

ESTANDARIZACIÓN A ESCALA PILOTO DE LA EXTRACCIÓN
DE ACEITE ESENCIAL DE ALBAHACA (*Ocimum micranthum* Willd.),
Y LA EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD BIOCIDA PARA MANEJO DEL ÁFIDO DE LA
PAPA, SOBRE PLANTAS DE PAPA AMARILLA (*Solanum phureja*),
EN EL DEPARTAMENTO DE NARIÑO

KATERINE SILVA BUCHELI

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL
SAN JUAN DE PASTO
2010

ESTANDARIZACIÓN A ESCALA PILOTO DE LA EXTRACCIÓN
DE ACEITE ESENCIAL DE ALBAHACA (*Ocimum micranthum* Willd.),
Y LA EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD BIOCIDA PARA MANEJO DEL ÁFIDO DE LA
PAPA, SOBRE PLANTAS DE PAPA AMARILLA (*Solanum phureja*),
EN EL DEPARTAMENTO DE NARIÑO

KATERINE SILVA BUCHELI

Trabajo de grado presentado como requisito
para optar al título de Ingeniera Agroindustrial

Director
DIEGO FERNANDO MEJÍA ESPAÑA
INGENIERO AGROINDUSTRIAL

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL
SAN JUAN DE PASTO
2010

Nota de aceptación:

Firma del asesor

Firma del jurado

Firma del jurado

Pasto, 18 de Mayo de 2010.

DEDICATORIA

A quien todo le debo, a mi Padre Dios, a su infinito amor,
A mi Madre María, por su protección y bendición,
A mis padres Agapito y Rosalba, el milagro más hermoso, por su amor y entrega,
A mis hermanos Javier, Maribel, Mónica y Felipe, por su cariño y apoyo incondicional,
A mis sobrinos, Luis Alejandro, Ana Carolina, Luisa Fernanda, Andrea, Jorge David, por la cuota de diversión y alegría que le dan a mi vida,
A mi Angelito de la Guarda, estás siempre conmigo †,
A mis amigos Susana y Samuel, por convertirme en parte de su familia,
A Oscar Armando, por todo su afecto, ternura y apoyo,
A mis amigas Daisy y Viviana por todo el tiempo compartido,
A todos mis familiares y amigos, que de alguna manera comparten y celebran mis logros.

AGRADECIMIENTOS

Diego Fernando Mejía España, Ingeniero Agroindustrial, Director del proyecto.

Nelson Edmundo Arturo, Ingeniero Industrial, Decano de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial.

Andrés Hurtado Benavides. Jurado del proyecto.

Oscar Arango Bedoya. Jurado del proyecto.

Sandra Burbano, Ingeniera Agrónoma.

Vicente Narváez. SENA.

David Arturo, Químico, Sección Laboratorios Especializados UDENAR.

Mauricio Rodríguez, Laboratorio de Entomología UDENAR.

Guillermo Castillo, Biólogo. Profesor adjunto al Programa de Biología UDENAR.

Aquiles Gutiérrez, Biólogo. Profesor adjunto al Programa de Biología UDENAR.

Claudia Salazar, Ingeniera Agrónoma, Facultad de Ciencias Agrícolas UDENAR.

Hugo Andrés Gomajoa, Planta Piloto – Ingeniería Agroindustrial UDENAR.

Luis Guillermo Rosero, Ingeniero Agrónomo.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN.	17
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	19
2. JUSTIFICACIÓN.	22
3. OBJETIVOS.	26
3.1 OBJETIVO GENERAL.	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	26
4. ESTADO DEL ARTE.	27
4.1 COMPOSICIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE ALBAHACA.	27
4.2 ESTUDIOS DE ACTIVIDAD BIOCIDA DE ALGUNAS PLANTAS SOBRE ÁFIDOS.	29
4.3 ESTUDIOS DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA ALBAHACA.	31
4.4 ESTUDIOS SOBRE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES.	34
5. MARCO TEÓRICO.	35
5.1 LA ALBAHACA (<i>Ocimum micranthum</i> Wild.).	35
5.1.1 Nomenclatura y taxonomía.	35
5.1.2 Generalidades.	36
5.2 METABOLISMO VEGETAL.	36
5.2.1 Metabolismo primario.	36
5.2.2 Metabolismo secundario.	37
5.2.3 Importancia del metabolismo secundario.	37
5.2.4 Terpenos.	37

	pág.
5.3 ACEITE ESENCIAL.	38
5.3.1 Definición.	38
5.3.2 Clasificación del aceite esencial.	39
5.3.3 Composición del aceite esencial natural.	39
5.4 CONTROL DE CALIDAD DE ACEITES ESENCIALES.	40
5.4.1 Características organolépticas.	40
5.4.2 Determinaciones físicas.	40
5.4.3 Índices químicos.	41
5.5 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES.	42
5.5.1 Destilación de aceites esenciales (hidrodestilación).	42
a) Destilación con agua.	42
b) Destilación con agua-vapor.	42
c) Destilación con vapor.	43
5.5.2 Extracción con fluidos supercríticos.	43
5.5.3 Estandarización.	43
5.6 MÉTODOS INSTRUMENTALES DE ANÁLISIS	43
5.6.1 Cromatografía de gases (CG).	43
a) Análisis cualitativo.	45
b) Análisis cuantitativo.	47
5.6.2 Espectrometría de masas (EM).	47
5.7 ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN LOS EXTRACTOS VEGETALES.	48
5.8 LOS ÁFIDOS.	49
5.8.1 <i>Myzus persicae</i> Sulzer.	51

	pág.
6. METODOLOGÍA.	53
6.1 OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE ALBAHACA.	53
6.1.1 Caracterización de la materia prima.	53
6.1.2 Acondicionamiento de la materia prima.	53
6.1.3 Extracción del aceite esencial de albahaca.	55
6.2 DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS MEDIANTE CG-EM.	59
6.3 DETERMINACIÓN DEL TIEMPO Y PRESIÓN ÓPTIMOS.	60
6.4 BIOENSAYO.	60
6.4.1 Material vegetal.	60
6.4.2 Insectos.	60
6.4.3 Experimentos.	61
6.4.4 Diseño experimental y análisis estadístico.	62
7. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	65
7.1 OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE ALBAHACA.	65
7.1.1 Caracterización de la materia prima.	65
7.1.2 Acondicionamiento de la materia prima.	66
7.1.3 Extracción del aceite esencial de albahaca.	66
7.2 DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS MEDIANTE CG-EM.	73
7.2.1 Análisis de varianza para concentración.	79
7.3 DETERMINACIÓN DE TIEMPO Y PRESIÓN ÓPTIMOS.	82
7.4 BIOENSAYO.	86
7.4.1 Análisis de varianza para repelencia (impregnación de papel).	86

	pág.
7.4.2 Análisis de varianza para mortalidad (impregnación de papel).	87
7.4.3 Análisis de varianza para mortalidad (inmersión del sustrato).	88
8. CONCLUSIONES.	93
9. RECOMENDACIONES.	95
BIBLIOGRAFIA.	96

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Variables independientes y variables de respuesta.	57
Tabla 2. Niveles de variables independientes.	57
Tabla 3. Matriz de diseño experimental.	57
Tabla 4. Resultados observados.	66
Tabla 5. Resultados calculados.	67
Tabla 6. Análisis de varianza para Rendimiento de Aceite.	68
Tabla 7. Análisis de varianza para Rendimiento de Proceso.	71
Tabla 8. Porcentajes de área relativa de compuestos identificados, para cada ensayo del diseño factorial $2^2 + 4$ puntos centrales.	78
Tabla 9. Porcentajes de área relativa de los compuestos mayoritarios de interés, para cada ensayo del diseño factorial $2^2 + 4$ puntos centrales.	79
Tabla 10. Análisis de varianza para Concentración.	79
Tabla 11. Valores óptimos para las variables de respuesta.	82
Tabla 12. Porcentajes de área relativa para réplicas del valor óptimo.	83
Tabla 13. Porcentajes de área relativa, de los compuestos mayoritarios de interés para réplicas del valor óptimo.	84
Tabla 14. Resultados observados para réplicas del valor óptimo.	84
Tabla 15. Resultados calculados para réplicas del valor óptimo.	84
Tabla 16. Análisis de varianza para Repelencia.	86
Tabla 17. Prueba HSD de Tukey para Repelencia.	86
Tabla 18. Análisis de varianza para Mortalidad (preliminar).	87
Tabla 19. Prueba HSD de Tukey para Mortalidad (preliminar).	88

	pág.
Tabla 20. Análisis de varianza para Mortalidad del ensayo definitivo.	89
Tabla 21. Prueba HSD de Tukey para Mortalidad del ensayo definitivo.	89

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Parámetros de un cromatograma.	45
Figura 2. Ciclo biológico de un áfido o pulgón.	50
Figura 3. <i>Myzus persicae</i> .	52
Figura 4. Secado de Albahaca.	53
Figura 5. Reducción de tamaño.	54
Figura 6. Turbulencia generada en el vaso florentino.	56
Figura 7. Disposición de la carga en el extractor.	58
Figura 8. Recuperación del aceite esencial.	58
Figura 9. Plantas de papa amarilla <i>Solanum phureja</i> .	61
Figura 10. Montaje para la cría de áfidos.	61
Figura 11. Montaje de la unidad experimental para el bioensayo.	62
Figura 12. Diseño experimental para el bioensayo.	63
Figura 13. Albahaca <i>Ocimum micranthum</i> Wild.	65
Figura 14. Grafico de Pareto estandarizado para Rendimiento de Aceite.	68
Figura 15. Gráfico de Efectos Principales para Rendimiento de Aceite.	70
Figura 16. Gráfico de la Interacción para Rendimiento de Aceite.	70
Figura 17. Grafico de Pareto estandarizado para Rendimiento de Proceso.	71
Figura 18. Gráfico de Efectos Principales para Rendimiento de Proceso.	72
Figura 19. Gráfico de la Interacción para Rendimiento de Proceso.	72
Figura 20. Composición química de aceite esencial según diferentes estudios sobre la misma especie de albahaca (<i>Ocimum basilicum</i> L.).	74

	pág.
Figura 21. Composición química de aceite esencial para diferentes especies de albahaca.	75
Figura 22. Cromatograma del aceite esencial de <i>Ocimum micranthum</i> Wild.	76
Figura 23. Grafico de Pareto estandarizado para Concentración.	80
Figura 24. Gráfico de Efectos Principales para Concentración.	81
Figura 25. Gráfico de Interacción para Concentración.	82
Figura 26. Comparación porcentual para las actividades biológicas evaluadas, en el aceite esencial de <i>Ocimum micranthum</i> Wild.	92

ANEXOS

	pág.
ANEXOS	107
Anexo A. Certificado de la identificación botánica de <i>Ocimum micranthum</i> Wild.	108
Anexo B. Estructura química de los principales compuestos identificados.	109
Anexo C. Pruebas complementarias para <i>Ocimum micranthum</i> Wild.	111
Anexo D. Datos corregidos y transformados para el bioensayo.	112
Anexo E. Datos cromatográficos para muestras de aceite del diseño factorial.	113
Anexo F. Datos cromatográficos para muestras de aceite de las réplicas.	129

RESUMEN

El aceite esencial de *Ocimum micranthum*, se extrajo por arrastre de vapor a escala piloto para ser analizado por CG-EM y luego se probó su actividad biológica *in vitro* contra *Myzus persicae*, usando foliolos de *Solanum phureja* como sustrato. Se encontraron como componentes mayoritarios el alcanfor (31,28 %) y el 1,8-cineol (32,19 %). También se calculó el rendimiento de aceite (0,85 %v/p) y el rendimiento del proceso (0,44 %v/v). Las mejores condiciones para el proceso fueron una presión de 1 psi_(g) y un tiempo de 20 min, para lograr una relación de compromiso entre las variables de respuesta.

La actividad biológica del aceite esencial fue probada contra *Myzus persicae*, a cinco concentraciones (0,5; 1; 2; 3 y 4 %v/v) en solución acuosa al 5 % de propilenglicol (emulsionante). La aplicación fue realizada por dos métodos: impregnación de papel e inmersión del sustrato, con 10 individuos y lectura a las 24 horas. En el primer método, la mortalidad corregida fue 29,89 % a 4 % de concentración ($p > 0,01$), sin embargo, se notó una importante actividad repelente de 49,99 % a la misma concentración ($p < 0,01$). En el segundo método, la mortalidad corregida fue significativa ($p < 0,01$), alcanzado el 85,15 % y 90 %, a concentraciones de 3 % y 4 %, respectivamente. Con el método de inmersión al 4 % de concentración, el sustrato sufrió un daño evidente por el aceite aplicado.

Palabras clave: Extracción, Aceite esencial, Albahaca, Áfido, Insecticidas vegetales, Bioensayo.

ABSTRACT

The essential oil was extracted from *Ocimum micranthum* aerial parts by steam distillation at pilot plant scale, further analyzed by GC-MS and tested *in vitro* for biological activity against *Myzus persicae*, applied on *Solanum phureja* leaves. The main compounds found were camphor (31,28 %) and 1,8-cineole (32,19 %), calculated as percentage of relative area. The oil and process yield were also calculated, resulting in 0,85 %v/w and 0,44 %v/v, respectively. The optimum parameters of the process were 1 psi_(g) for pressure and 20 min for time, obtaining a compromise relation between response variables.

The essential oil was tested for biological activity against *Myzus persicae*, at five concentration (0,5; 1; 2; 3 y 4 %v/v) in 5 % propilenglicol watery solution (emulsifier). The bioassay was developed by two methods: paper impregnation and substrate immersion, using 10 adult insects. The 24 hours after each treatment, data were recorded. For the first method, the corrected mortality measured was 29,68 % ($p > 0,01$) at 4 %, and the repellence activity was 49,99 % ($p < 0,01$) at the same concentration. By other side, the corrected mortality was meaningful in the second method ($p < 0,01$), reaching values as 85,15 % and 90 %, for 3 % and 4 % concentration, respectively. With the immersion method at 4 % concentration, the substrate suffered evident damage by the oil applied.

Key words: Hydrodistillation, Essential oil, Basil, Aphid, Botanical insecticides, Bioassay.

INTRODUCCIÓN

Desde hace mucho tiempo el hombre ha buscado la manera de proteger naturalmente los cultivos, susceptibles a un sinnúmero de plagas que amenazan su sanidad y repercuten en su calidad y rendimiento. Una de las alternativas más antiguas para esta finalidad, corresponde a los extractos naturales, que en una de sus mejores épocas han constituido un conjunto de insecticidas de origen vegetal, como la rotenona, el piretro, la nicotina, la rianodina, el nim y la sebadilla, entre otros.

Posibles soluciones ante la resistencia de los insectos, la contaminación y el desequilibrio ecológico en general, residen en los metabolitos secundarios sintetizados por las plantas. Estas sustancias pueden alterar el comportamiento de los insectos plaga, protegiendo a los cultivos de su ataque y de las graves consecuencias que lo acompañan, como la transmisión de virus que afectan el rendimiento, especialmente en cultivos de importancia económica.

Generalmente, los compuestos presentes en los extractos vegetales son heterogéneos, respecto a su naturaleza química y a su proporción. Esta particularidad representa una desventaja en el momento de estandarizar bioinsecticidas para uso comercial, sin embargo, este mismo hecho puede ser una ventaja en relación al nivel de resistencia que pueden desarrollar los insectos, ya que para ellos resulta más difícil destoxificarse de una mezcla compleja, que de un compuesto individual.

El planteamiento de este proyecto está orientado a proponer el uso de aceites esenciales como elemento coadyuvante en el manejo integrado de plagas y de esta manera favorecer la sustitución gradual del uso de plaguicidas sintéticos. En el campo de la Ingeniería Agroindustrial, la sustitución de plaguicidas sintéticos por productos naturales, ayuda al cumplimiento de normas internacionales para productos orgánicos, logrando mayor oportunidad en el mercado exterior.

Los objetivos propuestos apuntan a la obtención del aceite esencial y a la determinación de condiciones óptimas para maximizar el rendimiento de aceite esencial y el rendimiento de proceso, además de lograr la mayor concentración de principio activo. Para esto, se analiza químicamente el extracto obtenido con el fin de reconocer y cuantificar los compuestos presentes. Además se desarrolla un bioensayo del extracto sobre la plaga seleccionada. Los objetivos propuestos en el proyecto, crean una sinergia entre áreas del conocimiento como la biología y la química, que contribuyen con la ingeniería, para fomentar la investigación aplicada.

Se empleó la extracción por arrastre de vapor, materia prima seca con reducción de tamaño, análisis del aceite esencial por cromatografía de gases acoplada a

espectrometría de masas, tratamiento estadístico con el programa Statgraphics plus y prueba de bioensayo *in vitro*, con áfidos sobre folíolos de papa amarilla (diseño completamente al azar).

Las variables de proceso evaluadas en la extracción por arrastre de vapor, fueron la presión y el tiempo: el punto óptimo estimado fue de 1 psi_(g) y 20 min, para alcanzar un equilibrio entre las variables de respuesta. El rendimiento promedio de aceite fue de 0,85 %(v/p) y el rendimiento promedio de proceso fue de 0,44 %(v/v).

Mediante el análisis de CG-EM, se identificaron 21 compuestos con área relativa superior a 0,6 %, los dos compuestos mayoritarios identificados fueron alcanfor y 1,8-cineol (38,21 % y 32,19 % respectivamente) con principio activo reportado, estos se tomaron como referencia para determinar el mejor tratamiento según la concentración de principio activo. Además de los dos compuestos mayoritarios, se identificaron otros compuestos en cantidades apreciables: *cis*- α -bisaboleno (11,59 %), estragol (11,40 %), β -bisaboleno (8,66 %), linalol (4,98 %), *cis*- α -bergamoteno (4,41 %), canfeno (4,05 %), *trans*- β -ocimeno (3,66 %), *trans*-cinamato de metilo (3,60 %), *trans*-cariofileno (3,66 %) y β -pineno (3,03 %).

En la prueba de bioensayo sobre *Myzus persicae*, se evaluaron concentraciones de 0,5; 1; 2; 3 y 4 % en solución acuosa al 5 % de propilenglicol como emulsionante. Se realizaron aplicaciones por dos métodos: impregnación de papel e inmersión del sustrato, con 10 individuos y lectura a las 24 horas. Para el método de inmersión, la mortalidad corregida fue de 90 % frente al 29,86 % que se obtuvo con el método de impregnación de papel.

Los resultados del proyecto aportan indicios de actividad biológica, no solo frente a la plaga seleccionada, sino también frente a otro tipo de organismos, por la naturaleza de los compuestos identificados, que cuentan con actividad reportada en bases de datos fitoquímicas reconocidas por la comunidad científica.

La validación de conocimientos empíricos, gracias a la aplicación del método científico, posibilita el proceso de estandarización. Por tanto, el valor teórico del proyecto, se encuentra en la estandarización de la obtención de aceites esenciales, en función del manejo de un insecto plaga, que afecta cultivos de importancia económica en la región. Este trabajo representa un aporte al desarrollo y práctica de procedimientos, que permiten el aprovechamiento de recursos naturales con principios activos y su posterior aplicación.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

“En el Departamento de Nariño, hay un predominio de la actividad agrícola y los agricultores se esfuerzan por aumentar el rendimiento en sus cultivos, empleando una serie de estrategias entre las cuales se encuentra el uso de productos de protección de cultivos, grupo que comprende a los plaguicidas”¹. Un ejemplo de plaguicidas son los insecticidas sintéticos, estos consisten en productos generalmente tóxicos, que pueden permanecer como residuos en el producto final.

Teniendo en cuenta lo anterior, algunas de las consecuencias derivadas del uso inapropiado y continuo de plaguicidas son: “reducción en la calidad del producto, impedimento para su comercialización”², “enfermedades y muertes por envenenamiento a corto y largo plazo, resistencia a insecticidas por parte de los insectos, destrucción de parásitos, predadores naturales, polinizadores y contaminación del medio ambiente, en general”³.

“Los insectos han demostrado gran capacidad para desarrollar resistencia frente a los insecticidas, propiciando el uso indiscriminado de insecticidas sintéticos”⁴, que consiste en la mala dosificación o reiteración de su uso y su aplicación en tiempos no apropiados; este problema es evidente en Colombia, ya que una de las técnicas agrícolas más frecuentes es el monocultivo no tecnificado.

“La legislación colombiana acoge los límites máximos de residuos (LMR), que indican la cantidad máxima de residuo de un plaguicida en un determinado producto”⁵, sin embargo, no todos los productos que se comercializan son analizados, por la informalidad del sector, los altos volúmenes de producto y las diversas fuentes de los mismos, representando un riesgo inminente para el consumidor.

Un gran número de insectos plaga y enfermedades, atacan el cultivo de papa criolla afectando su producción y calidad, por tanto, los agricultores acuden al uso de gran

¹ MORENO, M. L. Evaluación de la residualidad de plaguicidas en el repollo (*Brassica oleracea* var. Capitata) en el departamento de Cundinamarca. Citado por: GUERRERO, Jairo Arturo. Estudio de residuos de plaguicidas en frutas y hortalizas en áreas específicas de Colombia. En: Agronomía Colombiana, 2003. vol.21, no.3, p.198-209.

² GUERRERO, Jairo Arturo. Estudio de residuos de plaguicidas en frutas y hortalizas en áreas específicas de Colombia. En: Agronomía Colombiana, 2003. vol.21, no.3, p.198-209.

³ MAGGI, María Eugenia. Insecticidas Naturales. Monografías.com, 2004. [En línea] [Citado 20-03-07] Disponible en Internet: <http://www.monografias.com/trabajos18/insecticidas-naturales/insecticidas-naturales.shtml>.

⁴ HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ, Santiago. Ecología para ingenieros : el impacto ambiental. Colegio de Ingenieros de Caminos, Canales y Puertos. 2ed. Colección Señor No.2, 1995. p.131-140. ISBN 84-380-0098-3.

⁵ CODEX ALIMENTARIUS, 1996. Citado por: GUERRERO, Jairo Arturo. Op. cit., p. 198-209.

cantidad de plaguicidas químicos, “que representan casi el 20 % de los costos totales de producción del cultivo”^{6,7}.

Además, la Organización Mundial de la Salud (OMS), de manera conjunta con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), denunció en el 2001 las "alarmantes" cantidades de pesticidas de mala calidad vendidos en los países en vías de desarrollo. Aproximadamente un 30 % de los pesticidas comercializados en los países en desarrollo, no responden a las normas de calidad internacionales, convirtiéndose en una amenaza para la salud y el medio ambiente⁸.

Por otra parte, la investigación deficiente de especies botánicas cuyos antecedentes son limitados, dificulta la identificación de fuentes naturales de insecticidas, que puedan llegar a representar una alternativa viable dentro del manejo integrado de plagas. “Por ejemplo, los usos de *Ocimum basilicum* y *Ocimum micranthum* son similares, pero se conoce muy poco acerca de la composición química de esta última”⁹.

“Aquellas plantas que hayan mostrado una actividad biológica potencial, deben pasar de la etapa de investigación a nivel de laboratorio, a la investigación a escala piloto, estableciendo prioridades de investigación y desarrollo, de acuerdo con las regiones en donde se encuentra la mayor diversidad biológica”¹⁰.

“Algunos estudios realizados con el afán de desarrollar productos bioinsecticidas en el ámbito regional, no cuentan con protocolos de trabajo comunes, que permitan un análisis sistemático de la flora local y regional”¹¹, por lo que se hace necesario identificar metodologías estándar.

⁶ PORRAS, P. Guía para la papa criolla clon 1. En: Papas colombianas con el mejor entorno ambiental. FEDEPAPA. 2da ed. Bogotá. 2000. pp. 44-47, 65-69. Citado por: DÍAZGRANADOS, Cristina y CHAPARRO, Alejandro. Desarrollo de un sistema de regeneración en papa criolla (*Solanum phureja* et Buck) var. Yema de huevo Clon 1. En: *Agronomía Colombiana*. Bogotá. Junio 2007. vol.25, no.1. ISSN 0120-9965.

⁷ LÓPEZ, A. y ESPITIA, E. Plagas y beneficios en el cultivo de la papa en Colombia. CORPOICA. Bogotá. 2000. p.35. Citado por: DÍAZGRANADOS, Cristina y CHAPARRO, Alejandro. Op. cit.

⁸ OMS. Pesticidas de mala calidad vendidos al Tercer Mundo. Salud Colombia Internacional. Ed.55. Febrero de 2001. [En línea] [Citado 12-04-07] Disponible en Internet: <http://www.saludcolombia.com/actual/salud55/interna55.htm>.

⁹ BIBLIOTECA DIGITAL DE LA MEDICINA TRADICIONAL MEXICANA. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. México 2009. [En línea] [Citado 25-11-09] Disponible en internet: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?|=3&t=&id=7196>

¹⁰ DÍAZ, J. A. Caracterización del mercado colombiano de plantas medicinales y aromáticas : Búsqueda de principios bioactivos en plantas. En : Informe técnico. Instituto Alexander Von Humboldt – Ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial. Bogotá. 2003. p. 22. ISBN: 958-8151-14-7.

¹¹ HOSS, Reinhart. Recursos botánicos con potencial biocida : conceptos básicos y métodos de análisis. Red de Acción en Alternativas al uso de Agroquímicos. Lima, Perú: Editorial Gráfica Stefany S. R. 1999.

En Nariño, el empleo de algunos bioinsecticidas, corresponde a extractos vegetales preparados de forma artesanal, con la participación del conocimiento empírico de los campesinos y su memoria ancestral. El problema puntual, es que “esto se lleva a cabo sin ningún tipo de estandarización, dando lugar a recomendaciones ambiguas en el uso de los extractos y dificultando la obtención de los resultados esperados”¹².

¹² SILVA AGUAYO, Gonzalo *et al.* Insecticidas vegetales : una vieja y nueva alternativa para el manejo de plagas. En: (Revista) *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, CATIE Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (Costa Rica). (dic 2002). no.66, p.9-10. ISSN 1659-0082.

2. JUSTIFICACIÓN

“Colombia ocupa el puesto 31 de la producción mundial de papa, además, la papa está catalogada como el cuarto alimento más importante en el mundo, después del trigo, el arroz y el maíz”¹³. “En el 2007, el 16 % de la producción de papa nacional, fue aportado por el departamento de Nariño, en donde este cultivo representa la base de la economía rural, generando la mayor proporción de empleos y de ingresos agropecuarios”^{14,15}.

Para el caso específico de la papa criolla, “se estima una exportación anual de 150.000 toneladas, que representan del 10 al 12 % de la papa cultivada en Colombia, en un área de siembra de 25.000 hectáreas, aproximadamente”^{16,17}.

“En Colombia, el valor de la producción en el periodo 1992-2004, creció solo un 0,6 %, lo que se atribuye a las malas prácticas en cultivo y postcosecha, a la producción minifundista, y al incremento de costos por los altos precios de los agroquímicos”¹⁸. “El cultivo de papa representa la mayor demanda de insecticidas y fungicidas, lo que implica la necesidad de recuperar la sostenibilidad ambiental de este cultivo, apuntando hacia la implementación de buenas prácticas agrícolas (BPA)”¹⁹.

“El mercado que constituye la agricultura orgánica se encuentra en expansión y generalmente, cuenta con altas tasas de retorno, representando un “nicho” importante para atender, ya que esta práctica no tolera el uso de agroquímicos convencionales”²⁰.

¹³ COLOMBIA, MINISTERIO DE AGRICULTURA. Alianza para la comercialización de papa criolla con productores de Nariño. Apoyo alianzas productivas. Comisión intersectorial regional. Pasto, Dic 3 de 2007.

¹⁴ Ibid.

¹⁵ NARIÑO, DEPARTAMENTO NACIONAL DE PLANEACIÓN (DNP). Agenda interna para la productividad y la competitividad: Documento regional Nariño. p.60. Bogotá, Junio 2007.

¹⁶ PORRAS, P. Op. cit.

¹⁷ GHISLAIN, M. y ZHANG, D. Genetic diversity analysis in a cultivated andean potato, *S. phureja* Juz. et. Buck. Program 2. Perú, 2001. p.8. Citado por: DÍAZGRANADOS, Cristina y CHAPARRO, Alejandro. Desarrollo de un sistema de regeneración en papa criolla (*Solanum phureja* et Buck) var. Yema de huevo Clon 1. En: *Agronomía Colombiana*. Bogotá. Junio 2007. vol.25, no.1. ISSN 0120-9965.

¹⁸ NARIÑO, DEPARTAMENTO NACIONAL DE PLANEACIÓN (DNP). Op. cit.

¹⁹ VILLARREAL, Héctor. Costos de producción de papa en las principales zonas productoras de Colombia. Federación Colombiana de productores de papa FEDEPAPA. Bogotá, Colombia. Diciembre 2007. p.7,9.

²⁰ SILVA AGUAYO, Gonzalo *et al.* Op. cit. p.8.

“Los insecticidas vegetales constituyen un 1 % del mercado mundial, pero que anualmente las ventas aumentan entre un 10 y un 15 %, siendo su principal uso en parques y jardines”²¹.

“Los insecticidas vegetales pueden ser integrados a los diferentes programas de manejo de insectos, debido a su compatibilidad con otras opciones de bajo riesgo, como feromonas, aceites, jabones, entomopatógenos, depredadores y parasitoides, entre otros”²².

Es por esto, que “la capacidad tecnológica mundial, concentrada en universidades, laboratorios y empresas”²³, se ha puesto al servicio de la investigación orientada a la obtención de bioinsumos para el manejo de insectos plaga, que según Asocolflores²⁴, presentan las siguientes ventajas:

- Compatibilidad entre algunos extractos vegetales y algunos hongos entomopatógenos.
- Biodegradabilidad y no residualidad.
- Restauración del agroecosistema y de su equilibrio biológico y, por lo tanto, menor dependencia de insumos sintéticos.
- Menores tiempos muertos por restricciones de reentradas a los cultivos.
- Menor número de incapacidades por enfermedades respiratorias y alérgicas.
- Aprovechamiento sostenible de la biodiversidad colombiana.

“Teniendo en cuenta los estudios realizados hasta la fecha, entre las familias botánicas más prometedoras en el control de plagas se encuentran: *Meliaceae*, *Rutaceae*, *Asteraceae*, *Annonaceae*, *Labiatae* y *Canellaceae*”²⁵. Es preciso resaltar que *Ocimum micranthum*, pertenece a la familia *Labiatae*. La obtención de extractos de *Ocimum micranthum*, con el fin de analizar su composición y evaluar su potencial insecticida, es

²¹ ISMAN, BM. Neem and other botanical insecticides: barriers to comercialization. *Phytoparasitica*, 1997. vol.25, no.1. p.339-344. Citado por: SILVA AGUAYO, Gonzalo *et al.* Op. cit. p.9.

²² RODRIGUEZ, HC. Extensión y capacitación en el uso de plaguicidas botánicos. En: Memoria I Taller Latinoamericano sobre bioplaguicidas ¿Mito, Placebos o una alternativa en agricultura sostenible?. Escuela Panamericana de Agricultura. El Zamorano. HN. p.1-6. Citado por: SILVA AGUAYO, Gonzalo *et al.* Op. cit. p.10.

²³ MATTA DÍAZ, Rodrigo Alberto. Aproximación al análisis de políticas públicas nacionales que pueden incidir en la conformación y consolidación de iniciativas en ciencia y tecnología, y entre ellas, de un *clúster* bioindustrial. En: Economía Gestión y Desarrollo, Cali: Colombia. Septiembre 2004. no.2, p.57-100. [En línea] [Citado 05-02-09] Disponible en Internet: http://revistaeconomia.puj.edu.co/revista_2/art3.pdf.

²⁴ MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL, Asocolflores, Consejo Empresarial Colombiano para el Desarrollo Sostenible – CECODES. Utilización de Bioinsumos en Colombia. Estudio de caso en flores de corte. Medellín, 2005. ISBN 33-6215-8.

²⁵ JACOBSON, M. Botanical pesticides past, present and future. En: Arnason. J.: *Philogéne*. BJR: Morand. P (Eds) *Insecticides of plant origin*. American Chemical Society. Washington. D.C. U.S. p.2-10. Citado por: SILVA AGUAYO, Gonzalo *et al.* Op. cit. p.10.

tan necesario como preservar la investigación de las especies botánicas en general, para identificar su actividad biológica potencial.

Evaluar el efecto insecticida de extractos vegetales sobre *Myzus persicae*, es de particular importancia, “porque de los 32 órdenes que componen la clase insecta, ocho poseen vectores de virus y entre los insectos que transmiten virus de papa, el orden *Homoptera*, (que incluye los áfidos) es el más importante y abundante”²⁶.

La importancia de *Myzus persicae* como plaga, no radica en los daños directos que ocasiona sino en el papel que desempeña como vector de virus. Por esta razón, las estadísticas muestran las pérdidas ocasionadas por los virus transmitidos y no por los daños directos que ocasiona el insecto. “Son alrededor de 30 las enfermedades virales que pueden atacar la papa, teniendo en cuenta, que las enfermedades virales no pueden ser controladas por métodos curativos, como en el caso de las enfermedades fungosas”²⁷.

“Dos de la enfermedades virales, ampliamente diseminadas por *Myzus persicae*, son el *Potato Leafroll Virus* (PLRV), que puede ocasionar pérdidas de más del 50 % y el *Potato Virus Y* (PVY), que puede disminuir las cosechas hasta en un 80 %. Cuando los virus actúan en forma combinada pueden ocasionar pérdidas totales”²⁸. Los resultados de la presente investigación, pueden beneficiar a investigadores interesados en el manejo de *Myzus persicae* mediante productos naturales, con el fin de prevenir la propagación de las enfermedades virales en los cultivos.

“Entre los principales insecticidas de síntesis empleados en Colombia, para el control de plagas en el cultivo de papa, se encuentran: Carbofuran, Clorpirifos y Metamidofos”²⁹. “El control de plagas con este tipo de insecticidas, puede llegar a representar hasta el 34,1 % de los costos totales de producción en este tipo de cultivo”³⁰.

El uso de insecticidas vegetales en América Latina, es comúnmente recomendado en manuales o folletos que no han sido validados científicamente. “No es lógico que no se diferencie entre lo publicado por una universidad u organismo internacional de

²⁶ COLOMBIA, CENTRO VIRTUAL DE INVESTIGACIÓN DE LA CADENA AGROALIMENTARIA DE LA PAPA – CEVIPAPA. Memorias “I Taller Nacional sobre patógenos del suelo, virus e insectos plaga diferentes a *Tecia solanivora*”. p.62. Bogotá, Colombia. Noviembre 29 – 30 de 2004. p.36.

²⁷ Ibid. p.30.

²⁸ Ibid. p.29.

²⁹ COLOMBIA, CENTRO VIRTUAL DE INVESTIGACIÓN DE LA CADENA AGROALIMENTARIA DE LA PAPA – CEVIPAPA. Consolidado de preguntas más frecuentes: manejo integrado de plagas. [En línea] [Citado 04-03-10] Disponible en: <http://www.cevipapa.org.co>.

³⁰ USAID. Costos de producción: papa. Boletín de producción no.12. Octubre 2005. P.3. [En línea] [Citado 04-03-10] Disponible en: <http://www.usaid-red.org>.

investigación y lo que publican agrupaciones de campesinos, pequeñas organizaciones e incluso grupos ecologistas, que no siempre tiene toda la rigurosidad necesaria”³¹.

“La falta de estandarización en la calidad de insecticidas vegetales, reviste dificultad al momento de registrar estos productos”³², debido a que “la concentración de los ingredientes activos varía de acuerdo con la procedencia del material del que fueron obtenidos”³³. La estandarización de procesos, permite el control de variables para lograr la obtención de productos que cumplan con determinadas especificaciones de calidad, así como también, permite formular propuestas metodológicas que conformen protocolos de trabajo comunes para el análisis sistemático de floras locales.

Con el presente trabajo, se pretende contribuir con los esfuerzos que vienen realizando, diversas instituciones, grupos de investigación y profesionales, con el fin de promover el desarrollo de bioinsecticidas; la estandarización a escala piloto de procesos, constituye uno de los eslabones fundamentales, para la posterior realización de un estudio de factibilidad, que facilite el montaje de una empresa dedicada a la extracción y comercialización de bioinsecticidas.

³¹ SILVA AGUAYO, Gonzalo *et al.* Op. cit. p.5.

³² ISMAN, BM. Op. cit.

³³ SILVA AGUAYO, Gonzalo *et al.* Op. cit. p.9.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Estandarizar a escala piloto la extracción de aceite esencial de Albahaca (*Ocimum micranthum* Willd.) y evaluar la actividad biológica insecticida, para manejo del áfido de la papa (*Myzus persicae*) en plantas de papa amarilla (*Solanum phureja*), en el Departamento de Nariño.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener el aceite esencial de Albahaca (*Ocimum micranthum* Willd.), mediante extracción por arrastre de vapor.
- Determinar los compuestos y cuantificarlos en el aceite esencial de Albahaca, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
- Determinar tiempo y presión óptimos para obtener mayor rendimiento y concentración de compuestos biocidas.
- Evaluar la actividad bioinsecticida, en el aceite esencial de Albahaca, con el áfido de la papa, en plantas de papa amarilla (*Solanum phureja*), en condiciones de laboratorio.

4. ESTADO DEL ARTE

4.1 COMPOSICIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE ALBAHACA

En un aceite esencial obtenido a partir de hojas de *O. micranthum*, se identificaron los siguientes compuestos:

Canfeno, cineol, linalol, mirceno, cis-ocimeno, trans-ocimeno, alfa-pineno, beta-pineno, alfa-terpineol, aromandreno, beta-cariofileno, beta-elemeno, delta-elemeno, gamma-elemeno, alfa-humuleno, neridol y liganano eugenol. Los estudios farmacológicos realizados demuestran plenamente sus efectos hipotensor y cronotrópico negativo sobre el corazón³⁴.

Los extractos vegetales se han venido evaluando como potenciales sustitutos de muchas sustancias químicas utilizadas en la actualidad como insecticidas, fungicidas y antibacteriales. “Una especie afín a *Ocimum micranthum*, de acuerdo con el uso que se le atribuye, es *Ocimum basilicum* que posee las siguientes sustancias químicas con mayor actividad bioinsecticida”³⁵:

Nota: Algunas de las actividades biológicas señaladas a continuación, se reportan con las siguientes iniciales: MLC=minimum lethal concentration; IC=inhibitory concentration; LD=lethal dose.

- 1,8-cineol: se encuentra en toda la planta en concentración de 776 ppm. Tiene actividad acaricida, en dosis de 6 uM. Entre las plantas con mayor concentración de este ingrediente se encuentran la albahaca y varias especies de ajeno.
- α -pineno (Aceite esencial): se encuentra en toda la planta en concentraciones que varían entre 2 a 180 ppm. Las actividades biológicas del α -pineno incluyen: insecticida en dosis de 0,82 uM/mosca.; repelente en dosis de 50 ppm.
- α -terpineno (Aceite esencial): se encuentra en toda la planta en concentraciones de 1 a 10 ppm. Esta sustancia tiene actividad acaricida e insecticida en dosis de 0,86 uM/mosca. Las plantas que contienen esta sustancia en mayor proporción son orégano, apio (1000 ppm en aceite esencial del fruto) y albahaca entre otras.

³⁴ BIBLIOTECA DIGITAL DE LA MEDICINA TRADICIONAL MEXICANA. Op. cit.

³⁵ DUKE, J. A. Writeups or information summaries on approximately 2000 economic plants [En línea] [Citado 20-01-07] Disponible en Internet: <http://www.ars-gov/duke>. Citado por: PINO, J; ROSADO, A.; GOIRE, I.; RONCAL, E. y GARCÍA, I. Analysis of the essential oil from Cuban Basil. En: Die Nahrung, (1993). vol.37, no.5, p.501-504.

- α -terpineol: se encuentra en toda la planta en concentraciones de 36 a 239 ppm. Esta sustancia tiene actividad biológica insecticida, aplicada en dosis de 1,29 uM/mosca y también nematicida, cuando se aplica en dosis de MLC =1 mg/ml; también se le atribuyen propiedades termicidas en dosis de IC 100=5 mg/g. Entre las plantas con mayores concentraciones de este compuesto se encuentran el limón (hojas), el apio (69,000 ppm en aceite esencial de la raíz; 3,000 a 14,000 ppm en aceite esencial del fruto).
- Citral (3,7- dimetil- 2,6- octadienal o lemonal)³⁶: se encuentra en la planta en concentraciones de 560 a 7000 ppm. Esta sustancia tiene actividad biológica nematicida. Es la principal sustancia insecticida que contiene esta planta, cuando se aplica en dosis de IC52=100 ug/ml y en dosis de MLC=100 a 260 ug/ml.
- Anetol: se encuentra en toda la planta. Esta sustancia tiene actividad insecticida y una de las plantas con mayor concentración de esta sustancia es el apio.
- Citronelol (rodinal o 3,7- dimetil- 6- en- 1- al (C₁₀H₁₈O)): se encuentra en la planta en concentraciones de hasta 2419 ppm. Tiene un efecto nematicida en concentraciones de MLC=100 ug/ml.
- Eugenol (C₁₀H₁₂O₂): sustancia presente en las hojas en concentraciones de 14 a 8575 ppm. Esta sustancia posee actividad biológica acaricida en dosis de LD50=5,47 ug/cm² y DEET (*N,N*-dietil-*meta*-toluamida) a 37,59 ug/cm²; también posee actividad nematicida en dosis de MLC=2,000 ug/ml. Igualmente se atribuyen propiedades fungicidas, herbicidas y termicidas entre otras.
- Metil eugenol: se encuentra en la planta en concentración de 13 a 1400 ppm.
- Ácido cafeico (C₉H₈O): se encuentra en las hojas en concentración de 19000 ppm. Actividad biológica reportada: repelente.
- Cariofileno (C₁₅H₂₄): se encuentra en toda la planta en concentración de 3196 ppm. Actividad biológica reportada: repelente, larvicida y mosquicida.

En un estudio farmacognóstico de *Ocimum basilicum* (albahaca blanca), según los resultados, “el secado artificial del material vegetal a 40 °C es el más rápido y el componente mayoritario del cromatograma fue el eugenol”³⁷.

En la determinación de la composición del aceite esencial de *O. basilicum* L., nativa del nordeste de India y su riqueza en alcanfor, se identificaron 44

³⁶ CITRAL. Wikipedia, la enciclopedia libre. [En línea] [Citado 20-01-07] Disponible en internet: <http://en.wikipedia.org/wiki/Citral>.

³⁷ SANCHEZ GOVIN, Ester *et al.* Estudio farmacognóstico de *Ocimum basilicum* L. (Albahaca blanca). *Revista Cubana de Farmacia*. (sep-dic 2000). vol.34, no.3, p.187-195. [En línea] [Citado 17-05-07] Disponible en Internet: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152000000300006&lng=es&nrm=iso. ISSN 0034-7515.

componentes de los cuales el alcanfor fue el componente mayoritario (42,1 %). Otros componentes se presentaron en cantidades apreciables en el aceite, como el limoneno (7,6 %), β -selineno (5,6 %), α -pineno (5,4 %), canfeno (4,7 %), α -selineno (4,3 %), myrtenol (3,3 %), β -cariofileno (3,3 %). Emplearon el método de hidrodestilación para la extracción, y la cromatografía de gases y CG-EM para el análisis³⁸.

La composición química de los aceites esenciales de *Ocimum basilicum* L. var morado y *Ocimum basilicum* L. var verde, cultivada en Irán fueron investigadas por CG-EM. Veinte componentes (98,5 % del aceite total) fueron identificados en el aceite volátil de *O. basilicum* L. var morada. Los componentes principales encontrados en el aceite fueron el metilchavicol (52,4 %), linalol (20,1 %), *epi*- α -cadinol (5,9 %) y *trans*- α -bergamoteno (5,2 %). En el aceite volátil de *O. basilicum* L. var verde, se encontraron doce componentes que corresponden al 99,4 % del aceite total. El metilchavicol (40,5 %), geranial (27,6 %), neral (18,5 %) y óxido de cariofileno (5,4 %) son los componentes principales. El metilchavicol es el componente dominante en los dos aceites. El citral (neral y geranial), fue identificado en el aceite de albahaca var verde (46,1 %), pero no se encontró en el aceite de albahaca var morada³⁹.

En términos de la composición del aceite esencial, la inoculación con rizobacteria estimulada aumentó la producción de ciertos terpenos. Las plantas inoculadas con *P. fluorescens* o *Bradyrhizobium* mostraron un aumento significativo ($p < 0,001$), en el rendimiento total de aceite esencial. En las plantas inoculadas con *P. fluorescens*, el rendimiento del aceite esencial (%V/P), aumentó 0,14 %, comparado a 0,05 % en plantas no inoculadas ($p < 0,05$). El incremento en el rendimiento total del aceite esencial en respuesta a la inoculación no se debió al aumento de biomasa, y por lo tanto, pudo haber resultado del incremento en la biosíntesis de terpenos. Se identificaron 68 constituyentes, para más del 95,9 % del total de la composición del aceite. Los principales compuestos afectados por la inoculación con *P. fluorescens* fueron terpinen-4-ol, *cis*-hidrato de sabineno, *trans*-hidrato de sabineno, y α -terpineol. La concentración de estos compuestos en plantas inoculadas fue mayor que en los controles⁴⁰.

³⁸ PURKAYASTHA, Jubilee y NATH, Subhan C. Composition of the Camphor-rich Essential oil of *Ocimum basilicum* L. Native to Northeast India. En: *ProQuest Agriculture Journals. Journal of Essential Oil Research*. (may-jun 2006). vol.18, no.3, p.332-334. [En línea] [Citado 01-04-07] Disponible en Internet: http://findarticles.com/p/articles/mi_qa4091/is_200605/ai_n17175092.

³⁹ SAJJADI, Seyed Ebrahim. Analysis of the essential oils of two cultivated basil (*Ocimum basilicum* L.) from Iran. En: *DARU Departamento de Farmacognosia, Facultad de Farmacia y Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Isfahan de Ciencias Médicas*, (2006). vol.14, no.3, p.128-130.

⁴⁰ BANCHIO, Erika *et al.* Plant growth promoting rhizobacteria improve growth and essential oil yield in *Origanum majorana* L. En: *Biochemical Systematics and Ecology*, (2008). vol.36, p.766-771.

4.2 ESTUDIOS DE ACTIVIDAD BIOCIDA DE ALGUNAS PLANTAS SOBRE ÁFIDOS

En la evaluación de la actividad repelente del aceite esencial de Lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf) sobre el pulgón ruso *Diuraphis noxia* Kurdj. (Hemíptera: Aphididae) en Trigo (*Triticum aestivum* L.), el aceite esencial se formuló en solución acuosa empleando como emulsionantes propilenglicol al 5 % y lecitina de soja al 0,5 %. Las concentraciones evaluadas fueron 0,5; 1; 2; 3 y 4 % y testigos en blanco, con cinco repeticiones por tratamiento. Se utilizaron dos técnicas de aplicación: impregnación de papeles y pulverización directa. Al evaluar las formulaciones con los dos emulsionantes, lecitina de soja y propilenglicol, el porcentaje de repelencia fue de 64,78 y 75,63 %, respectivamente. Para las concentraciones de Lemongrass, el porcentaje de repelencia osciló entre 65 y 89 %. Concluyeron que los volátiles de *C. Citratus* demostraron poseer actividad repelente sobre *D. Noxia*⁴¹.

Para la evaluación del efecto de extractos cetónicos de Paraíso, Eucalipto y Ricino, sobre *Myzus persicae*, se empleó la técnica del film residual en papel de filtro, manteniendo los individuos sobre hojas de pimiento ornamental. Se utilizaron extractos acetónicos a una dilución de 10000 ppm, con 5 individuos en cada una de las 10 réplicas de los tratamientos. Se efectuaron lecturas para mortalidad a los 30 minutos y 24, 48 y 72 horas. El extracto de eucalipto produjo una mortalidad significativa, alcanzando un máximo cercano al 50 % en promedio, para la lectura a las 72 horas. Asimismo, se observó un efecto sobre la reproducción, generado por los extractos de eucalipto y ricino, aunque no pudo probarse esto estadísticamente. Para el ricino, se infiere un probable efecto de repelencia⁴².

En Nariño⁴³, algunos autores describen la preparación y utilización de bioinsecticidas preparados a partir de *Allium sativum*, *Brumflesia pauciflora*, *Anethum graveolens*, *Eucaliptus globulus*, *Dalea coerulea*, *Raphanus raphanistrum* y *Verbena officinalis*. Los extractos que presentaron mayores efectos en la reducción de la población de insectos plaga fueron. Para *Myzus persicae* – macerado de *Brumflesia pauciflora*, en *Brevicoryne brassicae* –

⁴¹ RICCI, Mónica *et al.* Utilización de aceite esencial de Lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf) como repelente de *Diuraphis noxia* Kurdj. (Hemíptera: Aphididae) en Trigo. En: *Agricultura Técnica*, Chile. (jul-sep 2006). vol.66, no.3, p.256-263. [En línea] [Citado 23-10-07] Disponible en Internet: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0365-28072006000300004&script=sci_arttext.

⁴² CARRIZO, Paola *et al.* Evaluación de extractos cetónicos de Paraíso, Eucalipto y Ricino, sobre *Myzus persicae* (Homóptera: Aphididae). En: *Revista Facultad de Ciencias Agrícolas UNCuyo*, (2004). vol.36, no.1, p.47-52. [En línea] [Citado 23-10-07] Disponible en Internet: http://bdigital.uncu.edu.ar/bdigital/objetos_digitales/158/carrizoAgrarias1-04.pdf.

⁴³ MENDOZA PERDOMO, Leider y MIPAZ ORTEGA, Lilia Beatriz. Evaluación de plantas para el control de plagas en Papa (*Solanum tuberosum*), Frijol (*Phaseolus vulgaris*) y Repollo (*Brassica oleracea*) en la zona andina del departamento de Nariño. Pasto, 2004. Trabajo de Grado (Ingeniero Agrónomo). Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Agrícolas, Programa de Ingeniería Agronómica.

macerado de *Allium sativum* y *Brumflesia pauciflora*, en *Trialeurodes vaporariorum* – macerado de *Allium sativum*.

Las ninfas del áfido verde del duraznero *Myzus persicae* Sulzer, mostraron efectos de comportamiento y toxicidad en un bioensayo de laboratorio en el cual los áfidos fueron colocados en un disco de hoja de col que fue inmerso en emulsión de un aceite esencial basado en un insecticida (mezcla patentada de eugenol, timol y fenetilpropionato como ingredientes activos EcoSMART Technologies Inc.) a varias concentraciones. Mientras el 90 % de las ninfas ubicadas en el tratamiento control permanecieron sobre el disco de hoja y estuvieron alimentándose activamente después de 24 horas. El 50 % o menos de los áfidos permanecieron alimentándose sobre los discos tratados y la frecuencia de áfidos alimentándose fue inversamente proporcional a la concentración. De forma interesante, cerca del 20 % de los áfidos en todos los grupos de tratamientos (excepto los controles) fueron encontrados caminando en los discos petri, fuera de los discos de hoja después de 24 horas. Los resultados fueron aún más sobresalientes a las 48 horas del tiempo de observación: a la más baja concentración evaluada (0,18 %), el número de áfidos alimentándose sobre los discos declinó de 50 % a las 24 horas, al 25 %, y el número de áfidos muertos a esta concentración incrementó desde 22 hasta 60 %⁴⁴.

En el estudio del aceite esencial de *Lavandula luisieri* L. que pertenece a la familia *Labiatae*, es decir, la misma familia botánica de la Albahaca, es interesante encontrar que los componentes mayoritarios identificados en el aceite de lavandula fueron 1,8-cineol y alcanfor, igual que en el aceite de albahaca evaluado en el presente estudio. Los investigadores probaron el aceite con varios insectos plaga, entre ellos *Myzus persicae*. El efecto antialimentario del aceite de *Lavandula luisieri* sobre *Myzus persicae* fue de 66 %. El 1,8-cineol presentó una moderada correlación con el efecto antialimentario de *Myzus persicae*⁴⁵.

4.3 ESTUDIOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA ALBAHACA

En Venezuela, se determinó la composición química de los aceites esenciales de *Ocimum basilicum* L. var *basilicum*, *O. basilicum* L. var *purpurensens*, *O. gratissimum* L., y *O. tenuiflorum* L., y su efecto antimicrobiano sobre bacterias multirresistentes de origen nosocomial. Al final de la investigación, los autores concluyeron que de acuerdo al análisis cromatográfico y de espectrometría de masas, el linalol, el (E)-cinamato de metilo, el timol y el 4-alil anisol, fueron los componentes mayoritarios en los aceites del *O. basilicum* L. var *basilicum*, *O.*

⁴⁴ ISMAN, M.B. Plant essential oils for pest and disease management. En: *Crop Protection*, (2000). vol.19, p.603-608.

⁴⁵ GONZALEZ-COLOMA, Azucena *et al.* Antifeedant effects and chemical composition of essential oils from different population of *Lavandula luisieri* L. En: *Biochemical Systematics and Ecology*, (2006). vol.34, p.609-616.

basilicum L. var *purpurens*, *O. gratissimum* L., y *O. tenuiflorum* L. respectivamente. Además los aceites esenciales de *O. basilicum* L. var *basilicum* y *O. gratissimum* L. Mostraron actividad inhibitoria sobre varias cepas de *S. aureus* y de *K. pneumoniae* multirresistentes de origen nosocomial. Los autores aclaran que la actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano de los aceites esenciales fue dependiente de la especie⁴⁶.

En Colombia, se determinó un perfil químico de las variedades de albahaca cultivadas en Ibagué y la influencia de este en la actividad biológica del aceite esencial. Al final de la investigación, se concluyó que las albahacas con mayor potencial fitotóxico, pertenecen a variedades ricas en fenilpropanoides (72-92 %), los cuales son compuestos fenólicos involucrados en los mecanismos de defensa y a quienes se les puede atribuir la función protectora de las plantas contra insectos y patógenos. Por otra parte, las variedades ricas en monoterpenos (30-67 %), presentaron origen biosintético mixto (ruta del shiquimato y mevalonato) y en sus aceites esenciales predominan los compuestos terpenoides, los cuales son metabolitos responsables de efectos ecológicos, actuando en las plantas como disuasorios y tóxicos, participando por tanto en la actividad antifúngica (fungistática o fungicida) e insecticida. El estudio mostró que la actividad biológica de las albahacas cultivadas bajo las condiciones de clima y suelo de Ibagué, guarda relación directa con el perfil químico de sus aceites esenciales⁴⁷.

Así se resumen las actividades biológicas y principales usos de la Albahaca (*Ocimum basilicum*): Las sustancias presentes en las hojas y flores de la planta, se utilizan cada ocho días, las cuales poseen una acción insecticida, repelente e inhibitorias de crecimiento, repelente de garrapatas, afecta la polilla de la papa, escarabajo de la papa, áfidos, arañita roja, gusanos, moscas, mosquitos y pulgas. Fumigada sobre las plantas repele insectos voladores, moscas y mosquitos en proporción de una parte del hidrolato en cinco partes de agua y es eficaz para bañar animales domésticos⁴⁸.

Otro trabajo consistió en la evaluación de la actividad antiesporulante, de extractos metanólicos foliares de plantas de la India contra *Sclerospora graminicola* causante de la enfermedad del moho veloso en la perla del mijo. La actividad de los extractos de *Clematis gouriana*, *Evolvulus alsinoides*, *Mimusops elengi*, *Allium sativum* y *Piper nigrum* fueron proporcionales a los fungicidas

⁴⁶ ACOSTA, María *et al.* Composición química de los aceites esenciales de *Ocimum basilicum* L. var *basilicum*, *O. basilicum* L. var *purpurens*, *O. gratissimum* L., y *O. tenuiflorum* L., y su efecto antimicrobiano sobre bacterias multirresistentes de origen nosocomial. *En: Revista de la Facultad de Farmacia*, (2003). vol.45, no.1, p.19-24. [En línea] [Citado 20-02-08] Disponible en Internet: http://www.saber.ula.ve/db/ssaber/Edocs/pubelectronicas/revistafarmacia/vol45/acosta_m.pdf.

⁴⁷ MURILLO, Elizabeth y VIÑA, Amparo. Perfil químico de las variedades de Albahaca cultivadas en Ibagué e influencia de éste en la actividad biológica del aceite esencial. *En: Revista Colombiana de Química*, (2004). vol.33, no.2, p.139-148.

⁴⁸ CARRILLO RAMIREZ, Norman y FLOREZ MANTILLA, José. Manual técnico de agricultura orgánica biológica. Bucaramanga, s.n, 2003.

botánicos comerciales, mientras que los extractos de *Agave americana*, *Artemisia pallens*, *Citrus sinensis*, *Dalbergia latifolia*, *Helianthus annuus*, *Murraya koenigii*, *Ocimum basilicum*, *Parthenium hysterophorus*, *Tagetes erecta*, *Thuja occidentalis* y *Zingiber officinale*, mostraron efecto antiesporulante notable aún después de la décima partición de la dilución de los extractos crudos⁴⁹.

En Pakistán se determinó la influencia de las cuatro estaciones en la composición química, y las actividades antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial de partes aéreas de albahaca (*Ocimum basilicum* L.). El contenido de aceite esencial hidrodestilado osciló entre 0,5 % y 0,8 %, las cantidades máximas fueron observadas en invierno y las mínimas en verano. El componente más abundante fue el linalol (60,6 %), seguido de epi- α -cadinol (11,4 %), α -bergamoteno (9,2 %) y γ -cadineno (5,4 %). Las muestras recolectadas en invierno fueron más ricas en monoterpenos oxigenados (68,9 %), y las de verano fueron más ricas en sesquiterpenos hidrocarbonados (24,3 %)⁵⁰.

El aceite esencial presentó una buena actividad antioxidante y en la actividad antimicrobiana, el linalol fue el mejor componente contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pasteurella multocida* y hongos patógenos como *Aspergillus niger*, *Mucor mucedo*, *Fusarium solani*, *Botryodiplodia theobromae*, *Rhizopus solani*. Los resultados de los ensayos antimicrobianos indicaron que todos los microorganismos probados fueron afectados. La actividad antioxidante, antimicrobiana y la mayor parte de la composición química del aceite, variaron considerablemente ($p < 0.05$) con las estaciones⁵¹.

También se realizó la extracción de vapores de aceites esenciales, a partir de 12 plantas de la región Mediterránea, de las familias *Lamiaceae*, *Verbenaceae* y *Apiaceae*, probando su actividad insecticida contra los pulgones *Acyrtosiphon pisum* Harris y *Myzus persicae* Sulzer. Las dosis aplicadas fueron diferentes, comenzando desde 2 μ l/l aire y partiendo la dosis hasta alcanzar la actividad nula. El aceite esencial de anís, hinojo y albahaca causaron mortalidad alta, inclusive a las dosis bajas. La actividad fue dependiente de la dosis y a pesar de la fitotoxicidad que se pueda presentar en la planta después de aplicar el aceite esencial, los autores consideran factible esta alternativa de control de parásitos en plantas⁵².

⁴⁹ DEEPAK, S. A. *et al.* Actividad antiesporulante de extractos foliares de plantas de la India contra *Sclerospora Graminicola* causante de la enfermedad del moho veloso en la perla del mijo. *En: Archives of Phytopathology and Plant Protection.* (feb 2005). vol.38, no.1, p.31-39. ISSN 0323-5408.

⁵⁰ HUSSAIN, Abdullah *et al.* Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. Pakistán. *En: Food Chemistry,* (2008). vol.108, p.986-995.

⁵¹ Ibid.

⁵² DIGILIO, María Cristina *et al.* Insecticide activity of mediterranean essential oils. *En: Journal of Plant Interactions,* (mar 2008). vol.3, no.1, p.17-23. ISSN 1742-9145.

4.4 ESTUDIOS SOBRE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES

En Nariño, se identificaron y cuantificaron los principales compuestos presentes en el aroma y el aceite esencial de las hojas de Orozul (*Phyla nodiflora* L. Greene). Por el método DES (Destilación extracción simultánea con solventes) identificaron solo tres compuestos, mientras que con el método de hidrodestilación asistida por radiación con microondas (siglas en inglés MWHD), lograron identificar siete. El compuesto mayoritario corresponde al limoneno⁵³.

En Colombia, se estudió la influencia del método de extracción (hidrodestilación y soxhlet a presión normal) y del hábitat (cultivada y silvestre) en el potencial insecticida y repelente del aceite esencial de *Ocimum micranthum* frente a adultos de *Musca domestica* y se le comparó con la actividad del aceite proveniente de la planta desarrollada en su hábitat natural (en el monte). La muestra vegetal creció bajo las condiciones de suelo y clima de Ibagué. Se encontró que el aceite no tiene actividad insecticida frente a la mosca, pero puede competir con productos comerciales por su potencial repelente, especialmente si se le cultiva bajo condiciones agronómicas controladas. Mediante análisis de CG-EM se determinaron los compuestos: 1,8-cineol, linalol, metilchavicol (estragol) y cinamato de metilo, éstos se encuentran reportados con una amplia gama de actividad biológica⁵⁴.

Los componentes del aceite esencial pueden tener efectos biológicos sinérgicos. Por ejemplo, el aceite de *Salvia lavanduleifolia* Vahl inhibe la enzima acetilcolinesterasa a través de una interacción compleja entre sus componentes, incluyendo interacciones sinérgicas y antagónicas. Este estudio muestra que un alto contenido de 1,8-cineol y un bajo contenido de alcanfor en el aceite pueden incrementar la actividad anticolinesterasa⁵⁵.

⁵³ TOVAR, Darleny. Identificación y cuantificación de los principales compuestos presentes en el aroma y el aceite esencial de las hojas de Orozul (*Phyla nodiflora* L. Greene). Pasto, 2007. Trabajo de grado (Químico). Universidad de Nariño. Programa de Química.

⁵⁴ MURILLO PEREA, Elizabeth; ALCOCER, Milena Raquel y CARDONA Mónica Patricia. Actividad repelente e insecticida del aceite esencial de albahaca canela (*Ocimum micranthum* Wild.) frente a la mosca casera (*Musca domestica* L.) en diferentes condiciones de cultivo. En: Fitotecnia colombiana, (2003). vol.3, no.1, p.84-92. Colombia. ISSN 0123-1286.

⁵⁵ SAVELEV, S. *et al.* Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. En: Pharmacol. Biochem. Behav. vol.75, p.661-668. Citado por: GONZALEZ-COLOMA, Azucena *et al.* Op. cit., p.609-616.

5. MARCO TEORICO

5.1 LA ALBAHACA (*Ocimum micranthum* Willd.)

5.1.1 Nomenclatura y taxonomía. “Su nombre científico es *Ocimum micranthum* Willd. Su sinonimia es *Ocimum campechianum* P. Mill. (Bases de datos estadounidenses como SIIT, GRIN y PLANTS), pero también se conoce como *Ocimum guatemalense* Gandoger⁵⁶. “Respecto a su nombre común, algunas sinonimias en español son: albacarón, albaca, albacar, albahaca de monte, hierba de toro⁵⁷.”

Ocimum micranthum o albahaca de monte, es una hierba tropical pariente de la albahaca domesticada. Sus categorías taxonómicas superiores son: Reino: Plantae; Subreino: Traquobionta (plantas vasculares); Superdivisión: Spermatophyta (plantas con semillas); División: Magnoliophyta (plantas con flor); Clase: Magnoliopsida (dicotiledóneas); Subclase: Asteridae; Orden: Lamiales⁵⁸. Pertenece a la familia de las Labiadas o Lamiáceas (de nombre científico *Labiatae* o *Lamiaceae*)⁵⁹.

Es una hierba aromática anual, usualmente de 50 cm de altura o menos. Tiene los tallos cuadrados, rojizos y a veces con pelitos (tallos pilosos). Las hojas son más o menos redondeadas y pequeñas, y sus bordes tienen diente-cillos. Sus flores son numerosas y blancas o lila pálido, dispuestas en racimos terminales... Originaria del sur de Estados Unidos de América a Sudamérica, habita en climas cálido a semicálido desde el nivel del mar hasta los 1500 m. Cultivada en solares con fin medicinal u ornamental, también presente en vegetación perturbada, crece a orillas de caminos en bosques tropicales caducifolio, cubcaducifolio, perennifolio y en matorral xerófilo⁶⁰.

⁵⁶ MARTINEZ, M. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura de México. Citado por: VIBRANS, Heike; HANAN, Ana María y MONDRAGÓN, Juana. En: *Ocimum micranthum* Willd. : ficha informativa. Edición actualizada 01-04-09. México. [En línea] [Citado 25-11-09] Disponible en internet: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/lamiaceae/ocimum-micranthum/fichas/ficha.htm>.

⁵⁷ STANDLEY, P. C. y WILLIAMS, L. O. Flora of Guatemala : *Fieldiana Botany* 24 (9/3 y 4). Citado por: VIBRANS, Heike; HANAN, Ana María y MONDRAGÓN, Juana. Op. cit.

⁵⁸ VIBRANS, Heike; HANAN, Ana María y MONDRAGÓN, Juana. *Ocimum micranthum* Willd : ficha informativa. [En línea]. Edición actualizada 01-04-09. México. [Citado 25-11-09]. Disponible en internet: URL:<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/lamiaceae/ocimum-micranthum/fichas/ficha.htm>.

⁵⁹ FERNÁNDEZ-POLA, J. Cultivo de plantas medicinales: aromáticas y condimenticias. Barcelona : Omega, 1996. p.32. ISBN 84-282-1067-5.

⁶⁰ BIBLIOTECA DIGITAL DE LA MEDICINA TRADICIONAL MEXICANA. Op. cit.

5.1.2 Generalidades. La albahaca se considera una planta aromática, ya que puede generar un producto aromático mediante algún proceso fisicoquímico, “entendiéndose por productos aromáticos a los que tienen un olor o un sabor determinado, sin evaluar su calidad comercial o estética”⁶¹. “El aceite esencial de albahaca contiene: estragol (-metilcavicol), acetato de linalol (C₁₀H₁₇.OC₂H₃O), o-cimeno, pineno, cineol (C₁₀H₁₈O eucaliptol), alcanfor (cetona C₁₀H₁₆O), linalol levógiro, eugenol, entre otros”⁶².

Si el cultivo se destina a la producción de aceite esencial, se recomienda interrumpir los riegos tras la aparición de los órganos florales los cuales se suprimen en cuanto aparecen, logrando aumentar en un 39 % el peso de la planta y en un 82 % el contenido de esencia. Para producción de aceite esencial, se debe recolectar en avanzada floración. Las plantas cosechadas en la mañana son más ricas en aceite esencial que las cosechadas en la tarde. Hay un incremento importante en las pérdidas al cosechar en horas de fuerte calor. No se debe secar la planta al aire libre, el secado debe ser rápido y a la sombra, con temperaturas entre los 35 y 40 °C. Esta planta normalmente demora más en secar que otras. Cuando la planta está seca, se pueden mondar las hojas⁶³.

En relación al rendimiento de cosecha, a partir de 10 ó 16 t/ha de planta fresca, se obtiene con el secado un 18 ó 20 % del peso inicial, y con el mondado de las hojas, sólo el 10 ó 12 %, respectivamente. En una buena cosecha se puede alcanzar un 50 % más de peso del indicado. El rendimiento en aceite esencial de hojas y tallos verdes oscila entre 0,024 y 0,08 % (y hasta 0,33 %). El contenido de esencia en el ápice floral puede llegar hasta el 0,45 %⁶⁴.

5.2 METABOLISMO VEGETAL

5.2.1 Metabolismo primario. El metabolismo primario de las plantas está constituido por rutas metabólicas, mediante las cuales sintetizan y utilizan, ciertos compuestos orgánicos, como azúcares, aminoácidos, ácidos grasos comunes, nucleótidos y polímeros derivados de ellos (polisacáridos, proteínas, lípidos, DNA,

⁶¹ INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN DE RECURSOS BIOLÓGICOS ALEXANDER VON HUMBOLDT. Estudio del mercado colombiano de aceites esenciales. Biocomercio sostenible. Bogotá: Colombia, 2003. 109 pp. Archivo PDF: MERCADO NACIONAL DE ACEITES ESENCIALES.pdf von Humboldt (carpeta búsqueda_pdf) [En línea] [Citado 16-11-08] Disponible en internet: <http://www.humboldt.org.co> (palabras clave: Aceites Esenciales, Biocomercio Sostenible, Mercados).

⁶² FERNÁNDEZ-POLA, J, Op. cit., p.33.

⁶³ Ibid., p.33.

⁶⁴ Ibid., p.33.

RNA, etc.). Estos compuestos son los metabolitos primarios y son fundamentales para la supervivencia de los organismos vegetales⁶⁵.

5.2.2 Metabolismo secundario. Las rutas del metabolismo primario son similares en todos los organismos vivos, sin embargo, las plantas pueden seguir las rutas del metabolismo secundario que llevan a la formación de compuestos inherentes a un grupo taxonómico determinado (especie, género, familia o grupo estrechamente relacionado de familias), dichos compuestos se conocen como metabolitos secundarios. La biosíntesis de estos compuestos puede estar sujeta a estados específicos de desarrollo de la planta, a periodos de estrés causados por la deficiencia de nutrientes o el ataque de microorganismos⁶⁶.

5.2.3 Importancia del metabolismo secundario. Cuando la expresión del metabolismo secundario es una característica de la especialización celular, indica que la formación del compuesto secundario, respecto del compuesto primario, no tiene una importancia directa para la célula productora. Sin embargo, el compuesto secundario puede ser importante para la planta en general, ya que muchos metabolitos secundarios tienen un papel fundamental en las relaciones ecológicas, entre la planta productora y los otros organismos de su ámbito natural. Ejemplo de estas relaciones son: la alelopatía (pigmentos que atraen a los insectos polinizadores o compuestos que inhiben el crecimiento de otros organismos), producción de fitoalexinas (protegen a la planta contra infecciones) o disuasorios nutritivos (protegen contra los depredadores)⁶⁷.

El metabolismo secundario vegetal es una fuente importante de principios activos de medicamentos y de otros valiosos productos químicos (por ejemplo, esencias, colorantes, insecticidas y aditivos nutritivos). Otros compuestos secundarios como los esteroides (constituyentes de las biomembranas), la lignina (polímero estructural), las fitohormonas derivadas del indol, las giberilinas, el ácido abscísico y las citoquininas, entre otros, son esenciales para las plantas y por su importancia fisiológica se deben considerar compuestos primarios⁶⁸.

5.2.4 Terpenos. El término terpeno se usa en un amplio sentido para designar todos los compuestos con una estructura particular y relacionada químicamente a la molécula simple C_5H_8 , y en un sentido más restringido para designar compuestos con 10 átomos de carbono derivados de $C_{10}H_{16}$. Hay una posible

⁶⁵ PIÑOL, María Teresa; PALAZÓN, Javier y CUSIDÓ, Rosa María. Capítulo 17 : Introducción al metabolismo secundario. En: AZCON-BIETO, Joaquín y TALÓN, Manuel. Fundamentos de fisiología vegetal. Madrid, España : McGraw Hill Interamericana, 2000. p. 261-283.

⁶⁶ Ibid.

⁶⁷ Ibid.

⁶⁸ Ibid.

confusión con la designación general, los miembros del grupo C_{10} son frecuentemente referidos como monoterpenos. Hay compuestos que tienen una conexión más distante con los terpenos, pero siguen teniendo características que los vinculan con las estructuras terpénicas, a veces son llamados terpenoides o isoprenoides. Tomando como unidad de terpeno, dos unidades de isopreno, se distingue entre monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}), tetraterpenos (C_{40}), politerpenos ($C>40$)⁶⁹.

Los terpenos se encuentran principalmente en plantas, y se recuperan en forma de aceite esencial a partir de flores, hojas o frutos, sometidos a destilación con vapor de agua. El olor y sabor de muchos terpenos, son característicos y se utilizan en perfumería o en la industria alimentaria⁷⁰. La mayor parte de estructuras terpénicas se han descrito en las plantas superiores, pero también las plantas inferiores, los animales u organismos procariotas pueden sintetizarlas⁷¹.

5.3 ACEITE ESENCIAL

5.3.1 Definición. “Parte del metabolismo de un vegetal compuesto generalmente por terpenos, que están asociados o no a otros compuestos, la mayoría de ellos volátiles y que generan en conjunto el olor de dicho vegetal” (Bandoni). “Mezcla de componentes volátiles producto del metabolismo secundario de las plantas en cuya composición interviene una porción de hidrocarburos de la serie polimetilénica del grupo de los terpenos que responden a la fórmula $(C_5H_8)_n$ junto con otros compuestos casi siempre oxigenados (alcoholes, ésteres, éteres, aldehídos y compuestos fenólicos) que son los que transmiten a los aceites el aroma que los caracteriza” (Stashenko, E.)⁷².

“Los aceites esenciales son sustancias vegetales que se encuentran en la célula en forma de pequeñas gotitas muy refringentes que se unen y forman gotas mayores. También se presenta este fenómeno, cuando se desintegran las paredes celulares y los protoplastos”⁷³.

El aceite contenido en las plantas, ocasionalmente se encuentra combinado, por ejemplo, mezclas de terpenos y sesquiterpenos; alcoholes de cadena abierta y

⁶⁹ GUENTHER, Ernest. The essential oils : (volumen uno) History - Origin in plants – Production – Analysis. Princeton (Nueva Jersey) : Van Nostrand, 1948. vol.1, p.19.

⁷⁰ TERPENOS. En: Microsoft® Student 2008 [DVD]. Microsoft Corporation, 2007.

⁷¹ PIÑOL, María Teresa; PALAZÓN, Javier y CUSIDÓ, Rosa María. Op. cit.

⁷² INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN DE RECURSOS BIOLÓGICOS ALEXANDER VON HUMBOLDT. Op. cit.

⁷³ NULTSCH, Wilhelm. Botánica general : manual para médicos y naturalistas. Catedrático de Botánica de la Universidad de Marburg. Barcelona : Omega, 1975. ISBN 84-282-0431-4. p.88.

aldehídos; alcoholes aromáticos (serie alcanfor) y sus cetonas; alcoholes aromáticos (serie benceno) y sus aldehídos, entre otros. “Muchos de estos compuestos actúan como antisépticos, desinfectantes, repelentes de insectos e insecticidas”⁷⁴.

5.3.2 Clasificación del aceite esencial. Según el grado de calidad, el aceite esencial se puede clasificar en dos grandes grupos: los aceites esenciales crudos o de baja calidad y los aceites esenciales purificados o refinados que son de alta calidad. A los aceites esenciales crudos no se les ha agregado mayor valor y se utilizan como materia prima para velas, pebeteros, artículos de aseo y limpieza e incluso insecticidas, papelería o juguetería de plástico. Los aceites esenciales purificados o de alta calidad, tienen el mayor valor agregado y son utilizados en la industria alimenticia, farmacéutica, cosmética y de perfumes⁷⁵.

Los aceites esenciales también se pueden clasificar de acuerdo a su origen como: naturales, artificiales y sintéticos, los naturales se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, debido a su bajo rendimiento son muy costosos. Los artificiales se obtienen a través del enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes. Los aceites esenciales sintéticos como su nombre lo indica son los producidos por la combinación de varios componentes, que en la mayoría de los casos se han obtenido previamente por procesos de síntesis química⁷⁶.

Conforme al tipo de grupo mayoritario de terpenos, los aceites esenciales se pueden clasificar de la siguiente manera: los aceites esenciales ricos en monoterpenos se denominan aceites esenciales monoterpenoides, los ricos en sesquiterpenos son llamados aceites esenciales sesquiterpenoides y aquellos ricos en fenilpropanos se denominan aceites esenciales fenilpropanoides⁷⁷.

5.3.3 Composición de aceite esencial natural. En una planta, la composición del aceite esencial puede ser afectada por el ciclo circadiano. El ciclo circadiano hace referencia a un periodo de aproximadamente 24 horas y se aplica a ciertos fenómenos biológicos que ocurren rítmicamente alrededor de la misma hora. Por ejemplo, el aceite esencial del jazmín a las siete de la mañana contiene 0,6 %

⁷⁴ VERGARA RUÍZ, Rodrigo. Utilización de extractos de plantas en la producción de cultivos en Colombia : análisis de su desarrollo. Profesor asociado Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín – Facultad de Ciencias Agropecuarias. s.f. En: ARANGO MARÍN, Mario. Op. cit.

⁷⁵ INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN DE RECURSOS BIOLÓGICOS ALEXANDER VON HUMBOLDT. Op. cit.

⁷⁶ MARTINEZ, Alejandro. Aceites esenciales. Universidad de Antioquia -Facultad de Química Farmacéutica [CD]. Medellín, Febrero 2003.

⁷⁷ Ibid.

indol y 6,0 % linalol, a la una de la tarde contiene 0,3 % y 25,0 %, y a las siete de la noche contiene 0,4 % y 13,0 % respectivamente⁷⁸.

La composición del aceite esencial obtenido a partir de una planta, también depende del quimiotipo. El quimiotipo está determinado por el compuesto mayoritario o los compuestos mayoritarios del aceite esencial. Por ejemplo, algunos de los quimiotipos de albahaca son: aceite de albahaca europeo (metilchavicol y linalol), aceite de albahaca reunión (alta concentración de metilchavicol), aceite de albahaca tropical (rica en metilcinamato) y aceite de albahaca del norte de África y la antigua USSR (rica en eugenol)⁷⁹.

5.4 CONTROL DE CALIDAD DE ACEITES ESENCIALES

Entre los principales parámetros analíticos que se tienen en cuenta en la determinación de la calidad de un aceite esencial, se encuentran: las características organolépticas, determinaciones físicas e índices químicos.

5.4.1 Características organolépticas. Entre ellas se encuentran el olor, la apariencia y el color. El análisis organoléptico contribuye a la detección de adulteraciones y a determinar la calidad del aceite esencial. En este tipo de pruebas se compara el aceite esencial problema, con un aceite de alta calidad o un "tipo" de aceite de pureza conocida. Una gota o dos del aceite en cuestión se colocan en una tira de papel absorbente; la misma cantidad del "tipo" de aceite puro es colocada en una segunda tira; y las dos se sostienen juntas perpendicularmente por medio de unos clips. El olor de los dos aceites debe ser cuidadosamente estudiado y comparado a intervalos. Mediante este análisis se puede detectar "por notas", el defecto de ahumado ocasionado por una destilación inadecuada, o el solvente residual, cuando la extracción se ha realizado por ese método. Los datos del análisis se comparan con análisis previos y datos publicados, para determinar el grado de pureza y calidad del aceite esencial⁸⁰.

5.4.2 Determinaciones físicas. Principalmente: densidad (gravedad específica), poder rotatorio, índice de refracción, miscibilidad en etanol, punto de congelación, punto de inflamación y rango de destilación. Algunos de estos valores se emplean para descubrir diversos tipos de adulteración. Por ejemplo, un valor bajo para el índice de refracción y para la gravedad específica en aceite de linaloe, sugiere adulteración con alcohol etílico. Si el valor de la gravedad específica de un aceite,

⁷⁸ INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN DE RECURSOS BIOLÓGICOS ALEXANDER VON HUMBOLDT. Op. cit.

⁷⁹ Ibid.

⁸⁰ GUENTHER, Ernest. Op. cit., p.231-244.

es < 1 , es probable que agua residual se encuentre al fondo del envase junto con precipitados de óxido u otro tipo de impurezas; si el valor es > 1 , el agua presente puede aparecer como una capa sobrenadante. El valor de la gravedad específica para los aceites esenciales, está entre 0,696 y 1,188 a 15 °C. En general la gravedad específica es $< 1,000$ ⁸¹.

Al determinar la rotación óptica, el ángulo de rotación depende de la naturaleza del líquido, la longitud de la columna a través de la cual pasa la luz, la longitud de onda de la luz usada y la temperatura. Tanto el grado de rotación como su dirección son importantes criterios de pureza. Para indicar la dirección de la rotación se emplea el signo (+) para dextro-rotación (a la derecha) y el signo (-) para levo-rotación (a la izquierda). No obstante, el uso de la rotación específica y del índice de refracción, no se recomienda para aceites esenciales, ya que son mezclas complejas de compuestos, aunque cumplen un papel importante en la detección de estructuras para el caso de constituyentes individuales de un aceite esencial luego de su separación y purificación⁸².

La determinación de la solubilidad es una rápida y conveniente ayuda en la evaluación de la calidad de un aceite. En general, los aceites ricos en constituyentes oxigenados son más solubles en dilución de alcohol que los aceites ricos en terpenos. Las adulteraciones con material relativamente insoluble afecta enormemente la solubilidad del aceite. La solubilidad del aceite, también puede cambiar con el tiempo. La polimerización es usualmente acompañada de una disminución de la solubilidad. Dicha polimerización puede ser muy rápida si el aceite contiene una gran cantidad de terpenos fácilmente resinificables. El almacenamiento inadecuado puede apresurar la polimerización; factores como la luz, aire, calor y la presencia de agua, usualmente ejercen una influencia desfavorable. Ocasionalmente, la solubilidad de un aceite llega a mejorar con el tiempo⁸³.

5.4.3 Índices químicos. Por ejemplo, índice de acidez, Índice de éster, índice de saponificación, índice de acetilo e índice de fenoles. En la determinación de éster, todo el material saponificable es calculado como cierto éster, sin tener en cuenta el hecho incuestionable, de que otros ésteres estén presentes o que otros constituyentes sean capaces de saponificar, de todos modos el índice calculado no pierde valor para los propósitos prácticos⁸⁴.

⁸¹ GUENTHER, Ernest. Op. cit., p.231-244.

⁸² Ibid., p.231-244.

⁸³ Ibid., p.231-244.

⁸⁴ Ibid., p.231-244.

El índice de acidez frecuentemente incrementa con el tiempo, especialmente si el aceite es almacenado de forma inadecuada; procesos tales como la oxidación de aldehídos y la hidrólisis de ésteres incrementan el índice de acidez⁸⁵. El comprador también puede exigir pruebas físico-químicas específicas para cada aceite con el fin de identificar el porcentaje en que se encuentra su (s) componente (s) característico (s) o principal (es), por ejemplo en el caso del aceite esencial de eucalipto se determina el porcentaje de cineol⁸⁶.

5.5 METODOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES

El término extraer, hace referencia a obtener uno de los componentes de un cuerpo por la acción de disolventes u otros medios. “El aceite esencial se puede obtener por alguno de los siguientes métodos: destilación (hidrodestilación), enfleurage, maceración, extracción con solventes, expresión y extracción con fluidos supercríticos, principalmente”^{87,88,89}.

Para la extracción de aceite esencial a partir de flores, los procesos más empleados son el enfleurage, la maceración y la extracción con solventes volátiles. Cuando se quiere extraer el aceite esencial a partir de cáscaras, como en el caso de los cítricos, entonces el método más empleado es la extracción por prensado, también conocida como “expresión”. A continuación se describe la hidrodestilación, uno de los procedimientos más empleado para extraer el aceite esencial por su versatilidad respecto al tipo de material vegetal empleado.

5.5.1 Destilación de aceites esenciales (hidrodestilación). La destilación puede definirse como la separación de los componentes de una mezcla de dos o más líquidos por virtud de la diferencia en su presión de vapor. Se pueden considerar tres tipos de destilación:

a) Destilación con agua. El material está en contacto directo con el agua hirviendo. El agua hierve al aplicarle calor por alguno de los métodos usuales: fuego directo, chaquetas de vapor, serpentines de vapor cerrados o perforados⁹⁰.

b) Destilación con agua – vapor. La materia prima está en una rejilla a cierta distancia del fondo del destilador, el cual se llena con agua hasta un nivel por

⁸⁵ GUENTHER, Ernest. Op. cit., p.231-244.

⁸⁶ INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN DE RECURSOS BIOLÓGICOS ALEXANDER VON HUMBOLDT. Op. cit.

⁸⁷ GUENTHER, Ernest. Op. cit., p.88.

⁸⁸ MARTINEZ, Alejandro. Op. cit.

⁸⁹ SÁNCHEZ CASTELLANOS, Francisco J. Extracción de aceites esenciales. En: CONGRESO INTERNACIONAL DE PLANTAS MEDICINALES Y AROMÁTICAS. (2do.:2006:Bogotá). Memorias del segundo congreso internacional de plantas medicinales y aromáticas, Universidad Nacional de Colombia. 2006. p.8.

⁹⁰ GUENTHER, Ernest. Op. cit., p.88.

debajo de la rejilla. El agua no entra en contacto directo con la materia prima, es el vapor saturado y húmedo de baja presión (nunca sobrecalentado), el que entra en contacto con el material⁹¹.

c) Destilación con vapor. El vapor se genera en una caldera aparte, y luego es inyectado en el destilador, sin llenar el fondo del destilador con agua. El vapor vivo, saturado o sobrecalentado (frecuentemente a una presión superior a la atmosférica), se inyecta a través de serpentines o cilindros perforados que se encuentran bajo la carga, y avanza hacia arriba a través de la carga que está sobre la rejilla de soporte⁹².

5.5.2 Extracción con fluidos supercríticos. Es el método 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, bióxido 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 presiones⁹³.

5.5.3 Estandarización. También es importante aclarar en este punto el concepto de proceso de estandarización, éste no es un proceso industrial como tal, pero teniendo en cuenta la exigencia de parámetros fijos en la industria, es un procedimiento que ayuda a homogenizar y normalizar la calidad de un producto, cuyas características carecen de uniformidad por el número de factores que la afectan (como el origen, año y época de cosecha)⁹⁴.

5.6 METODOS INSTRUMENTALES DE ANALISIS

5.6.1 Cromatografía de gases (CG). La cromatografía de gases es un método de separación en el cual los componentes de una mezcla se reparten entre dos fases: la fase estacionaria (líquida), que posee una superficie de exposición muy grande y la otra, la fase móvil, que es un gas que circula en contacto con la fase

⁹¹ GUENTHER, Ernest. Op. cit., p.88.

⁹² Ibid.

⁹³ MARTINEZ, Alejandro. Op. cit.

⁹⁴ INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN DE RECURSOS BIOLÓGICOS ALEXANDER VON HUMBOLDT. Op. cit.

estacionaria. La muestra se vaporiza en el sistema de inyección y es transportada por la fase móvil gaseosa (gas carrier) a través de la columna. La distribución de los componentes de la muestra en la fase estacionaria, se basa en sus diferentes solubilidades en esta fase a una temperatura dada. Por lo tanto, los componentes de la mezcla (solutos o analitos) se separan entre sí, en base a sus presiones de vapor relativas y de acuerdo a sus afinidades con la fase estacionaria. Este tipo de proceso cromatográfico se denomina elución⁹⁵.

Los principales componentes en un sistema de cromatografía gaseosa son: la fuente de gas portador, el sistema de inyección, el horno que contiene la columna, el detector y el sistema de registro e integración. Un cromatógrafo de gases funciona de la siguiente forma: un gas inerte fluye en forma continua desde un cilindro de gas a través del inyector, la columna y el detector. La velocidad de flujo del gas carrier se controla para asegurar tiempos de retención reproducibles y minimizar las variaciones y ruidos en el detector. La muestra se inyecta (normalmente con una microjeringa) en el inyector que se encuentra a alta temperatura donde se vaporiza y es transportada a la columna, en general de 15 a 30 m de largo, cubierta en la parte interior por un film de un líquido de alto punto de ebullición (la fase estacionaria). La muestra se reparte entre la fase móvil y la estacionaria de modo que los componentes individuales se separen en base a su solubilidad relativa en la fase líquida y sus presiones de vapor relativas⁹⁶.

Luego de la columna, el gas carrier y la muestra pasan a través de un detector, donde se mide la cantidad de cada componente y se genera una señal eléctrica. Esta señal se transmite a un sistema de registro e integración, el cual genera un cromatograma que representa un registro del análisis (Fig. 1). En la mayor parte de los casos, el sistema integra automáticamente el área de cada pico, realiza los cálculos e imprime un reporte con los resultados cuantitativos y los tiempos de retención. Para que las muestra puedan ser analizadas por cromatografía gaseosa deben cumplir con las siguientes características: ser gases, líquidos o sólidos, con un peso molecular entre 2 a 400 unidades de masa aproximadamente, para valores mayores se requieren técnicas especiales. Pueden ser compuestos orgánicos o inorgánicos y la muestra debe ser volátil o susceptible de ser transformada en volátil⁹⁷.

La cromatografía de gases es una técnica eficiente de alta resolución que requiere muestras pequeñas (μl), tiene alta sensibilidad (ppm o ppb). Tiene alta velocidad de análisis, con buena exactitud y su manejo es bien conocido aunque se requiere de experiencia. Entre las limitaciones de esta técnica se encuentra

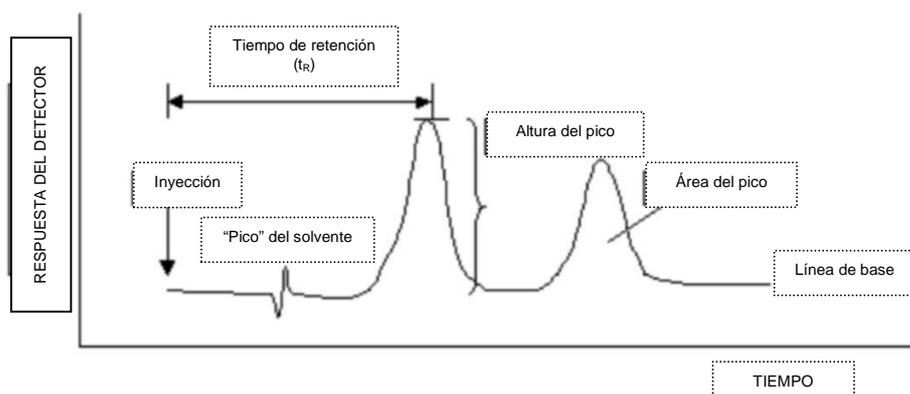
⁹⁵ LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA Y PRODUCTOS NATURALES. Departamento de Química Orgánica - Facultad de Química – Universidad de Nariño [CD].

⁹⁶ Ibid.

⁹⁷ Ibid.

que la muestra debe ser volátil y no termolábil, además se requiere otro sistema de detección para confirmar la identificación, por ejemplo, la espectrometría de masas⁹⁸.

Figura 1. Parámetros de un cromatograma.



Fuente: Laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales. Departamento de Química Orgánica. Facultad de Química. Universidad de Nariño.

a) Análisis cualitativo. El objetivo de este análisis es identificar los compuestos presentes en la muestra. Se requiere comparar los tiempos de retención del problema ($t_{R,x}$) con los de estándares ($t_{R,s}$). Además, se debe complementar información estructural con métodos espectroscópicos⁹⁹.

Correlación entre CG-EM e Índices de retención lineal (Kovats). Para asegurar la plena identificación en mezclas complejas, es preciso confrontar los tiempos de retención (T_r) de los componentes de la muestra, con los índices de Kovats (I_k) y la confirmación por CG-EM, que relaciona la estructura de la molécula y su patrón de fragmentación determinados por las condiciones experimentales y sobre todo por la estructura molecular¹⁰⁰.

Los I_k indican el orden en que eluyen los compuestos de interés, respecto a parafinas lineales. Las condiciones de temperatura son un factor determinante para esta comparación. Si se usa rangos de temperatura programada, los T_r aumentan en forma lineal con el número de carbonos. Cuando se cromatografía una serie homóloga de n -hidrocarburos, las fuerzas intermoleculares son relativamente constantes y la separación está controlada fundamentalmente por

⁹⁸ LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA Y PRODUCTOS NATURALES. Op. cit.

⁹⁹ Ibid.

¹⁰⁰ Ibid.

las diferencias en la presión de vapor (relacionada con los puntos de ebullición)¹⁰¹.

Para mezclas con un rango amplio de puntos de ebullición, se prefiere trabajar en condiciones de temperatura programada. En estas condiciones, los tiempos de retención de una serie homóloga aumentan en forma lineal con el número de carbonos y la ecuación que los relaciona tiene la siguiente expresión¹⁰²:

$$I_x^s = 100N + 100n \left(\frac{t_{R,x} - t_{R,N}}{t_{R,(N+n)} - t_{R,N}} \right)$$

I_x^s = índice de retención para el componente "x" en la fase estacionaria "s".

N = número de átomo de carbono del n-alcano menor.

n = diferencia en número de átomos de carbono de los n-alcanos entre los que se encuentra el componente.

$t_{R,x}$, $t_{R,N}$, $t_{R,(N+n)}$ = tiempos de retención del componente x, y los n-alcanos entre los que se encuentra este componente.

La ventaja de los índices de Kovats isotermos es que sólo dependen de la fase estacionaria y de la temperatura, lo que simplifica la comparación de valores entre laboratorios. En contraste, los índices en condiciones de temperatura programada, requieren una especificación precisa de las condiciones operativas incluyendo dimensiones de la columna, tipo de gas carrier, velocidad de flujo y programa de temperatura. Sin embargo, los índices de temperatura programada son los más utilizados. Normalmente los índices se determinan también para dos fases estacionarias de diferente polaridad y evitando posibles confusiones para componentes que presenten un mismo tiempo de retención (solapamiento) en una de las fases empleadas¹⁰³.

¹⁰¹ GUZINOWICS, B. y GUZINOWICS, M. Fundamentals of integrated GC. [En línea] [Citado 30-01-05]. Disponible en internet: <http://www.The-integratedG-C/Msanalyticaldystem-serier.htm>. Citado por: TOVAR, Darleny. Identificación y cuantificación de los principales compuestos presentes en el aroma y el aceite esencial de las hojas de Orozul (*Phyllanthus nodiflora* L. Greene). Pasto, 2007. Trabajo de grado (Químico). Universidad de Nariño. Programa de Química.

¹⁰² LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA Y PRODUCTOS NATURALES. Op. cit.

¹⁰³ Ibid.

b) Análisis cuantitativo. El objetivo es determinar la concentración de los componentes presentes en la muestra. Se realiza un cálculo por altura de pico y por área de pico, mediante estos procedimientos¹⁰⁴:

- Normalización simple de área. En este procedimiento se asume que cada pico tiene el mismo factor de respuesta en el detector, y que las áreas de los picos considerados representan el 100 % del área. Es el método más empleado para reportar la concentración de compuestos en el estudio de los aceites esenciales¹⁰⁵.

- Normalización del área mediante el cálculo de los factores de respuesta. En este caso se asume la disposición de los diferentes componentes que deben ser cuantificados, para analizarlos separadamente y determinar sus factores de respuesta¹⁰⁶.

- Uso de estándar externo. En este caso los factores de respuesta se calculan por normalización del área de cada pico con relación al pico de referencia; para esto se traza una curva de calibración utilizando un estándar de referencia, luego se analiza la muestra con el componente en cantidad desconocida. El procedimiento requiere reproductibilidad en la inyección de cada muestra y es más usado en HPLC que en cromatografía gaseosa¹⁰⁷.

- Uso de estándar interno. Se preparan e inyectan muestras del estándar interno y del analito de interés y luego se grafica una curva de calibración utilizando el estándar interno. Para ello se hace un agregado exacto del estándar interno a la muestra desconocida, se realiza la cromatografía de la mezcla, luego se calcula la relación de áreas, determinando la relación de concentraciones y los factores de respuesta a partir de la curva de calibración. Por último se determina la concentración del analito problema. Se requiere que el compuesto empleado como estándar sea puro, no se encuentre en la muestra problema y su concentración sea similar a la de los componentes que se desea cuantificar, además, los picos deben estar bien resueltos en las condiciones de CG utilizadas¹⁰⁸.

5.6.2 Espectrometría de masas (EM). Es un método de análisis químico rápido, sensible que permite la máxima información sobre la estructura molecular con la mínima cantidad de muestra ($10^{-6} - 10^{-14}$ g). El espectrómetro de masas consta de un sistema de entrada, una fuente iónica, un analizador y un sistema de detección con registro computarizado. La función del sistema de entrada es la volatilización

¹⁰⁴ LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA Y PRODUCTOS NATURALES. Op. cit.

¹⁰⁵ Ibid.

¹⁰⁶ Ibid.

¹⁰⁷ Ibid.

¹⁰⁸ Ibid.

de la muestra, para una posterior ionización en la cámara de ionización, una separación de iones según la relación masa/carga en el analizador, su colección y análisis con el detector y finalmente su almacenamiento en la memoria del computador¹⁰⁹.

5.7 ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN LOS EXTRACTOS VEGETALES

Según las aplicaciones los pesticidas, pueden ser: insecticidas, herbicidas, acaricidas, fungicidas, miticidas, rodenticidas, defoliantes, nematocidas, anticriptogámicos, entre otros. Principalmente los pesticidas se emplean contra plagas de insectos, lo que ha generalizado el nombre de insecticidas, sin desconocer el efecto que pueda tener sobre otro tipo de plagas, por ello, es importante conocer algunas definiciones:

Biocida. Es un término que indica el amplio conjunto de sustancias capaces de destruir la vida en general, que también suele denominarse “pesticidas”, aunque en origen son productos fabricados para luchar contra los parásitos animales y vegetales de los cultivos¹¹⁰.

Insecticida. Por definición, un insecticida es aquella sustancia o mezcla de sustancias que ejercen su acción biocida debido a la naturaleza de su estructura química¹¹¹. Se cree que el primer producto usado como insecticida vegetal fue el tabaco molido, mezclado con agua y cal, en 1763; en 1809 se aisló su principio activo, en 1828 se conoció que era un alcaloide y en 1904 fue sintetizado por Pictet y Rotachy¹¹².

Algunas de las principales actividades biológicas relacionadas con extractos vegetales, se describen a continuación:

- **Repelentes.** Las plantas tratadas resultan atractivas, impalatables u ofensivas. Algunos extractos con este principio son: aceites esenciales de citronela, alcanfor, terpenos, quinonas y fenoles entre otros. “Un repelente es una sustancia química o mezcla de ellas, que actuando en fase gaseosa causa en el insecto movimientos de orientación que los alejan de su fuente de alimento”¹¹³.
- **Atrayentes.** Ciertos químicos presentes en las plantas pueden ser usados para reorientar los insectos plagas hacia sitios de alimentación u oviposición diferentes al cultivo que se pretende proteger como ocurre con Isothiocianatos contra plagas

¹⁰⁹ GUZINOWICS, B. y GUZINOWICS, M. Op. cit.

¹¹⁰ HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ, Santiago. Op. cit.

¹¹¹ SILVA AGUAYO, Gonzalo *et al.* Op. cit.

¹¹² VERGARA RUÍZ, Rodrigo. Op. cit.

¹¹³ ALZOGARAY, R.; FONTAN A. y ZERBA E. Repellency of deet to nymphs of *Triatoma infestans*. 2000. En: *Med. Vet. Entomol.* (Oxford). vol.14, p.6-10. Citado por: RICCI, Mónica *et al.* Op. cit., p.256-263.

de crucíferas; trimedlure, azúcar y melazas contra moscas de las frutas, fenilacetaldehído contra lepidópteros y geraniol, eugenol y fenil-etil propionato contra coleópteros¹¹⁴.

▪ *Químico-esterilizantes*. Varios aceites esenciales extraídos de eucaliptos, casias, anís, clavo, limoncillo, acorus, neem, etc., tienen acción esterilizante y ovicida en varios insectos dañinos¹¹⁵.

▪ *Hormonas juveniles*. El juvadeceno descubierto en las raíces de *Macropiper excelsum* y los juvociminos I y II encontrados en el aceite destilado de *Ocimum basilicum*; todas estas citas las toma Camps (1988) de diversos autores y además anota que los juvociminos tienen frente a los insectos una actividad mayor que la de las hormonas juveniles naturales, pudiendo llegar a inducir efectos morfogénicos en las últimas fases de ciertos hemípteros en dosis del orden de picogramos [10^{-12}]¹¹⁶.

5.8 LOS AFIDOS

“Los áfidos o “pulgonos” como comúnmente se los conoce constituyen un grupo de gran importancia económica para el hombre, ya que por los daños que causan, generan enormes pérdidas económicas en la agricultura. Pertenecen al orden Hemiptera, suborden Homoptera y forman la superfamilia Aphidoidea”¹¹⁷.

El ciclo de vida de los áfidos es poco común y complejo. En las zonas nórdicas pasan el invierno en estado de huevo; estos huevos eclosionan en la primavera en hembras que se reproducen partenogenéticamente dando lugar a una progenie vivípara o sea que deposita ninfas. En esta estación se producen varias generaciones de hembras vivíparas, por lo general las dos primeras generaciones generalmente consisten de individuos ápteros y hacia el final se producen individuos alados¹¹⁸.

“En muchas especies estas formas aladas migran a una planta huésped diferente y el proceso reproductivo continúa. Hacia el final del verano los áfidos migran de nuevo a su

¹¹⁴ ALZOGARAY, R.; FONTAN A. y ZERBA E. Repellency of deet to nymphs of *Triatoma infestans*. 2000. En: Med. Vet. Entomol. (Oxford). vol.14, p.6-10. Citado por: RICCI, Mónica *et al.* Op. cit., p.256-263.

¹¹⁵ Ibid.

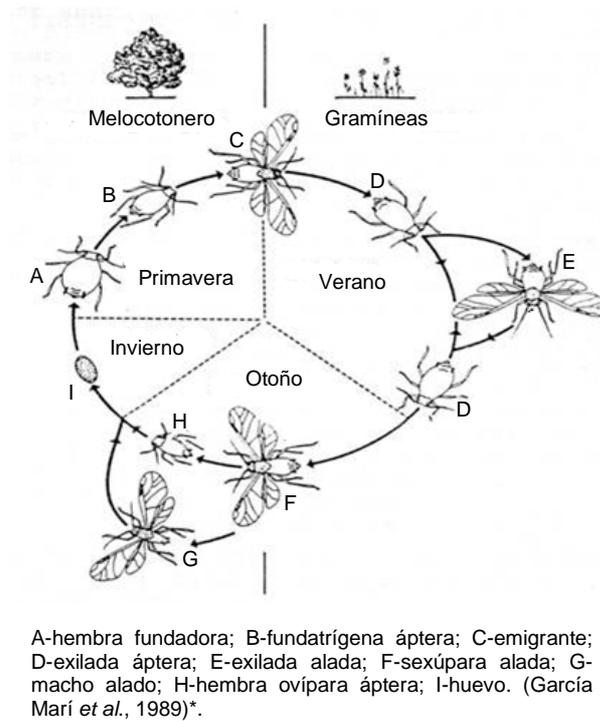
¹¹⁶ VERGARA RUÍZ, Rodrigo. Op. cit.

¹¹⁷ INFOAGRO. Control de áfidos o pulgonos. [En línea] [Citado 13-01-10]. Disponible en internet: <http://www.infoagro.com/hortalizas/pulgonos.htm>.

¹¹⁸ Ibid.

planta huésped original y producen una generación de machos y hembras los cuales copulan y depositan huevos pasando el invierno en este estado”¹¹⁹.

Figura 2. Ciclo biológico de un áfido o pulgón.



Fuente: SUPERFAMILIA APHIDOIDEA. [En línea] [Citado10-01-10] Disponible en internet: http://ocwus.us.es/producción-vegetal/sanidad-vegetal/sanidad_vegetal/tema%2010_html/Page_17.htm.

Sin embargo, en el trópico la reproducción de los áfidos es permanente y no se producen machos, ni las hembras ponen huevos. Las generaciones son partenogenéticas y solo hay migración de huéspedes primarios hacia secundarios a través de la producción de formas aladas. Las poblaciones que se producen por este sistema de reproducción son muy altas. La dispersión ocurre cuando por carencia de alimento o aglomeración en las colonias se producen las formas aladas¹²⁰.

¹¹⁹ BORROR, D.J. Y DeLONG, D.M. An introduction to the study of insects. Holt Rinehart and Winston. Nueva York. 3ª ed. 1971, p.812. Citado por: BUSTILLO, Alex y SANCHEZ, Guillermo. Los áfidos en Colombia : plagas que afectan los cultivos de importancia económica. Colombia : Colciencias. Sección de Producción de Medios – ICA. s.f. Instituto Colombiano Agropecuario. Subgerencia de investigación. División de Agronomía.

¹²⁰ BUSTILLO, Alex y SANCHEZ, Guillermo. Los áfidos en Colombia : plagas que afectan los cultivos de importancia económica. Colombia : Colciencias. Sección de Producción de Medios – ICA. s.f. Instituto Colombiano Agropecuario. Subgerencia de investigación. División de Agronomía.

Dentro del ciclo de vida en climas templados, los áfidos frecuentemente alternan entre hospederos primarios y secundarios, además producen un gran número de formas. Hay muchas variaciones en este ciclo, dependiendo de las especies de áfidos y del clima. Por ejemplo, algunos pueden invernar como formas vivíparas partenogenéticas. Algunos pueden pasar todo su ciclo de vida sobre una especie hospedera o varias especies dentro de un género¹²¹.

Los áfidos producen daños en varias formas:

- Succionando la savia de las plantas ocasionan el enroscamiento de los nuevos brotes o la formación de agallas en los tallos y raíces.
- Algunas especies secretan sustancias que son tóxicas a las plantas.
- La mayoría de los áfidos debido a sus secreciones azucaradas están asociados a hormigas y hongos como el *Capnodium* que producen la “fumagina”, interfiriendo con el normal desarrollo del proceso de la fotosíntesis en las plantas.
- El hecho más importante de este grupo es su capacidad para transmitir enfermedades virales de una planta a otra¹²².

“Las especies de mayor importancia económica por el número de enfermedades que pueden transmitir son: *Aphis gossypii* Glover, *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas), *Myzus persicae* (Sulzer) y *Aulacorthum solani* (Kaltenbach)”¹²³.

5.8.1 *Myzus persicae*. Se conoce también como el pulgón verde del melocotonero y la patata, tiene un tamaño de 1,2 a 2,3 mm y es de color verde amarillento, con sifones verdes, largos y dilatados. Los tubérculos frontales tienen la característica forma en W. Frecuentemente, aparecen hembras aisladas con muy pocos descendientes que tienden a dispersarse¹²⁴.

Myzus persicae es un insecto muy polífago que tiene una amplio rango de especies hospederas secundarias, produciendo importantes daños directos e indirectos sobre los cultivos, destacando tomate, pepino, patata, tabaco y muchos otros cultivos vegetales. Es capaz de transmitir más de 100 virosis, aunque rara vez aparece en grandes cantidades para causar daño directo debido a su actividad alimenticia¹²⁵.

¹²¹ MATTHEUS, R.E.F. Plant virology : Department of Cellular and Molecular Biology, Universidad de Auckland. 3ed. Estados Unidos de América : Academic Press, 1991. ISBN 0-12-480553-1.

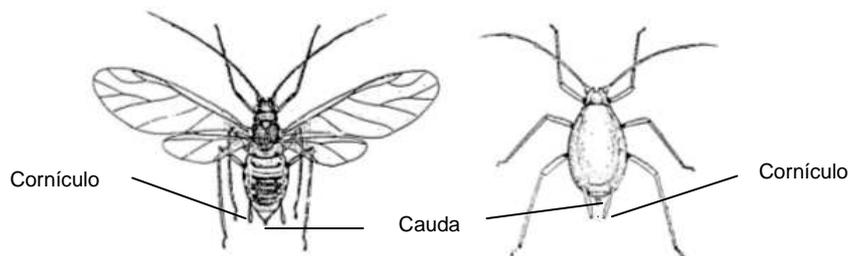
¹²² BUSTILLO, Alex y SANCHEZ, Guillermo. Op. cit.

¹²³ Ibid.

¹²⁴ INFOAGRO. Op. cit.

¹²⁵ Ibid.

Figura 3. *Myzus persicae*.



A la izquierda, forma alada; a la derecha, forma áptera adulta.

Fuente: SUPERFAMILIA APHIDOIDEA. [En línea] [Citado 10-01-10] Disponible en internet: http://ocw.us.es/producción-vegetal/sanidad-vegetal/sanidad_vegetal/tema%2010_html/Page_17.htm.



Fotografía de áfido áptero

Fuente: Esta investigación.

Durante su ciclo se producen cambios de hospederos, ya que para completar su ciclo necesitan dos hospederos. Tienen al melocotonero y algunas especies del género *Prunus* como hospedadores primarios, y a un gran número de plantas herbáceas como hospedadores secundarios. Se presentan particularmente en hortalizas como las Solanáceas, en invernadero hacen todo el ciclo sobre estas y alternando con plantas adventicias¹²⁶.

¹²⁶ INFOAGRO. Op. cit.

6. METODOLOGÍA

6.1 OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE ALBAHACA

6.1.1 Caracterización de la materia prima. Incluye los datos de recolección como el lugar y su descripción, la época de cosecha, el nivel de madurez de la planta en el momento de la cosecha. Para esto se llevó a cabo una revisión bibliográfica de otros estudios realizados en la misma región. También se realizó una identificación botánica de la muestra, para esto, se recolectaron varias muestras del material vegetal, las cuales fueron preparadas de la siguiente manera: se extendieron con cuidado sobre láminas de papel absorbente y se prensaron durante cuatro días, reemplazando el papel absorbente cada día, luego fueron llevadas al Herbario de la Universidad de Nariño PSO, en donde fueron analizadas y clasificadas por el personal a cargo.

6.1.2 Acondicionamiento de la materia prima. Para acondicionar la materia prima se emplearon las operaciones de secado y reducción de tamaño.

Secado. La recepción de la materia prima se efectuó en uno de los invernaderos del SENA – Lope Regional Nariño. Se recibieron dos grandes atados, los cuales se abrieron inmediatamente para permitir la aireación de la planta y evitar su deterioro. Se preparó el tendadero y el cobertizo en el invernadero del SENA, para evitar la incidencia directa de la luz solar sobre el material. Se dispuso el material en el tendadero, para dar inicio al proceso de secado dentro del invernadero. Luego de siete días de secado, la albahaca fue empacada en sacos de tejido sintético y se transportó a la Planta Piloto de la Universidad de Nariño (Fig. 4).

Figura 4. Secado de Albahaca.



Fuente: Esta investigación.

Reducción de tamaño. Se probaron dos métodos de reducción de tamaño; se realizaron pruebas en molino y corte manual con tijeras de jardinería. Con el molino disponible en la Planta Piloto de la Universidad de Nariño, no se obtuvo buenos resultados, ya que generaba desperdicio de hojas y flores, sin que los tallos redujeran de tamaño, ya que el molino no realiza el trabajo de corte. Por otra parte, la reducción de tamaño con tijeras de jardinería (Fig. 5), presentó la desventaja de ser un procedimiento dispendioso y lento, pero con la ventaja de reducir la longitud normal a pequeñas longitudes que se manejaron fácilmente en la destilación y aseguraron una carga más uniforme y compacta en el tanque.

Cuando los tallos no se cortan, causan la formación de amplios espacios, por los cuales el vapor vivo escapa sin entrar en contacto con las partículas de la planta, disminuyendo la producción de aceite. “El grado de reducción depende de la naturaleza del material; las hojas, flores, partes finas y no fibrosas, pueden destilarse sin reducción, ya que sus células suelen ser delgadas y permeables, permitiendo la rápida remoción de aceite. Al contrario, los tallos y material leñoso debe ser cortado para reducir la longitud y exponer las glándulas de aceite”¹²⁷. Desde la recepción de materia prima hasta la reducción de tamaño, se realizó simultáneamente la clasificación del material, descartando impurezas, restos de maleza, insectos o cualquier otro material extraño.

Figura 5. Reducción de tamaño.



Fuente: Esta investigación.

Al finalizar la reducción de tamaño y teniendo en cuenta el tamaño de partícula, fue necesario organizar dos grupos de materia prima. El primer grupo corresponde a los fragmentos de 3 cm de longitud que se lograron con las tijeras de jardinería y el segundo grupo corresponde a la hojarasca que se desprendió de los tallos durante el proceso de corte y que quedó depositada en el fondo de los sacos plásticos. Estas últimas partículas

¹²⁷ GUENTHER, Ernest. Op. cit.

tenían 5 mm aproximadamente. Los dos grupos se pesaron por separado y se distribuyeron en igual proporción para cada ensayo y así garantizar mayor homogeneidad del material.

Una vez terminada la reducción de tamaño, se procedió a pesar la materia prima y se dividió en porciones de 2 kg, al no poder procesarla inmediatamente, entonces se almacenó en bolsas de polietileno, en una atmósfera seca a una temperatura baja en un cuarto libre de circulaciones de aire, “teniendo en cuenta que las pérdidas por evaporación son menores que las ocasionadas por la oxidación y resinificación del aceite esencial”¹²⁸. De la reducción de tamaño depende el factor de empaquetamiento empleado, el cual se calculó con la siguiente fórmula¹²⁹:

$$\text{Factor de Empaquetamiento} = \frac{\text{Carga de Trabajo (kg)}}{\text{Capacidad del Tanque (m}^3\text{)}}$$

6.1.3 Extracción del aceite esencial de Albahaca.

Pruebas preliminares. Se realizaron dos pruebas a escala piloto con el fin de establecer los niveles máximo y mínimo para los factores presión y tiempo. Además se logró observar el comportamiento del proceso y del equipo.

La primera prueba piloto se realizó en la unidad de extracción que no cuenta con separador de fases. Se emplearon 2 kg de materia prima, el nivel de presión fue 2 psi_(g) y se redujo gradualmente hasta 1 psi_(g). Los resultados fueron reprobables, ya que el condensador que posee el equipo no resultó eficiente por la escasa longitud del tramo que le precede, lográndose una gran pérdida de aceite por falta de condensación y también por la turbulencia generada a la salida del equipo afectando la correcta separación en el vaso florentino que se adaptó (Fig. 6). Solo se recuperaron 3 ml de aceite esencial.

La segunda prueba piloto se realizó en la unidad de extracción que cuenta con separador de fases. También se emplearon 2 kg de materia prima y se trabajó con 2 psi_(g) reduciendo gradualmente hasta 1 psi_(g). Al trabajar a 2 psi_(g), la turbulencia era menor que en el primer equipo; al reducir la presión hasta 1 psi_(g), se logró un control de la turbulencia y un mejor manejo del equipo y del proceso, por cuanto se tomó esta última presión como nivel máximo para el diseño experimental. De 11 ml de aceite esencial recuperados en los

¹²⁸ GUENTHER, Ernest. Op. cit.

¹²⁹ NARVAEZ, Fabio y OBANDO, Nury. Estudio de factibilidad para el montaje de una planta de extracción por arrastre de vapor de aceite esencial de Limonaria (*Cymbopogon Citratus*) como agente aromatizante y saborizante, en el municipio de Sandoná, Dpto. de Nariño. Pasto, 2003. Trabajo de Grado (Ingeniero Agroindustrial). Universidad de Nariño, Facultad de Ingeniería Agroindustrial.

primeros 40 minutos del proceso, 9 ml se recuperaron en los primeros 20 minutos. En los 20 minutos restantes el volumen de aceite se estabilizó sin obtener mayores resultados, para un total de 60 minutos de proceso que se establecieron como nivel máximo para el diseño experimental. En este segundo caso también hubo una pérdida importante de aceite, que se debió principalmente al acople inadecuado del vaso florentino en donde se recolectó finalmente el aceite, detalle que fue corregido al desarrollar los experimentos definitivos.

Figura 6. Turbulencia generada en el vaso florentino.



Fuente: Esta investigación.

Diseño experimental para el proceso de extracción. Se empleó un diseño factorial 2^2 , con cuatro puntos centrales, para un total de ocho experimentos. Este diseño fue seleccionado por las siguientes razones:

El diseño factorial, estudia el efecto de varios factores sobre una o varias respuestas, cuando se tiene el mismo interés sobre todos los factores; se trabajan por lo menos dos niveles de prueba. Por ejemplo, la combinación de los niveles de los factores, para un mejor desempeño del proceso. La familia de diseños factoriales completos 2^k (k factores con dos niveles de prueba cada uno), es de gran impacto en industria e investigación, debido a su eficiencia y versatilidad. Se pueden trabajar de 2 a 5 factores, para obtener entre 4 y 36 tratamientos respectivamente, lo que resulta una cantidad de experimentos manejable¹³⁰.

Las variables estudiadas se aprecian en la Tabla 1. Los niveles evaluados para las variables independientes se presentan en la Tabla 2.

¹³⁰ GUTIERREZ PULIDO, Humberto y DE LA VARA SALAZAR, Román. Análisis y diseño de experimentos. México : McGraw Hill Interamericana, 2004. ISBN 970-10-4017-1.

Tabla 1. Variables independientes y variables de respuesta.

Variables Independientes	Variables de Respuesta
Presión de extracción (psi _(g))	Concentración del principios activos (% de área relativa)
Tiempo de extracción (minutos)	Rendimiento de extracción (% volumen/peso), (mililitro/gramo)
	Rendimiento de proceso (% volumen/volumen), (mililitro/mililitro)

Fuente: Esta investigación.

Tabla 2. Niveles de variables independientes.

Variable	Nivel mínimo	Nivel máximo
Presión de extracción	0,8 psi _(g)	1 psi _(g)
Tiempo de extracción	20 minutos	60 minutos

Fuente: Esta investigación.

La matriz de diseño de experimentos (Tabla 3) y el tratamiento estadístico de los datos se realizaron con ayuda del programa estadístico STATGRAPHICS plus 5.0 (Statistical Graphics Corp. 1994-2000).

Tabla 3. Matriz de diseño experimental.

Ensayo	Presión (psi _(g))	Tiempo (minutos)
E1	0,9	40
E2	0,8	60
E3	0,9	40
E4	1,0	60
E5	1,0	20
E6	0,9	40
E7	0,8	20
E8	0,9	40

Fuente: Esta investigación.

Extracción por arrastre con vapor. Se emplearon 2 kg de materia prima seca, previamente acondicionada, homogenizada y pesada. Se revisó el equipo ajustando las válvulas para la modalidad de extracción por arrastre de vapor. Se procedió a cargar la materia prima en la canastilla del equipo, con un arreglo adecuado para que el vapor circulara en medio del material y ejerciera bien su función de arrastre. Los fragmentos de tallo de 3 cm, formaban una estructura de nido (Fig. 7), por lo que se decidió emplear una capa ligera de esta estructura como base para extender sobre ella una porción pequeña

de hojarasca, realizando varias capas consecutivas de un tamaño de partícula y otro, teniendo en cuenta que la estructura de nido serviría de sostén para la hojarasca. Una vez cerrado el compartimiento de carga, se activó el equipo bajo las condiciones establecidas según el diseño experimental. El extracto obtenido, se recibió en un vaso florentino; de este se traspasó a un embudo de separación con ayuda de una pipeta con pera y finalmente se refrigeró en un frasco de vidrio ámbar a 5 °C (Fig. 8).

Figura 7. Disposición de la carga en el extractor.



Fuente: Esta investigación.

Figura 8. Recuperación del aceite esencial.



Fuente: Esta investigación.

Las variables a estudiar para este proceso fueron: presión de extracción y tiempo de extracción. Las variables de respuesta se calcularon de la siguiente forma¹³¹:

$$\text{Rendimiento de Aceite} = \left(\frac{\text{Cantidad de Aceite Obtenido (ml)}}{\text{Cantidad de Material Vegetal empleado (g)}} \right) \times 100$$

$$\text{Rendimiento de Proceso} = \left(\frac{\text{Cantidad de Aceite obtenido (ml)}}{\text{Cantidad de Solución Destilada (ml)}} \right) \times 100$$

Donde,

$$\text{Solución Destilada} = [\text{Cantidad de Aceite obtenido (ml)} + \text{Vapor Condensado (ml)}]$$

6.2 DETERMINACION Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Para la Concentración del principio activo de interés, se determinó el porcentaje de área de cada compuesto, respecto al área total del cromatograma. Estos valores se tomaron del reporte de Laboratorios Especializados de la Universidad de Nariño.

Las muestras envasadas en frascos de vidrio ámbar y refrigeradas a 5 °C, se llevaron a la sección de Laboratorios Especializados de la Universidad de Nariño, en donde el personal a cargo realizó el análisis en un cromatógrafo de gases con detector FID SHIMADZU GC-17 A, de columna capilar DB-5 J&W (30 m x 0,25 mm ID 0,25 µm). El gas carrier empleado fue Helio (1 µl/min.), con el modo de Inyección Split 1:30. La temperatura del Inyector fue de 250 °C y la del detector FID fue de 280 °C. La programación de temperatura para la columna fue de 45 °C a 250 °C (15 min) 4,5 °C/min. TA= 65 min. El análisis cuantitativo relativo se realizó mediante la identificación de los componentes mayoritarios (% de área mayor al 0,699 %) “con los índices de retención de Kovats”¹³² calculados con una serie de n-alcanos (RESTEK Alta Pureza) C6-C32.

También se envió una muestra al Laboratorio de Cromatografía de La Universidad Industrial de Santander, para confirmar con exactitud la identidad de los compuestos. La

¹³¹ TOVAR, Darleny. Op. cit.

¹³² ADAMS, R.P. Identification of Essentials Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Allured Publishing Corporation, 2004.

muestra enviada se analizó bajo las siguientes especificaciones: la preparación de la muestra se llevó a cabo por dilución e inyección directa del aceite esencial al equipo cromatográfico. El análisis cromatográfico se realizó en un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies* 6890 Plus, acoplado a un detector selectivo de masas (MSD, *Agilent Technologies* 5973) operado en el modo de barrido completo de radiofrecuencias (*full scan*). La columna empleada en el análisis fue DB-5MS (J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU) [5 %-fenil-poli(dimetilsiloxano), 60 m x 0.25 mm x 0.25 μ m]. La inyección se realizó en modo *split* (50:1), $V_{iny} = 1 \mu$ l. “Los compuestos determinados en la muestra “MUESTRA No. 1 ACEITE ESENCIAL DE ALBAHACA; EXTRACCIÓN CON ARRASTRE POR VAPOR”, se identificaron con base en sus espectros de masas, índices de retención y por comparación de sus espectros con los de sustancia referencia”¹³³.

6.3 DETERMINACIÓN DEL TIEMPO Y PRESIÓN ÓPTIMOS

“El tratamiento estadístico de los datos obtenidos se realizó con el programa estadístico STATGRAPHICS plus 5.0”¹³⁴. Se practicaron nuevas extracciones bajo condiciones de tiempo y presión, de acuerdo con los puntos óptimos sugeridos en el análisis de Statgraphics y el criterio personal del investigador.

6.4 BIOENSAYO

6.4.1 *Material vegetal*. En los experimentos se utilizaron foliolos de plantas de papa amarilla (*Solanum phureja*), las cuales se cultivaron en bolsas plásticas con 2 kg de un sustrato, “de proporción 2:1:1 de tierra, arena y materia orgánica respectivamente”¹³⁵ (Fig. 9). Las plantas de papa se cultivaron en dos grupos por separado: las plantas destinadas como sustrato para la cría masiva de áfidos y las plantas sanas reservadas como suministro de foliolos para el bioensayo.

6.4.2 *Insectos*. En los experimentos se emplearon áfidos identificados como *Myzus persicae*, de acuerdo con la clave taxonómica de Bustillo (1971). Los áfidos fueron colectados en la temporada 2008-2009 en árbol duraznero de huerto casero. Posteriormente, se criaron sobre plantas de papa amarilla bajo condiciones controladas, de esta forma se mantuvieron individuos del mismo linaje asexual (clon) mediante reproducción asexual (partenogénesis) permanente (Fig. 10).

¹³³ STASHENKO, Elena. Determinación de la composición química de aceites esenciales por cromatografía de gases con detector selectivo de masas (GC-MS) : Informe de resultados (CODIGO: 982317-AI). Bucaramanga: Laboratorio de Cromatografía – Universidad Industrial de Santander. 2009.

¹³⁴ STATISTICAL GRAPHICS CORPORATION. Statgraphics plus 5.0. 1994-2000.

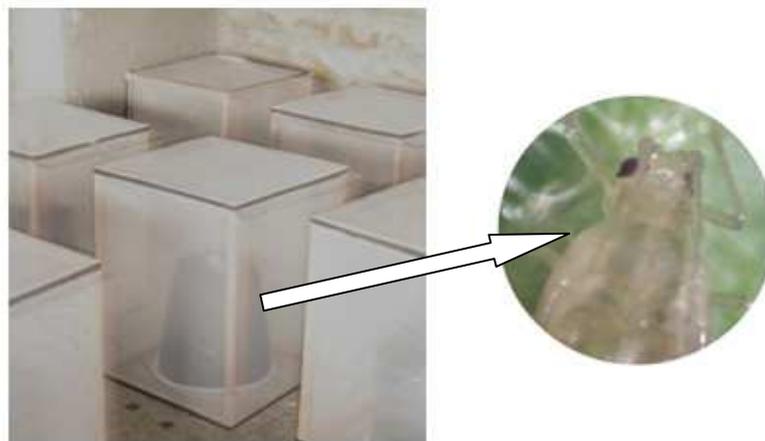
¹³⁵ MENDOZA PERDOMO, Leider y MIPAZ ORTEGA, Lilia Beatriz. Op cit.

Figura 9. Plantas de papa amarilla *Solanum phureja*.



Fuente: Esta investigación.

Figura 10. Montaje para la cría de áfidos.



Fuente: Esta investigación.

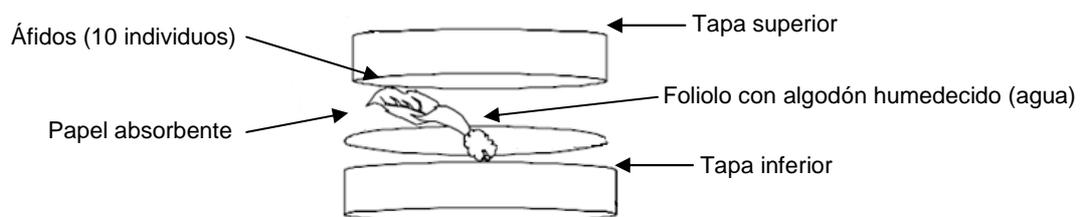
6.4.3 *Experimentos*. Se empleó una solución acuosa de aceite esencial de albahaca, usando propilenglicol al 5 % como emulsionante. “Las concentraciones de aceite esencial evaluadas fueron 0,5; 1; 2; 3 y 4 %(v/v), además se evaluaron dos testigos (agua con propilenglicol y agua”¹³⁶. Tanto para los tratamientos como para los testigos, se realizaron 5 réplicas. Se realizó una prueba preliminar y una prueba definitiva. Para ambas pruebas la unidad experimental consistió en una caja plástica transparente con un redondel de papel absorbente en el fondo y sobre él un foliolo de papa amarilla, “provisto de algodón

¹³⁶ RICCI, Mónica *et al.* Op. cit.

humedecido en el tallo para mantener la turgencia¹³⁷; sobre el foliolo se depositaron 10 individuos de *Myzus persicae* (Fig. 11).

En la prueba preliminar se empleó la forma de aplicación del extracto en papel absorbente (100 µl por cada unidad experimental), evaluando repelencia y mortalidad a las 24 horas. El criterio para evaluar la repelencia fue el número de áfidos que permanecieron en el sustrato y el criterio para determinar la mortalidad fue la respuesta negativa de movimiento al estímulo táctil. El recuento de los insectos se realizó con ayuda de un estereoscopio binocular. Para el ensayo definitivo se empleó la forma de aplicación por inmersión del foliolo en el extracto, evaluando mortalidad a las 24 horas. Los datos se procesaron con el programa STATGRAPHICS plus 5.0 (Statistical Graphics Corp. 1994-2000).

Figura 11. Montaje de la unidad experimental para el bioensayo.



Fuente: CARRIZO, Paola *et al.* Evaluación de extractos cetónicos de Paraíso, Eucalipto y Ricino, sobre *Myzus persicae* (Homóptera: Aphididae). Algunos nombres han sido modificados de acuerdo con el presente trabajo.

6.4.4 *Diseño experimental y análisis estadístico.* Tanto en la prueba preliminar como en la definitiva, se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con las unidades experimentales ubicadas en un arreglo espacial aleatorio (Fig. 12). En todos los tratamientos y en los testigos se realizaron cinco repeticiones.

La mortalidad se calculó mediante la fórmula:

$$\%M = \frac{\text{Número de áfidos muertos}}{\text{Número total de áfidos}} \times 100$$

¹³⁷ CARRIZO, Paola *et al.* Op cit.

Figura 12. Diseño experimental para el bioensayo.



Fuente: Esta investigación.

Todos los resultados se expresaron como “mortalidad corregida”¹³⁸, la cual permite separar de la mortalidad observada el efecto de mortalidad natural presente en el respectivo testigo.

$$\%MC = \frac{\%M \text{ del tratamiento} - \%M \text{ del testigo}}{100 - \%M \text{ del testigo}} \times 100$$

Los datos de mortalidad corregida (MC) de cada experimento se analizaron mediante ANDEVA. El efecto principal fue la concentración de aceite utilizado, y la variable de respuesta fue la mortalidad a las 24 horas. La separación de medias se realizó usando la prueba de comparación múltiple de Tukey con un nivel de confianza del 95 %. La MC se transformó para cumplir los supuestos de homogeneidad de varianzas, con la siguiente fórmula¹³⁹:

$$\text{Arcsen} \sqrt{\frac{\%MC}{100}}$$

¹³⁸ ABBOTT, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* vol.18, p.265-267. Citado por: FUENTES CONTRERAS, Hernando *et al.* Evaluación de la eficacia, efecto residual y de volteo de aplicaciones en pretrasplante de insecticidas nicotinoides y mezclas de nicotinoide-piretroide para el control de *Myzus persicae nicotianae* (Hemiptera:Aphididae) en tabaco. *En: Agricultura Técnica* (Chile), (ene-mar 2007). vol.67, no.1, p.16-22

¹³⁹ *Ibid.*, p.16-22.

Para determinar el porcentaje de repelencia, se empleó la siguiente fórmula:

$$\%R = \frac{\text{Número total de áfidos} - \text{Número de áfidos posados sobre el sustrato}}{\text{Número total de áfidos}} \times 100$$

Se aplicó la corrección de los datos, restando a la repelencia de cada tratamiento, la repelencia del testigo:

$$\%RC = \frac{\%R \text{ del tratamiento} - \%R \text{ del testigo}}{100 - \%R \text{ del testigo}} \times 100$$

Finalmente se transformaron los datos mediante la fórmula:

$$\text{Arcsen} \sqrt{\frac{\%RC}{100}}$$

7. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.1 OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE ALBAHACA

Figura 13. Albahaca *Ocimum micranthum* Wild.



Fuente: Esta investigación.

7.1.1 Caracterización de la materia prima. La Albahaca fue cosechada en el mes de Abril de 2008, en el departamento del Putumayo, en la vereda San Silvestre del Valle de Sibundoy. En el momento de la cosecha, la planta se encontraba en estado de floración en avanzada etapa de madurez. Las partes de la planta empleadas en la extracción corresponden a inflorescencias, hojas y tallos (tiernos y pilosos).

El Valle de Sibundoy hace parte de la Región Andino Amazónica, con una temperatura media anual de 16,3 °C (máx. 30 °C; mín. 3,8 °C). La región pertenece a una zona de vida de Bosque Muy Húmedo montano bajo (BMH-mb) y está influenciado por los vientos alisios del sur, situación que le permite tener unas características ambientales muy particulares. Octubre, Noviembre y Diciembre son los meses más cálidos y se registran heladas en el mes de Septiembre. El 50 % de la precipitación cae desde Mayo hasta Agosto. El verano se presenta generalmente de Octubre a Abril y el invierno de Mayo a Septiembre, aunque se han venido presentando variaciones de acuerdo con los fenómenos climáticos de los últimos tiempos. La humedad relativa media anual es de 79 % con un promedio de las máximas y mínimas variando entre 78 % y 84 % (IGAC, 1990)¹⁴⁰.

¹⁴⁰ MEJÍA, Luis y ORELLANA, Galo. Dialogo de saberes para la valoración ecológica y el fortalecimiento de los agroecosistemas tradicionales en Chagras indígenas del municipio de Sibundoy Putumayo. Pasto, 2001. Tesis de Especialización. Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Departamento de Biología.

Resultado de la clasificación botánica. La muestra identificada en el Herbario de la Universidad de Nariño PSO, corresponde a *Ocimum micranthum* Wild*. “El género *Ocimum*, se caracteriza por poseer especies de flores hermafroditas con abundante polinización cruzada, lo que produce elevada cantidad de subespecies, variedades, formas y aceites esenciales con diferentes perfiles de composición química”¹⁴¹.

7.1.2 Acondicionamiento de la materia prima. Se realizó el secado de la materia prima en un invernadero, evitando la incidencia directa de la luz solar. Posteriormente, se llevó a cabo la reducción de tamaño de la planta seca y a partir de este procedimiento se calculó el factor de empaquetamiento, teniendo en cuenta que la capacidad de la canastilla es de 55910,9 cm³ (0,0559 m³)¹⁴².

$$\text{Factor de Empaquetamiento} = \frac{2 \text{ (Kg)}}{0,0559 \text{ (m}^3\text{)}} = 35,77 \left(\frac{\text{Kg}}{\text{m}^3} \right)$$

7.1.3 Extracción del aceite esencial de Albahaca.

En la Tabla 4, se aprecian los datos registrados en cada experimento. Con base en estos datos se realizaron los cálculos, con las fórmulas indicadas en el marco metodológico.

Tabla 4. Resultados observados.

Ensayo	Presión (psi _(g))	Tiempo (min)	Cantidad aceite (ml)	Vapor condensado (ml)
E1	0,9	40	16,6	3900
E2	0,8	60	15,6	4700
E3	0,9	40	22,4	4800
E4	1,0	60	16,6	5950
E5	1,0	20	15,4	3700
E6	0,9	40	19,2	4500
E7	0,8	20	13,2	2050
E8	0,9	40	18,6	4000

Fuente: Esta investigación.

* CARTA de Martha Sofía Gonzáles Isuasty, Directora y curadora Herbario PSO. Profesora Asociada Departamento de Biología, Universidad de Nariño. Pasto 23 de Noviembre de 2009. Anexado.

¹⁴¹ ARANGO MARÍN, Mario. Contribuciones al cultivo de las plantas medicinales. Profesor asociado Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín – Facultad de Ciencias Agropecuarias. 2005.

¹⁴² NARVAEZ, Fabio y OBANDO, Nury. Op. cit.

La cantidad de material vegetal empleado para cada ensayo fue 2000 gramos (2 kg). Los cálculos para el Ensayo 1, se desarrollaron así:

$$\text{Rendimiento de Aceite} = \left(\frac{16,6 \text{ ml}}{2000 \text{ g}} \right) \times 100 = 0,83 \%$$

$$\text{Rendimiento de Proceso} = \left(\frac{16,6 \text{ ml}}{(16,6 \text{ ml} + 3900 \text{ ml})} \right) \times 100 = 0,42 \%$$

Como resultado de estos cálculos, se obtienen los datos presentados en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados calculados.

Ensayo	Presión (psi _(g))	Tiempo (min)	Rendimiento de Aceite (% v/p) (ml/g)	Rendimiento de Proceso (% v/v) (ml/ml)
E1	0,9	40	0,83	0,42
E2	0,8	60	0,78	0,33
E3	0,9	40	1,12	0,46
E4	1,0	60	0,83	0,28
E5	1,0	20	0,77	0,37
E6	0,9	40	0,96	0,42
E7	0,8	20	0,66	0,64
E8	0,9	40	0,93	0,46

Fuente: Esta investigación.

Análisis de varianza para Rendimiento de Aceite

El ANOVA para el rendimiento del aceite esencial (Tabla 6), muestra que ninguno de los efectos es estadísticamente significativo, al 95,0 % de nivel de confianza, ya que el valor de P es mayor que 0,05 para cada efecto. El estadístico R-cuadrado indica que el modelo así ajustado explica el 11,0951 % de la variabilidad en el rendimiento de aceite.

Tabla 6. Análisis de varianza para Rendimiento de Aceite.

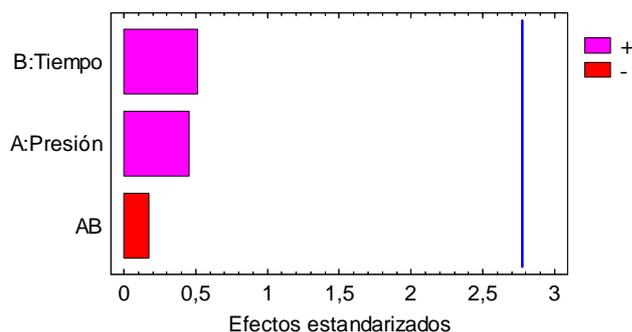
Fuente	Suma de cuadrados	G.I.	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
Efectos principales					
A:Presión	0,0064	1	0,0064	0,21	0,6724
B:Tiempo	0,0081	1	0,0081	0,26	0,6354
AB	0,0009	1	0,0009	0,03	0,8727
Error Total	0,1234	4	0,03085		
Total (corr.)	0,1388	7			

R-cuadrado = 11,0951 %; R-cuadrado (ajustado para G.I.) = 0,0 %; Error Estándar = 0,175642
 Coeficiente de variación (punto central) = 10,85 %

Fuente: Esta investigación.

En el diagrama de Pareto (Fig. 14), se observa que ninguno de los factores estudiados tiene un efecto significativo sobre el rendimiento de aceite esencial.

Figura 14. Grafico de Pareto estandarizado para Rendimiento de Aceite.



Fuente: Esta investigación.

Como todos los ensayos se realizaron a partir del mismo material, la variabilidad en el rendimiento de aceite no se atribuye a la reducción de tamaño. Sin embargo, se puede mencionar en términos generales, que un bajo rendimiento de aceite puede ser consecuencia de un amplio lapso de tiempo, entre la reducción de tamaño y la extracción del aceite, ya que se genera una evaporación parcial del aceite esencial expuesto.

“Se han reportado pérdidas de 0,5 % atribuidas completamente a la evaporación de aceite y no a la pérdida de humedad, (empleo de material seco en los experimentos)”¹⁴³. Por esta razón, sería conveniente realizar la reducción de tamaño sólo cuando se va a

¹⁴³ VON ROCHENBERG. Theorie der Gewinnung und Trennung der ätherischen Öle. Leipzig, 1910, p.391. Citado por: GUENTHER, Ernest. Op. cit., p.106-107.

procesar de inmediato; para el presente estudio, se realizó la disminución de tamaño de la materia prima, pero no se pudo procesar de inmediato por el tiempo que duró la reducción de tamaño y por la disponibilidad del equipo de extracción, lo que seguramente afectó el rendimiento de aceite esencial, pese a que el material se almacenó en una “atmósfera seca a temperatura baja en un cuarto libre de circulaciones de aire”¹⁴⁴.

Sin embargo, en el texto de Guenther algunos autores como Arrillaga, Colon, Rivera y Jones¹⁴⁵, demostraron que el secado al aire libre y apilamiento previo a la destilación de citronela y lemongrass, produjo una disminución considerable en el total de constituyentes acetilizables afectando el rendimiento y concluyeron que las pérdidas por oxidación son más importantes que las pérdidas por evaporación.

También existe una clara influencia de las condiciones agroambientales sobre el rendimiento de aceite esencial, por tanto, la variedad estacional puede afectar el rendimiento de aceite, como lo demuestran los estudios realizados en diversas partes del mundo.

Un estudio realizado en Pakistán, demuestra que el rendimiento de aceite esencial aumenta en invierno y decrece en verano, este último suele ser particularmente caluroso en ese país, alcanzando un promedio de temperatura de 35-40 °C; teóricamente, los autores atribuyen el bajo rendimiento de aceite en verano a las altas temperaturas y a la evaporación parcial de algunos constituyentes del aceite esencial¹⁴⁶.

El avance estacional tuvo el mayor efecto sobre el rendimiento de aceite esencial en *Origanum majorana*, correlacionando positivamente el nivel de nutrientes con las bajas temperaturas y negativamente con las altas temperaturas¹⁴⁷. En Brasil se reportó el porcentaje de aceite esencial de albahaca más alto en Enero (invierno) y el más bajo en Agosto (verano)¹⁴⁸.

Para la albahaca empleada en el presente estudio, el rendimiento obtenido fue en promedio de 0,86 %(v/p), lo que significa un buen rendimiento para la época en que fue

¹⁴⁴ GUENTHER, Ernest. Op. cit., p.106.

¹⁴⁵ ARRILLAGA, COLON, RIVERA Y JONES. *Am. Perfumer* 46 (May 1944), p.49. Citado por: GUENTHER, Ernest. Op. cit., p.108.

¹⁴⁶ HUSSAIN, Abdullah *et al.* Op. cit.

¹⁴⁷ TRIVINO, M. G. y JOHNSON, C. B. Season has a major effect on the essential oil yield response to nutrient supply in *Origanum majorana*. En: *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2000. vol.75, no.5, p.520-527. Citado por: HUSSAIN, Abdullah *et al.* Op. cit.

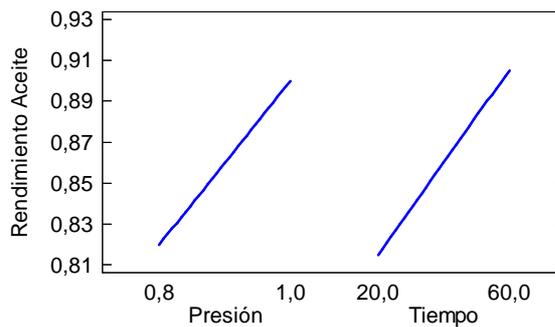
¹⁴⁸ Da-SILVA, F. Content and composition of basil essential oil at two different hours in the day and two seasons. En: *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 2003. vol.6, no.1, p.33-38. Citado por: HUSSAIN, Abdullah *et al.* Op. cit.

cosechada la albahaca (verano), por tanto, de acuerdo con lo expuesto por otros autores se esperaba un mejor rendimiento para la albahaca cosechada en época invernal.

En el diagrama de efectos principales (Fig. 15), se observa que el rendimiento de aceite es mejor a una presión de 1,0 psi_(g) que a una presión de 0,8 psi_(g). Por otra parte, el rendimiento de aceite obtenido durante 60 minutos es mejor que el obtenido durante 20 minutos.

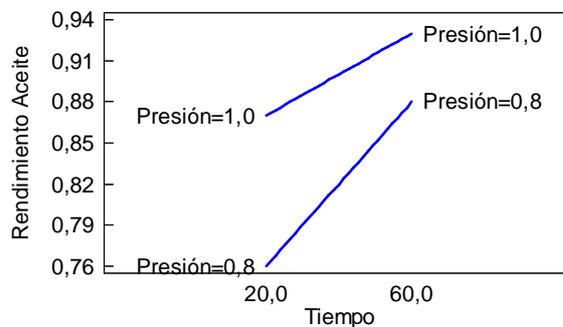
Para la variable rendimiento de aceite, la interacción entre tiempo y presión de extracción no es significativa, aunque es posible reconocer que las condiciones favorables para esta variable, son un alto nivel de tiempo y de presión, como se observa en la Figura 16. Sin embargo, los parámetros que favorecen el rendimiento de aceite, no favorecen la calidad del mismo en términos de la concentración de principios activos de interés, como se discutirá más adelante.

Figura 15. Gráfico de efectos principales para Rendimiento de Aceite.



Fuente: Esta investigación.

Figura 16. Gráfico de la interacción para Rendimiento de Aceite.



Fuente: Esta investigación.

Análisis de varianza para Rendimiento de Proceso

En este caso (Tabla 7), los tres efectos son estadísticamente significativos, al 95,0 % de nivel de confianza, ya que el valor de P para cada uno de ellos es inferior a 0,05. El estadístico R-cuadrado indica que el modelo así ajustado explica el 95,0459 % de la variabilidad en Rendimiento de Proceso.

Tabla 7. Análisis de varianza para Rendimiento de Proceso.

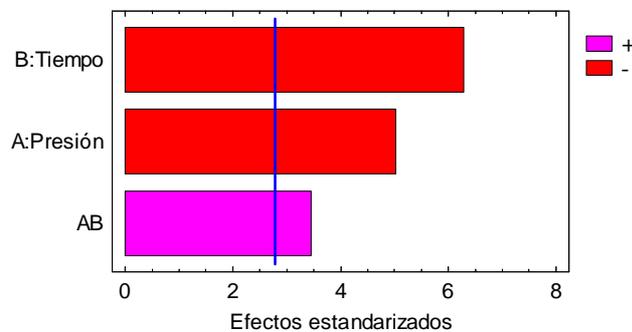
Fuente	Suma de cuadrados	G.l.	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
Efectos principales					
A:Presión	0,0256	1	0,0256	25,28	0,0073
B:Tiempo	0,04	1	0,04	39,51	0,0033
AB	0,0121	1	0,0121	11,95	0,0259
Error Total	0,00405	4	0,0010125		
Total (corr.)	0,08175	7			

R-cuadrado = 95,0459 %; R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 91,3303 %; Error Estándar = 0,0318198
Coeficiente de variación (punto central) = 4,54 %

Fuente: Esta investigación.

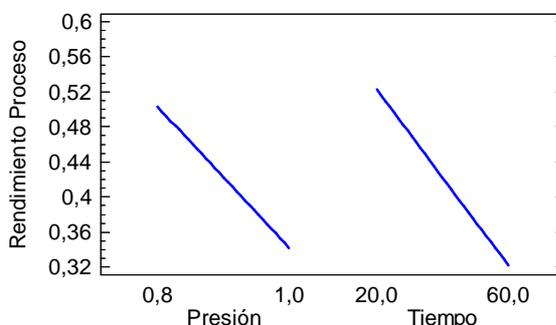
En el diagrama de Pareto (Fig. 17), se observa que los tres efectos son estadísticamente significativos, lo que denota una clara influencia de los factores evaluados sobre esta variable de respuesta. El efecto individual del factor tiempo es negativo y se debe a que la mayor cantidad de aceite se obtiene aproximadamente en los primeros 20 minutos, en adelante la cantidad de aceite obtenido es mínima. El efecto individual de la presión sobre el rendimiento de proceso es negativo, porque cuando se estabiliza el proceso y no se logra recuperar más aceite, no se justifica el gasto innecesario de vapor y tiempo. (Fig. 18).

Figura 17. Grafico de Pareto estandarizado para Rendimiento de Proceso.



Fuente: Esta investigación.

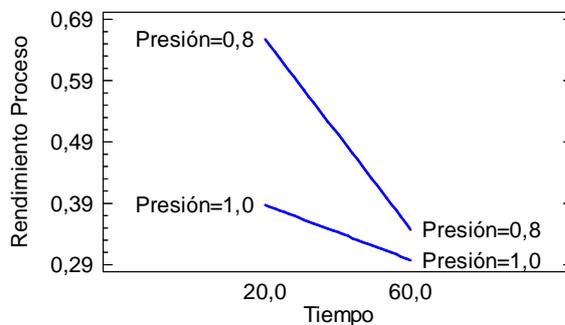
Figura 18. Gráfico de efectos principales para Rendimiento de Proceso.



Fuente: Esta investigación.

Para la variable rendimiento de proceso, la interacción entre tiempo y presión es significativa, tal como se observa en la Figura 19. La variable rendimiento de proceso, evidencia de alguna manera, el estrecho rango seleccionado para los niveles de los factores; no se justifica prolongar el proceso a más de 40 minutos y 1,0 psi_(g) de presión, cuando se obtiene mejor resultado de 20 a 30 minutos y 0,8 psi_(g) de presión, de esta manera se racionalizan los recursos y con ello el coste del proceso.

Figura 19. Gráfico de la interacción para Rendimiento de Proceso.



Fuente: Esta investigación.

Se presenta un antagonismo en el efecto del tiempo y la presión, sobre las variables rendimiento de aceite y rendimiento de proceso. Para explicar este hecho, se debe tener en cuenta que el efecto de los factores sobre el rendimiento de aceite, no resultó estadísticamente significativo, sin embargo, a mayor presión y tiempo, se consigue un máximo agotamiento del aceite en el material vegetal. Pero en este caso, agotar al máximo el aceite del material vegetal no resulta eficiente, ya que con menos tiempo y menor presión se puede obtener una cantidad suficiente de aceite según la finalidad del estudio, y se logra establecer una relación de compromiso entre las variables de respuesta.

7.2 DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS MEDIANTE CG-EM.

La unidad de medida empleada en este trabajo para la concentración de principios activos, es el porcentaje de área relativa. Estos datos son el resultado del análisis por cromatografía de gases y espectrometría de masas. Muchos de los constituyentes de los aceites esenciales se caracterizan por su inestabilidad y la facilidad con la que ocurre su reordenamiento intramolecular, por tanto, todas las variaciones estructurales de la misma fórmula empírica, son encontradas en los constituyentes de los aceites volátiles en plantas.

Los isómeros, entre los que se encuentran los del tipo *cis* y *trans*, son responsables de la riqueza aromática en los aceites esenciales de origen diverso. El doble enlace es una fuente de isomerismo, por ejemplo, el canfeno es inestable a altas temperaturas (250 °C) y se descompone considerablemente produciendo otros terpenos, además, se puede preparar artificialmente por isomerización de pineno con ácido sulfúrico.

En el análisis general de los compuestos encontrados, cabe destacar que ciertos compuestos se forman por la acción del vapor, esto se debe principalmente a la degradación de productos de carbohidratos, como el furfural. La pérdida de agua de alcoholes y la hidrólisis de ésteres, genera nuevos hidrocarburos y ácidos.

Lo anterior significa que la composición del aceite esencial obtenido, no corresponde fielmente a la composición del aceite en la planta en su estado natural. Por ejemplo, el pineno podría dar lugar a la formación de compuestos mono y bicíclicos, como el terpineol, borneol, canfeno, alcanfor, 1,4-cineol, pinol, mirtenol y verbenona, entre otros.

Particularmente, el α -pineno puede convertirse en derivados de la serie fenchil, por ejemplo, el fenchil alcohol y el fenchol. El alcanfor es la cetona del alcohol borneol, por tanto, puede obtenerse alcanfor por la oxidación de borneol o isoborneol con ácido nítrico, aunque también puede prepararse a partir de trementina. Los compuestos llamados azulenos, mezclados con componentes amarillos, son los responsables del color verde de muchos aceites¹⁴⁹.

En la información de la Figura 20, se observa que la composición química del aceite esencial de *Ocimum basilicum* L, varía considerablemente aunque se trata de la misma especie. Se debe tener en cuenta que los estudios se realizaron en diferentes lugares geográficos. Sin embargo, el linalol se destaca como el compuesto mayoritario en las tres muestras, aunque existen varios quimiotipos dentro de la misma especie.

¹⁴⁹ GUENTHER, Ernest. Op. cit., p.20-33, 63.

Figura 20. Composición química de aceite esencial según diferentes estudios sobre la misma especie de albahaca (*Ocimum basilicum* L.).

<i>Ocimum basilicum</i> L.*	%	<i>Ocimum basilicum</i> L.**	%	<i>Ocimum basilicum</i> L.***	%
Linalol	28,6	Linalol	60,6	Linalol	44,2
Estragol (metil chavicol)	21,7	Cadinol, epi- α	8,6	1,8-cineol	13,7
Trans-cinamato de metilo	14,3	α -bergamoteno	7,8	Eugenol	8,6
α -cadinol	7,1	γ -cadineno	3,2	α -cubebeno	5,0
Eugenol	5,9	Alcanfor	3,0	Cinamato de metilo	4,3
1,8-cineol	4,0	Cis-geraniol	1,3	Iso-cariofileno	3,1
Metil eugenol	3,1	Viridiflorol	1,3	Naftaleno	2,0
α -bergamoteno	2,2	1,8-cineol	1,2	γ -terpin	1,8
Cis-cinamato de metilo	1,6	β -cariofileno	1,2	α -cariofileno	1,8
α -amorfeno	1,0	Germacreno D	1,1	α -farneseno	1,7
α -terpineol	1,0	Oxido de linalol	1,1	Germacreno B	1,6
Espatulenol	0,8	Fenchona	1,0	Trans- β -ocimeno	1,6
Chavicol	0,7	Cis- β -ocimeno	0,8	Mirtenol	1,3
Terpinen-4-ol	0,7	Oxido de cariofileno	0,7	Azuleno	1,3
Alcanfor	0,5	α -terpineol	0,7	β -pineno	1,1
Bornil acetato	0,5	Biciclogermacreno	0,6	Canfeno	0,9
β -cubebeno	0,5	Calameneno	0,6	Germacreno D	0,8
Carvona	0,4	β -selineno	0,6	β -mirceno	0,8
Cariofileno	0,3	γ -muroleno	0,5	α -pineno	0,7
Germacreno D	0,3	Espatulenol	0,4	Alcanfor	0,7
β -elemeno	0,3	α -bisabolol	0,4		
Calameneno	0,2	α -cadinol	0,4		
Torreyol	0,2	Limoneno	0,3		
α -humuleno	0,2	α -humuleno	0,2		
β -farneseno	0,2				
γ -cadineno	0,2				
Limoneno	0,1				
β -pineno	0,1				

Los porcentajes corresponden a la abundancia en área relativa.

Fuentes:
 * POLITEO, O *et al.* Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. *En:* Food Chemistry, (2007). no.101, p.379-385. (Croacia).
 ** HUSSAIN, Abdullah *et al.* *Op cit.* (Pakistán).
 *** ISMAIL, M. Central Properties and Chemical Composition of *Ocimum basilicum* Essential Oil. *En:* Pharmaceutical Biology, (2006). vol.44, no.8, p.619-626. (Egipto).

El linalol es isómero del geraniol y el nerol (alcoholes acíclicos). El geraniol, principal constituyente del aceite de rosa y geranio, se convierte fácilmente en el principal constituyente del aceite de Jacinto que corresponde al α -terpineol (alcohol monocíclico) y también puede convertirse en linalol que representa el componente característico del aceite de Lavanda. Otros compuestos comunes a las tres muestras son: 1,8-cineol, alcanfor y germacreno D. Estos compuestos también se encuentran en el aceite esencial de *O. micranthum* L., analizada en el presente estudio.

En la Figura 21, se presenta una información comparativa, de la composición química del aceite esencial de diferentes especies de Albahaca, con base en diferentes estudios y en

diferentes lugares geográficos. En este caso, se observa que los componentes mayoritarios difieren para cada especie. Se reconocen como componentes mayoritarios el alcanfor, eugenol, timol, trans-cinamato de metilo y geraniol. Los principales compuestos que resultan comunes a algunas especies son el 1,8-cineol, estragol y linalol, estos tres compuestos también fueron encontrados en el aceite de *O. micranthum* L.

Figura 21. Composición química de aceite esencial para diferentes especies de albahaca.

<i>Ocimum micranthum</i> L.*	%
Alcanfor	23,8
1,8-cineol	21,8
Cis- α -bisaboleno	7,7
Estragol (metil chavicol)	7,7
β -bisaboleno	6,0
Linalol	3,2
Trans-cinamato de metilo	3,0
Canfeno	2,8
Trans-cariofileno	2,8
β -bourboneno	2,7
Germacreno D	2,5
Trans- β -ocimeno	2,5
Cis- α -bergamoteno	2,5
β -pineno	1,8
Chavicol	1,7
α -pineno	1,1

<i>Ocimum americanum</i> L.**	%
Trans-cinamato de metilo	75,4
Cis-cinamato de metilo	10,0
Estragol (metil chavicol)	5,2
Germacreno B	1,3
Cariofileno	0,8
Cis- β -Farneseno	0,7
Oxido de cariofileno	0,6
3-tujanol	0,5
β -selineno	0,5
Trans- β -Farneseno	0,4
Biciclogermacreno	0,4
Trans-ocimeno	0,4
1,8-cineol	0,3
Espatulenol	0,3
Fenchona	0,3
Valenceno/ecemofileno	0,3
β -felandreno	0,3
Linalol	0,2
Terpinoleno	0,2
Limoneno	0,1

<i>Ocimum sanctum</i> L.***	%
Eugenol	41,5
γ -cariofileno	23,7
Metil eugenol	11,8
β -elemeno	5,5
α -selineno	4,6
β -selineno	4,1
Valenceno/ecemofileno	2,6
α -humuleno	1,4
Naftaleno	1,0

<i>Ocimum gratissimum</i> L.****	%
Timol	43,7
γ -terpineno	21,1
β -cimeno	9,2
α -terpineno	4,5
α -tujeno	4,3
β -mirceno	3,6
p-cimeno	2,3
4-terpineol	1,5

<i>Ocimum americanum</i> L.***	%
Geraniol	32,0
Neral	27,2
Cis- α -bisaboleno	7,7
Trans-cariofileno	6,2
α -terpinoleno	4,5
α -bergamoteno	2,7
p-cimeno	1,8
Verbenol	1,4
α -humuleno	1,4
Trans- β -ocimeno	1,0
Limoneno	1,0
Estragol (metil chavicol)	0,8
α -terpineol	0,7

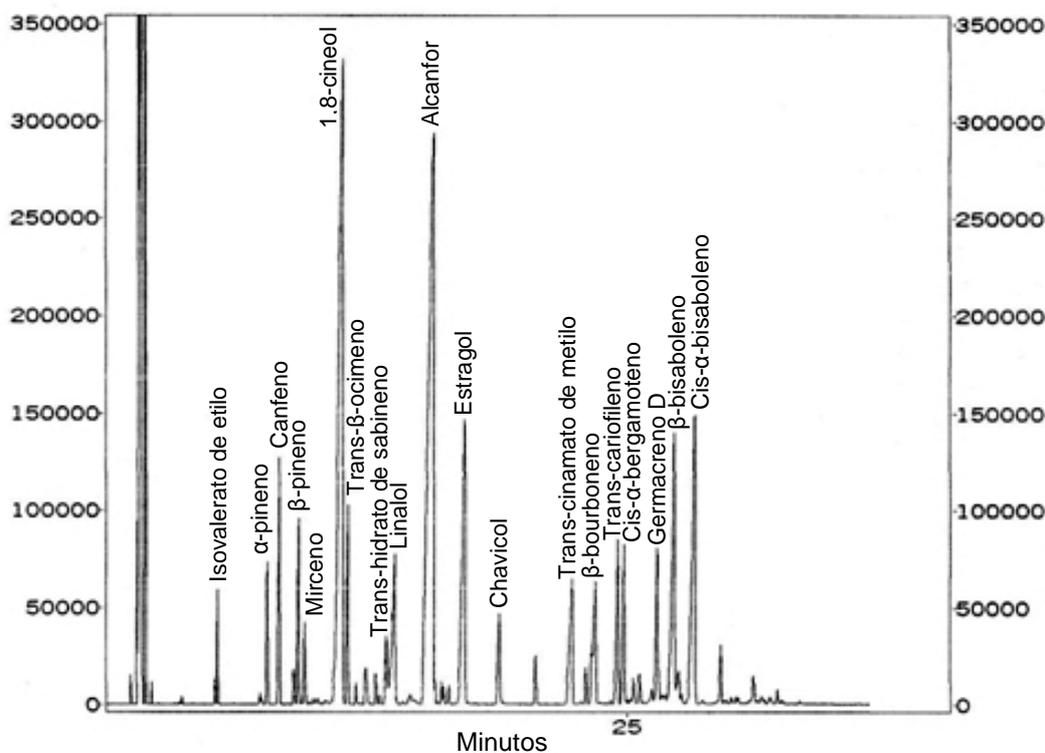
Los porcentajes corresponden a la abundancia en área relativa.

Fuentes:
* *Esta investigación*. (Colombia);
** MURILLO, Elizabeth *et al.* *Op cit.* (Colombia).
*** VIYUCH, J *et al.* Evaluation of in vitro antimicrobial activity of Thai basil oils and their micro-emulsion formulas against *Propionibacterium acnes*. *En: International Journal of Cosmetic Science*, (2006). no.28, p.125-133. (Tailandia).
**** ACOSTA, María *et al.* *Op cit.* (Venezuela).

“En el aceite esencial de *O. micrathum* cultivada en Ibagué, identificando los siguientes compuestos: 1,8-cineol, linalol, metilchavicol (estragol) y cinamato de metilo”¹⁵⁰. Estos mismos compuestos también fueron identificados en el aceite de *O. micranthum* cultivada en Sibundoy, pero además se encontró alcanfor como uno de los componentes mayoritarios.

En el cromatograma para el aceite esencial de *Ocimum micranthum* Wild. (Fig. 22), se observa que los dos compuestos mayoritarios son el alcanfor y 1,8-cineol, pero también se observan 17 compuestos más, en moderada proporción.

Figura 22. Cromatograma del aceite esencial de *Ocimum micranthum* Wild.



Fuente: Esta investigación.

¹⁵⁰ MURILLO PEREA, Elizabeth; ALCOCER, Milena Raquel y CARDONA Mónica Patricia. Op. cit.

La destilación de un aceite esencial revela claramente su alta o baja volatilidad, si el aceite se pone en contacto directo con agua hirviendo o con vapor: en las primeras etapas de la destilación destilan los compuestos con bajo punto de ebullición y los de alto punto de ebullición destilan después.

Según el fraccionamiento de aceite de menta americano, en un rango alrededor de los 100 °C destilan los hemiterpenos, seguidos de compuestos que destilan a 150 °C aproximadamente, constituidos de carbono e hidrógeno únicamente. Si la destilación continúa, el siguiente grupo de fracciones destila entre 200 y 230 °C, éste consiste principalmente en derivados oxigenados de los terpenos, $C_{10}H_{18}O$. El siguiente grupo de compuestos son nuevamente de naturaleza terpénica. Luego se encuentra la región de los sesquiterpenos C_{15} , seguidos de sus derivados oxigenados, a éstos últimos le siguen los diterpenos. Generalmente, el rango de puntos de ebullición para compuestos volátiles de un aceite va de 150 a 300 °C a presión atmosférica (760 mmHg)¹⁵¹.

Los principales compuestos identificados en el aceite esencial de *Ocimum micranthum* Wild., con un porcentaje de área relativa igual o superior a 0,6 %, se especifican en la Tabla 8.

¹⁵¹ GUENTHER, Ernest. Op. cit., p.46-50.

Tabla 8. Porcentajes de área relativa de compuestos identificados, para cada ensayo del diseño factorial $2^2 + 4$ puntos centrales.

Compuesto	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8
	40 min 0,9 psi(g)	60 min 0,8 psi(g)	40 min 0,9 psi(g)	60 min 1 psi(g)	20 min 1 psi(g)	40 min 0,9 psi(g)	20 min 0,8 psi(g)	40 min 0,9 psi(g)
Alcanfor	22,845	23,570	26,664	27,840	25,820	25,546	27,550	23,780
1,8-cineol	22,220	20,390	21,885	17,235	20,974	21,890	23,910	21,790
<i>Cis</i> - α -bisaboleno	9,410	8,360	7,460	7,810	8,286	7,660	6,030	7,665
Estragol	7,875	7,134	6,904	7,624	7,910	7,608	7,900	7,660
β -bisaboleno	6,700	6,190	5,520	5,390	6,117	5,460	5,020	6,030
Linalol	3,190	2,590	3,180	3,580	4,024	3,030	3,690	3,170
<i>Trans</i> -cariofileno	2,960	2,850	2,385	2,663	2,176	1,580	2,100	2,800
Canfeno	2,870	2,860	2,865	2,460	2,350	2,810	2,570	2,810
<i>Cis</i> - α -bergamoteno	2,770	2,565	2,415	2,340	2,260	2,490	2,060	2,450
<i>Trans</i> - β -ocimeno	2,620	2,450	2,190	2,383	2,270	2,440	2,000	2,480
<i>Trans</i> -cinamato de metilo	2,580	2,510	3,050	3,040	2,645	3,290	3,210	3,030
β -pineno	2,240	2,150	2,130	1,890	1,860	2,150	2,020	1,810
α -pineno	1,400	1,410	1,410	1,200	1,130	1,390	1,275	1,130
Germacreno D	1,170	0,950	1,280	2,250	2,274	2,165	1,854	2,500
Chavicol	1,140	1,290	1,485	1,390	1,180	1,690	1,390	1,653
Mirceno	0,975	0,920	0,883	0,829	0,820	0,920	0,830	0,950
β -bourboneno		4,720	1,976	3,265	1,120	1,680	1,515	2,653
Isovalerato de etilo	0,720	0,780	0,890		0,600	0,805	0,830	
<i>Trans</i> -hidrato de sabineno	1,050	1,760		0,840		0,880		0,760
<i>Cis</i> -hidrato de sabineno			0,690	0,820	0,730		0,890	
<i>Cis</i> -cinamato de metilo	0,650							0,740
Sumatoria	95,385	95,449	95,262	94,849	94,546	95,484	94,644	95,861

Fuente: Esta investigación.

Para el análisis de la variable concentración se tomó como referencia, la sumatoria del porcentaje de área de los dos compuestos mayoritarios de interés para cada tratamiento, de acuerdo a la Tabla 9. Los compuestos mayoritarios son el alcanfor y el 1,8-cineol, éstos representan aproximadamente el 50 % de la totalidad del área relativa.

Tabla 9. Porcentajes de área relativa de los compuestos mayoritarios de interés, para cada ensayo del diseño factorial $2^2 + 4$ puntos centrales.

Muestras diseño factorial $2^2 + 4$ puntos centrales								
Compuestos	E1 40 min 0,9 psi(g)	E2 60 min 0,8 psi(g)	E3 40 min 0,9 psi(g)	E4 60 min 1 psi(g)	E5 20 min 1 psi(g)	E6 40 min 0,9 psi(g)	E7 20 min 0,8 psi(g)	E8 40 min 0,9 psi(g)
Alcanfor	22,845	23,570	26,664	27,840	25,820	25,546	27,550	23,780
1,8-cineol	22,220	20,390	21,885	17,235	20,974	21,890	23,910	21,790
Sumatoria	45,065	43,960	48,549	45,075	46,794	47,436	51,460	45,570

Fuente: Esta investigación.

7.2.1 Análisis de varianza para Concentración

El único efecto estadísticamente significativo es el tiempo, cuyo valor de P es inferior a 0,05, indicando que es significativamente diferente de cero al 95,0 % de nivel de confianza. El estadístico R-cuadrado indica que el modelo así ajustado explica el 80,4524 % de la variabilidad en Concentración.

Tabla 10. Análisis de varianza para Concentración.

Fuente	Suma de cuadrados	G.I.	Cuadrado medio	F-Ratio	Valor-P
Efectos principales					
A:Presión	3,1524	1	3,1524	1,58	0,2766
B:Tiempo	21,2475	1	21,2475	10,68	0,0308
AB	8,35499	1	8,35499	4,20	0,1098
Error Total	7,95847	4	1,98962		
Total (corr.)	40,7133	7			

R-cuadrado = 80,4524 %

R-cuadrado (ajustado para G.I.) = 65,7918 %

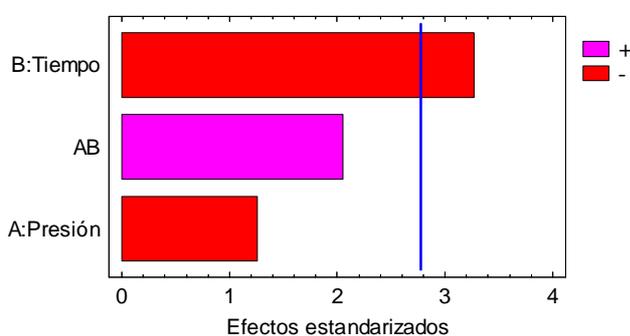
Error Estándar = 1,41054

Coficiente de variación (punto central) = 3 %

Fuente: Esta investigación.

En el diagrama de Pareto para concentración (Fig. 23), se puede apreciar que el único factor estadísticamente significativo es el tiempo; este efecto es negativo, lo que quiere decir, que a mayor tiempo, se tiene menor concentración de los componentes de interés. Lo anterior se debe a que en la primera etapa del proceso, destilan los compuestos con bajo punto de ebullición, acumulándose en mayor cantidad y hacia el final del proceso destilan los compuestos con mayor punto de ebullición. Estos últimos compuestos, aumentan el total del área relativa, pero la proporción de los compuestos mayoritarios se estabiliza.

Figura 23. Grafico de Pareto estandarizado para Concentración.



Fuente: Esta investigación.

“El punto de ebullición reportado en la literatura a presión atmosférica (760 mmHg), es de 209,1 °C para alcanfor y 176-177 °C para cineol”¹⁵².

Teniendo en cuenta que el punto de ebullición para un líquido de dos fases, siempre será más bajo que el punto de ebullición de cada uno de los líquidos puros a la misma presión total, se deduce que tanto el alcanfor y el 1,8-cineol destilaron a un punto de ebullición inferior al reportado inicialmente para cada uno. Al punto de ebullición de una mezcla de agua y aceite, la suma de las presiones parciales del aceite y el agua es igual a la presión atmosférica. Sin la ayuda del vapor de agua, la mayoría de los aceites se destilarían entre 150 y 300 °C, temperatura a la cual las sustancias lábiles se destruyen y puede ocurrir una fuerte resinificación¹⁵³.

Teóricamente en la destilación de un compuesto volátil insoluble en agua, el porcentaje de éste disminuye con el incremento del punto de ebullición del

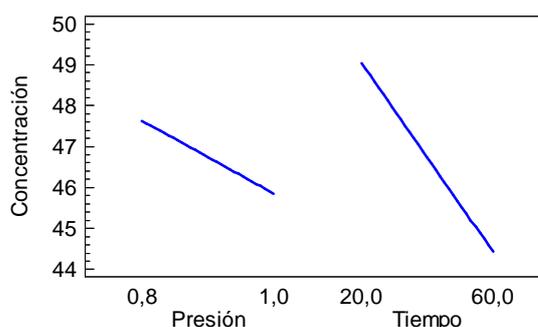
¹⁵² PERRY, Robert H. Manual del ingeniero químico. 6 ed. México: McGraw Hill Interamericana, 1992. Tomo 1. ISBN 968-422-971-2.

¹⁵³ GUENTHER, Ernest. Op. cit., p.94.

compuesto. Esta disminución no es uniforme con todas las sustancias, algunas sustancias con puntos de ebullición similares destilarían en diferentes proporciones, otros como el alcanfor y el 1,8-cineol, tienen diferentes puntos de ebullición pero durante la destilación pueden acumularse en casi las mismas proporciones. Las desviaciones de esta clase son causadas principalmente por la constitución química y la reactividad de varios componentes del aceite esencial, teniendo en cuenta que los aceites esenciales no son sustancias químicamente puras y contienen varios y frecuentemente muchos compuestos con diferentes propiedades químicas y físicas¹⁵⁴.

En el Gráfico de Efectos Principales para Concentración (Fig. 24), se observa que, a una presión de 0,8 psi_(g), se obtiene mejor concentración que a 1,0 psi_(g). A un tiempo de 20 minutos, se obtiene mejor concentración que a un tiempo de 60 minutos.

Figura 24. Gráfico de efectos principales para Concentración.



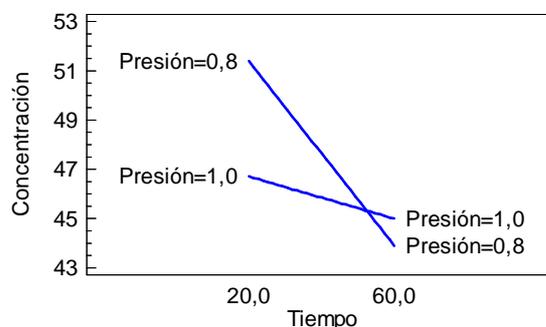
Fuente: Esta investigación.

Los principios expuestos anteriormente para las variables de rendimiento, también explican este comportamiento, ya que la menor presión y el menor tiempo, son suficientes para recuperar la mayor cantidad de los compuestos mayoritarios de interés y si se incrementa la presión y el tiempo de operación, se consigue enriquecer el aceite principalmente de compuestos minoritarios de alto punto de ebullición.

Se observa en la Figura 25, una clara interacción entre presión y tiempo, aunque no es significativa, para la variable concentración. Las condiciones que favorecen a esta variable, son un bajo nivel de presión y un bajo nivel de tiempo. A medida que el tiempo y la presión aumentan, la concentración disminuye, por tanto, es mejor trabajar a tiempo y presión reducidos.

¹⁵⁴ GUENTHER, Ernest. Op. cit., p.94.

Figura 25. Gráfico de interacción para Concentración.



Fuente: Esta investigación.

7.3 DETERMINACIÓN DE TIEMPO Y PRESIÓN ÓPTIMOS

Teniendo en cuenta el valor óptimo teórico (Tabla 11), se realizaron cuatro extracciones para verificar su validez, considerando 2000 g de materia prima para cada ensayo.

A continuación, “se observa el valor óptimo sugerido mediante el análisis estadístico realizado con el Programa Statgraphics Plus 0.5”¹⁵⁵, para cada variable de respuesta.

Tabla 11. Valores óptimos teóricos para las variables de respuesta.

Variable de respuesta	Valor óptimo teórico	Factores	
		Presión (psi _(g))	Tiempo (min)
Rendimiento de Aceite	0,93 % v/p	1,0	60
Rendimiento de Proceso	0,66 % v/v	0,8	20
Concentración	51,38 % área relativa	0,8	20

Fuente: Esta investigación.

En la Tabla 12 se presentan los resultados del porcentaje de área relativa para los compuestos identificados en las muestras de aceite recolectadas en las réplicas. No se aprecia un cambio sustancial en las concentraciones de los compuestos mayoritarios, sin embargo, algunos compuestos minoritarios, resultan menos representativos con respecto a los primeros análisis. La Tabla 13 muestra la sumatoria de los compuestos mayoritarios.

¹⁵⁵ STATISTICAL GRAPHICS CORPORATION. Statgraphics plus 5.0. 1994-2000. Op. cit.

Tabla 12. Porcentajes de área relativa para réplicas del valor óptimo.

Compuesto	EA 20 min 0,8 psi _(g)	EB 20 min 0,8 psi _(g)	EC 20 min 0,8 psi _(g)	ED 20 min 0,8 psi _(g)
Alcanfor	28,556	18,990	25,171	24,265
1,8-cineol	23,580	27,120	20,734	21,535
<i>Cis</i> - α -bisaboleno	7,614	6,700	6,263	7,700
Estragol	8,190	8,705	7,363	8,100
β -bisaboleno	6,324	5,515	5,830	5,543
Linalol		3,970	2,685	3,954
<i>Trans</i> -cariofileno	2,020	2,410	2,384	0,920
Canfeno	3,320	3,264	2,795	2,830
<i>Cis</i> - α -bergamoteno	2,550	2,553	2,297	2,513
<i>Trans</i> - β -ocimeno	1,890	2,380	2,132	2,165
<i>Trans</i> -cinamato de metilo	3,393	2,835	2,608	3,220
β -pineno	2,315	2,460	2,132	2,190
α -pineno	1,640	1,624	1,385	1,390
Germacreno D	1,580	2,410	2,341	2,703
Chavicol	1,654	1,256	1,398	1,714
Mirceno	0,920	1,020	0,917	0,932
Isovalerato de etilo	0,950	0,990	0,840	0,726
β -bourboneno		0,750	2,674	1,800
<i>Cis</i> -hidrato de sabineno		0,800		0,754
<i>Cis</i> -cinamato de metilo			0,600	
Sumatoria	96,496	95,752	92,549	94,954

Fuente: Esta investigación.

Tabla 13. Porcentajes de Área Relativa, de los compuestos mayoritarios de interés para réplicas del valor óptimo.

Compuestos	MA	MB	MC	MD
	20 min 0,8 psi _(g)			
Alcanfor	28,556	18,990	25,171	24,265
1,8-cineol	23,580	27,120	20,734	21,535
Sumatoria	52,136	46,110	45,905	45,800

Fuente: Esta investigación.

A partir de la medición de la cantidad de aceite obtenido y la cantidad de condensados generados en el proceso de extracción, se construyó la Tabla 14. Los datos calculados mediante las fórmulas presentadas en la metodología se observan en la Tabla 15.

Tabla 14. Resultados observados para réplicas del valor óptimo.

Ensayo	Presión (psi _(g))	Tiempo (min)	Cantidad aceite (ml)	Vapor condensado (ml)
EA	0,8	20	16,4	3900
EB	0,8	20	18,6	3000
EC	0,8	20	16,8	4000
ED	0,8	20	16,2	4500

Fuente: Esta investigación.

Tabla 15. Resultados calculados para réplicas del valor óptimo.

Ensayo	Presión (psi _(g))	Tiempo (min)	Concentración (% área relativa)	Rendimiento de Aceite (% v/p) (ml/g)	Rendimiento de Proceso (% v/v) (ml/ml)
EA	0,8	20	52,136	0,82	0,42
EB	0,8	20	46,110	0,93	0,61
EC	0,8	20	45,905	0,84	0,42
ED	0,8	20	45,800	0,81	0,36
		Promedio	47,488	0,85	0,45

Coefficiente de variación para Concentración: 7,7 %.

Coefficiente de variación para Rendimiento de Aceite: 1,76 %.

Coefficiente de variación para Rendimiento de Proceso: 20,8 %.

Fuente: Esta investigación.

Para la variable concentración, el promedio del valor experimental de las réplicas es 47,488 % (área relativa), por cuanto no alcanza el valor óptimo teórico planteado (51,38 %). Sin embargo, el promedio del valor experimental, evidencia la validez en la explicación suministrada al justificar la variabilidad resultante en el diseño factorial: a 0,8 psi_(g) y 20 minutos de proceso, se logra una concentración de compuestos mayoritarios superior a la concentración obtenida con 1 psi_(g) y 60 minutos de proceso.

En condiciones de 0,8 psi_(g) y 20 minutos de proceso, el valor óptimo teórico para la variable rendimiento de proceso es de 0,66 %v/v, frente al 0,45 %v/v que se obtuvo como promedio del valor experimental de las réplicas. Aunque no se alcanzó el valor teórico, el valor experimental obtenido confirma el supuesto derivado del diseño factorial: a 0,8 psi_(g) y 20 minutos de proceso, se logra un rendimiento de proceso superior al obtenido con 1 psi_(g) y 60 minutos de proceso.

En cuanto a la variable rendimiento de aceite, las condiciones para obtener el valor óptimo teórico eran 1 psi_(g) y 60 minutos de proceso, sin embargo, el promedio del valor experimental de las réplicas, se obtuvo en condiciones de 0,8 psi_(g) y 20 minutos de proceso. Por tanto, se esperaba un rendimiento de aceite menor que el valor óptimo teórico (0,93 %v/p), como efectivamente sucedió ya que el promedio del valor experimental fue 0,85 %v/p. Teniendo en cuenta que las réplicas para rendimiento de proceso no se trabajaron bajo las condiciones sugeridas, el promedio del valor experimental fue el más próximo al valor teórico, en comparación con las otras variables evaluadas, confirmando que el efecto del tiempo y la presión no son significativos sobre el rendimiento de aceite.

Teniendo en cuenta, que el análisis estadístico permitió deducir un efecto significativo de los factores sobre la variable rendimiento de proceso, se habría esperado un mejor desempeño de ésta variable en las réplicas. A partir de esto, se deriva la hipótesis de que en el proceso de extracción, independientemente de la presión seleccionada, hay una inyección importante de vapor al inicio del proceso, con el fin de alcanzar la presión de trabajo.

Una vez alcanzada la presión de trabajo, la cantidad de vapor que se inyecta para mantenerla es menor que la inicial. Por esta razón no se logró racionalizar el gasto de vapor de manera importante, sin embargo, el hecho de establecer el tiempo de proceso en 20 minutos, supone la ventaja de procesar mayor número de lotes en la misma jornada de trabajo, generando beneficio en la producción.

7.4 BIOENSAYO

7.4.1 Análisis de varianza para Repelencia (impregnación de papel). Este ensayo se realizó mediante la técnica de impregnación de papel, colocando 100 µl del extracto en el papel absorbente, y posteriormente se evaluó la repelencia en función de la concentración de aceite esencial. Los resultados del análisis estadístico de la Tabla 16, indican una diferencia significativa para este ensayo ($p < 0,01$).

Mediante la prueba de Tukey (Tabla 17), se concluye que desde el 2 % hasta el 4 % de concentración, se obtiene mejor repelencia que a las concentraciones más bajas, pero no hay diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de 2 % a 4 %.

Tabla 16. Análisis de varianza para Repelencia (impregnación de papel).

Fuente	Suma de cuadrados	G.I.	Cuadrado medio	Cociente-F	Valor-P
Entre grupos	5378,46	4	1344,62	13,31	0,0000
Intra grupos	2020,99	20	101,05		
Total (Corr.)	7399,46	24			

Error Estándar = 3,51176

Fuente: Esta investigación.

Mediante la prueba de Tukey, se obtienen dos grupos homogéneos, como se observa en la Tabla 17. El grupo A comprende concentraciones de 0,5 y 1,0 %, por otra parte el grupo B comprende concentraciones de 2,0; 3,0 y 4,0 %.

Tabla 17. Prueba HSD de Tukey para Repelencia (impregnación de papel).

Tratamiento	Concentración % (v/v)	Frecuencia	Media	Grupos homogéneos
1	0,5	5	15,76	A
2	1,0	5	17,05	A
3	2,0	5	41,16	B
4	3,0	5	46,18	B
5	4,0	5	49,99	B

Nivel de significancia de 0,01 para un nivel de confianza de 99 %.

Fuente: Esta investigación.

En el estudio de la actividad repelente del aceite esencial de Lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf) sobre el pulgón ruso *Diuraphis noxia* Kurdj., las concentraciones de Lemongrass empleadas fueron de 0,5; 1; 2; 3 y 4 %, en formulación acuosa al 5 % de propilenglicol. La mayor repelencia obtenida fue de

95 % para una concentración de esencia del 4 % y la menor repelencia fue de 75 % para el 0,5 % de concentración de esencia¹⁵⁶.

Sin embargo, es conveniente restar el valor medio de repelencia del testigo (39 %), al porcentaje de repelencia de los tratamientos, para conocer el efecto real del aceite esencial. Los resultados corregidos son: 56 % de repelencia neta para Lemongrass al 4 % de concentración, frente al 49,99 % de repelencia neta para *O. micranthum*, a la misma concentración, y por otra parte, el 36 % de repelencia neta para Lemongrass al 0,5 %, frente al 15,76 % de repelencia neta para *O. micranthum* a la misma concentración.

A pesar de que en los dos estudios se trabajó con aceite esencial de dos especies botánicas diferentes, sobre dos especies diferentes de áfidos, los datos de repelencia para la mayor concentración son bastante aproximados. De acuerdo con las conclusiones para el aceite de Lemongrass, se podría atribuir este efecto a la acción del aceite en fase gaseosa sin estar en contacto directo con la planta y los insectos, lo que ayudaría a mantener las características organolépticas de los productos agrícolas, en caso de su aplicación.

7.4.2 Análisis de varianza para Mortalidad (impregnación de papel). En el análisis estadístico de las Tablas 18 y 19, no se aprecian diferencias significativas para esta prueba ($p > 0,01$), por esta razón, se concluye que para esta prueba no hay efecto de la concentración sobre la mortalidad.

Tabla 18. Análisis de varianza para Mortalidad (impregnación de papel).

Fuente	Suma de cuadrados	G.l.	Cuadrado medio	Cociente-F	Valor-P
Entre grupos	830,671	4	207,668	1,35	0,2870
Intra grupos	3081,05	20	154,052		
Total (Corr.)	3911,72	24			

Error Estándar = 2,55334

Fuente: Esta investigación.

“La mayor mortalidad obtenida fue de 29,86 % al 4 % de concentración (lectura a las 24 horas), frente al 50 % de mortalidad en promedio, obtenida para el extracto cetónico de Eucalipto, sobre *Myzus persicae*¹⁵⁷. El extracto de eucalipto produjo una mortalidad significativa, para la lectura a las 72 horas, teniendo en cuenta que la mortalidad del testigo fue de 15 % aproximadamente. Los autores no reportan la mortalidad corregida de Abbott y por tanto, al hacer la corrección se alcanzaría un máximo cercano al 35 %. La

¹⁵⁶ RICCI, Mónica *et al.* Op. cit.

¹⁵⁷ CARRIZO, Paola *et al.* Op. cit.

aplicación del extracto se realizó por medio de la técnica del film residual, un método de aplicación indirecto en analogía a la técnica de impregnación de papel empleada en la fase preliminar con el extracto de *O. micranthum*.

Tabla 19. Prueba HSD de Tukey para Mortalidad (impregnación de papel).

Tratamiento	Concentración % (v/v)	Frecuencia	Media	Grupos homogéneos
1	0,5	5	14,94	A
2	1,0	5	14,94	A
3	2,0	5	16,69	A
4	3,0	5	22,61	A
5	4,0	5	29,86	A

Nivel de significancia de 0,01 para un nivel de confianza de 99 %.

Fuente: Esta investigación.

La falta de efectividad del extracto de *Ocimum micranthum* Wild para esta prueba de mortalidad, se puede explicar desde tres aspectos, principalmente: 1) se requiere mayor tiempo de acción del extracto en fase gaseosa, 2) se requiere mayor concentración del extracto ó 3) se requiere otro método de aplicación que permita un modo de acción diferente.

Teniendo en cuenta, que al realizar un recuento después de 24 horas, puede influir de forma negativa e importante el deterioro del sustrato, no se realizaron lecturas que superaran este plazo. Por otra parte, al emplear mayor concentración del extracto, se podrían presentar efectos colaterales indeseados durante el experimento. Por estas razones, se determinó trabajar mediante la técnica de inmersión del sustrato para el ensayo definitivo de mortalidad, empleando las mismas concentraciones evaluadas en el ensayo preliminar.

7.4.3 Análisis de varianza para Mortalidad (inmersión del sustrato). Este ensayo se realizó mediante la técnica de inmersión, sumergiendo el foliolo en el extracto, luego se depositaron los insectos sobre el foliolo y se realizó la lectura a las 24 horas. El análisis de los datos (Tablas 20 y 21), muestra diferencias significativas ($p < 0,01$), para el efecto de la concentración sobre la mortalidad.

La mortalidad evaluada para *O. micranthum* fue dependiente de la concentración; el menor porcentaje de mortalidad obtenido fue de 41,1 % y corresponde a la menor concentración (0,5 %) y el mayor porcentaje de mortalidad fue de 90 % para la mayor concentración (4 %), sin embargo, a esta última concentración se evidenció un deterioro del sustrato, lo que permite especular acerca de su fitotoxicidad. La mortalidad al 4 % no se diferencia significativamente de la obtenida al 3 % de concentración, pero la ventaja de esta última es que el deterioro del sustrato no es relevante, aunque este hecho no fue probado estadísticamente.

Tabla 20. Análisis de varianza para Mortalidad (inmersión del sustrato).

Fuente	Suma de cuadrados	G.I.	Cuadrado medio	Cociente-F	Valor-P
Entre grupos	7906,43	4	1976,61	29,03	0,0000
Intra grupos	1361,89	20	68,0947		
Total (Corr.)	9268,32	24			

Error Estándar = 3,93029

Fuente: Esta investigación.

Tabla 21. Prueba HSD de Tukey para Mortalidad (inmersión del sustrato).

Tratamiento	Concentración % (v/v)	Frecuencia	Media	Grupos homogéneos
1	0,5	5	41,10	A
2	1,0	5	64,22	B
3	2,0	5	78,45	BC
4	3,0	5	86,15	C
5	4,0	5	90,00	C

Nivel de significancia de 0,01 para un nivel de confianza de 99 %.

Fuente: Esta investigación.

La evaluación del aceite esencial de *Ocimum micranthum* Wild. se llevó a cabo mediante la técnica de aplicación por inmersión del sustrato. “Con el empleo de ésta técnica sobre las ninfas de *Myzus persicae* Sulzer, registrando una mortalidad del 22 % a las 24 horas, con una concentración de 0,18 % de aceite esencial (mezcla patentada de eugenol, timol y fenetilpropionato)”¹⁵⁸.

La mortalidad registrada para *O. micranthum* al 0,5 % de concentración fue de 41,1 % a las 24 horas, por tanto se concluye que con una diferencia de 0,32 % entre las concentraciones mínimas en los dos estudios, la mortalidad lograda con *O. micranthum* es casi el doble de la obtenida con la mezcla patentada de eugenol, timol y feniletilpropionato, con lectura a las 24 horas.

Se debe aclarar que los componentes mayoritarios de *O. micranthum* fueron 1,8-cineol y alcanfor, de manera que se podría atribuir principalmente a estos compuestos las actividades demostradas en el presente estudio. Es de especial interés en la confrontación de resultados, citar el “estudio del aceite esencial de *Lavandula luisieri* L. que pertenece a la familia *Labiatae*”¹⁵⁹, es decir, la misma familia botánica de *O. micranthum*.

¹⁵⁸ ISMAN, M.B. Op. cit.

¹⁵⁹ GONZALEZ-COLOMA, Azucena *et al.* Op. cit.

Los componentes mayoritarios identificados en el aceite de *Lavandula luisieri* L. también fueron 1,8-cineol y alcanfor. Los investigadores probaron el aceite con *Myzus persicae*, y encontraron una moderada correlación del 1,8-cineol respecto al efecto antialimentario estimado en 66 %. “Cabe destacar que el 1,8-cineol fue reportado como un efectivo tóxico contra plagas de insectos en productos almacenados¹⁶⁰, además es el componente característico del género *Eucalyptus*, y es responsable en gran parte, de varias de sus propiedades pesticidas”¹⁶¹.

Las propiedades repelentes de *E. saligna* pueden ser atribuidas al 1,8-cineol, porque éste representa el 93,2 % de su aceite esencial. Del aceite esencial evaluado a concentraciones menores de 90 %, éste fue el único que disminuyó significativamente en términos de tiempo de repelencia a concentraciones menores de 50 %. En conclusión, un estudio empleando 1,8-cineol mostró efectos moderados como disuasor alimentario y de oviposición de *Ae. aegypti*¹⁶².

Para el aceite de *O. micranthum* cultivada en Ibagué, no se encontró actividad insecticida frente a la mosca doméstica¹⁶³, a pesar de que los compuestos identificados se encuentran reportados con una amplia gama de actividades biológicas. Esto sugiere que para el caso de del aceite de *O. micranthum* cultivada en Sibundoy, el alcanfor sería uno de los compuestos con mayor actividad biológica respecto a los demás.

“El alcanfor en *R. officinalis* (33,6 %) y en *B. spartioides* (50,5%) puede ser responsable por la repelencia de estas plantas. Este componente es comúnmente usado para repeler plagas de productos almacenados tales como polillas y gorgojos”¹⁶⁴. “Como componente principal de aceites esenciales de plantas aromáticas éste ha mostrado repelencia contra *Anopheles culicifacies* Giles, *Cx. Quinquefasciatus* Say”¹⁶⁵, *Anopheles gambiae* Giles s.l. y *Anopheles*.

¹⁶⁰ LEE, S.; PETERSON, C.J. y COATS, J.R. Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. En: J. Stored Prod. Res.39, p.77-85. Citado por: GONZÁLEZ-COLOMA, Azucena *et al.* Op. cit.

¹⁶¹ DUKE, J.A. Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical databases, 2004. [En línea] [Citado 09-06-08] Disponible en internet: <http://www.ars-grin.gov/duke/>. Citado por: BATISH, Daizy *et al.* Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. En: Forest Ecology and Management, (2008). vol.256, p.2166-2174.

¹⁶² WANTANABE, K. *et al.* New mosquito repellent from *Eucalyptus camaldensis*. En: J. Agric. Food. Chem. (1993). vol.41, p.2164–2166. Citado por: GILLIJ, Y.G.; GLEISER, R.M y ZYGADLO, J.A. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. En: Bioresource Technology, (2008). vol.99, p.2507-2515.

¹⁶³ MURILLO PEREA, Elizabeth; ALCOCER, Milena Raquel y CARDONA Mónica Patricia. Op. cit.

¹⁶⁴ SPURR, E.B. y MCGREGOR, P.G. Potential invertebrate antifeedants for toxic baits used for vertebrate pest control. 2003. Science for Conservation 232. Department of Conservation, Wellington. Citado por: GILLIJ, Y.G.; GLEISER, R.M y ZYGADLO, J.A. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. En: Bioresource Technology, (2008). vol.99. p.2507-2515.

¹⁶⁵ ANSARI, M.A. y RAZDAN, R.K. Relative efficacy of various oils in repelling mosquitoes. 1995. *Indian J. Malariol.* vol.32, p.104–111. Citado por: GILLIJ, Y.G.; GLEISER, R.M y ZYGADLO, J.A. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. En: Bioresource Technology, (2008). vol.99, p.2507-2515.

“En un estudio sobre *Arabidopsis thaliana*, se reportó el trans- β -farneseno, como un compuesto relacionado con el estrés en la planta y también feromona de alarma en los áfidos. El trans- β -farneseno causó repulsión en *Myzus persicae* (áfido de la patata y el duraznero)”¹⁶⁶. En el presente estudio, el cis- β -farneseno, fue identificado en el aceite de *O. micranthum* con un porcentaje de área relativa de 0,4 %, es probable que este compuesto haya reforzado la actividad biológica atribuida a los dos compuestos mayoritarios (1,8-cineol y alcanfor).

“Los componentes del aceite esencial pueden tener efectos biológicos sinérgicos o antagonísticos, ya que un estudio del aceite esencial de *Salvia lavanduleifolia* Vahl, mostró que un alto contenido de 1,8-cineol y un bajo contenido de alcanfor en el aceite pueden incrementar su actividad anticolinesterasa”¹⁶⁷.

En la Figura 26, se observa una comparación de las pruebas del bioensayo, en términos de porcentaje de actividad biológica Vs concentración. Los mejores resultados se observan, para la mortalidad obtenida por inmersión del sustrato. El porcentaje de actividad biológica de esta prueba supera a las demás, en todas las concentraciones evaluadas. Sin embargo, los datos para la única prueba de repelencia evaluada, presentan un comportamiento favorable, respecto a la mortalidad por impregnación de papel.

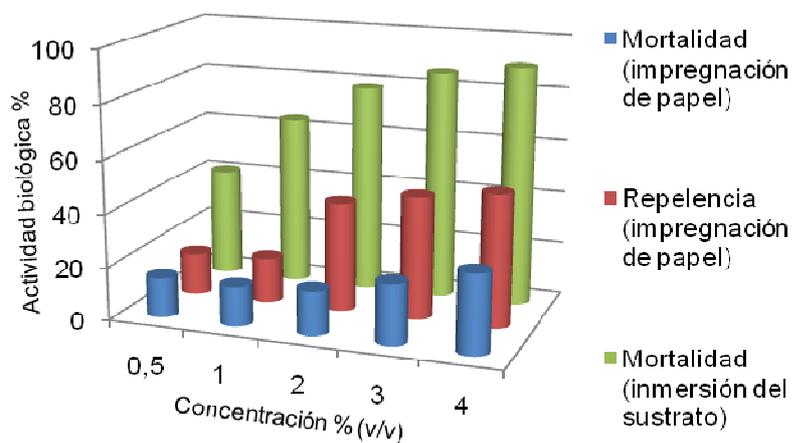
En la evaluación *in vitro* de un extracto vegetal, se espera por lo menos un 40 a 50 % de actividad biológica para continuar con la fase de campo. Sin embargo, el porcentaje de actividad biológica, no es un criterio suficiente por sí solo, para recomendar la aplicación comercial, ya que para esta finalidad es imprescindible evaluar los costos de la aplicación, además, el porcentaje de actividad biológica para comercialización de un extracto vegetal, debe ser por lo menos del 80 %.

El aceite esencial es un producto reconocido por su alto valor agregado, por esta razón, si la actividad biológica resulta significativa, a altas concentraciones del extracto, aunque tenga validez en cuanto a la actividad biológica, seguramente no sería conveniente en términos de rentabilidad, lo que implicaría determinar la relación beneficio-costos de la aplicación.

¹⁶⁶ BEALE, M.H. *et al.* Aphid alarm pheromone produced by transgenic plants affects aphid and parasitoid behaviour. En: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.103, p.10509–10513. Citado por: PICKETT, John *et al.* Developments in aspects of ecological phytochemistry: the role of cis-jasmone in inducible defence systems in plants. En: Phytochemistry, (2007). vol.68, p.2937-2945.

¹⁶⁷ SAVELEV, S. *et al.* Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. En: Pharmacol. Biochem. Behav. vol.75, p.661-668. Citado por: GONZALEZ-COLOMA, Azucena *et al.* Op. cit.

Figura 26. Comparación porcentual para las actividades biológicas evaluadas, en el aceite esencial de *Ocimum micranthum* Wild.



Fuente: Esta investigación.

Mediante las pruebas de bioensayo, se evidenció una actividad biológica en mayor o menor medida, por tanto, se puede destacar que la bioactividad del aceite esencial depende del tipo y naturaleza de los constituyentes y su concentración individual. Esto varía con especies, estaciones, localización, clima, tipo de suelo, edad de las hojas, régimen de fertilidad, el método usado para el secado del material vegetal y el método de extracción del aceite¹⁶⁸.

¹⁶⁸ BROOKER, M.I.H. y KLEINIG, D.A. Field Guide to Eucalyptus. vol.1. South-eastern Australia, 3ra ed. Bloomings, Melbourne. 2006. Citado por: BATISH, Daizy *et al.* Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. *En: Forest Ecology and Management*, (2008). vol.256, p.2166-2174.

8. CONCLUSIONES

La cantidad de aceite obtenido en promedio para cada ensayo fue de 17,13 ml, por tanto se recuperaron 205,6 ml de aceite en total, a partir de 24 kg de albahaca seca, para un promedio de Rendimiento de Aceite de 0,85 % (v/p).

Se identificaron 21 compuestos con un % de área relativa superior a 0,6 %. Fueron identificados como compuestos mayoritarios el alcanfor (38,21 %) y el 1,8-cineol (32,19 %). Sin embargo, otros compuestos en cantidades apreciables fueron: *cis*- α -bisaboleno (11,59 %), estragol (11,40 %), β -bisaboleno (8,66 %), linalol (4,98 %), *cis*- α -bergamoteno (4,41 %), canfeno (4,05 %), *trans*- β -ocimeno (3,66 %), *trans*-cinamato de metilo (3,60 %), *trans*-cariofileno (3,66 %) y β -pineno (3,03 %).

El punto óptimo para obtener una relación de compromiso entre Rendimiento de Aceite, Rendimiento de Proceso y Concentración, fue de 0,8 psi_(g) y 20 minutos de proceso.

El mayor Rendimiento de Aceite se obtuvo con una presión de 1 psi_(g) y 60 minutos de proceso. El efecto del tiempo y la presión, para el rango de niveles seleccionado, no fue significativo sobre la variable Rendimiento de Aceite ($p > 0,05$), por tanto, la variabilidad en este caso se atribuyó principalmente a la oxidación y evaporación de compuestos, y por otra parte a las condiciones agroambientales del cultivo, de acuerdo con la revisión bibliográfica.

El mayor Rendimiento de Proceso se obtuvo con una presión de 0,8 psi_(g) y 20 minutos de proceso. El efecto del tiempo y la presión de forma individual sobre la variable Rendimiento de Proceso, fue significativamente negativo ($p < 0,05$), ya que la mayor cantidad de aceite se obtuvo en los primeros minutos de la extracción. La interacción entre tiempo y presión fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$), lo que permitió obtener una cantidad suficiente de aceite sin extender más el tiempo de proceso.

La mayor Concentración de alcanfor y 1,8-cineol, se obtuvo con una presión de 0,8 psi_(g) y 20 minutos de proceso. El efecto tiempo contribuyó de manera importante en la disminución de la Concentración de alcanfor y 1,8-cineol ($p < 0,05$), ya que al prolongar el proceso, concluía la destilación de dichos compuestos y comenzaba la destilación de compuestos minoritarios con un punto de ebullición mayor. El efecto de interacción entre presión y tiempo, resultó positivo pero no fue estadísticamente importante ($p > 0,05$).

En la prueba preliminar del bioensayo, se apreció un efecto de repelencia importante ($p < 0,01$), con la técnica de impregnación de papel. El mejor tratamiento resultó con la emulsión acuosa al 4 %v/v para una repelencia del 49,99 %. Sin embargo, la mortalidad

evaluada con esta misma técnica no fue significativa ($p>0,01$), ya que a la máxima concentración (4 %v/v) no superó el 29,86 % de mortalidad corregida.

La prueba definitiva del bioensayo realizada con la técnica de inmersión del sustrato, arrojó resultados significativos ($p<0,01$). Los mejores tratamientos en términos del porcentaje de mortalidad corregida se observaron a concentraciones de 3 % y 4 %v/v, obteniendo resultados de 86,15 % y 90 % respectivamente. Sin embargo, al 4 %v/v de concentración se presentó un notable deterioro del sustrato vegetal.

El aceite esencial de *Ocimum micranthum* Wild. mostró un efecto de repelencia y mortalidad sobre *Myzus persicae* Sulzer, de acuerdo con la técnica empleada para la evaluación en condiciones de laboratorio. Los efectos observados se atribuyen al alcanfor y 1,8-cineol, sin desconocer las posibles interacciones de sinergia o antagonismo con los demás compuestos presentes.

9. RECOMENDACIONES

Se recomienda evaluar la composición y rendimiento del aceite esencial de *Ocimum micranthum* Wild., cultivada y cosechada en el mismo lugar, pero en otra época del año, para conocer la respuesta del metabolismo de esta planta, a los cambios agroclimáticos. Esto con el fin de identificar compuestos mayoritarios probablemente diferentes a los identificados en el presente estudio.

También se podría realizar un estudio, de común acuerdo con la Facultad de Ciencias Agrícolas, para el evaluar el aceite esencial de *Ocimum micranthum* Wild., cultivada bajo condiciones controladas, en invernaderos o con técnicas de producción agrícola determinadas, con el fin de identificar variaciones en sus características. También se recomienda evaluar la actividad biológica del aceite esencial, a nivel de campo, para conocer su grado de estabilidad y acción sobre el patógeno en esas condiciones.

Una de las más importantes fuentes de variación en la composición del aceite esencial, está relacionada con la naturaleza botánica de la especie trabajada, por tanto, sería primordial tener en cuenta los trabajos adelantados en el área de taxonomía vegetal para contribuir con una mayor especificidad en la identificación de variedades para cada especie.

En el campo de la Ingeniería Agroindustrial, se recomienda determinar la pureza del aceite obtenido, y evaluar la pertinencia de su empleo en el campo alimentario, farmacéutico o su aplicación en otras áreas no alimentarias, determinando la estabilidad del aceite esencial formulado en otro tipo de productos. Sería interesante evaluar el producto contra algunas plagas que amenazan la inocuidad, dentro de las plantas de procesamiento de alimentos, ya que los productos empleados para el manejo de plagas en estos lugares, presentan un alto nivel de toxicidad y residualidad.

Para el Ingeniero Agroindustrial, es fundamental preservar la calidad de las materias primas y productos, por tanto, se podría evaluar el efecto del aceite esencial sobre plagas de productos almacenados y frescos en la etapa postcosecha, contrarrestando el empleo de plaguicidas con mayor nivel de toxicidad, que ponen en riesgo la salud del consumidor y el equilibrio ambiental.

Para las áreas que guarden relación con el presente tema, se recomienda evaluar otras posibles aplicaciones y potenciales actividades del aceite esencial de *Ocimum micranthum* Wild., cultivado en la región del Valle de Sibundoy.

BIBLIOGRAFÍA

ABBOT, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* vol.18, p.265-267. Citado por: FUENTES CONTRERAS, Hernando; BASOALTO, Esteban; SANDOVAL, Claudio; PAVEZ, Patricia; LEAL, Claudia; BURGOS, Raiil y MUÑOZ, Cristian. Evaluación de la eficacia, efecto residual y de volteo de aplicaciones en pretrasplante de insecticidas nicotinoides y mezclas de nicotinoide-piretroide para el control de *Myzus persicae nicotianae* (Hemiptera:Aphididae) en tabaco. En: *Agricultura Técnica* (Chile), (ene-mar 2007). vol.67, no.1, p.16-22.

ACOSTA, María; GONZÁLEZ, María; ARAQUE, María; VELAZCO, Elsa; KHOURF, Nancy; ROJAS, Luis y USUBILLAGA, Alfredo. Composición química de los aceites esenciales de *Ocimum basilicum* L. var *basilicum*, *O. basilicum* L. var *purpurensens*, *O. gratissimum* L., y *O. tenuiflorum* L., y su efecto antimicrobiano sobre bacterias multirresistentes de origen nosocomial. En: *Revista de la Facultad de Farmacia*, (2003). vol.45, no.1, p.19-24. [En línea] [Citado 20-02-08] Disponible en Internet: http://www.saber.ula.ve/db/ssaber/Edocs/pubelectronicas/revistafarmacia/vol45/acosta_m.pdf.

ADAMS, R.P. Identification of Essentials Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Allured Publishing Corporation, 2004.

ALZOGARAY, R.; FONTAN A. y ZERBA E. Repellency of deet to nymphs of *Triatoma infestans*. 2000. En: *Med. Vet. Entomol.* (Oxford). vol.14, p.6-10. Citado por: RICCI, Mónica; PADÍN, Susana; RINGUELET, Jorge y KAHAN, Andrea. Utilización de aceite esencial de Lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf) como repelente de *Diuraphis noxia* Kurdj. (Hemiptera: Aphididae) en Trigo. En: *Agricultura Técnica*, Chile. (jul-sep 2006). vol.66, no.3, p.256-263. [En línea] [Citado 23-10-07] Disponible en Internet: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0365-28072006000300004&script=sci_arttext.

ANSARI, M.A. y RAZDAN, R.K. Relative efficacy of various oils in repelling mosquitoes. 1995. *Indian J. Malariol.* vol.32, p.104–111. Citado por: GILLIJ, Y.G.; GLEISER, R.M y ZYGADLO, J.A. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. En: *Bioresource Technology*, (2008). vol.99, p.2507-2515.

ARANGO MARÍN, Mario. Contribuciones al cultivo de las plantas medicinales. Profesor asociado Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín – Facultad de Ciencias Agropecuarias. 2005.

ARRILLAGA, COLON, RIVERA Y JONES. *Am. Perfumer* 46 (May 1944), p.49. Citado por: GUENTHER, Ernest. *The essential oils : (volumen uno) History - Origin in plants – Production – Analysis*. Princeton (Nueva Jersey) : Van Nostrand, 1948. vol.1, p.108.

BANCHIO, Erika; BOGINO, Pablo C.; ZYGADLO, Julio y GIORDANO, Walter. Plant growth promoting rhizobacteria improve growth and essential oil yield in *Origanum majorana* L. En: *Biochemical Systematics and Ecology*, (2008). vol.36, p.766-771.

BEALE, M.H.; BIRKETT, M.A.; BRUCE, T.J.; CHAMBERLAIN, K.; FIELD, L.M.; HUTTLY, A.K.; MARTIN, J.L.; PARKER, R.; PHILLIPS, A.L.; PICKETT, J.A.; PROSSER, J.M.; SHEWRY, P.R.; SMART, L.E.; WADHAMS, L.J.; WOODCOCK, C.M. y ZHANG, Y. Aphid alarm pheromone produced by transgenic plants affects aphid and parasitoid behaviour. En: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol.103, p.10509–10513. Citado por: PICKETT, John A.; BIRKETT, Michael A.; BRUCE, Toby J.A.; CHAMBERLAIN, Keith; GORDON-WEEKS, Ruth; MATTHES, Michaela C.; NAPIER, Johnathan A.; SMART, Lesley E. y WOODCOCK, Christine M. Developments in aspects of ecological phytochemistry: the role of cis-jasmone in inducible defence systems in plants. En: *Phytochemistry*, (2007). vol.68, p.2937-2945.

BIBLIOTECA DIGITAL DE LA MEDICINA TRADICIONAL MEXICANA. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. México 2009. [En línea] [Citado 25-11-09] Disponible en internet: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?|=3&t=&id=7196>.

BORROR, D.J. Y DeLONG, D.M. *An introduction to the study of insects*. Holt Rinehart and Winston. Nueva York. 3ª ed. 1971, p.812. Citado por: BUSTILLO, Alex y SANCHEZ, Guillermo. *Los áfidos en Colombia : plagas que afectan los cultivos de importancia económica*. Colombia : Colciencias. Sección de Producción de Medios – ICA. s.f. Instituto Colombiano Agropecuario. Subgerencia de investigación. División de Agronomía.

BROOKER, M.I.H. y KLEINIG, D.A. *Field Guide to Eucalyptus*. vol.1. South-eastern Australia, 3ra ed. Bloomings, Melbourne. 2006. Citado por: BATISH, Daizy R.; PAL SINGH, Harminder; KOHLI, Ravinder Kumar y KAUR, Shalinder. Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. En: *Forest Ecology and Management*, (2008). vol.256, p.2166-2174.

BUSTILLO, Alex y SANCHEZ, Guillermo. *Los áfidos en Colombia : plagas que afectan los cultivos de importancia económica*. Colombia : Colciencias. Sección de Producción de Medios – ICA. s.f. Instituto Colombiano Agropecuario. Subgerencia de investigación. División de Agronomía.

CARRILLO RAMIREZ, Norman y FLOREZ MANTILLA, José. Manual técnico de agricultura orgánica biológica. Bucaramanga, s.n, 2003.

CARRIZO, Paola; PELICANO, Alicia y CAFFARINI, Patricia. Evaluación de extractos cetónicos de Paraíso, Eucalipto y Ricino, sobre *Myzus persicae* (Homóptera: Aphididae). En: *Revista Facultad de Ciencias Agrícolas UNCuyo*, (2004). vol.36, no.1, p.47-52. [En línea] [Citado 23-10-07] Disponible en Internet: http://bdigital.uncu.edu.ar/bdigital/objetos_digitales/158/carrizoAgrarias1-04.pdf.

CITRAL. Wikipedia, la enciclopedia libre. [En línea] [Citado 20-01-07] Disponible en internet: <http://en.wikipedia.org/wiki/Citral>.

CODEX ALIMENTARIUS, 1996. Citado por: GUERRERO, Jairo Arturo. Estudio de residuos de plaguicidas en frutas y hortalizas en áreas específicas de Colombia. En: *Agronomía Colombiana*, 2003. vol.21, no.3, p.198-209.

COLOMBIA, CENTRO VIRTUAL DE INVESTIGACIÓN DE LA CADENA AGROALIMENTARIA DE LA PAPA – CEVIPAPA. Consolidado de preguntas más frecuentes: manejo integrado de plagas. [En línea] [Citado 04-03-10] Disponible en: <http://www.cevipapa.org.co>.

COLOMBIA, CENTRO VIRTUAL DE INVESTIGACIÓN DE LA CADENA AGROALIMENTARIA DE LA PAPA – CEVIPAPA. Memorias "I Taller Nacional sobre patógenos del suelo, virus e insectos plaga diferentes a *Tecia solanivora*". p.62. Bogotá, Colombia. Noviembre 29 – 30 de 2004. p.36.

Da-SILVA, F. Content and composition of basil essential oil at two different hours in the day and two seasons. En: *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 2003. vol.6, no.1, p.33-38. Citado por: HUSSAIN, Abdullah; ANWAR, Farooq; HUSSAIN, Syed y PRZYBYLSKI, Roman. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. Pakistán. En: *Food Chemistry*, (2008). vol.108, p.986-995.

DEEPAK, S. A.; OROS, G.; SATHYANARAYANA, S.G.; SHETTY, N.P.; SHETTY, H.S. y SASHIKANTH, S. Actividad antiesporulante de extractos foliares de plantas de la India contra *Sclerospora Graminicola* causante de la enfermedad del moho veloso en la perla del mijo. En: *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. (feb 2005). vol.38, no.1, p.31-39. ISSN 0323-5408.

DÍAZ, J. A. Caracterización del mercado colombiano de plantas medicinales y aromáticas : Búsqueda de principios bioactivos en plantas. En: Informe técnico. Instituto Alexander

Von Humboldt – Ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial. Bogotá. 2003. p. 22. ISBN: 958-8151-14-7.

DIGILIO, María Cristina; MANCINI, Emilio; VOTO, Emanuela y DE FEO, Vincenzo. Insecticide activity of mediterranean essential oils. En: *Journal of Plant Interactions*, (mar 2008). vol.3, no.1, p.17-23. ISSN 1742-9145.

DUKE, J. A. Writeups or information summaries on approximately 2000 economic plants [En línea] [Citado 20-01-07] Disponible en Internet: <http://www.ars-gov/duke>. Citado por: PINO, J; ROSADO, A.; GOIRE, I.; RONCAL, E. y GARCÍA, I. Analysis of the essential oil from Cuban Basil. En: *Die Nahrung*, (1993). vol.37, no.5, p.501-504.

DUKE, J.A. Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical databases, 2004. [En línea] [Citado 09-06-08] Disponible en internet: <http://www.ars-grin.gov/duke/>. Citado por: BATISH, Daizy R.; PAL SINGH, Harminder; KOHLI, Ravinder Kumar y KAUR, Shalinder. Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. En: *Forest Ecology and Management*, (2008). vol.256, p.2166-2174.

FERNÁNDEZ-POLA, J. Cultivo de plantas medicinales: aromáticas y condimenticias. Barcelona : Omega, 1996. p.32. ISBN 84-282-1067-5.

GHISLAIN, M. y ZHANG, D. Genetic diversity analysis in a cultivated andean potato, *S. phureja* Juz. *et. Buck*. Program 2. Perú, 2001. p.8. Citado por: DÍAZGRANADOS, Cristina y CHAPARRO, Alejandro. Desarrollo de un sistema de regeneración en papa criolla (*Solanum phureja* et Buck) var. Yema de huevo Clon 1. En: *Agronomía Colombiana*. Bogotá. Junio 2007. vol.25, no.1. ISSN 0120-9965.

GONZALEZ-COLOMA, Azucena; MARTÍN-BENITO, Darío; MOHAMED, Nagla; GARCÍA-VALLEJO, M^a Concepción y SORIA, Ana Cristina. Antifeedant effects and chemical composition of essential oils from different population of *Lavandula luisieri* L. En: *Biochemical Systematics and Ecology*, (2006). vol.34, p.609-616.

GUENTHER, Ernest. The essential oils : (volumen uno) History - Origin in plants – Production – Analysis. Princeton (Nueva Jersey) : Van Nostrand, 1948. vol.1, p.19.

GUERRERO, Jairo Arturo. Estudio de residuos de plaguicidas en frutas y hortalizas en áreas específicas de Colombia. En: *Agronomía Colombiana*, 2003. vol.21, no.3, p.198-209.

GUTIERREZ PULIDO, Humberto y DE LA VARA SALAZAR, Román. Análisis y diseño de experimentos. México : McGraw Hill Interamericana, 2004. ISBN 970-10-4017-1.

GUZINOWICS, B. y GUZINOWICS, M. Fundamentals of integrated GC. [En línea] [Citado 30-01-05]. Disponible en internet: <http://www.TheintegratedG-C/Msanalyticaldystem-serier.htm>. Citado por: TOVAR, Darleny. Identificación y cuantificación de los principales compuestos presentes en el aroma y el aceite esencial de las hojas de Orozul (*Phyllanthus nodiflora* L. Greene). Pasto, 2007. Trabajo de grado (Químico). Universidad de Nariño. Programa de Química.

HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ, Santiago. Ecología para ingenieros : el impacto ambiental. Colegio de Ingenieros de Caminos, Canales y Puertos. 2ed. Colección Señor No.2, 1995. p.131-140. ISBN 84-380-0098-3.

HOSS, Reinhart. Recursos botánicos con potencial biocida : conceptos básicos y métodos de análisis. Red de Acción en Alternativas al uso de Agroquímicos. Lima, Perú: Editorial Gráfica Stefany S. R. 1999.

HUSSAIN, Abdullah; ANWAR, Farooq; HUSSAIN, Syed y PRZYBYLSKI, Roman. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. Pakistán. En: *Food Chemistry*, (2008). vol.108, p.986-995.

INFOAGRO. Control de áfidos o pulgones. [En línea] [Citado 13-01-10]. Disponible en internet: <http://www.infoagro.com/hortalizas/pulgones.htm>.

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN DE RECURSOS BIOLÓGICOS ALEXANDER VON HUMBOLDT. Estudio del mercado colombiano de aceites esenciales. Biocomercio sostenible. Bogotá: Colombia, 2003. 109 pp. Archivo PDF: MERCADO NACIONAL DE ACEITES ESENCIALES.pdf von Humboldt (carpeta búsqueda_pdf) [En línea] [Citado 16-11-08] Disponible en internet: <http://www.humboldt.org.co> (palabras clave: Aceites Esenciales, Biocomercio Sostenible, Mercados).

ISMAIL, M. Central Properties and Chemical Composition of *Ocimum basilicum* Essential Oil. En: *Pharmaceutical Biology*, (2006). vol.44, no.8, p.619-626.

ISMAN, M.B. Neem and other botanical insecticides: barriers to comercialization. *Phytoparasitica*, 1997. vol.25, no.1. p.339-344. Citado por: SILVA AGUAYO, Gonzalo; LAGUNES T., Angel; RODRIGUEZ M., J. Concepción y RODRIGUEZ L., Daniel. Insecticidas vegetales : una vieja y nueva alternativa para el manejo de plagas. En:

(Revista) *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, CATIE Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (Costa Rica). (dic 2002). no.66, p.5. ISSN 1659-0082.

ISMAN, M.B. Plant essential oils for pest and disease management. En: *Crop Protection*, (2000). vol.19, p.603-608.

JACOBSON, M. Botanical pesticides past, present and future. En: Arnason. J.: Philogéne. BJR: Morand. P (Eds) *Insecticides of plant origin. American Chemical Society. Washington. D.C. U.S. p.2-10.* Citado por: SILVA AGUAYO, Gonzalo; LAGUNES T., Angel; RODRIGUEZ M., J. Concepción y RODRIGUEZ L., Daniel. *Insecticidas vegetales : una vieja y nueva alternativa para el manejo de plagas.* En: (Revista) *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, CATIE Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (Costa Rica). (dic 2002). no.66, p.5. ISSN 1659-0082.

LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA Y PRODUCTOS NATURALES. Departamento de Química Orgánica - Facultad de Química – Universidad de Nariño [CD].

LEE, S.; PETERSON, C.J. y COATS, J.R. Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. En: *J. Stored Prod. Res.*39, p.77-85. Citado por: GONZALEZ-COLOMA, Azucena; MARTÍN-BENITO, Darío; MOHAMED, Nagla; GARCÍA-VALLEJO, M^a Concepción y SORIA, Ana Cristina. Antifeedant effects and chemical composition of essential oils from different population of *Lavandula luisieri* L. En: *Biochemical Systematics and Ecology*, (2006). vol.34, p.609-616.

LÓPEZ, A. y ESPITIA, E. Plagas y beneficios en el cultivo de la papa en Colombia. CORPOICA. Bogotá. 2000. p.35. Citado por: DÍAZGRANADOS, Cristina y CHAPARRO, Alejandro. Desarrollo de un sistema de regeneración en papa criolla (*Solanum phureja* et Buck) var. Yema de huevo Clon 1. En: *Agronomía Colombiana*. Bogotá. Junio 2007. vol.25, no.1. ISSN 0120-9965.

MAGGI, María Eugenia. *Insecticidas Naturales*. Monografías.com, 2004. [En línea] [Citado 20-03-07] Disponible en Internet: <http://www.monografias.com/trabajos18/insecticidas-naturales/insecticidas-naturales.html>.

MARTINEZ, Alejandro. *Aceites esenciales*. Universidad de Antioquia -Facultad de Química Farmacéutica [CD]. Medellín, Febrero 2003.

MARTINEZ, M. *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*. Fondo de Cultura de México. Citado por: VIBRANS, Heike; HANAN, Ana María y MONDRAGÓN, Juana. En: *Ocimum micranthum* Willd. : ficha informativa. Edición actualizada 01-04-09. México. [En línea] [Citado 25-11-09] Disponible en internet:

<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/lamiaceae/ocimum-micranthum/fichas/ficha.htm>.

MATTA DÍAZ, Rodrigo Alberto. Aproximación al análisis de políticas públicas nacionales que pueden incidir en la conformación y consolidación de iniciativas en ciencia y tecnología, y entre ellas, de un clúster bioindustrial. En: *Economía Gestión y Desarrollo*, Cali: Colombia. Septiembre 2004. no.2, p.57-100. [En línea] [Citado 05-02-09] Disponible en Internet: http://revistaeconomia.puj.edu.co/revista_2/art3.pdf.

MATTHEUS, R.E.F. Plant virology : Department of Cellular and Molecular Biology, Universidad de Auckland. 3ed. Estados Unidos de América : Academic Press, 1991. ISBN 0-12-480553-1.

MEJÍA, Luis y ORELLANA, Galo. Dialogo de saberes para la valoración ecológica y el fortalecimiento de los agroecosistemas tradicionales en Chagras indígenas del municipio de Sibundoy Putumayo. Pasto, 2001. Tesis de Especialización. Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Departamento de Biología.

MENDOZA PERDOMO, Leider y MIPAZ ORTEGA, Lilia Beatriz. Evaluación de plantas para el control de plagas en Papa (*Solanum tuberosum*), Fríjol (*Phaseolus vulgaris*) y Repollo (*Brassica oleracea*) en la zona andina del departamento de Nariño. Pasto, 2004. Trabajo de Grado (Ingeniero Agrónomo). Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Agrícolas, Programa de Ingeniería Agronómica.

MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL, Asocolflores, Consejo Empresarial Colombiano para el Desarrollo Sostenible – CECODES. Utilización de Bioinsumos en Colombia. Estudio de caso en flores de corte. Medellín, 2005. ISBN 33-6215-8.

MORENO, M. L. Evaluación de la residualidad de plaguicidas en el repollo (*Brassica oleracea* var. *Capitata*) en el departamento de Cundinamarca. Citado por: GUERRERO, Jairo Arturo. Estudio de residuos de plaguicidas en frutas y hortalizas en áreas específicas de Colombia. En: *Agronomía Colombiana*, 2003. vol.21, no.3, p.198-209.

MURILLO PEREA, Elizabeth; ALCOCER, Milena Raquel y CARDONA Mónica Patricia. Actividad repelente e insecticida del aceite esencial de albahaca canela (*Ocimum micranthum* Wild.) frente a la mosca casera (*Musca domestica* L.) en diferentes condiciones de cultivo. En: *Fitotecnia colombiana*, (2003). vol.3, no.1, p.84-92. Colombia. ISSN 0123-1286.

MURILLO, Elizabeth; FERNÁNDEZ, Katherine; SIERRA, Diana y VIÑA, Amparo. Perfil químico de las variedades de Albahaca cultivadas en Ibagué e influencia de éste en la actividad biológica del aceite esencial. En: *Revista Colombiana de Química*, (2004). vol.33, no.2, p.139-148.

NARIÑO, DEPARTAMENTO NACIONAL DE PLANEACIÓN (DNP). Agenda interna para la productividad y la competitividad: Documento regional Nariño. p.60. Bogotá, Junio 2007.

NARVAEZ, Fabio y OBANDO, Nury. Estudio de factibilidad para el montaje de una planta de extracción por arrastre de vapor de aceite esencial de Limonaria (*Cymbopogon Citratus*) como agente aromatizante y saborizante, en el municipio de Sandoná, Dpto. de Nariño. Pasto, 2003. Trabajo de Grado (Ingeniero Agroindustrial). Universidad de Nariño, Facultad de Ingeniería Agroindustrial.

NULTSCH, Wilhelm. Botánica general : manual para médicos y naturalistas. Catedrático de Botánica de la Universidad de Marburg. Barcelona : Omega, 1975. ISBN 84-282-0431-4. p.88.

OMS. Pesticidas de mala calidad vendidos al Tercer Mundo. Salud Colombia Internacional. Ed.55. Febrero de 2001. [En línea] [Citado 12-04-07] Disponible en Internet: <http://www.saludcolombia.com/actual/salud55/interna55.htm>.

PERRY, Robert H. Manual del ingeniero químico. 6 ed. México: McGraw Hill Interamericana, 1992. Tomo 1. ISBN 968-422-971-2.

PIÑOL, María Teresa; PALAZÓN, Javier y CUSIDÓ, Rosa María. Capítulo 17 : Introducción al metabolismo secundario. En: AZCON-BIETO, Joaquín y TALÓN, Manuel. Fundamentos de fisiología vegetal. Madrid, España : McGraw Hill Interamericana, 2000. p. 261-283.

POLITEO, O; JUKIC, M y MILOS, M. Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum L.*) compared with its essential oil. En: *Food Chemistry*, (2007). no.101, p.379-385.

PORRAS, P. Guía para la papa criolla clon 1. En: Papas colombianas con el mejor entorno ambiental. FEDEPAPA. 2da ed. Bogotá. 2000. pp. 44-47, 65-69. Citado por: DÍAZGRANADOS, Cristina y CHAPARRO, Alejandro. Desarrollo de un sistema de regeneración en papa criolla (*Solanum phureja* et Buck) var. Yema de huevo Clon 1. En: *Agromía Colombiana*. Bogotá. Junio 2007. vol.25, no.1. ISSN 0120-9965.

PURKAYASTHA, Jubilee y NATH, Subhan C. Composition of the Camphor-rich Essential oil of *Ocimum basilicum* L. Native to Northeast India. En: *ProQuest Agriculture Journals. Journal of Essential Oil Research.* (may-jun 2006). vol.18, no.3, p.332-334. [En línea] [Citado 01-04-07] Disponible en Internet: http://findarticles.com/p/articles/mi_qa4091/is_200605/ai_n17175092.

RICCI, Mónica; PADÍN, Susana; RINGUELET, Jorge y KAHAN, Andrea. Utilización de aceite esencial de Lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf) como repelente de *Diuraphis noxia* Kurdj. (Hemiptera: Aphididae) en Trigo. En: *Agricultura Técnica*, Chile. (jul-sep 2006). vol.66, no.3, p.256-263. [En línea] [Citado 23-10-07] Disponible en Internet: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0365-28072006000300004&script=sci_arttext.

RODRIGUEZ, HC. Extensión y capacitación en el uso de plaguicidas botánicos. En: Memoria I Taller Latinoamericano sobre bioplaguicidas ¿Mito, Placebos o una alternativa en agricultura sostenible?. Escuela Panamericana de Agricultura. El Zamorano. HN. p.1-6. Citado por: SILVA AGUAYO, Gonzalo; LAGUNES T., Angel; RODRIGUEZ M., J. Concepción y RODRIGUEZ L., Daniel. Insecticidas vegetales : una vieja y nueva alternativa para el manejo de plagas. En: (Revista) *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, CATIE Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (Costa Rica). (dic 2002). no.66, p.5. ISSN 1659-0082.

SAJJADI, Seyed Ebrahim. Analysis of the essential oils of two cultivated basil (*Ocimum basilicum* L.) from Iran. En: *DARU* Departamento de Farmacognosia, Facultad de Farmacia y Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Isfahan de Ciencias Médicas, (2006). vol.14, no.3, p.128-130.

SÁNCHEZ CASTELLANOS, Francisco J. Extracción de aceites esenciales. En: CONGRESO INTERNACIONAL DE PLANTAS MEDICINALES Y AROMÁTICAS. (2do.:2006:Bogotá). Memorias del segundo congreso internacional de plantas medicinales y aromáticas, Universidad Nacional de Colombia. 2006. p.8.

SANCHEZ GOVIN, Ester; LEAL LÓPEZ, Ida María; HERNÁNDEZ FUENTES, Leticia y RODRIGUEZ FERRADA, Carlos A. Estudio farmacognóstico de *Ocimum basilicum* L. (Albahaca blanca). *Revista Cubana de Farmacia.* (sep-dic 2000). vol.34, no.3, p.187-195. [En línea] [Citado 17-05-07] Disponible en Internet: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152000000300006&lng=es&nrm=iso. ISSN 0034-7515.

STATISTICAL GRAPHICS CORPORATION. Statgraphics plus 5.0. 1994-2000.

SAVELEV, S; OKELLO, E.; PERRY, N.S.L.; WILKINS, R.M. y PERRY, E.K. Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia*

essential oil. En: *Pharmacol. Biochem. Behav.* vol.75, p.661-668. Citado por: GONZALEZ-COLOMA, Azucena; MARTÍN-BENITO, Darío; MOHAMED, Nagla; GARCÍA-VALLEJO, M^a Concepción y SORIA, Ana Cristina. Antifeedant effects and chemical composition of essential oils from different population of *Lavandula luisieri* L. En: *Biochemical Systematics and Ecology*, (2006). vol.34, p.609-616.

SILVA AGUAYO, Gonzalo; LAGUNES T., Angel; RODRIGUEZ M., J. Concepción y RODRIGUEZ L., Daniel. Insecticidas vegetales : una vieja y nueva alternativa para el manejo de plagas. En: (Revista) *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, CATIE Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (Costa Rica). (dic 2002). no.66, p.5. ISSN 1659-0082.

SPURR, E.B. y MCGREGOR, P.G. Potential invertebrate antifeedants for toxic baits used for vertebrate pest control. 2003. *Science for Conservation* 232. Department of Conservation, Wellington. Citado por: GILLIJ, Y.G.; GLEISER, R.M y ZYGADLO, J.A. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. En: *Bioresource Technology*, (2008). vol.99. p.2507-2515.

STANDLEY, P. C. y WILLIAMS, L. O. Flora of Guatemala : *Fieldiana Botany* 24 (9/3 y 4). Citado por: VIBRANS, Heike; HANAN, Ana María y MONDRAGÓN, Juana. *Ocimum micranthum* Willd : ficha informativa. [En línea]. Edición actualizada 01-04-09. México. [Citado 25-11-09]. Disponible en internet: URL:<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/lamiaceae/ocimum-micranthum/fichas/ficha.htm>.

STASHENKO, Elena. Determinación de la composición química de aceites esenciales por cromatografía de gases con detector selectivo de masas (GC-MS) : Informe de resultados (CODIGO: 982317-AI). Bucaramanga: Laboratorio de Cromatografía – Universidad Industrial de Santander. 2009.

TERPENOS. En: Microsoft® Student 2008 [DVD]. Microsoft Corporation, 2007.

TOVAR, Darleny. Identificación y cuantificación de los principales compuestos presentes en el aroma y el aceite esencial de las hojas de Orozul (*Phyla nodiflora* L. Greene). Pasto, 2007. Trabajo de grado (Químico). Universidad de Nariño. Programa de Química.

TRIVINO, M. G. y JOHNSON, C. B. Season has a major effect on the essential oil yield response to nutrient supply in *Origanum majorana*. En: *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2000. vol.75, no.5, p.520-527. Citado por: HUSSAIN, Abdullah; ANWAR, Farooq; HUSSAIN, Syed y PRZYBYLSKI, Roman. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential

oils depends on seasonal variations. Pakistán. En: *Food Chemistry*, (2008). vol.108, p.986-995.

USAID. Costos de producción: papa. Boletín de producción no.12. Octubre 2005. P.3. [En línea] [Citado 04-03-10] Disponible en: <http://www.usaid-red.org>.

VERGARA RUÍZ, Rodrigo. Utilización de extractos de plantas en la producción de cultivos en Colombia : análisis de su desarrollo. Profesor asociado Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín – Facultad de Ciencias Agropecuarias. s.f. En: ARANGO MARÍN, Mario. Contribuciones al cultivo de las plantas medicinales. Profesor asociado Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín – Facultad de Ciencias Agropecuarias. 2005.

VIBRANS, Heike; HANAN, Ana María y MONDRAGÓN, Juana. *Ocimum micranthum* Willd : ficha informativa. [En línea]. Edición actualizada 01-04-09. México. [Citado 25-11-09]. Disponible en internet: URL:<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/lamiaceae/ocimum-micranthum/fichas/ficha.htm>.

VILLARREAL, Héctor. Costos de producción de papa en las principales zonas productoras de Colombia. Federación Colombiana de productores de papa FEDEPAPA. Bogotá, Colombia. Diciembre 2007. p.7,9.

VIYOCH, J; PISUTTHANAN, N; FAIKREUA, A; NUPANGTA, K; WANGTORPOL, K y NGOKKUEN, J. Evaluation of in vitro antimicrobial activity of Thai basil oils and their micro-emulsion formulas against *Propionibacterium acnes*. En: *International Journal of Cosmetic Science*, (2006). no.28, p.125-133.

VON ROCHENBERG. Theorie der Gewinnung und Trennung der ätherischen Öle. Leipzig, 1910, p.391. Citado por: GUENTHER, Ernest. The essential oils : (volumen uno) History - Origin in plants – Production – Analysis. Princeton (Nueva Jersey) : Van Nostrand, 1948. vol.1, p.106-107.

WANTANABE, K.; SHONO, Y.; KAKIMIZU, A.; OKADA, A.; MATSUO, N.; SATOH, A. y NISHIMURA, H. New mosquito repellent from *Eucalyptus camaldensis*. En: *J. Agric. Food. Chem.* (1993). vol.41, p.2164–2166. Citado por: GILLIJ, Y.G.; GLEISER, R.M y ZYGADLO, J.A. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. En: *Bioresource Technology*, (2008). vol.99, p.2507-2515.

ANEXOS

ANEXO A. Certificado de la identificación botánica de *Ocimum micranthum* Willd.



San Juan de Pasto, noviembre 23 del 2009

Señorita

KATERINE SILVA BUCHELI
Facultad de Ingeniería Agroindustrial
Universidad de Nariño
Presente

Cordial saludo.

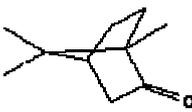
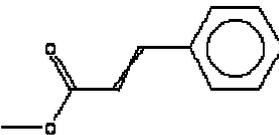
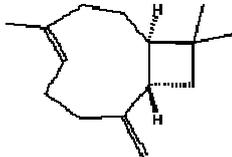
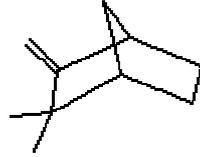
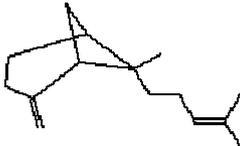
Luego de revisar el ejemplar enviado por Ud. para identificación en el herbario PSO, me permito confirmar que este corresponde a la especie *Ocimum micranthum* Willd. de la familia Lamiaceae. El espécimen posee tanto las características morfológicas como la distribución geográfica correspondiente a esta zona.

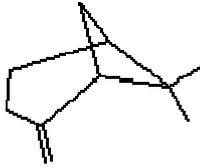
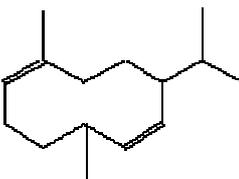
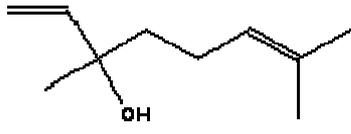
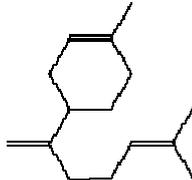
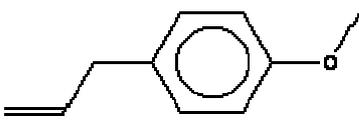
Agradezco su amable atención



MARTHA SOFÍA GONZÁLEZ INSUASTI
Profesora Asociada Departamento de Biología
Directora y curadora Herbario PSO

ANEXO B. Estructura química de los principales compuestos identificados.

(P. E.: Punto de ebullición).	
Compuesto	Estructura
<p>Alcanfor C₁₀H₁₆O</p> <p>P. E.: 205 a 207°C Cetona del alcohol Borneol Monoterpeno oxigenado</p>	
<p>Cinamato de metilo</p> <p>P. E.: 262 a 265°C Ester</p>	
<p>1,8-Cineol o Eucaliptol</p> <p>P. E.: 176°C Monoterpeno oxigenado</p>	
<p>Trans-Cariofileno</p> <p>P. E.: 258 a 261°C Sesquiterpeno</p>	
<p>Canfeno</p> <p>P. E.: 159 a 161°C Monoterpeno bicíclico</p>	
<p>Bergamoteno</p>	

<p style="text-align: center;">Beta-Pineno</p> <p>P. E.: 164 a 166°C Monoterpeno bicíclico</p>	
<p style="text-align: center;">Germacreno-D</p>	
<p style="text-align: center;">Linalol C₁₀H₁₈O</p> <p>P. E.: 198,3°C Alcohol Monoterpeno oxigenado Isómero de geraniol y nerol</p>	
<p style="text-align: center;">Beta-Bisaboleno</p>	
<p style="text-align: center;">Estragol o metilchavicol C₁₀H₁₂O</p> <p>P. E.: 215 a 216°C Fenol Isómero del anetol</p>	

Fuente: Laboratorios Especializados. Universidad de Nariño. Responsable: David Arturo.

ANEXO C. Pruebas complementarias para *Ocimum micranthum* Willd.

Propiedades fisicoquímicas del aceite esencial de albahaca.

Propiedad	Resultado
Color	Amarillo claro / transparente
Olor	Agradable, penetrante, alcanforado
Densidad	0,889 g/ml
Índice de refracción	1,485
Solubilidad	Insoluble en agua. Insoluble en etanol al 70 y 80%. Soluble en etanol al 96% y etanol absoluto. Soluble en hexano, diclorometano y éter etílico.
Índice de acidez	1,923
Índice de saponificación	28,05
Índice de éster	26,127

Fuente: Laboratorios Especializados. Universidad de Nariño. Responsable: David Arturo.

Reconocimiento de metabolitos secundarios.

Prueba metabolito secundario	<i>Ocimum micranthum</i> Willd.
Alcaloides	Negativo
Flavonoides	Positivo (flavonas)
Leucoantocianidinas	Positivo
Cardiotónicos	Negativo
Saponinas	Positivo
Taninos	Negativo
Esteroides – triterpenoides	Positivo
Quinonas	Negativo
Antocianidinas	Antocianinas

Fuente: Laboratorio de Química. Universidad de Nariño. Responsables: Marggy Castillo, Cristina Mejía.

ANEXO D. Datos corregidos y transformados para el bioensayo.

Datos para repelencia (impregnación de papel).

Tratamiento	Concentración % (v/v)	Repeticiones				
		1	2	3	4	5
1	0,5	14,47	11,30	14,47	14,47	24,08
2	1,0	11,30	14,47	24,08	11,30	24,08
3	2,0	37,76	24,08	62,83	49,79	31,35
4	3,0	37,76	56,01	49,79	31,35	56,01
5	4,0	49,79	37,76	49,79	62,83	49,79

% v/v : porcentaje volumen/volumen.

Datos para mortalidad (impregnación de papel).

Tratamiento	Concentración % (v/v)	Repeticiones				
		1	2	3	4	5
1	0,5	25,38	8,05	8,05	16,60	16,60
2	1,0	8,05	16,60	25,38	8,05	25,38
3	2,0	16,60	8,05	16,60	25,38	8,05
4	3,0	32,31	32,31	8,05	32,31	8,05
5	4,0	8,05	8,05	50,29	44,42	38,51

% v/v : porcentaje volumen/volumen.

Datos para mortalidad (inmersión del sustrato).

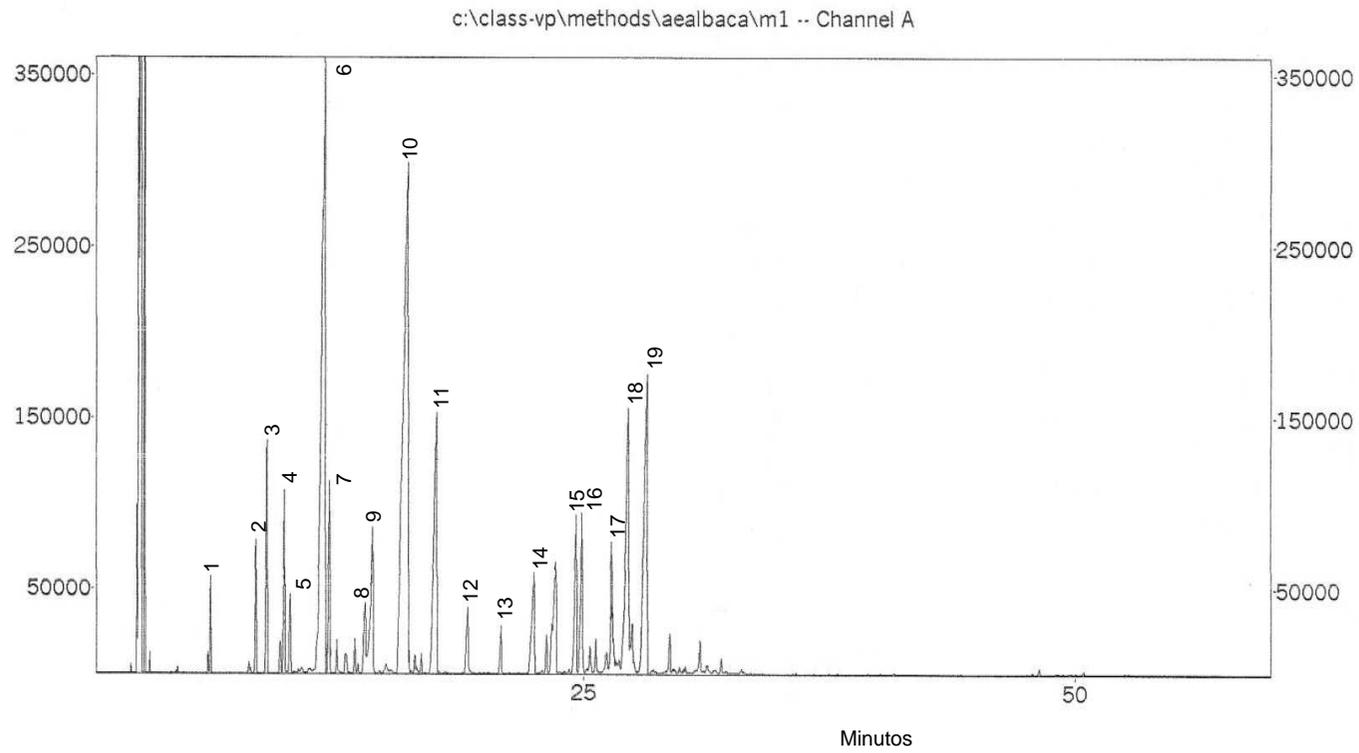
Tratamiento	Concentración % (v/v)	Repeticiones				
		1	2	3	4	5
1	0,5	48,75	36,14	36,14	29,28	55,18
2	1,0	62,21	70,75	62,21	70,75	55,18
3	2,0	90,00	70,75	70,75	70,75	90,00
4	3,0	90,00	70,75	90,00	90,00	90,00
5	4,0	90,00	90,00	90,00	90,00	90,00

% v/v : porcentaje volumen/volumen.

Fuente: Esta investigación.

ANEXO E. Datos cromatográficos para muestras de aceite del diseño factorial.

Cromatograma Muestra N° 1 de Aceite Esencial de Albahaca



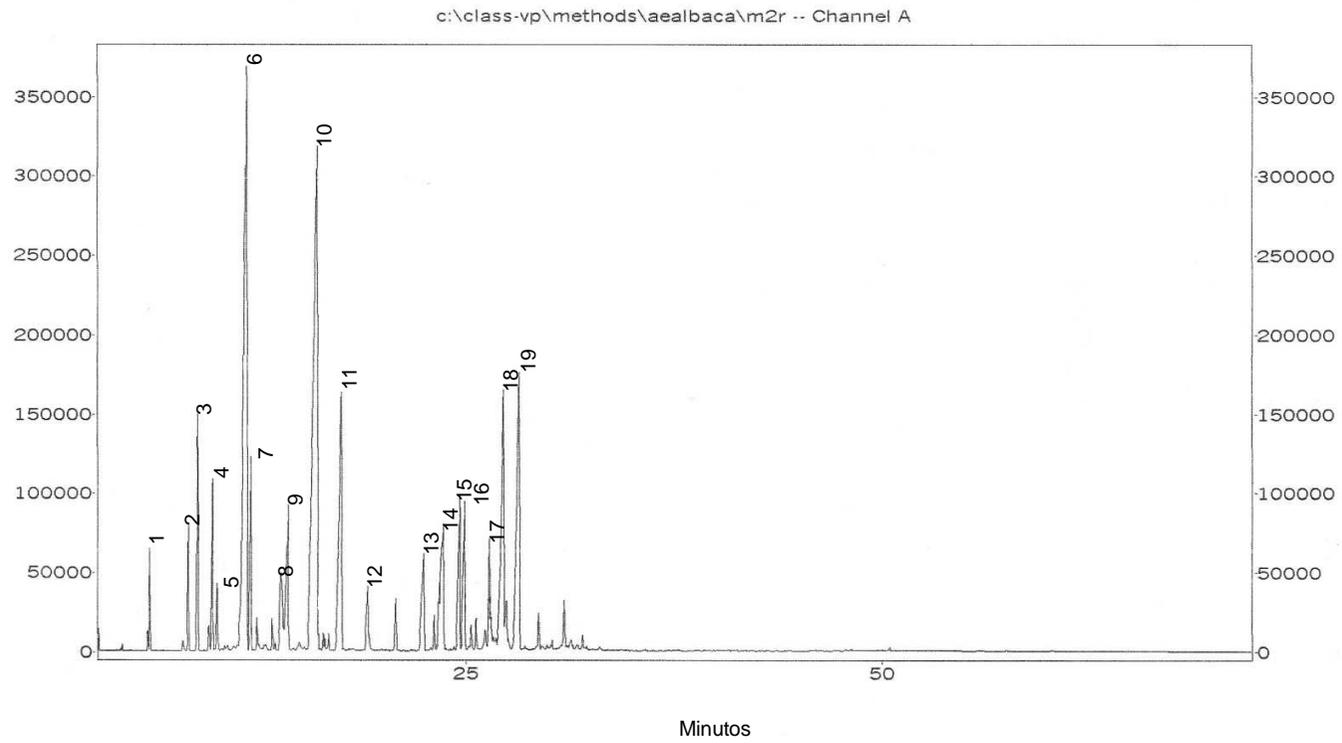
Muestra Nº 1 de Aceite Esencial de Albahaca

Pico	Tiempo de Retención (Minutos)	Índice de Retención Experimental (Ik)*	Compuesto	Área Relativa en cuentas	% Área Relativa
1	6,041	848	Isovalerato de etilo	148669	0,720
2	8,358	933	α -Pino	289397	1,400
3	8,924	951	Canfeno	592934	2,870
4	9,816	979	β -Pino	463909	2,240
5	10,091	987	Mirceno	201410	0,975
6	11,874	1041	1,8-Cineol	4594658	22,220
7	12,116	1048	<i>Trans</i> - β -Ocimeno	541293	2,620
8	13,907	1100	<i>Trans</i> -Hidrato de sabineno	216967	1,050
9	14,307	1112	Linalol	659398	3,190
10	16,091	1163	Alcanfor	4724867	22,845
11	17,557	1206	Estragol	1628489	7,875
12	19,132	1255	Chavicol	236199	1,140
13	20,832	1308	<i>Cis</i> -Cinamato de metilo	133913	0,650
14	22,500	1358	<i>Trans</i> -cinamato de metilo	533307	2,580
15	24,657	1429	<i>Trans</i> -Cariofileno	611794	2,960
16	24,950	1439	<i>Cis</i> - α -Bergamoteno	572961	2,770
17	26,450	1490	Germacreno D	241881	1,170
18	27,300	1519	β -Bisaboleno	1386262	6,700
19	28,260	1552	<i>Cis</i> - α -Bisaboleno	1945274	9,410
				Σ 19723582	Σ 95,385

Ik = Índices de Kovats con Columna Capilar DB-5.

* Índices de Retención \pm 3 Unidades.

Cromatograma Muestra N° 2 de Aceite Esencial de Albahaca



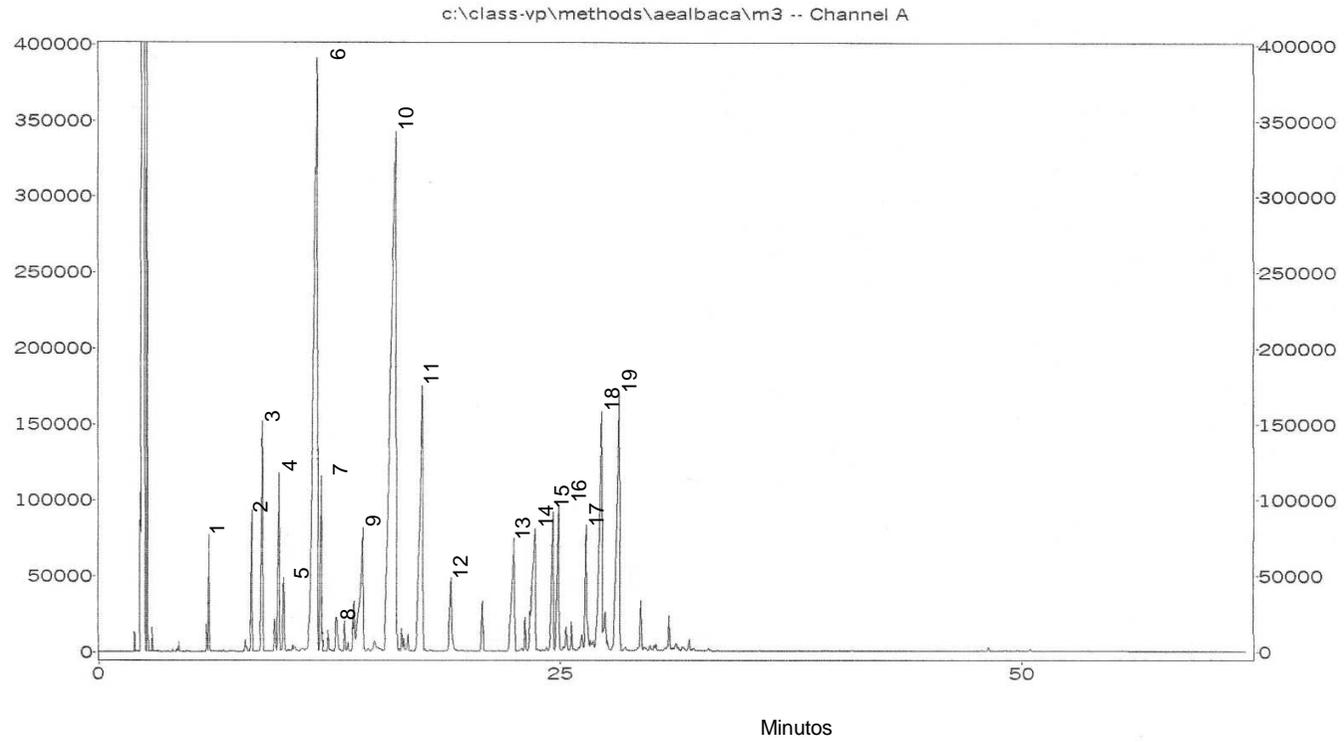
Muestra Nº 2 de Aceite Esencial de Albahaca

Pico	Tiempo de Retención (Minutos)	Índice de Retención Experimental (Ik)*	Compuesto	Área Relativa en cuentas	% Área Relativa
1	6,041	848	Isovalerato de etilo	189618	0,780
2	8,358	933	α -Pino	342555	1,410
3	8,924	951	Canfeno	695246	2,860
4	9,810	979	β -Pino	523258	2,150
5	10,090	987	Mirceno	223640	0,920
6	11,883	1041	1,8-Cineol	4958996	20,390
7	12,116	1048	<i>Trans</i> - β -Ocimeno	605076	2,450
8	13,924	1082	<i>Cis</i> -Hidrato de sabineno	428487	1,760
9	14,350	1113	Linalol	629837	2,590
10	16,116	1164	Alcanfor	5732463	23,570
11	17,560	1206	Estragol	1734961	7,134
12	19,140	1255	Chavicol	312787	1,290
13	22,510	1359	<i>Trans</i> -Cinamato de metilo	609978	2,510
14	23,680	1396	β -Bourboneno	1147439	4,720
15	24,660	1429	<i>Trans</i> -Cariofileno	693153	2,850
16	24,940	1438	<i>Cis</i> - α -Bergamoteno	623857	2,565
17	26,432	1489	Germacreno D	230811	0,950
18	27,290	1519	β -Bisaboleno	1505452	6,190
19	28,240	1551	<i>Cis</i> - α -Bisaboleno	2032860	8,360
				Σ 23220474	Σ 95,449

Ik = Índices de Kovats con Columna Capilar DB-5.

* Índices de Retención \pm 3 Unidades.

Cromatograma Muestra N° 3 de Aceite Esencial de Albahaca



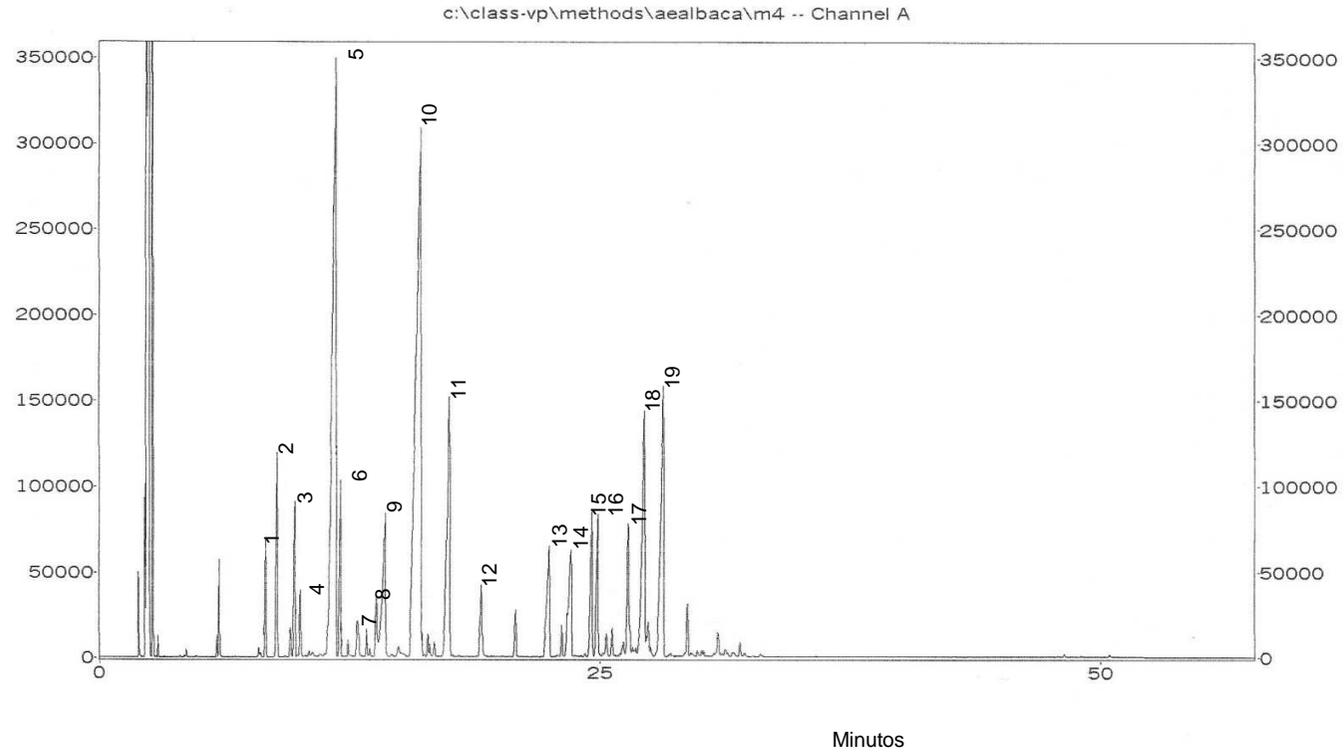
Muestra Nº 3 de Aceite Esencial de Albahaca

Pico	Tiempo de Retención (Minutos)	Índice de Retención Experimental (Ik)*	Compuesto	Área Relativa en cuentas	% Área Relativa
1	6,041	848	Isovalerato de etilo	223870	0,890
2	8,350	933	α -Pino	351047	1,410
3	8,916	950	Canfeno	714482	2,865
4	9,810	979	β -Pino	531843	2,130
5	10,080	987	Mirceno	220253	0,883
6	11,900	1041	1,8-Cineol	5457545	21,885
7	12,110	1047	<i>Trans</i> - β -Ocimeno	546299	2,190
8	12,940	1072	<i>Cis</i> -Hidrato de sabineno	171392	0,690
9	14,370	1113	Linalol	793049	3,180
10	16,157	1165	Alcanfor	6649429	26,664
11	17,580	1207	Estragol	1860466	7,460
12	19,160	1256	Chavicol	370007	1,485
13	22,550	1361	<i>Trans</i> -Cinamato de metilo	761018	3,050
14	23,680	1396	β -Bourboneno	492665	1,976
15	24,660	1429	<i>Trans</i> -Cariofileno	594455	2,385
16	24,950	1439	<i>Cis</i> - α -Bergamoteno	576968	2,415
17	26,450	1490	Germacreno D	318304	1,280
18	27,290	1519	β -Bisaboleno	1376138	5,520
19	28,240	1551	<i>Cis</i> - α -Bisaboleno	1721694	6,904
				Σ 23730924	Σ 95,262

Ik = Índices de Kovats con Columna Capilar DB-5.

* Índices de Retención \pm 3 Unidades.

Cromatograma Muestra N° 4 de Aceite Esencial de Albahaca



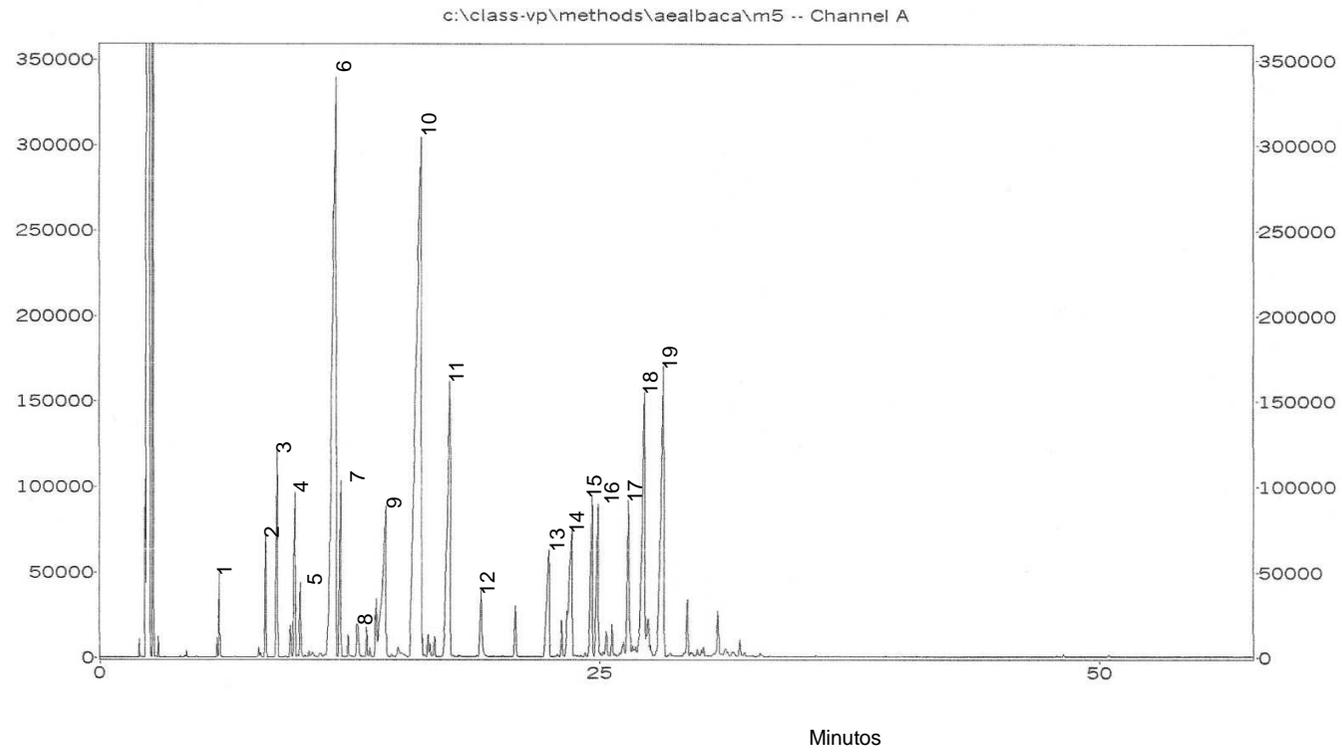
Muestra Nº 4 de Aceite Esencial de Albahaca

Pico	Tiempo de Retención (Minutos)	Índice de Retención Experimental (I _k)*	Compuesto	Área Relativa en cuentas	% Área Relativa
1	8,333	932	α-Pineno	236145	1,200
2	8,900	950	Canfeno	483636	2,460
3	9,780	978	β-Pineno	372243	1,890
4	10,066	987	Mirceno	162989	0,829
5	11,860	1043	1,8-Cineol	3389129	17,235
6	12,083	1047	<i>Trans</i> -β-Ocimeno	468676	2,383
7	12,941	1072	<i>Cis</i> -Hidrato de sabineno	161213	0,820
8	13,882	1099	<i>Trans</i> -Hidrato de sabineno	164921	0,840
9	14,316	1112	Linalol	704190	3,580
10	16,100	1164	Alcanfor	5475038	27,840
11	17,530	1206	Estragol	1499270	7,624
12	19,124	1255	Chavicol	272800	1,390
13	22,510	1359	<i>Trans</i> -Cinamato de metilo	596964	3,040
14	23,610	1393	β-Bourboneno	642011	3,265
15	24,630	1428	<i>Trans</i> -Cariofileno	523696	2,663
16	24,923	1438	<i>Cis</i> -α-Bergamoteno	469617	2,340
17	26,440	1490	Germacreno D	442488	2,250
18	27,265	1518	β-Bisaboleno	1060223	5,390
19	28,207	1550	<i>Cis</i> -α-Bisaboleno	1535589	7,810
				Σ18826982	Σ95,589

I_k = Índices de Kovats con Columna Capilar DB-5.

* Índices de Retención ± 3 Unidades.

Cromatograma Muestra N° 5 de Aceite Esencial de Albahaca



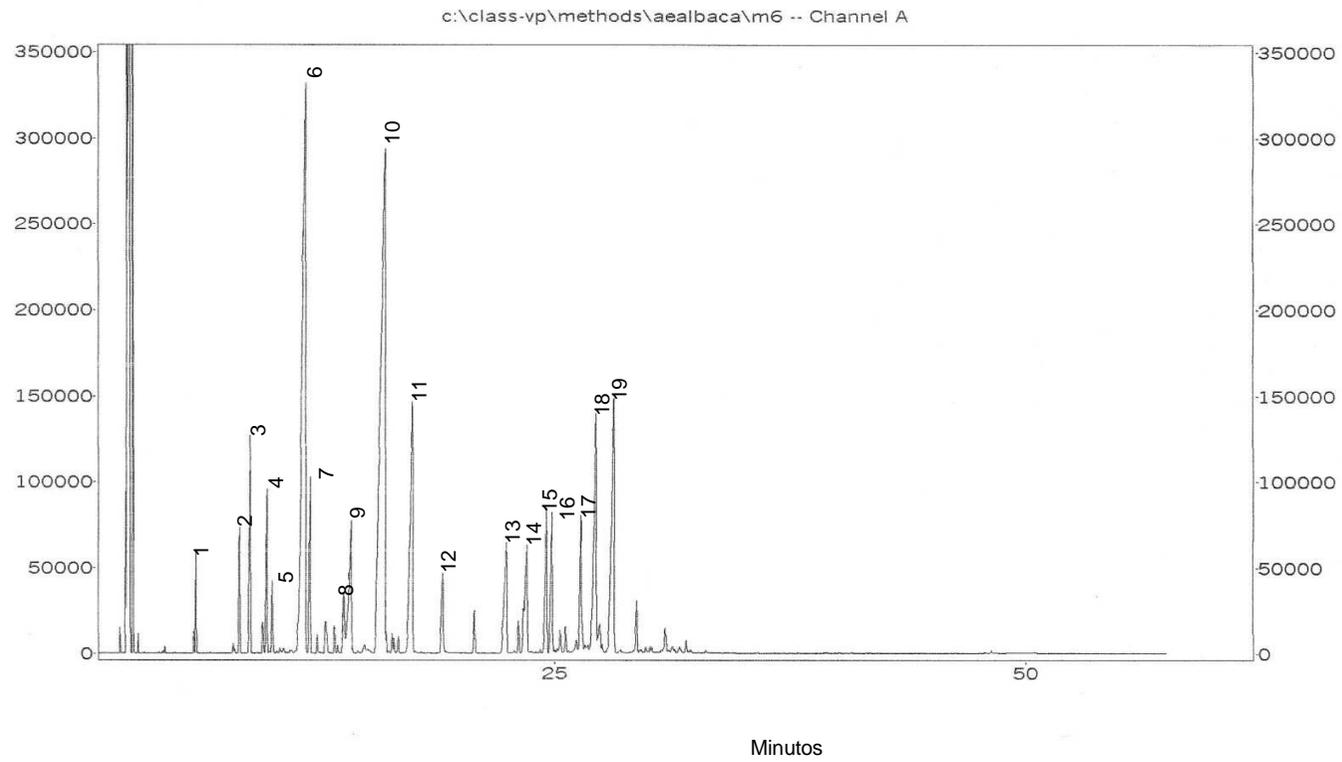
Muestra Nº 5 de Aceite Esencial de Albahaca

Pico	Tiempo de Retención (Minutos)	Índice de Retención Experimental (I _k)*	Compuesto	Área Relativa en cuentas	% Área Relativa
1	6,025	848	Isovalerato de etilo	123096	0,600
2	8,340	932	α-Pineno	233114	1,130
3	8,910	950	Canfeno	483579	2,350
4	9,790	978	β-Pineno	383137	1,860
5	10,074	987	Mirceno	169297	0,820
6	11,860	1040	1,8-Cineol	4321487	20,974
7	12,090	1047	<i>Trans</i> -β-Ocimeno	467833	2,270
8	12,933	1071	<i>Cis</i> -Hidrato de sabineno	149633	0,730
9	14,332	1112	Linalol	829042	4,024
10	16,110	1164	Alcanfor	5319229	25,820
11	17,570	1207	Estragol	1629240	7,910
12	19,124	1255	Chavicol	242769	1,180
13	22,510	1359	<i>Trans</i> -Cinamato de metilo	544517	2,645
14	23,660	1395	β-Bourboneno	230478	1,120
15	24,665	1429	<i>Trans</i> -Cariofileno	448377	2,176
16	24,960	1439	<i>Cis</i> -α-Bergamoteno	526893	2,260
17	26,465	1490	Germacreno D	468558	2,274
18	27,290	1519	β-Bisaboleno	1260292	6,117
19	28,248	1551	<i>Cis</i> -α-Bisaboleno	1707220	8,286
				Σ19537791	Σ94,546

I_k = Índices de Kovats con Columna Capilar DB-5.

* Índices de Retención ± 3 Unidades.

Cromatograma Muestra N° 6 de Aceite Esencial de Albahaca



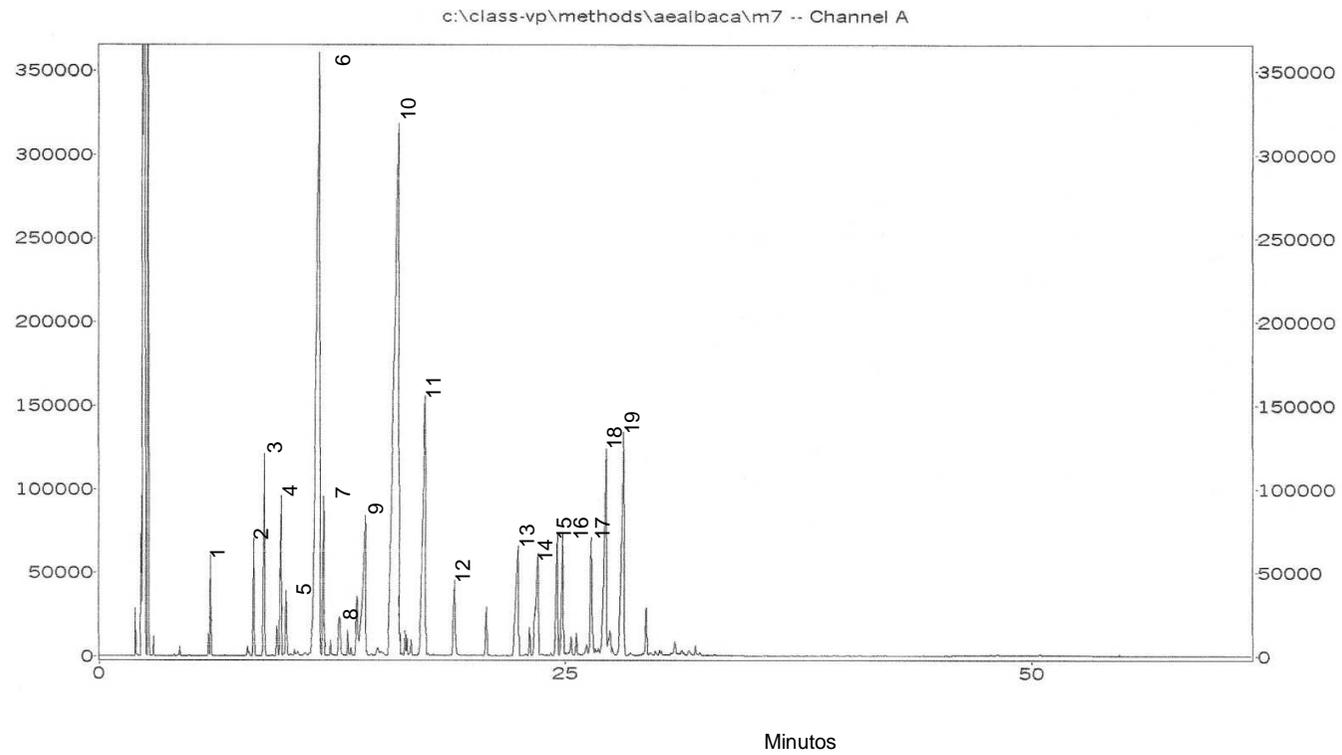
Muestra Nº 6 de Aceite Esencial de Albahaca

Pico	Tiempo de Retención (Minutos)	Índice de Retención Experimental (Ik)*	Compuesto	Área Relativa en cuentas	% Área Relativa
1	6,025	848	Isovalerato de etilo	150425	0,805
2	8,340	932	α -Pinoeno	259452	1,390
3	8,900	950	Canfeno	524931	2,810
4	9,790	978	β -Pinoeno	401410	2,150
5	10,070	987	Mirceno	172122	0,920
6	11,840	1040	1,8-Cineol	4092357	21,890
7	12,074	1046	<i>Trans</i> - β -Ocimeno	455835	2,440
8	13,874	1099	<i>Trans</i> -Hidrato de sabineno	164263	0,880
9	14,266	1110	Linalol	566710	3,030
10	16,066	1163	Alcanfor	4776243	25,546
11	17,516	1205	Estragol	1422491	7,608
12	19,130	1255	Chavicol	316035	1,690
13	22,507	1359	<i>Trans</i> -Cinamato de metilo	615506	3,290
14	23,590	1393	β -Bourboneno	313522	1,680
15	24,620	1427	<i>Trans</i> -Cariofileno	294948	1,580
16	24,915	1437	<i>Cis</i> - α -Bergamoteno	466198	2,490
17	26,440	1490	Germacreno D	404771	2,165
18	27,240	1517	β -Bisaboleno	1020779	5,460
19	28,200	1550	<i>Cis</i> - α -Bisaboleno	1431507	7,660
				Σ 17849505	Σ 95,484

Ik = Índices de Kovats con Columna Capilar DB-5.

* Índices de Retención \pm 3 Unidades.

Cromatograma Muestra N° 7 de Aceite Esencial de Albahaca



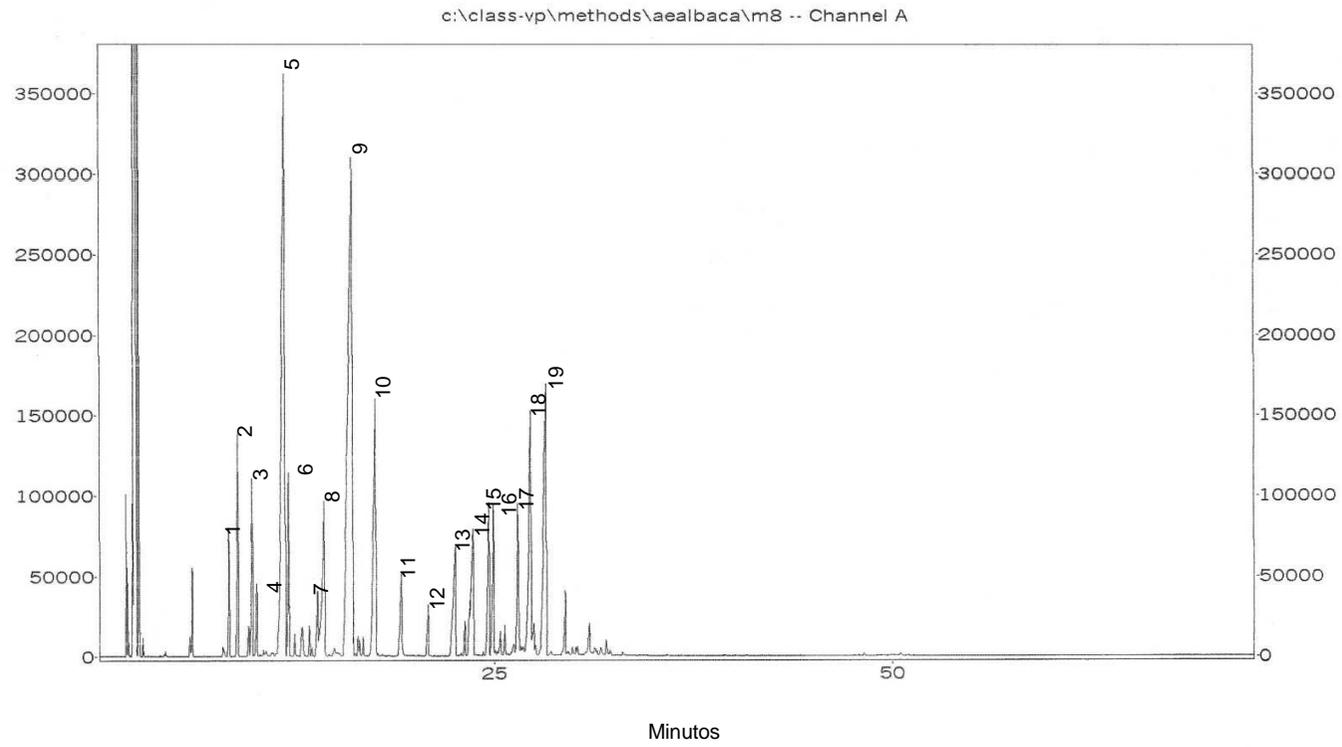
Muestra Nº 7 de Aceite Esencial de Albahaca

Pico	Tiempo de Retención (Minutos)	Índice de Retención Experimental (I _k)*	Compuesto	Área Relativa en cuentas	% Área Relativa
1	6,025	848	Isovalerato de etilo	161811	0,830
2	8,340	932	α-Pineno	249217	1,275
3	8,900	950	Canfeno	502803	2,570
4	9,790	978	β-Pineno	395520	2,020
5	10,074	987	Mirceno	161718	0,830
6	11,866	1040	1,8-Cineol	4676906	23,910
7	12,083	1047	<i>Trans</i> -β-Ocimeno	390589	2,000
8	12,960	1072	<i>Cis</i> -Hidrato de sabineno	174597	0,890
9	14,325	1112	Linalol	720839	3,690
10	16,116	1164	Alcanfor	5387493	27,550
11	17,540	1206	Estragol	1545616	7,900
12	19,133	1255	Chavicol	271191	1,390
13	22,515	1360	<i>Trans</i> -Cinamato de metilo	627063	3,210
14	23,580	1392	β-Bourboneno	296322	1,515
15	24,615	1427	<i>Trans</i> -Cariofileno	411389	2,100
16	24,915	1437	<i>Cis</i> -α-Bergamoteno	402795	2,060
17	26,423	1489	Germacreno D	362531	1,854
18	27,232	1517	β-Bisaboleno	980971	5,020
19	28,170	1549	<i>Cis</i> -α-Bisaboleno	1179034	6,030
				Σ18898405	Σ96,644

I_k = Índices de Kovats con Columna Capilar DB-5.

* Índices de Retención ± 3 Unidades.

Cromatograma Muestra N° 8 de Aceite Esencial de Albahaca



Muestra Nº 8 de Aceite Esencial de Albahaca

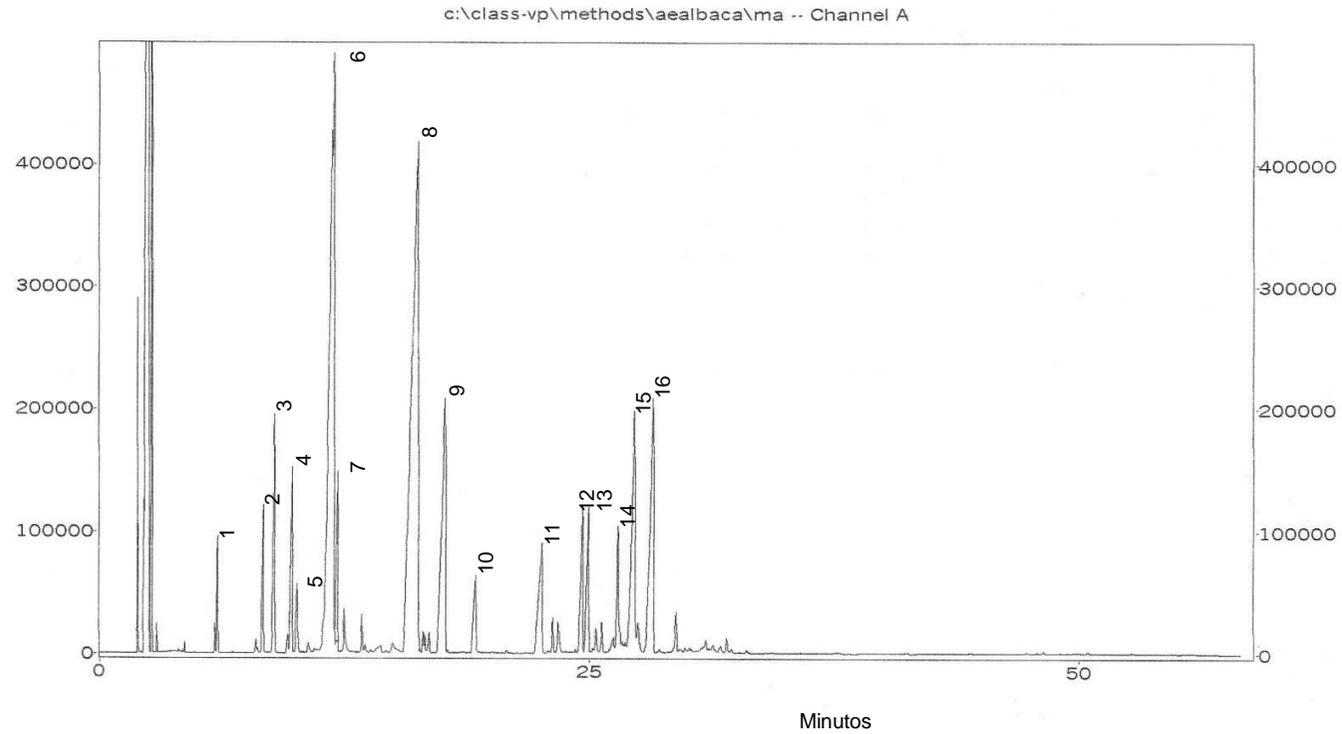
Pico	Tiempo de Retención (Minutos)	Índice de Retención Experimental (Ik)*	Compuesto	Área Relativa en cuentas	% Área Relativa
1	8,350	933	α -Pino	249092	1,130
2	8,920	951	Canfeno	616860	2,810
3	9,810	979	β -Pino	398202	1,810
4	10,085	987	Mirceno	208001	0,950
5	11,875	1041	1,8-Cineol	4790900	21,790
6	12,110	1047	<i>Trans</i> - β -Ocimeno	544403	2,480
7	13,900	1100	<i>Trans</i> -Hidrato de sabineno	167606	0,760
8	14,340	1113	Linalol	696549	3,170
9	16,110	1164	Alcanfor	5183958	23,780
10	17,570	1207	Estragol	1684086	7,660
11	19,165	1256	Chavicol	363331	1,653
12	20,849	1308	<i>Cis</i> -Cinamato de metilo	162980	0,740
13	22,550	1361	<i>Trans</i> -Cinamato de metilo	666333	3,030
14	23,682	1396	β -Bourboneno	583285	2,653
15	24,665	1429	<i>Trans</i> -Cariofileno	614722	2,800
16	24,960	1439	<i>Cis</i> - α -Bergamoteno	537946	2,450
17	26,480	1491	Germacreno D	549259	2,500
18	27,300	1519	β -Bisaboleno	1324728	6,030
19	28,260	1552	<i>Cis</i> - α -Bisaboleno	1685163	7,665
				Σ 21027404	Σ 95,861

Ik = Índices de Kovats con Columna Capilar DB-5.

* Índices de Retención \pm 3 Unidades.

ANEXO F. Datos cromatográficos para muestras de aceite de las réplicas.

Cromatograma Muestra A de Aceite Esencial de Albahaca



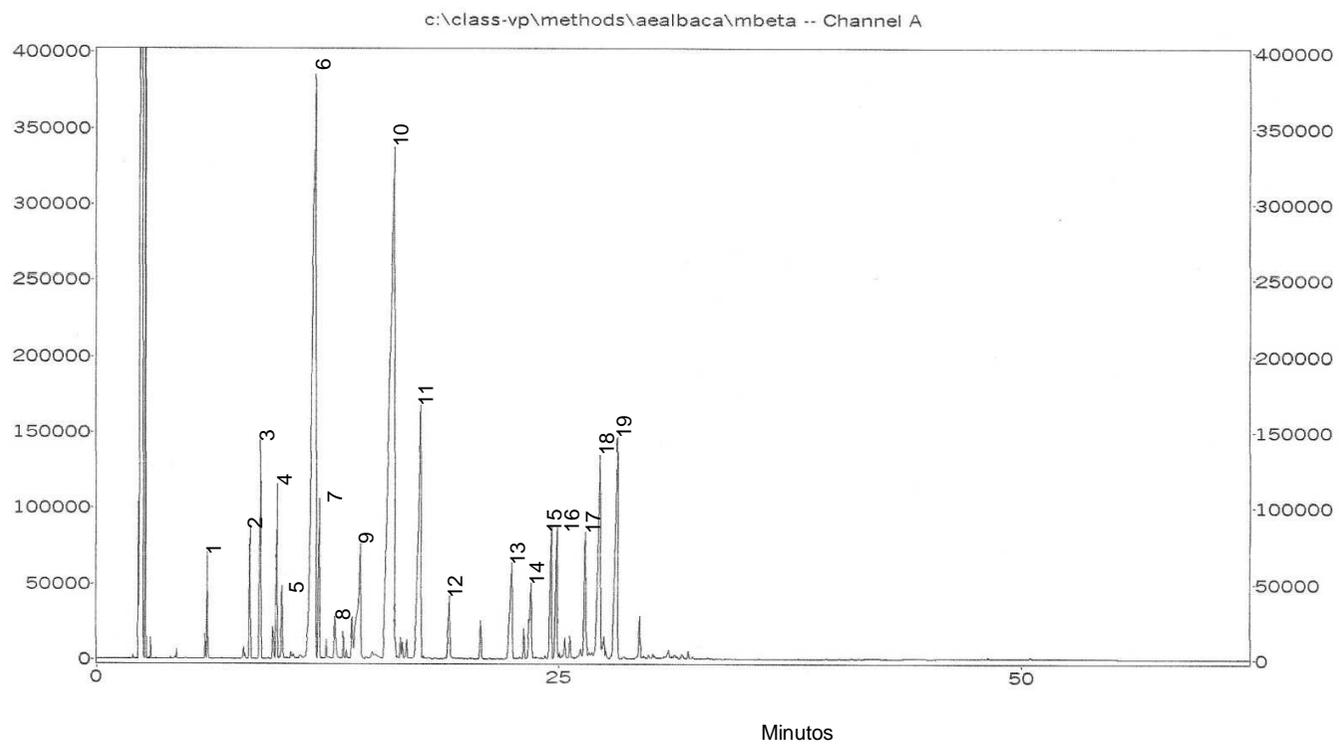
Muestra A de Aceite Esencial de Albahaca

Pico	Tiempo de Retención (Minutos)	Índice de Retención Experimental (Ik)*	Compuesto	Área Relativa en cuentas	% Área Relativa
1	6,083	850	Isovalerato de etilo	309225	0,950
2	8,408	934	α -Pino	533478	1,640
3	8,983	953	Canfeno	1081228	3,320
4	9,875	981	β -Pino	753560	2,315
5	10,133	989	Mirceno	300758	0,920
6	12,033	1045	1,8-Cineol	7674401	23,580
7	12,208	1050	<i>Trans</i> - β -Ocimeno	615413	1,890
8	16,300	1170	Alcanfor	9294408	28,556
9	17,700	1205	Estragol	2665103	8,190
10	19,260	1259	Chavicol	538359	1,654
11	22,650	1364	<i>Trans</i> -Cinamato de metilo	1104458	3,393
12	24,710	1430	<i>Trans</i> -Cariofileno	658057	2,020
13	25,010	1441	<i>Cis</i> - α -Bergamoteno	830941	2,550
14	26,515	1492	Germacreno D	514497	1,580
15	27,373	1522	β -Bisaboleno	2058219	6,324
16	28,330	1554	<i>Cis</i> - α -Bisaboleno	2478146	7,614
				Σ 31410251	Σ 96,496

Ik = Índices de Kovats con Columna Capilar DB-5.

* Índices de Retención \pm 3 Unidades.

Cromatograma Muestra B de Aceite Esencial de Albahaca



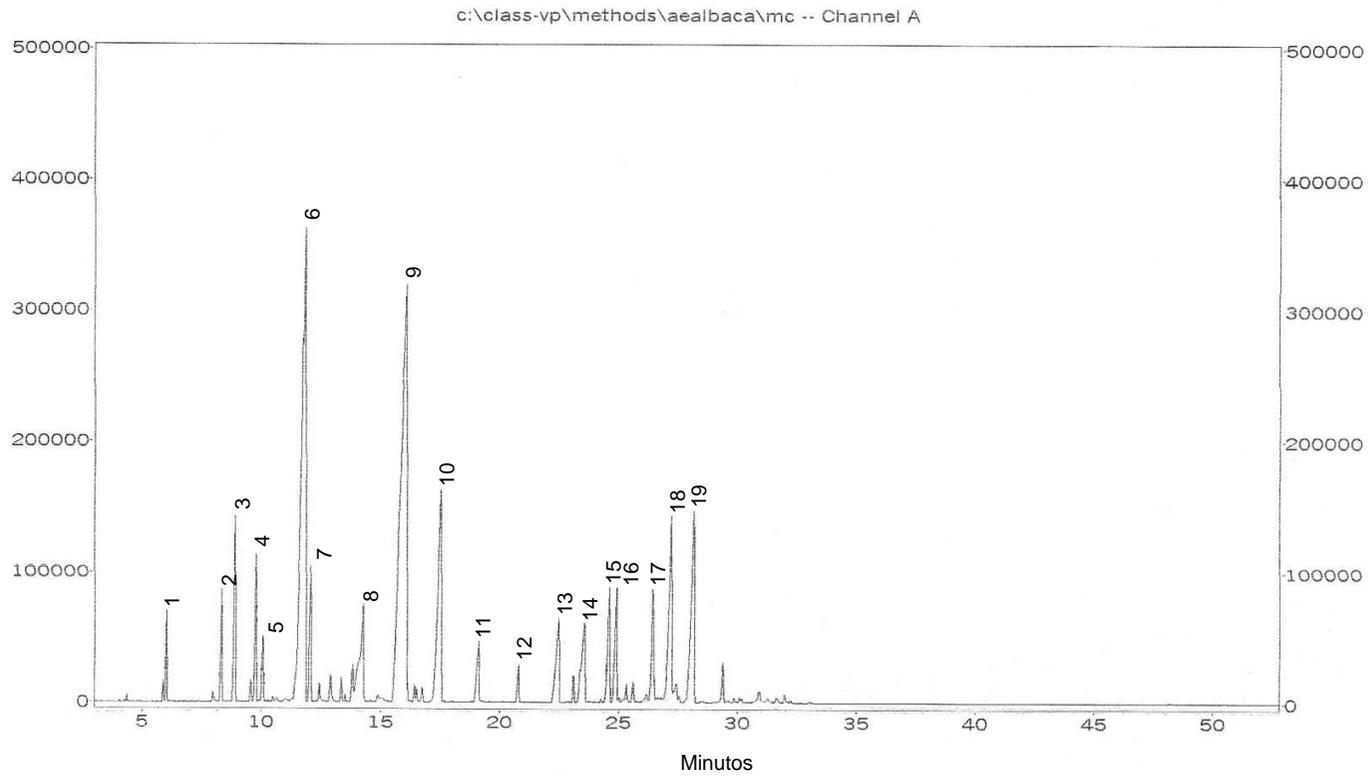
Muestra B de Aceite Esencial de Albahaca

Pico	Tiempo de Retención (Minutos)	Índice de Retención Experimental (I _k)*	Compuesto	Área Relativa en cuentas	% Área Relativa
1	6,041	848	Isovalerato de etilo	195239	0,990
2	8,350	933	α-Pineno	320979	1,624
3	8,920	951	Canfeno	645087	3,264
4	9,810	979	β-Pineno	486844	2,460
5	10,080	987	Mirceno	201530	1,020
6	11,900	1041	1,8-Cineol	5359745	27,120
7	12,100	1047	<i>Trans</i> -β-Ocimeno	470257	2,380
8	12,940	1072	<i>Cis</i> -Hidrato de sabineno	158506	0,800
9	14,330	1112	Linalol	783979	3,970
10	16,141	1165	Alcanfor	3753775	18,990
11	17,574	1207	Estragol	1720513	8,705
12	19,130	1255	Chavicol	248313	1,256
13	22,510	1359	<i>Trans</i> -Cinamato de metilo	560300	2,835
14	23,540	1391	β-Bourboneno	147666	0,750
15	24,630	1428	<i>Trans</i> -Cariofileno	475455	2,410
16	24,930	1438	<i>Cis</i> -α-Bergamoteno	504544	2,553
17	26,450	1490	Germacreno D	476486	2,410
18	27,250	1517	β-Bisaboleno	1089865	5,515
19	28,200	1550	<i>Cis</i> -α-Bisaboleno	1323569	6,700
				Σ18922652	Σ95,752

I_k = Índices de Kovats con Columna Capilar DB-5.

* Índices de Retención ± 3 Unidades.

Cromatograma Muestra C de Aceite Esencial de Albahaca



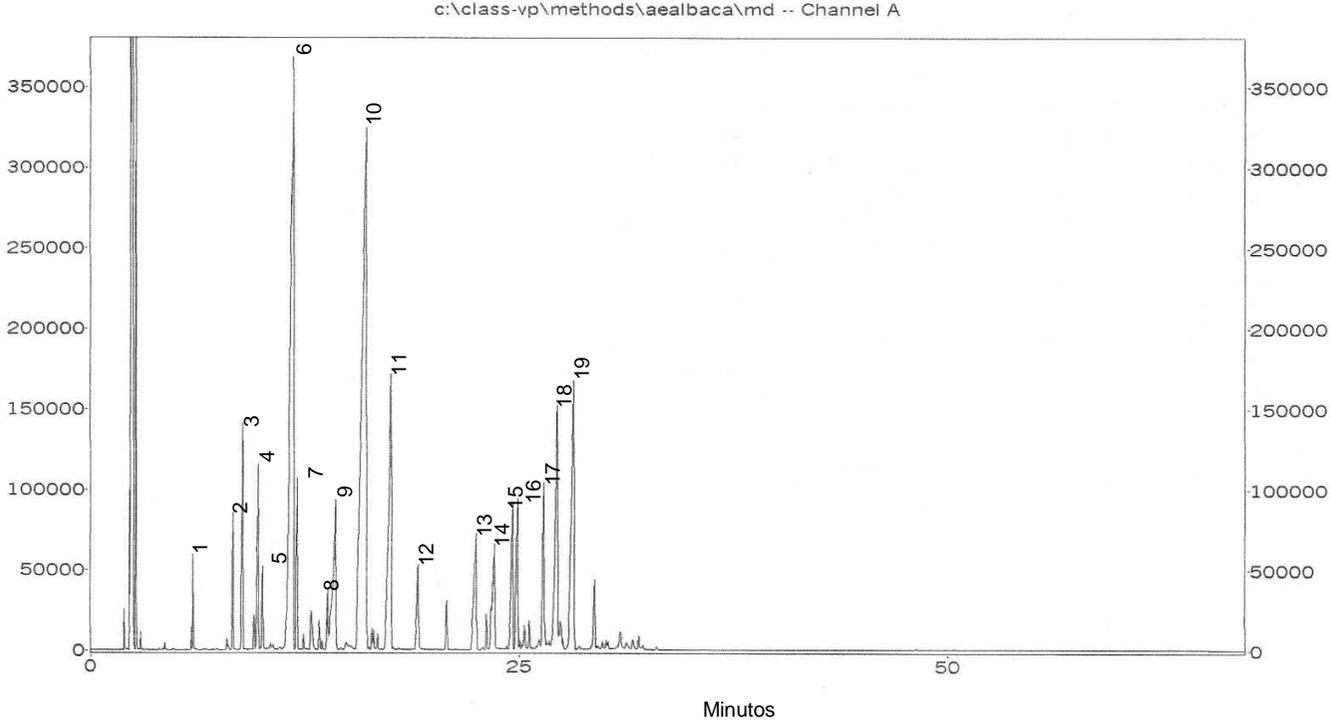
Muestra C de Aceite Esencial de Albahaca

Pico	Tiempo de Retención (Minutos)	Índice de Retención Experimental (Ik)*	Compuesto	Área Relativa en cuentas	% Área Relativa
1	6,035	848	Isovalerato de etilo	189181	0,840
2	8,340	932	α -Pino	312134	1,385
3	8,916	950	Canfeno	629796	2,795
4	9,800	978	β -Pino	480279	2,132
5	10,075	987	Mirceno	206504	0,917
6	11,875	1041	1,8-Cineol	4671230	20,734
7	12,090	1047	<i>Trans</i> - β -Ocimeno	480260	2,132
8	14,310	1112	Linalol	604951	2,685
9	16,116	1164	Alcanfor	5670874	25,171
10	17,560	1206	Estragol	1658829	7,363
11	19,150	1256	Chavicol	314973	1,398
12	20,830	1308	<i>Cis</i> -Cinamato de metilo	135028	0,600
13	22,515	1360	<i>Trans</i> -Cinamato de metilo	587464	2,608
14	23,598	1393	β -Bourboneno	602508	2,674
15	24,640	1428	<i>Trans</i> -Cariofileno	537120	2,384
16	24,940	1438	<i>Cis</i> - α -Bergamoteno	517511	2,297
17	26,450	1490	Germacreno D	527313	2,341
18	27,265	1518	β -Bisaboleno	1313445	5,830
19	28,210	1550	<i>Cis</i> - α -Bisaboleno	1410982	6,263
				Σ 20850382	Σ 92,548

Ik = Índices de Kovats con Columna Capilar DB-5.

* Índices de Retención \pm 3 Unidades.

Cromatograma Muestra D de Aceite Esencial de Albahaca



Muestra D de Aceite Esencial de Albahaca

Pico	Tiempo de Retención (Minutos)	Índice de Retención Experimental (I _k)*	Compuesto	Área Relativa en cuentas	% Área Relativa
1	6,033	848	Isovalerato de etilo	162879	0,726
2	8,349	933	α-Pineno	312154	1,390
3	8,924	951	Canfeno	634417	2,830
4	9,810	979	β-Pineno	491578	2,190
5	10,083	987	Mirceno	209120	0,932
6	11,883	1044	1,8-Cineol	4833521	21,535
7	12,100	1047	<i>Trans</i> -β-Ocimeno	485905	2,165
8	12,933	1071	<i>Cis</i> -Hidrato de sabineno	169165	0,754
9	14,350	1113	Linalol	887528	3,954
10	16,124	1164	Alcanfor	5446292	24,265
11	17,580	1204	Estragol	1817189	8,100
12	19,174	1256	Chavicol	384801	1,714
13	22,550	1361	<i>Trans</i> -Cinamato de metilo	722171	3,220
14	23,632	1393	β-Bourboneno	404179	1,800
15	24,648	1429	<i>Trans</i> -cariofileno	206588	0,920
16	24,950	1439	<i>Cis</i> -α-Bergamoteno	564101	2,513
17	26,470	1491	Germacreno D	606744	2,703
18	27,290	1519	β-Bisaboleno	1244044	5,543
19	28,240	1551	<i>Cis</i> -α-Bisaboleno	1727427	7,700
				Σ21309803	Σ94,954

I_k = Índices de Kovats con Columna Capilar DB-5.

* Índices de Retención ± 3 Unidades.