

# 7 COMPORTAMIENTO AL CULTIVO EXPERIMENTAL EN ARAGÓN DE *Lippia alba* PARA LA NORMALIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA OBTENIDA

Jesús Burillo

Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón. Gobierno de Aragón. Línea de Aromáticas y Medicinales. Apdo. de Correos 727, 50080 Zaragoza, España. Tel: (34) 976716300, Fax (34) 976716335, <jburilloa@aragon.es>

Roser Vila

Salvador Cañigueral

Unidad de Farmacología y Farmacognosia, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, Avda. Diagonal, 643, 08028 Barcelona, España. Tel: (34) 93402 4531, Fax: (34) 93403 5982, <s.canigueral@ub.edu>

José S. Urieta

Elisa Langa

Grupo de Termodinámica Aplicada y Superficies (GATHERS). Química Orgánica y Química Física, Facultad de Ciencias. Universidad de Zaragoza, España. Tel: (34) 976761298, Fax: (34) 976761202, <urieta@unizar.es>

Jesús Sanz

Análisis Instrumental y Química Ambiental, Instituto de Química Orgánica, CSIC, Juan de la Cierva, 3, 28006 Madrid. Tel: (34) 91562 2900, Fax: (34) 91564 4853, <iqojs02@iqog.csic.es>

---

## Resumen

Dentro de un amplio proyecto de normalización de productos naturales obtenidos de especies de la flora aromática latinoamericana, en el presente trabajo se presenta el estudio del comportamiento de los tres años iniciales de adaptación a cultivo de la especie *Lippia alba* (Fam. Verbenáceas), en diferentes condiciones agroclimáticas dentro la Comunidad Autónoma de Aragón. El material vegetal procedía de dos quimiotipos correspondientes a poblaciones de Uruguay y Costa Rica. La experimentación se realizó en parcelas de ensayo en Teruel y Ejea de los Caballeros (Zaragoza, España).

La respuesta de adaptación a las zonas ensayadas ha sido diferente para cada uno de los quimiotipos estudiados. Ninguno de los dos ha soportado las condiciones agroclimáticas de la zona de Teruel, mientras que en Ejea de los Caballeros solamente se ha adaptado el quimiotipo Uruguay. El factor limitante ha sido fundamentalmente las bajas temperaturas durante los meses de invierno. Se ha realizado un seguimiento para cada espécimen de planta en cada una de las fases del cultivo con tratamiento individualizado planta a planta con el fin de comprobar su grado de selección. La biomasa producida ha proporcionado muestras normalizadas para comprobar su respuesta en materia seca y aceite esencial. El aceite esencial se ha obtenido por dos diferentes métodos de extracción, hidrodestilación y con dióxido de carbono supercrítico. Asimismo, se ha efectuado la analítica de los extractos obtenidos de las plantas en estudio. Químicamente, se ha confirmado el mantenimiento de las características del quimiotipo adaptado al cultivo en Aragón.

## 1 Introducción

El conocimiento y uso de las plantas aromáticas y medicinales se extiende a cualquier parte del mundo donde el hombre tradicionalmente ha necesitado de ellas para curar sus dolencias o enfermedades.<sup>1</sup>

La especie *Lippia alba* (Fam. Verbenáceas), tiene una distribución geográfica muy amplia en todo el continente americano, siendo apreciada como planta medicinal por su uso popular en trastornos digestivos, afecciones hepáticas, como antiespasmódico, afecciones respiratorias, como expectorante, en afecciones de piel y mucosas, etc.<sup>2</sup> Se conocen diversos quimiotipos en relación con la composición de su aceite esencial.<sup>3,4,5</sup>

La domesticación, respuesta agronómica y transformación de la planta se ha desarrollado dentro de un amplio plan experimental establecido en Aragón con plantas aromáticas y medicinales.<sup>6</sup>

El material vegetal de *Lippia alba* con el que se ha trabajado pertenece a dos poblaciones de quimiotipos diferentes, una de Uruguay y otra de Costa Rica. La experimentación se ha planteado para obtener la respuesta agronómica y química de la especie en distintos hábitat de la Comunidad Autónoma de Aragón.<sup>7</sup>

A tal fin, se ha realizado la puesta en cultivo experimental de las plantas en las parcelas de cepas madre del Barrio de San Blas-Teruel y Ejea de los Caballeros (Zaragoza). A su vez, se pretende contribuir a la obtención de muestras normalizadas,<sup>8,9,10</sup> que permitan evaluar la importancia de esta especie en el mercado.

Durante los tres años en experimentación, se ha efectuado un estudio completo de cada una de las plantas en cultivo, se han utilizado distintas técnicas de extracción y se han obtenido cantidades de muestras de aceite esencial suficientes para analizar su composición química.

## 2 Material y métodos para la adaptación del cultivo

### 2.1 Plan de trabajo

El día 9 de mayo de 2003 llegan al CITA-Aragón 36 estaquillas de *Lippia alba* procedente de Montevideo. Las estaquillas se conservan en cámara hasta su plantación en bandeja de cultivo el día 12 de mayo.

– *Bandeja de enraizamiento.*

Alveolo cuadrado de 6 cm de lado y 18 cm de profundidad.

La Foto 1 ilustra el proceso de enraizamiento de las estaquillas de partida en bandeja y la obtención de planta enraizada.

– *Sustrato utilizado:*

50% de humín,  
25% arena y tierra de monte,  
25% de perlita.



**Foto 1.** Enraizamiento en bandeja de las estaquillas de *Lippia alba*.

Una vez realizada la plantación en bandeja se ubica en umbráculo con sombreado, dadas las altas temperaturas que se están registrando para esta época. El propósito es mantener las estaquillas controladas tanto de humedad como de temperatura hasta que hayan brotado, se efectúa un riego semanal en función de la humedad del suelo, la temperatura se mantiene entre 20-25 °C.

El tiempo transcurrido desde la plantación hasta la brotación y formación de hojas de todas las estaquillas es de 88 días, consiguiendo el 100% 100 de enraizamiento.

A principios de septiembre se retira la bandeja del umbráculo y se deposita en una zona de riego controlado al aire libre, para que se endurezcan los brotes.

El día 27 de octubre se efectúa una poda a las estaquillas que tienen los brotes más desarrollados para homogeneizar las plantas.

Durante los días 28 y 29 de octubre de 2003, se realiza la plantación en las Parcelas de Teruel y Ejea de los Caballeros (Zaragoza), con 16 estaquillas enraizadas en cada parcela.

El día 19 de abril de 2004, llegan al CITA procedentes de Costa Rica, 52 estaquillas de *Lippia alba* enraizadas, han perdido las hojas por lo que se ponen en bandeja con sustrato para que vuelvan a brotar.

El día 16 de junio con brotes nuevos se ponen en cultivo en la Parcela de Ejea de los Caballeros (Zaragoza) 30 plantas, el resto se dejan en la bandeja por si hubiese marras.

## 2.2 Consideraciones geográficas

- ESPAÑA

La Figura 1 ubica la Comunidad Autónoma de Aragón dentro del territorio español.

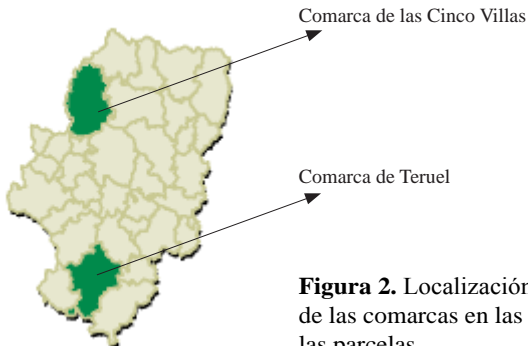


**Figura 1.** Comunidades Autónomas.

Las parcelas para los cultivos se encuentran situadas en dos Comarcas de la Comunidad Autónoma de Aragón, donde la flora autóctona en plantas aromáticas y medicinales es muy abundante.

La Figura 2 ilustra la situación de las comarcas en las que se hallan las parcelas.

- ARAGÓN



**Figura 2.** Localización geográfica de las comarcas en las que se hallan las parcelas.

## 2.2.1 Ubicación concreta de las parcelas experimentales

Los Términos Municipales elegidos para la instalación de las parcelas fueron:

- Barrio de San Blas (Teruel). Comarca de Teruel.
- Ejea de los Caballeros (Zaragoza). Comarca de las Cinco Villas.

## 2.2.2 Características de la Parcela de Teruel

- Parcela con riego por goteo Ejea de los Caballeros (Zaragoza). Comarca de las Cinco Villas.
- Se inició el cultivo el día 28 de octubre de 2003, con estaquilla enraizada en cepellón del material procedente de Uruguay.
- Número de plantas puestas en la fila: 16.
- Marco de plantación  $1,50 \times 0,40$  ( $0,60 \text{ m}^2/\text{planta}$ ). Nº de plantas/ha: 16.666.
- Altitud de la parcela 915 m sobre el nivel del mar.
- Tipo de suelo de textura franco-arcillosa.

En las Figuras 3 y 4 se indican las temperaturas medias anuales y las precipitaciones en el periodo 2002-2005, registradas en las parcelas de Teruel y Ejea.

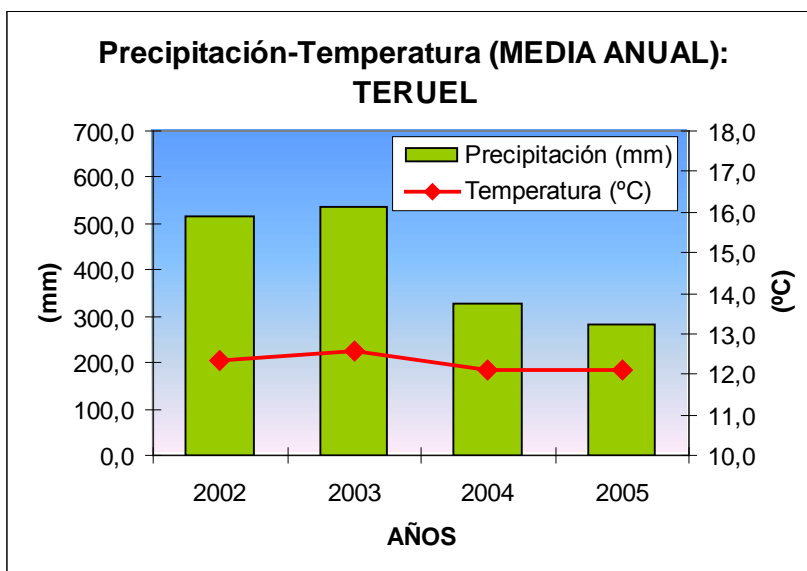


Figura 3. Datos meteorológicos de la zona de Teruel.

### 2.2.3. Características de la Parcela de Ejea

- Es una parcela de riego por goteo.
- Se inició el cultivo el día 29 de octubre de 2003, con estaquilla enraizada en cepellón del material procedente de Uruguay. N° de plantas puestas en fila: 16.
- El día 16 de junio de 2004, se plantan 30 estaquillas enraizadas en cepellón del material procedente de Costa Rica. N° de plantas puestas en fila: 30.
- Marco de plantación  $3 \times 0,50$  ( $1,50 \text{ m}^2/\text{planta}$ ). N° de plantas/ha: 6.666.
- Altitud de la parcela 346 m. sobre el nivel del mar.
- Tipo de suelo de textura franco-arcillo-arenosa.

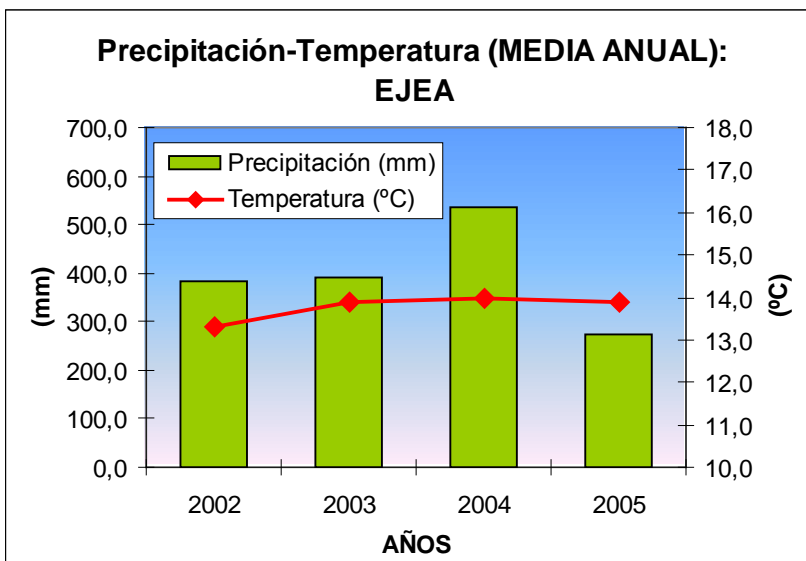


Figura 4. Datos meteorológicos de la zona de Ejea (Za.).

### 2.3 Especie seleccionada

La especie seleccionada para el estudio y sus orígenes es:

- *Lippia alba* (Fam. Verbenáceas), material vegetal procedente de dos poblaciones, una de Uruguay y otra de Costa Rica.

## 2.4 Variables controladas

- Producción anual de biomasa pesada en campo.
- Estudio fenológico de la planta en el momento de la recolección.
- Porcentaje de marras (%).
- Producción anual y rendimiento de materia seca.
- Rendimiento y producción de aceite esencial.
- Composición del aceite esencial.

## 2.5 Datos vegetativos

### 2.5.1 Parcela de Teruel

– *Seguimiento Lippia alba (Uruguay)*

- El 17 de junio de 2004, inicia la brotación una de las 16 plantas puestas el otoño pasado.
- A fecha 28 de julio de 2004, solamente ha brotado una nueva estaquilla.
- Día 16 de agosto/04, han brotado 3 estaquillas más. Su desarrollo vegetativo es muy escalonado.
- El 20 de octubre se recolectan las 5 plantas que han brotado. En el momento de la recolección el estadio fenológico es muy distinto en cada planta. Las 11 plantas restantes se dan por muertas.
- Porcentaje de marras (68,75%).

### 2.5.2 Parcela de Ejea (Zaragoza)

– *Seguimiento Lippia alba (Uruguay):*

- El día 22 de junio de 2004, inician la brotación 3 plantas de las 16 puestas en otoño pasado.
- A fecha 8 de julio ya han brotado 15 plantas. Se coloca un sistema de tutores para que no se mezclen los tallos entre plantas. Su desarrollando vegetativamente es bueno.
- El 11 de agosto de realiza una 1ª recolección por separado para cada una de las plantas más desarrolladas de las 15 que han brotado. Se da una planta por muerta.
- 30 de septiembre se realiza una 2ª recolección a las 15 plantas. Han desarrollado tanto como en la 1ª recolección aunque con menor floración.
- Porcentaje de marras (6,25%).
- El día 12 de mayo de 2005 se inicia la brotación en 6 plantas. El resto brotan en lo que queda de ese mes de mayo.

- El 27 de julio de 2005 se realiza la 1ª recolección en todas las plantas a excepción de la número 3 que se da como marra.
- El 27 de Octubre de 2005, se efectúa la 2ª recolección.

Las Fotos 2 y 3 ilustran el desarrollo de las planta de origen uruguayo y costarricense en la parcela de Ejea de los Caballeros.



**Foto 2.** *Lippia alba* (Uruguay). Parcela de Ejea (Za.).



**Foto 3.** *Lippia alba* (Costa Rica). Parcela de Ejea (Zaragoza).

– *Seguimiento Lippia alba (Costa Rica)*

- El día 18 de agosto de 2004 se coloca un sistema de tutores para que no se mezclen los tallos entre las plantas, aunque se comprueba que es una planta de porte erguido. Están brotando bien todas las plantas, aunque todavía no tienen flor.



- Día 30 de septiembre se recolectan las 5 plantas más desarrolladas en floración por separado y las otras 25 en conjunto.
- No se ha producido ninguna marra durante el año 2004.
- El año 2005 no brota ninguna de las plantas en cultivo, no han soportado los fríos del invierno.

## **2.6 Recolección y tratamiento de la biomasa**

- El diseño experimental se ha basado en un proceso de tratamiento individualizado por planta, con el fin de conocer y estudiar no solamente la domesticación y adaptación de la especie a nuestras zonas de cultivo, sino iniciar un proceso de selección de los individuos mejor adaptados y con mejores características productivas.
- Las muestras se recolectaron cuando las plantas se encontraban en floración.
- El material vegetal recolectado se sometió a un proceso de secado a la sombra bajo corriente de aire, durante un periodo de 8 días.
- Una parte de la materia seca obtenida, se destina a la obtención de aceite esencial por hidrodestilación en laboratorio, por el método Clevenger acogido a Farmacopea Europea.
- El proceso de secado y destilación se realiza en la Finca Experimental “La Alfranca” del Gobierno de Aragón.
- El año 2004 se proporciona muestra de los dos quimiotipos al Dpto. de Química-Física de la Universidad de Zaragoza, para la extracción con CO<sub>2</sub> Supercrítico.
- De las muestras de aceite esencial obtenido, se hacen lotes para su envío a otros Equipos de Investigación dentro del Proyecto.

## **2.7 Análisis estadístico de los datos agronómicos**

Se analizan los datos de la población de *Lippia alba* (Uruguay), ya que de la población de (Costa Rica) solamente se pudo efectuar una recolección el año 2004.

La metodología utilizada para la obtención de los resultados ha consistido en un análisis estadístico resumido en forma de un análisis descriptivo univariante, análisis gráfico y elaboración de informes de las variables representativas del estudio basado sobretodo en una comparación de medidas de posición central y dispersión (momentos de primer y segundo orden).

## **2.8 Análisis de la composición de los aceites esenciales obtenidos por destilación**

Los aceites esenciales obtenidos por destilación se han analizado en la Unidad de Farmacología y Farmacognosia de la Universidad de Barcelona utilizando

cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Los análisis se han realizado en dos columnas capilares con fases estacionarias de diferente polaridad: Supelcowax y Metilsilicona. A continuación se exponen las condiciones analíticas empleadas tanto para el desarrollo de los análisis como para la identificación de picos y la cuantificación de compuestos identificados.

### 2.8.1 Análisis por cromatografía de gases

- Aparato: Cromatógrafo de gases Hewlett-Packard, modelo 6890, equipado con un detector de ionización de llama (FID) y conectado a un ordenador dotado del software *HP Chemstation*<sup>TM</sup> para el tratamiento de datos cromatográficos.
- Columnas: Se han utilizado columnas capilares de sílice fundida de 0.25 mm de diámetro interno y 0.25  $\mu\text{m}$  de espesor de capa. Se emplearon columnas de 30 m de longitud para el análisis de las muestras del año 2004, mientras que se usaron columnas de 60 m de longitud para el análisis de las muestras del año 2005. Cada una de las muestras se analizó en 2 columnas de diferente polaridad: Supelcowax<sup>TM</sup>-10 (polietilenglicol) y SPB<sup>TM</sup>-1 (metilsilicona). Las condiciones experimentales fueron como sigue. Programa de temperatura, 60°C (2 min), 60-220°C a 4°C/min, 220°C (5 min). Temperatura del inyector, 250 °C; temperatura del detector, 270°C. Gas portador, Helio (1 ml/min); inyector split, split ratio 1:6. Volumen inyectado: Supelcowax, 0.2  $\mu\text{l}$ ; Metilsilicona, 0.6  $\mu\text{l}$ .

### 2.8.2 Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

- Aparatos: Se han empleado dos aparatos diferentes, cada uno equipado con una de las columnas descritas en el apartado anterior.
  - Para la columna de Supelcowax se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 serie II acoplado a un espectrómetro de masas Hewlett-Packard 5971A, equipado con un software *HP MS Chemstation*<sup>TM</sup>
  - Para la columna de metilsilicona se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 serie II acoplado a un espectrómetro de masas Hewlett-Packard 5989A.
- Las condiciones experimentales fueron como se indicaron anteriormente.

### 2.8.3 Identificación de componentes

Los compuestos fueron identificados mediante:

- Los **índices de retención** de cada pico, determinados en ambas columnas frente a una serie homóloga de ésteres metílicos cde ácidos grasos. Los datos experimentales obtenidos con las muestras fueron comparados con los datos disponibles en la base de datos de la Unidad de Farmacología y Farmacognosia de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona.
- Los **espectros de masas** de cada pico, obtenidos en ambas columnas. Los espectros experimentales obtenidos con las muestras fueron comparados los de las bibliotecas de espectros NIST98.L y Wiley6.L., así como con los espectros disponibles en la base de datos de la Unidad de Farmacología y Farmacognosia de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona.

## 2.8.4 Cuantificación de componentes

Los constituyentes de los aceites esenciales fueron cuantificados a partir de las áreas cromatográficas de los picos obtenidos en los correspondientes cromatogramas, empleando el procedimiento de normalización interna. En los porcentajes finales se han empleado tanto los datos obtenidos en columna de metilsilicona como de Supelcowax, obviando así los posibles problemas de superposiciones de picos en alguna de las columnas y calculando las medias entre los resultados de las dos columnas cuando no había superposición.

## 3 Resultados y Discusión

En un primer apartado, se presentan los datos productivos y de transformación para las dos poblaciones de *Lippia alba*, durante los años 2004 y 2005, mientras que los datos resultantes del análisis químico de los aceites esenciales obtenidos por destilación de las mismas muestras se incluyen en un segundo apartado.

### 3.1 Datos agronómicos

#### 3.1.1 Año 2004

Las Tablas 1 y 2 recogen los resultados de *Lippia alba* Uruguay obtenidos en gramos planta (tratamientos), tanto de materia verde como de materia seca, y el rendimiento en materia seca de cada planta en las parcelas de Teruel y Ejea, respectivamente.

La destilación por hidrodestilación de 100 g de materia seca obtenida en la 1ª recolección de todos los tratamientos (especímenes) de procedencia uruguaya en la parcela de Teruel, proporciona en este año 2004 un rendimiento de 0,300 litros.

**Tabla 1.** Parcela de Teruel datos productivos 1ª recolección *Lippia alba* (Uruguay) en el año 2004.

Tratamientos	Materia verde (g)	Materia seca (g)	Materia seca (%)
T-1	144	90	62,50
T-2	612	358	58,50
T-3	12	6,4	53,33
T-4	82	33	40,24
T-5	29	15	51,72
Media	175,8	100,48	57,16

**Tabla 2.** Parcela de Ejea, datos productivos 1ª recolección *Lippia alba* (Uruguay) en el año 2004.

Tratamientos (especímenes)	Materia verde (g)	Materia seca (g)	Materia seca (%)
T-2	73	32,1	43,97
T-4	362	138,6	38,29
T-5	438	136,1	31,07
T-6	216	78,7	36,44
T-8	154	57,1	37,08
T-9	93,5	34,95	37,38
T-10	93,5	34,95	37,38
T-11	200	82,4	41,20
T-12	162	54,5	33,64
T-13	239	92	38,49
T-14	238	92,3	38,78
T-15	234	84,8	36,24
T-16	260	87	33,46
Media	212,54	77,35	36,39

Los tratamientos 1 y 3 no se han desarrollado lo suficiente en la parcela de Ejea hasta el momento de la 1ª cosecha. El n° 7 no ha brotado.

En las Tablas 3, 4 y 5 se dan los resultados correspondientes a la producción y al proceso de destilación por hidrodestilación (método Clevenger), de las plantas uruguayas y costarricenses en la parcela de Ejea en el año 2004.

**Tabla 3.** Parcela de Ejea, datos de hidrodestilación 1ª recolección *Lippia alba* (Uruguay) año 2004.

Tratamientos (especímenes)	Materia seca destilada (g)	Aceite esencial obtenido (ml)	% Aceite esencial
T-4	100	0,50	0,500
T-5	100	0,60	0,600
T-14	80	0,50	0,625
T-16	87	0,60	0,689
Mezcla 9 plantas	300	1,90	0,630
Media	667	4,10	0,614

**Tabla 4.** Parcela de Ejea, datos productivos e hidrodestilación 2ª recolección *Lippia alba* (Uruguay) año 2004.

Tratamientos	Materia verde (g)	Materia seca (g)	Materia seca (%)
	333	122	36,64
Mezcla de plantas	Materia seca destilada (g)	Aceite esencial obtenido (ml)	Rendimiento de aceite esencial
	300	1,00	0,333

**Tabla 5.** Parcela de Ejea, datos productivos e hidrodestilación *Lippia alba* (Costa Rica) año 2004.

Tratamientos	Materia verde (g)	Materia seca (g)	% Materia seca	Materia seca destilada (g)	Aceite esencial obtenido (ml)	Rendimiento de aceite esencial (%)
T-11	233	67	30,04	-	-	-
T-12	211	64	30,33	-	-	-
T-13	287	90	31,35	87	0,45	0,571
T-14	279	87	31,18	86	0,50	0,581
T-15	226	71	31,41	-	-	-
Mezcla 25 plantas	120	44	36,66	300	1,50	0,500
Media	226	70,50	31,19	143,25	0,75	0,523

- Los tratamientos (11,12 y 15) se destilan en conjunto 100 g MS = 0,550 litros.

### 3.1.2 Año 2005

En las Tablas de la 6 a la 9 se recogen los datos de producción de materia verde y seca de la planta uruguaya en su segundo año de cultivo, así como los rendimientos en aceite esencial obtenido por hidrodestilación. En la Tabla 9 se consignan las cantidades de aceite esencial obtenido (en litros) referidos a 100 kg de materia seca de cada uno de los tratamientos considerados (ejemplares de cada planta).

**Tabla 6.** Parcela de Ejea, datos productivos materia verde y seca *Lippia alba* (Uruguay) año 2005.

Tratamientos	1ª Recolección 27/07/05			2ª Recolección 27/10/05			Total Producción 2005		
	M. V. (g)	M. S. (g)	% M. S.	M. V. (g)	M. S. (g)	% M. S.	M. V. (g)	M. S. (g)	% M. S.
T-1	100	37	37,00	102	23	22,55	202	60	29,70
T-2	150	46	30,67	512	150	29,30	662	196	29,61
T-3 (marra)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T-4	700	257	36,71	768	246	32,03	1468	503	34,26
T-5	160	49	30,63	152	39	25,66	312	88	28,21
T-6	350	147	42,00	863	273	31,63	1213	420	34,62
T-7	50	18	36,00	106	26	24,53	156	44	28,21
T-8	150	61	40,67	274	89	32,48	424	150	35,38
T-9	100	46	42,00	210	69	32,86	310	115	37,10
T-10	300	126	42,00	373	125	33,51	673	251	37,30
T-11	450	173	38,44	453	150	33,11	903	323	35,77
T-12	150	64	42,67	301	99	32,89	451	163	36,14
T-13	550	211	38,36	659	220	33,38	1209	431	35,65
T-14	400	148	37,00	550	185	33,64	950	333	35,05
T-15	300	116	38,67	608	179	29,44	908	295	32,49
T-16	570	247	43,33	856	277	32,36	1426	524	36,75

**Tabla 7.** Parcela de Ejea, datos de rendimiento sobre materia seca de tallo/hoja en *Lippia alba* (Uruguay) año 2005.

Tratamientos	1ª Recolección				2ª Recolección				Total Producción 2005			
	MS (g)	Peso tallo (g)	Peso hoja flor (g)	% Hoja flor	MS (g)	Peso tallo (g)	Peso hoja flor (g)	% Hoja flor	MS (g)	Peso tallo (g)	Peso hoja flor (g)	% Hoja flor
T-1	37	21	16	43,24	23	13	10	43,48	60	34	26	43,33
T-2	46	26	20	43,48	150	92	58	38,67	196	118	78	39,80
T-3 (marra)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T-4	257	149	108	42,02	246	143	103	41,87	503	292	211	41,95
T-5	49	27	22	44,90	39	22	17	43,59	88	49	39	44,32
T-6	147	82	65	44,22	273	173	100	36,63	420	255	165	39,29
T-7	18	11	7	38,89	26	15	11	42,31	44	26	18	40,91
T-8	61	33	28	45,90	89	52	37	41,57	150	85	65	43,33
T-9	46	26	20	43,48	69	42	27	39,13	115	68	47	40,87
T-10	126	79	47	37,30	125	80	45	36,00	251	159	92	36,65
T-11	173	94	79	45,66	150	95	55	36,67	323	189	134	41,49
T-12	64	36	28	43,75	99	59	40	40,40	163	95	68	41,72
T-13	211	118	93	44,08	220	137	83	37,73	431	255	176	40,84
T-14	148	81	67	45,27	185	112	73	39,46	333	193	140	42,04
T-15	116	64	52	44,83	179	109	70	39,11	295	173	122	41,36
T-16	247	142	105	42,51	277	176	101	36,46	524	318	206	39,31

**Tabla 8.** Parcela de Ejea, aceite esencial obtenido por hidrodestilación en 1ª y 2ª recolección con planta entera y hoja y flor con *Lippia alba* (Uruguay) año 2005.

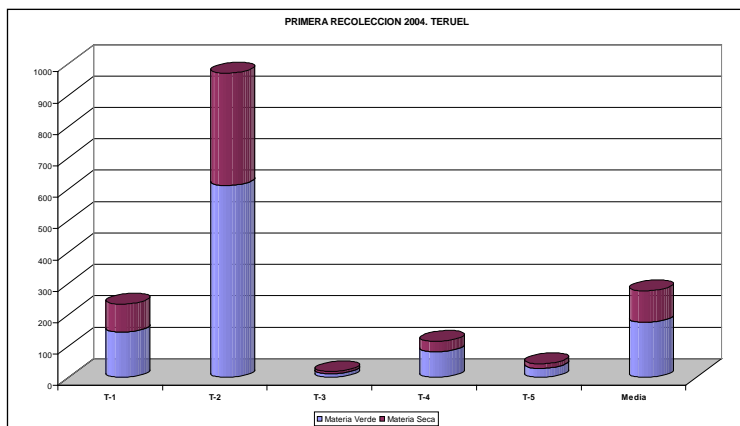
Tratamientos	1ª Recolección materia seca		2ª Recolección materia seca	
	Destilación planta entera %	Destilación hoja y flor %	Destilación planta entera %	Destilación hoja y flor %
T-1				
T-2				
T-3 (marra)				
T-4	1,01 ml	2,00 ml	1,02 ml	50 g / 1,20 ml
T-5				
T-6			0,80 ml	
T-7				
T-8				
T-9				
T-10	1,20 ml		0,74 ml	
T-11	1,02 ml	2,50 ml	0,80 ml	
T-12				
T-13	1,02 ml	2,50 ml	0,90 ml	1,33 ml
T-14	1,01 ml	1,50 ml	0,90 ml	1,75 ml
T-15				
T-16	1,00 ml	2,04 ml	0,80 ml	1,56 ml
Mezcla		2,60 ml		1,50 ml

**Tabla 9.** Parcela de Ejea, rendimiento % en aceite esencial de *Lippia alba* (Uruguay) año 2005.

Tratamientos	1ª Recolección materia seca		2ª Recolección materia seca	
	Destilación planta entera %	Destilación hoja y flor %	Destilación planta entera %	Destilación hoja y flor %
T-1				
T-2				
T-3 (marra)				
T-4	1,010 litros	2,000 litros	1,020 litros	1,200 litros
T-5				
T-6			0,800 litros	
T-7				
T-8				
T-9				
T-10	1,200 litros		0,737 litros	
T-11	1,020 litros	2,500 litros	0,800 litros	
T-12				
T-13	1,020 litros	2,500 litros	0,900 litros	1,333 litros
T-14	1,010 litros	1,500 litros	0,900 litros	1,750 litros
T-15				
T-16	1,000 litros	2,040 litros	0,800 litros	1,550 litros
Mezcla		2,600 litros		1,500 litros

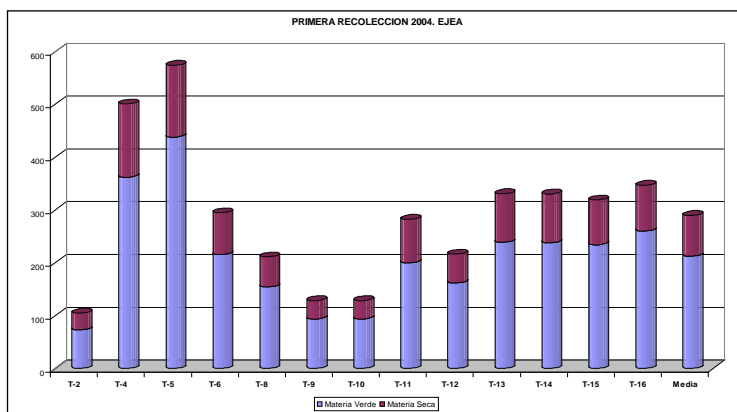
### 3.1.3 Análisis estadístico de resultados *Lippia alba* (Uruguay)

En los gráficos de barras de las Figuras 5 y 6 se representan los resultados estadísticos del desarrollo de cada uno de los tratamientos (ejemplares de plantas cultivadas) en el año 2004. En cada barra se representa en azul los gramos de materia verde y en rojo la cantidad de materia seca correspondiente.



**Figura 5.** Rendimiento de los distintos ejemplares de *Lippia uruguayana* 1ª recolección (2004) en la parcela de Teruel.

En la parcela de Teruel el único tratamiento a tener en cuenta en cuanto a rendimiento fue el segundo, con producciones casi nulas en los tratamientos tres y seis y nula en el quinto. El cultivo no sobrevivió en esta parcela al segundo año.

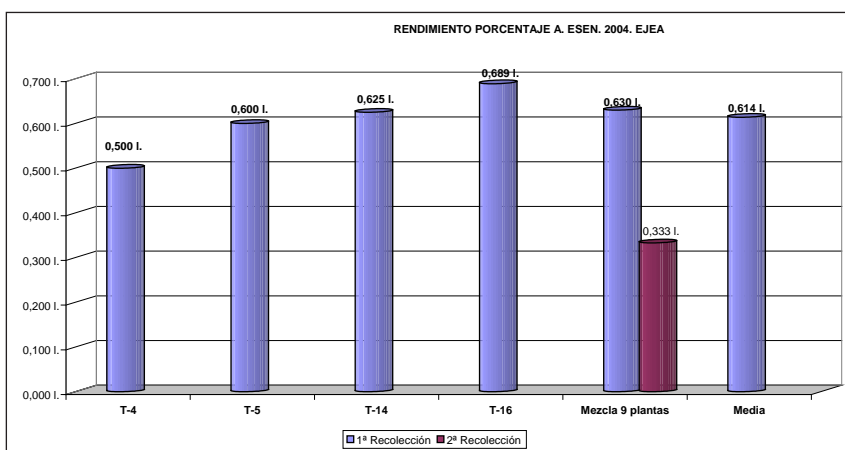


**Figura 6.** Rendimiento de los distintos ejemplares de *Lippia uruguayana* en la 1ª recolección (2004) en la parcela de Ejeja.



En la parcela de Ejea de los Caballeros la situación es muy diferente. Sobrevive a lo largo de todo el estudio con unas producciones suficientes debido, principalmente, a la diferencia en el clima, pero en este primer año la producción en esta parcela no logra alcanzar los mejores resultados de Teruel. En la primera recolección del año 2004, las cepas 1, 3 y 7 no dan producción. Entre las que sí se obtiene producción, destacan en materia seca los tratamientos 4 y 5, lo que pudiera ser debido a que se encuentran con menos competencia, y un grupo (tratamientos 13, 14, 15 y 16) que superan en materia verde los 200 gramos. También destacan, con carácter negativo, las cepas 2, 9 y 10 que no alcanzan los 100 gramos. En cuanto a materia seca, la relación se mantiene, siendo, curiosamente, mayor porcentualmente, en el tratamiento 2 (el de menor producción) y en el tratamiento 11, pero sin grandes cambios, manteniéndose, en general, entre el 30 y 40%.

En el gráfico de la Figura 7 se representa el rendimiento en aceite esencial de cada uno de los ejemplares de *Lippia uruguayana* en el año 2004 en primera y segunda recolección.

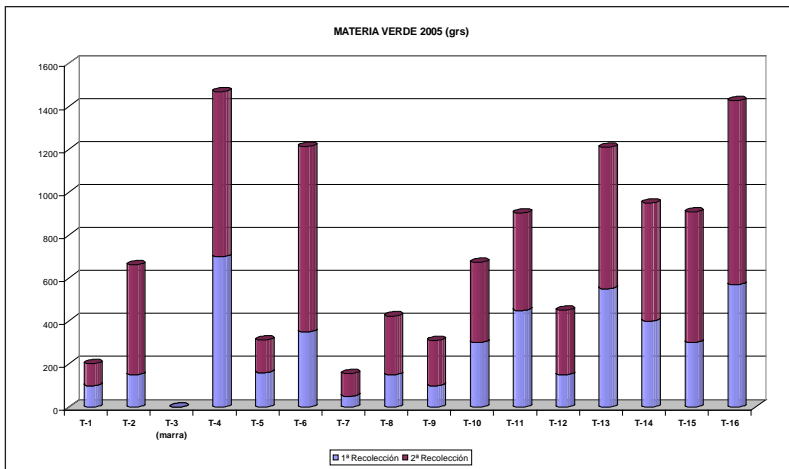


**Figura 7.** Rendimiento en aceite esencial de los distintos ejemplares de *Lippia uruguayana* cultivados en Ejea para la primera y segunda recolección, año 2004.

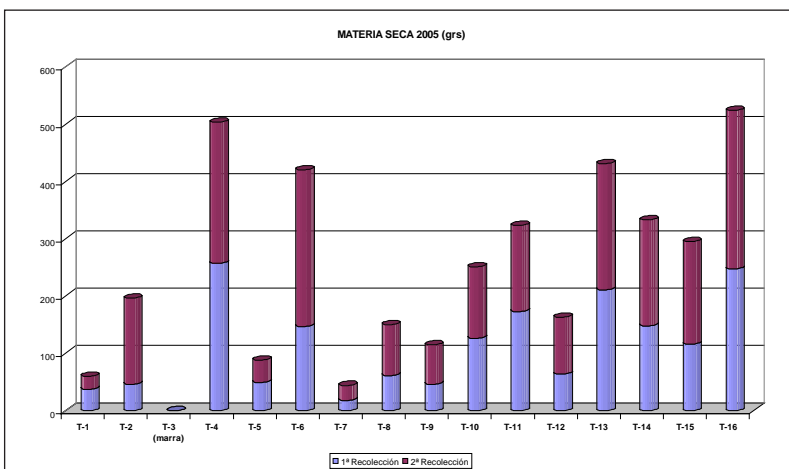
El rendimiento porcentual que se obtiene de aceite esencial varía entre 50% en el caso del tratamiento cuatro, y casi el 70% en el caso del tratamiento 16 (tener en cuenta que es extremo), exceptuando, claro está, los tratamientos que por no obtener la suficiente producción no se analizaron por separado. Para ellos se realizó una mezcla. Obteniéndose un rendimiento de 63% (el segundo más alto si lo considerásemos tratamiento independiente). De esa misma forma se analizaron las producciones de la segunda recolección, ya que debido a que era el primer año de plantación, la segunda recolección no dio otra posibilidad. En

este caso se obtuvo un rendimiento del 33% muy inferior a las del primer corte (en torno a la mitad).

En los gráficos de barras de las Figuras de la 8 a la 15 se representan los resultados estadísticos del desarrollo de cada uno de los tratamientos (ejemplares de plantas cultivadas) en el año 2005.

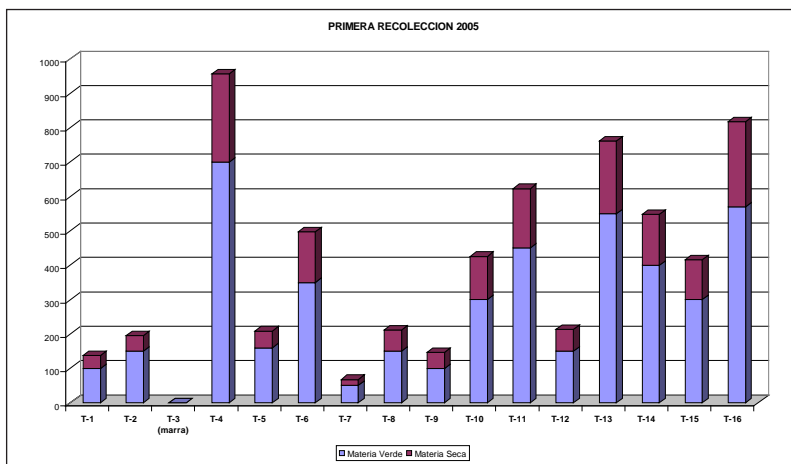


**Figura 8.** Rendimiento en materia verde de los distintos ejemplares de *Lippia uruguayana* en Ejea, año 2005.

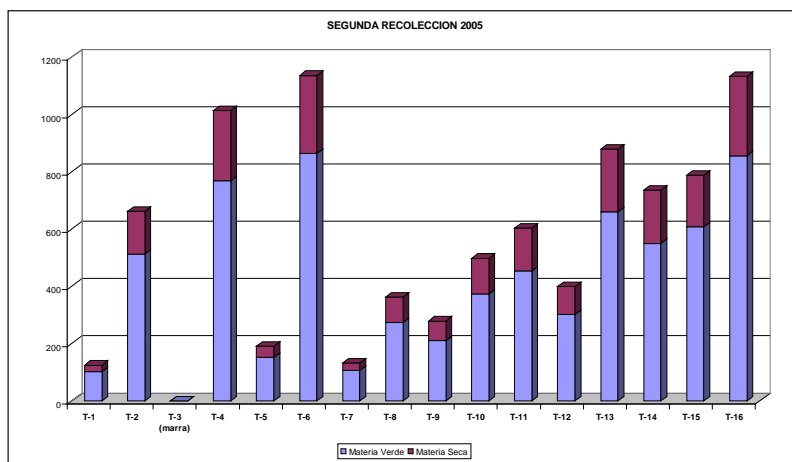


**Figura 9.** Rendimiento en materia seca de los distintos ejemplares de *Lippia uruguayana* en Ejea, año 2005.

Atendiendo a la producción de materia verde y materia seca. La relación relativa entre tratamientos se mantiene exactamente igual que en las otras variables analizadas. No existen datos que llamen especialmente la atención. Tanto en materia seca como verde en la primera recolección no existen grandes diferencias entre los tratamientos 1 y 2, pero en las dos variables esto cambia bruscamente en la segunda recolección aumentando al menos cinco veces la materia verde y en seis la seca a favor del tratamiento dos.



**Figura 10.** Comparación entre materia verde y materia seca obtenida para cada planta (*Lippia uruguay*, Ejea, 2005, 1ª recolección)

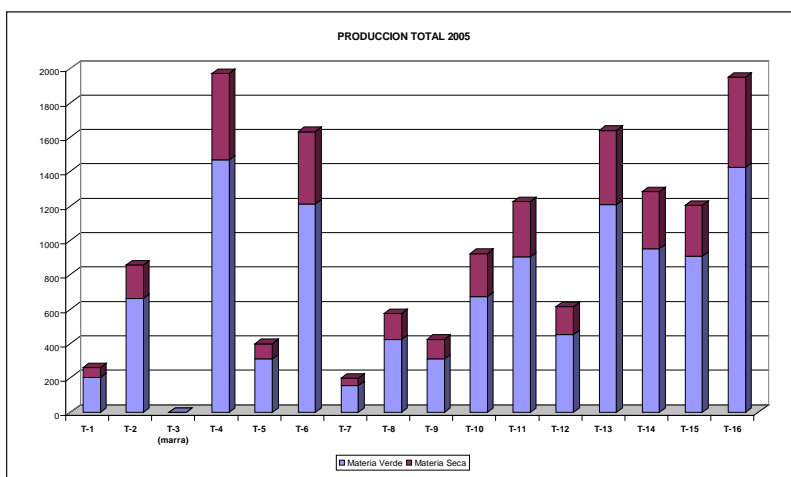


**Figura 11.** Comparación entre materia verde y materia seca obtenida para cada planta (*Lippia uruguay*, Ejea, 2005, 2ª recolección)

En cambio si diferenciamos por recolecciones 1ª y 2ª, en lugar de por materia seca y verde, los resultados son más interesantes. A excepción del tratamiento 5, todos los tratamientos aumentan su rendimiento en el segundo corte en cuanto a materia verde. Si observamos, la materia seca veremos que en los tratamientos 1, 4, 5, 10 y 11 (es decir en la tercera parte de los tratamientos estudiados) disminuyen su producción en el segundo corte.

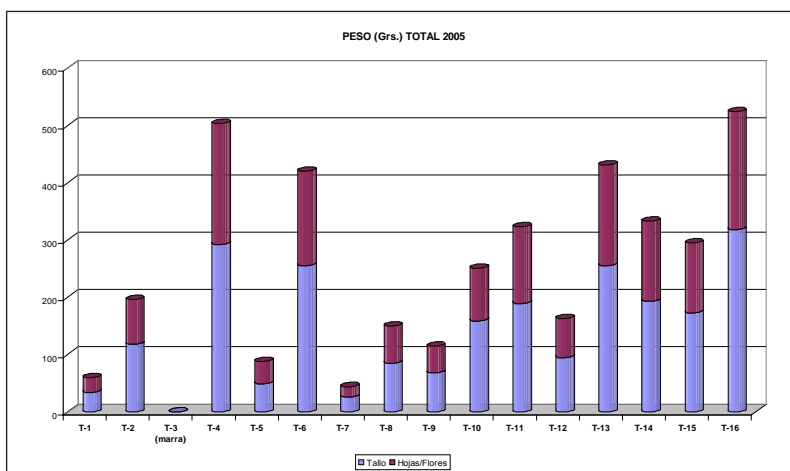
También debemos mencionar que existe una gran variabilidad en cuanto a las diferentes producciones por corte, presentándose casos como el uno y el once en donde el aumento entre cortes en materia verde es mínimo, hasta los casos 2, 6, 7, 9, 12 y 15 en donde ese aumento es el doble o el triple. En la variable materia seca, se da el mismo aumento en casi todos los casos descritos, aunque el cambio se ve minorado.

De todo ello, podemos ver como cambia el ranking entre tratamientos y así el tratamiento 2 que ocupaba las últimas posiciones en el primer corte avanza hasta un puesto mucho más favorecido en el segundo. El tratamiento 4 que en el primer corte dio el máximo rendimiento cae a la tercera posición en el segundo corte y el tratamiento 6 que en la primera recolección se situaba en el grupo mediano, se sitúa a la cabeza en la segunda recolección, por citar algunos de los rasgos más sobresalientes.



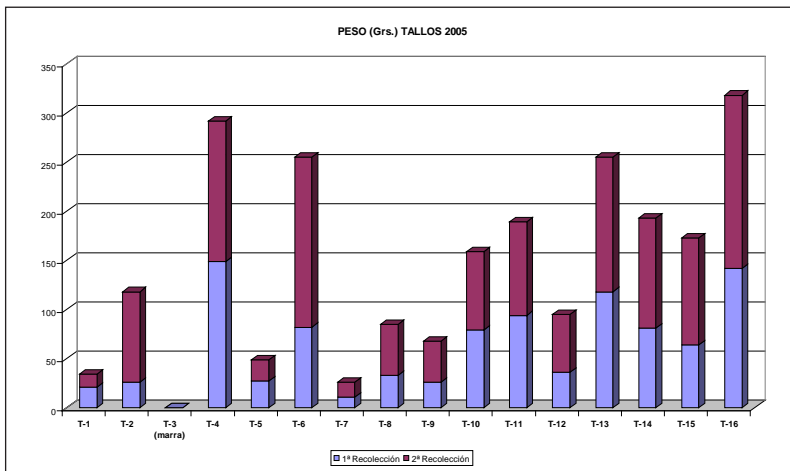
**Figura 12.** Rendimiento anual materia verde y materia seca para cada planta (*Lippia uruguay*, Ejea, año 2005).

Como resumen de los dos gráficos anteriores, podemos ver en el de la Figura 12 la producción total del 2005 para materia verde y materia seca, siguiendo en las dos variables el mismo patrón dentro de los distintos tratamientos. Existen grupos, dos a dos, encabezados por los tratamientos 4 y 16, seguidos por los 6 y 13 y 11 y 14 en tercero, con prácticamente idéntica materia verde y seca. En cuanto a los que peor producciones han obtenido (aparte de la marra del tratamiento 3) nos encontramos con los tratamientos 7 y 1 (podría haber sido por ser extremo, pero el tratamiento 16 también lo es). Lo que si se puede observar es una ordenación en los distintos tratamientos de ganador-perdedor-ganador con mayor (4, 6, 13 y 16) o menor (2, 8 y 10 y 11) suerte en los ganadores, pero existiendo, lo que da la idea de recursos dados y usos competitivos.



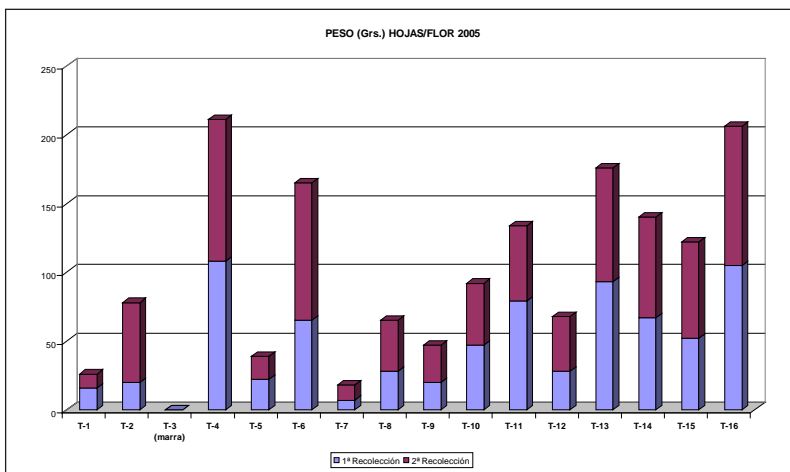
**Figura 13.** Masa de tallos (azul) y de hojas y flores (rojo) de los distintos ejemplares de *Lippia uruguaya* (Ejea, año 2005).

Si se considera el peso total de las distintas partes de la planta (tallos y hojas y flores), se observan dos ganadores en el conjunto, tratamientos 4 y 16, donde en el primero el grupo hojas y flores tiene un mayor porcentaje. Les siguen a estos los tratamientos 6 y 13 prácticamente indistinguibles entre sí. En el otro extremo, con un menor rendimiento (si obviamos el caso del tercer tratamiento que fue marra) tenemos los casos 7, 1 y 6 por este orden. Asimismo los menores pesos relativos de la parte hojas y flor (con mayores rendimientos en aceites esenciales) fueron los tratamientos 2, 6, 10 y 16 obteniendo porcentajes de ese grupo menores del 40% sobre el total de materia verde.



**Figura 14.** Comparativa de las masas de tallos para la 1ª y segunda recolección (*Lippia uruguayana*, Ejea, año 2005).

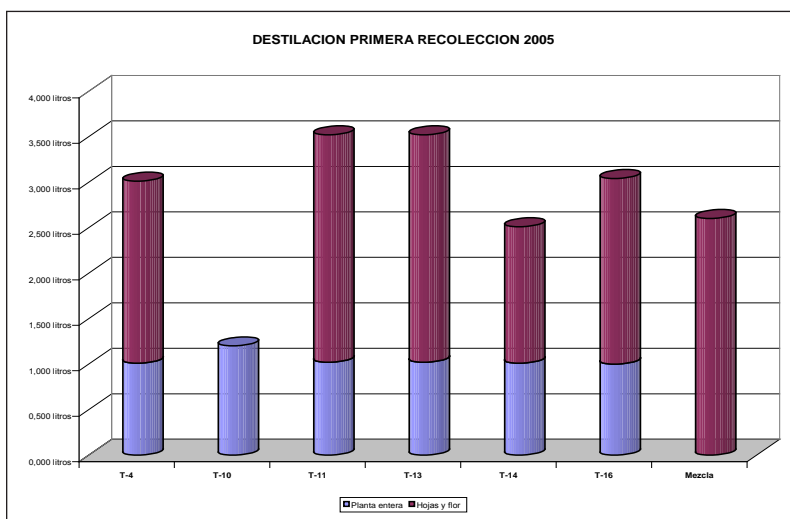
Si se observa selectivamente el desarrollo de los tallos (Fig. 14), se aprecia generalizadamente, un menor peso en la primera recolección, en comparación con la segunda. El orden relativo de cada tratamiento al contemplar las dos partes es análogo al general,



**Figura 15.** Comparativa de las masas de hojas y flores para la 1ª y segunda recolección (*Lippia uruguayana*, Ejea, año 2005)

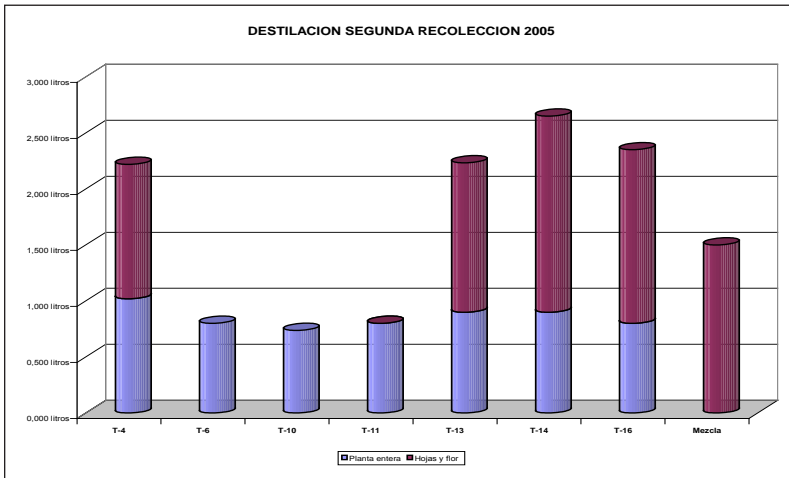
Si tenemos en cuenta el grupo de hojas y flor (Fig. 15), los resultados son idénticos. Únicamente es de destacar el caso del tratamiento 11 donde el peso relativo del primer corte es bastante mayor que en su parte tallo.

En los gráficos de barras de las Figuras 16 a la 19 se representan los resultados estadísticos de la destilación de cada uno de los tratamientos (ejemplares de plantas cultivadas) en el año 2005.



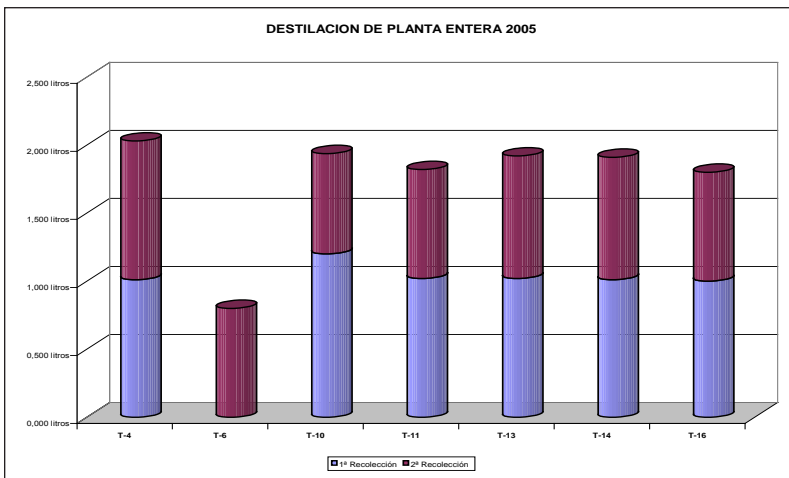
**Figura 16.** Rendimiento en aceite esencial para la planta entera (azul) y para hoja y flor (rojo). Cultivo en Ejea, primera recolección, año 2005.

Se realizó, para el segundo año, una destilación, diferenciando entre planta entera y hojas y flor (la mayor parte hojas), en los tratamientos que fue posible (Fig. 16). Se observa el mayor rendimiento (superior en dos veces) de la parte diferenciada tomando, únicamente las hojas y la flor, como es natural. El mayor potencial se ve en la mezcla de los tratamientos donde no ha sido posible obtener los resultados por separado, muy parecido a los observados en los tratamientos 11 y 13, en cuanto a los tratamientos 4 y 16 tienen un rendimiento en torno a los 2 litros y destacando por su menor rendimiento están los tratamientos 14 (en torno a 1,5 litros) y el 10 (del que no se obtuvieron datos). En cuanto a los rendimientos de la planta entera, son todos más o menos análogos, destacando este último tratamiento mencionado (10) que obtiene en torno a un 20% más que sus competidores.



**Figura 17.** Rendimiento en aceite esencial para la planta entera (azul) y para hoja y flor (rojo). Cultivo en Ejea, segunda recolección, año 2005.

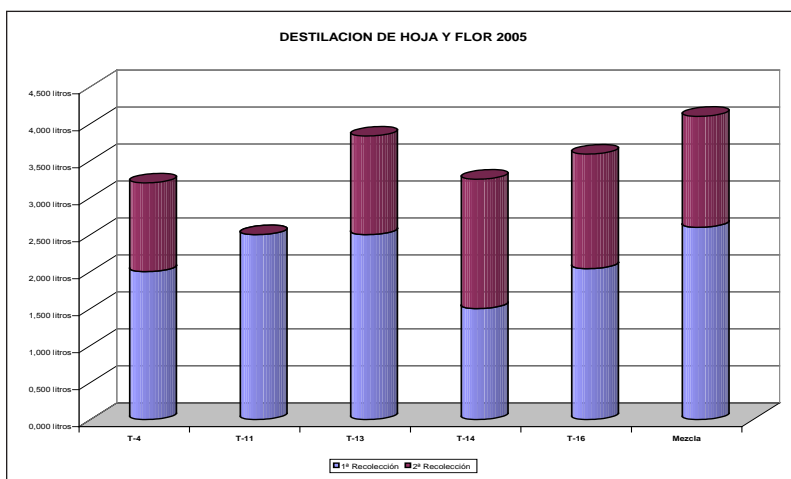
En los datos de la segunda recolección (Fig. 17), el tratamiento 6 tiene para la planta entera un porcentaje muy parecido a todo el grupo (destacando únicamente el cuarto con un mayor rendimiento), pero siendo mucho menos su rendimiento en la parte de hojas y flor, en cuyo caso destacan los tratamientos 14 y 16, por encima de la mezcla (1,500 litros).



**Figura 18.** Rendimiento en aceite esencial (planta entera) de los distintos ejemplares de *Lippia* uruguayana cultivados en Ejea para la primera y segunda recolección, año 2005.



Si comparamos la destilación, diferenciando esta vez por las recolecciones realizadas (únicamente puede hacerse en el 2005) de la planta entera (Fig. 18), los rendimientos descienden en casi todos los casos (caso excepcional es el cuarto en donde asciende mismamente) en la segunda recolección. Esto es un hecho normal debido a las fechas escogidas para los cortes. Es interesante también, hacer notar que el décimo tratamiento, que en la primera recolección obtiene el mayor rendimiento, se comporta de forma totalmente diferente en la segunda recolección, siendo el tratamiento con menor rendimiento. El tratamiento 6 que no obtenía producción suficiente en la primera recolección para ser estudiado de forma autónoma, si que lo obtiene en la segunda obteniéndose un rendimiento (0,800 litros) que aun por debajo de la media (0,851 litros) no representa una diferencia importante.



**Figura 19.** Rendimiento en aceite esencial (hoja y flor) de los distintos ejemplares de *Lippia uruguaya* cultivados en Ejea para la primera y segunda recolección, año 2005.

Si realizamos el mismo estudio para la parte de hoja y flor únicamente (Fig. 19), el tratamiento 10 no puede ser analizado independientemente, pero en cambio, disponemos de los datos de la mezcla de tratamientos. El tratamiento número 14, que da el menor rendimiento en el primer corte, consigue el mayor en el segundo corte, pero sin llegar a compensar totalmente. En conjunto, son similares los rendimientos obtenidos para cada tratamiento en ambos cortes. En suma, la mezcla de tratamientos restantes supera a los tratamientos 4, 11, 13, 14 y 16, aunque el tratamiento número 11 no puede ser comparado, ya que en el segundo corte no se dispone de datos.

## 3.2 Composición de los aceites esenciales destilados

### 3.2.1 Año 2004

En la Tabla 10, se incluye la lista de muestras de aceites esenciales destilados a partir de las muestras recolectadas en el año 2004. Los resultados analíticos de dichas muestras se reflejan en la Tabla 11.

**Tabla 10.** Descripción de las muestras de aceites esenciales obtenidas por destilación del material recolectado en 2004.

Muestra	Origen	Planta individual / mezcla de plantas	Lugar de cultivo
1	Uruguay	Mezcla de 9 plantas	Ejea
2	Uruguay	Mezcla de todas las plantas	Ejea
3	Costa Rica	Mezcla de 25 plantas	Ejea
4	Uruguay	Individual	Ejea
5	Uruguay	Individual	Ejea
6	Uruguay	Individual	Ejea
7	Uruguay	Individual	Ejea
8	Uruguay	Mezcla de 4 plantas	Teruel
9	Uruguay	Mezcla de 3 plantas	CITA
10	Costa Rica	Individual	Ejea
11	Costa Rica	Individual	Ejea
12	Costa Rica	Mezcla de 3 plantas	Ejea

**Tabla 11.** Resultados de los análisis de los aceites esenciales destilados de muestras recolectadas en 2004 a partir de plantas de *Lippia alba* procedentes de Uruguay y Costa Rica, cultivadas en Aragón.

Compuestos identificados	Porcentaje de cada compuesto identificado											
	Muestras de Uruguay						Muestras de Costa Rica					
	1	2	4	5	6	7	8	9	3	10	11	12
<b>1. Hidrocarburos monoterpénicos</b>												
canfeno									0,1			
limoneno	0,4	0,9		1,0	0,2	0,7	0,2	0,4	26,0	11,3	14,7	18,1
mirceneno	0,3	0,3	0,2	0,4	0,2	0,3	0,3	0,3	t	0,2	0,2	0,3
sabineno	0,7	0,5	0,8	0,5	1,0	0,4	1,0	0,8	0,1			
<i>trans</i> - $\beta$ -ocimeno	0,5	0,6	0,4	0,6	0,6	0,5	0,3	0,4		0,2	0,1	0,2
$\alpha$ -pineno									0,1			
<b>2. Monoterpenos oxigenados</b>												
1,8-cineol	2,9	3,4	3,8	1,2	4,0	3,3	4,4	4,5	0,2	0,4	0,2	
alcanfor									0,1			
borneol									0,3	0,3	0,1	0,2

continúa

**Tabla 11** (conclusión)

Compuestos identificados	Porcentaje de cada compuesto identificado												
	Muestras de Uruguay								Muestras de Costa Rica				
	1	2	4	5	6	7	8	9	3	10	11	12	
<b>2. Monoterpenos oxigenados</b>													
<i>cis</i> -dihidrocarvona				0,3									
<i>cis</i> -linalol-óxido	0,2	0,1	0,2	T	0,3	0,2	0,2	0,3					
<i>cis</i> -verbenol											0,2		
<b><i>d</i>-carvona</b>			0,8				1,8	0,9	<b>63,0</b>	<b>68,9</b>	<b>75,0</b>	<b>73,7</b>	
geranial	t												
hotrienol	0,6		0,4	0,5	0,4	0,5	0,1	0,4		0,1			
<i>l</i> -carvona	0,1												
<b>linalol</b>	<b>79,3</b>	<b>76,7</b>	<b>79,9</b>	<b>81,3</b>	<b>78,7</b>	<b>80,3</b>	<b>73,2</b>	<b>73,8</b>	3,4	10,8	3,2	1,1	
neral								0,2					
piperitenona										0,7	0,6	0,6	0,7
piperitona			t							0,4	0,4	0,3	
pulegona										0,2			
terpinen-4-ol		0,1								0,2			
<i>trans</i> -carveol									0,4	0,3	0,3	0,3	0,3
<i>trans</i> -dihidrocarvona	0,1	0,3		0,2		0,1				0,1			
<i>trans</i> -linalol-óxido	0,2	0,1	t	0,2	0,1	t	0,7	0,8					
$\alpha$ -terpineol	0,4	0,2	0,4	0,2	0,4	0,3	0,4	0,4					
<b>3. Hidrocarburos sesquiterpénicos</b>													
calareno												0,5	
germacreno B	0,7	1,2	0,5	0,7	0,8	0,6	1,5	1,1	0,1	0,2			
germacreno D	1,3	1,5	1,0	1,0	0,9	0,9	1,4	1,2	0,2	0,9	0,2	0,1	
$\beta$ -bisaboleno													0,2
$\beta$ -burboneno			t							0,4	0,3	0,2	0,2
$\beta$ -cariofileno	1,2	1,8	0,9	1,3	0,8	1,1	1,1	1,0	0,2	0,3	0,1	0,3	
$\beta$ -cubebeno										0,1		0,1	0,4
$\beta$ -elemeno	0,7	1,1	0,5	0,7	0,5	0,6	0,8	0,8	0,3	0,4	0,3	0,4	
$\beta$ -farneseno	t	0,2	0,1	0,1	0,2	t		0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	
$\alpha$ -amorfenol	t												
$\alpha$ -copaeno	0,1	0,2	0,1	0,1		0,1	0,1	0,1					
$\alpha$ -cubebeno	0,1			0,1									
$\alpha$ -humuleno	0,2	0,5	0,3	0,3	0,1	0,3	0,3	0,3	t				
$\alpha$ -muroleno	t												
$\gamma$ -elemene	0,2	t	0,1	0,2	0,1	0,2	0,3	0,2					
$\delta$ -cadineno	0,1	0,1	0,1	0,1	0,4	0,1	0,9	0,7	0,5	0,3	t	0,6	
<b>4. Sesquiterpenos oxigenados</b>													
( <i>E</i> )-nerolidol	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,3		0,1			
óxido de $\beta$ -cariofileno	0,9	0,4	0,6	0,9	0,7	0,7	0,4	1,1	0,1	0,2	0,1	0,1	
<b>5. Otros</b>													
1-octen-3-ol	0,5	0,4	0,4	0,4	0,3	0,4	0,1	0,4	0,1	0,2	0,1	0,1	
eugenol										t			
fitol											0,1		

 t: trazas ( $\leq 0,05\%$ )

### 3.2.2 Año 2005

En la Tabla 12, se incluye la lista de muestras de aceites esenciales destilados a partir de las muestras recolectadas en el año 2005, todas ellas pertenecientes al quimiotipo procedente de Uruguay. Los resultados analíticos de dichas muestras se reflejan en la Tabla 13 y en la Figura 20 se muestran cromatogramas típicos de dichos aceites esenciales.

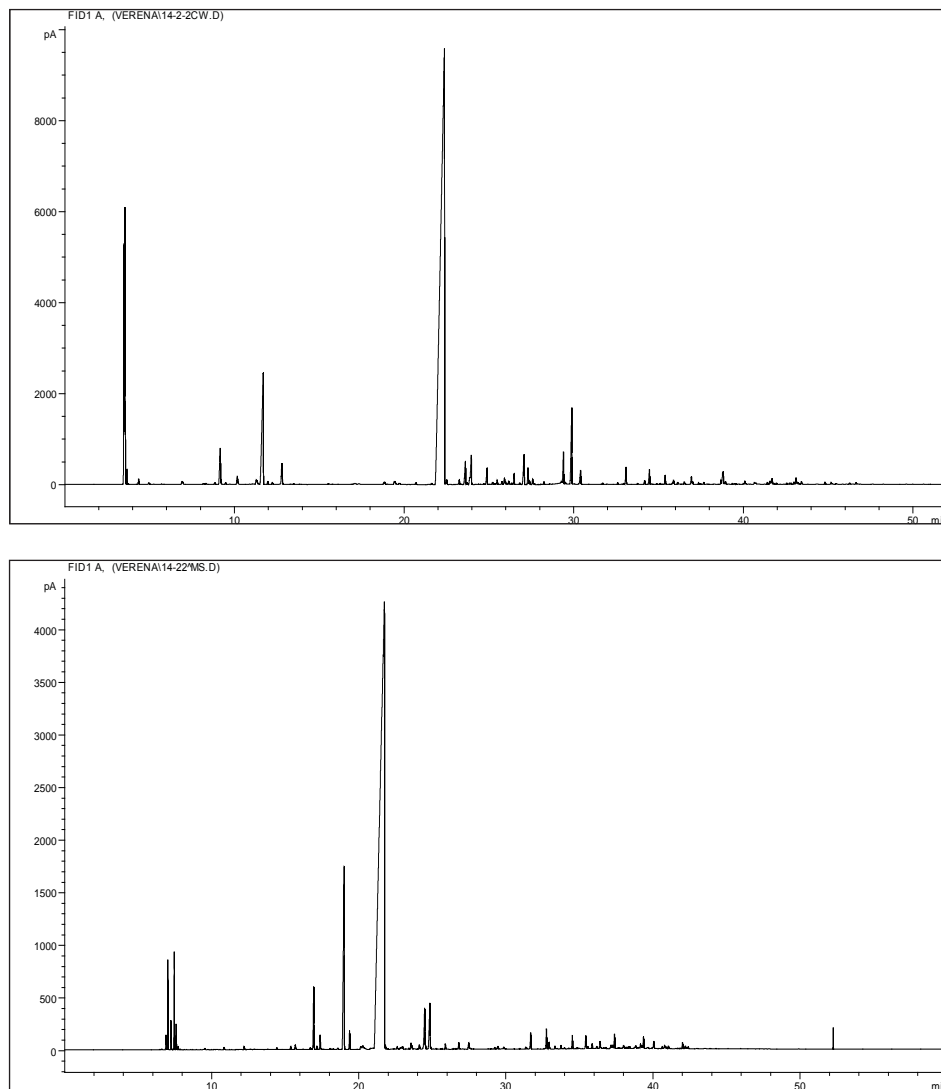
**Tabla 12.** Descripción de las muestras de aceites esenciales obtenidas por destilación del material recolectado en 2005. Se indica el número de individuo, la recolección y la parte de la planta destilada. Todas las plantas tenían su origen en Uruguay y fueron cultivadas en Ejea de los Caballeros (Zaragoza).

Muestra	Planta	Recolección	Parte de la planta destilada
4-1-1	4	1	Planta entera
4-1-2	4	1	Hojas y flores
4-2-1	4	2	Planta entera
4-2-2	4	2	Hojas y flores
6-2-1	6	2	Planta entera
10-1-1	10	1	Planta entera
10-2-1	10	2	Planta entera
11-1-1	11	1	Planta entera
11-1-2	11	1	Hojas y flores
11-2-1	11	2	Planta entera
13-1-1	13	1	Planta entera
13-1-2	13	1	Hojas y flores
13-2-1	13	2	Planta entera
13-2-2	13	2	Hojas y flores
14-1-1	14	1	Planta entera
14-1-2	14	1	Hojas y flores
14-2-1	14	2	Planta entera
14-2-2	14	2	Hojas y flores
16-1-1	16	1	Planta entera
16-1-2	16	1	Hojas y flores
16-2-1	16	2	Planta entera
16-2-2	16	2	Hojas y flores
20-1-2	Mezcla de 5 plantas	1	Hojas y flores
20-2-2	Mezcla de 5 plantas	2	Hojas y flores

**Tabla 13.** Resultados de los análisis de los aceites esenciales destilados de muestras recolectadas en 2005 a partir de plantas de *Lippia alba* procedentes de Uruguay, cultivadas en Aragón.

Componentes mayoritarios identificados (%) <sup>1</sup>	Muestras																							
	4-1-1	4-1-2	4-2-1	4-2-2	6-2-1	10-1-1	10-2-1	11-1-1	11-1-2	11-2-1	13-1-1	13-1-2	13-2-1	13-2-2	14-1-1	14-1-2	14-2-1	14-2-2	16-1-1	16-1-2	16-2-1	16-2-2	20-1-2	20-2-2
sabineno	1.4	1.2	1.7	1.6	1.6	1.2	1.3	1.1	1.4	1.4	1.3	1.3	1.6	1.6	1.4	1.4	1.6	1.6	1.4	1.4	1.3	1.6	1.1	0.4
trans-β-ocimeno	0.7	0.6	0.9	0.9	1.0	0.7	0.8	0.6	0.6	0.9	0.5	0.6	1.0	0.9	0.6	0.7	1.0	0.6	0.7	0.6	0.9	1.0	0.7	0.7
1,8-cineol	6.8	6.3	7.3	7.3	6.9	6.0	5.9	5.8	6.1	7.2	6.4	6.1	7.3	7.1	6.9	6.9	7.2	7.5	6.4	6.6	7.2	7.5	5.1	2.9
<b>linalol</b>	<b>76.3</b>	<b>77.9</b>	<b>74.2</b>	<b>74.6</b>	<b>73.9</b>	<b>77.5</b>	<b>70.6</b>	<b>72.3</b>	<b>74.3</b>	<b>74.6</b>	<b>79.9</b>	<b>76.4</b>	<b>74.7</b>	<b>73.5</b>	<b>76.1</b>	<b>73.1</b>	<b>73.0</b>	<b>75.6</b>	<b>77.1</b>	<b>76.9</b>	<b>73.3</b>	<b>74.2</b>	<b>77.1</b>	<b>79.2</b>
limoneno	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.8	0.3	0.4	0.4	0.3	0.3	0.3	0.4	0.4	0.3	0.4	0.3	0.3	0.4	0.3	0.2	0.4	0.7	2.1
β-cariofileno	0.7	0.4	0.7	0.5	1.3	1.1	1.8	0.9	0.6	1.1	0.3	0.9	1.0	1.1	0.9	0.6	1.2	0.9	0.8	0.7	1.1	0.9	1.1	1.8
germacreno D	0.8	0.4	0.7	0.6	1.5	0.9	1.9	1.2	0.6	1.4	0.6	0.9	1.0	1.2	1.0	0.6	1.4	0.8	0.9	1.0	1.4	1.2	1.3	0.9
germacreno B	0.4	0.5	0.7	0.7	0.8	0.8	0.6	0.9	0.8	0.8	0.3	0.4	0.4	0.7	0.7	0.3	0.6	0.6	0.4	0.1	0.7	0.7	0.5	0.6
β-elemeno	0.5	0.3	0.2	0.4	0.8	0.6	1.2	0.7	0.5	0.6	0.4	0.5	0.7	0.7	0.3	0.4	0.7	0.4	0.6	0.7	0.7	0.5	0.7	0.8
óxido de β-cariofileno	0.7	1.1	0.7	0.5	0.4	0.8	0.6	1.1	1.5	0.4	0.8	1.4	0.3	0.4	1.9	0.9	0.4	0.5	0.7	0.9	0.3	0.3	0.7	0.6
<b>Total identificado</b>	<b>93.5</b>	<b>95.2</b>	<b>92.2</b>	<b>91.7</b>	<b>92.9</b>	<b>93.8</b>	<b>90.2</b>	<b>90.6</b>	<b>91.6</b>	<b>92.7</b>	<b>95.5</b>	<b>92.6</b>	<b>92.7</b>	<b>92.3</b>	<b>94.3</b>	<b>94.8</b>	<b>92.1</b>	<b>93.2</b>	<b>94.4</b>	<b>93.0</b>	<b>91.3</b>	<b>92.2</b>	<b>93.9</b>	<b>93.7</b>

<sup>1</sup> Se indican solamente los componentes que han dado porcentajes superiores a 0,5% en alguna de las muestras.



**Figura 20.** Cromatogramas (CG) típicos obtenidos en columnas de Supelcowax (arriba) y metilsilicona (abajo) para los aceites esenciales destilados a partir de muestras de *Lippia alba* recolectadas en 2005, procedentes de plantas cultivadas en Aragón, pertenecientes al quimiotipo originario de Uruguay.

## 4 Extracción con dióxido de carbono supercrítico

### 4.1 Técnica experimental

Dentro del contexto de la obtención de productos de origen natural, el desarrollo de nuevas técnicas de separación como es la de extracción con fluidos supercríticos puede representar para las industrias, la posibilidad de lograr productos de una mejor calidad. En el caso de los aceites de plantas, frente a otras técnicas tradicionales de separación, la extracción con dióxido de carbono supercrítico puede evitar los problemas de la presencia de residuos de disolventes orgánicos o la degradación de compuestos lábiles por efecto de temperaturas altas.

La composición y calidad del extracto supercrítico está fundamentalmente relacionada con las presiones y temperaturas de operación. La elección de las condiciones se hace de acuerdo con las solubilidades de los componentes de las sustancias solubles de la planta, aunque otros factores como la disposición del lecho en el extractor, el flujo del fluido o el número de separadores del dispositivo tienen, asimismo, una importante relevancia.<sup>11</sup>

### 4.2 Equipo utilizado y proceso de extracción

El equipo utilizado para la extracción supercrítica ha consistido en una planta piloto de construcción propia con un extractor de 1 L de capacidad cuyo esquema aparece en la Figura 21 y reproducido en la Foto 4. En esencia, consta de una fuente de CO<sub>2</sub>, un compresor con dispositivo de ajuste de presión, el extractor y dos colectores. A lo largo de la línea se disponen cambiadores de calor, dispositivos para control y medida de las temperaturas y de las presiones y un medidor de flujo. El procedimiento experimental es similar al descrito por Reverchon.<sup>12</sup>

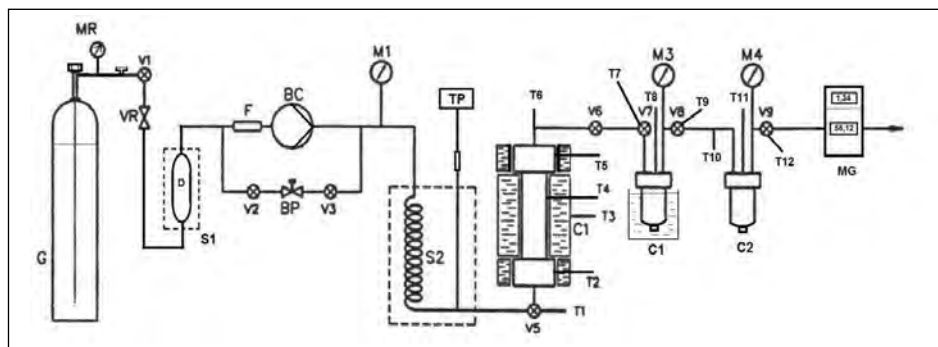


Figura 21. Esquema de la planta de extracción supercrítica.



**Foto 4.** Vista parcial de la planta de extracción supercrítica.

De las plantas secas de *Lippia alba* se separan flores y hojas que se congelan con nitrógeno líquido para triturarlas con un molino comercial. Este material molido se tamiza en un dispositivo vibratorio con bandejas de varios tamaños de malla. Del material disponible se separaron fracciones con tamaños medios de partícula de 0,125 mm y 0,400 mm al objeto de observar el efecto del tamaño de partícula en el proceso de extracción.

En el caso del material de Costa Rica, dada su poca disponibilidad, el tratamiento previo se limitó a un troceado en fragmentos de algunos milímetros y a efectos comparativos también se hizo una extracción con planta uruguaya escasamente troceada. En el resto de las extracciones se utilizó el material molido finamente a los tamaños de partícula anteriormente indicados.

Fracciones de unos 90-100 gr. de este material triturado se llevaron al extractor y una vez que la vasija de extracción y los separadores alcanzan la temperatura de régimen, la bomba comprime el CO<sub>2</sub> hasta que en el extractor alcanza las condiciones deseadas. Mediante el manejo adecuado de las válvulas de la línea de los separadores se consiguen las presiones programadas para éstos (80 bar en el primero y 20 en el segundo). El proceso se interrumpe momentáneamente de forma periódica para sacar muestras del segundo separador.

El análisis del aceite obtenido ha sido realizado mediante GC y mediante GC-ME. Se utilizó un cromatógrafo de gases Thermoquest y un cromatógrafo de gases Fisons GC 8030, acoplado a un detector de masas Fisons MD 800. La columna cromatográfica fue de metilpolisiloxano (Quadrex Corporation, New



Haven, CT, (20 m × 0.25 mm × 0.25 μm). Las condiciones de operación fueron como sigue. Programa de temperatura, 70-240°C a 4°C/min. Inyector split, relación de split 1:15. El registro de masas se practicó a 70 eV, *m/z* entre 39 y 350 u.m.a.

### 4.3 Experiencias de extracción supercrítica realizadas

#### 4.3.1 Planteamiento de los experimentos

De acuerdo con las disponibilidades de material, la evolución de los cultivos experimentales y sobre la base de experiencias anteriores, se realizaron los siguientes experimentos que permitieron establecer las diferencias entre los dos quimiotipos de la especie que fueron objeto de experimentación, las características del proceso extractivo y la influencia del tamaño de partícula:

##### – *Quimiotipo Costa Rica*

Ref. Experimento	Año	Cosecha	Diámetro partícula
CR1	2004	1	material troceado

##### – *Quimiotipo Uruguay*

Ref. Experimento	Año	Cosecha	Diámetro partícula
U1	2004	1	material troceado
U2	2004	1	0,400 mm
U3 (interrumpido)	2004	1	0,125 mm
U4	2005	1	0,400 mm
U5	2005	1	0,125 mm
U6	2005	2	0,400 mm
U7	2005	2	0,125 mm

Condiciones de extracción:

- Presión en el extractor: 90 bar,
- Temperatura en el extractor: 40°C,
- Flujo de CO<sub>2</sub> (red. a 1 bar, 25°C): 10,5 L/min.

El experimento U3 fue interrumpido por recogerse cantidades insignificantes de extracto en las etapas iniciales.

#### 4.3.2 Resultados de la extracción dinámica

En la Figura 22 se representan los rendimientos del proceso de extracción del material de Costa Rica y de Uruguay, cuando el material se fragmenta escasamente.

El gráfico a en dicha figura representa los datos acumulativos de extracción supercrítica para la planta costarricense, realizada a 90 bar, y 40°C (densidad del CO<sub>2</sub>: 0.4855 g/ml) con un flujo 10.5 l/min, material troceado, masa muestra (material troceado) de 107 g; temperatura del primer colector: 8°C, y del segundo colector: -1°C. Masa de la muestra: 106,9 gr. Altura del lecho: 37 cm.

El gráfico b en dicha figura representa los datos acumulativos de extracción supercrítica, para la planta uruguaya, realizada en las mismas condiciones de presión temperatura y flujo. Masa de la muestra: 122,1 gr. Altura del lecho: 43 cm.

El rendimiento másico porcentual acumulado del proceso,  $R_p$ , representado en las gráficas de la Figura 21 es la masa de extracto total obtenida para el tiempo considerado referido a la cantidad de planta seca introducida en el lecho del extractor, y se calcula de acuerdo a la expresión

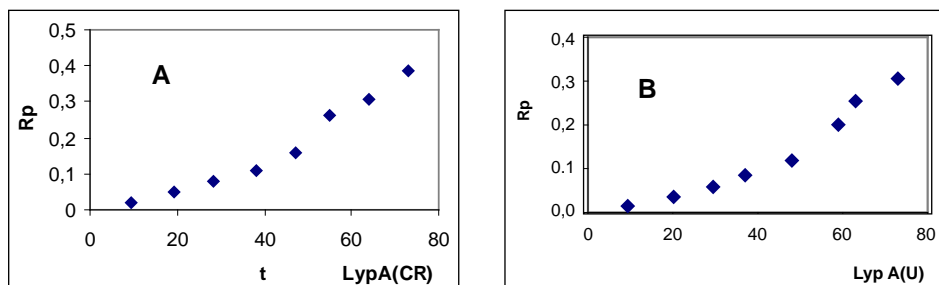
$$R_p = \frac{\text{masa extracto}}{\text{masa planta}} \times 100 \quad (1)$$

Es de señalar que debido a la escasa división del material, el aspecto de la curva de extracción es diferente del que presentan las curvas cuando el material que se utiliza está finamente dividido.

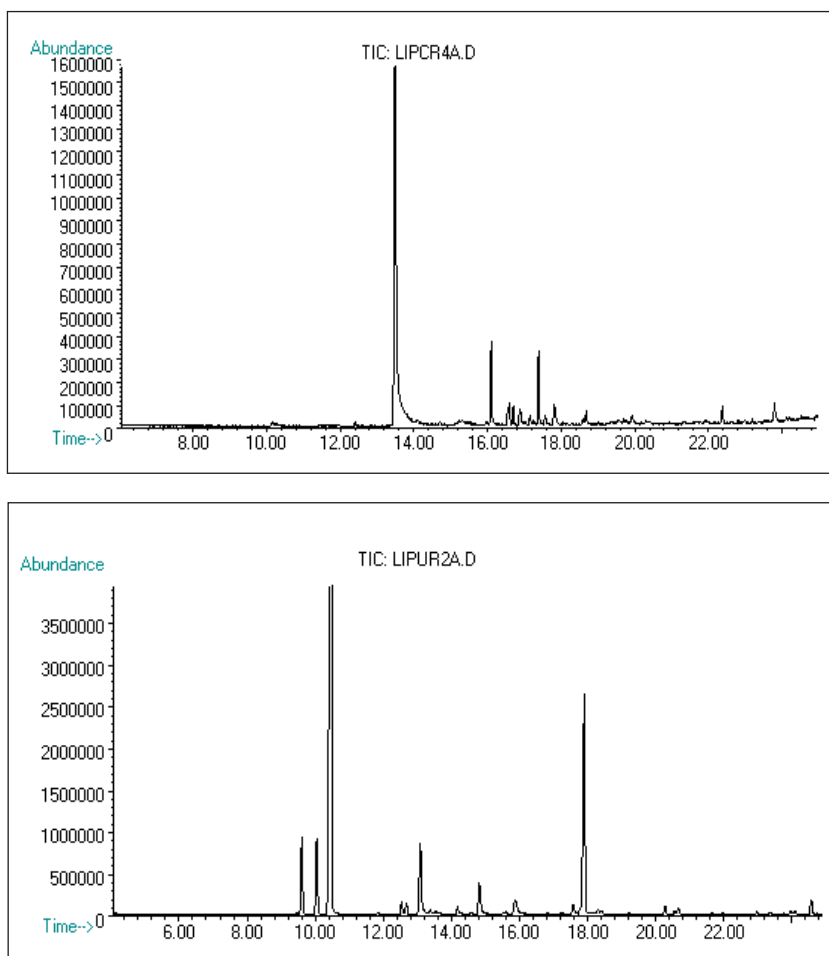
En las gráficas de la Figura 23 se pueden observar los cromatogramas de gases correspondientes al material de Costa Rica (gráfica A) y Uruguay (grafica B) que ilustran la diferente composición de los quimiotipos.

La composición de las muestras separadas en las primeras etapas de estas extracciones se consigna en las Tablas 14 y 15.

En la figura 24 se representan de manera conjunta los rendimientos correspondientes al material de Uruguay para los dos tamaños de partícula considerado más arriba y para cada una de las recolecciones efectuadas.



**Figura 22.** Rendimientos iniciales de la extracción supercrítica de la *Lippia Alba* de Costa Rica (material troceado) (A) y de Uruguay (B) en función del tiempo.



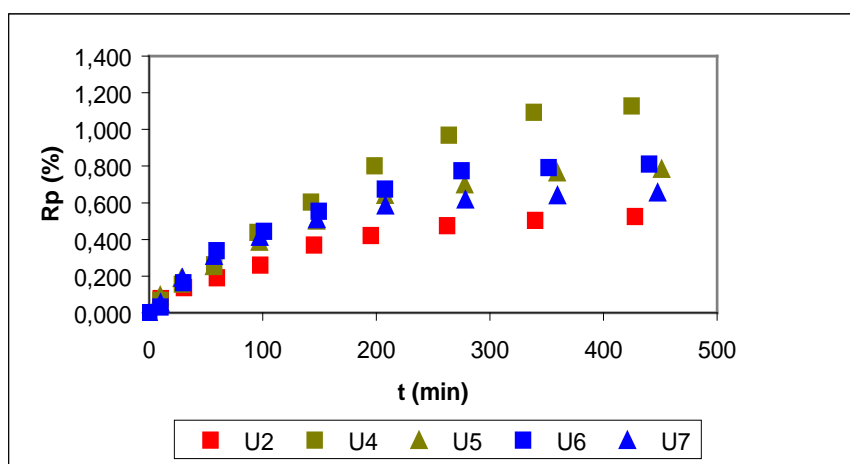
**Figura 23.** Cromatogramas de gases de los extractos supercríticos de *Lippia alba* costarricense y uruguayana en las primeras etapas de extracción.

**Tabla 14.** Composición de los extractos iniciales de *Lippia* costarricense

	Área %			
	Fracción 2	Fracción 4	Fracción 6	Fracción 8
limoneno	2,96	3,49	4,76	4,53
carvona	95,8	93,8	94,1	94,5
$\beta$ -bourboneno	0,64	0,63	0,60	0,54
Germacreno D	<1	0,58	0,49	0,41
ciclofarnesilcetona	<1	<1	<1	<1
ácido hexadecanoico	<1	<1	<1	<1

**Tabla 15.** Composición de los extractos iniciales de *Lippia uruguayana*

	Area%			
	Fracción 2	Fracción 4	Fracción 6	Fracción 8
óxido de linalilo cis (furano)	1,12	<1	0,15	<1
óxido de linalilo trans (furano)	1,18	<1	<1	<1
linalol	88,73	93,05	93,11	75,86
hotrienol	1,48	1,02	0,46	1,97
derivado del linalol (*)	4,46	2,76	1,47	5,01
C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	3,03	2,22	<1	3,89
óxido de cariofileno	<1	<1	<1	4,75
óxidos de linalilo cis y trans (piranoides)	<1	<1	<1	<1

**Figura 24.** Rendimientos de la SCE para las distintas experiencias de extracción.

### 4.3.3 El modelado de los procesos de extracción supercrítica

Los modelos del proceso de extracción supercrítica permiten correlacionar y predecir resultados cuando las condiciones de trabajo se hayan modificado, lo que supone una reducción del trabajo experimental. La importancia de desarrollar un buen modelo radica en la utilidad de los mismos para efectuar el paso del laboratorio a la industria.

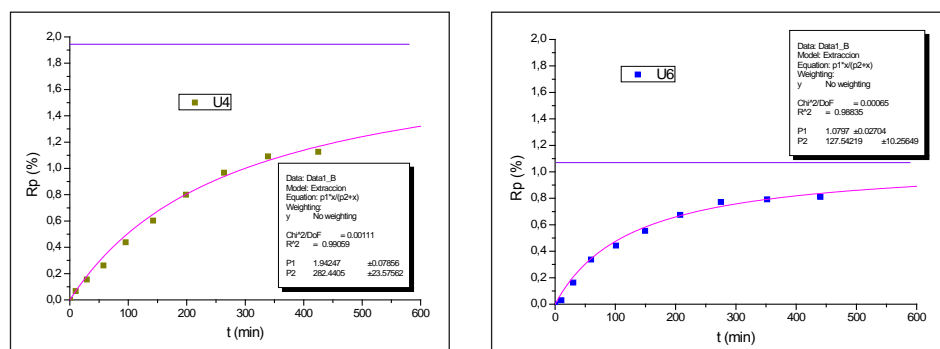
Los modelos más utilizados para la SFE de los aceites esenciales de plantas son o bien de tipo empírico, o semiempíricos basados en la transferencia de calor o en otros procesos dinámicos, o bien los obtenidos de la integración de ecuaciones diferenciales de balance de materia.

En este trabajo se ha utilizado, en primer lugar, el modelos propuesto por Naik et al. (1989)<sup>13</sup> para representar sus resultados experimentales de extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico de varias especies vegetales, entre ellas clavo, cardamomo y sándalo. La ecuación de ajuste utilizada fue una ecuación similar a la de Langmuir:

$$Rp = \frac{Rp_{\infty} \cdot t}{B + t} \quad (2)$$

donde t representa el tiempo de extracción, Rp es el rendimiento de la extracción y Rp<sub>∞</sub> y B son parámetros de ajuste, el primero de los cuales representa el rendimiento después de un tiempo de extracción suficiente para extraer prácticamente todo el aceite esencial contenido.

En la Figura 25 se representa, junto a los resultados experimentales del rendimiento, el ajuste según la ecuación 3 y la asíntota correspondiente al valor límite del rendimiento de la operación, Rp (%) para las extracciones con mayor rendimiento en aceites volátiles.



**Figura 25.** Ajuste de los datos experimentales de los procesos de extracción U4 y U6 de la *Lippia Alba* mediante la ecuación de Naik.

El otro modelo utilizado en este trabajo es el modelo teórico de Sovová.<sup>14</sup> Las hipótesis de partida del modelo son:

- El flujo del fluido sobre el lecho se asimila al de flujo pistón,
- Las partículas contienen células rotas en la superficie y células intactas en el núcleo. La fracción de células rotas en las partículas es la llamado eficacia de la molienda,
- El soluto localizado en las células rotas es transferido directamente a la fase fluida, mientras que el soluto de las células intactas difunde primero a las células rotas y de allí a la fase fluida,

- d) La transferencia de masa de desde las células rotas al disolvente se caracteriza por un coeficiente de transferencia de masa en la fase fluida que es varios órdenes de magnitud mayor que el coeficiente de transferencia de masa en la fase sólida.

El proceso de extracción puede considerarse temporalmente dividido en dos periodos. El primero esta gobernado por el equilibrio de reparto (solubilidad) del soluto entre la fase sólida y la fluida y el segundo periodo está gobernado por el transporte de materia desde el interior de las partículas de sólido.

A partir de las ecuaciones diferenciales de partida correspondientes al balance de materia y de las “condiciones limite” asociadas a la disposición y proceso experimentales se obtiene la ecuación extracción genérica que da la cantidad de extracto como función del tiempo de extracción.

En el caso de la extracción de los aceites vegetales de plantas como la considerada en este trabajo, las relaciones que describen la curva de extracción son:

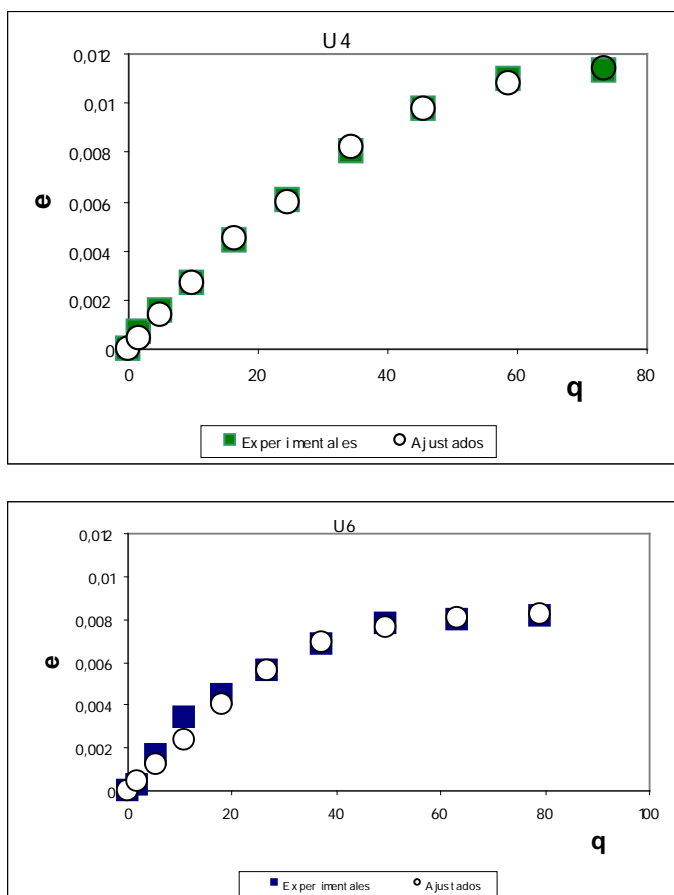
$$e = q \frac{Kx_u}{1 + K(\gamma/r)_0} \quad \text{para} \quad 0 \leq q \leq q_c \quad (3)$$

$$e = x_u [1 - C_1 \exp(-C_2 q)] \quad \text{para} \quad q > q_c \quad (4)$$

donde K representa el coeficiente de partición para el reparto del soluto libre en la superficie de las partículas entre la fase fluida y la sólida,  $e$  es el rendimiento de la extracción expresado como masa de extracto por unidad de masa de material insoluble y  $q$  la cantidad relativa de disolvente referido, asimismo, a la unidad de masa de material insoluble;  $q_c$  es el valor de  $q$  a partir del cual el proceso de extracción está gobernado por la difusión. Otros parámetros necesarios y característicos del lecho de extracción son  $\varepsilon$ ,  $\gamma$  y  $r$  que representan, respectivamente, la fracción vacía del lecho, la relación disolvente/matriz en el lecho y la eficacia de la molienda (relación de células vegetales rotas a total de células en las partículas) y  $C_1$  y  $C_2$  son dos parámetros característicos que están relacionados con la eficacia de molienda mediante la ecuación:

$$r = 1 - C_1 \exp(-C_2 q_c) \quad (5)$$

En la Figura 26 se comparan los resultados experimentales obtenidos (cuadros coloreados) con los ajustados (círculos) para las experiencias U4 y U6 realizadas con material con tamaño medio de partícula de tamaño 0,40 mm, experiencias que son las que proporcionan mayor rendimiento. El ajuste es, asimismo satisfactorio para le resto de las experiencias con el material molido.



**Figura 26.** Ajuste de los datos experimentales mediante el modelo de Sovová (extracciones U4 y U6).

## Conclusiones

La *Lippia alba* procedencia Uruguay se ha adaptado al cultivo en la parcela de Ejea de los Caballeros y hemos comprobado que no se adapta a las condiciones agroclimáticas de la parcela de Teruel. La heterogeneidad de las plantas tanto en brotación como en producción, nos indica que para establecer el cultivo, es necesario realizar un proceso de selección del material vegetal de la especie.

La *Lippia alba* procedencia Costa Rica se experimentó solamente en la parcela de Ejea de los Caballeros donde las temperaturas no son tan bajas con respecto a la zona de Teruel. Durante el primer año de cultivo (verano-2004), se adaptó a las

temperaturas de la zona, a partir del otoño se secó la parte aérea y en el año 2005 ya no llegó a brotar ninguna de las planta en cultivo, por lo tanto no es posible su domesticación en nuestras zonas de cultivo.

En los análisis de los aceites esenciales de las plantas cultivadas durante el primer año, se identificaron dos quimiotipos. Uno, caracterizado por la presencia de **linalol** como constituyente mayoritario (73.2-80.3%), correspondiente a las 8 muestras procedentes de Uruguay. Otros constituyentes importantes identificados en este quimiotipo fueron 1,8-cineol y germacreno D. El segundo quimiotipo, correspondiente a las muestras procedentes de Costa Rica, se caracteriza por el contenido en **d-carvona** (63.0-75.0%) como componente mayoritario, seguida por limoneno y linalol. Por tanto, los aceites esenciales de las plantas de *Lippia alba* puestas en cultivo experimental en España conservan el perfil químico correspondientes a los quimiotipos de sus lugares de origen, Uruguay y Costa Rica.

De los análisis químicos de los aceites esenciales de las plantas de *Lippia alba* del **quimiotipo linalol** recolectadas durante su **segundo año** de cultivo en España, se observa que existe homogeneidad de composición entre individuos y que esta no difiere sustancialmente entre recolecciones. El alto porcentaje de linalol en el aceite esencial (77-78%) se mantiene estable de un año para otro (media correspondiente al primer año: 77.9%, media correspondiente al segundo año: 77.5%).

La masa de aceite esencial extraído puede alcanzar hasta el 2% de la masa original del material vegetal seco adecuadamente seleccionado.

La composición de los aceites volátiles obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico de las plantas de Uruguay y Costa Rica es muy distinta, siendo el componente mayoritario en el primero de los casos linalol y en el segundo carvona. Los porcentajes obtenidos para estos componentes aparecen como muy mayoritarios en relación con el resto.

El tamaño de partícula afecta notablemente a la curva de extracción. La simple fragmentación proporciona unas curvas muy diferentes a las del material sometido la molienda, obteniéndose menos extracto en el periodo inicial consecuencia de la ausencia de aceite libre en los fragmentos

La molienda a tamaño de partícula fina, 0,15 mm, conduce a cantidades de extracto considerablemente menores que la que conduce a tamaño intermedio, 0,40 mm lo que puede atribuirse a mayores pérdidas de los volátiles en el proceso mas prolongado de molienda y, más probablemente, a la formación de canales preferenciales para el flujo del fluido en el lecho sólido que aíslan prácticamente a porciones considerables de material.

El modelo empírico propuestos por Nike et al. y el modelo teórico de Sovová resultan adecuados para correlacionar los datos experimentales obtenidos si bien las extrapolaciones a tiempo infinito conducen a resultados apreciablemente



distintos. El modelo empírico proporciona un valor más elevado de la cantidad total de extracto que el modelo teórico.

## Agradecimientos

La parte agronómica de este trabajo ha sido financiado por el Gobierno de Aragón a través del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón y se ha realizado en el marco del Programa CYTED, Proyecto IV. 20. La financiación de los materiales del equipo de extracción supercrítica se ha realizado a través de dos proyectos, uno del Ministerio de Educación y Ciencia (DIGICYT PB98-1624) y otro del gobierno de Aragón (DGA PO54/99-C). Se agradece la colaboración de J. Cosculluela y la ayuda técnica de J. Tapia. También se agradece la colaboración de Marko Lubura y Verena Mair, alumnos de la Universidad de Viena, en los análisis de aceites esenciales realizados en la Universidad de Barcelona.

## Referencias

1. Font Quer P. Plantas medicinales. El Dioscórides renovado. Editorial Labor, Barcelona, 1981.
2. Gupta M.P. (Ed.). 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. CYTED-Convenio Andrés Bello, Bogotá, 1995.
3. Lorenzo D., Paz D., Davies P., Vila R., Cañigueral S., Dellacassa E. Composition of a new essential oil type of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown from Uruguay. *Flavour Fragr. J.* 2001, 16, 356-359.
4. Fischer U., López R., Pöhl E., Vetter S., Novak J., Franz Ch. Two chemotypes within *Lippia alba* populations in Guatemala. *Flavour Fragr. J.* 2004, 19, 333-335.
5. Tavares E.S., Julião L.S., Lopes D., Bizzo H.R., Lage C.L.S., Leitão S.G. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) NE Br. (Verbenaceae). *Braz J. Pharmacogn.* 2005, 15, 1-5.
6. Burillo J., García-Vallejo MC. Investigación y Experimentación de Plantas Aromáticas y Medicinales en Aragón. Cultivo, Transformación y Análítica. Dpto. de Agricultura y Alimentación. Dirección General de Tecnología Agraria. Gobierno de Aragón, 2003.
7. Guillén M.D., Burillo J. Characterisation of the Essential Oils of some Cultivated Aromatic Plants of Industrial Interest. *J. Sci. Food Agric.* 1996, 70, 359-363.
8. Saavedra G., Velásquez E., León de Fernández O., Tymoschuk A., Murcia M.A., Shinella G., Rojano B., Codina C., Ríos J.L., Gutiérrez J., Burillo J., Fernández A., Rosas A. Nuevas Fuentes de Antioxidantes Naturales. A. Rosas Romero (Ed.). CYTED y Ministerio de Ciencia y Tecnología de Venezuela. Caracas, Venezuela, 2004.
9. Rota C., Carramiñana I.I., Burillo J., Herrera A. In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *J. Food Prot.* 2004, 67, 1252-1256.
10. Fernández Barrero A. (Ed.). Plantas iberoamericanas como fuente de terpenoides útiles en química fina. Programa CYTED, Granada, España, 2005.
11. Coelho J.A., Grosso C., Pereira A.P., Burillo J., Urieta J.S., Figueiredo A.C., Barroso J.G., Mendes R.L., Palavra A.M.F. Supercritical carbon dioxide extraction of volatiles from *Satureja fructicosa* Béginot. *Flavour Fragr. J.* 2007, 22, 438-442.

12. Reverchon E. Fractional separation of SCF extract from marjoram leaves. Mass transfer and optimization. *J. Supercrit. Fluids* 1992, 5, 256-261.
13. Naik S.N., Lentz H., Maheshwari R.C. Extraction of perfumes and flavours from plant material with liquid carbon dioxide under liquid-vapour equilibrium conditions. *Fluid Phase Equilib.* 1989, 49, 115-126.
14. Sovová H. Mathematical model for supercritical fluid extraction of natural products and extraction curve evaluation. *J. Supercrit. Fluids* 2005, 33, 35-52.