Duran, Giocarolo Vásquez, Felipe Solano, Andrea Morales, Jesica Mejía.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	17
1. MARCO TEÓRICO	19
1.1 ACEITES ESENCIALES, AEs.....	19
1.1.1 Mercado de los AEs.....	19
1.2 <i>Lippia origanoides</i> (LO).....	20
1.3. QUIMIOTIPO.	21
1.4 ACEITE ESENCIAL DE LO.....	21
1.5 DESTILACIÓN FRACCIONADA.	23
1.5.1. Destilación a presión reducida	23
1.5.2. Destilación fraccionada de aceites esenciales.....	24
1.5.3. <i>Spinning Band Distillation</i> , SBD	25
2. METODOLOGÍA	26
2.1 EQUIPO DE FRACCIONAMIENTO.	26
2.2 PRUEBAS PRELIMINARES.	26
2.3 OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE LO.	26
2.4 DESTILACIÓN FRACCIONADA DEL AE DE LO.....	27
2.4.1 Condiciones de operación.....	27
2.4.2 Pruebas de reproducibilidad.	28
2.5 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	28

2.6. MODELAMIENTO.....	29
2.6.1 Validación y calibración.....	29
2.7 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN POR GC-MS Y GC-FID.....	30
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS	32
3.1 PRUEBAS PRELIMINARES	32
3.2 OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE LO.	33
3.2.1 Composición de los AEs de LO quimiotipos timol y carvacrol.....	33
3.3 DESTILACIÓN FRACCIONADA DEL AE DE LO.....	34
3.3.1. Pruebas de reproducibilidad.	34
3.3.2 Determinación de la reproducibilidad y repetibilidad del sistema de medición	36
3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	37
3.4.1 Análisis de varianza.	37
3.5. MODELOS DE REGRESIÓN.....	38
3.5.1 Validación.	40
3.6 EFECTO DE LOS PARÁMETROS DE DESTILACIÓN FRACCIONADA.	43
3.6.1 Efecto de la presión.	43
3.6.2 Efecto de la concentración inicial de timol y de carvacrol en el AE.....	43
4. CONCLUSIONES	45
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
ANEXOS	54

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

AE	aceite esencial
AEs	aceites esenciales
LO	<i>Lippia origanoides</i>
SBD	<i>spinning band distillation</i> (destilación con banda rotatoria)
DANE	Departamento Administrativo Nacional de Estadística
CENIVAM	Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales
MV	Material vegetal
T ₁	Temperatura del fondo de la columna
T ₂	Temperatura del tope de la columna
r	Repetibilidad
R	Reproducibilidad
I	Interacción operador/medición
(r&R)	Relación entre la repetibilidad y reproducibilidad
LOO	<i>Leave one out</i> (dejando uno por fuera)
R ²	Coeficiente de determinación
R ² _{aj}	Coeficiente de determinación ajustado
C _{IT}	Concentración inicial de timol en el AE
C _{IC}	Concentración inicial de carvacrol en el AE
GC-MS	Cromatografía de gases acoplado a un detector selectivo de masas

GC-FID	Cromatografía de gases acoplado a un detector de ionización de llama
IR	Índice de retención
EPDM	(Etileno Propileno Dieno tipo M ASTM)
F1	Fracción 1
F2	Fracción 2
F3	Fracción 3
FF	Fracción de fondo

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Lotes de LO utilizados para la obtención de AE.	27
Tabla 2. Rendimiento de obtención de AE de LO.....	33
Tabla 3. Composición típica del AE de LO quimiotipos timol y carvacrol, componentes con más del 1% en peso.	34
Tabla 4. Resultados de la composición del AE de LO timol y fracciones obtenidas por destilación fraccionada. Condiciones: 7 Torr, 10 g de alimentación. Total experimentos: 6.	35
Tabla 5. Reproducibilidad y repetibilidad del sistema de medición del fraccionamiento de LO.	36
Tabla 6. Análisis de varianza sobre la respuesta de la destilación fraccionada de AE quimiotipo timol.	37
Tabla 7. Análisis de varianza sobre la respuesta de la destilación fraccionada de AE quimiotipo carvacrol.	38
Tabla 8. Resultados experimentales y predichos para la respuesta de AE quimiotipo timol.	39
Tabla 9. Resultados experimentales y predichos para la respuesta de AE quimiotipo carvacrol.	39
Tabla 10. Modelos de respuesta propuestos.....	40
Tabla 11. Valores óptimos de presión para la destilación fraccionada del AE de LO quimiotipos timol y carvacrol.	42

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Promedio de la cantidad en % peso de hexano y heptano en cada fracción, a presión atmosférica, con y sin SBD.	32
Figura 2. Distribución de la composición en las fracciones colectadas para AE de LO quimiotipo timol a 7 Torr.....	35
Figura 3. Superficie de respuesta del observable combinado Y del proceso de destilación fraccionada de AE de LO quimiotipo timol.	41
Figura 4. Superficie de respuesta del observable combinado Y del proceso de destilación fraccionada de AE de LO quimiotipo carvacrol.	42

RESUMEN

TÍTULO: ESTANDARIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE *Lippia organoides*, A PARTIR DE DESTILACIÓN FRACCIONADA A PRESIÓN REDUCIDA¹.

AUTORES:

Luz Stella Diaz Padilla

Sergio José Rincón Solano²

PALABRAS CLAVE: Aceite esencial, *Lippia organoides*, estandarización, columna rotatoria, quimiotipo.

DESCRIPCIÓN:

El objetivo de este trabajo fue estudiar las condiciones de operación de la destilación fraccionada de aceite esencial (AE) de *Lippia organoides* (LO), con el propósito de obtener fracciones reproducibles enriquecidas en timol y carvacrol, que permitieran la estandarización de la concentración del AE, debido a que la industria requiere AEs con rangos de composiciones estrechos, exigidos en la formulación de los productos. Se utilizó un equipo de destilación fraccionada a escala de laboratorio de columna rotatoria, con el cual se lograron obtener 3 fracciones más la fracción de fondo. Los AEs obtenidos y las fracciones colectadas se analizaron con GC-MS y FID. Se construyó una respuesta combinada (Y) para la destilación fraccionada de AE de LO para cada quimiotipo. Se realizaron modelos de regresión a partir de los resultados experimentales con el propósito de generar superficies de respuesta con las cuales se identificaran las regiones óptimas de fraccionamiento de cada uno de los quimiotipos de AE. Se logró la separación del timol a partir de la tercera fracción colectada y se obtuvo con mayor concentración en la fracción de fondo. La mayor concentración de timol alcanzada en la fracción de fondo fue de 81% en peso a una presión de 5 Torr. Para el AE quimiotipo carvacrol se enriqueció solo la fracción de fondos en carvacrol y la mayor concentración fue de 62% en peso, a una presión de 10 Torr.

¹ Trabajo de grado

² Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Jairo Rene Martínez Morales, Químico PhD. Codirector: Ánderson Julián Arias Velandia.

ABSTRACT

TITLE: STANDARDIZATION OF THE COMPOSITION OF ESSENTIAL OIL *Lippia origanoides*, FROM FRACTIONAL DISTILLATION UNDER REDUCED PRESSURE³.

AUTHORS:

Luz Stella Diaz Padilla

Sergio José Rincón Solano⁴

KEYWORDS: Essential Oil, *Lippia origanoides*, standardization, rotating column, chemotype.

DESCRIPTION:

The objective of this work was to study the operating conditions of the fractional distillation of essential oil (AE) of *Lippia origanoides* (LO), in order to obtain reproducible fractions enriched in thymol and carvacrol, which allow the standardization of the concentration of the AE because the industry requires AEs with narrow ranges compositions required in the formulation of the products. Fractional distillation equipment was used on a laboratory scale rotating column, with which they were able to obtain three fractions over the bottom fraction. EAs obtained and the collected fractions were analyzed with MS and GC-FID. A combined response (Y) for the fractional distillation of LO AE was constructed for each chemotype. Regression models were made from the experimental results in order to generate response surfaces with which the optimum fractionation regions each AE chemotypes were identified. Thymol separation was achieved from the third and collected fraction was obtained with the highest concentration in the bottom fraction. The highest concentration of thymol achieved in the bottom fraction was 81% by weight at a pressure of 5 Torr. For AE carvacrol chemotype enriched bottoms fraction only carvacrol and the highest concentration was 62% by weight, at a pressure of 10 Torr.

³ Graduation Project.

⁴ Physicochemical Engineering Department. Chemical Engineering. Director: Jairo Rene Martínez Morales, Chemist PhD. Codirector: Ánderson Julián Arias Velandia.

INTRODUCCIÓN

Las nuevas tendencias de consumo hacia los productos de carácter orgánico y natural han despertado interés por aprovechar sosteniblemente la biodiversidad como fuente primaria en la industria [1]. A pesar de que en todo el territorio nacional hay más de 200 especies de plantas aromáticas con potencial aplicación en la industria de aceites esenciales (AEs) [2], la producción del país es casi nula, y los AEs demandados son en su mayoría importados [3]. Sin embargo, según Procolombia para el año 2014 los AEs (incluyendo aceites puros, extractos naturales, agentes colorantes naturales, cosméticos y perfumería) representaron el 0,88% de los productos principales de exportación en el país, alcanzando los \$483 millones de dólares [4], por lo que es una industria con pequeña participación pero con mucho potencial.

Los AEs pueden presentar ciertos atributos tanto curativos como de actividad biológica. Debido a estas propiedades se han convertido en materias primas e insumos de las industrias de fragancias, de aromas y sabores, alimentos, agrobiológicos y productos farmacéuticos, etc. [5]. Una de las razones por la cual se busca obtener un AE de alguna especie aromática o medicinal, se debe a que puede ser la fuente de uno o varios compuestos químicos que faciliten la síntesis de nuevas moléculas para la fabricación de productos bioactivos [6]. Es el caso de los fenilpropanos timol y carvacrol, cuyas fuentes naturales más conocidas comercialmente son el tomillo (*Thymus zygis*) y el orégano (*Origanum vulgare*), ambas de origen euroasiático [7]. Algunas especies nativas de América también poseen un importante contenido de estos dos componentes en su AE, destacándose la *Lippia organoides* (LO), una especie perteneciente a la familia Verbenaceae [8], que dependiendo de su quimiotipo es capaz de producir AE selectivamente enriquecido de alguna de estas moléculas, las cuales le confieren las actividades antígenotóxicas [9], antimicrobianas [10], antifúngicas y citotóxicas [11]; y antioxidante [12]. La elevada bioactividad del timol y del carvacrol en el AE

de LO, explica su uso en las industrias farmacéutica y alimentaria como conservantes, al evitar la proliferación de hongos [13].

Los AEs pueden ser sometidos a diferentes procesos industriales con el fin de mejorar su calidad o aumentar la concentración de sus componentes [14]. La destilación fraccionada a presión reducida, es la operación más común, la cual permite aumentar el grado de pureza de los componentes del AE, lo que incrementa su valor económico [15]. Por ejemplo, el AE de *ylang ylang*, usado en la industria de la perfumería y en el cuidado de la piel, tiene un precio de 255 dólares por litro en su estado crudo y luego de someterse a un proceso de fraccionamiento su precio alcanza un valor de 516 dólares por litro [16]. Este valor agregado se debe a que esta técnica de separación logra obtener fracciones con composiciones reproducibles, para ofrecer al mercado de AEs una materia prima estandarizada que facilita la formulación en la fabricación de productos.

La gran mayoría de las investigaciones publicadas, utilizan columnas de destilación fraccionada de platos o rellenas con empaques (anillos *Rasching*, anillos *Pall*, empaques estructurados, etc.) para facilitar el contacto vapor-liquido [15]. Una alternativa para lograr una separación eficiente de algún componente en especial en los AEs, es la columna rotatoria o columna *Spinning Band Distillation* (SBD), diseño que permite alcanzar un mayor número de platos teóricos en una columna de menor dimensión que las que se usan convencionalmente. Además la SBD crea un contacto íntimo entre vapor y reflujo que favorece la eficiencia del proceso, logra una baja caída de presión y disminuye la cantidad de pérdidas de material valioso [17].

El objetivo de este trabajo fue estudiar las condiciones de operación de la destilación fraccionada de AE de LO, con el propósito de obtener fracciones reproducibles enriquecidas en timol y carvacrol, que permitieran la estandarización de la concentración del AE, debido a que la industria requiere AEs con rangos de composiciones estrechos, exigidos en la formulación de los productos.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 ACEITES ESENCIALES, AEs.

Los AEs, son fracciones líquidas volátiles, que conforman mezclas homogéneas de hasta 300 y más compuestos químicos orgánicos, distribuidos en diferentes partes de las plantas (raíz, tallo, hojas, frutos y flores), especialmente las aromáticas [18]. Los aceites esenciales son metabolitos secundarios de las plantas por lo que un mayor metabolismo se asocia con una mayor producción de AE [19]. Son líquidos aceitosos o balsámicos liberados cuando la planta presenta algún tipo de estrés o lesión [20]. Son necesarios para la polinización, reproducción, y demás funciones fisiológicas [21]. Los AEs se obtienen del material vegetal, a nivel industrial, por diferentes métodos destilativos: hidrodestilación, destilación con agua-vapor y destilación por arrastre con vapor [22].

Los AEs pueden ser atractivos para su obtención y comercialización a diferentes escalas industriales, ya sea por un alto rendimiento de extracción, por sus agradables propiedades sensoriales o algunas características de actividad biológica aprovechables en diferentes productos terminados (repelente de insectos, jabón antifúngico, crema antibacteriana, etc.) [6]. Los AEs también pueden ser la fuente de algún compuesto químico deseable que se encuentra en altas concentraciones y que puede servir como precursor en la síntesis de nuevas moléculas de interés, como por ejemplo el citral que se emplea para obtener iononas, valiosos ingredientes en perfumes finos [22].

1.1.1 Mercado de los AEs

El mercado de los AEs se ha mantenido en constante crecimiento a nivel mundial, con una producción aproximada de 110.000 toneladas métricas de AE por año, alcanzando un valor de 1.300 millones de dólares. Solo 10 empresas en el mundo controlan más del 70% de la venta y distribución de los AEs, aromatizantes, sabores y fragancias [22].

Colombia a pesar de ser un país que cuenta aproximadamente con 28.000 especies de plantas y con condiciones favorables para el desarrollo de esta industria (clima, tierra, varias cosechas al año y mano de obra), no hace parte de los países productores de AEs y es un importador neto [22]. Según el DANE, para el año 2014 Colombia importó 364 toneladas de AEs por un valor de 11 millones de dólares; los más demandados son el AE de naranja y demás cítricos, seguido por AEs desterpenados, y de plantas aromáticas como el eucalipto, menta, anís, AEs agrios, oleorresinas y otros. Los principales países proveedores de estos AEs fueron: Brasil, Estados Unidos, Alemania, España, Italia y China. Por otro lado, para ese mismo año se exportaron 14 toneladas de AE, especialmente de cítricos y eucalipto, a países como Aruba, Antillas Holandesas, China, Estados Unidos y México, alcanzando un valor de 179 mil dólares [23] por cuanto existe un déficit comercial negativo para este producto de 10.821.000 USD.

1.2 *Lippia origanoides* (LO).

La planta LO, es una especie nativa de algunos países de América Central (México, Guatemala, Cuba) y el norte de América del sur, principalmente en la región amazónica (Guayana, Venezuela, Brasil y Colombia) [8]. En Colombia se encuentra en forma silvestre en ambientes secos y semidesérticos en altitudes entre 400 y 2500 msnm, en los departamentos de la Guajira, Magdalena, Santander, Norte de Santander y Cauca; en este país se le conoce como “orégano de monte” y “orégano cimarrón” [24]. Tradicionalmente, las hojas de esta planta son utilizadas para preparar infusiones contra enfermedades respiratorias, como: la gripe, bronquitis, tos y asma; en el tratamiento de trastornos gastrointestinales como: dolor de estómago, náuseas, acidez, diarrea; así como carminativo para la evacuación de gases intestinales, padecimiento de los riñones, antiséptico para la boca y emenagogo, término que se refiere a los remedios caseros para tratar problemas menstruales [25]. Hay otros estudios importantes sobre LO, por ejemplo el de Guevara *et al.* [26] que evalúa el potencial de especies nativas de la región Guayana

para repoblar terrenos degradados por la minería. El estudio demostró que especies como LO, sirven para ser sembradas en estas zonas, ya que además de ser nativas, toleran gran cantidad de metales pesados en los suelos y con esto disminuyen el impacto ambiental generado por el sector minero.

1.3 QUIMIOTIPO.

El término quimiotipo se refiere a los individuos de una misma especie que se diferencian entre sí por su composición química [27]. Las plantas pueden presentar variaciones en su metabolismo secundario, lo que genera ciertas diferencias en el aceite esencial obtenido (e.g., en su aroma y color). Por esto, en apariencia se ve la misma planta, pero se percibe un olor diferente. Una especie con diferentes quimiotipos es, *Thymus vulgaris* (Tomillo), de la cual se han encontrado hasta seis quimiotipos en el sur de Francia [28].

1.4 ACEITE ESENCIAL DE LO.

Sobre la base de los principales componentes que se encuentran en el AE de LO, se han reportado diferentes quimiotipos en Brasil, Venezuela y Colombia [29]. Aunque se ha demostrado que los métodos de extracción [30] y los factores ambientales [31] pueden afectar la producción de metabolitos secundarios en especies de *Lippia*; al menos tres quimiotipos pueden diferenciarse para LO; dos quimiotipos cuyos compuestos mayoritarios son carvacrol y timol, y otro caracterizado por la ausencia de estos compuestos y una alta concentración de felandrenos [26]. Los principales componentes del AE de LO son, carvacrol y timol, los cuales son terpenos fenólicos que pertenecen al grupo de los monoterpenos oxigenados; seguido del p-cimeno y γ -terpineno que pertenecen al de los monoterpenos [8]. El p-cimeno y γ -terpineno, son los precursores biogénicos (a través de la hidroxilación enzimática) del timol y carvacrol; apoyando la asociación biológica y funcional de estos componentes [21]. Esto justifica según Burt *et al.* [32], que la suma de las cantidades de estos cuatro compuestos presentes en el AE de

una especie de orégano griego resultara ser casi igual en muestras procedentes de diferentes regiones geográficas y se mantuvieran estables en diferentes temporadas de cosecha.

El AE de LO, presenta actividad biológica como: antigenotóxica [9], antimicrobiana [10], antifúngica y citotóxica [11]. También presentan actividad repelente útil en la elaboración de bioinsecticidas que pueden ser degradados con mayor rapidez en el ambiente que los sintéticos [33]. El AE de LO posee actividad antioxidante cercana o superior a la de los antioxidantes sintéticos BHA (hidroxibutilanisol) y BHT (butil hidroxitolueno), antioxidantes ampliamente usados en la industria cosmética y relacionados con efectos cancerígenos de piel [12].

Timol y Carvacrol.

El timol es un sólido cristalino, de olor pungente, el carvacrol tiene sabor picante y produce el olor del orégano. Son compuestos fenólicos o fenilpropanos, conocidos por ser antifúngicos y antibacteriales. Por su potencial capacidad antioxidante, estas moléculas pueden ser empleadas en alimentos como conservantes, remplazando a los de origen sintético [7,34], también pueden usarse como antitumorales, por sus efectos anti-proliferativos en células con cáncer de mama metastásico en humanos [35], como suplemento dietético de origen vegetal, para animales [36] y como antimicrobiano potente contra microorganismos como: *E. Coli* [37]. Entre los usos cotidianos de estas moléculas se encuentran los enjuagues bucales a los cuales confieren las propiedades antibacteriana, antiinflamatoria y aséptica [38].

Debido a la relación que existe entre estos dos compuestos, y sus potenciales activos, se ha incrementado el estudio de las especies que los contienen. Las especies vegetales más usadas a nivel comercial como fuentes naturales del timol y el carvacrol son el tomillo (*Thymus zygis*) y el orégano (*Origanum vulgare*). Estas plantas de origen euroasiático, presentan en sus AEs composiciones entre 37 - 55% de timol y 0,5 - 5,5 % de carvacrol para tomillo (ISO 14715:2010) y aproximadamente 22% de timol y 18% de carvacrol para el orégano [7, 39]. Una fuente alternativa de estas dos moléculas es LO, especie que se encuentra

distribuida en diferentes regiones de Colombia, cuyo AE logra enriquecerse selectivamente en timol y carvacrol a composiciones más altas que las especies comerciales.

1.5 DESTILACIÓN FRACCIONADA.

La destilación es un proceso de separación de mezclas, por diferencia en la presión de vapor de cada uno de sus componentes. Existen dos tipos: continua y discontinua. La primera se da cuando el sistema trabaja con una alimentación constante; mientras que en la segunda, la composición del alimento varía en el tiempo, debido a la remoción constante, de los componentes volátiles. En el sistema más sencillo, el vapor que sale del destilador es pasado directamente a un condensador, obteniéndose así el destilado rico en el componente con menor presión de vapor (más volátil). La destilación discontinua únicamente con una columna simple de destilación, no conduce a una buena separación a menos que los compuestos tengan puntos de ebullición muy alejados. Por tal razón, se emplean columnas fraccionadoras, para mejorar la eficiencia de separación [40]. La destilación fraccionada se basa en el retorno de una parte del condensado a la columna de destilación conocido como reflujo, permitiendo el contacto íntimo entre el líquido que retorna y el vapor que asciende por la columna. La base fundamental de la destilación es el equilibrio físico entre las fases líquido y vapor del sistema [41].

1.5.1. Destilación a presión reducida

La mayoría de las sustancias orgánicas, son afectadas por las altas temperaturas ya que se tienden a descomponer químicamente, inclusive a temperaturas cercanas a su punto de ebullición. Por tal razón, se hace necesario separarlas a temperaturas y presiones reducidas. Al reducir la presión de destilación, la temperatura de ebullición también disminuye como es sabido debido a la relación de transición de fase de primer orden que tiene lugar en un sistema monocomponente. El tiempo de destilación también juega un papel importante ya que debe ser pequeño para tratar de evitar la descomposición térmica de las moléculas [41].

1.5.2. Destilación fraccionada de aceites esenciales

La destilación fraccionada de AE, es un método de separación que permite obtener fracciones o particiones, concentradas en algunos componentes del AE. Esto facilita la estandarización de la composición y su comercialización. Se debe garantizar una baja presión de operación, debido a que varios de los componentes que conforman a los AEs tienen puntos de ebullición por encima de 200 °C y así se evita su polimerización y descomposición [42].

La aplicación más importante a nivel comercial es la destilación de aceites cítricos [43]. La destilación logra mejorar la calidad organoléptica del AE al concentrar los compuestos oxigenados (aldehídos, alcoholes, ésteres y cetonas). Entre más destilados o fracciones se obtengan, mayor cantidad de terpenos son removidos, lo que resulta en un producto más estable y soluble en agua [44]. Estudios realizados al AE de naranja dulce, en una columna rellena de anillos *Rasching* a 80 °C y con una relación de reflujo de 0,25-0,75, tuvieron sus mejores condiciones de operación a presiones de 7 y 15 mmHg, para lograr fracciones de menor concentración de monoterpenos y con un alto contenido de monoterpenos oxigenados [45]. En la destilación fraccionada al vacío, por lotes, del AE de bayas de enebro en una columna de 36 platos teóricos, se obtuvieron 14 fracciones, donde las seis primeras fueron enriquecidas en más del 98,3 % en masa de α -pineno y las otras fracciones aumentaron su contenido en sabineno, mirceno y limoneno [46]. Con las fracciones de mayor concentración de α -pineno, lograron aumentar la actividad antiinflamatoria, antiséptica y antibacteriana de productos bioactivos en la industria farmacéutica [47]. Así mismo, se ha comprobado que utilizando la destilación fraccionada, la tasa de recuperación de pachulol en el AE de pachulí (sesquiterpeno tricíclico utilizado en la perfumería), ha superado el rendimiento logrado con métodos tradicionales los cuales generan mayor impacto ambiental. La destilación fraccionada es un proceso de separación altamente eficiente y libre de disolventes [48].

1.5.3. *Spinning Band Distillation, SBD*

Es un tipo específico de columna de destilación compuesta de un material inerte, que gira a lo largo del interior de la columna. Generalmente se utiliza un tornillo sin fin con forma de espiral, que al rotar genera un leve contacto con las paredes del equipo. La forma espiral que tiene el tornillo sin fin da una apariencia de elongaciones helicoidales, que producen una fuerza axial cuando éste gira a altas revoluciones. Esto permite que el reflujo descienda rápida y uniformemente por las paredes de la columna, de manera que se previene la inundación cuando se opera con un flujo de vapor elevado, logrando una mayor eficiencia en una columna de menor dimensión que las que se usan convencionalmente [49]. Las principales características de esta técnica son:

- **Alta pureza.** Se pueden diseñar columnas SBD, que logren hasta 100 platos teóricos con el propósito de obtener destilados con alta pureza y para separar componentes con puntos de ebullición cercanos.
- **Bajo “Hold up”.** se pierde muy poca cantidad de material valioso en el proceso de purificación.
- **Baja caída de presión.** La caída de presión desde la parte superior hasta el fondo, es muy baja, comparada con una torre empacada. Esto resulta ventajoso cuando se trabaja con sustancias muy sensibles a cambios bruscos de temperatura o presión.

Las bandas rotatorias, pueden ser de metal o de teflón, la de teflón se usa para destilaciones por debajo de 225 °C, siendo la ideal para destilar AEs. Otras aplicaciones son la destilación del petróleo crudo y el reciclado de disolventes que a menudo utilizan esta técnica cuando se requieren fracciones de alta pureza [50].

2. METODOLOGÍA

2.1 EQUIPO DE FRACCIONAMIENTO.

El fraccionamiento del AE se llevó a cabo en un equipo de destilación fraccionada a escala laboratorio (*B/R Instrument 800 - High Efficiency Micro Distillations*, BR Instrument Corporation, Easton, MD, EE.UU.), con una columna de vidrio de 0,34 m de altura, acompañada por un tornillo sinfín de teflón en forma de espiral (*spinning band*), con 30 etapas teóricas. El equipo consta de un balón de alimentación de 25 mL en el fondo de la columna, manta de calentamiento, condensador, válvula de reflujo y reservorio para coleccionar las fracciones con capacidad de hasta 4 viales de 4 mL. Los equipos auxiliares son: una bomba de vacío, un termómetro digital con dos termocuplas tipo K y un baño recirculatorio de enfriamiento (Véase **Anexo 1**).

2.2 PRUEBAS PRELIMINARES.

Se llevaron a cabo pruebas preliminares para evaluar la funcionalidad del *spinning* en el equipo de destilación fraccionada. Las pruebas se realizaron, usando una mezcla de composición conocida de 0,25 n-hexano y 0,75 n-heptano (fracción másica) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Se realizó el fraccionamiento de la mezcla por duplicado, manteniendo durante la destilación el *spinning* encendido o apagado. Para cada experimento se cargaron 12 g de la mezcla, la presión se mantuvo a condiciones atmosféricas.

2.3 OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE LO.

Todos los AEs se obtuvieron usando la metodología de destilación por arrastre con vapor. El material vegetal (MV) fue cosechado de parcelas piloto ubicadas en el campus central de la UIS. Se cosecharon cuatro lotes diferentes de LO, dos lotes correspondientes al quimiotipo timol y dos al quimiotipo carvacrol. Una vez colectado el MV se realizó su reducción de tamaño en una picadora PE-800

(Penagos, Girón, Colombia), el diámetro de picado usado fue de 0,9 cm. El MV fue extraído en equipos de destilación de 0,4 y 1 m³ de capacidad, ver **anexo 2**. En la **tabla 1** se presenta la cantidad de MV cargado de cada lote al equipo de destilación.

Tabla 1. Lotes de LO utilizados para la obtención de AE.

N° Lote	Quimiotipo	Capacidad del equipo [m ³]	Tipo de MV	Cantidad de MV [kg]
1	timol	0,4	seco	22,5
2	timol	0,4	seco	37
3	carvacrol	0,4	seco	64
4	carvacrol	1	fresco	241

Para separar el AE del hidrolato, se usó un sistema de vasos comunicantes llamado Florentino. El vapor se generó utilizando una caldera pirotubular vertical (*Tecnik*, Bogotá, Colombia) de 58,86 kW con una presión de diseño de 1,034 MPa y presión máxima de trabajo de 861 kPa. Todas las destilaciones se llevaron a cabo a presión de 552 kPa, durante 1,5 horas. El AE obtenido fue secado y limpiado de impurezas, empleando un montaje de filtración con sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄). Posteriormente el AE fue almacenado a 3°C.

2.4 DESTILACIÓN FRACCIONADA DEL AE DE LO.

2.4.1 Condiciones de operación

Se cargaron al balón de alimentación 10,00 ± 0,02 g de AE para todas las destilaciones. El baño de enfriamiento se mantuvo a -2 °C. La destilación iniciaba con una tasa de calentamiento en la manta del 15% y se aumentaba 5% cada 20 minutos, para mantener controlada la temperatura del fondo (T₁) y así evitar el sobrecalentamiento del AE y posterior inundación de la columna. El *spinning* se encendió a los 30 min de haber comenzado la destilación, tiempo en el que se formaba la primera gota en el tope de la columna. Las fracciones se colectaron cuando la temperatura del tope (T₂) se mantuvo constante durante más de 15 minutos, en ese punto se consideró que la fracción se encontraba en equilibrio. La

válvula de reflujo se abrió manualmente para coleccionar la fracción y se cerró cuando la T_2 disminuyó 10 °C por debajo de su valor en equilibrio. La presión de operación se mantuvo constante durante toda la prueba, según lo reportado por Lopes *et al.* [45]. La temperatura máxima de calentamiento fue de 120 °C, debido a que temperaturas superiores podrían haber afectado la calidad de los AEs [51].

2.4.2 Pruebas de reproducibilidad.

Se realizaron 6 destilaciones preliminares con AE de LO quimiotipo timol a presión de 7 Torr. Se cargaron 10,00 ± 0,02 g de AE con una concentración de timol al 55 % en peso. Con base en estos experimentos se elaboró un estudio de repetibilidad y reproducibilidad del sistema de medición de la temperatura máxima de calentamiento y de equilibrio alcanzadas en la primera fracción coleccionada. Las mediciones fueron tomadas por 2 operarios, usando un termómetro digital HH12A (Omega, Stamford CT, EE.UU) con una tolerancia de ± 1°C. Para realizar el estudio de repetibilidad y reproducibilidad se llevó a cabo un análisis de varianza **ANOVA**, que permitió calcular la variación del sistema de medición debida a la interacción entre operadores y temperaturas medidas. A partir de los valores obtenidos del ANOVA, se calculó la repetibilidad (r), la reproducibilidad (R), la interacción operador/medición (I) y la relación entre la repetibilidad y reproducibilidad (r&R), parámetro que determina si el sistema de medición es aceptable o no [52] (Véase, **Anexo 3**).

2.5 DISEÑO EXPERIMENTAL.

Para determinar los efectos de los parámetros que afectan la destilación fraccionada, se realizó un diseño de dos factores completamente aleatorizado, utilizando para su análisis la metodología de superficie de respuesta. Para cada quimiotipo se hicieron experimentos a diferentes presiones (3 - 11 Torr) y a diferentes composiciones iniciales de timol y carvacrol del AE dependiendo del quimiotipo. Los experimentos con AE de LO quimiotipo timol, se llevaron a cabo con AE de composiciones iniciales entre 53% y 61% en peso de timol según los valores

reportados por Stashenko *et al.* [24] para aceites de diferentes regiones geográficas de Colombia. Para el quimiotipo carvacrol se usaron Aes con composiciones iniciales entre 22% y 68% en peso de carvacrol según lo reportado por Agudelo *et al* [53] en su estudio sobre la diferencia en la composición del AE en Colombia cuando la planta es sometida a diferentes tratamientos externos de cultivo (densidad de siembra, época de corte, grado de fertilización, condiciones de extracción) y condiciones climáticas.

2.6. MODELAMIENTO.

Se realizaron modelos de regresión a partir de los resultados experimentales con el propósito de generar superficies de respuesta con las cuales se identificaran las regiones óptimas de fraccionamiento de cada uno de los quimiotipos de AE. El análisis se hizo teniendo en cuenta una respuesta que combinara aspectos de eficiencia de separación de los fenilpropanos de interés y tiempo de operación que está relacionado con los costos energéticos del proceso.

2.6.1 Validación y calibración.

La validación se hace con el objetivo de conocer la capacidad de predicción de los modelos de regresión. Se aplicó el método de validación cruzada dejando uno por fuera o *Leave one out* (LOO), que consiste en separar los experimentos dejando una prueba por fuera para con el resto conformar los datos de entrenamiento o *training set* [54] con los cuales se calculará un valor predicho del dato que no se tuvo en cuenta. Se utilizó un algoritmo de *Scilab* 5.3.3 creado por Arias y Ramírez [55] para encontrar los coeficientes y los parámetros estadísticos de regresión usando mínimos cuadrados. El R^2 (coeficiente de determinación), que explica la variabilidad explicada por el modelo sobre la variabilidad total de los experimentos, el R^2_{aj} (coeficiente de determinación ajustado), la suma del cuadrado de los residuales, el RMSEC (*Root Mean Square of Calibration*) fueron determinados para el modelo. Para determinar qué tan buena es la predicción del modelo se calculó el

coeficiente de correlación para los valores predichos Q^2 , usando la siguiente ecuación:

$$Q^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{training} (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^{training} (y_i - \bar{y}_i)^2} \quad (1)$$

Donde y_i , \hat{y}_i y \bar{y}_i son el valor de la respuesta experimental, predicha y promediado de todos los datos respectivamente. El Q^2 es un parámetro que indica el ajuste que posee el modelo calculado solo con datos predichos. [54].

2.7 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN POR GC-MS Y GC-FID.

Las muestras de AE se identificaron por cromatografía de gases utilizando un cromatógrafo *Agilent technologies 6890 Plus Series* (Palo Alto, CA, EE.UU.) acoplado a un detector selectivo de masas (MSD, EI, 70 eV, m/z 40-350). Se empleó una columna capilar apolar DB5-MS (*J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU*) con fase estacionaria de 5%fenilpoli(metilsiloxano), de 60 m x 0,25 mm, D.I x 2,25 μ m. Se utilizó como gas de arrastre, helio (99.995% Linde, Bogotá, Colombia), con flujo constante de 1 mL/min. La temperatura del horno de cromatografía fue programada de la siguiente manera: 45 °C (5 min) hasta 150 °C (2 min) a 4 °C/min, luego hasta 250 °C (5 min) a 5 °C/min, posteriormente, se llevó hasta 290 °C (60 min) a 10 °C/min. La identificación se realizó por comparación de espectros de masas, empleando las bases de datos *ADAMS*, *NIST* y *WILEY*; y por medio del cálculo de los índices de retención (IR), en relación a los tiempos de retención de una serie homologa de patrones de hidrocarburos desde C10 hasta C25, registrados a las mismas condiciones cromatográficas. Se comparó el IR calculado con el reportado en la literatura [56]. La ecuación empleada para el cálculo de IR, fue:

$$I_R = 100n + 100 \left(\frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \right) \quad (2)$$

Dónde, I_R : Índice de retención del compuesto de interés, n : Numero de átomos de carbono del n -alcano que eluye antes del compuesto de interés, t_{RN} : tiempo de retención del n -alcano que eluye después del compuesto de interés, t_{Rx} : tiempo de

retención del compuesto de interés, t_{Rn} : tiempo de retención del *n*-alcano que eluye antes del compuesto de interés.

Para la cuantificación de las fracciones de AE, se empleó un cromatógrafo de gases *Agilent technologies 6890 Plus* (Palo Alto, California, EE.UU.), equipado con un detector de ionización en llama (FID). Las condiciones de la columna, flujo del gas de arrastre y programación de temperatura del horno fueron iguales a las usadas en análisis de GC-MS. La cuantificación se llevó a cabo usando como patrón interno *n*-tetradecano, (*Istd* por sus siglas en inglés, 99%, *Sigma Aldrich*). La preparación de la muestra se realizó con 50 mg de muestra y aforando a 1 mL con solución stock (20 mg de *Istd* aforados a 10 mL de diclorometano).

La concentración de cada uno de los compuestos se determinó con base en la Ecuación 3, donde las áreas de los compuestos se compararon con el área del patrón interno. Se supuso que la respuesta del detector, para el *Istd* y los compuestos es similar.

$$C_X = \frac{C_A \times A_X}{A_A} \quad (3)$$

Donde, C_X : concentración del compuesto de interés (mg/mL), C_A : concentración del estándar interno (mg/mL), A_X : área del compuesto de interés, A_A : área del estándar interno.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 PRUEBAS PRELIMINARES

Para la destilación fraccionada de la mezcla hexano-heptano, se obtuvieron dos fracciones más la fracción de fondo. Al ser el heptano un hidrocarburo con mayor peso molecular y con menor volatilidad, se espera que éste se mantenga en el fondo de la columna y que las fracciones obtenidas sean ricas en hexano. En la **figura 1a**, que muestra los resultados de la composición para cuando no se enciende el *spinning*, no se logró separar eficientemente los componentes con puntos de ebullición cercanos. Para cuando se enciende el *spinning*, en cambio, la distribución del componente más volátil se mantiene en su mayoría en las fracciones y el menos volátil en los fondos, Véase **figura 1b**. Con esto se ratifica la importancia del uso del *spinning* en la separación de las moléculas al mejorar el área de contacto entre el vapor que asciende y el líquido que desciende.

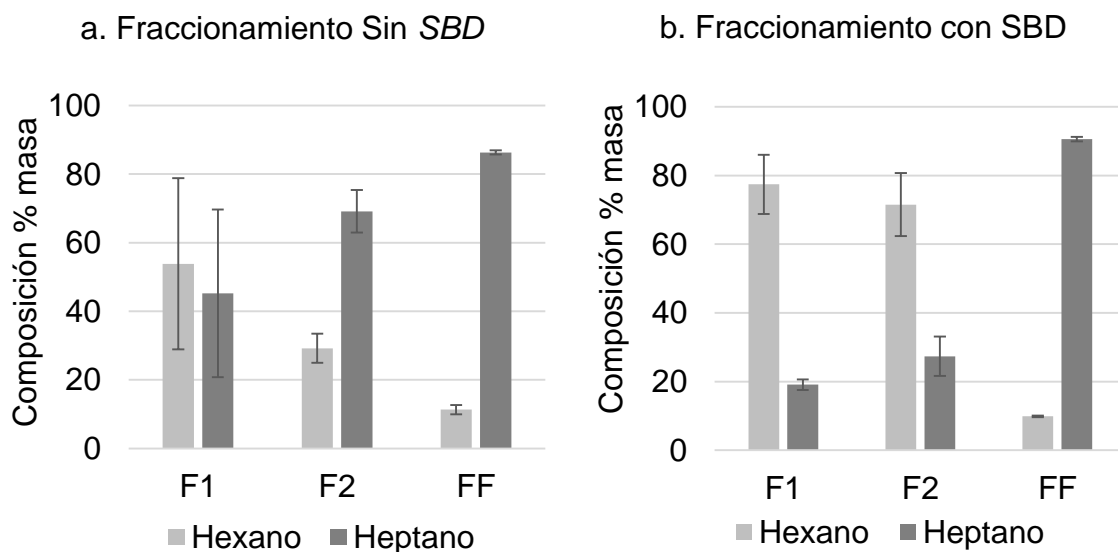


Figura 1. Promedio de la cantidad en % peso de hexano y heptano en cada fracción, a presión atmosférica, con y sin SBD.

3.2 OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE LO.

La masa de AE obtenido sobre la masa de MV cargado al destilador por cien corresponde al porcentaje de rendimiento de extracción del AE. En la **tabla 2** se muestran los valores de rendimiento de AE de LO para los dos quimiotipos junto con el estado del MV antes de ser destilado.

Tabla 2. Rendimiento de obtención de AE de LO.

N° Lote	Quimiotipo	Capacidad del equipo [m3]	tipo de MV	Rendimiento [%]
1	timol	0,4	seco	0,87
2	timol	0,4	seco	0,85
3	carvacrol	0,4	seco	0,63
4	carvacrol	1	fresco	0,35

Se obtuvo mayor rendimiento en la obtención de AE cuando el MV cargado estaba seco, lo que concuerda con Mejía *et al.* [57] quienes reportaron que para especies vegetales aromáticas secar el material a la sombra durante mínimo diez días, genera un mayor rendimiento de obtención del AE al reducir el contenido de agua en la matriz, además que los aceites obtenidos tienen menor contenido de monoterpenos [57].

3.2.1 Composición de los AEs de LO quimiotipos timol y carvacrol.

En la **tabla 6** se muestran los principales componentes que conforman la mezcla del AE de LO para cada quimiotipo. Se encontró que para todos los AEs extraídos siempre se mantuvo el mismo número de componentes con diferencias en la composición. Sin embargo, la suma de la composición del timol, carvacrol y sus precursores biogénicos ρ -cimeno y γ -terpineno se mantuvo entre el 63 y 64 % lo cual concuerda con lo estudiado por Burt *et al.*, quienes encontraron que la composición de estos cuatro compuestos en una especie de orégano griego procedentes de diferentes regiones geográficas no variaba, sino que permanecía estable en diferentes temporadas de cosecha. [32]. Como se observa en la **tabla 3**, el timol y el carvacrol son los compuestos mayoritarios del AE, del cual se derivan sus quimiotipos.

Tabla 3. Composición típica del AE de LO quimiotipos timol y carvacrol, componentes con más del 1% en peso.

IR calculado	IR teórico *	Compuestos	Quimiotipo timol		Quimiotipo carvacrol	
			mg/ml	% peso	mg/ml	% peso
992	991	β -Mirceno	0,66	1,3	0,72	1,4
1030	1025	<i>p</i> -Cimeno	2,24	4,5	5,43	10,8
1064	1060	γ -Terpineno	1,09	2,2	1,76	3,5
1293	1291	Timol	27,66	55,0	3,30	6,6
1308	1299	Carvacrol	1,53	3,0	23,04	45,7
1443	1436	<i>trans</i> - α -Bergamoteno	2,62	5,2	1,26	2,5
1476	1461	<i>allo</i> -Aromadendreno	1,34	2,7	0,72	1,4
1520	1513	γ -Cadineno			0,62	1,2
1610	1581	Óxido de cariofileno	0,56	1,1	1,22	2,4
1637	1640	<i>epi</i> - α -Cadinol,			0,55	1,1
		Otros		20,0		18,4

* Media del valor de IR reportado por Zenkevich [56].

3.3 DESTILACIÓN FRACCIONADA DEL AE DE LO

3.3.1. Pruebas de reproducibilidad.

Para las pruebas de reproducibilidad hechas con AE quimiotipo timol, se logró coleccionar 3 fracciones más la fracción de fondo. De $10,00 \pm 0,02$ g de AE cargado, se pierden $0,61 \pm 0,19$ g de AE. Esta cantidad representa un 6% del total del aceite original. Estas pérdidas en el proceso de fraccionamiento ocurren por un lado debido a que la succión creada por la bomba, arrastra las moléculas más livianas a la trampa de vacío y por otro a la cantidad de AE que se queda impregnada en las paredes del equipo, típico de un proceso discontinuo. En la **tabla 4** se muestra la masa de las fracciones coleccionadas de los experimentos de reproducibilidad junto con la composición de los componentes mayoritarios.

En las primeras dos fracciones se obtuvieron los compuestos de menor punto de ebullición como el *p*-cimeno, γ -terpineno y el mirceno. Componentes que corresponden a la familia de los monoterpenos, los cuales predominan en las fracciones de los AEs separadas a bajas temperaturas de ebullición (30-45 °C) [51].

Tabla 4. Resultados de la composición del AE de LO timol y fracciones obtenidas por destilación fraccionada. Condiciones: 7 Torr, 10 g de alimentación. Total experimentos: 6.

Fracción	Cantidad de AE obtenido [g]	p-Cimeno [% peso]	γ-terpineno [% peso]	Timol [% peso]	Carvacrol [% peso]
Fracción 1	0,8 ± 0,03	30,8 ± 0,57	12,2 ± 0,62	0,00	0,00
Fracción 2	0,2 ± 0,03	35,9 ± 0,59	20,1 ± 0,84	0,00	0,00
Fracción 3	0,6 ± 0,07	10,1 ± 0,71	7,0 ± 0,38	23,4 ± 0,58	0,7 ± 0,14
Fracción de Fondo	7,8 ± 0,19	0,00	0,00	64,5 ± 0,88	3,7 ± 0,14

El timol, fenilpropano de interés en este aceite, se logró separar en la tercera fracción colectada. Sin embargo, la mayor concentración se obtuvo en la fracción de fondos, tal como en el AE de carvacrol del que se hablará más adelante. En la **Figura 2**, se presentan las composiciones de los cuatro componentes mayoritarios del AE de LO quimiotipo timol, para cada una de las fracciones colectadas y del AE antes de ser fraccionado con 55% en peso de timol. Además, se observa un aumento en la concentración del 16,4% en peso de timol en la fracción de fondo. En el **anexo 4** se presentan los perfiles cromatográficos típicos de los AEs de LO quimiotipos timol y carvacrol junto con los de las fracciones obtenidas.

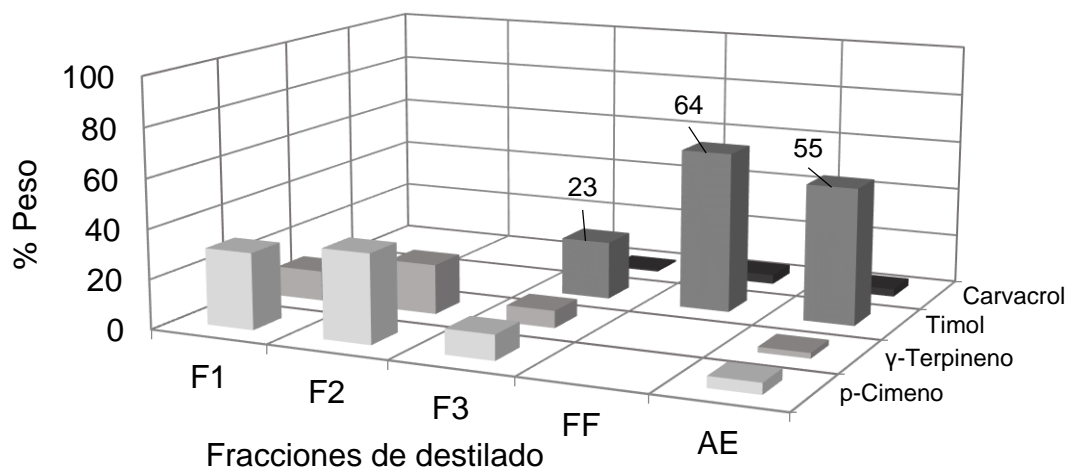


Figura 2. Distribución de la composición en las fracciones colectadas para AE de LO quimiotipo timol a 7 Torr.

3.3.2 Determinación de la reproducibilidad y repetibilidad del sistema de medición

A partir de las pruebas anteriores se llevó a cabo un estudio de repetibilidad y reproducibilidad, con el propósito de hallar un sistema de medición con un mayor grado de concordancia entre experimentos y que permitió la validación de la metodología de operación del equipo de destilación fraccionada, (Véase **Anexo 5**). En la **Tabla 5** Se muestran repetibilidad y reproducibilidad del sistema de medición de la temperatura máxima de calentamiento y de equilibrio alcanzadas en la primera fracción colectada.

Tabla 5. Reproducibilidad y repetibilidad del sistema de medición del fraccionamiento de LO.

Parámetros	temperatura de equilibrio en la fracción 1	temperatura máxima de calentamiento del AE
Repetibilidad r	2,97	3,43
Reproducibilidad R	1,57	2,22
Interacción	4,60	3,90
r&R	5,69	5,65
% r&R	5,68%	5,65%

Se observa un porcentaje de relación entre la repetibilidad y reproducibilidad (%r&R) menor del 10% para ambas temperaturas, lo que significa que el sistema de medición es aceptable según lo reportado por Arbeláez *et al.* [52]. Por lo tanto, la relación operador/instrumento es la apropiada para la aplicación del sistema de medición utilizado. Para ambas mediciones, se encontró que el valor de la reproducibilidad es menor que el de la repetibilidad; esto indica que hay menor variación en las medidas sobre una misma lectura realizadas por los dos operarios. Como la temperatura de equilibrio no varía para una respectiva fracción entre destilaciones, garantiza que los componentes que tengan puntos de ebullición cercanos a esta temperatura ebullican y así se obtengan concentraciones estándares de carvacrol o timol en la fracción de fondo.

3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

3.4.1 Análisis de varianza.

Se evaluó la significancia estadística de las interacciones de los parámetros que influyeron sobre la destilación fraccionada de AE de LO quimiotipos timol y carvacrol. Para esto fue necesario encontrar si el valor-p (significancia observada), era menor que 0,05 para cada parámetro e interacción indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%.

A partir de los resultados experimentales se construyó una respuesta combinada (Y) para la destilación fraccionada de AE de LO para cada quimiotipo. La respuesta combinada que mejor se ajustó para el quimiotipo timol está conformada por: un 30 % de la concentración de timol en la fracción de fondo (C_{FT}), 40 % del tiempo de operación (t) y 30% del rendimiento de recuperación del timol en la fracción de fondo (R). R es una relación peso a peso de la masa de timol en la fracción de fondo sobre la masa total de timol en todas las fracciones. En la **Tabla 6** se muestra que la concentración inicial de timol en el AE, fue el parámetro con mayor significancia (valor-p<0,05), sobre la respuesta combinada del proceso de destilación fraccionada. El cambio en la varianza para la presión no fue suficientemente grande comparado con el error experimental, para que fuese significativo sobre el observable combinado. Pero, se observa que la interacción entre la presión y la concentración inicial si presentó efecto.

Tabla 6. Análisis de varianza sobre la respuesta de la destilación fraccionada de AE quimiotipo timol.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
P	0,013	1	0,013	3,47	0,1118
C_{iT}	0,082	1	0,082	22,05	0,0033
PP	0,109	1	0,109	29,32	0,0016
$P C_{iT}$	0,045	1	0,045	12,11	0,0131
$C_{iT} C_{iT}$	0,178	1	0,178	47,97	0,0004
Error total	0,022	6	0,004		
Total (corr.)	0,397	11			

P: presión, C_{iT} : concentración inicial de timol en el AE.

Para la respuesta combinada de AE quimiotipo carvacrol, no se tuvo en cuenta el rendimiento de recuperación de carvacrol en la fracción de fondo, pues el valor de esta variable resultante se mantuvo constante e igual a 1, debido a que este componente no se encontró en las demás fracciones y se enriqueció solo en la fracción de fondo. La respuesta que mejor se ajustó para este quimiotipo tiene un peso uno a uno de la concentración de carvacrol en la fracción de fondo (C_{Fc}) y el tiempo de operación (t). Como se observa en la **Tabla 7** la presión y la concentración inicial de carvacrol en el AE cargado en cada destilación, no presentaron significancia sobre la respuesta combinada, comparada con el error experimental.

Tabla 7. Análisis de varianza sobre la respuesta de la destilación fraccionada de AE quimiotipo carvacrol.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
P	0,010	1	0,010	0,71	0,448
C_{ic}	0,009	1	0,009	0,66	0,461
PP	0,024	1	0,024	1,72	0,260
$P C_{ic}$	0,011	1	0,011	0,8	0,422
$C_{ic} C_{ic}$	0,031	1	0,031	2,16	0,215
Error total	0,057	4	0,014		
Total (corr.)	0,169	9			

P: presión, C_{ic} : concentración inicial de carvacrol en el AE.

3.5. MODELOS DE REGRESIÓN.

Se ajustaron 120 modelos de regresión para el quimiotipo timol y 219 para el quimiotipo carvacrol, que describieron la relación entre la respuesta combinada y 7 variables predictoras constituidas por la concentración inicial de los fenilpropanos de interés en el AE, la presión de operación y las interacciones entre ellas. Se escogieron aquellos modelos que presentaron el menor número de coeficientes de regresión y el mayor $R^2_{ajustado}$. Para el quimiotipo timol Se seleccionó el modelo que presento un valor de $R^2_{ajustado}$ de 0,94 y con seis términos. En las **Tablas 8 y 9** se presentan los resultados experimentales y predichos por los modelos para cada quimiotipo.

Tabla 8. Resultados experimentales y predichos para la respuesta de AE quimiotipo timol.

NE	Presión [Torr]	C _{IT} [% peso]	Respuesta Y: (30% C _{FT} + 30% R + 40% 1/t)				
			C _{FT} [% peso]	R [%]	t [horas]	Y [exp]	Y [pred]
1	3	55,0	62,4	0,74	4,8	0,31	0,34
2	7	55,0	66,1	0,97	6,2	0,48	0,48
3	7	55,0	63,2	0,98	5,3	0,49	0,48
4	7	55,0	64,7	0,97	7,1	0,45	0,48
5	7	55,0	65,0	0,97	6,0	0,47	0,48
6	11	55,0	62,3	0,61	11,3	0,10	0,08
7	9	56,5	77,0	1,00	4,8	0,67	0,70
8	8	46,8	79,8	1,00	3,8	0,75	0,98
9	5	57,1	81,2	1,00	4,0	0,76	0,73
10	7	47,9	62,5	1,00	4,5	0,53	0,54
11	4	44,5	53,5	1,00	2,0	0,70	0,69
12	5	55,3	68,0	1,00	6,1	0,53	0,51

NE: número de experimentos, C_{IT}: concentración inicial de timol en AE, exp: experimental, pred: predicho.

Tabla 9. Resultados experimentales y predichos para la respuesta de AE quimiotipo carvacrol.

NE	Presión [Torr]	C _{IC} [%peso]	Respuesta Y: (50% C _{FC} + 50% 1/t)			
			C _{FC} [%peso]	t [horas]	Y [exp]	Y [pred]
1	3	45,7	55,0	6,17	0,36	0,37
2	3	45,7	50,7	4,75	0,38	0,37
3	7	45,7	60,3	5,58	0,58	0,58
4	11	45,7	50,8	5,17	0,33	0,32
5	9	47,6	58,6	4,42	0,67	0,77
6	10	37,6	46,4	3,42	0,50	0,51
7	8	50,4	51,6	3,75	0,58	0,58
8	9	33,3	59,1	4,50	0,67	0,67
9	8	39,4	53,9	6,42	0,31	0,31
10	10	49,0	62,6	7,67	0,50	0,50

A partir de los resultados de las **tablas 8 y 9**, se realizó un análisis sobre el valor agregado del AE después del fraccionamiento, empleando como punto de partida los precios de los AEs más usados comercialmente por su contenido en timol y carvacrol, como el AE de *Thymus zygis* con 50,4 % en peso de timol (81,62 dólares por kilogramo) y *Origanum vulgare* con composiciones entre 60-65% en peso de carvacrol (45,57 dólares por kilogramo) [16]. Se encontró que para el AE de LO se logra un incremento en el precio del 60% después de aumentar la concentración en estos dos componentes a partir de la destilación fraccionada.

3.5.1 Validación.

Una vez se obtuvieron los modelos se procedió a hacer la validación de cada uno, con el objetivo de conocer la capacidad predicción de los modelos. El modelo para el quimiotipo timol se validó logrando un $R^2_{ajustado}$ de 0,98 y un valor de Q^2 de 0,70 que indica que hay un 30% de información que el modelo no logra predecir. Para el quimiotipo carvacrol se logró obtener un modelo validado con un valor $R^2_{ajustado}$ de 0,98 y un valor de Q^2 de 0,75. La **Tabla 10** muestra los modelos que mejor se ajustaron para los experimentos de AE quimiotipos timol y carvacrol; estos modelos permitieron analizar la superficie de respuesta para cada uno e identificar las regiones optimas de operación.

Tabla 10. Modelos de respuesta propuestos.

QUIMIOTIPO	MODELOS DE REGRESIÓN	
Timol	$Y = 0,641 - 0,636 \cdot C_{iT} + 3,151 \cdot P^2 - 5,424 \cdot P \cdot C_{iT} + 7,709 \cdot P \cdot C_{iT}^2 - 5,091 \cdot C_{iT} \cdot P^2$	
	RMSEC: $3,54 \cdot 10^{-4}$	$R^2 = 0,98$
	$Q^2 = 0,70$	$R^2_{aj} = 0,97$
Carvacrol	$Y = -1,372 - 2,967 \cdot P \cdot C_{iC} + 8,166 \cdot P^2 + 6,511 \cdot C_{iC}^2 - 6,057 \cdot P^3 - 4,418 \cdot C_{iC}^3$	
	RMSEC: $4,10 \cdot 10^{-5}$	$R^2 = 0,99$
	$Q^2 = 0,75$	$R^2_{aj} = 0,98$

El gráfico de superficie de respuesta generado a partir del modelo para el quimiotipo timol se muestra en la **figura 3**, llevado a cabo con la totalidad de experimentos, con valores normalizados de los rangos establecidos en la metodología. Allí se observa la tendencia de obtener una mejor respuesta sobre el proceso de fraccionamiento, cuando se destilan AEs con una concentración inicial de timol alta en el AE y se incrementa la presión; hasta llegar a un punto óptimo después del cual la respuesta desciende. Este comportamiento indica que valores de presión superiores al límite empleado en los experimentos, desfavorecen la respuesta del proceso de fraccionamiento. Esto se debe a que aumenta el tiempo de operación, lo que implica un aumento en el gasto energético, disminuye la concentración de timol en la fracción de fondo y disminuye la calidad del AE por sobrecalentamiento del mismo.

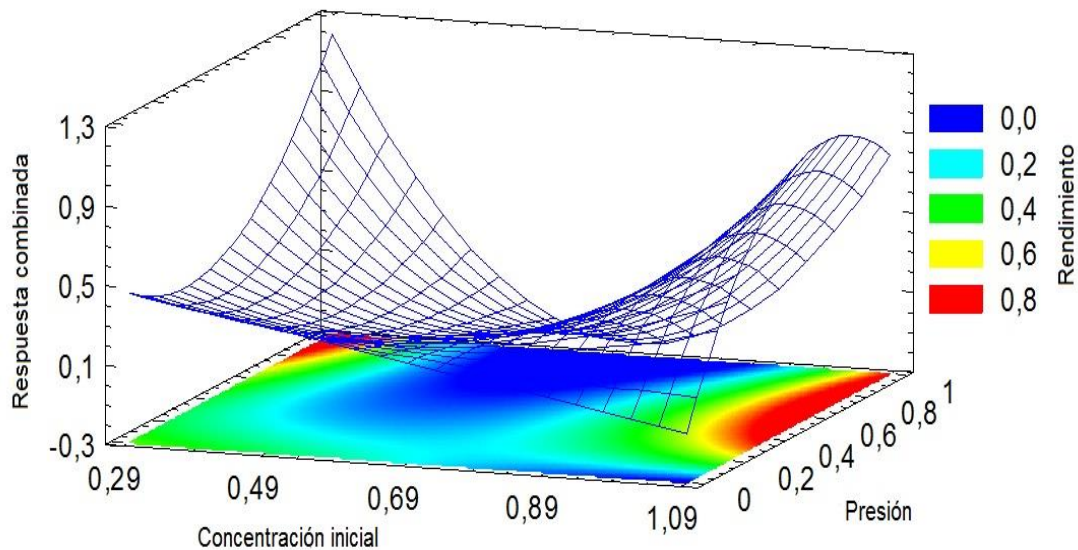


Figura 3. Superficie de respuesta del observable combinado Y del proceso de destilación fraccionada de AE de LO quimiotipo timol.

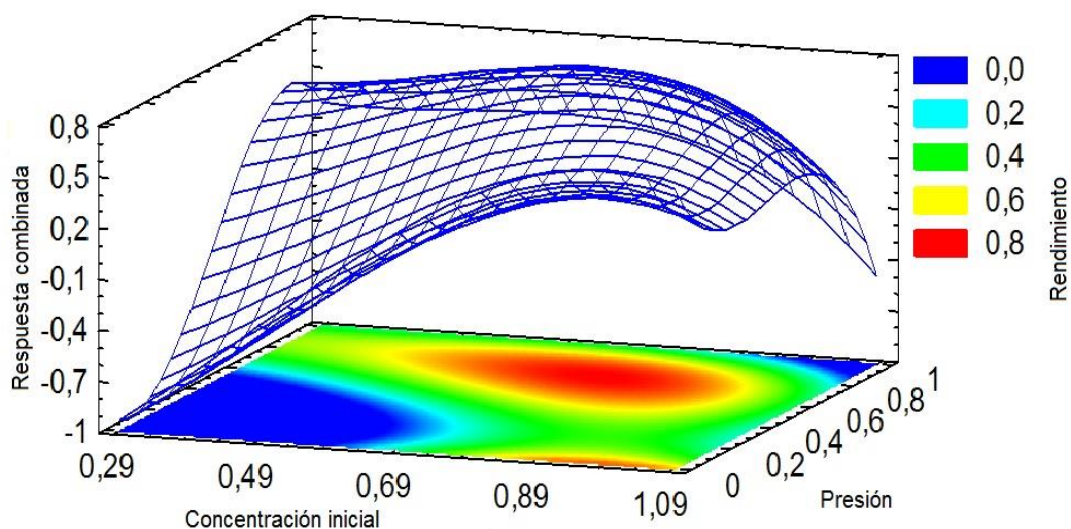


Figura 4. Superficie de respuesta del observable combinado Y del proceso de destilación fraccionada de AE de LO quimiotipo carvacrol.

A partir del modelo encontrado para el quimiotipo carvacrol, se generó un gráfico de superficie de respuesta el cual se muestra en la **figura 4**. En esta se observa una región óptima entre los rangos trabajados de concentración inicial del fenilpropano en el AE destilado y la presión de operación. Estas superficies de respuesta permitieron visualizar el comportamiento del proceso de destilación fraccionada del AE de LO y determinar las condiciones óptimas de presión para los valores mínimos y máximos de concentración inicial de los fenilpropanos de interés a los que se aplicó el diseño experimental, ver **tabla 11**.

Tabla 11. Valores óptimos de presión para la destilación fraccionada del AE de LO quimiotipos timol y carvacrol.

	Quimiotipo timol		Quimiotipo carvacrol	
	Min	Max	Min	Max
Concentración inicial del AE, % Peso	44%	55%	33%	50%
Presión óptima , Torr	5	8	3	8

3.6 EFECTO DE LOS PARÁMETROS DE DESTILACIÓN FRACCIONADA.

3.6.1 Efecto de la presión.

Para el AE de LO quimiotipo timol se encontró que la interacción entre la presión y la concentración inicial del AE presentó efecto significativo sobre el observable combinado según lo indica el análisis de varianza (ver **tabla 6**). Esto coincide con lo observado en la superficie de respuesta, ver **figura 3**, donde se muestra que AEs con concentraciones bajas, tienen una mejor respuesta del proceso de destilación para valores altos de presión y para AEs de concentraciones altas la presión se incrementa hasta llegar a un punto óptimo, después del cual la respuesta desciende. Para el AE quimiotipo carvacrol se puede llevar a cabo el proceso de fraccionamiento en el rango de presión al cual se realizaron los experimentos, alcanzando una mejor respuesta a presiones entre 3 y 8 Torr.

En los experimentos con AE quimiotipo timol se observó que a una presión de 11 Torr, el tiempo de destilación fraccionada fue de 11 horas, siendo el de mayor duración de todos los experimentos. Para altas presiones de operación, por encima del rango seleccionado, se necesita mayor energía térmica para calentar el AE, elevándose la temperatura por encima de los 120°C, condición no deseada para mantener las propiedades cualitativas o fisicoquímicas del AE Según lo reportado por Lopes *et al.* [45]. Además, periodos de tiempo largos, generan un alto costo energético y pueden provocar la polimerización y descomposición del AE [51].

3.6.2 Efecto de la concentración inicial de timol y de carvacrol en el AE.

La concentración inicial de timol en el AE alimentado, fue la variable que presentó un efecto significativo sobre la respuesta de destilación fraccionada de AE de LO quimiotipo timol. Esto debido a que la columna de destilación SBD, tiene como principio separar compuestos volátiles de bajo peso molecular, los cuales se presentan en mayor proporción en el AE de timol (ver **Tabla 6**). Estos compuestos livianos según su naturaleza química suelen ser los monoterpenos como el mirceno, γ -terpineno y el *p*-cimeno, componentes que se caracterizan por su bajo peso molecular con respecto al timol y mayoritarios en las dos primeras fracciones según

los resultados de los experimentos. Además, se observa en la **Tabla 8** que para una concentración inicial de timol en el AE de 57% se alcanza una concentración en la fracción de fondos 81% en timol, siendo uno de los experimentos donde se logra la mayor cantidad de este componente; esto implica el hecho de que en ese experimento en la fracción 1 se logró concentrar en un 42% en *p*-cimeno y 16% en γ -terpineno. Caso contrario para la concentración inicial de carvacrol en el AE alimentado, puesto que fue el factor con el menor efecto relevante como se puede evidenciar en el análisis de varianza (ver **Tabla 7**).

4. CONCLUSIONES

La destilación fraccionada de AE de LO quimiotipo timol, aplicando la técnica SBD, logró la separación del timol a partir de la tercera fracción colectada y se obtuvo con mayor concentración en la fracción de fondo. La mayor concentración de timol alcanzada en la fracción de fondo fue de 81% en peso a una presión de 5 Torr. Para el AE quimiotipo carvacrol se enriqueció solo la fracción de fondos en carvacrol y la mayor concentración fue de 62% en peso, a una presión de 10 Torr.

La fracción de fondo para ambos quimiotipos, resulto ser el 78% de la masa de AE que se cargó en la destilación fraccionada, siendo esta fracción el producto de interés. Se encontró que la masa de carvacrol en el AE cargado se mantuvo igual en el producto, mientras que el timol presentó una disminución del 6% en masa, la cual corresponde a la obtenida en la tercera fracción. A partir del fraccionamiento se puede lograr un incremento en la concentración hasta del 40% para el quimiotipo timol y hasta un 26% para el quimiotipo carvacrol, utilizando los mejores valores de presión encontrados mediante los modelos ajustados, para AEs de LO de plantas nativas colombianas. Por todo esto fue posible estandarizar la composición de los AEs, lo cual permite ofrecer un producto que se ajuste a los requerimientos del mercado y le da un valor agregado al aumentar el precio en un 60% de su valor inicial.

Se ajustaron modelos de regresión, con una aceptable capacidad de predicción de los resultados del proceso de fraccionamiento del AE de LO. Estos modelos ofrecen información sobre la concentración del producto, aspectos económicos representados en el gasto energético y la calidad del aceite fraccionado. Las superficies de respuesta representadas a partir de los modelos para los dos quimiotipos trabajados, permitieron visualizar las regiones óptimas en el proceso de destilación fraccionada, para los rangos de concentración en timol y carvacrol en los AEs. Los resultados de este trabajo marcan la viabilidad del escalamiento de la destilación fraccionada de AEs de plantas nativas de Colombia con componentes de interés comercial.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BOUCHER, F. Los productos nutraceuticos: oportunidad para los recursos naturales autóctonos el papel de los investigadores. En: *Red tecnológica agroindustrial alimentaria*. Mayo, 1999. P. 14.
- [2] INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN DE RECURSOS BIOLÓGICOS ALEXANDER VON HUMBOLDT. Informe sobre el estado de los recursos naturales renovables y del ambiente, componente de biodiversidad 2010-2011. Bogotá D.C. 2012. P. 6.
- [3] AVELLANEDA, G. y ROA, G. Estudio de la estructura de mercado para la comercialización de aceites esenciales en Colombia. Trabajo de grado economía. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de ciencias humanas. 2008, 95 p.
- [4] GONZÁLES, J. Colombia: un puente con oriente. En: *proColombia*. 2015. no. 25, p. 21-25.
- [5] SOSTENIBLE, B. Estudio del mercado colombiano de aceites esenciales. *Instituto de investigación de recursos biológicos Alexander Von Humboldt, Bogotá, Colombia* 2003. pp.109.
- [6] STASHENKO, E. Aceites esenciales: el espíritu de las plantas. En: *Innovación y Ciencia*. 2010. no. 17, p. 28-43.
- [7] D'ANTUONO, F.L., GALLETTI, G.C. y BOCCHINI, P. Variability of essential oil content and composition of *Origanum vulgare* L. populations from a north mediterranean area (Liguria Region, Northern Italy). En: *Ann. Bot.* 2000. no. 86, p. 471-478.
- [8] OLIVEIRA, D., LEITÃO, G., BIZZO, H., LOPES, D., ALVIANO, D., ALVIANO, C. y LEITÃO, S. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. En: *Food chemistry*. 2007. no. 101, p. 236–240.

[9] VICUÑA, G., STASHENKO, E. y FUENTES, J. Chemical composition of the *Lippia organoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. En: *Fitoterapia*. 2010. no. 81, p. 343-349.

[10] AROMAS QUE CURAN, Aroma terapia y aceites esenciales, Otros, Quimiotipos 2da parte, [Sitio en internet] disponible en: <http://aromasquecuran.es/otrosparasabermasquimiotipossegundaparte.html>.

Fecha de consulta: 13 de mayo de 2015.

[11] BETANCUR, L., ZAPATA, B., BAENA, A; BUENO, J., RUÍZ, C., STASHENKO, E. y MESA, A. Antifungal, cytotoxic and chemical analyses of essential oils of *Lippia organoides* H.B.K grown in Colombia. En: *Revista de la Universidad Industrial de Santander, Salud*. 2011. no. 43, p. 141-148.

[12] MUÑOZ, A; KOUZNETSOV, V. y STASHENKO, E. composición y capacidad antioxidante *in-vitro* de aceites esenciales ricos en timol, carvacrol, trans-anetol o estragol. En: *Revista de la universidad industrial de Santander, salud*. 2009. no. 41, p. 287-294.

[13] OVIEDO, L. A. Biotransformación de los sustratos timol y carvacrol mediante el hongo fitopatógeno *colletotrichum acutatum*. Trabajo de grado en maestría de ciencias químicas. Medellín: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. 2014, 111 p.

[14] IRIBARREN, O.A., SALOMONE, H.E. y ZAMAR, S.D. Operation planning in the rectification of essential oils. En: *Journal of Food Engineering*. 2005. no. 69, p. 207-215.

[15] ELDER, H. Optimización de procesos extractivos aplicados a especies vegetales aromáticas y medicinales, buenas prácticas de operaciones unitarias. En: *Dellacassa, E. (Org.)*. 2010. p. 317-62.

- [16] New directions aromatics, [Sitio en internet] disponible en: http://www.newdirectionsaromatics.com/oils-essential-oils-oz-c-9_29.html. Fecha de consulta: 23 de julio de 2015.
- [17] Spinning Band Distillation, [sitio de internet] disponible en: <https://www.brinstrument.com/fractional-distillation/spinning-band-distillation.html>. Fecha de consulta: 16 de mayo de 2015.
- [18] RODRÍGUEZ, M., ALCARÁZ, L. y REAL, S. Procedimientos para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas. Proyecto SAGARPA-CONACYT, Baja California Sur, México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. 2012, 38 p.
- [19] BANDONI, A. Generalidades sobre los procesos extractivos utilizados en la obtención de aceites esenciales. En: Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Buenos Aires.: Red de Editoriales Universitarias, 2002. p. 136-158.
- [20] GIMPSEY, J. A., DOUGLAS, M. H., van KLINK, J. W., BEAVREGARD, D.A., and PERRY, N.B. Seasonal variation in essential oil yield and composition from naturalized *Thymus vulgaris* L. in New Zealand. En: *Flavour and Fragrance Journal*. 1994. no. 9, p. 347-352.
- [21] CRONQUIST, A. On the taxonomic significance of secondary metabolites in angiosperms. En: *Flowering Plants*. Springer Vienna, 1997. p. 179-189.
- [22] STASHENKO, E., Aceites esenciales. Primera edición. Capítulo 1, Generalidades, pp. 16,17. 2009.
- [23] DANE. Dirección de difusión, mercadeo y cultura estadística, exportaciones e importaciones colombianas por partidas arancelarias y países de destino, [Sitio en internet] disponible en: <http://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/comercio-internacional>. Fecha de consulta: 21 de mayo de 2015.

- [24] STASHENKO, E., MARTÍNEZ, J. R., RUÍZ, C. A., ARIAS, G., DURÁN, C., SALGAR, W. y CALA, M. *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. En: *Journal of Separation Science*. 2010. no. 33, p. 93–103.
- [25] OLIVEIRA, D., LEITÃO, G., FERNANDES, P. y LEITÃO, S. Ethnopharmacological studies of *Lippia origanoides*. En: *Brazilian journal of pharmacognosy*. 2014. no. 24, p. 206-214.
- [26] GUEVARA, R., ROSALES, J. y SANOJA, E. Vegetación pionera sobre rocas, un potencial biológico para la revegetación de áreas degradadas por la minería de hierro. En: *Interciencia*. 2005. no. 30, p. 644-652.
- [27] SORIA, A. C., ESTEBAN, J., MORALES, R., MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J., SNAZ, J., Validación estadística de la presencia en plantas de quimiotipos caracterizados por la concentración de componentes volátiles obtenida mediante GC-MS. En: *Botanica complutensis*. 2008. no. 32, p. 225-236.
- [28] BODIL, K., y THOMPSON, J., Do co-occurring plant species adapt to one another? The response of *Bromus erectus* to the presence of different *Thymus vulgaris* chemotypes. En: *Oecologia*. 2004. no. 141, p. 511-518.
- [29] VICUÑA, G., STASHENKO, E. y FUENTES, J. Chemical composition of the *Lippia origanoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. En: *Fitoterapia*. 2010. no. 81, p. 343-349.
- [30] DURÁN, C., MONSALVE, L., MARTÍNEZ, J. y STASHENKO, E. Estudio comparativo de la composición química de aceites esenciales de *lippia alba* provenientes de diferentes regiones de Colombia, y efecto del tiempo de destilación sobre la composición del aceite. En: *Scientia et Technica*. 2007. no. 33, p. 435-438.
- [31] ROJAS, J., MORALES, A., PASQUALE, S., MARQUEZ, A., RONDON, M., VERES, K., & MATHE, I. Comparative study of the chemical composition of the

essential oil of *lippia origanoides* collected in two different seasons in Venezuela. En: *Natural product communications*. 2006. no. 3, p. 205-207.

[32] BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. En: *International Journal of Food Microbiology*. 2004. no. 94, p. 223– 253.

[33] OLIVERO, J., CABALLERO, K., JARAMILLO, B. y STASHENKO, E. Repellent activity of the essential oils from *Lippia origanoides*, *Citrus sinensis* and *Cymbopogon nardus* cultivated in Colombia against *Tribolium castaneum*, Herbst. En: *Revista de la Universidad Industrial de Santander, Salud*. 2009. no. 41, p. 244-250.

[34] CHAVAN, P. S., y TUPE, S. G. Antifungal activity and mechanism of action of carvacrol and thymol against vineyard and wine spoilage yeasts. En: *Food Control*. 2014. no. 46, p. 115-120.

[35] ARUNASREE, K. M. Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. En: *Phytomedicine*. 2010. vol. 17, no 8, p. 581-588.

[36] GIANNENAS, I., TRIANTAFILLOU, E., STAVRAKAKIS, S., MARGARONI, M., MAVRIDIS, S., STEINER, T., y KARAGOUNI, E. Assessment of dietary supplementation with carvacrol or thymol containing feed additives on performance, intestinal microbiota and antioxidant status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). En: *Aquaculture*. 2012. no. 350, p. 26-32.

[37] XU, J., ZHOU, F., JI, B. P., PEI, R. S., y XU, N. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. En: *Letters in Applied Microbiology*. 2008. no. 47, p. 174-179.

[38] ROVETTO, G. Aplicaciones medicinales del tomillo. En: *Universidad, Ciencia y Sociedad*, 2010, vol. 1, p. 16.

- [39] BAYDAR, H., SAGDIC, O. y OZCKAN, G. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with comercial importance in Turkey. En: *Food control*. 2004. no. 15, p. 162-172.
- [40] Mc CABE, W.; SMITH, J; HARRIOTT, P. Operaciones unitarias en ingeniería química. Cuarta edición. Capítulo 18, Destilación. McGraw-Hill. 1991.
- [41] TREYBAL, R. Operaciones de transferencia de masa. Segunda edición. Capítulo 9. Destilación. McGraw-Hill. 1990.
- [42] MARÍN, N.A. adición de valor al aceite esencial de *Cymbopogon martinii* a través de procesos físico-químicos. Tesis de Maestría en Química. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Escuela de Química. 2013, p. 29-30.
- [43] STUARTA, G., LOPES, D. y DE OLIVEIRA, V. Deterpenation of Brazilian Orange Peel Oil by Vacuum Distillation. En: *Journal of the American oil Chemists' Society*. 2001. no. 78, p. 1041–1044.
- [44] LUNA, H. A. Obtención, caracterización y estudio de la desterpenación del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis*). Trabajo de grado en ingeniería Química. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de fisico-químicas. 2007, 72 p.
- [45] LOPES, D., RAGA, A. C., STUART, G. y DE OLIVEIRA, V. Influence of vacuum distillation parameters on the chemical composition of a five-fold sweet orange oil (*Citrus sinensis Osbeck*). En: *Journal of the American oil Chemists' Society*. 2003. no. 6, p. 408 – 411.
- [46] MILOJEVIĆ, S., GLIŠIĆ, S. y SKALA, D. The batch fractionation of *juniperus communis* L. essential oil: experimental study, mathematical simulation and process economy. En: *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*. 2010. no. 2, p. 183-191.

- [47] STANKOVIĆ, M. Z., VELJKOVIĆ, V. B. y LAZIĆ, M. Bioactive products of juniper fruit (*Juniperus communis* L.), Monography, Faculty of Technology in Leskovac, University of Niš, 1994 (in Serbian).
- [48] SU, Z. Q., WU, X. L., BAO, M. J., LI, C. W., KONG, S. Z., SU, Z. R. y CHEN, J. N. Isolation of (-)-patchouli alcohol from patchouli oil by fractional distillation and crystallization. En: *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2014. no. 3, p. 359-363.
- [49] AHMAD, F. Z. Extraction of gaharu essential oil using spinning band distillation. Tesis de Doctorado. Faculty of Chemical & Natural Resources Engineering, University College of Engineering & Technology Malaysia. 2006, p. 10-12.
- [50] Spinning Band Distillation, [sitio de internet] disponible en: <https://www.brinstrument.com/fractional-distillation/spinning-band-distillation.html>. Fecha de consulta: 16 de mayo de 2015.
- [51] Química de los aceites esenciales, Universidad de Jaén, [sitio de internet] disponible en: <http://www4.ujaen.es/~plinares/Prac%20AA%20EE.pdf>. Fecha de consulta: 22 de enero de 2015.
- [52] ARBELÁEZ, M. B; SALAZAR, O. A., & VARGAS, J. A. M. Método ANOVA utilizado para realizar el estudio de repetibilidad y reproducibilidad dentro del control de calidad de un sistema de medición. *Scientia et Technica*. 2007. 37. pp. 533-537.
- [53] AGUDELO, A, J. Análisis estadístico multivariado de las propiedades fisicoquímicas de tres aceites esenciales colombianos para el establecimiento de criterios de calidad. Tesis de maestría. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Escuela de Química. 2011, p. 54 -56.
- [54] TROPSHA, A; GRAMATICA, P., & GOMBAR, V. The importance of being Earnest: validations is the absolute essential for successfull application and interpretation of QSPR models. *QSAR & Combinatorial science*. 2003. 22. pp. 69 - 77.

[55] ARIAS, A, J., & RAMÍREZ, E. Obtención de extractos con CO₂ supercrítico a escala piloto de las especies: *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* y *Psidium guajava*. Tesis de pregrado. Escuela de Ingeniería Química, Universidad Industrial de Santander. 2012. pp. 58-59.

[56] BABUSHOK, V. I; LINSTROM, P. J; ZENKEVICH, I. G. Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils. En: *National Institute of Standards and Technology*, Gaithersburg. 2011. no. 40, p. 1-46.

[57] MEJÍA, O., JULIO, M., SÁNCHEZ, M. S., BONILLA, C. R., & VANEGAS, P. Efecto de la altura y frecuencia de corte y secado en el rendimiento y calidad del aceite esencial de pronto alivio. *Scientia et Technica*. 2004. 26. pp. 253-255.

ANEXOS

ANEXO 1. ESPECIFICACIONES DEL EQUIPO DE MICRODESTILACIÓN FRACCIONADA *B/R INSTRUMENT 800 HIGH EFFICIENCY MICRO DISTILLATIONS (EASTON, MD, EEUU).*

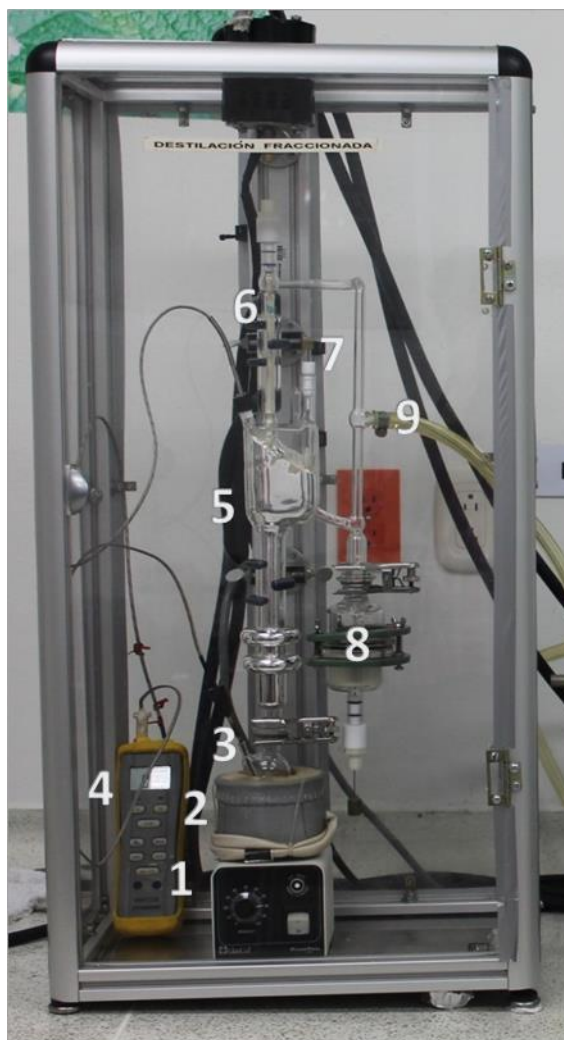


Figura 1. Sistema de destilación *B/R Instrument 800*

Consta de:

1. Manta de agitación magnética.
2. Manta de calentamiento, conectada a un controlador que opera por porcentaje.
3. Balón de alimentación, 25 mL, con pozo u ubicación para termocupla.

4. Termocupla para medir temperatura T1 y T2 en la torre
5. Columna de destilación fraccionada de vidrio dentro de la cual se encuentra una banda rotatoria de teflón, que simula los platos o etapas de separación. La columna posee una longitud de 20 cm, 7 mm de diámetro y 30 platos teóricos.
6. Sistema de condensación que opera con un baño de enfriamiento, con agua y propilenglicol.
7. Válvula manual de paso, para tomar las muestras (Fracciones de destilado).
8. Reservorio de muestras, **figura 2**, con capacidad para 4 viales de 4mL.

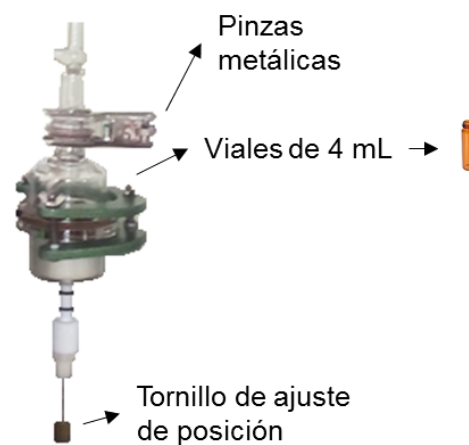


Figura 2. Reservorio de muestras de destilado

9. Sistema de vacío: bomba, válvulas de ajuste de presión y trampa de vapores.

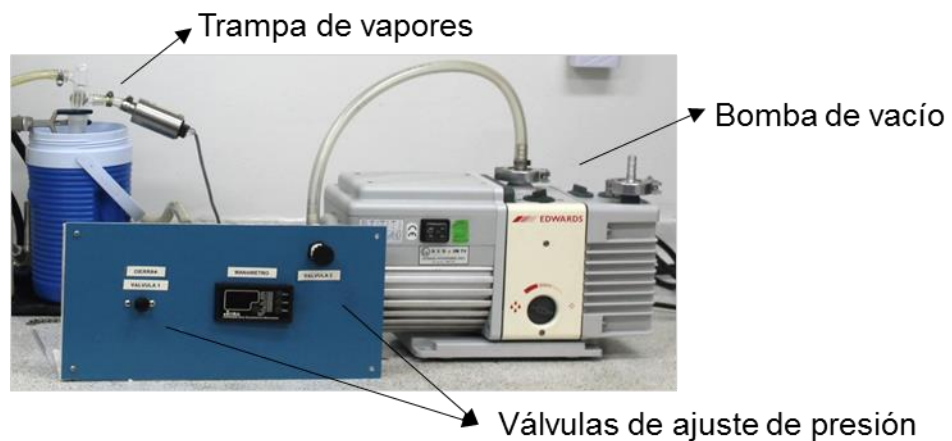


Figura 3. Sistema de vacío

ANEXO 2. MONTAJE DE DESTILACIÓN POR ARRASTRE CON VAPOR.



Figura 1. Equipo de destilación por arrastre con vapor, 0,4 m³.

1. Destilador: consta de un alambique o tanque cilíndrico con capacidad de 0,4 m³, donde se deposita el material vegetal (MV) a destilar, previamente picado; y por el cual entra vapor sobrecalentado que penetra las paredes celulares del MV, arrastrando consigo los metabolitos secundarios contenido en éste. En la parte superior emplea una tapa y cuello de cisne que minimiza la condensación de vapores dentro del alambique.

2. Condensador: Es de tipo, tubos y carcasa. Por el cual pasa el vapor proveniente del cuello de cisne y en donde se genera la transferencia de energía con el agua de enfriamiento.

3. Vaso florentino: Sistema de vasos comunicantes donde se separa el aceite esencial (AE) del vapor de agua condensada, proceso llevado a cabo por diferencia de densidad.

Se usa el mismo montaje para el equipo de 1 m³

ANEXO 3. MÉTODO ANOVA UTILIZADO PARA REALIZAR EL ESTUDIO DE REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD [45]

El estudio de repetibilidad y reproducibilidad debe iniciarse realizando un experimento diseñado estadísticamente; cualquier tipo de experimento desarrollado dentro de un proceso debe contener dos elementos:

- Partes o unidades del producto las cuales son seleccionadas por medio de un muestreo aleatorio.
- Cierta número de operadores que se seleccionan aleatoriamente, estos operadores son los encargados de realizar las mediciones sobre las partes varias veces.

La Tabla de Anova para un sistema de medición es la que se muestra en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Anova para un sistema de medición con dos factores

Fuente de variación	Suma cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios
Operador	SSA	$a - 1$	$MSA = \frac{SSA}{a - 1}$
Partes	SSB	$b - 1$	$MSB = \frac{SSB}{b - 1}$
Interacción	SSAB	$(a - 1)(b - 1)$	$MSAB = \frac{SSAB}{(a - 1)(b - 1)}$
Error	SSE	$ab(n - 1)$	$MSE = \frac{SSE}{ab(n - 1)}$
Total	SST	$N - 1$	

Donde: a es el número de operadores, b es el número de partes, n es el número de medidas para cada parte por cada operador y N es el número total de datos.

Después de obtener la Tabla del Anova, se procede a calcular la variación del sistema de medida, siguiendo los pasos:

1. La repetibilidad del sistema de medida dada por la ecuación 1.

$$r = 5,15 \sqrt{\text{MSE}} \quad (1)$$

2. El porcentaje de repetibilidad se calcula por medio de la ecuación 2.

$$\%r = \frac{r}{T} \times 100 \quad (2)$$

Donde T es la tolerancia de la característica medida.

3. La reproducibilidad del sistema de medida [3] está dada por la ecuación 3.

$$R = 5,15 \sqrt{\frac{\text{MSD} - \text{MSAB}}{bn}} \quad (3)$$

Nota: Si en algún caso el término de la raíz es un número negativo, entonces la reproducibilidad es cero.

4. El porcentaje de reproducibilidad se calcula por medio de la ecuación 4.

$$\%R = \frac{R}{T} \times 100 \quad (4)$$

Donde T es la tolerancia de la característica medida.

5. La interacción entre los operadores y las partes [3] se calcula por medio de la ecuación 5.

$$I = 5,15 \sqrt{\frac{\text{MSAB} - \text{MSE}}{n}} \quad (5)$$

Nota: Si en algún caso el término de la raíz es un número negativo, la interacción entre operadores y partes es cero.

6. El porcentaje de la interacción entre los operadores y las partes se calcula por medio de la ecuación (6).

$$\% I = \frac{I}{T} \times 100\% \quad (6)$$

Donde T es la tolerancia de la característica medida.

7. La relación entre la repetibilidad y la reproducibilidad está dada por la ecuación 7.

$$r \& R = \sqrt{(r)^2 + (R)^2 + I^2} \quad (7)$$

8. El porcentaje de la relación entre la repetibilidad y la reproducibilidad está dada por la ecuación 8.

$$\%r \& R = \sqrt{(\%r)^2 + (\%R)^2 + (\%I)^2} \quad (8)$$

9. Se interpretan los resultados aplicando los siguientes criterios:

- Si $\% r \& R < 10\%$ el sistema de medición es aceptable.
- Si $10\% \leq \% r \& R < 30\%$ el sistema de medición puede ser aceptable según su uso, aplicación, costo del instrumento de medición, costo de reparación.
- Si $\% r \& R > 30\%$ el sistema de medición es considerado como no aceptable y requiere de mejoras en cuanto al operador, equipo, método, condiciones, etc.

ANEXO 4. PERFIL CROMATOGRÁFICO DEL AE DE LO

ANEXO 4.1 Cromatograma del AE quimiotipo timol

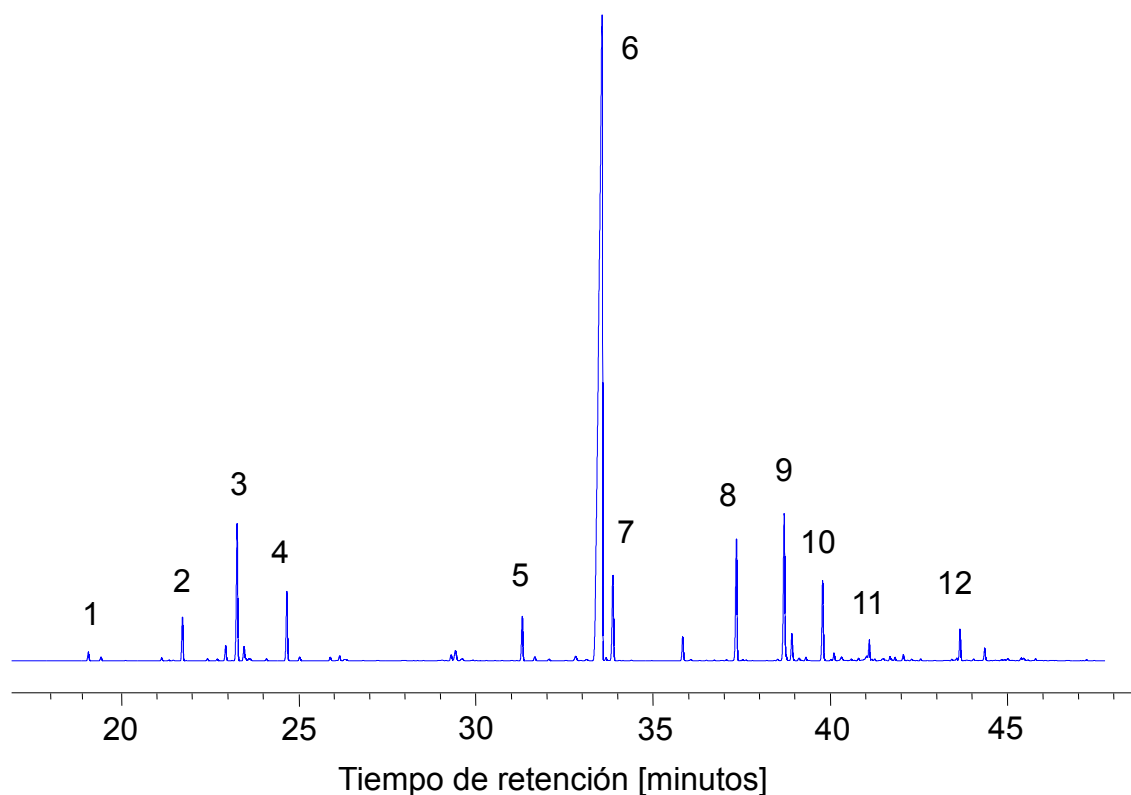
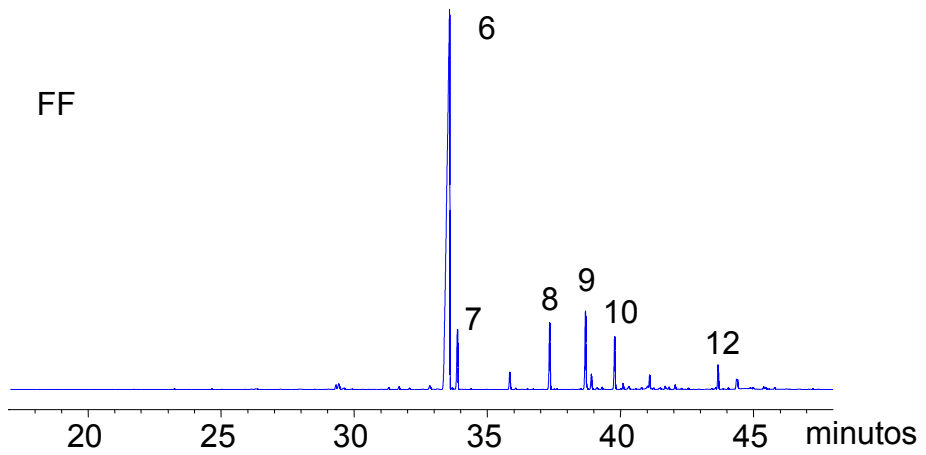
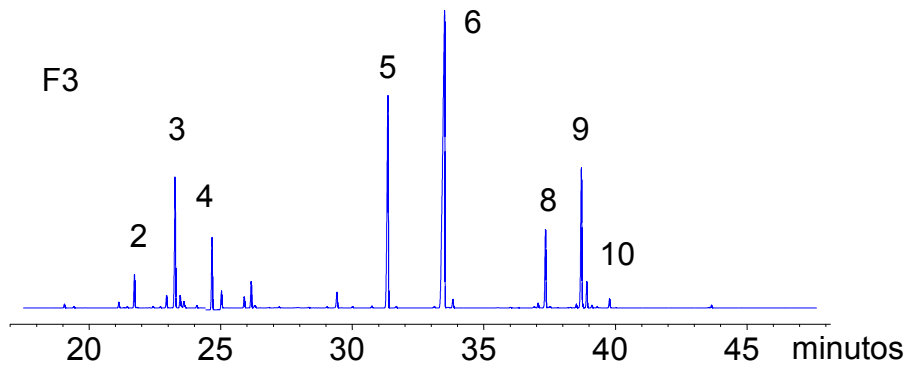
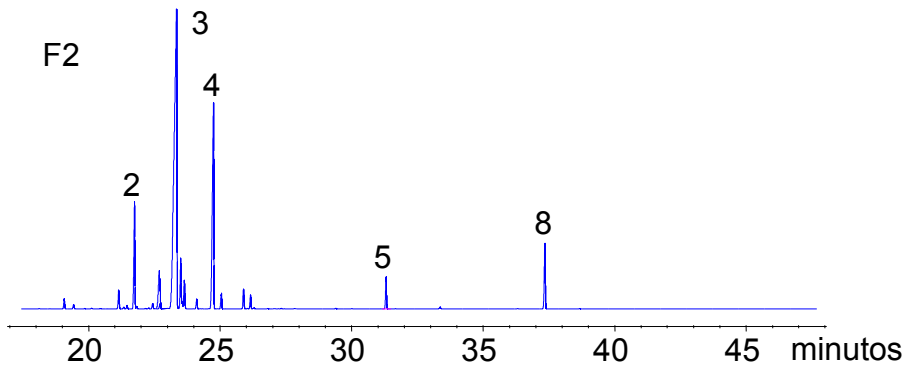
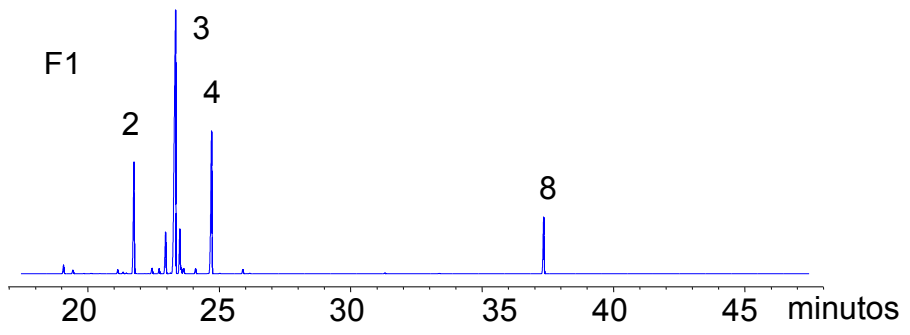


Figura 1. Perfil cromatografico típico del AE de *Lippia origanoides* quimiotipo timol, columna DB-5 (60 m), Donde: 1: α -Tujeno, 2: Mirceno, 3: p-cimeno, 4: γ -terpineno, 5: Metil-eter timol, **6: Timol**, 7: Carvacrol, 8: lstd, 9: trans- α -Bergamoteno, 10: allo-Aromadendreno, 11: β -Bisaboleno, 12: oxido de cariofileno.

A continuación se muestran los cromatogramas para cada fracción de destilado (F1, F2 y F3) y fondo (FF) obtenidas del fraccionamiento del AE de LO quimiotipo timol a presión de 7 Torr. Se puede observar la diferencia en la composición de las fracciones, y cómo el timol (pico 6) eluye a partir de la tercera fracción y se enriquece en la fracción de fondo. La intensidad de la señal cromatografía se relaciona a la cantidad másica de los compuestos en esa fracción.



ANEXO 4.2 Cromatograma del AE quimiotipo carvacrol

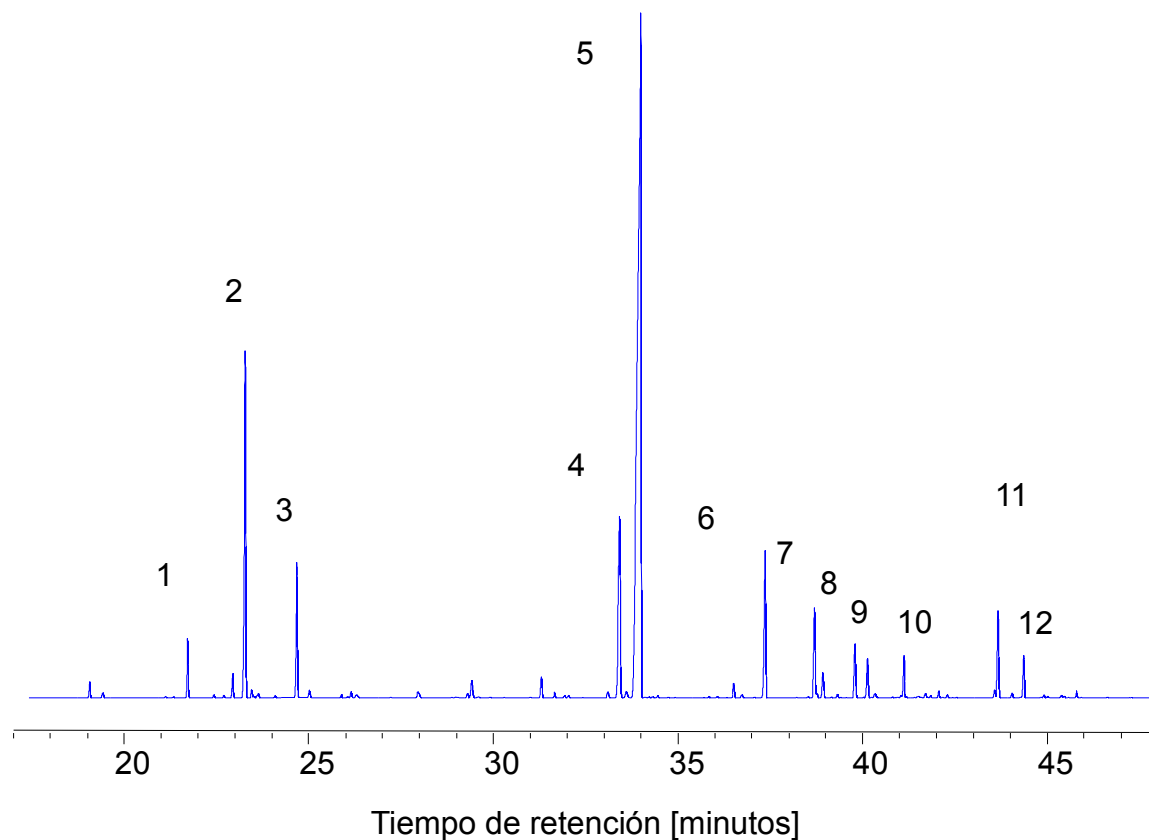
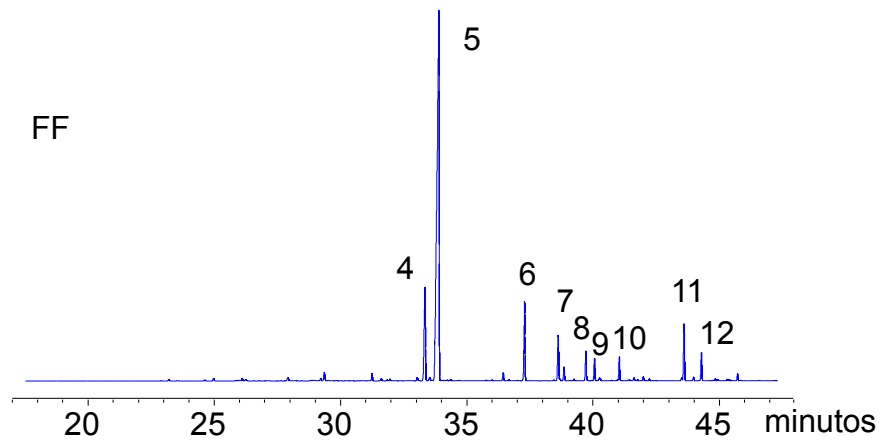
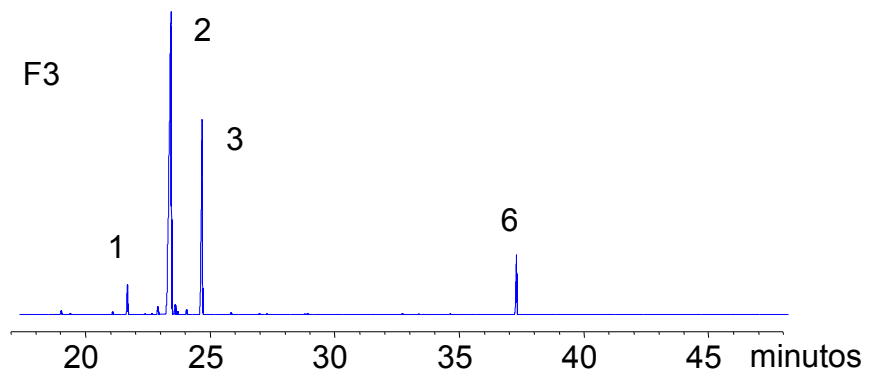
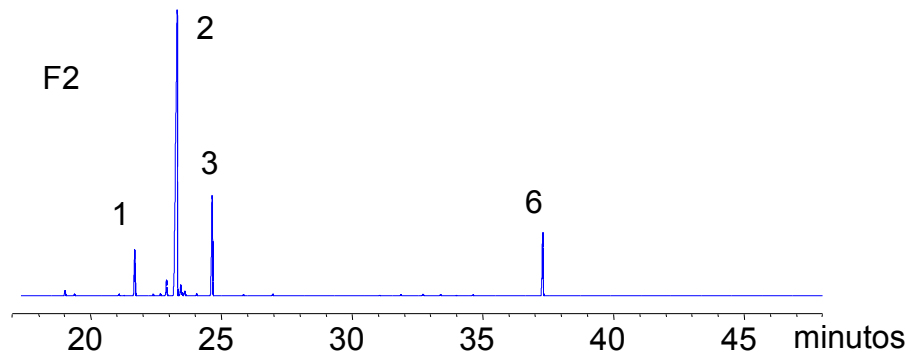
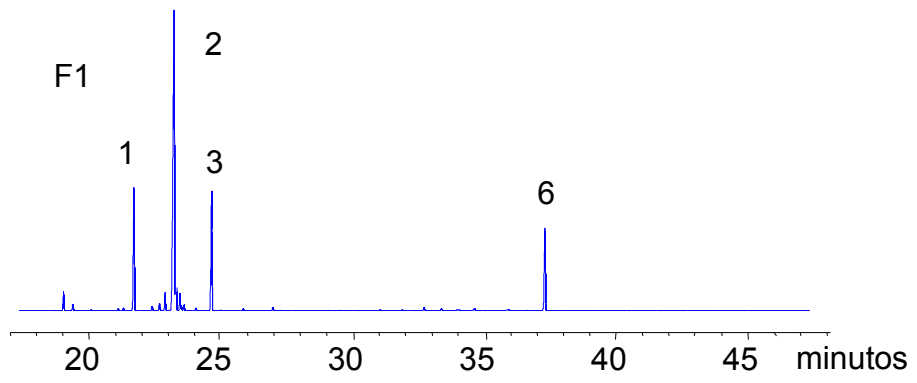


Figura 2. Perfil cromatografico típico del AE de *Lippia origanoides* quimiotipo carvacrol, columna DB-5 (60 m), Donde: 1: Mirceno, 2: p-cimeno, 3: γ -terpineno, 4: Timol, **5: carvacrol**, 6: lstd, 7: trans- α -Bergamoteno, 8: Allo-aromadendreno, 9: ar-Curcumeno, 10: γ -Cadineno, 11: oxido de cariofileno, 12: α -Cadinol.

Simultáneamente se muestran los cromatogramas para cada fracción de destilado (F1, F2 y F3) y fondo (FF) obtenidas del fraccionamiento del AE de LO quimiotipo carvacrol a presión de 7 Torr. Para el caso del AE de LO carvacrol todo este compuesto, se concentró en la fracción de fondos. La intensidad de la señal cromatografía se relaciona a la cantidad másica de los compuestos en esa fracción.



ANEXO 5. METODOLOGÍA DEL PROCESO DE DESTILACIÓN FRACCIONADA

Para llevar a cabo el proceso de destilación fraccionada se debe tener en cuenta, que la mayor parte de los componentes del equipo son de vidrio y teflón, por lo cual se recomienda tener el mayor cuidado posible, al seguir el procedimiento descrito a continuación. Los valores reportados son los utilizados en este trabajo, por lo que pueden variar, según sean las condiciones estudiadas, o deseadas.

Recomendaciones iniciales:

La torre debe estar completamente limpia. Ésta debe ser lavada y purgada con solvente. Recuerde que si va analizar los destilados por una técnica sensible como la cromatografía de gases, el solvente muy probablemente aparecerá en los cromatogramas o resultados obtenidos. Este lavado puede ser prolongado si se va a utilizar el mismo AE.

Inicio:

1. Se enciende el baño de enfriamiento, para que la temperatura disminuya, con un *set point* en $-2.0\text{ }^{\circ}\text{C}$, dependiendo de la especificación del aceite esencial a fraccionar, por ejemplo: Si tiene componentes muy livianos, que se puedan succionar con el sistema de vacío. Se puede operar a una temperatura mayor, si no hay componentes altamente volátiles.
2. Se adiciona el aceite esencial, AE en el balón de fondo redondo junto con una barra de agitación magnética, agitar 500 rpm, con el fin de homogeneizar la temperatura en el alimento. Pesar el AE para hacer balance de masa al final de la prueba.
3. Se pesan los viales previamente identificados y se ubican en el reservorio de muestras. Marcarlos para no confundir a qué fracción pertenecen.
4. El reservorio de muestras, donde se recogen las fracciones destiladas, debe ser ajustado suavemente; no apretar demasiado para no fracturar las partes.
5. Se montan en la torre, el balón y el reservorio utilizando las pinzas y aplicando grasa de vacío en las uniones, garantizando así su hermeticidad.

6. Se enciende la bomba, oprimiendo el botón de encendido. Se ajusta la presión de trabajo y se deja estabilizar durante 5 minutos.

Recomendaciones:

Una vez que la presión y la temperatura del baño de enfriamiento se han estabilizado, se inicia el calentamiento, y se toman datos cada 5 min como se muestra en la **Tabla 1**. La presión se debe ir ajustando durante todo el proceso para mantenerla en el valor deseado.

Para llevar a cabo la destilación fraccionada, se debe realizar una prueba para determinar las condiciones de operación con el AE utilizado, es decir, cómo calentar sin presentar inundaciones en la columna.

El AE no debe dar saltos bruscos durante su calentamiento en el balón, ya que impregna las paredes de la columna y se modifica el principio de su funcionamiento. Si esto pasa es porque se está calentando muy rápido o no se está agitando adecuadamente.

Calentamiento:

7. Se inicia el calentamiento con un porcentaje de 15% y se aumenta 5% cada 20 minutos, todo esto siempre y cuando la temperatura 2, T2 permanezca constante.
8. Se enciende el *spinning* cuando se observa un aumento de 1°C en la T2. Esto se da, como consecuencia de que el vapor está subiendo hasta la cabeza de la columna.

En esta etapa, se empieza a formar un goteo muy lento en la lágrima azul.

Cuando T2 empieza a subir, es recomendable no aumentar más la T1, para dejar que se dé el equilibrio.

Conforme pasa el tiempo y T2 continúa en aumento, se forma un goteo más acelerado, y en ocasiones, dependiendo de la composición del AE, se logra ver un

poco inundado en la parte de la válvula, esto debe ser debido al fraccionamiento, y no a la inundación en la columna, en la que se tiende a presenciar liquido en todas las partes incluyendo en el condensador.

Toma de las fracciones:

9. Las fracciones se toman al alcanzar el equilibrio, esto es, cuando T1 y T2 se mantienen constantes por más de 15 min. Para estar seguro, se aumenta 2% el calentamiento y se verifica que efectivamente T1 y T2 no cambien.

Para tomar las fracciones se debe tener en cuenta que efectivamente sea el equilibrio, luego:

10. Se debe abrir la válvula de reflujo, muy despacio, para no hacer cambios abruptos de presión en el sistema. Es recomendable establecer una apertura para todas las pruebas, delimitando un punto de referencia en la válvula, y girando solo dos o tres vueltas.

Finalización de la prueba:

El proceso termina cuando se han obtenido las fracciones en el equilibrio establecido. Se apaga el motor del *spinning*, la bomba de vacío, el baño de enfriamiento.

Dejar estabilizar la presión en la torre antes de desmontar las partes. Se puede abrir toda la válvula de control de presión para hacer que el sistema vuelva a la presión atmosférica.

Se deja escurrir por media hora el aceite que queda impregnado en la torre.

Se desmonta el balón y el reservorio de muestras. Se pesan los viales y los fondos que quedan en el balón.

Recomendaciones finales:

Lavar el balón inmediatamente después de terminada la prueba, con agua de jabón y luego purgar con un poco de solvente.

Si va a trabajar con el mismo AE, lavar la torre máximo cada 5 pruebas ya que en las paredes de la columna se quedan partes de AE, que se polimerizan con el calentamiento. Es recomendable evitar estas impurezas, tanto para, la higiene de la columna, la reproducibilidad en los resultados; como para la preparación de las muestras, que se vería antepuesta por un proceso de filtración, si esto ocurriera.

Tabla1. Toma de datos hasta la primera fracción, de una prueba a 7 Torr.

Tiempo ,min	T1, °C	T2, °C	Presión, Torr	Observaciones
0	22	19	7.02	6% Calentamiento
5	27	19	7.08	
10	36	19	7.03	
15	45	19	6.98	
20	52	18	6.99	
25	58	18	6.99	
30	63	18	6.97	Encendido del <i>spinning</i>
35	67	18	7.04	
40	70	18	7.01	
45	73	19	6.98	
50	75	19	7.04	
55	77	20	7.02	15%
60	78	20	7.02	
65	83	21	6.99	
70	86	21	9.96	
75	88	22	7.02	
80	88	22	7.01	20%
85	90	24	6.98	
90	91	27	7.00	
95	93	33	6.97	
100	94	37	7.02	
105	94	39	7.02	25%
110	95	39	6.98	
115	96	39	6.98	
120	97	40	6.96	35%
125	97	40	6.94	
130	99	41	7.00	
135	100	41	6.98	
140	101	42	6.97	
145	101	43	7.00	
150	102	43	7.00	
155	104	45	6.98	
160	104	45	6.97	37%

165	104	45	7.00	F1
170	101	46	7.02	23 gotas
175	102	44	7.02	37 gotas
180	103	39	7.02	45 gotas
185	104	37	7.04	
190	104	37	7.04	40%

Donde:

T1, es la temperatura medida en el balón de alimentación, reportada en el *tester* de temperatura.

T2, es la temperatura medida en la parte superior de la torre, o temperatura promedio de la torre, reportada en el *tester* de temperatura.

F1, es la Fracción de destilado 1, perteneciente al primer equilibrio alcanzado. En donde se abre la válvula para tomar la fracción