

**ESTUDIO DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE
OREGANO SILVESTRE DEL ALTO PATIA (*Lippia organoides Kunth*) Y
DETERMINACIÓN DE LA INFLUENCIA DE ALGUNAS CONDICIONES
AGROECOLÓGICAS EN SU COMPOSICIÓN Y RENDIMIENTO**

**ALEXANDER FELIPE BOLAÑOS CAICEDO
OSCAR ARMANDO VILLOTA BRAVO**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
SAN JUAN DE PASTO
2010**

**ESTUDIO DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE
OREGANO SILVESTRE DEL ALTO PATIA (*Lippia organoides Kunth*) Y
DETERMINACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES
AGROECOLÓGICAS EN SU COMPOSICIÓN Y RENDIMIENTO**

**ALEXANDER FELIPE BOLAÑOS CAICEDO
OSCAR ARMANDO VILLOTA BRAVO**

**Trabajo de grado, presentado como requisito parcial para optar al título de
Ingeniero Agroindustrial**

**Asesor:
OSCAR ARANGO BEDOYA
Ingeniero Agroindustrial
Magíster en Ingeniería Sanitaria y Ambiental**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
SAN JUAN DE PASTO
2010**

NOTA DE RESPONSABILIDAD

“Las ideas y conclusiones aportadas en el trabajo son responsabilidad exclusiva de su autor”

Artículo 1 de Acuerdo N° 324 de octubre 11 de 1966 emanada por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación

Firma del Presidente del jurado

Firma del Jurado

Firma del jurado

San Juan de Pasto, Mayo de 2010

AGRECIAMIENTOS

Al magíster Oscar Arango por su apoyo y amistad incondicional. Al Ingeniero Hugo Gomajoa quien desde el primer momento nos brindó todo su apoyo, colaboración y amistad sin interés alguno. Al Doctor Andrés Hurtado por su asesoría especializada. A los Ingenieros Diana Bolaños y Julián Acosta por todos sus consejos oportunos. A nuestras familias quienes desde lo lejos siempre estuvieron pendientes de nuestras labores. A las entidades como CORPOICA, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Planta Piloto y demás quienes hicieron posible la culminación de este proyecto.

En general quisiéramos agradecer a todas y cada una de las personas que han vivido con nosotros la realización de esta tesis, con sus altos y bajos y que no necesito nombrar, porque tanto ellas como nosotros sabemos que desde lo más profundo de nuestros corazones les agradecemos el habernos brindado todo el apoyo, colaboración, ánimo y sobre todo su amistad.

DEDICATORIA

*A dios por se siempre la luz que me indica el camino y el motor de mi existencia
a mis padres por su amor y apoyo incondicional*

A mis hermanos por su compañía durante mi vida

*Y a todas las personas que siempre estuvieron a mi lado fijando metas para así
alcanzar sueños....*

Alexander Felipe Bolaños Caicedo

DEDICATORIA

A dios por ser el apoyo incondicional en los malos y buenos momentos de mi vida

A mi madre por su sacrificio para que esta meta fuera posible

A mis tías y familiares por su desinteresada y constante colaboración

Y a todas las personas que de una u otra manera aportaron su granito de arena para alcanzar este logro.

Oscar Armando Villota Bravo

RESUMEN

En este trabajo de investigación se estudiaron las condiciones más apropiadas para la extracción del aceite esencial de orégano silvestre del alto Patía (*Lippia origanoides Kunth*), mediante la técnica de arrastre con vapor, y además se determinó el efecto de las condiciones agroecológicas sobre la composición y rendimiento del aceite.

Se llegó a determinar que el rendimiento de extracción promedio a nivel de laboratorio fue de un 2.67%, y en planta piloto de 2.76%; de igual manera el estudio arrojó que en el proceso de optimización en laboratorio y planta piloto los niveles superiores de los factores o variables estudiadas maximizan el rendimiento del aceite esencial y el contenido de timol del mismo.

En cuanto al efecto de las condiciones agroecológicas se obtuvo que el factor vereda y la interacción vereda – época de recolección, influyen sobre el rendimiento de extracción de aceite esencial de orégano, contrario de la edad de la planta y la época de recolección que no mostraron un efecto significativo sobre el rendimiento del aceite.

Los mayores rendimientos se obtuvieron en las muestras procedentes de las veredas Alto de Mayo, San Juanito y El Cardo con un promedio de 3,01% y los menores rendimientos fueron del orden de 2,53% en la vereda Las Juntas.

En cuanto al contenido de los componentes mayoritarios del aceite esencial, se obtuvo que estos son dependientes de la época de recolección de las hojas.

En promedio se obtuvo un contenido de timol de 72.54% (intervalo de variación entre 65% y 85%), p-cimeno de 10,7% (intervalo de variación entre 8% y 14%) y γ -terpineno de 4,9% (intervalo de variación entre 3,5% y 5,6%).

ABSTRACT

In this investigation work the most appropriate conditions were studied for the extraction of the essential oil of wild oregano of the high Patía (*Lippia origanoides* Kunth), by means of the haulage technique with vapor, and you also determines the effect of the conditions agroecológicas on the composition and yield of the oil.

You ended up determining that the yield of extraction average at laboratory level was of 2.67%, and in plant pilot of 2.76%; in a same way the study hurtles that in the process of optimization in laboratory and pilot plants the superior levels of the factors or studied variables maximize the yield of the essential oil and the content of timol of the same one.

As for the effect of the conditions agroecológicas it was obtained that the factor sidewalk and the interaction sidewalk - gathering time, they influence on the yield of extraction of oil oregano essential, contrary of the age of the plant and the gathering time that didn't show a significant effect on the yield of the oil.

The biggest yields were obtained in the samples coming from the High sidewalks of May, San Juanito and The Thistle with an average of 3,01% and the smallest yields were of the order of 2,53% in the sidewalk The Meetings.

As for the content of the majority components of the essential oil, it was obtained that these they are dependent of the time of gathering of the leaves.

Was a content of timol of 72.54% obtained on the average (variation interval between 65% and 85%), p-cimeno of 10,7% (variation interval between 8% and 14%) and? - terpineno of 4,9% (variation interval between 3,5% and 5,6%).

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN.....	20
1. IDENTIFICACIÓN Y ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA.....	22
2. JUSTIFICACIÓN.....	23
2.1 JUSTIFICACIÓN TEÓRICA.....	23
2.2 JUSTIFICACIÓN METODOLÓGICA.....	23
2.3 JUSTIFICACIÓN PRÁCTICA.....	23
3. OBJETIVOS.....	25
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
4. MARCO REFERENCIAL.....	26
4.1 GENERALIDADES.....	26
4.1.1 El orégano.....	26
4.1.2 Clasificación Taxonómica. <i>Lippia origanoides Kunth</i>	26
4.1.3 Composición y usos potenciales del orégano.....	27
4.2 ACEITES ESENCIALES.....	33
4.2.1 Clasificación de los aceites esenciales.....	33
4.2.2 Distribución y estado natural.....	34
4.2.3 Extracción y aislamiento.....	35
4.2.4 Usos y mercado de los aceites esenciales.....	36
4.3 EXTRACCIÓN POR ARRASTRE CON VAPOR.....	37
4.4 HIDRODESTILACIÓN.....	37
4.4.1 Hidrodestilación asistida por radiación con microondas.....	38
4.5 CROMATOGRAFÍA.....	40
4.5.1 Cromatografía de gases.....	40
4.5.2 La espectrometría de masas.....	41
4.5.3 Acoplamiento cromatografía de gases- espectrometría de masas.....	42
5. DISEÑO METODOLÓGICO.....	44

5.1 SITIO Y DISEÑO DEL MUESTREO	44
5.2 DISEÑOS EXPERIMENTALES.	44
5.2.1 Optimización del proceso de extracción a nivel de laboratorio y planta piloto.	44
5.2.2 Evaluación del efecto de algunas condiciones agroecológicas sobre el rendimiento y la composición del aceite esencial de orégano	47
5.3 PROCESO DE EXTRACCIÓN.....	49
5.3.1 Proceso de extracción a nivel de laboratorio y planta piloto	49
5.3.2. Estudio del efecto de algunas condiciones agroecológicas sobre el rendimiento de extracción y la composición del aceite esencial	51
5.4 DETERMINACIÓN DE LOS RENDIMIENTOS DEL ACEITE ESENCIAL.....	53
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
6.1 COMPOSICIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE OREGANO SILVESTRE DEL ALTO PATÍA	54
6.2 OPTIMIZACIÓN A NIVEL DE LABORATORIO DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE ARRASTRE CON VAPOR.	56
6.2.1 Análisis de resultados en función del rendimiento	56
6.2.2 Análisis de resultados en función del contenido de timol.....	61
6.3 OPTIMIZACIÓN A NIVEL DE PLANTA PILOTO DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE ARRASTRE CON VAPOR.....	65
6.3.1 Análisis de resultados en función del rendimiento	65
6.3.2 Análisis de resultados en función del contenido de timol.....	71
6.4 ESTUDIO DEL EFECTO DE ALGUNAS CONDICIONES AGROECOLÓGICAS SOBRE EL RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN Y LA COMPOSICIÓN DEL ACEITE ESENCIAL.	75
6.4.1. Efecto del origen, la época de recolección y la edad de la planta sobre el rendimiento del aceite esencial.....	76

6.4.2. Efecto del origen, la época de recolección y la edad de las hojas de la planta sobre la composición del aceite esencial.	80
6.4.2.1. Efecto del origen, la época de recolección y la edad de las hojas de la planta sobre el contenido de timol en el aceite esencial de orégano:	80
6.4.2.2 Efecto del origen, la época de recolección y la edad de la planta sobre el contenido de p-cimeno en el aceite esencial de orégano:	84
7. CONCLUSIONES	89
8. RECOMENDACIONES	91
BIBLIOGRAFÍA	92
ANEXOS	96

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Clasificación taxonómica de <i>Lippia origanoides</i> Kunth	26
Cuadro 2. Factores o variables independientes estudiados y sus niveles a nivel de laboratorio y planta piloto	45
Cuadro 3. Matriz experimental para la optimización a nivel de laboratorio de la extracción del aceite esencial de orégano.	46
Cuadro 4. Matriz experimental para la optimización a nivel de planta piloto de la extracción de aceite esencial de orégano.	47
Cuadro 5. Matriz experimental para la evaluación del efecto de algunas condiciones agroecológicas sobre el rendimiento y la composición del aceite esencial de orégano.	48
Cuadro 6. Posibles compuestos encontrados en el aceite esencial de orégano silvestre del Alto Patía (<i>Lippia origanoides</i>).	55
Cuadro 7. Rendimientos obtenidos para la extracción de aceite esencial de <i>Lippia origanoides</i> a nivel de laboratorio.	57
Cuadro 8. ANOVA para el rendimiento del aceite esencial de orégano a nivel de laboratorio	58
Cuadro 9. Respuesta óptima para rendimiento en aceite esencial de orégano a nivel de laboratorio.	61
Cuadro 10. Contenido de timol del aceite esencial obtenido a partir de hojas de <i>Lippia origanoides</i>	61
Cuadro 11. ANOVA para contenido de timol (% relativo) en aceite esencial de orégano a nivel de laboratorio.	62
Cuadro 12. Respuesta óptima para contenido de timol en aceite esencial de orégano a nivel de laboratorio.	65
Cuadro 13. Rendimiento del aceite esencial de hojas de <i>Lippia origanoides</i> extraído en Planta Piloto.	66
Cuadro 14. ANOVA para el rendimiento de la extracción en aceite esencial de orégano a nivel de planta piloto	67

Cuadro 15. Respuesta óptima para el rendimiento en la extracción de aceite esencial a nivel de planta piloto.	70
Cuadro 16. Contenido de timol del aceite esencial de hojas de <i>Lippia origanoides</i> extraído en planta piloto.....	71
Cuadro 17. ANOVA para contenido de timol (% relativo) en aceite esencial de orégano a nivel de planta piloto.	72
Cuadro 18. Respuesta óptima para contenido de timol en aceite esencial de orégano a nivel de planta piloto.	75
Cuadro 19. Rendimientos y composición del aceite esencial de orégano del Alto Patía en función de algunas variables agroecológicas	76
Cuadro 20. Análisis de varianza para rendimiento en función del origen, la época de recolección y la edad de las hojas de la planta.....	78
Cuadro 21. Prueba de rangos múltiples para rendimiento con base en LSD Fisher.....	79
Cuadro 22. Análisis de varianza para el contenido de timol en el aceite esencial	80
Cuadro 23. Análisis de varianza para el contenido de p-cimeno en el aceite esencial.....	84
Cuadro 24. Tabla comparativa de los resultados obtenidos en esta investigación frente a los encontrados por otros autores.	88

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura química de los principales componentes presentes en el aceite esencial de orégano (<i>Lippia origanoides</i>).....	29
Figura 2. Cromatograma general de una muestra de aceite esencial de orégano silvestre del Alto Patía.	54

LISTA DE GRÁFICOS

	Pág.
Grafico 1. Diagrama de Pareto para el rendimiento del aceite esencial de orégano a nivel de laboratorio.....	59
Grafico 2. Diagrama de efectos principales para el rendimiento de extracción de aceite esencial de orégano a nivel de laboratorio.	60
Gráfico 3. Superficie de respuesta para la optimización del rendimiento de aceite esencial de orégano a nivel de laboratorio.	60
Gráfico 4. Diagrama de Pareto para el contenido de timol en el aceite esencial de orégano obtenido a nivel de laboratorio.....	63
Gráfico 5. Diagrama de efectos principales para el contenido de timol en el aceite esencial de orégano obtenido a nivel de laboratorio.....	64
Gráfico 6. Superficie de respuesta para contenido de timol a nivel de laboratorio.	64
Gráfico 7. Diagrama de Pareto para el rendimiento de extracción de aceite esencial de orégano a nivel de planta piloto.	68
Gráfico 8. Diagrama de efectos principales para el rendimiento en la extracción de aceite esencial de orégano a nivel de planta piloto.....	69
Gráfico 9. Superficie de respuesta para el rendimiento en la extracción de aceite esencial a nivel de planta piloto.	69
Gráfico 10. Diagrama de Pareto para contenido de timol a nivel de planta piloto..	73
Gráfico 11. Diagrama de efectos principales para contenido de timol en el aceite esencial de orégano obtenido a nivel de planta piloto.	74
Gráfico 12. Superficie de respuesta para contenido de timol a nivel de planta piloto.	74
Grafico 13. Interacción de las variables vereda y época de recolección en función del rendimiento.	79
Gráfico 14. Promedios e intervalos de LSD de Fisher en relación al contenido de timol.	82

Gráfico 15. Interacción de las variables época de recolección y edad de las hojas en función del porcentaje relativo de timol.	83
Gráfico 16. Promedios e intervalos de LSD de Fisher en relación al contenido de p-cimeno.	85
Gráfico 17. Interacción de las variables época de recolección y edad de las hojas en función del porcentaje relativo de p-cimeno.	86
Gráfico 18. Interacción de las variables época de recolección y vereda en función del porcentaje relativo de p-cimeno.	87

LISTA DE IMÁGENES

	Pág.
Imagen 1. Equipo de arrastre con vapor a nivel de laboratorio.....	50
Imagen 2. Equipo de arrastre con vapor a nivel de planta piloto.	50
Imagen 3. Equipo de Hidrodestilación asistida por microondas.....	51

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Guía para la colecta de material vegetal de hábitat natural.....	97
Anexo B. Determinación de la composición química del aceite esencial de orégano silvestre del Alto Patía por cromatografía de gases con detector selectivo de masas (GC-MS), realizado por el laboratorio de cromatografía de la Universidad Industrial de Santander.	99
Anexo C. Cromatograma de las parafinas utilizadas en la identificación de los posibles compuestos de todas las muestras analizadas por GC-FID.	103
Anexo D. Cromatograma obtenidos por GC-FID de muestras de aceite esencial de orégano silvestre del Alto Patía (<i>lippia organoides Kunt</i>); extracción por arrastre con vapor a nivel de laboratorio.....	104
Anexo E. Cromatogramas obtenidos por GC-FID de muestras de aceite esencial de orégano silvestre del Alto Patía (<i>lippia organoides Kunt</i>); extracción por arrastre con vapor a nivel de planta piloto.	114
Anexo F. Cromatogramas obtenidos por GC-FID de muestras de aceite esencial de orégano silvestre del Alto Patía (<i>lippia organoides Kunt</i>); extracción por MWHD; estudio del efecto de algunas condiciones agroecológicas sobre la composición y rendimiento del aceite esencial.	121

INTRODUCCIÓN

El cultivo de orégano es muy tradicional alrededor del mundo y con una amplia distribución en Europa y Asia. La producción mundial de orégano seco supera las 60.000 toneladas y si a esto se le agregan los productos frescos, congelados y los que se destinan a la producción de aceites esenciales y oleorresinas, se llega a un mercado de exportación en expansión, que en el caso de Colombia es factible de acrecentar exitosamente por productores nacionales, en la medida que la calidad del producto cumpla con las crecientes exigencias del mercado nacional e internacional. Comercialmente se conocen bajo la forma de orégano varias especies, entendiéndose que bajo este carácter se considera principalmente sus características de aroma y sabor. Los principales productores de orégano (*Oregano vulgare*) son Turquía, Grecia e Israel, en Latinoamérica sobresalen Chile y Perú, que están consolidando cada vez más su oferta en los mercados mundiales. México a su vez presenta altos niveles de producción del denominado "orégano mexicano" (*Lippia graveolens*) que corresponde a un producto con unas características específicas y similares a las encontradas en Colombia. En cuanto a los importadores se destaca Estados Unidos con más del 10% del volumen total, seguido por la Unión Europea, especialmente Alemania, Italia, Francia y España. En Sudamérica los principales importadores son Brasil, Uruguay y Argentina. Este panorama muestra el orégano como condimento, pero no en el papel de sus bio-componentes funcionales.

El uso de orégano ha sido asociado de manera estratégica con la Fitomedicina ya que la planta contiene poderosos compuestos anti-microbiales y antioxidantes. Las distintas características de la planta de orégano requieren asegurar la calidad, eficacia y estabilidad del producto final extraído de la misma, debido a que la actividad biológica varía significativamente con la genética y los parámetros ambientales locales, por lo que se requiere de estrategias innovadoras, las cuales incluyan la caracterización de los nichos o conglomerados de producción y la definición de potencialidades para el desarrollo de plantas con un perfil óptimo de ingredientes específicos biológicamente activos en un escenario de procedimientos experimentales tecnológicos eficazmente estandarizado. En este sentido, entre los muchos factores que afectan la composición de los aceites esenciales del orégano, los más importantes son el origen de la planta, la parte de la planta utilizada, el estado de desarrollo, el clima y las condiciones de crecimiento (temperatura, suelo, fertilizante), así como el tipo de destilación y las condiciones de almacenamiento (Cosentino et al., 1999; McGimpsey et al., 1994).

El orégano silvestre, (*Lippia origanoides Kunth*), tiene una fragancia fuerte la cual se conoce que proviene de la presencia de aceites esenciales. Estas sustancias naturales son fuente de aromas, perfumes y fragancias las cuales tienen un alto valor comercial. Su extracción, si bien se hace a través de un proceso industrial, no se trata de una tecnología muy sofisticada y la infraestructura requerida se

puede construir en Colombia. En la presente investigación se estudiaron las condiciones más apropiadas para la extracción de aceite esencial de orégano silvestre mediante la técnica de arrastre con vapor a nivel de laboratorio y planta piloto y además se determinó el efecto del origen, edad de la planta sobre la composición y rendimiento de dicho aceite.

1. IDENTIFICACIÓN Y ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA

Al norte del departamento de Nariño y sur del Cauca se encuentra la región del Alto Patía, que se caracteriza por poseer un clima seco, suelos áridos, devastación forestal, escasez de fuentes hídricas, entre otras dificultades, pero igualmente abunda de forma silvestre una especie de orégano la cual hasta el momento localmente no se le ha dado ningún uso. Algunos estudios como los de Cosentino et al., 1999; y McGimpsey et al., 1994., han demostrado que esta planta posee aceites esenciales que contienen compuestos con propiedades antimicrobiales y antioxidantes por lo que tienen potencialidad para ser utilizados como preservantes, como suplemento alimenticio para estimular el sistema inmunológico y mejorar la producción de carne en peces, cerdos y aves, como fungicida entre otros usos, por lo tanto es necesario promover el desarrollo de nuevas tecnologías que exploten las potencialidades que posee la región para así lograr un cambio en la cultura de aprovechamiento de los recursos propios de esta zona, generando una alternativa de trabajo e ingresos a los habitantes.

Teniendo en cuenta estos aspectos es de vital importancia profundizar en la investigación de esta variedad realizando estudios sobre la composición y rendimiento del aceite esencial de orégano nativo del alto Patía y la influencia que puedan tener las condiciones agroecológicas de producción, en su composición y rendimiento, determinando con lo anterior las condiciones óptimas de extracción mediante arrastre con vapor debido a que en el momento no se encuentran estudios científicos realizados sobre estos importantes aspectos que determinan la viabilidad económica y que favorecen la explotación de recursos propios de la región.

2. JUSTIFICACIÓN

2.1 JUSTIFICACIÓN TEÓRICA

Turgut Dunford y Silva Vázquez, 2005., señalan que la concentración de muchos de los metabolitos secundarios presentes en los aceites esenciales de una determinada especie de planta se ve afectada por diversos factores agroecológicos y ambientales, como el clima, la época de lluvias o de sequías, la altitud, las características del suelo, el nivel de radiación solar, la edad o estado de desarrollo de la planta, etc.

En el presente proyecto se analizaron la influencia de tres factores (época del año, edad de la planta y altitud de la zona de producción) con relación al rendimiento de extracción y composición en la producción de aceite esencial de orégano silvestre del alto Patía específicamente respecto al contenido de timol como componente mayoritario de interés con fines comerciales. Lo anterior permitió conocer cuales son las condiciones en las cuales se obtiene un aceite esencial con unas características deseables con miras a una explotación comercial sostenible de la especie.

Por otro lado también se ha demostrado que las condiciones bajo las cuales se realiza el proceso de extracción de aceites esenciales pueden influir sobre el rendimiento y composición final de los mismos por lo cual fue importante estudiar los factores y niveles de las variables que intervienen en el proceso de extracción por arrastre con vapor para llegar a determinar las condiciones óptimas, replicables a nivel de campo, bajo las cuales se pueda llevar a cabo la extracción de los aceites esenciales de orégano silvestre del alto Patía con máximo rendimiento y mejor calidad.

2.2 JUSTIFICACIÓN METODOLÓGICA

En el presente proyecto se aplicó la metodología de superficie de respuesta y diseño factorial de experimentos que permitió la optimización del proceso de extracción mediante la técnica de arrastre con vapor y la determinación de la influencia de algunos factores de producción respecto al rendimiento y composición de los aceites esenciales de orégano silvestre del alto Patía. Esta metodología es replicable en estudios similares con lo que se convierte en un modelo metodológico aplicable a los propósitos antes señalados.

2.3 JUSTIFICACIÓN PRÁCTICA

En los Departamentos de Cauca y Nariño el sector agropecuario se caracteriza

por la escasez de alternativas de producciones sostenibles y económicamente viables. El cultivo de especies tradicionales como papa, maíz, trigo, frijol, ha estado sujeto a situaciones de mercado interno y externo que no le permiten al agricultor participar de manera competitiva y rentable. En particular en la microregion del Alto Patía ha traído como consecuencias el deterioro de los recursos naturales por sobreexplotación y uso inadecuado; implantación de cultivos ilícitos, conflictos sociales, y unas condiciones de vida e ingresos que bordean los límites de la pobreza absoluta de la mayoría de la población rural localizada en esta microregion. Una de las alternativas de solución a la problemática anterior es la valoración y aprovechamiento sostenible de especies promisorias y con un alto potencial de producción de biomoléculas, que permitan el desarrollo agroindustrial mediante la articulación de su producción con la transformación industrial y la comercialización en escenarios de mercado con un alto valor agregado, de esta manera se está contribuyendo con la solución del problema social y económico que afronta esta región dándole a sus habitantes una alternativa de trabajo mediante el aprovechamiento de recursos propios de su territorio y que pueden generar altas utilidades (CORPOICA 2005)

Bajo este contexto el proyecto de investigación se enfocó en la extracción de aceite esencial de orégano, su optimización y respectivo estudio basado en las variaciones tanto en rendimiento y composición.

Esta investigación hace parte del programa denominado "Utilización de aceites esenciales de orégano silvestre del Alto Patía como aditivo nutracéutico en sistemas de alimentación animal", aprobado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, siendo el primer objetivo de dicho programa. De esta manera se está contribuyendo a desarrollos científicos y tecnológicos tales como la elaboración de productos nutracéuticos, antibióticos naturales o antioxidantes para especies animales; cadenas de producción y de valor con nuevas perspectivas de desarrollo para los pequeños productores y la agroindustria rural de la microregion del Alto Patía.

También se estableció datos concretos acerca de las condiciones óptimas de extracción como la determinación de la zona y época del año en la que se obtiene mejor cantidad y calidad de aceite, lo que contribuye en el planteamiento de una alternativa de explotación de esta especie. Así mismo se contribuyó en el proceso de domesticación del cultivo, pues se tiene certeza de cual vereda y época del año es la más propicia para obtener una planta de mejor calidad, esto determina épocas de siembra, así como también brinda ventajas en la operación de la planta extractora de aceites esenciales a nivel rural que se construyó en la región, ya que se trabaja en condiciones óptimas de extracción que permiten un mayor aprovechamiento del orégano en el momento de extraer el aceite.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar el proceso de extracción, mediante la técnica de arrastre con vapor, de aceite esencial de orégano silvestre del alto Patía y determinar el efecto de las condiciones agroecológicas en su composición y rendimiento.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Identificar las condiciones más apropiadas para la extracción de aceite esencial de orégano silvestre del alto Patía mediante la técnica de arrastre con vapor a nivel de laboratorio y a nivel de planta piloto.
- ✓ Determinar la influencia de la zona de producción (vereda), la época de recolección de la hoja (invierno – verano) y la edad de las hojas de la planta (joven - madura), sobre el rendimiento y la composición de los aceites esenciales de orégano nativo del Alto Patía.

4. MARCO REFERENCIAL

4.1 GENERALIDADES

4.1.1 El orégano. El orégano silvestre, de monte o cimarrón (*Lippia origanoides Kunth*) pertenece a la familia de las Verbenaceae, es un arbusto aromático, con olor a artemisa o/y orégano, que alcanza una altura hasta 3,5 m de alto, muy ramificado; posee ramas subredondeadas, estriadas, hojas opuestas en forma de cruz, pecíolos cortos, de mas o menos 1-10 mm largo, limbos verdes a verde oscuro por la haz y gris plateado por el envés, el tamaño de la hoja es muy variable según los ambientes sean propicios (6 X 3,5 cm) o más secos y pobres (5 X 3 mm), es de forma lanceolada o alargada, denticulado. (www.infoagro.com 2008)

4.1.2 Clasificación Taxonómica. *Lippia origanoides Kunth*

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Lippia origanoides Kunth*

	NOMBRE	CARACTERISTICA
ORDEN	<u>Lamiales Bromhead</u>	Las Lamiales son un orden de plantas dicotiledóneas. Principalmente tropicales, de árboles, arbustos y hierbas.
FAMILIA	<u>Verbenaceae J. St.-Hil.</u>	Consta de alrededor de 90 géneros y 2.000 especies. Muchos miembros de ésta familia son notables por sus cabezas o racimos de flores pequeñas.
GENERO	<u><i>Lippia L.</i></u>	La <i>Lippia</i> se desarrolla como un arbusto. <i>lippia</i> no es siempre verde; durante verano toma una coloración violetarajo ; los ejemplares adultos son de la talla medio y alcanzan los 3 m de grandeza . El desarrollo de estas plantas es columnar, se irguen hacia arriba con un escaso desarrollo lateral.
ESPECIE	<i>Lippia origanoides Kunth</i>	Tiene un alto contenido de aceites volátiles, de interés industrial. Se ha demostrado que los aceites esenciales presentes en <i>L. origanoides</i> , poseen actividad antimicrobial contra <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> y <i>Candida tropicalis</i> . Además, las hojas de <i>L. origanoides</i> son usadas como sustituto del orégano común.

Fuente: www.tropicos.org.

Lippia organoides es Neotropical, del Caribe y norte de sur América. Todas las características indican que es conespecífica con *Lippia suaveolens* que crece desde el sur de E.U. hasta Guatemala.

El orégano es un cultivo tradicional en el mundo, originario principalmente de Turquía y está dentro del grupo de las plantas medicinales, posee una amplia distribución en Europa y Asia. Es un cultivo que se adapta en todos los tipos de terreno, ricos en materia orgánica, sueltos, silíceos arcillosos, francos, humíferos, calcáreos, arcilloso - arenosos e incluso en lugares áridos.

El mercado del orégano tanto en seco como también el que se utiliza para la extracción de aceite esencial y oleorresinas es un mercado en expansión y promisorio para países como Colombia los cuales tienen la posibilidad de acrecentarlo en la medida que se elaboren productos de calidad acordes con las exigencias nacionales e internacionales.

Comercialmente la palabra orégano abarca muchas especies dado que bajo este carácter se considera primordialmente características como aroma y sabor.

Dentro de los grandes productores de orégano están Turquía, Grecia e Israel, en Latinoamérica esta Chile y Perú teniendo como especie principal al *orégano vulgare*; esta especie pertenece al orden de las Lamiales Bromhead, a la familia Lamiaceae Martinov y al género *Origanum*. En México se presentan producciones del denominado orégano mexicano (*Lippia graveolens*), el cual posee características similares a las del orégano encontrado en Colombia.

La planta de orégano contiene compuestos antimicrobiales y antioxidantes por lo cual ha sido asociada a la fitomedicina. Además, debido a las diferentes características del orégano, este requiere que se asegure la calidad del producto final extraído de la planta, esto debido a que la actividad biológica depende significativamente de la genética y las condiciones ambientales del sitio de producción. En este sentido, entre los muchos factores que afectan la composición de los aceites esenciales del orégano, los más importantes son el origen de la planta, la parte de la planta utilizada, el estado de desarrollo, el clima y las condiciones de crecimiento (temperatura, suelo, fertilizante), así como el tipo de destilación y las condiciones de almacenamiento (Cosentino *et al.*, 1999; McGimpsey *et al.*, 1994).

4.1.3 Composición y usos potenciales del orégano. Existen básicamente dos tipos de orégano: orégano europeo (mejorana, orégano común, etc.) nativo de la región mediterránea y el orégano americano (Suramérica o México) pertenecientes al genero *Lippia* (*L. organoides*, *L. graveolens*, *entre otras*), los cuales se destacan por su alto contenido de compuestos fenólicos (timol y carvacrol) (Goren, 2003, Vernin, 2001). Debido a la relación existente entre estos dos compuestos y sus potenciales actividades, muchos estudios se han enfocado en la determinación de la composición química de especies pertenecientes a estos

géneros. Así por ejemplo, se encontró que los compuestos químicos presentes en mayor concentración en el aceite esencial del orégano mexicano (*Lippia berlanderi Schauer*) son el timol y el carvacrol, muy apetecidos debido a sus propiedades antioxidantes y antimicrobiales (Turgut Dunford, y Silva Vazquez, 2005).

Otras especies como el *orégano vulgare* subsp. *Hirtum* (comercialmente conocidas como orégano griego) tienen también altos contenidos de estos fenoles (carvacrol + timol 78.27%) en los aceites esenciales obtenidos de la planta. Otros componentes presentes son monoterpenos hidrocarbonados; α -terpineno y p-cimeno (5.54 y 7.35% del total del aceite, respectivamente) (Poulose and Croteau, 1978).

El género *Lippia* (*Verbenaceae*) incluye aproximadamente 200 especies de hierbas y arbustos. Las especies están especialmente distribuidas en países de América Central (México, Guatemala, Cuba) y América del Sur (Venezuela, Brasil, Colombia). Muchas de ellas son tradicionalmente utilizadas como remedio para afecciones gastrointestinales y respiratorias, además las hojas de la mayoría de estas especies son utilizadas como condimentos en la preparación de alimentos.

El uso más común de las especies de *Lippia* es para el tratamiento de desordenes respiratorios, con este fin la planta es usualmente preparada en forma de infusión. En Sur América también es empleada como remedio para resfriados, gripe, bronquitis, tos y asma. Es el caso de *L. origanoides* cuyas hojas son utilizadas como condimentos en la preparación de alimentos, y en forma de infusión para el tratamiento de la diarrea, como analgésico, antiinflamatorio y antipiretico. Otros autores han reportado propiedades como antioxidantes, antisepticas, calmantes, cicatrizantes, desinflamante, digestiva, estomacica y estimulante.

Lippia origanoides Kunth, pertenece a la familia Verbenaceae. Esta familia se caracteriza por la gran variabilidad de usos que presentan sus especies, algunas de las cuales son de gran aplicación en la farmacéutica, alimentos, textiles, química orgánica fina y, sobre todo, cosmética y perfumería dado su alto contenido de aceites volátiles de interés industrial. Así mismo, se ha demostrado que los aceites esenciales presentes en *L. origanoides*, poseen actividad antimicrobial contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Candida tropicalis*. Además, las hojas de *L. origanoides* son usadas como sustituto del orégano común. En Santander, *L. origanoides* posee una amplia distribución, en la región seca del Cañon del Rio Chicamocha. Por su importancia, el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM), se encuentra estudiando esta especie promisoría, entre otras, por la calidad de sus aceites esenciales, con el fin de brindar una alternativa económica al campesino colombiano.

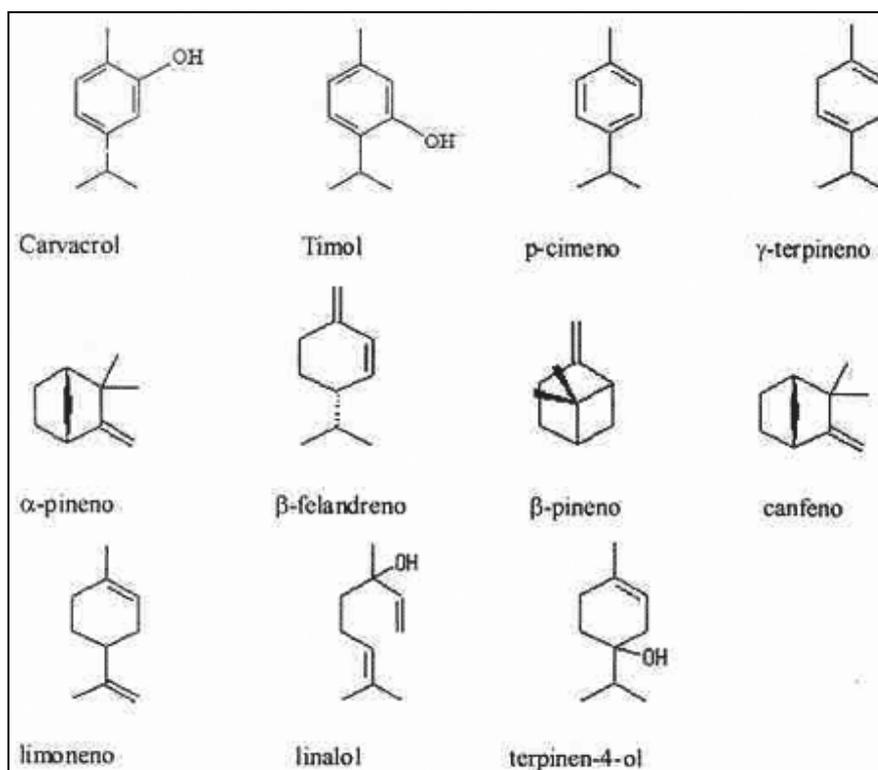
L. origanoides se conoce en Colombia como "orégano de monte" y junto con otras especies de similar nominación, varios autores han reportado un alto contenido de

los monoterpenos timol y carvacrol. Una revisión de la literatura muestra que por lo menos 36 especies pertenecientes a diferentes géneros son llamadas "orégano" y son usadas como condimentos, la presencia del aceite esencial y su composición en estas especies determinan el aroma y el sabor de estos condimentos.

Existen diversos estudios sobre la composición química del orégano, usando extractos acuosos y sus aceites esenciales, Se han identificado flavonoides como la apigenina y la luteolina, agliconas, alcoholes alifáticos, compuestos terpenicos y derivados del fenilpropano. En *Origanum vulgare* se han encontrado ácidos coumerico, ferulico, cafeico, r-hidroxibenzoico y vainillínico. (Martínez A. 2003).

La figura 1 presenta las estructuras químicas de los principales compuestos presentes en el aceite esencial de orégano.

Figura 1. Estructura química de los principales componentes presentes en el aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides*).



Fuente. Martínez A. 2003.

Los monoterpenoides, compuestos volátiles con olores intensamente pungentes, son los responsables de las fragancias y las sensaciones de olor-sabor de muchas plantas. Estructural y biológicamente son muy diferentes, llegando a clasificarse hasta en 35 grupos. Los principales quimiotipos de la especie *O. vulgare* son el carvacrol y el timol cada uno con enzimas específicas que dirigen su biosíntesis.

La subespecie *O. vulgare ssp. Hirtunres* es la más estudiada, especialmente en relación a la composición y calidad de su aceite esencial, ya que este último tiene un importante valor comercial. En esta subespecie el rendimiento del aceite esencial en la hoja seca varía entre 2% y 6%. Este porcentaje se ve afectado por la altitud del lugar de cultivo, y por la época de recolección, siendo este más bajo en el otoño.

Los compuestos mayoritarios encontrados en *O. vulgare ssp. Hirtum* son el carvacrol, timol, p-cimeno y α -Terpineno aunque en diversos estudios realizados por cromatografía de gases/espectrometría de masas se han identificado de 16 a 56 compuestos diferentes. Estos componentes también se han encontrado en *O. dictamnus* y se sabe que otras especies como *O. scabrum* y *O. microphyllum* contienen alrededor de 28 y 41 compuestos diferentes, respectivamente. Los investigadores cubanos caracterizaron tres especies de orégano y concluyeron que se recomendaba la producción de *Lippia micromera*. En el aceite del orégano que crece en forma silvestre se ha encontrado la presencia dominante de carvacrol y timol. Se ha observado que un incremento en los porcentajes de timol provoca un decremento en el contenido de carvacrol. De igual manera, los hidrocarburos monoterpenoides γ -terpineno y p-cimeno están presentes de manera constante en los aceites esenciales, pero siempre en cantidades menores a las de los dos fenoles.

En el aceite del orégano silvestre cultivado en hidroponía y adicionado de fósforo se han identificado 46 componentes. En este caso, los principales compuestos fueron el carvacrol y el p-cimeno. Al mismo tiempo se observó un incremento en el porcentaje de p-cimeno y un decremento de carvacrol cuando se comparó con el aceite de plantas enriquecidas con nitrógeno (Martínez A 2003).

Castaneda *et al.*, (2007), estudiaron la composición química de los aceites esenciales de las hojas de 10 plantas aromáticas colombianas, entre ellas *Lippia Organoides*, encontrando dos quimiotipos para el aceite esencial de esta especie. El quimiotipo A (típico) cuyos componentes mayoritarios fueron: carvacrol (36,6%), p-cimeno (14,0%), terpineno (13,3%), timol (9,1%), y α -terpineno (3,8%); mientras que, para el quimiotipo B (atípico) los componentes mayoritarios fueron: p-cimeno (15,7%), trans- β -cariofileno (9,4%), α -felandreno + d-3-careno (8,7%), limoneno (6,9%) y α -felandreno + eucaliptol.

El timol y el carvacrol son compuestos fenólicos naturales, considerados como posibles antioxidantes, agentes antifúngicos y antibacteriales, presentes en cantidades significativas en los aceites esenciales del género *Thymus*, *Origanum*, *Satureja*, *Thymbra* y *Lippia*, especies ampliamente utilizadas como especias y tés herbarios (Burdock, 2005). Al timol y al carvacrol se le han atribuido propiedades acaricidas, alergénicas, analgésicas, antiacné, antibacteriales, antiinflamatorias, antioxidantes, antiplaca, antisalmonella, antisépticas, antiespasmódicas, dentífricas, desodorantes, dermatogénicas, expectorantes, aromatizantes, fungicidas, insecticidas, larvicidas, pesticidas, vermífida. (Duke, J. 2007).

Torres Harlen, *et al.*, (2007), determinaron la composición química del aceite esencial de dos quimiotipos de la especie *Lippia origanoides* cultivada en un corregimiento de Palmira, Colombia. Los aceites esenciales fueron obtenidos mediante destilación por arrastre con vapor en un equipo tipo Clevenger modificado y analizados por cromatografía de gases (CG) acoplada a espectrometría de masas (EM). La identificación de las sustancias se realizó con base en los índices de Kovats y por comparación de sus espectros de masas con las sustancias de referencia. El aceite esencial de uno de los quimiotipos presentó una constitución principalmente monoterpénica, siendo el timol (45%) el componente mayoritario mientras que el aceite esencial del otro quimiotipo presentó una constitución sesquiterpénica siendo el trans- β -cariofileno (17%) el componente principal.

Stashenko Elena *et al.*, (2007), analizaron extractos de hojas de dos quimiotipos de *Lippia origanoides*, cultivados en el Complejo Agroindustrial de CENIVAM (UIS). Se utilizaron las técnicas de extracción hidrodestilación asistida por radiación de micro-ondas, extracción con solvente - destilación simultánea y extracción con fluido supercríticos. Los metabolitos secundarios fueron separados por cromatografía capilar con detección de masas. La identificación se llevó a cabo por comparación de espectros de masas con bases de datos, patrones e índices de Kovats. Los compuestos mayoritarios en los extractos para el quimiotipo I fueron: p-cimeno (13%), y 1,8-cineol (9%). Para el quimiotipo II: timol (56%), y p-cimeno (10%).

Blanco Moreno, *et al* (2006) caracterizaron la composición y el rendimiento del aceite esencial (AE) de arbustos de *Lippia origanoides*, durante la época de lluvia y la época de sequía, en el ambiente semiárido del Cañón del Chicamocha (Santander, Colombia). El aceite esencial de *L. origanoides*, fue obtenido del follaje de los arbustos mediante hidrodestilación asistida por microondas y la determinación de la composición del AE a través de análisis de Cromatografía de Gases acoplada a un Espectrómetro de Masas (GC/MS). Los compuestos carvacrol, timol, p-cimeno, terpineno, mirceno, terpineno, trans-cariofileno, acetato de carvacrilo y acetato de timilo fueron identificados como los componentes mayoritarios en el AE de esta especie, independientemente de la época de colecta.

Se ha demostrado que al igual que la mayoría de los metabolitos secundarios presentes en las plantas, la composición de los aceites esenciales también se ven afectados por las distintas condiciones ambientales experimentadas durante el crecimiento de la planta, entre ellas la duración de la luz solar, la temperatura, el estrés de agua, etc. Otro factor determinante en la composición de los metabolitos es la edad de la planta. (*Turgut Dunford, y Silva Vazquez, 2005*).

Recientemente, se ha incrementado la búsqueda de antioxidantes de origen natural para ser usados en alimentos y como base de nuevos fármacos y así reemplazar los antioxidantes sintéticos debido a las restricciones de carcinogenicidad que estos presentan, lo cual lo hace un tema importante para el estudio de diversas especies autóctonas, ricas en timol y carvacrol, como posibles fuentes con propiedades biológicas beneficiosas (Zheng, 2001).

Muñoz *et al.*, (2007) determinaron la composición química de extractos de seis especies vegetales (tomillo, oréganos común, cimarrón de castilla, rastrero y mejorana) y cuatro aceites esenciales obtenidos por destilación-extracción simultánea con solvente (SDE) y hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD), respectivamente. Los ensayos de actividad antioxidante mostraron que los aceites esenciales evaluados presentaron una menor actividad comparada con los antioxidantes BHA y α -tocoferol. Sin embargo, Tomillo, Orégano de Castilla y Orégano común presentaron capacidad antiradicalaria cercanas a la del antioxidante sintético BHT; mientras que, la actividad antiradicalaria del Orégano cimarrón fue mayor que la del BHT, confirmando que los aceites esenciales son potentes antioxidantes naturales, los cuales pueden ser usados en alimentos como posibles sustitutos de los antioxidantes sintéticos, pudiendo atrapar radicales libres y prevenir la oxidación.

Matsumura *et al.*, (2003) estudiaron la actividad antioxidante de hojas de *orégano vulgare* utilizando el método de DPPH encontrando que la misma es comparable a la del ácido rosmarínico y la quercetina.

Govaris *et al.*, (2004) estudiaron el uso de aceite de orégano para evitar la oxidación lipídica en carnes durante almacenamiento refrigerado mediante suplementación en la dieta comparado con uso pos mortem, los resultados demostraron un retardo en la oxidación lipídica en ambos tratamientos; sin embargo, el efecto del uso del aceite de orégano pos mortem fue inferior al logrado con el tratamiento de suplemento en la dieta.

Existen muchos estudios que demuestran las propiedades y actividades biológicas del aceite esencial de *orégano vulgare*, por ejemplo, Souza *et al.*, (2007) estudiaron la actividad antimicrobiana de *Candida albicans* y *Candida krusei*, demostrando la efectividad para inhibir el crecimiento de dichas levaduras presentes en productos alimenticios. Lemhadri *et al.*, (2004) demostraron el efecto antihiperlipémico de extractos acuosos obtenidos a partir de las hojas de

orégano.

Celis Clara, *et al.*, (2007), determinaron por GC -MS la composición química de los aceites esenciales de dos quimiotipos de Lippia, lippia alba, citral y carvona; Lippia organoides y además de Phyla dulcis. Se evaluó la actividad antioxidante de cada uno de los aceites, como una medida de la capacidad antirradicalaria. Adicionalmente, evaluaron la citotoxicidad en células Vero y las actividades antifúngica, antiparasitaria y antibacteriana. Los resultados obtenidos permitieron establecer que el aceite de *L. organoides*, fue la mezcla más promisoría, debido a su alta actividad en los diferentes ensayos biológicos, y su capacidad antirradicalaria, al ser un aceite esencial no tóxico.

La influencia de la aplicación de orégano como suplemento en la alimentación de cerdas de cría ha sido estudiada a escala comercial en una granja en Europa, las dietas utilizadas contenían 1000 ppm de orégano, la conclusión del estudio demostró un aumento en el desarrollo productivo, los grupos tratados con orégano mostraron una menor tasa de mortalidad.

4.2 ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (saborizantes). Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes que pueden ser compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), Monoterpenos, Sesquiterpenos y Fenilpropanos.

En su gran mayoría son de olor agradable, aunque existen algunos de olor relativamente desagradable como por ejemplo los de ajo y la cebolla, los cuales contienen compuestos azufrados. (Martínez A. 2003)

4.2.1 Clasificación de los aceites esenciales. Los aceites esenciales se clasifican con base en diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios. De acuerdo con su consistencia los aceites esenciales se clasifican en esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas. Las Esencias fluidas son líquidos volátiles a temperatura ambiente. Los Bálsamos son de consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización, son ejemplos el bálsamo de copaiba, el bálsamo del Perú, Benjuí, bálsamo de Tolú, Estoraque, etc.

Las Oleorresinas tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas (caucho, gutapercha,

chicle, balata, oleorresina de paprika, de pimienta negra, de clavel, etc.).

De acuerdo a su origen los aceites esenciales se clasifican como naturales, artificiales y sintéticos. 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, por ejemplo, la mezcla de esencias de rosa, geranio y jazmín enriquecidas con linalool, o la esencia de anís enriquecida con anetol. Los aceites esenciales sintéticos como su nombre lo indica son los producidos por 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 (esencias de vainilla, limón, fresa, etc.).

Desde el punto de vista químico y a pesar de su composición compleja con diferentes tipos de sustancias, los aceites esenciales se pueden clasificar de acuerdo con el tipo de sustancias que son los componentes mayoritarios. Según esto los aceites esenciales ricos en monoterpenos se denominan aceites esenciales monoterpenoides (p.ej. hierbabuena, albahaca, salvia, etc.). Los ricos en sesquiterpenos son los aceites esenciales sesquiterpenoides (p.ej. copaiba, pino, junipero, etc.). Los ricos en fenilpropanos son los aceites esenciales fenilpropanoides (p.ej. clavo, canela, anís, etc.). (Martínez A. 2003)

4.2.2 Distribución y estado natural. Los aceites esenciales se encuentran ampliamente distribuidos en unas 60 familias de plantas que incluyen las Compuestas, Labiadas, Lauráceas, Mirtáceas, Pináceas, Rosáceas, Rutáceas, Umbelíferas, etc. Se les puede encontrar en diferentes partes de la planta: en las hojas (ajeno, albahaca, buchú, cidrón, eucalipto, hierbabuena, limoncillo, mejorana, menta, pachuli, quenopodio, romero, salvia, toronjil, etc.), en las raíces (angélica, ásaro, azafrán, cálamo, cúrcuma, galanga, jengibre, sándalo, sasafrás, valeriana, vetiver, etc.), en el pericarpio del fruto (limón, mandarina, naranja, etc.), en las semillas (anís, cardamomo, eneldo, hinojo, comino, etc.), en el tallo (canela, caparrapi, etc.), en las flores (árnica, lavanda, manzanilla, piretro, tomillo, clavo de olor, rosa, etc.) y en los frutos (Stashenko, E *et al* 2006).

Los monoterpenoides se encuentran principalmente en plantas de los órdenes Ranunculales, Violales y Primulales, mientras que son escasos en Rutales, Cornales, Lamiales y Asterales. Por el contrario, los sesquiterpenoides abundan en Magnoliales, Rutales, Cornales y Asterales. Aunque en los aceites esenciales tanto los mono-, los sesquiterpenos y los fenilpropanos se les encuentra en forma libre, mas recientemente se han investigado los que están ligados a carbohidratos, ya que se considera que son los precursores inmediatos del aceite como tal (Martínez A. 2003).

4.2.3 Extracción y aislamiento. Los aceites esenciales se pueden extraer de las muestras vegetales mediante varios métodos como son: expresión, destilación con vapor de agua, extracción con solventes volátiles, enflorado y con fluidos supercríticos.

En la expresión el material vegetal es exprimido para liberar el aceite y este es recolectado y filtrado. Este método es utilizado para el caso de las esencia de cítricos.

a. Destilación por arrastre con vapor de agua. La muestra vegetal generalmente fresca y cortada en trozos pequeños, es encerrada en una cámara inerte y sometida a una corriente de vapor de agua sobrecalentado, la esencia así arrastrada es posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa. Esta técnica es muy utilizada especialmente para esencias fluidas, especialmente las utilizadas para perfumería. Se utiliza a nivel industrial debido a su alto rendimiento, la pureza del aceite obtenido y porque no requiere tecnología sofisticada.

b. Extracción con solventes volátiles. La muestra seca y molida se pone en contacto con solventes tales como alcohol, cloroformo, etc. Estos solventes solubilizan la esencia pero también solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas y ceras, obteniéndose al final una esencia impura. Se utiliza a escala de laboratorio pues a nivel industrial resulta costoso por el valor comercial de los solventes, porque se obtienen esencias impurificadas con otras sustancias, y además por el riesgo de explosión e incendio característicos de muchos solventes orgánicos volátiles.

c. Enflorado o enfleurage. Método en el cual el material vegetal (generalmente flores) es puesto en contacto con un aceite vegetal. La esencia es solubilizada en el aceite vegetal que actúa como vehículo extractor. Se obtiene inicialmente una mezcla de aceite esencial y aceite vegetal la cual es separada posteriormente por otros medios fisicoquímicos. Esta técnica es empleada para la obtención de esencias florales (rosa, jazmín, azahar, etc.), pero su bajo rendimiento y la difícil separación del aceite extractor la hacen costosa.

d. Destilación fraccionada. Uno de los métodos mas utilizados a nivel industrial para la separación y purificación de mezclas complejas, como lo son los aceites esenciales, es la destilación fraccionada al vacío, en la cual los vapores se pasan a través de una columna de fraccionamiento antes de recogerlos. La columna provee una gran área superficial para el intercambio de calor entre el vapor que sube y el condensado que desciende, lo cual hace posible una serie de vaporizaciones y condensaciones a lo largo de la columna. De esta manera, en cualquier punto, el condensado frío recibe calor que asciende y se revaporiza parcialmente formando un vapor que es más rico en el componente más volátil. Igualmente, al ceder calor al condensado, el vapor se enfría formando un

condensado más rico en el componente menos volátil. Como conclusión, una destilación fraccionada es equivalente a una secuencia de destilaciones simples y por lo tanto es un proceso mucho más eficiente. El vacío permite obtener fracciones de compuestos a menor temperatura evitando la degradación térmica y oxidativas de los mismos.

e. Extracción con fluidos supercríticos. Método de desarrollo más reciente. El material vegetal cortado en trozos pequeños, licuado o molido, se empaca en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un líquido supercrítico (por ejemplo dióxido de carbono líquido), las esencias son así solubilizadas y arrastradas y el líquido supercrítico que actúa como solvente extractor y se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente, y finalmente se obtiene una esencia pura. Aunque presenta varias ventajas como rendimiento alto, es ecológicamente compatible, el solvente se elimina fácilmente e inclusive se puede reciclar, y las bajas temperaturas utilizadas para la extracción no cambian químicamente los componentes de la esencia, sin embargo el equipo requerido es relativamente costoso, ya que se requieren bombas de alta presión y sistemas de extracción también resistentes a las altas presiones. (Martínez A 2003)

4.2.4 Usos y mercado de los aceites esenciales. En una revisión sobre las yerbas importadas por los Estados Unidos en los últimos veinte años la mayor cantidad en peso y en valor corresponde al orégano (Turgut Dunford, y Silva Vazquez, 2005). A pesar de que Colombia cuenta con una gran variedad de especies vegetales con potencial para la obtención de aceites esenciales, la industria nacional importa aproximadamente el 95% de ellos, por un valor superior a 7 millones de dólares (Díaz, J. *et al.* 2003).

Colombia es un país tropical privilegiado por su variedad de climas y topografía, donde el cultivo de plantas aromáticas y la posterior obtención de aceites esenciales surgen como una posibilidad de aprovechamiento en el campo agrícola y agroindustrial, generando empleo y desarrollo socioeconómico, mediante una agroindustria de tecnología barata, con escasa producción de desechos, poca demanda de insumos y un valor agregado importante (Olaya, J. 2000).

La Universidad Industrial de Santander tiene la mayor trayectoria nacional en la investigación de aceites esenciales. Los trabajos de investigación los han realizado en el Laboratorio de Cromatografía. Han desarrollado métodos de extracción de volátiles tales como el arrastre por vapor (SD), la destilación-extracción con solvente simultánea (SDE), la extracción con fluidos supercríticos (SFE) y asistida por la radiación de microondas. Los componentes de los aceites esenciales se ha caracterizado por espectroscopia infrarroja, espectroscopia RMN y por cromatografía de gases de alta resolución (HRGC) utilizando detectores de ionización en llama (FID), selectivo de nitrógeno y fósforo (NPD), de captura de electrones (ECD) y detector selectivo de masas (MSD) (UIS, 2007).

La Universidad de Nariño cuenta con la infraestructura para adelantar investigaciones al respecto, tanto para la extracción como la identificación de los compuestos. Específicamente cuenta con un equipo para destilación por arrastre de vapor y una planta piloto para destilación fraccionada. También, cuenta con un equipo de cromatografía de gases acoplado a un detector de espectrometría de masas (GC-MS). Allí se han adelantado varios trabajos de investigación y la idea es fortalecer cada día más esta unidad regional.

El consumo de fragancias y saborizantes naturales continua creciendo a pesar del incremento de la participación en el mercado de sustitutos sintéticos que ofrecen otras ventajas como menores precios y oferta constante. Sin embargo, existen razones para suponer que la tendencia creciente en el consumo de aceites esenciales y oleorresinas continuará.

4.3 EXTRACCIÓN POR ARRASTRE CON VAPOR

La extracción de aceite por arrastre con vapor es un proceso que consiste en calentar una solución hasta que sus componentes mas volátiles pasen a la fase de vapor y, a continuación, enfriar el vapor para recuperar dichos componentes en forma líquida por medio de la condensación. En la destilación por arrastre con vapor, la presencia de vapor por cualquiera de los componentes no puede ser modificada por la presencia del otro; además ambos ejercen una presión verdadera a la temperatura predominante. El líquido orgánico de alto punto de ebullición se evapora a una temperatura bastante menor que su punto de ebullición normal, sin la necesidad de utilizar vacío en la operación. (Olaya *et al.*,2000)

4.4 HIDRODESTILACIÓN

El proceso de hidrodestilación es llamado comúnmente: destilación por arrastre de vapor, extracción por arrastre, hidrodifusión o hidroextracción. Sin embargo, no existe un nombre claro y conciso para definirlo, debido a que se desconoce exactamente lo que sucede en el interior del equipo principal y porque se usan diferentes condiciones del vapor de agua para el proceso. Es así que, cuando se usa vapor saturado o sobrecalentado, fuera del equipo principal, es llamado "destilación por arrastre de vapor" (Gunther, 1948). Cuando se usa vapor saturado, pero la materia prima esta en contacto íntimo con el agua generadora del vapor, se le llama "hidrodestilación" (Gunther, 1948). Cuando se usa vapor saturado, pero la materia no esta en contacto con el agua generadora, sino con un reflujo del condensado formado en el interior del destilador y se asume que el agua es un agente extractor, se le denomina "hidroextracción" (Palomino y Cerpa, 1999).

Se adoptará el término hidrodestilación, para definir el proceso para obtener el aceite esencial de una planta aromática, mediante el uso del vapor saturado a presión atmosférica. El generador de vapor no forma parte del recipiente donde se almacena la materia prima, es externo y suministra un flujo constante de vapor. Su presión es superior a la atmosférica, pero el vapor efluente, que extrae al aceite esencial está a la presión atmosférica. La materia prima forma un lecho compacto y se desprecia el reflujó interno de agua debido a la condensación del vapor circundante

De manera general, la hidrodestilación se describe de la siguiente manera: La materia prima vegetal es cargada en un hidrodestilador, de manera que forme un lecho fijo compactado, el estado de la misma puede ser molido, cortado, entero o la combinación de estos. El vapor de agua es inyectado mediante un distribuidor interno, próximo a su base y con la presión suficiente para vencer la resistencia hidráulica del lecho. La generación del vapor puede ser local (autoclave) [hidrodestilación húmeda], remota (caldera) [hidrodestilación seca] o interna (base del recipiente) [hidrodestilación directa]. Conforme el vapor entra en contacto con el lecho, la materia prima se calienta y va liberando el aceite esencial contenido y este, a su vez, debido a su alta volatilidad se va evaporando. Al ser soluble en el vapor circundante, es "arrastrado", corriente arriba hacia el tope del hidrodestilador. La mezcla, vapor saturado y aceite esencial, fluye hacia un *condensador*, mediante un "cuello de cisne" o prolongación curvada del conducto de salida del hidrodestilador. En el condensador, la mezcla es condensada y enfriada, hasta la temperatura ambiental.

A la salida del condensador, se obtiene una emulsión líquida inestable. La cual, es separada en un decantador dinámico o florentino. Este equipo está lleno de agua fría al inicio de la operación y el aceite esencial se va acumulando, debido a su casi inmiscibilidad en el agua y a la diferencia de densidad y viscosidad con el agua. Posee un ramal lateral, por el cual, el agua es desplazada para favorecer la acumulación del aceite. El vapor condensado acompañante del aceite esencial y que también se obtiene en el florentino, es llamado "*agua floral*". Posee una pequeña concentración de los compuestos químicos solubles del aceite esencial, lo cual le otorga un ligero aroma, semejante al aceite obtenido (Gunther, 1948)

Para este proceso el equipo más conocido según (Gunther, 1948), es el de tipo Clevenger usado en muchos laboratorios y considerado en varios estándares internacionales, como el más adecuado para la determinación del contenido total del aceite esencial de una planta aromática.

4.4.1 Hidrodestilación asistida por radiación con microondas. Las micro-ondas son radiaciones electromagnéticas con una frecuencia en el rango de 0,3 a 300 GHz. Para evitar interferencias con las radio-comunicaciones, los microondas domésticos e industriales operan generalmente a 2,45 GHz. Debido a su naturaleza, las micro-ondas poseen campos eléctricos y magnéticos, los cuales

son perpendiculares entre ellos. El campo eléctrico causa el calentamiento, vía dos mecanismos simultáneos: rotación bipolar y conducción iónica. La rotación bipolar es debida al alineamiento en el campo eléctrico de las moléculas con un mismo momento bipolar en la muestra sólida y el disolvente.

Esta oscilación produce colisiones con las moléculas circundantes y así, la liberación de la energía térmica al medio. Con una frecuencia de 2,45 GHz, este fenómeno ocurre 4,9 veces por segundo y el calor generado es muy rápido.

Mientras mayor sea la constante dieléctrica del disolvente, el calentamiento aumentará. Por lo tanto, a diferencia de los métodos conocidos de suministro de calor por conducción, las micro-ondas dan el calentamiento a toda la muestra homogéneamente. El efecto de las micro-ondas es fuertemente dependiente de la naturaleza de las matrices del disolvente y del sólido. Los disolventes usados comúnmente cubren un amplio rango de polaridades. La mayoría de las veces, el disolvente escogido posee una alta constante dieléctrica y absorbe fuertemente la energía de las micro-ondas. Sin embargo, la selectividad de la extracción y la capacidad del medio para interactuar con las micro-ondas puede ser modulado por el uso de mezclas de disolventes. En algunos casos, la matriz misma interactúa con las microondas mientras el disolvente circundante posee una baja constante dieléctrica y así, permanece frío.

Esta última situación presenta algunas ventajas obvias en el caso de compuestos termo-sensibles y ha sido usado exitosamente para la extracción de aceites esenciales. Además, las microondas interactúan selectivamente con las moléculas polares presentes en los tricomas glandulares. El calor produce la expansión y ruptura de las paredes celulares y la liberación del aceite esencial al disolvente circundante. El contenido de humedad es esencial en MWHD debido a que el agua caliente más y promueve la liberación de los analitos al medio circundante. El equipo usado es un extractor cerrado, donde se sumerge el disolvente y la materia prima molida, dentro de un horno por micro-ondas, conectado a un condensador superior y exterior.

Se aplica la energía por un corto tiempo de operación y luego se realiza la separación del disolvente y la materia tratada.

Este extracto es evaporado para recuperar el disolvente y obtener el aceite esencial. Los rendimientos conseguidos son similares, pero el tiempo de operación es mínimo y el análisis cromatográfico revela una composición totalmente diferente a la de los aceites esenciales convencionales (Kaufmann and Christen, 2002; Luque de Castro *et al.*, 1999).

4.5 CROMATOGRAFÍA

4.5.1 Cromatografía de gases. El primer trabajo en el que se hace pasar una fase móvil gaseosa a través de una columna data de 1951, dando lugar a la técnica conocida como cromatografía de gases. Esta técnica, descrita por Martin y James en 1952, es en la actualidad el método usado ampliamente para la separación de los componentes volátiles y semivolátiles de una muestra. La combinación de altas resoluciones, sensibilidad y tiempos de análisis cortos la ha convertido en una técnica de rutina usada en la mayoría de los laboratorios químicos. Respecto a la cromatografía líquida, la cromatografía de gases tiene la ventaja de disponer de detectores mucho más universales (por ejemplo, el de ionización de llama). Además, para numerosas aplicaciones, los métodos son más simples, más rápidos y más sensibles que los correspondientes a la cromatografía líquida de alta resolución. La instrumentación requerida para cromatografía de gases también es mucho más sencilla y económica que la empleada en HPLC. Sin embargo, en cromatografía de gases, la influencia de la temperatura sobre la distribución del equilibrio es considerable, a diferencia de la cromatografía líquida. Por ello, la cromatografía de gases presenta limitaciones en tres casos:

- Compuestos poco volátiles, generalmente los de peso molecular superior a 300 u.m.a.
- Compuestos sensibles a una elevación de la temperatura incluso moderada (determinados compuestos de interés biológico).
- Compuestos que se encuentran en forma iónica (puesto que son en general poco volátiles).

Por esta razón, la cromatografía de gases se emplea cuando los componentes de la mezcla problema son volátiles o semivolátiles y térmicamente estables a temperaturas de hasta 350-400°C. En cambio, cuando los compuestos a analizar son poco volátiles y/o termolábiles, la técnica separativa adecuada suele ser la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

A menudo la cromatografía de gases se emplea para confirmar la presencia o ausencia de un compuesto en una muestra determinada. Esto se lleva a cabo por comparación del cromatograma de la sustancia pura con el de la muestra, siempre que las condiciones para la obtención de ambos sean idénticas. Una de las dificultades de esta comparación es que puede haber diferentes compuestos que presenten el mismo comportamiento cromatográfico bajo condiciones idénticas, lo que llevaría a identificaciones erróneas. En consecuencia, las mejores técnicas de análisis cualitativo son aquellas que combinan la capacidad de separación de la cromatografía con la capacidad de la identificación de técnicas como la espectroscopía de masas (técnicas acopladas).

Por otra parte, también se utiliza la cromatografía de gases para establecer la cantidad de componentes individuales presentes en una muestra, empleando curvas de calibración de los correspondientes patrones. A tal efecto, se pueden emplear diferentes detectores basados generalmente en la medida de una determinada propiedad física de los componentes a analizar. Algunos de ellos son universales, mientras que otros resultan más selectivos y responden únicamente a algunos de los componentes de una mezcla.

En este sentido, la espectrometría de masas acoplada a la cromatografía de gases puede resultar un detector efectivo para la cuantificación de sustancias orgánicas si se registran el total de los iones generados (modo TIC) o bien un detector más específico cuando se seleccionan unos iones de masa determinada (modo SIR).

En cromatografía de gases, la muestra se inyecta en la fase móvil, la cual es un gas inerte (generalmente He). En esta fase, los distintos componentes de la muestra pasan a través de la fase estacionaria que se encuentra fijada en una columna. Actualmente, las más empleadas son las columnas capilares. La columna se encuentra dentro de un horno con programación de temperatura. La velocidad de migración de cada componente (y en consecuencia su tiempo de retención en la columna) será función de su distribución entre la fase móvil y la fase estacionaria. (*M.C. Gutierrez, M. Droguet, 2002*).

4.5.2 La espectrometría de masas. La espectrometría de masas (MS) es una de las técnicas analíticas más completas que existen. Recientemente, esta técnica se utiliza no solo en investigación, sino también en análisis de rutina de los procesos industriales, en control de calidad, etc. Sus principales cualidades son:

- Capacidad de identificación de forma prácticamente inequívoca, ya que proporciona un espectro característico de cada molécula.
- Cuantitativa: permite medir la concentración de las sustancias.
- Gran sensibilidad: habitualmente se detectan concentraciones del orden de ppm o ppb y en casos específicos se puede llegar hasta ppt e incluso ppq.
- Universal y específica.
- Proporciona información estructural sobre la molécula analizada.
- Suministra información isotópica.
- Es una técnica rápida: se puede realizar un espectro en décimas de segundo, por lo que puede monitorizarse para obtener información en tiempo real sobre la composición de una mezcla de gases.

Dentro del espectrómetro de masas, se procede a la ionización de la muestra mediante diferentes métodos. El sistema de ionización más frecuente es el de impacto electrónico que bombardea las moléculas con electrones de una cierta energía, capaces de provocar la emisión estimulada de un electrón de las moléculas y así ionizarlas. Además de moléculas ionizadas o iones moleculares (M+) también se forman iones fragmento debido a la descomposición de los iones

moleculares con exceso de energía. El tipo y proporción relativa de cada uno de estos fragmentos es característico de las moléculas analizadas y de las condiciones del proceso de ionización. Una vez ionizadas las moléculas, se aceleran y se conducen hacia el sistema colector mediante campos eléctricos o magnéticos. La velocidad alcanzada por cada ion será dependiente de su masa. La detección consecutiva de los iones formados a partir de las moléculas de la muestra, suponiendo que se trate de una sustancia pura, produce el espectro de masas de la sustancia, que es diferente para cada compuesto químico y que constituye una identificación prácticamente inequívoca del compuesto analizado. El espectro de masas puede almacenarse en la memoria del ordenador para compararse con los espectros de una colección de espectros (o librería) y proceder a su identificación o puede estudiarse para averiguar la naturaleza de la molécula que le dio origen, etc. (M.C. Gutierrez, M. Droguet, 2002).

4.5.3 Acoplamiento cromatografía de gases- espectrometría de masas. La cromatografía de gases es una técnica separativa que tiene la cualidad de conseguir la separación de mezclas muy complejas. Pero una vez separados, detectados, e incluso cuantificados todos los componentes individuales de una muestra problema, el único dato de que se dispone para la identificación de cada uno de ellos es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos. Este dato no es suficiente para una identificación inequívoca, sobre todo cuando se analiza muestras con un número elevado de componentes, como es frecuente en cromatografía de gases capilar.

Por otra parte, la espectrometría de masas puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero normalmente no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separar previamente sus componentes, debido a la extrema complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente. Por lo tanto, la asociación de las dos técnicas, GC ("Gas Chromatography") y MS ("Mass Spectrometry") da lugar a una técnica combinada GC-MS que permite la separación e identificación de mezclas complejas.

La utilización de la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas requiere sistemas especiales de conexión. En principio, se trata de dos técnicas que trabajan en fase gaseosa y necesitan una muy pequeña cantidad de muestra para su análisis, por lo que son muy compatibles. El único obstáculo serio a la hora de realizar su acoplamiento es que el efluente que emerge de la columna cromatográfica sale a presión atmosférica y debe introducirse en el interior del espectrómetro de masas que trabaja a alto vacío. Actualmente, el acoplamiento directo resulta fácil cuando se utiliza la cromatografía de gases capilar, que es el caso más habitual.

En resumen, una mezcla de compuestos inyectada en el cromatógrafo de gases se separa en la columna cromatográfica obteniendo la elusión 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.

En este proceso, el espectrómetro de masas, además de proporcionar los espectros, actúa como detector cromatográfico al registrar la corriente iónica total generada en la fuente iónica, cuya representación grafica constituye el cromatograma o "TIC" (total ion current). En efecto, la corriente iónica generada por todos los iones da lugar a un pico gaussiano de área proporcional a la concentración del compuesto detectado.

En el caso de mezclas complejas, el cromatograma obtenido puede presentar muchos picos, algunos de ellos muy próximos, resultando difícil la identificación rápida y fiable de algún compuesto de interés. Cuando se desea explícitamente localizar la presencia de uno o varios compuestos determinados, de espectro conocido, con la mayor rapidez o con la máxima sensibilidad posible se recurre a la técnica de detección SIR ("selected ion recording"). En esta modalidad de trabajo se detectan solamente algunas masas de interés, en lugar de trabajar con el total de los iones (TIC). De esta forma, se aumenta la selectividad del método, reduciéndose las interferencias.

Con este tipo de cromatografía se puede determinar de qué se compone la muestra que se esta analizando de manera cualitativa y cuantitativa, por el medio del índice de Kovats.

El índice de Kovats relaciona el volumen de retención, el tiempo de retención t_R de un compuesto desconocido con otro que contiene n-hidrocarburos y que fluye antes y después que él. Para cada serie de parafinas existe un índice

$$IK = 100 \cdot n + \frac{t_{1x} - t_{1n}}{t_{1N} - t_{1n}} \cdot 100 \quad (1)$$

IK = índice de retención para el componente "x" en la fase estacionaria

N = numero de átomos de carbono del n-alcano menor

$t_{px}, t_{pN}, t_{pf(N+n)}$ = tiempos de retención del componente x, y los n-alcanos entre los que se encuentra este componente. (M.C. Gutierrez, M. Droguet, 2002).

5. DISEÑO METODOLÓGICO

La presente investigación se realizó en la ciudad de San Juan de Pasto, ubicada al extremo sur occidental de Colombia, se encuentra a una altura de 2.527 m.s.n.m, con una temperatura media de 14°C, latitud 1° 10' N longitud 77° 16' 0.

5.1 SITIO Y DISEÑO DEL MUESTREO

La materia prima fue obtenida de cultivos silvestres de cuatro microregiones del Alto Patía al norte del departamento de Nariño y suministrada por la asociación Vencedores del Verano, quienes fueron capacitados para la colecta del material biológico con base en especificaciones aportadas por CORPOICA.(ver Anexo 1)

Se recolectaron las hojas maduras de plantas de orégano de monte, como lo denominan los habitantes de la región, (*Lippia origanoides Kunth*), entre las hileras uno y diez contadas de abajo hacia arriba, sin cortar la rama, con el objeto de no destruir la mata. Esta se colectó en cuatro veredas (Alto del Mayo, San Juanito, El Cardo, Las Juntas (Viento Libre) del área subxerofítica denominada Cordón Panamericano del Alto Patía, ubicadas en los municipios de Taminango en el norte del departamento de Nariño y Mercaderes al sur del Cauca.

Las muestras que se usaron en el proceso de estandarización, se recolectaron usando un diseño experimental lo que permitió determinar el efecto de las condiciones agroecológicas sobre la composición de los aceites esenciales (específicamente en cuanto al contenido de los compuestos mayoritarios timol, y p-cimeno). Para este diseño se tomaron muestras durante el periodo de lluvias (en un día sin lluvia) y el periodo seco, de hojas de dos edades (jóvenes y maduras), en dos altitudes El Cardo, Las Juntas-Viento Libre, (entre 740 y 990 msnm) y Alto del Mayo y San Juanito (1100 y 1200 msnm).

5.2 DISEÑOS EXPERIMENTALES.

5.2.1 Optimización del proceso de extracción a nivel de laboratorio y planta piloto. Para la determinación de las condiciones óptimas del proceso de extracción del aceite esencial de orégano, se elaboró un diseño factorial de experimentos utilizando la metodología de superficie de respuesta, en la que se consideraron los diferentes factores o efectos que influyen sobre la variable de respuesta con lo cual se realizó un modelamiento matemático que responde a la región experimental.

A nivel de laboratorio y planta piloto los factores o variables independientes estudiados y sus niveles son:

Cuadro 2. Factores o variables independientes estudiados y sus niveles a nivel de laboratorio y planta piloto

Factores	Niveles				Variable de Respuesta	
	Laboratorio		Planta Piloto		Rendimiento	Composición
	Inferior (-1)	Superior (+1)	Inferior (-1)	Superior (+1)		
Tiempo de extracción (h)	1	3	1	3		
Densidad del lecho (g/l)	60	90	60	100		
Presion (psig)			1	3		

La densidad del lecho (DL) o factor de empaquetamiento se la define como los gramos de materia prima a utilizar por cada litro de capacidad del equipo.

$$DL = \frac{\text{gr materia prima}}{\text{litro}}$$

Para su determinación experimental, se realizaron ensayos previos en los cuales se llenaba el volumen útil del recipiente extractor con las hojas de orégano para luego tomar ese volumen de llenado y pesarlo; este valor de peso se lo tomo como referencia máxima. Luego se decidió dividir el volumen del tanque en tres partes para sacar un punto mínimo un intermedio y un máximo a utilizar, de los cuales se conoció su valor en de igual manera que se realizo para determinar el primer valor.

Para las pruebas a nivel de laboratorio, se construyo un diseño factorial 2² con dos puntos centrales y puntos estrella realizado por duplicado para un total de 20 experimentos como se indica en la siguiente tabla.

Cuadro 3. Matriz experimental para la optimización a nivel de laboratorio de la extracción del aceite esencial de orégano.

N° Experimento	Tiempo de extracción (h)	Densidad Lecho (g/L)	Peso Materia prima (g)
1	1	60	30
2	3	90	45
3	1	90	45
4	2	96.2	48.1
5	3.4	75	37.5
6	2	75	37.5
7	0.6	75	37.5
8	2	53.7	26.8
9	2	75	37.5
10	3	60	30
11	1	60	30
12	3	90	45
13	1	90	45
14	2	96.2	48.5
15	3.4	75	37.5
16	2	75	37.5
17	0.6	75	37.5
18	2	53.8	26.9
19	2	75	37.5
20	3	60	30

Fuente: Esta investigación.

En la planta piloto además de las variables anteriores se evaluó el efecto de la presión de vapor. Como variables de respuesta se utilizaron el rendimiento de la extracción y la calidad del aceite en términos de concentración (% área normalizada del cromatograma) de los componentes activos principales o de interés.

Para planta piloto se elaboró un diseño central compuesto 2^3 con 4 puntos centrales y 6 puntos estrella para un total de 18 experimentos, como se indica en la siguiente tabla.

Cuadro 4. Matriz experimental para la optimización a nivel de planta piloto de la extracción de aceite esencial de orégano.

N° Experimento	Tiempo (h)	Densidad Lecho (g/L)	Presión de vapor (psig)
1	2	80	2,0
2	1,0	60,0	1,0
3	3,0	60,0	1,0
4	1,0	100,0	1,0
5	3,0	100,0	1,0
6	1,0	60,0	3,0
7	3,0	60,0	3,0
8	1,0	100,0	3,0
9	3,0	100,0	3,0
10	0,318207	80,0	2,0
11	3,68179	80,0	2,0
12	2,0	46,3641	2,0
13	2,0	113,636	2,0
14	2,0	80,0	0,318207
15	2,0	80,0	3,68179
16	2,0	80,0	2,0
17	2,0	80,0	2,0
18	2,0	80,0	2,0

Fuente. Este estudio

Las matrices de diseño de experimentos se realizaron con la ayuda del programa estadístico STATGRAPHICS Plus 5.0 (Statistical Graphics Corp. 1994 – 2000); los experimentos se llevaron a cabo de manera aleatoria.

El análisis de resultados se realizó utilizando la técnica de análisis de varianza con lo que se determinó la significancia estadística de los factores sobre las variables de respuesta.

5.2.2 Evaluación del efecto de algunas condiciones agroecológicas sobre el rendimiento y la composición del aceite esencial de orégano. Para la evaluación del efecto de las condiciones agroecológicas sobre el rendimiento y la composición del aceite esencial de orégano, se elaboró un diseño factorial de experimentos utilizando la metodología de superficie de respuesta, en la que se consideraron los diferentes factores o efectos.

Para el análisis del efecto de las condiciones agroecológicas sobre la composición se tomo como referentes solamente al timol y al p-cimeno ya que estos posibles compuestos son los que se encuentran en mayor proporción en la muestra; además el timol es el compuesto de interés de esta investigación y del proyecto del cual hace parte (extracción, caracterización y purificación de aceite esencial de orégano silvestre del Alto Patia).

Se planteó un diseño experimental multifactorial categórico que permitiera estudiar el efecto del origen (4 veredas), la época de recolección (invierno – verano) y la edad de las hojas de las plantas (jóvenes y maduras) para determinar su influencia sobre las siguientes variables de respuesta:

- %de timol
- % de p- cimeno
- Relación timol - p- cimeno
- Rendimiento del aceite esencial en la extracción (%p/p)

La matriz experimental se indica en la siguiente tabla.

Cuadro 5. Matriz experimental para la evaluación del efecto de algunas condiciones agroecológicas sobre el rendimiento y la composición del aceite esencial de orégano.

Exp.	Vereda	Edad hojas	Época de recolección	Rendimiento	% Timol	% p-Cimeno
1	San Juanito	Joven	Invierno			
2	San Juanito	Joven	Invierno			
3	San Juanito	Madura	Invierno			
4	San Juanito	Madura	Invierno			
5	Alto de Mayo	Joven	Invierno			
6	Alto de Mayo	Joven	Invierno			
7	Alto de Mayo	Madura	Invierno			
8	Alto de Mayo	Madura	Invierno			
9	El Cardo	Joven	Invierno			
10	El Cardo	Joven	Invierno			
11	El Cardo	Madura	Invierno			
12	El Cardo	Madura	Invierno			
13	Las Juntas	Joven	Invierno			
14	Las Juntas	Joven	Invierno			
15	Las Juntas	Madura	Invierno			
16	Las Juntas	Madura	Invierno			
17	San Juanito	Joven	Verano			
18	San Juanito	Joven	Verano			

Exp.	Vereda	Edad hojas	Época de recolección	Rendimiento	% Timol	% p-Cimeno
19	San Juanito	Madura	Verano			
20	San Juanito	Madura	Verano			
21	Alto de Mayo	Joven	Verano			
22	Alto de Mayo	Joven	Verano			
23	Alto de Mayo	Madura	Verano			
24	Alto de Mayo	Madura	Verano			
25	El Cardo	Joven	Verano			
26	El Cardo	Joven	Verano			
27	El Cardo	Madura	Verano			
28	El Cardo	Madura	Verano			
29	Las Juntas	Joven	Verano			
30	Las Juntas	Joven	Verano			
31	Las Juntas	Madura	Verano			
32	Las Juntas	Madura	Verano			

Fuente. Este estudio

La matriz del diseño de experimentos y el análisis estadístico de los datos fue elaborada con ayuda del programa estadístico STATGRAPHICS Plus 5.0. (Statistical Graphics Corp. 1994-2000).

El análisis de resultados se realizó utilizando la técnica de análisis de varianza con lo que se determinó la significancia estadística de los factores sobre las variables de respuesta.

5.3 PROCESO DE EXTRACCIÓN

5.3.1 Proceso de extracción a nivel de laboratorio y planta piloto. Para la optimización de la extracción por arrastre con vapor se dispuso de un equipo a nivel de laboratorio con capacidad de 1 litro y otro a nivel piloto de 50 litros de capacidad en la Planta Piloto de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad de Nariño, de los cuales se describe sus principales características a continuación:

Extractor. Consiste en un recipiente con tapa donde en su interior se coloca el material a extraer, el cual se puede acomodar dentro de una rejilla removible para retirar el material. En la parte inferior ingresa el vapor de agua para la extracción de los aceites.

Condensador. Es un equipo que tiene como función condensar el vapor de agua más los vapores de aceite arrastrados.

Separador - decantador primario. Es un componente que tiene como función separar las gotas de aceite extraído del agua condensada. Por diferencia de densidad, las gotas de aceite sobrenadan en el agua y pueden separarse fácilmente.

Decantador final. Es un equipo que tiene como función final colectar todo el aceite extraído en el proceso, dejándolo reposar por un tiempo determinado. Toda el agua decantada queda en el fondo del decantador final, siendo fácilmente retirada del mismo.

Imagen 1. Equipo de arrastre con vapor a nivel de laboratorio.



Fuente. Este estudio

Imagen 2. Equipo de arrastre con vapor a nivel de planta piloto.



Fuente. Este estudio

5.3.2. Estudio del efecto de algunas condiciones agroecológicas sobre el rendimiento de extracción y la composición del aceite esencial. La extracción de aceites esenciales para determinar la influencia de los factores agroecológicos se realizó mediante la técnica de Hidrodestilación asistida por radiación con microondas.

Este equipo está compuesto de un balón dentro de un horno por micro-ondas, donde se deposita la materia prima molida y una cantidad conocida de agua pura. Se le calienta constantemente, el aceite esencial con el agua presente se evaporan continuamente. Un condensador va acoplado al balón y una conexión en forma de D, permite acumular y separar el aceite esencial de la mezcla condensada. El agua floral o vapor condensado acompañante del aceite esencial y que también se obtiene en el florentino, regresa al balón por el rebose de la conexión.

Basándose en la literatura consultada (Cerpa Ch., 2007), y en ensayos previos realizados, se determinó que las mejores condiciones de operación para el proceso de extracción mediante la técnica de Hidrodestilación asistida por radiación con microondas eran las siguientes:

- Cantidad de materia prima a utilizar: 50g.
- Cantidad de agua en el balón: 300ml.
- Potencia del horno microondas: 80%.
- Tiempo de extracción: 30 minutos.

Imagen 3. Equipo de Hidrodestilación asistida por microondas.



Fuente. Este estudio

Análisis de los aceites esenciales: La composición de los aceites esenciales se analizó por medio de un cromatógrafo de gases GC-FID, equipo con el que cuenta la Universidad de Nariño.

Además, se envió una muestra de aceite esencial de orégano para que sea analizada por cromatografía de gases con detector selectivo de masas GC-MS a la Universidad Industrial de Santander (UIS) (ver Anexo 2). Esto con el fin de certificar los resultados obtenidos de los posibles compuestos mayoritarios encontrados por medio del análisis de índices de Kovats realizado en la Universidad de Nariño.

Análisis por cromatografía de gases GC – FID:

Preparación de la Muestra: Se preparó una solución del Aceite Esencial al 30% en Diclorometano (1 mL) grado HPLC, Mallinckrodt. 1 uL del extracto se inyectó al Cromatógrafo de Gases con detector FID.

Condiciones de Análisis:

Equipo: Cromatógrafo de Gases con detector de ionización en llama FID SHIMADZUGC-17A.

Columna: Columna Capilar DB-5 J&W (30m x 0,25mm ID 0,25um)
Gas Carrier: Helio DAP (99,995%) a flujo de 1.0 mL/min.

Presión de entrada de la columna: 80 kPa.

Inyector: Temperatura Inyector: 250°C Modo Inyección: Split, relación 50:1

Detector: Detector FID Temperatura: 280°C

Programación de Temperatura Columna: 45°C (5 min) hasta 150°C (2 min) a razón de 4°C/min, posteriormente se incrementó a 250°C (5 min) a razón de 5°C/min, por último se llevó a una temperatura de 275°C (15 min) aumentando a 10°C/min.

La identificación de los diferentes compuestos presentes en los aceites esenciales se realizó mediante el análisis de los espectros de masas y complementariamente mediante el método de cálculo de índices de Kovats. Este método requiere de los tiempos de retención obtenidos por cromatografía de gases y se relaciona con los tiempos de retención de una mezcla de parafinas de C6 a C28 (Estandar RESTEK, Bellefonte) analizada en las mismas condiciones cromatográficas (ver Anexo 3).

5.4 DETERMINACIÓN DE LOS RENDIMIENTOS DEL ACEITE ESENCIAL

El rendimiento se calculó para cada una de las muestras de orégano procedentes de las cuatro veredas del Alto Patía, a partir de la cantidad de aceite esencial obtenido por unidad másica de materia prima seca en términos porcentuales (por ejemplo g de aceite/100 g de materia prima).

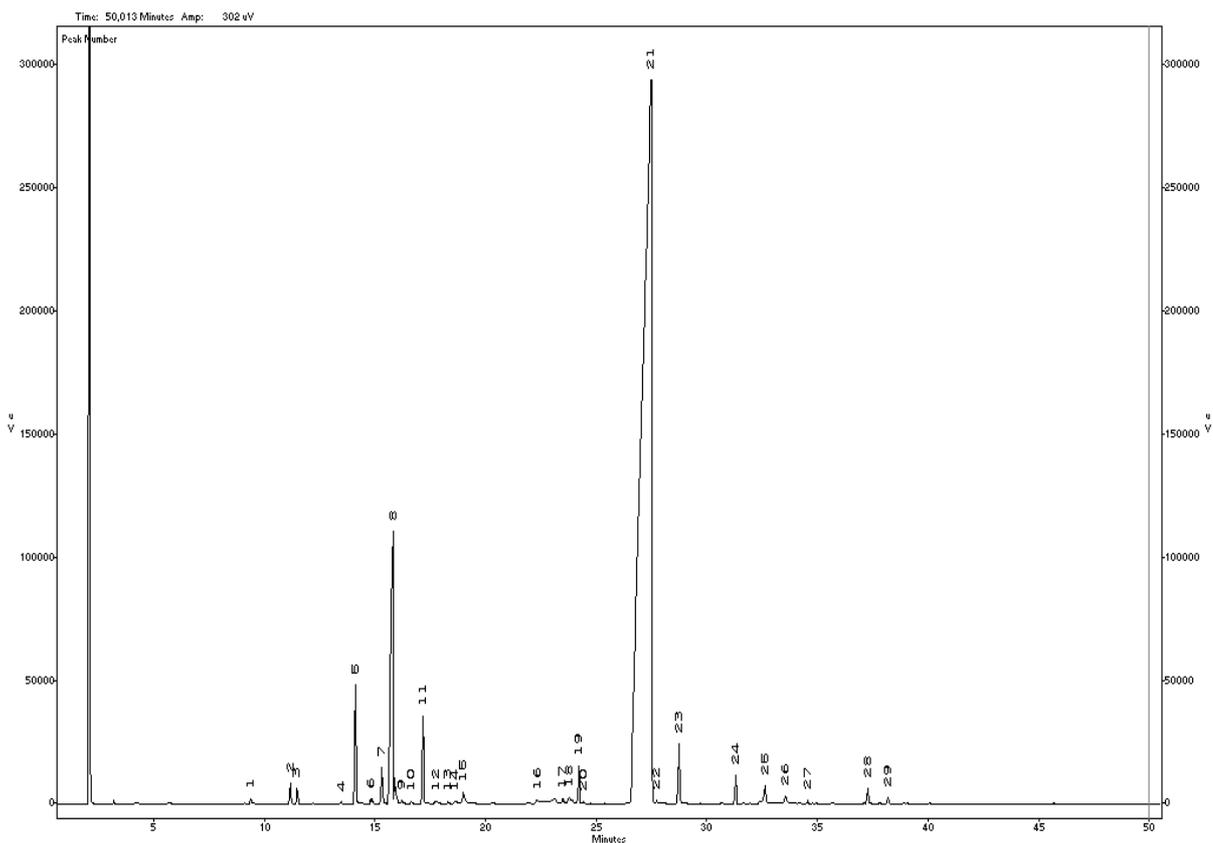
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 COMPOSICIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE OREGANO SILVESTRE DEL ALTO PATÍA

La identificación de los componentes mayoritarios se efectuó con el cálculo de los índices de Kovats (Adams 2004), con una serie de n-alcános de C6 a C28 (Estándar RESTEK, Bellefonte); para la identificación del timol y carvacrol se usaron patrones de referencia de estos compuestos (Aldrich Chemicals 99.9% de pureza).

La siguiente figura indica un cromatograma general del aceite esencial de orégano silvestre del Alto Patía extraído mediante la técnica de arrastre con vapor.

Figura 2. Cromatograma general de una muestra de aceite esencial de orégano silvestre del Alto Patía.



Fuente. Este estudio

En la tabla 6 se muestran los posibles compuestos mayoritarios encontrados en el aceite esencial de orégano silvestre del Alto Patía, con sus respectivos porcentajes de área, tiempos de retención e índices de kovats, identificados por medio de la cromatografía de gases GC- FID.

Cuadro 6. Posibles compuestos encontrados en el aceite esencial de orégano silvestre del Alto Patía (*Lippia origanoides*).

No de pico	Tiempo de retención	% de área	Índice de kovats	Compuesto
1	11.27	0.27	925	Triciclono
2	14.24	2	990	Mirceno
3	14.91	0.24	1005	. α -Felandreno
4	15.42	0.85	1018	<alfa>-Terpineno
5	15.91	6.19	1030	<p>-Cimeno
6	17.32	2.96	1060	<gama>-Terpineno
7	19.13	0.41	1102	Linalool
8	24.31	0.79	1233	Timol Metil Eter
9	27.72	81.47	1324	Timol
10	28.83	0.34	1354	Acetato de Timilo
11	31.42	1.13	1424	<i>Trans-Cariofileno</i>
12	32.3	0.27	1449	<i>Trans-β-Cariofileno</i>
13	32.75	0.79	1463	. α -Humuleno
14	33.61	0.25	1488	. γ -Muuroleno
15	34.64	0.23	1514	. β -Bisaboleno
16	37.37	0.31	1591	Oxido de Cariofileno

Fuente. Este estudio

Como se puede observar en la tabla anterior, los posibles compuestos mayoritarios encontrados en el aceite esencial son: timol (81.47%), p-cimeno (6.19%), γ -terpineno (2.96%) y trans-cariofileno (1.13%). Esta tabla nos da a conocer que posiblemente el compuesto de mayor porcentaje de área es el timol, este resultado se lo certifica con los análisis enviados por la UIS, en los cuales por medio de un análisis por GC-MS comprueban la presencia del timol como compuesto mayoritario. Estos resultados difieren de los encontrados por Stashenko *et al.* (2007) quienes en su estudio comparativo de metabolitos secundarios volátiles de dos quimiotipos de *Lippia origanoides* encontraron como componentes mayoritarios del aceite esencial timol (56%), p-cimeno (13%) y 1,8 cineol (9%). Harlen *et al.*(2008) en su estudio sobre la composición química del aceite esencial de dos quimiotipos de *Lippia origanoides* H. B. K. en condiciones del Valle del Cauca, encontraron que los componentes mayoritarios fueron el timol (45%) y *trans- β -cariofileno* (17%).

Este resultado también difiere del encontrado por Castañeda M. *et al.* (2007), quienes realizaron un estudio de dos quimiotipos de *Lippia origanoides*, con hojas colectadas en los departamentos de Santander, Meta, Bolívar, Sucre y Cesar encontrando que el contenido de timol del quimiotipo A, era del 9.1%, con lo que se evidencia la variación en cuanto a composición de metabolitos secundarios volátiles para cada quimiotipo existente. Sin embargo este quimiotipo de *Lippia origanoides*, de los departamentos de Santander, Meta, Bolívar, Sucre y Cesar tiene un contenido de p-cimeno del 14%, comparable al encontrado en esta investigación.

Estas diferencias en composición también fueron encontradas por Martínez F. *et al.* (2007) en su estudio comparativo por GC-MS de metabolitos secundarios volátiles de dos quimiotipos de *Lippia origanoides* obtenidos por diferentes técnicas de extracción en donde se señala que al mantener constantes variables como técnica de extracción, almacenamiento de la materia vegetal y condiciones geobotánicas de crecimiento, se advierten diferencias persistentes en la naturaleza química de los metabolitos, lo que permite apuntar a variaciones genéticas de la especie, esto ya que cambios en la biosíntesis se expresan como diferencias en los productos secundarios del metabolismo de plantas de la misma especie.

Se puede observar que el aceite esencial de orégano silvestre del Alto Patía contiene porcentajes de timol mucho más altos que los encontrados en otros estudios realizados con la misma especie procedente de distintas regiones de Colombia.

6.2 OPTIMIZACIÓN A NIVEL DE LABORATORIO DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE ARRASTRE CON VAPOR.

Para la optimización a nivel de laboratorio se realizó un diseño factorial utilizando la metodología de superficie de respuesta en la que se consideraron dos factores (tiempo de extracción y densidad del lecho) que influyen sobre las variables de respuesta (rendimiento y composición), tal como se describió en el apartado 5.2 del diseño metodológico.

6.2.1 Análisis de resultados en función del rendimiento. El análisis con referencia al rendimiento del aceite esencial obtenido a partir de hojas de *Lippia origanoides* cosechadas en las 4 microregiones del alto Patía permitió establecer las mejores condiciones de extracción tomando como referencia las variables propuestas.

En la tabla 7 se indica la matriz experimental y los resultados de rendimiento obtenidos para la optimización del proceso de extracción de aceite esencial de orégano mediante la técnica de arrastre con vapor a nivel de laboratorio.

Cuadro 7. Rendimientos obtenidos para la extracción de aceite esencial de *Lippia origanoides* a nivel de laboratorio.

N° Experimento	Tiempo de extracción (h)	Densidad Lecho (g/L)	Peso Materia prima (g)	Rendimiento % p/p
1	1	60	30	2.6
2	3	90	45	3.2
3	1	90	45	3.1
4	2	96.2	48.1	3.2
5	3.4	75	37.5	2.8
6	2	75	37.5	2.4
7	0.6	75	37.5	2.8
8	2	53.7	26.8	2.0
9	2	75	37.5	2.7
10	3	60	30	2.5
11	1	60	30	2.4
12	3	90	45	3.0
13	1	90	45	2.6
14	2	96.2	48.5	2.8
15	3.4	75	37.5	2.6
16	2	75	37.5	2.6
17	0.6	75	37.5	2.9
18	2	53.8	26.9	1.9
19	2	75	37.5	2.7
20	3	60	30	2.5

Fuente. Este estudio

En la extracción por arrastre con vapor a nivel de laboratorio se obtuvo un rendimiento promedio de extracción de 2.67%.

Estudios como el de Arcila C. *et al.* (2004) acerca de las propiedades y componentes del orégano reportan un rendimiento del aceite esencial en hoja seca que varía entre el 2% y 6%, rango que abarca el rendimiento promedio obtenido en esta investigación.

Aranda J. *et al.* (2007) encontraron en su estudio sobre la caracterización del aceite esencial de orégano liso (*Poliminta longiflora Gray*) realizado en la localidad de Infiernillo municipio de Higuera, N.L. México un rendimiento promedio de extracción de 0.7% con respecto al material vegetativo en seco; igualmente Albado E. *et al.* (2001) en su estudio sobre composición química y

actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* obtuvieron un rendimiento de extracción promedio de 1.3%, resultados que difieren al encontrado en esta investigación, lo que podría atribuirse al tipo de material vegetal utilizado.

El análisis de varianza para los resultados mostrados en la tabla anterior se presenta en la tabla 8.

Se obtuvo que la densidad del lecho es el único factor estadísticamente significativo sobre el rendimiento de la extracción ya que presenta un valor de p menor que 0.05, lo que indica que es significativamente diferente de cero con un nivel de confianza del 95%. El factor tiempo así como la interacción de éste con la densidad del lecho no mostraron efectos significativos sobre la variable de respuesta en los niveles evaluados.

Cuadro 8. ANOVA para el rendimiento del aceite esencial de orégano a nivel de laboratorio

Análisis de la Varianza para RENDIMIENTO					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
A:TIEMPO	0.00143069	1	0.00143069	0.05	0.8272
B:DENSIDAD LECHO	1.37015	1	1.37015	47.52	0.0000
AA	0.106785	1	0.106785	3.70	0.0765
AB	0.0235771	1	0.0235771	0.82	0.3823
BB	0.00881638	1	0.00881638	0.31	0.5897
bloques	0.0616383	1	0.0616383	2.14	0.1675
Error Total	0.374814	13	0.0288318		
Total (corr.)	2.00544	19			
R-cuadrado = 81.3101 por ciento					
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 74.6352 por ciento					
Error Estándar de Est. = 0.169799					
Error absoluto de la media = 0.120921					
Estadístico Durbin-Watson = 2.47166 (P=0.1181)					
Autocorrelación residual Lag 1 = -0.260846					

Fuente. Este estudio

El valor de R- cuadrado, indica que el modelo encontrado explica el 81.3101% de la variabilidad en el rendimiento.

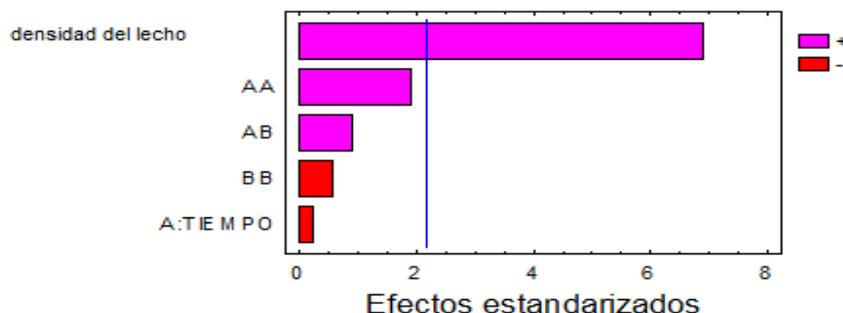
El test de Durbin – Watson, indica que el valor de p es mayor de 0.05 (P= 0.1181), lo que muestra que no hay autocorrelación en el residual de los datos, es decir que los experimentos fueron realizados aleatoriamente de manera adecuada.

El diagrama de Pareto del gráfico 1 muestra en orden de importancia el efecto de cada uno de los factores sobre el rendimiento; solo la variable densidad del lecho es estadísticamente significativa, al encontrarse a la derecha de la línea divisoria.

Respecto al tiempo y las demás interacciones se puede afirmar que éstas no son estadísticamente significativas.

Este comportamiento indica que al haber una mayor cantidad de materia prima sobre el porta muestra del equipo existe un mayor contacto del vapor por unidad de volumen; por tanto en este caso la mayor parte del vapor suministrado es aprovechado; contrario a cuando se tiene poca cantidad de material vegetal ya que el vapor tiende a tomar canales preferenciales en los cuales no tiene contacto con las hojas de orégano.

Grafico 1. Diagrama de Pareto para el rendimiento del aceite esencial de orégano a nivel de laboratorio.



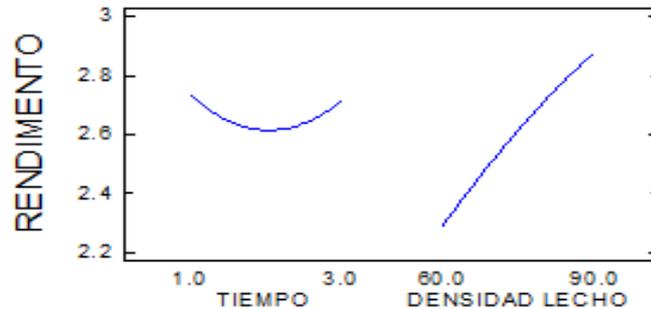
Fuente. Este estudio

En el diagrama de efectos principales (gráfico 2) se puede observar que al incrementarse la densidad del lecho de 60 a 90 g/L se obtiene un incremento en el rendimiento del aceite esencial de 0,58%.

Con relación al tiempo se observa que los aumentos en éste no conducen a incrementos significativos en el rendimiento, por lo cual no se justifica desde el punto de vista económico trabajar con tiempos mayores a una hora.

Este comportamiento indica que ya sea a 1 o 3 horas el rendimiento es similar o sea que la mayor cantidad de aceite esencial se extrae durante la primera hora por lo cual el incremento del tiempo en la extracción no es necesario ni recomendable ya que a nivel industrial este aumento de tiempo de extracción se vería representado en un aumento en los costos.

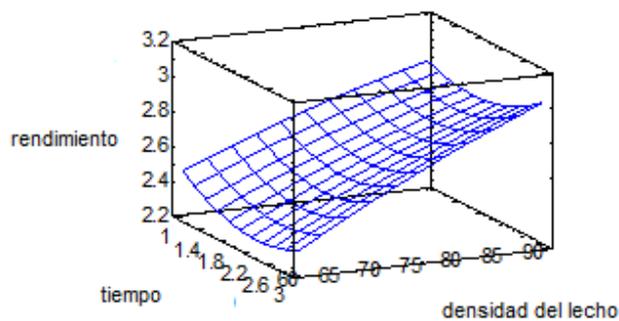
Grafico 2. Diagrama de efectos principales para el rendimiento de extracción de aceite esencial de orégano a nivel de laboratorio.



Fuente. Este estudio

El análisis de la superficie de respuesta del gráfico 3, indica que las condiciones óptimas de tiempo y densidad del lecho, se presentan a 3.4 horas y 95 g/L respectivamente. Estos valores se verifican en el tabla de respuesta óptima (tabla No 9), donde se encuentran los puntos óptimos arrojados por el programa estadístico para el proceso, en el rango experimental estudiado.

Gráfico 3. Superficie de respuesta para la optimización del rendimiento de aceite esencial de orégano a nivel de laboratorio.



Fuente. Este estudio

La ecuación que arroja el programa estadístico Statgraphics Plus 5.0 y que permitirá maximizar el rendimiento de extracción de aceite esencial de orégano se presenta a través del siguiente modelo matemático ajustado.

$$\text{RENDIMIENTO} = 1.36983 - 0.713183 \cdot \text{TIEMPO} + 0.0329726 \cdot \text{DENSIDAD LECHO} + 0.108072 \cdot \text{TIEMPO}^2 + 0.00361917 \cdot \text{TIEMPO} \cdot \text{DENSIDAD LECHO} - 0.000138014 \cdot \text{DENSIDAD LECHO}^2$$

Cuadro 9. Respuesta óptima para rendimiento en aceite esencial de orégano a nivel de laboratorio.

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Tiempo (h)	0,585786	3.41421	3.41421
Densidad Lecho. (g/L)	53.7868	96.2132	95.4091

Fuente. Este estudio

La tabla anterior nos indica que el punto óptimo de extracción para obtener un máximo rendimiento corresponde a los niveles más altos de los factores empleados.

6.2.2 Análisis de resultados en función del contenido de timol. En la tabla 10 se presentan los resultados que se obtuvieron para la optimización del proceso de extracción en función del contenido de timol del aceite esencial de orégano a nivel de laboratorio (los cromatogramas se indican en el Anexo 3).

Cuadro 10. Contenido de timol del aceite esencial obtenido a partir de hojas de *Lippia origanoides*

Experimento	Tiempo de extracción (h)	Densidad Lecho (g/L)	% timol
1	1	60	84.8
2	3	90	99.46
3	1	90	85.2
4	2	96.2	75.69
5	3.4	75	72.37
6	2	75	81.46
7	0.6	75	85.73
8	2	53.7	79.74
9	2	75	90.03
10	3	60	66.88
11	1	60	83.89
12	3	90	89.62
13	1	90	90.03
14	2	96	81.47
15	3.4	75	82.37
16	2	75	82.06
17	0.6	75	84.22

Experimento	Tiempo de extracción (h)	Densidad Lecho (g/L)	% timol
18	2	53.8	81.86
19	2	75	79.27
20	3	60	82.4

Fuente. Este estudio

El contenido porcentual promedio para el timol encontrado en el desarrollo de la matriz experimental fue de 82.92%.

El análisis de varianza (tabla 11) muestra que ninguno de los factores estudiados tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre el contenido de timol en el aceite esencial ($P < 0,05$) a un 95 % de nivel de confianza. La densidad del lecho, el tiempo y las respectivas interacciones, tienen p – valúe mayor de 0.05, lo que indica que no son estadísticamente significativas.

Cuadro 11. ANOVA para contenido de timol (% relativo) en aceite esencial de orégano a nivel de laboratorio.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:TIEMPO	45.7996	1	45.7996	0.99	0.3373
B:DENSIDAD LECHO	100.305	1	100.305	2.17	0.1641
AA	0.355527	1	0.355527	0.01	0.9314
AB	138.278	1	138.278	3.00	0.1071
BB	2.70628	1	2.70628	0.06	0.8124
bloques	0.869445	1	0.869445	0.02	0.8929
Error total	599.754	13	46.1349		
Total (corr.)	889.787	19			

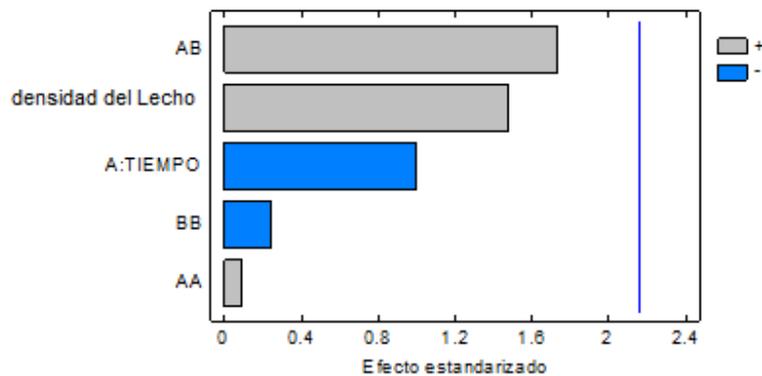
Fuente. Este estudio

El diagrama de Pareto del gráfico 4, indica que ninguna variable es estadísticamente significativa, ya que todas estas se encuentran a la izquierda de la línea divisoria. Por lo tanto se considera que estadísticamente ningún factor es determinante en el proceso de extracción, en función del contenido de timol del aceite esencial de orégano.

A pesar de que los resultados indican que estadísticamente ningún factor es significativo, observamos que la interacción densidad del lecho – tiempo es la que mayor efecto tiene sobre el contenido de timol, seguida de la densidad del lecho la cual también tiene un efecto considerable; además se observa que el tiempo tiene un efecto negativo sobre el porcentaje relativo de timol; por tanto se podría decir

que al realizar una extracción en la que se trabaje con densidades del lecho altas de 90 g/L y con tiempos bajos de 1 hora, se obtendrían los mejores resultados en relación al porcentaje relativo de timol.

Gráfico 4. Diagrama de Pareto para el contenido de timol en el aceite esencial de orégano obtenido a nivel de laboratorio.



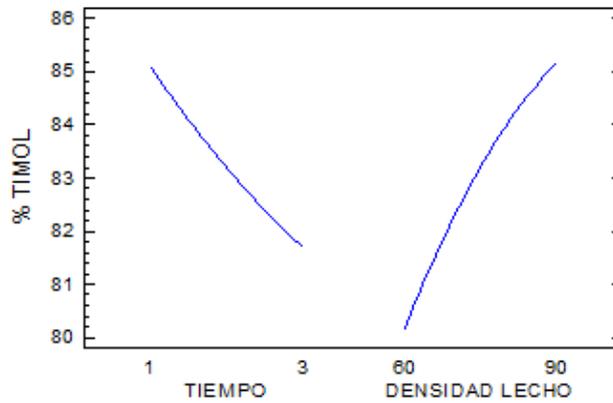
Fuente. Este estudio

En el diagrama de efectos principales para contenido de timol (gráfico 5) se observa que solo al aumentar el nivel de la variable densidad del lecho en el proceso se logra un incremento del contenido de timol en el aceite esencial de orégano, contrario al tiempo, el cual al incrementarse produce una disminución en el contenido de timol.

La variable tiempo indica un efecto negativo sobre el contenido de timol; esto puede deberse a que a medida que aumenta el tiempo de extracción, también aumenta el número de compuestos extraídos lo que conduciría a una disminución sobre la cantidad relativa de timol.

Según el gráfico 5 el efecto promedio estimado del tiempo sobre el contenido de timol es de 3.38%, esto significa que al pasar de un tiempo de extracción de una a tres horas, se tendría un decremento en el porcentaje de timol en el aceite. El efecto estimado de la densidad del lecho sobre el contenido de timol fue del 5 % lo que indica que contrario al tiempo, al pasar de una densidad del lecho de 60 g/L a 90 g/L, se tendría un incremento en el porcentaje de timol hasta de 5%.

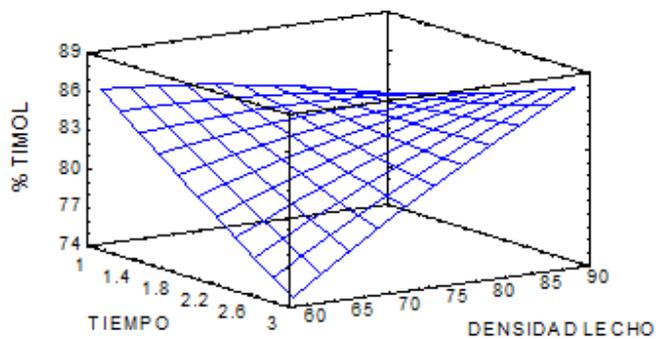
Gráfico 5. Diagrama de efectos principales para el contenido de timol en el aceite esencial de orégano obtenido a nivel de laboratorio.



Fuente. Este estudio

El gráfico 6, corresponde a la superficie de respuesta que representa el efecto de los factores o variables del proceso de extracción sobre el contenido de timol. En este caso se puede observar que las mejores condiciones que favorecen la extracción de timol se encuentran en los niveles superiores de las variables, es decir a un tiempo de 3,4 horas y una densidad de lecho de 96 g/L. Estos valores se verifican en la tabla de respuesta óptima (tabla 6), donde se muestran con exactitud los resultados de dichas variables.

Gráfico 6. Superficie de respuesta para contenido de timol a nivel de laboratorio.



Fuente. Este estudio

Cuadro 12. Respuesta óptima para contenido de timol en aceite esencial de orégano a nivel de laboratorio.

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
TIEMPO	0.585786	3.41421	3.41421
DENSIDAD LECHO	53.7868	96.2132	96.2132

Fuente. Este estudio

El modelo matemático que representa la superficie de respuesta del proceso de extracción sobre el contenido de timol es:

$$\% \text{ TIMOL} = 102.832 - 23.2682 \cdot \text{TIEMPO} - 0.0247075 \cdot \text{DENSIDAD LECHO} + 0.197195 \cdot \text{TIEMPO}^2 + 0.277167 \cdot \text{TIEMPO} \cdot \text{DENSIDAD LECHO} - 0.00241804 \cdot \text{DENSIDAD LECHO}^2$$

Del estudio del proceso de optimización teniendo en cuenta las dos variables de respuesta consideradas en el aceite de orégano se concluye que los niveles superiores de los factores o variables estudiadas maximizan el rendimiento de aceite esencial y contenido de timol a pesar de que estas variables no son estadísticamente significativas, por lo tanto es de esperarse que si el proceso se realiza durante 3,4 horas de extracción y con una densidad de lecho de 96.2 g/L el rendimiento sea en promedio 2.67 % y el contenido de timol en el aceite sea de 82.92 %.

6.3 OPTIMIZACIÓN A NIVEL DE PLANTA PILOTO DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE ARRASTRE CON VAPOR

Para la optimización a nivel de planta piloto se realizó un diseño factorial utilizando la metodología de superficie de respuesta en la que se consideraron tres factores (tiempo de extracción, densidad del lecho y presión) que influyen sobre las variables de respuesta (rendimiento y composición), tal como se describió en el apartado 5.2 del diseño metodológico.

6.3.1 Análisis de resultados en función del rendimiento. En la tabla 13 se presenta la matriz experimental y los resultados que se obtuvieron para la optimización del proceso de extracción en función del rendimiento del aceite esencial de orégano a nivel de planta piloto.

Cuadro 13. Rendimiento del aceite esencial de hojas de *Lippia origanoides* extraído en Planta Piloto.

N°Experimento	Tiempo (h)	Densidad Lecho (g/L)	Presión de vapor (psig)	Rendimiento % p/p
1	2	80	2,0	2,94
2	1,0	60,0	1,0	2,76
3	3,0	60,0	1,0	2,29
4	1,0	100,0	1,0	2,67
5	3,0	100,0	1,0	2,87
6	1,0	60,0	3,0	2,59
7	3,0	60,0	3,0	2,96
8	1,0	100,0	3,0	3,11
9	3,0	100,0	3,0	2,89
10	0,318207	80,0	2,0	2,51
11	3,68179	80,0	2,0	2,92
12	2,0	46,3641	2,0	1,59
13	2,0	113,636	2,0	3,20
14	2,0	80,0	0,318207	3,27
15	2,0	80,0	3,68179	2,98
16	2,0	80,0	2,0	2,60
17	2,0	80,0	2,0	3,05
18	2,0	80,0	2,0	2,45

Fuente. Este estudio

Con la extracción por arrastre con vapor a nivel de planta piloto se obtuvo un rendimiento promedio de 2.76% (p/p) de aceite esencial.

Quezada E. (2008) en su estudio sobre la evaluación del rendimiento de extracción del aceite esencial crudo de orégano (*Lippia graveolens*) proveniente de dos zonas de distinta altitud, por medio del método de arrastre de vapor a nivel planta piloto, obtuvo un rendimiento de 1.528%, resultado que difiere al encontrado en esta investigación, lo cual podría atribuirse al tipo de material vegetal utilizado.

El análisis de resultados se realizó utilizando la técnica de análisis de varianza para determinar la significancia estadística de los factores sobre las variables de respuesta.

Como se indica en la tabla ANOVA (tabla 14) solamente la densidad del lecho tuvo un efecto significativo sobre el rendimiento de la extracción (valor $P < 0,05$) a un 95% de nivel de confianza. Los factores tiempo y presión así como las interacciones no mostraron efectos significativos sobre la variable de respuesta en los niveles evaluados.

Cuadro 14. ANOVA para el rendimiento de la extracción en aceite esencial de orégano a nivel de planta piloto

Analysis of Variance for rendimiento					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:tiempo	0.0237514	1	0.0237514	0.18	0.6851
B:presion	0.0163325	1	0.0163325	0.12	0.7362
C:densidad lecho	0.974285	1	0.974285	7.26	0.0273
AA	0.0014867	1	0.0014867	0.01	0.9188
AB	0.02205	1	0.02205	0.16	0.6958
AC	0.0008	1	0.0008	0.01	0.9404
BB	0.227521	1	0.227521	1.70	0.2291
BC	0.0002	1	0.0002	0.00	0.9702
CC	0.194425	1	0.194425	1.45	0.2631
Total error	1.07363	8	0.134204		
Total (corr.)	2.64665	17			
R-squared = 59.4343 percent					
R-squared (adjusted for d.f.) = 13.7979 percent					
Standard Error of Est. = 0.366339					
Mean absolute error = 0.22914					
Durbin-Watson statistic = 2.20508 (P=0.3388)					
Lag 1 residual autocorrelation = -0.185518					

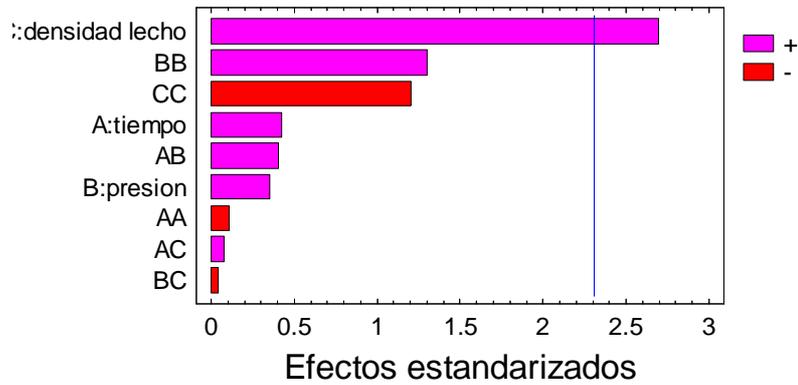
Fuente. Este estudio

El R – cuadrado (R – squared), indica que el modelo utilizado explica el 59.4343% de la variabilidad en el rendimiento.

El test de Durbin – Watson, indica que el valor de P es mayor de 0.05 ($p= 0.3388$), lo que muestra que no hay auto correlación residual de los datos, es decir que los experimentos fueron realizados aleatoriamente de manera adecuada.

El diagrama de Pareto del gráfico 7, indica que solo la variable densidad del lecho es estadísticamente significativa, al encontrarse a la derecha de la línea divisoria. Respecto al tiempo, la presión y las respectivas interacciones se puede afirmar que éstas no son estadísticamente significativas. Por tanto se considera que la densidad del lecho es el factor más determinante en el proceso de extracción, en función del rendimiento de aceite esencial de orégano.

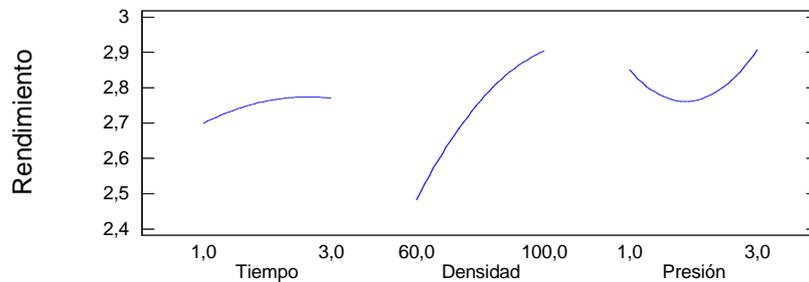
Gráfico 7. Diagrama de Pareto para el rendimiento de extracción de aceite esencial de orégano a nivel de planta piloto.



Fuente. Este estudio

En el diagrama de efectos principales (gráfico 8) se puede observar que al incrementarse la densidad del lecho de 60 a 100 g/L se obtiene un incremento en el rendimiento del aceite esencial de 0,42%. Con relación al tiempo se observa que a medida que éste aumenta, también lo hace el rendimiento, aunque alrededor de las 2 horas de extracción se llega a un punto en el cual el rendimiento se hace constante. El incremento marginal en el rendimiento debido al incremento en el tiempo es muy pequeño (0,07%), por lo cual no se justifica desde el punto de vista económico trabajar con tiempos mayores a una hora; esto concuerda con lo encontrado por Quezada E. (2008) quien afirma que el tiempo de extracción que se observó que era el más adecuado fue de 1.5 horas, esto debido que a partir de ahí ya no se obtenía una mayor cantidad de aceite esencial. De la misma manera se observa que los aumentos en la presión no conducen a incrementos significativos en el rendimiento, por lo que es suficiente realizar la extracción con presiones de 1 psig.

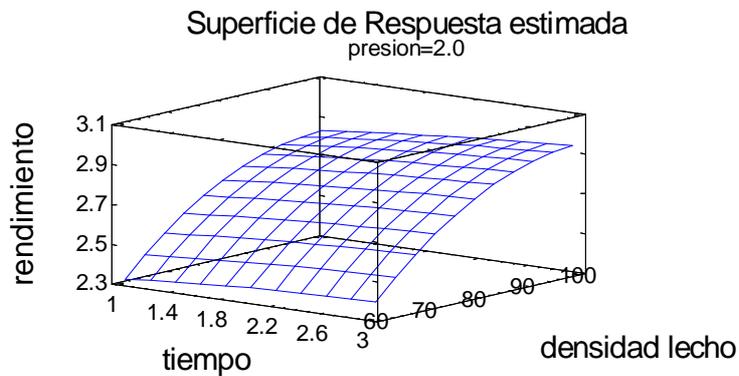
Gráfico 8. Diagrama de efectos principales para el rendimiento en la extracción de aceite esencial de orégano a nivel de planta piloto.



Fuente. Este estudio

El análisis de la superficie de respuesta del gráfico 9, indica que las condiciones óptimas de tiempo, densidad del lecho y presión, se presentan a 3.6 horas, 113 g/L y 3.6 psig respectivamente. Estos valores se verifican en el tabla de respuesta óptima (Tabla 15), donde se encuentran los puntos óptimos arrojados por el programa estadístico para el proceso, en el rango experimental estudiado.

Gráfico 9. Superficie de respuesta para el rendimiento en la extracción de aceite esencial a nivel de planta piloto.



Fuente. Este estudio

La ecuación que permitiría maximizar el rendimiento se presenta a través del siguiente modelo matemático ajustado.

$$\text{Rendimiento} = 0.297371 - 0.0599316 \cdot \text{tiempo} - 0.586882 \cdot \text{presión} + 0.0624458 \cdot \text{densidad lecho} - 0.0108413 \cdot \text{tiempo}^2 + 0.0525 \cdot \text{tiempo} \cdot \text{presión} +$$

$$0.0005 * \text{tiempo} * \text{densidad lecho} + 0.134116 * \text{presion}^2 - 0.00025 * \text{presión} * \text{densidad lecho} - 0.000309944 * \text{densidad lecho}^2$$

Cuadro 15. Respuesta óptima para el rendimiento en la extracción de aceite esencial a nivel de planta piloto.

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Tiempo	0,318207	3,68179	3,68179
Densidad	46.113	113.663	113.663
Presión	0,318207	3,68179	3,68179

Fuente. Este estudio

La tabla anterior indica que el punto óptimo de extracción para obtener un máximo rendimiento corresponde a los niveles más altos de los factores empleados.

El efecto significativo de la densidad del lecho sobre el rendimiento se puede explicar en razón a que al haber mayor cantidad de material vegetal en el tanque de extracción se logra un mayor contacto del vapor por unidad de volumen. Cuando la cantidad de muestra es pequeña el vapor puede irse por canales preferenciales en los cuales no encuentra resistencia y su capacidad de extracción y arrastre de los aceites esenciales se ve disminuida.

Vale la pena resaltar el hecho de haber obtenido rendimientos entre el 2,0 % y 3,27%, con un promedio de 2,77 %, valores considerablemente altos en el campo de los aceites esenciales.

Los resultados obtenidos en esta investigación donde se afirma que la densidad del lecho es una variable que incide significativamente en el rendimiento se pueden comparar con los de Quezada E. (2008) quien reportó en su estudio acerca de la evaluación del rendimiento de extracción del aceite esencial crudo de orégano (*Lippia graveolens*) proveniente de dos zonas de distinta altitud, por medio del método de arrastre de vapor a nivel planta piloto, que el tamaño del lote utilizado incidió significativamente en los valores de rendimiento obtenidos.

Sin embargo, Quezada E. (2008) difiere del resultado de esta investigación al asegurar que en cuanto al tamaño del lote era el de menor cantidad el que presentaba mayor rendimiento de extracción debido a que las hojas no están tan apelmazadas y permiten que el flujo de vapor pase sin mayor dificultad a través de éstas.

6.3.2 Análisis de resultados en función del contenido de timol. En la tabla 16 se presentan los resultados que se obtuvieron para la optimización del proceso de extracción en función del contenido de timol del aceite esencial de orégano a nivel de planta piloto (los cromatogramas se indican en el Anexo 4).

Cuadro 16. Contenido de timol del aceite esencial de hojas de *Lippia origanoides* extraído en planta piloto.

NºExperimento	Tiempo (h)	Densidad Lecho (g/L)	Presión de vapor (psig)	% Timol
1	2	80	2,0	43,3
2	1,0	60,0	1,0	48,2
3	3,0	60,0	1,0	44,3
4	1,0	100,0	1,0	45,2
5	3,0	100,0	1,0	44,3
6	1,0	60,0	3,0	46,8
7	3,0	60,0	3,0	64,7
8	1,0	100,0	3,0	56,8
9	3,0	100,0	3,0	71,6
10	0,318207	80,0	2,0	54,7
11	3,68179	80,0	2,0	71,8
12	2,0	46,3641	2,0	51,3
13	2,0	113,636	2,0	74,9
14	2,0	80,0	0,318207	43,7
15	2,0	80,0	3,68179	70,7
16	2,0	80,0	2,0	54,7
17	2,0	80,0	2,0	73,6
18	2,0	80,0	2,0	74,7

Fuente. Este estudio

El promedio de porcentaje de timol encontrado en la optimización del proceso a nivel de planta piloto fue de 57.52%.

Martinez F. (2007) en su estudio comparativo por GC-MS de metabolitos secundarios volátiles de dos quimiotipos de *Lippia origanoides* H.B.K. obtenidos por diferentes técnicas de extracción demostró que los componentes variaban dependiendo del quimiotipo estudiado; uno de los quimiotipos estudiados muestra similitudes con respecto al porcentaje de timol encontrado en esta investigación (porcentaje de timol quimiotipo II =56.3%)

Se puede observar que existen diferencias entre el contenido de timol obtenido en los ensayos a nivel de laboratorio y el obtenido en los ensayos a nivel de planta piloto (ver Anexos 3 y 4). Estas diferencias pueden deberse a que el equipo a nivel de laboratorio al momento de la extracción logró ser más selectivo con la muestra y extraer menor número de componentes razón por la cual aumentó el porcentaje relativo de timol; contrario al equipo utilizado en planta piloto en el cual se podía aumentar la presión de vapor, razón por la cual se consiguió una extracción en la cual se obtuvieron un mayor número de compuestos lo cual ocasionó la reducción en el porcentaje relativo de timol.

El análisis de varianza (tabla17) muestra que solamente el factor presión de extracción tiene un efecto estadísticamente significativo sobre el contenido de timol en el aceite esencial ($P < 0,05$) a un 95 % de nivel de confianza. En el caso de la densidad del lecho, el tiempo y las respectivas interacciones, tienen un valor de P mayor de 0.05, lo que indica que no son estadísticamente significativas.

Cuadro 17. ANOVA para contenido de timol (% relativo) en aceite esencial de orégano a nivel de planta piloto.

Análisis de la Varianza para contenido timol					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
A:tiempo	235.061	1	235.061	1.82	0.2140
B:densidad lecho	210.292	1	210.292	1.63	0.2375
C:presion	781.484	1	781.484	6.06	0.0392
AA	19.1788	1	19.1788	0.15	0.7098
AB	0.00125	1	0.00125	0.00	0.9976
AC	175.781	1	175.781	1.36	0.2767
BB	20.8659	1	20.8659	0.16	0.6981
BC	49.5012	1	49.5012	0.38	0.5528
CC	143.684	1	143.684	1.11	0.3221
Error Total	1031.92	8	128.99		

Total (corr.)	2634.63	17			
R-cuadrado = 60.8323 por ciento					
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 16.7685 por ciento					
Error Estándar de Est. = 11.3574					
Error absoluto de la media = 5.98503					
Estadístico Durbin-Watson = 2.05432 (P=0.3991)					
Autocorrelación residual Lag 1 = -0.0400086					

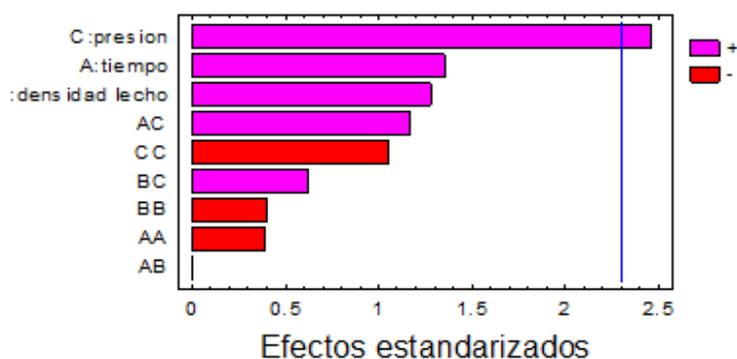
Fuente. Este estudio

El R – cuadrado (R – squared), indica que el modelo utilizado explica el 60.8323% de la variabilidad en el contenido de timol.

El test de Durbin – Watson, indica que el P – Valor es mayor de 0.05 ($p= 0.3991$), lo que muestra que no hay auto correlación residual de los datos, es decir que los experimentos fueron realizados aleatoriamente de manera adecuada.

El diagrama de Pareto del gráfico 10, indica que sólo la variable presión es estadísticamente significativa, al encontrarse a la derecha de la línea divisoria. Respecto al tiempo, la densidad del lecho y las respectivas interacciones se puede afirmar que éstas no son estadísticamente significativas. Por lo tanto se considera que la presión es el factor más determinante en el proceso de extracción, en función del contenido de timol de aceite esencial de orégano.

Gráfico 10. Diagrama de Pareto para contenido de timol a nivel de planta piloto.

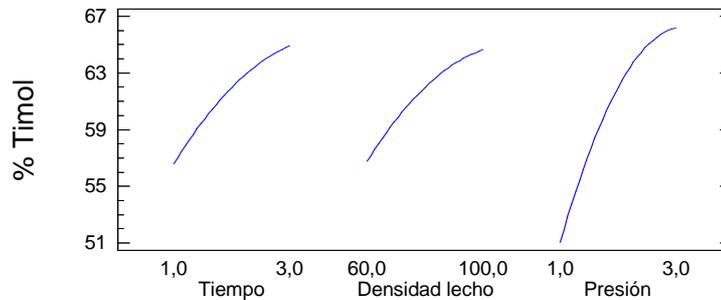


Fuente. Este estudio

En el diagrama de efectos principales para contenido de timol (gráfico 11) se observa que al aumentar los niveles de cada una de las variables del proceso se logra un incremento del contenido de timol en el aceite esencial de orégano.

El efecto promedio estimado del tiempo sobre el contenido de timol es de 8,3%, esto significa que al pasar de un tiempo de extracción de una a tres horas, se podría alcanzar un incremento en el porcentaje de timol en el aceite hasta de 8,3%. Del mismo modo los efectos estimados de la densidad del lecho y de la presión sobre el contenido de timol fueron del 7,8 % y 15,1 % respectivamente.

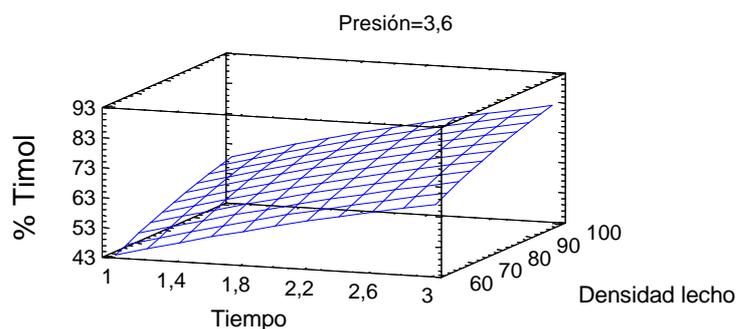
Gráfico 11. Diagrama de efectos principales para contenido de timol en el aceite esencial de orégano obtenido a nivel de planta piloto.



Fuente. Este estudio

El gráfico 12, corresponde a la superficie de respuesta que representa el efecto de los factores o variables del proceso de extracción sobre el contenido de timol. En este caso se puede observar que las mejores condiciones que favorecen la extracción de timol se encuentran en los niveles superiores de las variables, es decir a un tiempo de 3,6 horas, una densidad de lecho de 113 g/L y una presión de 3,6 psig. Estos valores se verifican en la tabla de respuesta óptima (Tabla No 18), donde se encuentran con exactitud los resultados de dichas variables.

Gráfico 12. Superficie de respuesta para contenido de timol a nivel de planta piloto.



Fuente. Este estudio

Cuadro 18. Respuesta óptima para contenido de timol en aceite esencial de orégano a nivel de planta piloto.

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Tiempo	0,318207	3,68179	3,68179
Densidad	46.113	113.663	113.663
Presión	0,318207	3,68179	3,68179

Fuente. Este estudio

El modelo matemático que representa la superficie de respuesta del proceso de extracción sobre el contenido de timol es:

$$\text{Contenido de timol} = 22.4531 - 0.25088 \cdot \text{tiempo} + 0.462446 \cdot \text{densidad lecho} + 1.72096 \cdot \text{presión} - 1.23135 \cdot \text{tiempo}^2 - 0.000625 \cdot \text{tiempo} \cdot \text{densidad lecho} + 4.6875 \cdot \text{tiempo} \cdot \text{presión} - 0.00321089 \cdot \text{densidad lecho}^2 + 0.124375 \cdot \text{densidad lecho} \cdot \text{presión} - 3.37035 \cdot \text{presión}^2$$

El modelo matemático considerando solamente la presión como variable significativa es:

$$\% \text{ timol} = 42.3875 + 7.56459 \cdot \text{presión.}$$

Del estudio del proceso de optimización teniendo en cuenta las dos variables de respuesta consideradas en el aceite de orégano se concluye que los niveles superiores de los factores o variables estudiadas maximizan el rendimiento de aceite esencial y contenido de timol por lo tanto es de esperarse que si el proceso se realiza durante 3,6 horas de extracción con un lecho de 113 g/L y 3,6 psig de presión, el rendimiento sea de 3,3 % y el contenido de timol en el aceite sea de 69,6 %.

6.4 ESTUDIO DEL EFECTO DE ALGUNAS CONDICIONES AGROECOLÓGICAS SOBRE EL RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN Y LA COMPOSICIÓN DEL ACEITE ESENCIAL.

En esta fase de la investigación se planteó un diseño experimental multifactorial categórico que permitiera estudiar el efecto del origen (4 veredas), la época de recolección (invierno – verano) y la edad de las hojas de la planta (jóvenes y maduras), sobre el rendimiento y composición (respecto a los compuestos mayoritarios) del aceite esencial de orégano.

Cabe aclarar que en épocas de verano prolongado las plantas de orégano en la zona del Alto Patía pierden sus hojas, las cuales rebrotan nuevamente cuando

comienza el periodo de lluvias. Las hojas nuevas o jóvenes que se mencionan como variables son las primeras que brotan, estas son, blandas, de color verde y bastante turgentes; luego en un lapso aproximado de uno a tres meses éstas se tornan de un color amarillo y un poco más pequeñas debido al arrugamiento de las mismas; a estas hojas ya se las considera como maduras.

Los aceites esenciales fueron analizados por cromatografía de gases con un detector de ionización de llama GC – FID.

Los rendimientos fueron calculados como peso de aceite esencial obtenido por unidad de masa seca con un contenido de aproximadamente 15% de humedad.

6.4.1. Efecto del origen, la época de recolección y la edad de la planta sobre el rendimiento del aceite esencial. En el tabla 19 se indica la matriz experimental y los resultados obtenidos para determinar el efecto del origen, la época de recolección y la edad de las hojas de la planta sobre el rendimiento y la composición (con relación a los componentes mayoritarios) del aceite esencial de orégano (los cromatogramas se indican en el Anexo 5). Se debe resaltar que el carvacrol, sustancia reportada en la literatura como uno de los componentes mayoritarios en varios quimiotipos de *Lippia organoides* aparece en las muestras de aceite analizadas con un contenido menor al 0,5%, mientras que el timol constituye el componente mayoritario con porcentajes significativamente altos con relación otras muestras reportadas por la literatura.

Cuadro 19. Rendimientos y composición del aceite esencial de orégano del Alto Patía en función de algunas variables agroecológicas

Exp.	Vereda	Edad	Época de recolección	Rendimiento	% Timol	% p-Cimeno
1	San Juanito	Joven	Invierno	2,7	69,2	10,2
2	San Juanito	Joven	Invierno	3,1	59,9	16,7
3	San Juanito	Madura	Invierno	3,0	70,2	11,6
4	San Juanito	Madura	Invierno	3,0	50,8	19,5
5	Alto de Mayo	Joven	Invierno	3,5	58,0	17,2
6	Alto de Mayo	Joven	Invierno	3,2	52,3	19,4
7	Alto de Mayo	Madura	Invierno	3,2	64,2	14,1
8	Alto de Mayo	Madura	Invierno	3,2	67,8	13,2
9	El Cardo	Joven	Invierno	3,1	70,3	11,8
10	El Cardo	Joven	Invierno	3,2	56,6	17,6
11	El Cardo	Madura	Invierno	2,7	67,8	12,3
12	El Cardo	Madura	Invierno	2,9	68,1	12,4
13	Las Juntas	Joven	Invierno	2,6	81,6	7,5

Exp.	Vereda	Edad	Época de recolección	Rendimiento	% Timol	% p-Cimeno
14	Las Juntas	Joven	Invierno	2,5	64,3	14,1
15	Las Juntas	Madura	Invierno	2,5	68,2	12,8
16	Las Juntas	Madura	Invierno	2,5	69,7	12,1
17	San Juanito	Joven	Verano	3.7	79.8	7.5
18	San Juanito	Joven	Verano	3.4	79.4	8.0
19	San Juanito	Madura	Verano	4.0	83.4	6.0
20	San Juanito	Madura	Verano	3.4	83.0	6.1
21	Alto de Mayo	Joven	Verano	2.7	78.1	9.6
22	Alto de Mayo	Joven	Verano	2.7	77.1	10.4
23	Alto de Mayo	Madura	Verano	2.4	86.7	4.4
24	Alto de Mayo	Madura	Verano	2.7	87.3	4.6
25	El Cardo	Joven	Verano	2.6	74.2	7.2
26	El Cardo	Joven	Verano	3.5	74.2	7.2
27	El Cardo	Madura	Verano	2.9	82.1	8.5
28	El Cardo	Madura	Verano	3.0	82.5	8.3
29	Las Juntas	Joven	Verano	2.0	77.2	7.9
30	Las Juntas	Joven	Verano	1.9	77.5	7.8
31	Las Juntas	Madura	Verano	2.9	82.1	7.6
32	Las Juntas	Madura	Verano	3.6	80.9	8.4

Fuente. Este estudio

Los resultados del diseño experimental que se muestran en el cuadro anterior fueron analizados mediante la técnica de análisis de varianza y prueba de rangos múltiples utilizando la LSD de Fisher, mediante el programa estadístico Statgraphics Plus 5.0, los cromatogramas se indican en el Anexo 6. El análisis se indica a continuación:

Cuadro 20. Análisis de varianza para rendimiento en función del origen, la época de recolección y la edad de las hojas de la planta.

Analysis of Variance for rendimiento - Type III Sums of Squares					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:edad de las hoja	0.195313	1	0.195313	1.80	0.1957
B:vereda	1.53594	3	0.511979	4.71	0.0127
C:epoca de recolec	0.0703125	1	0.0703125	0.65	0.4310
INTERACTIONS					
AB	1.01344	3	0.337813	3.11	0.0508
AC	0.165312	1	0.165312	1.52	0.2323
BC	2.49844	3	0.832813	7.67	0.0015
RESIDUAL	2.06344	19	0.108602		
TOTAL (CORRECTED)	7.54219	31			

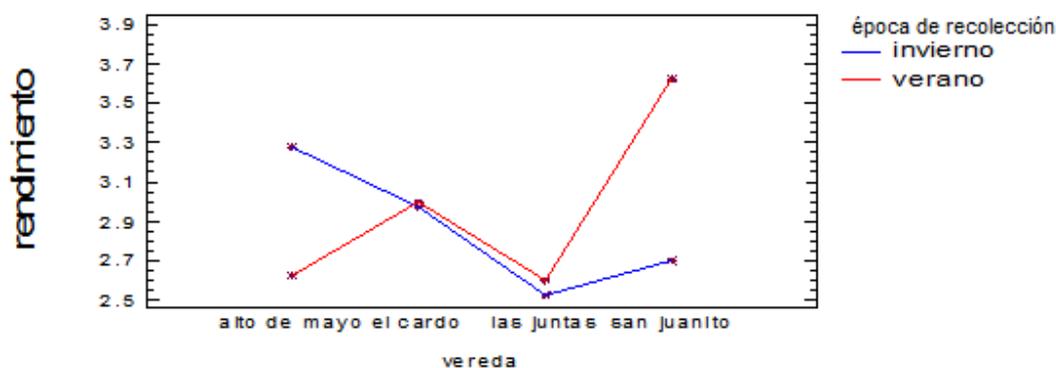
Fuente. Este estudio

El valor de $P = 0,0127$ ($P \leq 0,05$) para el factor vereda indica que hay un efecto significativo del origen de la muestra sobre el rendimiento de aceite esencial a un 95% de nivel de confianza. Dicho de otra manera, existen diferencias estadísticamente significativas entre los promedios de los rendimientos de aceite de orégano según la vereda de donde proviene la materia prima.

La tabla 20 indica que la interacción vereda – época de recolección también tiene un efecto significativo sobre el rendimiento de aceite esencial ($P=0.0015$) a un 95% de nivel de confianza. Entonces se podría decir que al tomar una muestra de determinada vereda en una determinada época de recolección se obtendrían diferencias estadísticamente significativas con respecto a los promedios del rendimiento del aceite esencial de orégano.

En el gráfico de interacción (gráfico 13) se puede observar que en la vereda San Juanito y la época de recolección verano, se obtienen los niveles más altos en el rendimiento. El rendimiento máximo obtenido es de aproximadamente 3.7%

Grafico 13. Interacción de las variables vereda y época de recolección en función del rendimiento.



Fuente. Este estudio

Los factores edad de las hojas y época de recolección siendo analizados individualmente no mostraron un efecto significativo sobre el rendimiento del aceite ($P \geq 0,05$), es decir, que no hay diferencias significativas entre los rendimientos promedio de aceite obtenidos a partir de hojas jóvenes o maduras ni entre las hojas recolectadas en época de invierno o verano a un 95% de nivel de confianza.

Dado que el análisis de varianza indica que existen diferencias estadísticamente significativas para el rendimiento según el origen de la muestra, entonces se procede a realizar la prueba de rangos múltiples, con el fin de evidenciar que veredas son las que producen plantas que arrojan rendimientos significativamente diferentes. Para ello se seleccionó la prueba de la Mínima Diferencia Significativa de Fisher.

Cuadro 21. Prueba de rangos múltiples para rendimiento con base en LSD Fisher

Vereda	# datos	Media (%)	Grupos homogéneos
Las Juntas	8	2,56	X
Alto de Mayo	8	2,95	X
El Cardo	8	2,98	X
San Juanito	8	3,16	X

Fuente. Este estudio

El cuadro anterior indica que los rendimientos de aceite de orégano son estadísticamente iguales en las veredas de San Juanito, El Cardo y Alto de Mayo, mientras que el rendimiento del aceite obtenido de plantas procedentes de la vereda de Las Juntas es diferente con respecto a las otras veredas. Los mayores rendimientos se obtuvieron en las muestras procedentes de las veredas Alto de Mayo, San Juanito y El Cardo con un promedio de 3.03% y los menores rendimientos fueron del orden de 2,56% en la vereda Las Juntas.

6.4.2. Efecto del origen, la época de recolección y la edad de las hojas de la planta sobre la composición del aceite esencial. A continuación se presentan los resultados concernientes al efecto de algunas de las condiciones agroecológicas sobre la composición del aceite esencial de orégano silvestre del Alto Patía.

6.4.2.1. Efecto del origen, la época de recolección y la edad de las hojas de la planta sobre el contenido de timol en el aceite esencial de orégano:

Cuadro 22. Análisis de varianza para el contenido de timol en el aceite esencial

Analysis of Variance for % timol - Type III Sums of Squares					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:vereda	70.6959	3	23.5653	0.84	0.4865
B:edad hojas	132.438	1	132.438	4.75	0.0422
C:epoca de recolle	1898.82	1	1898.82	68.04	0.0000
INTERACTIONS					
AB	152.086	3	50.6953	1.82	0.1783
AC	216.318	3	72.1061	2.58	0.0834
BC	40.2753	1	40.2753	1.44	0.2444
RESIDUAL	530.223	19	27.9065		
TOTAL (CORRECTED)	3040.86	31			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

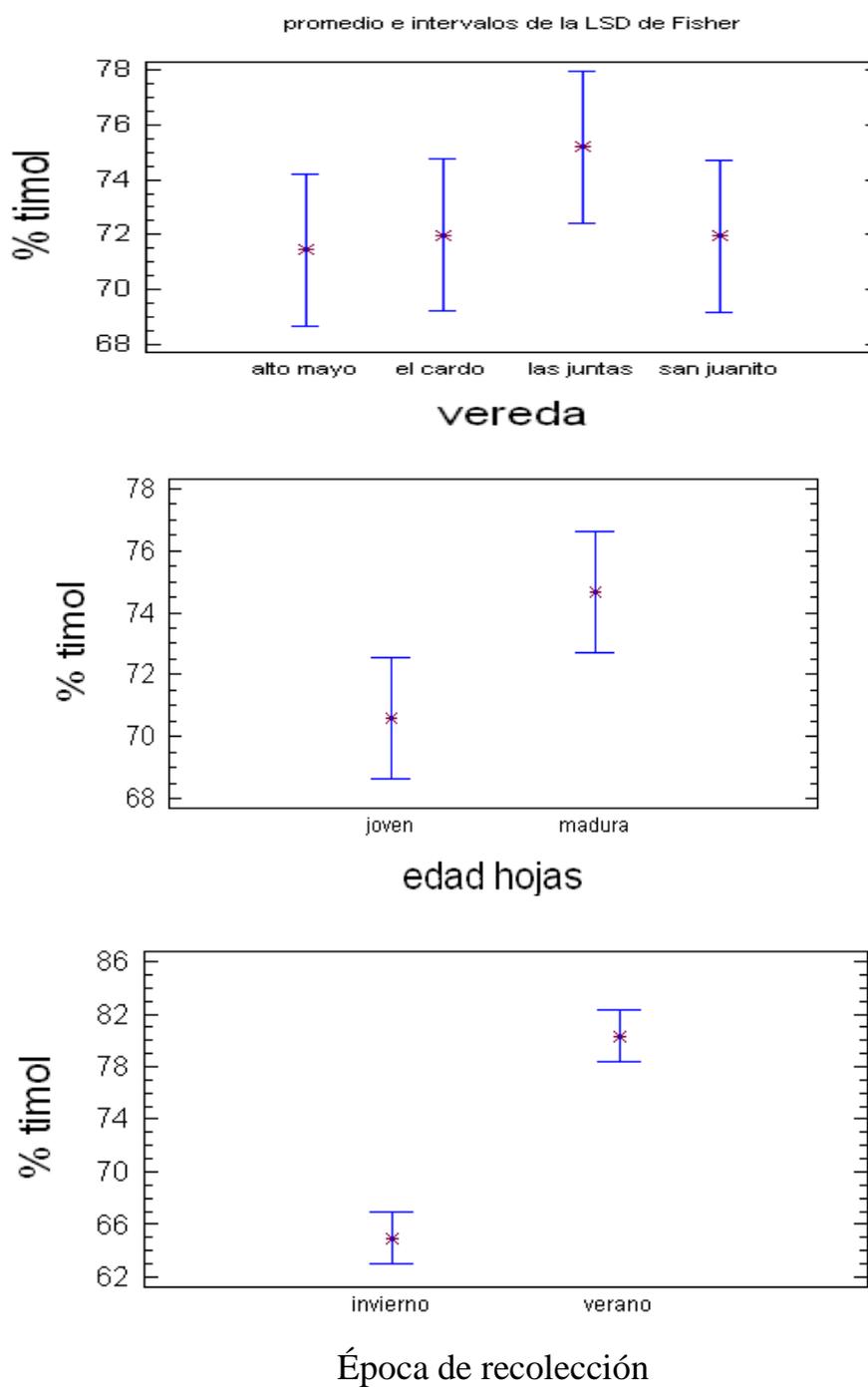
Fuente. Este estudio

El valor de $P = 0,0000$ y $P = 0.0422$ ($P \leq 0,05$) para los factores época de recolección y edad de las hojas respectivamente, indican que hay un efecto significativo de la época de recolección y la edad de las hojas de la planta sobre el porcentaje relativo de timol del aceite esencial a un 95% de nivel de confianza.

Dicho de otra manera, existen diferencias estadísticamente significativas entre los promedios de los porcentajes de timol del aceite de orégano según la época de recolección y la edad de las hojas de la materia prima.

El factor vereda (lugar de origen de la muestra), no mostró un efecto significativo sobre el porcentaje relativo de timol en el aceite esencial ($P \geq 0,05$), es decir, que no hay diferencias significativas entre los porcentajes de timol obtenidos de todas las veredas estudiadas a un 95% de nivel de confianza.

Gráfico 14. Promedios e intervalos de LSD de Fisher en relación al contenido de timol.

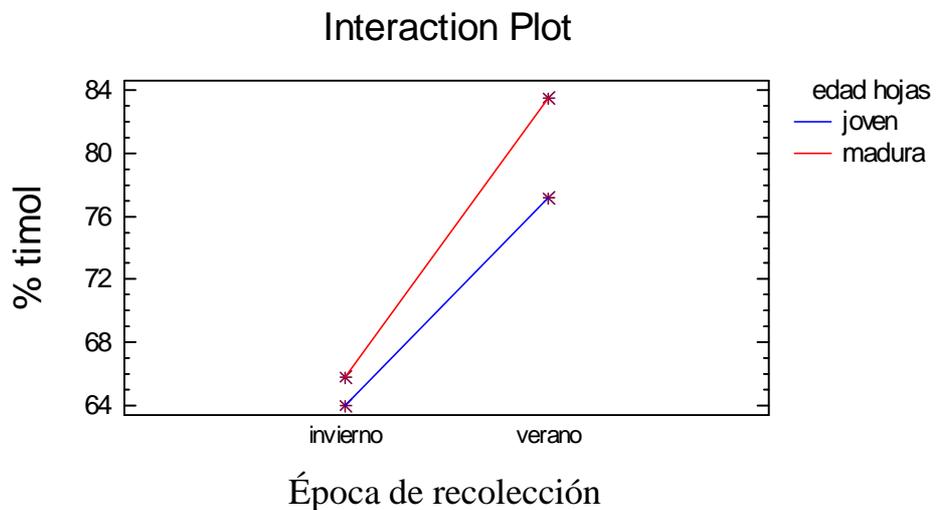


Fuente. Este estudio

En las gráficas anteriores se observa que los intervalos de las medias del contenido de timol obtenidos de muestras de orégano de las cuatro veredas se solapan, lo que significa que el rango de variación del contenido de timol en el aceite esencial es estadísticamente similar independiente del origen (vereda); contrario a lo que sucede con las medias del contenido de timol analizadas en relación a la edad de las hojas y la época de recolección las cuales no se alcanzan a solapar lo que significa que el rango de variación del contenido de timol en el aceite esencial es estadísticamente significativo dependiente de la edad de las hojas y la época de recolección.

El gráfico 15, indica que al tomar muestras recolectadas en época de verano y hojas maduras se obtendrá el mayor porcentaje relativo de timol el cual oscila entre el 82 y 84%. Se observa también que el contenido de timol es considerablemente mayor en época de verano que en época de invierno ya sea con hojas jóvenes o maduras. En época de invierno los porcentajes relativos de timol están entre el 64 y 68%.

Gráfico 15. Interacción de las variables época de recolección y edad de las hojas en función del porcentaje relativo de timol.



Fuente. Este estudio

6.4.2.2 Efecto del origen, la época de recolección y la edad de la planta sobre el contenido de p-cimeno en el aceite esencial de orégano:

Cuadro 23. Análisis de varianza para el contenido de p-cimeno en el aceite esencial.

Analysis of Variance for % para cimeno - Type III Sums of Squares					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:vereda	12.7975	3	4.26583	0.73	0.5486
B:edad de las hoja	10.8113	1	10.8113	1.84	0.1907
C:epoca de recolle	334.111	1	334.111	56.91	0.0000
INTERACTIONS					
AB	42.7213	3	14.2404	2.43	0.0973
AC	28.0913	3	9.36375	1.59	0.2237
BC	0.72	1	0.72	0.12	0.7300
RESIDUAL	111.547	19	5.87092		
TOTAL (CORRECTED)	540.8	31			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

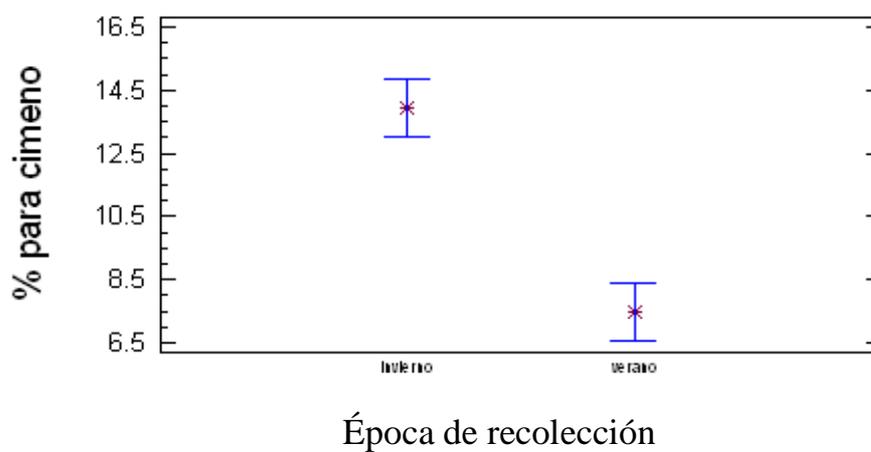
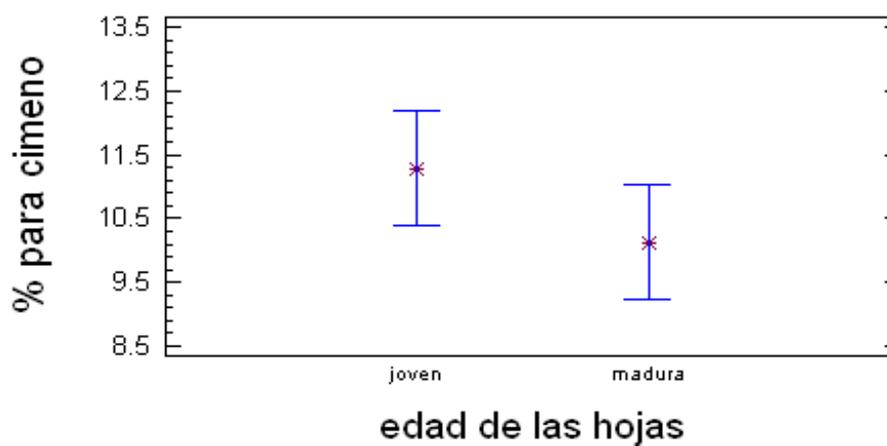
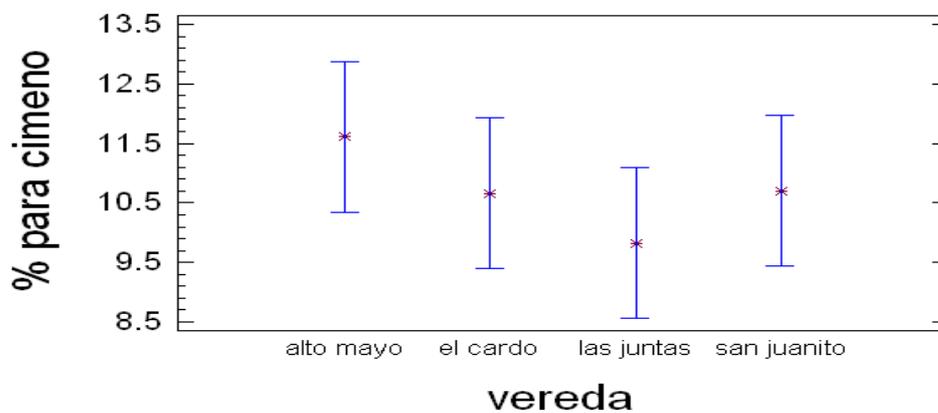
Fuente. Este estudio

El valor de $P = 0,0000$ ($P \leq 0,05$) para el factor época de recolección, indica que hay un efecto significativo de esta variable sobre el porcentaje relativo de p-cimeno del aceite esencial a un 95% de nivel de confianza.

Dicho de otra manera, existen diferencias estadísticamente significativas entre los promedios de los porcentajes de p-cimeno del aceite de orégano según la época de recolección de la materia prima.

Los factores vereda de origen y edad de las hojas, no mostraron un efecto significativo sobre el porcentaje relativo de p-cimeno del aceite ($P \geq 0,05$), es decir, que no hay diferencias significativas entre los porcentajes de p-cimeno promedio del aceite obtenidos de todas las veredas estudiadas ni de la edad de las hojas a un 95% de nivel de confianza.

Gráfico 16. Promedios e intervalos de LSD de Fisher en relación al contenido de p-cimeno.

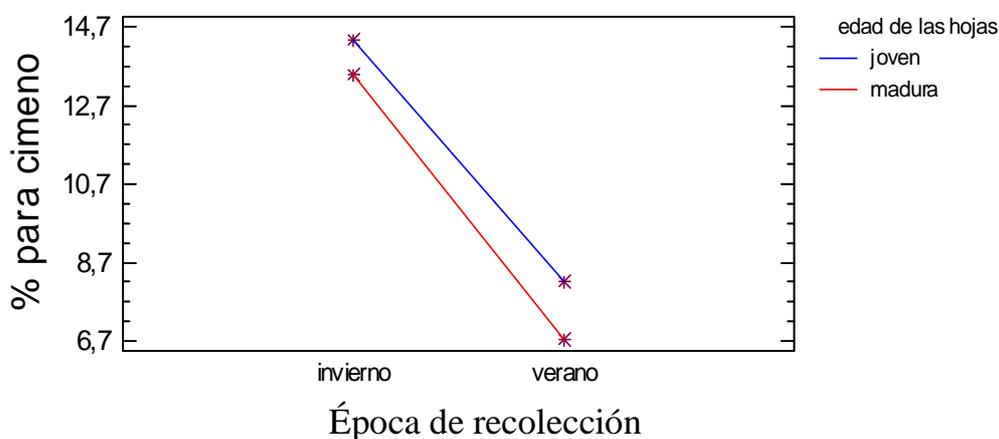


Fuente. Este estudio

En las gráficas anteriores se observa que los intervalos de las medias del contenido de ρ -cimeno obtenidos de muestras de orégano de las cuatro veredas y de las hojas jóvenes y maduras se solapan, lo que significa que el rango de variación del contenido de ρ -cimeno en el aceite esencial es estadísticamente similar independiente del origen (vereda) y de la edad de las hojas de la planta; contrario a lo que sucede con las medias del contenido de ρ -cimeno analizadas en relación a la época de recolección las cuales no se alcanzan a solapar lo que significa que el rango de variación del contenido de ρ -cimeno en el aceite esencial es estadísticamente significativo dependiente de la época de recolección.

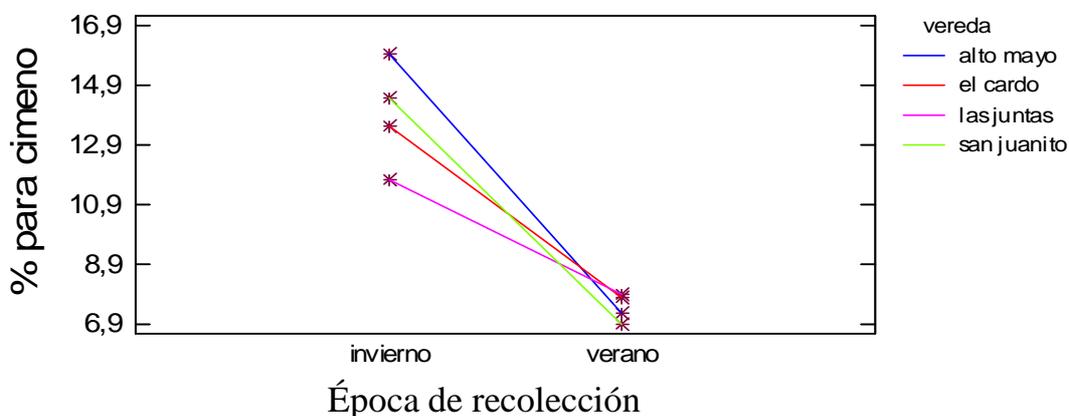
En los gráficos siguientes (gráfico 17 y gráfico 18), se indica que a diferencia del contenido de timol, la mejor época de recolección para obtener un mayor porcentaje relativo de ρ -cimeno es la época de invierno, con hojas jóvenes y procedentes de la vereda Alto de Mayo, con valores de aproximadamente el 14.5%. Se observa también que el contenido de ρ -cimeno es considerablemente mayor en época de invierno que en época de verano ya sea con cualquier edad de las hojas u origen de la planta. En época de verano los porcentajes relativos de ρ -cimeno oscilan entre el 6.5 y 7 %.

Gráfico 17. Interacción de las variables época de recolección y edad de las hojas en función del porcentaje relativo de ρ -cimeno.



Fuente. Este estudio

Grafico 18. Interacción de las variables época de recolección y vereda en función del porcentaje relativo de p-cimeno.



Fuente. Este estudio

Estos resultados son explicables por el hecho de que siendo el timol el compuesto mayoritario en el aceite esencial, solo se puede esperar obtener un porcentaje relativo más alto de los otros componentes bajo aquellas condiciones en las cuales el contenido de timol se vea reducido.

En promedio se obtuvo un contenido de timol de 72.54% (intervalo de variación entre 65% y 85%), p-cimeno de 10,7% (intervalo de variación entre 8% y 14%) y γ -terpineno de 4,9% (intervalo de variación entre 3,5% y 5,6%) en las 32 muestras analizadas.

Estudios como el realizado por Celis N *et al.* (2007), en el que se usó la técnica de hidrodestilación asistida por microondas para la extracción de aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides*), se encuentra que existe un 56% de compuestos fenólicos, timol y carvacrol siendo común el primero como compuesto mayoritario.

Cuadro 24. Tabla comparativa de los resultados obtenidos en esta investigación frente a los encontrados por otros autores.

CRITERIO	RESULTADOS OBTENIDOS	
	Investigación	Otros Autores
Componentes mayoritarios	timol - p-cimeno	Turgut 2005 → timol - carvacrol
		Martinez 2003 → carvacrol - timol
		Stashenko 2007 → timol - p-cimeno
Porcentaje relativo de timol	timol = 82% promedio	Castañeda 2007 → timol = 9.1%
		Martinez 2007 → timol = 56%
		Torres 2007 → timol = 45%
		Stashenko 2007 → timol = 56%
Rendimiento	R= 2.7% promedio	Arcila 2007 → R= 2 % - 6%
		Aranda 2007 → R= 0.7%
		Albado 2001 → R= 1.3%
		Quezada 2008 → R= 1.5%

Fuente. Este estudio

7. CONCLUSIONES

La composición promedio del aceite esencial de orégano silvestre de Alto Patía (*Lippia origanoides*) con respecto a sus componentes mayoritarios fue: timol de 72.54% (intervalo de variación entre 65% y 85%), p-cimeno de 10,7% (intervalo de variación entre 8% y 14%) y γ -terpineno de 4,9% (intervalo de variación entre 3,5% y 5,6%).

El aceite esencial de orégano silvestre del Alto Patía (*Lippia origanoides*), debido a su alto contenido de timol, mucho mayor al reportado para la misma especie obtenida en otras regiones del país y del mundo, presenta un importante potencial comercial debido a los comprobados efectos antimicrobianos y antioxidantes que tiene esta sustancia.

Para la optimización del proceso de extracción tanto a nivel de laboratorio como a nivel de planta piloto en función del rendimiento, se obtuvo que el factor densidad del lecho es el único estadísticamente significativo y determinante en el proceso de extracción. Se obtienen mayores rendimientos cuando la densidad del lecho es mayor debido a que al haber mayor cantidad de material vegetal, se logra un mayor contacto del vapor por unidad de volumen.

Según el análisis estadístico para obtener un máximo rendimiento de extracción del aceite esencial a nivel de laboratorio y planta piloto se debe trabajar a los niveles más altos de los factores evaluados; es decir, tiempo de 3.4 h, densidad del lecho de 95.4g/L y una presión de 3.7 psig. Sin embargo debido a que el tiempo no es una variable estadísticamente significativa, entonces no se justifica trabajar con tiempos altos ya que implicarían mayores costos de producción.

Solamente el factor presión tiene un efecto estadísticamente significativo en el contenido de timol del aceite esencial extraído por arrastre con vapor a nivel de planta piloto. A nivel de laboratorio no se tiene una incidencia significativa de ningún factor sobre el porcentaje relativo de timol. Las condiciones en las cuales se logra obtener el máximo rendimiento de extracción y mayor contenido de timol en el aceite esencial son aquellas en las cuales los factores estudiados se encuentran en los niveles superiores; es decir: tiempo de 3.68 h, densidad del lecho de 113 g/l y presión de 3.68 psig.

Se determinó que existen diferencias significativas en cuanto al rendimiento de extracción del aceite esencial de orégano silvestre del Alto Patía debido al origen (vereda) de donde se obtienen las hojas. Los mayores rendimientos (promedio de 3.7%) se lograron en las muestras procedentes de la vereda San Juanito.

La época de recolección es un factor estadísticamente significativo sobre el contenido de los componentes mayoritarios timol y p-cimeno del aceite esencial de orégano silvestre del Alto Patía. Los mayores contenidos de timol se obtuvieron en época de verano

Desde el punto de vista económico se recomienda realizar extracciones en cortos tiempos y bajas presiones ya que ni el rendimiento ni la composición se ven afectadas significativamente, de esta manera se verá disminuido el gasto de combustible lo que representa ahorro en dinero, ya que no se requiere de tanto vapor.

8. RECOMENDACIONES

Realizar estudios sobre el aprovechamiento del aceite esencial de orégano ya que presenta características bastante promisorias para el uso agroindustrial.

Realizar estudios que permitan la purificación del aceite de orégano, para así incrementar su valor agregado y su presentación.

Considerar otros métodos de extracción del aceite esencial de orégano, tales como soxhlet y fluidos supercríticos.

Los residuos sólidos resultantes de la extracción del aceite, pueden ser utilizados en la preparación de abonos ya que constituyen fuente de materia orgánica.

Estudiar a nivel agronómico la domesticación del orégano silvestre del alto Patía con miras a obtener cultivos comerciales que constituyan fuente de materia prima para una posible explotación a escala industrial.

Realizar un estudio de factibilidad con el fin de establecer pronósticos financieros económicos y sociales para realizar la inversión.

BIBLIOGRAFÍA

ADAMS, Robert, Identification of essential oil components by gas chromatography quadrupole mass spectroscopy, Baylor University. 15p. Año 2004.

ARANDA, Juana. SILVA, Ramón. VASQUEZ, Diana. HERNANDEZ, Franco. Caracterización del aceite esencial del orégano liso (*Poliminta lingiflora Gray*) de la localidad infiernillo en el municipio de Higueras México. Facultad de Agronomía. Universidad Autónoma de Nuevo León. Centro de Investigaciones para los recursos naturales. pp 1-7 Año 2007.

ARCILA, Cynthia Cristina, LOARCA, Guadalupe, LECONA, Salvador *et al.* El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *ALAN*, mar. 2004, vol.54, no.1, p.100-111. ISSN 0004-0622.

BLANCO, Dalia. RODRIGUEZ, Lopez. MELGAREJO Luz Marina. Composición y rendimiento del aceite esencial de *Lippia origanoides* (verbenaceae) en el cañon del chicamocha, Santander. Segundo congreso internacional de plantas medicinales y aromáticas. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. Año 2006.

BOUCHER, F. Los productos nutraceuticos oportunidades para los recursos naturales autóctonos. IICA. Año 1999.

BURDOCK, George A. Fenaroli's handbook of flavor ingredients. 5th edition. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 262, 1789-1794. Año 2005.

CASTAÑEDA, M., MUÑOZ, A., STASHENKO, E. Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas. *Scientia et Technica* año XIII, 2007, No 33: 165-166.

CAVERO, S., IBÁÑEZ, E., REGLERO, G., Supercritical fluid extraction of antioxidant compounds from oregano. *Journal of Supercritical Fluids*, Vol 38, N^o 1, pp. 62, Año 2006.

CELIS Clara, ESCOBAR Patricia, ISAZA José, MARTINEZ Jairo, STASHENKO Elena, estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de *Lippia alba*, *Lippia origanoides* y *Phyla dulcis*, especies de la familia *verbenaceae*, *Scientia et Technica* Año XIII, No 33,. UTP. ISSN 0122-1701 103. Mayo de 2007.

CENTRE FOR THE PROMOTION OF IMPORTS FROM DEVELOPING COUNTRIES, Essential oils and oleoresins. A survey of the Netherlands and other major markets in the European Union, Año 1999.

CERPA Ch. Manuel. Tesis doctoral. Hidrodestilación de aceites esenciales: modelado y caracterización. UNIVERSIDAD DE VALLADOLID. Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente. Valladolid, 304 pg. Año 2007

CORPORACIÓN COLOMBIANA DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA (Corpoica). Evaluación prospectiva del Cordón Panamericano. Informe al Incoder. 14. pg, Año 2005.

COSENTINO, S., C. I. G. Tuberose, B. Pisano, M. Satta, and V. Mascia.. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian thymus essential oils. Lett Appl Microbiol 29: pag 130-135. Año 1999.

DIAZ, J., et. al. Iniciativa Biocomercio Sostenible. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt. Proyecto GEF – CAF- PNUMA. 88 pg. Bogotá. Año 2003.

DUKE, J. A. Handbook of Medicinal Herbs. CRC. Press, Inc., Boca Ratón, USA. 667pp. Año 1985.

GOREN, A.; BILSEL, G.; BILSEL, M.; *et al* Analysis of essential oil of *Coridothymus capitatus* (L.) and its antibacterial and antifungal activity. Z.Naturforsch., 58c, pp. 687-690. Año 2003.

GONZALEZ P. D. J.; "Utilización Terapéutica de Nuestras Plantas Medicinales Universidad de la Salle Bogota. Capitulo VI. Año 1984.

GRAY, A. Caracterización y actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de *Tithonia diversifolia* (hemsl.), Revista Científica UNET, Vol. 14,. pp 45-54. Año 2002.

GUIGNARD, J-L., COSSON, L., Henry, M.; "ABREGÉ DE PHYTOCHIMIE", Masson, Paris - New York - Barcelona, capitulo 8. pp 224. Año 1985.

GUNTHER, E. *The Essential Oils*. Vol. 1: History and origin in Plants Production Analysis. Krieger Publishing: New York, USA, pp 111-119. Año 1948.

IBAÑEZ, Jimena, Estudio de la composición del aceite esencial y de la resina en el ciclo vital de la *espeletia schultzei*, *coespeletia moritziana*, *ruilopezia atropurpurea* y de un híbrido, Base de información Fonacit, pp 121. Año 2004.

LEMHADRI A., ZEQQWAQH N.A., MAGHRANI M., JOUAD H., EDDOUKS M.,
Anti-hiperhyperglycaemic Activity of de Aqueous Extrac of *Origanum vulgare*
Growing Wild in Tafilalet Region. J. of Ethnopharmacol. 92 (2), 251. Año 2004

LOPEZ, P. S. VERBENACEAE. Flora de Venezuela, Consejo de Publicaciones,
ULA-Mérida; 654p. Año 1977.

LOZANO Cristina, LOARCA Guadalupe, LECONA Salvador, y GONZALEZ Elvira.
El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes.
Archivos Latinoamericanos de nutrición. pp. 100-111. Año 2004.

MARTINEZ, A, Aceites Esenciales, Universidad De Antioquia, Facultad De
Química Farmacéutica Medellín, pp. 110 -115. Año 2003.

MARTINEZ, E. GALAN, M. Extracción con fluidos supercríticos. Vol (I, II y III).
Aplicaciones Industriales. Ingeniería Química. Num 23. Págs. 251-260. Edición de
la Universidad Politecnica de Catalunya, SL. Año 1991

MARTINEZ F, RUIZ J, STASHENCKO E, Estudio comparativo por GC-MS de
metabolitos secundarios volátiles de dos quimotipos de *Lippia origanoides*
obtenidos por diferentes técnicas de extracción. Scientia Et Technica. Vol XIII. Pp
325-328. Universidad tecnològica de Pereira. Año 2007.

MATSUURA H., CHEIJI H., ASAKAWA C., DPPH Radical Scavengers from dried
leaves of oregano (*Origanum vulgare*). Biosci Biotechnol Biochem. Vol 67, N° 11,
pp. 2311, noviembre de 2003.

MCGIMPSEY et al., J.A. MCGIMPSEY, M.H. DOUGLAS, J.L. Van Klink, D.A.
BEAUREGARD and N.B. PERRY, Synergistic antibacterial activity between
Thymus vulgaris and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. pp
403-406. Año 1994

M. GUTIÉRREZ, M. DROGUET, la cromatografía de gases y la espectrometría de
masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. Boletín Intexter
(U.P.C.). No. 122. pp 1-7. Año 2002.

MUÑOZ, A., CASTANEDA, M., STASHENKO, E. Composición y capacidad
antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y
carvacrol. Scientia et Technica. N°33. Pp 125-128. Año 2007.

OJEDA de RODRIGUEZ, Graciela; Y SAMBERTT, Fredy; SULBARAN de
FERRER, Betzabe, Composición de la fracción volátil del aceite esencial de
naranja venezolana (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), revista ciencia vol. 11. Año
2003.

OLAYA, J. M. Et al. Manual de extracción de aceites esenciales de plantas aromáticas. Banco de proyectos CORPOEDUAGRO. 35pg. Año 2000.

PALOMINO, A. Y CERPA, M. Hidroextracción de los aceites esenciales. Memorias de la IV Reunión de Fenómenos de Transporte. Callao, Perú, 73pg. Año 1999.

QUEZADA RODRÍGUEZ, Aldo Enrique. Evaluación del rendimiento de extracción del aceite esencial crudo de orégano (*Lippia graveolens*) proveniente de dos zonas de distinta altitud, por medio del método de arrastre de vapor a nivel planta piloto. Trabajo de graduación. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. pp 1- 80. Año 2008.

REVISTA ALAN, Archives Latinoamericanas De Nutrición / Publicación oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición / Trabajos De Investigación. Año 2004.

SANTOYO, S., CAVERO, S., JAIME, L., IBANEZ, E., SENORANS, F.J., REGLERO, G. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Compounds with Antimicrobial Activity from *Oreganum vulgare*: Determination of Optimal Extraction Parameters. J Food Prot, Vol 69, N°2, pp. 369, febrero de 2006.

SOUZA E.L., STANFORD T.L.M., LIMA E. O, TRAJANO V.N., Food Control, Vol 18, N° 5, mayo 2007.

STASHENKO Elena, MARTINEZ Jairo, TUNAROSA Fabián, RUIZ Carlos, estudio comparativo por GC-MS de metabolitos secundarios volátiles de dos quimiotipos de *Lippia origanoides* H.B.K., obtenidos por diferentes técnicas de extracción, Scientia et Technica Año XIII, No 33. UTP. pp 122-170. Mayo de 2007

TORRES Harlem, SANCHEZ Manuel, POTES, J, BONILLA C. Ponencia: Composición química del aceite esencial de dos quimiotipos de *Lippia origanoides* H.B.K en condiciones del Valle del Cauca Libro:Memorias Día De La Ciencia Y La Tecnología, Universidad Nacional De Colombia Sede Palmira , Año 2008

VAZQUEZ R Silva. and TURGUT Nurhan. Bioactive Components of Mexican Oregano. Oil as Affected by Moisture and Plant Maturity. Journal of Essential Oil Research. RESPYN Edición Especial No. 1-2008 . pp 1-2. Mexico. Año 2005.

VERNIN G, LAGEOT C, GAYDOU EM, PARKANYI C. Analysis of the essential oil of *Lippia graveolens* HBK from El Salvador. Flav. Frag. J. 16:219-226. Año 2001.

ZHENG, W.; WANG, S.; Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs, J. Agric. FoodChem., 49, pp. 5165-5170. Año 2001.

ANEXOS

Anexo A. Guía para la colecta de material vegetal de hábitat natural.

Consideraciones para el personal que colecta el material.

- Estos deben poseer un conocimiento de la identificación de la planta.
- Deben distinguir la planta medicinal de otras estrechamente relacionadas para evitar mezclas indeseables.
- Deben tener un suficiente conocimiento e información sobre las condiciones de cosecha incluyendo las técnicas, los procesos de conservación y almacenamiento del material para asegurar la calidad.
- Deben tener un alto grado de higiene personal y no sufrir enfermedades transmisibles, lesiones en la piel, etc.
- Deben ser supervisados por personal competente que asegure la calidad del material colectado.
- Los procesos de aprendizaje deben ser documentados.

Para la colección del material.

- Esta se debe llevar a cabo a un tiempo óptimo requerido para obtener la calidad farmacéutica y la eficacia funcional.
- Debe hacerse en periodos secos y no durante la precipitación, ya que estas condiciones son desfavorables.
- Los equipos deben ser limpios y libres de remanentes de cosechas previas.
- Los procesos de colección deben evitar el daño mecánico a los tejidos, ya que se afecta la calidad con pérdida de aceites esenciales.
- Se debe reducir al mínimo el periodo entre la recolección y el secado de la muestra para evitar cambios en la apariencia externa, calidad y contaminación microbiológica.
- La planta se debe proteger del ataque de plagas y enfermedades.
- Se debe evitar la sobrecosecha en una determinada área.
- La naturaleza del hábitat, clima, tipo de suelos y otras variables específicas asociadas a la calidad se deben registrar y documentar.

- Se debe documentar la recolección incluyendo identidad de la muestra, calidad macroscópica, pureza, etc.
- El lote se debe identificar y documentar.

Anexo B. Determinación de la composición química del aceite esencial de orégano silvestre del Alto Patía por cromatografía de gases con detector selectivo de masas (GC-MS), realizado por el laboratorio de cromatografía de la Universidad Industrial de Santander.

		LABORATORIO DE CROMATOGRFIA UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER	CÓDIGO: 982227-AI FECHA: 2008/10/30
		INFORME DE RESULTADOS	PÁGINA 1 de 5 VoBo: <i>[Signature]</i>

DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE ACEITES ESENCIALES POR CROMATOGRFIA DE GASES CON DETECTOR SELECTIVO DE MASAS (GC-MS)

1. DATOS GENERALES

ENTIDAD SOLICITANTE: UNIVERSIDAD DE NARIÑO (Calle 18 Cra 50 Ciudad Universitaria Torabajo-Bloque de Laboratorios especializados)

CÓDIGO DE LA(S) MUESTRA(S): 982227-01-AI, 982227-02-AI, 982227-03-AI

DESCRIPCIÓN DE LA(S) MUESTRA(S): "Muestra No. 1; aceite esencial de Laurel de cera (Morella pubencens); extracción: arrastre con vapor; fecha: 30/09/08; solución del aceite esencial al 20% en diclorometano", "Muestra No. 2; aceite esencial de Romero (Rosmarinus officinalis); extracción: arrastre con vapor; fecha: 30/09/08; aceite esencial puro", "Muestra No. 3; aceite esencial de Orégano; extracción: arrastre con vapor; aceite esencial puro"

FECHA DE RECEPCIÓN DE LA(S) MUESTRA(S): 2008-10-11

ANÁLISIS SOLICITADO: Determinación por GC-MS de la composición química de la fracción volátil y semivolátil de aceites esenciales.

FECHA DE REALIZACIÓN DEL ANÁLISIS: 2008-10-15

2. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

La preparación de las muestras se llevó a cabo por dilución e inyección directa de los aceites esenciales al equipo cromatográfico. El análisis se realizó en un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies* 6890N acoplado a un detector selectivo de masas (MSD) *Agilent Technologies* 5975 *Inert*, operado en el modo de barrido completo (*full scan*) de radiofrecuencia. La columna empleada en el análisis fue DB-WAX (*J & W Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.) [poli(etilenglicol), 60 m x 0.25 mm x 0.25 μm]. La inyección se realizó en modo *split* (50:1), $V_{iny} = 1 \mu\text{L}$.

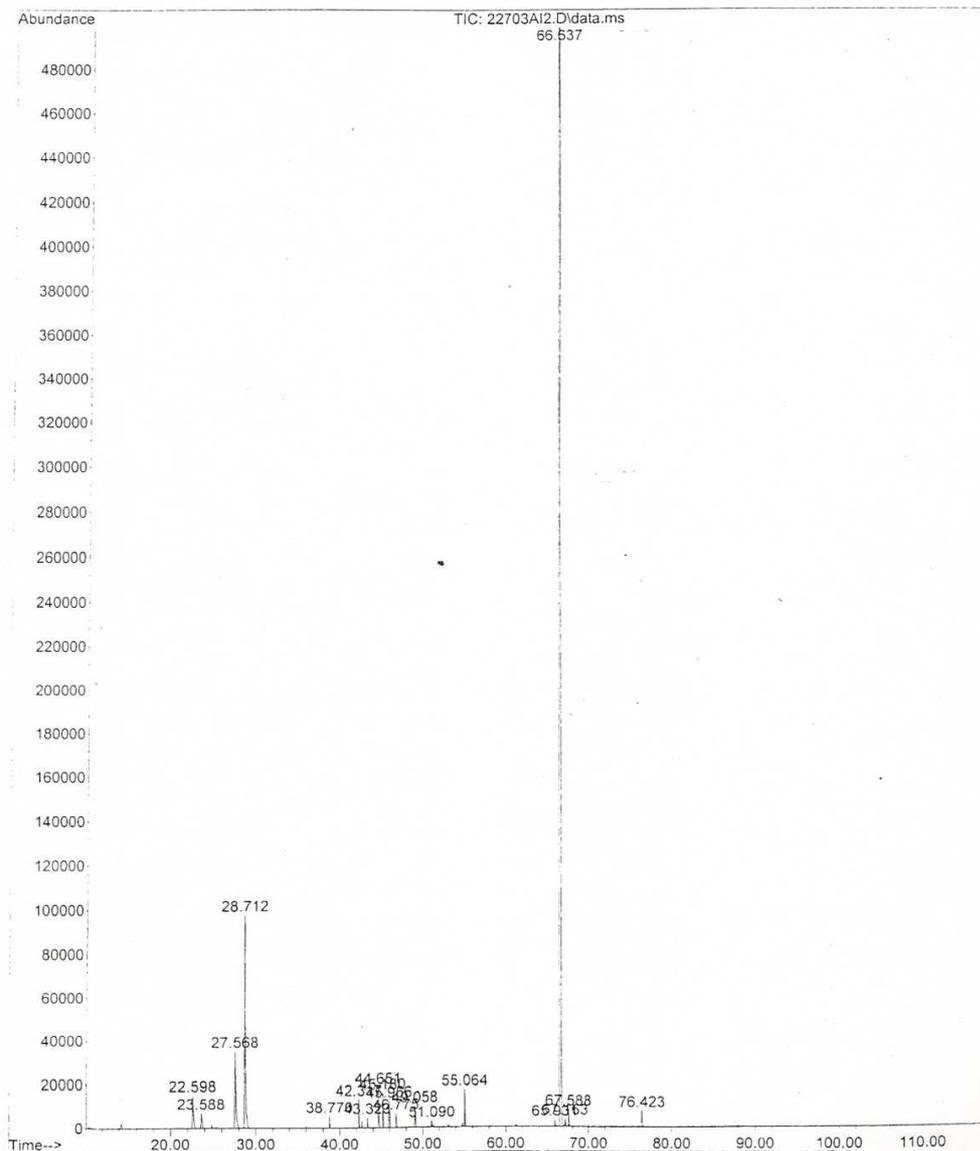
PROHIBIDA LA REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL DE LOS DATOS RESGISTRADOS EN ESTE INFORME DE RESULTADOS

Tabla 3. Cantidad relativa (%) de los componentes presentes en la muestra "Muestra No. 3; aceite esencial de Orégano; extracción: arrastre con vapor; aceite esencial puro", enviada por el **Profesor Oscar Arango Bedoya de la Universidad de Nariño.**

ALTO MAYO JOVEN

N° pico	t _R min	Identificación	Cantidad relativa, %
1	22,6	Mirceno	1,3
2	23,59	α-terpineno	0,6
3	27,57	γ-terpineno	3,2
4	28,71	p-Cimeno	7,3
5	38,77	cis-Hidrato de sabineno	0,2
6	42,32	Linalool	0,5
7	43,32	Liratul	0,2
8	44,65	Timol metil éter	0,9
9	45,18	Terpinen-4-ol	0,7
10	45,96	trans-Cariofileno	0,9
11	46,77	Umbellulona	0,3
12	49,06	α-Humuleno	0,7
13	51,09	β-Bisaboleno	0,1
14	55,07	Acetato de timol	0,8
15	65,93	Isómero del timol	0,1
16	66,64	Timol	81,2 *
17	67,16	Isómero del timol	0,2
18	67,59	Carvacrol	0,3 †
19	76,42	2,5-Dimetoxiacetofenona	0,4

File :C:\msdchem\1\DATA\151008\22703AI2.D
Operator : Elena Stashenko (UIS)
Acquired : 16 Oct 2008 6:10 using AcqMethod AEDEANMS.M
Instrument : 6890N - 5975
Sample Name: 982227-03-AI, U. NARINO
Misc Info : 982227-03-AI, AEs OREGANO
Vial Number: 24



Area Percent Report

Data Path : C:\msdchem\1\DATA\151008\
 Data File : 22703AI2.D
 Acq On : 16 Oct 2008 6:10
 Operator : Elena Stashenko (UIS)
 Sample : 982227-03-AI, U. NARINO
 Misc : 982227-03-AI, AEs OREGANO
 ALS Vial : 24 Sample Multiplier: 1

Integration Parameters: events.e
 Integrator: ChemStation

Method : C:\msdchem\1\METHODS\AEDeanMS.M
 Title : System Performance Check - CH4/NCI - OFN

Signal : TIC: 22703AI2.D\data.ms

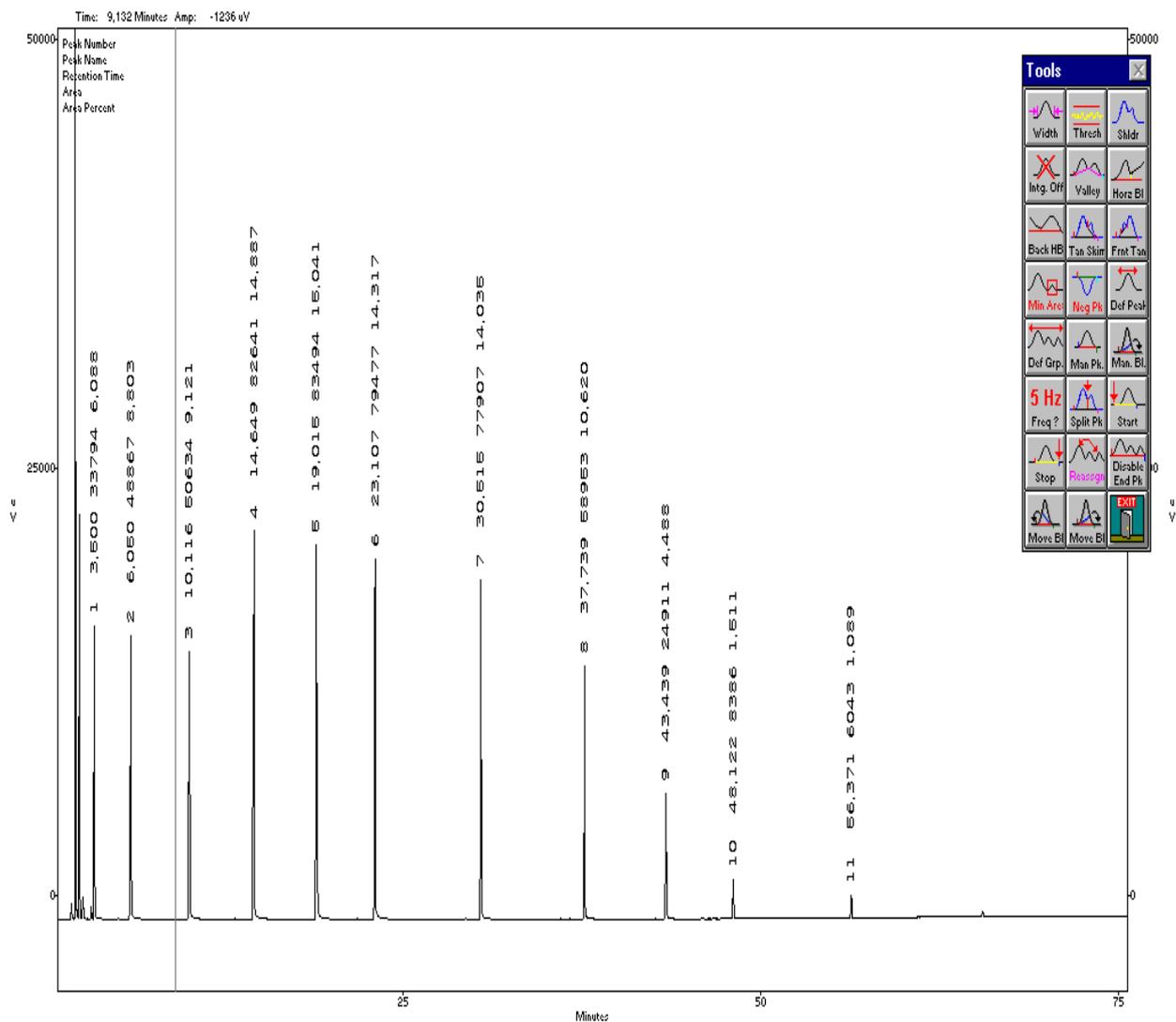
peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	22.598	4528	4574	4739	BB 4	14986	1278518	1.57%	1.278%
2	23.588	4894	4936	5027	BV 4	6884	579731	0.71%	0.580%
3	27.568	6334	6391	6560	BB 2	34791	3162178	3.89%	3.162%
4	28.711	6750	6809	7030	BB 2	96728	7265380	8.94%	7.264%
5	38.770	9631	9652	9677	BB 5	4924	192876	0.24%	0.193%
6	42.318	10586	10612	10640	BB 4	12902	506435	0.62%	0.506%
7	43.323	10857	10884	10910	BB 5	4676	217916	0.27%	0.218%
8	44.650	11211	11243	11287	BB	18029	933536	1.15%	0.933%
9	45.182	11359	11387	11420	BB 3	15666	726152	0.89%	0.726%
10	45.958	11561	11597	11645	BB 8	12077	944223	1.16%	0.944%
11	46.774	11789	11818	11842	BB 3	6578	290713	0.36%	0.291%
12	49.058	12394	12436	12482	BV 7	9704	726834	0.89%	0.727%
13	51.090	12876	12895	12921	BV 6	2857	145092	0.18%	0.145%
14	55.066	13619	13646	13675	BB 2	17074	757688	0.93%	0.758%
15	65.932	15681	15698	15714	BV 2	3133	125494	0.15%	0.125%
16	66.637	15790	15831	15914	BV 3	867863	81245569	100.00%	81.229%
17	67.161	15914	15930	15968	VB 3	3670	176678	0.22%	0.177%
18	67.590	15989	16011	16034	BB 2	8016	336652	0.41%	0.337%
19	76.422	17654	17679	17734	BB 2	7194	408761	0.50%	0.409%

Sum of corrected areas: 100020424

AEDeanMS.M Thu Oct 30 10:14:31 2008

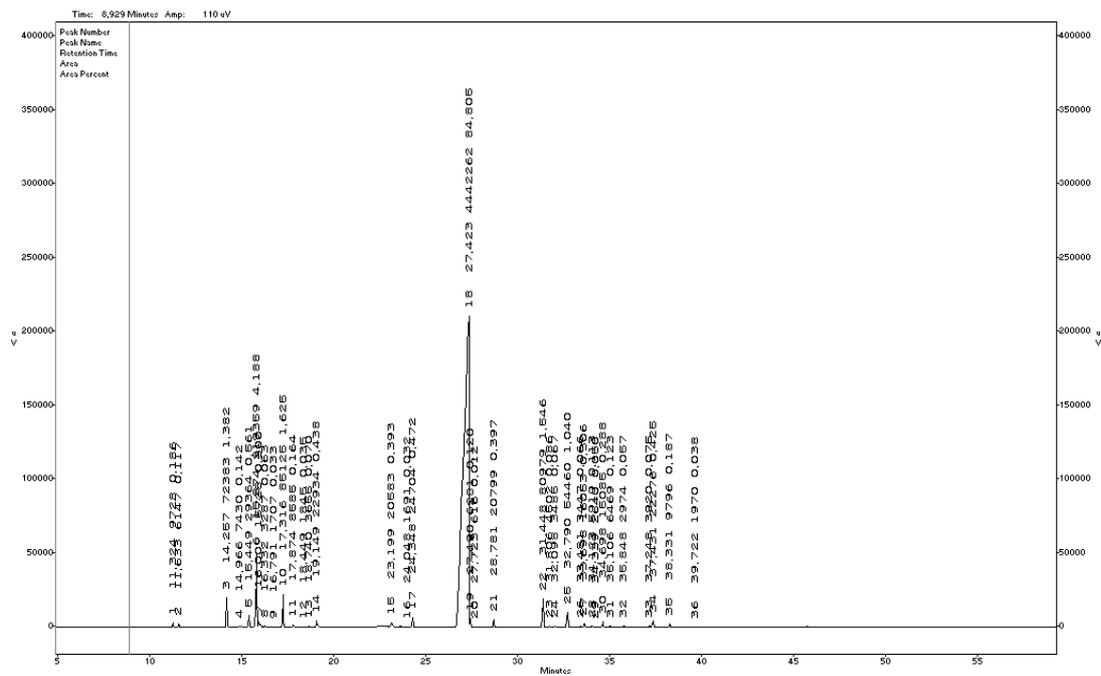
Anexo C. Cromatograma de las parafinas utilizadas en la identificación de los posibles compuestos de todas las muestras analizadas por GC-FID.

n-Parafinas

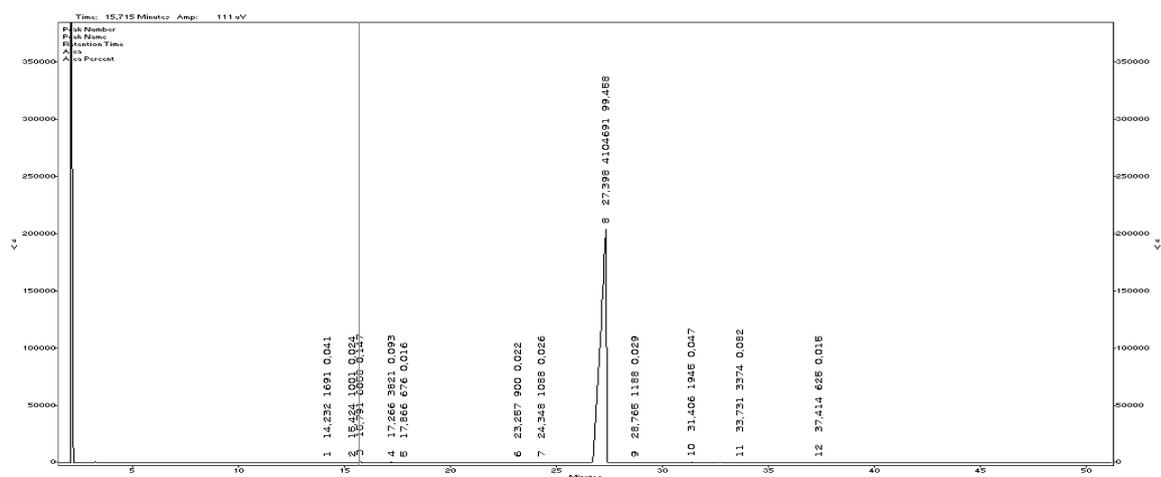


Anexo D. Cromatograma obtenidos por GC-FID de muestras de aceite esencial de orégano silvestre del Alto Patía (*lippia origanoides* Kunt); extracción por arrastre con vapor a nivel de laboratorio.

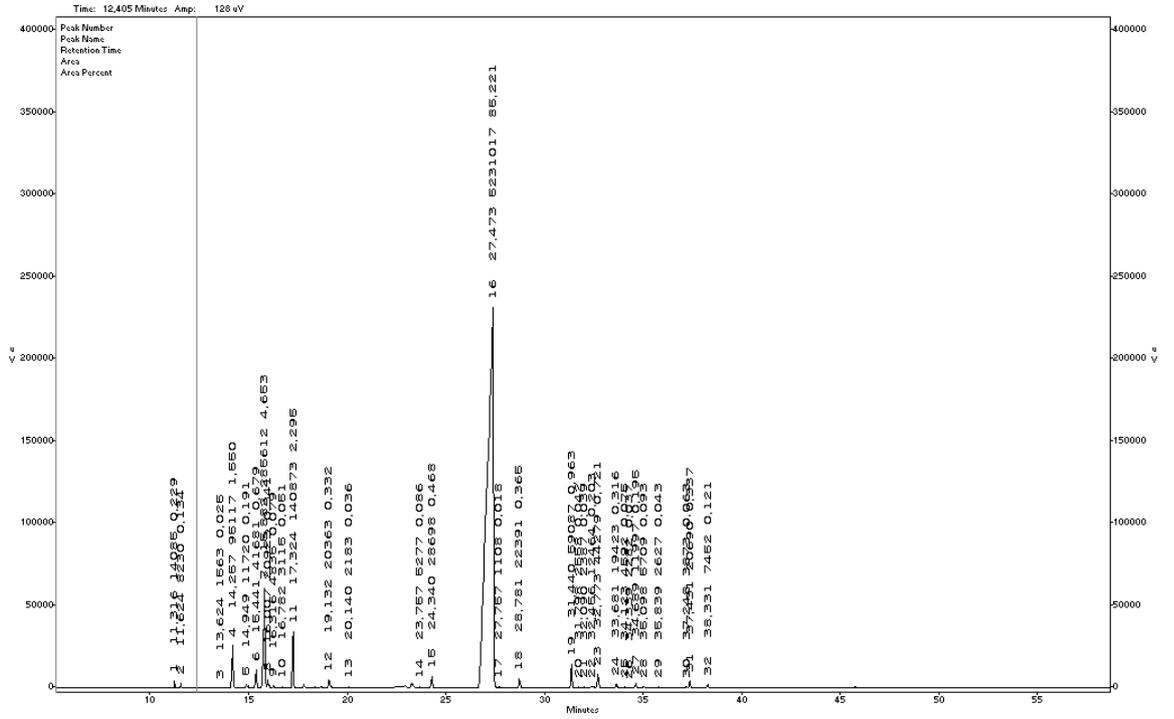
MUESTRA 1 T= 1h D= 60g/l



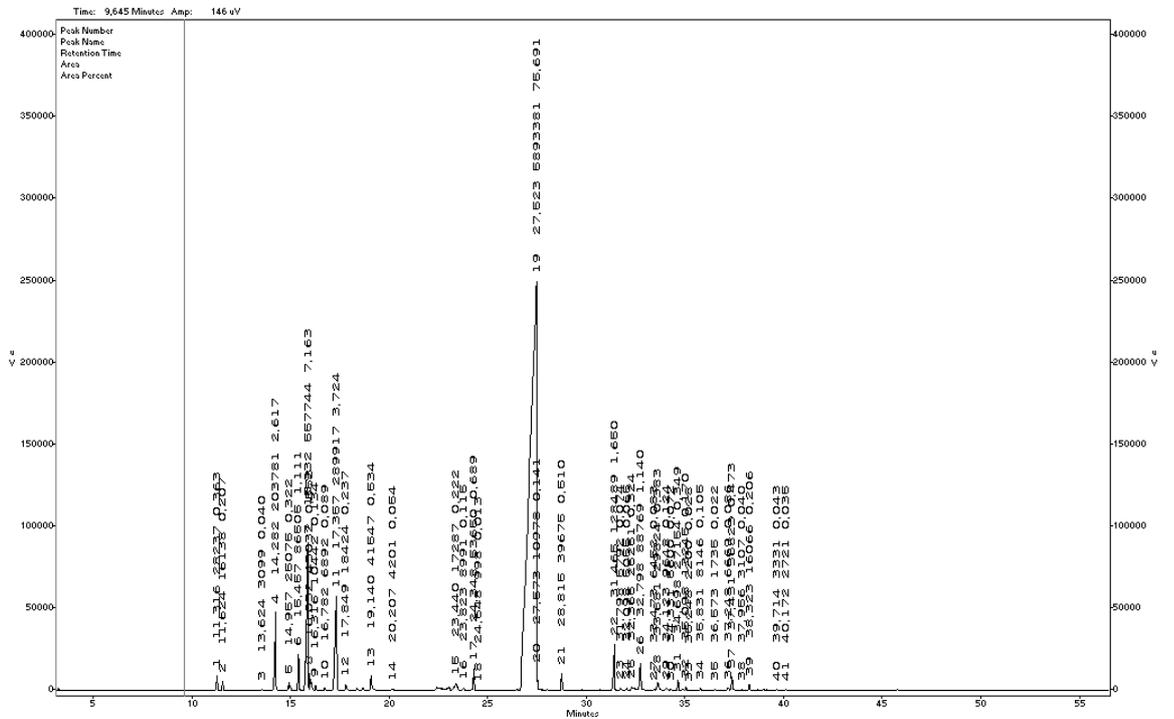
MUESTRA 2 T= 3 h D= 90 g/l



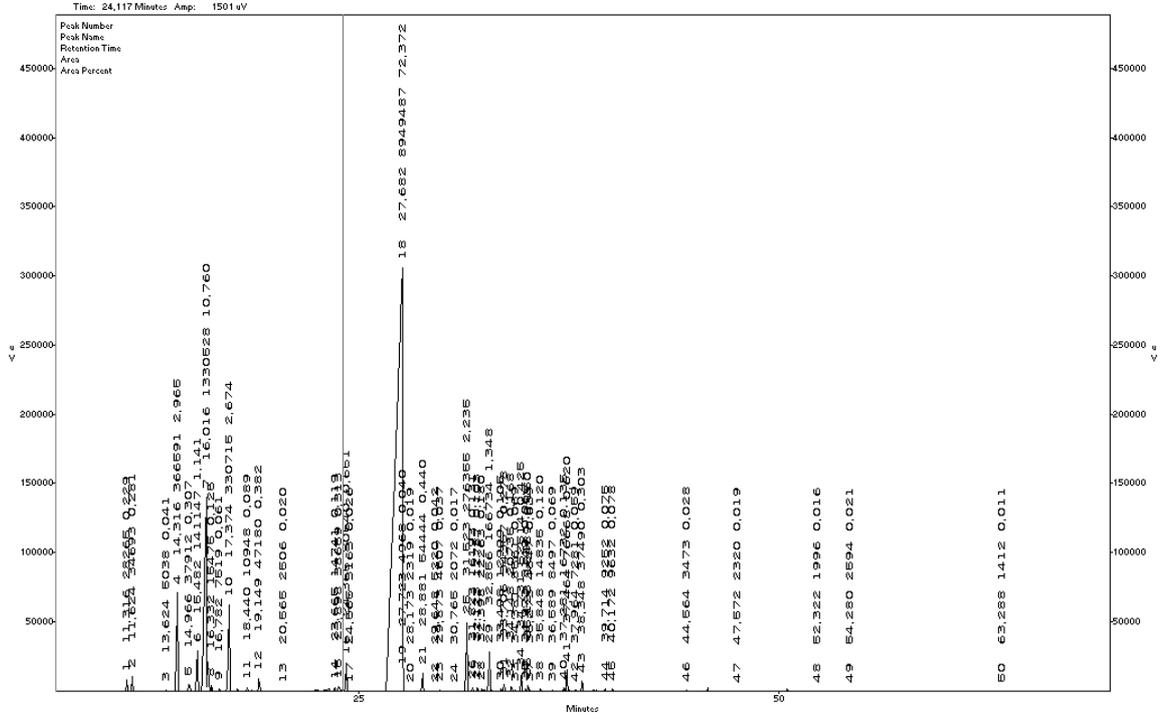
MUESTRA 3 T= 1 h D= 90g/l



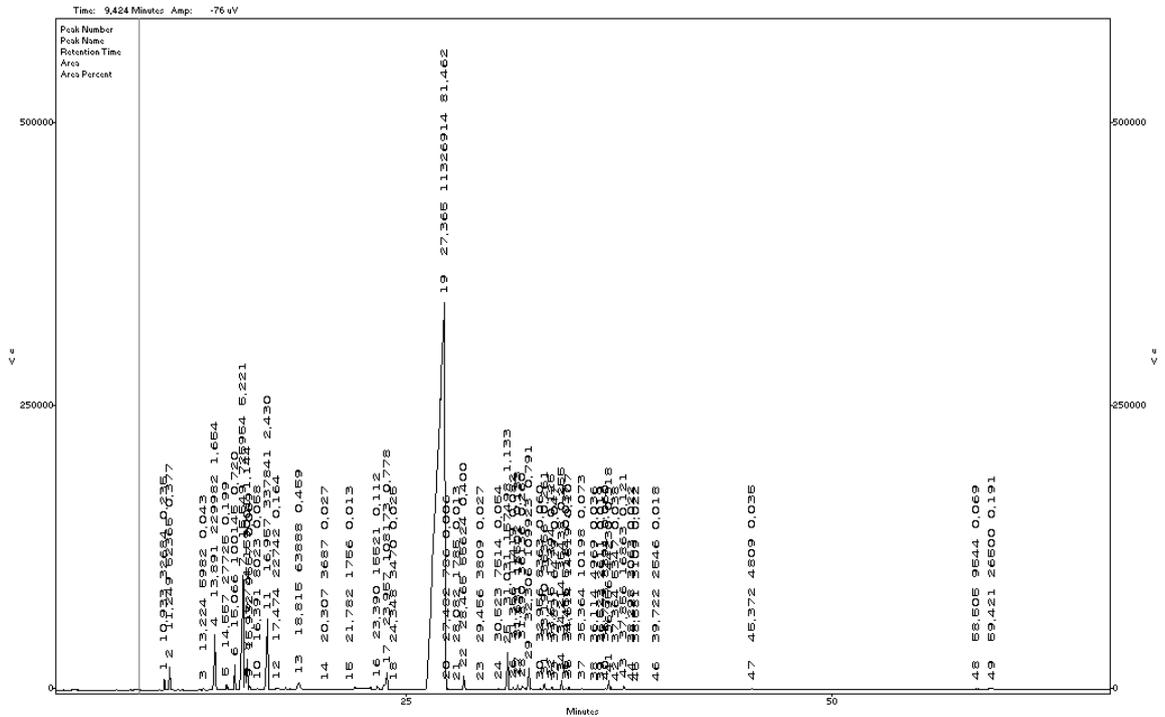
MUESTRA 4 T= 2 h D= 96,2 g/L



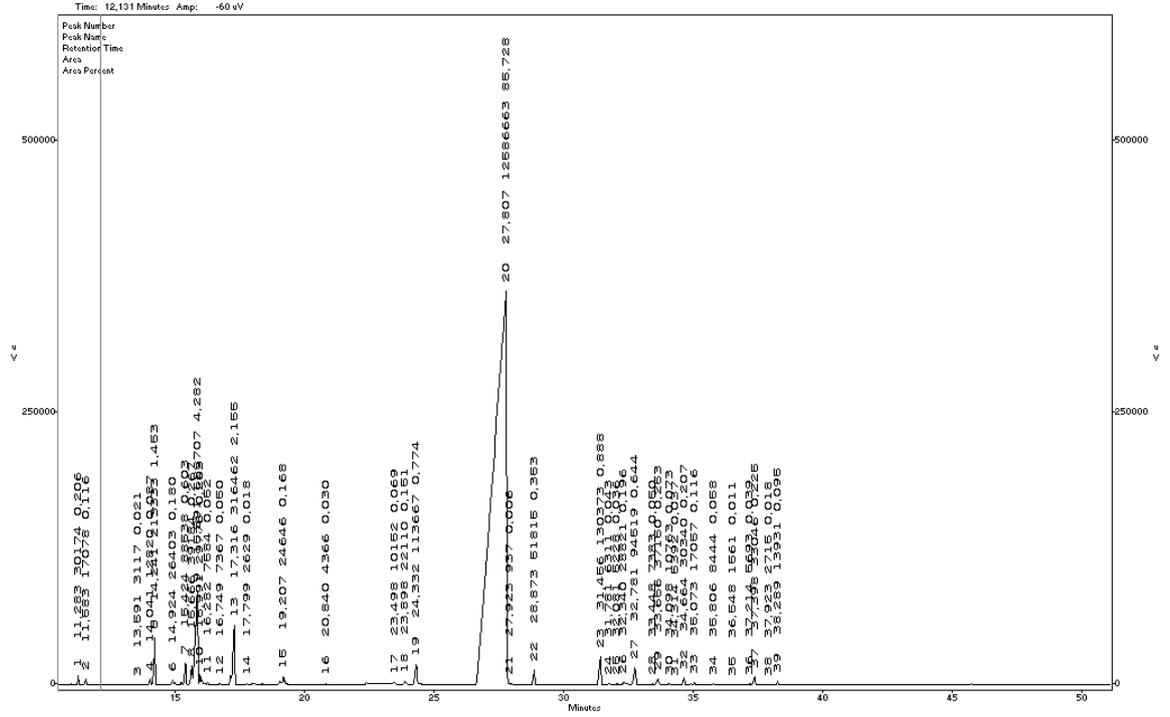
MUESTRA 5 T= 3,4h D= 37,5 g/L



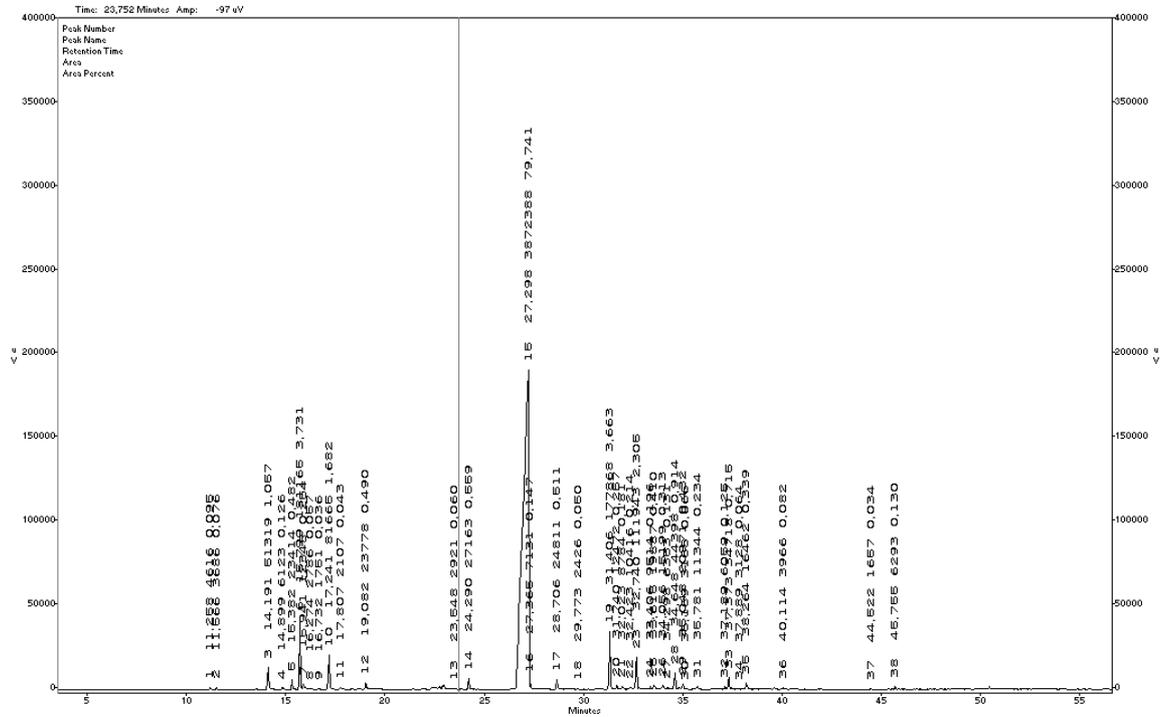
MUESTRA 6 T=2h D=37,5 g/L



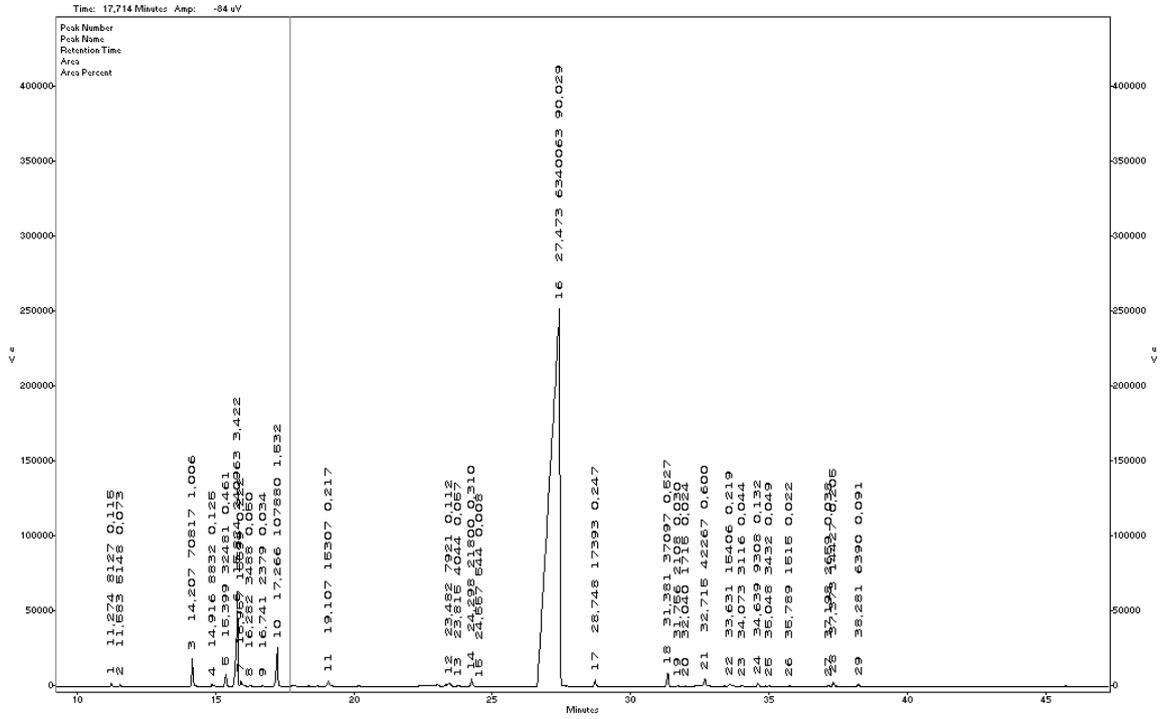
MUESTRA 7 T= 0,6 D= 37,5 g/L



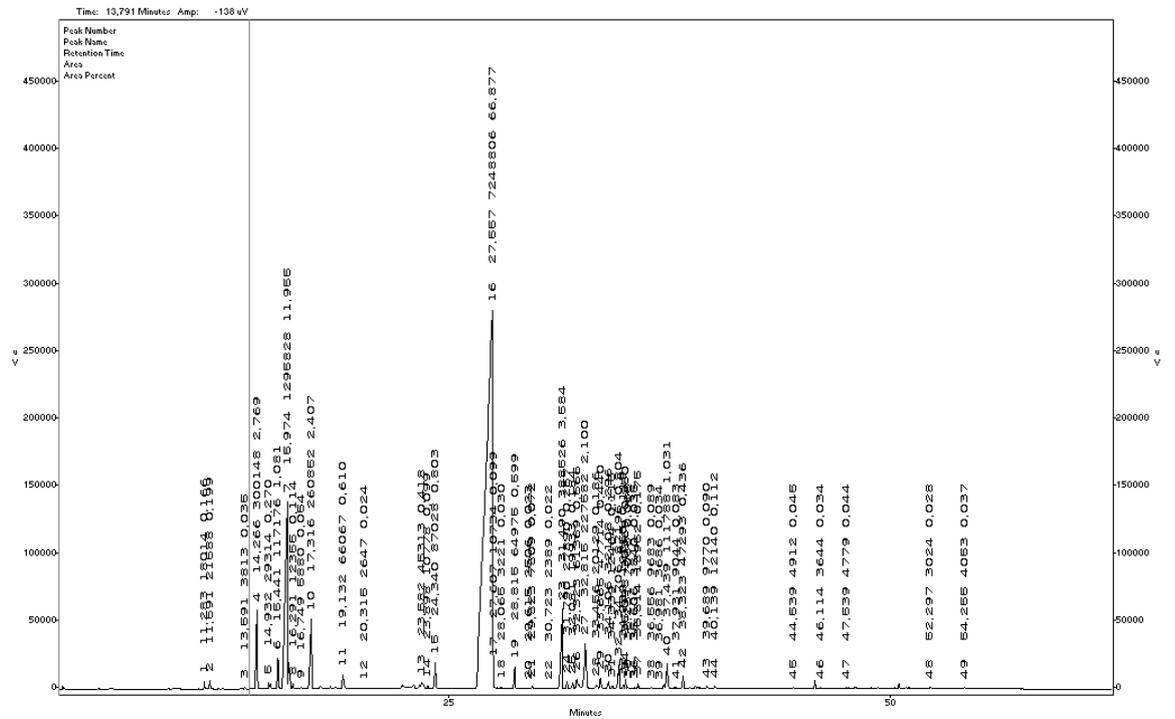
MUESTRA 8 T= 2h D= 53,7 g/L



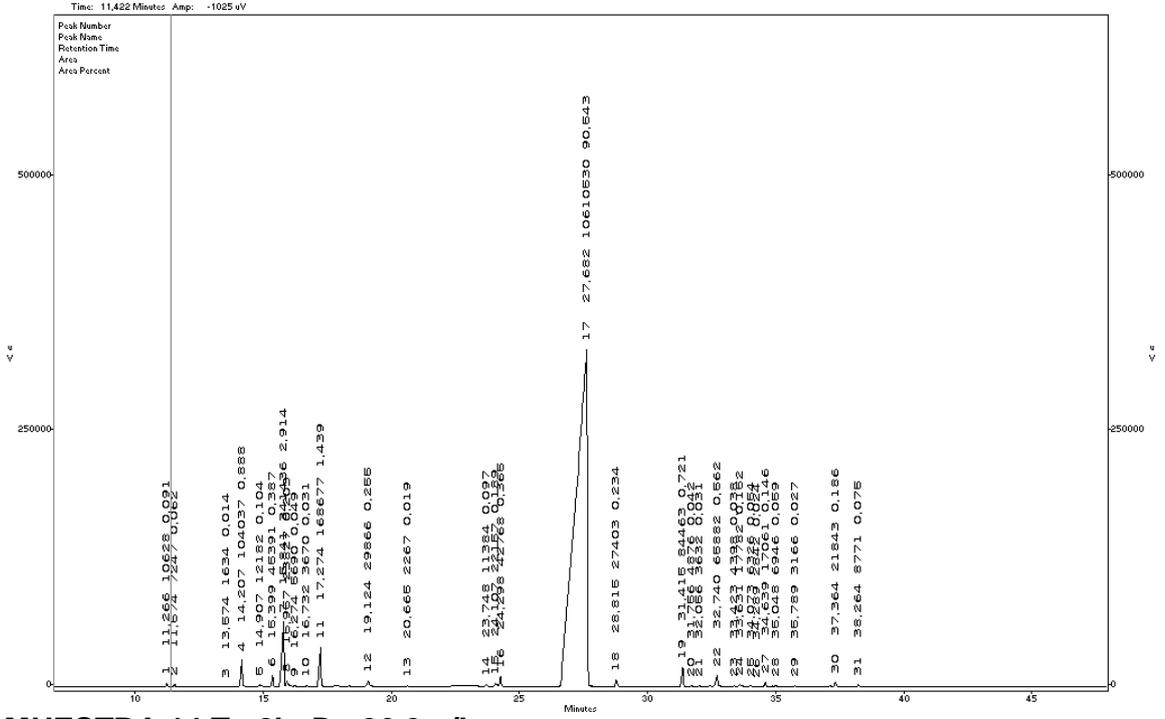
MUESTRA 9 T= 2h D= 75g/L



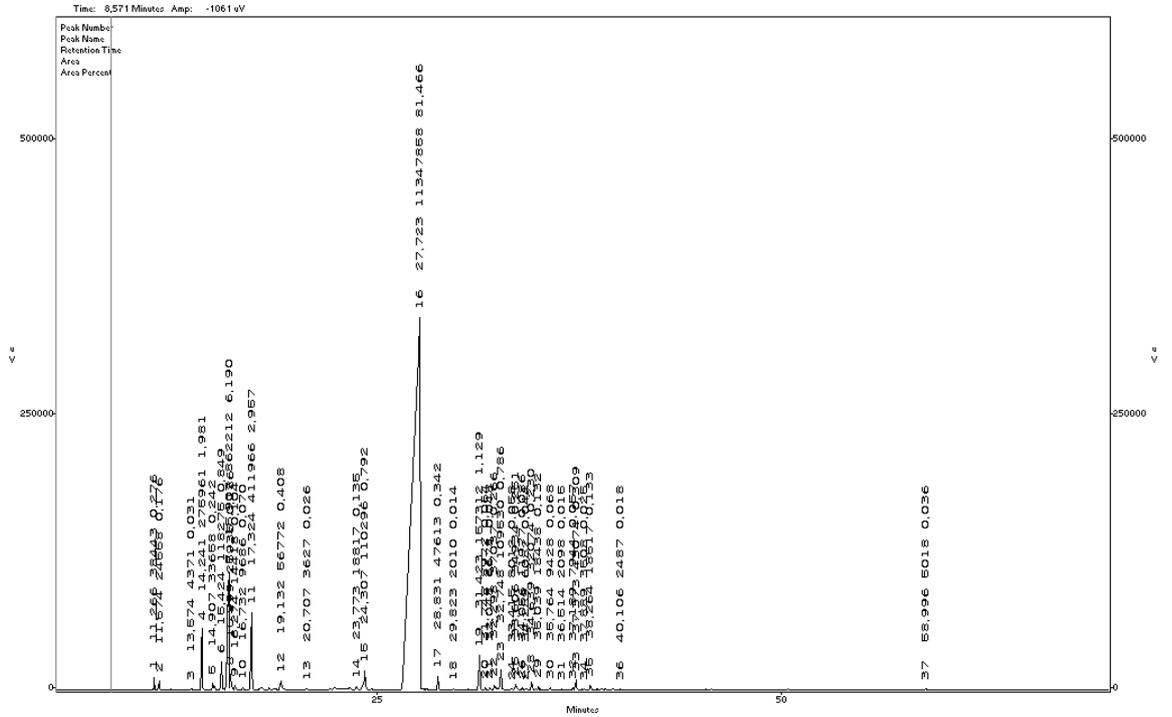
MUESTRA 10 T= 3h D= 60g/L



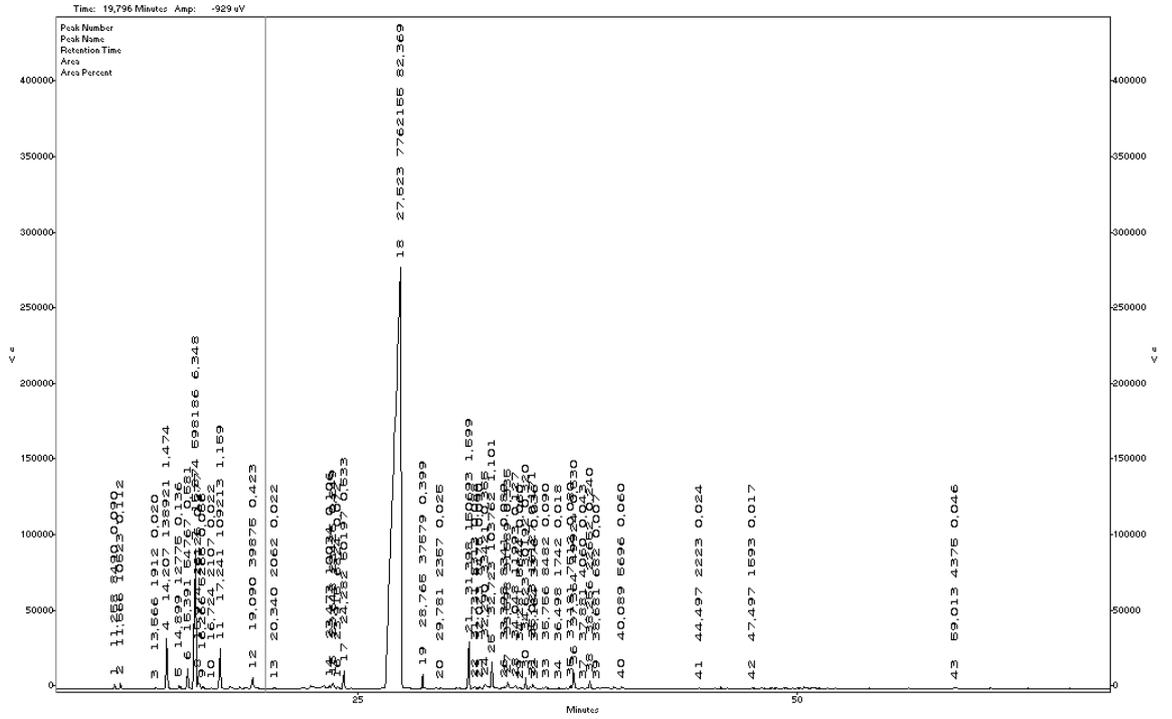
MUESTRA 13 T= 1h D= 90g/L



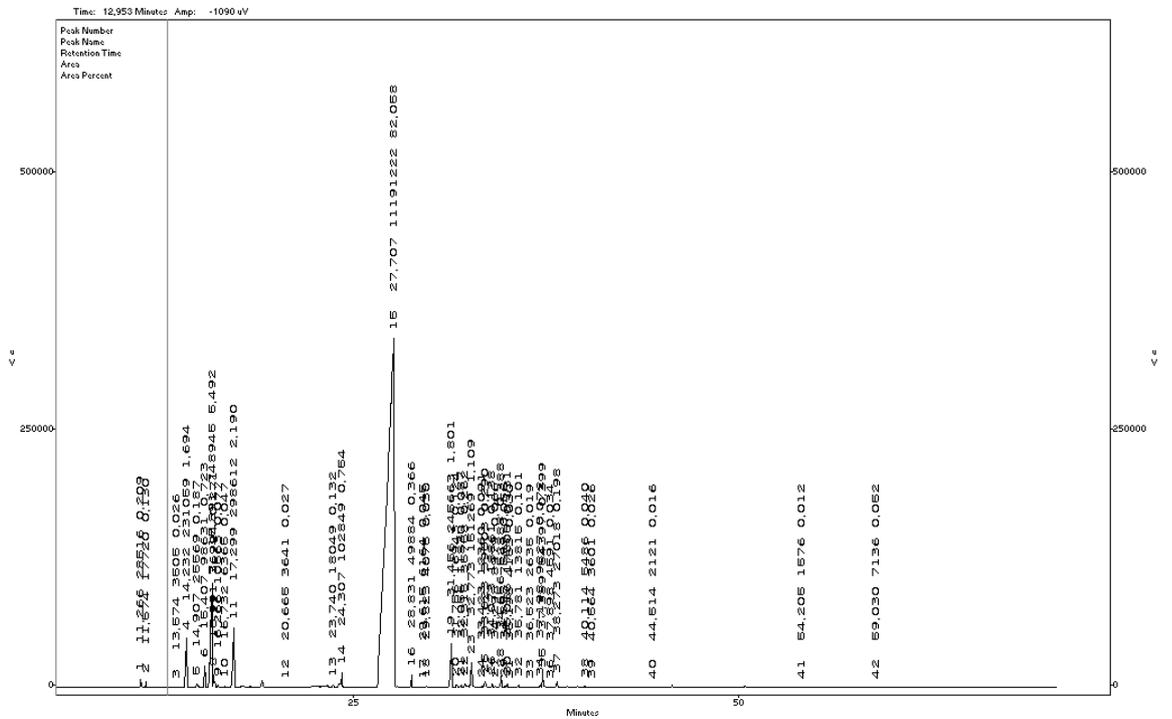
MUESTRA 14 T= 2h D= 96,2 g/L



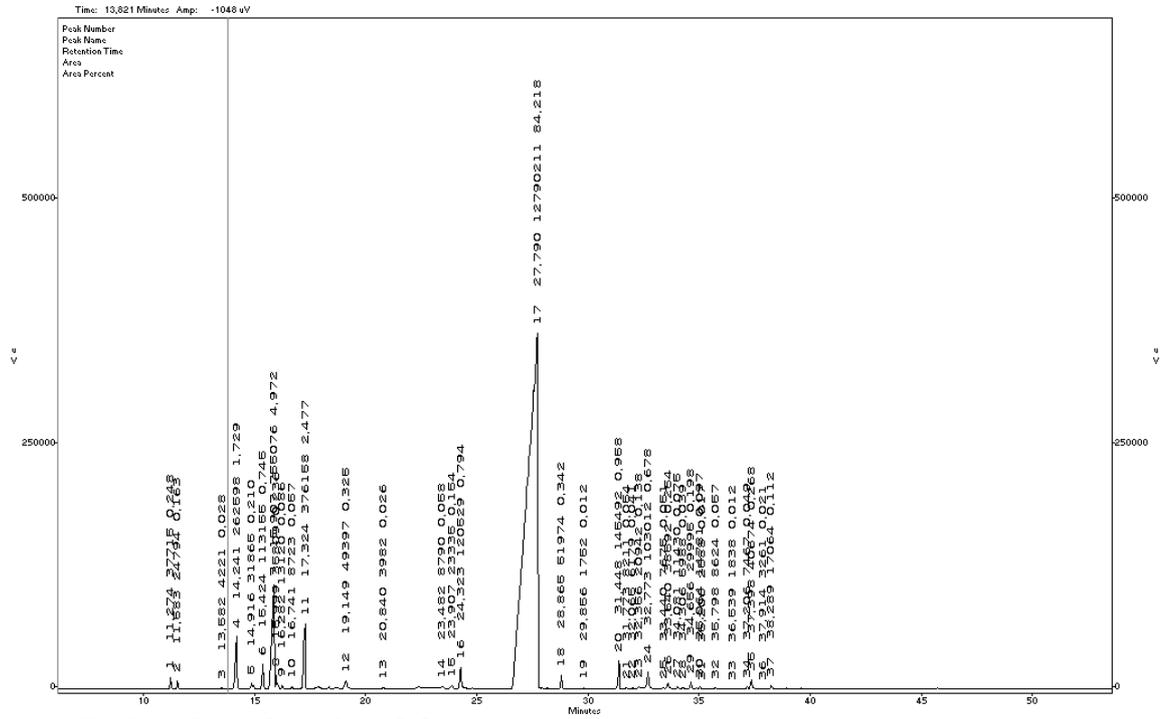
MUESTRA 15 T=3,4 D= 75g/L



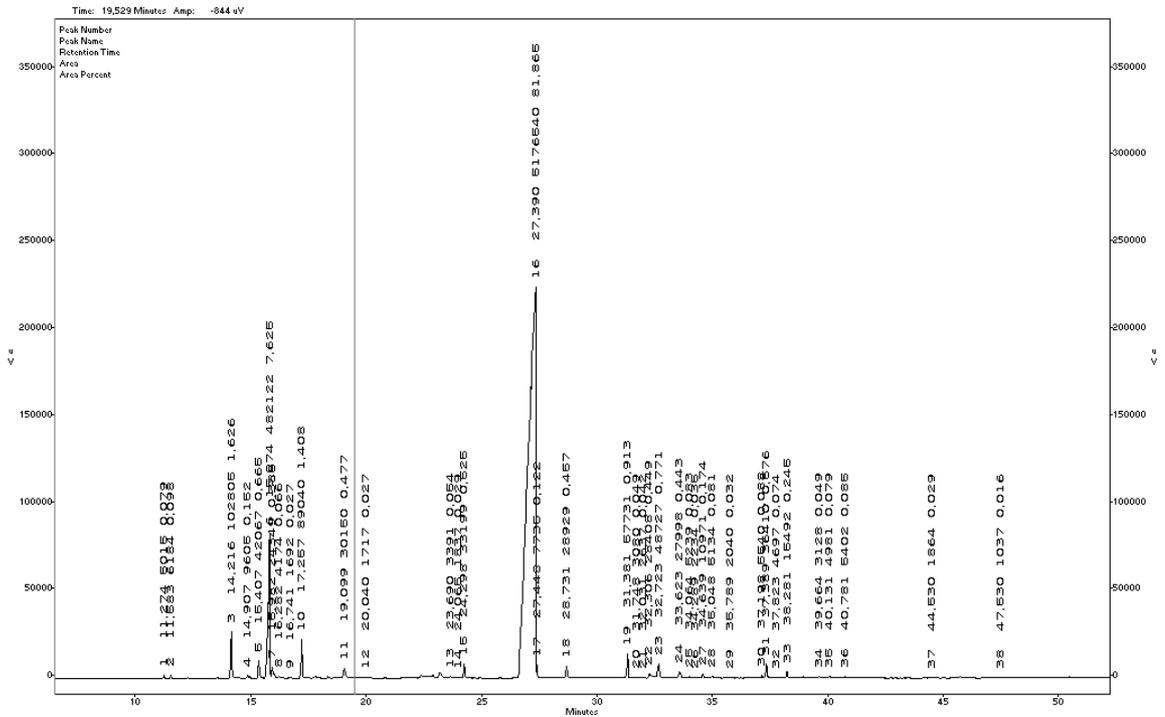
MUESTRA 16 T= 2h D= 75g/L



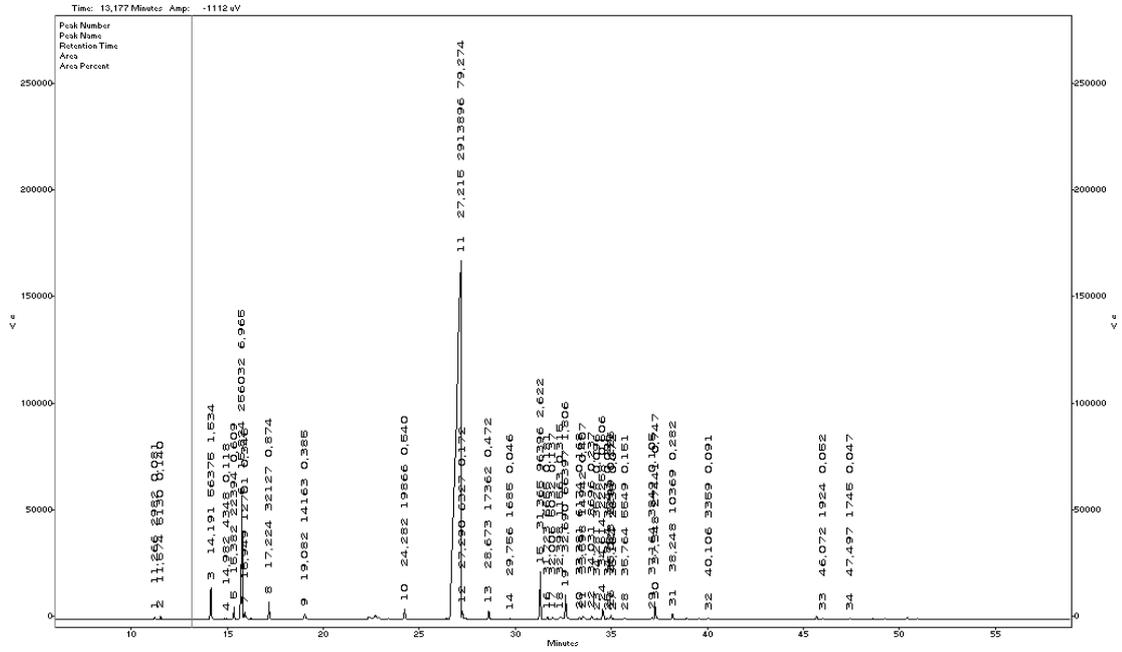
MUESTRA 17 T= 0,6 h D= 75g/L



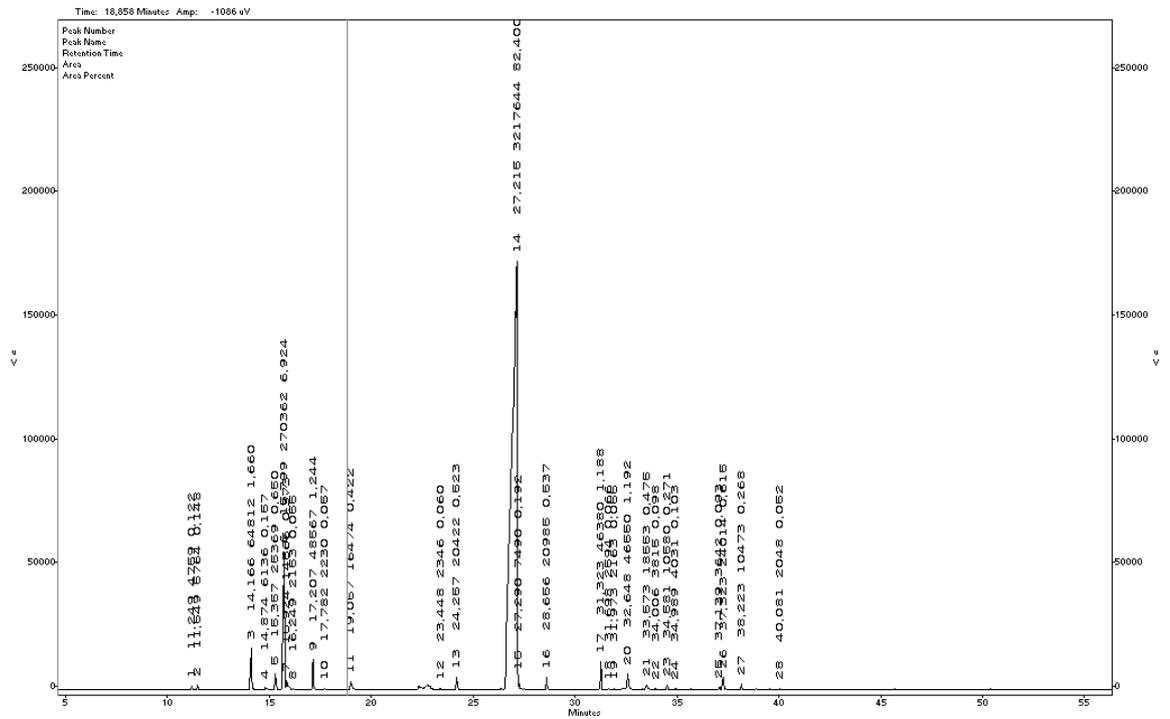
MUESTRA 18 T= 2 h D= 53,8 g/L



MUESTRA 19 T= 2h D= 75g/L

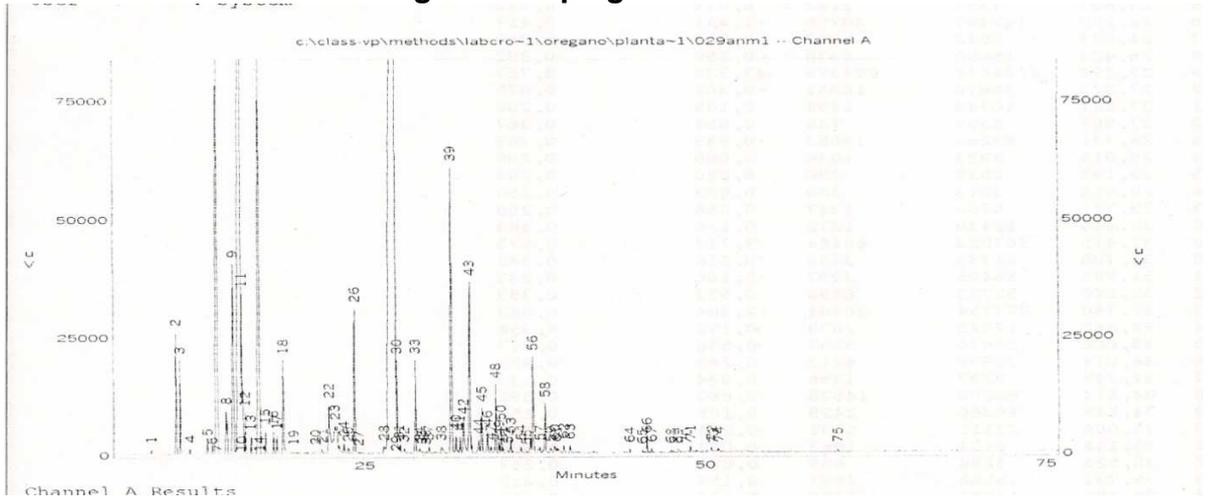


MUESTRA 20 T= 3h D= 60g/L

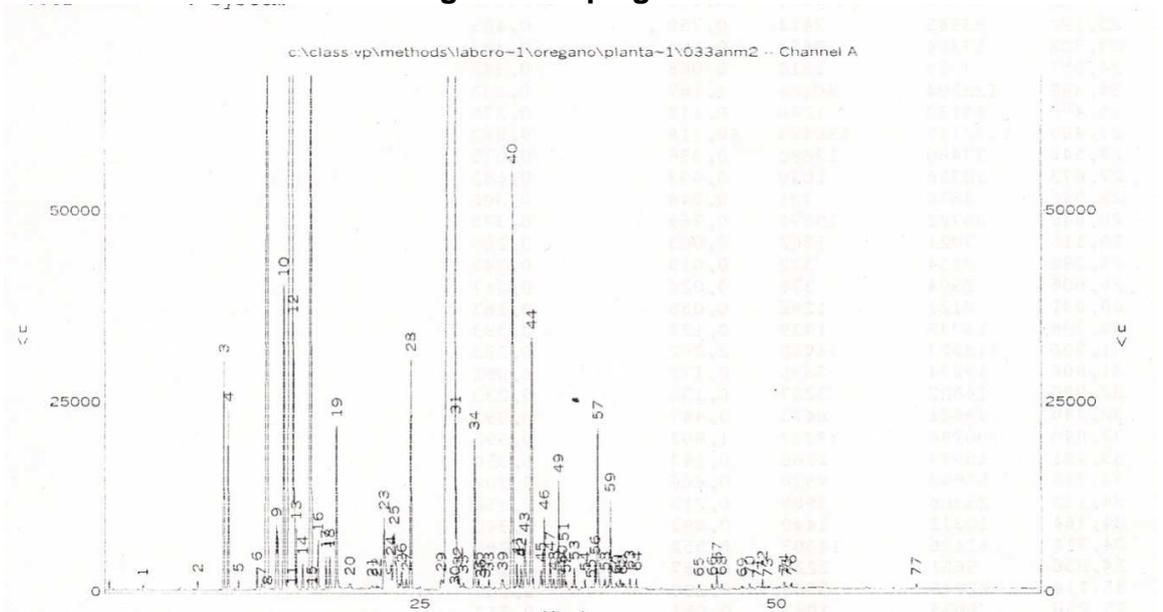


Anexo E. Cromatogramas obtenidos por GC-FID de muestras de aceite esencial de orégano silvestre del Alto Patía (*lippia origanoides* Kunt); extracción por arrastre con vapor a nivel de planta piloto.

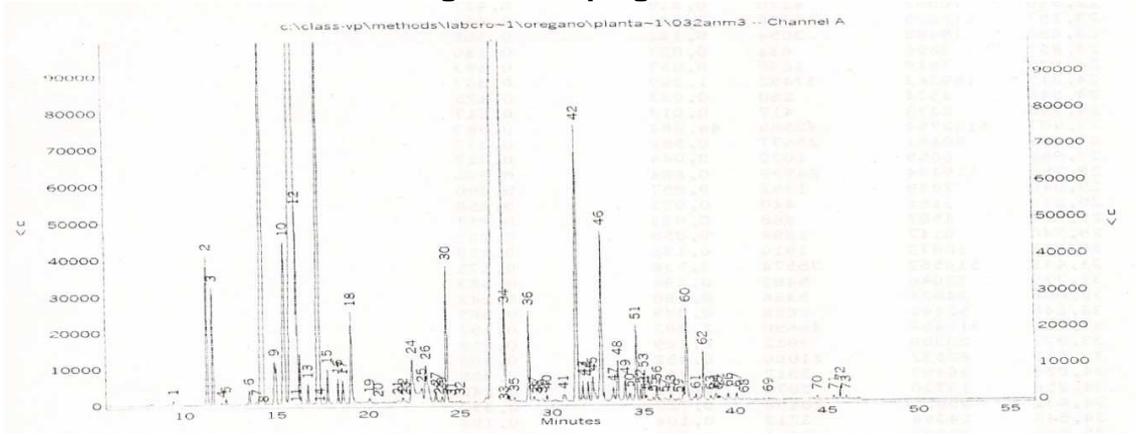
MUESTRA 1 T= 2.0 h D= 80 g/L P=2.0 psig



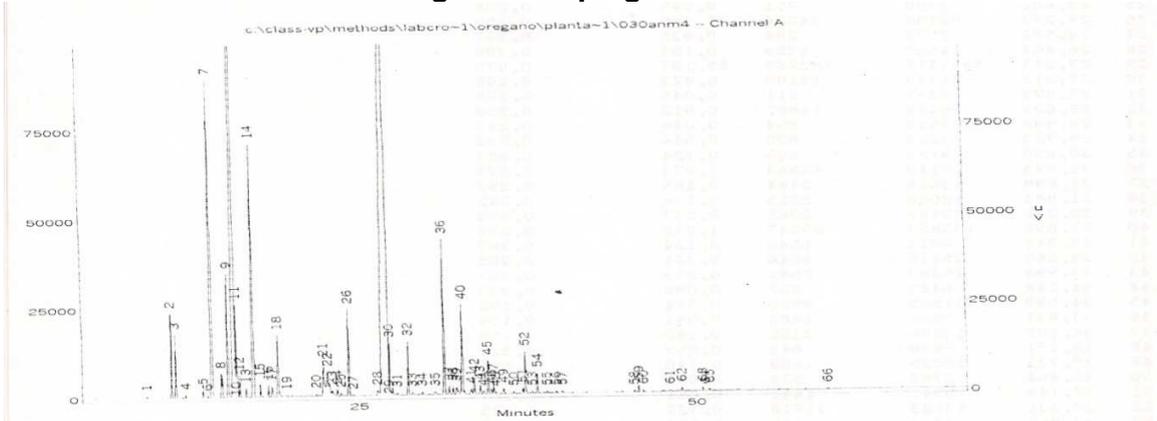
MUESTRA 2 T= 1.0 h D= 60.0 g/L P=1.0 psig



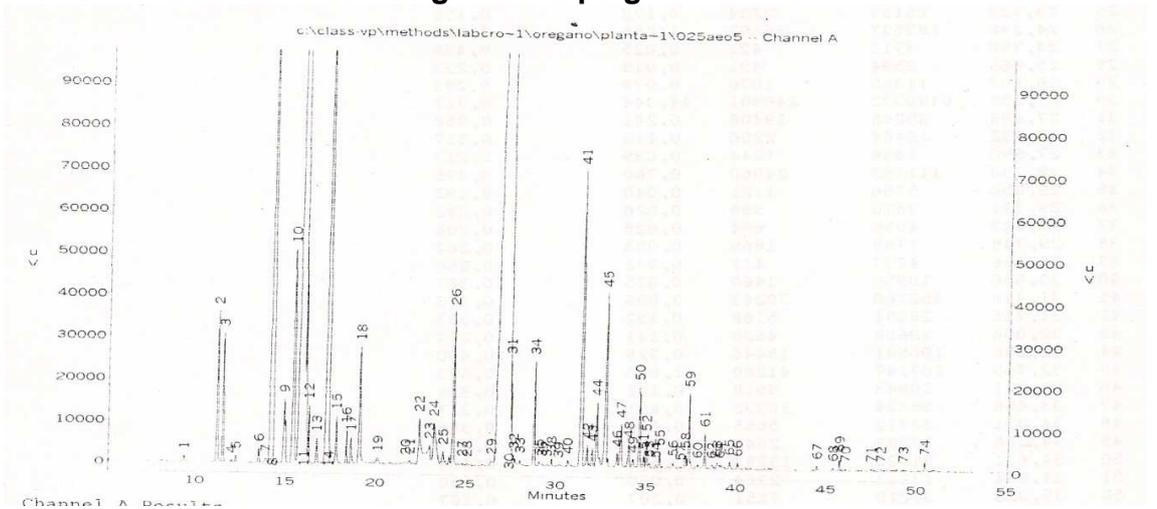
MUESTRA 3 T= 3.0 h D= 60.0 g/L P=1.0 psig



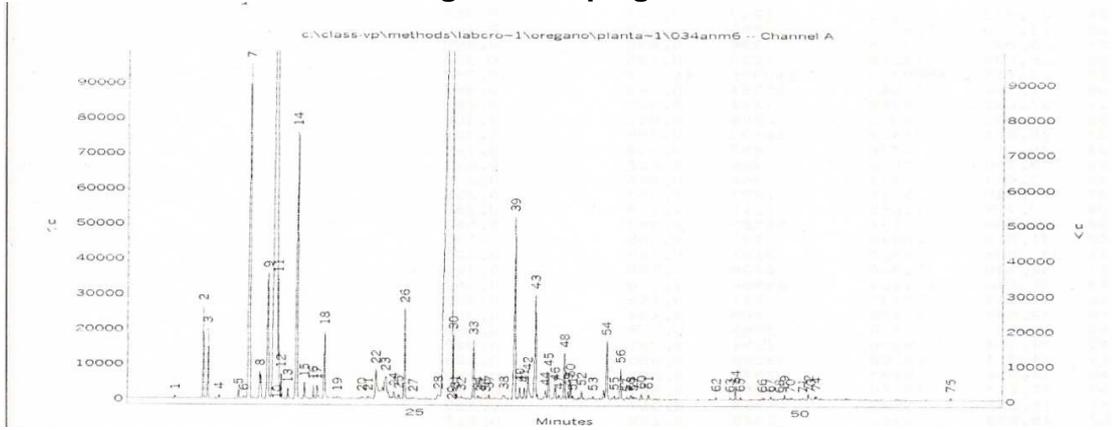
MUESTRA 4 T= 1.0 h D= 100 g/L P=1.0 psig



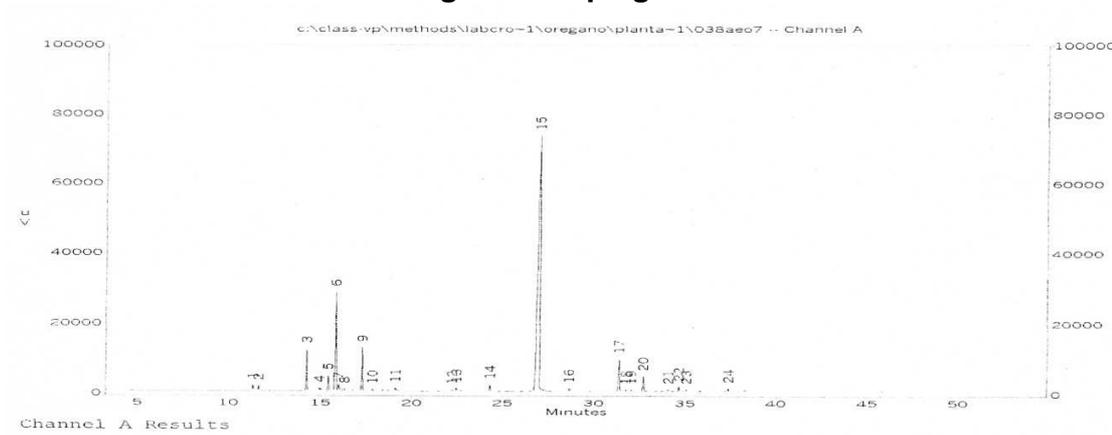
MUESTRA 5 T= 3.0 h D= 100 g/L P=1.0 psig



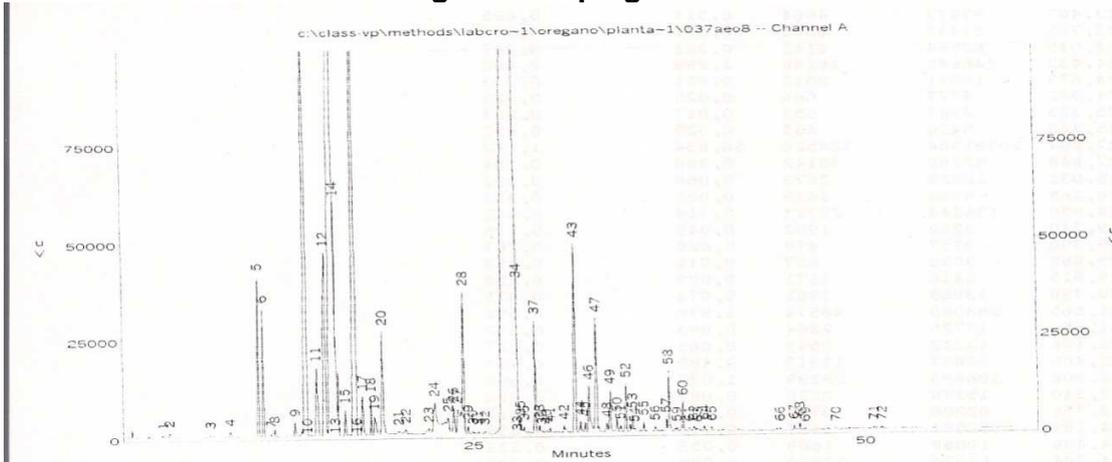
MUESTRA 6 T= 1.0 h D= 60.0 g/L P=3.0 psig



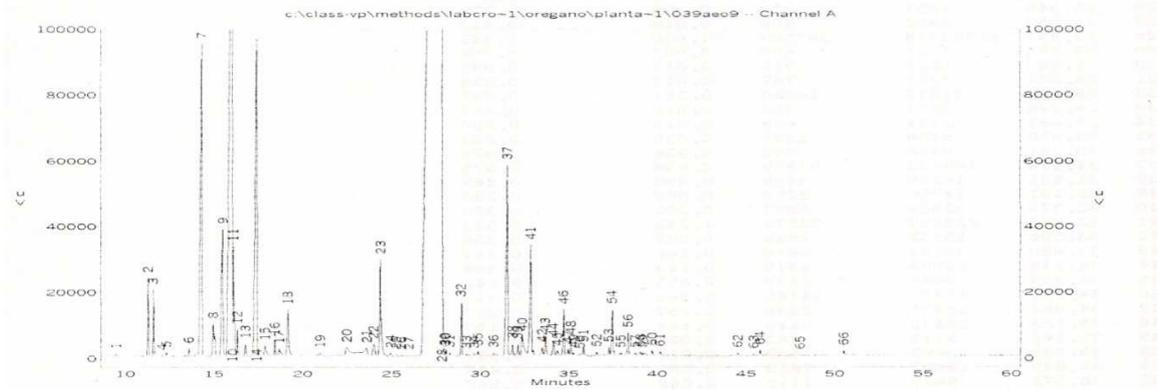
MUESTRA 7 T= 3.0 h D= 60.0 g/L P=3.0 psig



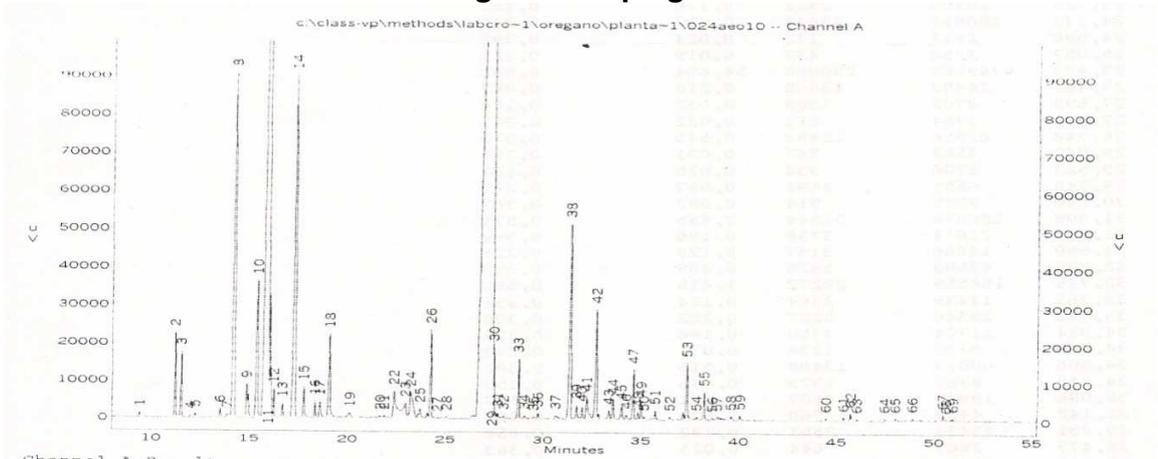
MUESTRA 8 T= 1.0 h D= 100 g/L P=3.0 psig



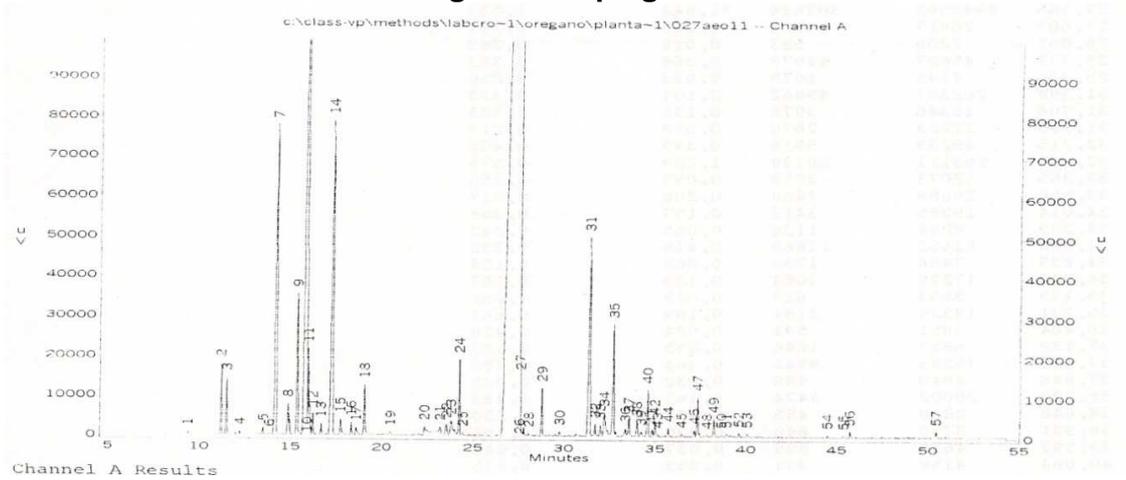
MUESTRA 9 T= 3.0 h D= 100 g/L P=3.0 psig



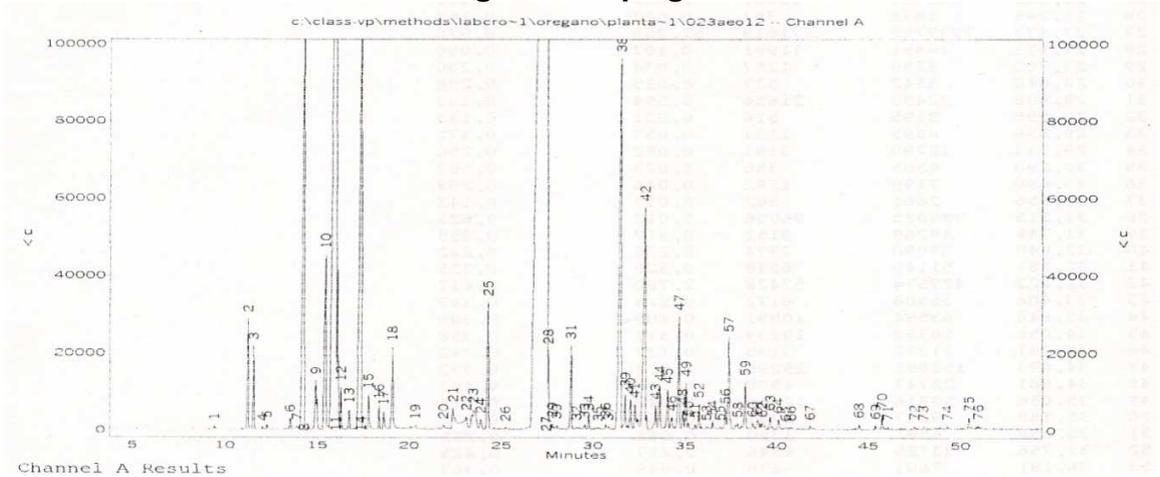
MUESTRA 10 T= 0.32 h D= 80.0 g/L P=2.0 psig



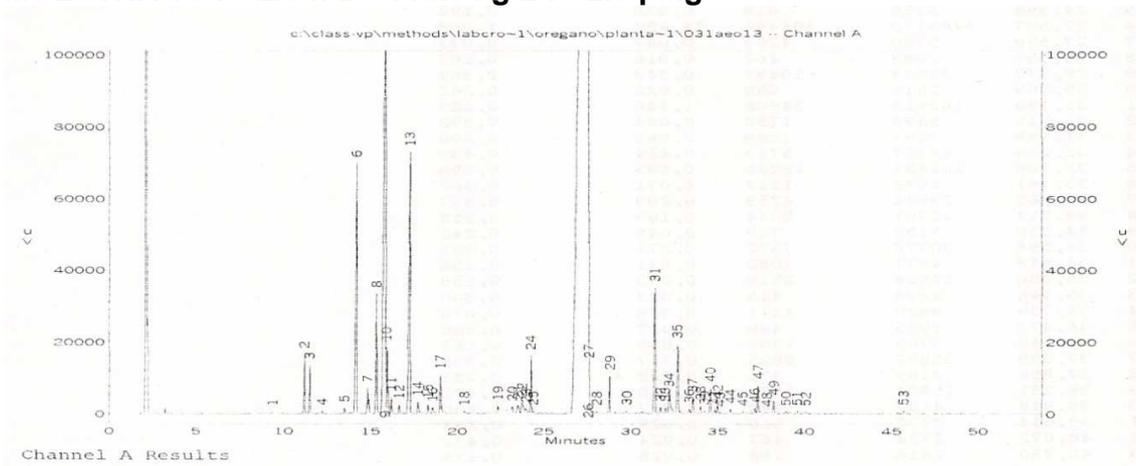
MUESTRA 11 T= 3.68 h D= 80 g/L P=2.0 psig



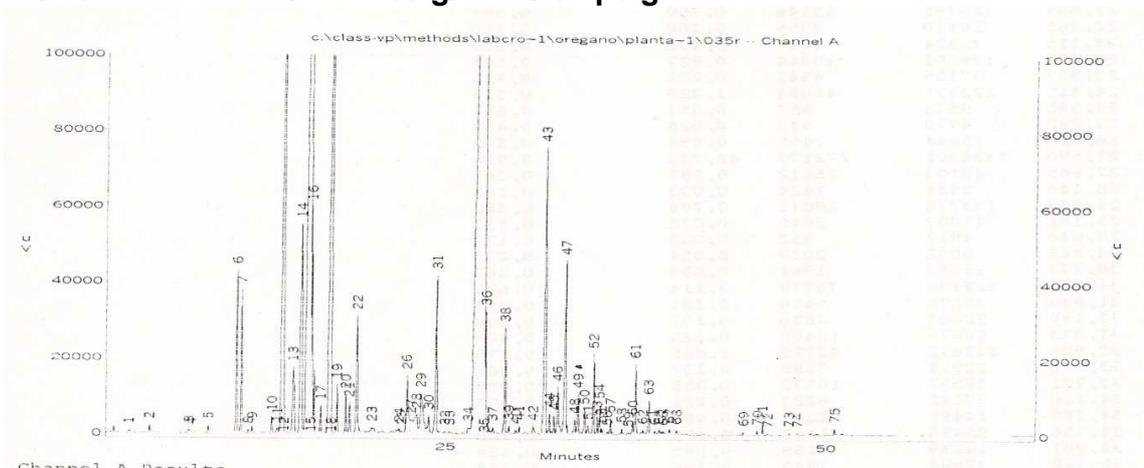
MUESTRA 12 T= 2.0 h D= 46.36 g/L P=2.0 psig



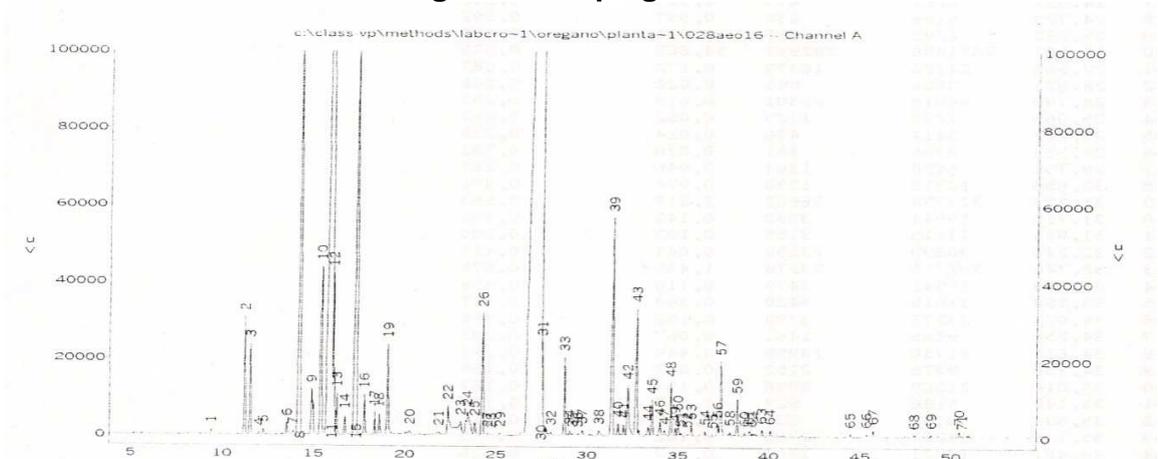
MUESTRA 13 T= 2.0 h D= 113.64 g/L P=2.0 psig



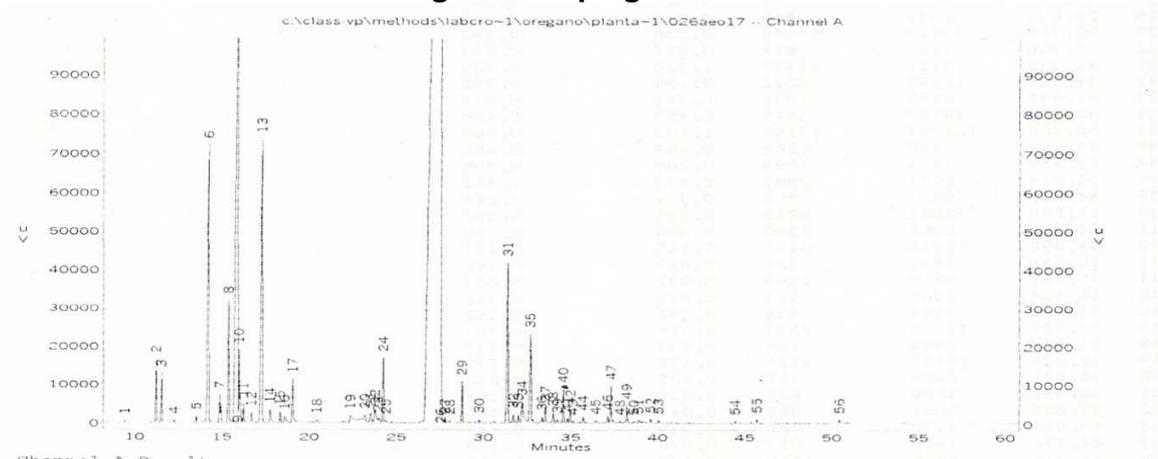
MUESTRA 14 T= 2.0 h D= 80 g/L P=0.32 psig



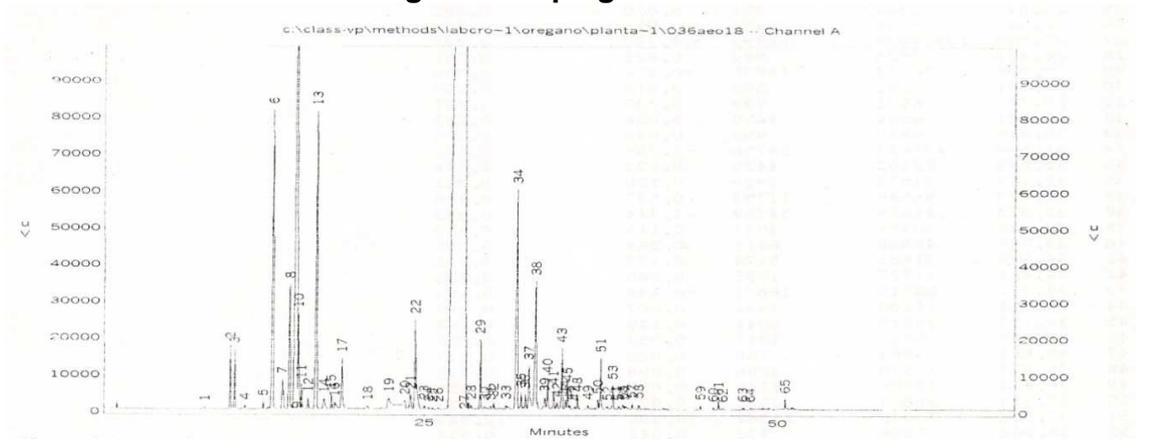
MUESTRA 15 T= 2.0 h D= 80 g/L P=3.68 psig



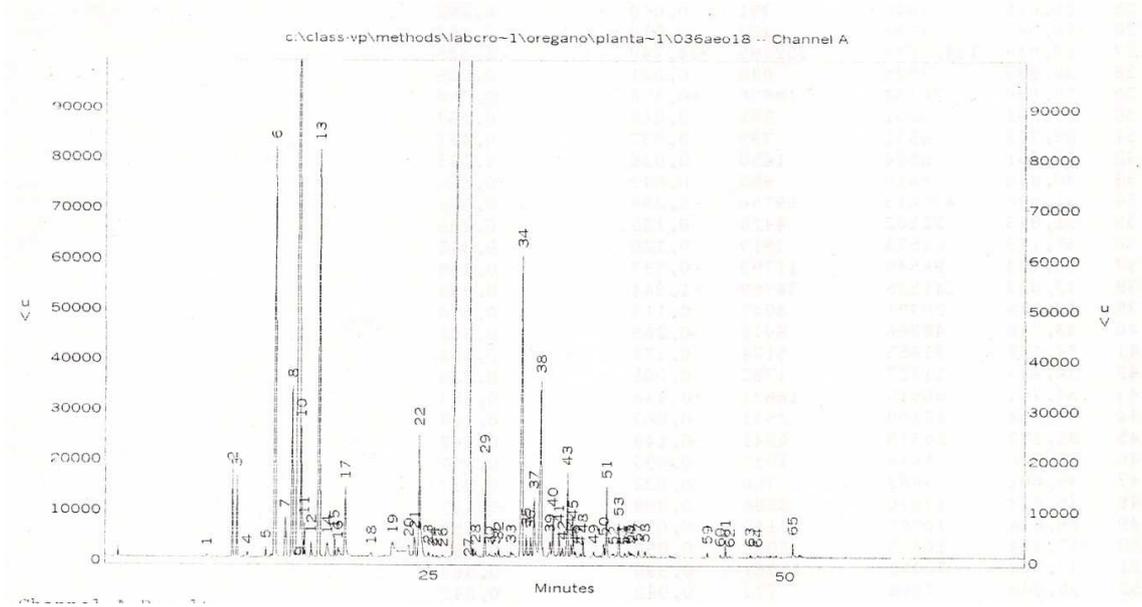
MUESTRA 16 T= 2.0 h D= 80 g/L P=2.0 psig



MUESTRA 17 T= 2 h D= 80 g/L P=2.0 psig

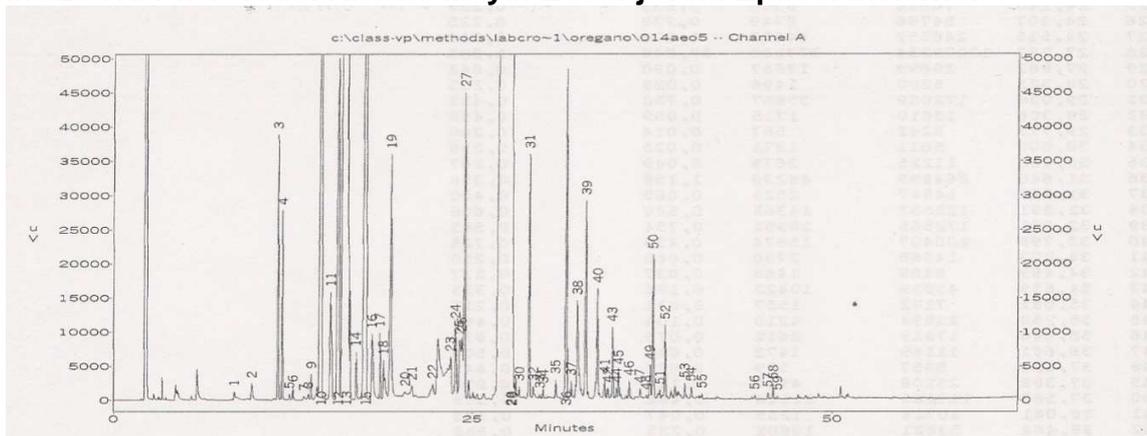


MUESTRA 18 T= 2 h D= 80 g/L P=2.0 psig

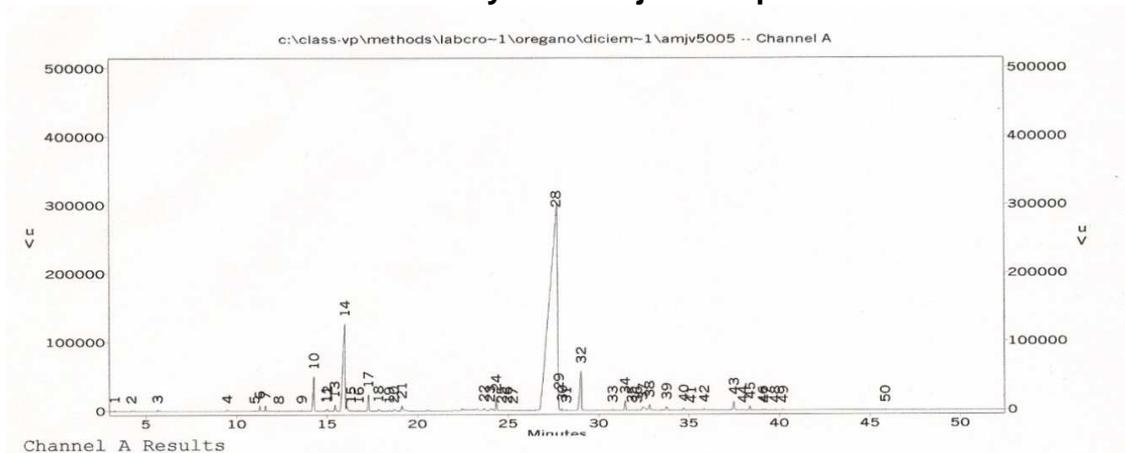


Anexo F. Cromatogramas obtenidos por GC-FID de muestras de aceite esencial de orégano silvestre del Alto Patía (*Lippia origanoides* Kunt); extracción por MWH; estudio del efecto de algunas condiciones agroecológicas sobre la composición y rendimiento del aceite esencial.

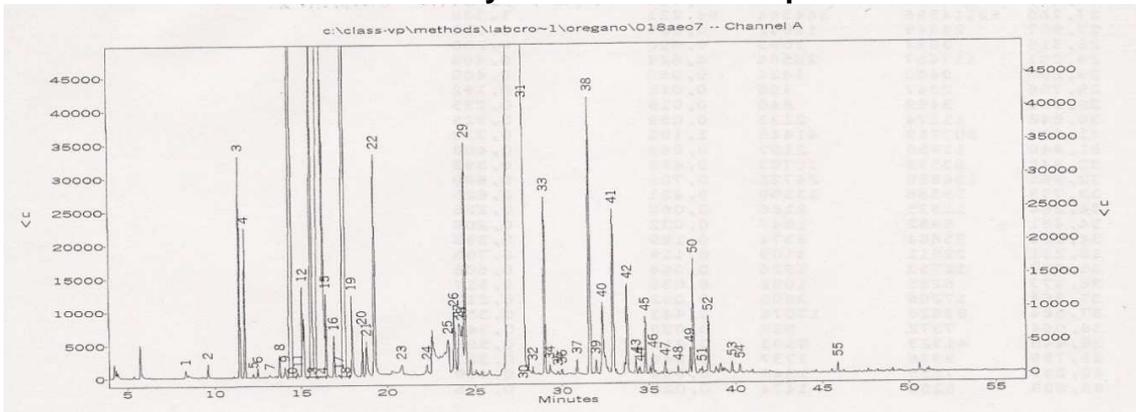
MUESTRA 1. Vereda: Alto de Mayo. Edad: joven. Época: invierno.



MUESTRA 2. Vereda: Alto de Mayo. Edad: joven. Época: verano.

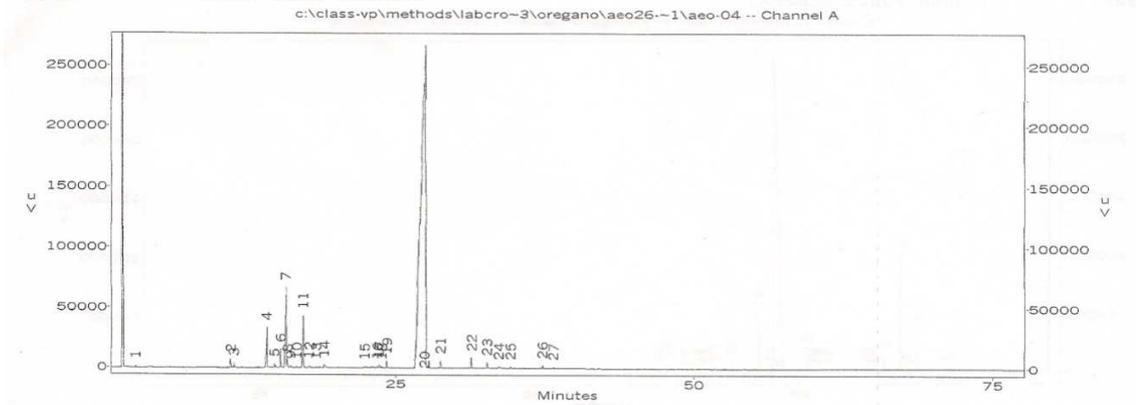


MUESTRA 3. Vereda: Alto de Mayo. Edad: madura. Época: invierno.

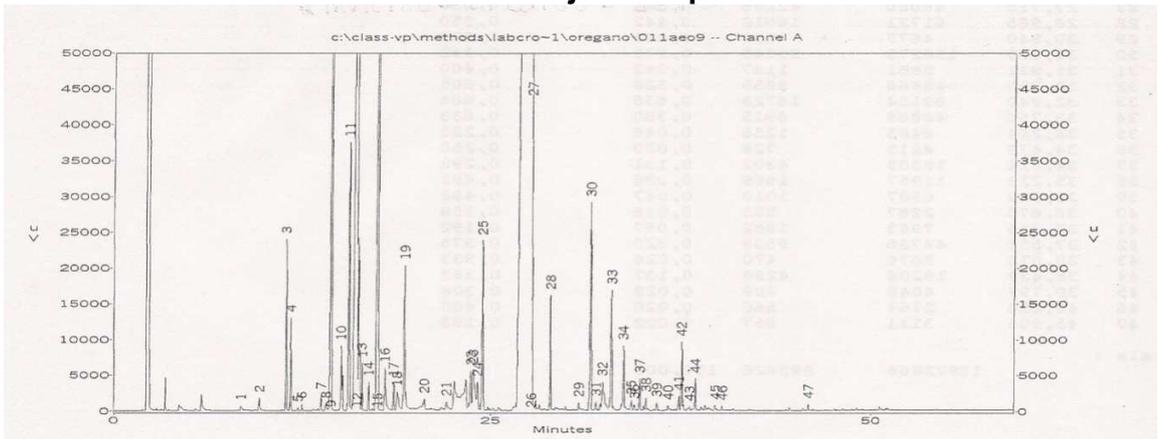


MUESTRA 4. Vereda: Alto de Mayo. Edad: madura. Época: verano.

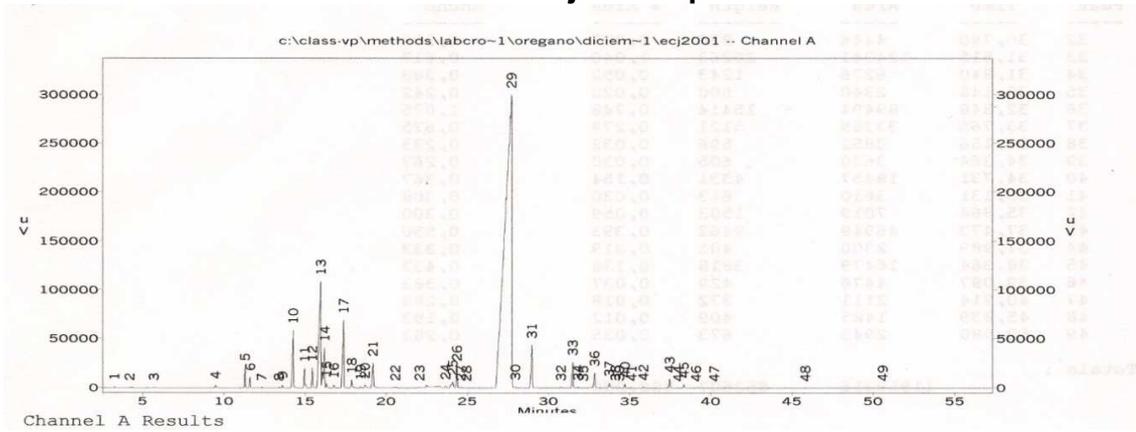
User : Juan Pablo Jimenez



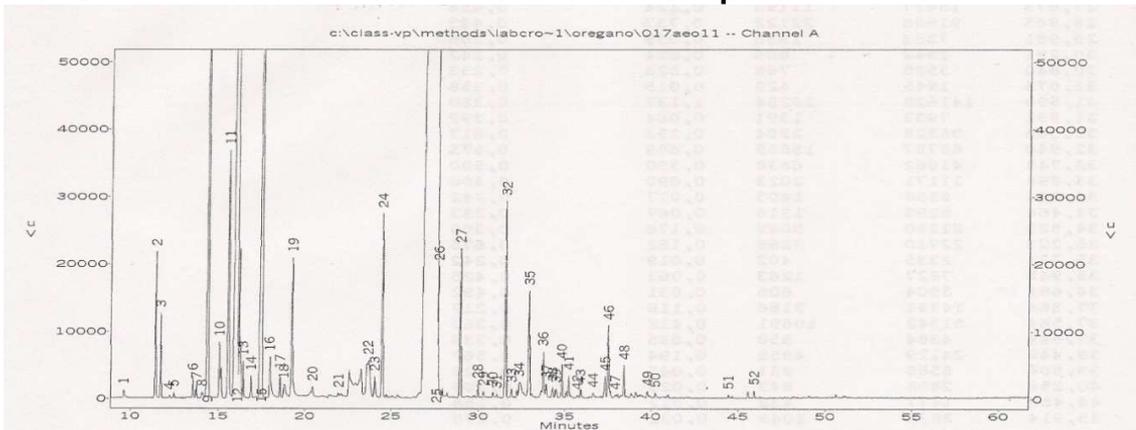
MUESTRA 5. Vereda: El Cardo. Edad: joven. Época: invierno.



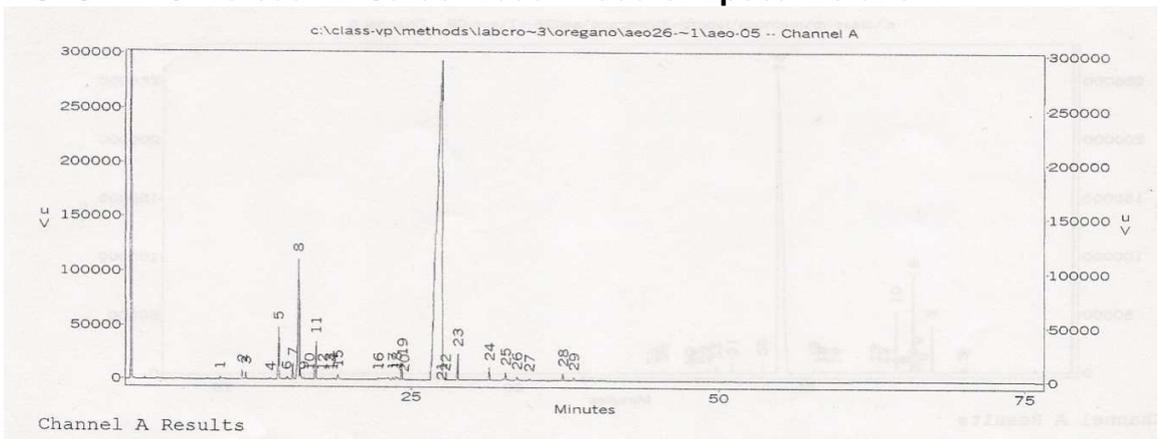
MUESTRA 6. Vereda: El Cardo. Edad: joven. Época: verano.



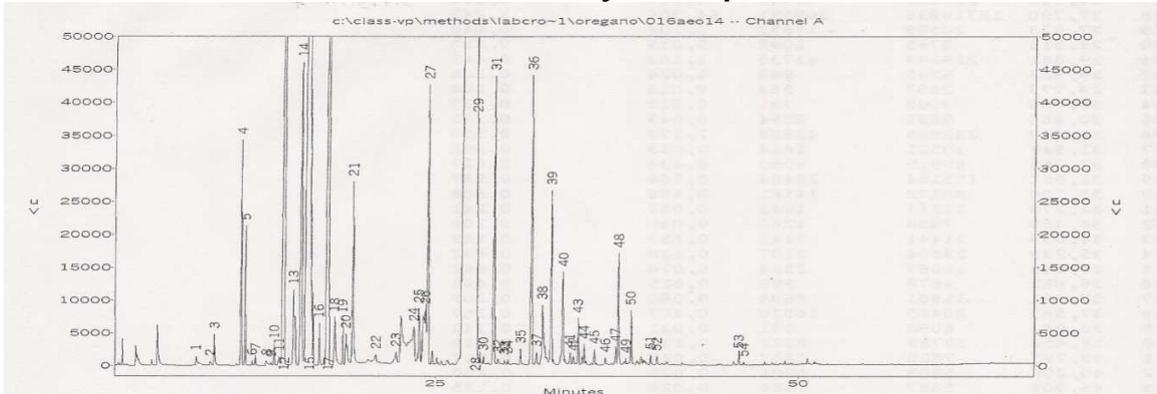
MUESTRA 7. Vereda: El Cardo. Edad: madura. Época: invierno.



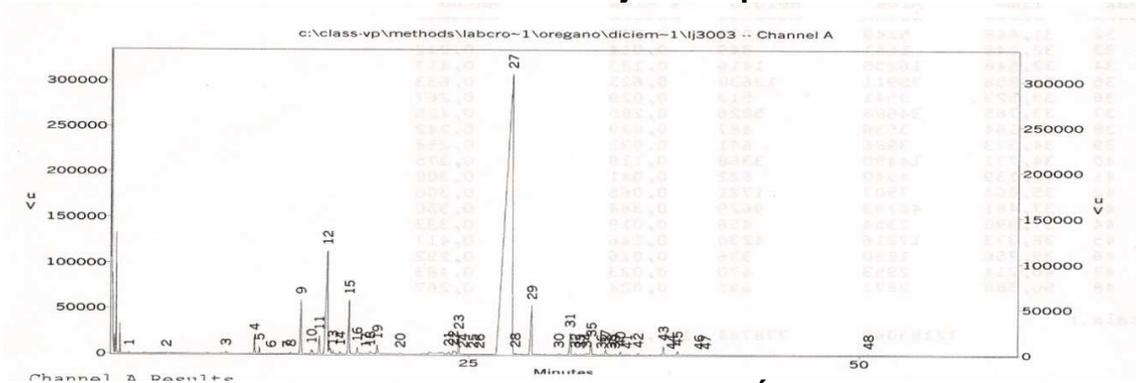
MUESTRA 8. Vereda: El Cardo. Edad: madura. Época: verano.



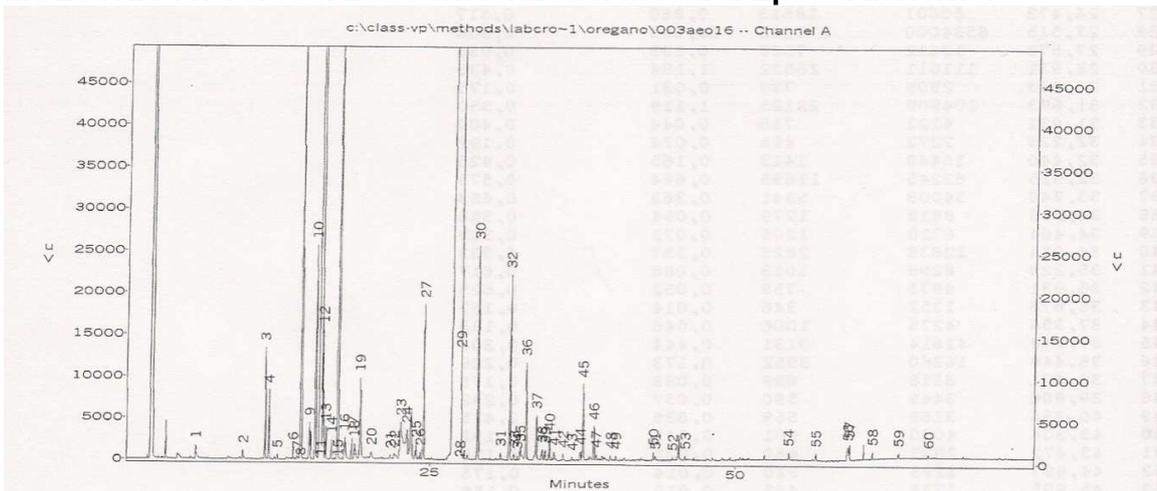
MUESTRA 9. Vereda: Las Juntas. Edad: joven. Época: invierno.



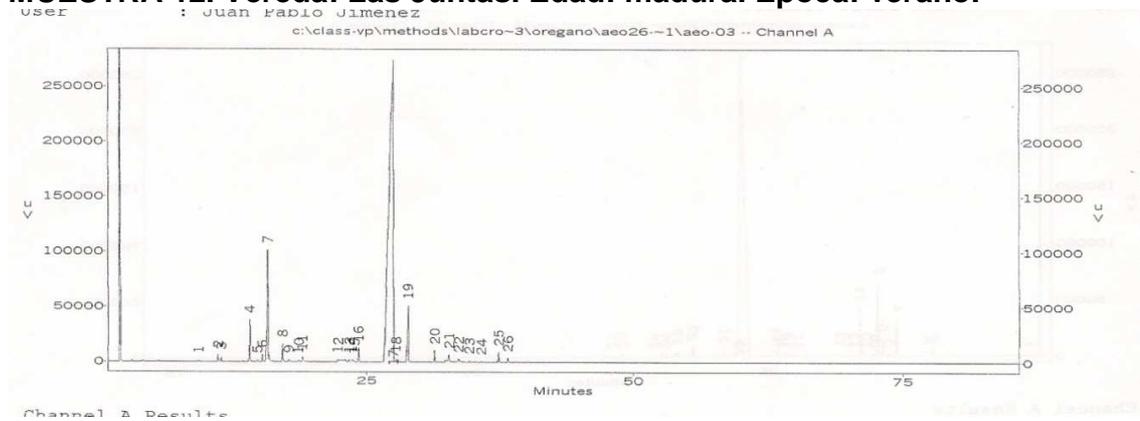
MUESTRA 10. Vereda: Las Juntas. Edad: joven. Época: verano.



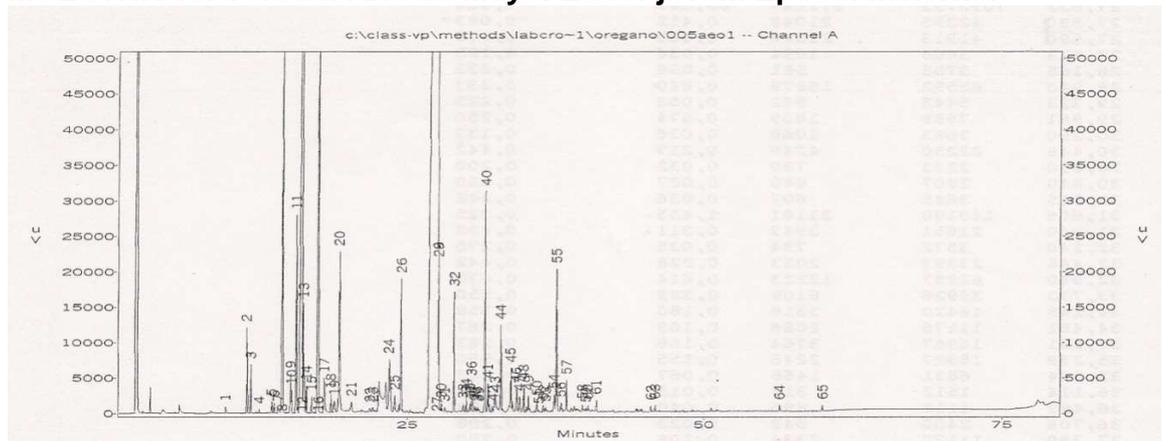
MUESTRA 11. Vereda: Las Juntas. Edad: madura. Época: invierno.



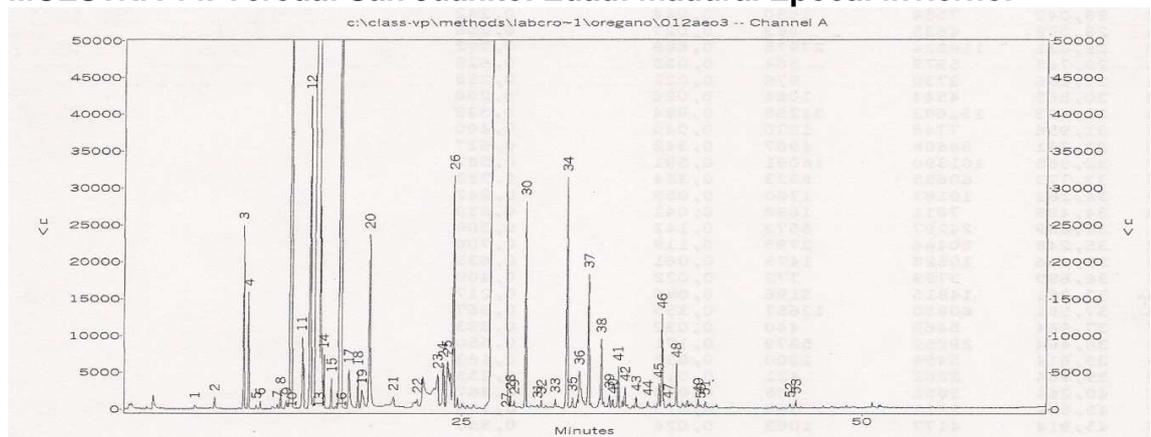
MUESTRA 12. Vereda: Las Juntas. Edad: madura. Época: verano.



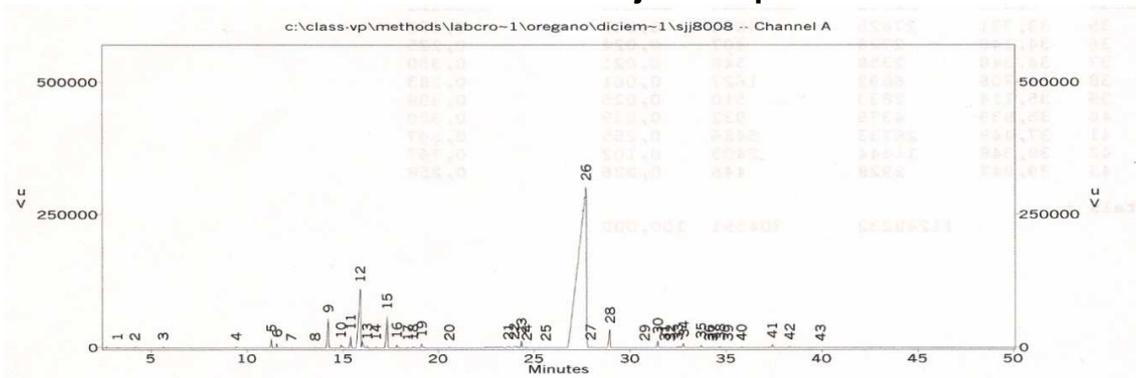
MUESTRA 13. Vereda: Alto de Mayo. Edad: joven. Época: invierno.



MUESTRA 14. Vereda: San Juanito. Edad: madura. Época: invierno.



MUESTRA 15. Vereda: San Juanito. Edad: joven. Época: verano.



MUESTRA 16. Vereda: Alto de Mayo. Edad: joven. Época: invierno.

