

**AISLAMIENTO DE LA CARVONA PRESENTE EN EL ACEITE ESENCIAL DE  
*Lippia alba (Mill.) N.E. Brown* POR DESTILACIÓN FRACCIONADA A  
PRESIÓN REDUCIDA**

**NATALIA E. CONDE MARTÍNEZ**

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

**AISLAMIENTO DE LA CARVONA PRESENTE EN EL ACEITE ESENCIAL DE  
*Lippia alba (Mill.) N.E. Brown* POR DESTILACIÓN FRACCIONADA A  
PRESIÓN REDUCIDA**

**NATALIA E. CONDE MARTÍNEZ**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial  
para optar por el Título de Química**

**Director: Jairo René Martínez Morales, Químico, Ph.D.**

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

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

**2008**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Jairo René Martínez por todos los aportes realizados al proyecto y a la Dra. Elena Stashenko, quienes, en conjunto, han dedicado gran parte de sus vidas al desarrollo de la ciencia en Colombia y a construir nuevas opciones de agroindustria en Santander.

A William y a Deyanira, por su fuerza y apoyo en el comienzo del proyecto y a mis demás compañeros del Laboratorio de Cromatografía y de CENIVAM, quienes hicieron de este proyecto una travesía de risas y alegrías.

A mis padres, Eliza y Alfonso, a Cris, July, Caro y a mis amigos de siempre, Mafe, Cesar, Yenny y Javier quienes han aportado muchos granitos de arena durante mi formación y les agradezco infinitamente por su compañía, amor y sobretodo sonrisas durante tantos años.

A Nathaly, Jhoao y Fernando, que se convirtieron en mis amigos durante largas jornadas de estudio. Les agradezco la compañía, las estudiadas, las trasnochadas, pero sobretodo los buenos momentos, las risas y los chistes. A Saúl, por su apoyo, su ánimo y su compañía constante en el desarrollo del proyecto.

Finalmente, a COLCIENCIAS por la financiación de este proyecto.

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO CONCEPTUAL	4
1.1 <i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E. Brown	4
1.2 CARVONA	5
1.3 EQUILIBRIO LÍQUIDO – VAPOR	6
1.3.1 Diagramas de temperatura – composición	8
1.3.2 Diagramas de equilibrio liquido – vapor	9
1.4 DESTILACIÓN	11
1.4.1 Destilación por lotes	12
1.5 MÉTODO DE McCABE Y THIELE	14
1.6 ANÁLISIS CIENCIOMÉTRICO	17
2. METODOLOGÍA	21
2.1 CONSTRUCCIÓN DE LA CURVA DE EQUILIBRIO LÍQUIDO – VAPOR	22
2.1.1 Curva de equilibrio líquido – vapor benceno – tolueno	23
2.1.1.1 Análisis cromatográfico de las fracciones de benceno y tolueno	24
2.1.2 Curva de equilibrio para la carvona presente en el aceite esencial de <i>Lippia alba</i>	25
2.1.2.1 Fraccionamiento del aceite esencial	25
2.1.2.2 Análisis cromatográfico	26
* GC – MS	26
* Identificación	26

*	Cuantificación (estándar externo)	27
2.1.3.	Determinación de las composiciones en equilibrio	28
2.1.4	Determinación de la volatilidad relativa	28
2.2	APLICACIÓN DEL MÉTODO GRÁFICO McCABE Y THIELE	28
2.3	DESTILACIÓN FRACCIONADA A PRESIÓN REDUCIDA	30
3.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	32
3.1	CURVA DE EQUILIBRIO LÍQUIDO – VAPOR DE BENCENO – TOLUENO	32
3.2	CURVA DE EQUILIBRIO LÍQUIDO – VAPOR PARA LA CARVONA EN EL ACEITE ESENCIAL DE <i>Lippia alba</i>	34
3.2.1	Fraccionamiento del aceite esencial de <i>Lippia alba</i>	34
3.2.2	Determinación de las composiciones en equilibrio	38
3.3	MÉTODO DE McCABE Y THIELE	40
3.4	DESTILACIÓN FRACCIONADA	43
4.	CONCLUSIONES	50
5.	RECOMENDACIONES	51
	BIBLIOGRAFÍA	52

	Pág.	
<b>Figura 1.</b>	6	Estructuras enantioméricas de la carvona
<b>Figura 2.</b>	8	Diagrama de Temperatura – composición para un sistema binario.
<b>Figura 3.</b>	10	Diagrama equilibrio líquido – vapor para un sistema de dos componentes
<b>Figura 4.</b>	12	Montaje Destilación por lotes simple
<b>Figura 5.</b>	13	Montaje a nivel de laboratorio para la destilación fraccionada con adaptación para vacío.
<b>Figura 6.</b>	15	Determinación gráfica de la relación de reflujo mínima.
<b>Figura 7.</b>	16	Diagrama McCabe Thiele. Destilación <i>batch</i> . Determinación número de platos teóricos a reflujo óptimo ( $R_{op}$ )
<b>Figura 8.</b>	22	Diseño del montaje para la determinación de equilibrio líquido-vapor a presión reducida
<b>Figura 9.</b>	23	Montaje diseñado para la determinación de equilibrio líquido-vapor a presión reducida.
<b>Figura 10.</b>	30	Diagrama McCabe Thiele. Destilación tipo <i>batch</i> . Reflujo mínimo.

<b>Figura 11.</b>	Diagrama McCabe Thiele. Destilación <i>batch</i> . Determinación número de platos teóricos a reflujo óptimo ( $R_{op}$ )	30
<b>Figura 12.</b>	Equipo destilación fraccionada <i>B/R Instrument 800 – High Efficiency Micro Distillation</i> .	31
<b>Figura 13.</b>	Curva de calibración empleada en la cuantificación de las mezclas de benceno tolueno.	32
<b>Figura 14.</b>	Curva de equilibrio líquido vapor para el sistema binario de benceno tolueno a 1 atm.	34
<b>Figura 15.</b>	Perfil cromatográfico de metabolitos secundarios del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> obtenidos por arrastre con vapor. Columna DB-5MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV).	36
<b>Figura 16.</b>	Curva de calibración para la cuantificación de carvona en las fracciones obtenidas del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> . Columna DB-5 (30m). Detector de ionización de llama (FID).	37
<b>Figura 17.</b>	Perfil cromatográfico del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> destemperado por destilación fraccionada a presión reducida (5 torr). Columna DB-5 (30m). Detector de ionización de llama (FID).	38
<b>Figura 18.</b>	Curva de equilibrio líquido vapor para el sistema carvona – aceite esencial a 5 torr.	40
<b>Figura 19.</b>	Diagrama McCabe Thiele. Curva equilibrio líquido vapor carvona – aceite esencial. $\alpha= 1,60$	41
<b>Figura 20.</b>	Diagrama McCabe Thiele, $\alpha=1,60$ . Relación de reflujo 3,6.	42
<b>Figura 21.</b>	Diagrama McCabe Thiele, $\alpha=1,60$ . Relación de reflujo 3,6. Etapas teóricas requeridas para una concentración de 98% p/p.	43

- Figura 22.** Perfiles cromatográficos del aceite esencial y de las fracciones obtenidas por destilación fraccionada a 5 torr. Columna HP-5 (30m). Detector de ionización en llama (FID). 46
- Figura 23.** Etapas para el aislamiento de carvona a partir de aceite esencial de *Lippia alba*. 48

## LISTA DE TABLAS

		Pág.
<b>Tabla 1.</b>	Principales resultados encontrados sobre la actividad científica en el campo de la destilación fraccionada y el equilibrio líquido vapor para aceites esenciales en las bases de datos <i>Scopus</i> y <i>Web of Science (ISI Web of Knowledge)</i> .	20
<b>Tabla 2.</b>	Mezclas de benceno tolueno para la determinación del equilibrio líquido – vapor.	24
<b>Tabla 3.</b>	Composiciones en equilibrio de las mezclas de benceno tolueno.	33
<b>Tabla 4.</b>	Volatilidad relativa experimental para el sistema benceno tolueno	33
<b>Tabla 5.</b>	Cantidad relativa de los componentes mayoritarios del aceite esencial de <i>L. alba</i> .	35
<b>Tabla 6.</b>	Contenido de carvona en el aceite esencial y en las fracciones obtenidas.	37
<b>Tabla 7.</b>	Composiciones en equilibrio de carvona en el aceite esencial de <i>L. alba</i>	38
<b>Tabla 8.</b>	Volatilidad relativa de la carvona en el aceite desterpenado de <i>Lippia alba</i> .	39
<b>Tabla 9.</b>	Cantidad relativa (%) de los componentes mayoritarios del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> y sus fracciones.	44
<b>Tabla 10.</b>	Concentración de carvona en aceite esencial y fracciones obtenidas.	47

## RESUMEN

**TÍTULO:** AISLAMIENTO DE LA CARVONA PRESENTE EN EL ACEITE ESENCIAL DE *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown POR DESTILACIÓN FRACCIONADA A PRESIÓN REDUCIDA\*

**Autora:** Natalia Elizabeth Conde Martínez \*\*

**Palabras claves:** *Lippia alba*, carvona, destilación fraccionada, equilibrio líquido – vapor.

Los aceites esenciales obtenidos industrialmente son, generalmente, sometidos a procesos unitarios con el fin de mejorar sus características organolépticas, concentrar sus componentes útiles, facilitar su procesamiento industrial o para homogeneizar su calidad. Uno de los procesos más empleados es el fraccionamiento. En este proceso se fracciona el aceite esencial mediante una columna de destilación y es utilizado para concentrar componentes que sean de gran interés y que puedan ser obtenidos en un alto grado de pureza.

Para lograr el aislamiento eficiente de la carvona mediante procesos destilativos es necesario determinar su comportamiento termodinámico en el aceite esencial. En este trabajo se determinó la volatilidad relativa de la carvona en el aceite esencial, con el fin de establecer la facilidad con la que se podría llevar a cabo un proceso destilativo de separación. Y a partir de esta se construyó la curva de equilibrio líquido – vapor para la carvona en el aceite esencial destilado a presión reducida para determinar las condiciones mínimas requeridas para el diseño del proceso de aislamiento destilativo de la carvona.

Con base en estas condiciones, se realizó el fraccionamiento del aceite esencial de *Lippia alba*, obteniéndose 3 fracciones, a saber: la primera fracción rica en limoneno (componente mayoritario más volátil del aceite esencial), la segunda fracción rica en carvona, y el residuo de la destilación. A partir de este proceso se logró remover más del 95 % de limoneno presente en el aceite esencial y se consiguió separar la carvona con un alto grado de pureza (94 %), demostrando que la técnica escogida para este fin es la adecuada.

\* Proyecto de grado.

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Jairo René Martínez  
Codirector: Elena E. Stashenko.

## ABSTRACT

**TITLE:** ISOLATION OF CARVONE FROM *LIPPIA ALBA* (MILL.) N.E. BROWN ESSENTIAL OIL BY FRACTIONATED DISTILLATION UNDER REDUCED PRESSURE\*.

**AUTHOR:** Natalia Elizabeth Conde Martínez\*\*.

**Keywords:** *Lippia alba*, carvone, fractionated distillation, vapor-liquid equilibria

Essential oils, industrially, pass through different process that improve their organoleptic characteristics, concentrate their useful components, facilitate their industrial processing or just homogenize their quality. One of the most useful processes is fractionation. In this process the essential oil is fractionated by a distillation column, concentrating the most important components that can be finally obtained in a high pure grade.

For carvone isolation through distillation processes is necessary know how is the essential oil thermodynamic behave. In this work was determined the relative volatility of carvone in *Lippia alba* essential oil, and also a vapor – liquid equilibria curve was constructed using a essential oil without limonene. This equilibria curve was used for determination of minimum required conditions for carvone isolation by distillation process.

Finally lippia alba essential oil was fractionated, specifically were obtained three fractions. First obtained fraction presented high limonene concentration (principal volatile component in the essential oil), the second fraction showed high level of carvone, and the third fraction was distillation waste. Through this process was possible the separation of 95% of limonene from essential oil and carvone isolation was reached with a high pure grade (94%).

\* College thesis

\*\* Universidad Industrial de Santander, Faculty of Science, School of Chemistry. Directors: Jairo René Martínez and Elena E. Stashenko.



## INTRODUCCIÓN

El aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown es reconocido por su actividad farmacológica; tradicionalmente ha sido usado como analgésico, antiinflamatorio, antipirético, sedante, antiespasmódico y en tratamientos para enfermedades respiratorias, entre otras (Pascual et al. 2001). También ha sido utilizado en perfumería, en cosmetología y como agente antimicrobiano.

Se conoce que el contenido de carvona en el aceite esencial de uno de los quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown es aproximadamente del 40% al 60% (Vale T.G. et al. 1999); sin embargo, su composición varía de acuerdo con la parte de la planta que se utilice para la extracción, la etapa de desarrollo en la que se encuentra la planta, de la localización geográfica, características del suelo, clima y demás condiciones agronómicas (Guzmán R. et al. 2004). Aparte de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown se han encontrado otras plantas que poseen un alto contenido de carvona. Algunas de ellas son *Mentha spicata*, *Carum carvi* y *Anethum graveolens* (C.C.C.R. de Carvalho et al. 2006). No obstante, la ventaja que presenta *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown es que se desarrolla fácilmente en las condiciones agronómicas colombianas (tipo de suelo, régimen de lluvia, altitud y humedad, entre otras) y en general en Centro América y Suramérica, mientras que las demás plantas son cultivadas en países de Europa central, Canadá, Estados Unidos y Australia (Guzmán R. et al. 2004).

La carvona ha sido ampliamente utilizada como fragancia y saborizante en la industria cosmética, además de ser un buen agente antimicrobiano y un indicador bioquímico ambiental. Recientemente se han hecho estudios en el campo de la medicina que han documentado su uso como un potente agente contra infecciones causadas por hongos (C.C.C.R. de Carvalho et al. 2006).

Los aceites esenciales obtenidos industrialmente son, generalmente, sometidos a procesos unitarios con el fin de mejorar sus características organolépticas, concentrar sus componentes útiles, facilitar su procesamiento industrial o para homogeneizar su calidad. Uno de los procesos más empleados es el fraccionamiento. En este proceso se fracciona el aceite esencial mediante una columna de destilación (Bandoni, A. 2000), y es utilizado para concentrar componentes que sean de gran interés y que puedan ser obtenidos en un alto grado de pureza.

Para lograr el aislamiento eficiente de la carvona mediante procesos destilativos es necesario determinar su comportamiento termodinámico en el aceite esencial. En este trabajo se determinó la volatilidad relativa de la carvona en el aceite esencial, con el fin de establecer la facilidad con la que se podría llevar a cabo un proceso destilativo de separación. Una vez calculada la volatilidad relativa, se construyó la curva de equilibrio líquido – vapor para la carvona en el aceite esencial destilado a presión reducida para determinar las condiciones mínimas (número de etapas teóricas y relación de reflujo) requeridas para el diseño del proceso de aislamiento destilativo de la carvona.

Con base en el conocimiento de las condiciones mínimas, se realizó el fraccionamiento del aceite esencial de *Lippia alba*, obteniéndose 3 fracciones, a saber: la primera fracción rica en limoneno (componente mayoritario más volátil del aceite esencial), la segunda fracción rica en carvona, y el residuo de la destilación. A partir de este proceso se logró remover más del 95 % de limoneno presente en el aceite esencial y se consiguió separar la carvona con un alto grado de pureza (94 %), demostrando que la técnica escogida para este fin es la adecuada.

El presente trabajo consta de 55 páginas, 5 capítulos, 10 tablas, 22 figuras y 29 referencias bibliográficas, y se llevó a cabo con el apoyo del Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander y de CENIVAM

(Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Tropicales).

## 1. MARCO CONCEPTUAL

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



Familia: *Verbenaceae*

Género: *Lippia*

Especie: *Lippia alba*

Nombres comunes: Prontoalivio (Colombia) Erva Cidreira (Brazil), Juanilama (Costa Rica), Salvia Morada (Argentina).

*Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown se encuentra en regiones con clima cálido húmedo, cálido seco y templado a una altura de hasta 1800 msnm (Martínez, *et al.*, 2000). Se desarrolla en regiones con temperaturas hasta de 32°C, con alta intensidad lumínica (Ocampo y Valverde, 2000) en Latinoamérica, desde México hasta Argentina. Es un arbusto aromático que mide entre 1 y 1,5 m de altura. Sus hojas usualmente opuestas de 2-7 cm de largo, alargadas, alargadas – ovaladas, flores en espigas, con corola lila pálido, púrpura o blanco púrpura (Bandoni, A. 2000).

La planta se caracteriza por su intenso y penetrante olor. La composición química del aceite esencial depende sensiblemente del origen geográfico de la planta, las condiciones de cultivo, edad y parte de la planta que se emplea para la extracción así como de la técnica que se utiliza. La familia de las Verbenáceas tiende a presentar variaciones fitoquímicas, en particular la especie *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. No habiendo ninguna diferencia morfológica en plantas de distinta procedencia, se presenta variación en la

composición química de su aceite esencial (Guzmán R. et al. 2004). Para esta especie en particular, se han encontrado dos quimiotipos en Brasil; los cuales se caracterizan por el monoterpeno que se encuentra en mayor proporción. En el primer quimiotipo es citral (63%) y en el segundo quimiotipo, carvona (54,7%) (Matos *et al.*, 1996).

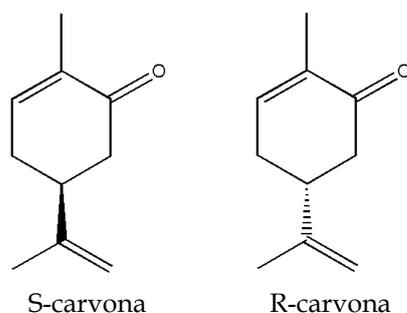
Para *Lippia alba* se han reportado 7 quimiotipos (Hennebelle *et al.*, 2008). El primer quimiotipo se caracteriza por tener citral, linalool y  $\beta$ -cariofileno como constituyentes principales. Para el segundo quimiotipo, el principal componente del aceite esencial es la tagetenona. El tercer quimiotipo, contiene limoneno y carvona, el cual es el más común para *Lippia alba*. El cuarto quimiotipo, corresponde al mirceno como componente mayoritario, el quinto, al  $\gamma$ -terpineno, el sexto quimiotipo se caracteriza por el alto contenido de 1,8-cineol y el último quimiotipo identificado contiene estragol como componente principal.

La *Lippia alba* ha sido reconocida por su gran variedad de usos tradicionales como analgésico-antiinflamatorio-antipirético, como sedante, como remedio para la diarrea y disentería y para afecciones gastrointestinales; también se ha utilizado en el tratamiento de enfermedades hepáticas, para el dolor de vesícula; así como para el tratamiento de enfermedades respiratorias, alteraciones menstruales y como antiespasmódico (Pascual, M. *et al.*, 2001; Oliveira, D. *et al.*, 2006). Además de sus usos tradicionales tiene una gran aplicación farmacológica como agente antimicrobiano, antiviral, citoestático y anticonvulsionante, reforzando los usos tradicionales como analgésico-antiinflamatorio-antipirético y sedante (Pascual, M. *et al.*, 2001).

## **1.2 CARVONA**

La carvona es un monoterpeno oxigenado quiral que puede encontrarse en los aceites esenciales de diversas plantas, principalmente en la alcaravea (*Carum*

*carvi*) y en la conocida menta verde (*Mentha spicata*). Los terpenos comprenden una gran cantidad de componentes vegetales que tienen un origen biosintético común. La carvona puede presentarse en sus dos formas enantioméricas (**Figura 1**).



**Figura 1.** Estructuras enantioméricas de la carvona.

La R-carvona tiene el olor dulce característico de la menta, mientras que la S-carvona tiene un olor característico de la alcaravea (*Carum carvi*), similar al anís y al hinojo. Los usos que han sido reportados para el enantiómero R-carvona se han clasificado en categorías según su área de aplicación. Este enantiómero ha presentado actividad antimicrobiana, siendo efectivo contra una amplia gama de hongos y de bacterias patógenos humanos. En el campo medicinal, la S-carvona fue clasificada con un agente potencial preventivo, ya que su actividad anticarcinogénica está relacionada con su capacidad para inducir un aumento en la actividad de enzimas detoxificantes. Simultáneamente se ha estudiado el mecanismo de acción de los terpenos y su influencia en la prevención del estrés oxidativo, la carcinogénesis y en las enfermedades cardiovasculares (C.C.R. de Carvalho et al. 2006).

### 1.3 EQUILIBRIO LÍQUIDO – VAPOR

Para la separación de una mezcla de analitos volátiles por destilación fraccionada se requiere que la composición de la fase vapor de la mezcla volátil difiera de la composición de la fase líquida de la mezcla. La facilidad con la que

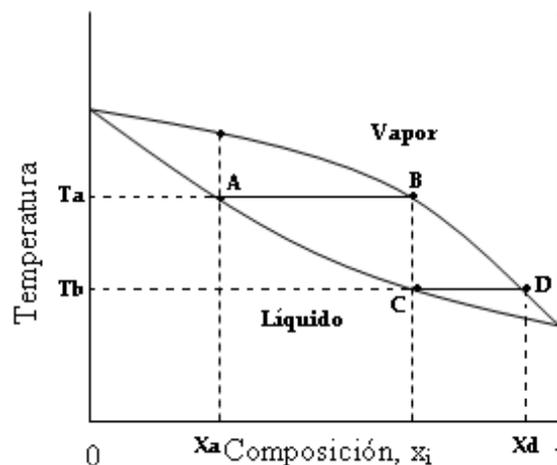
se puede llevar a cabo la separación de los componentes volátiles de una mezcla está relacionada con la diferencia en la concentración del(los) analito(s) de interés en las fases líquida y vapor; mientras la concentración en fase vapor sea significativamente mayor que en la fase líquida el proceso de separación se podrá llevar a cabo fácilmente (Uusi-kyyny, P, 2004). La relación de composición de un analito en las fases líquida y vapor de una matriz puede ser determinada de forma experimental, midiendo las concentraciones en equilibrio de ambas fases, lo cual es de gran ayuda en el diseño de procesos de destilación fraccionada.

En el diseño de una columna para un propósito específico, es necesario conocer la curva de equilibrio líquido-vapor para el sistema a destilar. La curva de equilibrio es graficada luego de una serie de determinaciones individuales de la concentración del analito de interés en las fases vapor y líquida en el equilibrio. Para construir estas curvas, las determinaciones se realizan en mezclas que varían su composición, partiendo del compuesto puro de menor punto de ebullición, hasta alcanzar una composición donde sólo se encuentre el compuesto de mayor punto de ebullición. En conclusión, la determinación de la curva de equilibrio consiste en establecer la composición de muestras de vapor condensado y del líquido en equilibrio.

Varios métodos han sido empleados con este fin. El primero de ellos es la destilación simple de una pequeña cantidad de vapor que proviene de un recipiente con una gran cantidad de líquido. Este método posee el problema que durante la destilación se presenta el fenómeno de reflujo, el cual varía la composición del vapor a destilar, enriqueciéndolo en el componente más volátil. El segundo método consiste en hacer pasar vapor cuya composición es constante a través del líquido hasta alcanzar el equilibrio; sin embargo, se presenta una gran dificultad en el manejo experimental de la técnica. Por último, el tercer método consiste en vaporizar parte del líquido, condensar sus vapores y luego hacer recircular este condensado a través de líquido hasta

alcanzar el equilibrio. Algunos requisitos que deben cumplirse para asegurar su eficiencia sin errores son: que el líquido debe ser vaporizado y condensado sin permitir algún reflujo entre la primera vaporización y la última condensación. Este reflujo debe evitarse ya que proporciona las condiciones para enriquecer el vapor en el componente más volátil, alterando la composición real del equilibrio. En segundo lugar, el arrastre de líquido no vaporizado por el vapor da una composición menor que la composición real del equilibrio del componente más volátil. Tercero, la composición del material en el recipiente debe permanecer constante. Cuarto, ninguna parte del aparato debe ser sobrecalentada lo suficiente como para causar vaporización total en lugar de una vaporización en equilibrio, lo que ocasiona una disminución en la composición del componente más volátil. Y por último, el calentamiento en la mezcla debe ser homogéneo (Uusi-kyyny, P, 2004). Este último método fue el empleado para el desarrollo de este proyecto. La información obtenida se presenta básicamente de 2 formas, la primera en diagramas de temperatura – composición y la segunda en diagramas de composición líquido – vapor.

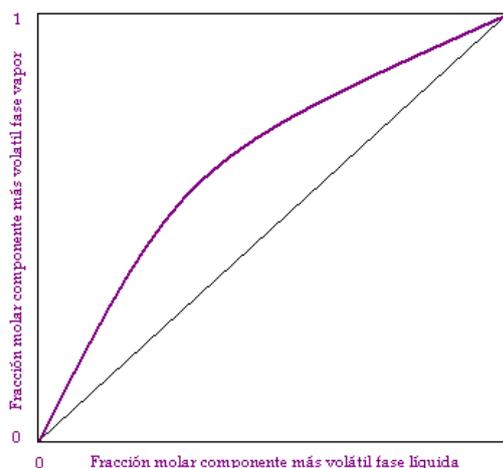
**1.3.1 Diagramas de temperatura – composición.** En los diagramas de temperatura – composición (**Figura 2.**) se relacionan la composición de las fases líquida y vapor a diferentes temperaturas y a una presión establecida (presión constante).



**Figura 2.** Diagrama de Temperatura-Composición para un sistema binario.

El diagrama anterior representa un sistema ideal de dos componentes, donde la línea inferior del diagrama determina la composición de la fase líquida, mientras que la línea superior define la composición de la fase vapor del componente más volátil. Los puntos en la región media describen estados en los cuales coexisten en equilibrio líquido y vapor. La línea de unión (línea AB de la **Figura 2.**) de la región líquido-vapor comunica la composición del vapor que coexiste con el líquido a esa temperatura ( $T_a$ ). Para los procesos de destilación fraccionada las etapas que se realizan están dadas en la **Figura 2** por las líneas AB, BC y CD. La línea AB indica las composiciones en equilibrio a la temperatura A ( $T_a$ ) de ambas fases (líquido y vapor). La línea BC consiste en la condensación del vapor de composición inicial hasta una temperatura B ( $T_b$ ) para obtener un líquido de esta misma composición. Simultáneamente, este líquido está en equilibrio con vapor cuya composición está dada por  $X_d$  (Robinson, 1950). De esta manera se pasa de un líquido cuya composición inicial es  $X_a$  a un líquido de composición  $X_d$ , enriqueciéndolo en el (los) componente (s) más volátil (es). Este proceso realizado consecutivamente es la base de la destilación fraccionada, donde cada etapa consiste en condensación y re-evaporación.

**1.3.2 Diagramas de equilibrio líquido – vapor.** Para la elaboración de los diagramas de equilibrio líquido – vapor se utiliza la misma información que en los diagramas de temperatura – composición solo que se grafica composición de vapor vs. composición de líquido a temperatura o presión constante como se muestra en la **Figura 3.**



**Figura 3.** Diagrama equilibrio líquido – vapor para un sistema de dos componentes.

En este tipo de diagramas se grafican directamente las parejas de composiciones en equilibrio. La línea a 45° representa cuando el vapor y el líquido tienen la misma composición (Robinson, 1950). Estos diagramas no dan una información completa debido a que en ellos se elimina la información que proporciona la temperatura como sí la dan los diagramas de temperatura – composición. Sin embargo, son de gran importancia para el diseño de procesos destilativos.

Otra manera de determinar la curva de equilibrio se basa en la volatilidad relativa ( $\alpha$ ) del componente más volátil respecto a la mezcla. El concepto de volatilidad relativa fue introducido con el fin de tener algún término que midiera el grado de separación a esperar cuando dos compuestos son fraccionados. Para sistemas ideales la volatilidad relativa está definida como la relación de la presión de vapor del componente más volátil sobre la presión de vapor del menos volátil a la temperatura a la cual el fraccionamiento se llevará a cabo. A mayor valor de  $\alpha$ , más fácil será la separación. Para sistemas no ideales la volatilidad relativa está definida en función de las fracciones molares (o en peso) del compuesto más volátil en las fases en equilibrio, según la relación mostrada en la **Ecuación 1**. (Carney, T. 1949)

$$= \frac{(1-x)y}{(1-y)x} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde

x: Fracción molar (o en peso) del componente clave más volátil en fase líquida.

y: Fracción molar (o en peso) del componente clave más volátil en fase vapor.

Para sistemas multicomponentes se establecen los 2 componentes claves de mayor interés para el proceso. El más volátil que se obtiene en el destilado y el menos volátil que queda en el fondo de la destilación. Una vez establecidos los componentes claves, la volatilidad relativa para el componente más volátil se calcula aplicando la **Ecuación 1**, teniendo en cuenta que para el intervalo de temperatura trabajado  $\alpha$  debe ser constante (Carney, T. 1949).

Una vez calculada la volatilidad relativa, despejando y de la **Ecuación 1**, se obtiene la **Ecuación 3** que se emplea para graficar la curva de equilibrio líquido vapor en función de x.

$$= \frac{\alpha x}{(1+(\alpha-1)x)} \quad \text{Ecuación 2}$$

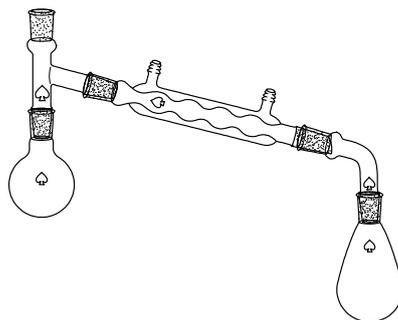
#### 1.4 DESTILACIÓN

La destilación es una técnica que consiste en la separación de los componentes de una mezcla por volatilización parcial de la mezcla, en la que se recolectan separadamente, el líquido destilado y el residuo. En un sistema cerrado existe un equilibrio de fases entre el líquido y el vapor del sistema. En el momento en que se realiza una destilación, el vapor es removido del sistema y condensado como destilado. Así, la condición de equilibrio cambia y el sistema poco a poco va enriqueciendo la fase vapor con los componentes más volátiles que van siendo removidos simultáneamente del sistema para romper

nuevamente el equilibrio. A medida que el vapor se va enriqueciendo respecto a un componente volátil, mejor será la eficiencia de separación (Carney, T. 1949).

Hay dos métodos generales de destilación, continuo y discontinuo (por lotes), la operación en continuo se da comúnmente a nivel industrial, cuando el material a destilar puede ser cargado continuamente sin interrumpir la destilación. Mientras que la operación por lotes predomina en trabajo de laboratorio e industrialmente, cuando la cantidad de material a destilar no es suficiente para mantener un proceso en continuo.

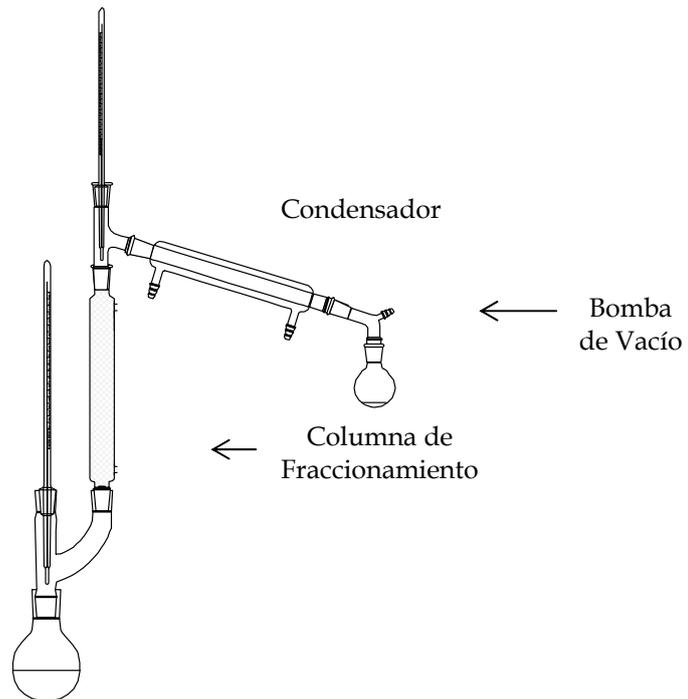
**1.4.1 Destilación por lotes.** El proceso de destilación por lotes consiste en destilar una cantidad específica de una mezcla líquida y obtener un destilado. En la **Figura 4** se muestra el montaje para una destilación simple en modo discontinuo a escala laboratorio, el cual consiste en un recipiente unido a un condensador y un recipiente recolector. Hay dos tipos de destilación por lotes; la destilación simple que se emplea con frecuencia en montajes de laboratorio cuando la diferencia de los puntos de ebullición de los componentes a separar es mayor de 30 °C. Y la destilación con rectificación o columna de fraccionamiento cuando la diferencia es menor de 30 °C (**Figura 5**)



**Figura 4.** Montaje de destilación por lotes simple.

La destilación con fraccionamiento consiste en una serie de volatilizaciones y condensaciones continuas en una misma columna; esto con el fin de

enriquecer, respecto a un componente volátil específico, el vapor que es removido en la parte superior de la columna. Cuando la mezcla volatilizada es enfriada a tal punto que los componentes con mayor punto de ebullición son condensados, ocurre un enriquecimiento de los componentes con menor punto de ebullición en fase vapor los cuales son retirados de la columna. El montaje empleado a nivel de laboratorio se presenta en la **Figura 5**.



**Figura 5.** Montaje a nivel de laboratorio para la destilación fraccionada con adaptación para vacío.

La destilación discontinua con fraccionamiento se emplea para la obtención de productos en un rango de composición específica. Inicialmente se carga el líquido a destilar y la columna es operada bajo reflujo total hasta encontrar un estado estacionario. Una vez alcanzado este estado, parte del destilado removido del sistema es devuelto a la columna; la relación de lo que se devuelve y lo que se remueve de la columna se denomina relación de reflujo (R). Esta condición se mantiene hasta extraer la mayor cantidad de destilado posible, cuya composición sea acorde a la deseada. Además, es posible sacar

fracciones, recibiendo el destilado en diferentes recipientes, dependiendo de la composición del destilado y/o de la temperatura de destilación.

En las destilaciones por lotes la columna opera como una sección de enriquecimiento. A medida que avanza el proceso de destilación, la composición del material destilado disminuye en el componente más volátil, mientras que el destilado combinado alcanza la composición deseada (Perry, R., 1999).

Para la destilación por lotes de sistemas multicomponentes la complejidad del problema depende de cuántos componentes están involucrados, qué producto se desea separar y el grado de separación que se requiera. El problema del diseño se hace más fácil cuando el componente más volátil es el que se retira de la columna con un grado más alto de pureza que el siguiente componente más pesado que compone la mezcla (Hengstebeck, 1961). Para el caso del aceite esencial de *Lippia alba* el componente de interés que es retirado de la columna es la carvona.

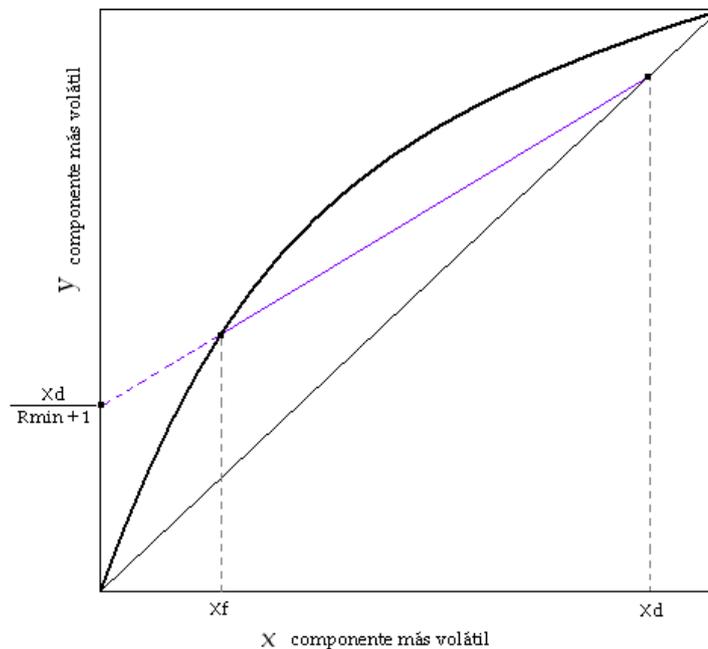
## **1.5 MÉTODO DE McCABE Y THIELE**

Existen varios métodos para la determinación del número de platos teóricos y la relación de reflujo requeridos para un proceso de separación; éstos se basan en datos termodinámicos de la mezcla a separar, principalmente la volatilidad relativa y coeficientes de actividad, de los cuales se pueden obtener las curvas de equilibrio líquido – vapor. Éstas son empleadas para determinar el número de etapas teóricas y la relación de reflujo, mediante la aplicación del método gráfico de McCabe – Thiele.

El método de McCabe – Thiele se basa en la representación gráfica de los balances de materia del sistema en el diagrama de equilibrio líquido – vapor de una mezcla determinada (Perry, R. 1999). En procesos de diseño de columnas para destilación por lotes, una vez conocida la curva de equilibrio líquido – vapor, se grafica la composición del destilado que se quiere obtener y se une con el punto de la composición del vapor en equilibrio de la alimentación  $X_f$  (**Figura 6**). Una vez trazada esta recta, se lleva hasta el punto de intersección con el eje y, donde se obtiene el reflujo mínimo a partir de la **Ecuación 3**;

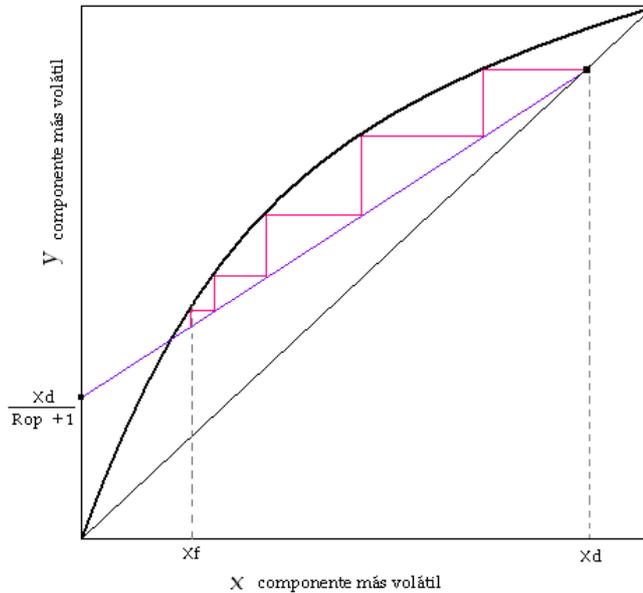
$$y_{\text{int}} = \frac{X_d}{R_{\text{min}} + 1} \quad \text{Ecuación 3}$$

Una vez despejado el valor de  $R_{\text{min}}$  de la **Ecuación 3** (Kister, 1992), se escoge un valor de reflujo operacional que es aproximadamente 1.5 a 10 veces  $R_{\text{min}}$ ; este reflujo operacional es determinado experimentalmente (Hengstebeck, 1961).



**Figura 6.** Determinación gráfica de la relación de reflujo mínima.

Ya determinado el valor de reflujo operacional ( $R_{op}$ ), se determina el nuevo valor de intersección con  $R_{op}$ , a partir de la **Ecuación 3**, reemplazando  $R_{min}$  por  $R_{op}$  y se prosigue a graficar una recta que una los dos puntos  $X_d$  y  $Y_{int}$ , (**Figura 7.**)



**Figura 7.** Diagrama McCabe – Thiele. Destilación por lotes. Determinación número de platos teóricos a reflujo operacional ( $R_{op}$ ).

Con la línea de rectificación graficada, se prosigue a determinar el número de etapas teóricas requeridas para el grado de separación deseado trazando líneas paralelas a los ejes  $x$  y  $y$  y desde el punto  $X_d$  hasta llegar o pasar por el punto  $X_f$ , tocando siempre las líneas de equilibrio y de rectificación, como se observa en la **Figura 7.** (Kister, 1992).

Con el número de etapas teóricas requeridas y el reflujo operacional de trabajo es posible emplear una columna apropiada que cumpla con estas condiciones y que permita el aislamiento del (los) componente (s) de interés.

## 1.6 ANÁLISIS CIENCIOMÉTRICO

La cienciometría permite hacer una revisión del estado investigativo de un tema de interés específico, usa técnicas matemáticas y el análisis estadístico para investigar las características de la investigación científica. Además, se ha considerado como un instrumento de la sociología de la ciencia, incluye el análisis de factores que pueden ser determinantes para el desarrollo de la actividad científica como lo son el número de investigadores, su distribución geográfica o por especialidad, fuentes de financiamiento y productividad.

La comunicación y la información son intrínsecas a la práctica de la ciencia. La investigación es estimulada y se sustenta por un flujo constante de nueva información. Cuando el ciclo de información se completa, otra vez se suministra nueva información en una iteración infinita, generando un ciclo renovado de creación y de descubrimientos, de ahí la gran importancia de la cienciometría como técnica de información y comunicación.

El análisis cienciométrico para este proyecto se realizó empleando dos bases de datos reconocidas, *Scopus* y *Web of Science*. La búsqueda se realizó el 15 de agosto de 2008.

En la **Tabla 1** se muestran los resultados para la búsqueda en las bases de datos con las respectivas ecuaciones de búsqueda.

Como lo muestra la **Tabla 1**, los temas relacionados con la aplicación de la destilación fraccionada y las curvas de equilibrio líquido vapor al procesamiento de aceites esenciales hasta ahora están comenzando a ser investigados. Las

áreas de mayor investigación son la agricultura y ciencias biológicas junto con la química y la ingeniería química. En consecuencia, las revistas con mayor número de publicaciones son *Journal of Supercritical Fluids* donde se encuentran varias de las publicaciones sobre equilibrio líquido vapor aplicado a los aceites esenciales. Entre las más relevantes, están las publicadas por Reverchon en 1997 y Stievano en 2005, donde se determina la solubilidad de algunos compuestos en CO<sub>2</sub> supercrítico con el fin de aislarlos a partir de estas condiciones. Además, Reverchon aplicó esta técnica especialmente para aislar carvona, citral y limoneno de diferentes aceites esenciales.

Otra publicación relacionada, fue la publicada por Marteau y colaboradores en 1995, donde determinaron el equilibrio líquido – vapor para sistemas CO<sub>2</sub> – limoneno y CO<sub>2</sub> – citral, con el fin demostrar que estos compuestos pueden ser aislados empleando técnicas con fluidos supercríticos

Otra revista de impacto científico en los temas mostrados en la **Tabla 1**, fue *Fluid Phase Equilibria* donde se encontró un estudio realizado por Zamar *et al.* en 2005, donde plantean una metodología para desarrollar modelos que representen cada una de las etapas del proceso de separación para la planeación de una destilación discontinua en columna para sistemas con un número extenso de componentes y cuyo rendimiento puede ser mejorado variando las condiciones de proceso, como es el caso de la rectificación de aceites esenciales empleando un programa computacional denominado *HYSYS*. Sin embargo, cabe destacar que la información requerida por el programa sobre los terpenos que comúnmente constituyen los aceites esenciales aún no es completa y por lo tanto no se han podido desarrollar estas metodologías para algunos aceites esenciales.

Otro de los estudios significativos para este proyecto, fue el desarrollado por Delaquis y colaboradores, donde lograron aislar carvona al 99,7 % del aceite esencial de *Anethum graveolens* empleando destilación fraccionada a presión

reducida con una columna empacada de 6,2 m de altura y relación de reflujo 10:1, demostrando así que es posible obtener un producto con un alto grado de pureza empleando técnicas destilativas, siempre y cuando las condiciones operacionales sean las adecuadas, lo cual es básicamente el motivo de este proyecto.

Sampaio de Sousa y colaboradores en el 2004 estudiaron el sistema etano-aceite de cáscara de naranja. En este trabajo midieron los puntos de rocío y burbuja para las fracciones molares de etano desde 0.1 hasta 0.9988 con un rango de presión de 1 – 10 MPa y un intervalo de temperatura entre 282 – 363 K, con el fin de construir la curva de equilibrio para este sistema. Los puntos de burbuja y de rocío encontrados para este sistema fueron comparados con los obtenidos para el sistema etano-limoneno y etano-cáscara de limón, encontrando una alta coincidencia entre estos tres sistemas a pesar de la gran cantidad de compuestos presentes en los aceites esenciales de cáscara de naranja y limón.



**Tabla 1.** Principales resultados encontrados sobre la actividad científica en el campo de la destilación fraccionada y el equilibrio líquido vapor para aceites esenciales en las bases de datos *Scopus* y *Web of Science (ISI Web of Knowledge)*. Fecha de búsqueda: 15 de agosto de 2008.

	<b>SCOPUS</b>		<b>WEB OF SCIENCE (ISI Web of Knowledge)</b>	
	<i>liquid vapor equilibrium and essential oil<sup>1</sup></i>	<i>fractional distillation and essential oil<sup>2</sup></i>	<i>liquid vapor equilibrium and essential oil<sup>3</sup></i>	<i>fractional distillation and essential oil<sup>4</sup></i>
<b>No. Total de artículos</b>	14	20	13	9
<b>Años con mayor número de publicaciones</b>	2005 (2) 2004 (2) 2002 (2)	2007 (2) 2006 (3) 2003 (5)	2008 (2) 2007 (2) 2006 (2)	2007 (4) 2006 (2) 2002 (1)
<b>Autores con mayor número de publicaciones</b>	Peters, C.J. (5) Raeissi, S. (4) Stateva, R.P. (1)	Marongiu, B. (7) Porcedda, S. (7) Piras, A. (4)	Cocero, M.J (2) Peters, C.J (2) Raeissi (2)	Farah, A. (3) Satrani, B. (3) Talbi, M. (3)
<b>Revistas con mayor número de publicaciones</b>	- <i>Journal of Supercritical Fluids</i> (7) - <i>Fluid Phase Equilibria</i> (3) - <i>Canadian Journal of Chemical engineering</i> (1)	- <i>Flavour and Fragrance Journal</i> (6) - <i>Journal of Essential Oil Research</i> (5) - <i>Acta Botanica Gallica</i> (2)	- <i>Journal of Supercritical Fluids</i> (5) - <i>Journal of Chemical and Engineering Data</i> (2) - <i>Fluid Phase Equilibria</i> (1)	- <i>Acta Botanica Gallica</i> (2) - <i>Flavour and Fragrance Journal</i> (1) - <i>Journal of Essential Oil Research</i> (1)
<b>Áreas de mayor investigación</b>	- <i>Chemistry</i> (10) - <i>Chemical engineering</i> (5) - <i>Materials Science</i> (4)	- <i>Agricultural and biological sciences</i> (18) - <i>Chemistry</i> (17) - <i>Chemical Engineering</i> (2)	- <i>Engineering, Chemical</i> (13) - <i>Chemistry, Physical</i> (6) - <i>Chemistry, Multidisciplinary</i> (2)	<i>Food Science &amp; Technology</i> (4) - <i>Plant Sciences</i> (4) - <i>Chemistry, applied</i> (2)

- 1 Ecuación de búsqueda: (TITLE-ABS-KEY(liquid vapor equilibrium) AND TITLE-ABS-KEY(essential oil\*)) AND DOCTYPE(ar OR re)
- 2 Ecuación de búsqueda: (TITLE-ABS-KEY(fractional distillation) AND TITLE-ABS-KEY(essential oil\*)) AND DOCTYPE(ar OR re)
- 3 Ecuación de búsqueda: Topic= (liquid vapor equilibrium) AND Topic=(essential oil\*) Timespan= 2001 – 2008. Databases=SCI-EXPANDED, SSCI, A&HCI.
- 4 Ecuación de búsqueda: Topic= (fractional distillation) AND Topic=(essential oil\*) Timespan= 2001 – 2008. Databases=SCI-EXPANDED, SSCI, A&HCI.

## 2. METODOLOGÍA

Este proyecto está dividido en 5 etapas. La primera consistió en el diseño y verificación del equipo para la determinación de la composición de las fases en equilibrio comparando la curva de equilibrio reportada para un sistema conocido con los datos obtenidos experimentalmente. Para este fin se utilizó un sistema de benceno y tolueno.

La segunda etapa consistió en la obtención de fracciones de aceite esencial de *Lippia alba* por destilación fraccionada a presión reducida con el fin de reducir significativamente el contenido de limoneno y de variar su contenido de carvona. Luego de obtenerlas y de cuantificar el contenido de carvona, las fracciones fueron destiladas en el equipo de equilibrio líquido vapor siguiendo el mismo procedimiento que las mezclas de benceno tolueno para determinar el contenido de carvona en equilibrio para cada una de las fases.

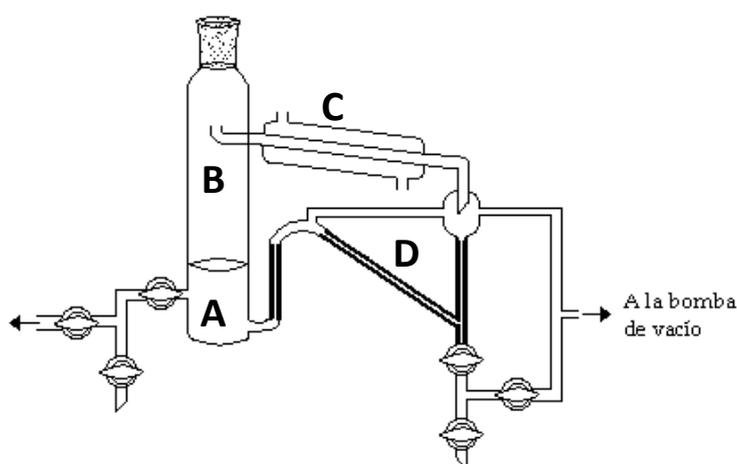
Con los datos de concentración de carvona se calculó la volatilidad relativa de la carvona respecto al aceite esencial aplicando la **Ecuación 1**. y a partir de ese dato y la **Ecuación 2** se graficó la curva de equilibrio líquido – vapor de la carvona en el aceite esencial.

Una vez graficada la curva de equilibrio, se aplicó el método de McCabe – Thiele para determinar el número de etapas teóricas requeridas para obtener carvona al 98 % p/p.

Posteriormente se destiló aceite esencial de *Lippia alba* en un equipo comercial de destilación fraccionada a presión reducida (*B/R Instrument 800 – High Efficiency Micro Distillation*), con el fin de obtener una fracción cuya concentración de carvona fuera lo más cercana a la requerida.

## 2.1 CONSTRUCCIÓN DE LA CURVA DE EQUILIBRIO LÍQUIDO – VAPOR

El diseño del equipo se realizó con base en la **Figura 8**. Este equipo consta de un reservorio (**A**) donde se agrega la mezcla a destilar, un espacio de cabeza (**B**), un condensador (**C**) y una sección de capilares (**D**) por los cuales recircula el destilado hacia el reservorio (**A**).

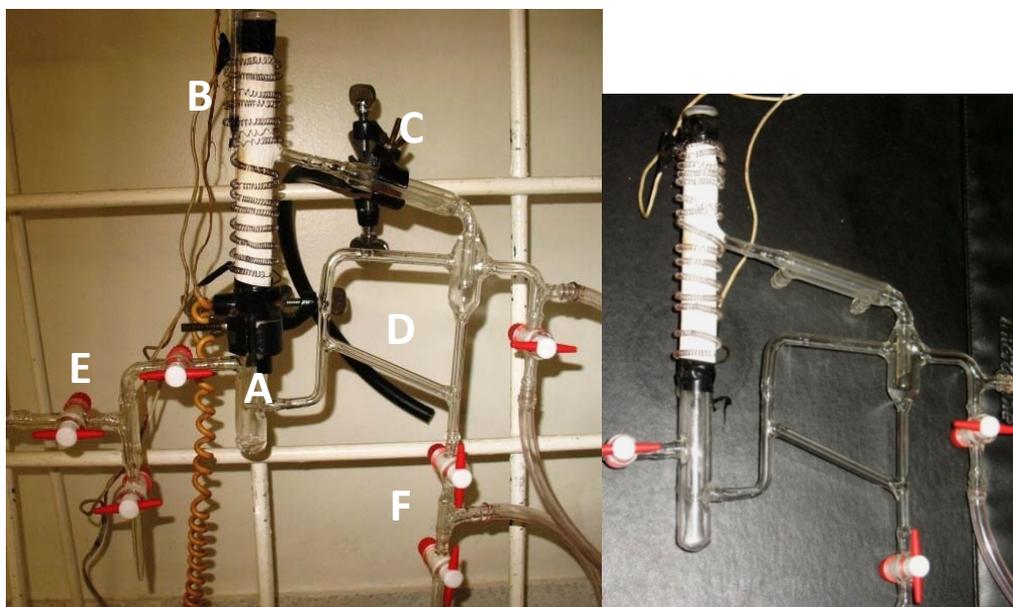


**Figura 8.** Diseño del montaje para la determinación de equilibrio líquido-vapor a presión reducida.

Una vez alcanzadas las condiciones de equilibrio las fracciones de líquido y de vapor (como destilado) son extraídas a través de las llaves adaptadas en el sistema y posteriormente analizadas. La información obtenida de la concentración del(los) analito(s) de interés en las fases en equilibrio (líquido-vapor) es representada básicamente de 2 formas, la primera en diagramas de temperatura–composición y la segunda en diagramas de composición líquido-vapor.

El montaje diseñado para determinar la composición de las fases en equilibrio se muestra en la **Figura 9**. Para asegurar el calentamiento homogéneo de la mezcla, el reservorio **A** se cubrió con una chaqueta de calentamiento y para evitar las condensaciones parciales, la temperatura en el sector **B** se controló a

través de una resistencia conectada a un controlador de temperatura DIGI-SENSE (*Cole Palmer Instrument Company*). La temperatura en este sector se mantuvo 30 °C por encima de la temperatura del líquido.



**Figura 9.** Montaje diseñado para la determinación de equilibrio líquido-vapor a presión reducida.

En la sección **A** del montaje se agregó la mezcla a destilar (4 mL) y se cerró el sistema con una tapa esmerilada por la cual se introdujeron 2 termocuplas (*Sper Scientific 2 channel thermometer*), con las que se midió la temperatura simultáneamente en cada una de las fases (líquida y vapor). Luego de cerrar el sistema, se ajustó la presión de trabajo a la establecida y se calentó la mezcla hasta aproximadamente 10 °C por debajo del punto de ebullición. Una vez alcanzada esta temperatura, se calentó lentamente hasta que la velocidad de destilación fue de 10 gotas/min. Una vez conseguida la velocidad de destilación deseada, el sistema se dejó en recirculación por 10 min aproximadamente. Pasado este tiempo se recolectaron muestras de las fases líquida y vapor (como destilado) a través de las llaves **E** y **F** respectivamente.

**2.1.1 Curva de equilibrio líquido – vapor benceno – tolueno.** Para la determinación del equilibrio líquido – vapor del sistema binario de benceno y

tolueno, se prepararon 5 mezclas de diferente composición que se reportan en la **Tabla 2**, con sus temperaturas de ebullición.

**Tabla 2.** Mezclas de benceno y tolueno para la determinación del equilibrio líquido – vapor.

Mezcla *	T <sub>eb</sub> ** (°C)
34:76	99
44:66	96
64:46	90
74:36	87
84:26	84

\* Relación molar Benceno : Tolueno

\*\* Perry's Chemical Engineers' Handbook

Cada una de estas mezclas se destiló en el equipo de equilibrio líquido – vapor siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Estos ensayos se realizaron a presión atmosférica. Cuando el sistema alcanzó la velocidad de destilación y el tiempo establecido, se tomaron muestras de cada fase, las cuales fueron almacenadas para su posterior análisis. La cuantificación de estas muestras se realizó por estándar externo bajo las mismas condiciones operacionales.

**2.1.1.1 Análisis cromatográfico de las fracciones de benceno y tolueno.** Para este análisis se utilizó un equipo *Agilent Technologies 6890 Plus Series GC System* acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5973 Inert XL Mass Selective Detector* equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (250 °C, relación de *split* 50:1), un inyector automático *Agilent Technologies 7893B Series Inyector* y un *autosampler Agilent Technologies 7863 Series*. El proceso de separación de los analitos se llevó a cabo en una columna capilar polar DB-WAX (*J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU*), con fase estacionaria entrecruzada e inmovilizada de poli(etilenglicol) de 60 m x 0,25 mm D.I. x 0,25 µm, d<sub>f</sub>. El gas de arrastre utilizado fue helio, con una presión de entrada en la cabeza de columna de 20,15 psi. La temperatura del horno se programó desde 45 °C (10 min) @ 10 °C/min hasta 200 °C (10 min). Los espectros de masas y corrientes iónicas

reconstruidas (TIC) se obtuvieron en un cuadrupolo, por medio de barrido automático de frecuencia (*full scan*), en el rango de masas de  $m/z$  40-350. Los datos cromatográficos fueron adquiridos y procesados con el sistema de datos *Hewlett-Packard MSChemStation* que incluye bases de datos Wiley versión 2002, NIST versión 2005 y QuadLib2004 (Adams).

**2.1.2 Curva de equilibrio para la carvona presente en el aceite esencial de *Lippia alba*.** Para la construcción de la curva de equilibrio de la carvona fue necesaria la obtención de fracciones cuyo contenido de limoneno fuera menor del 3 % y con un contenido de carvona variable para que abarcara todo el rango de concentraciones de la curva de equilibrio.

**2.1.2.1 Fraccionamiento del aceite esencial.** Para el fraccionamiento del aceite esencial se empleó un montaje de destilación fraccionada en vidrio como lo muestra la **Figura 6**, con una columna *Vigreux* de 20 cm de alto con el fin de remover la mayor cantidad de limoneno. Una vez cargado el aceite esencial (19,00 – 22,01 g) la destilación se realizó a 5 torr con una temperatura en la cabeza de destilación entre 50 y 60 °C hasta que el sistema dejó de destilar. Se colectaron 2 fracciones a saber: el destilado (1,95 – 3,21 g), rico en limoneno y el fondo de la destilación rico en carvona (14,71 - 16,20 g).

Con el fin de obtener fracciones cuya composición en carvona variara, el fondo de la destilación anterior se destiló nuevamente a la misma presión aumentando la temperatura hasta llegar a una temperatura en la cabeza de destilación entre 80 y 90 °C, donde se mantuvo constante y el sistema comenzó a destilar. Estas condiciones se mantuvieron hasta que el sistema dejó de destilar. Las fracciones recolectadas fueron 2, la primera fue el destilado, rico en carvona (6,59 – 7,23 g) y el fondo con un contenido de carvona menor (8,48 – 10,19 g). Las fracciones obtenidas en las destilaciones fueron almacenadas para su posterior análisis cromatográfico. Esta etapa fue realizada varias veces, hasta obtener fracciones con diferente concentración de

carvona. Por lo tanto, los pesos reportados son intervalos de las cantidades obtenidas en las destilaciones realizadas.

**2.1.2.2 Análisis cromatográfico.** Para el estudio de la composición del aceite esencial obtenido y de las fracciones se emplearon las técnicas de cromatografía de gases (GC) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) en columna apolar.

\* **GC-MS.** Para este análisis se utilizó un equipo *Agilent Technologies 6890 Plus Series GC System* acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5973 Network, Mass Selectivity Detector*, equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (250 °C, relación de *split* 30:1), un inyector automático *Agilent Technologies 7893* y un *autosampler Agilent Technologies 7863 Series*. La columna empleada en la separación de los analitos fue una columna capilar apolar DB5-MS (*J&W Scientific Folsom, CA, EE.UU*) de 60 m x 0.25 mm, D.I x 0,25 µm, d<sub>r</sub>, con fase estacionaria de 5%-fenil-poli(metilsiloxano). El gas de arrastre empleado fue helio, con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 16.47 psi. La temperatura del horno se programó de 45 °C (5 min) @4 °C/min hasta 150 °C (2 min) @5 °C/min hasta 250 °C (5 min) @ 10 °C/min hasta 275 °C (15 min). Los espectros de masas fueron obtenidos por impacto con electrones (EI) con energía de 70 eV. Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia se mantuvieron a 230 °C y 285 °C respectivamente. Los espectros de masas y corrientes iónicas reconstruidas (TIC) fueron obtenidos en un cuadrupolo, por medio de barrido automático de frecuencia (*full scan*), en el rango de masas de *m/z* 40-350. Los datos cromatográficos fueron adquiridos y procesados con el sistema de datos *Hewlet-Packard MSChemStation* que incluye bases de datos *QuadLib2004 (Adams)*, *NIST* versión 2005 y *Wiley* 2002.

\* **Identificación.** La identificación de los analitos presentes en el aceite esencial se realizó por comparación de sus índices de Kovàts y patrones de

fragmentación en los espectros de masa obtenidos, con los existentes en las bases de datos de espectros.

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>, que se corrieron en el GC bajo las mismas condiciones operacionales que los aceites esenciales. Para su determinación se empleó la **Ecuación 4**. Los índices calculados se compararon con los reportados en la literatura.

$$= 100n + 100 \left[ \frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \right] \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde:

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

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

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

$t_{Rx}$ : tiempo de retención del compuesto de interés;

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

**\* Cuantificación (estándar externo).** La cuantificación de las fracciones de aceite esencial obtenidas se realizó por estándar externo utilizando patrón certificado de carvona al 98% (*Sigma-Aldrich*). El análisis se realizó por cromatografía de gases en un equipo *Agilent Technologies 5890 Plus Series GC System* con detector FID, equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (250 °C, relación de *split* 30:1), un inyector automático *Agilent Technologies 7893* y un *autosampler Agilent Technologies 7863 Series*. La columna de separación fue capilar apolar DB-5 (*J&W Scientific Folsom, CA, EE.UU*) de 30 m x 0.25 mm, D.I x 0,25 μm,  $d_f$ , con fase estacionaria de 5%-fenil-poli(metilsiloxano). El gas de arrastre empleado fue helio, con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 16.47 psi. La temperatura del horno se programó de 45 °C (5 min) @4 °C/min hasta 150 °C (2 min) @5 °C/min

hasta 250 °C (5 min) @ 10 °C/min hasta 275 °C (15 min). Los datos fueron adquiridos y procesados en el sistema *ChemStation* HP 5890. Para la curva de calibración se prepararon soluciones de concentraciones a saber: 500, 1000, 300, 5000, 7600 y 10000 ppm. Se graficó el área cromatográfica *versus* la concentración respectiva. Las fracciones a cuantificar fueron corridas bajo las mismas condiciones operacionales.

**2.1.3 Determinación de las composiciones en equilibrio.** Para la construcción de la curva de equilibrio para la carvona presente en el aceite esencial se destilaron cada una de las fracciones obtenidas en la sección 2.1.2.1 en el montaje para la determinación del equilibrio líquido – vapor y siguiendo el mismo procedimiento que se empleó para el sistema benceno – tolueno. La presión de trabajo fue ajustada a 5 torr.

Una vez cumplido el tiempo y las condiciones de equilibrio establecidas al inicio de este capítulo, se tomaron muestras de cada una de las fases y se cuantificaron según lo establecido en la sección 2.1.2.2.3.

**2.1.4 Determinación de la volatilidad relativa.** Una vez determinado el contenido de carvona en cada una de las fases en equilibrio para cada fracción destilada, se procedió a calcular la volatilidad relativa promedio de la carvona en función de las composiciones determinadas experimentalmente aplicando la **Ecuación 1**. Con el valor promedio de  $\alpha$  se graficó la curva de equilibrio líquido vapor para este sistema luego de aplicar la **Ecuación 2**.

## **2.2 APLICACIÓN DEL MÉTODO GRÁFICO McCABE y THIELE.**

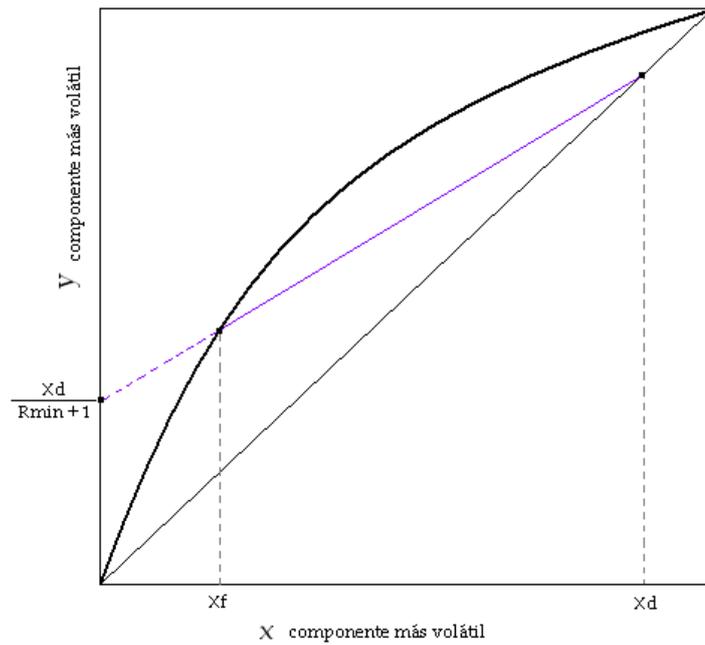
Una vez construida la curva de equilibrio se realizó el análisis gráfico de McCabe – Thiele para determinar el número de etapas teóricas y la relación de reflujo que se requiere para obtener un producto al 98 % en carvona a partir de un aceite esencial de *Lippia alba* desterpenado.

Este análisis gráfico consiste en ubicar la composición del destilado que se quiere obtener  $X_d$  (0,98 para este trabajo) y unirla con el punto de la composición en equilibrio del aceite esencial destilado  $X_f$  (**Figura 10**). Una vez trazada esta línea, se determinó el punto de intersección con el eje y, con el que se calculó la relación de reflujo mínima a partir de la **Ecuación 5**.

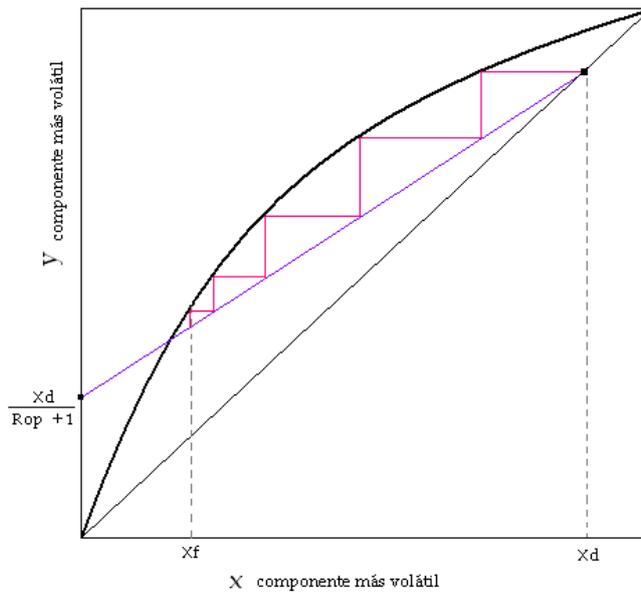
$$y_{\text{int}} = \frac{X_d}{R_{\text{min}} + 1} \quad \text{Ecuación 5}$$

Una vez calculado el valor de  $R_{\text{min}}$  de la **Ecuación 5**, se estableció un valor de reflujo operacional de  $1,5 * R_{\text{min}}$ . Una vez determinado el valor de reflujo operacional ( $R_{\text{op}}$ ), se calculó el nuevo valor de intersección para ese  $R_{\text{op}}$ , a partir de la **Ecuación 5**, reemplazando  $R_{\text{min}}$  por  $R_{\text{op}}$ .

El punto calculado para la nueva intersección se unió con el punto de la composición deseada (**Figura 11**) y sobre esta recta se determinó el número de etapas teóricas requeridas para el grado de separación establecido trazando líneas paralelas a los ejes x y y desde el punto  $X_d$  hasta llegar o pasar por el punto  $X_f$ , tocando siempre las líneas de equilibrio y de rectificación como lo muestra la **Figura 11**. Una vez trazada la “escalera” se cuenta el número de “escalones” que representan el número de etapas teóricas requeridas para la separación.



**Figura 10.** Diagrama McCabe – Thiele. Destilación por lotes. Reflujo mínimo.



**Figura 11.** Diagrama McCabe – Thiele. Destilación por lotes. Determinación del número de platos teóricos a reflujo operacional ( $R_{op}$ ).

### 2.3 DESTILACIÓN FRACCIONADA A PRESIÓN REDUCIDA

Una vez determinado el número de etapas requeridas se procedió a destilar el aceite esencial (17 g) en el equipo de fraccionamiento a escala de laboratorio

(*B/R Instrument 800 – High Efficiency Micro Distillation*) con columna con 30 etapas teóricas (**Figura 12**) con el propósito de obtener un producto con un alto contenido de carvona.



**Figura 12.** Equipo destilación fraccionada *B/R Instrument 800 – High Efficiency Micro Distillation*.

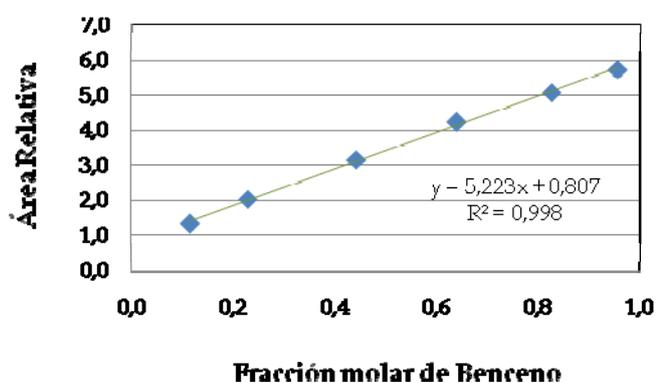
El fraccionamiento se llevó a cabo a una presión de 5 torr. La primera etapa de la destilación consistió en la remoción de limoneno. La fracción rica en limoneno fue destilada y recogida (8,50 g) a una temperatura constante en la parte superior de la columna, de 43 °C.

La segunda fracción, rica en carvona, fue recolectada (3,95 g) mientras la temperatura en el tope de la columna permaneció constante a 86 °C y hasta que el sistema dejó de destilar. Finalizada la destilación se obtuvieron 3 fracciones a saber: la fracción 1 (rica en limoneno), la fracción 2 (rica en carvona) y la fracción 3 como el residuo de la destilación (3,45 g). Estas fueron identificadas y cuantificadas según lo establecido en las secciones anteriores.

### 3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

#### 3.1 CURVA DE EQUILIBRIO LÍQUIDO – VAPOR DE BENCENO – TOLUENO

Las composiciones en equilibrio de las mezclas de benceno y tolueno preparadas se determinaron siguiendo los parámetros descritos en la metodología y se cuantificaron de acuerdo con la siguiente curva de calibración (Figura 13).



**Figura 13.** Curva de calibración empleada en la cuantificación de las mezclas de benceno y tolueno.

Las composiciones de benceno en las fases en equilibrio obtenidas se observan en la **Tabla 3**. En esta se puede observar que las temperaturas de ebullición experimentales para cada una de las mezclas son acordes a las temperaturas reportadas en la literatura.

A partir de los datos obtenidos de las fracciones molares en equilibrio de benceno y aplicando la **Ecuación 1**, se calculó la volatilidad relativa promedio como se muestra en la **Ecuación 6** y el porcentaje de error teniendo en cuenta el valor de  $\alpha$  (2,90) reportado en la literatura (Kister, H. Z. 1992) (**Tabla 4**).

$$\alpha = \frac{(1 - 0,35) * 0,62}{(1 - 0,62) * 0,35} = 3,0 \quad \text{Ecuación 6}$$

**Tabla 3.** Composiciones en equilibrio de las mezclas de benceno tolueno.

Mezcla *	T <sub>experimental</sub> (°C)	T <sub>eb</sub> ** (°C)	Fracción molar Benceno	
			Fase Líquida	Fase Vapor
34:76	100 – 101	99	0,35	0,62
44:66	97 – 98	96	0,47	0,72
64:46	90 – 91	90	0,53	0,76
	89 – 90		0,56	0,78
74:36	86 – 87	87	0,70	0,87
84:26	83 – 84	84	0,78	0,91
	84 – 85		0,79	0,92

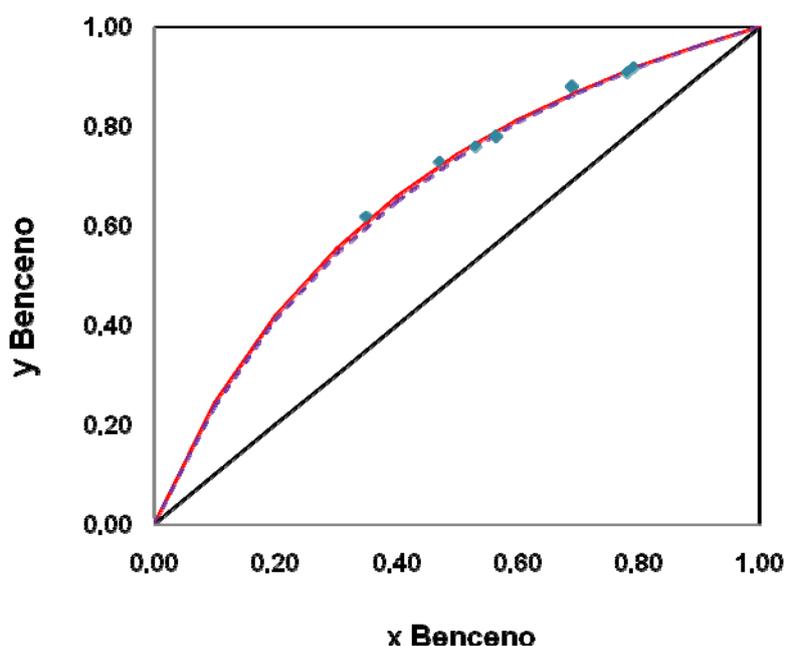
\* Relación molar Benceno : Tolueno

\*\* Perry's Chemical Engineers' Handbook

**Tabla 4.** Volatilidad relativa experimental para el sistema benceno tolueno

Fracción molar Benceno		Volatilidad relativa ( $\alpha$ )
Fase Líquida	Fase Vapor	
0,35	0,62	3,0
0,47	0,73	3,1
0,53	0,76	2,8
0,56	0,78	2,7
0,69	0,88	3,3
0,78	0,91	2,9
0,79	0,92	3,1
$\alpha_{\text{prom}} \pm \text{SD}$		3,0 $\pm$ 0,2
% CV		6,4
% Error		2,6

Con el valor promedio de  $\alpha$  determinado experimentalmente y aplicando la **Ecuación 2** se graficó la curva de equilibrio líquido vapor para el sistema benceno – tolueno (**Figura 14**).



**Figura 14.** Curva de equilibrio líquido – vapor para el sistema binario de benceno tolueno a 1 atm. Datos obtenidos experimentalmente ( $\blacklozenge$ ), curva graficada a partir de la volatilidad relativa promedio experimental (- - -) y curva calculada a partir de la volatilidad relativa reportada del benceno (—). (x: fracción molar de la fase líquida, y: fracción molar de la fase vapor)

Como se puede observar en la **Tabla 4**, el porcentaje de error calculado para la volatilidad relativa experimental fue de 2,6 % y el coeficiente de variación de 6,4 %, lo cual confirma que los datos obtenidos de las composiciones de las fases en equilibrio con el montaje diseñado, son confiables para este sistema.

### 3.2 CURVA DE EQUILIBRIO LÍQUIDO – VAPOR PARA LA CARVONA EN EL ACEITE ESENCIAL DE *Lippia alba*

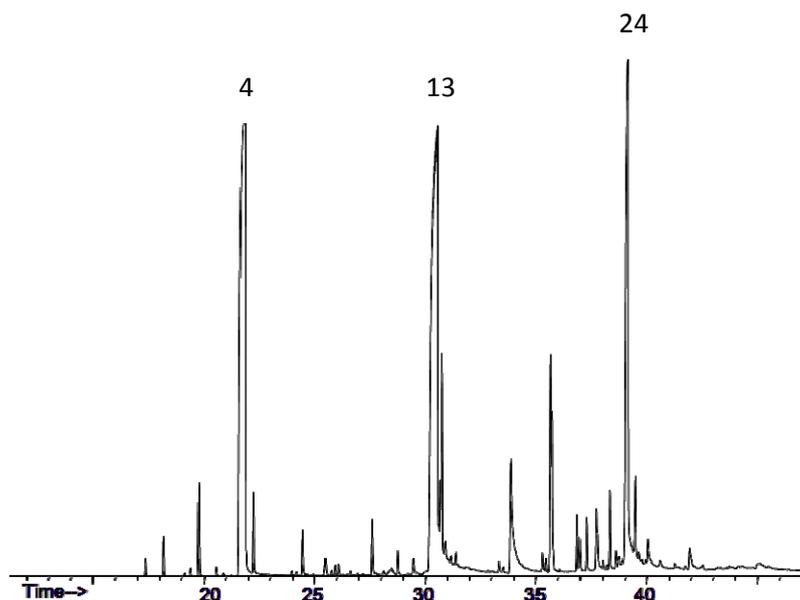
**3.2.1 Fraccionamiento del aceite esencial de *Lippia alba*.** Los componentes mayoritarios del aceite esencial de *Lippia alba* aislados e identificados por GC-MS se registran en la **Tabla 5**, según su orden de elución en la columna DB-5MS junto con los índices de retención y cantidad relativa (%). En la **Figura 15**, se ilustra el perfil cromatográfico típico de los metabolitos secundarios volátiles de *Lippia alba* obtenidos por arrastre con vapor.

**Tabla 5.** Cantidad relativa de los componentes mayoritarios del aceite esencial de *L. alba*.

N° Pico <sup>1</sup>	I <sub>k</sub> DB-5 <sup>2</sup>	Compuesto	Cantidad relativa (%)
1	940	α-Pineno	0,12
2	956	Canfeno	0,33
3	995	β-Mirceno	0,08
<b>4</b>	<b>1039</b>	<b>Limoneno</b>	<b>39,28</b>
5	1048	E-β- Ocimeno	0,12
6	1089	Terpinoleno	0,18
7	1101	Linalol	0,20
8	1124	<i>trans-p</i> -Mentha-2,8-dien-1-ol	0,28
9	1134	<i>cis</i> -Óxido de limoneno	0,13
10	1137	<i>cis-p</i> -Mentha-2,8-dien-1-ol	0,17
11	1172	Borneol	0,10
12	1198	<i>trans</i> -Dihidrocarvona	0,12
<b>13</b>	<b>1249</b>	<b>Carvona</b>	<b>35,15</b>
14	1255	Piperitona	1,07
15	1348	Piperitenona	1,20
16	1378	α-Copaeno	0,20
17	1388	β-Bourboneno + β-Elemeno	1,18
18	1390	β-Copaeno	1,08
19	1426	E-Cariofileno	0,40
20	1449	γ-Amorfeno	0,23
21	1458	<i>trans</i> -β-Farneseno	0,16
22	1464	<i>allo</i> -Aromadendreno	1,06
23	1481	Germacreno D	0,24
<b>24</b>	<b>1492</b>	<b>Biciclosesquifelandreno</b>	<b>14,24</b>
25	1502	N.I.	0,52
26	1508	N.I.	0,18

<sup>1</sup> Número de pico en la **Figura 15**.

<sup>2</sup> Índices de Kovats determinados experimentalmente en la columna DB-5.



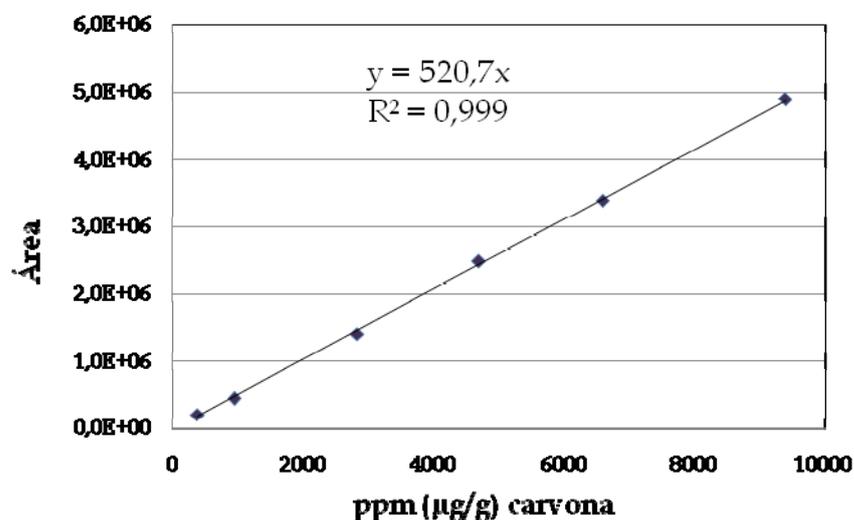
**Figura 15.** Perfil cromatográfico de metabolitos secundarios del aceite esencial de *Lippia alba* obtenidos por arrastre con vapor. Columna DB-5MS (60m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV).

La carvona presente en el aceite esencial de *Lippia alba* y en las fracciones obtenidas a partir de la destilación fraccionada a presión reducida se cuantificó según lo descrito en la sección 2.1.2.2.3. La curva de calibración empleada para este fin se reporta en la **Figura 16**.

Se obtuvieron 6 fracciones del aceite esencial con diferentes concentraciones de carvona. En la **Tabla 6**, se observa el contenido de carvona en el aceite esencial y en cada una de las fracciones que se emplearon para construir la curva de equilibrio líquido – vapor para la carvona presente en el aceite esencial de *Lippia alba*.

Es importante destacar que el contenido de limoneno en las fracciones empleadas para la determinación del equilibrio líquido – vapor fue menor del 3 % debido a que en los experimentos realizados con concentraciones mayores se encontró que los resultados obtenidos no presentaban concordancia con los demás resultados, al mostrar concentraciones en fase vapor menores que las esperadas. Esto demostró que la construcción de curvas de equilibrio debe hacerse respecto al componente más volátil, para evitar este tipo de

inconvenientes. En la **Figura 17**, se observa el perfil cromatográfico típico de las fracciones obtenidas del aceite esencial después de remover el limoneno.

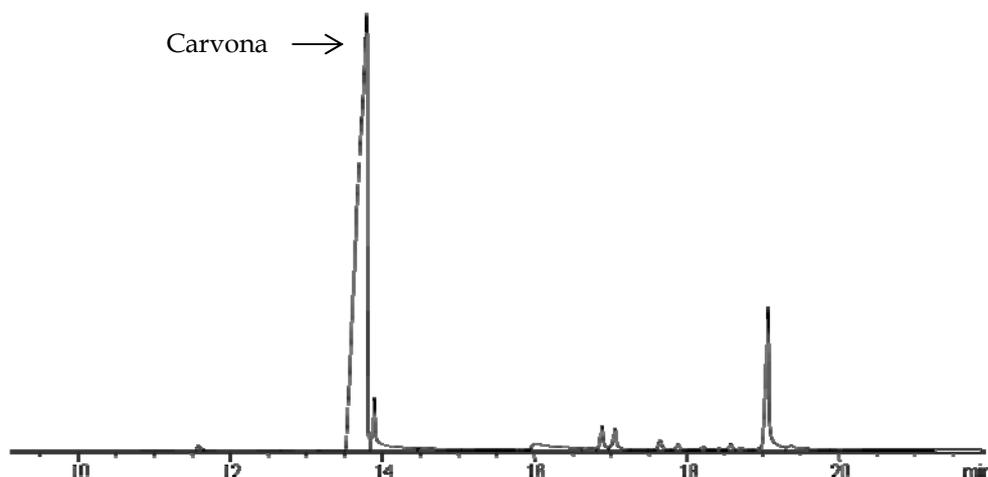


**Figura 16.** Curva de calibración para la cuantificación de carvona en las fracciones obtenidas del aceite esencial de *Lippia alba*. Columna DB-5 (30m). Detector de ionización en llama (FID).

**Tabla 6.** Contenido de carvona en el aceite esencial y en las fracciones obtenidas.

Muestra	Fracción en peso de carvona
	(g carvona/g AE)
LA*	0,38
LAF1	0,27
LAF2	0,28
LAF3	0,54
LAF4	0,64
LAF5	0,33
LAF6	0,40

\* Aceite esencial de *Lippia alba* (LA).



**Figura 17.** Perfil cromatográfico del aceite esencial de *Lippia alba* desterpenado por destilación fraccionada a presión reducida (5 torr). Columna DB-5 (30m). Detector de ionización de llama (FID).

**3.2.2 Determinación de las composiciones en equilibrio.** La determinación de la composición de las fases en equilibrio se realizó de acuerdo con lo planteado en la sección 2.1 utilizando las fracciones obtenidas de aceite esencial previamente cuantificadas. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 7**, donde aparece la muestra de aceite esencial empleada para cada punto, su temperatura de ebullición experimental y el contenido de carvona en cada una de las fases en equilibrio.

**Tabla 7.** Composiciones en equilibrio de carvona en el aceite esencial de *L. alba*

Muestra	T <sub>eb.</sub> (°C)	Fracción en peso de Carvona	
		Fase líquida	Fase vapor
LAF1	92,2 – 93,8	0,13	0,19
LAF2	92,5 – 93,5	0,14	0,20
LAF3	96,6 – 97,3	0,57	0,68
LAF4	96,9 – 98,1	0,69	0,79
LAF5	94,8 – 95,4	0,43	0,54
LAF6	94,9 – 96,1	0,44	0,58

A partir de los datos obtenidos para las composiciones de carvona en equilibrio mostrados en la **Tabla 7**, y con la **Ecuación 1**, se calculó la volatilidad relativa

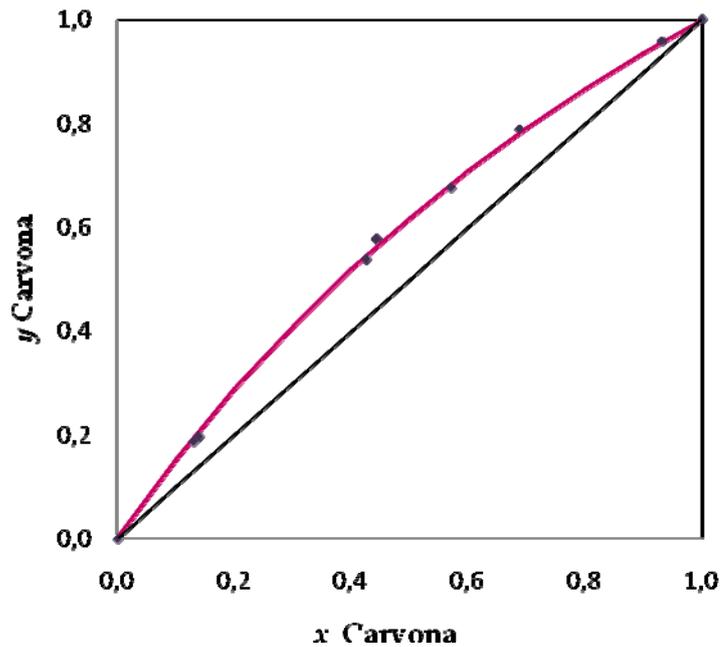
para cada punto con el fin de determinar una volatilidad relativa promedio. Los valores calculados se muestran en la **Tabla 8**.

**Tabla 8.** Volatilidad relativa de la carvona en el aceite desterpenado de *Lippia alba*.

Muestra	Fracción en peso de carvona		Volatilidad Relativa ( $\alpha$ )
	Fase líquida	Fase vapor	
LAF1	0,13	0,19	1,54
LAF2	0,14	0,20	1,51
LAF3	0,57	0,68	1,58
LAF4	0,69	0,79	1,71
LAF5	0,43	0,54	1,57
LAF6	0,44	0,58	1,71
$\alpha$ prom			1,60 $\pm$ 0,09
% CV			5,0

Un coeficiente de variación menor del 10 % indica que la variación de los datos de volatilidad relativa para el rango de temperatura al cual las fracciones fueron obtenidas, no es significativa, lo cual permite emplear el valor promedio de  $\alpha$  calculado, suponiendo que esta es constante en todo el intervalo de temperatura, para graficar la curva de equilibrio líquido – vapor, de la cual se determinan las condiciones óptimas de aislamiento para la carvona en el aceite esencial.

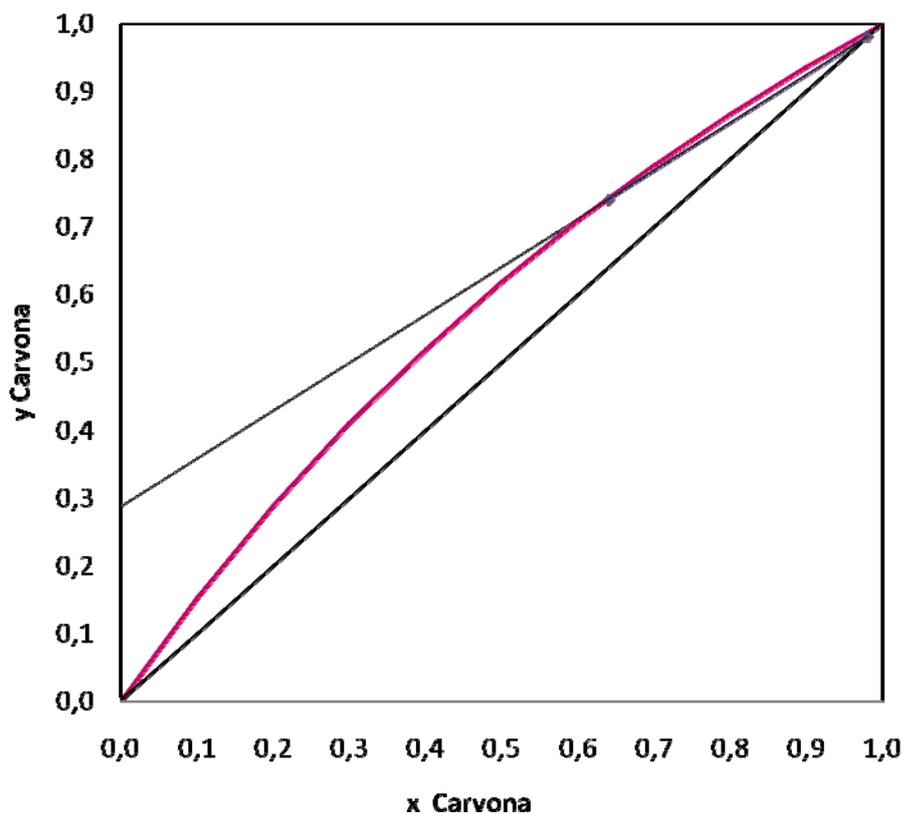
Una vez calculada la volatilidad relativa promedio para la carvona respecto al aceite esencial, se graficó la curva de equilibrio a partir de la **Ecuación 2 (Figura 18)**.



**Figura 18.** Curva de equilibrio líquido – vapor para el sistema carvona – aceite esencial a 5 torr. Datos obtenidos experimentalmente (♦) y curva graficada a partir de la volatilidad relativa promedio experimental (—). (x: fracción en peso de la fase líquida, y: fracción en peso de la fase vapor).

### 3.3 MÉTODO DE McCABE Y THIELE

Una vez graficada la curva de equilibrio, el análisis gráfico se realizó siguiendo los pasos planteados en la metodología. La cuantificación del aceite esencial destilado arrojó un contenido de carvona de 0,64 g carvona/g AE. Como se determinó al inicio de este trabajo, se buscan las condiciones para obtener un producto al 98% en carvona; teniendo en cuenta esto, se prosiguió a dibujar estos puntos en la curva de equilibrio (**Figura 19**).

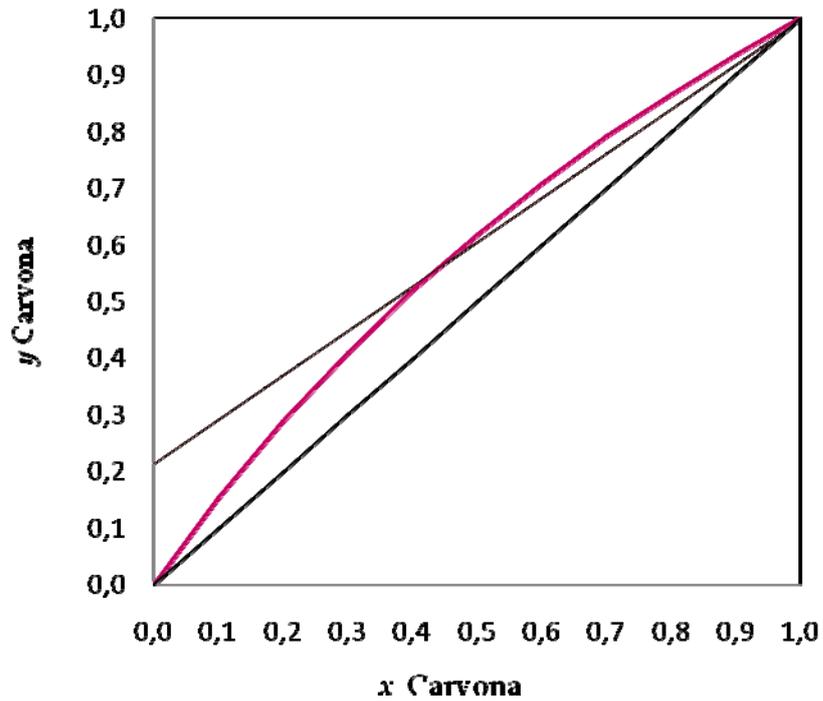


**Figura 19.** Diagrama McCabe Thiele. Curva equilibrio líquido vapor carvona – aceite esencial.  $\alpha= 1,60$ .

A partir de la línea de rectificación se determinó que el punto de corte con el eje y fue 0,29. Con este valor se despejó el  $R_{\min}$  de la **Ecuación 3** y se encontró un valor de  $R_{\min}$  de 2,4. Para el valor de reflujo operacional se optó por 1,5 veces el valor de reflujo mínimo (3,6) para determinar el número de platos. Con el valor de reflujo operacional se calculó el nuevo punto de intersección aplicando nuevamente la **Ecuación 3** como se muestra en la **Ecuación 7**.

$$\epsilon = \frac{0,98}{(3,6+1)} = 0,21 \quad \text{Ecuación 7}$$

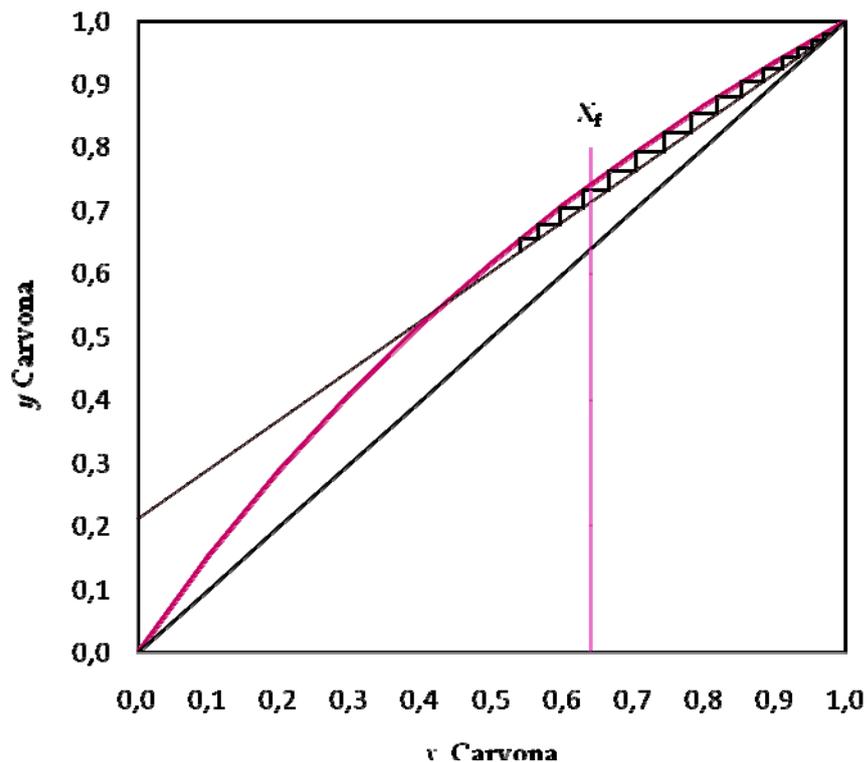
Con este nuevo intercepto se trazó la nueva recta de operación uniéndolo con el punto  $X_d$  (0,98) para determinar el número de platos requeridos para el grado de separación establecido (**Figura 20**).



**Figura 20.** Diagrama McCabe – Thiele,  $\alpha=1,60$ . Relación de reflujo 3,6.

Luego de trazar la línea de rectificación, se dibujaron los platos teóricos paralelos a los ejes como se muestra en la **Figura 21**.

A partir del gráfico se determinó que para una composición inicial del aceite esencial destemperado de 0,64 g carvona/g AE ( $X_f$ ) son necesarias 12 etapas teóricas para obtener un producto de 0,98 g carvona/g AE con una relación reflujo operacional de 3,6.



**Figura 21.** Diagrama McCabe – Thiele,  $\alpha=1,60$ . Relación de reflujo 3,6. Etapas teóricas requeridas para lograr una fracción con una concentración de 0,98 g carvona/g AE.

### 3.4 DESTILACIÓN FRACCIONADA

A partir de los datos obtenidos de la curva de equilibrio se determinó que era posible utilizar un equipo de destilación fraccionada comercial para aislar carvona del aceite esencial de *Lippia alba*. Como resultado del fraccionamiento del aceite esencial se obtuvieron 4 fracciones a saber; F1 (fracción más volátil, rica en limoneno), F1R (aceite esencial desterpenado), F2 (fracción 2 rica en carvona) y FD (residuo de la destilación). En la **Tabla 9** se muestran los componentes mayoritarios identificados para el aceite esencial (LA) y las fracciones obtenidas a partir de éste, y en la **Figura 22** se presentan los perfiles cromatográficos respectivos.

**Tabla 9.** Cantidad relativa (%) de los componentes mayoritarios del aceite esencial de *Lippia alba* y sus fracciones.

N° Pico <sup>1</sup>	I <sub>k</sub> <sup>2</sup> DB-5	Compuesto	Cantidad relativa, %				
			LA	F1	F1R	F2	FD
1	967	α-Pineno	0,12	0,27	—	—	—
2	976	Canfeno	0,33	0,54	—	—	—
3	995	β-Mirceno	0,08	0,21	—	—	—
<b>4</b>	<b>1039</b>	<b>Limoneno</b>	<b>39,28</b>	<b>95,59</b>	<b>0,69</b>	<b>1,19</b>	<b>—</b>
5	1048	<i>trans</i> -β- Ocimeno	0,12	2,40	—	—	—
6	1089	Terpinoleno	0,18	—	—	0,10	—
7	1101	Linalol	0,20	—	0,14	0,42	—
8	1124	<i>trans-p</i> -Menta-2,8-dien-1-ol	0,28	—	0,44	0,61	0,10
9	1134	<i>cis</i> -Óxido de limoneno	0,13	—	0,10	0,21	—
10	1137	<i>cis-p</i> -Menta-2,8-dien-1-ol	0,17	—	0,15	0,21	0,10
11	1172	Borneol	0,10	—	0,12	0,10	—
12	1198	<i>trans</i> -Dihidrocarvona	0,12	—	—	0,15	0,21
<b>13</b>	<b>1249</b>	<b>Carvona</b>	<b>35,15</b>	<b>—</b>	<b>68,84</b>	<b>83,54</b>	<b>54,50</b>
14	1255	Piperitona	1,07	—	4,33	1,25	2,30
15	1348	Piperitenona	1,20	—	2,72	2,04	3,70
16	1378	α-Copaeno	0,20	—	0,42	0,20	1,20
17	1388	β-Bourboneno + β-Elemeno	1,18	—	1,67	1,30	1,70
18	1390	β-Copaeno	1,08	—	1,44	0,90	0,70
19	1426	<i>trans</i> -Cariofileno	0,40	—	0,29	0,43	1,00
20	1449	γ-Amorfenol	0,23	—	0,40	0,20	—
21	1458	<i>trans</i> -β-Farneseno	0,16	—	0,30	0,10	0,40
22	1464	<i>allo</i> -Aromadendreno	1,06	—	0,40	0,30	—
23	1481	Germacreno D	0,24	—	0,39	0,20	2,10
<b>24</b>	<b>1492</b>	<b>Biciclosesquifelandreno</b>	<b>14,24</b>	<b>—</b>	<b>10,11</b>	<b>4,22</b>	<b>23,30</b>
25	1502	N.I.	0,52	—	1,37	1,03	1,30
26	1508	N.I.	0,18	—	0,78	—	1,60

<sup>1</sup> Número de pico en la Figura 21.

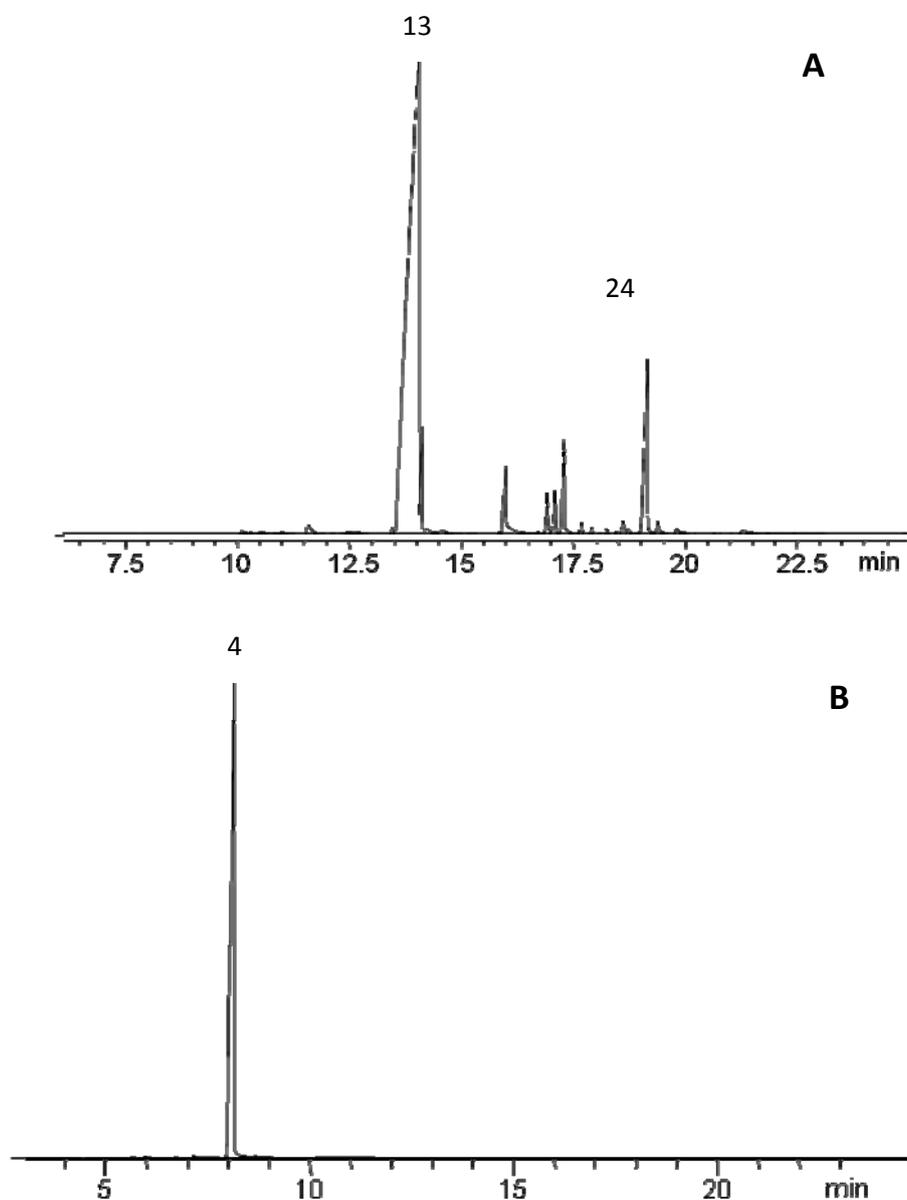
<sup>2</sup> Índices de Kovats determinados experimentalmente en la columna DB-5.

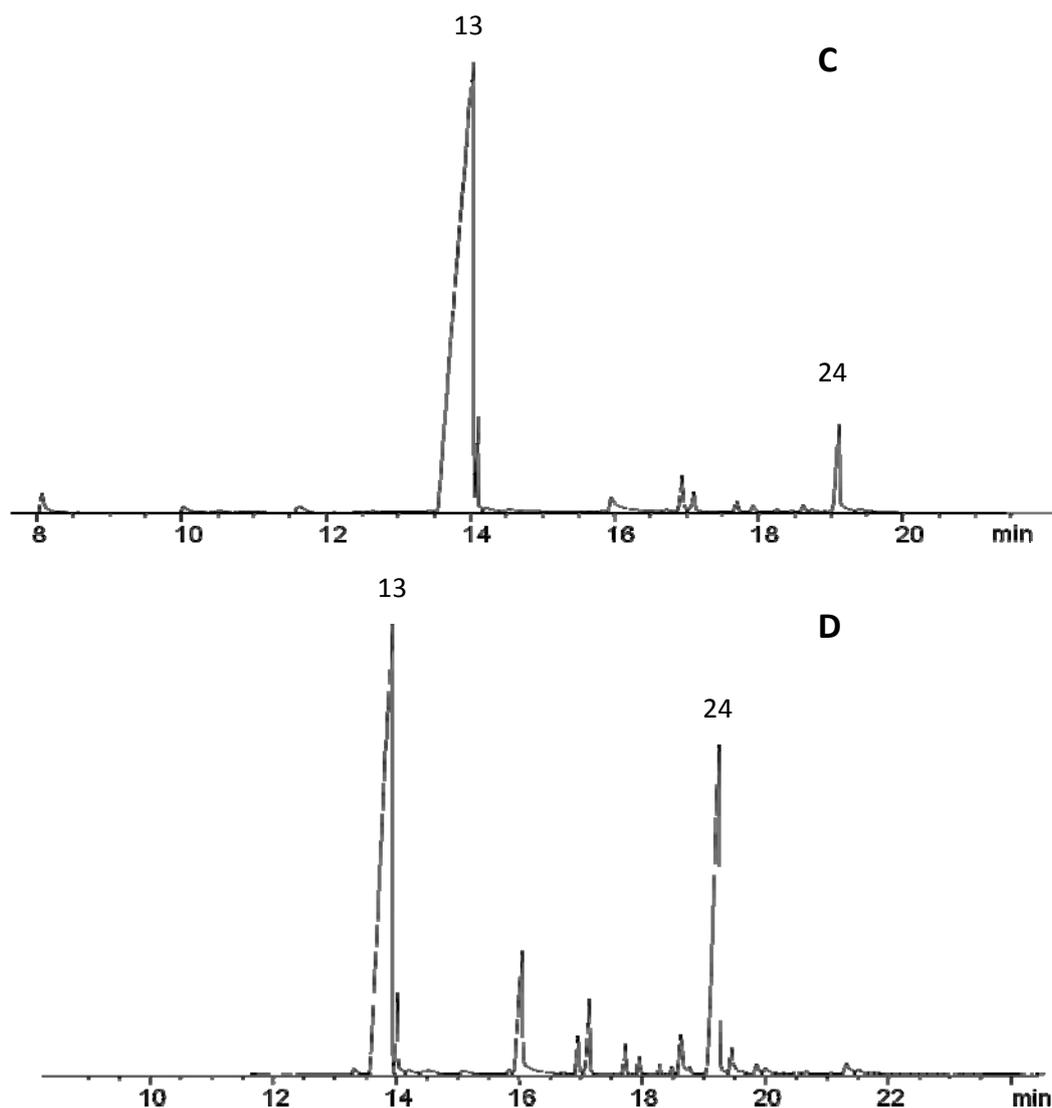
N.I. No Identificado.

— No Detectado.

Como se puede observar en la **Tabla 9**, la separación del aceite en las fracciones 1 y 2 es muy clara, ya que en F1 se observan solo los primeros 5 compuestos (los más volátiles) mientras que en F2 los compuestos comienzan a aparecer a partir del limoneno, que se encuentra en muy baja cantidad, teniendo en cuenta que los compuestos no detectados pueden estar presentes en cantidades menores de 0,1%.

Esta separación se hace más visible en las **Figuras 22b y 22c**, donde se observan los cromatogramas obtenidos para cada fracción y se observa una clara ausencia de los compuestos más volátiles del aceite en la fracción 2.





**Figura 22.** Perfiles cromatográficos del aceite esencial desterpenado (A), fracción 1 (B), fracción 2 (C) y residuo (D) obtenidos por destilación fraccionada del aceite esencial de *Lippia alba* a 5 torr. Columna HP-5 (30m). Detector de ionización en llama (FID).

Igualmente, se puede observar en la fracción 3 (**Figura 22d**) el aumento en la cantidad de biciclosquifelandreno, el cual pasó de un 14 % en el aceite esencial a un 23 % en residuo de la destilación.

Además, como se puede observar en las **Figuras 22a y 22c**, se logró remover un alto contenido de limoneno como se evidencia en la **Tabla 9**, ya que para estas dos fracciones el contenido fue inferior al 2%. Cabe resaltar que el contenido de limoneno en la fracción 1 fue superior al 95 %, lo cual muestra la

capacidad de separación que tiene la columna empleada durante esta destilación.

La cuantificación por estándar externo de estas fracciones arrojó los resultados que se muestran en la **Tabla 10**, Se destaca la fracción 2 donde se determinó que el contenido de carvona fue de 0,94 g carvona / g AE.

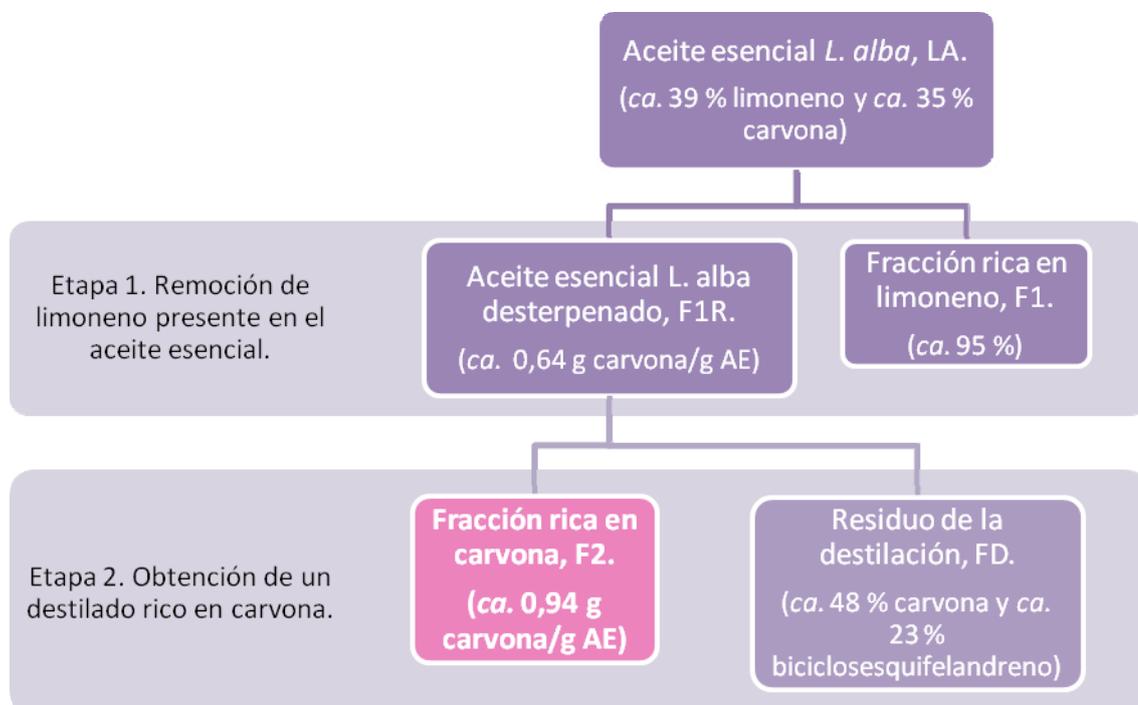
**Tabla 10.** Concentración de carvona en aceite esencial y fracciones obtenidas.

Fracción	g carvona/g AE
LA	0,38
F1	< 0,01
F1R	0,68
F2	0,94
FD	0,48

En el **Figura 23**, se muestran los pasos seguidos para obtener un producto rico en carvona mediante destilación fraccionada a presión reducida. En ella se plantean dos destilaciones consecutivas. La primera se realizó con el fin de eliminar la mayor cantidad de limoneno posible y así, obtener un aceite esencial destemperado cuyo componente mayoritario y más volátil fuera la carvona. La segunda destilación consistió en el aislamiento de la carvona, como destilado en el proceso de destilación, esta etapa se consideró como la más importante debido a que las condiciones que fueron empleadas en ella afectaron directamente la concentración de carvona en el producto final.

Como se observa en la **Figura 23**, a partir de un aceite cuya composición en carvona fue de ca. 0,38 g carvona/g AE, se logró obtener un producto rico en carvona (ca. 0,94 g carvona/g AE) mediante procesos destilativos, los cuales están basados principalmente en la información que proporcionan las curvas de equilibrio líquido vapor. El porcentaje de recuperación de carvona del aceite esencial fue de 57,5 %, como fracción al 0,94 g carvona/g AE, teniendo en cuenta que se destilaron inicialmente 17 g de aceite y que se recolectaron 3,95

g de carvona al 94 % de pureza y que en el residuo de la destilación (3,45 g) la concentración de carvona fue de 0,48 g carvona/g AE.



**Figura 23.** Etapas para el aislamiento de carvona a partir de aceite esencial de *Lippia alba*.

Es importante destacar que aunque se logró obtener producto con alto contenido de carvona, en el residuo de la destilación la concentración de carvona continúa siendo elevada por lo cual se podría llegar a obtener más cantidad destilado en la fracción 2. Sin embargo, se podría observar un efecto contrario debido a que la carvona destilada puede arrastrar consigo otros componentes menos volátiles, que a medida que avanza la destilación, pueden aumentar su concentración, disminuyendo la concentración final de carvona en el destilado.

Un factor importante durante el proceso de destilación es recolectar la fracción intermedia en recipientes separados, ya que hay un punto en el proceso donde termina la primera fracción y comienza a salir la segunda en donde se mezclan

estas dos fracciones disminuyendo la concentración final de la carvona debido al arrastre de componentes residuales de la primera fracción.

El control de la relación de reflujo es otro factor muy importante e influye en el número de etapas teóricas durante el proceso de destilación. Sin embargo, en el equipo empleado para este proceso, la relación de reflujo es regulada según el criterio del operador, ya que es controlada por una válvula que puede ser abierta o cerrada en cualquier momento del proceso. Esta válvula es la encargada de regular el paso del destilado hacia los recipientes de recolección respectivos. La apertura de esta válvula durante todo el proceso de destilación se reguló de manera tal que cada vez que se produjeran 4 gotas de destilado, saliera una de ellas hacia el recipiente recolector.

El método de McCabe y Thiele se aplicó para determinar la relación de reflujo operacional a la cual se llevó a cabo la destilación. Para ello se tomó como  $X_d$ , 0,94, que fue la composición del destilado obtenido y se unió con el punto de las composiciones en equilibrio para el aceite esencial desterpenado (0,64, 0,74), y se llevó hasta el intercepto con el eje  $y$ , del cual se calculó la relación de reflujo operacional (1,94). Al comparar este valor con el calculado para obtener un producto al 98 % de carvona (2,40) se observa que la relación de reflujo a la cual se trabajó fue menor, lo cual puede ser una de las razones por las cuales, a pesar que la columna tuviera más etapas teóricas que las calculadas empleando el método de McCabe y Thiele, el producto obtenido fue de menor concentración que el esperado. Como se definió en la sección 1.4.1, la relación de reflujo está definida como la relación entre el destilado que se remueve de la columna y el destilado que retorna a ella. Así, una relación de reflujo menor indica que la porción de destilado que es removida del sistema es mayor y por lo tanto se disminuye la cantidad de destilado que retorna a la columna, disminuyendo la cantidad de líquido que interacciona con el vapor que sube por la columna.

#### 4. CONCLUSIONES

Los datos obtenidos de la volatilidad relativa para la carvona presente en el aceite esencial desterpenado, mostraron una varianza igual al 5 %, demostrando que la variabilidad de los datos obtenidos para la volatilidad relativa en el rango de temperatura trabajado, no es significativa. Lo que permitió hacer una aproximación de volatilidad relativa constante para la carvona en el aceite esencial de *Lippia alba* desterpenado, estableciendo un valor igual a 1,60.

En la determinación de las concentraciones en equilibrio se evidenció la importancia de la etapa previa de destilación para eliminar limoneno del aceite esencial ya que se demostró que al aumentar la concentración de analitos más volátiles que la carvona, la concentración en la fase vapor disminuía generando datos discordantes, lo cual es acorde con lo planteado por Kister en su libro *Distillation Design* (1992), donde define las concentraciones limitantes de los componentes volátiles y no volátiles que no son claves para el proceso destilativo, lo que se relaciona para este caso como, el limoneno en el proceso de aislamiento de carvona del aceite esencial de *Lippia alba*.

Una vez construida la curva de equilibrio líquido – vapor y la aplicación del método McCabe – Thiele se determinó que para obtener un producto al 98 % p/p en carvona a partir del aceite esencial de *Lippia alba* desterpenado al 64 % p/p en carvona, se requiere una columna con 12 etapas teóricas y una relación de reflujo mínima de 2,40.

De acuerdo con la cuantificación de las fracciones obtenidas y la información que ha sido recopilada por el Centro de Excelencia de Investigación CENIVAM, se calculó que la producción anual de carvona (0,94 g carvona/g AE) sería de 82 kg por hectárea sembrada de *Lippia alba*.

## 5. RECOMENDACIONES

Se recomienda optimizar el proceso destilativo para el aislamiento de la carvona presente en el aceite esencial de *Lippia alba*, con el fin de aumentar la cantidad de producto obtenido rico en carvona. Así como el escalamiento de este proceso a nivel industrial.

También cabe recalcar que el aceite esencial de *Lippia alba* ha sido ampliamente estudiado por presentar actividad biológica, como agente antimicrobiano, antiviral y analgésico, entre otras, por lo cual se recomienda realizar estudios de actividad biológica en las fracciones obtenidas; tanto en la fracción rica en carvona como en el fondo de la destilación que tiene un contenido menor de carvona y que presenta como segundo componente mayoritario el biciclosesquifelandreno.

## BIBLIOGRAFÍA

BANDONI, A. (Ed). Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. 1ª edición. La Plata, Argentina. **2000**, p. 34-36.

CARNEY, Thomas. Laboratory Fractional Distillation. The Macmillan Company. New York. **1949**.

CARVALHO, C.C.C.R; DA FONSECA, M. M. R. Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene. *Food Chemistry* 95. **2006**, 413-422.

CASTRO, H. Aislamiento de R(-)-carvona por derivación química selectiva del aceite esencial de *Lippia alba*. Bucaramanga: Tesis de grado. Escuela de Química. Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, **2002**.

DELAQUIS, P.; STANICH, K.; GIRARD, B.; MAZZA, G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of Hill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*. 74. **2002**, 101-109.

GUZMÁN R., S.; CARDOZO Z., R.; GARCÍA N., V. Desarrollo agrotecnológico de *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown ex Britton & Wilson. *Revista científica Guillermo de Ockham*. Vol. 7 (1). Enero-Junio de **2004**.

HENGSTEBECK, R.J. Distillation. Principles and design procedures. Reinhold Book Corporation. New York, **1961**.

KISTER, H.Z. Distillation Design. McGraw-Hill. New York. **1992**.

MANEERAT, C.; HAYATA, Y.; KOZUKA, H.; SAKAMOTO, K.; OSAJIMA, Y. Application of the Porapak Q column extraction method for tomato flavor volatile analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 3401-3404.

MARTEAU, Ph.; OBRIOT, J.; TUFEU, R. Experimental determination of vapor-liquid equilibria of CO<sub>2</sub> + limonene and CO<sub>2</sub> + citral mixtures. *J. of Supercritical Fluids* 8, **1995**, 20-24.

MARTÍNEZ, J. V.; BERNAL, H. Y.; CÁCERES, A. Fundamentos de agrotecnología de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas. **2000**, Convenio Andrés Bello – CYTED. Primera edición.

MATOS, F. J.; MACHADO, M. I.; CRAVEIRO, A. A.; ALENCAR, J. W. The essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in Northeast Brazil. *Journal of Essential Oil Research* 8, **1996**, 695-698.

MOKBEL, I.; BLONDEL-TELOUK; VELLUT, D.; JOSE, J. Vapor – liquid equilibrio of two binary mixtures: benzene + *n*-tetradecane and benzene + squalene. *Fluid Phase Equilibria* 149, **1998**, 287 – 308.

NUÑEZ, A.; ZAVALETA, J. Aplicación de los métodos de contribución de grupos a la predicción del equilibrio de fases del sistema acetato de etilo – ciclohexano. Facultad de Ingeniería Química y Textil, Universidad Nacional de Ingeniería. Perú. [Sitio en Internet] Disponible en: [http://www.jackzavaleta.galeon.com/Jack\\_Paper4\\_2005.pdf](http://www.jackzavaleta.galeon.com/Jack_Paper4_2005.pdf). Acceso el 8 de abril de **2008**.

OCAMPO S., R. A. y VALVERDE R.. Manual de cultivo y conservación de plantas medicinales. Tomo I. San José, Costa Rica: Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt”, Ministerio de la Agricultura, **2000**, pp. 97-100.

OLIVEIRA, D.; LEITÃO, G.; SANTOS, S.; et al. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. Article in press. **2006**.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ M., D.; VILLAR, AL. Lippia: tradicional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology* 76, **2001**, 201-214.

PERRY, R.; GREEN, D. Perry's Chemical Engineers' Handbook. Tomo II. Segunda Parte. Sección 13. Distillation. McGraw-Hill. New York. **1999**.

PINO, J.; ORTEGA, L.; PEREZ, A.; RODRIGUEZ, J. And BALUJA, R. Composition and antibacterial properties of the essential oil of *Lippia alba* (Mill). *N.E Brown, Revista Cubana de Farmacia*, 30 (1), **1996**, 29-35.

REVERCHON, Ernersto. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. *Journal of Supercritical Fluids* 10, **1997**, 1-37.

ROBINSON, C. S.; GILLILAND, E. R. Elements of Fractional Distillation. McGraw Hill Book Company Inc. Fourth edition. New York. **1950**.

SAMPAIO DE SOUSA, A.R.; RAEISSI, S.; AGUIAR-RICARDO, A.; DUARTE, C. M. M.; PETERS, C. J. High pressure phase behavior of the system ethane + orange peel oil. *Journal of Supercritical Fluids*, 29, **2004**, 59-67.

SIMÁNDI, B.; SASS-KISS, A.; CZUKOR, B.; DEÁK, A.; PRECHL, A.; CSORDÁS, A.; SAWINSKY, J. Pilot-scale extraction and fractional separation of onion oleoresin using supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering* 46, **2000**, 183-188.

SPINAK, Ernesto. Indicadores científicos. **ACIMED**. [online]. Mayo **2001**, vol.9 supl.4 [citado 18 Diciembre 2007], p.16-18. Disponible en la World Wide Web: <[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1024-94352001000400007&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1024-94352001000400007&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 1024-9435.

STASHENKO, E.; JARAMILLO B.; MARTÍNEZ R., J. 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.*: volumen XXVII, número 105-diciembre de **2003**.

STIEVANO, M., ELVASSORE, N. High-pressure density and vapor-liquid equilibrium for the binary systems carbon dioxide-ethanol, carbon dioxide-acetone and carbon dioxide-dichloromethane. *J. of Supercritical Fluids* 33, **2005**, 7-14.

UUSI-KYYNY, P. Vapour liquid equilibrium measurements for process design. Dissertation for the degree of Doctor of Science in Technology. Helsinki University of Technology. Department of Chemical Technology. Laboratory of Chemical Engineering and Plant Design. **2004**.

VALE, T. G.; MATOS, F. J.; LIMA T. C.; VIANA, G. S. Behavioral effects os essential oils from *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown chemotypes. *Journal of Ethnopharmacology* 167, **1999**, 127 – 133.

ZAMAR, S.; SALOMONE, H.; IRRIBARREN, O. Operation planning in the rectification of essential oils. *Journal of Food Engineering* 69, **2005**, 207- 215.