



Evaluación de la composición química del aceite esencial extraído de Lippia alba

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGIA Y LABORATORIO CLINICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTA 2019-II



Evaluación de la composición química del aceite esencial extraído de Lippia alba

Estudiante:

Leslie Daniela Ordoñez Delgado

Asesora interna:

Jovanna Acero Godoy

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE BACTERIOLOGIA Y LABORATORIO CLINICO

TRABAJO DE GRADO

BOGOTA 2019-II

DEDICATORIA

A mi familia, en especial a mis padres Edmundo Ordoñez y Sonia Delgado por ser mí soporte a lo largo de toda la carrera, por estar siempre presentes y no desampararme, a mi hermana Ginna Estephany Ordoñez Delgado por ser el apoyo más grande y guiarme en todos los pasos que doy, y a todos mis amigos y compañeros que compartieron cada alegría o sufrimiento durante esta carrera.

AGRADECIMIENTOS

A la vida por ponerme donde estoy.

A mi asesora, Jovanna Acero Godoy por su orientación, apoyo y dedicación a lo largo del desarrollo de este trabajo.

A la Universidad Nacional de Colombia y a la Pontificia Universidad Javeriana por permitir el uso de sus instalaciones y equipos para el desarrollo de este trabajo de grado.

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca y el programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico por acogerme en sus instalaciones, prepararme para la vida profesional y personal.

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE TABLAS.....	9
RESUMEN	10
INTRODUCCION	11
OBJETIVOS.....	13
General.....	13
Específicos	13
1. ANTECEDENTES	14
2. MARCO REFERENCIAL.....	18
2.1 Aceites esenciales	18
2.2 Propiedades de los aceites esenciales	20
2.3 <i>Lippia alba</i>	21
2.4 Usos y propiedades del aceite esencial de <i>Lippia alba</i>	23
2.5 Métodos de extracción del aceite	26
2.6 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	28
3. DISEÑO METODOLOGICO	29
3.1 Universo, población y muestra	29
3.2 Hipótesis, variables e indicadores	29
3.2.1 Hipótesis.....	29
3.2.2 Variables	29
3.2.3 Indicadores.....	29
3.3 Técnicas y procedimientos	30
4. RESULTADOS	35
5. DISCUSIÓN.....	40
6. CONCLUSIONES.....	45
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Componentes de acuerdo al grupo funcional mayoritario.	19
Figura 2. <i>Lippia alba</i>	22
Figura 3. Procedimiento para la extracción y análisis de la planta.....	30
Figura 4. Espécimen llevado al Herbario Nacional de Colombia.....	31
Figura 5. Destilador por arrastre de vapor.....	32
Figura 6. Aceite esencial extraído	36
Figura 7. Compuestos presentes en el aceite esencial de <i>Lippia alba</i>	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2. Métodos de extracción de aceites esenciales	26
Tabla 3. Análisis físico del aceite esencial de <i>Lippia alba</i>	35
Tabla 4. Compuestos del aceite esencial de <i>Lippia alba</i>	37

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE BACTERIOLOGIA Y LABORATORIO CLINICO

Evaluación de la composición química del aceite esencial extraído de Lippia alba

RESUMEN

Los aceites esenciales son líquidos aromáticos de diferentes colores y olores los cuales varían según su procedencia; pues poseen propiedades analgésicas, digestivas, antioxidantes, citotóxicas y antimicrobianas; dentro de su entorno las plantas utilizan los aceites para interactuar entre ellas, repeler insectos o combatir enfermedades, protegerse de los rayos solares y reproducirse, puesto que el aroma atrae insectos polinizadores los cuales ayudan a la reproducción de la planta.

Para el desarrollo del presente trabajo se extrajo de las hojas y el tallo el aceite esencial de la planta *Lippia alba* o también conocida como pronto alivio, con el objetivo de evaluar la composición química del mismo, a través de la técnica de destilación por arrastre de vapor, la cual es un método sencillo, de bajo costo y permite la obtención de una muestra pura, pues en este método el vapor fluye a través del material vegetal y funciona como un agente que rompe los poros de la materia prima y libera el aceite esencial, además para conocer el comportamiento se analizaron las propiedades físico – químicas del aceite, y con tres repeticiones se logró establecer la densidad en 0.827 g/mL, índice de refracción en 1.492 y el porcentaje de rendimiento en 0.691%. Así mismo se determinó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, los compuestos que conforman este aceite, encontrando a Carvona (16,75%) y Limoneno (13.68%) como las dos sustancias más representativas del total del porcentaje de área del aceite esencial.

Palabras claves: aceite esencial, *Lippia alba*, arrastre de vapor.

Estudiante: Leslie Daniela Ordoñez Delgado

Docente: Jovanna Acero Godoy

Institución: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca **Fecha:** 4 de octubre 2019

INTRODUCCION

Considerando que en los últimos años ha habido una tendencia al consumo de alimentos naturales u orgánicos, se han incrementado las investigaciones que ayudan a resolver el problema del control de plagas o enfermedades en las plantas, sin la necesidad de recurrir al uso de plaguicidas y/o herbicidas (agroquímicos) que son productos que se ha comprobado que perjudican el medio ambiente, incluyendo el suelo, y además, afectan a largo plazo a las personas que consumen alimentos tratados con estos productos.

Por lo tanto, cabe resaltar que el suelo es uno de los más afectados a causa del constante uso de plaguicidas, porque existen agroquímicos que son de difícil eliminación o degradación y por lo tanto tienden a persistir en este, como por ejemplo los organoclorados, mientras que los fosforados y carbamatos son de fácil degradación (3), teniendo en cuenta que existen factores como la temperatura, condiciones del suelo y propiedades fisicoquímicas del plaguicida que pueden ayudar a la degradación.

Los aceites esenciales son “las fracciones líquidas volátiles que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas” (1). Las cuales se han relacionado por poseer propiedades antimicrobianas, y “se han encontrado alrededor de 1.340 plantas a las que se les atribuye propiedades antimicrobianas y en las cuales se ha identificado alrededor de 30.000 componentes activos” (2), incluyendo la planta aromática *Lippia alba* la cual está ampliamente distribuida por las zonas tropicales y subtropicales de América, Asia y África.

El aceite esencial extraído de esta planta está compuesto principalmente por terpenoides y fenilpropanoides y, gracias a su gran variabilidad química existen diferentes quimiotipos de estos aceites, los cuales se extienden a diferentes países como Brasil, Perú, Uruguay, entre otros y Colombia en donde se han identificado tres quimiotipos como carvona, limoneno y citral (4).

Teniendo en cuenta lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo principal evaluar la composición química del aceite esencial de la planta *Lippia alba* el cual

fue extraído utilizando la técnica de destilación por arrastre de vapor, obteniéndose una muestra transparente aromática y pura, seguida del análisis de los compuestos encontrados por medio de la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas donde se diferenciaron dos elementos principales que componen el aceite como Carvona (16,75%) y Limoneno (13.68%). Además, se da un valor agregado al uso de los aceites al proponer expandir su uso al campo dentro de la agricultura ya que funcionan como “fitofortificantes, bioestimulantes, herbicidas y plaguicidas” (25), gracias a sus compuestos orgánicos, su degradación se lleva a cabo de una manera más fácil debido a que no contienen alta cantidad de antioxidantes al contrario, la mayoría de los aceites esenciales están compuestos de Limoneno, un monoterpeno que se oxida rápidamente, y tampoco son tóxicos ni causan algún tipo de contaminación en el medio ambiente.

Es importante anotar que, este proyecto es parte de un macroproyecto que pretende extraer los aceites esenciales de diversas plantas colombianas y determinar a través de diversos ensayos que estos aceites esenciales pueden llegar a ser bioplaguicidas o fitoprotectores en cultivos de importancia colombiana.

OBJETIVOS

General

Evaluar la composición química del aceite esencial extraído de la planta *Lippia alba*

Específicos

- Realizar la extracción del aceite esencial de *Lippia alba* por medio de la técnica de arrastre de vapor.
- Identificar la composición química del aceite esencial de *Lippia alba* a través de la técnica cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
- Determinar el quimiotipo del aceite esencial con el cual se trabajó.

1. ANTECEDENTES

En el 2010 Escobar P. y su grupo de investigación determinaron la composición química de los aceites esenciales obtenidos de especies de *Lippia* cultivadas en Colombia y evaluaron la actividad *in vitro* contra *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania chagasi* en células Vero y THP-1. Para la obtención de los aceites esenciales se utilizó la técnica de hidrodestilación asistida por radiación de microondas y para el análisis se empleó la técnica de cromatografía de gases, donde para poder ser analizada la muestra (aceite esencial 50 μ L) se mezcló con n-tetradecano (2.0 μ L) y se diluyó con diclorometano para obtener un volumen final de 1.0 mL. Se demostró que el aceite esencial de *Lippia alba* tiene una alta actividad anti protozoaria gracias a: geranial, neral, geraniol, trans- β -cariofileno y 6-Methyl-heptan-2-ol, que son los compuestos que le dan esta característica al aceite de *L. alba* puesto que son parcialmente tóxicos para las células mamíferas (5).

Por otro lado, Agudelo L, Gómez G, Duran D, Stashenko E, Betancur L (2010) evaluaron la actividad antiviral *in vitro* frente al virus del herpes humano Tipo 1 (HSV-1), de veinte aceites esenciales de *L. alba*, la actividad antiviral fue evaluada por medio de la técnica de titulación del punto final (EPTT) mientras que la extracción del aceite se realizó por hidrodestilación asistida con radiación de microondas y su composición química por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas donde se identificaron dos quimiotipos: citral y carvona, donde los aceites de quimiotipo carvona, mostraron actividad antiherpética *in vitro*, moderada sobre la monocapa de células HeLa infectadas, con valores de referencia de 1×10^4 , en concentraciones, de 250 μ g/mL y 125 μ g/mL mientras que ninguno de los monoterpenos evaluados mostró actividad contra el virus (6).

Santos N, Pascon R, Vallim M, Figueiredo C, Soares M, Lago J et al. (2016) evaluaron la actividad antimicrobiana y citotóxica, el aceite esencial se extrajo por medio de la técnica de hidrodestilación, se analizó por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas y por espectroscopia de resonancia magnética. Para los ensayos se utilizó difusión en disco y microdiluciones. Se logró identificar que en *C.albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*,

C. krusei, *C. grubii* (A), *C. gattii* (B), *C. gattii* (C), *C. neoformans*, *S. cerevisiae* y *E.coli* el aceite esencial de *L.alba* presentó por lo menos un 90% de inhibición a una concentración de 0.5 mg/mL (7).

Ringuelet J, Ocampo R, Henning C, Padín S, Urrutia M, Dalbello G. (2014) evaluaron la actividad repelente e insecticida sobre *T. castaneum* del aceite esencial de *Lippia alba*, para ello se realizaron dos ensayos, uno de repelencia y otro de mortalidad. En el primero, se utilizó un olfatómetro compuesto por dos frascos de vidrio en una de las bases del recipiente se colocó papel filtro con aceite esencial a una concentración de 52 $\mu\text{L L}^{-1}$ de aire durante 2 y 24 h y 7, 14 y 21 días. Para el ensayo de mortalidad se utilizaron dos frascos de vidrio cerrados con diferentes técnicas de aplicación del aceite esencial, en uno se utilizó papeles impregnados y en otro por pulverización sobre la masa de granos a una concentración de 131, 263 y 526 $\mu\text{L L}^{-1}$ de aire. Los resultados obtenidos en el ensayo de repelencia fueron significativos ya que se produjo una repelencia en todas las instancias, y en el ensayo de mortalidad se determinó que los papeles impregnados con la concentración más alta (526 $\mu\text{L L}^{-1}$ de aire) tuvieron un efecto insecticida (8).

Olivero-Verbel J, Barreto-Maya A, Bertel-Sevilla A, Stashenko E. en el 2014 realizaron un estudio donde se evaluó la actividad antimicrobiana, anti quorum sensing y la composición del aceite esencial de *Lippia alba*. Para la extracción del aceite esencial se utilizó plantas recolectadas de diferentes lugares de Colombia con la técnica de hidrodestilación asistida por microondas y arrastre de vapor. La caracterización se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), para el ensayo de inhibición de crecimiento los aceites esenciales se disolvieron inicialmente en DMSO y luego se agregaron al medio de cultivo para obtener concentraciones de 0.01, 0.1, 10, 100, 200, 300 $\mu\text{g / mL}$. La concentración máxima de DMSO utilizada en los ensayos fue del 0,5%. Los resultados obtenidos evidenciaron la inhibición del crecimiento celular de CV026 inducida por aceites esenciales de *L. alba*, mayores concentraciones de aceite produjeron un impacto proporcional en el crecimiento celular, excepto el aceite esencial que contiene el mayor contenido de geraniol. Además, la mayoría de los aceites esenciales mostraron amplias zonas de inhibición del crecimiento contra *S. aureus* ATCC 25923 a 10 y 5 μL de cada aceite esencial puro, VEboW02E produce la zona de inhibición de crecimiento máxima ($46 \pm 0,8 \text{ mm}$) (9).

En el 2014 Terezinha Machado y su grupo de investigación evaluaron el potencial antimicrobiano del aceite esencial de *Lippia alba* y su eficacia sobre los ingredientes de la comida. La obtención de aceite se realizó mediante hidrodestilación, la determinación de la composición porcentual por cromatografía de gases con detector de ionización de llama y la identificación de los compuestos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría masas. Dentro de los resultados, identifico 36 componentes diferentes como fueron e-citral (31.57%), neral (25.50%), d-limonemo (14.07%), germacreno D (5.47%), b-elemol (5.37%), g - terpineno (4.09%) y p-cimeno (1.56%) también, el análisis de la actividad antimicrobiana mostro en todas las concentraciones probadas un amplio espectro de actividad, inhibiendo el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas. (10)

En el 2017, Porfirio E y su grupo de investigación evaluaron la actividad antibacteriana y antibiofilm de tres quimiotipos del aceite esencial de *Lippia alba* contra *Staphylococcus aureus*. La extracción del aceite se realizó por medio de hidrodestilación también, se analizaron por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, se realizaron concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y concentraciones mínimas bactericidas (CMB) por micro dilución. Los ensayos de anti - biofilm se realizaron por la técnica de placa de microtitulación con el ensayo cristal violeta y viabilidad de células bacterianas, todos los aceites y sus componentes principales presentaron actividad antibacteriana, y los valores más bajos de MIC y MBC fueron 0.5 mg mL^{-1} con LA1EO y citral mientras que, se observó una inhibición del 100% del biofilm de *Staphylococcus aureus* por todos los aceites a una concentración de 0.5 mg mL^{-1} (11).

Santos N, Pascon R, Vallim M, Figueiredo C, Soares M, Lago J et al. En el 2016 extrajeron el aceite de *Lippia alba* por medio de la técnica de hidrodestilación, se analizó por cromatografía de gases y espectroscopia de resonancia magnética nuclear mientras que los ensayos de citotoxicidad y actividad antimicrobiana se evaluaron mediante microdiluciones en caldo.

Se lograron identificar 39 sustancias las cuales corresponden al 99.45% de la composición total del aceite, donde las principales sustancias encontradas fueron los monoterpenos nerol, geraniol y citral, mientras que, la actividad citotóxica del aceite esencial obtenido contra varias líneas celulares tumorales mostró valores

de CI_{50} que varían entre 45 - 64 $\mu\text{g/ml}$ para B16F10Nex2 (melanoma murino) y A549 (adenocarcinoma de pulmón humano) en la actividad antimicrobiana todas las cepas de levadura analizadas fueron sensibles al aceite esencial, excepto *C. albicans* (12).

En el 2011, Glamočlija J con su grupo de investigación determinaron las características químicas del aceite esencial de *Lippia alba* y su actividad antifúngica contra los mohos verdes como una alternativa a los fungicidas sintéticos. El aceite se obtuvo por medio de hidrodestilación y se analizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y se confirmó por espectroscopia de resonancia magnética nuclear mientras que, para la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima fungicida se utilizaron diluciones en agar. El análisis mostro que geranial (50.94%) y neral (33.32%) son los principales componentes del 97.69% del aceite esencial y se clasifica como tipo citral que presenta una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 0.300–1.250 mg/ml y una concentración mínima fungicida (CMF) de 0.600–1.250 mg/ml por lo tanto se presenta como una alternativa potencial a los fungicidas sintéticos (13).

2. MARCO REFERENCIAL

2.1 Aceites esenciales

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas, se pueden concentrar en diferentes partes de las plantas como en las hojas, raíces, semillas, flores, y en los frutos (1).

El uso de los aceites esenciales data desde la antigüedad aproximadamente 3000 años antes de cristo y eran utilizados como cicatrizantes, elementos curativos o en rituales. “Los egipcios, griegos, romanos y chinos han tenido una gran incidencia en el desarrollo de la aromaterapia, los egipcios fueron los primeros que utilizaron una forma primitiva de destilación para extraer los aceites esenciales de las plantas, calentándolos en ollas de arcilla cuya boca era recubierta con filtros de lino; al subir, el vapor traía consigo los aceites esenciales y éstos quedaban impregnados en el filtro, el cual era estrujado para obtener el aceite esencial que era utilizado en medicina y para todo tipo de rito religioso. Además, se han destacado grandes investigadores como Teofrasto, considerado uno de los precursores en el uso terapéutico de los aceites” (15).

Con el tiempo los griegos comenzaron a tomar las prácticas de los egipcios, pero mejoraron el sistema de destilación del aceite preservando su fragancia y pureza, llegando a la incorporación total de los aceites en la vida cotidiana debido a que eran usados en el baño, alimentos, ritos o magia y en ungüentos para conservar el aspecto físico y mental (15).

Los aceites esenciales están constituidos en mayor cantidad por compuestos aromáticos como los aldehídos, cetonas, fenoles, monoterpenos, sesquiterpenos o fenilopropanos; los cuales se pueden clasificar según su grupo funcional (1).

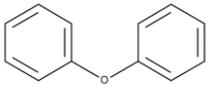
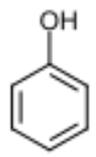
Compuesto	Grupo funcional	Ejemplo	Propiedades
Alcohol	$\begin{array}{c} R \\ \\ R-C-OH \\ \\ R \end{array}$	Mentol, geraniol	Antimicrobiano, antiséptico, tonificante, espasmolítico.
Aldehído	$\begin{array}{c} H \\ \\ C=O \\ \\ R \end{array}$	Citral, citronelal	Espasmolítico, sedante, antiviral.
Cetona	$\begin{array}{c} O \\ \\ R^1-C-R^2 \end{array}$	Alcanfor, tuyona	Mucolítico, regenerador celular, neurotóxico.
Ester	$\begin{array}{c} O \\ \\ R-C-OR' \end{array}$	Metil salicilato	Espasmolítico, sedativo, antifúngico.
Éteres	$R-O-R'$	Cineol, ascaridol	Expectorante, estimulante
Éter fenólico		Safrol, anetol, miristicina	Diurético, carminativo, estomacal, expectorante.
Fenol		Timol, eugenol, carcacrol	Antimicrobiano irritante, estimulante, inmunológico.
Hidrocarburo	Solo contiene C y H	Pineno, limoneno	Estimulante, descongestionante, antivírico, antitumoral

Figura 1. Componentes de acuerdo al grupo funcional mayoritario (66).

Igualmente, los aceites esenciales se pueden clasificar en esencias fluidas que son “aquellas que presentan volatilidad a temperatura ambiente; bálsamos son líquidos más espesos, poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización; y en oleorresinas que son líquidos viscosos o sustancias semisólidas que tienen el aroma de la planta muy concentrado (14).

Otra forma de clasificación es según su origen “Los naturales se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, debido a su rendimiento tan bajo son muy costosas. Los artificiales se obtienen a

través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes” (1) “sintéticos como su nombre lo indica son producto de la combinación de sus componentes los cuales son la mayoría de las veces producidos por procesos de síntesis química. Estos son más económicos y por lo tanto son mucho más utilizados como aromatizantes y saborizantes” (1).

2.2 Propiedades de los aceites esenciales

- **Antimicrobianos:**

“Una gran cantidad de aceites esenciales presentan actividad antimicrobiana la cual se debe a constituyentes activos atribuidos a isoprenos, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos, alcoholes y otros hidrocarburos. La acción antimicrobiana de estos componentes se debe a las características lipofílicas de los hidrocarburos y a las hidrofílicas de los grupos funcionales” la capacidad antimicrobiana está definida por fenoles, aldehídos, acetonas, alcoholes, ésteres e hidrocarburos “estudios han demostrado que en algunos casos, todos los componentes presentes en aceite esencial presentan mayor actividad antimicrobiana que el principal componente del mismo lo que da a entender que los componentes minoritarios también son factores críticos en cuanto a esta actividad específica del aceite” (14).

- **Antiviral:**

Los aceites esenciales extraídos de varias plantas aromáticas como albahaca, hinojo, orégano, limonaria, romero, tomillo o cítricos tienen actividad antifúngica contra *Candida albicans*, *Candida apícola*, *Candida catenulata*, *Candida tropicalis*, *Rhodotorula rubra*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Trigonopsis variabilis* (60).

Los aceites esenciales tienen efecto en la membrana celular, en la pared celular, bomba de flujo, en la mitocondria, anti quorum sensing e inhiben el desarrollo de biofilm (60).

- **Antioxidante:**

La actividad antioxidante de los aceites esenciales se mide en la habilidad de donar hidrógenos o eliminación de radicales libres y los aceites de Fino verde, holandjanin, genoves, canela, especia azul, opalo morado presentan estas dos características (61).

- **Analgésica:**

El mentol es un terpeno cíclico con tres átomos de carbono asimétricos y es un componente presente en varios aceites esenciales, y se ha comprobado que exhibe propiedades analgésicas. El mentol causa una sensación de hormigueo y frescor inhibiendo la corriente de Ca^{+2} de las membranas neuronales. Se ha descubierto que el mentol tiene propiedad antitusiva. Otro componente presente en los aceites esenciales que ha mostrado una gran actividad analgésica es la lavándula híbrida cuando su administración es por inhalación. El aceite de lavanda y sus principales componentes linalool, y linalyl acetato, y 1,8 –cineole antiulcerosa permiten el alivio del dolor. De la misma manera muchos componentes de diversas variedades de aceites esenciales han presentado ser buenos analgésicos para muchas enfermedades y dolores” (14).

- **Digestiva:**

“Muchos reportes han demostrado que los aceites esenciales regulan el proceso digestivo antes que la comida alcance el estómago. Algunos pueden intervenir en la función gastrointestinal a través de la activación del nervio vago y la secreción gástrica” (14).

“Generalmente se utiliza a las plantas aromáticas en infusiones o tés, en donde estas tienen una actuación directa en el sitio de acción. Lo que hacen las plantas aromáticas y sus aceites esenciales es inhibir la movilidad gástrica liberando la bilis desde la vesícula biliar, expulsando gases del estómago e intestino e indirectamente protegiendo la función hepática” (14).

2.3 *Lippia alba*

El género *Lippia* que cuenta con alrededor de 5000 especies, y pertenecen a la familia de las verbenáceas, las especies más representativas son *Lippia alba*, *Lippia abyssinica*, *Lippia acuminata*, *Lippia graveolens*, *Lippia acutiedens*, *Lippia hirssuta*, *Lippia intergrifolia*, *Lippia organoides* y *Lippia umbellata*.

La planta aromática *Lippia alba* “se encuentra incluida en el reino Plantae; filum Magnoliophyta; clase Magnoliopsida; orden Lamiales; familia Verbenaceae” (35) usada ampliamente por toda Suramérica y Centroamérica; esta familia comprende más de 175 géneros y 2800 especies en África, Latinoamérica e India. *Lippia alba* tiene diversidad de nombres, en Brasil se conoce como falsa melisa o hierba de limón, en Costa Rica como juanilama, Argentina como salvia morada, en Estados Unidos como, bushy matgrass o bushy Lippia y en Colombia como pronto alivio (16) (33).

Las hojas de esta planta “son membranosas, pecioladas, pubescentes, lugar en donde se encuentra una alta cantidad de aceites esenciales, estos aceites se localizan en la epidermis, en las glándulas secretoras para ser más específicos, estructuras conocidas como tricomas glandulares, sus miembros difieren en diferentes formas, pueden presentar una base cuneiforme o decumbente, ápice agudo y bordes dentados o irregulares” (34)



Figura 2. *Lippia alba* (67).

“Esta planta se usa en medicina popular como sedante, tratamiento para enfermedades cardiovasculares, diabetes, y enfermedades hepáticas y como jarabe contra la bronquitis” (17) también, se emplea como “antiinflamatorio, antipirético

sedante, antidiarreico, antifúngico, en enfermedades intestinales y anticolesterolémico, larvicida, repelente, antimicrobiano, antiviral, antimalaria y molusquicida” (35).

La reproducción de *Lippia alba* presenta “anormalidades postmeióticas afectan la formación de granos de polen viables y es determinante de viabilidad y germinación baja de las semillas, presentando problemas importantes en su reproducción sexual, contrario a su forma de reproducción asexual que es fácil, rápida y exitosa” (36)

Sumado a esto, el aceite de la planta presenta variaciones cualitativas y cuantitativas en su composición por eso se presentan diferentes quimiotipos, que hacen referencia al compuesto o molécula que se encuentra en mayor cantidad.

Se han reportado siete quimiotipos del aceite, que se pueden describir de la siguiente manera, el quimiotipo I que posee citral, linalol, β -cariofileno como sus componentes principales; quimiotipo II que tiene tagetenona; quimiotipo III contiene limoneno, carvona o cetonas monoterpénicas; el quimiotipo IV mirceno; el quimiotipo V posee γ -terpineno; el VI: canfora-1,8-cineol y el VII: estragol. (16). Y en Colombia se ha reportado que los quimiotipos de *Lippia alba* que predominan son limoneno, p-cimeno, carvona y linalool.

Existen diferentes factores que pueden afectar la composición del aceite y su rendimiento “Estímulos ambientales pueden redirigir la ruta de biosíntesis cambiando la composición química, producción y actividad biológica de los aceites esenciales en las plantas, tales como interacción planta–microorganismo, planta–insecto o planta– planta”... se reportó que las plantas son muy vulnerables al ataque de hormigas afectando la producción del aceite, además, los factores ambientales y la etapa de desarrollo de la planta también pueden influir directamente en la calidad y cantidad de los aceites esenciales, por ejemplo “señalan una menor producción de aceite esencial al mediodía, indicando que la cantidad de componentes químicos de la planta varían en función del momento de recolección, mostrando la mañana como el mejor momento para obtener mayor cantidad de aceite esencial” (16).

2.4 Usos y propiedades del aceite esencial de *Lippia alba*

- **Citotoxicidad**

“Debido al gran número de componentes, los aceites esenciales parecen no tener sitios celulares específicos en las células animales y microbianas, ellos pasan a través de la pared celular y la membrana citoplasmática, y muchas veces alteran la estructura de sus diferentes capas de polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos” (16) por ejemplo, el quimiotipo del aceite esencial de *Lippia alba* citral es capaz de inhibir el crecimiento de células con leucemia en un ratón, por el contrario, no es capaz de hacerlo en el bazo humano (16).

- **Anti genotoxicidad**

Se ha descrito que los compuestos terpenicos del aceite como carvona, geraniol, limoneno, citral y alcohol perílico, poseen propiedades quimiopreventivas debido a que disminuyen la genotoxicidad del medicamento bleomicina a concentraciones entre 28 y 450 mg/mL, notando una total inhibición en dosis superiores a 56 mg/mL. La genotoxicidad es la capacidad de un agente para ocasionar daño en el material genético. (16 - 18)

- **Actividad antioxidante**

La capacidad antioxidante hace referencia “a cualquier molécula capaz de estabilizar o desactivar los radicales libres antes de que puedan atacar a las células, es decir retardar la oxidación (pérdida de uno o más electrones) de otras moléculas, generalmente sustratos biológicos como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos.” (19).

El aceite esencial de *b* contiene una cantidad importante de compuestos fenólicos que le dan la propiedad de poseer actividad antioxidante porque “usando un modelo in vitro para oxidación del ácido linoleico - describieron una actividad superior o similar a la de la vitamina E y del hidroxibutilanisol (BHA) para el aceite esencial en concentraciones mayores de 5 g/L.” (16).

- **Actividad antimicrobiana**

Es la capacidad que tiene una sustancia para producir un efecto inhibitorio frente a cierto microorganismo (bacterias, hongos y/o parásitos).

Se ha descrito actividad antifúngica de los quimiotipos citral y myrcene citral del aceite esencial de *Lippia alba* contra hongos patógenos humanos como *Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Candida neoformans*, *Candida krusei*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichophyton rubrum* y *Fonsecaea pedrosoi*, *Trichoderma*, *Fusarium* y *Penicillium* (13).

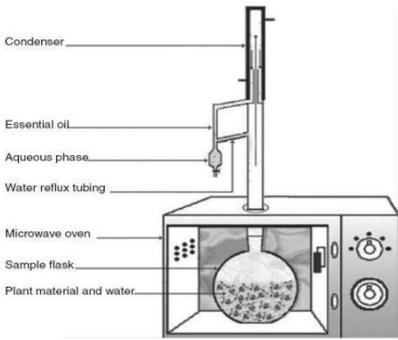
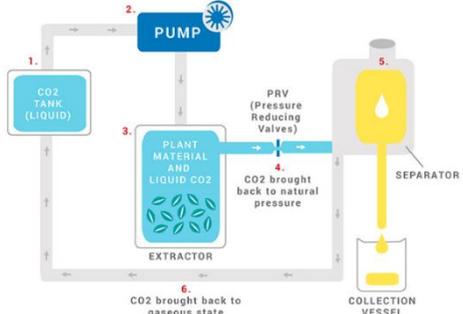
Igualmente, muestra propiedades antibacterianas descritas en diversos artículos, por ejemplo, se encontró que los compuestos como α citral, E carveol y limoneno tienen actividad antimicrobiana sobre *Aeromonas spp.* (20) y “contra *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus casei*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans*, *Fonsecaea pedrosoi* y *Trichophyton rubrum*. *Salmonella choleraesuis*, *Listeria monocytogenes*, y *Listeria innocua*. Y finalmente, también reportaron actividad contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.” (16).

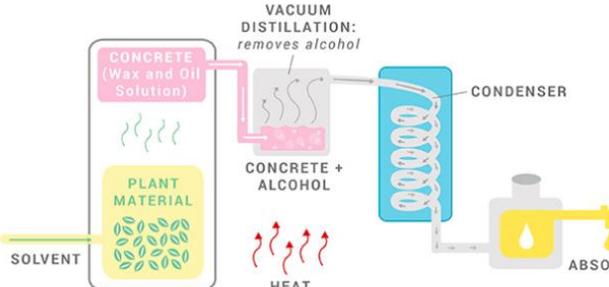
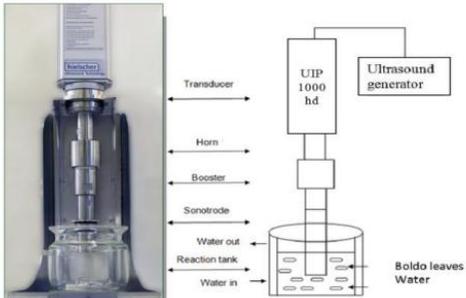
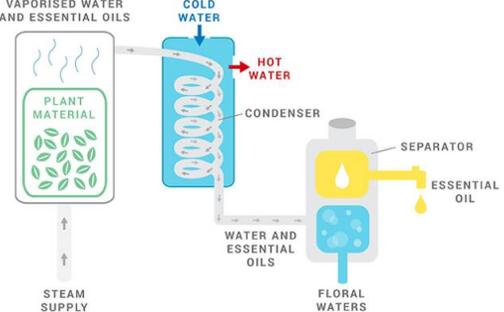
Al mismo tiempo se ha estudiado la actividad antiparasitaria de esta planta ya que se ha encontrado que funciona como tripanocida, teniendo efecto en los epimastigotes, tipomastigotes y amastigotes; el quimiotipo citral es el más tripanocida presentando concentraciones mínimas inhibitorias de $14 \pm 1.5 \mu\text{g/mL}$; $22 \pm 1.4 \mu\text{g/mL}$ y $74 \pm 4.4 \mu\text{g/mL}$ (21).

Adicional a las propiedades anteriores se encontró que varios aceites cuentan con efectos antivirales y dentro de estos se encuentra el de *L. alba*, con concentraciones mínimas inhibitorias de 3.7 y 11.1 $\mu\text{g/mL}$ contrarrestando el efecto viral in vitro del virus de la fiebre amarilla (22).

2.5 Métodos de extracción del aceite

Tabla 1. Métodos de extracción de aceites esenciales (23) (24).

Método de extracción	Definición	Imagen
<p>Hidrodestilación asistida por microondas</p>	<p>Es una tecnología actual que se usa para extraer materiales biológicos y ha sido considerada como una alternativa importante en las técnicas de extracción, debido a sus ventajas que son una reducción en el tiempo de extracción, solventes, selectividad, calentamiento volumétrico y proceso de calentamiento controlable. La eficiencia de este método depende de la constante dieléctrica del agua y de la muestra (23).</p>	 <p>The diagram shows a microwave oven with a round-bottom flask inside containing plant material and water. A condenser is attached to the top of the flask. Labels indicate: Condenser, Essential oil (collected in a small vial), Aqueous phase, Water reflux tubing, Microwave oven, Sample flask, and Plant material and water.</p>
<p>Extracción por fluidos supercríticos</p>	<p>Es el proceso de separación de un componente (extractante) de otro, utilizando fluidos supercríticos como el disolvente de extracción, la extracción es generalmente en una matriz solida pero también puede ser líquida. Se realiza con dióxido de carbono (CO₂), y una temperatura baja, el CO₂ que es relativamente no tóxico, no inflamable, no corrosivo, seguro, disponible en alta pureza a un bajo costo y se elimina fácilmente del extracto, el CO₂ es el fluido supercrítico más utilizado, algunas veces modificado por codisolventes como el etanol o el metanol (23).</p>	 <p>The diagram illustrates the supercritical CO₂ extraction cycle. It starts with a CO₂ tank (1) connected to a pump (2). The CO₂ then flows through a pressure-reducing valve (PRV) (3) into an extractor containing plant material and liquid CO₂. From the extractor, the mixture goes through another PRV (4) where CO₂ is brought back to natural pressure. The mixture then enters a separator (5) where the essential oil is collected in a collection vessel. Finally, the CO₂ is brought back to its gaseous state (6) and recycled back to the tank.</p>

<p>Extracción con solventes</p>	<p>En este método se emplean solventes como el hexano y el etanol para aislar los aceites esenciales de material vegetal. Es adecuado para plantas que producen bajas cantidades de aceite esencial, como los resinosos o aromáticos delicados que no soportan la presión de la destilación al vapor (24).</p>	 <p>The diagram illustrates the solvent extraction process. It starts with a container of 'PLANT MATERIAL' and 'SOLVENT'. This mixture is placed in a 'CONCRETE (Wax and Oil Solution)' container. 'HEAT' is applied to the concrete, causing it to boil. The vapor, labeled 'CONCRETE + ALCOHOL', rises into a 'VACUUM DISTILLATION' chamber where alcohol is removed. The remaining mixture then passes through a 'CONDENSER' and is collected in a flask labeled 'ABSO'.</p>
<p>Extracción asistida por ultrasonido</p>	<p>El ultrasonido permite la extracción selectiva e intensificada de aceites esenciales mediante la liberación de material vegetal cuando se usa una combinación de técnicas. La materia prima se sumerge en agua u otro disolvente y al mismo tiempo se somete al ultrasonido (23).</p>	 <p>The diagram shows an ultrasound-assisted extraction setup. It includes an 'Ultrasound generator' connected to a 'Transducer'. The transducer is linked to a 'Horn', which is connected to a 'Booster' and a 'Sonotrode'. The sonotrode is immersed in a 'Reaction tank' containing 'Boldo leaves' and 'Water'. Arrows indicate 'Water in' and 'Water out' from the reaction tank. A 'UIP 1000 hd' unit is also shown connected to the system.</p>
<p>Extracción por arrastre de vapor</p>	<p>Es un método en el que el vapor fluye a través del material y funciona como un agente que rompe los poros de la materia prima y libera el aceite esencial. El sistema produce una mezcla de vapor y aceite esencial deseado, luego, el vapor se condensa y se recolecta el aceite esencial, el principio de esta técnica es que la presión de vapor combinada es igual a la presión ambiente a aproximadamente 100 ° C, por lo que los componentes volátiles con puntos de ebullición que van de 150 a 300 ° C pueden evaporarse a una temperatura cercana a la del agua (23)</p>	 <p>The diagram depicts the steam distillation process. 'STEAM SUPPLY' enters a chamber containing 'PLANT MATERIAL'. The mixture is heated, producing 'VAPORISED WATER AND ESSENTIAL OILS'. This mixture flows into a 'CONDENSER' where 'COLD WATER' is circulated around it. The condensed mixture, labeled 'HOT WATER', then enters a 'SEPARATOR'. The separator has two layers: 'WATER AND ESSENTIAL OILS' on top and 'FLORAL WATERS' on the bottom. 'ESSENTIAL OIL' is collected from the top layer.</p>

2.6 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Es una técnica que se utiliza para separar, identificar y cuantificar mezclas de sustancias volátiles y semivolátiles, donde la “mezcla de compuestos inyectada en el cromatógrafo de gases se separa en la columna cromatográfica obteniendo la elución sucesiva de los componentes individuales aislados que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas. Cada uno de estos componentes se registra en forma de pico cromatográfico y se identifica mediante su respectivo espectro de masas” (41) además, el espectrómetro de masas actúa como detector cromatográfico generando una representación gráfica llamada cromatograma.

Para correr la cromatografía primero se toma una muestra del aceite la cual pasa a través de una columna de metal con la ayuda del gas transportador, la cual está cubierta de un material que tiene diferente afinidad por los componentes del aceite esencial a diferentes temperaturas y a medida de que el gas pasa por la columna se va incrementando su temperatura con el fin de que el detector reconozca el vapor y genere un pico (cromatograma) que corresponde al porcentaje del componente en la muestra.

3. DISEÑO METODOLOGICO

3.1 Universo, población y muestra

Universo: plantas aromáticas en Colombia

Población: *Lippia alba*

Muestra: aceite esencial de *Lippia alba*

3.2 Hipótesis, variables e indicadores

3.2.1 Hipótesis

La composición química del aceite esencial de *Lippia alba* se relaciona con los quimiotipos encontrados en Colombia.

3.2.2 Variables

Dependiente:

Porcentaje de compuestos presentes en el aceite esencial.

Independiente:

Condiciones de crecimiento de las plantas.

Sector de procedencia de la muestra vegetal.

3.2.3 Indicadores

Tiempo de retención

Rendimiento del aceite

Análisis físico – químico

Composición química

3.3 Técnicas y procedimientos

En la **Figura 3** se describe el proceso de extracción y análisis de datos realizado para el desarrollo del presente trabajo.

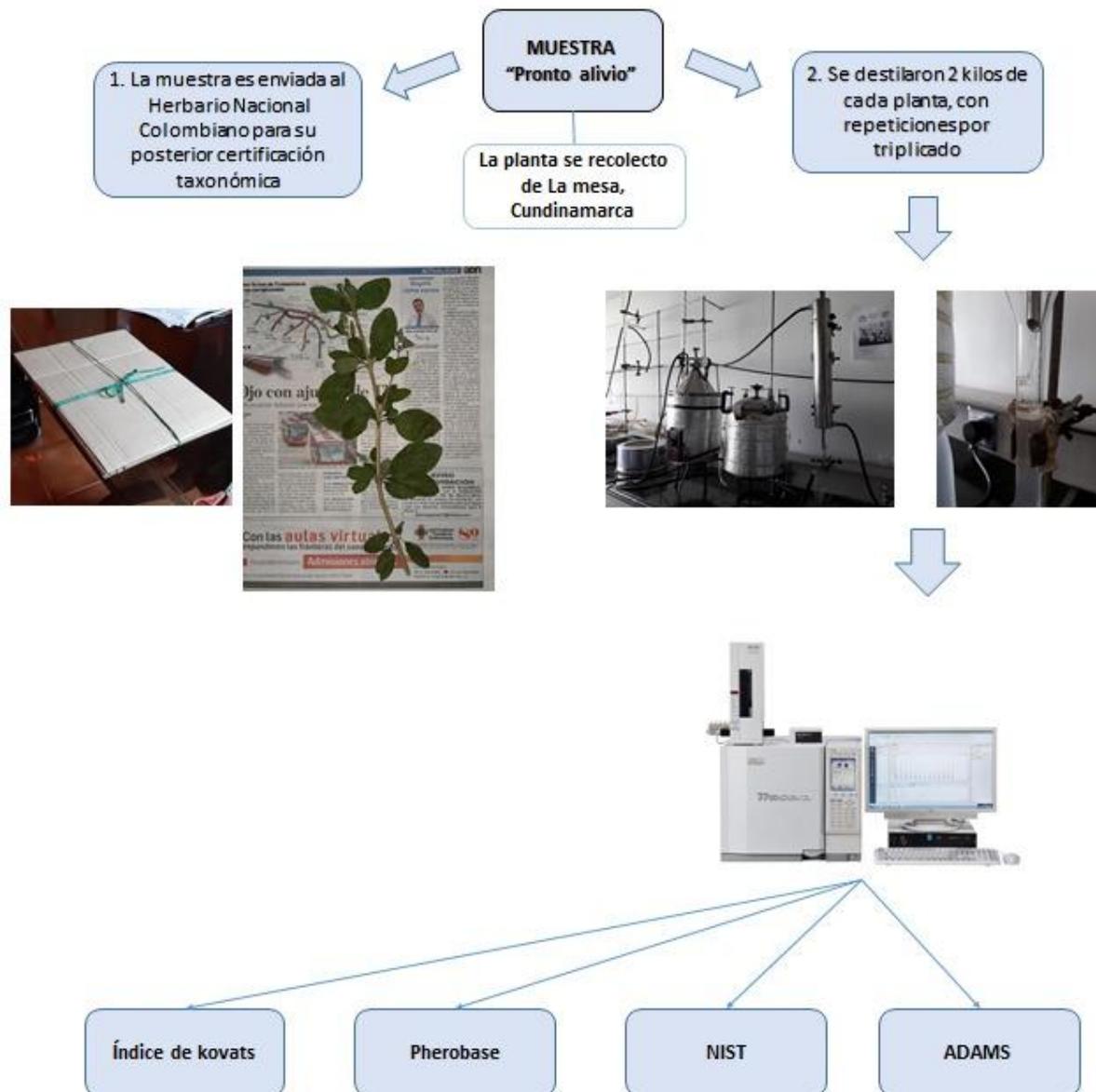


Figura 3. Procedimiento para la extracción y análisis de la planta

Fase 1. Recolección del material vegetal

La recolección de las plantas se realizó entre octubre, noviembre y diciembre del año 2018, se compró el material vegetal en la plaza de mercado Samper Mendoza ubicada en la ciudad de Bogotá D.C; se interrogó al vendedor a cerca de la

procedencia de la muestra e indico que los cultivos de hierbas aromáticas se encuentran en el municipio de La Mesa, Cundinamarca, en las coordenadas 4°40'04.5"N 74°27'57.8"W.

Fase 2. Certificación taxonómica de la planta

El proceso se realizó según lo establecido por el Herbario Nacional de Colombia (**Anexo 1**), el cual indica que el tamaño del espécimen no debe ser mayor a 30 x 40 cm, cada planta se entrega por duplicado y debe llevarse a las instalaciones de la Universidad Nacional de Colombia presado como lo indica la **Figura 4**.

La obtención del certificado taxonómico del material vegetal se puede observar en el **Anexo 2**.



Figura 4. Especimen llevado al Herbario Nacional de Colombia

Fase 3. Extracción del aceite esencial de *Lippia alba*

La extracción del aceite esencial se realizó en las instalaciones de la Universidad Nacional de Colombia en el laboratorio de productos vegetales y naturales donde se cuenta con un equipo de destilación por arrastre de vapor constituido por una entrada de agua al generador de vapor de 12 Litros de capacidad; el generador de vapor; alambique o cámara de destilación con una capacidad máxima de 2

Kilogramos; salida de vapor del alambique; condensador; entrada de agua al condensador; salida de agua del condensador; tubo recolector (tipo clavenger); salida del tubo recolector y por último el barómetro.

Inicialmente, se llena el generador de vapor de agua y se enciende el equipo, seguido se llena la cámara de destilación con 1.5 Kg del material vegetal fresco asegurándose que quede bien cerrada la cámara y que la salida de vapor de la misma este bien conectada, igualmente, con las mangueras de entrada y salida de agua al condensador. Al cabo de un tiempo (3 horas aprox.) se observa que no hay más salida de aceite por el tubo recolector entonces, se retira toda la muestra vegetal y se termina con la purgación del equipo.

Como producto del procedimiento anteriormente descrito se obtiene el aceite esencial el cual se guardó en un lugar frio y oscuro envasado en un frasco limpio y estéril de color ámbar con sulfato de sodio (Na_2SO_4) para su conservación.



Figura 5. Destilador por arrastre de vapor

Fase 4. Análisis fisicoquímico

Para este procedimiento se calculó el porcentaje de rendimiento, índice de refracción y densidad del aceite esencial.

El porcentaje de rendimiento de aceite se calculó siguiendo la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{\text{masa final del aceite esencial (ml)}}{\text{masa inicial del follaje (g)}} \times 100$$

Para la definir el índice de refracción se siguió el método oficial AOAC 921.08.1995. El ensayo se llevó a cabo utilizando un refractómetro de la marca Sper Scientific, limpiando previamente el prisma con etanol y agua destilada en seguida se agregó 50uL del aceite esencial a 20°C en el prisma y se leyó el resultado.

$$\text{Indice de refraccion} = \frac{\text{velocidad de la luz en el vacio}}{\text{velocidad de la luz en en el medio}}$$

En la determinación de la densidad relativa del aceite esencial se empleó el método oficial AOAC 920.212:1995 y la norma ISO 279:1998.

En el procesamiento del aceite esencial se utilizó un picnómetro de 1.0 mL de capacidad, limpio y seco proporcionado por la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. El picnómetro se pesó vacío en una balanza electrónica a continuación se llenó con 1.0 mL del aceite en estudio y se volvió a pesar para así determinar la densidad relativa del aceite, siguiendo la siguiente ecuación:

$$\text{Densidad} = \frac{(\text{peso picnómetro} + \text{muestra}) - (\text{peso picnómetro})(g)}{\text{volumen aceite esencial (mL)}}$$

Fase 5. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Este ensayo se realizó en las instalaciones de la Universidad Pontificia Javeriana en el laboratorio de cromatografía.

En esta prueba se utilizó un cromatógrafo de gases Shimadzu GC2010, con inyector spit/splitless acoplado a un detector selectivo de masas MS/GCTQ8040, modo de ionización IE, analizador de masas triple cuadrupolo y dos sistemas de separación. El primero empleó una columna apolar RTX-5MS (60m x 0.25 mm x 0.25um) en las

siguientes condiciones de operación: el gas de arrastre fue helio a un flujo de 1.5 mL/min, la temperatura del horno se programó desde los 40°C (2 min) hasta 125°C (2 min) a 4°C/min, luego se incrementó hasta 160°C (5 min) a 4°C/min, posteriormente se aumentó hasta 220 °C (8 min) a 5 °C/min y finalmente la temperatura aumentó a 280 °C (4 min) a 5 °C/min. La temperatura en el puerto de inyección fue de 250 °C y la de la línea de transferencia de 290 °C, la relación de split 1:20 y el voltaje de ionización fue de 70 eV a una corriente de 60 µA. La adquisición de los espectros de masas se realizó en un rango de masas entre 30-600 m/z. El segundo sistema de separación fue una columna polar DB-WAX (60 m×0.25 mm×0.25 µm) operado bajo las mismas condiciones excepto por la programación de la temperatura del horno que fue de la siguiente forma: 45 °C (4 min) hasta 250 °C (8 min) a 4 °C/min. Se inyectó 1.0 µL de cada solución analizada, dilución 1/40 (25 ul aceite a 1.0 ml utilizando hexano como diluyente).

Fase 6. Análisis de datos

A partir de los tiempos de retención obtenidos en la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se calculó el índice de Kovats o índice de retención, teniendo en cuenta que se corrió una serie homóloga de n-alcenos (C2 - C28) en las mismas condiciones que la muestra (aceite esencial), con este resultado se comenzó a filtrar la información para llegar a un compuesto definido, primero, se utilizó la base de datos llamada: Pherobase, continuando con el Chemistry WebBook de la página NIST (National Institute of Standards and Technology) y finalmente se confirmaron los compuestos en el libro *Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectrometry* por Robert P. Adams, 2007.

4. RESULTADOS

Lippia alba es una planta que se encuentra ampliamente distribuida por toda Latinoamérica y se caracteriza porque a través diferentes ensayos ha mostrado que tiene diversas propiedades gracias a su composición química, además, es una planta que puede crecer en suelos arenosos, arcillosos y francos y su cultivo se da cada cuatro meses por lo tanto su obtención no es difícil y si puede ser provechosa.

La importancia de este trabajo radica en que estudia los compuestos más importantes de la planta *Lippia alba* y además propone el uso de este aceite como antimicrobiano para cultivos agrícolas teniendo en cuenta que las herramientas actualmente utilizadas en el sector agrícola para la eliminación o control de bacterias, hongos, virus, parásitos fitopatógenos o plagas, conllevan a una contaminación ambiental a largo plazo como la deterioración del suelo. Entonces, la economía de los agricultores, se puede ver afectada si no se da un buen manejo a los plaguicidas, pues el exceso de estos causa la pérdida de fertilidad en los terrenos e influye en el rendimiento de la producción, pues los agricultores deberán invertir más dinero en insumos, que ya de por sí tienen un alto costo en el mercado, adicional más tiempo de mano de obra, lo que nos lleva a plantear una forma de hacer de este negocio algo más sostenible y amigable con el medio ambiente, el cual es el uso de aceites esenciales como plaguicidas.

La extracción del aceite esencial se realizó exitosamente obteniendo un aceite transparente, aromático y puro.

También se observa un buen porcentaje de rendimiento en la extracción del aceite esencial, puesto que, la mayoría de aceites presenta un porcentaje menor a 1% y varía según factores como la humedad y el secado del material vegetal.

Tabla 2 Análisis físico del aceite esencial de *Lippia alba*

Densidad (g/mL)	Índice de refracción	porcentaje de rendimiento
0.827	1.492	0.691%



Figura 6. Aceite esencial extraído

Una vez realizada la extracción y el análisis físico químico del aceite se procedió a realizar el ensayo de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. El equipo arrojó los cromatogramas (**Anexo 3**) y en ellos, los datos necesarios para calcular el índice de kovats y continuar con el análisis.

El índice de kovats es un método de cuantificación de los tiempos de elución de los diferentes compuestos obtenidos en la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, este sistema se basa en los n-alcános como referencia debido a que son inertes y solubles (62) y por espectrometría de masas compara el espectro de la sustancia y los asemeja, la determinación se realizó siguiendo la ecuación descrita a continuación, una vez concluido el anterior paso, se ingresó cada índice de kovats en la base de datos Pherobase que nos condujo a un posible nombre del compuesto encontrado en la composición química del aceite.

$$I_r = 100 * n + 100 \frac{(tr_x - tr_n)}{(tR_n - tr_n)}$$

Donde **n** es el carbono

tr_x: tiempo de retención de la sustancia a determinar.

trn: tiempo de retención del carbohidrato antes del índice de retención de la sustancia.

tRn: tiempo de retención del carbohidrato después del índice de retención de la sustancia.

Después de la organización de los compuestos por tiempo de retención, en la página NIST (National Institute of Standards and Technology) Chemistry webBook se ingresó el nombre químico de los compuestos para así conocer el nombre común del mismo, por ejemplo, 2-Ciclohexan-1-ona, 3-metil-6-(1-metilethyl)- que se obtuvo de la página pherobase y al ingresarla a la base de datos de NIST su nombre es piperitona, y de esta manera con todos los compuestos.

Al tener estos datos se fue construyendo una tabla que contiene todos los elementos anteriormente mencionados, adicionalmente, todos los compuestos se buscaron en el libro *Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/ Mass Spectrometry*, con la diferencia que en este se confirman los compuestos por índice de Kovats con una variación de ± 2 .

Continuando con la metodología, se realizó un promedio del porcentaje de área y se estableció cuáles son los compuestos presentes en las tres repeticiones y cuáles son los compuestos que poseen mayor porcentaje de área e importancia para determinar el quimiotipo del aceite en estudio obteniéndose la **Tabla 3**.

Tabla 3. Compuestos del aceite esencial de *Lippia alba*

Nombre del compuesto	Porcentaje de área total (%)	Índice de refracción	Tiempo de retención
Mirceno	1,36	993	17,733
Careno <δ-3->	1,94	1022,4	18,900
Limoneno	15,25	1041,6	19,415
Oxido de pineno <α->	2,49	1043,8	19,750
Ocimeno <(Z)-β>	0,78	1053,0	20,095
Terpineno <γ>	3,54	1067,6	20,693
Mentha-2,4(8)-dieno <p->	0,77	1094,1	21,743
Linalool	1,18	1102,5	22,076
Terpinen-4-ol	1,35	1184,4	25,419
Dihidrocarvona <trans->	0,50	1212,8	26,587
Carvona	18,68	1262,4	28,64

Piperitona	1,66	1271,4	29,022
Timol	2,61	1297,1	30,098
Carvacrol	1,42	1307,0	30,474
Piperitenona	1,44	1354,9	32,293
Bourboneno <math>\beta</math>	2,49	1400,5	34,028
Naftalina	4,71	1434,0	35,410
Cis- Cariofileno	4,23	1434,7	35,441
β-Copaeno	2,42	1442,7	35,772
Germacreno D	14,92	1517,4	38,915
Biciclo germacreno	1,46	1513,9	38,760
β-Selineno	0,96	1504,0	38,315
α-Guaieno	1,63	1512,1	38,676
α-Muuroleno	1,90	1517,5	38,919
γ-Muuroleno	1,14	1523,0	39,168
Cubebol	1,28	1532,9	39,610
δ-Cadineno	2,04	1546,3	40,212
No identificado	1,29	1553,8	40,545
No identificado	2,10	1561,8	40,905
No identificado	0,69	1710,6	46,098
No identificado	1,41	1456,7	36,350
No identificado	1,36	1460,3	36,498
No identificado	2,26	1467,6	36,800
No identificado	1,50	1475,3	37,117
No identificado	0,73	1435,9	35,490
No identificado	2,37	1404,1	34,179
No identificado	1,00	1348,8	32,063
No identificado	1,69	1266,8	28,830
No identificado	0,92	1041,9	19,674

En la **Figura 7** realizada a partir de la **Tabla 3** se puede observar los compuestos con porcentajes de áreas mayores a 0.5.

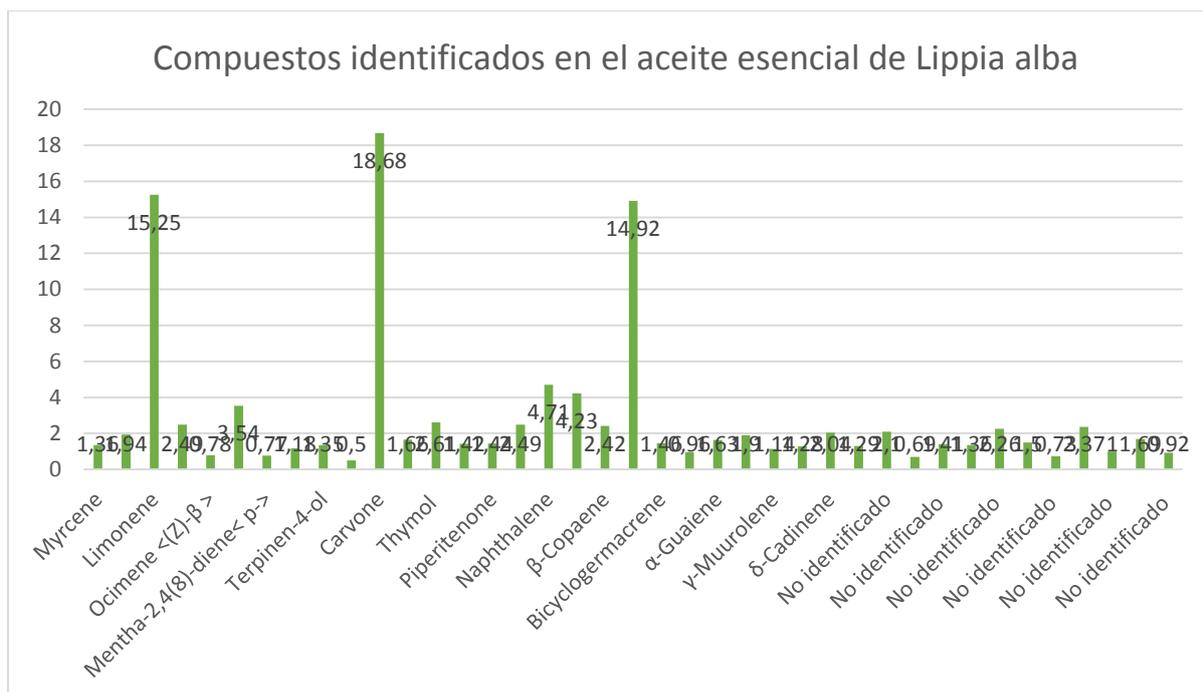


Figura 7. Compuestos presentes en el aceite esencial de *Lippia alba*

A partir de la anterior gráfica se puede inferir que el quimiotipo de la planta *Lippia alba* cultivada en La mesa, Cundinamarca, pertenece al tipo III dentro de los siete quimiotipos anteriormente descritos debido a que sus compuestos principales son Carvona con un porcentaje de área de 18,68% y Limoneno con 10,25%.

Es importante resaltar que para cada localización geográfica el quimiotipo o la composición del aceite esencial va a ser diferente por las condiciones en las que el cultivo se ha desarrollado, no siempre se presenta la misma composición química ni tampoco los mismos porcentajes de área ya que estos dependen de la humedad, el suelo, época del año o factores ambientales.

5. DISCUSIÓN

Las características físicas del aceite esencial, como la densidad y el rendimiento pueden variar, por eso es difícil establecer una cifra específica para cada aceite extraído de diferentes especies de plantas, aun así, en el artículo “Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) n. e. Brown” escrito por Pino Alea J. y su grupo de investigación (46) determinaron la densidad del aceite esencial en 0,921 g/mL. Igualmente, en el artículo escrito por Leal Torres E. “Extracción, composición y caracterización de los aceites esenciales de hoja y semilla de cilantro (*Coriandrum sativum*)” (47) establecieron la densidad del aceite esencial del comúnmente conocido como cilantro en 0.887 g/mL para las hojas de la planta y 0,875 g/mL para el extraído de la semilla. Adicional a estos dos artículos, Tellez L y Nolazco D en el libro “Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes” (48) reportan la densidad del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare* spp.) en 0,913 g/mL. Es importante notar que la densidad de los aceites esenciales oscila entre 0,700 - 0,900 g/mL, como la obtenida en este trabajo para el aceite esencial de *Lippia alba*, siempre siendo menor a la densidad del agua (1 g/mL).

Los resultados de este trabajo orientan a que efectivamente el quimiotipo del aceite esencial de *Lippia alba* Carvona-Limoneno es uno de los más comunes en Colombia como lo indica Stashenko E. et al. En artículo “Estudio comparativo de la composición química y la actividad antioxidante de los aceites esenciales de algunas plantas del género *Lippia* (Verbenaceae) cultivadas en Colombia” (42) donde describen que los dos quimiotipos presentes en Colombia son Citral y Carvona. Igualmente, los mismos autores en el artículo “Estudio comparativo de la composición química de aceites esenciales de *lippia alba* provenientes de diferentes regiones de Colombia, y efecto del tiempo de destilación sobre la composición del aceite” (43), señalan que en Colombia se presentan tres quimiotipos principales como Citral, en los municipios de Colorado y Turbaco; Carvona, en los departamentos de Cundinamarca, Tolima, Valle del cauca, Santander, Antioquia, Quindio y Cesar, y un último quimiotipo híbrido en Arauca, el cual es rico en Citral, Carvona y Limoneno; en este sentido, se puede corroborar que la muestra vegetal

utilizada en este estudio concuerda con la distribución geográfica de la planta en Colombia, ofrecida por el grupo de investigación de Stashenko E.

Respecto a los componentes que se encuentran en mayores concentraciones en el aceite esencial, Zambrano E. y colaboradores en “Efecto de la fertilización nitrogenada en el rendimiento y la composición de los aceites esenciales de especies y accesiones de *Lippia*” (44) obtuvieron resultados muy similares a los del presente trabajo, pues muestran a Carvona (47.4%), Limoneno (36.0%), Germacreno D (8.3%), Piperitona (1.1%), Piperitenona (1.2%), biciclogermagreno (0.5%) y bourboneno (0.5%) como los principales componentes del aceite esencial de *Lippia alba*, siendo Carvona y Limoneno los más representativos. Contrario a los resultados obtenidos, en Brasil da Silva Júnior expone en su artículo “Seasonal and circadian evaluation of a citral-chemotype from *Lippia alba* essential oil displaying antibacterial activity” (45) diferentes concentraciones de componentes donde Neral (23.4%), Geraniol (7.6%), Geranial (28.6%), p-Cymene (4.0%) y Carvona (5.1%) son los principales compuestos. La variación entre las concentraciones de los componentes de diferentes países se correlaciona por que como se ha explicado anteriormente, existen diferentes factores que afectan o que predisponen la composición y/o rendimiento del aceite en las plantas, como la interacción de estas con el entorno que las rodea, ya sean microorganismos, insertos, factores ambientales u otras plantas.

De igual manera, existen aceites esenciales de plantas que tienen una composición química similar con respecto a los componentes principales de *Lippia alba*, como es el caso de *Mentha spicata* conocido como menta o yerbabuena, que fue estudiada por Mahboubi M. en “*Mentha spicata* L. essential oil, phytochemistry and its effectiveness in flatulence” (52), y encuentra que, en la planta recolectada de diferentes países, el principal compuesto es Carvona y Limoneno. Contrario a los aceites esenciales de plantas aromáticas comunes como albahaca (*Ocimum basilicum*), laurel (*Laurus nobilis*), manzanilla (*Chamaemelum nobile*), oregano, perejil (*Petroselinum crispum*), romero (*Rosmarinus officinalis*), tomillo (*Thymus vulgais*) y toronjil (*Melissa officinalis*).

El limoneno es uno de los terpenos más comunes en la naturaleza, también hace parte de los principales constituyentes de los aceites cítricos, es altamente oxidativo,

sensible a la temperatura y posee baja toxicidad, se utiliza ampliamente en la industria farmacéutica, alimentaria y perfumería debido a su aroma y sabor (49 - 50). Este compuesto ha sido parte de diversos estudios donde se ha estudiado su actividad contra insectos como el del trabajo hecho por Hollingsworth R en su artículo “Limonene, a Citrus Extract, for Control of Mealybugs and Scale Insects” que por medio de aspersión le añade limoneno al cultivo y resulta en un control del 93% de *Dactylopius coccus* (cochinillas) y >90% de *Aleyrodidae* (moscas blancas) (51).

Ademas, Badawy Mohamed et al. En el artículo “Acaricidal activity, biochemical effects and molecular docking of some monoterpenes against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch)” evalúan la actividad acaricida de monoterpenos y describen al Limoneno como el mejor inhibidor de la actividad de la gamma amino acido transaminasa, teniendo efecto acaricida (55).

Igualmente, en el artículo “Physico-chemical and antimicrobial properties of D-limonene oil nanoemulsion stabilized by whey protein–maltodextrin conjugates” se evaluó la actividad antimicrobiana de Limoneno, este inicialmente fue encapsulado por un método de ultrasonificación para emulsificar el compuesto y poder evaluar la concentración mínima inhibitoria (CMI) contra cepas de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhi* y *Bacillus cereus*, mostrando una CMI de 12.50 µL/mL(53).

Respecto a la función antifúngica, en “Comparative microbiological activity of volatile oils from anethum graveolens species” se evalúa Limoneno y Carvona contra *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium digitatum* y *Asperigallus niger*, obteniendo efecto inhibitorio en la actividad de la pectina metil esterasa (PME) y celulasa, pero no en el polifenol oxidasa (PPO) por parte del compuesto Limoneno, mientras que Carvona resulto siendo menos efectivo contra los patógenos enfrentados (54) apoyando lo explicado en “Comparative microbiological activity of volatile oils from Anrthum graveolens species” donde se realizaron ensayos midiendo la actividad antifúngica y encontraron que Carvona no tiene ninguna actividad fúngica, ni siquiera, al añadirle Limoneno a Carvona (complejo Limoneno - Carvona), no intensifica su actividad antifúngica.

Mustafa Ümit (56) señala que este compuesto también tiene efecto en las levaduras pues al enfrentarlo con *Saccharomyces cerevisiae* se observó inhibición del crecimiento celular, formación de etanol, y la utilización de azúcar.

Arrigoni Blank M encontró que el quimiotipo Carvona tiene una actividad larvicida y adulticida en *Rhipicephalus microplus* y en *Aedes aegypti* (57) igualmente en “Toxicity and repellency of essential oils of *Lippia alba* chemotypes and their major monoterpenes against stored grain insects” se evalúa la toxicidad y repelencia de Carvona contra *Sitophilus zeamais* (gorgojo del maíz) y *Tribolium castaneum* (gorgojo rojo de la harina) resultando en una alta toxicidad para ambos insectos (58).

En “Carvone (Mentha spicata L.) Oils” hablan de las propiedades antimicrobianas de Carvona y dentro de estas, mencionan actividad antibiótica con patógenos como *Salmonella typhimurium*, y D- Carvona igualmente tiene propiedades antimicrobianas contra *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Photobacterium leiognathi*, *Fusarium subglutinans*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus carbonarius*, *Alternaria alternata* y *Penicillium sp.* (59).

Adicionalmente, se tiene en cuenta que el aceite esencial de *Lippia alba* es un candidato viable para control biológico debido a que, en diversos ensayos *in vitro* ha demostrado que tiene hasta el 97% de control en fitopatógenos, igualmente, el rendimiento del aceite esencial en dichos estudios es aproximadamente 1%, incrementando en las zonas cálidas, lo que significa mayor obtención del aceite esencial en menor superficie cultivada. También, la producción del aceite esencial de *Lippia alba* es costo-efectivo debido a que el método de extracción más común y más barato es el arrastre de vapor (63), no requiere personal profesional para su funcionamiento, y según Blanco M. el método de extracción y secado no influyen en la calidad de los componentes del aceite esencial (64).

Por otro lado, uno de los cultivos más relevantes en Colombia es el del cacao, y muchas veces la producción de este se vea afectada por problemas fitosanitarios que producen pérdidas en el cultivo. Dentro las enfermedades que afectan la plantación del cacao se encuentra la infección causada por el hongo *Moniliophthora*

roreri el cual puede causar pérdidas hasta del 90% de la producción, sin embargo, Escobar P. describe que el aceite esencial de *Lippia alba* tiene efecto en la germinación y la inhibición del crecimiento micelar del hongo (65). Adicionalmente, el aceite esencial de *Lippia alba* también tiene efecto sobre *Acanthoscelides obtectus* un gorgojo que afecta el almacenamiento del frijol.

6. CONCLUSIONES

Se evidencia que el aceite esencial de *Lippia alba* tiene variedad de usos y aplicaciones, dentro de estas, se destaca la actividad antimicrobiana que se ve beneficiada por diversos componentes químicos dentro de su estructura como son Limoneno y Carvona, que, de hecho, son los dos compuestos más representativos del total del porcentaje de área en el aceite esencial, confiriéndole su quimiotipo, así mismo, poseen propiedades antifúngicas, antiparasitarias y antibacterianas que pueden o no ser utilizados en el sector agrícola para tratar diferentes patologías que afectan a los cultivos, siendo una gran alternativa al uso de agroquímicos y resultando ser más sostenible debido a que es amigable ambientalmente ya que es menos tóxico y dañino para la salud humana y el medio ambiente.

La extracción del aceite esencial se realizó por medio de la técnica de arrastre de vapor debido a que es una técnica que no requiere tecnología sofisticada y proporciona un alto rendimiento al momento que se lleva a cabo la extracción del aceite y la pureza del mismo es alta.

El ensayo realizado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas permitió la identificación de los compuestos presentes en el aceite esencial con la ventaja que es una técnica sensible, de alta resolución, entrega resultados cuantitativos y tiene una base de datos que orientan en la identificación de los compuestos del aceite esencial.

Aunque se ha demostrado que el aceite esencial de *Lippia alba* cuenta con propiedades antimicrobianas es importante continuar estudiando este aceite a nivel agrícola debido a que la mayoría de los artículos o libros publicados se encuentran con un enfoque en salud humana y no agrícola que es un campo de exploración con gran potencial.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Martínez A. aceites esenciales. Universidad de Antioquia; [Internet] 2001. [citado 20 oct 2018]. Disponible en: http://www.med-informatica.com/OBSERVAMED/Descripciones/AceitesEsencialesUdeA_escencias2001b.pdf
2. Reyes F, Palou E, Lopez A. Vapores de aceites esenciales: alternativa de antimicrobianos naturales. Temas selectos de ingenieria de alimentos. 2012;6:29 - 39.
3. Del Puerto Rodríguez A, Suárez Tamayo S, Palacio Estrada D. Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud [Internet]. Scielo.sld.cu. 2014 [citado 21 Oct 2018]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032014000300010
4. Linde, G. A.; Colauto, N. B.; Alberto, Edgardo Omar; Gazim, Z. C.; Quimiotipos, Extracción, Composición y Aplicaciones del Aceite Esencial de *Lippia alba*; Sociedade Brasileira de Plantas Mediciniais; Revista Brasileira de Plantas Mediciniais; 18; 1; 1-2016; 191-200
5. Escobar P, Leal SM, Herrera LV, Martinez JR, Stashenko E. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia spp* essential oils and their major components. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010; [citado 20 Oct 2018]. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762010000200013
6. Agudelo L, Gomez G, Duran D, Stashenko E, Betancur L. Composición química y evaluación de la actividad antiherpética in vitro de aceites esenciales de *Lippia alba* (Mill) N.E Brown y sus componentes mayoritarios. Salud UIS. 2010;
7. Santos N, Pascon R, Vallim M, Figueiredo C, Soares M, Lago J et al. Cytotoxic and Antimicrobial Constituents from the Essential Oil of *Lippia alba* (Verbenaceae). Medicines. 2016 [citado 24 Oct 2018] 3 (3):22. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5456251/>

8. Ringuelet J, Ocampo R, Henning C, Padín S, Urrutia M, Dalbello G. Actividad insecticida del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown sobre *Tribolium castaneum* Herbst. en granos de trigo (*Triticum aestivum* L.). Rev Bras de Agroecologia [Internet]. 2014 [citado 20 Oct 2018]; 61:102-110. Disponible en: <http://revistas.aba-agroecologia.org.br/index.php/rbagroecologia/article/view/15442/10204>.
9. Olivero-Verbel J, Barreto-Maya A, Bertel-Sevilla A, Stashenko E. Composition, anti-quorum sensing and antimicrobial activity of essential oils from *Lippia alba*. Brazilian Journal of Microbiology [Internet]. 2014 [citado 10 Agosto 2019];45(3):759-767. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4204956/>
10. Machado T, Nogueira N, Pereira R, Sousa C, Batista V. The antimicrobial efficacy of *Lippia alba* essential oil and its interaction with food ingredients. Brazilian Journal of Microbiology [Internet]. 2014 [citado 10 Agosto 2019];45(2):699-705. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4166302/>
11. Porfírio E, Melo H, Pereira A, Cavalcante T, Gomes G, Carvalho M et al. In Vitro Antibacterial and Antibiofilm Activity of *Lippia alba* Essential Oil, Citral, and Carvone against *Staphylococcus aureus*. The Scientific World Journal [Internet]. 2017 [citado 10 Agosto 2019]; 2017:1-7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5560023/>
12. Santos N, Pascon R, Vallim M, Figueiredo C, Soares M, Lago J et al. Cytotoxic and Antimicrobial Constituents from the Essential Oil of *Lippia alba* (Verbenaceae). Medicines [Internet]. 2016 [citado 10 Agosto 2019];3(3):22. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5456251/>
13. Glamočlija J, Soković M, Tešević V, Linde G, Colauto N. Chemical characterization of *Lippia alba* essential oil: an alternative to control green molds. Brazilian Journal of Microbiology [Internet]. 2011 [citado 10 Agosto 2019]; 42(4):1537-1546. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3768719/>
14. Bernal C. Extracción del aceite esencial de la cáscara de naranja: caracterización y estudio de potencial industria en el Ecuador [Internet].

- quito; 2012 [citado 6 mayo 2019]. Disponible en: <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/1980/1/105022a.pdf>
15. CAMERONI G. HISTORIA DE LAS HIERBAS AROMÁTICAS, ESPECIAS Y ACEITES ESENCIALES [Internet]. 2012 [citado 10 Agosto 2019]. Disponible en: <http://www.labamere.com/images/2012-Historia-de-las-hiervas-aromaticas-especias.pdf>
 16. LINDE G; COLAUTO N; ALBERTÓ E; GAZIM, Z. Quimiotipos, Extracción, Composición y Aplicaciones del Aceite Esencial de *Lippia alba*. Rev Bras [Internet]. 2016 [citado 10 agosto 2019];18(1):191-200. Disponible en: https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/55053/CONICET_Digital_Nro.dee941a9-6148-4a59-b2d1-fd742fe5f643_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y
 17. Chies C, Branco C, Scola G, Agostini F, Gower A, Salvador M. Antioxidant Effect of *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown. Antioxidants [Internet]. 2013;2(4):194-205. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4665525/>
 18. Abrevaya X. ¿Qué es la genotoxicidad? - Artículos - IntraMed [Internet]. Intramed.net. 2008 [citado 10 agosto 2019]. Disponible en: <https://www.intramed.net/contenidover.asp?contenidoid=47111>
 19. Angulo Vaca J. Caracterización y actividad antioxidante de propóleos de diferentes zonas apícolas de la provincia de Chimborazo utilizados en la Empresa APICARE - Riobamba. ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO [Internet]. 2014 [citado 10 agosto 2019]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/3188>
 20. De Souza, R. C., da Costa, M. M., Baldisserotto, B., Heinzmann, B. M., Schmidt, D., Caron, B. O., & Copatti, C. E. (2017). *Antimicrobial and synergistic activity of essential oils of Aloysia triphylla and Lippia alba against Aeromonas spp.* *Microbial Pathogenesis*, 113, 29–33. doi:10.1016/j.micpath.2017.10.013
 21. Moreno É, Leal S, Stashenko E, García L. Induction of programmed cell death in *Trypanosoma cruzi* by *Lippia alba* essential oils and their major and synergistic terpenes (citrinal, limonene and caryophyllene oxide). BMC Complementary and Alternative Medicine [Internet]. 2018 [citado 10

- agosto 2019]. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6062979/pdf/12906_2018_Article_2293.pdf
22. Lopez R, Ocazonez R, Martinez J, Stashenko E. Inhibitory effect of essential oils obtained from plants grown in Colombia on yellow fever virus replication in vitro. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* [Internet]. 2009 [citado 12 Agosto 2019];8(1):8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2661042/>
23. Hesham H. A. Rassem, Abdurahman H. Nour, Rosli M. Yunus., Techniques For Extraction of Essential Oils From Plants: A Review. *Aust. J. Basic & Appl. Sci.*, 10(16): 117-127, 2016
24. A Comprehensive Guide to Essential Oil Extraction Methods [Internet]. *Newdirectionsaromatics.com*. 2017 [citado 6 mayo 2019]. Disponible en: <https://www.newdirectionsaromatics.com/blog/articles/how-essential-oils-are-made.html>
25. Martinez E. USOS AGRONÓMICOS DE LOS ACEITES ESENCIALES DE ESPECIES AUTÓCTONAS [Internet]. 2017 [citado 20 Oct 2018]. Disponible en: <https://www.linkedin.com/pulse/uso-agron%C3%B3micos-de-los-aceites-esenciales-especies-ochando-mart%C3%ADnez>
26. France A. MANEJO DE ENFERMEDADES EN FRUTILLA [Internet]. 2013 [citado 28 Agosto 2019]. Disponible en: <http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/boletines/NR39090.pdf>
27. Jiménez P E, Mosquera M. O. Actividad antifúngica In vitro de tres extractos de plantas frente a *Botrytis cinerea* (Moho gris). *sys* [Internet]. 28abr.2015 [citado 29 Agosto 2019];1(2). Disponible en: https://revistas.uptc.edu.co/revistas/index.php/salud_sociedad/article/view/3495
28. Perfil de agente patógeno: *Alternaria* | PRO-MIX [Internet]. *Pthorticulture.com*. 2018 [citado 28 Agosto 2019]. Disponible en: <https://www.pthorticulture.com/es/centro-de-formacion/perfil-de-agente-patogeno-alternaria/>

29. Laemmlen F. Alternaria diseases [Internet]. university of california; 2019 [citado 28 Agosto 2019]. Disponible en: <https://anrcatalog.ucanr.edu/pdf/8040.pdf>
30. Uribe L, Castro L, Arauz F, Henríquez C, Blanco M. PUDRICIÓN BASAL CAUSADA POR *Phytophthora capsici* EN PLANTAS DE CHILE TRATADAS CON VERMICOMPOST [Internet]. Agron. Mesoam.; 2014 [citado 28 Agosto 2019]. Disponible en: <https://www.scielo.sa.cr/pdf/am/v25n2/a03v25n2.pdf>
31. González Ivonne, Yailén Arias, Peteira Belkis. GENERAL ASPECTS OF *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*-TOMATO INTERACTION. Rev. Protección Veg. [Internet]. 2012 Abr [citado 2019 Ago 31]; 27(1): 1-7. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522012000100001&lng=es.
32. Villa-Martínez A, Pérez-Leal R, Morales-Morales H, Basurto-Sotelo M, Soto-Parra J, Martínez-Escudero E. Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. Acta Agronómica 2015;64(2):194-205.
33. Glamoclija J, Sokovic M, Tesevic V, Linde GA, Colauto NB. Chemical characterization of *Lippia alba* essential oil: an alternative to control green molds. Brazilian J Microbiol 2011;42(4):1537-n/a.
34. Canabal González A. Evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales y de bacterias endofitas extraídas de *Lippia alba* y *Lippia origanoides* contra *Bulkholderia glumae*. Universidad de Sucre. 2017.
35. LINDE G, COLAUTO N, ALBERTÓ E, GAZIM Z. Quimiotipos, Extracción, Composición y Aplicaciones del Aceite Esencial de *Lippia alba*. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. 2016;18(1):191-200.
36. Cardona Montoya J. Estructura genética y fitogeografía de poblaciones colombianas de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae). Universidad Nacional de Colombia [Internet]. 2014 [citado 7 May 2019];. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/12886/1/9105502.2014.pdf>

37. Barroso-Albarracín JB, Carreras Egaña A, Valderrama R, Chaki M, Begara Morales JC, Mercado-Blanco J, et al. Cepa de trichoderma útil para el tratamiento y/o prevención de infecciones provocadas por hongos pertenecientes al género verticillium. 2011 Apr 15 [citado 28 Agosto 2019]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10261/92452>
38. Fahad Mohammedsaleh Albukhari. 0RW1S34RfeSDcfkexd09rT2Verticillium dahliae1RW1S34RfeSDcfkexd09rT2 causes the fungal wilting disease of cotton plants grown on the Mississippi State North Farm. Ann Arbor: Mississippi State University; 2015.
39. DIAZ-CELAYA, Marlene et al. Identificación de especies de Pythium aisladas de plantas ornamentales. Rev. Mex. Cienc. Agríc [online]. 2011, vol.2, n.spe3 [citado 2019-09-01], pp.431-443. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342011000900003&lng=es&nrm=iso>. ISSN 2007-0934.
40. Alvez B, Alonso G, Oropeza M. GENOTIPIFICACIÓN Y PERFIL BIOQUÍMICO DE AISLADOS DE Xanthomonas albilineans EN VENEZUELA. Interciencia 2016 11;41(11):732-739.
41. Gutierrez C, Droguet M. LA CROMATOGRAFÍA DE GASES Y LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS: IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS CAUSANTES DE MAL OLOR. BOLETÍN INTEXTER. 122.
42. Stashenko EE, Martínez JR, Durán DC, Córdoba Y, Caballero D. Estudio comparativo de la composición química y la actividad antioxidante de los aceites esenciales de algunas plantas del género Lippia (Verbenaceae) cultivadas en Colombia. Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat. [Internet]. 28 de noviembre de 2014 [citado 12 de septiembre de 2019];380:89-105. Disponible en: <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/156>
43. Durán G D, Monsalve L, Martínez J, Stashenko E. Estudio comparativo de la composición química de aceites esenciales de *Lippia alba* provenientes de diferentes regiones de Colombia, y efecto del tiempo de destilación sobre la composición del aceite [Internet]. Universidad Tecnológica de

- Pereira. 2007 [citado 11 Sep 2019]. Disponible en: <https://revistas.utp.edu.co/index.php/revistaciencia/article/view/6067>
44. Erika Leonor Zambrano M, luz angela BF, Leila AD, Manuel Salvador SO, Carmen Rosa BC. Efecto de la fertilización nitrogenada en el rendimiento y la composición de los aceites esenciales de especies y accesiones de *Lippia*. *Acta Agronómica* 2013;62(2):129-135.
 45. da Silva Júnior A, da Silva D, Figueiredo P, Sarrazin S, Bouillet L, de Oliveira R et al. Seasonal and circadian evaluation of a citral-chemotype from *Lippia alba* essential oil displaying antibacterial activity. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2019;85:35-42.
 46. Pino Alea Jorge A, Ortega Luis Ariel G, Rosado Pérez Arístides, Rodríguez Jorge Mayra, Baluja Ricardo. Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) n. e. Brown. *Rev Cubana Farm [Internet]*. 1996 Abr [citado 2019 Sep 21] ; 30(1). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75151996000100007&lng=es.
 47. Leal Torres E, Lopez Malo A, Sosa Morales M. Extracción, composición y caracterización de los aceites esenciales de hoja y semilla de cilantro (*Coriandrum sativum*). *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 2013;7(1):97 - 103.
 48. Tellez L, Nolazco D. Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. *Ingeniería industrial*. 2017.
 49. Rubiano K, Cárdenas J, Ciro H. EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES TERMODINÁMICAS Y TÉRMICAS DEL D-LIMONENO ENCAPSULADO MEDIANTE SECADO POR ASPERSIÓN. *Rev UDCA Act & Div Cient*. 2015;18(2):425 - 434.
 50. Sun J. D-limonene: Safety and clinical applications. *Alternative Medicine Review*. 2007.
 51. Hollingsworth, R. G. (2005). Limonene, a Citrus Extract, for Control of Mealybugs and Scale Insects. *Journal of Economic Entomology*, 98(3), 772–779. doi:10.1603/0022-0493-98.3.772

52. Mahboubi, M. (2018). *Mentha spicata* L. essential oil, phytochemistry and its effectiveness in flatulence. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. doi:10.1016/j.jtcme.2017.08.011
53. Sonu KS, Mann B, Sharma R, Kumar R, Singh R. Physico-chemical and antimicrobial properties of d-limonene oil nanoemulsion stabilized by whey protein–maltodextrin conjugates. *Journal of Food Science and Technology* 2018 07;55(7):2749-2757.
54. Marei G, Abdel Rasoul M, Abdelgaleil S. Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2012;103(1):56-61.
55. S. A. M. Abdelgaleil, M. E. I. Badawy, N. F. Mahmoud, A. E. S. M. Marei, Acaricidal activity, biochemical effects and molecular docking of some monoterpenes against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 156, 105–115. 2019.
56. M. Ü. Ünal, F. Uçan, A. Şener, S. Dinçer, Research on antifungal and inhibitory effects of DL-limonene on some yeasts. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 36, 576–582. 2012.
57. Peixoto MG, Costa-Júnior LM, Blank AF, Lima A da S, Menezes TSA, Santos D de A, et al. Acaricidal activity of essential oils from *Lippia alba* genotypes and its major components carvone, limonene, and citral against *Rhipicephalus microplus*. *Vet Parasitol*. 2015.
58. M. G. Peixoto et al., Toxicity and repellency of essential oils of *Lippia alba* chemotypes and their major monoterpenes against stored grain insects. *Industrial Crops and Products*. 71, 31–36. 2015.
59. Morcia C, Tumino G, Ghizzoni R, Terzi V. Carvone (*Mentha spicata* L.) Oils. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. 2016;309-316.
60. Tariq S, Wani S, Rasool W, Shafi K, Bhat M, Prabhakar A et al. A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microbial Pathogenesis*. 2019;134:103580.
61. Beatovic, Damir & Krstić-Milošević, Dijana & Trifunovic, Snezana & Petrovic, Jovana & Glamoclija, Jasmina & Ristic, Mihailo & Jelacic,

- Slavica. (2015). Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Essential Oils of Twelve *Ocimum basilicum* L. Cultivars Grown in Serbia. *Records of Natural Products*. 9. 62-75.
62. Barrera N, Bedoya P, Bonilla L. Índice de Kovats | Cromatografía de gases Química [Internet]. Scribd. [citado 3 Oct 2019]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/402339964/Indice-de-Kovats>
63. Barrientos J, Reina M, Chacón M. Potencial económico de cuatro especies aromáticas promisorias para producir aceites esenciales en Colombia. *REVISTA COLOMBIANA DE CIENCIAS HORTÍCOLAS* [Internet]. 2012 [citado 30 Oct 2019];6(2):225-237. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcch/v6n2/v6n2a10.pdf>
64. Blanco M. Rendimiento de biomasa y aceite esencial de quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown en respuesta a las prácticas agronómicas, y sus propiedades farmacológicas. *UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA* [Internet]. 2014 [citado 30 Oct 2019]. Disponible en: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/43581>
65. LOZADA, Betty Stefany et al. Efecto in vitro de aceites esenciales de tres especies de *Lippia* sobre *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) Evans et al., agente causante de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L.). *Acta Agron.* [Internet]. 2012, vol.61, n.2 [citado 30 oct 2019], pp.102-110. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-28122012000200002&lng=en&nrm=iso
66. Bernal C. Extracción del aceite esencial de la cáscara de naranja: caracterización y estudio de potencial industria en el Ecuador. Universidad San Francisco de Quito [Internet]. 2012. [citado 6 oct 2019] Disponible en: <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/1980>
67. *Lippia alba* [Internet]. Tramil.net. [citado 6 Oct 2019]. Disponible en: <http://www.tramil.net/sites/tramil.aegirprod.martinique.univ-antilles.fr/files/lippia-albamc2web.jpg>

Anexo 1

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS INSTITUTO DE CIENCIAS NATURALES
HREBARIO NACIONAL COLOMBIANO (COL)
INSTRUCCIONES PARA LA ENTREGA DE COLECCIONES BOTÁNICAS PARA
DETERMINACION

Señor usuario, cuando usted necesite utilizar los servicios del Herbario Nacional Colombiano (COL) para la determinación de colecciones botánicas, por favor tenga en cuenta la siguiente información:

1. El Herbario Nacional Colombiano recibe para determinación Angiospermas, Gimnospermas, Pteridófitas (helechos y plantas afines), Briófitas (musgos y hepáticas) y Hongos Liquenizados (Líquenes).
2. Las Gimnospermas y Angiospermas deben incluir ramas con flores y/o frutos y las Pteridófitas rizoma y soros (esporangios). Las Briófitas y Hongos Liquenizados pueden o no presentar estructuras reproductivas. En el caso de Angiospermas y Gimnospermas estériles y de colecciones deficientes no se garantiza su correcta determinación como tampoco su inclusión en el herbario.
3. El tamaño de un ejemplar botánico de Angiospermas, Gimnospermas o Pteridófitas debe ocupar un área no mayor a 40 X 30 cm (este tamaño corresponde a la mitad de una hoja de periódico, como la del periódico El Tiempo). En Briófitas y Hongos Liquenizados la muestra no debe ser mayor a 10 cm; procure que la colección quede esparcida y plana, nunca voluminosa.
4. El material botánico debe ser entregado prensado o alcoholizado según el caso y con etiquetas. Prensados significa colocar dentro de media hoja de papel periódico no mayor a 40 X 30 cm el ejemplar; si el ejemplar es de un tamaño considerable se aconseja dividir el ejemplar en dos o en tres partes y marcar el periódico respectivamente (ejemplo: número colecta 01a, 01b, 01c). De cada espécimen si es posible se deben entregar dos (2) ejemplares, debidamente prensados; uno de los ejemplares (testigo que avala la determinación) será incluido en el COL y el otro se utilizará como duplicados

para realizar canjes u obsequios entre herbarios. POR FAVOR NO PEGAR LOS EJEMPLARES CON NINGUN TIPO DE CINTA O ADHESIVO SOBRE EL PAPEL PERIODICO. En el caso de existir un solo ejemplar, este será depositado en el COL. Cada ejemplar debe llevar escrito en la parte exterior del periódico, con marcador indeleble, la siguiente información: su propio número de colección, independiente a los anteriores, donde indique las iniciales o el nombre del colector y el número correspondiente de colecta. Este número de colección debe corresponder con el que será posteriormente consignado en la etiqueta.

5. **ALCOHOLIZACIÓN** (este procedimiento solo debe ser realizado en ciertas ocasiones; por favor lea cuidadosamente): El material botánico debe ser alcoholizado, en caso de que no pueda ser secado o entregado al Herbario en un lapso de más de 36 horas posterior a su colección en el campo. Para alcoholizar los especímenes ya prensados, estos deben ser colocados uno sobre otro y deben ser sujetos con dos cartones en extremos opuestos, amarrándolos en forma de paquete. Este paquete se introduce dentro de una bolsa plástica gruesa, y se vierte abundante alcohol al 70% sobre el paquete con el fin de humedecer totalmente las muestras; inmediatamente se debe cerrar la bolsa para evitar que no se evapore el alcohol. El proceso de prensado y alcoholizado debe realizarse el mismo día en que se recolecta el material vegetal con el fin de evitar su deterioro.
6. **PRENSADO:** El material botánico debe ser entregado prensado, alcoholizado y con etiquetas. Pero si usted no desea alcoholizar el material, se puede secar y prensar de manera fácil y sin emplear hornos ni fuentes de calor; se coloca cada ejemplar botánico separado por varios periódicos (1 ó 2), en bloques y de forma inversa cada ejemplar, de no más de 10 especímenes, con cartones en los extremos, sobre los que se colocan ladrillos o libros o algún otro artefacto para ejercer presión (**Figura 1**). Para evitar que por la humedad ocurra ataque de hongos, se recomienda cambiar el periódico cada dos (2) días, hasta que el material quede completamente seco. Las flores y/o frutos, deben quedar a la vista y con hojas mostrando la cara inferior y la cara superior.
7. Es imprescindible que cada ejemplar esté acompañado por su respectiva

etiqueta (elaborada a máquina o en computador, en papel bond blanco de 75gr, de 9 cm de largo x 12 cm de ancho). **POR FAVOR NO PEGAR LA ETIQUETA AL EJEMPLAR O AL PERIODICO, ENTREGARLA SUELTA.** La etiqueta debe tener los siguientes datos (**Ver Figura 2**):

- a) Nombre del herbario: hace referencia al herbario de procedencia de la colección o en su defecto puede hacer referencia a FLORA DE COLOMBIA.
- b) Nombre común: utilizado por las comunidades rurales o aborígenes en el sitio en que se realizó la colección; si no se conoce este nombre **no poner nada en este espacio de la etiqueta.**
- c) Usos: los utilizados por los habitantes en el sitio en que se realizó la colección; si no se conoce **no poner nada en este espacio de la etiqueta.** Por favor NO transcribir usos de la literatura o de internet en la etiqueta.
- d) Caracteres de campo: relacionados con hábito o porte (hierba, arbusto, árbol, bejuco, liana, etc.), tamaño aproximado (alto o largo, en m o cm), color de las flores, frutos y/o semillas, presencia de exudados (látex, resinas o gomas), olores, sabores, información ecológica (abundante, escaso, raro, a lo largo de un caño o de un camino, etc.) y uso en la región. Estos datos corresponden a los que tenía la planta en vivo y no a descripciones provenientes de la literatura o de internet.
- e) Datos geográficos: se recomienda utilizar la siguiente secuencia: País (en mayúscula sostenida). Departamento, Municipio, Vereda o Corregimiento, hacienda o finca, y algún otro dato geográfico de interés. Si es posible incluya la posición geoastronómica (coordenadas geográficas).
- f) Altitud: altura sobre el nivel del mar; para ello utilice el altímetro o en su defecto altitudes aproximadas obtenidas a través de mapas o la literatura
Número del colector: utilice siempre un número de colección secuencial de uno (1) a n. Tenga en cuenta que cada uno de los ejemplares de un mismo individuo que usted entregue al herbario (numeral 4) tiene el mismo número de colección.
- g) Persona o personas que realizaron la colección: utilice nombre y apellido; cuando se trate de más de tres personas utilice el nombre de la primera persona y para el resto utilice la partícula et al.

- h) Fecha de colección: utilice la forma: 20 de enero de 2003.
 - i) Institución: programa o proyecto que financió la colección. Esto es opcional.
8. Tenga en cuenta que las letras que se encuentran en rojo en la **Figura 2** sólo representan espacios a ocupar con la información mencionada en el numeral **7**; **no las escriba en la etiqueta (Ver Figura 2a).**
9. En el caso de Briófitos y Hongos Liqueenizados, al momento de hacer la colecta por ningún motivo los introduzca en bolsas plásticas puesto que este material permite la rápida proliferación de hongos (por lo general se secan en sobres de papel, que deben ser cambiados diariamente antes de llegar al herbario); utilice papel bond blanco para reproducir el sobre modelo que proporcionamos en la **Figura 3** (puede usted trabajar sobre este formato, reemplazando la información aquí proporcionada por la de sus colecciones e imprimir directamente). Esta operación la puede usted realizar tantas veces como sobres requiera) y generar el sobre de la **Figura 3**, doblando el papel por las marcas proporcionadas.

La recepción de la colección botánica se realizará en la Universidad Nacional de Colombia – Instituto de Ciencias Naturales – Edificio 425- Cra 30 No.45-03 por la entrada de la Calle 53 en la Secretaría de Colecciones Científicas del Instituto de Ciencias Naturales, en un horario de Lunes a Viernes de 8.30 am a 12:00 am y en la tarde de 2:00 pm a 4:00 pm, para ello se solicita una carta de la persona o institución que solicita el servicio, en la que se debe especificar la cantidad de especímenes entregados para determinación, a nombre de quien debe ir el certificado, nombre y teléfono móvil para contactar.

Para efectos de pago por favor hacer un prepago consignando en el **BANCO POPULAR - CUENTA DE AHORROS No. 22001272001-7 Cuenta a Nombre de Fondo Especial Facultad de Ciencias, en la casilla “Relación de pagos” por favor colocar SERVICIOS DE HERBARIO Código 20132428.**

Una vez efectuada la consignación, deberá llevar o enviar el original y una fotocopia del Rut o de la Cédula de Ciudadanía, según sea el caso, a la secretaría del Herbario Nacional Colombiano o al email

herbacol_fcboq@unal.edu.co para generar la correspondiente constancia de pago. Tenga en cuenta que la constancia de pago saldrá a nombre de la persona o compañía que fue especificada en el recibo de consignación del Banco Popular; es imposible cambiar este nombre en la constancia de pago una vez esta haya sido elaborada. Adicionalmente solicitamos envíe los datos de la persona a contactar y a quien deba dirigirse la certificación y constancia. Sin esa información no podemos avalar el pago, generar la constancia de pago ni la correspondiente certificación. Por otra parte, se debe tener en cuenta que la certificación general que el Herbario emite no es válida para trámites ante el INVIMA o el ICA. Para trámites ante esta entidad, se debe solicitar un certificado especial cuyo costo difiere del certificado general.

Es de tener en cuenta que los resultados serán entregados veinticinco (25) días hábiles contados a partir del momento en que este hecho el pago y el día de recepción de las muestras.

Colecciones que no cumplan las normas anteriormente señaladas serán rechazadas por el Herbario Nacional Colombiano.

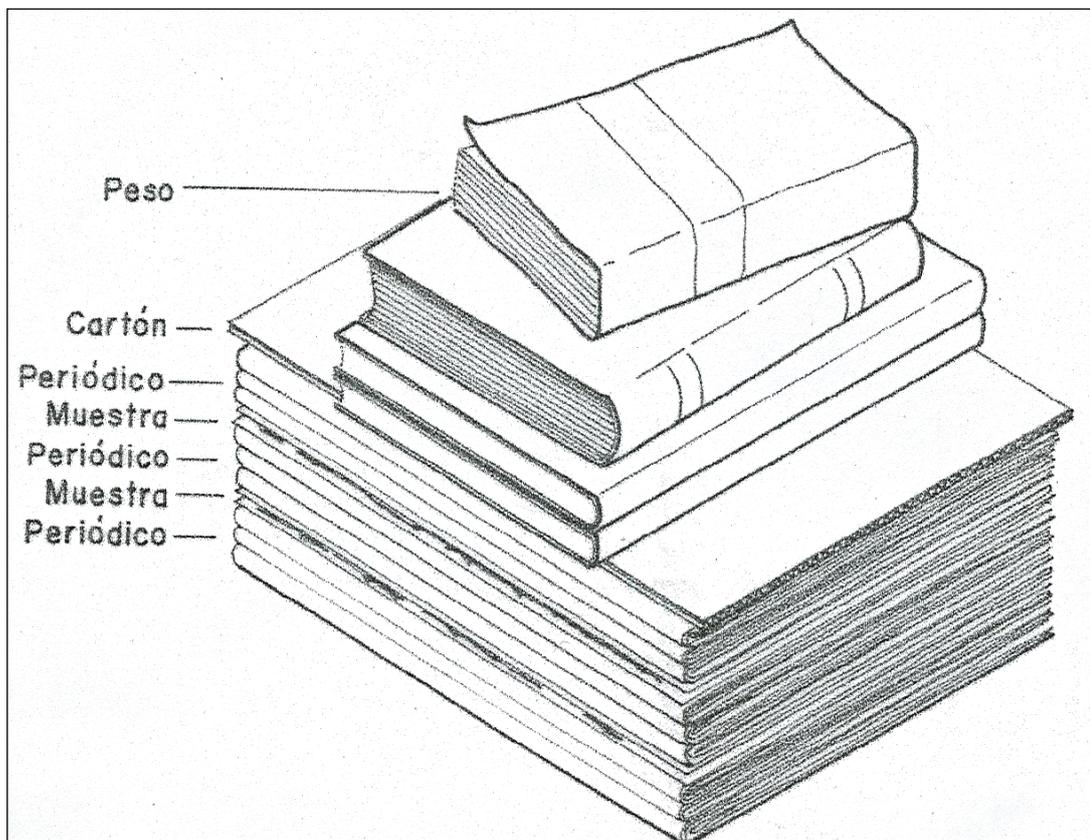


Figura 1. Prensado y secado de colecciones botánicas

(a) **FLORA DE COLOMBIA HERBARIO NACIONAL COLOMBIANO**

b) **Nombre común:** “Frambuesa”

c) **Usos:** El fruto es comestible. Sirve para ayudar con la digestión y se dice que ayuda a prevenir el cáncer de colón.

d) **Descripción:** Arbusto de 3 m de altura aproximadamente, frutos rojos y jugosos, crece en clima templado.

e) **Localización:** COLOMBIA. Boyacá, Sutatenza, Vereda El Salitre, Finca El Bosque. f) **Alt.**1320

h) **Colector:** Tomas León y Ángela León.

j) **Proyecto:** Colección financiada por el Convenio Universidad Nacional – Corpoguavio

No. g) 1 Fecha i) 28 de enero de 2007
:
:

Figura 2. Formato de una etiqueta de herbario (por favor **no** escriba en la etiqueta las letras que se encuentran en color rojo; esto es tan solo una guía). Recuerde que no debe incluir información en la etiqueta tomada de la literatura o de internet (ver numeral 7 arriba).

FLORA DE COLOMBIA HERBARIO NACIONAL COLOMBIANO	
Nombre común: “Frambuesa”	
Usos: El fruto es comestible. Sirve para ayudar con la digestión y se dice que ayuda a prevenir el cáncer de colón.	
Descripción: Arbusto de 3 m de altura aproximadamente, frutos rojos y jugosos, crece en clima templado.	
Localización: COLOMBIA. Boyacá, Sutatenza, Vereda El Salitre, Finca El Bosque. Alt.1320	
Colector: Tomas León y Ángela León.	
Colección financiada por el Convenio Universidad Nacional – Corpoguavio	
No. 1	Fecha 28 de enero de 2007
:	:

Figura 2a. PRESENTACION CORRECTA DE UNA ETIQUETA

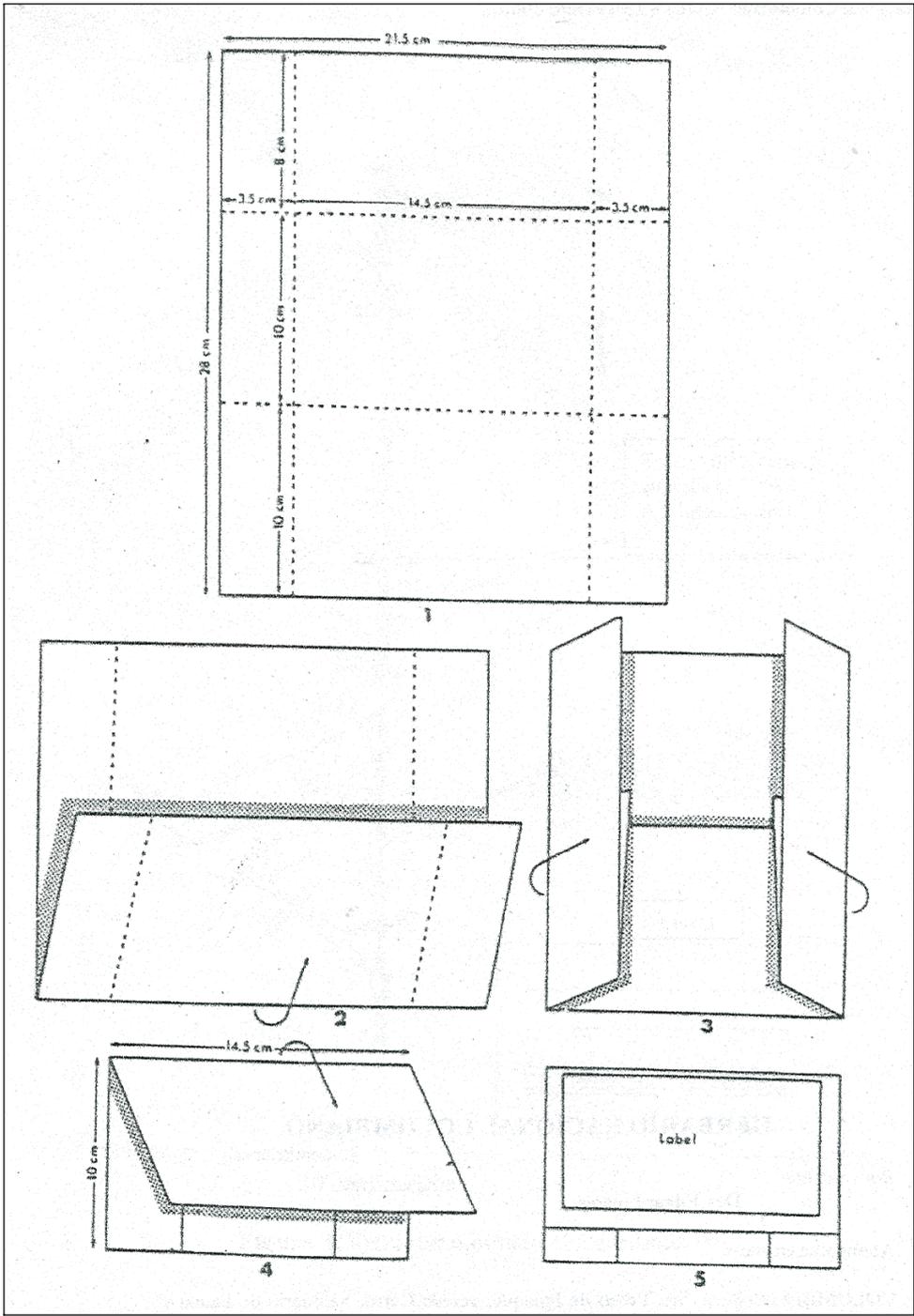
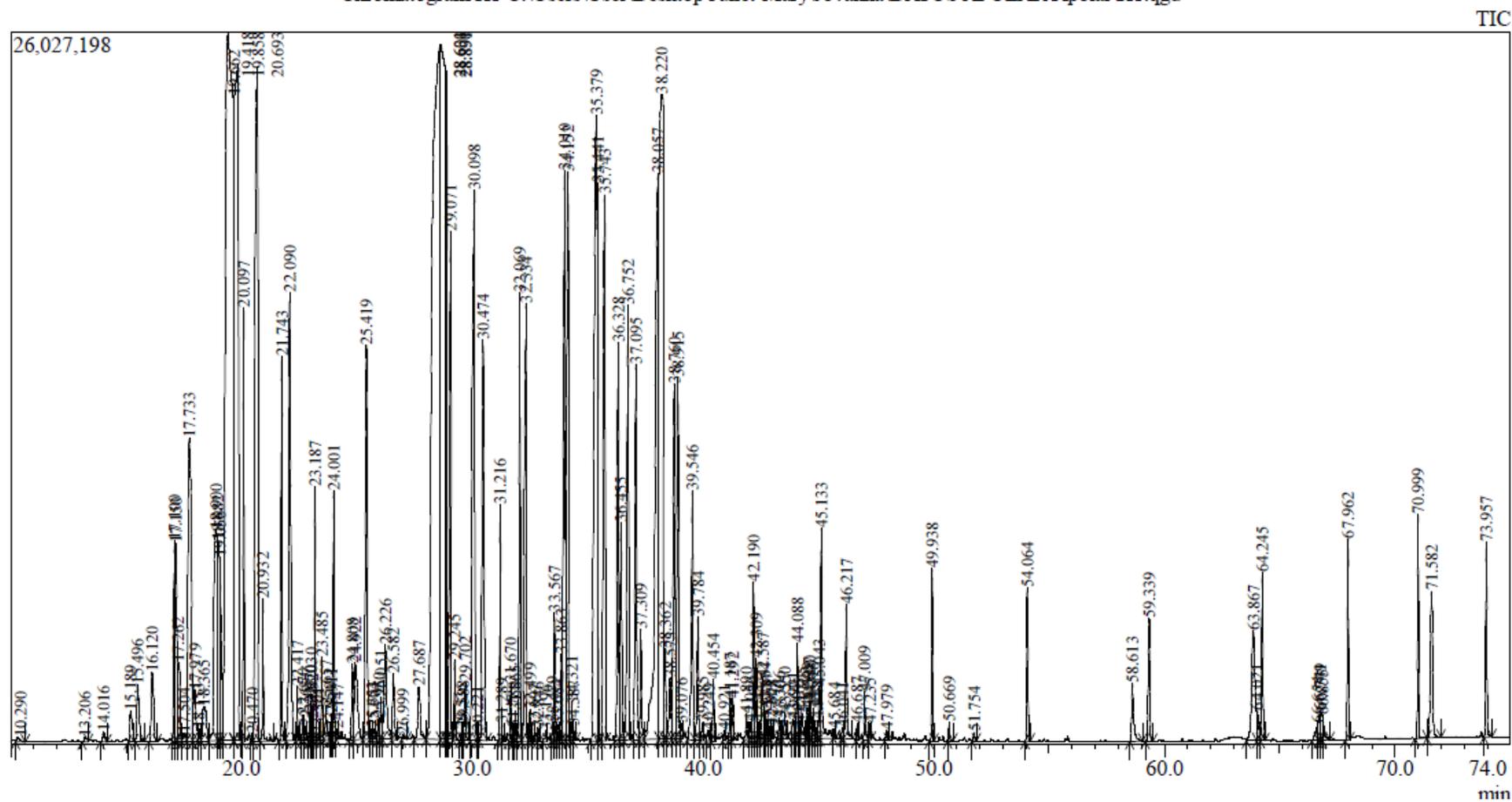


Figura 3. Elaboración sobre para briofitos y hongos liquenizados.

Anexo 3

Repetición 1

Chromatogram H1 C:\Users\User\Desktop\Juliet-Mary\Jovanna\DATOS APOLAR\Apolar\H1.qgd



Repetición 3

Chromatogram H3 C:\Users\User\Desktop\Juliet-Mary\Jovanna\DATOS APOLAR\Apolar\H3.qgd

