

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y EVALUACIÓN  
DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACEITE ESENCIAL DE *Aloysia  
triphylla* (L'Her) Britton, CULTIVADA EN TRES REGIONES DE COLOMBIA**

**OLGA LILIANA DÍAZ FAJARDO**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
ESCUELA DE QUÍMICA  
LABORATORIO DE CROMATOGRFÍA, CENIVAM  
BUCARAMANGA  
2007**

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y EVALUACIÓN  
DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACEITE ESENCIAL DE *Aloysia  
triphylla* (L'Her) Britton, CULTIVADA EN TRES REGIONES DE COLOMBIA**

**OLGA LILIANA DÍAZ FAJARDO**

**Tesis presentada como requisito parcial para optar el título de Químico**

**Directora: Elena E. Stashenko,  
Química, Ph. D.**

**Codirector: Jairo René Martínez,  
Químico, Ph. D.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
ESCUELA DE QUIMICA  
LABORATORIO DE CROMATOGRFÍA, CENIVAM  
BUCARAMANGA**

**2007**

## DEDICATORIA

El camino que he llevado hasta el día de hoy, lo recorrido gracias a las personas que siempre han estado junto a mí, a mis padres que además de su cariño y amor, me han dado el mejor ejemplo y quienes hoy, ven reflejado en mí, lo que ellos nunca pudieron ser, un profesional.

A mis hermanos, quienes siempre me apoyaron en todo momento y me heredaron el amor por el estudio y trabajo.

A Dios por ser el hombro y la fuerza en los momentos más difíciles, y permitirme realizar una de mis metas más anheladas.

## AGRADECIMIENTOS

Muy especialmente, a la doctora Elena E. Stashenko, por permitirme trabajar en su laboratorio, por sus enseñanzas y por ser la guía durante esta última etapa de mi carrera universitaria; al doctor, Jairo René Martínez, por su humildad y nobleza. A ellos dos, gracias por transmirme el amor a la ciencia e investigación e infundirnos que las cosas se consiguen con mucho esfuerzo y dedicación.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Cromatografía, a Sayde, Lety Martica, Andrea, Carol, Elkin, Lucy, Amner, Geovana, Angelita, a la adris; a Adriana y Edwin por las idas al campo; a todos ellos quienes de alguna manera colaboraron en la realización de este trabajo, quienes fueron mi apoyo y me brindaron una hermosa amistad. A Martica Cervantes por consentirnos. Pero, un especial agradecimiento a Amner y Geovanna, por haber aportado a este trabajo sus sabios conocimientos y colaboración.

A Maribel, mi mejor amiga durante toda la carrera universitaria, por las traspasadas para estudiar, por estar ahí siempre, cuando más lo necesitaba y a Fernando Martínez, que además de ser mi profesor, encontré un buen amigo.

A aquellas empresas que nos proporcionaron el material vegetal para la realización de esta investigación: Culticol S.A (Rionegro, Antioquia), MORENOS Ltda. (Rosal, Cundinamarca) y la asociación de productores MORELIA, en Bolívar, (Santander).

A CENIVAM y Colciencias, por la financiación para la realización de esta investigación.

A aquellas personas que de una u otro forma creyeron en este proyecto, y que piensan, que esta es la principal salida a una mejor calidad de vida.

Por último, y no menos importante, quiero agradecer a toda mi familia (a mi Papá, Mamá, hermanos y sobrinos) que me han brindado su amor y apoyo, para todas las cosas que he realizado en mi vida.

## CONTENIDO

	Pág
INTRODUCCIÓN	1
1. ESTADO DEL ARTE	4
1.1 GENERALIDADES Y CULTIVO DE <i>Aloysia triphylla</i>	4
1.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Aloysia triphylla</i>	7
1.2.1 Citral	7
1.2.2 Limoneno	9
1.3 GENERALIDADES DE LOS ACEITES ESENCIALES	11
1.3.1 Reseña histórica	11
1.3.2 Definición	12
1.3.3 Composición química de los aceites esenciales	12
1.3.4 Aplicaciones de los aceites esenciales	13
1.3.5 Control de calidad de los aceites esenciales	15
1.3.6 Biogénesis de los aceites esenciales	16
1.3.7 Tipos de aceites esenciales	20
1.3.8 Factores que influyen sobre su composición y el rendimiento	20
1.4 MERCADO DE LOS ACEITES ESENCIALES	20
1.5 METODOS DE EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES	23

1.5.1 Destilación con agua/vapor	24
1.5.2 Hidrodestilación asistida por la radiación con microondas (MWHD)	25
1.5.3 Hidrodestilación (HD)	26
1.6 CONTROL DE CALIDAD DE LOS ACEITES ESENCIALES	26
1.6.1 Índice de refracción	26
1.6.2 Solubilidad	27
1.6.3 Densidad	27
1.7 ANÁLISIS INSTRUMENTAL	27
1.7.1 Cromatografía de gases (GC)	27
1.7.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)	29
1.8 Cuantificación de los metabólicos secundarios	30
1.8.1 Estandarización interna	30
1.8.2 Estandarización externa	30
1.9 ACTIVIDAD BIOLÓGICA	31
1.9.1 Actividad antioxidante	31
1.9.2 Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS <sup>+</sup>	32
1.10 ANALISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA)	34
1.10.1 Definición	34
1.11 ASPECTOS GENERALES DEL MUNICIPIO DE BOLÍVAR, SANTANDER	35
1.11.1 Ubicación geográfica	35
1.11.2 Características naturales	35
2. ANÁLISIS CIENCIOMÉTRICO SOBRE LA PLANTA	37
2.1 Cienciométrica	37

2.2 Base de datos <i>Scopus</i>	38
2.3 Base de datos <i>Web of Science</i>	39
2.3 Patentes	42
3. METODOLOGÍA	44
3.1 Siembra de los esquejes	45
3.2 Identificación taxonómica	45
3.3 Selección del material vegetal	46
3.3.1 Recolección	46
3.3.2 Secado	47
3.4 EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES	48
3.4.1 Extracción del aceite esencial por arrastre con agua/vapor	48
3.4.2 Hidrodestilación asistida por la radiación con microondas	50
3.4.3 Preparación de las muestras para el análisis cromatográfico	51
3.5 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO	51
3.5.1 Análisis por columna apolar	51
3.5.2 Análisis por columna polar	53
3.6 DETERMINACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DEL ACEITE ESENCIAL USANDO EL ENSAYO DE DECOLORACIÓN DEL CATION-RADICAL ABTS <sup>+</sup>	54
3.7 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE LOS ACEITES ESENCIALES	55
4. ANÁLISIS DE RESULTADOS	56
4.1 Estudio de la reproducibilidad de los $t_R$ , áreas de los picos cromatográficos e índices de retención experimentales	56
4.2 Caracterización del aceite esencial de <i>Aloysia triphylla</i> L'Her Britton	61

4.3 ACEITES ESENCIALES, OBTENIDOS DE PLANTAS CULTIVADAS EN RIONEGRO, ANTIOQUIA POR HIDRODESTILACIÓN ASISTIDA POR LA RADIACIÓN DE MICROONDAS.	62
4.3.1 Rendimiento del aceite esencial	62
4.3.2 Determinación de la composición química de los aceites esenciales de <i>Aloysia triphylla</i> .	63
4.3.3 Análisis de componentes principales de los AEs de <i>A. triphylla</i> extraídos por MWHD, de plantas, en diferentes estados de madurez	68
4.4 ACEITES ESENCIALES AISLADOS DE PLANTAS CULTIVADAS EN BOLÍVAR, SANTANDER POR HIDRODESTILACIÓN ASISTIDA POR LA RADIACIÓN CON MICROONDAS.	70
4.4.1 Rendimiento del aceite esencial	70
4.4.2 Determinación de la composición química del aceite esencial de <i>Aloysia triphylla</i>	72
4.4.3 Análisis de componentes principales de los AEs de <i>A. triphylla</i> extraídos por MWHD, de plantas cultivadas en Bolívar, Santander.	76
4.5. ACEITE ESENCIAL AISLADO DE PLANTAS CULTIVADAS EN EL ROSAL, CUNDINAMARCA POR HIDRODESTILACIÓN ASISTIDA POR LA RADIACIÓN CON MICROONDAS.	78
4.5.1 Rendimiento del aceite esencial	78
4.5.2 Determinación de la composición química del aceite esencial de <i>Aloysia triphylla</i> .	78
4.6 Análisis de componentes principales de los AEs de <i>Aloysia triphylla</i> extraídos por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas, de plantas cultivadas en Rionegro (Antioquia), Bolívar (Santander) y el Rosal (Cundinamarca).	83
4.7 EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES DE <i>Aloysia triphylla</i> MEDIANTE DESTILACIÓN CON AGUA/VAPOR.	87
4.7.1 Rendimiento del aceite esencial	87
4.7.2 Caracterización química de los aceites esenciales de <i>Aloysia triphylla</i> , cultivada en Bolívar, Santander y obtenidos por destilación con agua/vapor	91
4.7.3 Comparación del rendimiento de los aceites esenciales obtenidos por MWHD y A/V de <i>Aloysia triphylla</i> , cultivada en Bolívar (Santander).	101

4.7.4 ANÁLISIS DE LOS AE POR GC-MS	104
4.7.5 Determinación de la capacidad antioxidante del aceite esencial, usando el método de decoloración del catión-radical ABTS <sup>+</sup> .	109
5. CONCLUSIONES	112
6. RECOMENDACIONES	114
7. BIBLIOGRAFÍA	115
ANEXO 1	127
ANEXO 2	128
ANEXO 3	140
ANEXO 4	144

## LISTA DE FIGURAS

		<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b>	Planta de <i>Aloysia triphylla</i> L' (Her) Britton. Parcela experimental de CENIVAM.	4
<b>Figura 2.</b>	Isómeros geométricos del citral: geranial y neral.	8
<b>Figura 3.</b>	Reacciones de hidrogenación del citral.	9
<b>Figura 4.</b>	Isómeros ópticos del limoneno.	10
<b>Figura 5.</b>	Vías de síntesis de los principales grupos de metabolitos secundarios.	18
<b>Figura 6.</b>	Principales importadores de aceites esenciales en el mundo.	21
<b>Figura 7.</b>	Exportadores de la UE y destinaciones principales de aceites esenciales en el 2003.	22
<b>Figura 8.</b>	Destilación mediante agua/vapor.	25
<b>Figura 9.</b>	Principales partes de un cromatógrafo de gases.	28
<b>Figura 10.</b>	Principales partes de un cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas.	29
<b>Figura 11.</b>	Estructuras químicas del ABTS, vitamina E y Trolox <sup>®</sup>	33
<b>Figura 12.</b>	Mapa del departamento de Santander.	36
<b>Figura 13.</b>	Número de publicaciones, sobre <i>Aloysia triphylla</i> realizadas en diferentes temáticas durante el periodo 1993 a 2006. Periodo de observación: 1993 a 2006. Fuente: Base de datos <i>Elsevier (Scopus)</i> , consultado: 2 de febrero de 2007 Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH " <i>Aloysia triphylla</i> + <i>Lippia citriodora</i> ".	38
<b>Figura 14.</b>	Número de publicaciones, sobre <i>Aloysia triphylla</i> realizadas en el periodo 2001 a 2007. Periodo de observación: 2001 a 2007. Fuente: <i>Web of Science (ISI Web of knowledge)</i> . Consultado: 3 de febrero de 2007. Ecuación de búsqueda: " <i>Aloysia triphylla</i> + <i>Lippia citriodora</i> ".	39

<b>Figura 15.</b>	Relación entre País y número de publicaciones sobre <i>Aloysia triphylla</i> . Periodo de observación: 2001-2007. Fuente: <i>Web of Science (ISI of knowledge)</i> . Consultado: 18 de mayo de 2007. Ecuación de búsqueda: “ <i>Aloysia triphylla</i> + <i>Lippia citriodora</i> ”.	40
<b>Figura 16.</b>	Autores que más han publicado sobre la especie <i>Aloysia triphylla</i> . Periodo de observación: 2001-2007. Fuente: <i>Web of Science (ISI of Web Knowledge)</i> . Consultado: 18 de mayo de 2007. Ecuación de búsqueda: “ <i>Aloysia triphylla</i> + <i>Lippia citriodora</i> ”.	41
<b>Figura 17.</b>	Relación entre revista y número de publicaciones sobre <i>Aloysia triphylla</i> . Periodo de observación: 2001-2007. Fuente: <i>Web of Science (ISI of Web Knowledge)</i> . Consultado: 18 de mayo de 2007. Ecuación de búsqueda: “ <i>Aloysia triphylla</i> + <i>Lippia citriodora</i> ”.	42
<b>Figura 18.</b>	Número de patentes registradas sobre <i>Aloysia triphylla</i> durante el periodo 1993 a 2006.	43
<b>Figura 19.</b>	Diagrama de para la metodología utilizada en este trabajo.	44
<b>Figura 20.</b>	Forma de recolección del material vegetal.	46
<b>Figura 21.</b>	Mapa de ubicación del área de estudio de la especie <i>A. triphylla</i> , cultivada en tres departamentos.	47
<b>Figura 22.</b>	Secado del material vegetal, bajo sombra con aireación natural.	48
<b>Figura 23</b>	Destilador semi-industrial de cobre, para obtención de aceites esenciales.	49
<b>Figura 24.</b>	Montaje empleado para obtener los aceites esenciales por el método de hidrodestilación asistida por la radiación con microondas	50
<b>Figura 25.</b>	Cromatógrafo de gases (6890N), acoplado a espectrómetro de masas (5973) <i>Agilent Technologies</i> , usado para el análisis de los aceites esenciales.	52
<b>Figura 26.</b>	Cromatógrafo de gases (6890N), acoplado a espectrómetro de masas (5975) <i>Agilent Technologies</i> , usado para el análisis de los aceites esenciales.	53
<b>Figura 27.</b>	Espectrofotómetro <i>Jenway</i> 6300.	55
<b>Figura 28.</b>	Perfil cromatográfico típico del AE de <i>A. triphylla</i> , obtenido por MWHD.	61

<b>Figura 29.</b>	Variación del rendimiento de AE de <i>Aloysia triphylla</i> , obtenido de plantas cultivadas en Rionegro, Antioquia.	63
<b>Figura 30.</b>	Contenido de las fracciones presentes en el aceite esencial de <i>Aloysia triphylla</i> , cultivada en Rionegro, Antioquia.	66
<b>Figura 31.</b>	Relación “Área del compuesto/Área del estándar interno” de los compuestos mayoritarios del aceite esencial.	67
<b>Figura 32.</b>	Representación gráfica de las cantidades relativas (%) de los componentes presentes en los AEs de plantas de <i>A. triphylla</i> obtenidos por MWHD.	68
<b>Figura 33.</b>	Variación del rendimiento de AE de <i>Aloysia triphylla</i> , obtenido de plantas cultivadas en Bolívar, Santander.	71
<b>Figura 34.</b>	Contenido de las fracciones presentes en el aceite esencial de <i>Aloysia triphylla</i> cultivada en Bolívar, Santander.	74
<b>Figura 35.</b>	Relación de “Área del compuesto/Área del estándar interno”, de los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales de <i>Aloysia triphylla</i> , cultivada en Bolívar, Santander.	75
<b>Figura 36.</b>	Representación gráfica de las cantidades relativas (%) de los componentes presentes en los aceites esenciales de plantas de <i>A. triphylla</i> cultivadas en Bolívar, Santander y obtenidos por MWHD.	76
<b>Figura 37.</b>	Perfil cromatográfico típico del AE obtenido por MWHD de <i>A. triphylla</i> , cultivada en Cundinamarca. Columna DB-5MS (60 m), <i>split</i> 1:30, MSD.	79
<b>Figura 38.</b>	Contenido de las fracciones presentes en el aceite esencial de <i>Aloysia triphylla</i> cultivada en el Rosal, Cundinamarca.	82
<b>Figura 39.</b>	Distribución por familias de los compuestos presentes en los aceites esenciales obtenidos por MWHD de plantas de <i>A. triphylla</i> , cultivadas en Rionegro (Antioquia), Rosal (Cundinamarca) y Bolívar (Santander).	83
<b>Figura 40.</b>	Representación gráfica de las cantidades relativas (%) de los componentes presentes en los aceites esenciales de plantas de <i>A. triphylla</i> cultivada en Antioquia, Cundinamarca y Santander, en diferentes estados de desarrollo vegetativo y ambiente ecológico.	85
<b>Figura 41.</b>	Variación del rendimiento de AE de <i>Aloysia triphylla</i> , obtenido de plantas cultivadas en Bolívar, Santander, mediante destilación con agua/vapor.	88

<b>Figura 42.</b>	Fotos parcelas experimentales en Bolívar, Santander.	90
<b>Figura 43.</b>	Perfil cromatográfico típico del AE de <i>A. triphylla</i> , obtenido por A/V. Columna DB-5MS (60 m), <i>split</i> 1:30, MSD.	91
<b>Figura 44.</b>	Relación “Área del compuesto/Área del estándar interno”, de los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales de <i>Aloysia triphylla</i> .	94
<b>Figura 45.</b>	Relación de “Área del compuesto/Área del estándar interno”, de los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales de <i>Aloysia triphylla</i> .	97
<b>Figura 46.</b>	Contenido de las fracciones presentes en el aceite esencial de <i>Aloysia triphylla</i> , cultivada en las cinco parcelas experimentales.	100
<b>Figura 47.</b>	Rendimientos de aceites esenciales (% p/p), obtenidos por MWHD y A/V, de plantas cultivadas en Bolívar, Santander.	102
<b>Figura 48.</b>	Distribución por familias de los compuestos presentes en los aceites esenciales de <i>Aloysia triphylla</i> , cultivada en Bolívar, Santander.	103
<b>Figura 49.</b>	Espectro de masas del <i>ar</i> -curcumeno (EI, 70 eV).	105
<b>Figura 50.</b>	Espectro de masas del Fotocitral A (EI, 70eV).	107
<b>Figura 51.</b>	Esquema de reacción del ABTS <sup>+</sup> con un antioxidante.	109
<b>Figura 52.</b>	Comparación de las actividades antioxidantes (TAA), del aceite esencial de <i>A. triphylla</i> y sustancias de referencia.	11

## LISTA DE TABLAS

		Pág.
<b>Tabla 1.</b>	Variación de la composición química del AE y extractos de <i>A. triphylla</i> de diferentes partes del mundo.	6
<b>Tabla 2.</b>	Composición química de los AEs con base en los grupos funcionales de moléculas constituyentes.	13
<b>Tabla 3.</b>	Industrias usuarias de productos aromáticos naturales y aceites esenciales.	14
<b>Tabla 4.</b>	Parámetros utilizados para el control de calidad de los aceites esenciales.	15
<b>Tabla 5.</b>	Descripción general de los métodos más usados en la destilación de aceites.	24
<b>Tabla 6.</b>	Condiciones geográficas de los Departamentos de Antioquia, Cundinamarca y Bolívar.	45
<b>Tabla 7.</b>	Análisis de la reproducibilidad de los $t_R$ de algunos componentes del aceite esencial.	57
<b>Tabla 8.</b>	Reproducibilidad de los $I_k$ experimentales.	58
<b>Tabla 9.</b>	Reproducibilidad de las áreas cromatográficas de algunos componentes del AE de <i>Aloysia triphylla</i> .	59
<b>Tabla 10.</b>	Rendimiento de extracción (% p/p) de los aceites esenciales de <i>Aloysia triphylla</i> , provenientes de diferentes cultivos en Rionegro, Antioquia.	62
<b>Tabla 11.</b>	Cantidad relativa (%) de los principales componentes presentes en los aceites esenciales de <i>Aloysia triphylla</i> , provenientes de diferentes cultivos en Rionegro, Antioquia.	64
<b>Tabla 12.</b>	Rendimiento de extracción (% p/p) de los aceites esenciales de <i>Aloysia triphylla</i> , cultivada en Bolívar, Santander.	70

<b>Tabla 13.</b>	Cantidad relativa (%) de los principales componentes presentes en los aceites esenciales de <i>Aloysia triphylla</i> , proveniente de diferentes cultivos experimentales en el Municipio de Bolívar, Santander.	72
<b>Tabla 14.</b>	Rendimiento de extracción (% p/p) del aceite esencial de <i>Aloysia triphylla</i> , cultivada en el Municipio del Rosal, Cundinamarca.	78
<b>Tabla 15.</b>	Cantidad relativa (%) de los principales componentes presentes en aceite esencial de <i>Aloysia triphylla</i> , cultivada el Rosal, Cundinamarca.	79
<b>Tabla 16.</b>	Rendimiento de extracción (% p/p) de los aceites esenciales de <i>Aloysia triphylla</i> obtenidos por destilación con agua/vapor.	88
<b>Tabla 17.</b>	Cantidad relativa (%) de los principales componentes presentes en el aceite esencial de <i>Aloysia triphylla</i> , cultivada en la parcela N° 10.	92
<b>Tabla 18.</b>	Cantidad relativa (%) de los principales componentes presentes en el aceite esencial de <i>Aloysia triphylla</i> , cultivada en la parcela N° 11.	95
<b>Tabla 19.</b>	Cantidad relativa (%) de los principales componentes presentes en el aceite esencial de <i>Aloysia triphylla</i> , cultivadas en las parcelas N° 33, 2 y 26.	97
<b>Tabla 20.</b>	Producción de aceite esencial por hectárea, para las parcelas de Bolívar, Santander.	104
<b>Tabla 21.</b>	Capacidad de atrapar radicales del aceite y sustancias de referencia.	110

## LISTA DE ESQUEMAS

	<b>Pág.</b>
<b>Esquema 1.</b> Reacción entre el catión-radical ABTS <sup>+</sup> y un AO.	33
<b>Esquema 2.</b> Rutas de fragmentación del <i>ar</i> -curcumeno.	106
<b>Esquema 3.</b> Rutas de fragmentación del Fotocitral A.	108

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

<b>AE(s)</b>	Aceite(s) esencial(es)
<b>ABTS<sup>+</sup></b>	<i>2,2'-Azinobis-(Ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid)</i> [Ácido 2,2'-azino bis-(3-etiltiazolina- bencenosulfónico-6)]
<b>AO(s)</b>	Antioxidante(s)
<b>BPM</b>	Buenas prácticas de manufactura
<b>ca.</b>	Aproximadamente
<b>CENIVAM</b>	Centro Nacional de Investigación para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales
<b>CIBIMOL</b>	Centro de investigación en Biomoléculas
<b>D.I.</b>	Diámetro interno
<b>d<sub>f</sub></b>	Espesor de la fase estacionaria, $\mu\text{m}$
<b>EI</b>	<i>Electron Impact</i> (Impacto de electrones)
<b>eV</b>	Electrón-voltio(s)
<b>e.g.</b>	Por ejemplo
<b>FID</b>	<i>Flame Ionisation Detector</i> (Detector de ionización en llama)
<b>GC</b>	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases)
<b>GC-MS</b>	<i>Gas Chromatography – Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas)
<b>g</b>	Gramos
<b>HD</b>	<i>Hydrodistillation</i> (Hidrodestilación)

<b>HM</b>	Hidrocarburos monoterpénicos
<b>HP</b>	<i>Hewlett-Packard</i>
<b>HS</b>	Hidrocarburos sesquiterpénicos
<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia)
<b>HS-SPME</b>	<i>Headspace Solid-Phase Microextraction</i> (Microextracción en fase sólida en modo <i>headspace</i> )
<b>ha</b>	Hectárea
<b>I<sub>k</sub></b>	Índice de retención de Kovàts
<b>IR</b>	Infrarrojo
<b><i>i.e</i></b>	o sea, es decir
<b><i>kg</i></b>	Kilogramo
<b>L</b>	Litros
<b>MSD</b>	<i>Mass Selective Detector</i> (Detector selectivo de masas)
<b>MWHD</b>	<i>Microwave-Assisted Hidrodistillation</i> (Hidrodestilación asistida por la radiación con microondas)
<b>MIC</b>	<i>Inhibitory Minimun Concentration</i> (Concentración mínima inhibitoria)
<b>MO</b>	Monoterpenos oxigenados
<b><i>m/z</i></b>	Relación masa / carga
<b><i>mg</i></b>	Miligramo
<b><i>mL</i></b>	Mililitro(s)
<b><i>m.s.n.m.</i></b>	Metros sobre el nivel del mar
<b>PCA</b>	<i>Principal Component Analysis</i> (Análisis de componentes principales)
<b>SD</b>	<i>Steam Distillation</i> (Destilación por arrastre con vapor)

<b>SO</b>	Sesquiterpenos oxigenados
<b>SDE</b>	<i>Simultaneous Distillation-Solvent Extraction</i> (Destilación-extracción con solvente simultánea)
<b>SFE</b>	<i>Supercritical Fluid Extraction</i> (Extracción con fluido supercrítico)
<b>TEAC</b>	<i>Trolox<sup>®</sup> equivalent antioxidant capacity</i> (Actividad antioxidante equivalente a trolox)
<b>TIC</b>	<i>Total Ion Current</i> (Corriente iónica total)
<b>Ton</b>	Tonelada
<b>UV-Vis</b>	<i>Ultraviolet –Visible</i> (Ultravioleta-visible)
<b>W</b>	Vatios

## RESUMEN

**Titulo:** ESTUDIO COMPARATIVO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACEITE ESENCIAL DE *Aloysia triphylla* L'HER (Britton) CULTIVADA EN TRES REGIONES DE COLOMBIA\*

**Autor:** Olga Liliana Díaz Fajardo\*\*

**Palabras claves:** *Aloysia triphylla*, Aceite esencial, actividad antioxidante, catión radical ABTS<sup>+</sup>.

El AE de *Aloysia triphylla* presenta cambios en su composición química de acuerdo con el origen del cultivo, estados de desarrollo, suelo, etc. Todos los aceites esenciales examinados correspondían al mismo quimiotipo, se caracterizan por su alto contenido de citral, lo que lo hace interesante, para ser aplicado en diferentes ramas de la industria.

En la presente investigación se estudiaron los metabolitos secundarios volátiles de la especie *Aloysia triphylla*, recolectada en tres regiones de Colombia, a saber: Rionegro (Antioquia), Rosal (Cundinamarca) y Bolívar (Santander), con el fin de evaluar el efecto del estado de desarrollo y lugar de procedencia de la planta, sobre la composición química del aceite. Adicionalmente, la capacidad antioxidante del aceite esencial, fue evaluado usando el método de decoloración del catión-radical **ABTS<sup>+</sup>**.

Los AE fueron obtenidos mediante la hidrodestilación asistida por la radiación con microondas (MWHD) y analizados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). El compuesto principal encontrado en todos los aceites, fueron el geranial (17-25%), neral (14-20%) y limoneno (6-10%), seguidos por sesquiterpenos oxigenados como el espatulenol (4-10%) y óxido de cariofileno (2-7%), variando en proporción de acuerdo con su lugar de origen. El aceite esencial de *Aloysia triphylla*, presentó una baja capacidad antioxidante en comparación con sustancias estándar, como la vitamina E, BHA y BHT.

\* Tesis de grado.

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

## ABSTRACT

**Title:** COMPARATIVE STUDY OF THE CHEMICAL COMPOSITION AND EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *Aloysia triphylla* L'HER (Britton) ESSENTIAL OIL FROM THREE COLOMBIAN REGIONS \*

**Autor:** Olga Liliana Díaz Fajardo\*\*

**Keywords:** *Aloysia triphylla*, essential oil, antioxidant activity, ABTS<sup>+</sup> Cation-radical.

The chemical composition of the of *Aloysia triphylla* essential oil changed according to the origin of the crop, the stage of development, soil nutrients, etc. All the essential oils examined corresponded to the same chemotype, characterized by its high citral content, which makes it interesting for applications in different branches of industry.

Volatile secondary metabolites were determined in samples of *Aloysia triphylla*, collected in three regions of Colombia: Rionegro (Antioquia), Rosal (Cundinamarca) and Bolivar (Santander). The effects of plant origin and state of development oil chemical composition were examined. Additionally, the essential oil antioxidant capacity was evaluated using the ABTS + cation-radical decoloration method.

The essential oils were obtained by microwave radiation-assisted hydrodistillation and analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. The main compounds found in all oils, were geranial (17-25%), neral (14-20%) and limonene (6-10%), followed by oxygenated sesquiterpenes such as spathulenol (4-10%) and caryophyllene oxide (2-7%), varying in proportion according to the place of origin. The *Aloysia triphylla* essential oil showed a low antioxidant capacity compared to standard substances such as vitamin E, BHA and BHT.

\* Tesis de grado.

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

## INTRODUCCIÓN

Durante toda su historia, los humanos han tenido una estrecha relación con las plantas aromáticas, pues desde niños nos hemos familiarizado con sabores u olores particulares, que siempre han hecho parte de nuestras vidas. Historia que comienza recordándonos las múltiples aplicaciones de aquellas sustancias con su aroma característico. Tiempos inmemoriales que van desde la cultura Mesopotámica, donde se encontraron piezas de equipos de destiladores de esencias, el uso del tomillo por parte de los Egipcios para la elaboración de cerveza, o la época de aquellos expedicionarios como Marco Polo y Colón, quienes cada vez que pisaban tierras nuevas descubrían especies raras con olores y fragancias riquísimas. Pero todo esto ha evolucionado hasta el día de hoy, ya que el cultivo de plantas aromáticas, no sólo se hace en huertas o jardines familiares, sino también a gran escala, de forma que les da una mayor importancia comercial.

Esta investigación forma parte de un Macroproyecto, financiado por Colciencias, del **Centro Nacional para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales, CENIVAM**, el cual tiene como objetivo el desarrollo sostenible de la agroindustria de esencias en Colombia, buscando aquellas plantas aromáticas promisorias y medicinales con alto potencial y buena aplicabilidad en el campo de la industria de aceites esenciales (AEs).

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del estado de desarrollo vegetativo y lugar de procedencia de la planta, sobre el rendimiento y composición química del AE de *Aloysia triphylla* (cidrón), mediante el análisis estadístico de componentes principales (PCA). Este estudio se realizó en tres regiones del país, a saber: Rosal (Cundinamarca), Rionegro (Antioquia) y Bolívar (Santander). En Colombia esta planta se adapta muy bien a diferentes pisos térmicos, se puede

encontrar en jardines o huertos como planta ornamental y medicinal, por lo que su cultivo es más que todo de tipo comercial, para uso en alimentos y en bebidas aromáticas. El AE de *Aloysia triphylla* tiene una amplia aplicación en la industria de perfumes, cosmética y alimenticia, así como en síntesis orgánica, debido a su alto contenido de citral, mezcla de dos isómeros, neral y geranial, que se usan como materia prima para la síntesis de otros compuestos como la vitamina A y iononas, lo que hace que aumente el valor comercial del aceite.

El estudio de la composición química de los AE se realizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), los compuestos fueron identificados usando criterios cromatográfico (índices de Kovàts) y espectroscópico (espectros de masas).

Actualmente, se tiene la oportunidad de encontrar nuevos agentes activos desde el punto de vista farmacológico, a partir de una fuente de materia prima natural y más económica, como lo son las plantas aromáticas y medicinales. Desde este contexto podemos referirnos a las diferentes propiedades biológicas que presentan los AE, pero una, en particular, es la actividad antioxidante, ya que la información sobre esta propiedad, de la especie en estudio, es aún deficiente. Muchas de las sustancias que poseen esta capacidad tienen gran relevancia y aplicación, ya que se ha demostrado su participación en la prevención de enfermedades degenerativas, e.g. cardiovasculares, neurológicas, diferentes tipos de cáncer y otras relacionadas con el estrés oxidativo [1]. El método, que se empleó para evaluar la capacidad del AE para atrapar radicales, fue el de la decoloración del catión-radical ABTS<sup>+</sup> [(Ácido 2,2'-azino-bis- (3- etiltiazolina-bencenosulfónico-6)], empleando la espectroscopía UV-Vis.

Este estudio permitirá en un futuro incursionar en una rama de producción, que aún no está desarrollada completamente en Colombia, i.e. la cadena productiva de AE, con fines de procesar el material vegetal para su extracción; además, el

trabajo contribuirá al conocimiento de las propiedades químicas y farmacológicas de *Aloysia triphylla* y dejará abierta la posibilidad de su mejor aprovechamiento a nivel industrial, como fuente de materia prima para obtener productos de mayor valor agregado.

Resultados parciales de esta investigación, fueron presentados en el IX Congreso Colombiano de Fitoquímica, realizado del 8 al 11 de mayo de 2007 en Pereira (Colombia) (Véase **Anexo 1**).

El trabajo consta de 166 páginas, 7 capítulos, 21 Tablas, contiene 52 Figuras, 3 esquemas y 82 referencias bibliográficas.

## 1. ESTADO DEL ARTE

### 1.1. GENERALIDADES Y CULTIVO DE *Aloysia triphylla*



La *Aloysia triphylla* L' (Her) Britton, pertenece a la familia de las Verbenáceas y es también conocida botánicamente con los nombres de *Lippia citriodora* Kunth, *Lippia triphylla* Kuntze, *Aloysia citriodora* Ortega. Popularmente, se le conoce en Colombia como “Cidrón”; en Argentina, “Cedrón”, “Hierba Luisa”; “Maria Luisa” y “Hierba de la princesa”, en España. Es apreciada como planta ornamental en los jardines y solares, debido al intenso y agradable olor a limón que desprenden sus hojas [2].

**Figura 1.** Planta de *Aloysia triphylla* L' (Her) Britton. Parcela experimental de CENIVAM.

Es un arbusto perenne, que puede medir más de 1.50 m de altura. Su nombre “*triphylla*” se debe a que sus hojas simples, rugosas e insertadas en cada nudo, están reunidas en vértices de tres; sus flores son pequeñas, blancas por fuera y violáceas por dentro [2]. Esta planta es originaria de la región montañosa del norte de Argentina (la Rioja, Salta), donde crece silvestre. Es cultivada en México,

Venezuela, Brasil, Perú, Uruguay, Chile, EE.UU. e introducida en Europa y Norte de África. Los cultivos pueden durar hasta 15 años y se ubican en lugares soleados o en semisombra; se ha observado, que la concentración de AE en las hojas aumenta con iluminación solar alta; y disminuye en las plantas que crecen bajo la sombra [3].

La planta se adapta bien en climas templado y templado-cálido. Con frío riguroso suele perder las hojas. Prospera bien en buenos suelos, de consistencia media, sueltos, permeables, profundos, con pH entre 6.5 y 7.2, más bien frescos, pero no húmedos, pues el exceso de agua favorece la podredumbre de raíces [2].

La propagación se realiza mediante estacas de 15 a 25 cm de longitud, con 4 a 5 yemas; que se siembran en cama caliente (temperaturas de 17 a 20°C), con una capa de arena de 7 a 10 cm [4] y a una distancia de 0.9 m entre surcos y 0.6 m entre plantas [2].

La *Aloysia triphylla* es una hierba astringente y aromática, rica en aceites volátiles, que posee propiedades antiespasmódicas, es un analgésico local, carminativa, antiséptica y es ligeramente sedante [2, 4]. Además, se usa para controlar el vértigo, náuseas, insomnio, flatulencia, dispepsia, desordenes neuronales leves, para apaciguar la congestión nasal y bronquial, alivia la hinchazón de ojos. Es recetada para diferentes tipos de alteraciones nerviosas, especialmente la ansiedad, ya que en muchos casos, se consiguen mejores resultados con infusiones de esta planta, que con algunos tranquilizantes químicos, que generan efectos secundarios. Es un ingrediente común en repelentes de insectos, ya que su AE posee propiedades insecticida y bactericida [4, 5].

El AE de *Aloysia triphylla* ha demostrado tener actividad antiespasmódica, por el contenido de compuestos polifenólicos, tales como hidroxicinámicos, flavonoides tipo el luteolin-7- glucósido [6], exhiben actividad antibacteriana fuerte sobre la

*Helicobacter pylori*, mientras que presenta una acción moderada contra la *Fusarium verticillioides*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* [7-11]. Los verbascósidos aislados de las hojas de *Aloysia triphylla* presentan propiedades analgésicas [12]. El AE de *Aloysia triphylla* también posee una alta actividad nematocida contra la *Meloidogyne sp.* [13]. El contenido de flavonoides y varios compuestos fenólicos en la *Aloysia triphylla* le proporcionan actividad antioxidante. Resultados han demostrado que la infusión tiene una potente actividad contra el radical superóxido, pero moderada contra el radical hidroxilo y ácido hipocloroso [14-16].

La variabilidad de la composición química de los AE depende de las condiciones geobotánicas y climáticas de las especies cultivadas. En la **Tabla 1**, se observan los diferentes compuestos de los AE y extractos aislados de plantas de *A. triphylla*, cultivadas en diferentes partes del mundo [17-27].

**Tabla 1.** Variación de la composición química del AE y extractos de *A. triphylla* cultivada en diferentes partes del mundo.

Compuesto	Cantidad relativa, % (pais)											
	Colombia [17]	Portugal [18]	Brasil [19]	Italia* [20]	Corea* [21]	Francia [22]	Turquía [23]	Argentina [13,24]		Marruecos [25]	Chile [26]	Grecia [27]
							IV	I	II	III		
Limoneno	11,9	15,4	16	-	7,5	19	18,6	-	3,7	3,7	13	5,8
1,8-Cineol	-	-	-	-	-	-	-	-	12	12	6	-
cis-Carveol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carvona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mircenona	-	-	-	-	-	-	-	37	-	-	-	-
$\alpha$ -Tujona	-	-	-	-	-	-	-	17	-	-	-	-
Neral	19	23,3	27,0	-	-	10	17,6	-	7,0	7,0	18	24,5
Geranial	38	29,5	29,5	-	-	40	11,9	-	10	10	24	38,7
Espatulenol	-	-	-	7,1	-	-	-	-	-	-	-	-
Fitol	-	-	-	11,6	-	-	-	-	-	-	-	-

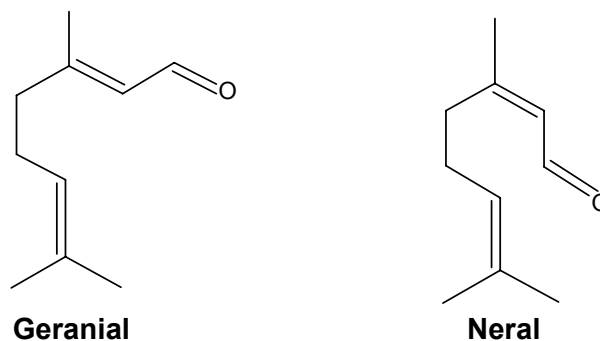
\* Extracto de *A. triphylla*

Se encuentran principalmente 5 quimiotipos de *A. triphylla*, clasificados según el componente principal: (I) Mircenona (37%) y  $\alpha$ -Tujona (17%); (II)  $\alpha$ -Tujona (23%) y *cis*-carveol (18%); (III) 1,8- Cineol (12%) y geranial (10%); (IV) Limoneno (37%), geranial (14%) y neral (11%); y el quimiotipo (V) Neral (10%) y geranial (40%). Los quimiotipos I y II se encuentran en Argentina. Zygadlo y colaboradores [24] identificaron como componentes mayoritarios, la mircenona y  $\alpha$ -tujona, mientras que Duschatzky y colaboradores [13], encontraron la  $\alpha$ -tujona y el *cis*-carveol como componentes principales del AE. En un estudio reciente, realizado en Argentina, por Torres [28], se evaluó el efecto del estado vegetativo de la planta, sobre la composición química de su AE, observándose que no se producen cambios en el contenido de los metabolitos secundarios, mientras que variaciones en el ambiente ecológico sí causan un aumento en los componentes principales, *i.e.* geranial (36%) y neral (31%). El quimiotipo (III), cultivado en Marruecos fue abundante en 1,8-cineol, pero presentaba poca cantidad de citral, *i.e.* geranial y neral [25]. En el aceite de hojas y tallos de *A. triphylla* de Turquía (quimiotipo IV) [23], se identificaron como componentes mayoritarios el limoneno y geranial; mientras que el quimiotipo V, que más abunda en el mundo, en países como Colombia, Chile, Eslovenia, Portugal, Francia, Brasil y Grecia, está constituido principalmente por citral (geranial y neral) como componente mayoritario, junto con el limoneno, geraniol y nerol. Todos estos estudios demuestran que a pesar de que la *A. triphylla* es una planta autóctona de América del Sur, su cultivo se puede adaptar en muchas otras regiones del planeta, en donde se lleva a cabo su siembra e industrialización.

## **1.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Aloysia triphylla***

**1.2.1 Citral.** El citral es una mezcla de dos aldehídos monoterpénicos isoméricos, geranial y neral. El isómero *trans*- se conoce como geranial o citral A, (*E*)- 3,7-

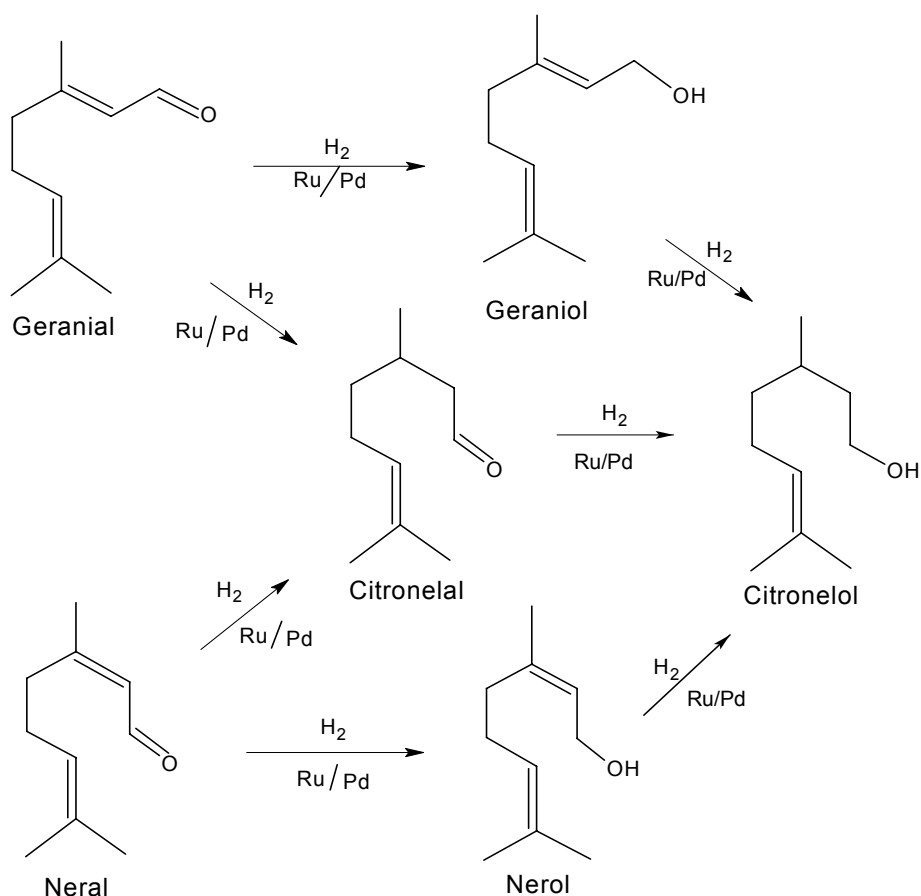
dimetil-2,6- octadienal y el isómero *cis*- se conoce como neral o citral B, (*Z*)- 3,7-dimetil-2,6-octadienal (Véase, **Figura 2**).



**Figura 2.** Isómeros geométricos del citral: geranial y neral.

El citral es el componente mayoritario del AE de *Aloysia triphylla* (38-40%), se caracteriza por un fuerte olor a limón; su sensibilidad a la exposición de la luz, calor, oxígeno y pH bajos o altos, provoca, con el paso del tiempo, un aumento en la densidad del AE [29, 30]; citral está presente en otras plantas, *e.g.* *lemon grass*, jengibre, naranja y algunas variedades de albahaca [31]. Este compuesto, es materia prima para la síntesis de iononas, vitaminas A y E, así como un ingrediente importante en la industria de alimentos y perfumes [30, 31].

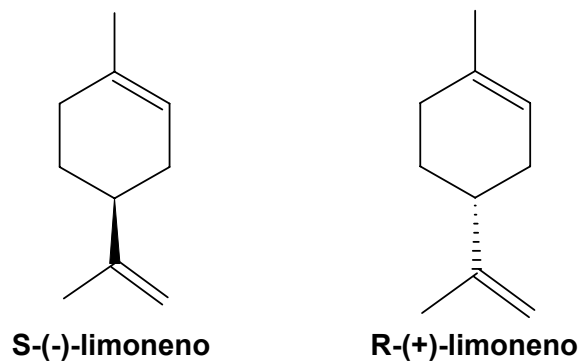
Por ser un aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado, el citral puede presentar reacciones de hidrogenación con la formación de alcoholes insaturados, *i.e.* el geraniol, nerol y citronelol (Véase, **Figura 3**); productos que son de gran interés como intermediarios en síntesis orgánica en la industria química, industrias de sabores y fragancias y la industria farmacéutica [32-34]. Se considera, que los compuestos responsables por el olor “cítrico” del AE de esta especie son el citral, limoneno, geraniol y nerol.



**Figura 3.** Reacciones de hidrogenación del citral [34].

**1.2.2 Limoneno.** El limoneno es el otro componente abundante en el AE de *Aloysia triphylla* (7-11%), es un monoterpeno de fórmula C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>, presenta dos isómeros ópticos, el R-(+)-limoneno y el S-(-)-limoneno (Véase **Figura 4**). Se encuentra abundante en muchos aceites esenciales, el (+) limoneno en la corteza de naranja y en el aceite de alcaravea, el (-) limoneno en las hojas de pino. Tiene una gran importancia en la industria, se emplea en la producción de *p*-cimeno, como disolventes de resinas, pigmentos, tintas, en la fabricación de adhesivos y en la obtención de la carvona. Últimamente, la demanda del compuesto se debe a su aplicación como disolvente biodegradable [35, 36].

Es utilizado en muchos procesos farmacéuticos y de alimentos, para dar sabor, e.g. en la obtención de sabores artificiales de menta, en la fabricación de dulces y goma de mascar [36]. Recientes estudios apuntan a que el limoneno tiene efectos anticancerígenos, incrementa los niveles de enzimas hepáticas implicadas en la detoxificación de carcinógenos [36, 37].



**Figura 4.** Isómeros ópticos del limoneno.

Los siguientes son los componentes presentes en el aceite esencial de *Aloysia triphylla*, que muestran actividad biológica [38]:

- ✓ *Citral*: antibacterial, fungicida.
- ✓ *Linalol*: antibacterial.
- ✓ *Canfeno*: antioxidante.
- ✓ *α-Terpineol*: antibacterial.
- ✓ *trans-β-Cariofileno*: antibacterial.
- ✓ *Limoneno*: antibacterial.

## 1.3 GENERALIDADES DE LOS ACEITES ESENCIALES

**1.3.1 Reseña histórica.** Una visión más “esotérica” de los aceites esenciales los define como la fuerza vital de la planta, equivalente al espíritu humano o a su alma.

La utilización de AE y el conocimiento de sus propiedades curativas se remontan a las civilizaciones China y Egipcia y están consideradas algunas de las formas más antiguas de medicina y cosmética. A partir de la extracción de AE de plantas aromáticas, los egipcios hacían pomadas verdaderamente milagrosas, también los utilizaban para embalsamar los muertos, para fines espirituales, medicinales y cosméticos [39].

Los griegos también comprendían los efectos milagrosos del aroma de ciertas flores y plantas. Adquirieron la mayor parte de sus conocimientos a través de los egipcios, que eran excelentes conocedores de sus propiedades. El médico griego Hipócrates, considerado el padre de la medicina, recomendaba muchas veces masajes con aceites esenciales y en sus escritos hace referencia a un vasto número de plantas medicinales [40].

Los romanos, y más tarde los árabes, perfeccionarían los conocimientos adquiridos a través de las civilizaciones que los precedieron. En la civilización árabe se destaca la contribución del famoso médico alquimista Avicena, pionero en el método de destilación de plantas medicinales con alambiques. A pesar de haber surgido otros métodos más sofisticados, éste sigue siendo el más utilizado y aconsejable para la obtención de esencias [40].

Muchos siglos después, el conocimiento de los poderes curativos de las plantas empezó a perderse, pero su creencia se mantuvo dentro de los monasterios, entre los monjes que preparaban, entre otras, soluciones antibacterianas que pretendían combatir las pestes que en la época diezaban las poblaciones [40, 41].

**1.3.2 Definición.** Los AE son mezclas de componentes volátiles, producto del metabolismo secundario de las plantas; en su composición química entran hidrocarburos del grupo de los terpenos, junto con compuestos oxigenados de bajo peso molecular (alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), que son los que les dan a los AE el aroma que los caracteriza [4, 42].

Los metabolitos secundarios volátiles tienen una distribución restringida en la naturaleza, la cual se limita a ciertas plantas llamadas “aromáticas”, en algunos casos, a solo algunas especies o subespecies, por lo que son consideradas como una manifestación individual del organismo que las contiene y se les atribuye una gran variedad de funciones específicas, por lo que éstos deben tener algún significado biológico, ya que son biosintetizados y biodegradados [4].

Los AE se biosintetizan en tricomas glandulares (hojas) o en glándulas (cáscaras); en las plantas se pueden ubicar e.g. en pelos glandulares (menta, lavanda), células modificadas del parénquima: *Piperáceas* (pimienta), tubos oleíferos (canela), tubos esquizógenos (anís, hinojo), canales lisígenos (pino), entre otros [43].

**1.3.3 Composición química de los aceites esenciales.** La composición química de los AE es muy compleja [42, 44]; los metabolitos secundarios volátiles se pueden clasificar con base en los grupos funcionales que contienen sus moléculas, según se muestra en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Composición química de los AE con base en los grupos funcionales de moléculas constituyentes.

GRUPO FUNCIONAL	NATURALEZA QUÍMICA	EJEMPLO
Hidrocarburos	Terpénicos Aromáticos Sesquiterpénicos	Limoneno, $\alpha$ -terpineno Cumeno, <i>p</i> -cimeno <i>trans</i> - $\beta$ - Cariofileno
Aldehídos	Monoterpénicos Alifáticos Aromáticos	Citral Nonanal, octadecanal Cinamaldehído
Alcoholes	Monoterpénicos Alifáticos Sesquiterpénicos Aromáticos	Geraniol, citronelol 3-Decanol Espatulenol, cedrol Alcohol bencílico
Fenoles	Aromáticos	Timol, carvacrol

**1.3.4 Aplicaciones de los aceites esenciales.** El tipo de AE y su calidad, determinan en qué producto final será incorporado un aceite. Los AE son ampliamente utilizados como materia prima en diferentes tipos de industria, e.g. cosmética, alimenticia, bebidas, textil, etc., mientras que otras industrias pueden usar productos aislados de esencias, como es el caso de la industria farmacéutica [45].

La **Tabla 3** proporciona una visión general del uso de los AE en las diferentes ramas de consumo.

**Tabla 3.** Industrias usuarias de productos aromáticos naturales y aceites esenciales.

<b>Industrias</b>	<b>Aplicaciones</b>
Alimenticia	Salsas Condimentos Bebidas refrescantes Alimentos procesados y enlatados
Licorera	Aperitivos Saborizantes
Cosmética	Perfumes Dentífricos Cremas, lociones
Farmacéutica	Veterinaria Antisépticos Analgésicos Aromaterapia Homeopatía
Uso doméstico	Desodorantes Desinfectantes de ambiente Jabones
Agroquímica	Bioinsecticidas Aleloquímicos
Textil	Elaboración de enmascadores de olores Tratamiento con mordientes después del teñido
Petroquímica y minería	Utiliza esencias o terpenos derivados de ellas como vehículos flotantes y lubricantes
Pinturas	Enmascaradotes de olores Disolvente biodegradable
Química fina	Precusores químicos, <i>e.g.</i> citral, safrol, trementina.

**1.3.5 Control de calidad de los aceites esenciales.** Dentro de todos los niveles de la cadena productiva de aceites esenciales, el primer control que se realiza, es el de los parámetros organolépticos. Esta prueba se realiza para saber si el AE presenta adulteración, e.g. la dilución, aunque en otros casos, el comprador puede exigir un análisis químico con el fin de saber la proporción en la cual se encuentran sus componentes principales, o en el peor de los casos, exigirle a la empresa certificaciones en BPM, ISO [4, 43, 45].

En la **Tabla 4**, se observan los parámetros que más se utilizan para el control de calidad de los AE.

**Tabla 4.** Parámetros utilizados para el control de calidad de los aceites esenciales

Características organolépticas	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Olor</li> <li>▪ Color</li> </ul>
Determinaciones físicas	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Densidad</li> <li>▪ Miscibilidad en etanol</li> <li>▪ Índice de refracción</li> <li>▪ Poder rotatorio</li> </ul>
Índices químicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Índice de acidez</li> <li>▪ Índice de fenoles</li> <li>▪ Índice de éster</li> <li>▪ Determinación de aldehídos y cetonas</li> </ul>
Características cromatográficas	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Cuantificación de los componentes principales</li> <li>▪ Análisis por cromatografía de gases (GC-MS, GC)</li> </ul>
Características espectroscópicas	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Ultravioleta</li> <li>▪ Infrarrojo</li> <li>▪ RMN</li> </ul>

**1.3.6 Biogénesis de los aceites esenciales.** En las plantas se presentan unas vías metabólicas particulares, no existentes en los animales, por las cuales se pueden producir cantidades grandes de compuestos de naturaleza química conocida, la mayoría de los cuales no tiene un rol específico aún bien conocido. El conjunto de estas vías metabólicas se le conoce como metabolismo secundario. Cabe señalar, que los productos de este proceso de biosíntesis, en general, cumplen con las siguientes funciones:

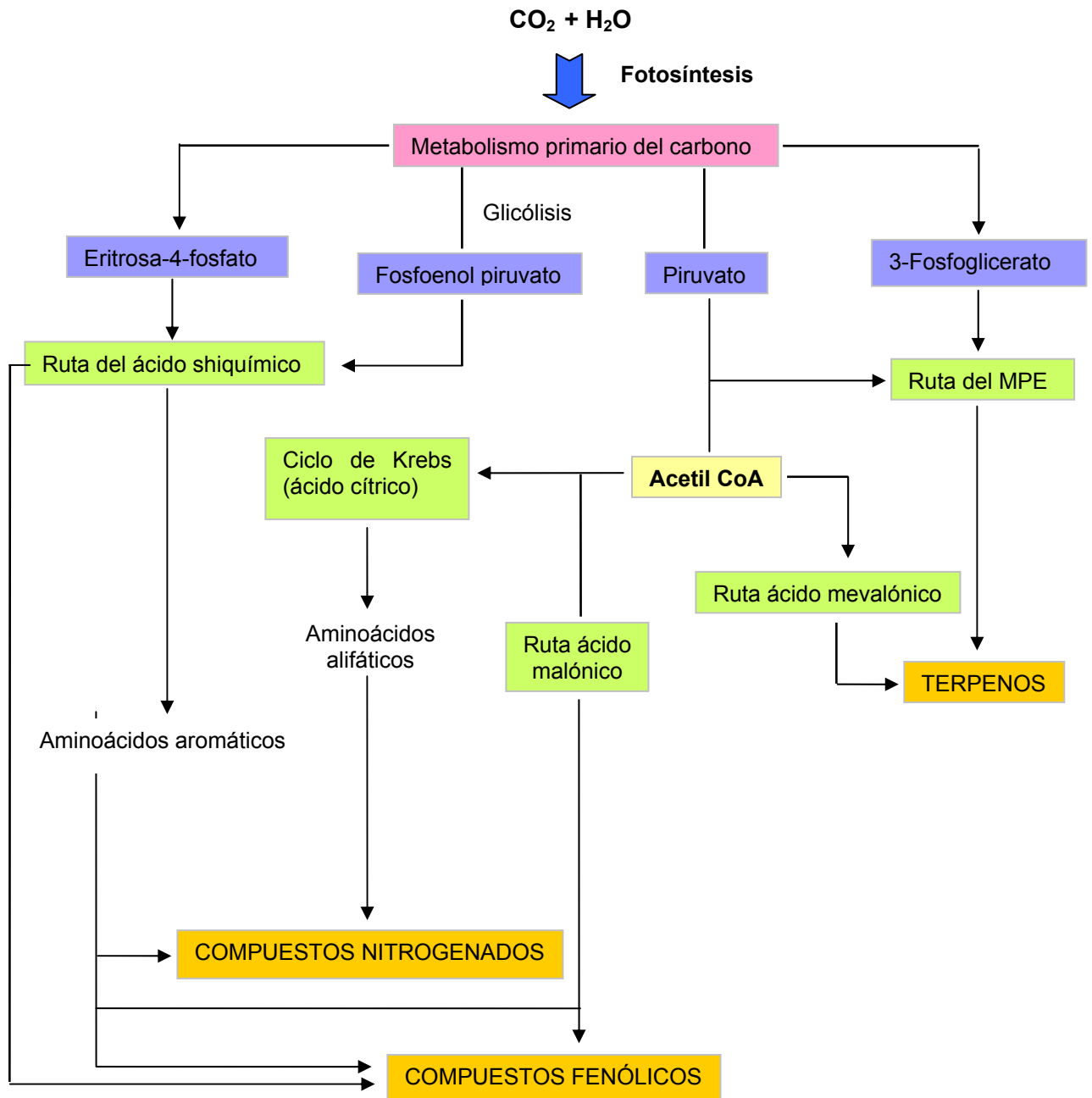
- ✓ No juegan rol en el metabolismo primario;
- ✓ Tienen una distribución restringida;
- ✓ La principal función de algunos de ellos es la protección contra el ataque de insectos y patógenos;
- ✓ Son atractivos de los animales para la polinización y la dispersión del fruto y de la semilla;
- ✓ Se acumulan en grandes cantidades sin efectos negativos en las células o en las plantas.

Sin embargo, los metabolitos secundarios y sus derivados tienen efectos significativos sobre el metabolismo animal y humano a bajas dosis. Por esa razón, muchos de ellos se emplean como drogas, venenos, saborizantes, ingredientes industriales, *etc.*

La síntesis específica de cada compuesto, suele estar restringida a estados específicos del desarrollo de cada tipo de organismo, células especializadas y periodos de estrés causados por la deficiencia de nutrientes o por el ataque de microorganismos.

- ✓ **Metabolismo de las plantas.** El metabolismo secundario se puede definir como la biosíntesis, la transformación y la degradación de los compuestos endógenos mediante proteínas [44]. Los metabolitos secundarios volátiles son compuestos orgánicos que aparentemente no tienen ninguna función directa en el crecimiento y desarrollo de las plantas y, al parecer, en los procesos de fotosíntesis, respiración, formación de carbohidratos, proteínas, lípidos, *etc.* [46, 47].

Según las vías biosintéticas que les dan su origen, los metabolitos se dividen en tres grupos: (1) Terpenos; (2) Compuestos fenólicos y (3) Nitrogenados, que se obtienen a partir de vías de síntesis relacionadas con rutas degradativas del metabolismo primario de las plantas. En la **Figura 5**, se muestran la interconexión de los principales grupos de metabolitos secundarios y su relación con la fotosíntesis.



**Figura 5.** Vías de síntesis de los principales grupos de metabolitos secundarios.

La biosíntesis de los terpenos depende de un número variable de condensaciones consecutivas de los monómeros activos. Existen dos rutas biosintéticas para la formación de terpenos [43, 44]:

- **Ruta del ácido mevalónico:** tres moléculas de acetil-CoA se unen para formar el ácido mevalónico, que es un intermediario de seis carbonos, el cual es fosforilado con dos grupos fosfato (pirofosfato), que después es descarboxilado y deshidratado para producir isopentenil difosfato (IPP).
- **Ruta independiente del mevalonato:** utiliza intermediarios de la glicólisis para sintetizar IPP.

Los fenilpropanos presentes en los AE se originan biosintéticamente a partir del ácido shiquímico, aislado inicialmente de la planta asiática *Illicium sp.* (Fam. Illiciaceae), y es reconocido como el punto de partida para un vasto número de compuestos naturales de diferentes clases. Aunque es un constituyente vegetal a nivel de trazas, no hay duda de que es un metabolito “universal” en todas las plantas superiores. El ácido shiquímico es el precursor de los constituyentes vegetales que contienen anillos aromáticos diferentes a los formados por la ruta de la malonilcoenzima-A.

Hay en muchos casos dos patrones estructurales claros que permiten reconocer los compuestos aromáticos derivados biosintéticamente del ácido shiquímico: el patrón de oxigenación y la presencia de anillos aromáticos ligados a cadenas de tres átomos de carbono, e.g. en este caso, los grupos oxigenados están en disposición *orto*- o *diorto*- entre sí; mientras que en los metabolitos aromáticos originados por la vía de la malonilcoenzima-A, los grupos oxigenados se hallan en disposición *meta*- entre sí [48].

### 1.3.7 Tipos de aceites esenciales

Los AE pueden ser clasificados de la siguiente manera [2, 42]:

- ✓ AEs crudos: son directamente aislados de la planta, sin procesamiento adicional alguno y se utilizan como materia prima para velas, artículos de aseo y limpieza, insecticidas, *etc.*
- ✓ AEs refinados: tienen el mayor valor agregado y se utilizan en la industria farmacéutica, alimenticia, cosmética y de perfumes.

### 1.3.8 Factores que influyen sobre la composición y el rendimiento de los aceites esenciales.

Los siguientes son los factores que influyen sobre la composición química y rendimiento de los AE [42]:

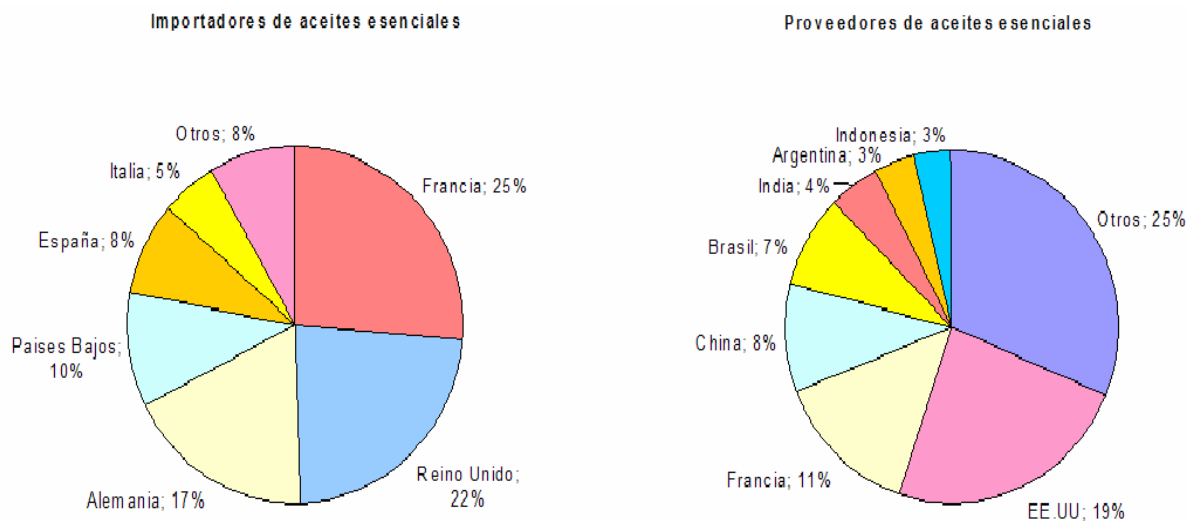
- ✓ Método de cultivo: fertilizantes, abono, distancia de siembra, podas;
- ✓ Condiciones geobotánicas: clima, altitud, tipo de suelo, luminosidad, pluviosidad, temperatura;
- ✓ Parte de la planta: tallos, hojas, flores, raíz;
- ✓ Método de extracción del aceite: destilación, extracción con solvente, hidrodestilación, extracción con fluido supercrítico, *etc.*;
- ✓ Época de recolección y edad de la planta.

## 1.4 MERCADO DE LOS ACEITES ESENCIALES

El interés en las plantas aromáticas y medicinales, se ha incrementado en los últimos años, ya que éstas no sólo producen un beneficio para la salud, sino

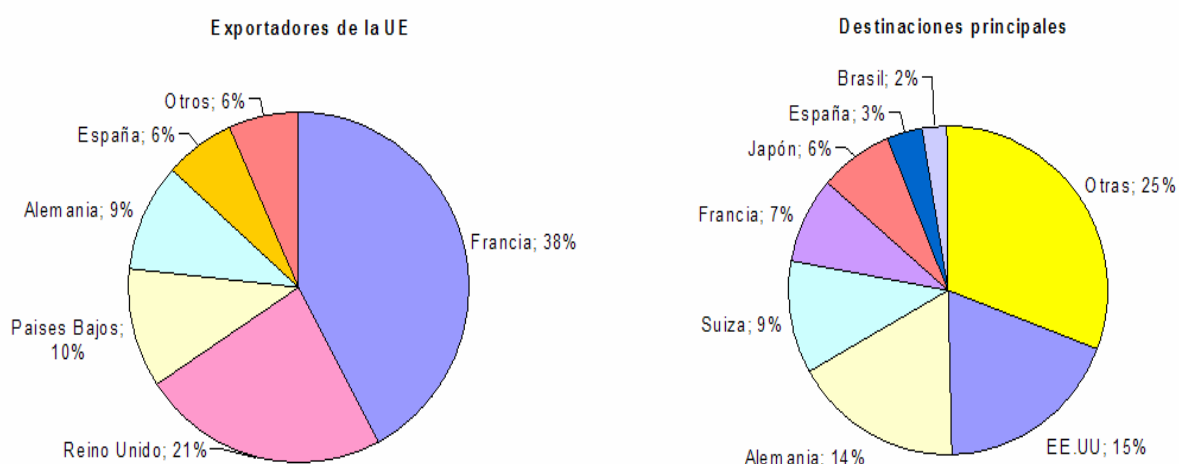
también contribuyen al sistema productivo y económico de un país. Desde el punto de vista económico, la demanda de materia prima y productos elaborados sobre la base de plantas aromáticas y medicinales ha crecido, alcanzando el mercado mundial de plantas medicinales y hierbas aromáticas US\$ 24.18 billones anuales [49] y siendo Europa el principal consumidor de hierbas medicinales procesadas, seguido, por Asia, Norteamérica y Latinoamérica.

Francia y el Reino Unido son los importadores líderes de AE en la Unión Europea (EU), juntos dan razón de casi la mitad del valor total de importaciones. El Reino Unido es también un importante comerciante de AE, al poseer un gran número de compañías que exportan grandes volúmenes de aceites reprocesados. En el 2003, Alemania importó un valor de € 81 millones en AE, haciéndolo el tercer importador líder de la EU de estos productos. Otros importadores son los Países Bajos (10% del valor total de importación de la UE) y España (8%) [49]. En la **Figura 6**, se observan los países que más importan AE [49].



**Figura 6.** Principales importadores de aceites esenciales en el mundo [49].

Se calculó un total de € 373 millones en exportaciones de AEs, por parte de los estados miembros de la UE en el 2003 [49]. Más de la mitad del valor total de las exportaciones de la UE estuvo dirigido a otros países, como Alemania, Francia y Reino Unido; otra parte sustancial de las exportaciones es dirigida a los Estados Unidos. Los AE que más se exportan son los de cítricos, naranja, limón y lima, entre otros [49]. En la **Figura 7**, se observan los países que más exportan AEs.



**Figura 7.** Exportadores de la UE y destinaciones principales de aceites esenciales en el 2003 [49].

En nuestro país, existen especies y variedades bien adaptadas o propias de nuestra biodiversidad que algunos expertos señalan como las más promisorias en el esquema de producción sostenible, para su comercialización, bien sea como productos frescos y secos, o como sus derivados procesados, tales como los AE, oleorresinas y extractos etanólicos, requeridos por diferentes industrias, e.g, farmacéutica. Existen cerca de 120 especies aromáticas con potencial productivo

y con aptitud para ser cultivadas; sin embargo, las que principalmente se cultivan en el país son, en orden de importancia, la manzanilla, la limonaria, la albahaca, la hierbabuena; junto con otras aromáticas y especias ampliamente reconocidas como limoncillo, toronjil, cidrón, tomillo, menta, mejorana, romero y orégano [50]. Su producción en nuestro país se encuentra ubicada en zonas frías y ligeramente templadas, sobresaliendo los Departamentos de Antioquia (La Ceja, San Jerónimo, Marinilla y Rionegro), Cundinamarca (Cota, Fómeque, Anolaima, Funza, Chía, Mosquera), Cauca (Piendamó, Boquerón y Popayán) y Nariño (Pasto e Ipiales) [50].

## 1.5 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

La destilación es el principal método para extraer los AE de las plantas aromáticas, puede ser directo o con vapor de agua. La elección del método depende de la cantidad o características del aceite (volatilidad, punto de ebullición de los componentes, *etc*), como de la planta o su parte de la cual se va a extraer el AE [2, 4].

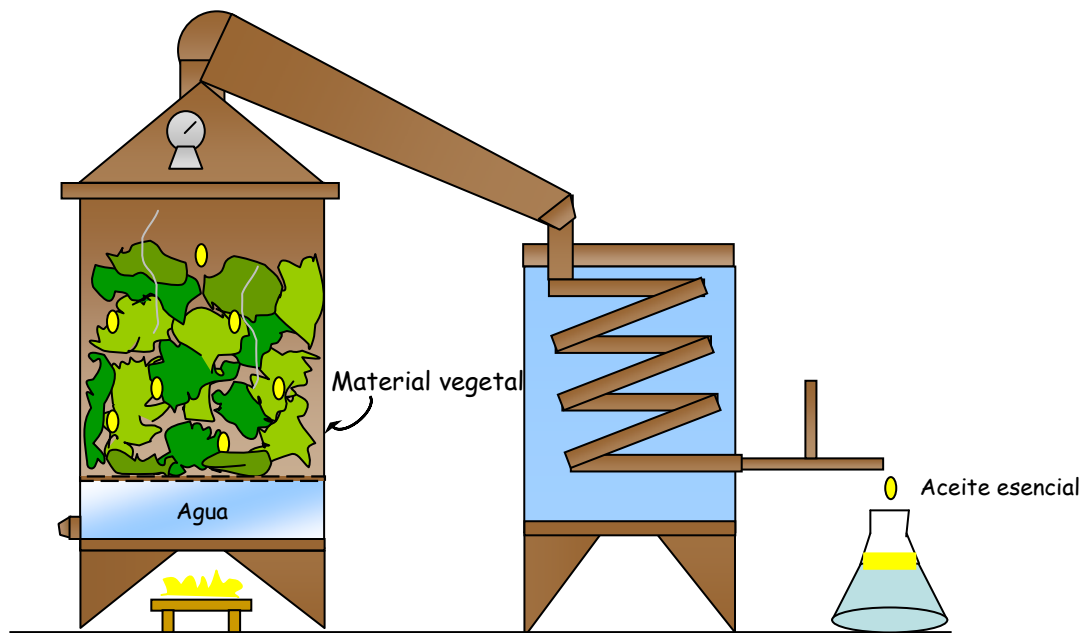
Dentro de las prácticas existen tres métodos que son los más utilizados tanto a nivel industrial, como de laboratorio y dependen del grado de contacto entre el material vegetal y el agua, estos son: la hidrodestilación, destilación con agua/vapor y destilación por arrastre con vapor. En la **Tabla 5**, se muestra una descripción general de estos métodos de extracción [4, 51, 52].

**Tabla 5.** Descripción general de los métodos más usados en la destilación de aceites.

Método de destilación	Descripción
Destilación con agua (hidrodestilación)	Es el método de destilación más simple y relativamente económico. El material es inmerso en agua y puesto a hervir. El vapor y aceite se condensan y se separan del agua. Este método es apropiado para plantas finamente pulverizadas. El inconveniente es: que los compuestos pueden sufrir hidrólisis durante la destilación.
Destilación con agua y vapor	Similar a la destilación con agua, sólo que el material vegetal no necesita ser pulverizado o picado, y es mantenido sobre una criba perforada, que lo separa del agua. Este método es ligeramente más costoso que el anterior.
Destilación por arrastre con vapor	Este método utiliza vapor seco para extraer el aceite. Es más caro que los dos anteriores. Es apropiado para plantas con aceites que tienen compuestos con puntos de ebullición muy alto. La calidad del aceite obtenido es buena.

**1.5.1 Destilación con agua/vapor.** El material vegetal se coloca sobre un fondo perforado o criba, la cual está ubicada a cierta distancia del fondo de un tanque llamado retorta. La parte más baja contiene agua hasta una altura algo menor que el nivel de la criba. El principio de la destilación con agua/vapor es llevar el agua a su estado de ebullición, en donde el vapor generado atraviesa el material vegetal, arrastrando los metabolitos secundarios volátiles, de tal manera, que todos los vapores generados puedan ser luego condensados y recolectados [51, 52]. El tiempo total de destilación es función de la naturaleza de los componentes presentes en el AE. Si el aceite contiene compuestos con puntos de ebullición altos, el tiempo de destilación es muy largo.

En la **Figura 8**, se muestra un sistema tradicional de un proceso de destilación de AE con agua/vapor.



**Figura 8.** Destilación mediante agua/vapor.

**1.5.2 Hidrodestilación asistida por la radiación con microondas (MWHD).** El método consiste en sumergir el material vegetal al agua y someterlo a la acción de la radiación de microondas, el agua se calienta hasta su punto de ebullición, libera los compuestos del AE contenidos en glándulas, por efecto de la presión de vapor; los compuestos volátiles en fase gaseosa son arrastrados hasta el condensador, en donde se forman dos capas, una rica en aceite y otra es hidrolato, las cuales se separan por decantación. El periodo de destilación por MWHD toma de 10 a 30 min. Se debe tener en cuenta que el tiempo de hidrodestilación influye tanto sobre la cantidad de aceite aislado, como en su composición [42, 53].

El método de extracción asistida por la radiación de microondas, presenta ventajas sobresalientes con respecto a las técnicas tradicionales de destilación: es un proceso muy rápido y relativamente económico y los AE obtenidos se encuentran libres de los productos de descomposición térmica y de contaminantes [53, 54].

**1.5.3. Hidrodestilación (HD).** El principio del método es llevar el agua hasta su punto de ebullición, la cual está en contacto directo con el material vegetal, de tal forma que los vapores generados atraviesen los tejidos de la planta, arrastrando las sustancias de interés.

Los AE obtenidos mediante hidrodestilación presentan olores fuertes y colores más oscuros, en comparación con los producidos por otros métodos. Podrán resultar de menor calidad, ya que algunos componentes, como los ésteres, pueden experimentar la hidrólisis, algunos hidrocarburos monoterpénicos o aldehídos son susceptibles a la polimerización. Los compuestos oxigenados, *e.g.* fenoles, tienden a ser algo solubles en agua [4].

## **1.6 CONTROL DE CALIDAD DE LOS ACEITES ESENCIALES**

Existen diferentes métodos para el control de la calidad de los AE, entre los cuales se encuentran los métodos fisicoquímicos, que permiten determinar propiedades macroscópicas de la mezcla como son su densidad, solubilidad en etanol, índice de refracción, entre otras.

**1.6.1 Índice de refracción.** El índice de refracción de una sustancia transparente, mide la relación entre la velocidad de la luz en el vacío y la velocidad de la luz en la sustancia. Se usa para la identificación y determinación de la pureza de un compuesto y para el análisis de la composición de mezclas binarias homogéneas de constituyentes conocidos. Esta propiedad sirve para controlar la pureza de los

AE, que tienen un índice de refracción característico [4] y, para ello se exige su medición según la norma ISO 280:1998.

**1.6.2 Solubilidad.** Los aceites se disuelven bien en solventes orgánicos tales como benceno, pentano, éter de petróleo, etc. En cambio, se obtienen grandes diferencias de su solubilidad en alcohol de 70 – 90% [4]. Si bien los AE son solubles en medio no polar, también suelen tener una solubilidad alta en etanol, lo que es ampliamente explotado en la elaboración de fragancias [3]. La norma internacional que rige esta determinación es ISO 875:1999.

**1.6.3 Densidad.** La determinación de la densidad permite algunas veces deducir acerca de la composición de los aceites. Los AE, que tienen densidades mayores de  $1,0 \text{ g/cm}^3$ , contienen, principalmente, fenoles o sus derivados y ésteres, los de densidad más baja son ricos en hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpénicos [4]. La densidad se mide de acuerdo con la norma ISO 279:1998.

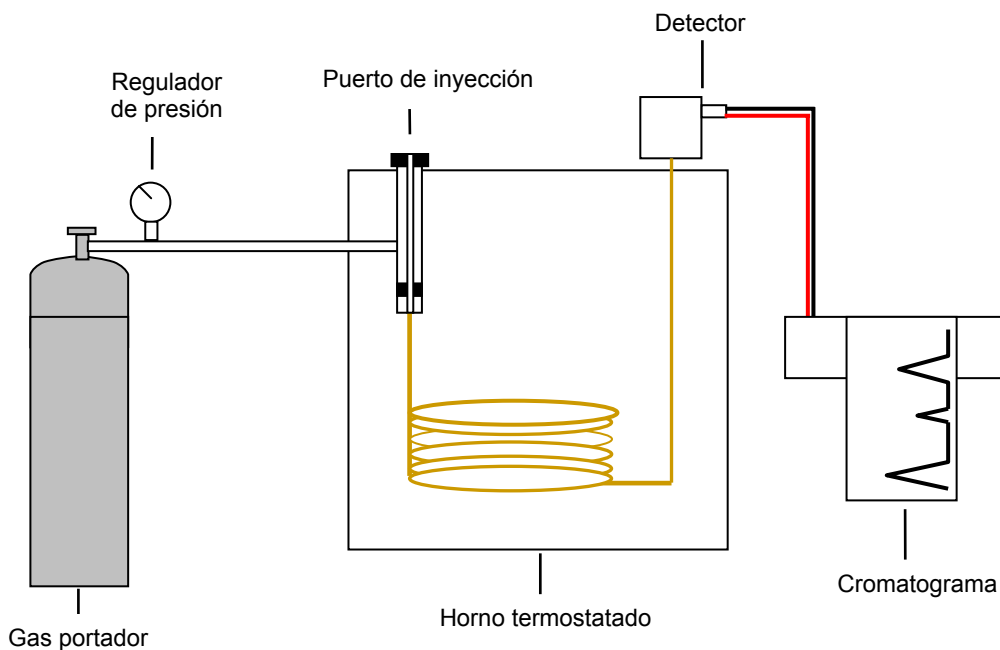
## 1.7 ANÁLISIS INSTRUMENTAL

**1.7.1 Cromatografía de gases (GC).** Es la técnica más importante para el estudio de los AE. La cromatografía, es un método físico de separación de mezclas complejas, en el cual los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales es la fase estacionaria (f.e., sólida o líquida) y otra es la móvil (gas  $\text{N}_2$ , He,  $\text{H}_2$ ). La columna se encuentra localizada dentro del horno, se usa la temperatura constante o programada. En la entrada, la columna está conectada a un inyector, en donde se introduce una porción de la muestra a analizar [55-57]. La muestra entra en la columna y los analitos pasan a través de ella a diferentes velocidades, emergiendo a distintos tiempos, de acuerdo estrictamente con su temperatura de ebullición, cuando la f.e. es apolar.

La cromatografía de gases separa los compuestos de una mezcla, pero para su identificación se hace necesario implementar otras técnicas espectroscópicas como son la espectrometría de masas (GC-MS), espectroscopía infrarroja (IR), etc [58].

El tiempo de retención no es un parámetro absolutamente confiable para el análisis cualitativo de componentes, ya que depende de muchas variables, e.g. tipo de columna, temperatura, flujo del gas de arrastre, cantidad de muestra inyectada, etc. Por este motivo, se hizo necesaria la aplicación de un sistema de índices de retención, propuesto por Kovàts [59], que sirve para la identificación cualitativa. Este sistema se basa en la comparación de la posición del pico del compuesto de interés, con la de los picos correspondientes a los hidrocarburos patrón, uno, que eluye antes y, otro, después del analito [55, 59, 60].

En la **Figura 9**, se observan las principales partes de un GC: gas portador, puerto de inyección, columna capilar, un horno termostataado y el detector.

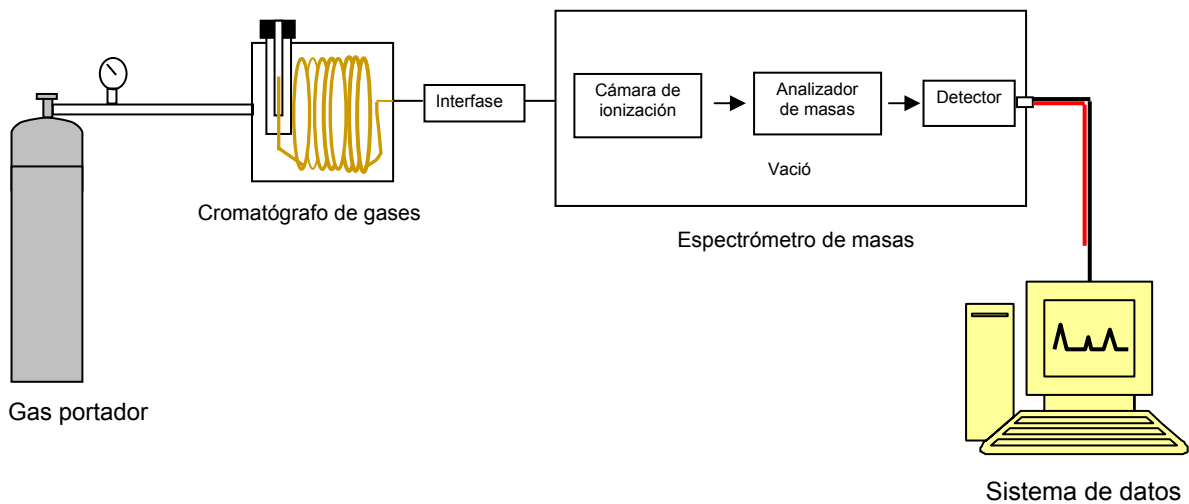


**Figura 9.** Principales partes de un cromatógrafo de gases.

### 1.7.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

El acoplamiento de un cromatógrafo de gases a un espectrómetro de masas, permite hacer un análisis rápido y confiable, para el análisis cualitativo y cuantitativo de mezclas complejas [60, 61]. Este sistema de GC-MS consta de tres bloques: cromatógrafo de gases, espectrómetro de masas y un sistema de datos. En la **Figura 10**, se observan las principales partes del equipo GC-MS.

El sistema de datos, convierte las señales procedentes del espectrómetro de masas, en cromatogramas y espectros de masas, permitiendo obtener información estructural de los componentes de la esencia, de acuerdo con el patrón de fragmentación del compuesto [62].



**Figura 10.** Principales partes de un cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas.

## 1.8 Cuantificación de los metabolitos secundarios

**1.8.1 Estandarización interna.** Uno de los métodos más utilizados en GC para cuantificar los compuestos presentes en un AE es el de estandarización interna, cuando se obtienen dos cromatogramas bajo las mismas condiciones de operación, uno del AE y otro con el mismo aceite mas el estándar o patrón interno añadido, comprobando previamente que éste no interfiera, ni reaccione con algún componente presente en el AE. La concentración de cada uno de los compuestos se determina mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{A_{istd}}{C_{istd}} = \frac{A_X}{C_X}$$

**Ecuación 1**

Donde:

$A_{istd}$ : Área del estándar interno, *n*-tetradecano (cuentas);

$A_X$ : Área del compuesto de interés x (cuentas);

$C_{istd}$ : Concentración del estándar interno, *n*-tetradecano (ppm);

$C_X$ : Concentración del compuesto de interés x (ppm).

**1.8.2 Cuantificación externa.** Es la comparación de las áreas de las sustancias de referencia (patrón certificado) de los compuestos que contiene el AE, con las áreas de los mismos en el cromatograma de la muestra real obtenido bajo los mismos parámetros operacionales.

## 1.9 ACTIVIDAD BIOLÓGICA

**1.9.1 Actividad antioxidante.** Se ha desarrollado una serie de métodos que permite evaluar la capacidad antioxidante. Uno de ellos, se basa en la medida de la reacción con radicales, tales como el ABTS<sup>+</sup> [63]. La unidad de medida o comparativa es el factor Trolox<sup>®</sup> o TEAC (*Trolox<sup>®</sup> Equivalent Antioxidant Capacity*) [64, 65]. Los compuestos que tienen la habilidad para “secuestrar” los radicales generados durante la oxidación, inhiben la propagación de éstos, transfiriéndoles protones o electrones [63, 64].

✓ **Definición.** Un antioxidante (AO), se define como cualquier sustancia, ya sea de origen natural o sintético, que cuando está en baja concentración en relación con un sustrato oxidable, inhibe o previene la oxidación de este sustrato [64 - 66].

Los antioxidantes fueron usados antes de la II Guerra Mundial para la conservación de los alimentos. Eran sustancias naturales, que hoy en día son reemplazados por sustancias sintéticas, las cuales poseían propiedades antioxidantes más pronunciadas. Los antioxidantes naturales se encuentran en casi todas las plantas, microorganismos, hongos. La mayoría de ellos son compuestos fenólicos y los grupos más importantes de antioxidantes naturales son tocoferoles, flavonoides y ácidos fenólicos [67].

La función antioxidante que presentan estos compuestos en los alimentos ha atraído la atención gracias al papel que juegan en la dieta, en cuanto a la prevención de enfermedades; los antioxidantes son importantes porque poseen la capacidad de proteger las células contra el daño oxidativo, el cual provoca envejecimiento y enfermedades crónico-degenerativas, tales como el cáncer, enfermedad cardiovascular, cataratas y diabetes [67]. En muchos estudios sobre especies se ha aislado una amplia variedad de compuestos antioxidantes

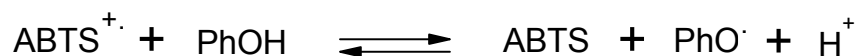
fenólicos, lo cual los coloca en la categoría de los AO más interesantes y promisorios, e.g. los flavonoides. Son sustancias importantes en el área de la farmacología, principalmente, por su capacidad de contrarrestar la formación de radicales, cuya influencia se ve reflejada en las propiedades antialérgicas, antivirales, antimicrobianas, antiinflamatorias, etc. que poseen [68, 69]. La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos presentes en las plantas aromáticas depende de su estructura y, particularmente, del número y la posición del grupo hidroxilo [6, 69-71].

**1.9.2 Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS<sup>+</sup>.** El efecto protector de los AE y sustancias de referencia se determina, entre otros, por el método descrito por Re R. *et al.* [65], el cual se basa en la capacidad que tienen algunos compuestos para atrapar radicales, *i.e.* ABTS<sup>+</sup>. La técnica se usa ampliamente para muestras biológicas, alimentos, compuestos puros o extractos de plantas de naturaleza hidrófila o lipofílica [65, 72].

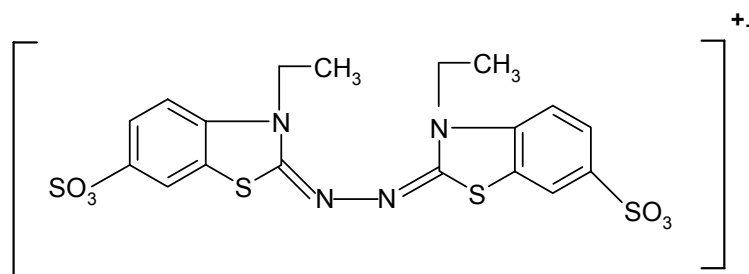
El compuesto cromóforo ABTS es una sustancia color azul/verde con máximo de adsorción a 432 nm, es muy soluble en agua y químicamente estable. El radical ABTS<sup>+</sup>, una vez generado de la reacción entre el ABTS y el persulfato potásico, presenta nuevas características y un máximo de absorción en 734 nm [64, 65, 71, 72]. Esta longitud de onda, próxima a la región infrarroja, reduce la posibilidad de interferencias de compuestos coloreados que absorben en la región visible o compuestos resultantes de reacciones secundarias. Además el radical generado fue validado por su estabilidad, reproducibilidad y por ser una alternativa más económica en este tipo de pruebas [65, 71, 73].

El atrapamiento del catión-radical por interacción con la sustancia antioxidante, que se añade, una vez ha transcurrido un tiempo de 6 min, al sistema  $ABTS^{\cdot+}$ , se detecta por una disminución de la absorbancia [65, 71]. En el **Esquema 1**, se observa la reacción entre una sustancia AO y el catión-radical  $ABTS^{\cdot+}$  [74].

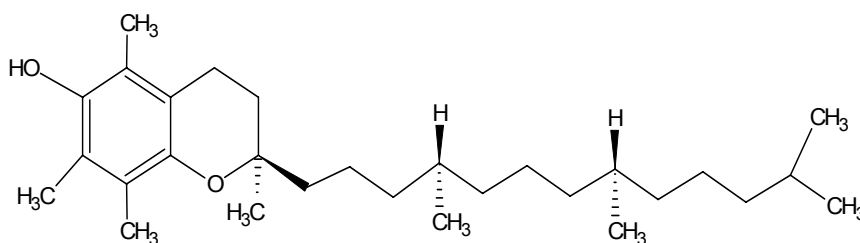
**Esquema 1.** Reacción entre el catión-radical  $ABTS^{\cdot+}$  y un AO.



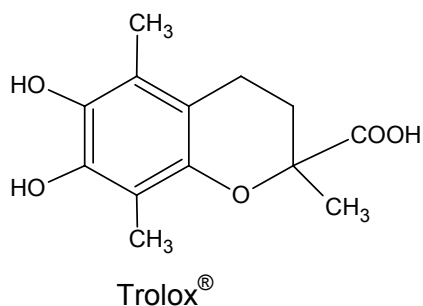
La actividad antioxidante de la sustancia se compara con la actividad del Trolox<sup>®</sup> [65], el compuesto análogo a la vitamina E, pero soluble en agua. En la **Figura 11**, se muestran las estructuras del  $ABTS^{\cdot+}$ , vitamina E y Trolox<sup>®</sup>.



ABTS<sup>+</sup>.



Vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol)



**Figura 11.** Estructuras químicas del ABTS, vitamina E y Trolox®.

### 1.10 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA)

El análisis de componentes principales es una de las herramientas más utilizadas que proporciona una descripción condensada de los datos, puesto que reduce su dimensionalidad.

**1.10.1 Definición.** El Análisis de Componentes Principales (PCA) es una técnica estadística de síntesis de la información numérica, o reducción de la dimensión (número de variables). Es decir, ante un conjunto de datos con muchas variables, el objetivo será reducirlas a un menor número, con la pérdida mínima de la información [75, 76].

Los siguientes son aspectos a tener en cuenta en este método:

- ✓ El uso del análisis de componentes principales en un sistema de datos multivariantes, puede realizar la reducción de dimensiones, la clasificación de muestras e identificación de grupos.
- ✓ La elección de los factores se realiza de tal forma, que el primero recoja la mayor proporción posible de la variabilidad original; el segundo factor debe

recoger la máxima variabilidad posible no recogida por el primero, y así sucesivamente. Del total de factores se elegirán aquéllos que recojan el porcentaje de variabilidad que se considere suficiente; a éstos se les denominará “componentes principales”.

## **1.11 ASPECTOS GENERALES DEL MUNICIPIO DE BOLÍVAR, SANTANDER**

**1.11.1 Ubicación geográfica.** El Municipio de Bolívar se encuentra ubicado al sur del Departamento de Santander, aproximadamente a una distancia de 234 km de su capital Bucaramanga. Limita territorialmente por el Norte con los municipios de Landázuri y Cimitarra; por el Oriente con Vélez y Guavatá; por el Sur con el Peñón, Sucre, La Belleza y con el Departamento de Boyacá (Municipio Puerto Boyacá) y al Occidente con el Departamento de Antioquia.

**1.11.2 Características naturales.** El territorio bolivarense cuenta con una extensión total de 957.25 km<sup>2</sup>, con 150 km<sup>2</sup> de área urbana y 850 km<sup>2</sup> correspondientes al área rural. La altitud de la cabecera municipal es de 2100 m.s.n.m y una temperatura promedio de 17 °C.

El municipio de Bolívar, presenta los tres pisos térmicos, a saber: cálido, templado y frío, los cuales están dados por la altura sobre el nivel del mar. El piso térmico cálido, corresponde a las áreas localizadas entre los 200 - 1000 m.s.n.m y temperaturas mayores de 24 °C, que se presentan especialmente en la parte occidental del municipio, en las áreas de influencia del río Magdalena, Carare. El piso térmico templado, corresponde a las áreas localizadas entre los 1000 - 2000 m.s.n.m y temperaturas entre los 18 – 24 °C y se presenta en las partes medias del Municipio. Mientras que el piso térmico frío, corresponde a las áreas localizadas entre los 2000 – 2900 m.s.n.m y temperaturas entre los 12 - 18 °C; se localiza en las partes altas del Municipio, en límites con los Municipios de Peñón y Sucre.



## 2. ANÁLISIS CIENCIOMÉTRICO SOBRE LA PLANTA

### 2.1 Cienciometría

La cienciometría es una herramienta que permite situar a un país, una institución, un área temática o un individuo en el contexto mundial de la productividad científica [77]. La cienciometría también se define como el estudio de los aspectos cuantitativos de la ciencia como disciplina o actividad económica. Se aplica en la elaboración de las políticas científicas; comprende estudios cuantitativos de las actividades científicas, incluidas las publicaciones [78].

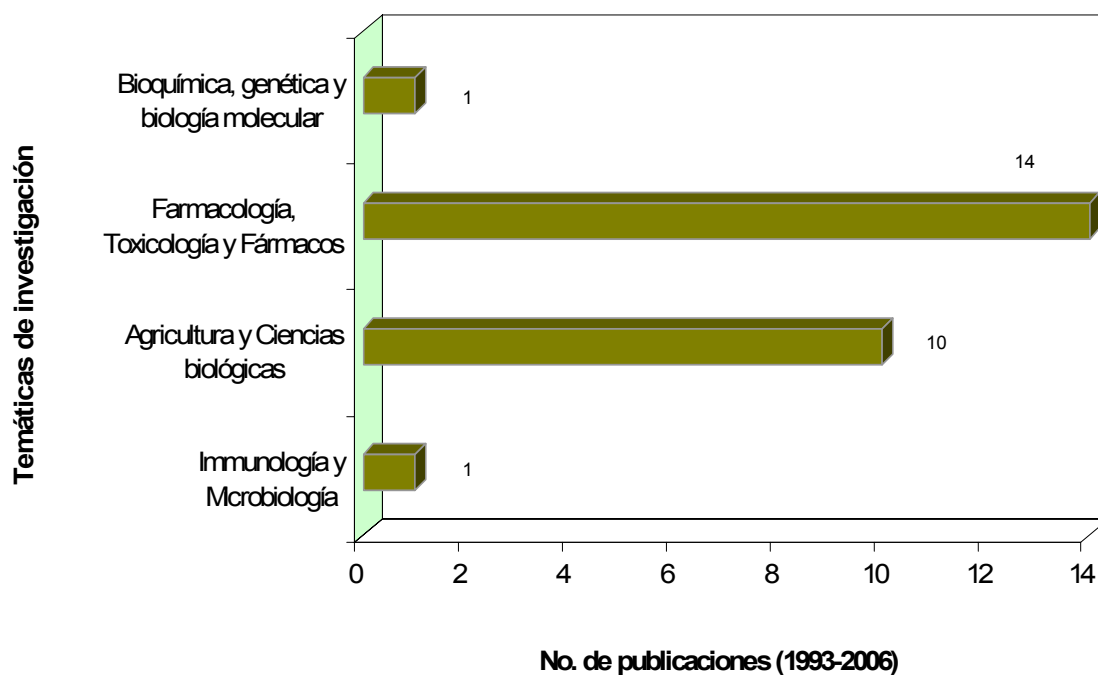
La cienciometría utiliza indicadores conocidos, e.g. la producción científica se puede medir por el conteo de trabajos y tipos de documentos (libros, artículos de revistas, publicaciones científicas, etc), la dinámica investigativa de un país puede monitorearse y seguir su tendencia a través del tiempo. En cuanto a las patentes, éstas reflejan las tendencias en los cambios técnicos a través del tiempo y miden los resultados de los recursos invertidos en actividades de investigación y desarrollo [78, 79].

La especie *Aloysia triphylla* ha sido objeto de muchos estudios, debido a sus aplicaciones medicinales. Existen bases de datos como la **Web of Science (ISI Web of Knowledge)** y **Elsevier (Scopus)**, que permiten hacer búsqueda sobre esta especie. En la siguiente sección se observará cuales son los autores, países, revistas y las áreas temáticas, relacionados con lo publicado sobre la especie.

## 2.2 Base de datos *Elsevier (Scopus)*

En la base de datos de *Scopus* se registraron 26 artículos que hacen referencia a la *Aloysia triphylla* o *Lippia citriodora*. Estos artículos se distribuyen, según las áreas temáticas Bioquímica, genética y Biología molecular, Farmacología, toxicología y fármacos, Agricultura y Ciencias biológicas, Inmunología y microbiología, en el periodo de observación de 1993 a 2006, así como aparece en la **Figura 13**.

**Figura 13.** Número de publicaciones, sobre *Aloysia triphylla* realizadas en diferentes áreas temáticas durante el periodo 1993-2006.



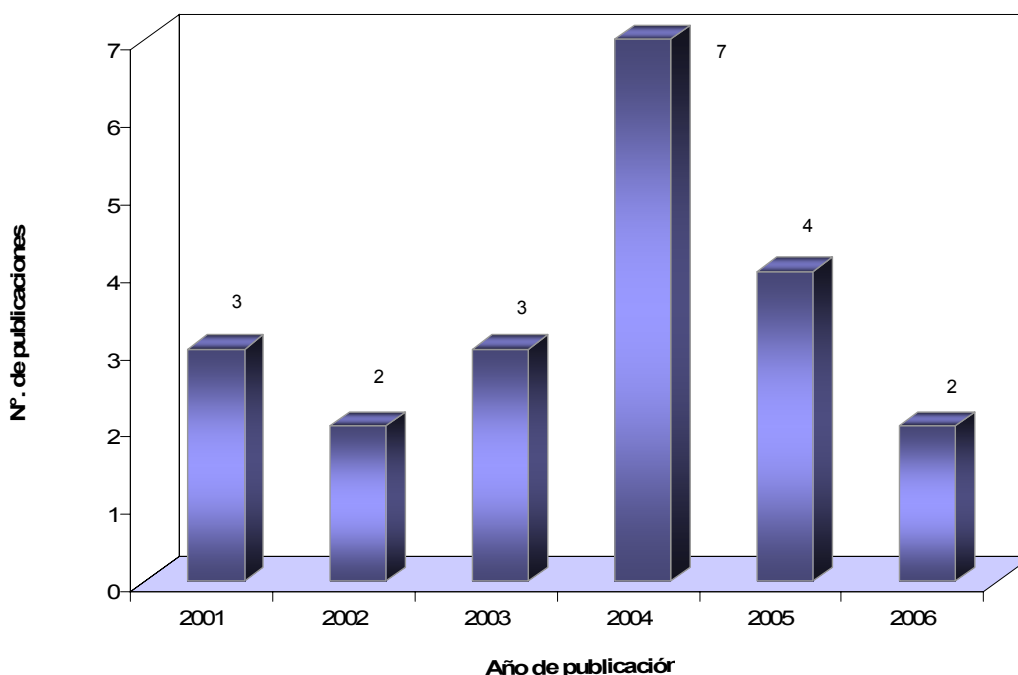
Periodo de observación: 1993-2006. Fuente: Base de datos *Elsevier (Scopus)*. Consultado: 2 de febrero de 2007. Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY-AUTH "*Aloysia triphylla* + *Lippia citriodora*".

En la **Figura 13**, se presentan las principales áreas de estudio sobre *Aloysia triphylla*. Las áreas en la que más se ha investigado sobre la planta es Farmacología, Toxicología y Fármacos; y Agricultura y Ciencias Biológicas, con 14 y 10 publicaciones, respectivamente, lo que demuestra la amplia aplicación de la planta en la medicina, debido a sus propiedades terapéuticas y medicinales.

### 2.3 Base de datos *Web of Science (ISI Web of knowledge)*

En la base de datos de la *Web Science* se encontraron 23 artículos que hacen referencia a la *Aloysia triphylla* o *Lippia citriodora*, en el periodo de observación de 2001 a 2007.

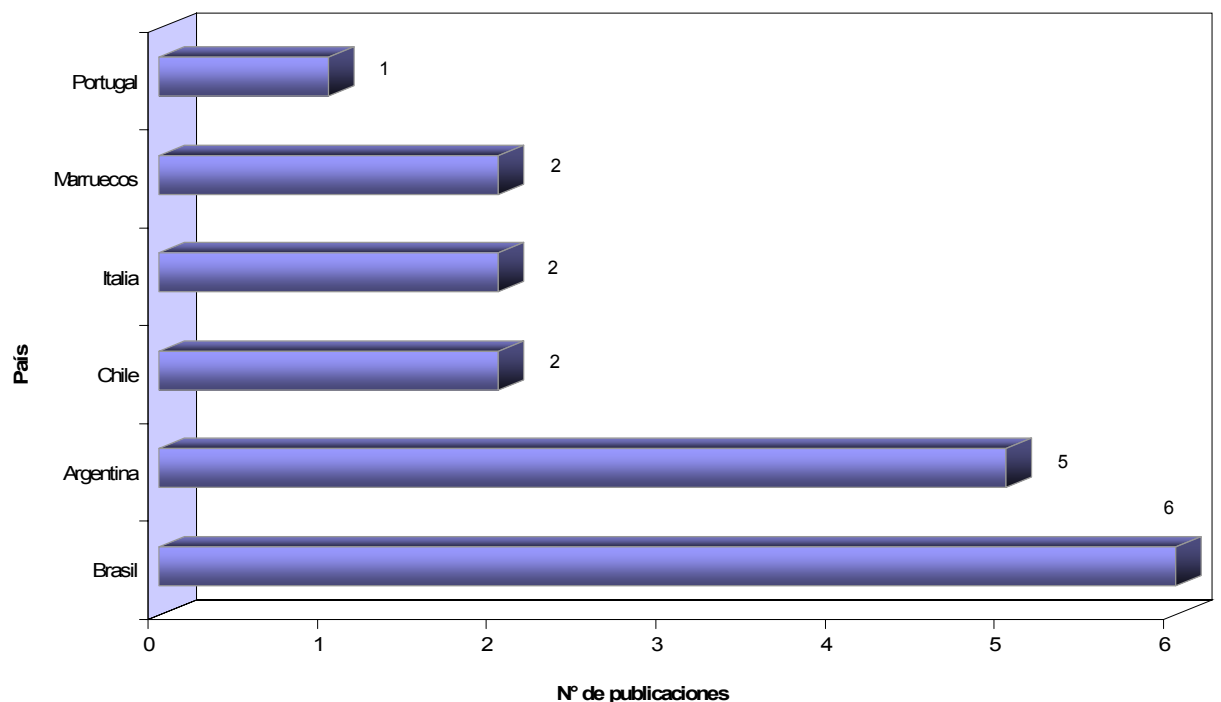
**Figura 14.** Número de publicaciones, sobre *Aloysia triphylla* realizadas en el periodo de observación de 2001-2007.



Periodo de observación: 2001-2007. Fuente: *Web of Science (ISI Web of knowledge)*. Consultado: 3 de febrero de 2007. Ecuación de búsqueda: "*Aloysia triphylla* + *Lippia citriodora*".

En la **Figura 14**, se observa que las investigaciones sobre la aplicación del AE de *Aloysia triphylla* han disminuido en los últimos años, a partir del año 2004 hasta el presente año (2007). El año, en que más se publicó, fue el 2004.

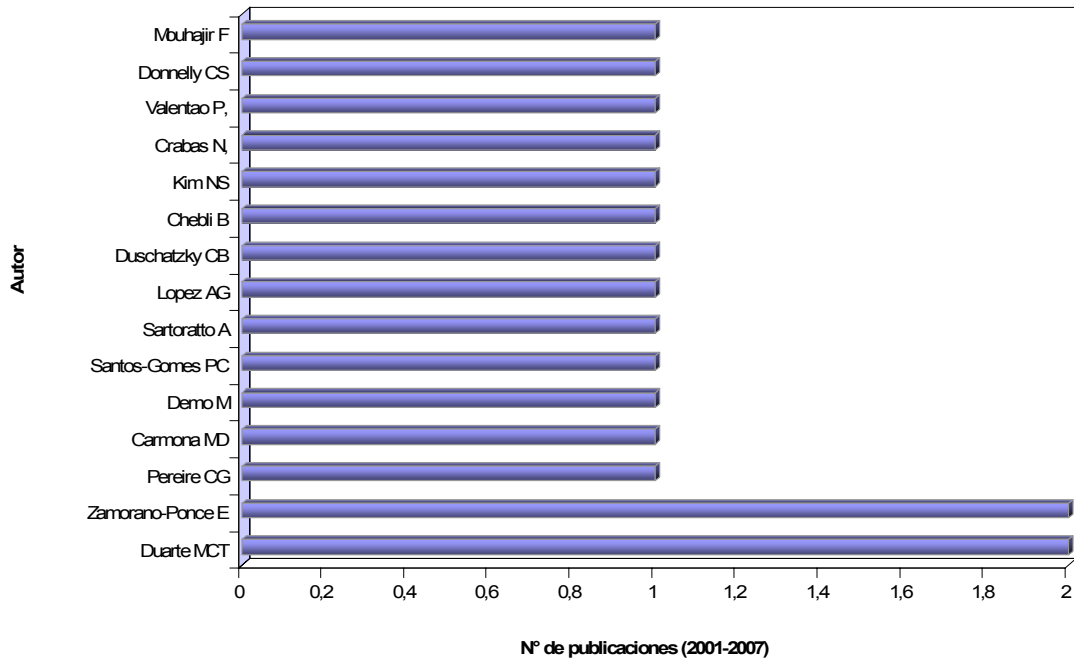
**Figura 15.** Relación entre país y número de publicaciones sobre *Aloysia triphylla*.



Periodo de observación: 2001-2007. Fuente: *Web of Science (ISI Web of Knowledge)*. Consultado: 18 de mayo de 2007. Ecuación de búsqueda: "*Aloysia triphylla* + *Lippia citriodora*".

Como se aprecia en la **Figura 15**, los países donde más se ha investigado sobre esta especie, son los Sur Americanos, como: Chile, Argentina y Brasil, estos dos últimos sobresalen por el alto número en la producción científica sobre *Aloysia triphylla*.

**Figura 16.** Autores que más han publicado sobre la especie *Aloysia triphylla*.

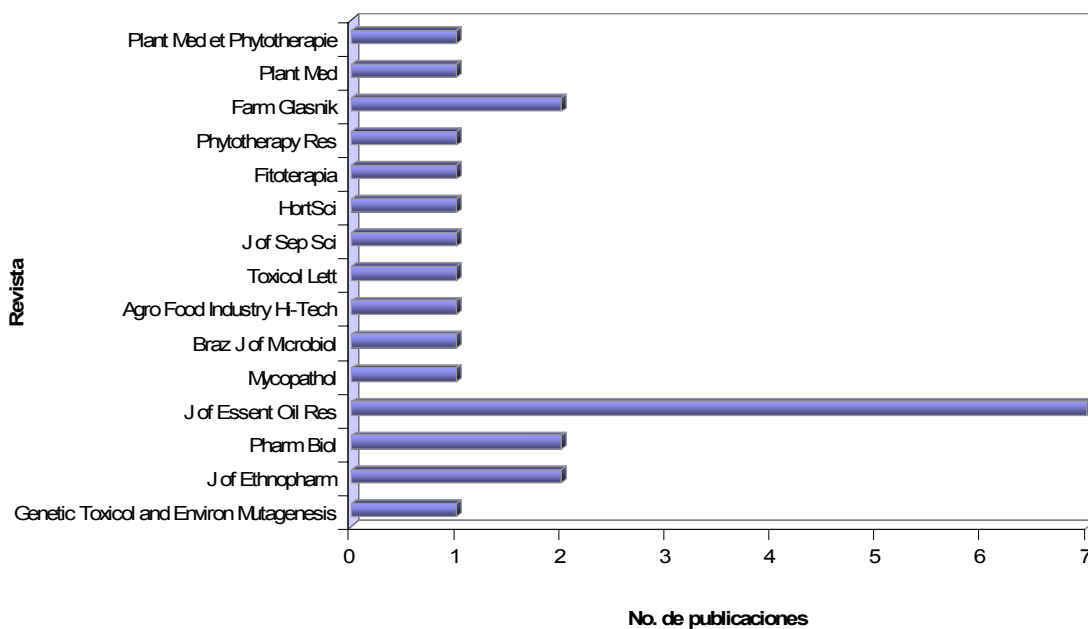


Periodo de observación: 2001-2007. Fuente: *Web of Science (ISI Web of Knowledge)*. Consultado: 18 de mayo de 2007. Ecuación de búsqueda: “*Aloysia triphylla* + *Lippia citriodora*”.

Como se había mencionado antes, uno de los países que más ha investigado sobre esta especie, es Brasil, lo que se ve reflejado, en los autores que son originarios de este país.

En la **Figura 17**, se presentan las revistas con más impacto, referenciadas en la **Web of Science**. La *Journal of Essential Oil Research* (7), es la revista donde más se ha publicado sobre *Aloysia triphylla*.

**Figura 17.** Relación entre revista y número de publicaciones sobre *Aloysia triphylla*.



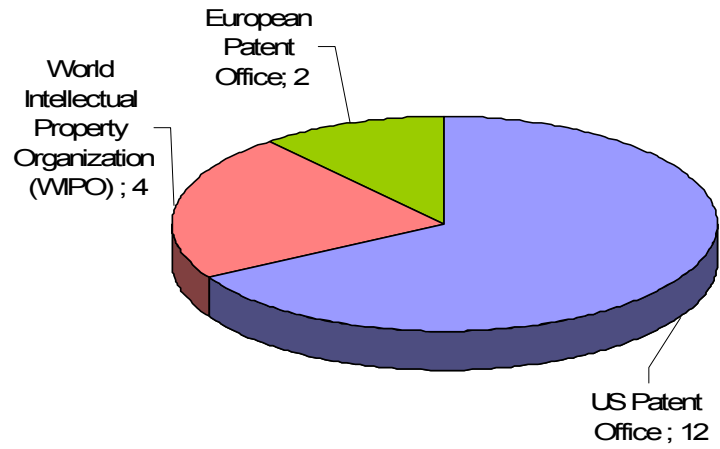
Periodo de observación: 2001-2007. Fuente: *Web of Science (ISI Web of Knowledge)*. Consultado: 18 de mayo de 2007. Ecuación de búsqueda: "*Aloysia triphylla* + *Lippia citriodora*".

### 2.3 Patentes

En la **Figura 18**, se muestra el número de patentes registradas sobre *Aloysia triphylla* en diferentes oficinas.

La oficina que más ha registrado patentes relacionadas con la especie *Aloysia triphylla* ha sido la oficina de los EE.UU., con 12 patentes y el área en la que más se ha estudiado es Farmacología y Toxicología.

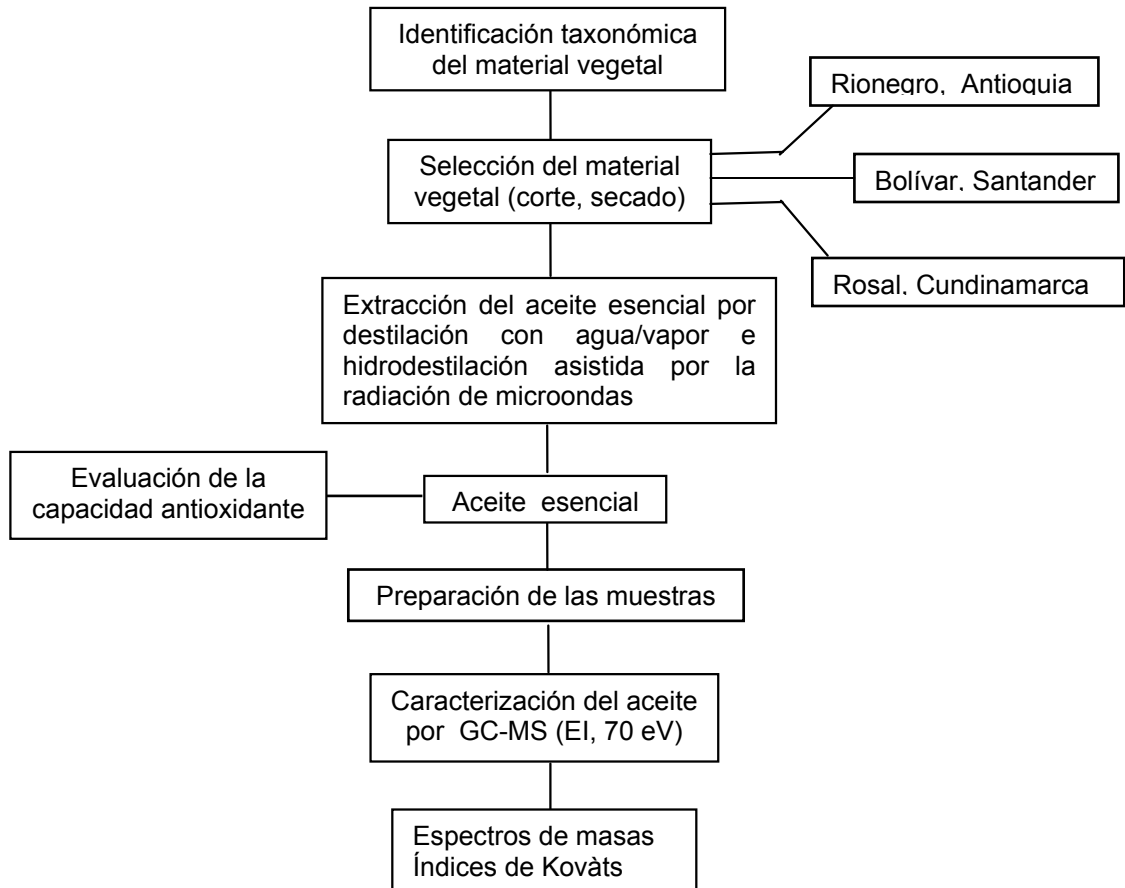
**Figura 18.** Número de patentes registradas sobre *Aloysia triphylla* durante el periodo 1993-2006.



Periodo de observación: 1993-2006. Fuente: Base de datos *Elsevier (Scopus)*. Consultado: 5 de febrero de 2007.

### 3. METODOLOGÍA

El desarrollo experimental de este estudio se llevó a cabo según el esquema que aparece en la **Figura 19**.



**Figura 19.** Diagrama de bloques para la metodología utilizada en este trabajo.

La presente investigación se desarrolló en tres Departamentos de Colombia, a saber: Antioquia, Cundinamarca y Santander. Para esta última región se trabajó con cinco parcelas experimentales, que cuentan con una variabilidad de clima, temperatura y se distribuyen en un amplio rango de altitudes, como se indica en la **Tabla 6**.

**Tabla 6.** Condiciones geográficas de los Departamentos de Antioquia, Cundinamarca y Bolívar.

<b>Municipio</b>	<b>Departamento</b>	<b>Altitud (m.s.n.m)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
Rionegro	Antioquia	2300	17
Rosal	Cundinamarca	2500	14
Bolívar	Santander	2100 - 2900	13-20
<b>Parcela N°</b>	<b>Vereda</b>		
10	Loma Alta	2288	19
11	Loma Alta	2292	19
33	Mojón	2220	-
2	Peña Negra	2570	-
26	Cristales	2900	14

### **3.1 Siembra de los esquejes**

En el municipio del Bolívar (Santander), la densidad de siembra para las plantas, fue de 0.6 m entre plantas y entre surcos de aproximadamente 0.9 m.

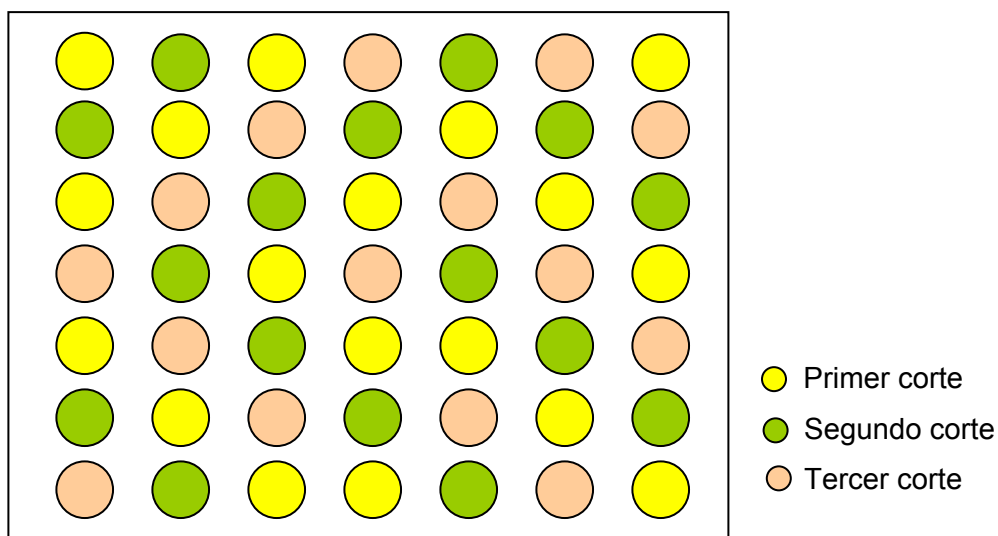
### **3.2 Identificación taxonómica**

La identificación taxonómica de la planta se realizó en el Instituto de Ciencias Naturales, adscrito a la Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Los pliegos testigo de cada planta quedaron almacenados en el Herbario Nacional Colombiano (COL, Bogotá) así:

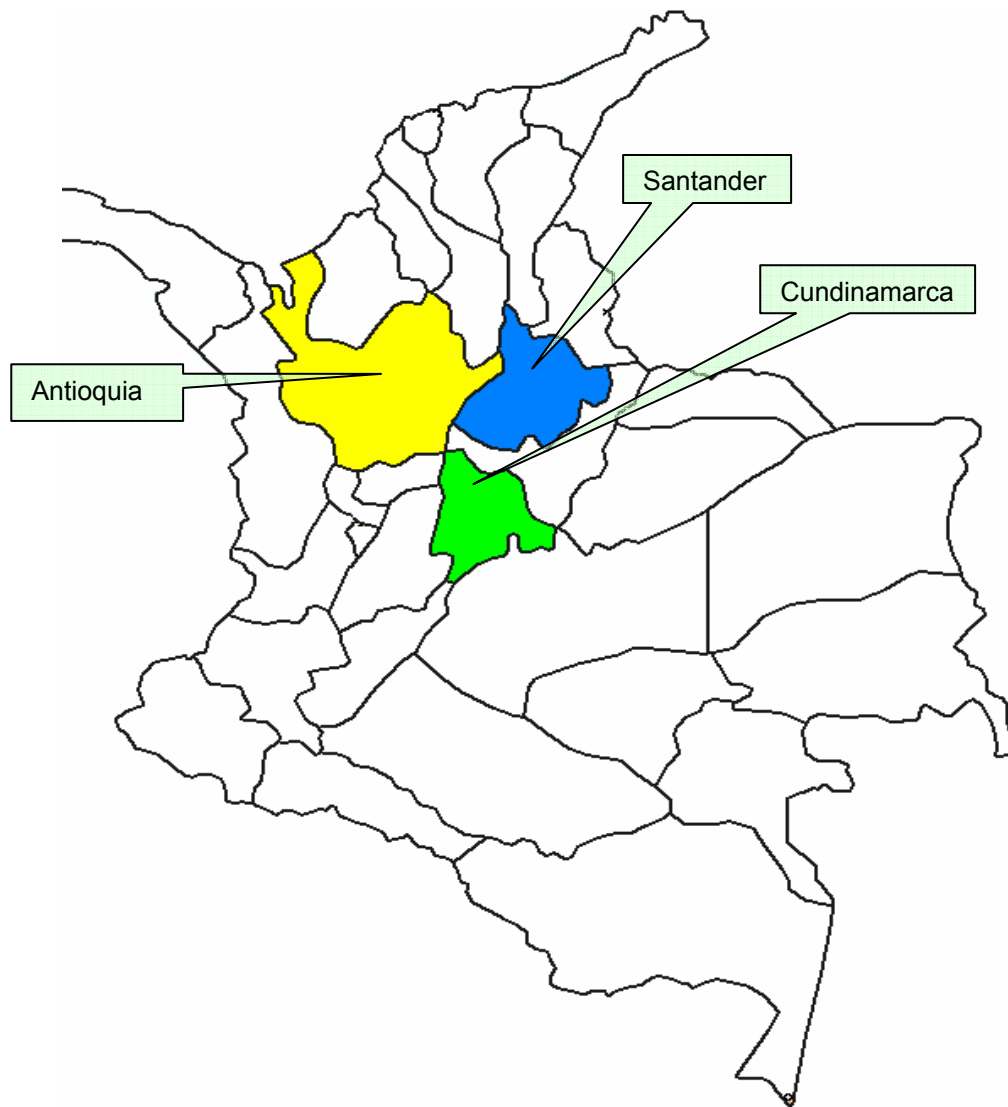
- ✓ *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton. de Bolívar, Santander (N° COL 517189). Clasificadas por el doctor J. L. Fernández.
- ✓ *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton. de Antioquia (N° COL 484334). Clasificada por el doctor J. L. Fernández.
- ✓ *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton. de Cundinamarca (N° COL 480749). Clasificada por el doctor J. L. Fernández.

### 3.3 Selección del material vegetal

**3.3.1 Recolección.** Las plantas de *Aloysia triphylla* fueron proporcionadas, y recolectadas, en tres regiones diferentes de Colombia, a saber: C.I. Culticol S.A. (Rionegro, Antioquia), MORENOS Ltda (Rosal, Cundinamarca) y MORELIA (Bolívar, Santander). Las plantas correspondientes a las parcelas experimentales en el Municipio de Bolívar, Santander, se cortaron en forma aleatoria, como se muestra en la **Figura 20**. En la **Figura 21** se observan las regiones de muestreo donde se recolectó el material vegetal.



**Figura 20.** Forma de recolección del material vegetal.



**Figura 21.** Mapa de ubicación del área de estudio de la especie *A. triphylla*, cultivada en tres departamentos.

**3.3.2 Secado.** El proceso de secado es necesario, ya que evita el desarrollo de hongos y microorganismos en las plantas. En este caso el material vegetal se dejó secar durante un tiempo de 8 a 15 días, a temperatura ambiente, bajo sombra y con buena aireación. En la **Figura 22**, se observa una de las formas de secado del material vegetal.



**Figura 22** Secado del material vegetal, bajo sombra con aireación natural.

### **3.4 EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES**

Para la extracción de los AE se emplearon la destilación vapor/agua e hidrodestilación asistida por radiación con microondas (MWHD). El material vegetal se deshojó y se sometió a extracción, por cada uno de los métodos que se mencionan a continuación.

**3.4.1 Extracción del AE por arrastre con agua/vapor.** Para aislar el AE de la especie *A. triphylla*, cultivada en el Municipio de Bolívar (Santander), se usó un destilador semi-industrial de cobre, que empleaba como fuente de calentamiento, gas, como se observa en la **Figura 23**.

El AE se extrajo de 800 g de material vegetal, constituido por hojas y flores de *Aloysia triphylla*, cultivada en Bolívar, Santander. La retorta o alambique (extractor) usado, consistía en un tanque cilíndrico, dentro del cual se colocó la criba, que era la que soportaba el material vegetal, que fue sumergido en agua (8 L). La parte superior del alambique se cerraba herméticamente mediante una tapa, de la

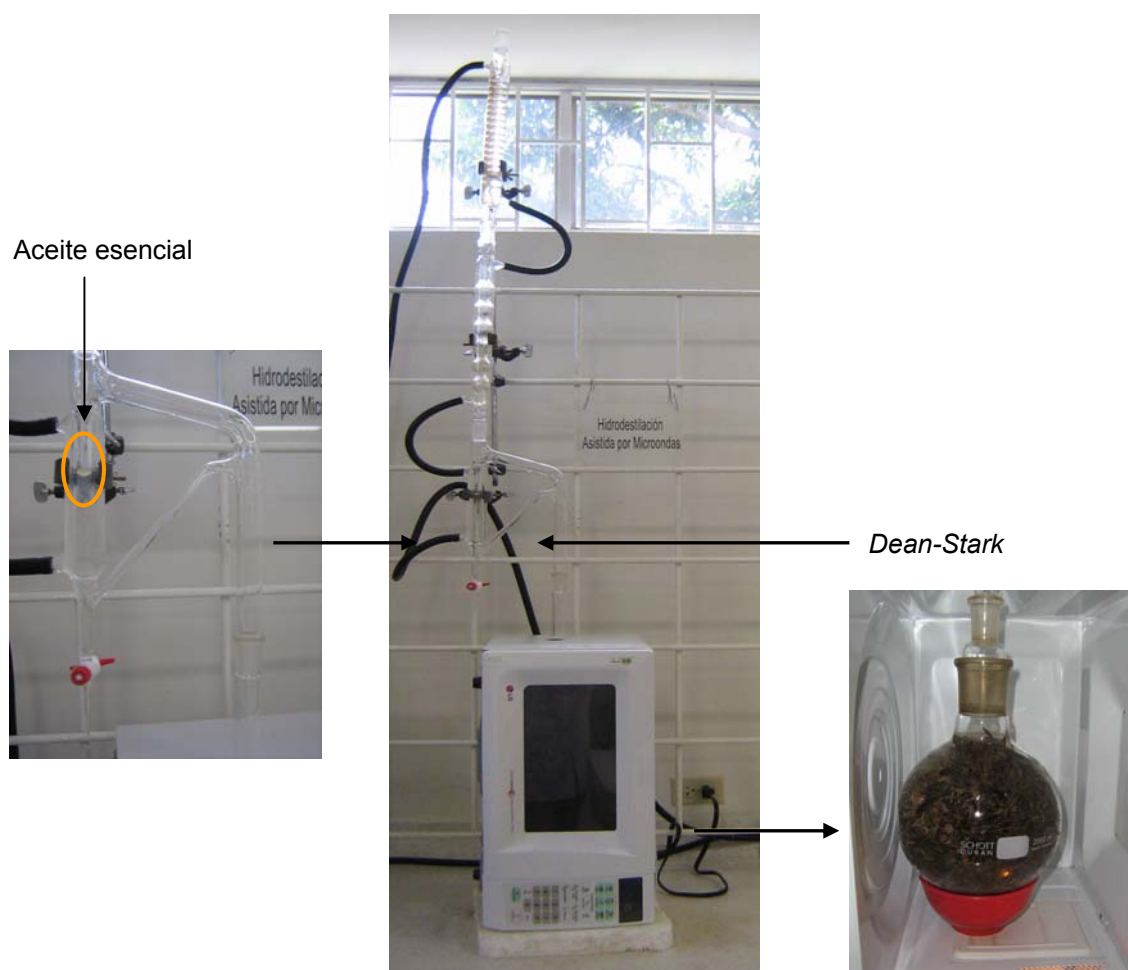
cual salía un tubo llamado "Cuello de *Cisne* o de *Ganso*", que era el conductor de los vapores hacia el condensador de serpentin.

El condensador tenía una forma de espiral, el cual estaba inmerso constantemente al agua fría, de esta forma, se aseguraba, que tanto los vapores de agua, como los del aceite, se condensaran, volviendo a su estado líquido, para ser recogidos en un recipiente recolector (Florentino), el cual, por diferencias en la densidad, separaba el agua del aceite. El tiempo total de destilación fue de dos horas y media.



**Figura 23** Destilador semi-industrial de cobre, para obtención de los AE.

**3.4.2 Hidrodestilación asistida por la radiación con microondas.** La extracción de los AE de la especie *Aloysia triphylla* cultivada en Antioquia, Cundinamarca y Bolívar (Santander), se llevó cabo empleando un equipo de destilación tipo *Clevenger*, con reservorio de destilación *Dean-Stark* y la adaptación para calentamiento por radiación mediante un horno de microondas LG, *Intelowave*, con potencia de salida de 720 W, dentro del cual se colocó un balón (1L) con 300 mL de agua y material vegetal (200 g), para la obtención de los AE. En la **Figura 24** se observa el montaje usado. El tiempo de extracción fue de 40 min, en intervalos de 10 min. Este procedimiento se realizó por triplicado.



**Figura 24** Montaje empleado para obtener los aceites esenciales por el método de hidrodestilación asistida por radiación con microondas (MWHD).

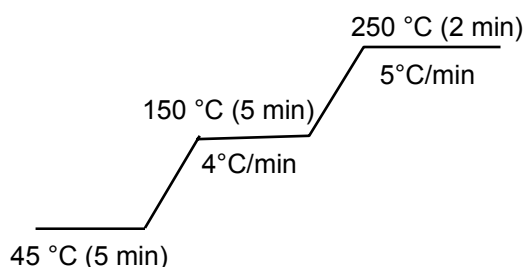
**3.4.3 Preparación de las muestras para el análisis cromatográfico.** El aceite esencial se separó del agua por decantación y se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Una alícuota del aceite (50 µL), se trasvasó a un microtubo de reacción, donde se adicionó 1 µL de *n*-tetradecano (estándar interno, *Istd*); la mezcla se aforó a 1 mL con diclorometano.

### 3.5 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

**3.5.1 Análisis en columna apolar.** Los espectros de masas fueron obtenidos por impacto de electrones con energía de 70 eV, en un cromatógrafo *Agilent Technologies 6890 Plus Series GC System* acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5973 Network, Mass Selectivity Detector* (Véase **Figura 25**).

Los siguientes fueron los parámetros operacionales utilizados:

- Puerto de inyección: *split/splitless* (250 °C, relación de *split* 1:30).
- La temperatura del horno fue programada de 45 °C (5 min) hasta 150°C (5 min) @ 4 °C/min, luego, se incrementó hasta 250 °C (2 min) @ 5 °C/min; finalmente, la temperatura permaneció constante durante 15 min, así:



- Columna capilar apolar: DB-5MS (J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU) de 60 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25  $\mu\text{m}$  ( $d_f$ ), con fase estacionaria de 5%- fenil–poli(metil siloxano).
- Gas de arrastre: helio, con una presión de entrada en la cabeza de columna de 16,47 Psi.

La identificación de los componentes presentes en cada AE se realizó con base en la comparación de sus espectros de masas, con los de las bibliotecas de espectros comerciales NIST, WILEY y ADAMS, disponibles en el Laboratorio.



**Figura 25.** Cromatógrafo de gases (6890N), acoplado a espectrómetro de masas (5973) *Agilent Technologies*, usado para el análisis de los aceites esenciales.

**3.5.2 Análisis en columna polar.** Para la respectiva identificación cualitativa de los compuestos presentes en los AE se aplicó la técnica *GC-MS*, utilizando un cromatógrafo *Agilent Technologies 6890 Network GC System*, acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5975* (Véase **Figura 26**).

Parámetros operacionales utilizados:

- Puerto de inyección: *split/splitless* (250 °C, relación *split* 50:1).
- Columna capilar polar: DB-WAX (*J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.*), de 60 m x 0,25 mm, D.I x 0,25  $\mu$ m ( $d_f$ ), con fase estacionaria entrecruzada e inmobilizada de poli(etilenglicol).
- La programación de la temperatura del horno fue: de 45 °C (5min) @ 3 °C/min hasta 150 °C (3min), nuevamente, @ 4 °C/min, hasta 220 °C (5min).



**Figura 26** Cromatógrafo de gases (6890N), acoplado a espectrómetro de masas (5975) *Agilent Technologies*, usado para el análisis de los aceites esenciales.

Los índices de Kovàts se calcularon teniendo en cuenta los tiempos de retención de una serie homóloga de patrones de hidrocarburos desde C<sub>10</sub> hasta C<sub>25</sub>, corridos por GC bajo las mismas condiciones operacionales usadas para los aceites esenciales. Para su determinación se empleó la siguiente fórmula [58]:

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

Donde:

$I_k$ : Índice de retención del compuesto de interés x;

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

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

$t_{RX}$ : Tiempo de retención del compuesto de interés x;

$t_{Rn}$ : Tiempos de retención de *n*-alcanos que eluye antes del compuesto x;

$t_{RN}$ : Tiempo de retención de *n*-alcanos que eluye después del compuesto x.

### 3.6 DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL ACEITE ESENCIAL, USANDO EL ENSAYO DE DECOLORACIÓN DEL CATIÓN-RADICAL ABTS<sup>+</sup>

Preparación del catión-radical ABTS<sup>+</sup>: 20 mg de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis- (3-etiltiazolina- bencenosulfónico-6) se disolvieron en 10 mL de agua grado HPLC, luego se agregaron 4 mg de persulfato de potasio. La solución se dejó reaccionar por 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente, una alícuota de la solución se diluyó en etanol, hasta conseguir una absorbancia de 0.70±0.5 a 734nm [17, 65].

El AE se preparó en un rango de concentraciones de 70.000 a 400.000 ppm, usando etanol como solvente. La absorbancia se midió seis minutos después de la adición de una alícuota de 30  $\mu$ L de la solución del aceite, a 3 mL de la solución del catión-radical **ABTS<sup>+</sup>**. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Los datos espectroscópicos fueron obtenidos en un espectrofotómetro *Jenway* 6300 (*Jenway Ltd.*, Felsted, Dunmow, U.K.) (Véase **Figura 27**); se usaron celdas desechables de 1 x 1 x 4.5 cm.



**Figura 27** Espectrofotómetro *Jenway* 6300.

### **3.7 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE LOS ACEITES ESENCIALES**

Se realizó un análisis estadístico de PCA (análisis de componentes principales), con el fin de comparar la composición de los AE aislados por el método de MWHD de plantas de *A. triphylla* cultivadas en las tres regiones. Todos los datos se procesaron, usando el programa *STATISTICA 6.0* (*StatSoft Inc.*, Tulsa, Oklahoma, EE.UU).

## 4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Después del corte y secado del material vegetal, los AE se obtuvieron por el método de MWHD. Se usaron plantas de *Aloysia triphylla*, cultivadas en Rionegro (Antioquia), Rosal (Cundinamarca) y Bolívar (Santander).

Los AE de plantas de *Aloysia triphylla*, cultivadas en diferentes regiones de Colombia, se compararon, con el objetivo de evaluar la influencia de las condiciones geográficas, lugar de procedencia y estados de desarrollo vegetativo de las plantas, sobre el rendimiento y la composición química. Adicionalmente, se llevó a cabo un estudio composicional de los AE obtenidos por el método de destilación con agua/vapor, con el fin de observar la influencia del estado de desarrollo vegetativo de la planta, sobre su rendimiento y la composición química.

### 4.1 Estudio de la reproducibilidad de los $t_R$ , áreas de los picos cromatográficos e índices de retención experimentales.

Para estudiar la reproducibilidad en la integración de las áreas cromatográficas, tiempos de retención e índices de retención, se inyectó al cromatógrafo tres veces una misma muestra de aceite. Este análisis permitió validar el método cromatográfico empleado. En las **Tablas 7-9** se resumen resultados de este análisis.

En la **Tabla 7** se muestran los valores de  $t_R$ ,  $t_R$  promedio, desviación estándar ( $\sigma$ ) y coeficiente de variación (CV, %) de algunos componentes de una muestra de aceite esencial.

**Tabla 7.** Análisis de la reproducibilidad de los  $t_R$  de algunos componentes del aceite esencial de *Aloysia triphylla*, cultivada en Bolívar, Santander (parcela N° 33).

Compuesto	Tiempos de retención, min (n=3)			$t_R$ promedio	$\sigma$	CV (%)
	1	2	3			
Sabineno	19.181	19.175	19.165	19.173	0.008	3.98E-05
3-Octanol	20.144	20.137	20.132	20.138	0.007	3.25E-05
Limoneno	21.703	21.694	21.703	21.700	0.005	2.39E-05
1,8-Cineol	21.862	21.850	21.856	21.856	0.006	2.75E-05
Linalol	24.499	24.488	24.497	24.495	0.006	2.39E-05
<i>cis</i> -Óxido de limoneno	26.128	26.120	26.128	26.125	0.005	1.77E-05
$\alpha$ -Terpineol	28.443	28.437	28.457	28.45	0.013	4.52E-05
Nerol	29.478	29.456	29.503	29.48	0.024	7.98E-05
Neral	30.119	30.108	30.153	30.13	0.023	7.79E-05
Geraniol	30.368	30.352	30.383	30.37	0.016	5.10E-05
Geranial	31.293	31.274	31.257	31.28	0.029	9.36E-06
$\alpha$ -Copaeno	35.366	35.366	35.363	35.365	0.002	4.32E-06
$\beta$ -Bourboneno	35.724	35.723	35.718	35.721	0.003	7.41E-06
<i>ar</i> -Curcumeno	38.871	38.880	38.867	38.87	0.040	1.02E-04
<i>trans</i> -Nerolidol	41.248	41.252	41.241	41.247	0.006	1.35E-05
Espatuleno	42.087	42.088	42.084	42.085	0.002	5.49E-06
Óxido de cariofileno	42.284	42.286	42.279	42.282	0.003	8.53E-06

En la **Tabla 7**, se presentan los coeficientes de variación (CV) para los tiempos de retención de algunos constituyentes del aceite. Como se puede observar estos valores no exceden el 2 %, valor máximo establecido por las normas GLP (*Good Laboratory Practic*, Buenas Prácticas de Laboratorio), ello mostró una alta reproducibilidad en el análisis cromatográfico empleado en esta investigación.

Ya que la identificación preliminar de los componentes del AE de *Aloysia triphylla* se realizó con base en los índices de Kovàts, calculados experimentalmente, se hizo un estudio de su reproducibilidad. En la **Tabla 8**, se reportan los datos de reproducibilidad de los  $I_k$  experimentales de algunos compuestos presentes en el aceite esencial, determinados en una columna apolar (DB-5). Se observa que la desviación estándar y CV no superan lo establecido por las normas GPL, lo que mostró una buena reproducibilidad en la determinación de los  $I_k$  y la confiabilidad en sus valores.

**Tabla 8.** Reproducibilidad de los  $I_k$  experimentales

Compuesto	$I_k$ experimentales (n=3)			$I_k$ promedio	$\sigma$	CV (%)
	1	2	3			
Limoneno	1034	1034	1034	1034	0	0
1,8-Cineol	1038	1038	1038	1038	0	0
Linalol	1101	1101	1101	1101	0	0
Fotocitral A	1155	1154	1155	1155	0.58	0.05
$\alpha$ -Terpineol	1202	1202	1202	1202	0	0
Nerol	1230	1229	1230	1230	0.58	0.05
Neral	1247	1246	1248	1247	1.00	0.08
Geraniol	1253	1253	1254	1253	0.58	0.05
Geranial	1276	1275	1277	1276	1.00	0.08
$\alpha$ -Copaeno	1385	1385	1385	1385	0	0
$\beta$ -Bourboneno	1394	1394	1394	1394	0	0
<i>ar</i> -Curcumeno	1487	1487	1486	1487	0.58	0.04
<i>trans</i> -Nerolidol	1564	1565	1564	1564	0.58	0.04
Espatulenol	1593	1593	1590	1592	1.73	0.11
Óxido de cariofileno	1599	1597	1599	1598	1.15	0.07

Según las normas GLP, los coeficientes de variación (CV) para áreas de picos cromatográficos no deben superar el 10 %. En la **Tabla 9**, se observa que los CV para las áreas, efectivamente, no superan este valor, lo que indica una buena reproducibilidad en los análisis cromatográficos de los AE estudiados.

**Tabla 9.** Reproducibilidad de las áreas cromatográficas de algunos componentes del AE de *Aloysia triphylla*.

Compuesto	Área*	Cantidad relativa (%)	Promedio		$\sigma$		CV (%)	
			Área	Cantidad relativa (%)	Área	Cantidad relativa (%)	Área	Cantidad relativa (%)
Sabineno	15490856	0,94	17000000	0,90	2015684,9	0,04	9	4
	17027305	0,87						
	19486843	0,88						
3-Octanol	16256210	0,86	18000000	0,86	1897904,2	0,03	10	3
	18940252	0,86						
Limoneno	152838118	9,29	170000000	8,9	18189756,2	0,5	10	5
	165308678	8,51						
	188670113	8,52						
1,8-Cineol	52839561	3,21	56000000	3,1	3689920,1	0,1	6	4
	58057896	2,98						
Linalol	17417408	1,05	18000000	1,04	1657759,5	0,02	8	2
	19761834	1,02						
Forocitral A	25428055	1,55	28000000	1,03	3032439,4	0,01	8	1
	29716572	1,53						
$\alpha$ -Terpineol	20312663	1,24	22000000	1,22	2036533,2	0,02	9	2
	23192756	1,19						
Nerol	36643173	1,89	39000000	1,90	4122630,5	0,02	10	1
	42473453	1,92						
Neral	373275388	22,7	400000000	22,3	35585239,3	0,6	8	3
	423600516	21,8						
Geraniol	23453984	1,21	25000000	1,22	2540253,5	0,01	10	1
	27046445	1,22						

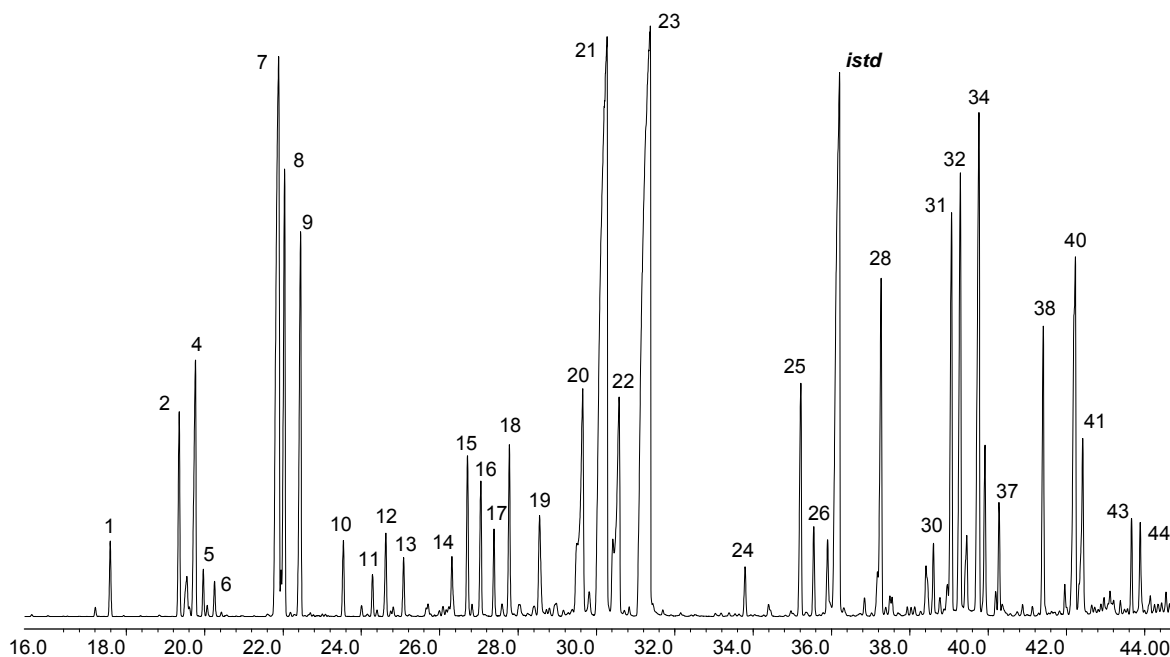
Continuación **Tabla 9.**

Geranial	451364333 512108919	27,5 26,4	48000000	26,9	42952908,7	0,8	8	3
$\alpha$ -Copaeno	12527041 13871222	0,64 0,62	13000000	0,64	950479,5	0,01	7	2
$\beta$ -Bourboneno	20301777 22805014	1,04 1,03	22000000	1,04	1770055,8	0,01	8	1
<i>allo</i> -Aromadendreno	8020304 9240397	0,49 0,48	8600000	0,48	862736,0	0,01	9	2
<i>ar</i> -Curcumeno	61613357 72988596	3,17 3,29	67000000	3,2	8043508,6	0,1	9	3
Espatuleno	79125228 89160410	4,07 4,03	84000000	4,05	7095945,2	0,03	8	1
Óxido de cariofileno	86647059 99903532	4,46 4,52	93000000	4,49	9373741,9	0,04	10	1

$\sigma$ : Desviación estándar  
 CV: Coeficiente de variación  
 \* Cuentas

## 4.2 Caracterización del aceite esencial de *Aloysia triphylla* L'Her Britton

En la **Figura 28**, aparece el perfil cromatográfico típico del aceite esencial de *A. triphylla*, obtenido por el método de MWHD. La identificación de los compuestos presentes en el aceite se llevó a cabo utilizando los índices de retención de Kovàts, calculados en dos columnas, apolar (DB-5MS) y polar (DB-WAX). Los parámetros de integración aplicados para las muestras (umbral de integración, *Thshd*=18, y “área de rechazo” del pico sobre la línea base= 0.1). Los espectros de masas y tiempos de retención de los componentes del aceite se compararon con los de patrones de terpenos certificados, para confirmar la identificación (Véase **Anexo 2**).



**Figura 28.** Perfil cromatográfico típico del AE de *A. triphylla*, obtenido por MWHD. Columna DB-5MS (60 m), *split* 1:30, MSD. La identificación de los picos aparece en la **Tabla 11**.

### 4.3 ACEITES ESENCIALES OBTENIDOS POR HIDRODESTILACIÓN ASISTIDA POR LA RADIACIÓN CON MICROONDAS, DE PLANTAS CULTIVADAS EN RIONEGRO, ANTIOQUIA.

#### 4.3.1 Rendimiento del aceite esencial

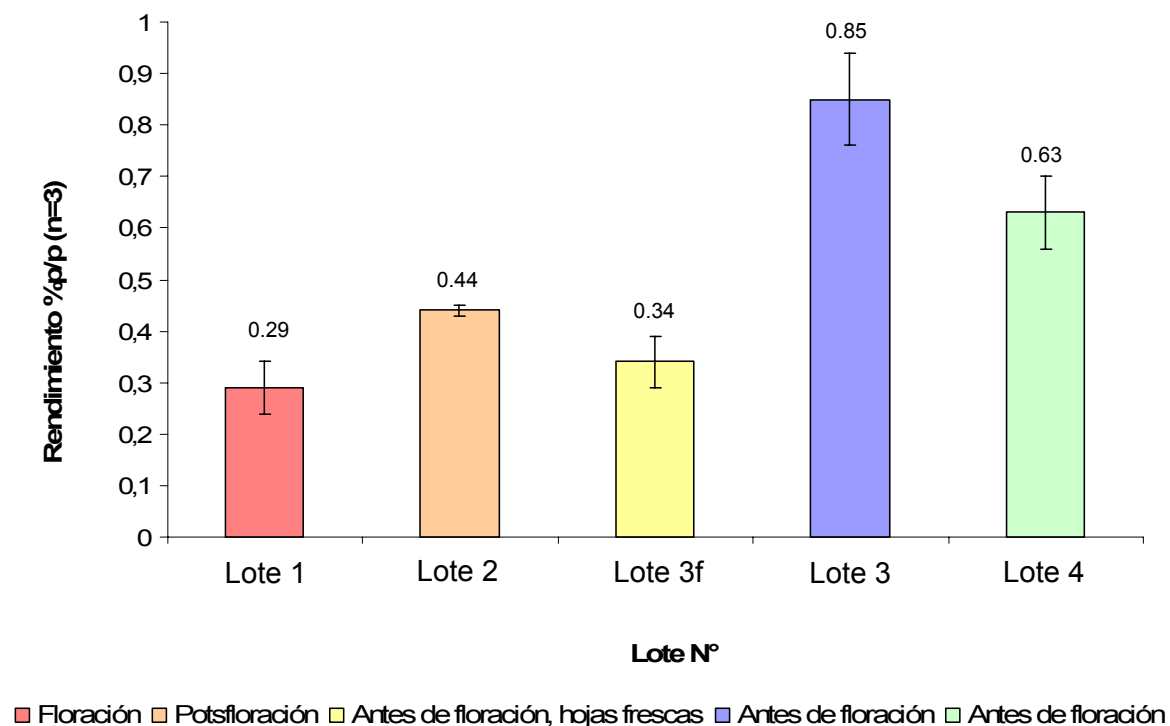
Para evaluar el efecto del estado de desarrollo vegetativo (edad, estados de maduración) de plantas de *Aloysia triphylla*, sobre la composición química de los AE, se tomaron muestras de cuatro cultivos establecidos en Rionegro, Antioquia, a saber: **L1**= 3 meses, en estado de floración; **L2**= 4 meses, postfloración; **L3**= 3 meses, antes de la floración; **L3f**= 3 meses, antes de floración, hojas frescas; **L4**= 2 meses, antes de la floración.

En la **Tabla 10**, se presentan los rendimientos (% p/p), obtenidos de plantas de *Aloysia triphylla*, identificadas como “Lote 1”, “Lote 2”, “Lote 3” y “Lote 4”, así como las características de cada uno. En la **Figura 29**, se observa la variación del rendimiento del AE en función del estado de maduración de la planta.

**Tabla 10.** Rendimiento de extracción (% p/p) de los aceites esenciales de *Aloysia triphylla*, provenientes de diferentes cultivos en Rionegro, Antioquia.

Muestra	Rendimiento (%p/p) $\pm$ s (n=3)	Características
Lote 1	0.29 $\pm$ 0.02	Florecida, 3 meses
Lote 2	0.44 $\pm$ 0.01	Postfloración, 4 meses
Lote 3f	0.34 $\pm$ 0.02	Antes de florecer, 3 meses, hojas frescas.
Lote 3	0.85 $\pm$ 0.06	Antes de florecer, 3 meses
Lote 4	0.63 $\pm$ 0.03	Antes de florecer, 2 meses

**Figura 29.** Variación del rendimiento de AE de *Aloysia triphylla*, obtenido de plantas cultivadas en Rionegro, Antioquia.



El rendimiento más alto de AE de *Aloysia triphylla*, se encontró para plantas recolectadas antes de su floración, hacia el segundo y tercer mes de crecimiento. El rendimiento del AE, también aumentó con el desarrollo vegetativo de la planta, *i.e.* en potsfloración, si se comparan los resultados obtenidos de los lotes 2 y 3 (Véase Tabla 10, Figura 29).

#### 4.3.2 Determinación de la composición química de los aceites esenciales de *Aloysia triphylla*.

En la **Tabla 11**, aparecen la cantidad relativa (%) y la identificación de los componentes mayoritarios presentes en los AE de *Aloysia triphylla*.

**Tabla 11.** Cantidad relativa (%) de los principales componentes presentes en los aceites esenciales de *Aloysia triphylla*, obtenidos de plantas cultivadas en Rionegro, Antioquia.

Pico N° (Fig. N° 28)	Ik <sup>a</sup>		Compuestos	Cantidad relativa, %				
	DB-5MS	DB-WAX		L1	L2	L3f	L3	L4
1	933	1018	$\alpha$ - Pineno	0.47	0.43	0.45	0.48	0.36
2	975	1039	Sabineno	1.34	1.05	1.32	1.39	1.18
3	979	1500	1-Octen-3-ol	0.48	0,50	-	-	0.38
4	1029	1335	6-Metil-5-hepten-2-ona	2.33	2.32	2.44	1.92	2.36
5	1050	-	3-Octanol	0.22	-	-	-	0.34
6	1031	1161	$\beta$ -Mirceno	0.27	0,21	0.24	-	0.22
7	1035	1201	Limoneno	7.86	6,09	6.78	7.46	7.09
8	1038	1208	1,8-Cineol	3.43	3.21	3.50	3.59	3.17
9	1048	1300	<i>trans</i> - $\beta$ -Ocimeno	3.16	1.45	2.45	2.02	2.57
10	1075	-	<i>trans</i> -4-Tujanol	0.49	0.64	0.60	0.61	0.61
11	1092	-	Compuesto oxigenado, C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> (N.I)	0.25	0.50	0.35	0.42	0.33
12	1101	1542	Linalol	0.59	0.72	0.86	0.80	0.77
13	1138	1448	<i>cis</i> -Óxido de limoneno	0.58	0.40	-	0.62	0.71
14	1144	1460	<i>trans</i> -Óxido de limoneno	-	0.74	0.66	0.62	-
15	1154	1510	Fotocitral A	1.14	0.85	1.20	1.17	1.12
16	1163	-	<i>trans</i> -Verbenol	0.92	0.25	0.26	0.34	0.36
17	1172	1603	Epóxido de rosafurano	0.55	1.30	1.07	1.23	0.80
18	1182	1571	<i>trans</i> -Isocitral	-	0.44	0.66	0.61	0.64
19	1202	1700	$\alpha$ -Terpineol	0.92	1.12	1.38	1.07	1.08
20	1231	1819	Nerol	3.71	3.32	4.83	2.14	2.35
21	1248	1690	Neral	15.8	8.1	12.7	14.7	16.2
22	1257	1901	Geraniol	3.46	2.17	3.58	1.45	1.74
23	1278	1741	Geranial	18.7	11.8	17.6	20.3	21,4
24	1338	-	6-Hidroxi-carvotanacetona*	0.37	-	0.46	0.32	0.35
25	1377	1757	Acetato de geranilo	1.83	2.12	2.15	2.24	2.19
26	1385	1499	$\alpha$ -Copaeno	0.63	1.12	0.84	0.86	0.76
27	1394	1527	$\beta$ -Bourboneno	0.65	1.25	0.84	0.82	0.76
28	1433	1609	<i>trans</i> - $\beta$ -Cariofileno	3.03	3.18	3.45	3.17	2.86
29	1441	2184	$\beta$ -Cedreno	-	0.46	-	-	0.30
30	1469 1469	1819 -	Propanoato de nerilo $\alpha$ -Humuleno	0.53	0.57	0.42	0.63	0.59
31	1473	1606	<i>allo</i> -Aromadendreno	0.47	0.79	0.57	0.59	0.53
32	1487	1780	<i>ar</i> -Curcumeno	3.33	4.84	3.49	3,62	3.19
33	1499	1800	Germacreno D	3.69	2.02	3.87	2.80	2.69
34	1508	1801	Biciclogermacreno	4.73	1.85	4.89	3.87	3.65

Continuación **Tabla 11.**

35	1514	1746	$\beta$ -Curcumeno*	1.15	1.00	1.35	1.23	1.19
36	1524	1954	$\gamma$ -Cadineno	-	0.21	-	-	-
37	1528	-	10- <i>epi</i> -Cubebol*	0.83	1.46	1.05	1.14	0.96
38	1567	2037	<i>trans</i> -Nerolidol	2.10	3.58	2.33	2.61	2.27
39	1586	2211	<i>ar</i> -Turmerol	0.26	0.65	-	-	0.23
40	1596	2140	Espatulenol	4.17	8.59	5.00	5.86	4.93
41	1601	2007	Óxido de cariofileno	1.77	5.22	2.13	2.56	2.15
42	1646	2161	Sesquiterpeno oxigenado, C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O (N.I.)	0.68	0.95	0.74	0.92	0.77
43	1655	2184	<i>epi</i> - $\alpha$ -Cadinol	0.68	1.16	0.84	1.02	0.83
44	1752	-	Oplopanona	-	0.30	-	-	0.18

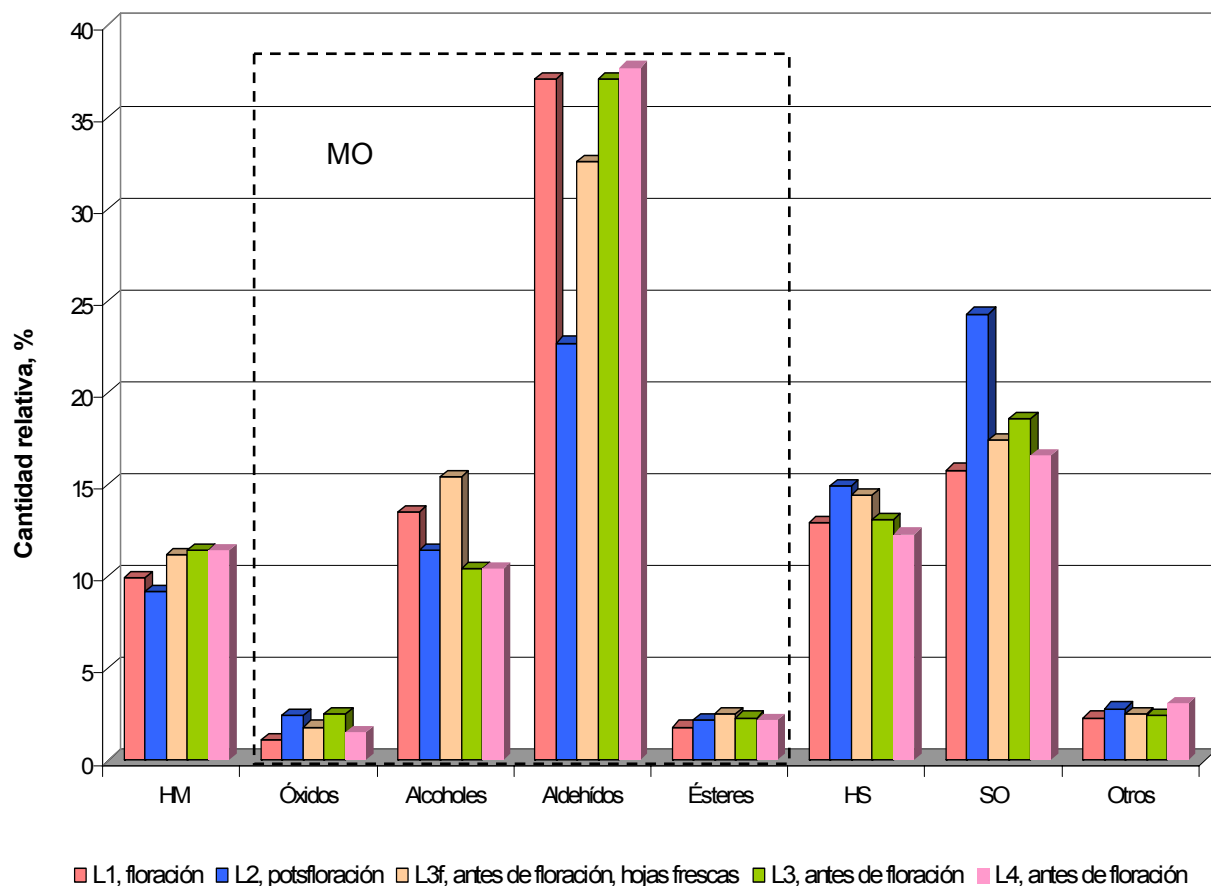
Clasificación por familias	Cantidad relativa, %				
	L1	L2	L3f	L3	L4
<b>HM:</b> Hidrocarburos monoterpénicos	9.9	9.2	11.2	11.4	11.4
<b>MO:</b> Monoterpenos oxigenados	52.5	37.7	51.9	52.3	53.5
- <b>Óxidos</b>	1.1	2.4	1.8	2.5	1.5
- <b>Alcoholes</b>	13.5	11.9	15.1	10	10.1
- <b>Aldehídos</b>	36.1	21.2	32.6	37.1	39.7
- <b>Ésteres</b>	1.8	2.2	2.5	2.3	2.2
<b>HS:</b> Hidrocarburos sesquiterpénicos	17.7	16.5	14.4	16.9	15.9
<b>SO:</b> Sesquiterpenos oxigenados	10.5	21.9	17.4	14.1	12.3
Otros	2.3	2.8	2.5	2.4	3.1

I<sub>k</sub><sup>a</sup> Índices de Kovàts determinados experimentalmente; \* Identificación tentativa; **N.I.** No identificado.

En total, se detectaron 44 compuestos en el aceite esencial, en cantidades relativas > 0.2%, de los cuales se identificaron positivamente 42 compuestos (95.5%). Los componentes del AE se distribuyeron en cuatro grupos de compuestos, a saber: hidrocarburos monoterpénicos (HM), monoterpenos oxigenados (MO), hidrocarburos sesquiterpénicos (HS), sesquiterpenos oxigenados (SO). En todos los casos, los aceites esenciales se caracterizaron por su alto contenido de neral, geranial, limoneno, óxido de cariofileno y espatulenol.

En la **Figura 30**, se muestran las fracciones presentes en el AE de *Aloysia triphylla*, clasificadas por familias químicas.

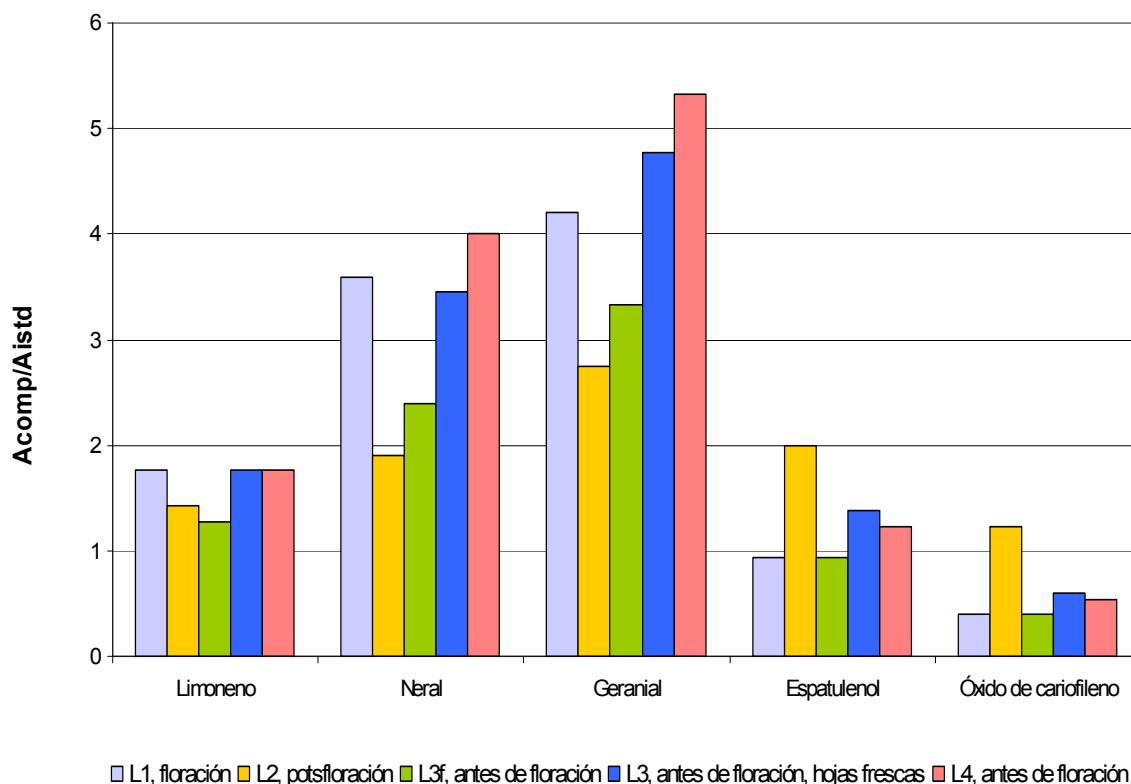
**Figura 30.** Contenido de las fracciones presentes en el aceite esencial de *Albisia triphylla*, cultivada en Rionegro, Antioquia.



La composición química de los AE de plantas recolectadas en Antioquia en diferentes estados de desarrollo vegetativo, presenta pocas variaciones en la proporción de sus constituyentes; las fracciones de componentes son bastante similares entre sí. Solo se observa una pequeña variación en el contenido de MO en los aceites de lotes 1, 3 y 4; correspondientes a las plantas, recolectadas antes y durante la floración. Se nota un ligero aumento de SO y HS en los aceites de las plantas del lote 2 (en postfloración).

En la **Figura 31**, se observan los componentes mayoritarios de los AE de *Aloysia triphylla* cultivada en Rionegro, Antioquia, graficados según su relación de “Área del compuesto/Área del estándar interno”, en el cromatograma.

**Figura 31.** Relación “Área del compuesto/Área del estándar interno” de los compuestos mayoritarios del aceite esencial.

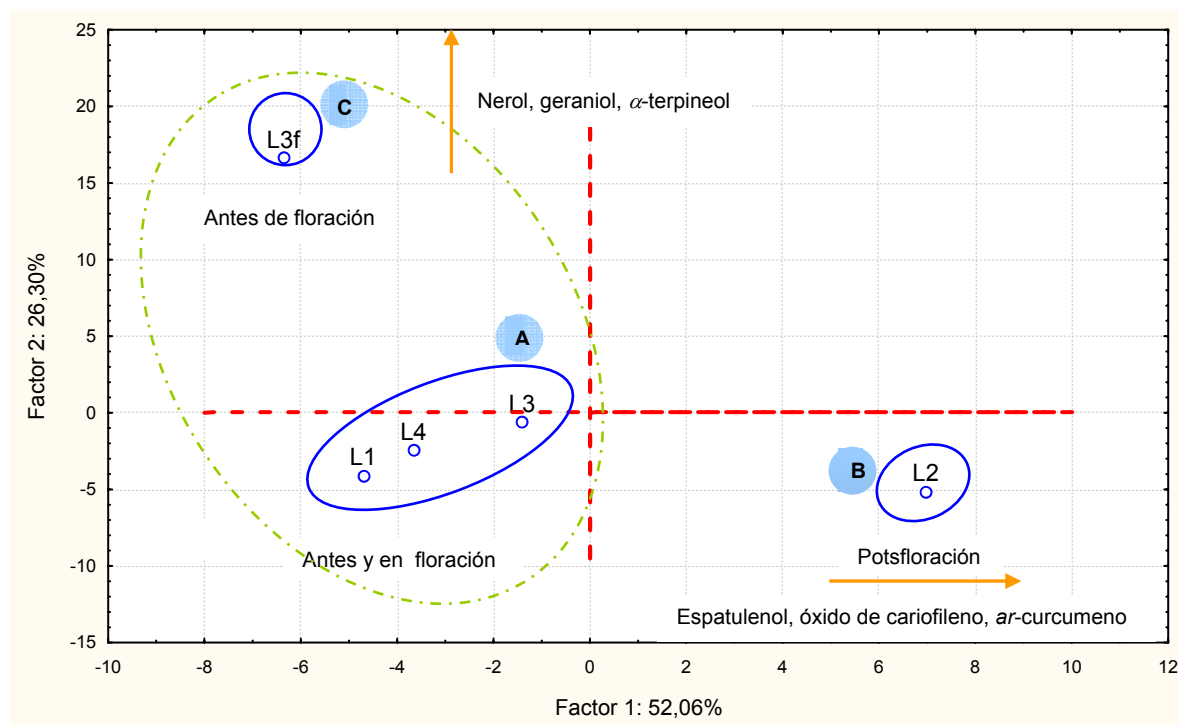


Se puede observar, que las relaciones de área del neral y geranial, con respecto a la del *istd* es más alta para los lotes 3 (3,45 y 2,47) y 4 (4,0 y 5,3), respectivamente. De igual forma, se observa que para el espatulenol (2,0) y óxido de cariofileno (1,2) hay un aumento en la relación de áreas para el lote 2.

### 4.3.3 Análisis de componentes principales de los aceites esenciales de *Aloysia triphylla* extraídos por MWHD, de plantas en diferentes estados de desarrollo vegetativo.

Para apreciar mejor la influencia de los diferentes estados de desarrollo vegetativo de las plantas sobre la composición final de los AE; las cantidades relativas (%) de sus metabolitos secundarios volátiles obtenidos por MWHD, se sometieron al análisis estadístico de componentes principales (PCA, STATISTICA). El análisis por PCA de los diferentes AE de *Aloysia triphylla* indica que más del 90% de la información de la **Tabla 11**, puede ser representado por un subespacio de dos coordenadas (componentes principales), construido por las combinaciones lineales de las concentraciones relativas de los componentes presentes en el AE, tal como se aprecia en la **Figura 32**.

**Figura 32.** Representación gráfica de las cantidades relativas (%) de los componentes presentes en los AE de plantas de *A. triphylla*, obtenidos por MWHD.



Véase el **Anexo 3 (Tabla 1)** para las contribuciones de los componentes en cada uno de los *Factores*.

La **Figura 32** muestra que el *Factor 1* corresponde al 52% de la información y está representado, más que todo, por sesquiterpenos, tales como el *allo*-aromadendreno, óxido de cariofileno,  $\beta$ -bourboneno,  $\alpha$ -copaeno, *ar*-curcumeno y aldehídos monoterpénicos, geranial y neral. El *Factor 2* corresponde al 26 % de la información y está conformado por los *cis*- y *trans*- óxidos de limoneno, acetato de geranilo, limoneno y HS (germacreno D, biciclogermacreno,  $\beta$ -curcumeno, 10-*epi* cubebol). En la **Figura 32** aparece la representación de los AE en el subespacio formado por los dos primeros componentes principales, donde se observa la existencia de dos grupos grandes definidos. Los dos subgrupos **A** y **C**, están desplazados hacia la izquierda, en el mismo subespacio y son plantas que se encontraban antes y durante floración.

En el **Anexo 3 (Tabla 1)** aparecen las contribuciones de los diferentes compuestos a los *Factores* 1 y 2. Se observa, que los tres subgrupos (**A**, **B** y **C**), presentan diferencias en la proporción de sus componentes a lo largo de las dos coordenadas. La proximidad de los puntos L1, L3 y L4 (**A**), se debe a la similitud en la composición química de los AE de plantas en estado de madurez (antes y durante la floración). Todas estas semejanzas en la composición se deben principalmente al contenido de neral, geranial y limoneno, mientras que un desplazamiento de **B** hacia la derecha de la gráfica, muestra un aumento en el contenido de espatulenol, óxido de cariofileno y *ar*-curcumeno, el subgrupo **C** representado por L3f (plantas en fresco, antes de floración), se caracteriza por un alto contenido en alcoholes monoterpénicos (nerol, geraniol y  $\alpha$ -terpineol).

#### 4.4 ACEITES ESENCIALES AISLADOS POR HIDRODESTILACIÓN ASISTIDA POR LA RADIACIÓN CON MICROONDAS, DE PLANTAS CULTIVADAS EN BOLÍVAR, SANTANDER.

##### 4.4.1 Rendimiento del aceite esencial

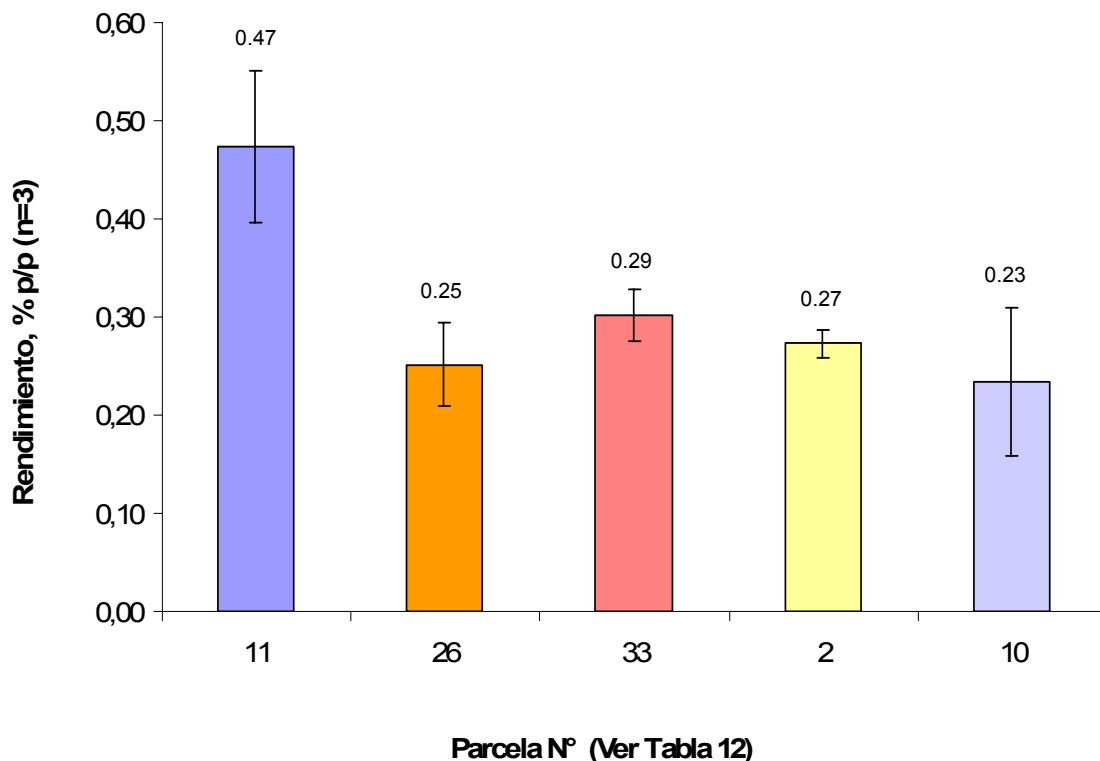
En la **Tabla 12**, se registran los rendimientos de los AE de las plantas cultivadas en cinco parcelas experimentales, en el Municipio de Bolívar, Santander.

**Tabla 12.** Rendimiento de extracción (% p/p) de los aceites esenciales de *Aloysia triphylla*, cultivada en Bolívar, Santander.

Nº parcela	Rendimiento (%p/p) $\pm$ s (n=3)	Características
10	0.23 $\pm$ 0.03	Florecida, 5 meses
11	0.47 $\pm$ 0.07	Posfloración, 6 1/2 meses
33	0.29 $\pm$ 0.01	Postfloración, 8 meses
26	0.25 $\pm$ 0.02	Potsfloración, 8 meses
2	0.27 $\pm$ 0.02	Potsfloración, 8 meses

En la **Figura 33**, se observa la variación del rendimiento del AE de *Aloysia triphylla*, en función del estado de desarrollo vegetativo de la planta.

**Figura 33.** Variación del rendimiento de AE de *Aloysia triphylla*, obtenido de plantas cultivadas en Bolívar, Santander.



Se observa la misma tendencia que la de los AE de plantas cultivadas en Antioquia. Las plantas después de floración, se caracterizaron por un rendimiento de aceite esencial más alto (0.47%). Los rendimientos de aceites esenciales de hojas de *Aloysia triphylla* de este estudio, son similares a los obtenidos por otros autores, quienes reportaron valores de 0.18% [23], 0.2% [15], 0.2-0.4% [6], 0.2-1.0% [12], para AE de *Aloysia triphylla* estudiados.

#### 4.4.2 Determinación de la composición química del aceite esencial de *Aloysia triphylla* cultivada en Bolívar, Santander.

En la **Tabla 13**, aparecen la cantidad relativa (%) e identificación de los componentes mayoritarios presentes en los AE de *Aloysia triphylla*, cultivada en Bolívar, Santander. En la **Figura 34**, se muestra una distribución de los cuatro grupos de familias de los 42 componentes identificados en los AE.

**Tabla 13.** Cantidad relativa (%) de los principales componentes presentes en los aceites esenciales de *Aloysia triphylla*, proveniente de diferentes cultivos experimentales en el Municipio de Bolívar, Santander.

N°	Ik <sup>a</sup>		Compuestos	Cantidad relativa, % (n=3) (N° Parcela)				
	DB-5MS	DB-WAX		10	11	26	33	2
1	933	1018	$\alpha$ - Pineno	0.30±0.02	-	-	0.22±0.01	-
2	975	1039	Sabineno	0.8±0.2	0.51±0.04	0.5±0.1	0.55±0.01	0.54±0.03
3	979	1448	1-Octen-3-ol	0.5±0.1	0.53±0.04	0.56±0.03	0.6±0.4	0.69±0.06
4	985	1335	6-Metil-5-hepten-2-ona	0.9±0.4	0.66±0.04	0.51±0.04	0.7±0.6	0.54±0.03
5	997	-	3-Octanol	0.5±0.2	0.24±0.02	0.3±0.4	0.27±0.05	0.4±0.1
6	1035	1201	Limoneno	6.7±0.4	4.4±0.3	5.2±0.2	5.5 ±0.5	5.4±0.2
7	1038	1208	1,8-Cineol	3.4±0.2	2.6±0.2	2.84±0.05	2.9±0.3	2.95±0.03
8	1048	1300	<i>trans</i> - $\beta$ -Ocimeno	0.3±0.4	0.7±0.1	0.5±0.2	0.3±0.2	1.4±0.4
9	1075	-	<i>trans</i> -4-Tujanol	0.7±0.1	0.53±0.03	0.3±0.5	0.56±0.04	0.6±0.2
10	1092	-	Compuesto oxigenado, C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> * (N.I)	-	0.29±0.01	-	0.23±0.02	-
11	1101	1542	Linalol	1.15±0.02	0.77±0.04	0.81±0.01	0.8±0.1	0.88±0.02
12	1106	-	<i>cis</i> -4-Tujanol	0.3±0.1	0.33±0.01	0.2±0.3	0.2±0.2	0.4±0.1
13	1106	-	Nonanal					
13	1138	1448	<i>cis</i> -Óxido de limoneno	0.54±0.02	0.70±0.04	-	0.2±0.2	0.24±0.01
14	1142	1460	<i>trans</i> -Óxido de limoneno	0.30±0.04	0.25±0.03	0.3±0.2	0.3±0.1	0.41±0.02
15	1144	-	Compuesto oxigenado, C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O* (N.I)	0.5±0.2	0.39±0.02	0.30±0.04	0.5±0.2	0.4±0.4
16	1154	1510	Fotocitral A	1.5±0.6	1.48±0.02	1.80±0.02	1.57±0.04	1.87±0.03
17	1163	-	<i>trans</i> -Verbenol	0.4±0.1	0.40±0.02	1.01±0.04	1.3±0.1	1.3±0.2
18	1172	1603	Epóxido de rosafurano	0.8±0.4	0.68±0.02	0.52±0.01	0.50±0.01	0.69±0.04
19	1182	1571	<i>trans</i> -Isocitral	0.7±0.5	0.6±0.1	1.43±0.01	1.7±0.1	1.62±0.02
20	1198	-	Compuesto oxigenado, C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O* (N.I)	-	0.4±0.1	-	0.25±0.03	-
21	1202	1700	$\alpha$ -Terpineol	1.1±0.1	0.96±0.02	1.0±0.1	0.9±0.1	1.2±0.2
22	1231	1819	Nerol	1.2±0.1	1.5±0.3	1.2±0.2	2±2	1.1±0.2
23	1248	1690	Neral	20±1	19.0±0.3	18±2	17±1	19±1

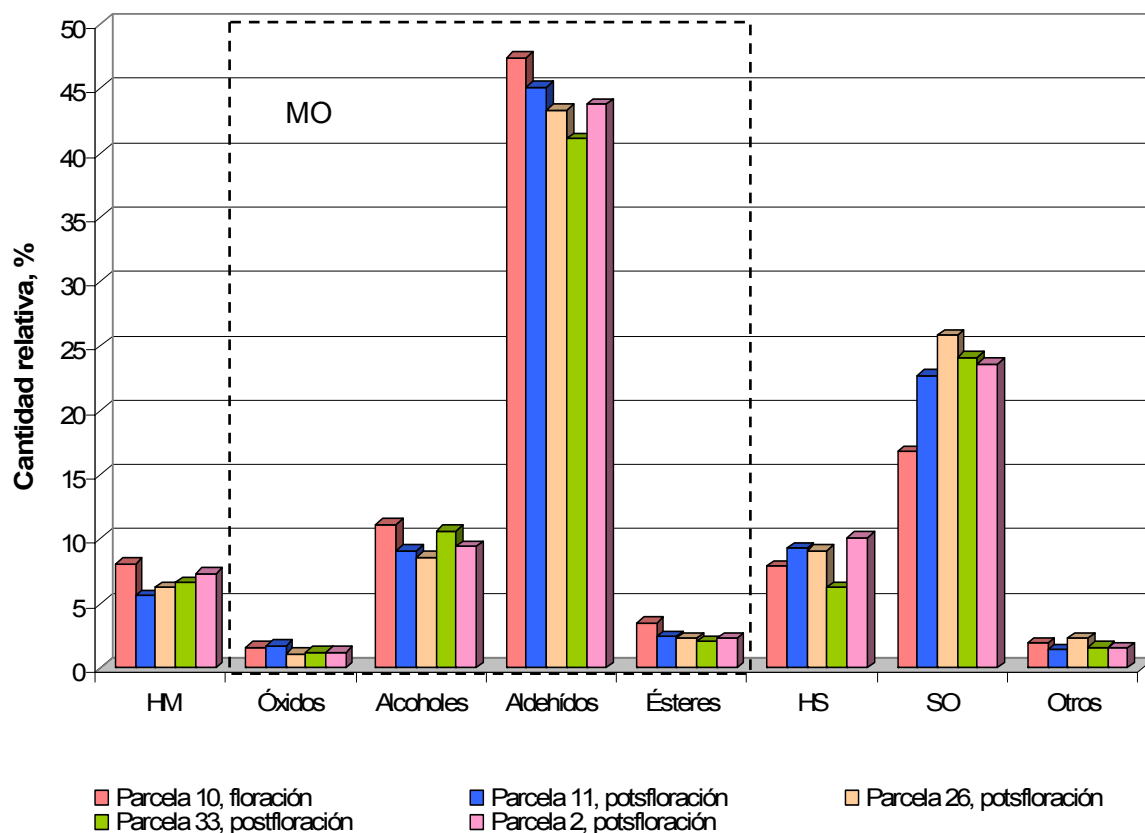
Continuación **Tabla 13.**

24	1257	1901	Geraniol	0.9±0.2	1.3±0.6	1.2±0.2	2.2±0.7	1.1±0.4
25	1278	-	Piperitona	0.38±0.02	0.25±0.04	-	0.1±0.1	-
26	1278	1741	Geranial	24.7±0.2	23.8±0.9	22±2	21±2	23±1
27	1287	-	Compuesto oxigenado, C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub> <sup>+</sup> (N.I)	0.4±0.2	0.3±0.1	-	-	0.2±0.4
28	1377	1757	Acetato de geraniol	3.5±0.5	2.4±0.1	2.3±0.1	2.0±0.1	2.4±0.2
29	1385	1499	α-Copaeno	0.8±0.5	0.63±0.01	0.79±0.01	0.6±0.1	0.90±0.03
30	1394	1527	β-Bourboneno	0.9±0.6	0.78±0.04	1.32±0.09	0.96±0.02	1.63±0.06
31	1433	1609	trans-β-Cariofileno	1.15±0.03	2±0.4	1.6±0.3	1.5±0.5	2.1±0.1
32	1441	2184	α-Cedreno β-Cedreno	-	0.3±0.2	0.22±0.03	0.3±0.2	-
33	1469	1819	Propanoato de nerilo α-Humuleno	0.4±0.1	0.4±0.1	0.34±0.04	0.38±0.01	0.4±0.2
34	1473	1606	allo-Aromadendreno	0.5±0.3	0.49±0.03	0.64±0.03	0.51±0.02	0.74±0.02
35	1487	1780	ar-Curcumeno	5±2	4.3±0.1	4.6±0.2	2.23±0.03	4.8±0.3
36	1499	1800	Germacreno D	-	0.68±0.04	-	0.36±0.02	-
37	1508	1801	Biciclogermacreno	-	1.14±0.01	0.25±0.03	0.6±0.1	0.4±0.2
38	1514	1746	β-Curcumeno	-	0.55±0.02	-	0.3±0.2	0.9±0.2
39	1528	-	10-epi-Cubebol*	1.0±0.7	1.1±0.1	1.35±0.03	1.08±0.01	1.46±0.06
40	1567	2037	trans-Nerolidol	1.6±0.3	3.1±0.1	2.7±0.2	2.66±0.04	2.9±0.3
41	1586	2037	ar-Turmerol	-	0.87±0.02	1.63±0.01	1.2±0.1	1.60±0.02
42	1596	2140	Espatulenol	7±1	8.2±0.3	10.1±0.9	9±1	7.3±0.7
43	1601	2007	Óxido de cariofileno	5±2	5.3±0.2	7.1±0.5	6.2±0.5	6.7±0.3
44	1646	2161	Sesquiterpeno oxigenado, C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sup>+</sup> (N.I)	0.5±0.3	1.1±0.2	0.87±0.04	1.0±0.1	0.95±0.01
45	1655	2184	epi-α-Cadinol	1.0±0.9	1.2±0.1	1.46±0.02	1.34±0.05	1.56±0.04
46	1665	-	N.I	-	0.3±0.1	0.4±0.7	0.6±0.1	-
47	1672	-	N.I	0.44±0.01	0.2±0.1	0.23±0.02	0.3±0.1	-
48	1752	-	Oplopanona	-	0.3±0.1	-	0.2±0.1	-

Clasificación por grupos de componentes	Cantidad relativa, % (N° Parcela)				
	10	11	26	33	2
HM: Hidrocarburos monoterpénicos	8.1	5.6	6.2	6.6	7.3
MO: Monoterpenos oxigenados	61.7	58	55.3	55	58.3
- Óxidos	1.6	1.7	1.1	1.0	1.2
- Alcoholes	9.2	8.8	8.6	10.6	9.4
- Aldehídos	47.4	45.1	43.3	41.4	45.4
- Ésteres	3.5	2.4	2.3	2.0	2.3
HS: sesquiterpénicos	8.8	11	9.4	7.3	9.5
SO: Sesquiterpenos oxigenados	16.1	21.1	25.2	22.7	22.6
Otros	1.9	1.4	2.3	1.6	1.5

I<sub>k</sub><sup>a</sup> Índice de Kovats determinados experimentalmente; \* Identificación tentativa; N.I. No identificado.

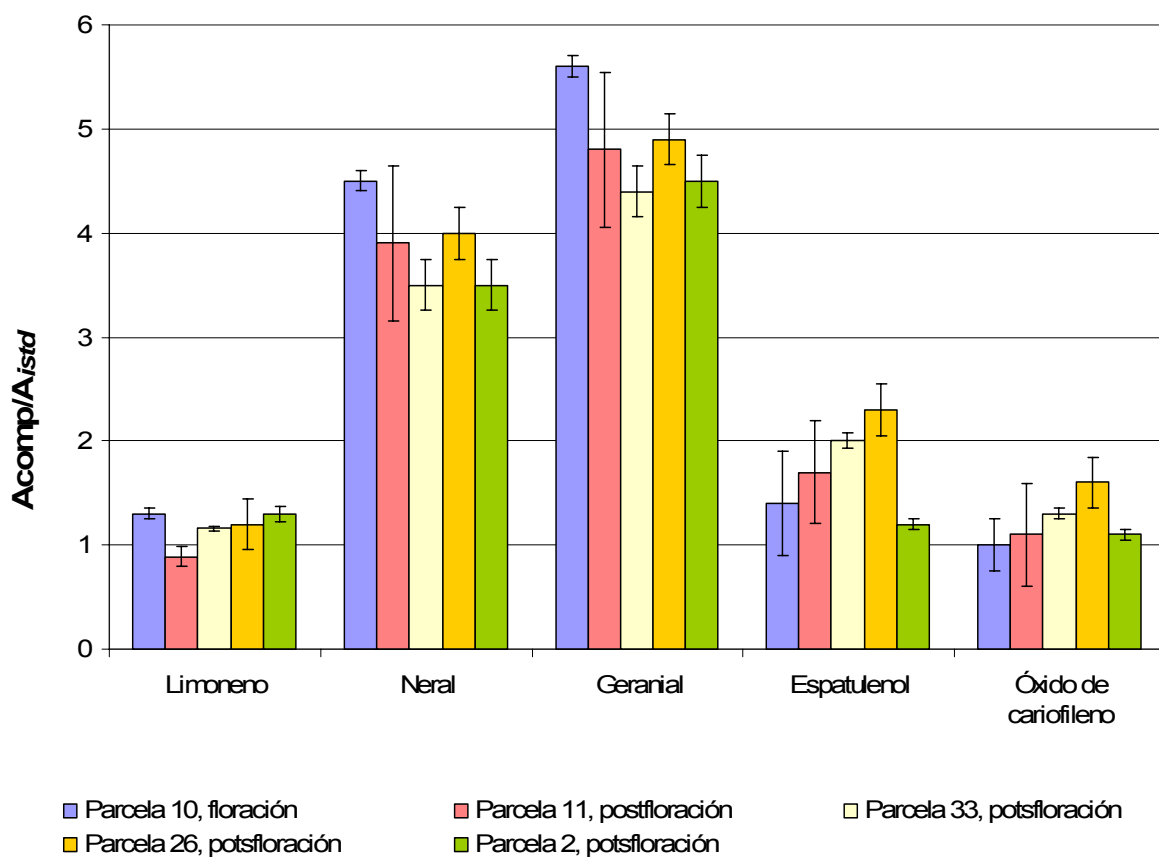
**Figura 34.** Contenido de las fracciones presentes en el aceite esencial de *Aloysia triphylla*, cultivada en Bolívar, Santander.



La mayor variabilidad en los AE se observó para las plantas de la parcela N° 10, que se encontraban en floración: la cantidad de MO (61,7%) aumentó en comparación con las demás parcelas; cambio, que se debió a la contribución del subgrupo de aldehídos. Al igual que en las muestras de Antioquia, los compuestos que más afectaron esta variación fueron el geranial y neral. También se observó un aumento en el contenido de sesquiterpenos oxigenados para casi todas las parcelas, a excepción de la parcela 10, donde la contribución del espatulenol y óxido de cariofileno fue muy baja, de 7 y 5%, respectivamente (**Figura 34**).

En la **Figura 35**, se muestra la relación de áreas cromatográficas de algunos compuestos del aceite y del estándar interno. Se observa un valor más alto para el neral y geranial, en la parcela 10 y para espatulenol y óxido de cariofileno en la parcela 26.

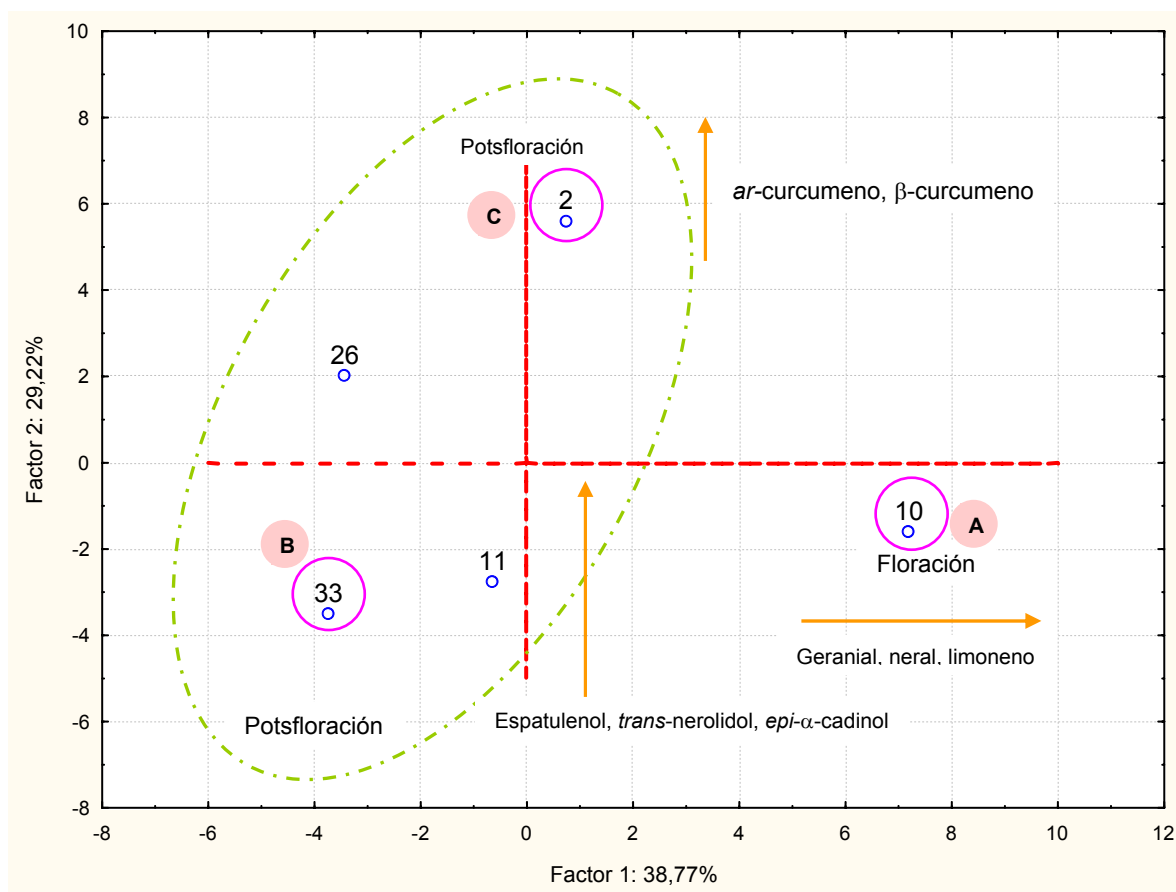
**Figura 35.** Relación de “Área del compuesto/Área del estándar interno”, en cromatogramas, de los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales de *Aloysia triphylla*, cultivada en Bolívar, Santander.



#### 4.4.3 Análisis de componentes principales de los aceites esenciales de *Aloysia triphylla* extraídos por MWHD, de plantas cultivadas en Bolívar, Santander.

Las composiciones relativas de los AE obtenidos por MWHD de plantas cultivadas en Bolívar, Santander, se compararon, usando el análisis estadístico de componentes principales. En la **Figura 36** aparece la representación gráfica de las composiciones de estos aceites.

**Figura 36.** Representación gráfica de las cantidades relativas (%) de los componentes presentes en los aceites esenciales obtenidos por MWHD, de plantas de *A. triphylla* cultivadas en Bolívar, Santander.



Véase el **Anexo 3 (Tabla 2)** para las contribuciones de los componentes en cada uno de los *Factores*.

La distribución de cada AE está determinada por su composición química. La **Figura 36** muestra que el *Factor 1* corresponde al 39% de la variación y está representado por el neral, geranial, acetato de geranilo, linalol, epóxido de rosafurano y el espatulenol. El *Factor 2* corresponde al 29% de la información y está conformado por nerol,  $\alpha$ -terpineol, *trans*- $\beta$ -ocimeno, y sesquiterpenos ( $\beta$ -bourboneno, *allo*-aromadendreno y 10-*epi*-cubebol).

La diferencia, en las distancias de los tres grupos (**A**, **B** y **C**) correspondientes a los AE, confirma que éstos tienen diferentes proporciones en sus constituyentes, a lo largo de los dos componentes principales. La mayor contribución a esta diferencia corresponde a las variaciones en el contenido de geranial, neral y limoneno, generando un desplazamiento hacia la derecha en el gráfico, para el subgrupo **A** (parcela 10); el aporte al subgrupo **B** (representado por la parcela 33) lo hacen los sesquiterpenos como el espatulenol, *trans*-nerolidol, *epi*- $\alpha$ -cadinol, mientras que la diferencia en la composición química del subgrupo **C** (parcela 2), se debe a sesquiterpenos (*ar*-curcumeno,  $\beta$ -curcumeno), por lo que presenta un desplazamiento en el eje de las ordenadas, esto, si se tienen en cuenta los tres puntos más distantes, observados en la **Figura 36**. En el **Anexo 3 (Tabla 2)** aparecen las contribuciones de los diferentes compuestos a los *Factores* 1 y 2.

#### 4.5. ACEITES ESENCIALES AISLADOS POR HIDRODESTILACIÓN ASISTIDA POR LA RADIACIÓN CON MICROONDAS DE PLANTAS CULTIVADAS EN EL ROSAL, CUNDINAMARCA.

##### 4.5.1 Rendimiento del aceite esencial

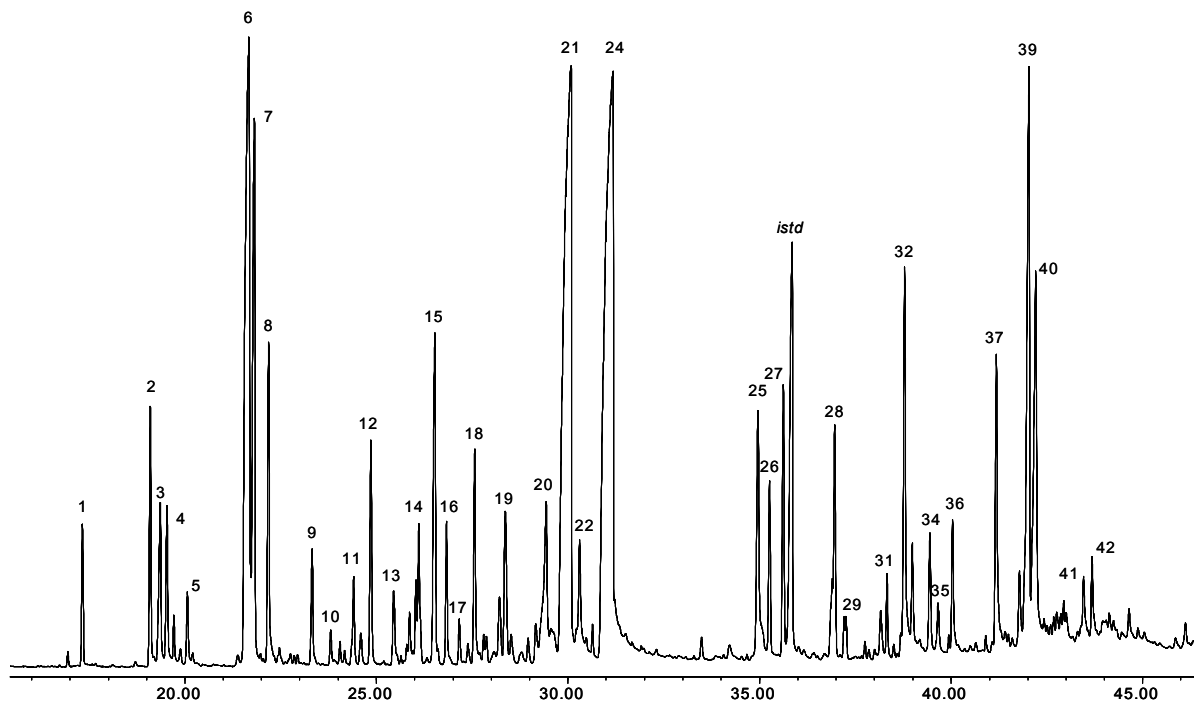
En la **Tabla 14** se reporta el rendimiento del aceite de *Aloysia triphylla*, cultivado en el Rosal, Cundinamarca.

**Tabla 14.** Rendimiento de extracción (% p/p) del aceite esencial de *Aloysia triphylla*, cultivada en el Municipio del Rosal, Cundinamarca.

Localidad	Rendimiento (%p/p) $\pm$ s (n=3)	Característica
El Rosal, Cundinamarca	0.46 $\pm$ 0.06	En estado de floración

##### 4.5.2 Determinación de la composición química del aceite esencial de *Aloysia triphylla* cultivada en el Rosal, Cundinamarca.

En la **Figura 37** aparece el perfil cromatográfico típico del AE de *Aloysia triphylla*, cultivado en el Rosal, Cundinamarca.



**Figura 37.** Perfil cromatográfico típico del AE obtenido por MWHD de *A. triphylla*, cultivada en Cundinamarca. Columna DB-5MS (60 m), *split* 1:30, MSD. La identificación de los picos aparece en la **Tabla 15**.

En la **Tabla 15**, se reportan la cantidad relativa (%) e identificación de los componentes en el AE de *A. triphylla* cultivada en el Rosal, Cundinamarca.

**Tabla 15.** Cantidad relativa (%) de los principales componentes presentes en el aceite esencial de *Aloysia triphylla*, cultivada el Rosal, Cundinamarca.

Pico N° (Fig. 37)	$I_k^a$		Compuestos	Cantidad relativa, % (n=3)
	DB-5MS	DB-WAX		
1	933	1018	$\alpha$ - Pineno	0.71± 0.05
2	975	1039	Sabineno	1.5±0.9
3	979	1500	1-Octen-3-ol	1.3±0.1
4	1050	-	3-Octanol	0.4±0.1

Continuación **Tabla 15**

5	1029	1335	6-Metil-5-hepten-2-ona	1.1±0.1
6	1035	1201	Limoneno	9.3±0.3
7	1038	1208	1,8-Cineol	4.4±0.1
8	1048	1300	<i>trans</i> -β-Ocimeno	2.1±0.2
9	1075	-	<i>trans</i> -4-Tujanol	0.78±0.02
10	1092	-	Compuesto oxigenado, C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> (N.I)	0.254±0.003
11	1101	1542	Linalol	0.61±0.02
12	1106	-	<i>cis</i> -4-Tujanol	0.30±0.01
13	1138	1448	Nonanal <i>cis</i> -Óxido de limoneno	0.52±0.02
14	1144	1460	<i>trans</i> -Óxido de limoneno	0.9±0.1
15	1154	1510	Fotocitral A	2.7±0.1
16	1163	-	<i>trans</i> -Verbenol	0.9±0.1
17	1172	1603	Epóxido de rosafurano	0.27±0.01
18	1182	1571	<i>trans</i> -Isocitral	1.4±0.1
19	1202	1700	α-Terpineol	1.18±0,04
20	1231	1819	Nerol	2.0±0.4
21	1248	1690	Neral	15.1±0.2
22	1257	1901	Geraniol	1.0±0.4
23	1278	-	Piperitona	0.10±0.04
24	1278	1741	Geranial	17.0±0.5
25	1377	1757	Acetato de geraniol	2.43±0.02
26	1385	1499	α-Copaeno	1.14±0.03
27	1394	1527	β-Bourboneno	1.73±0.04
28	1433	1609	<i>trans</i> -β-Cariofileno	2.1±0.1
29	1441	2184	β-Cedreno	0.46±0.01
30	1469	1819	Propanoato de nerilo	0.40±0.03
31	1469 1473	1606	α-Humuleno <i>allo</i> -Aromadendreno	0.50±0.01
32	1487	1780	<i>ar</i> -Curcumeno	3.10±0.04
33	1499	1800	Germacreno D	0.7±0.1
34	1508	1801	Biciclogermacreno	0.7±0.2
35	1514	1746	β-Curcumeno	0.36±0.03
36	1528	-	10- <i>epi</i> -Cubebol*	0.6±0.1
37	1567	2037	<i>trans</i> -Nerolidol	2.40±0.04
38	1586	2211	<i>ar</i> -Turmerol	0.61±0.03
39	1596	2140	Espatuleno	6.1±0.2
40	1601	2007	Óxido de cariofileno	4.2±0.2
41	1646	2161	Sesquiterpeno oxigenado, C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O (N.I)	0.2±0.2
42	1655	-	<i>epi</i> -α-Cadinol	0.6±0.05

Continuación **Tabla 15.**

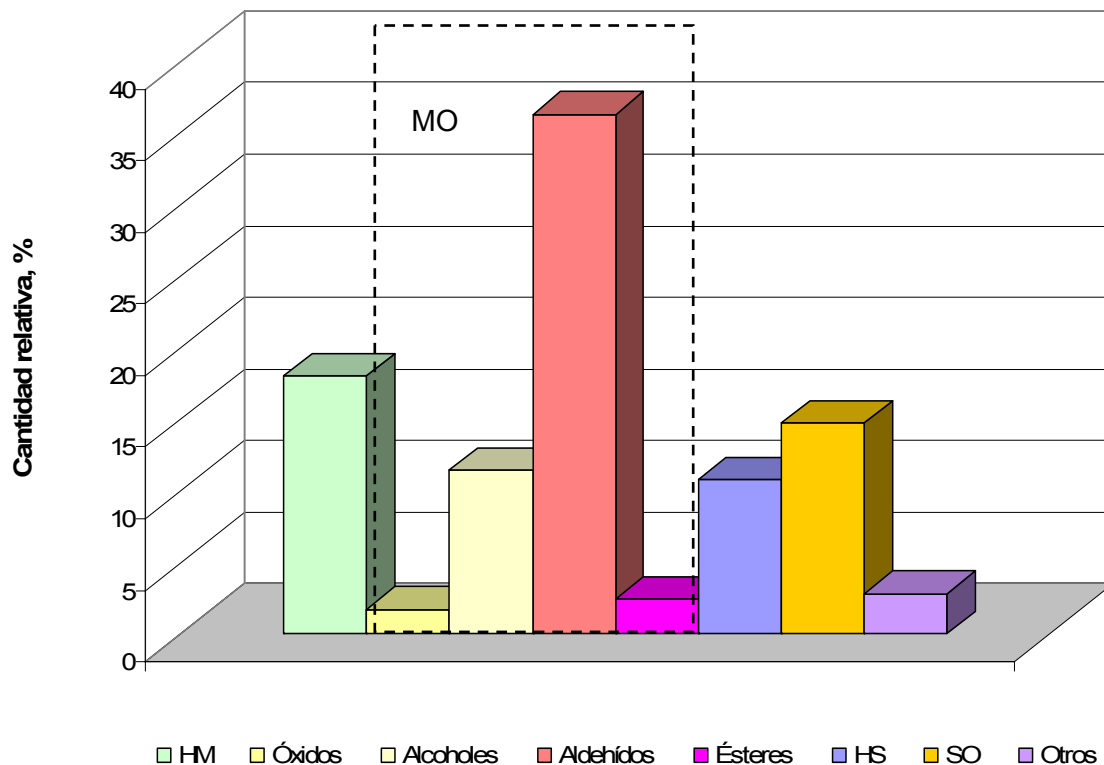
Clasificación por grupos de componentes	Cantidad relativa, %
<b>HM:</b> Hidrocarburos monoterpénicos	18
<b>MO:</b> Monoterpenos oxigenados	51.6
- Óxidos	1.7
- Alcoholes	11.2
- Aldehídos	36.3
- Ésteres	2.43
<b>HS:</b> Hidrocarburos sesquiterpénicos	10.8
<b>SO:</b> Sesquiterpenos oxigenados	14.7
<b>Otros</b>	2.8

$I_k^a$  Índice de Kovàts determinados experimentalmente; \* Identificación tentativa; N.I. No identificado

Se detectaron 42 compuestos en cantidades relativas  $> 0.2\%$ , en el AE de *Aloysia triphylla*, cultivada en Cundinamarca, de los cuales 40 fueron identificados positivamente, representando el 90.2% del aceite total. Geranial (17%), neral (15%) y limoneno (9,3%) fueron los componentes mayoritarios, que constituyeron el 41% del aceite, seguidos de los espatulenol (6,1%), óxido de cariofileno (4,2%) y 1,8-cineol (4,4%).

En la **Figura 38**, se muestra una distribución de los cuatro grupos de familias de los 42 componentes identificados en el AE de Cundinamarca.

**Figura 38.** Fracciones presentes en el aceite esencial de *Aloysia triphylla*, cultivada en el Rosal, Cundinamarca.

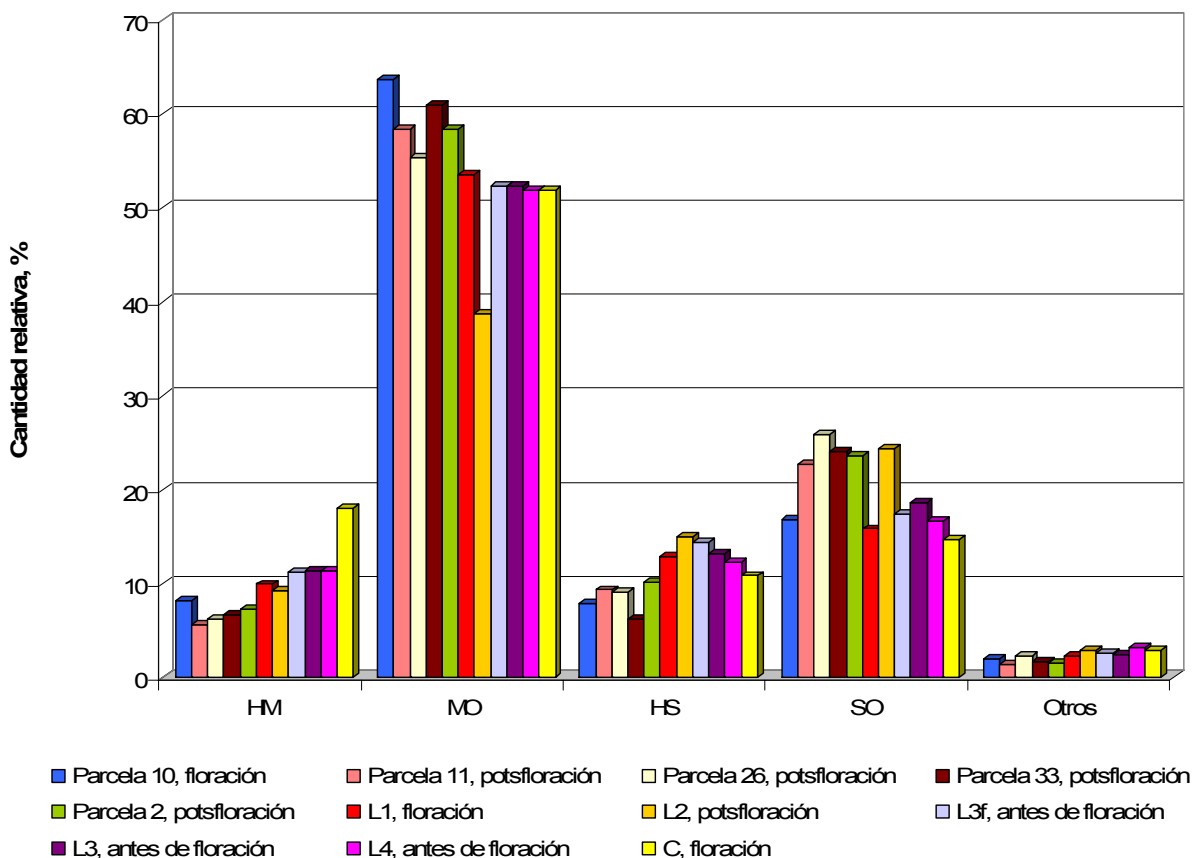


El aceite esencial de *A. triphylla*, se puede clasificar como un aceite de tipo “*monoterpenoide*”, según las gráficas de familias de compuestos (**Figuras N° 30, 34 y 37**). El aceite está representado básicamente por compuestos como el neral y geranial, responsables del aroma cítrico que caracteriza a la especie. Estudios previos realizados en Portugal [18], sobre el AE de *Aloysia triphylla*, recolectada en diferentes lugares (Merelim y Arcos de Valdevez) reportan un 59-66% de MO en hojas de cidrón; este estudio, concuerda con los resultados obtenidos en esta investigación: el contenido de MO en el aceite de *Aloysia triphylla* colombiano varía de 37 a 61%, según el estado de desarrollo vegetativo y lugar de procedencia de la planta.

**4.6 Análisis de componentes principales de los aceites esenciales de *Aloysia triphylla* extraídos por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas, de plantas cultivadas en Rionegro (Antioquia), Bolívar (Santander) y el Rosal (Cundinamarca).**

El análisis global de la composición de los metabolitos secundarios volátiles de las plantas cultivadas en Rionegro (Antioquia), Rosal (Cundinamarca) y Bolívar (Santander), se llevó a cabo con base en las principales familias de compuestos aislados, *i.e.* HM, MO, HS y SO (Véase **Figura 39**).

**Figura 39.** Distribución por familias de los compuestos presentes en los aceites esenciales obtenidos por MWHHD de plantas de *A. triphylla*, cultivadas en Rionegro (Antioquia), Rosal (Cundinamarca) y Bolívar (Santander).

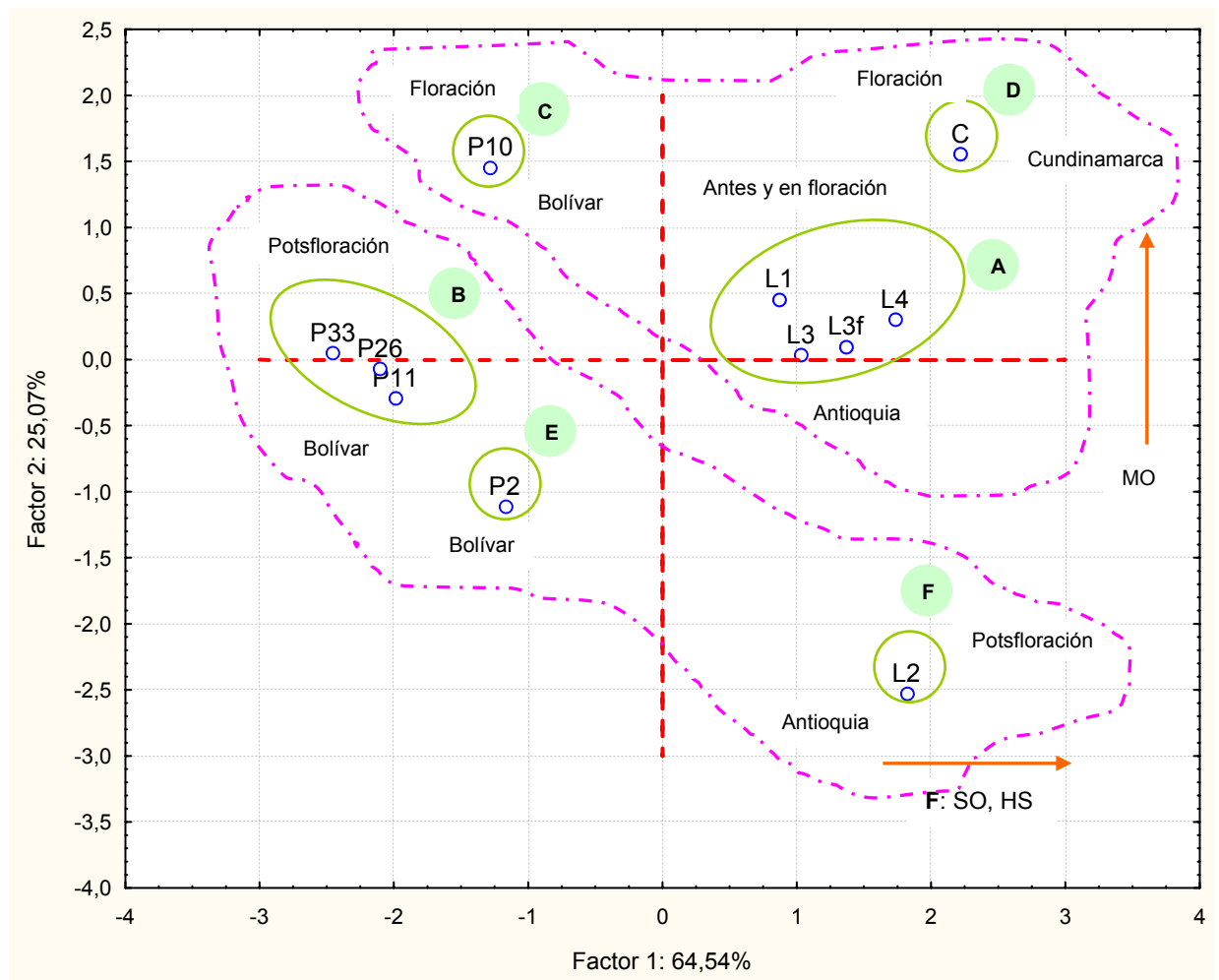


Los constituyentes del aceite de *Aloysia triphylla* se distribuyeron en cuatro grupos de compuestos, a saber: monoterpenos oxigenados, hidrocarburos monoterpénicos, sesquiterpenos oxigenados y hidrocarburos sesquiterpénicos. El cambio más pronunciado en la composición del aceite, se observó para las muestras de Bolívar, Santander (plantas en estado de floración). El contenido de MO en estas muestras fue de 55-62% y el grupo de aldehídos alcanzó 42-47%. El contenido más alto de SO se encontró en muestras de Bolívar y Antioquia (plantas en estado de potsfloración), con la cantidad relativa de 25 y 21%, respectivamente, siendo el espatulenol y óxido de cariofileno, los componentes que más contribuyen a la variación. El germacreno D, biciclogermacreno, *ar*-curcumeno, fueron los compuestos de mayor participación en la fracción de HS, en los aceites de Antioquia y Bolívar (plantas en potsfloración). La fracción de HM, disminuyó en muestras de Bolívar (plantas en potsfloración) en comparación con la de Cundinamarca (plantas en floración).

Adicionalmente, Se compararon los AE de las tres regiones mediante un análisis estadístico de componentes principales. La información reunida en las **Tablas 11, 13 y 15** es representada por un subespacio de dos coordenadas, construido con base en las combinaciones lineales de las cantidades relativas (%) de los componentes presentes en los AE.

El resultado de PCA (**Figura 40**) aplicado a todos los AE de plantas de *Aloysia triphylla*, cultivada en las tres regiones de Colombia, vislumbra a la formación de seis grupos bien definidos. El *Factor 1* involucra el 65% de la información y está representado básicamente por todos los grupos de compuestos, HM (20%), MO (18%), HS (23%) y SO (11%); principalmente 1,8-cineol, geraniol, nerol, *ar*-curcumeno y *trans*- $\beta$ -Cariofileno). El *Factor 2* corresponde al 25% de la información e involucra MO (30%), HM (16%) y SO (45%) (geranial, neral y limoneno). En el **Anexo 3 (Tabla 3)** se muestran las contribuciones de las diferentes familias de compuestos a los *Factores 1 y 2*.

**Figura 40.** Representación gráfica de las cantidades relativas (%) de los componentes presentes en los aceites esenciales, obtenidos por MWHD de plantas de *A. triphylla* cultivada en Antioquia, Cundinamarca y Santander, en diferentes estados de desarrollo vegetativo y ambiente ecológico.



De acuerdo con la **Figura 40**, se observa la existencia de seis grupos, a saber: El grupo **A**, que corresponde a los AE de plantas cultivadas en Antioquia (L1: plantas en floración, 3 meses; L3: plantas antes de floración, 3 meses y L4: plantas antes de floración, 2 meses) y Cundinamarca (C: plantas en floración), se caracterizan por un mayor contenido de MO; el grupo **B** que corresponde a los AE de plantas de

Bolívar (P11: potsfloración, 6 ½ meses; P33: potsfloración, 8 meses; P26: potsfloración, 8 meses) tienen un alto contenido de SO (óxido de cariofileno y espatulenol); en el grupo **C**, se encuentra el AE de plantas cultivadas en Bolívar (P10: en floración, 5 meses) y se caracteriza por un alto contenido de MO, lo que hace que se desplace hacia arriba en el eje de las ordenadas; mientras que altas cantidades de HS y SO, indican un desplazamiento hacia la derecha en el grupo **F** representado por plantas de Antioquia (L2: Potsfloración, 4 meses). Las muestras correspondientes a los AE de Bolívar (Santander) están ubicadas en el subespacio de abajo de la gráfica; mientras que los aceites de Antioquia y Cundinamarca, están localizados en el subespacio de arriba de la gráfica (Véase **Figura 40**).

También se observa, que los AE obtenidos de plantas antes de floración y durante la floración, a partir del segundo y tercer mes de su cultivo (**A**), presentan poca variación en su composición. Sin embargo, a medida que se logra una mayor madurez y desarrollo vegetativo, la composición del AE presenta cambios significativos en su composición (**F**). Lo mismo ocurre con plantas cultivadas en Bolívar, Santander, cuando para plantas en floración hacia el cuarto mes de su crecimiento (**C**), se presenta una variación muy significativa en la composición química de su aceite, en comparación con los AE obtenidos de plantas en estado de desarrollo más avanzado, *i.e.* potsfloración (**B**). Todas estas diferencias en los subgrupos a lo largo de las dos coordenadas, se deben a una variación en la composición del aceite, dependiendo del estado de desarrollo vegetativo y, al parecer, de la procedencia de la planta.

## **4.7 EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Aloysia triphylla* MEDIANTE DESTILACIÓN CON AGUA/VAPOR.**

En esta parte del Proyecto, los AE de plantas cultivadas en Bolívar, Santander, se obtuvieron en un destilador semi-industrial de cobre. Se siguió el procedimiento descrito en la Sección **3.4.1** de la Parte Experimental. Las plantas fueron recolectadas en diferentes estados de desarrollo y, algunas de ellas, en tres periodos de crecimiento.

### **4.7.1 Rendimiento del aceite esencial**

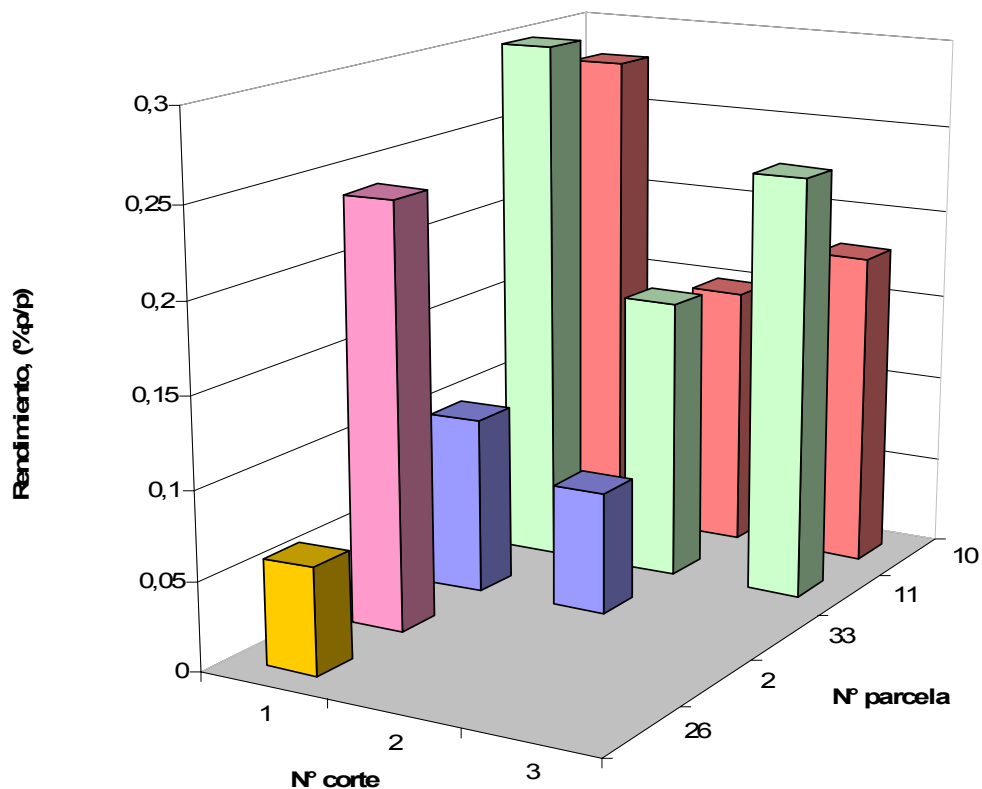
Con el fin de observar la influencia de la época de recolección y estados de desarrollo de las plantas, sobre el rendimiento y la composición química, se estudiaron los AE de plantas recolectadas a los 3, 4 ½ y 6 ½ meses de edad, solo para las parcelas N° 10 y 11 (Bolívar, Santander). Para la parcela N° 33 se evaluaron dos cortes a los 4 ½ y 6 ½ meses. Para las parcelas 2 y 26 sólo se realizó un corte (7 y 9 meses, respectivamente), debido al poco material vegetal disponible.

En la **Tabla 16**, se presentan los rendimientos obtenidos por destilación agua/vapor, de las plantas de *Aloysia triphylla* cultivadas en cada una de las parcelas experimentales. La variación del rendimiento del AE de los respectivos cortes para cada una de las parcelas, se puede observar en la **Figura 41**.

**Tabla 16.** Rendimiento de extracción (% p/p) por destilación con agua/vapor, de los aceites esenciales de *Aloysia triphylla*, cultivada en Bolívar, Santander.

N° Parcela	Rendimiento (% p/p) $\pm$ s (n=2)		
	1 <sup>er</sup> corte	2 <sup>do</sup> corte	3 <sup>er</sup> corte
10	0,28 $\pm$ 0,08	0,15 $\pm$ 0,02	0,18 $\pm$ 0,04
11	0,30 $\pm$ 0,02	0,16 $\pm$ 0,03	0,24 $\pm$ 0,01
33	0,100 $\pm$ 0,001	0,07 $\pm$ 0,02	-
2	0,24 $\pm$ 0,03	-	-
26	0,06	-	-

**Figura 41.** Variación del rendimiento de AE obtenido por destilación con agua/vapor, de plantas de *Aloysia triphylla*, cultivadas en Bolívar, Santander.



En la **Figura 41**, se observa que el rendimiento de AE más alto se dio para las plantas de las parcelas N° 10 y 11, antes de floración y 3 meses de edad. Durante la etapa de floración (4 ½ meses) se notó una drástica disminución en el rendimiento del aceite, esto se explica debido a que los nutrientes consumidos por las plantas son usados principalmente para el desarrollo de las flores, disminuyendo su uso en la producción de metabolitos secundarios y demás procesos biológicos; el rendimiento presentó nuevamente un aumento hacia la etapa de postfloración (6 1/2 meses), efecto que se atribuye a un mayor desarrollo foliar de las plantas.

Para la parcela N° 26, se obtuvo el rendimiento de AE más bajo (0,06%), debido probablemente, a que las condiciones geográficas bajo las cuales se desarrollaron las plantas (2900 m.s.n.m y 14 °C), no favorecen la acumulación de AE. Igualmente se observó, un deficiente desarrollo foliar, presentando pocas ramificaciones, hojas pequeñas, alturas muy bajas y un crecimiento muy lento, factores responsables del bajo rendimiento del aceite. Este comportamiento concuerda con el planteado por Guzman [80], quien afirma que en regiones de mayor altitud y con temperaturas bajas, las plantas crecen con más dificultad, mientras que en lugares con temperaturas altas, se presenta una mayor acumulación de aceite esencial.

El buen desarrollo foliar y los rendimientos de AE más altos, en las parcelas N° 10, 11, 33 y 2, sugieren que las plantas allí cultivadas presentaron una mejor adaptabilidad a las condiciones climáticas de la región. En la **Figura 42**, se muestra un registro fotográfico de las plantas sembradas en cada una de las parcelas de Bolívar, Santander.

**Figura 42.** Fotos de las parcelas experimentales en Bolívar, Santander.



Parcela N° 10



Parcela N° 11



Parcela N° 2

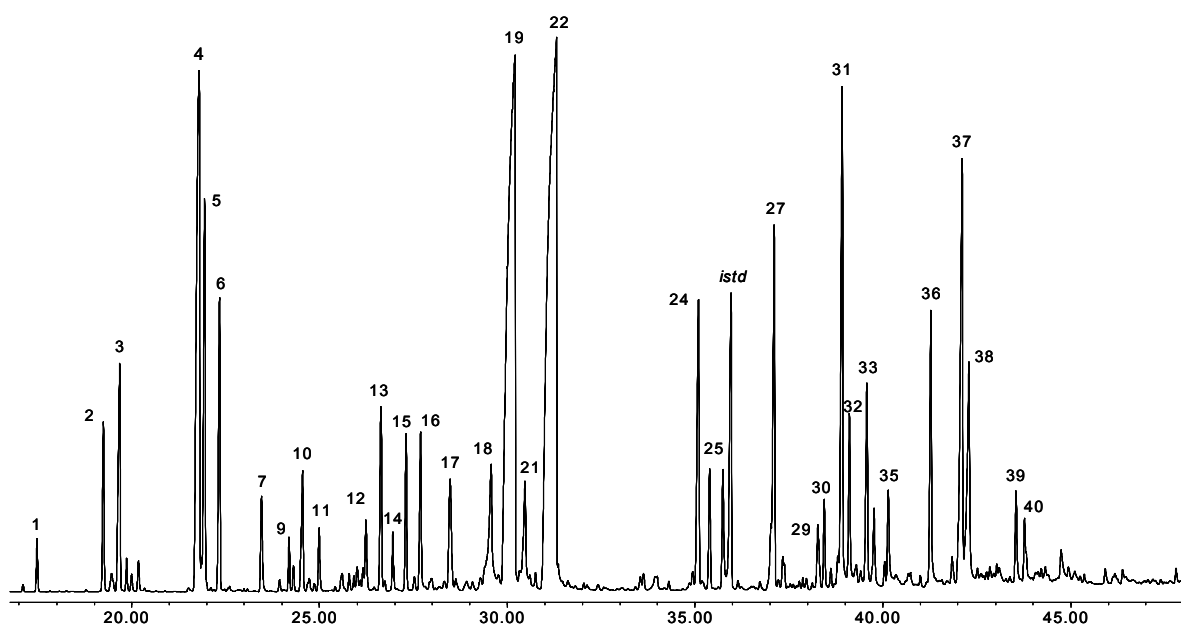


Parcela N° 26

Para más registros fotográficos, Véase **Anexo 4.**

#### 4.7.2 Caracterización química de los aceites esenciales de *Aloysia triphylla*, cultivada en Bolívar, Santander y obtenidos por destilación con agua/vapor.

En todos los AE de *Aloysia triphylla*, se identificaron más de 40 componentes. El aceite se caracterizó por su más alto contenido de neral, geranial, limoneno, óxido de cariofileno y espatulenol, en comparación con los de los aceites de Antioquia, Cundinamarca y los reportados en otros estudios [18, 19, 26]. En la **Figura 43**, se muestra el perfil cromatográfico del AE de *Aloysia triphylla*, obtenido por el método de destilación. La identificación de los compuestos en el aceite se hizo usando los índices de retención de Kovàts, calculados en dos columnas, apolar y polar, y espectros de masas (EI, 70 eV). En las **Tablas 17-19** se muestran las cantidades relativas (%) de los componentes presentes en cada uno de los AE de las cinco parcelas experimentales. En la **Figura 46**, se observa el contenido de las fracciones presentes en todos los AE, clasificadas según los grupos de compuestos químicos.



**Figura 43.** Perfil cromatográfico típico del AE de *A. triphylla*, obtenido por A/V. Columna DB-5MS (60 m), *split* 1:30, MSD. La identificación de los picos aparece en la **Tabla 17**.

**Tabla 17.** Cantidad relativa (%) de los principales componentes presentes en el aceite esencial obtenido por destilación agua/vapor de *Aloysia triphylla*, cultivada en la parcela N° 10, de Bolívar, Santander.

Pico N° (Fig. 43)	I <sub>k</sub> <sup>a</sup>		Compuestos	Cantidad relativa, % (n=2)		
	DB-5MS	DB-WAX		I	II	III
1	933	1018	$\alpha$ - Pineno	0.50±0.06	-	0.4±0.1
2	975	1039	Sabineno	0.8±0.3	0.5±0.1	0.5±0.3
3	1029	1335	6-Metil-5-hepten-2-ona	1.2±0.8	0.7±0.1	0.63±0.01
4	1035	1201	Limoneno	7±1	4±1.4	5±1
5	1038	1208	1,8-Cineol	3±2	1.25±0.02	1.1±0.2
6	1048	1300	<i>trans</i> - $\beta$ -Ocimeno	0.4±0.2	0.4±0.1	0.5±0.2
7	1075	-	<i>trans</i> -4-Tujanol	0.9±0.5	0.57±0.03	0.5±0.2
8	1092	-	Compuesto oxigenado, C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> (N.I)	-	0.8±0.1	0.4±0.1
9	1101	1542	Linalol	1.1±0.1	1.2±0.1	0.9±0.2
10	1138	1448	<i>cis</i> -Óxido de limoneno	1.9±0.8	-	-
11	1143	1460	<i>trans</i> -Óxido de limoneno	1.4±0.7	-	0.3±0.1
12	1144	-	Compuesto oxigenado, C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O (N.I)	0.8±0.2	0.8±0.1	1.0±0.2
13	1154	1510	Fotocitral A	1.3±1.5	1.7±0.1	2.1±0.3
14	1163	-	<i>trans</i> -Verbenol	-	0.7±0.1	1.3±0.2
15	1172	1603	Epóxido de rosafurano	1.1±0.5	0.9±0.2	0.61±0.03
16	1182	1571	<i>trans</i> -Isocitral	0.6±0.3	-	2.3±0.3
17	1202	1700	$\alpha$ -Terpineol	1.1±0.1	1.2±0.2	1.0±0.3
18	1231	1819	Nerol	1.2±0.6	2.1±0.6	1.2±0.3
19	1248	1690	Neral	21±1	25±1	22±2
20	-	-	Piperitona	-	0.4±0.2	-
21	1257	1901	Geraniol	1.1±0.4	1.6±0.3	0.6±0,1
22	1278	1741	Geranial	26±1	31±2	28±1
23	1357	-	Ácido geránico	2.2±0.5	-	-
24	1377	1757	Acetato de geranilo	5.2±1.3	3.6±0.8	3.1±0.1
25	1385	1499	$\alpha$ -Copaeno	0.8±0.3	0.7±0.3	0.8±0.3
26	1394	1527	$\beta$ -Bourboneno	0.9±0.2	0.8±0.2	1.0±0.4
27	1433	1609	<i>trans</i> - $\beta$ -Cariofileno	2±1.4	-	2.5±0.9
28	1441	2184	$\beta$ -Cedreno	-	-	0.5±0.2
	1441	-	$\beta$ -Copaeno	-	-	-
29	1469	1819	Propanoato de nerilo	0.6±0.2	0.6±0.2	-
	1469	-	$\alpha$ -Humuleno	-	-	-
30	1473	1606	<i>allo</i> -Aromadendreno	0.5±0.2	0.5±0.2	0.5±0.2
31	1487	1780	<i>ar</i> -Curcumeno	4±1.0	4±1.3	4±1.3
32	1499	1800	Germacreno D	-	-	0.4±0.2
33	1508	1801	Biciclogermacreno	-	-	0.5±0.2
34	1528	-	10- <i>epi</i> -Cubebol*	0.63±0.01	0.7±0.1	0.9±0.1

Continuación **Tabla 17.**

35	1567	2037	<i>trans</i> -Nerolidol	1.9±0.5	1.9±0.5	2.3±0.5
36	1586	2211	<i>ar</i> -Turmerol	-	-	0.4±0.2
37	1596	2140	Espatulenol	5.0±0.3	4±1	5.7±0.8
38	1601	2007	Óxido de cariofileno	4.5±0.3	3.5±0.8	4.6±0.5
39	1646	2161	Sesquiterpeno oxigenado, C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O (N.I.)	0.4±0.1	0.4±0.2	0.6±0.3
40	1655	2184	<i>epi-α</i> -Cadinol	0.5±0.1	0.47±0.12	0.6±0.1

Clasificación por grupos de componentes	Cantidad relativa, %		
	I	II	III
<b>HM:</b> Hidrocarburos monoterpénicos	8.7	4.5	6.1
<b>MO:</b> Monoterpenos oxigenados	66.9	72.8	67.4
- <b>Óxidos</b>	4.4	0.9	0.9
- <b>Alcoholes</b>	9.2	9.4	8.0
- <b>Aldehídos</b>	48.9	58.1	55.4
- <b>Ésteres</b>	5.2	3.6	3.1
<b>HS:</b> Hidrocarburos sesquiterpénicos	8.0	6.0	9.4
<b>SO:</b> Sesquiterpenos oxigenados	13.5	12.5	15.6
<b>Otros</b>	3.4	0.7	0.6

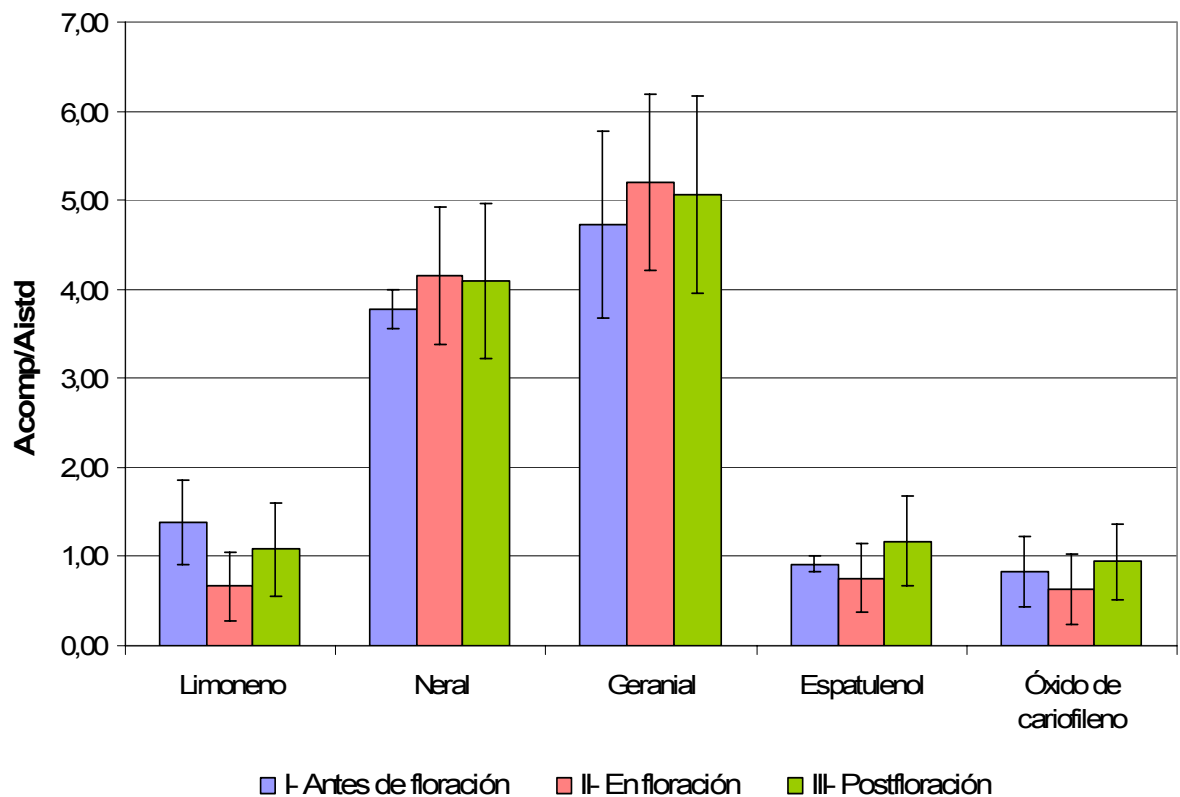
I - Antes de floración, 3 meses; II - En estado de floración, 4 ½ meses; III - Postfloración, 7 meses; I<sub>k</sub><sup>a</sup> Índice de Kováts determinados experimentalmente; \* Identificación tentativa; N.I. No identificado.

En la **Tabla 17**, se registran la identificación y cantidad relativa (%) de los compuestos presentes en el AE. Se detectaron 40 compuestos, 37 de ellos fueron identificados positivamente, representando el 92.5% de la muestra. Los compuestos mayoritarios en el aceite corresponden al geranial, neral, limoneno, acetato de geranilo, *ar*-curcumeno, espatulenol y óxido de cariofileno.

En las **Figuras 44 y 45**, se presenta la relación de áreas cromatográficas de los compuestos mayoritarios de los AE obtenidos de plantas cultivadas en Bolívar, Santander, y del patrón interno (*n*-tetradecano). En éstas, se aprecia una diferencia significativa en el contenido de neral y geranial, *i.e.* su aumento durante la floración. Caso contrario ocurre con el espatulenol y óxido de cariofileno, que

sufren una disminución, durante esta misma etapa. Parece ser que las diferencias en la composición química del aceite están definidas por los estados de madurez y desarrollo vegetativo de la planta, *i.e.* antes, durante y después de floración, así como por la edad de la planta.

**Figura 44.** Relación “Área del compuesto/Área del estándar interno”, en cromatogramas, de los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales de *Aloysia triphylla*, cultivada en la parcela N° 10 en Bolívar, Santander.



**Tabla 18.** Cantidad relativa (%) de los principales componentes del aceite esencial de *Aloysia triphylla*, cultivada en la parcela N° 11, Bolívar, Santander.

N°	I <sub>k</sub> <sup>a</sup>		Compuestos	Cantidad relativa, % (etapas) (n=2)		
	DB-5MS	DB-WAX		I	II	III
1	933	1018	$\alpha$ - Pineno	-	0.32±0.03	0.3±0.1
2	975	1039	Sabineno	0.4±0.2	1.0±0.1	0.9±0.2
3	979	1500	1-Octen-3-ol	-	0.500±0.005	-
4	1050	-	3-Octanol	-	0.60±0.01	-
5	1029	1335	6-Metil-5-hepten-2-ona	1.5±0.2	1.2±0.03	1.0±0.1
6	1035	1201	Limoneno	5.2±0.5	7.5±0.7	8±1
7	1038	1208	1,8-Cineol	3.1±0.3	3.21±0.01	2.9±0.9
8	1048	1300	<i>trans</i> - $\beta$ -Ocimeno	0.7±0.5	1.1±0.7	0.42±0.04
9	1075	-	<i>trans</i> -4-Tujanol	0.9±0.2	0.7±0.1	0.7±0.1
10	1092	-	Compuesto oxigenado, C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> (N.I)	-	0.1±0.2	-
11	1101	1542	Linalol	1.0±0.2	1.2±0.01	1.1±0.3
12	1105	-	<i>cis</i> -4-Tujanol + nonanal	-	-	0.4±0.2
13	1112	-	N.I.	0.2±0.4	0.7±0.1	0.8±0.2
14	1138	1448	<i>cis</i> -Óxido de limoneno	1.4±1.0	0.60±0.01	0.6±0.1
15	1143	1460	<i>trans</i> -Óxido de limoneno	0.8±0.6	0.5±0.4	0.4±0.1
16	1144	-	Compuesto oxigenado, C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O (N.I)	0.47±0.01	0.81±0.30	0.9±0.1
17	1154	1510	Fotocitral A	1.5±0.2	2.1±0.3	2.12±0.04
18	1163	-	<i>trans</i> -Verbenol	-	0.6±0.3	1.3±0.5
19	1172	1603	Epóxido de rosafurano	0.8±0.6	0.6±0.1	0.7±0.2
20	1182	1571	<i>trans</i> -Isocitral	-	1.3±0.4	2.0±0.6
21	1202	1700	$\alpha$ -Terpineol	1.23±0.05	1.1±0.1	0.9±0.2
22	1231	1819	Nerol	1.1±0.6	1.5±0.3	0.9±0.2
23	1248	1690	Neral	20.4±0.7	25±1	23±2
24	1257	1901	Geraniol	0.6±0.9	0.8±0.1	0.7±0.1
25	-	-	Piperitona	0.2±0.1	0.3±0.1	-
26	1278	1741	Geranial	25.8±0.8	29.2±0.7	27±1
27	1359	-	Ácido geránico	1.±2.0	2±1.1	-
28	1377	1757	Acetato de geranilo	5.4±1.3	3±1.0	2.9±0.7
29	1385	1499	$\alpha$ -Copaeno	1.0±0.6	0.47±0.02	0.6±0.2
30	1394	1527	$\beta$ -Bourboneno	0.7±0.3	0.5±0.1	0.7±0.2
31	1433	1609	<i>trans</i> - $\beta$ -Cariofileno	4±1.5	1.3±0.2	4.0±1.7
32	1433	-	$\alpha$ -Cedreno	-	-	-
32	1441	2184	$\beta$ -Cedreno	0.3±0.2	-	-
32	1441	-	$\beta$ -Copaeno	-	-	-
33	1469	1819	Propanoato de nerilo	0.4±0.3	0.30±0.03	0.5±0.3
33	1469	-	$\alpha$ -Humuleno	-	-	-
34	1473	1606	<i>allo</i> -Aromadendreno	0.5±0.4	0.30±0.01	0.2±0.4
35	1487	1780	<i>ar</i> -Curcumeno	4±2.3	2.0±0.4	3±1.8

Continuación **Tabla 18.**

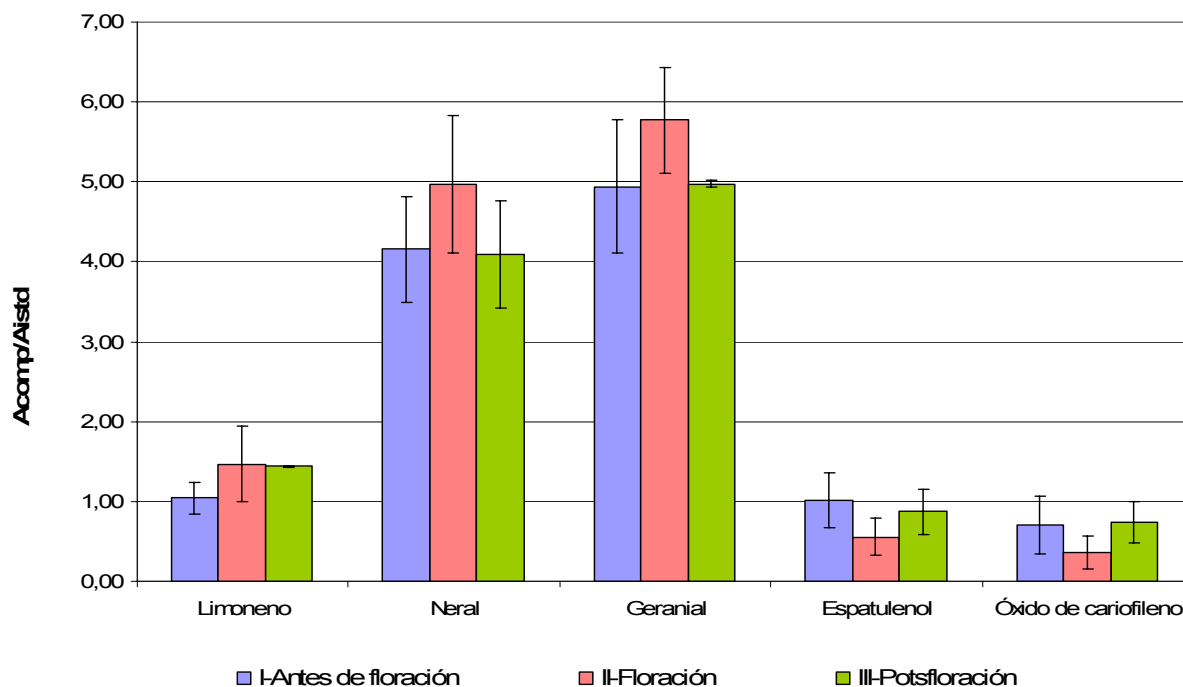
36	1514	1746	$\beta$ -Curcumeno*	0.5±0.4	-	-
37	1528	-	10- <i>epi</i> -Cubebol*	0.6±0.5	0.44±0.05	0.4±0.6
38	1567	2037	<i>trans</i> -Nerolidol	0.6±0.3	1.1±0.4	2±1.1
39	1586	2211	<i>ar</i> -Turmerol	0.2±0.1	-	0.6±0.2
40	1596	2140	Espatulenol	5±1.8	2.8±0.4	4.6±1.3
41	1601	2007	Óxido de cariofileno	3.5±0.8	1.8±0.5	4.0±2.0
42	1646	2161	Sesquiterpeno oxigenado, C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O (N.I.)	1.0±0.7	0.27±0.02	-
43	1655	2184	<i>epi</i> - $\alpha$ -Cadinol	1±1.1	0.3±0.1	0.4±0.5
44	1740	-	Sesquiterpeno oxigenado, C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub> (N.I.)	0.4±0.1	0.4±0.3	0.3±0.1
45	1752	-	Oplopanona	0.3±0.1	-	-

Clasificación por grupos de componentes	Cantidad relativa, % (etapa)		
	I	II	III
<b>HM:</b> Hidrocarburos monoterpénicos	6.3	9.9	9.6
<b>MO:</b> Monoterpenos oxigenados	64.2	72	68.5
- <b>Óxidos</b>	3.0	1.7	1.6
- <b>Alcoholes</b>	8.1	9.2	9.0
- <b>Aldehídos</b>	47.7	57.9	54.1
- <b>Ésteres</b>	5.4	3.2	2.9
<b>HS:</b> Hidrocarburos sesquiterpénicos	10.3	4.6	8.9
<b>SO:</b> Sesquiterpenos oxigenados	12.5	7.4	12.1
<b>Otros</b>	3.1	3.9	1.0

I- Antes de floración, 3 meses; II- En floración, 4 ½ meses; III- Postfloración, 7 meses; I<sub>k</sub><sup>a</sup> Índice de kovàts determinados experimentalmente; \* Identificación tentativa; N.I. No identificado.

Se identificaron 43 constituyentes en el AE (>0.2%), correspondientes al 92% de compuestos positivamente identificados del total del aceite. El geranial, neral y limoneno se encontraron como los componentes mayoritarios, se observó también un aumento del 1,8-cineol, con respecto al aceite, obtenido de las plantas cultivadas en la parcela N° 10.

**Figura 45.** Relación de “Área del compuesto/Área del estándar interno”, en cromatograma, de los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales de *Aloysia triphylla*, cultivada en Bolívar, Santander.



**Tabla 19.** Cantidad relativa (%) de los principales componentes presentes en los aceites esenciales de *Aloysia triphylla*, cultivadas en las parcelas N° 33, 2 y 26, Bolívar, Santander.

N°	Ik <sup>a</sup>		Compuesto	Cantidad relativa, % (N° Parcela) (n=2)			
	DB-5MS	DB-WAX		33		2	26
				I	II		
1	933	1018	$\alpha$ - Pineno	0.3±0.1	-	-	0.31
2	975	1039	Sabineno	0.7±0.2	0.58	0.4±0.1	0.75
3	979	1500	1-Octen-3-ol	-	-	0.38±0.02	0.32
4	1050	-	3-Octanol	0.6±0.3	-	0.3±0.1	0.35
5	1029	1335	6-Metil-5-hepten-2-ona	0.7±0.15	-	0.6±0.3	0.27
6	1035	1201	Limoneno	8.2±0.5	6.37	4.9±0.1	7.2
7	1038	1208	1,8-Cineol	2.8±0.3	0.45	2.036±0.004	1.6

Continuación **Tabla 19.**

8	1048	1300	<i>trans</i> - $\beta$ -Ocimeno	-	1.34	0.39 $\pm$ 0.05	0.26
9	1075	-	<i>trans</i> -4-Tujanol	0.6 $\pm$ 0.2	-	0.5 $\pm$ 0.2	0.37
10	1092	-	Compuesto oxigenado, C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> (N.I.)	-	0.47	0.24 $\pm$ 0.02	-
11	1101	1542	Linalol	0.9 $\pm$ 0.2	0.69	0.95 $\pm$ 0.35	0.74
12	1105	-	<i>cis</i> -4-Tujanol	-	0.37	0.9 $\pm$ 0.9	-
13	1112	-	Nonanal N.I.	0.3 $\pm$ 0.5	0.75	0.8 $\pm$ 0.1	0.94
14	1138	1448	<i>cis</i> -Óxido de limoneno	1.4 $\pm$ 0.3	-	0.6 $\pm$ 0.1	0.51
15	1143	1460	<i>trans</i> -Óxido de limoneno	0.8 $\pm$ 0.4	1.29	0.3 $\pm$ 0.2	0.33
16	1144	-	Compuesto oxigenado, C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O (N.I.)	0.4 $\pm$ 0.5	-	0.9 $\pm$ 0.7	0.82
17	1154	1510	Fotocitral A	1.3 $\pm$ 0.3	1.80	2.0 $\pm$ 0.9	2.01
18	1163	-	<i>trans</i> -Verbenol	0.7 $\pm$ 0.3	1.76	1.8 $\pm$ 0.4	1.25
19	1172	1603	Epóxido de rosafurano	0.3 $\pm$ 0.1	0.43	0.6 $\pm$ 0.2	0.35
20	1182	1571	<i>trans</i> -Isocitral	1.2 $\pm$ 0.4	2.30	2.0 $\pm$ 0.9	1.72
21	1202	1700	$\alpha$ -Terpineol	1.0 $\pm$ 0.3	-	1.2 $\pm$ 0.5	0.60
22	1231	1819	Nerol	1.3 $\pm$ 0.9	1.30	0.47 $\pm$ 0.05	2.19
23	1248	1690	Neral	20 $\pm$ 1.4	15.6	20 $\pm$ 1.2	17.7
24	1257	1901	Geraniol	1.1 $\pm$ 0.2	0.60	1.0 $\pm$ 0.3	1.02
26	1278	1741	Geranial	24 $\pm$ 1.7	21.6	25 $\pm$ 2	22.9
27	1286	-	Isopiperitona	1.3 $\pm$ 0.2	-	-	-
28	1339	-	6-Hidroxi- carvotanacetona*	2.7 $\pm$ 0.2	-	-	-
29	1359	-	Ácido geránico	3.1 $\pm$ 0.7	-	-	1.47
30	1377	1757	Acetato de geraniol	5.0 $\pm$ 1.6	3.76	2.50 $\pm$ 0.01	3.09
31	1385	1499	$\alpha$ -Copaeno	0.7 $\pm$ 0.1	1.19	1.0 $\pm$ 0.7	0.73
32	1394	1527	$\beta$ -Bourboneno	1.0 $\pm$ 0.1	1.85	1.0 $\pm$ 0.6	1.22
33	1433	1609	<i>trans</i> - $\beta$ -Cariofileno	0.9 $\pm$ 0.3	3.44	2.2 $\pm$ 1.6	1.43
34	1441	2184	$\alpha$ -Cedreno	-	-	-	-
	1441	-	$\beta$ -Cedreno	0.6 $\pm$ 0.3	0.61	0.4 $\pm$ 0.3	0.47
	1441	-	$\beta$ -Copaeno	-	-	-	-
35	1469	1819	Propanoato de nerilo	-	0.62	0.3 $\pm$ 0.4	0.39
	1469	-	$\alpha$ -Humuleno	-	-	-	-
36	1473	1606	<i>allo</i> -aromadendreno	0.50 $\pm$ 0.03	0.77	0.6 $\pm$ 0.4	0.56
37	1487	1780	<i>ar</i> -Curcumeno	3.9 $\pm$ 1.0	4.98	5 $\pm$ 2.0	4.78
38	1514	1746	$\beta$ -Curcumeno*	-	0.65	-	-
39	1528	-	10- <i>epi</i> -Cubebol*	0.7 $\pm$ 0.1	1.29	5 $\pm$ 1.6	1.18
40	1567	2037	<i>trans</i> -Nerolidol	1.5 $\pm$ 0.6	2.97	3 $\pm$ 1.5	2.35
41	1586	2211	<i>ar</i> -Turmerol	0.44 $\pm$ 0.21	0.80	0.9 $\pm$ 0.3	1.00
42	1596	2140	Espatuleno	5 $\pm$ 1.1	7.80	6 $\pm$ 1.2	7.20
43	1601	2007	Óxido de cariofileno	5 $\pm$ 1.3	6.44	4 $\pm$ 1.9	7.13
44	1646	2161	Sesquiterpeno oxigenado, (N.I.)	-	1.07	-	0.60
			C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O				
45	1655	2184	<i>epi</i> - $\alpha$ -Cadinol	0.4 $\pm$ 0.1	0.85	0.23 $\pm$ 0.03	0.84

Continuación **Tabla 19.**

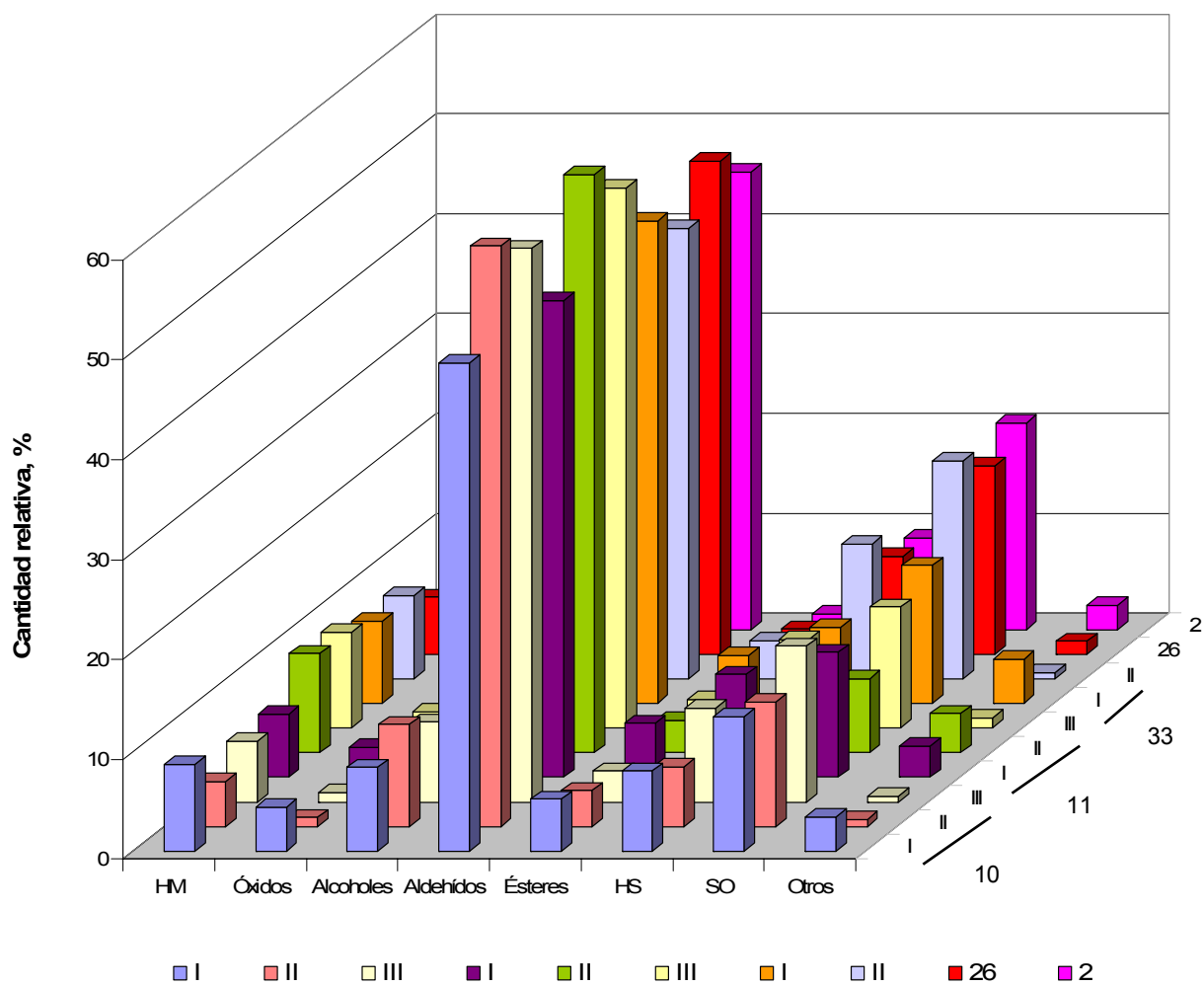
Clasificación por grupos de componentes	Cantidad relativa, %			
	33			
	I	II	2	26
<b>HM:</b> Hidrocarburos monoterpénicos	8.2	8.3	5.7	8.5
<b>MO:</b> Monoterpenos oxigenados	64.4	52	61.5	54.8
- <b>Óxidos</b>	2.5	1.7	1.7	1.2
- <b>Alcoholes</b>	8.8	5.2	8.9	7.7
- <b>Aldehídos</b>	48.3	41.3	48.4	44.3
- <b>Ésteres</b>	4.8	3.8	2.5	1.6
<b>HS:</b> Hidrocarburos sesquiterpénicos	7.6	13.5	9.8	9.2
<b>SO:</b> Sesquiterpenos oxigenados	13.8	21.8	18.9	20.7
<b>Otros</b>	4.4	4.2	1.3	3.2

I- En floración, 4 ½ meses; II- Posfloración, 7 ½ meses; N.I No identificado; \* Identificación tentativa; I<sub>K</sub><sup>a</sup> Índices de Kovàts experimentales.

Diferentes composiciones del aceite de *A. triphylla* han sido reportadas en varios estudios. En el aceite proveniente de Chile [26] se encontraron el geranial (23%), neral (17%), limoneno (13%); en el aceite esencial de Marruecos fueron identificados 61 compuestos, mayoritario el 1,8-cineol (12%), seguido de geranial y neral (Bellakhdar *et al.*, 1993) [25]; En el aceite de Turquía, el mayor componente fue el limoneno (15%), geranial (12%) y 1,8-cineol (7%) (Ozek *et al.*, 1996) [23]. En otros estudios reportaron al citral (geranial y neral) en más alta cantidad, que el limoneno (Carnat *et al.*, 1999) [6]; (Kim *et al.*, 2004) [21], mientras que Zygadlo *et al.* en Brasil (1994) [24] detectaron en el aceite de *A. triphylla* la mircenona,  $\alpha$ -tujona como los componentes mayoritarios, con un contenido de limoneno y citral bajo. Estos resultados difieren con los obtenidos en la presente investigación, en la que no se detectaron la presencia de *p*-cimeno y timol, mencionados en otros estudios (Kim *et al.* [21]; Zygadlo *et al.* [24]). Esto demuestra que los componentes del aceite esencial de *A. triphylla*, varían de un lugar a otro, *i.e.* dependen del origen del cultivo (Bellakhdar *et al.* [25]). Todas estas variaciones en la composición química hacen que no se tenga un estándar de calidad definido para el AE, si no que dependa de su origen.

En la **Figura 46**, se aprecia la distribución de los compuestos por grupos de familias, presentes en los AE de plantas de *Aloysia triphylla*, en diferentes estados de desarrollo, cultivadas en Bolívar, Santander.

**Figura 46.** Contenido de las fracciones presentes en los aceites esenciales de *Aloysia triphylla*, cultivadas en las cinco parcelas experimentales en Bolívar, Santander.



I-Parcela 10, antes de floración	I-Parcela 11, antes de floración	I-Parcela 33, en floración	Parcela 26, potsfloración
II-Parcela 10, en floración	II-Parcela 11, en floración	II-Parcela 33, potsfloración	Parcela 2, potsfloración
III-Parcela 10, potsfloración	III-Parcela 11, potsfloración	-	-

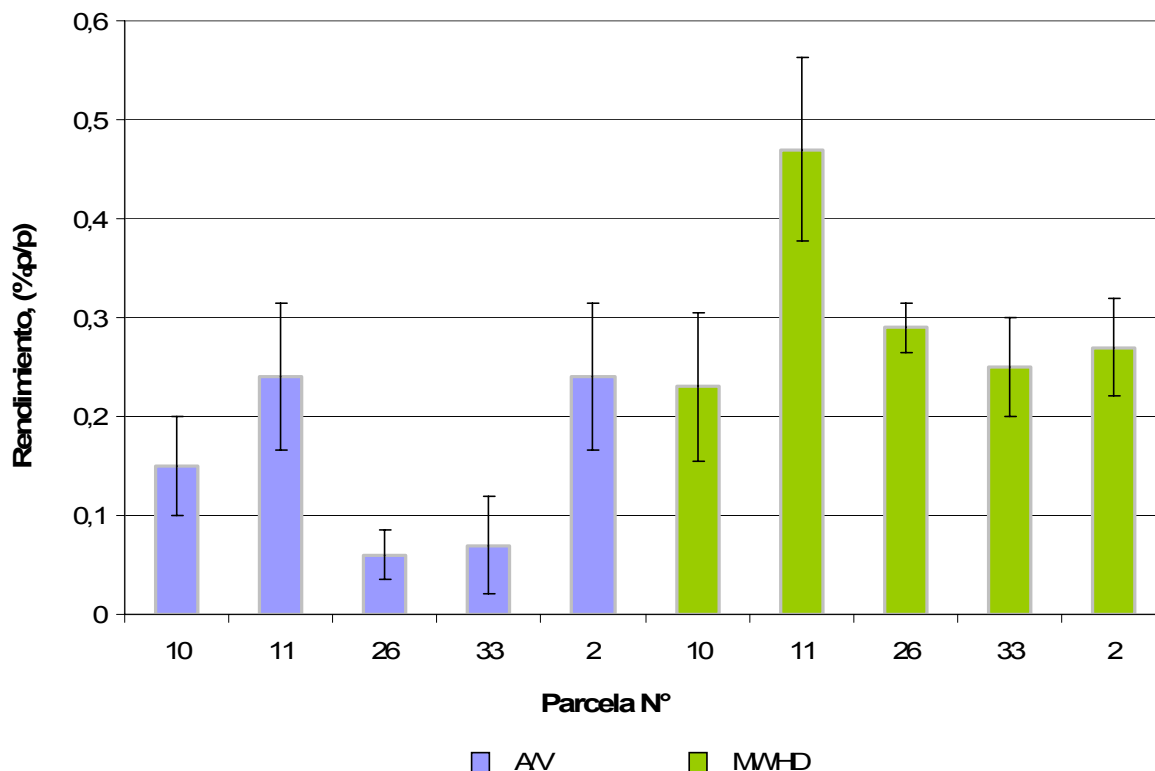
El aumento de los MO en el AE de *Aloysia triphylla*, está acompañado de una disminución en el contenido de SO y HS. El nivel de la fracción MO, se incrementa de 66,9 a 72,8% y de 64,2 a 72%, en correlación inversa con los niveles de SO, los cuales disminuyen de 13,5 a 12,5% y de 12,5 a 7,4% (antes y durante floración), para las parcelas No 10 y 11, respectivamente. Los componentes que más contribuyen a la variación en la fracción MO, son los aldehídos, neral y geranial, también está el subgrupo de alcoholes y ésteres, representados por el nerol, geraniol y acetato de geranilo, respectivamente; mientras que el óxido de cariofileno, espatulenol son los responsables del aumento en la fracción de SO y el *ar*-curcumeno en la fracción de HS. Esta misma tendencia se observa en la parcela No 33 (I y II) (**Figura 46**). Estas variaciones en la composición química del AE, permite suponer que la composición química del AE de la planta, está influenciada por el estado de desarrollo vegetativo (edad, estado de madurez).

Como es conocido, las condiciones geográficas y ecológicas pueden generar diferencias cuantitativas en la composición del AE. También existe otro tipo de factores, que pueden afectar la composición, e.g. el estado de desarrollo de la planta, la edad, el lugar de procedencia, entre otros [17, 23, 24, 80].

#### **4.7.3 Comparación del rendimiento de los aceites esenciales obtenidos por MWHD y A/V de plantas de *Aloysia triphylla*, cultivada en Bolívar (Santander).**

En la **Figura 47**, se muestran los rendimientos de los AE obtenidos empleando un destilador semi-industrial de cobre y MWHD, para cada una de las parcelas experimentales en el Municipio de Bolívar, Santander.

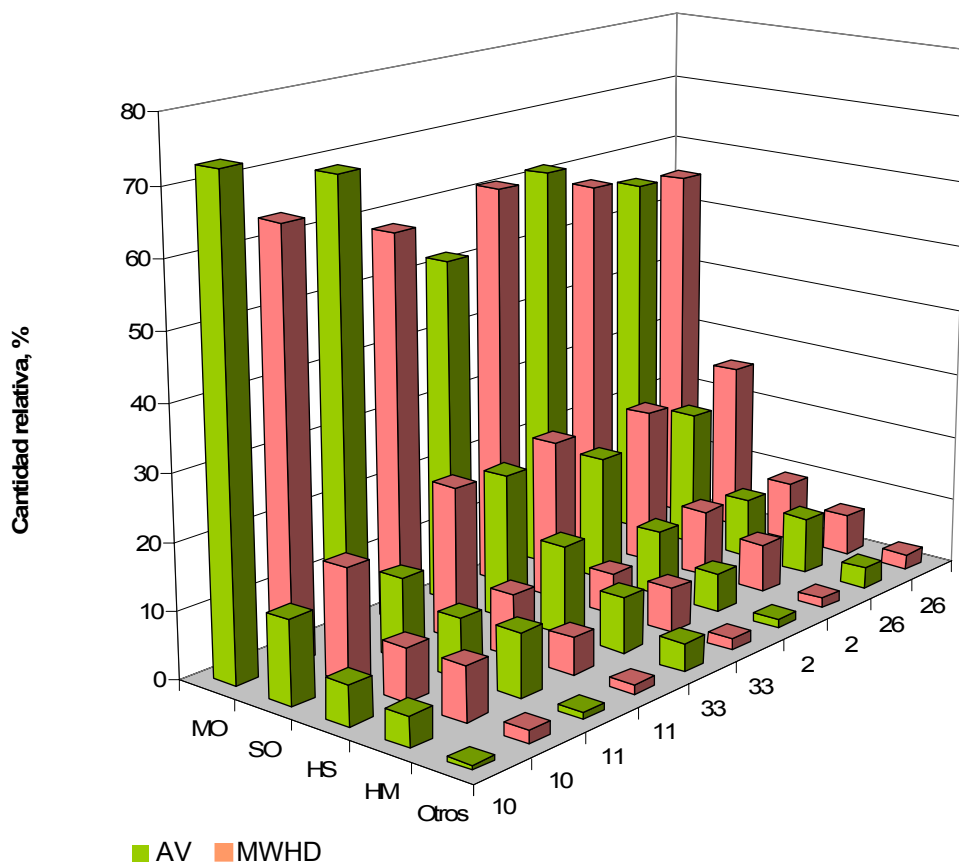
**Figura 47.** Rendimientos de aceites esenciales (% p/p), obtenidos por MWHD y AV, de plantas de *Aloysia triphylla* cultivadas en Bolívar, Santander.



El rendimiento más alto de AE, se logró con la técnica MWHD. Este método presenta ventajas en cuanto al tiempo de destilación, en comparación con la destilación con agua/vapor, siendo ésta, la más utilizada a nivel industrial, por ser una técnica sencilla, económica y que permite manejar volúmenes grandes del material vegetal. Las diferencias en los rendimientos, se deben, probablemente, a que la energía suministrada por la radiación de microondas es mayor en comparación con la del destilador de cobre; además la ebullición del agua se logra en un tiempo mucho más corto, que por convección del agua. Cabe resaltar que las comparaciones se realizaron para plantas cultivadas bajo las mismas condiciones, las mismas parcelas y para el mismo tiempo de corte; siendo la única variable el método usado en su extracción.

En la **Figura 48**, se muestra la distribución por familia de compuestos de los AE aislados por los métodos de MWHD y A/V, de plantas cultivadas en Bolívar, Santander.

**Figura 48.** Distribución por familias de los compuestos presentes en los aceites esenciales de *Aloysia triphylla*, cultivada en Bolívar, Santander.



En general, los metabolitos secundarios volátiles de los AE de *A. triphylla*, aislados por MWHD y A/V, fueron similares entre si. Se observa, que la familia de MO en los AE aislados por el método de agua/vapor, se presentan en mayor proporción, en comparación con la de los AE obtenidos por MWHD, contrario a lo que sucede con los SO, los cuales se extraen en mayor cantidad, empleando esta última técnica. Esta variación, posiblemente se debe a que la energía suministrada al

material vegetal, es mayor en MWHD comparado con la del destilador, lo que explica que los sesquiterpenos oxigenados se obtengan en mayor cantidad por MWHD. Los porcentajes de HS y HM, no varían, *i.e.* se encuentran en igual proporción en los AE extraídos por ambos métodos.

En la **Tabla 20**, se muestra la producción de aceite esencial para las parcelas N° 10, 11 y 26, de Bolívar (Santander).

**Tabla 20.** Producción de aceite esencial por hectárea, para algunas parcelas representativas de Bolívar, Santander.

Vereda	N° parcela	Edad de la planta (meses)	N° plantas	Peso hojas secas (kg)	Plantas/ha	Peso hojas secas por hectárea (kg)	Rendimiento de AE (%p/p)	kg AE/ha
Loma alta	10	3	80	1.8	18517	417	0.28	146
		4 ½	104	2.5		445	0.15	83.4
		6 1/2	120	3.85		594	0.18	134
Loma alta	11	3	69	1.5	18517	402	0.30	151
		4 ½	90	1.7		349	0.16	70
		6 1/2	170	4.51		491	0.24	147
Cristales	26	9	40	1.2	18517	555	0.06	41.6
Promedio	-	-	101	2.43	18517	464	0,22	110

#### 4.7.4 ANÁLISIS DE LOS AE POR GC-MS

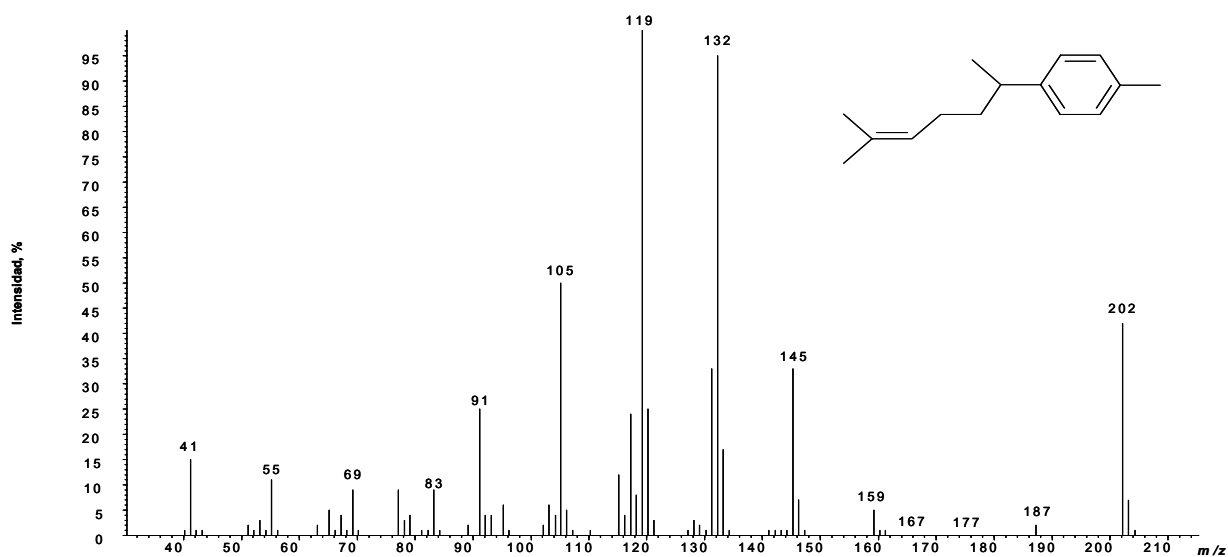
Los compuestos de los AE fueron identificados empleando índices de retención de Kovàts, calculados en columnas apolar y polar; y los espectros de masas (MS), obtenidos por impacto de electrones (70 eV), los cuales se compararon con los reportados en la literatura [81]. Las rutas de fragmentación y espectros de masas para los compuestos mayoritarios del AE *A. triphylla*, geranial, neral y limoneno, ya han sido reportados previamente [82]. A continuación, se muestran algunos

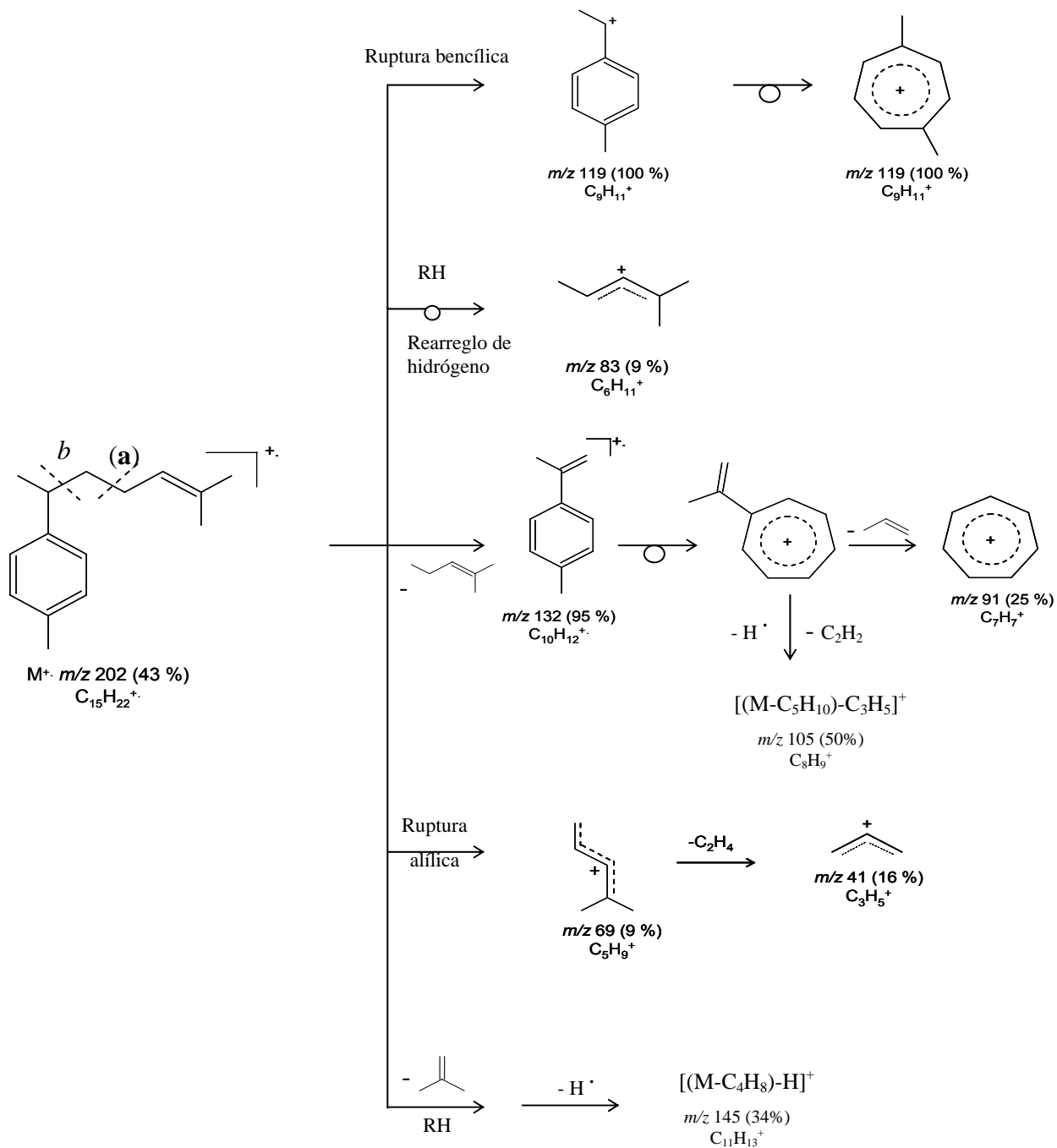
espectros de masas y rutas de fragmentación, de algunos compuestos presentes en el aceite de la especie *Aloysia triphylla*.

### ✓ *ar*-Curcumeno

En la **Figura 49** se observa el espectro de masas del *ar*-curcumeno. Las rutas de ionización disociativa del *ar*-curcumeno, se muestran en el **Esquema 2**. La ruptura bencílica a partir del ion molecular en  $m/z$  202 (44%) conduce a la formación de los iones complementarios, *i.e.*  $m/z$  en 119 (100%), pico de base, que posteriormente se reordena a ion dimetil-tropilio; y el ion en  $m/z$  83 (9%). La ruptura alílica a partir del ion, conduce a la formación del fragmento, en  $m/z$  69 (9%), el cual tras la pérdida de una molécula de etileno, da origen al catión alilo en  $m/z$  41 (16%). La ruptura (**a**) en el ion  $M^+$ , por pérdida de isopenteno, conduce a la formación del ion en  $m/z$  132 (95%). A partir de éste se generan los iones fragmento  $[(M-C_5H_{10})-C_3H_5]^+$  en  $m/z$  105 (50%) y  $C_7H_7^+$ , ion tropilio en  $m/z$  91 (25%).

**Figura 49.** Espectro de masas del *ar*-curcumeno (EI, 70 eV).





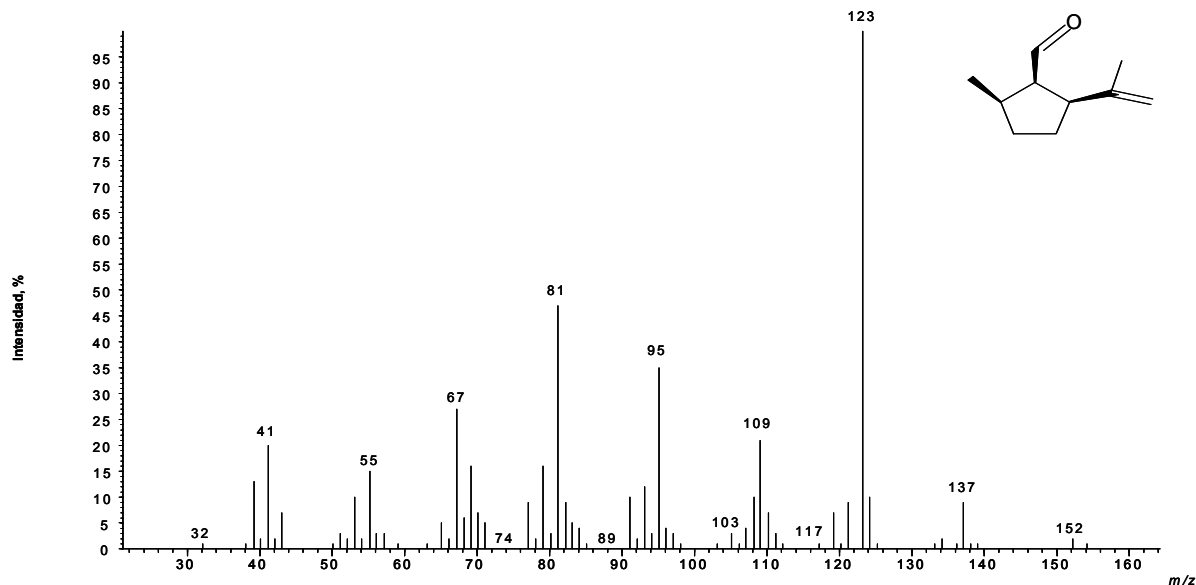
**Esquema 2.** Rutas de fragmentación del *ar*-curcumeno.

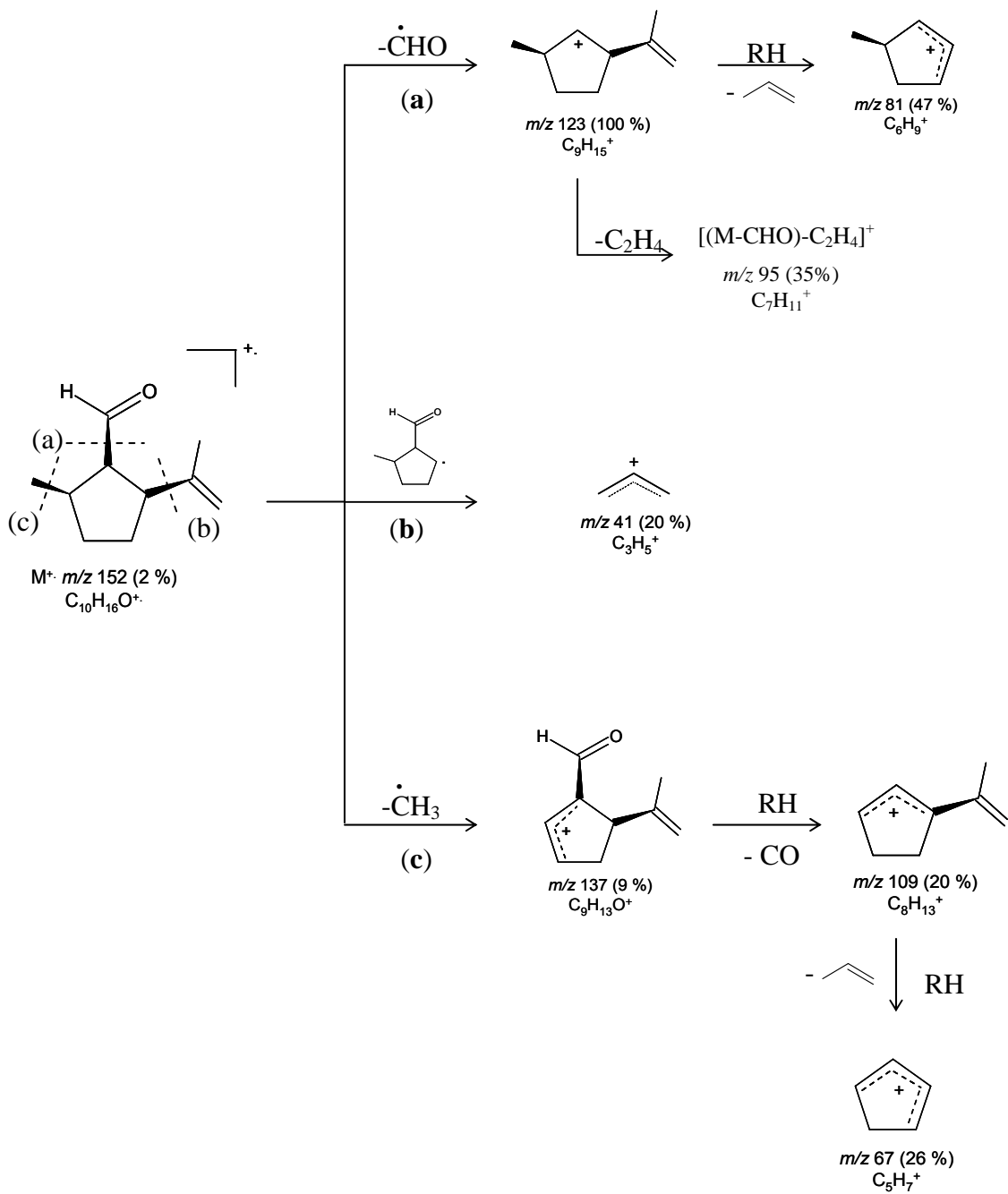
## ✓ Fotocitral A

El espectro de masas del fotocitral A, se muestra en la **Figura 50**. Las rutas de ionización disociativa, por impacto de electrones a 70 eV, se aprecian en el **Esquema 3**.

Este aldehído, presenta en su espectro de masas ion molecular en  $m/z$  152, de intensidad baja (2%). En el **Esquema 3**, se observan tres rupturas en el ion  $M^+$ , a saber; **(a)**. Conduce a la formación del ion pico de base  $C_9H_{15}^+$  en  $m/z$  123 (100%); el cual por la pérdida de una molécula de etileno, y un rearrreglo de hidrógeno (RH), genera el ion  $C_7H_{11}^+$  en  $m/z$  95 (35%) y el ion  $C_6H_9^+$  en  $m/z$  81 (47%), respectivamente; **(b)**. Conduce a la formación del catión alílico  $C_3H_5^+$  en  $m/z$  41 (20%); **(c)**. La salida de un metilo del ion molecular, genera el fragmento  $C_9H_{13}O^+$  en  $m/z$  137 (9%), que posteriormente por pérdida de CO genera el ion  $C_8H_{13}^+$ , en  $m/z$  109 (20%). A partir de éste, se forma el ion  $C_5H_7^+$ , en  $m/z$  67 (26%).

**Figura 50.** Espectro de masas del Fotocitral A (EI, 70eV).





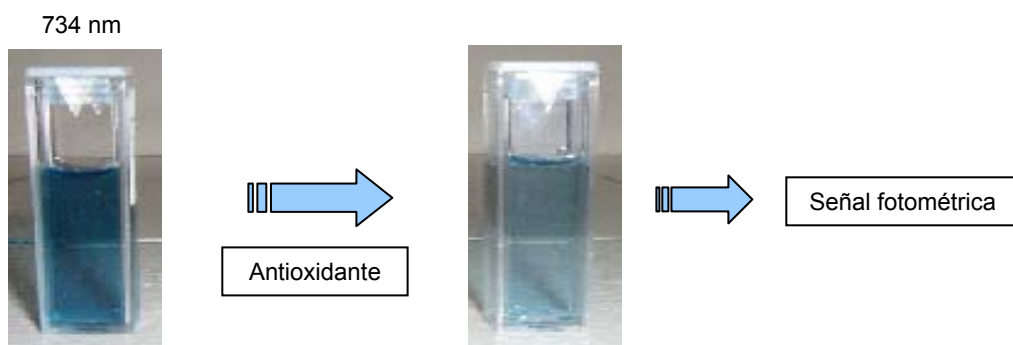
**Esquema 3.** Rutas de fragmentación del Fotocitral A.

#### 4.7.5 Determinación de la capacidad antioxidante del aceite esencial, usando el método de decoloración del catión-radical ABTS<sup>+</sup>.

La capacidad antioxidante del AE de *Aloysia triphylla*, se evaluó, mediante el método de decoloración del catión-radical 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), **ABTS<sup>+</sup>**. La capacidad del AE de “secuestrar” radicales se comparó con la de los antioxidantes de referencia, *i.e.* la vitamina E, BHA, BHT y Trolox<sup>®</sup>.

En la **Figura 51**, se observa un esquema general de reacción para estimar la capacidad antioxidante (secuestro de radicales) utilizando compuestos cromóforos *i.e.* catión-radical ABTS<sup>+</sup>. La disminución en la absorbancia se ve reflejada en un cambio en la coloración después de transcurrido un tiempo. El AE, que es una mezcla compleja que puede contener más de 200 componentes, produce una disminución más o menos rápida de la absorbancia, que irá reduciéndose, hasta estabilizarse, al ir convirtiendo el radical ABTS<sup>+</sup> en ABTS (incoloro).

**Figura 51.** Esquema de reacción del ABTS<sup>+</sup> con un antioxidante.



En la **Tabla 21**, se observan los valores obtenidos de la capacidad equivalente al Trolox<sup>®</sup> (TEAC) y actividad antioxidante total (ATT), para sustancias antioxidantes de referencia, tales como la vitamina E, BHA, BHT y el AE de *Aloysia triphylla*. Para que una sustancia sea considerada buen antioxidante, ésta debe tener un TEAC mayor que 1. En la **Figura 52**, se muestra la capacidad antioxidante de cada sustancia expresada como TAA.

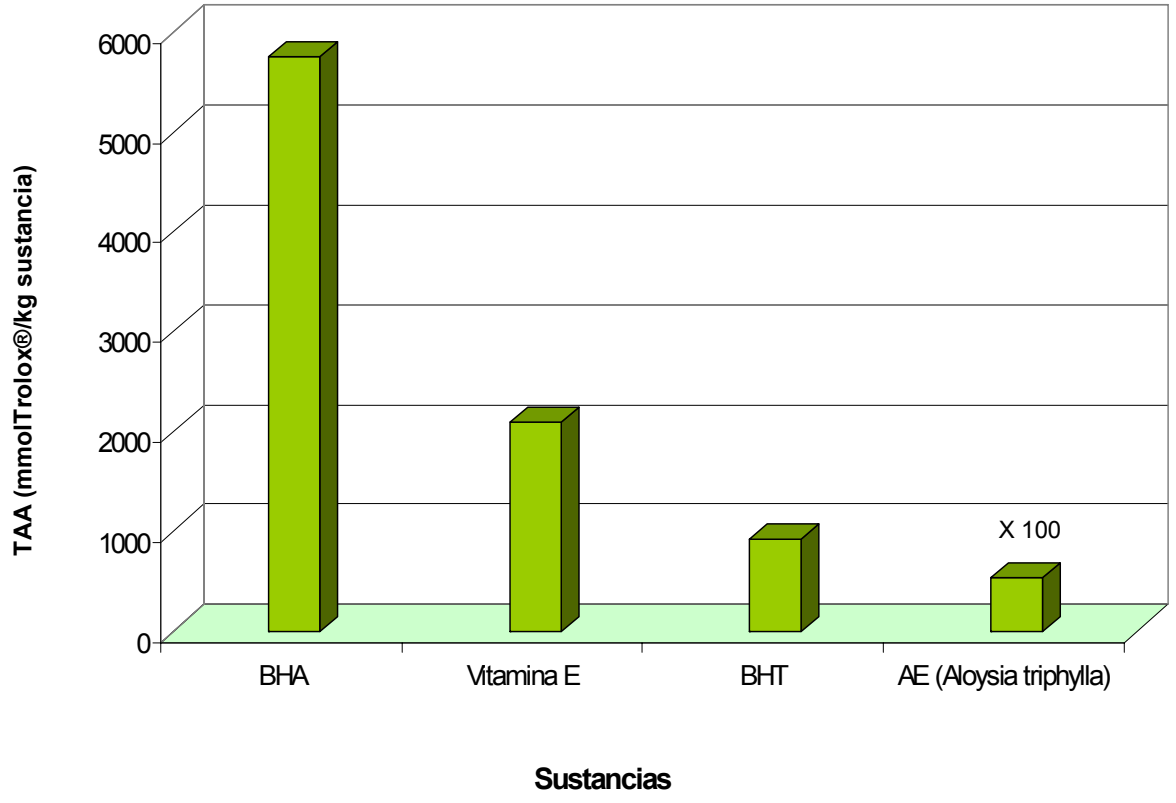
**Tabla 21.** Capacidad de atrapar radicales del aceite de *Aloysia triphylla* y sustancias de referencia.

Sustancia	TEAC* (mM Trolox/mM sustancia)	TAA* (mmol Trolox <sup>®</sup> /kg sustancia)
BHA	1.04±0.0002	5800±177
BHT	0.20±0.0004	930±35
Vitamina E ( $\alpha$ -Tocoferol)	0.90±0.0002	2100±61
<i>Aloysia triphylla</i>	-	5.3±0.3

\* Tres replicas.

El aceite esencial de *Aloysia triphylla* mostró tener una baja capacidad para reducir el catión-radical **ABTS<sup>+</sup>** (Véase **Figura 52**), en comparación con la de sustancias sintéticas de referencia, que se usan como antioxidantes en la industria de alimentos.

**Figura 52.** Comparación de las actividades antioxidantes (TAA), del aceite esencial de *Aloysia triphylla* y sustancias de referencia.



## 5. CONCLUSIONES

- Los componentes de los aceites esenciales fueron identificados con base en sus índices de Kovàts, en columnas polar y apolar, espectros de masas (EI, 70 eV) y por comparación con patrones certificados.
- Se detectaron en los aceites estudiados 42 compuestos en cantidades relativas > 0.2%, de los cuales 92.5% fueron identificados positivamente.
- El geranial, neral, limoneno, óxido de cariofileno y espatulenol fueron los compuestos mayoritarios para todos los AE de *A. triphylla*, los cuales presentan variación en su cantidad relativa, de acuerdo con el estado fenológico y origen geográfico de la planta; igualmente el rendimiento en la producción de AE fue influenciado por estos factores, lo que se resume en la Tabla, que a continuación se presenta:

Compuestos mayoritarios	Cantidad relativa, %										
	Antioquia (Lotes)					Bolívar, Santander (N° Parcelas)					Cundinamarca
	L1	L2	L3f	L3	L4	10	11	26	33	2	
Limoneno	7.86	6.09	6.78	7.46	7.09	6.7	4.4	5.2	5.5	5.4	9.3
Neral	15.8	8.1	12.7	14.7	16.2	20	19.0	18	17	19	15.1
Geranial	18.7	11.8	17.6	20.3	21,4	24.7	23.8	22	21	23	17.0
Espatulenol	4.17	8.59	5.00	5.0	4.93	7.0	8.2	10.1	9	7.3	6.1
Óxido de cariofileno	1.77	5.22	2.13	2.13	2.15	5.0	5.3	7.1	6.2	6.7	4.2
<b>Rendimiento (%p/p)</b>	0.29	0.44	0.34	0.85	0.63	0.23	0.47	0.25	0.20	0.27	0.46

L1: Lote Antioquia, en floración; L2: Lote Antioquia, potsfloración; L3f: Lote Antioquia, antes de floración, hojas frescas, L3: Lote Antioquia, antes de floración, L4: Lote Antioquia, antes de floración.

- Para todas las regiones estudiadas, las plantas presentaron mayores contenidos de geranial y neral antes de floración; a medida que las plantas alcanzan un mayor estado fenológico y madurez, se produce un aumento en el contenido de sesquiterpenos (óxido de cariofileno y espatulenol) en el AE.
- El rendimiento del AE está influenciado por el estado fenológico de las plantas. La mayor cantidad de AE se presentó antes y después de la floración.
- Las mejores plantas estudiadas en el proyecto, en cuanto a producción de biomasa y contenido de AE, fueron aquellas que se desarrollaron en parcelas a 2200 – 2600 m.s.n.m (Bolívar, Santander), obteniéndose los mejores resultados para las plantas cultivadas a 2200 m de altitud.
- El rendimiento y contenido de los compuestos mayoritarios del AE de *A. triphylla* varían con el método de extracción. Se obtiene mayor contenido de AE y sesquiterpenos, usando MWHD, y un rendimiento más bajo con destilación con agua/vapor (A/V); sin embargo, esta última técnica permite obtener más monoterpenos oxigenados (citrál).
- El aceite esencial de *A. triphylla*, presentó muy baja capacidad de atrapamiento de radicales, medida en la prueba de decoloración del catión-radical ABTS<sup>+</sup>, en comparación con las sustancias antioxidantes estándar, como la vitamina E, BHA y BHT, aunque otros resultados, han demostrado que la infusión tiene una potente actividad contra el radical superóxido, pero moderada contra el radical hidroxilo.

## 6. RECOMENDACIONES

- El rendimiento y composición química del AE de *A. triphylla*, está condicionado por factores como la edad y el estado vegetativo, lo que permite determinar el momento idóneo para su cosecha. Para conseguir una mayor acumulación de citral (geranial y neral) es necesario que la planta haya alcanzado un nivel de maduración y desarrollo vegetativo apropiado, es decir, aproximadamente, 3- 4 meses después de la siembra.
- Según los resultados obtenidos en la presente investigación, la mayor producción de biomasa y AE se presentó en plantas que se desarrollaron entre 2000 y 2600 m.s.n.m (Bolívar, Santander); por lo que se recomienda este rango de altitud para su cultivo.
- Se necesita profundizar más en el estudio de otras variables o factores que afectan el rendimiento y producción del aceite esencial de *A. triphylla*, e.g. manejo agronómico, de esta forma, ofrecer un producto de alta calidad, con buen rendimiento de aceite, económicamente viable.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. ESPINOZA, H. J., BRUGUERAS, M. Vitaminas y minerales contra el estrés. *Rev. Cubana. Farm.* **2001**, 35(1), p.p. 74-78.
2. MUÑOZ, L. F. Plantas medicinales y aromáticas; estudio, cultivo y procesado. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, 4<sup>a</sup> Ed, **2002**, p.p. 175-179.
3. POMILIO, A. B.; SELDES, A. M.; BURTÓN, G. Introducción al estudio de los productos naturales. Monografías OEA. Washington, D.C., **1985**, 54(30), p.p. 1-3.
4. BANDONI, A. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. 1<sup>a</sup> Ed, Editorial U. Nacional de la Plata, La Plata, **2000**. p.p. 13 – 42.
5. GARCÍA, B. H. Flora medicinal de Colombia. 2<sup>a</sup> Ed. Tercer Mundo. Bogotá, **1992**. p.p. 495-496.
6. CARNAT, A.; CARNAT, A. P.; FRAISSE, D.; LAMAISSON, J. L. The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea., *Fitoter.*, **1999**, 70(1), p.p. 44-49.
7. OHNO, T.; KITA, M.; YAMAOKA, Y. Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, **2003**, 8(3), p.p. 207-215.

8. LÓPEZ, A. G.; THEUMER, M. G.; ZYGADLO, J. A.; RUBISTEIN, H. R. Aromatic plants essential oils activity on *Fusarium verticillioides* Fumonisin B<sub>1</sub> production in corn grain. *Mycopathol.*, **2004**, 158 (3), p.p. 343-349.
9. SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L.; DELARMELENA, C.; FIGUEIRA, G. M. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz. J. Microbol.*, **2004**, 35 (4), p.p. 275-280.
10. TEIXEIRA, M. C.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *J. Ethnopharm.*, **2005**, 97 (2), p.p.305-311.
11. DEMO, M.; OLIVA, M.; LÓPEZ, M.; ZYGADLO, J. Antimicrobial activity of essential oils obtained from aromatic plants of Argentina. *Pharm. Biol.*, **2005**, 43 (2), p.p. 123-134.
12. NAKAMURA, T.; OKUYAMA, E.; TSUKADA, A.; YAMAZAKI, M. Acteoside as the analgesic principle of Cedron (*Lippia triphylla*), a Peruvian medicinal plant. *Chem. Pharm. Bull.*, **1997**, 45(3), p.p. 499-504.
13. DUSCHATZKY, C.; MARTINEZ, A.; ALMEIDA, N. Nematicidal activity of the essential oils of several Argentina plants against the root-knot nematode. *J. Essent. Oil Res.*, **2004**, 16 (6), p.p. 626-628.
14. RICCIARDI, G. A.; RICCIARDI, A. Fitoquímica de verbenáceas (*Lippias* y *Aloysias*) del nordeste Argentino. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*. Universidad Nacional del Nordeste, corrientes, **2000**.

Disponible:[http://www.plantasmedicinales.org/archivos/fitoquimica\\_verbenaceas.pdf?AHPSESSID=b4c695e892357b4ecf07948ecb39610](http://www.plantasmedicinales.org/archivos/fitoquimica_verbenaceas.pdf?AHPSESSID=b4c695e892357b4ecf07948ecb39610). Consultado: 03/03/2007.

15. VALENTAO, P.; FERNÁNDEZ, E.; CARVALHO, F.; ANDRADE, P. Studies on the antioxidant activity of *Lippia citriodora* infusion: Scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *Biol. Pharm. Bull*, **2002**, 25 (10), p.p. 1324-1327.
16. ARCILA, C.; PIÑA, G. Lecom, U.S. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *ALAN Mar*, **2004**, 54 (1), p.p. 100-111.
17. STASHENKO, E. E.; JARAMILLO, B. E. Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, **2003**, 27 (105), p.p. 579-597.
18. SANTOS-GOMEZ, P.C.; FERNANDEZ, F.M.; VICENTE, A.M.S. Composition of the essential oils from flowers and leaves of vervain *Aloysia triphylla* (L'Herit.) Britton, grown in Portugal. *J. Essent. Oil Res.*, **2005**, 17 (1), p.p. 73-78.
19. FIGUEIREDO, R.O.; STEFANINI, M. B.; MING, L. C.; FACANALI, R. Essential oil composition of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton leaves cultivated in Botucatu, São Paulo, Brazil. *Acta Hort.* (ISHS): XXVI International Horticultural Congress: The Future for Medicinal and Aromatic Plants. **2004**, 629, p.p. 131-134.  
Disponible en: [http://www.actahort.org/books/629/629\\_17.htm](http://www.actahort.org/books/629/629_17.htm).  
Consultado: 15/09/2007.

20. CRABAS, N.; MARONQUIU, B.; PIRAS, A.; PIVETTA, T. Extraction, separation and isolation of volatiles and dyes from *Calendula officinalis* and *Aloysia triphylla* (L'Her) Britton by supercritical CO<sub>2</sub>. *J. Essent. Oil Res.* **2003**.
21. KIM, N. S.; LEE, D. S. Headspace solid-phase microextraction for characterization of fragrances of lemon verbena (*Aloysia triphylla*) by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Sep. Sci.*, **2004**, 27 (1-2), p.p. 96-100.
22. LAMAISON, J. L.; PETIT JEAN-FREYTET, C.; CARNAT, A. Verbascoside, major phenolic compound of ash leaves (*Fraxinus excelsior*) and Vervain (*Aloysia triphylla*). *Plant Med. Phytother.* **1993**, 26 (3), p.p. 225-233
23. ÖZEK, T.; KITIMER, N.; BASER, K.H.C.; TUMEN, G. Composition of the essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton grown in Turkey. *J. Essent. Oil Res.*, **1996**, 8 (5), p.p. 581 – 583.
24. ZYGADLO, J. A., LAMARQUE, A.L., MAESTRI, D. M. Volatile constituents of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton. *J. Essen. Oils. Res.*, **1994**, 6, p.p 407-409.
25. BELLAKHDAR, J.; IDRISSE, A.; CANIGUERAL, S. Analysis of the essential oil from odorant verbena (*Lippia* H.B. and K). *Plan. Med. Phytother*, **1993**, 26 (4), p.p. 269-273.
26. VOGEL, H.; SILVA, M. L.; RAZMILIC, I. Seasonal fluctuation of essential oil content in lemon verbena (*Aloysia triphylla*). *Acta Hort.* (ISHS): II Congress Medicinal and Aromatic Plants, part 1: Biological resources,

sustainable use, conservation and Ethnobotany. **1999**, 500, p.p. 75-80.  
Disponible: [http://www.actahort.org/books/500\\_9htm](http://www.actahort.org/books/500_9htm).

27. ARGYROPOULOU, C.; DAFERERA, D.; TARANTILIS, P. A. Chemical composition of the oil from leaves of *Lippia citriodora* H. B. K. (Verbenaceae) at two developmental stages. *Biochem. System. Ecol.* **2007**, p.p 1-7.
28. TORRES, A. M.; RICCIARDI, G. A. Evaluación de la influencia del ambiente ecológico en la composición química del aceite esencial de *Aloysia citriodora* Palau. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*. Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes, **2006**. Disponible en: [www.unne.edu.ar/web/cyt/cy2006/08-exactas/2006-E-000.htm](http://www.unne.edu.ar/web/cyt/cy2006/08-exactas/2006-E-000.htm).  
Consultado: 22/07/2002.
29. RODRIGUEZ, C. J.; FUENTES, L.; PARDO, R. Z. Estabilidad de extractos fluidos al 70 % de *Cymbopogon citratus*. *Rev. Cub. Plant. Med.*, **2003**, 8 (2), p.p. 12-15.
30. MASUDA, H.; UENO, T.; MURANISHI, S. Inhibition of citral deterioration. *ACS Symp. Ser. Free radicals in Food Chemistry, Nutrition and Health Effects*. **2002**, 807, p.p. 176-187.
31. IJIMA, Y., WANG, G., FRIDMAN, E. P. Analysis of the enzymatic formation of citral in the glands of sweet basil. *Arch. Biochem Biophys*, **2006**, 448, p.p. 141-149.
32. HALL, M.; HAUER, B.; STUERMER, R.; KROUTIL, W. Asymmetric whole-cell bioreduction of an  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehyde (citral): competing

- prim*-alcohol dehydrogenase and C-C lyase activities. *Tetrahedron*, **2006**, 17, p.p. 3058-3062.
33. LIU, R.; ZHAO, F.; FUJITA, S.; ARAN, M. Selective hydrogenation of citral with transition metal complexes in supercritical carbon dioxide. *Appl. Catal. A.*, **2007**, 316, p.p. 127-133.
34. PATO, S. N.; PARIS, J. F. Hidrogenación del citral en presencia de dicloroetileno con catalizadores de cobre. Disponible en: [www.universia.com.ar/contenidos/investigacion/unl/TECNOLOGIA/catalisis2/627.htm](http://www.universia.com.ar/contenidos/investigacion/unl/TECNOLOGIA/catalisis2/627.htm). Consultado: 03/03/2007.
35. FERNANDEZ, C.; CATRINESCU, C.; CASTILLO, P.; RUSSO, P.; CARROTT, M. Catalytic conversion of limonene over acid activated serra de Dentro (SD) bentonite. *Appl. Catal, A*, **2006**, 318, p.p. 108-120.
36. <http://es.wikipedia.org/wiki/limoneno>. Consultado: 15/07/2007.
37. ZAMORA, S. J., OTAROLA, I., BRENES, G. O. La apoptosis y su relación con diversos nutrientes. *Rev. Chil. Nutr.*, **2005**, 32 (3), p.p. 178-190.
38. MAGUNA, F. P., ROMERO, A. M., GARRO, O. A. Actividad antimicrobiana de un grupo de terpenoides. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Corrientes*. 57, **2006**.
39. <http://www.cci.org.co/publicaciones/Exotica/exotica07.html>. Consultado: 02/06/2007.

40. [http://www.copper-alembic.com/essential\\_history.php?lang=es](http://www.copper-alembic.com/essential_history.php?lang=es)  
Consultado: 02/06/2007.
41. [http://www.geocities.com/aceites\\_esenciales/historia.html](http://www.geocities.com/aceites_esenciales/historia.html)  
Consultado: 02/06/2007.
42. STASHENKO, E. E; COMBARIZA, J.; PUERTAS, M. Aceites esenciales: Técnicas de extracción y análisis. Laboratorio de Cromatografía, UIS, **1998**, 30 p.
43. Terpenos. Disponible: <http://mail.fq.edu.uy/~planta/Cursos/material/teorico%20terpenos%20para%20imprimir.pdf>. Consultado: 03/07/2007.
44. GARCÍA, D. E. Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. *Pastos y Forrajes.*, **2004**, 27 (1), p.p. 1-12.
45. Biocomercio sostenible. Estudio del mercado nacional de aceites esenciales. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos "Alexander von Humboldt", **2003**, Bogotá, Colombia, 85 p.
46. AZCÓN, J., TALÓN, M. Fundamentos de fisiología vegetal. 1ª Ed. Mc Graw-Hill Interamericana, Madrid: **2000**, 261p.
47. TAIZ, L., ZEIGER, E. Plant Physiology. 3ª Ed. Sinauer Associates Inc, Publisers. Massachusetts. **2002**, p.p. 171-192.
48. Fenilpropanos.  
Disponible en: <http://www.flissbis.com/aroma/fenilpropanos.html>.  
Consultado: 03/07/2007

49. Programa Nacional de Biocomercio Sostenible. Breve *scan* de Mercado para aceites esenciales. **2005**, 46 p. Disponible en: [www.biocomerciobolivia.org.bo/sacfan/public/LST\\_MERCADOS\\_11\\_documento](http://www.biocomerciobolivia.org.bo/sacfan/public/LST_MERCADOS_11_documento). Consultado: 07/02/2007.
50. El mercado de hierbas aromáticas y medicinales en Colombia. Bogotá, Colombia. *MARKETING & CONSULTING*, Informe, **2001**, p.p.1-32. Disponible:[http://www.ecuadorexporta.org/productos\\_down/perfil\\_de\\_hierbas\\_aromaticas](http://www.ecuadorexporta.org/productos_down/perfil_de_hierbas_aromaticas). Consultado: 07/02/2007.
51. Destilación de aceites esenciales. Disponible en: <http://www.herbotecnia.com.ar/poscosecha-esencias.html>. Fecha de consulta: 12/03/2006.
52. GÜENTHER, E. The Essential Oils. Volume I: History-Origin in plants production-Analysis. 3 Ed. Litton Educational, New York, **1948**, Vol I, p.p. 241-248.
53. KINGSTON, H. M; JASSIE, L. B. Introduction to microwave sample preparation, theory and practice. Washington: American Chemical Society. **1988**, p.p. 7-3.
54. FERHAT, M.; MEKLATI, B.; SMADJA, J.; CHEMAT, F. An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel. *J. Chromatogr. A.*, **2006**, 1112, p.p. 121-126.
55. JENNINGS, W., Analytical gas chromatography. San Diego: Academic Press, **1987**, 259 p.

56. GROB, L. Modern practice of gas chromatography. Ed. John Wiley & Sons, New York, **1985**, p.p. 267-288, 895-897.
57. HARVEY, D. Modern Analytical Chemistry. McGraw Hill, New York, **2000**, p.p. 580-581.
58. JENNIGS, W.; SHIBAMOTO, T. Qualitative analysis of flavor and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography. New York: Academic Press, Inc., **1980**, 472 p.
59. KOVÁTS, E. Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. *Adv. Chromatogr.* **1**, **1965**. p.p. 229-247.
60. SANDRA, P., BICCHI C., Capillary gas chromatography in essential oil analysis. New York: Huethig Verlag, **1987**, 435p.
61. McNAIR, H.; MILLER, J. Basic gas chromatography. Ed. John Wiley & Sons, New York, **1997**, p.p. 154-156.
62. McLAFFERTY, F. W. and TURECEK, F., Interpretation of mass spectra. San Diego: University Science Books, **1993**, 374p.
63. HENRIQUEZ, C.; ALIAGA, C. Formation and decay of the ABTS derived radical cation: a comparison of different preparation procedures. *Inter. J. Chem. Kinet.*, **2002**, 34 (12), p.p. 559-665.
64. GUERRERO, A.; PANIZO, G. Actividades antioxidantes y fotoprotectora de la secreción de *Cryptomphalus aspersa*. *Industria Farmaceutica*, **2000**, , p.p 1-13.

65. RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M., and RICE-EVANS, C. "Antioxidant activity applying and improved ABTS<sup>+</sup> radical cation decolorization assay". *Free Rad. Biol. Med.*, **1999**, 26 (1), p.p. 1231-1237.
66. BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E. and BERSET, C., "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity". *Lebens. Wiss. U. Technol.*, **1995**, 28, p.p. 25-30.
67. CONTRERAS, N. Evaluación de la actividad antioxidante *in-vitro* de algunos aceites esenciales en el proceso de peroxidación lipídica por la radiación ultravioleta. Tesis de Maestría, Escuela de Química, UIS, **2002**.
68. ARCILA, C.; CRISTINA, L.; PIÑA, G. Lecom, U.S. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *ALAN Mar*, **2004**, 54 (1), pp. 100-111.
69. PIETTA, P. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* **2000**, 63 (7), p.p. 1035-1042.
70. BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.*, **2006**, 99 (1), p.p. 191-203.
71. KUSKOKI, M. E.; ASUERO, G. A.; GARCÍA, M. C. Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Cienc. Technol. Aliment.*, **2004**, 24 (4), p.p. 691-693.

72. KUSKOSKI, E. M., ASUERO, A. G., TRONCOSO, A. M. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Cien. Technol. Aliment.* **2005**, 25 (4), p.p. 726-732.
73. GONZALES, M. C.; SOTO, M. Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano Mexicano. *Rev. Fitotec. Mex.*, **2007**, 30 (1), p.p. 43-49.
74. CAMPOS, A. M., LIAAI, E. A. Kinetic of the reaction between 2,2'-Azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) derived radical cations and phenols. **1996**. *Free Rad. Biol. Med.*, Chile, 7, p.p 119-224.
75. ROBERT, O. K. Diseño de experimentos: principios estadísticos de diseño y análisis de investigación. 2<sup>a</sup> Ed. **2001**, p.p. 3 -18 y 175 – 200.
76. TERRADEZ, G. M. Análisis de componentes principales. Disponible en Internet: [www.uoc.edu](http://www.uoc.edu). Consultado: 03/08/2006.
77. **Cienciometría: midiendo la productividad. 2006.**  
Disponible: <http://www.med.uchile.cl/noticias/2006/agosto/pdf/cienciometria.pdf>. Consultado: 15/07/2007.

78. MACIAS, C. A. Papel de la infometría y de la Cienciometría y su perspectiva nacional e internacional. **1998**. CANALES, B. H. Bibliometría, Informetría, Cienciometría: Su Etimología y Alcance Conceptual.
79. CANALES, B. H. Bibliometría, Informetría, Cienciometría: su Etimología y alcance conceptual. Disponible en: <http://www.congreso-info.cu/UserFiles/File/Info/Info2002/Ponencias/96.pdf>.  
Consultado: 13/01/2007.
80. GUZMAN, S. P., CARDOZO, R., GARCIA, V. Desarrollo agrotecnológico de *Lippia alba* (Miller) N.E.Br. ex Britton y Wilson. Revista Científica *Guillermo de Ockham*, **2004**, 7(1), p.p. 201-215.
81. ADAMS, R. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Illinois. Allured Publishing Corporation, **1995**, 469 p.
82. MONSALVE, L. A. Comparación de la composición química de los aceites esenciales de las plantas de *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown, proveniente de diferentes regiones de Colombia. Proyecto de Grado. **2007**. p.p 113-119.

## ANEXO 1

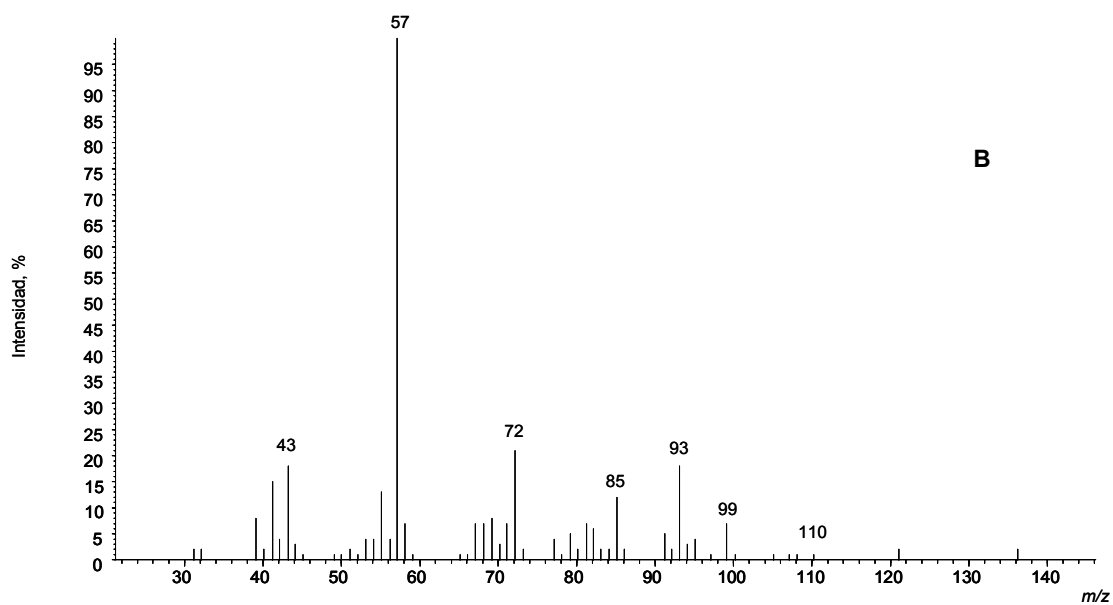
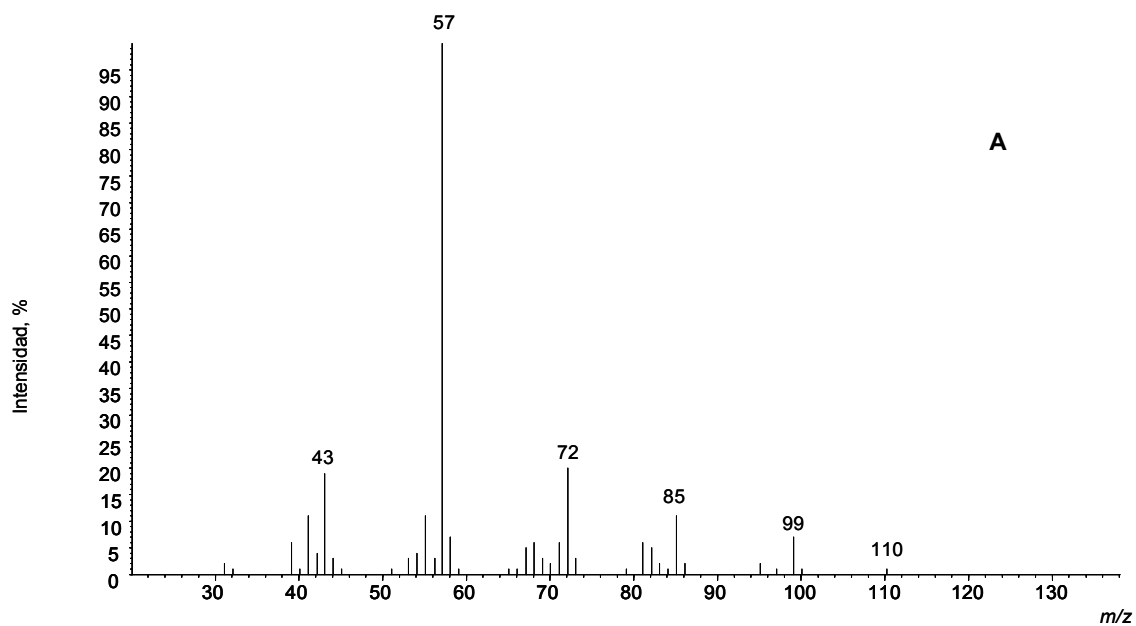
- Olga L. Díaz, Diego C. Duran, Jairo. R. Martínez y Elena. E. Stashenko. Póster: “*Comparación de la composición química del aceite esencial de Aloysia triphylla L’Her Britton cultivada en tres regiones de Colombia*”. IX Congreso Colombiano de fitoquímica, Pereira, mayo 8-11, 2007.

### RESUMEN

Se comparó la composición química de aceites esenciales (AEs) de plantas de *Aloysia triphylla*, recolectadas en tres regiones de Colombia, en diferentes estados de madurez. Los AE fueron obtenidos por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD) y analizados por GC-MS. El componente mayoritario presente en los AE evaluados fue el citral (32-41%). El mayor rendimiento (%p/p) se obtuvo para las plantas recolectadas en Bolívar, Santander (0.88%). La mayor acumulación de metabolitos de interés se logró para las plantas con tres meses de edad, antes de la floración.

## ANEXO 2

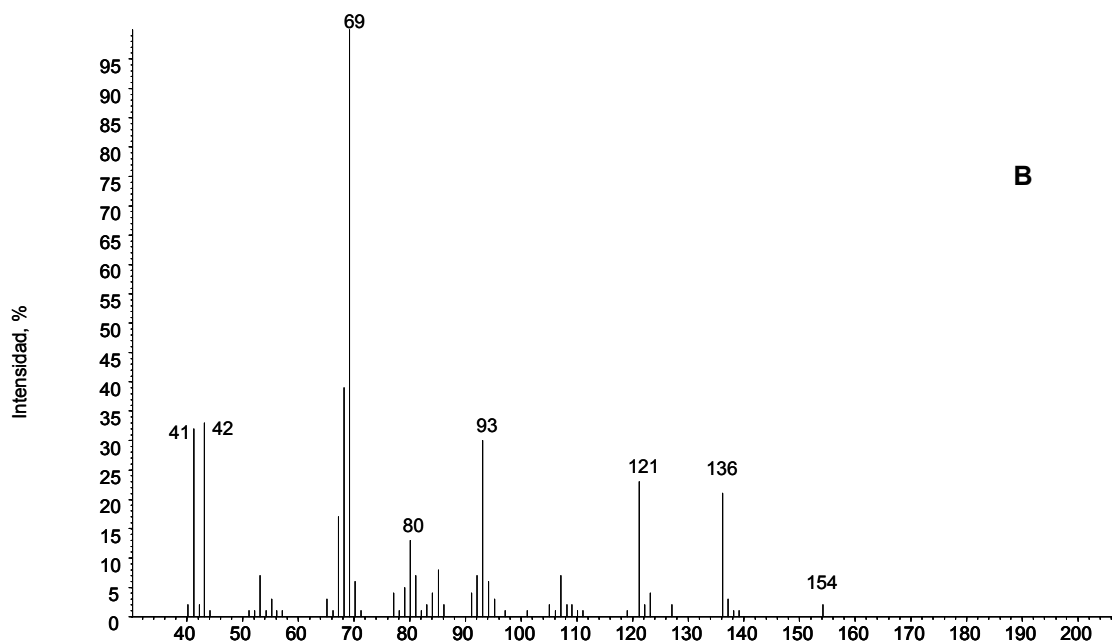
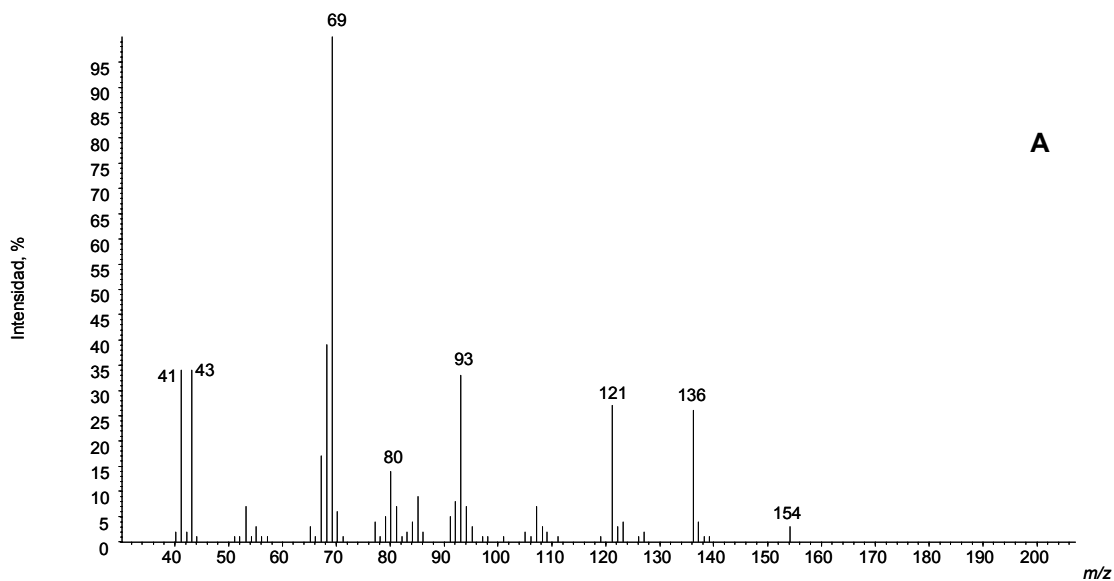
Para una identificación más segura de los compuestos presentes en el aceite esencial de *Aloysia triphylla*, se corrieron sustancias patrón, bajo las mismas condiciones cromatográficas que las de los aceites. En las siguientes figuras, se presentan los espectros de masas de las sustancias de referencia y algunos compuestos presentes en el aceite esencial.



**Anexo 2-Figura 1.** MS del 1-octen-3-ol. **A.** Patrón certificado de 1-octen-3-ol (98 % pureza); **B.** 1-octen-3-ol presente en el AE de *A. triphylla*. EI, 70 eV.

**Anexo 2-Tabla 1.**  $I_k$  y  $t_R$  del 1-Octen-3-ol

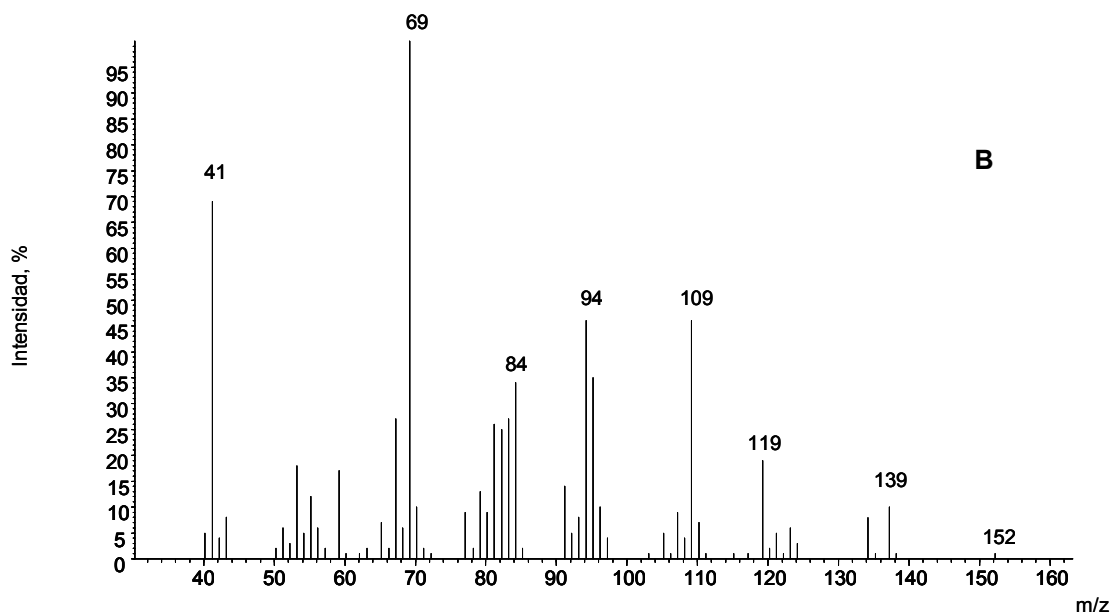
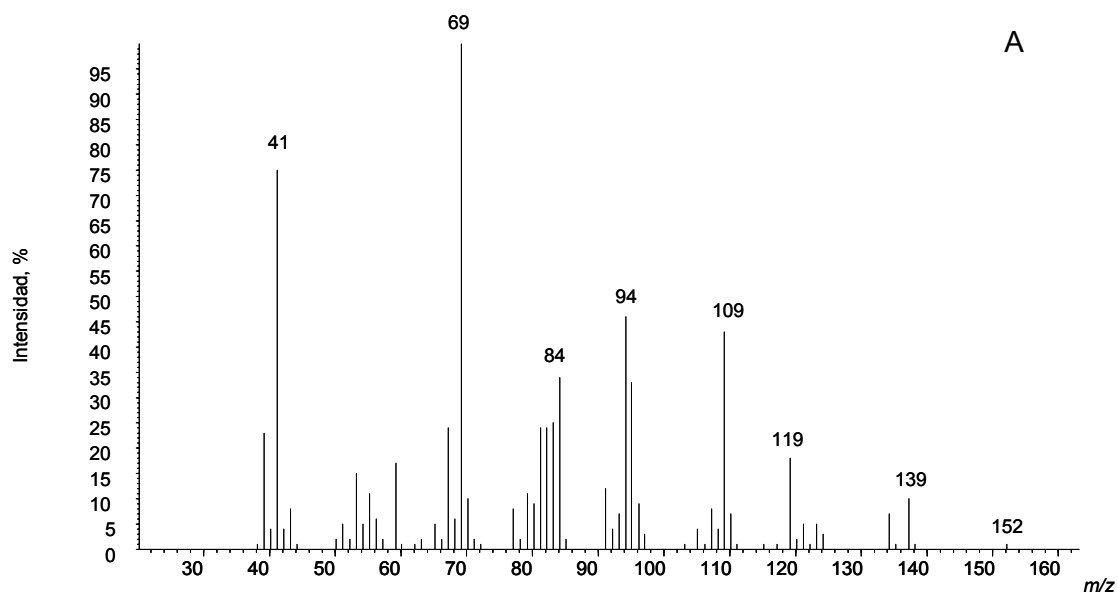
Sustancias	$I_k$ literatura [81]	$I_{kexp}$	$t_R$ (DB-5, 60m)
AE	979	980	19.434
Patrón certificado		979	19.477



**Anexo 2-Figura 2.** MS del acetato de geranilo. **A.** Patrón certificado del acetato de geranilo (98% pureza); **B.** Acetato de geranilo presente en el AE. EI, 70 eV.

**Anexo 2-Tabla 2.**  $I_k$  y  $t_R$  del acetato de geranilo

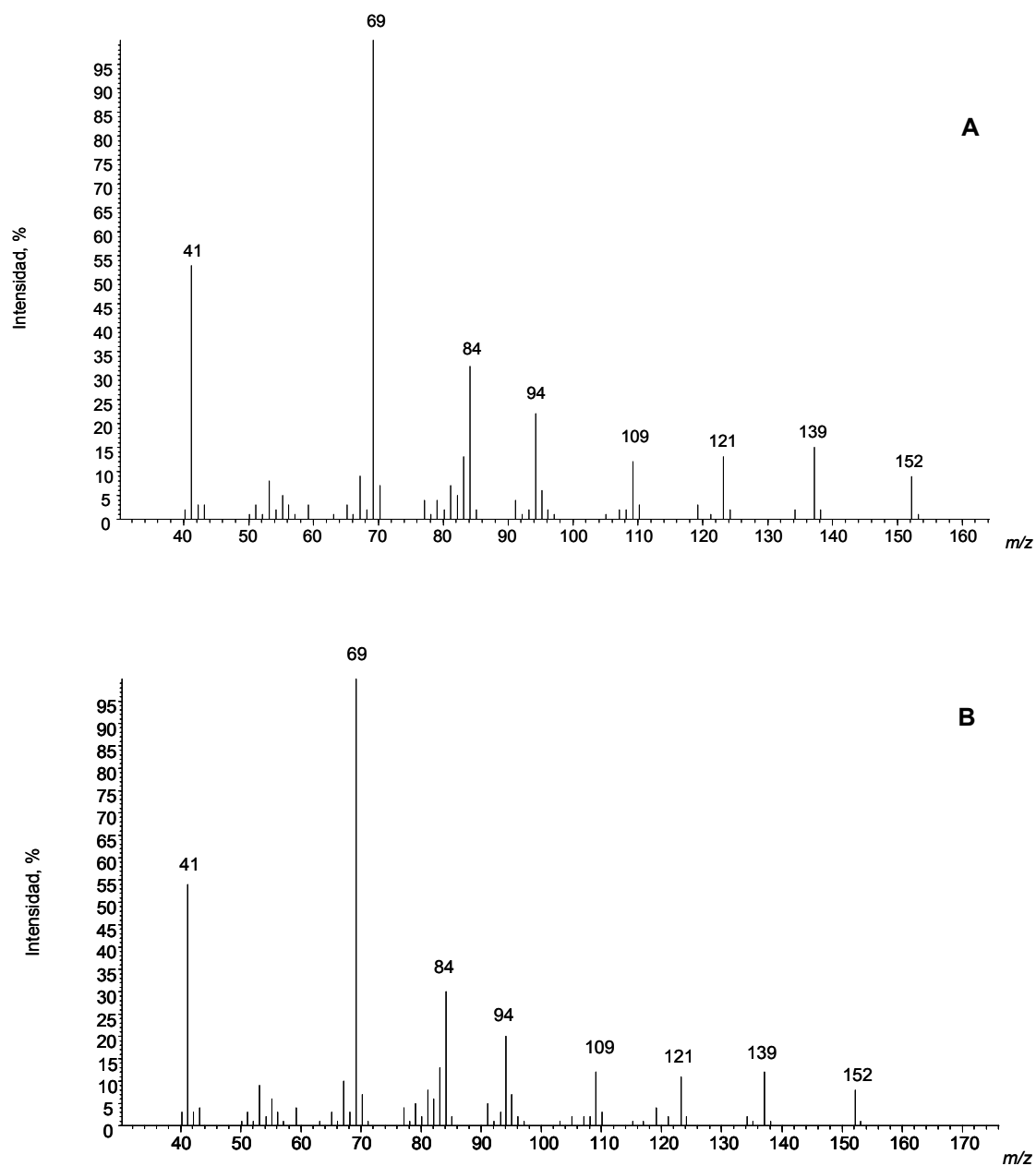
Sustancia	$I_k$ literatura [81]	$I_{kexp}$	$t_R$ (DB-5, 60m)
AE	1381	1377	35.037
Patrón certificado		1379	35.063



**Anexo 2-Figura 3.** MS del neral. **A.** Patrón certificado del neral (mezcla de *cis-trans*-Citral, 95% pureza); **B.** Neral presente en el AE. EI, 70 eV.

**Anexo 2-Tabla 3.**  $I_k$  y  $t_R$  del neral

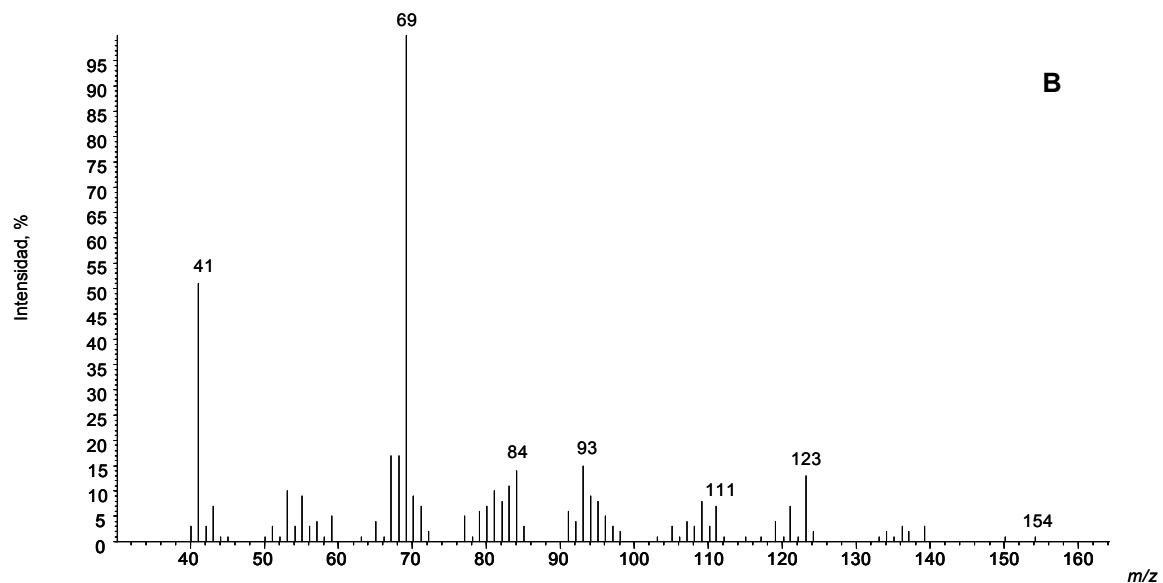
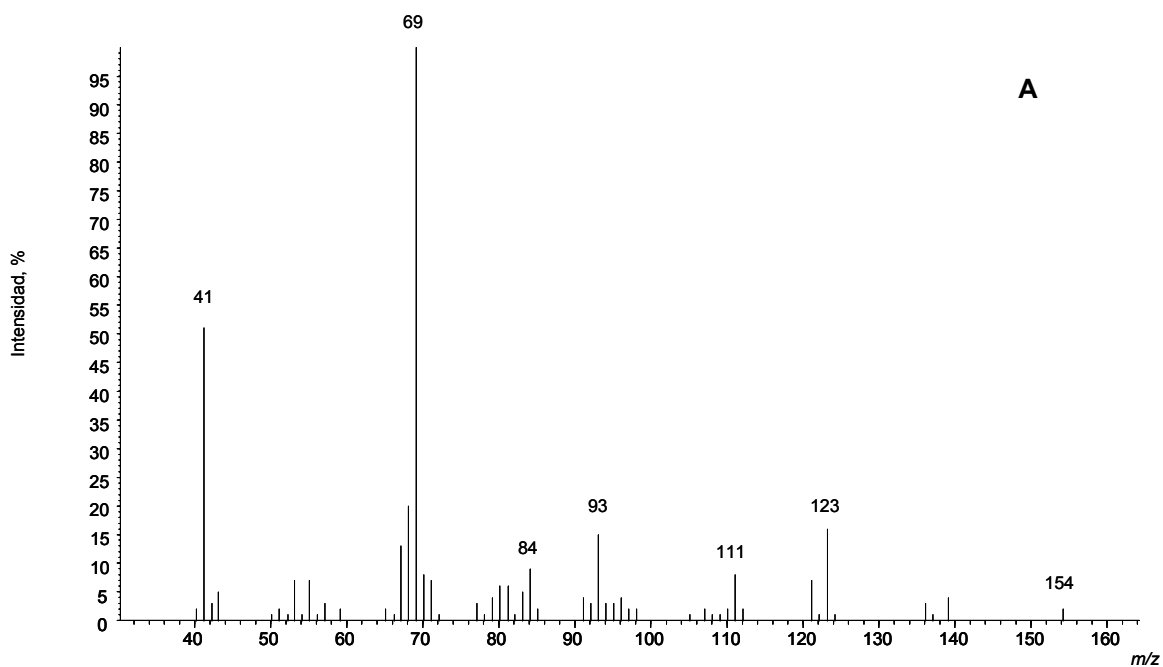
Sustancias	$I_k$ literatura [81]	$I_{kexp}$	$t_R$ (DB-5, 60m)
AE	1238	1247	30.116
Patrón certificado		1248	30.120



**Anexo 2-Figura 4.** MS del geranial. **A.** Patrón certificado del geranial (mezcla *cis-trans*-Citral, 95% pureza); **B.** Geranial presente en el AE. EI, 70 eV.

**Anexo 2-Tabla 4.**  $I_k$  y  $t_R$  del geranial

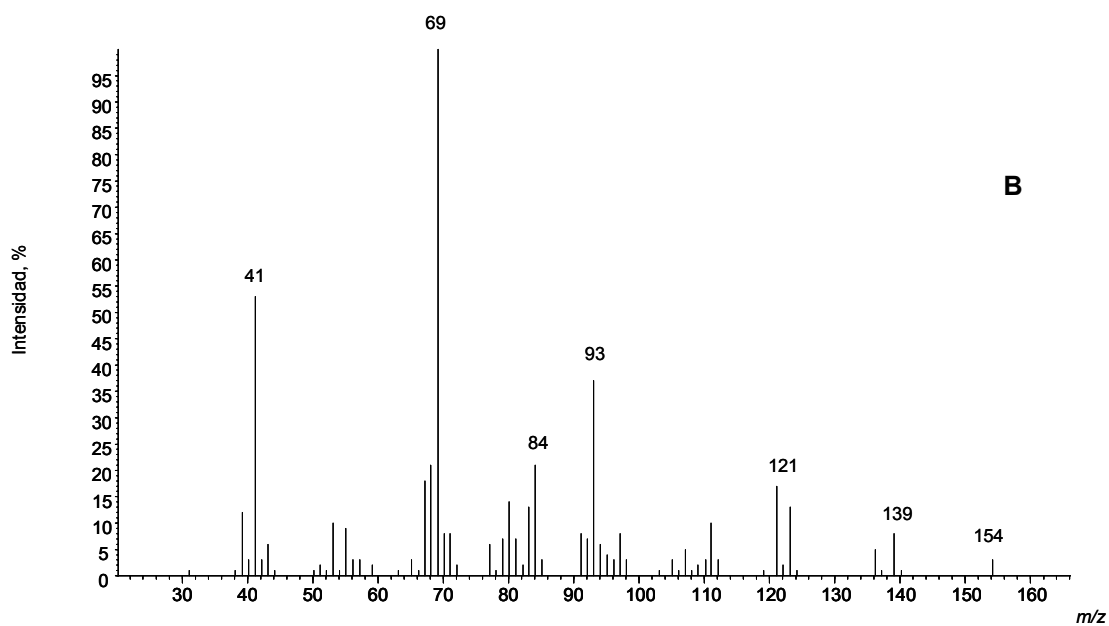
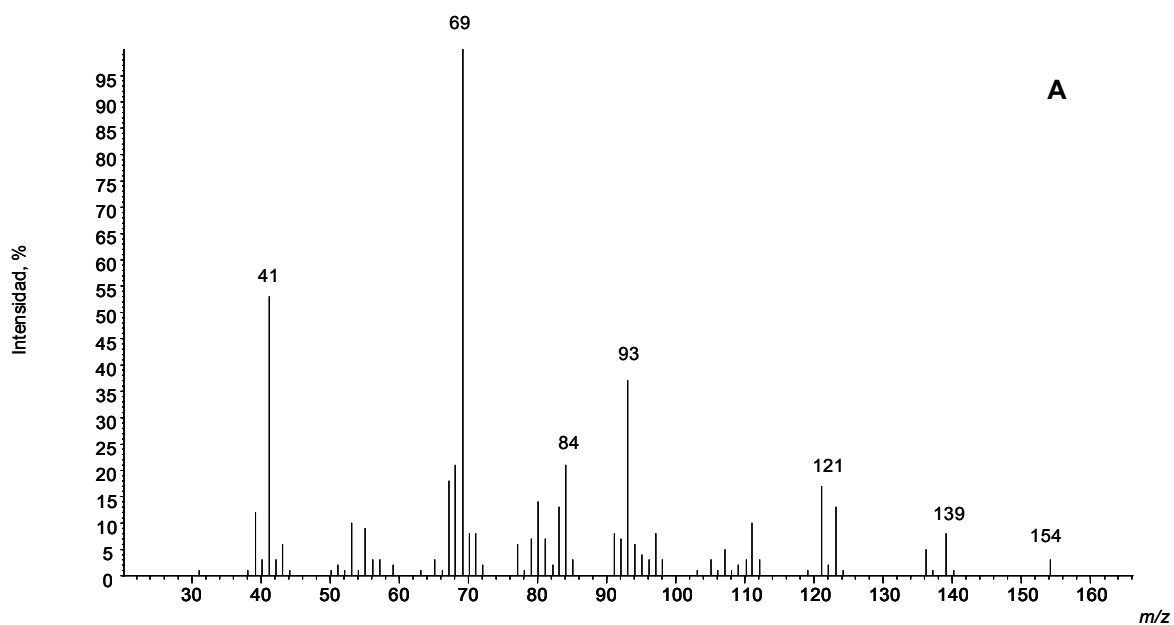
Sustancias	$I_k$ literatura [81]	$I_{kexp}$	$t_R$ (DB-5, 60m)
AE	1267	1277	31.197
Patrón certificado		1278	31.289



**Anexo 2-Figura 5.** MS del geraniol. **A.** Patrón certificado del geraniol (98% pureza); **B.** Geraniol presente en el AE. El, 70 eV.

**Anexo 2-Tabla5.**  $I_k$  y  $t_R$  del geraniol

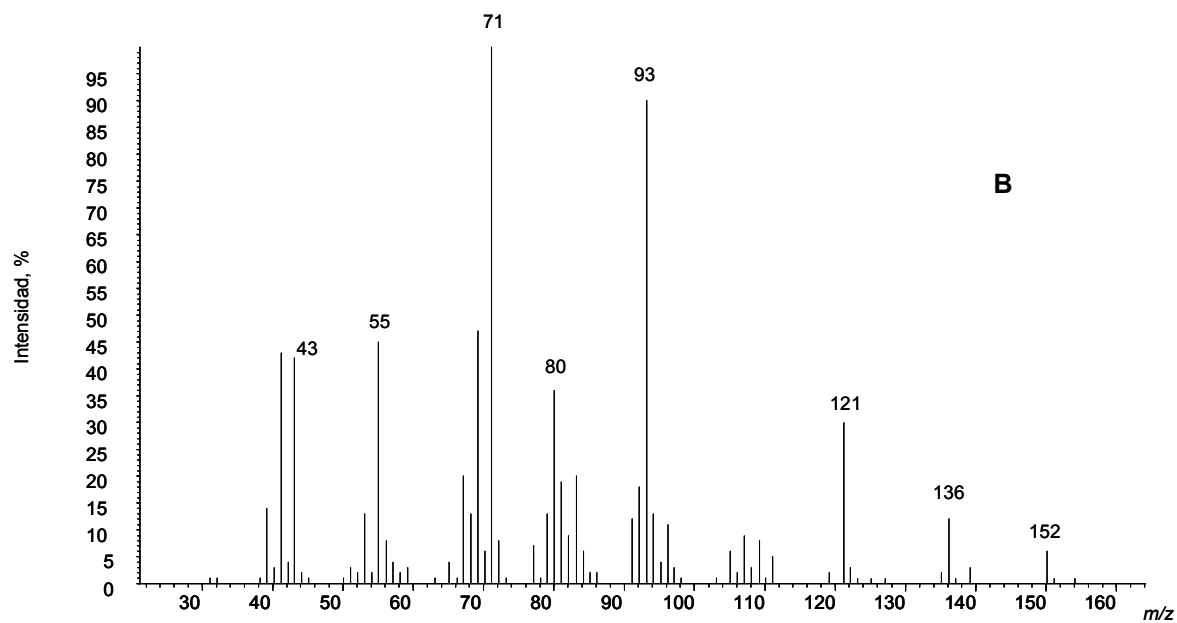
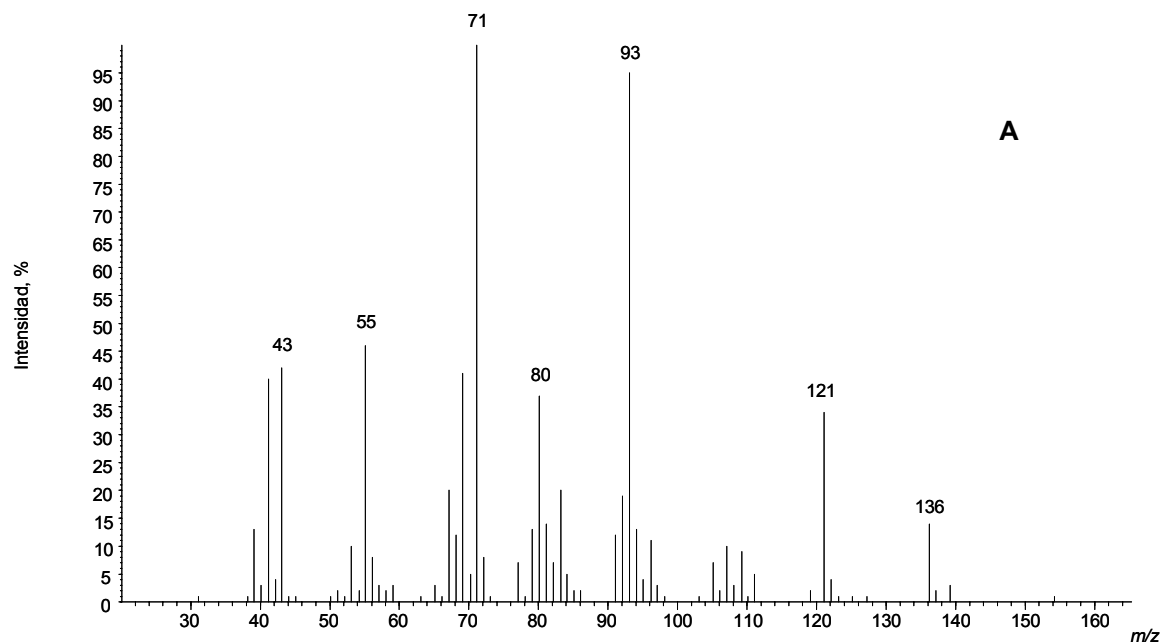
Sustancias	$I_k$ literatura [81]	$I_{kexp}$	$t_R$ (DB-5, 60m)
AE	1253	1254	30.267
Patrón certificado		1253	30.277



**Anexo 2-Figura 6.** MS del nerol. **A.** Patrón certificado del nerol (97% pureza); **B.** Nerol presente en el AE. EI, 70 eV.

**Anexo 2-Tabla 6.**  $I_k$  y  $t_R$  del nerol

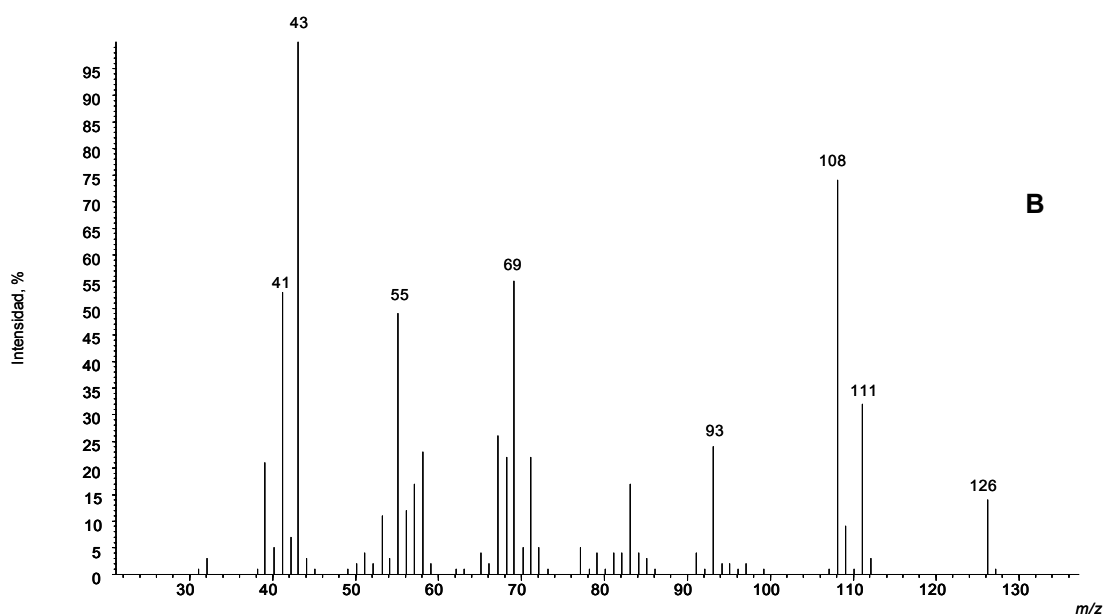
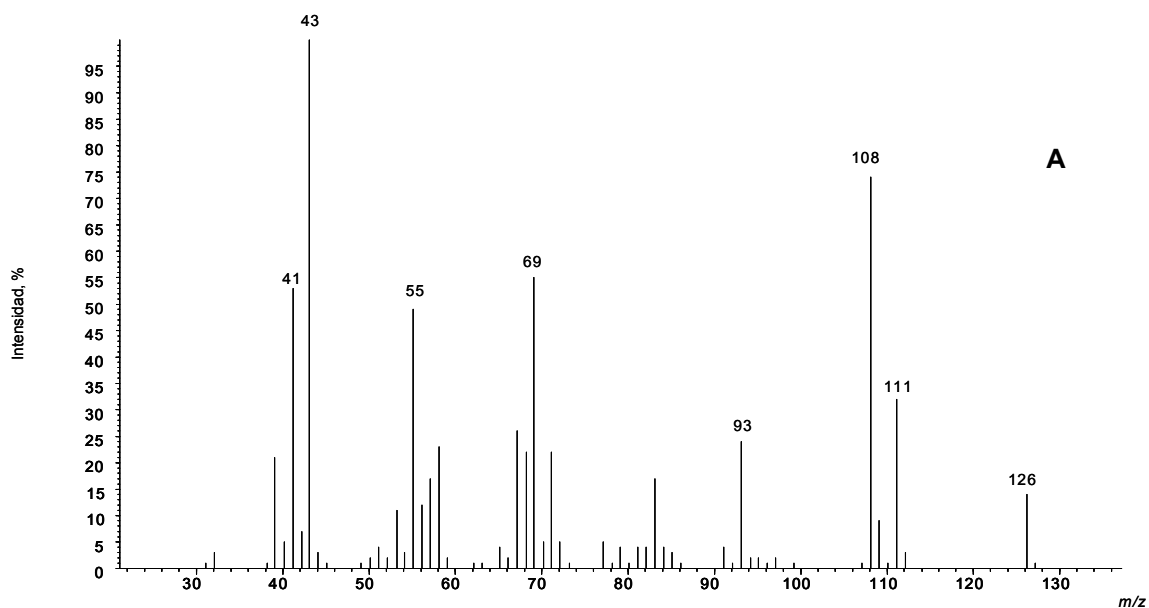
Sustancias	$I_k$ literatura	$I_{kexp}$	$t_R$ (DB-5, 60m)
AE	1230	1230	29.427
Patrón certificado		1230	29.446



**Anexo 2-Figura 7.** MS del linalool. **A.** Patrón certificado del linalool (97% pureza); **B.** Linalool presente en el AE. EI, 70 eV.

**Anexo 2-Tabla 7.**  $I_k$  y  $t_R$  del linalool

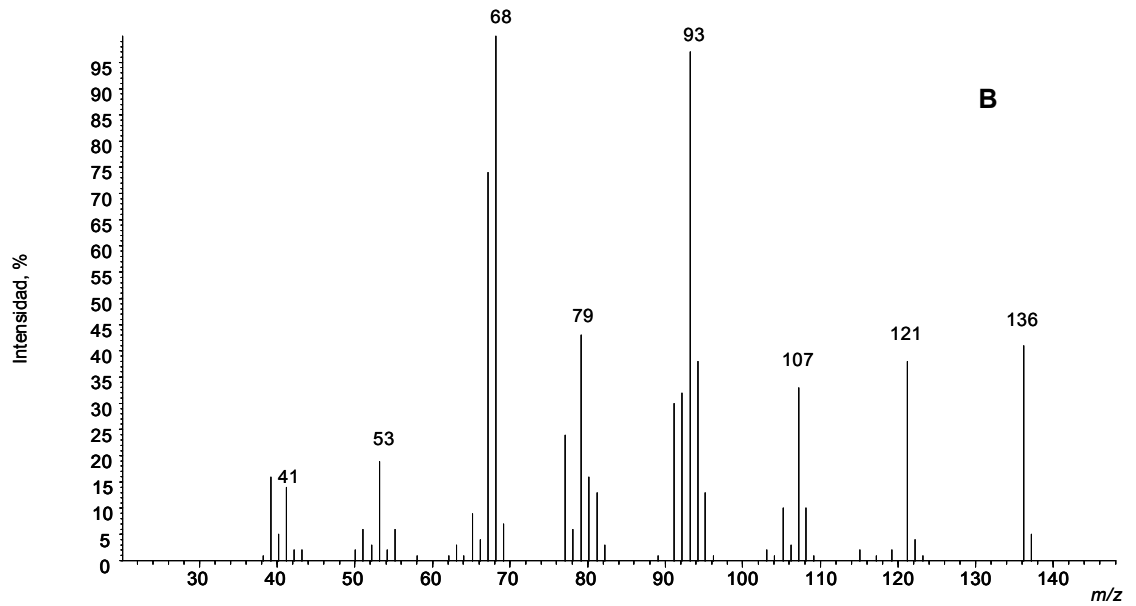
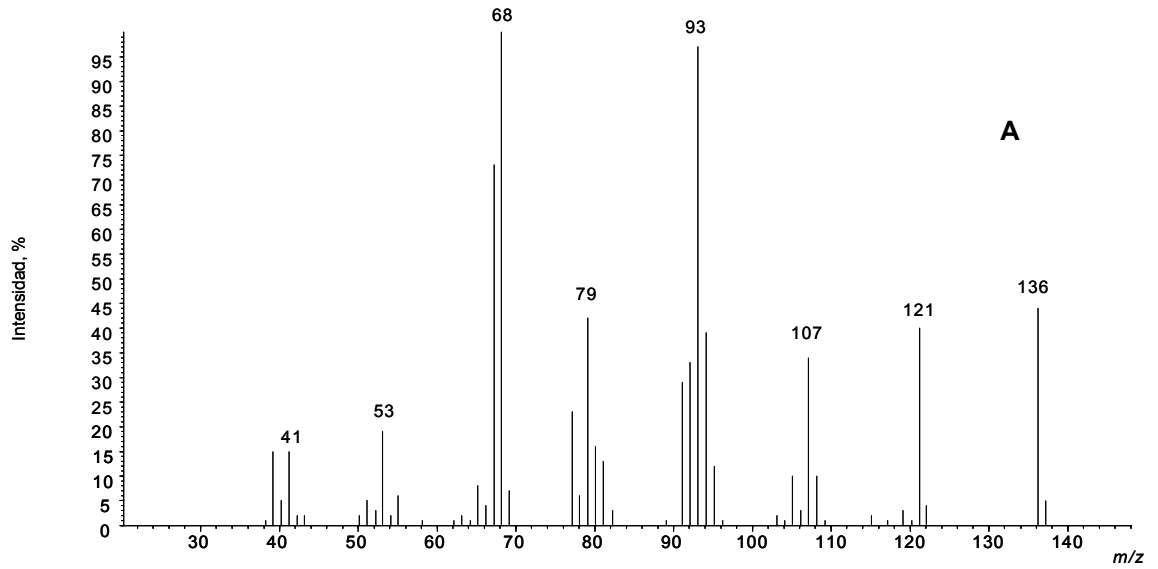
Sustancias	$I_k$ literatura [81]	$I_{k\text{exp}}$	$t_R$ (DB-5, 60m)
AE	1097	1101	24.498
Patrón certificado		1102	24.490



**Anexo 2-Figura 8.** MS de 6-metil-5-hepten-2-ona. **A.** Patrón certificado de 6-metil-5-hepten-2-ona (99% pureza); **B.** 6-Metil-5-hepten-2-ona presente en el AE. EI, 70 eV.

**Anexo 2-Tabla 8.**  $I_k$  y  $t_R$  del 6-Metil-5-hepten-2-ona

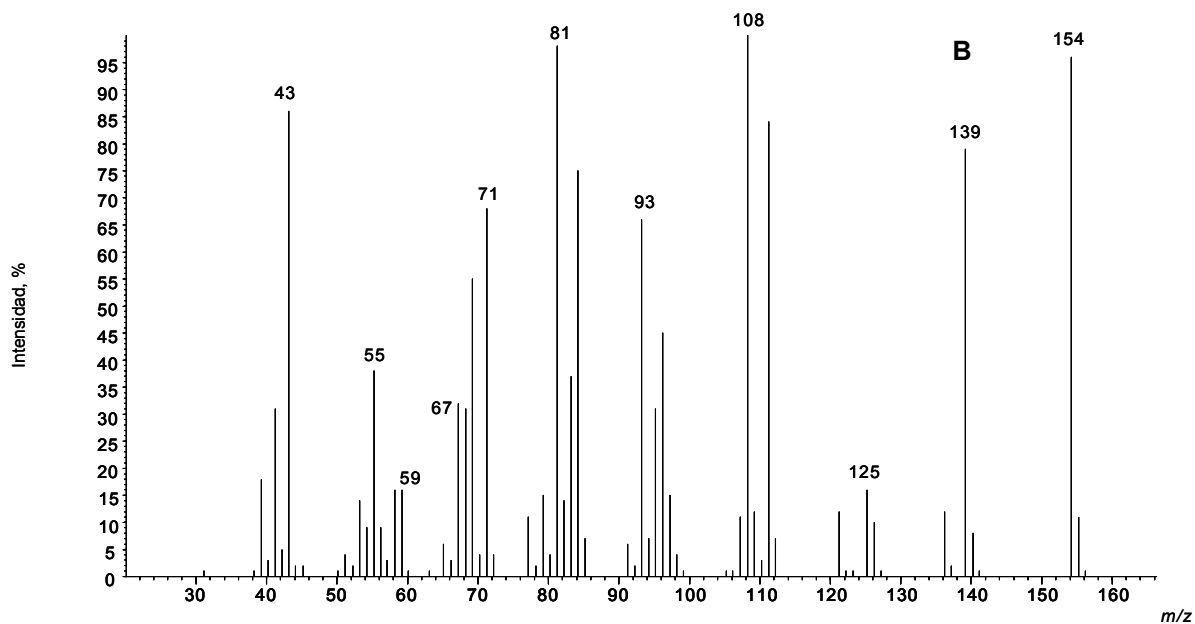
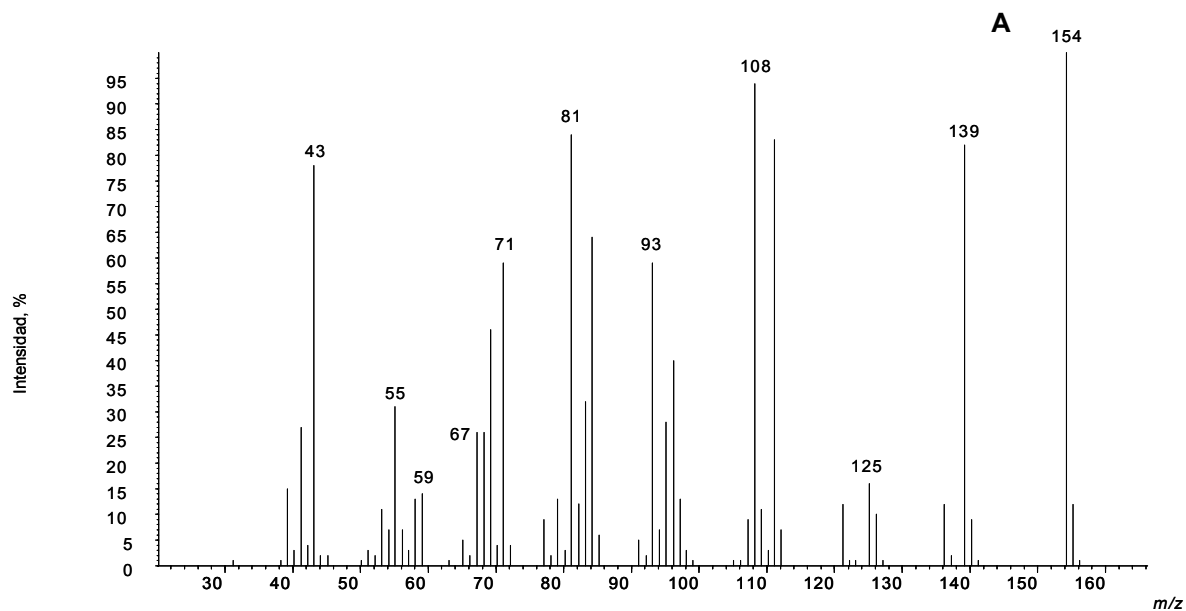
Sustancias	$I_k$ literatura [81]	$I_{kexp}$	$t_R$ (DB-5, 60m)
AE	986	985	19.576
Patrón certificado		985	19.595



**Anexo 2-Figura 9.** MS del limoneno. **A.** Patrón certificado del limoneno (99% pureza); **B.** Limoneno presente en el AE. EI, 70 eV.

**Anexo 1-Tabla 9.**  $I_k$  y  $t_R$  del limoneno

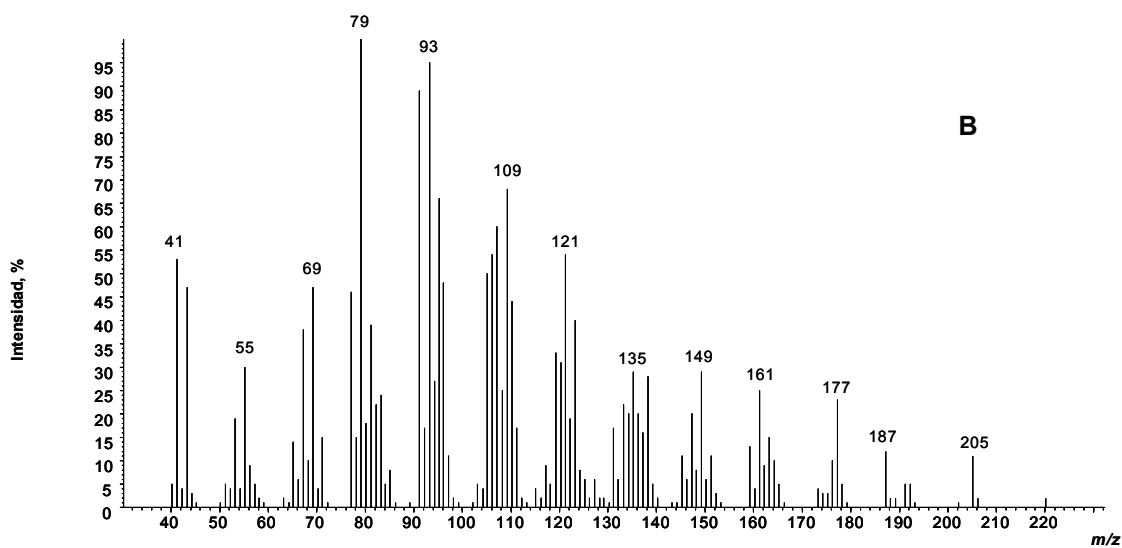
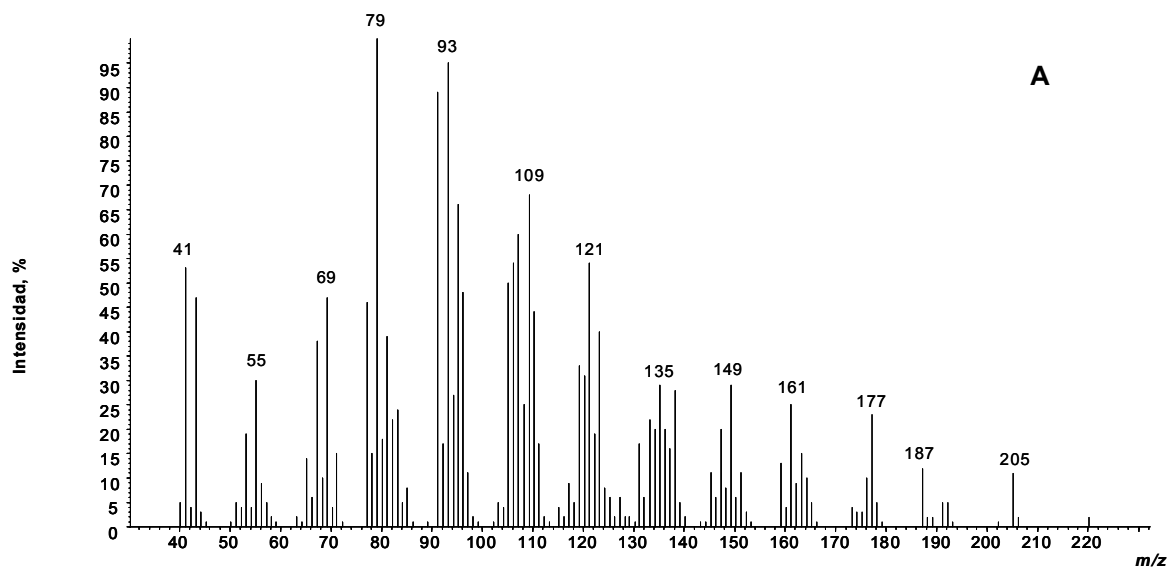
Sustancias	$I_k$ literatura [81]	$I_{kexp}$	$t_R$ (DB-5, 60m)
AE	1029	1034	21.658
Patrón certificado		1035	21.699



**Anexo 2-Figura 10.** MS del 1,8-cineol. **A.** Patrón certificado del 1,8-cineol (99% pureza); **B.** 1,8-Cineol presente en el AE. EI, 70 eV.

**Anexo 1-Tabla 10.**  $I_k$  y  $t_R$  del 1,8-Cineol

Sustancias	$I_k$ literatura [81]	$I_{kexp}$	$t_R$ (DB-5, 60m)
AE	1031	1038	21.658
Patrón certificado		1036	21.699



**Anexo 2-Figura 11.** MS del óxido de cariofileno. **A.** Patrón certificado del óxido de cariofileno (99% pureza); **B.** Óxido de cariofileno presente en el AE. EI, 70 eV.

**Anexo 2-Tabla 11.**  $I_k$  y  $t_R$  del *trans*-óxido de cariofileno

Sustancias	$I_k$ literatura [81]	$I_{kexp}$	$t_R$ (DB-5, 60m)
AE	1583	1599	42.289
Patrón certificado		1600	42.279

### ANEXO 3

A continuación, se muestra la contribución de los Factores 1 y 2, a los componentes principales de plantas de *A. triphylla*, cultivada en Rionegro (Antioquia), Bolívar (Santander).

**Anexo 3-Tabla 1.** Contribuciones a los componentes principales de cada uno de los constituyentes de los AE de *A. triphylla*, cultivada en Rionegro, Antioquia.

Compuesto	Factor 1	Factor 2
$\alpha$ - Pineno	0,000071	0,002181
Sabineno	0,003732	0,000157
1- Octen-3-ol	0,022327	0,022626
6-Metil-5-hepten-2-ol	0,010360	0,009457
$\beta$ -Mirceno	0,022299	0,021703
3-Octanol	0,014835	0,019981
Limoneno	0,001967	0,050672
1,8-Cineol	0,018684	0,008078
<i>trans</i> - $\beta$ -Ocimeno	0,028262	0,013226
<i>trans</i> -4-Tujanol	0,026852	0,003039
Linalool	0,041388	0,000251
<i>cis</i> -Óxido de limoneno	0,008544	0,057544
<i>trans</i> -Óxido de limoneno	0,001141	0,055510
Fotocitral A	0,026410	0,008932
<i>trans</i> -Verbenol	0,039356	0,001037
Epóxido de rosafurano	0,029969	0,016187
<i>trans</i> -Isocitral	0,031041	0,009104
$\alpha$ -Terpineol	0,013845	0,037393
Nerol	0,005064	0,019211
Neral	0,036999	0,003280
Geraniol	0,000857	0,005139

Continuación **Anexo 3-Tabla 1**

Geranial	0,032477	0,004426
<i>iso</i> -Piperitenona	0,001193	0,049691
Compuesto oxigenado, C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>	0,005946	0,000020
6-Hidroxi-carvotanacetona*	0,008042	0,062338
Acetato de geranilo	0,004494	0,055172
$\alpha$ -Copaeno	0,038727	0,002512
$\beta$ -Bourboneno	0,040167	0,000029
<i>trans</i> - $\beta$ -Cariofileno + $\alpha$ -Cedreno	0,033534	0,003466
Propanoato de nerilo	0,010684	0,006581
<i>allo</i> -Aromadendreno	0,039990	0,000104
<i>ar</i> -Curcumeno	0,040227	0,000852
Germacreno D	0,007601	0,065169
Biciclogermacreno	0,008695	0,061043
$\beta$ -Curcumeno*	0,005565	0,068890
10- <i>epi</i> -Cubebol*	0,008735	0,063338
<i>trans</i> -Nerolidol	0,032208	0,013938
<i>ar</i> -Turmerol	0,039222	0,000008
Espatuleno	0,024328	0,024297
Óxido de cariofileno	0,039031	0,000002
<i>epi</i> - $\alpha$ -Cadinol	0,032374	0,011871

**Anexo 3-Tabla 2.** Contribuciones a los componentes principales de cada uno de los constituyentes de los AE de *A. triphylla*, cultivada en Bolívar, Santander.

Compuesto	Factor 1	Factor 2
Sabineno	0,027836	0,012250
1- Octen-3-ol	0,019905	0,032464
6-Metil-5-hepten-2-ol	0,013077	0,018172

Continuación **Anexo 3-Tabla 2.**

3-Octanol	0,041154	0,004262
Limoneno	0,023636	0,000064
1,8-Cineol	0,027230	0,000041
<i>trans</i> - $\beta$ -Ocimeno	0,000002	0,037690
<i>trans</i> -4-Tujanol	0,028730	0,002671
Linalol	0,045677	0,000225
<i>cis</i> -Óxido de limoneno	0,017098	0,007819
<i>trans</i> -Óxido de limoneno	0,002150	0,008705
Fotocitral A	0,012204	0,048108
<i>trans</i> -Verbenol	0,032263	0,006739
Epóxido de rosafurano	0,040757	0,004769
<i>trans</i> -Isocitral	0,018214	0,019025
$\alpha$ -Terpineol	0,024447	0,029628
Nerol	0,011612	0,043503
Neral	0,041711	0,001207
Geraniol	0,025751	0,014088
Geranial	0,036966	0,000036
6-Hidroxi-carvotanacetona*	0,012755	0,013512
Acetato de geranilo	0,046417	0,000601
$\alpha$ -Copaeno	0,014724	0,035394
$\beta$ -Bourboneno	0,001993	0,063694
<i>trans</i> - $\beta$ -Cariofileno + $\alpha$ -Cedreno	0,018462	0,006113
<i>allo</i> -Aromadendreno	0,000189	0,067000
<i>ar</i> -Curcumeno	0,012478	0,022878
Germacreno D	0,000131	0,002611
$\beta$ -Curcumeno*	0,000048	0,015514
10- <i>epi</i> -Cubebol*	0,007534	0,056401
<i>trans</i> -Nerolidol	0,028396	0,002686
<i>ar</i> -Turmerol	0,031835	0,023703
Espatulanol	0,043839	0,001479
Óxido de cariofileno	0,020815	0,017064
<i>epi</i> - $\alpha$ -Cadinol	0,019911	0,038949
Oplopanona	0,028463	0,000333

**Anexo 3- Tabla 3.** Contribuciones a los componentes principales de cada una de las familias de componentes, de los AE de plantas de *A. triphylla*, cultivada en Cundinamarca, Antioquia y Bolívar, Santander.

Familia de compuestos	Factor 1	Factor 2
HM	0,204530	0,161283
MO	0,180838	0,303412
HS	0,235673	0,078445
SO	0,113206	0,451565
Otros	0,265753	0,005295

## ANEXO 4

### Parcela N° 10



3 meses



3 meses



Registro fotográfico parcela N° 10 (Bolívar, Santander). 2288 m.s.n.m

**Parcela N° 11**



3 meses

Registro fotográfico parcela N° 11 (Bolívar, Santander). 2292 m.s.n.m

**Parcela N° 26**



3 meses





10 meses

Registro fotográfico parcela N° 26 (Bolívar, Santander). 2900 m.s.n.m

**Parcela N° 2**





3 meses





10 meses

Registro fotográfico parcela N° 2 (Bolívar, Santander). 2570 m.s.n.m