

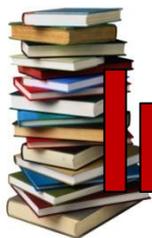
# ACEITES ESENCIALES

QUÍMICA, BIOQUÍMICA, PRODUCCIÓN Y USOS

JORGE ANTONIO PINO ALEA



**Subido por:**



# **Interfase IQ**

**Libros de Ingeniería Química y más**



<https://www.facebook.com/pages/Interfase-IQ/146073555478947?ref=bookmarks>

**Si te gusta este libro y tienes la posibilidad,  
cómpralo para apoyar al autor.**

# **ACEITES ESENCIALES**

**QUÍMICA, BIOQUÍMICA, PRODUCCIÓN Y USOS**

# **ACEITES ESENCIALES**

**QUÍMICA, BIOQUÍMICA, PRODUCCIÓN Y USOS**

**Jorge Antonio Pino Alea**

© Todos los derechos reservados Jorge Antonio Pino Alea, 2015.

Editorial Universitaria. Calle 23 No. 565 e/ F y G, Vedado, La Habana, Cuba.

E-mail: [eduniv@mes.edu.cu](mailto:eduniv@mes.edu.cu)

Teléfono: (+537) 837 4538

e ISBN (pdf) 978-959-16-2556-4

Foto de la cubierta: Carlos Chavez Márquez [facebook.com](https://www.facebook.com)

Diseño de interior: Dr.C. Raul G. Torricella Morales



## AGRADECIMIENTOS

**E**l autor desea agradecer a todos los autores referenciados en este texto por sus esfuerzos para conocer y aplicar los avances científicos y tecnológicos en el tema de los aceites esenciales.

También desea agradecer a los profesores que brindaron sus conocimientos para poder adentrarse en los secretos de este campo tan interesante y a los colegas y estudiantes que han contribuido, de una manera u otra, a la elaboración de este libro.

## DATOS DEL AUTOR

**J**orge Antonio Pino Alea, Químico y Dr. Cs., Investigador Titular del Departamento de Aromas del Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria, en La Habana, Cuba. Se graduó de Licenciado en Química en la Universidad de La Habana en 1975, recibió su grado de Doctor en Ciencias Técnicas en 1980 en el Centro Nacional de Investigaciones Científicas en La Habana y el grado de Doctor en Ciencias en 2011 en el Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de La Habana. En 1985, en el Centro Nacional de Investigaciones Científicas recibe el grado de Investigador Titular. Estudia los aceites esenciales y el aroma de los alimentos ha publicado más de 500 artículos científicos en revistas de impacto. Es editor y miembro de Consejo Editorial de varias revistas científicas internacionales. Es miembro de la Academia de Ciencias de Cuba, del Comité Doctoral del Programa de Doctorado en Ciencias de los Alimentos y del Comité Doctoral del Programa de Doctorado en Química. Ha recibido la Medalla Juan Tomás Roig (2001), el Premio Nacional de Química (2011), el Premio del Ministerio de Educación Superior a la Mejor Tesis de Doctorado en Ciencias en el 2012, es Premio Nacional de Ciencias 2012 otorgado por la Academia de Ciencias de Cuba y Orden Carlos J. Finlay otorgada por el Consejo de Estado de Cuba.

## SE RECOMIENDA LA OBRA

**C**ontribución al estudio de la composición volátil de la flora cubana. / Jorge Antonio Pino Alea. – Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria (Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias (Dr. Cs). – Ciudad de La Habana : Editorial Universitaria, 2011. -- ISBN 978-959-16-1365-3.-- 446 páginas, tablas, figuras. – Disponible en la plataforma académica e-Libro S.R.L. <http://www.e-libro.com>

# TABLA DE CONTENIDO

<b>PÁGINA LEGAL.....</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>11</b>
<b>1.- ACEITES ESENCIALES: CONCEPTOS, HISTORIA Y FUNCIÓN.....</b>	<b>12</b>
Introducción.....	12
Historia de los aceites esenciales.....	15
Función de los compuestos volátiles en las plantas.....	18
Búsqueda de información de aceites esenciales.....	20
Libros.....	20
Revistas.....	20
Referencias.....	21
<b>2.- CONSTITUYENTES QUÍMICOS DE LOS ACEITES ESENCIALES.....</b>	<b>26</b>
Introducción.....	26
Terpenoides.....	26
Monoterpenos.....	27
Sesquiterpenos.....	30
Diterpenos.....	30
Homoterpenos.....	33
No terpenoides.....	33
Fenilpropanoides / bencenoides.....	33
Derivados de ácidos grasos.....	34
Derivados de aminoácidos.....	36
Norterpenoides C13.....	36
Ftalidos.....	37
Compuestos nitrogenados.....	37
Compuestos azufrados.....	38
Isotiocianatos.....	38
Compuestos enlazados a glicósidos.....	38
Referencias.....	40
<b>3.- BIOGÉNESIS DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES.....</b>	<b>42</b>
Introducción.....	42
Terpenoides.....	42

Fenilpropanoides / bencenoides.....	47
Derivados de ácidos grasos.....	50
Derivados de aminoácidos.....	53
Derivados de glucosinolatos.....	54
Derivados de sulfóxidos de alqu(en)il cisteína.....	56
Referencias.....	57

#### **4.- FACTORES QUE AFECTAN LA COMPOSICIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES. 64**

Introducción.....	64
Variaciones fisiológicas.....	66
Desarrollo de los órganos.....	66
Ciclo de actividad del polinizador.....	67
Parte de la planta.....	69
Tipo de estructura secretoria.....	70
Daños mecánicos y químicos.....	70
Condiciones ambientales.....	72
Clima.....	72
Polución.....	73
Enfermedades y plagas.....	73
Factores edáficos.....	74
Variaciones geográficas.....	75
Factores genéticos y evolutivos.....	77
Almacenamiento.....	78
Condiciones políticas y sociales.....	79
Acceso al material vegetal y necesidad de labores manuales y espacio.....	79
Referencias.....	79

#### **5.- OBTENCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES.....89**

Introducción.....	89
Preparación del material vegetal.....	89
Métodos de obtención a escala industrial.....	90
Métodos de obtención a escala de laboratorio.....	99
Envasado y almacenamiento.....	105
Etiquetado y marcado.....	106
Referencias.....	108

<b>6.- PROCESAMIENTO DE LOS ACEITES ESENCIALES.....</b>	<b>113</b>
Introducción.....	113
Destilación.....	114
Destilación con alcohol.....	116
Extracción con disolvente.....	117
Extracción con fluidos supercríticos.....	118
Cromatografía de columna.....	120
Referencias.....	121
<b>7.- ANÁLISIS DE LOS ACEITES ESENCIALES.....</b>	<b>124</b>
Introducción.....	124
Muestreo.....	124
Preparación de la muestra de ensayo.....	125
Métodos de control de calidad.....	126
Métodos de evaluación sensorial.....	127
Cromatografía de gases.....	128
Análisis cualitativo.....	129
Análisis cuantitativo.....	137
Cromatografía de capa fina.....	141
Cromatografía de columna.....	142
Cromatografía líquida de alta eficiencia.....	144
Técnicas destilativas.....	146
Técnicas de separación química.....	146
Referencias.....	147
<b>8.- EFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS ACEITES ESENCIALES.....</b>	<b>157</b>
Introducción.....	157
Citotoxicidad.....	158
Fototoxicidad.....	162
Mutagenicidad nuclear.....	163
Mutagenicidad citoplasmática.....	166
Carcinogenicidad.....	166
Actividad antimutagénica.....	167
Actividad anticancerígena.....	168

Actividad antioxidante.....	169
Actividad digestiva.....	170
Actividad analgésica.....	171
Actividad anti-inflamatoria.....	172
Otras actividades.....	172
Seguridad toxicológica.....	174
Referencias.....	176
<b>9.- ADULTERACIÓN DE ACEITES ESENCIALES.....</b>	<b>203</b>
Introducción.....	203
Tipos de adulteraciones.....	204
Adición de un diluyente.....	204
Adición de aceites esenciales de menor costo y sus componentes.....	205
Cambio de un aceite esencial por otro.....	205
Detección de las adulteraciones.....	206
Referencias.....	208

## Indice de Figuras

Figura 2.1 Reordenamiento cabeza-cola de dos unidades de isopreno.....	27
Figura 2.2 Estructuras típicas de compuestos monoterpénicos presentes en aceites esenciales.....	29
Figura 2.3 Esqueletos de monoterpenos irregulares.....	30
Figura 2.4 Estructuras típicas de compuestos sesquiterpénicos presentes en aceites esenciales.....	31
Figura 2.5 Estructuras típicas de diterpenos.....	32
Figura 2.6 Estructuras típicas de dos homoterpenos.....	33
Figura 2.7 Estructuras típicas de fenilpropanoides / bencenoides presentes en aceites esenciales.....	35
Figura 2.8 Estructuras típicas de lactonas presentes en aceites esenciales.....	36
Figura 2.9 Ejemplos de norisoprenoides C13 presentes en aceites esenciales.....	37
Figura 3.1 Vía de mevalonato (MVA) para la biosíntesis de terpenos en el citoplasma ..	45
Figura 3.2 Vía del fosfato deoxilulosa para la biosíntesis de terpenos en el plastidio ..	46
Figura 3.3 Biosíntesis esquemática de los fenoles.....	49
Figura 3.4 Esquema general de la formación de compuestos volátiles por la vía de la lipoxigenasa.....	53
Figura 3.5 Biosíntesis de glucosinolatos y productos de hidrólisis.....	55
Figura 5.1 Diagrama de un hidrodestilador típico.....	94
Figura 5.2 Diagrama de un destilador típico de arrastre con vapor y agua.....	95
Figura 5.3 Diagrama de un destilador típico de arrastre con vapor.....	96
Figura 5.4 Aparato de hidrodestilación simple para aceites menos densos que el agua .....	101
Figura 5.5 Aparato de hidrodestilación simple para aceites más densos que el agua....	102
Figura 5.6 Equipo de destilación-extracción simultaneas según Likens y Nickerson (1964) .....	104

## INTRODUCCIÓN

La obra presente es la combinación de lo esencial de la química, bioquímica y tecnología de los aceites esenciales. Las referencias con relación a la producción y empleo de los aceites esenciales se remontan a épocas muy antiguas, pero no fue hasta el siglo XIX que se iniciaron las investigaciones para conocer su composición química. Con la introducción de la cromatografía de gases a principios de la década de 1960 y su posterior acoplamiento con la espectrometría de masas se aceleraron, de una manera trascendental, las investigaciones en esta área.

Aunque el destino y referencia de esta obra, en última instancia, es el de la agroindustria, el producto del presente esfuerzo está dirigido, en primera instancia, al público calificado de la academia, especialistas en el área, y a otros investigadores y estudiantes o aficionados al tema, de disciplinas afines o no, que puedan establecer conexiones con otros saberes, los cuales permitan quizás incluir nuevos campos de aplicación. Podrá ser usada, además, en los distintos niveles de docencia de los centros de enseñanza superior, así como texto de referencia para aquellos en la academia o la industria.

# 1.- ACEITES ESENCIALES: CONCEPTOS, HISTORIA Y FUNCIÓN

## Introducción

Los aceites esenciales son productos caracterizados por un fuerte olor, constituidos por mezclas complejas de compuestos volátiles y obtenidos a partir de algún material natural mediante destilación (seca, con agua o vapor) o por expresión mecánica (para las frutas cítricas) (Dewick, 2002). Estos productos están asociados al reino vegetal, pero algunos pocos de ellos se encuentran en fuentes animales, por ejemplo: almizcle, esperma de ballena y algalia, o son producidos por microorganismos (Bauer *et al.*, 2001). La Farmacopea Europea define al aceite esencial como: “Un producto oloroso, usualmente de composición compleja, obtenido de un material de una planta definida botánicamente, mediante destilación con vapor, destilación seca o por algún proceso mecánico sin calor” (Farmacopea Europea, 2008). El Consejo de Europa describe al aceite esencial como un producto obtenido a partir de materiales vegetales (Anónimo, 2000). Debido a la prohibición del uso de materiales provenientes de animales para la elaboración de fragancias, los aceites esenciales son, en la actualidad, producidos solamente a partir de materiales vegetales.

Los extractos de plantas aromáticas obtenidos mediante el uso de disolventes o gases fluidizados no son considerados como aceites esenciales (Reineccius, 1999; Anónimo, 2000). Los concretos, pomadas, absolutos y oleorresinas, que pueden considerarse como extractos aromáticos tampoco son aceites esenciales, de igual forma que los productos obtenidos por extracción con fluidos supercríticos tampoco lo son. Tampoco deben ser confundidos los aceites esenciales con los

aceites grasos, que están compuestos por mezclas de lípidos que no necesariamente son volátiles. Una prueba simple de diferenciación es precisamente esta diferencia de volatilidad, pues una gota de un aceite esencial sobre un papel de filtración se evaporará completamente, mientras que la gota del aceite graso permanecerá en el papel.

Los aceites esenciales son productos del metabolismo de las plantas y en su composición generalmente están presentes hidrocarburos mono- y sesquiterpénicos, así como derivados oxigenados biogenéticamente derivados de ellos. Otros constituyentes comunes son fenilpropanoides / bencenoides por la vía del ácido shikímico y sus productos de biotransformación, así como otros compuestos provenientes del metabolismo de los ácidos grasos y aminoácidos. También pueden estar presentes compuestos nitrogenados y azufrados.

Los aceites esenciales son la fuente de los olores de las flores, hojas, frutos, corteza y madera de muchas plantas aromáticas, generalmente localizadas en zonas templadas y cálidas como las áreas mediterráneas y tropicales. Ellos son más comunes en especies de las familias Apiaceae (Umbelliferae), Asteraceae (Compositae), Cupressaceae, Hypericaceae (Guttiferae), Lamiaceae (Labiatae), Lauraceae, Leguminosae (Fabaceae), Liliaceae, Malvaceae, Myrtaceae, Oleaceae, Pinaceae, Rosaceae, Rutaceae y Zingiberaceae (Mann *et al.*, 1994; Torssell, 1997; Bauer *et al.*, 2001; Evans, 2002; Dewick, 2002; Başer y Demirci, 2007; Figueiredo *et al.*, 2008).

La Tabla 1.1 resume las partes de la planta en donde están ubicados los aceites esenciales. En algunos casos, sus compuestos están enlazados con carbohidratos en forma de glicósidos (Torssell, 1997; Winterhalter y Skouroumounis, 1997; Bauer *et al.*, 2001; Dewick, 2002), que deben ser liberados por hidrólisis del enlace glicósido mediante una reacción enzimática que normalmente tiene lugar durante el marchitado del material vegetal antes de la destilación. Los mohos, algas, esponjas y hongos también pueden contener aceites esenciales (Mann *et al.*, 1994; Evans, 2002; Başer y Demirci, 2007).

**Tabla 1.1 Ubicación de los aceites esenciales en las plantas**

Organelo	Familia	Planta
Tubos esquizógenos	Umbelliferae	Anís, hinojo
Tubos oleíferos o vitas	Lauraceae	Canela
Canales lisígenos	Pinaceae	Pino
Canales esquizógenos	Rutaceae	Ruda
Células modificadas del parénquima	Piperaceae	Pimienta
Pelos glandulares	Labiatae	Menta, lavanda
Glándulas	Rutaceae	Cítricos

En la actualidad se conocen alrededor de 3000 aceites esenciales, 300 de los cuales son comercialmente importantes (Van de Braak y Leijten, 1999), de ellos 163 son recogidos por la ISO 4720 (2002). Los aceites esenciales son ampliamente usados en perfumería, cosmética, en la industria farmacéutica, agricultura, como aditivos en la industria alimentaria y remedios naturales, así como en aromaterapia (Buchbauer *et al.*, 1993; Brunke *et al.*, 1993; Bakkali *et al.*, 2008; Franz, 2010; Antunes y Cavaco, 2010; Shaaban *et al.*, 2012).

En las últimas décadas ha habido un renacer por el interés en la medicina natural, particularmente con el empleo de remedios herbales como complemento de la medicina moderna (Silva *et al.*, 2003; Hajhashemi *et al.*, 2003; Perry *et al.*, 2003). Ocurre igual con el uso de materiales naturales en las industrias de alimentos, bebidas, saborizantes, de productos agrícolas y perfumería. La búsqueda de sustancias activas se ha animado, particularmente en el uso de aceites esenciales y sus compuestos volátiles como agentes antimicrobianos y antioxidantes en alimentos y productos alimenticios. El hecho de que los aceites esenciales y sus constituyentes unan su capacidad aromatizante a: (a) ser naturales y biodegradables; (b) poseer generalmente poca toxicidad y (c) ser capaces de cumplir la función de sustancias obtenidas por vía sintética, han contribuido a lograr esto. Además, los aceites esenciales pueden ser usados para proteger cosechas y contra plagas, con la ventaja de que no se acumulan en el medio ambiente y que poseen un amplio rango de actividades, lo que disminuye el riesgo del desarrollo de cepas patogénicas resistentes. Los aceites esenciales también son fuente de materias primas valiosas, pues sus componentes mayoritarios pueden aislarse por destilación o cristalización. Así por ejemplo, se obtiene eugenol a partir de los aceites esenciales de clavo

(*Syzygium aromaticum*) y pimenta (*Pimenta racemosa*), citronelal de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus citriodora*) y citronela (*Cymbopogon winterianus*), citral de los aceites esenciales de litsea (*Litsea cubeba*) y *Cymbopogon flexuosus*, mentol de la menta japonesa (*Mentha arvensis* var. *piperascens*) y geraniol del aceite esencial de palmarosa (*Cymbopogon martinii*). Estos compuestos son usados como tales o sirven de punto de partida para la síntesis de otros derivados que son usados en perfumería y para saborizantes.

El mundo está experimentando un cambio hacia el consumo de “productos verdes” (Tuley de Silva, 1996; Smid y Gorris, 1999), con el interés de usar cada vez menos aditivos sintéticos y productos que no afecten al medio ambiente, por lo que el uso de los aceites esenciales se amplía en la actualidad (Tiwari *et al.*, 2009; Miguel, 2010).

## Historia de los aceites esenciales

Las plantas aromáticas, que contienen aceites esenciales, han sido usadas desde tiempos remotos para varios fines que incluyen tratamientos médicos, preservantes alimentarios y saborizantes de alimentos, así como en la preparación de perfumes. El término “aceite esencial” fue empleado por primera vez en el siglo XVI por el reformador de la medicina suizo Paracelsus von Hohenheim, quien nombró al componente efectivo de una droga, en su libro *Quinta essentia* (Guenther, 1948).

La aparición de las primeras civilizaciones y su preocupación por la imagen y apariencia ante los demás pueden considerarse como el origen de la búsqueda y estudio de los aceites esenciales.

El uso de hierbas y especias en la condimentación de los alimentos es tan antiguo como el propio hombre y la comercialización de la canela, cardamomo y jengibre se menciona en manuscritos antiguos que datan de antes del 2000 a.n.e. (Reineccius, 2006).

El Antiguo Testamento recoge numerosos testimonios sobre el conocimiento y uso de los aceites esenciales. Los primeros procesos de destilación de aceites esenciales se realizaron en Oriente (Egipto, Persia e

India). Sin embargo y al igual que en muchos otros campos, estas rudimentarias destilaciones consiguieron su máximo desarrollo en Occidente. Los legados sobre los métodos, objetivos y resultados de estas primeras destilaciones son escasos y ambiguos. Sólo en los escritos de grandes historiadores como Herodoto (484-425 a.n.e.), Plinio (23-79 a.n.e.) y su contemporáneo Dioscórides (?-65 a.n.e.), empiezan a haber reseñas sobre aceites esenciales, en donde el aceite esencial de trementina fue el primero mencionado por los historiadores griegos y romanos (Guenther, 1948).

En la Antigua Grecia y Roma, pero sobre todo a partir de la Edad Media, se elaboraban aceites esenciales cuya obtención distaba mucho de los métodos utilizados en la actualidad. Los aceites grasos se embotellaban con flores, raíces u otras partes aromáticas de las plantas y después de un tiempo de maceración se conseguían “aceites olorosos”.

El primer manuscrito que define la destilación como método de obtención de un aceite esencial fue escrito por Arnald de Villanova (1235-1311), quien especificó detalladamente el proceso de destilación del aceite esencial de trementina (Guenther, 1948).

En el siglo XIII, los aceites esenciales se producían en farmacias y sus aplicaciones ya eran descritas en farmacopeas (Bauer *et al.*, 2001), pero su uso en Europa no parece extenderse hasta el siglo XVI, época en la que comenzaron a comercializarse en Londres (Crosthwaite, 1998). Cabe destacar la obra de 1556 titulada *New Gross Destillirbuch*, de Brunshwig y Reiff (1556), que contiene la primera referencia sobre la industria y comercialización de aceites esenciales, entre ellos la trementina, enebro, romero, lavanda, clavo, nuez moscada, anís y canela (Guenther, 1948). De acuerdo con el médico francés Du Chesne, en el siglo XVII la preparación de aceites esenciales era muy común y las farmacias comercializaban de 15 a 20 tipos de aceites esenciales diferentes (Guenther, 1948). El uso del aceite esencial del árbol del té con fines medicinales fue bien documentado desde la colonización de Australia a finales del siglo XVIII (Carson y Riley, 1993).

Todos estos avances en la obtención de aceites esenciales se desarrollaron paralelamente a técnicas de fraccionamiento y caracterización. En el siglo XIX comenzó la revolución química con el

planteamiento de la hipótesis sobre la naturaleza de las sustancias que componen estas mezclas y la forma de separarlas para conseguir su identificación. Las primeras investigaciones relacionadas con la composición de los aceites esenciales se deben al químico francés M. J. Dumas (1800–1884), quien publicó sus resultados en 1833. Otro químico francés, M. Berthelot (1827–1907) caracterizó distintos compuestos químicos naturales y sus productos de reordenamiento mediante polarimetría. Sin embargo, los estudios más importantes se deben al químico alemán O. Wallach, un asistente de A. Kekulé (1829–1896). Houton en 1887 fue el primero en detectar la relación carbono / hidrógeno, aunque no fue hasta 1918 cuando Wallach sentó las bases de los terpenos y su clasificación (Guenther, 1972).

Con la introducción de las técnicas de separación cromatográficas, en particular la cromatografía de gases y las técnicas espectroscópicas como la espectrometría de masas, espectroscopía infrarroja y resonancia magnética nuclear es que se logró la asignación de estructuras a los terpenos. El desarrollo logrado en el conocimiento en el campo de los aceites esenciales se debe a los avances en la química analítica de la segunda mitad del siglo pasado.

Como consecuencia de los avances en la caracterización y propiedades de los aceites esenciales, su uso se ha ampliado a lo largo de la historia. Los primeros experimentos sobre las propiedades bactericidas de los vapores de los aceites esenciales fueron descritas por De la Croix en 1881 (Boyle, 1955). Sin embargo, en el transcurso de los siglos XIX y XX, el uso de los aceites esenciales con fines médicos pasó a un segundo plano, dando mayor importancia a su empleo como saborizantes (Guenther, 1948).

En la actualidad se han afianzado las aplicaciones en alimentos (como saborizantes), perfumes (fragancias), farmacéuticas (por sus propiedades funcionales) (Bauer *et al.*, 2001; Van Welie, 1997; Van de Braak y Leijten, 1999; Burt, 2004; Miguel, 2010) y en aromaterapia (Van de Braak y Leijten, 1999). Algunos de sus componentes también se aíslan y se usan para formulaciones de saborizantes y fragancias (Shaaban *et al.*, 2012).

## **Función de los compuestos volátiles en las plantas**

La ocurrencia y funciones de los compuestos volátiles en la naturaleza es aún discutida en la actualidad (Pichersky y Gershenzon, 2002; Dudareva *et al.*, 2004, 2006; Gang, 2005; Başer y Demirci, 2007).

Numerosas hipótesis se han planteado a través de los años para explicar la ocurrencia y funciones de los constituyentes volátiles. Una primera suposición para la producción de estos compuestos fue que eran metabolitos de importancia secundaria para las funciones de las plantas, que en realidad eran productos de desperdicio. Esta misma función fue atribuida anteriormente a muchos grupos de metabolitos de las plantas, que posteriormente se comprobó eran críticos para el crecimiento, desarrollo y supervivencia de las plantas (Pichersky y Gang, 2000).

De acuerdo a Gang (2005), los metabolitos de las plantas no son producidos por vías metabólicas incontroladas ni son subproductos de la digestión de alimentos. Las evidencias sugieren que la visión centrada en los animales del reino vegetal no es válida. De hecho, los metabolitos de las plantas son casi siempre generados por la vía específica de una ruta metabólica que comprende enzimas específicas que a menudo actúan en sustratos específicos para producir metabolitos específicos.

La hipótesis más aceptada en la actualidad es que estos compuestos del metabolismo tienen funciones especializadas e importantes en las plantas (Pichersky y Gang, 2000; Dudareva *et al.*, 2004). Aunque no son requeridos para procesos metabólicos primarios como la síntesis de proteínas o la utilización de azúcar directa, muchos de estos metabolitos son necesarios para la supervivencia de las especies, como son por ejemplo que una planta que requiera la polinización por abejas no podría vivir sin la atracción de estos insectos y por tanto, reproducirse. Es por esta razón que no deben ser considerados como de importancia secundaria. Sin embargo, muchos de estos compuestos están limitados en su distribución entre las plantas, por lo que sería mejor nombrarlos como metabolitos “especializados”. Además, su biosíntesis está casi siempre restringida a tipos específicos de tejidos y determinados estados de desarrollo.

Tres son las funciones vitales de los metabolitos volátiles: Una primera función es actuar como atrayentes de polinizadores y dispersores de semillas (Harrewijn *et al.*, 1995; Piechulla y Pott, 2003; Theis y Lerdau, 2003; Müller y Buchbauer, 2011). Para muchas especies que no son capaces de la auto-polinización, la atracción de los polinizadores es imprescindible para la reproducción. Metabolitos volátiles como el metileugenol son producidos y emitidos por los órganos de las flores, tales como el estigma y pétalos de *Clarkia breweri* (Wang y Pichersky, 1998), cuando la flor está receptiva para la polinización.

Una segunda función de los metabolitos volátiles de las plantas es atraer a los enemigos naturales de los herbívoros atacantes, tales como avispas, moscas o ácaros, los cuales pueden proteger a la planta de daños causados por los herbívoros (Dicke *et al.*, 1990; Turlings *et al.*, 1990; Vet y Dicke, 1992; Pare y Tumlinson, 1997; Drukker *et al.*, 2000; Kessler y Baldwin, 2001).

Una tercera función de los metabolitos volátiles es que pueden actuar como compuestos de defensa directa de la planta (Dobson y Bergstrom, 2000; Wink, 200; Wink y Mohamed, 2003; Seybold *et al.*, 2006). Esta función ha recibido poca atención en comparación con la acción defensiva de otros compuestos no volátiles de la planta (Gang *et al.*, 1997), a pesar de que los metabolitos volátiles poseen actividades antimicrobianas y antiherbívoras. Ejemplos de ello son los fenilpropanoides timol, carvacrol y eugenol que poseen excelentes actividades antibacterianas y antifúngicas (Gallucci *et al.*, 2009; Shaaban *et al.*, 2012). El eugenol tiene un efecto antiherbívoro-insecto (Sisk *et al.*, 1996; Obeng-Ofori y Reichmuth, 1997). De esta forma, el eugenol tiene una función importante en la defensa general de muchas plantas, de manera similar a otros metabolitos especializados de las plantas. Se ha sugerido que las plantas comenzaron a emitir compuestos volátiles de sus tejidos primeramente como mecanismo de defensa para protegerlos de herbívoros y patógenos (Harrewijn *et al.*, 1995; Dobson *et al.*, 1996). Los polinizadores aprendieron posteriormente a reconocer estos compuestos químicos como señales de la presencia de flores. De esta forma se inició la coevolución de las flores con sus polinizadores.

## Búsqueda de información de aceites esenciales

Es imposible abarcar en este libro todo el tema de los aceites esenciales en detalle. Por tanto, se consideró útil incluir un acápite en el texto con la búsqueda de información con relación a aceites esenciales.

### Libros

Ernest Guenther fue el primero en dar a conocer un trabajo voluminoso con relación a los aceites esenciales, al publicar una colección de seis volúmenes (Guenther, 1948). Al momento de su publicación, la mayoría de las formulaciones de los saborizantes estaban basadas en aceites esenciales y esta colección se consideró como la fuente de información de saborizantes. Esta colección reimpressa es todavía en la actualidad una obra obligada de consulta (Guenther, 1972).

Otra importante colección de volúmenes sobre aceites esenciales se debe a los autores alemanes Gildemeister y Hoffman (1965-1967).

En la década de los sesenta, Steffen Arctander publicó sendos libros (Arctander, 1960, 1969) acerca de materiales para perfumería y saborizantes que aún hoy en día están disponibles (Arctander, 2000) y que abordan el tema de los aceites esenciales y sus componentes.

Otros libros reconocidos corresponden a los autores Carle (1993), Tuley de Silva (1996), Bauer *et al.* (2001) y Başer y Buchbauer (2010).

### Revistas

Las revistas constituyen una segunda fuente de información importante, tanto las meramente científicas como las comerciales. Aunque las investigaciones relacionadas con los aceites esenciales aparecen en numerosas revistas científicas, hay algunas revistas que enfocan este tema regularmente. Entre ellas están: *Journal of Essential Oil Research*, *Flavour and Fragrance Journal*, *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, *Perfumer and Flavorist* (también informa aspectos comerciales), *Natural Product Communications* y *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

Merecen especial atención las revisiones periódicas que ha hecho Brian Lawrence en *Perfumer and Flavorist* y sus compilaciones en forma de libros sobre las investigaciones publicadas de aceites esenciales comerciales.

## Referencias

- Anónimo. (2000). Natural Sources of Flavourings. Report No. 1. Council of Europe Publishing, Strasbourg, France.
- Antunes M.D.C., Cavaco A.M. (2010). The use of essential oils for postharvest decay control. A review. *Flavour Fragr. J.* 25 (5), 351-366.
- Arctander S. (1960). *Perfume and Flavor Materials of Natural Origin*. Published by the author, Elizabeth.
- Arctander S. (1969). *Perfume and flavor Chemicals (Aroma Chemicals)*. Steffen Arctander's Publications, Las Vegas.
- Arctander S. (2000). *Perfume and Flavor Chemicals and Perfume and Flavor Materials of Natural Origin*, 3 vols. Reprinted and available in CD-ROM by Allured Pub. Corp., Carol Stream, Il., <http://www.allured.com/pf/ppfcandppfm.html>
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446-475.
- Başer K.H.C., Demirci F. (2007). Chemistry of essential oils. En: *Flavours and Fragrances. Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*. Berger R.G. (Ed.). Springer, Heidelberg, pp. 43-83.
- Başer K.H.C., Buchbauer G. (2010). *Handbook of Essential Oils. Science, Technology, and Applications*. Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA.
- Bauer K., Garber D., Surburg H. (2001). *Common Fragrance and flavor Materials: Preparation, Properties and Uses*. 2<sup>nd</sup> edn., Wiley-VCH, Weinheim.
- Boyle W. (1955). Spices and essential oils as preservatives. *The American Perfumer and Essential Oil Review* 66, 25-28.
- Brunke E.-J., Hammerschmidt F.-J., Schmaus G. (1993). Flower scent of some traditional medicinal plants. En: *Bioactive Volatile compounds in Plants*. Teranishi R., Buttery R.G., Sugisawa H. (Eds.), ACS Symp. Ser. 525, 282-296.

- Buchbauer G., Jäger W., Jirovetz L., Ilmberger J., Dietrich H. (1993). Therapeutic properties of essential oils and fragrances. En: Bioactive Volatile compounds in Plants. Teranishi R., Buttery R.G., Sugisawa H. (Eds.), ACS Symp. Ser. 525, 159-167.
- Burt S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. Intern. J. Food Microbiol. 94, 223-253.
- Carle R. (1993). Ätherische Öle—Anspruch und Wirklichkeit. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- Carson C.F., Riley T.V. (1993). Antimicrobial activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. Letters in Applied Microbiol. 16, 49-55.
- Crosthwaite D. (1998). UK trade within the flavour and fragrance industry. International Federation of Essential Oils and Aroma Trades—21st International Conference on Essential Oils and Aroma's. IFEAT, London, pp. 6 -12.
- Dewick P.M. (2002). Medicinal and Natural Products: A Biosynthetic Approach. 2<sup>nd</sup> edn., Wiley, Chichester.
- Dicke M., Abelis M.W., Takabayashi J., Bruin J., Posthumus M.A. (1990). Plant strategies of manipulating predator-prey interactions through allelochemicals: Prospects for application in pest control. J. Chem. Ecol. 16, 3091-3117.
- Dobson H.E.M., Groth I., Bergstrom G. (1996). Pollen advertisement: chemical contrasts between whole-flower and pollen odors. Am. J. Bot. 83, 877-885.
- Dobson H.E.M., Bergstrom G. (2000). The ecology and evolution of pollen odors. Plant Syst. Evol. 222, 63-87.
- Drukker B., Bruin J., Jacobs G., Kroon A., Sabelis M.W. (2000). How predatory mites learn to cope with variability in volatile plant signals in the environment of their herbivorous prey. Exp. Appl. Acarol. 24, 881-895.
- Dudareva N., Pichersky E., Gershenzon J. (2004). Biochemistry of plant volatiles. Plant Physiol. 135, 1893-1902.
- Dudareva N., Negre F., Nagegowda D.A., Orlova I. (2006). Plant volatiles: recent advances and future perspectives, Crit. Rev. Plant Sci. 25 (5), 417-440.
- Evans W.C. (2002). Trease and Evans' Pharmacognosy, 15<sup>th</sup> ed. Saunders, London.
- Farmacopea Europea (2008). Pharmacopoeia, 6th ed. EDQM (Council of Europe), Strasbourg, France, p. 680.

- Figueiredo A.C., Barroso J.G., Pedro L.G., Scheffer J.J.C. (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour Fragr. J.* 23, 213-226.
- Franz C.M. (2010). Essential oil research: past, present and future. *Flavour Fragr. J.* 25, 112-113.
- Gallucci M.N., Oliva M., Casero C., Dambolena J., Luna A., Zygadlo J., Demo M. (2009). Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. *Flavour Fragr. J.* 24, 348-354.
- Gang D.R., Dinkova-Kostova A.T., Davin L.B., Lewis N.G. (1997). Phylogenetic links in plant defense systems: lignans, isoflavonoids and their reductases. *ACS Symp. Ser.* 658, 58-89.
- Gang D.R. (2005). Evolution of flavors and scents. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 301-325.
- Gildemeister E., Hoffman F. (1965-1967). *Die Atherischen Öle*, 4<sup>th</sup> ed. Akademie-Verlag, Berlin.
- Guenther E. (1948-1952). *The Essential Oils*, Vol. 1-6, Van Nostrand Co., New York.
- Guenther E. (1972-1998). *The Essential Oils*, Vol. 1-6, Allured Pub. Corp., Carol Stream, Il., <http://www.allured.com/pf/peoeg.html> .
- Hajhashemi V., Ghannadi A., Sharif B. (2003). Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. *J. Ethnopharmacol.* 89, 67-71.
- Harrewijn P., Minks A.K., Mollema C. (1995). Evolution of plant volatile production in insect-plant relationships. *Chemoecology* 5/6, 55-73.
- ISO 4720 (2002). International Organization for Standardization. Essential oils. Nomenclature.
- Kessler A., Baldwin I.T. (2001). Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* 291, 2142-2143.
- Mann I., Davidson R.S., Hobbs J.B., Banthorpe D.V., Harborne J.B. (1994). *Natural Products: Their Chemistry and Biological Significance*. Longman, London.
- Miguel M.P. (2010). Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. *Flavour Fragr. J.* 25 (5), 291-312.
- Müller M., Buchbauer G. (2011). Essential oil components as pheromones. A

- review. *Flavour Fragr. J.* 26, 357-377.
- Obeng-Ofori D., Reichmuth C. (1997). Bioactivity of eugenol, a major component of essential oil of *Ocimum suave* (Wild.) against four species of stored-product Coleoptera. *Int. J. Pest. Manag.* 43, 89-94.
- Paré P.W., Tumlinson J.H. (1997). De novo biosynthesis of volatiles induced by insect herbivory in cotton plants. *Plant Physiol.* 114, 1161-1167.
- Perry N.S., Bollen C., Perry E.K., Ballard C. (2003). *Salvia* for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 75, 651-659.
- Pichersky E., Gang D.R. (2000). Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends Plant Sci.* 5, 439-445.
- Pichersky E., Gershenzon J. (2002). The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 237-243.
- Piechulla B., Pott M.B. (2003). Plant scents—mediators of inter- and intraorganismic communication. *Planta* 217, 687-689.
- Reineccius G. (1999). *Source Book of Flavors*, 2<sup>nd</sup> edn. Aspen, Gaithersburg.
- Reineccius G. (2006). *Flavor Chemistry and Technology*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Seybold S.J., Huber D.P.W., Lee J.C., Graves A.D., Bohlmann J. (2006). Pine monoterpenes and pine bark beetles: a marriage of convenience for defense and chemical communication. *Phytochem. Rev.* 5, 143-178.
- Shaaban H.A.E., El-Ghorab A.H., Shibamoto T. (2012). Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components: Review. *J. Essent. Oil Res.* 24 (2), 203-212.
- Silva J., Abebe W., Sousa S.M., Duarte V.G., Machado M.I.L., Matos F.J.A. (2003). Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. *J. Ethnopharmacol.* 89, 277-283.
- Sisk C., Shorey H., Gerber R., Gaston L. (1996). Semiochemicals that disrupt foraging by the Argentine ant (Hymenoptera: Formicidae): laboratory bioassays. *J. Econ. Entom.* 89, 381-385.
- Smid E.J., Gorris L.G.M. (1999). Natural antimicrobials for food preservation. En: *Handbook of Food Preservation*. Rahman M.S. (Ed.), Marcel Dekker, New York, pp. 285-308.

- Theis N., Lerdau M. (2003). The evolution of function in plant secondary metabolites. *Int. J. Plant Sci.* 164, S93-S102.
- Tiwari B.K., Valdramidis V.P., O'Donnell C.P., Muthukumarappan K., Bourke P., Cullen P.J. (2009). Application of natural antimicrobials for food preservation. *J. Agric. Food Chem.* 57, 5987-6000.
- Torsell K. (1997). *Natural Products Chemistry: A Mechanistic, Biosynthetic and ecological Approach*. Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm.
- Tuley de Silva K. (1996). *A Manual on the Essential Oil Industry*. United Nations Industrial Development Organization, Vienna.
- Turlings T.C.J., Tumlinson J.H., Lewis W.J. (1990). Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science* 250, 1251-1253.
- Van de Braak, S.A.A.J., Leijten, G.C.J.J. (1999). *Essential Oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union*. CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam, p. 116.
- Van Welie R.T.H. (1997). *Alle cosmetica ingrediënten en hun functies*. Nederlandse Cosmetica Vereniging, Nieuwegein, p. 126.
- Vet L.E.M., Dicke M. (1992). Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. *Annu. Rev. Entomol.* 37, 141-172.
- Wang J., Pichersky E. (1998). Characterization of S-adenosyl-L-methionine: (iso)eugenol O-methyltransferase involved in floral scent production in *Clarkia breweri*. *Arch. Biochem. Biophys.* 349, 153-160.
- Wink M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochem.* 64, 3-19.
- Wink M., Mohamed G.I.A. (2003). Evolution of chemical defense traits in the Leguminosae: mapping of distribution patterns of secondary metabolites on a molecular phylogeny inferred from nucleotide sequences of the *rbcl* gene. *Biochem. Syst. Ecol.* 31, 897-917.
- Winterhalter P., Skouroumounis G.K. (1997). Glycoconjugated aroma compounds: Occurrence, role and biotechnological transformation. En: *Biotechnology of Aroma Compounds*. Berger R.G. (Ed.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 73-105.

## 2.- CONSTITUYENTES QUÍMICOS DE LOS ACEITES ESENCIALES

### Introducción

Los constituyentes volátiles, que conforman los aceites esenciales, constituyen alrededor del 1% de los metabolitos secundarios de las plantas y están representados principalmente por terpenoides, fenilpropanoides / bencenoides y derivados de ácidos grasos y aminoácidos. De forma general, la composición química de los aceites esenciales puede agruparse en dos grandes grupos: terpenoides y no terpenoides.

### Terpenoides

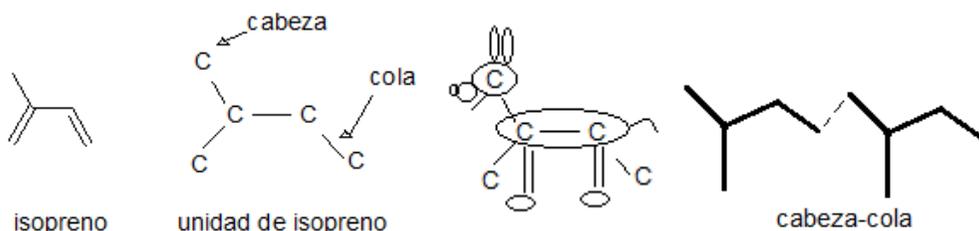
Los terpenoides, isoprenoides o terpenos son una de las clases principales de compuestos orgánicos en la naturaleza, de los cuales se conocen más de 30 mil compuestos aislados de plantas, microorganismos y animales (Bramley, 1997; Dewick, 2002; Başer y Demirci, 2007). Estos compuestos son constituyentes importantes de los aceites esenciales.

Tradicionalmente se han considerado derivados del 2-metil-1,3-butadieno (isopreno). Esta llamada "regla del isopreno", propuesta por el químico alemán Wallach en 1887, ha permitido clasificarlos y estudiarlos, pero en realidad los terpenos no derivan directamente del isopreno. Por esta regla, se considera que los terpenos son productos de fusión de dos o más moléculas del isopreno ( $C_5H_8$ ). Así, según el número de unidades de isopreno, los terpenos se clasifican según la fórmula general  $(C_5H_8)_n$

donde n toma valores como: hemiterpenos (n=1), monoterpenos (n =2), sesquiterpenos (n =3), diterpenos (n =4), sesterpenos (n =5), triterpenos (n=6), tetraterpenos (n =8) y politerpenos (n =10).

El isopreno en si es considerado el único hemiterpeno, pero derivados que contienen oxígeno tales como el prenol y el ácido isopentanoico son hemiterpenoides. Terpenos superiores a los diterpenos no se encuentran en los aceites esenciales, debido a su poca volatilidad.

Esta fusión de las moléculas de isopreno sigue un orden, propuesto por el químico checo Ruzicka en 1950 como la regla biogenética del isopreno. Esta regla plantea la formación de los terpenos por un reordenamiento cabeza-cola de dos o más unidades de isopreno (Figura 2.1). De esta forma, el geraniol es el precursor de la formación de los monoterpenos, farnesol de los sesquiterpenos, geranilgeraniol de los diterpenos y escualeno de los triterpenos (Başer y Demirci, 2007).



**Figura 2.1 Reordenamiento cabeza-cola de dos unidades de isopreno**

## Monoterpenos

Los monoterpenos están formados por dos unidades de isopreno. De acuerdo a su estructura pueden ser: acíclicos o lineales, monocíclicos, bicíclicos y tricíclicos, atendiendo al número de anillos presentes. Además, pueden ocurrir adiciones (oxidación), eliminación de dobles enlaces (reducción) y adición de oxígeno para formar alcoholes (-OH), cetonas (-CO), aldehídos (-CHO) y ésteres (-OCO-). La Figura 2.2 representa algunos de estos tipos de monoterpenos.

Los monoterpenos monocíclicos, con una estructura del tipo 1-metil-4-isopropil-ciclohexano (p-mentano), representan el grupo mayoritario. Los monoterpenos bicíclicos pueden tener estructuras tipo carano ( $\delta$ -3-

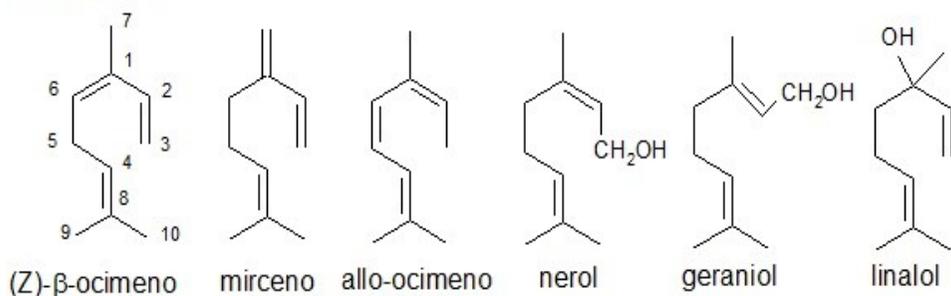
careno), pinano (ej.  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno), canfano (ej. canfeno), fenchano (ej. alcanfor), bornano (ej. borneol) y tuyano (ej.  $\alpha$ -tuyeno).

Bajo la denominación de iridoides se agrupan una serie de monoterpenos bicíclicos derivados biosintéticamente del monoterpeno geraniol, que presentan como estructura básica común un ciclopentapirano denominado iridano, por haberse detectado la primera vez en unas hormigas pertenecientes al género *Iridomirmex*. Estos compuestos pueden encontrarse como estructuras abiertas (secoiridoides) o cerradas (iridoides) generalmente en forma heterosídica, mayoritariamente como glucósidos. Existen una serie de plantas que se usan por sus propiedades farmacológicas precisamente porque algunos de sus principios activos son de naturaleza iridoídica. Entre las más importantes se destaca la valeriana (*Valeriana officinalis*), de los cuales se utilizan los órganos subterráneos y las hojas de olivo (Dewick, 2002).

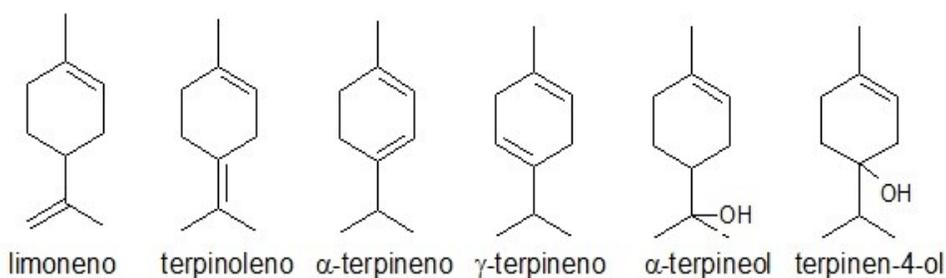
En la naturaleza existe un grupo de monoterpenos irregulares, en los cuales las fusiones de las dos unidades de isopreno no siguen la regla de cabeza-cola planteada por Ruczicka (Figura 2.3). Este grupo está constituido por dos tipos:

- (i) monoterpenos formados por la unión cola a no cabeza de las unidades de isopreno. Ejemplos de ellos son: la artemisia cetona, santolinatrieno, yomogi alcohol y lavandulol;
- (ii) monoterpenos de cicloheptano sustituidos, conocidos como troponas. Ejemplos de ellos son: eucarvona,  $\gamma$ -tuyaplicin y nezukona.

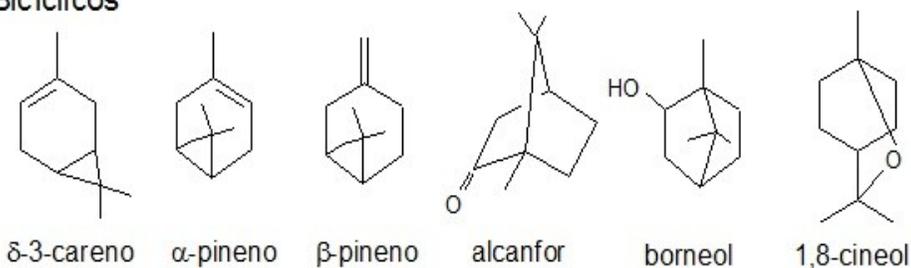
## Acíclicos



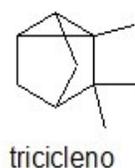
## Monocíclicos



## Bicíclicos



## Tricíclicos



**Figura 2.2 Estructuras típicas de compuestos monoterpénicos presentes en aceites esenciales**

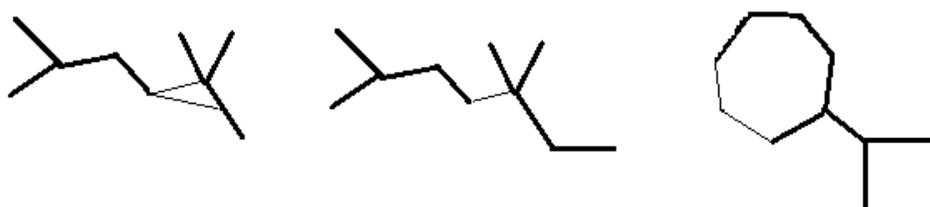


Figura 2.3 Esqueletos de monoterpenos irregulares

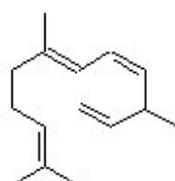
### Sesquiterpenos

Los sesquiterpenos están formados por tres unidades de isopreno. El hecho de poseer cinco átomos de carbono más que los monoterpenos hace que tengan una mayor diversidad estructural y estereoquímica. Esto hace además de que sean menos volátiles que los monoterpenos y tengan menos importancia en las propiedades sensoriales (Bramley, 1997). De acuerdo a su estructura pueden ser: acíclicos o lineales, monocíclicos, bicíclicos y tricíclicos. De forma similar a los monoterpenos, pueden ocurrir adiciones (oxidación), eliminación de dobles enlaces (reducción) y adición de oxígeno para formar distintos alcoholes (-OH), cetonas (-CO), aldehídos (-CHO) y ésteres (-OCO-). La Fig. 2.4 representa algunos de estos tipos de sesquiterpenos.

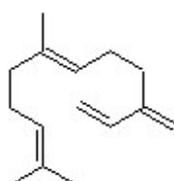
### Diterpenos

Los diterpenos están constituidos por cuatro unidades de isopreno fusionadas de cabeza-cola. Al ser moléculas relativamente grandes poseen mayores puntos de ebullición que los sesquiterpenos y solo se encuentran en los aceites esenciales obtenidos con destilaciones prolongadas. De acuerdo a su estructura pueden ser: acíclicos o lineales, monocíclicos, bicíclicos y tricíclicos. La Figura 2.5 representa algunos de estos tipos de compuestos.

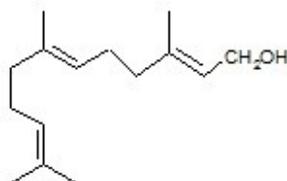
## Acíclicos



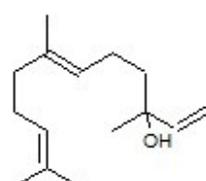
$\alpha$ -farneseno



$\beta$ -farneseno

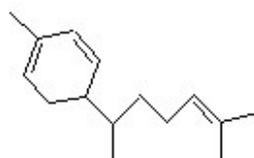


farnesol

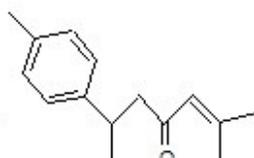


(Z)-nerolidol

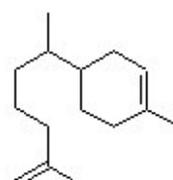
## Monocíclicos



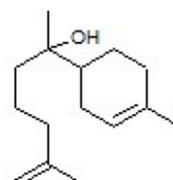
$\alpha$ -zingibereno



ar-turmerona

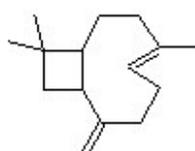


$\alpha$ -bisaboleno

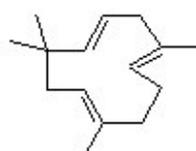


$\alpha$ -bisabolol

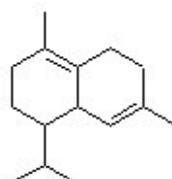
## Bicíclicos



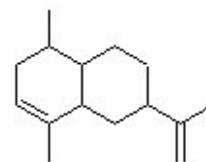
$\beta$ -cariofileno



$\alpha$ -humuleno

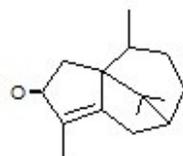


$\gamma$ -cadineno



$\alpha$ -selineno

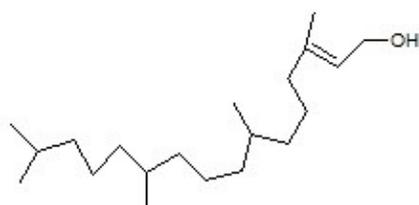
## Tricíclicos



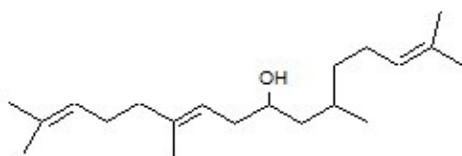
ciperenona

**Figura 2.4 Estructuras típicas de compuestos sesquiterpénicos presentes en aceites esenciales**

## Acíclicos

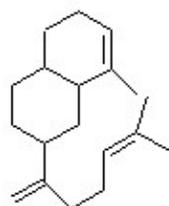


(E)-fitol



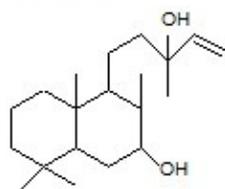
geranilcitronelol

## Monocíclicos

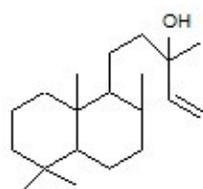


canforeno

## Bicíclicos

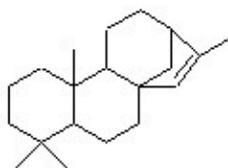


esclareol

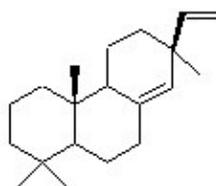


manol

## Tricíclicos



kaur-15-eno

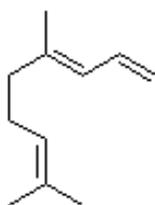


pimaradieno

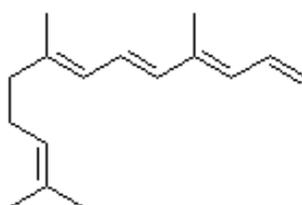
Figura 2.5 Estructuras típicas de diterpenos

## Homoterpenos

Este es un grupo irregular de terpenoides acíclicos con esqueletos de carbono C11 y C16, los que son formados generalmente en tejidos dañados de las plantas. La Figura 2.6 muestra a dos de estos compuestos. Aunque no se conocen bien las rutas biosintéticas del 4,8-dimetil-1,3E,8-dimetilnonatrieno (C11) y 4,8,12-trimetil-1,3E,7E,11-tridecatetraeno (C16), se cree que se derivan del (*E*)-nerolidol (C15) y geranil-linalol (C20), respectivamente, por una oxidación catalizada por enzimas (Gäbler *et al.*, 1991; Donath y Boland, 1994; Degenhardt y Gershenzon, 2000).



4,8-dimetil-1,3E,8-dimetilnonatrieno



4,8,12-trimetil-1,3E,7E,11-tridecatetraeno

Figura 2.6 Estructuras típicas de dos homoterpenos

## No terpenoides

Además de los terpenoides, en los aceites esenciales están presentes otros compuestos de distinta naturaleza química, donde se incluyen compuestos alifáticos saturados e insaturados, así como compuestos aromáticos. De acuerdo a las funciones químicas se encuentran alcanos, alquenos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos, ésteres, lactonas, fenilpropanoides, bencenoides, compuestos azufrados y compuestos nitrogenados.

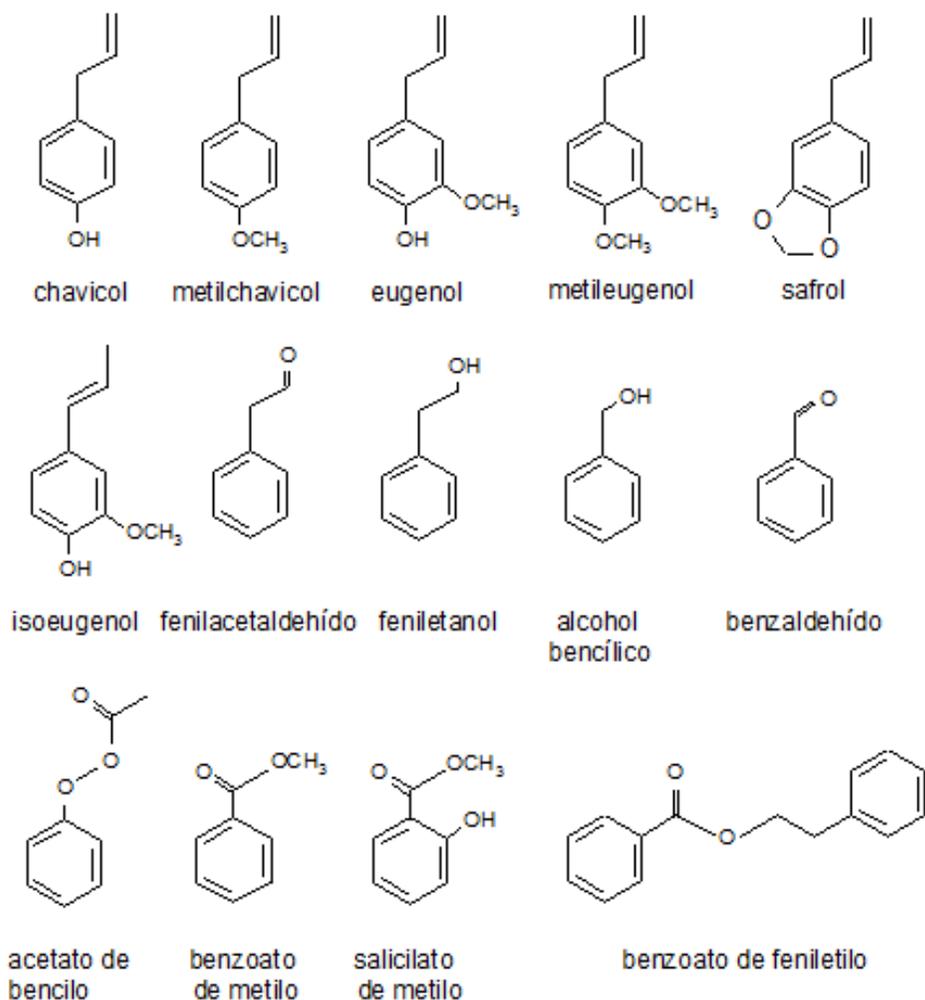
### Fenilpropanoides / bencenoides

Los fenilpropanoides son constituyentes comunes de los aceites esenciales (Torssell, 1997; Bauer *et al.*, 2001; Dewick, 2002). El esqueleto de los fenilpropanoides consiste en una estructura tipo C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>,

en la que la unidad C<sub>6</sub> es un anillo bencénico unido a una cadena de tres átomos de carbono. Esta cadena lateral generalmente contiene un doble enlace y puede ocasionalmente contener un grupo funcional oxigenado. El anillo bencénico puede estar sustituido hasta por cuatro oxígenos, en los que a su vez puede adicionarse un anillo metilendioxi, como en el safrol. Además de los fenilpropanoides, en muchos aceites esenciales es típica la presencia de bencenoides con estructuras tipo C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub> y C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>. Ésteres de ácidos y alcoholes aromáticos también pueden encontrarse en los aceites esenciales. Algunos de los fenilpropanoides y bencenoides más importantes se representan en la Figura 2.7.

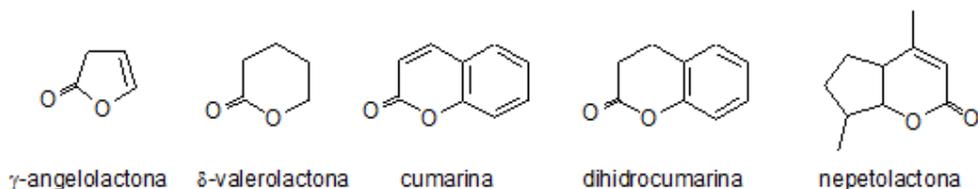
### Derivados de ácidos grasos

Los compuestos de los aceites esenciales pueden formarse a partir de los lípidos por diferentes vías. Estas involucran el rompimiento del hidroxiácido para formar lactonas, β-oxidación y oxidación catalizada por la lipoxigenasa. Mientras que los productos primarios de estas vías son aldehídos y cetonas, la oxidación adicional, reducción y esterificación provocan la formación de ácidos, alcoholes, lactonas y ésteres. El grupo de compuestos carbonílicos incluye al formaldehído, acetaldehído, propanal, acetona, butanal, isobutanal, 2-butenal, isobutenal, 2-butanona, crotonaldehído, 2-pentanona, 2-metil-2-pental, hexanal, (*E*)-2-hexenal, (*Z*)-3-hexenal, 3-octanona, nonanal, metil isopropil cetona y metil vinil cetona, entre otros (Kesselmeier y Staudt, 1999; Bauer *et al.*, 2001).



**Figura 2.7 Estructuras típicas de fenilpropanoides / bencenoides presentes en aceites esenciales**

La producción de lactonas es la segunda vía de formación de compuestos volátiles a partir de los lípidos. Las lactonas son ésteres cíclicos derivados de ácido láctico y están presentes en varios aceites esenciales. Algunas lactonas típicas se representan en la Figura 2.8.



**Figura 2.8 Estructuras típicas de lactonas presentes en aceites esenciales**

### Derivados de aminoácidos

A demás de los fenilpropanoides / bencenoides originados del aminoácido fenilalanina, otros aminoácidos, tales como la alanina, valina, leucina, isoleucina y metionina, son precursores de un conjunto de aldehídos, alcoholes, ésteres, ácidos, compuestos nitrogenados y compuestos azufrados. Ejemplos de ellos son los alcoholes, ácidos y ésteres de cadena ramificada, sulfuro de dimetilo y tioésteres volátiles.

### Norterpenoides C13

Este es un grupo de compuestos con 13 átomos de carbono originados a partir de la degradación de carotenoides o catabolitos del ácido abscísico. Ejemplos de ellos son la  $\alpha$ -ionona,  $\beta$ -ionona, (*E*)-geranilacetona,  $\beta$ -damascenona, edulano I y teaspirano, que se encuentran en numerosos aceites esenciales (Bauer *et al.*, 2001; Başer y Demirci, 2007) (Figura 2.9). Las ironas son homólogos de la ionona que tienen un grupo metilo adicional adyacente a los dos grupos metilo del anillo ciclohexano y el número de isómeros es mayor que el de las iononas debido al grupo adicional metilo en el anillo. Algunos de estos isómeros de la irona se han reportado en el aceite esencial del rizoma de *Iris palida* cultivada en Italia. Otro grupo de homólogos de la ionona son las metiliononas, en los que el grupo oxoalqueno (-C<sub>4</sub>H<sub>7</sub>O) posee un grupo metilo adicional.

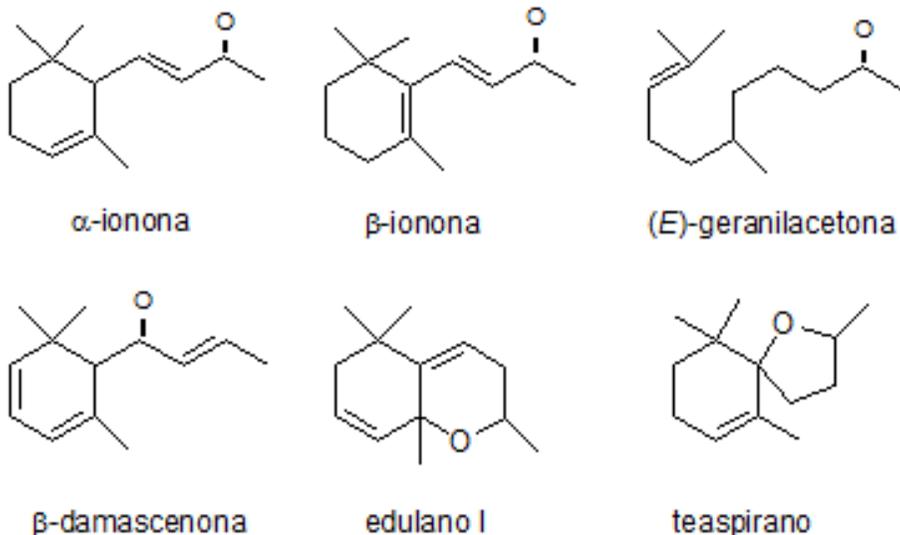


Figura 2.9 Ejemplos de norisoprenoides C13 presentes en aceites esenciales

### Ftalidos

Estos compuestos son lactonas del ácido 2-hidroximetilbenzoico y están presentes en aceites esenciales de algunas plantas de la familia Apiaceae como son el apio (*Apium graveolens*) y angélica (*Archangelica officinalis*). El 3-butilftalido es el responsable del olor del apio (Bauer *et al.*, 2001; Dewick, 2002).

### Compuestos nitrogenados

Algunos compuestos nitrogenados están presentes en varios aceites esenciales, los que pueden agruparse como aminas, amidas, nitrocompuestos, nitrilos, oximas, ésteres y compuestos cíclicos (indol, imidazol, pirazina, pirazol, piridina y triazina). Ejemplos de ello son: antranilato de metilo en los aceites esenciales de naranja dulce (*Citrus sinensis*), mandarina (*Citrus reticulata*), limón (*Citrus limon*), bergamota (*Citrus aurantium* subsp. bergamia), nerolí (*Citrus aurantium* subsp. *aurantium*) e ylang-ylang (*Cananga odorata* subs. *genuina*); N-metil antranilato de metilo en el aceite esencial de las hojas de mandarina y la corteza de mandarina y naranja agria (*Citrus aurantium* subsp. *aurantium*); indol y 3-metilindol en flores de jazmín (*Jasminum grandiflorum*); 2-metoxi-3-isobutilpirazina en el aceite esencial de

galbanum (*Ferula galbaniflua*) y piridina en el aceite esencial de pimienta negra (*Piper nigrum*) (Knudsen *et al.*, 1993; Bauer *et al.*, 2001; Dewick, 2002; Başer y Demirci, 2007).

### Compuestos azufrados

Los compuestos azufrados presentes en aceites esenciales pueden agruparse como acíclicos (sulfóxidos, sulfuros, tioles y tioésteres) y cíclicos (tiofuranos y tiazoles). En particular, las especies del género *Allium* se caracterizan por la presencia de numerosos sulfuros y tiofenos, Así por ejemplo, el sulfuro de dimetilo, disulfuro de dimetilo, trisulfuro de dimetilo, disulfuro de alilo y 2,3-dimetiltiofeno se encuentran en los aceites esenciales de cebolla (*Allium cepa*), ajo (*Allium sativum*) y puerro (*Allium porrum*). Otros ejemplos son el 8-mercapto-p-mentan-3-ona en el aceite esencial de las hojas de buchu (*Barosma betulina*); 1-p-menten-8-tiol en el aceite esencial de toronja (*Citrus paradisi*); tiazol en el aceite esencial de cilantro (*Coriandrum sativum*) y sulfuro de menta (C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>S) en aceites esenciales de menta (*Mentha* spp.), geranio (*Pelargonium graveolens*) e ylang-ylang (*Cananga odorata* subsp. *genuina*) (Knudsen *et al.*, 1993; Bauer *et al.*, 2001; Dewick, 2002; Başer y Demirci, 2007).

### Isotiocianatos

Los isotiocianatos son compuestos que contienen nitrógeno y azufre, con fórmula general R-NCS, comúnmente encontrados en las especies de la familia *Cruciferae*. Se encuentran en la planta como glucosinolatos conjugados que se liberan por la acción de la enzima mirosinasa. El isotiocianato de alilo, constituyente mayoritario del aceite esencial de mostaza negra (*Brassica nigra*) es un ejemplo típico de este tipo de compuestos (Bauer *et al.*, 2001).

### Compuestos enlazados a glicósidos

Los compuestos volátiles pueden estar presentes en las plantas no solo como tales, sino también como compuestos enlazados a glicósidos. Estos compuestos han sido detectados en diferentes órganos de las plantas en más de 170 especies (Winterhalter y Skouroumounis, 1997; Ikan, 1999). Los estudios han demostrado que estos compuestos pueden ser cuantitativamente más importantes que en su forma libre

(Stahl-Biskup, 1987). Estos compuestos enlazados están constituidos por una parte glicosídica, denominada glicósido y el compuesto volátil libre, denominado aglicona.

Las agliconas pueden separarse de los precursores no volátiles por vías enzimática o química durante el crecimiento de la planta, pretratamiento industrial o procesamiento. Un ejemplo lo constituye la vainillina, que se libera durante la fermentación de las vainas de la planta por la acción de una  $\beta$ -glucosidasa endógena a partir del glicósido amargo e inodoro (Arana, 1943). El incremento del rendimiento de aceite esencial en la menta después de un almacenamiento previo también se explica por la liberación de los compuestos terpénicos de sus precursores no volátiles (Esdorn, 1950). En el caso de las flores, como la rosa y el jazmín, ocurre un aumento del rendimiento cuando se tratan con ácido los residuos de la destilación o extracción con disolvente (Naves, 1974; Ambid, 1987).

Fisiológicamente, los compuestos enlazados a glicósidos son considerados como formas de acumulación de los compuestos volátiles (Wilson *et al.*, 1984). La glicosilación brinda una protección contra la toxicidad de los compuestos lipofílicos como son los compuestos volátiles (Winterhalter y Skouroumounis, 1997). También permite la transporación de los terpenos y otros compuestos del aroma a través de los fluidos de la planta (Watanabe *et al.*, 1993).

La extracción de los compuestos enlazados a glicósidos es difícil debido a la presencia de muchas otras sustancias en las plantas. Se parte del material vegetal sin los compuestos volátiles libres y los compuestos enlazados se aíslan con el empleo de columnas con el adsorbente de fase inversa C 18 (Williams *et al.*, 1982) o resina Amberlite XAD-2 (Günata *et al.*, 1985). La elución de los compuestos enlazados se realiza, después de haber eliminado los azúcares (por elución con agua), mediante metanol (Menon *et al.*, 2001; García *et al.*, 2009; Politeo *et al.*, 2010). El extracto crudo obtenido después de eliminado el disolvente se trata, en ocasiones, con Polyclar AT para eliminar los compuestos fenólicos (Moon *et al.*, 1994; Kilic *et al.*, 2005). El compuesto volátil se libera mediante una hidrólisis ácida (pH = 3) y calor o por tratamiento con la enzima  $\beta$ -glucosidasa.

## Referencias

- Ambid C. (1987). Procédé de préparation d'un extrait de jasmin et extrait obtenu. French Patent 87 13081.
- Arana F. (1943). Action of  $\beta$ -glucosidase in the curing of vanilla. Food Res. 8, 343-351.
- Başer K.H.C., Demirci F. (2007). Chemistry of essential oils. En: Flavours and Fragrances. Chemistry, Bioprocessing and Sustainability. Berger R.G. (Ed.). Springer, Heidelberg, pp. 43-83.
- Bauer K., Garber D., Surburg H. (2001). Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses. 2<sup>nd</sup> edn., Wiley-VCH, Weinheim.
- Bramley P.M. (1997). Isoprenoid metabolism. En: Plant Biochemistry. Dey P.M., Harborne J.B. (Eds.), Academic Press, New York, pp. 417-435.
- Degenhardt, J., Gershenzon, J. (2000). Demonstration and characterization of (*E*)-nerolidol synthase from maize: A herbivore-inducible terpene synthase participating in (3*E*)-4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene biosynthesis. Planta 210, 815-822.
- Dewick P.M. (2002). Medicinal and Natural Products: A Biosynthetic Approach. 2<sup>nd</sup> edn., Wiley, Chichester.
- Donath J., Boland W. (1994). Biosynthesis of acyclic homoterpenes in higher-plants parallels steroid-hormone metabolism. J. Plant Physiol. 143, 473-478.
- Esdorn I. (1950). Ethereal content of wilting plants. Pharmazie 5, 481-488.
- Gäbler A., Boland W., Preiss U., Simon H. (1991). Stereochemical studies on homoterpene biosynthesis in higher plants; mechanistic, phylogenetic, and ecological aspects. Helv. Chim. Acta 74, 1773-1789.
- García M., Quijano C.E., Pino, J. (2009). Free and glycosidically bound volatiles in guava leaves (*Psidium guajava* L.) Palmira ICA-I cultivar. J. Ess. Oil Res. 21 (2), 131-134.
- Ikan R. (1999). Naturally Occurring Glycosides. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, pp. 225-274.
- Kesselmeier J., Staudt M. (1999). Biogenic volatile organic compounds (VOC): an overview on emission, physiology and ecology. J. Atmospheric Chem. 33, 23-88.

- Kilic A., Kollmannsberger H., Nitz S. (2005). Glycosidically bound volatiles and flavor precursors in *Laurus nobilis* L. J. Agric. Food Chem. 53, 2231-2235.
- Knudsen J.T., Tollsten L., Bergström G. (1993). A review: Floral scents—a check list of volatile compounds isolated by head-space techniques. Phytochem. 33, 253-280.
- Menon A.N., Chacko S., Narayanan C.S. (2001). Free and glycosidically bound volatiles of pepper (*Piper nigrum* L.). J. Ess. Oil Res. 13 (3), 161-169.
- Moon J.H., Watanabe N., Sakata K., Yagi A., Ina K., Luo S. (1994). *Trans*- and *cis*-linalool 3,6-oxide 6'-*O*- $\beta$ -glucopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranoside isolated as aroma precursors from leaves for oolong tea. Biosci. biotech. biochem. 58, 1742-1744.
- Naves Y.R. (1974). Essences concrètes, résinoïdes huiles et pommades aux fleurs. En: Technologie et Chimie des Parfums Naturels. Masson, Paris, pp. 124-229.
- Politeo O., Jukic M., Milos M. (2010). Comparison of chemical composition and antioxidant activity of glycosidically bound and free volatiles from clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). J. Food Biochem. 34, 129-141.
- Stahl-Biskup E. (1987). Monoterpen glycosides, state-of-the-art. Flavours Fragr. J. 2, 75-82.
- Torsell K. (1997). Natural Products Chemistry: A Mechanistic, Biosynthetic and ecological Approach. Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm.
- Watanabe N., Watanabe S., Nakajima R., Moon J.H., Shimo K., Inagaki J., Etoh H., Asai T., Sakata K., Ina K. (1993). Formation of flower fragrance compounds from their precursors by enzymic during flower opening. Biosci. Biotech. Biochem. 57, 1101-1106.
- Wilson B., Strauss C.R., Williams P.J. (1984). Changes in free and glycosidically bound monoterpenes in developing muscat grapes. J. Agric. Food Chem. 32, 919-924.
- Winterhalter P., Skouromounis G.K. (1997). Glycoconjugated aroma compounds: occurrence role and biotechnological transformation. En: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Special volume 55. Biotechnology of Aromas. Berger R.G. (Ed.), pp. 73-105, Springer Verlag, Berlin.

## 3.- BIOGÉNESIS DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES

### Introducción

Los constituyentes volátiles de las plantas son compuestos de bajo peso molecular (< 300 Da) que pueden dividirse principalmente en tres clases: terpenoides, fenilpropanoides / bencenoides y derivados de ácidos grasos y aminoácidos, de acuerdo a su biogénesis. En los aceites esenciales existen otros tipos de compuestos volátiles nitrogenados o azufrados como glucosinolatos o derivados de isotiocianatos que son característicos del metabolismo secundario de distintas especies de la familia *Brassicaceae* o crucíferas y aceites de mostaza, que poseen vías bioquímicas más específicas. Aunque los compuestos volátiles son sintetizados por unas pocas vías bioquímicas, en su generación participan varias modificaciones enzimáticas tales como hidroxilación, acetilación y metilación que amplían la diversidad existente en la naturaleza (Osorio *et al.*, 2010, Dudareva *et al.*, 2004, 2006; Gang, 2005; Başer y Demirci, 2007).

### Terpenoides

El metabolismo de los carbohidratos es el responsable de la formación de los terpenoides, compuestos volátiles que representan, en general, la mayor proporción en la composición de los aceites esenciales.

La vía biosintética de los terpenoides genera metabolitos primarios y secundarios. Entre los primeros están las feromonas, pigmentos fotosin-

téticos (clorofilas y carotenoides) y esteroides, mientras que los terpenoides volátiles corresponden a los secundarios. Las plantas poseen dos vías biosintéticas que conducen a los intermediarios centrales para todos los terpenoides: la vía de mevalonato (MVA) dentro del citoplasma y la vía del fosfato metileritritol activa en los plastidios (denominada vía no mevalónica o del fosfato deoxixilulosa), forman ambas difosfato de isopentenilo (IPP) y su isómero difosfato de dimetilalilo (DMAPP) (Qureshi y Porter, 1981; McCaskill y Croteau, 1995; Eisenreich *et al.*, 1998; Lichtenthaler, 1999; Rohmer, 1999; Newman y Chappell, 1999; Rodríguez-Concepción y Boronat, 2002; Rohdich *et al.*, 2003; Pichersky *et al.*, 2006; Sanz y Pérez, 2010). Datos de la vía mevalónica son consistentes con la biosíntesis de una molécula de MVA a partir de tres de moléculas de acetil-CoA, mediante una secuencia enzimática que incluye la acetil-CoA acetiltransferasa, hidroximetil-glutaril-CoA sintetasa e hidroxil-glutaril-CoA reductasa en una reacción de dos etapas que requiere de NADPH (Kleinig, 1989). El IPP es formado del MVA por una serie de reacciones (Figura 3.1). El primer paso es la síntesis del ácido mevalónico-5-fosfato mediante la reacción del MVA por la acción de la MVA kinasa. La etapa final en la biosíntesis del IPP es la descarboxilación y deshidratación del ácido mevalónico difosfato (MVAPP). La biosíntesis del IPP a través de la vía del metiletitriol-4-fosfato (MEP) (Figura 3.2) comienza con la formación del 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DXP) catalizada por DXP sintasa (Estevez *et al.*, 2001). En una segunda etapa, la DXP reductoisomerasa transforma al DXP en MEP (Mahmoud y Croteau, 2002). La enzima que cataliza la última etapa de esta vía, la hidroximetilbutenil difosfato reductasa, ha sido sugerida como la etapa limitante en la vía del MEP en el tomate (Botella-Pavia *et al.*, 2004).

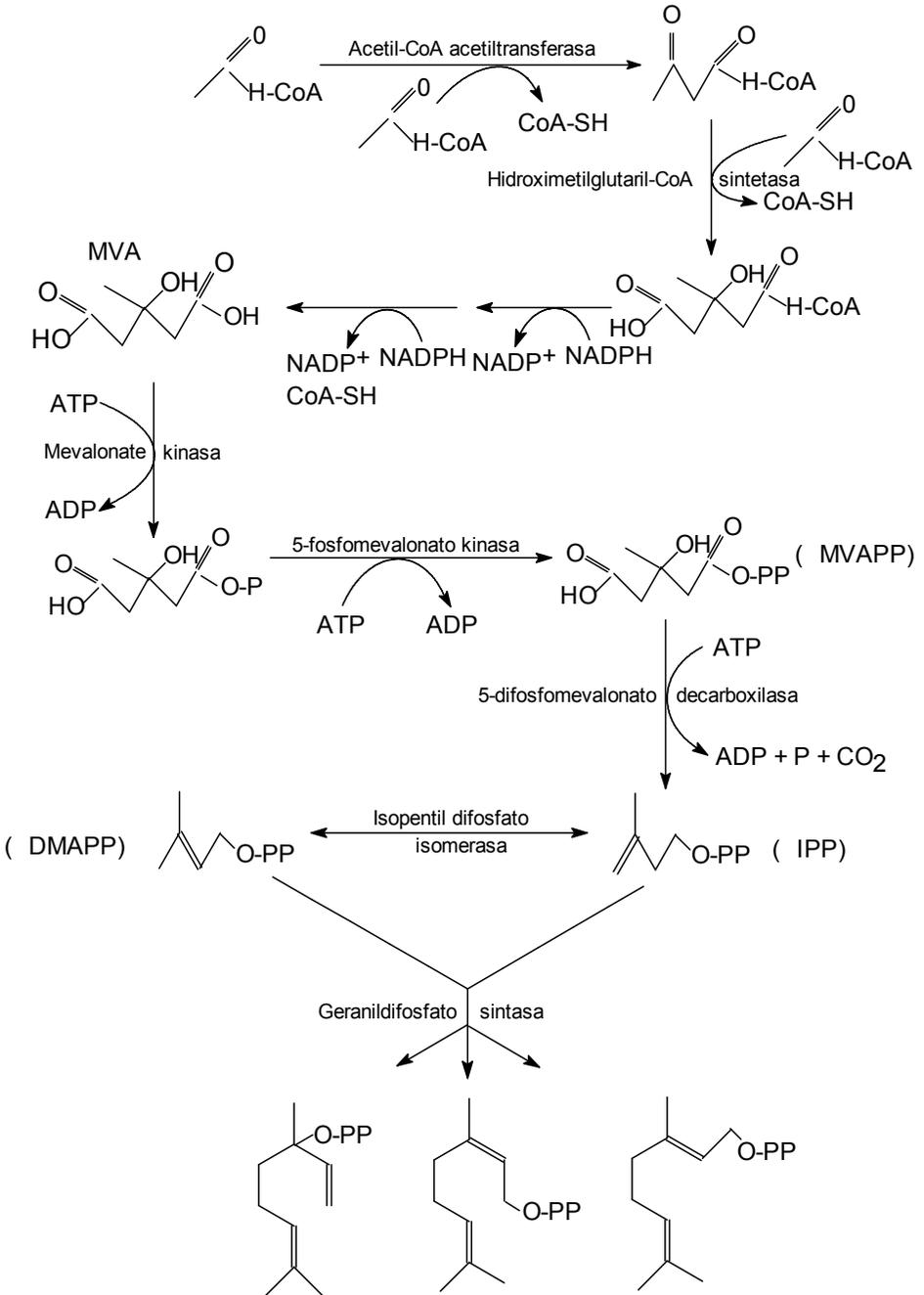
La vía MVA generalmente es considerada como suministradora de los precursores de la producción de sesquiterpenos y triterpenos, mientras que la vía del fosfato deoxixilulosa genera los precursores de los monoterpenos, diterpenos y tetraterpenos (Aharoni *et al.*, 2005). En ambas vías metabólicas, el IPP es usado por las preniltransferasas en reacciones de condensación para generar mayores prenil difosfatos, tales como el GPP. Esta reacción requiere la isomerización previa de IPP a DMAPP realizada por la enzima IPP isomerasa. La preniltransferasa produce GPP cuando DMAPP e IPP son sustratos o farnesil difosfato (FPP)

cuando el GPP e IPP son los sustratos (Lucker *et al.*, 2002; Iijima *et al.*, 2004).

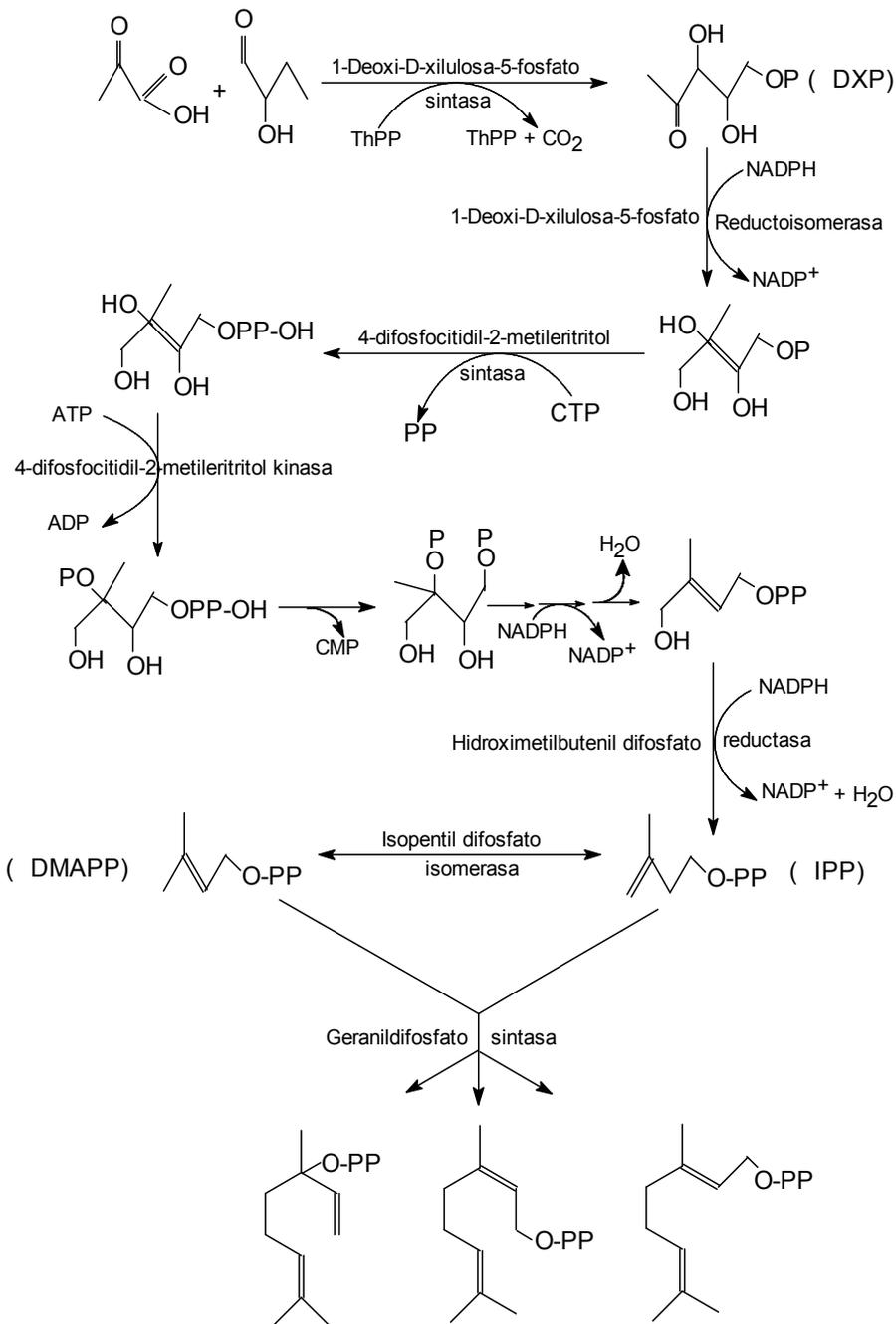
La biosíntesis de los monoterpenos es bien conocida. El GPP es el precursor directo de su formación a través de una secuencia de reacciones que incluyen hidrólisis, ciclizaciones y oxidoreducciones (Schreier, 1986; Lange y Croteau, 1999). La formación del nerilpifosfato (NPP) a partir del GPP produce una amplia gama de esqueletos acíclicos, cíclicos, bicíclicos o tricíclicos. El papel crucial de las ciclasas en el origen de los diferentes grupos estructurales de monoterpenos ha estimulado diversos estudios del mecanismo estereoquímico de ciclización (Croteau, 1992; Schwab *et al.*, 2001). Se han aislado y caracterizado más de 100 terpeno sintasas en diferentes especies de plantas (Bohlmann *et al.*, 1998; Trapp y Croteau, 2001; Aubourg *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2004).

Los hidrocarburos monoterpénicos son generalmente oxigenados en una serie de etapas que involucran a los sistemas citocromos P450 y oxígeno molecular (Sanz *et al.*, 1997). Así, mientras que muchos terpenoides son producto directo de las terpeno sintasas, muchos otros se forman por la transformación de los productos iniciales por oxidación, deshidrogenación, acilación y otras reacciones (Dudareva *et al.*, 2004; Pichersky *et al.*, 2006).

La condensación de GPP e IPP produce farnesilpifosfato (FPP), el precursor inmediato de los sesquiterpenos. De igual forma, FPP e IPP conducen a los diterpenos.



**Figura 3.1 Vía de mevalonato (MVA) para la biosíntesis de terpenos en el citoplasma**



**Figura 3.2 Vía del fosfato deoxixilulosa para la biosíntesis de terpenos en el plastidio**

## Fenilpropanoides / bencenoides

Los aminoácidos aromáticos son también precursores de una amplia familia con más de ocho mil compuestos fenólicos (Robbins, 2003). A diferencia de los isoprenoides, las vías de biosíntesis de los fenilpropanoides y bencenoides han sido menos estudiadas.

La biosíntesis de los compuestos fenólicos se inicia por la vía ácido shikímico con los intermediarios del metabolismo de los carbohidratos hasta la biosíntesis de la L-fenilalanina (Herrmann y Weaver, 1999).

La Figura 3.3 presenta un esquema simplificado de la biosíntesis de compuestos fenólicos. El ácido cinámico y ácido benzoico están presentes en la mayoría de los tejidos de plantas, enlazados a componentes estructurales tales como la pared celular. Los ácidos clorogénicos son ésteres entre los derivados del ácido trans-cinámico y el ácido quínico, conocidos también como hidroxicinamatos. El más común es el ácido 5-O-cafeoil-quínico, pero numerosos compuestos relacionados con distintos grupos acilos también se han identificado (Clifford, 2000). El ácido p-cumárico es el precursor común de dos ramas metabólicas que generan a las cumarinas y flavonoides.

En la primera etapa de la biosíntesis de los fenilpropanoides, la L-fenilalanina es transformada a ácido trans-cinámico en una reacción catalizada por L-fenilalanina amonio-liasa. En las siguientes etapas, en común con la biosíntesis de la lignina y lignanos, se forman una variedad de ácido hidrocínámicos, aldehídos y alcoholes por la vía del ácido trans-cinámico a través de reacciones de hidroxilación y metilación, que producen los ésteres del ácido hidroxicinámico y los correspondientes aldehídos y alcoholes (Humphreys y Chapple, 2002).

Algunos de estos intermediarios son convertidos a compuestos volátiles tales como el eugenol e isoeugenol, que son formados del acetato de coniferilo en reacción catalizada por la eugenol sintasa e isoeugenol sintasa, respectivamente (Koeduka *et al.*, 2006). El eugenol e isoeugenol se transforman por metilación a metileugenol e isometileugenol, respectivamente. Las enzimas que catalizan esta O-metilación

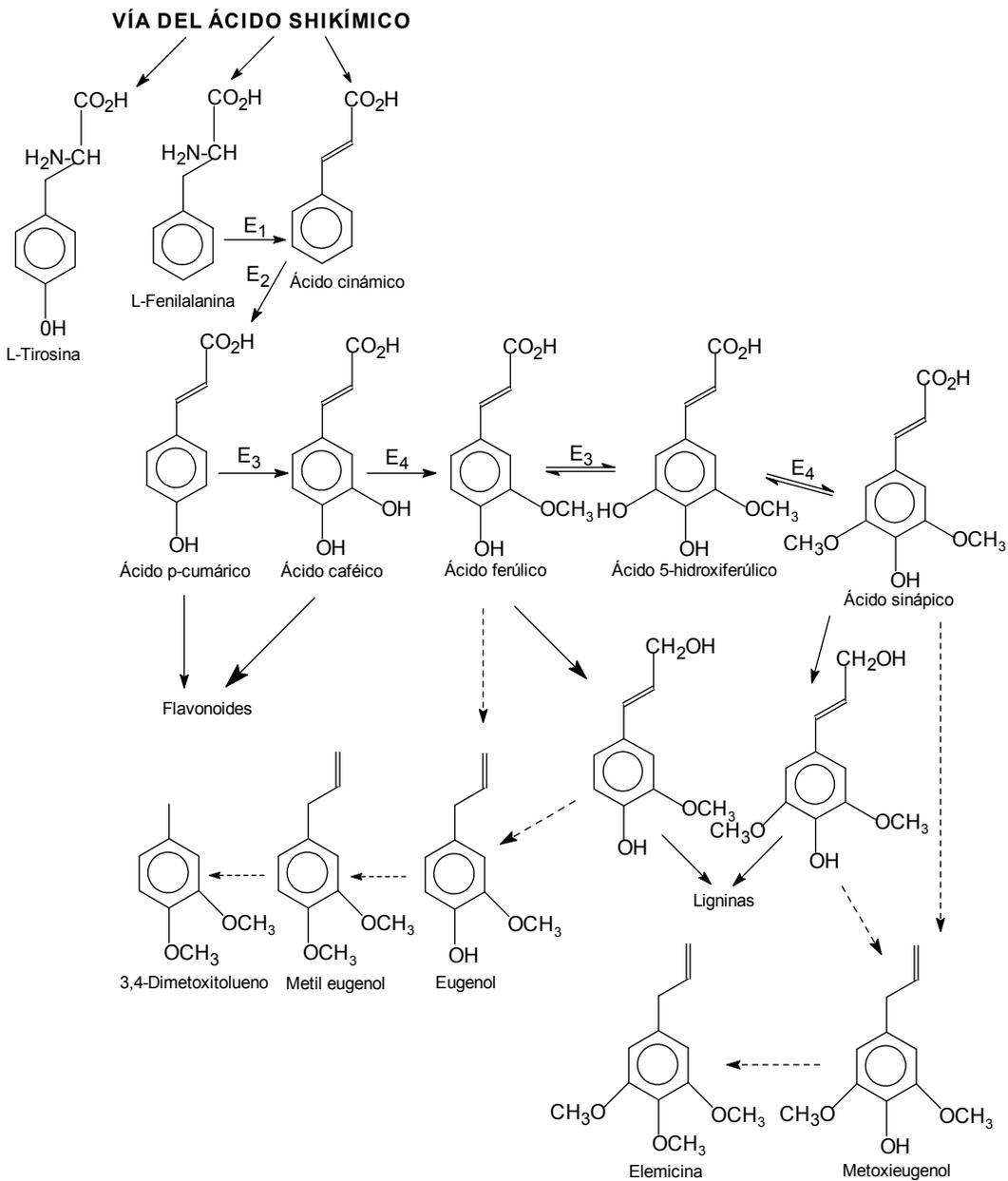
han sido aisladas y caracterizadas en la *Clarkia breweri* (Wang *et al.*, 1997) y albahaca (Gang *et al.*, 2002). De forma similar, el metilchavicol pudiera ser formado a partir del chavicol por una chavicol O-metiltransferasa (Gang *et al.*, 2002), pero esta ruta bioquímica no está bien estudiada.

Los bencenoides también se originan a partir de ácido trans-cinámico como una rama lateral de la vía general de los fenilpropanoides (Dudareva *et al.*, 2006). Su síntesis requiere el acortamiento en una unidad C<sub>2</sub> de la cadena lateral del ácido trans-cinámico, en la que se han propuesto diferentes rutas. El acortamiento de la cadena lateral puede ocurrir por la vía del paso  $\beta$ -oxidativa CoA-dependiente,  $\beta$ -oxidativa CoA-independiente o la combinación de ambas vías.

La vía  $\beta$ -oxidativa CoA-dependiente es análoga a la que ocurre en la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y procede a través de la formación de cuatro intermediarios CoA-ésteres. La vía  $\beta$ -oxidativa CoA-independiente requiere la hidratación del ácido trans-cinámico a ácido 3-hidroxi-3-fenilpropanoico y degradación de la cadena lateral mediante una reacción aldol reversa con formación de benzaldehído, que es oxidado a ácido benzoico por una dehidrogenasa NADP<sup>+</sup>-dependiente.

La biosíntesis de los compuestos volátiles tipo C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>, tales como el fenilacetaldehído y feniletanol no ocurre por la vía del ácido trans-cinámico y es en competencia con la síntesis del ácido trans-cinámico por el uso de L-fenilalanina (Boatright *et al.*, 2004).

Aunque se desconoce mucho con relación a las enzimas y genes responsables de los pasos metabólicos que originan los fenilpropanoides / bencenoides, se han realizado significativos progresos en los últimos años (Dudareva *et al.*, 2004, 2006).



**Figura 3.3 Biosíntesis esquemática de los fenoles**

## Derivados de ácidos grasos

Los ácidos grasos son los principales precursores de los compuestos volátiles de la mayoría de las plantas. Ellos son catabolizados a través de vías oxidativas principales: la  $\alpha$ - y  $\beta$ -oxidación, así como la vía de la lipoxigenasa (LOX). Ha sido sugerido que la  $\beta$ -oxidación es la vía metabólica principal de generación de los compuestos en tejidos intactos, mientras que la vía LOX puede considerarse como la generadora de una amplia gama de compuestos a partir de los ácidos grasos en los tejidos dañados de las plantas (Osorio *et al.*, 2010). El catabolismo de los ácidos grasos de cadena lineal por la vía de la  $\alpha$ - y  $\beta$ -oxidación es el proceso principal de la producción de compuestos volátiles; sin embargo, las vías específicas en las plantas aún no son bien comprendidas.

La  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos parece estar restringida a los ácidos grasos de cadena larga (más de 12 átomos de carbono), en la que ocurre una degradación a un aldehído con un átomo de carbono menos junto con cantidades variables de hidroxilácidos y un ácido graso con un átomo de carbono menos (Hamberg *et al.*, 1999). Los intermediarios y productos de estas reacciones pueden ser metabolizados para formar compuestos volátiles de distintas clases químicas, tales como alcoholes, aldehídos, ácidos carboxílicos, lactonas, ésteres o cetonas (Flamini *et al.*, 2007; Osorio *et al.*, 2010).

La vía de la  $\beta$ -oxidación se ha descrito en relación no solo con el catabolismo de los ácidos grasos sino también del metabolismo de aminoácidos y la biosíntesis de compuestos hormonales (Baker *et al.*, 2006). Debe señalarse que la información acerca de la  $\beta$ -oxidación en tejidos vegetales no está basada en estudios detallados de enzimas sino en experimentos de incubación con ácidos grasos marcados. En esta vía metabólica los derivados acil-coenzima A (CoA) de los ácidos grasos son metabolizados a unidades de cadena más corta acil-CoA por la pérdida de dos átomos de carbono en cada vuelta del ciclo involucrado en el caso de los ácidos grasos saturados, en la que participan las enzimas acil-CoA dehidrogenasa, enoil-CoA hidratasa, 3-hidroxiacil-CoA dehidrogenasa y acetil-CoA acetiltransferasa (Goepfert y Poirier, 2007). La  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos insaturados involucra la acción de enzimas auxiliares, tales como la enoil-CoA isomerasa y la 3-hidroxiacil-CoA-epimerasa, que

pudieran estar implicadas en la formación de las diferentes formas enantioméricas de los ésteres de 3-hidroxiácidos (Goepfert *et al.*, 2005). La biosíntesis de las lactonas está también asociada a la vía de la  $\beta$ -oxidación (Tressl y Albrecht, 1986).

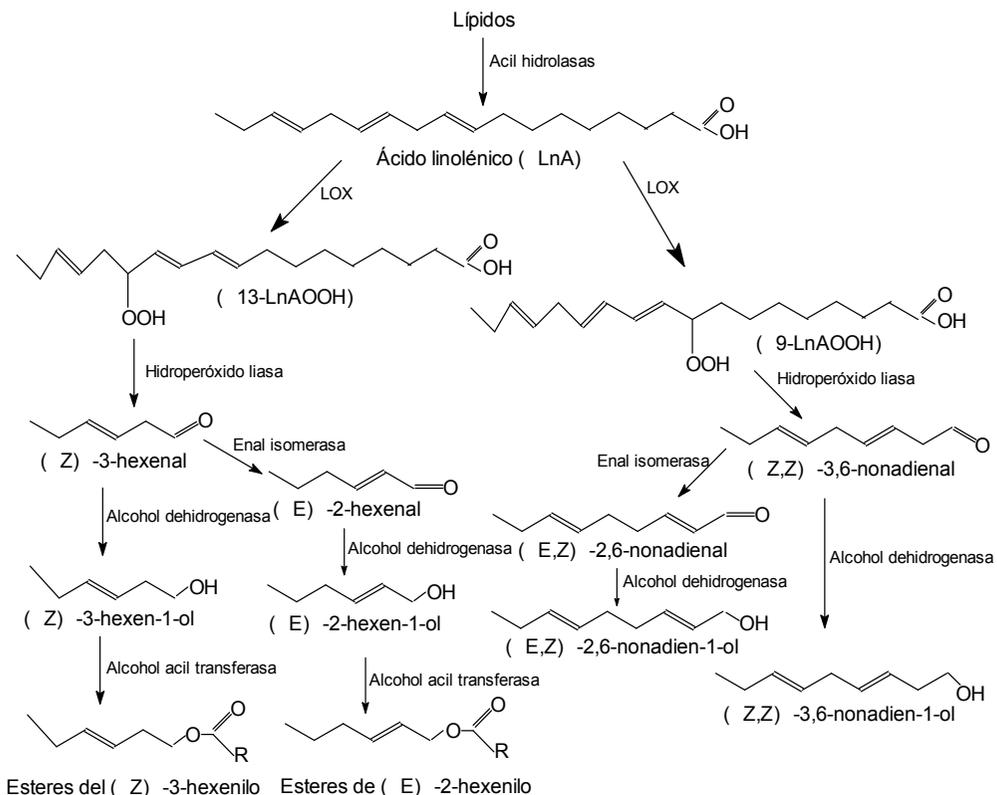
El metabolismo de los ácidos grasos poliinsaturados, iniciando por una etapa LOX-catalizada y reacciones subsiguientes es comúnmente conocido como la vía LOX (Hatanaka, 1993). Los ácidos linoleico y linolénico son los principales sustratos de la LOX. El doble enlace Z atacado por el oxígeno se mueve en conjugación con los vecinos dobles enlaces Z y asume una configuración E. En dependencia de la fuente de la planta y de isoenzimas presentes, la incorporación del oxígeno puede ocurrir preferentemente en el C-9, C-13 o en cualquiera C-9 o C-13 en una manera no-específica (Vick y Zimmerman, 1987). En las plantas, los ácidos grasos poliinsaturados hidroperoxidados inicialmente sintetizados por LOX son sustratos de distintas familias de enzimas que generan un número significativo de compuestos y que en los últimos años se han estudiado como mecanismos de defensa de las plantas (Feussner y Wasternak, 2002; Matsui, 2006). La Figura 3.4 muestra un esquema general de la formación de compuestos volátiles por la vía LOX.

La oxidación enzimática es precedida por la acción de acil hidrolasas, que liberan a los ácidos grasos poliinsaturados de los triglicéridos, fosfolípidos y glicolípidos. Aunque la mayoría de las LOX de plantas prefieren ácidos grasos libres como sustratos, se ha demostrado la actividad de LOX con ácidos grasos poliinsaturados esterificados en fosfolípidos o triglicéridos (Matsui *et al.*, 1998). La vía LOX es reconocida como la responsable de la generación del olor “verde” en las plantas (Hatanaka, 1993). Aunque algunos compuestos volátiles (carbonílicos C5) pudieran ser generados a causa de una rama adicional de la vía LOX del ácido linolénico (Gardner *et al.*, 1996), el primer compuesto volátil formado proviene de la ruptura de los hidroperóxidos del ácido graso que es catalizada por la enzima hidroperóxido liasa. La presencia de esta enzima, enlazada a la membrana, ha sido demostrada en varios productos de plantas (Matsui, 2006). La ruptura catalizada por hidroperóxido liasa genera compuestos carbonílicos C<sub>6</sub> o C<sub>9</sub> los correspondientes oxoácidos (Hatanaka *et al.*, 1986). Los productos del ácido 13-hidroperoxilinoico son hexanal y ácido (9Z)-12-oxododecenoico.

Cuando el sustrato es el ácido 13-hidroperoxilinolénico se produce el mismo oxoácido y el aldehído (*Z*)-3-hexenal. Los productos de la hidroperóxido liasa con los 9-hidroperóxidos del ácido linoleico y ácido linolénico son el ácido 9-oxononaico y (*Z*)-3-nonenal o (*Z,Z*)-3,6-nonadienal, respectivamente. Numerosos estudios han aclarado la contribución de LOX y la hidroperóxido liasa en términos de la producción de aldehídos. Así, es probable que la producción de hexenal y 3-hexenal esté determinada por la disponibilidad del sustrato a la hidroperóxido liasa más que por su abundancia de actividad (Vancanneyt *et al.*, 2001).

A partir del ácido 13-hidroperoxilinolénico y por acción de una aleno óxido sintasa, la vía LOX pasa del ácido linolénico a la familia jasmónica que incluye al ácido jasmónico y su éster metílico (Howe y Schillmiller, 2002). Ellos son esenciales no solo para las respuestas inducidas por stress, sino también para el proceso de desarrollo (Ishiguro *et al.*, 2001). Además, el jasmonato de metilo es el principal contribuyente al olor de las flores del jazmín y otras especies.

El metabolismo de los ácidos grasos 9-hidroperóxidos por las enzimas aleno óxidosintasa, hidroperóxido liasa y divinil éter sintasa genera oxilipinos estructuralmente relacionados con los oxilipinos derivados de la vía 13-LOX. Los 9-hidroperóxidos son divididos por la hidroperóxido liasa para formar los productos volátiles (*Z*)-3-nonenal, (*E*)-2-nonenal, (*Z,Z*)-3,6-nonadienal y (*E,Z*)-2,6-nonadienal (Osorio *et al.*, 2010).



**Figura 3.4 Esquema general de la formación de compuestos volátiles por la vía de la lipoxigenasa**

## Derivados de aminoácidos

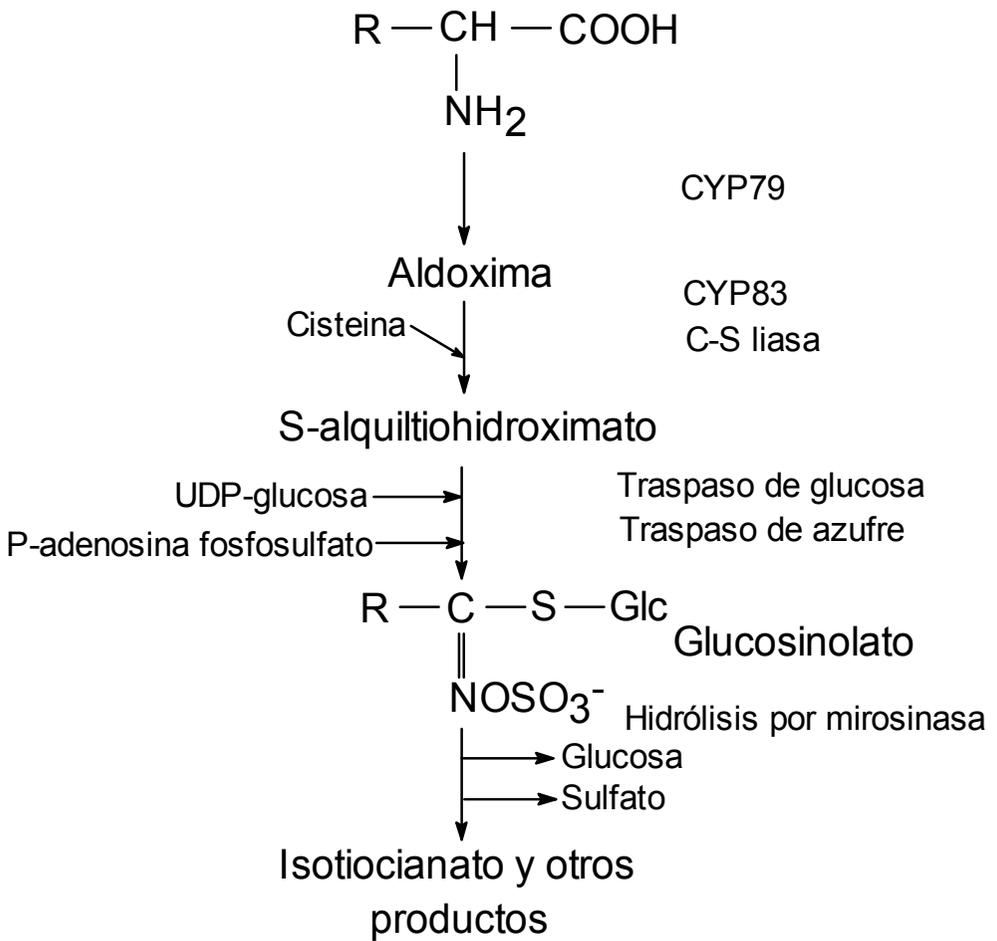
Otros aminoácidos, diferentes a la L-fenilalanina que origina los fenilpropanoides / bencenoides, tales como alanina, leucina, isoleucina y metionina, también generan compuestos volátiles como aldehídos, alcoholes, ésteres, ácidos y compuestos con átomos de nitrógeno o azufre.

El esquema general de biosíntesis procede de forma similar al que ocurre en las bacterias y levadura, donde estos mecanismos han sido más estudiados (Dickinson *et al.*, 1998, 2000; Beck *et al.*, 2002; Tavaría *et al.*, 2002). Los aminoácidos sufren una desaminación inicial o transaminación para formar un  $\alpha$ -ceto ácido. Una descarboxilación siguiente seguida de

reducciones, oxidaciones y esterificaciones producen aldehídos, ácidos, alcoholes y ésteres (Reineccius, 2006). Cuando los aminoácidos de partida son leucina, isoleucina y valina se generan compuestos volátiles de cadena ramificada.

## Derivados de glucosinolatos

Los glucosinolatos son los precursores con azufre de compuestos volátiles, tales como los nitrilos e isotiocianatos, que están presentes en la familia Brassicaceae. Existen más de 120 glucosinolatos conocidos que han sido descritos como compuestos de defensa con toxicidad documentada y efectos de aversión. La primera etapa de la biosíntesis de los glucosinolatos es la oxidación de los aminoácidos a sus respectivas aldoximas (Jones, 2008) (Figura 3.5). La siguiente etapa es la oxidación de la aldoxima y conjugación con la cisteína como donante de azufre con ruptura, probablemente por una C-S liasa para generar ácido tihidroxímico. Esto es seguido por transferencia de glucosa de la difosfato (UDP)-glucosa (generando tioglucosa) y finalmente por transferencia de sulfato de la fosfoadenosina-fosfosulfato para crear una oxima sulfonada y generar los glucosinolatos. Solo unas pocas enzimas de esta biosíntesis han sido completamente caracterizadas (Halkier y Gershenzon, 2006). Los tejidos vegetales que contienen glucosinolatos también contienen enzimas que degradan estos compuestos llamadas mirosinas. Estas enzimas están localizadas en células especiales llamadas células mirosinas, separadas de los glucosinolatos. Los productos de la hidrólisis de la mirosinasa son glucosa, sulfato y una inestable aglicona intermedaria que posteriormente sufre cambios para generar los compuestos activos al aroma: isotiocianatos, nitrilos y otros compuestos, en dependencia del pH, iones metálicos y factores proteicos (Bones y Rossiter, 2006; Burow *et al.*, 2006).



**Figura 3.5 Biosíntesis de glucosinolatos y productos de hidrólisis**

## Derivados de sulfóxidos de alqu(en)il cisteína

Estos derivados de la cisteína con sulfóxido son los precursores de los compuestos volátiles azufrados del género *Allium*. La composición química de este género se caracteriza generalmente por un gran número de compuestos de este tipo (1 a 5% base seca) siendo el sabor dependiente del dulzor de los azúcares y el aroma asociado a cuatro sulfóxidos de cisteína: sulfóxido de S-metil cisteína (metiína, presente en la mayoría de los *Allium* y en algunas *Brassicaceae*), sulfóxido de S-alil cisteína (alíina, característico del ajo), sulfóxido de S-*trans*-1-propenyl cisteína (isoalíina, característico de la cebolla) y sulfóxido de S-propil cisteína (propíina, en la cebolla y otras especies relacionadas) (Jones *et al.*, 2004). La mayoría de estos compuestos han sido identificados en el ajo y la cebolla, pero ellos está presentes en otras plantas del género (Wang *et al.*, 2008).

Los sulfóxidos de cisteína se han encontrado en forma libre y conjugado como sulfóxidos de  $\gamma$ -glutamil-S-alqu(e)il-L-cisteína. Estos péptidos son rápidamente hidrolizados por la  $\gamma$ -glutamil peptidasa o  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa, dos enzimas ampliamente distribuidas en las plantas. Lancaster y Shaw (1989) propusieron un mecanismo para la biosíntesis de varios sulfóxidos de  $\gamma$ -glutamil-S-alqu(en)ilo cisteína donde la  $\gamma$ -glutamil cisteína y el glutatión son las materiales de partida y los  $\gamma$ -glutamil péptidos son los precursores inmediatos de los sulfóxidos de cisteína. Una segunda vía alternativa, con analogías a la síntesis de cisteína, fue inicialmente propuesta por Granroth (1970), a través de una alqu(en)ilación de cisteína o tionalqu(en)ilación de O-acetil cisteína en una forma similar a la biosíntesis de muchas otros metabolitos secundarios mediados por la o-serina acetil transferasa y cisteína sintasa (Ikegami y Murakoshi, 1994). Ambas vías bioquímicas está soportadas experimentalmente (Jones *et al.*, 2004; McManuc *et al.*, 2005; Shaw *et al.*, 2005) y las discrepancias entre ambas hipótesis puede realmente reflejar rutas biosintéticas diferentes en tejidos diferentes (Jones, 2008). La etapa enzimática clave de la generación de los compuestos volátiles en las especies de *Allium* es la ruptura de los sulfóxidos de alqu(en)ilo cisteína

libres por la enzima aliinasa. Esta enzima, también llamada alquilcisteína liasa es una glicoproteína piridoxal fosfato dependiente que produce piruvato, amoníaco y compuestos volátiles azufrados. Varios tipos de aliinasas han sido aisladas y caracterizadas en el ajo y la cebolla (Lancaster *et al.*, 2000; Shimon *et al.*, 2002; Do *et al.*, 2004). Estas enzimas están en la vacuola, mientras que los sustratos están en el citoplasma por lo que la catálisis solo ocurre después que el tejido es homogenizado o roto. Los tiosulfatos son los compuestos azufrados primarios que se forman y rápidamente sufren reacciones no enzimáticas para generar un amplio número de compuestos azufrados característicos del aroma de las plantas de *Allium* y *Brassica* (Imai *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2008).

## Referencias

- Aharoni A., Jongsma M.A., Bouwmeester H.J. (2005). Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. *Trends Plant Sci.* 10, 594-602.
- Aubourg S., Lecharny A., Bohlmann J. (2002). Genomic analysis of the terpenoid synthase AtTPS gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genomics* 267, 730-745.
- Baker A., Graham I.A., Hodsworth M.; Smith S.M. (2006). Chewing the fat:  $\beta$ -Oxidation in signaling and development. *Trends Plant Sci.* 11, 124-132.
- Başer K.H.C., Demirci F. (2007). Chemistry of essential oils. En: *Flavours and Fragrances. Chemistry, Bioprocessing and Sustainability.* Berger R.G. (Ed.). Springer, Heidelberg, pp. 43-83.
- Beck H.C., Hansen A.M., Lauritsen F.R. (2002). Metabolite production and kinetics of branched-chain aldehyde oxidation in *Staphylococcus xylosus*. *Enzyme Microb. Technol.* 31, 94-101.
- Boatright J., Negre F., Chen X.L., Kish C.M., Wood B., Peel G., Orlova I., Gang D., Rhodes D., Dudareva N. (2004). Understanding in vivo benzenoid metabolism in petunia petal tissue. *Plant Physiol.* 135, 1993-2011.
- Bohlmann J., Meyer-Gauen G., Croteau R. (1998). Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 4126-4133.

- Bones A.M., Rossiter J. (2006). The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. *Phytochem.* 67, 1053-1067.
- Botella-Pavia P., Besumbes O., Phillips M.A., Carretero-Paulet L., Borona A., Rodríguez- Concepción M. (2004). Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: Evidence for a key role of hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors. *Plant J.* 40, 188-199.
- Burow M., Markert J., Gershenzon J., Wittstock U. (2006). Comparative biochemical characterization of nitrile-forming proteins from plants and insects that alter myrosinase-catalysed hydrolysis of glucosinolates. *FEBS J.* 273, 2432-2346.
- Clifford M.N. (2000). Chlorogenic acid and other cinnamates - Nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J. Sci. Food Agric.* 80, 1033-1043.
- Croteau R. (1992). Monoterpene biosynthesis, cyclization of geranyl diphosphate to sabinene. *ACS Symp. Ser.* 490, 8-20.
- Dickinson J.R., Harrison S.J., Hewlins M.J.E. (1998). An investigation of the metabolism of valine to isobutyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273, 25751-25756.
- Dickinson J.R., Harrison S.J., Dickinson J.A., Hewlins M.J.E. (2000). An investigation of the metabolism of isoleucine to active amyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 275, 10937-10942.
- Do G.S., Suzuki G., Mukai Y. (2004). Genomic organization of a novel root alliinase gene, ALL1, in onion. *Gene* 325, 17-24.
- Dudareva N., Pichersky E., Gershenzon J. (2004). Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiol.* 135, 1893-1902.
- Dudareva N., Negre F., Nagegowda D.A., Orlova I. (2006). Plant volatiles: recent advances and future perspectives, *Crit. Rev. Plant Sci.* 25 (5), 417-440.
- Eisenreich W., Schwarz M., Cartayrade A., Arigoni D., Zenk M.H., Bacher A. (1998). The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms. *Chem. Biol.* 5, 221-233.
- Estevez J.M., Cantero A., Reindl A., Reichler S., Leon P. (2001). 1-Deoxy-xylulose-5-phosphate synthase: a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem.* 276, 22901-22909.
- Feussner I., Wasternak C. (2002). The lipoxygenase pathway. *Annu. Rev. Plant*

Biol. 53, 275-297.

- Flamini G., Tebano M., Cioni P.L. (2007). Volatiles emission patterns of different plant organs and pollen of *Citrus limon*. *Anal. Chim. Acta* 589, 120-124.
- Gang D.R., Lavid N., Zubieta C., Chen F., Beuerle T., Lewinsohn E., Noel J.P., Pichersky E. (2002). Characterization of phenylpropene O-methyltransferases from sweet basil: Facile change of substrate specificity and convergent evolution within a plant OMT family. *Plant Cell* 14, 505-519.
- Gang D.R. (2005). Evolution of flavors and scents. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 301-325.
- Gardner H.W., Grove M.J., Salch Y.P. (1996). Enzymic pathway to ethyl vinyl ketone and 2-pentanal in soybean preparations. *J. Agric. Food Chem.* 44, 882-886.
- Goepfert S., Vidoudez C., Ressonico E., Hitunen J.K., Poirier Y. (2005). Molecular identification and characterization of the *Arabidopsis*  $\Delta^{3,5},\Delta^{2,4}$ -dienoyl-coenzyme A. isomerase, a peroxisomal enzyme participating in the  $\omega$ -oxidation cycle of unsaturated fatty acids. *Plant Physiol.* 138, 1947-1956.
- Goepfert S., Poirier Y. (2007). Beta-oxidation in fatty acid degradation and beyond. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 245-255.
- Granroth B. (1970). Biosynthesis and decomposition of cysteine derivatives in onion and other *Allium* species. *Ann. Acad. Sci. Fenn. A* 154: 1-71.
- Halkier B.A., Gershenzon J. (2006). Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 303-333.
- Hamberg M., Sanz A., Castresana C. (1999). Alpha-oxidation of fatty acids in higher plants. Identification of a pathogen-inducible oxygenase (piox) as an alpha-dioxygenase and biosynthesis of 2-hydroperoxylinolenic acid. *J. Biol. Chem.* 274, 24503-24513.
- Hatanaka A., Kajiwaru K., Sekiya J. (1986). Fatty acid hydroperoxide lyase in plant tissues. Volatile aldehyde formation from linoleic and linolenic acids. En: *Biogenesis of Aromas*. Parliament T.H., Croteau R. (Eds.), ACS, Washington D.C., pp. 167-175.
- Hatanaka A. (1993). The biogenesis of green odour by green leaves. *Phytochem.* 34, 1201-1218.
- Herrmann K.M., Weaver L.M. (1999). The shikimate pathway. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 473-503.

- Howe G.A., Schillmiller A.L. (2002). Oxylin metabolism in response to stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 230-236.
- Humphreys J.M., Chapple C. (2002). Rewriting the lignin roadmap. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 224-229.
- Iijima Y., Gang D., Fridman E., Lewinsohn E., Pichersky E. (2004). Characterization of geraniol synthase from the peltate glands of sweet basil. *Plant Physiol.* 134, 370-379.
- Ikegami F., Murakoshi I. (1994). Enzymic synthesis of non-protein  $\beta$ -substituted alanines and some higher homologues in plants. *Phytochem.* 35, 1089-1104.
- Imai S., Tsuge N., Tomotake M., Nagatome Y., Sawada H., Nagata T., Kumagai H. (2002). An onion enzyme that makes the eyes water. *Nature* 419, 685-690.
- Ishiguro S., Kawai-Oda A., Ueda J., Nishida I., Okada K. (2001). The defective in anther dehiscence gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in Arabidopsis. *Plant Cell* 13, 2191-2209.
- Jones M.G., Hughes J., Tregova A., Milne J., Tomsett A.B., Collin H.A. (2004). Biosynthesis of the flavor precursors of onion and garlic. *J. Exp. Bot.* 55, 1903-1918.
- Jones M.G. (2008). Formation of vegetable flavour. En: *Fruit and Vegetable Flavour*. Bruckner B., Wyllie S.G. (Eds.), Woodhead Publishing, Cambridge, England, pp. 71-102.
- Kleinig H. (1989). The role of plastids in isoprenoid biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40, 39-59.
- Koeduka T., Fridman E., Gang D.R., Vassão D.G., Jackson B.L., Kish C.M., Orlova I., Spaaova S.M., Lewis N.G., Noel J.P., Baiga T.J., Dudareva N., Pichersky E. (2006). Eugenol and isoeugenol, characteristic aromatic constituents of spices, are biosynthesized via reduction of a coniferyl alcohol ester. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 10128-10133.
- Lancaster J.E., Shaw M.L. (1989).  $\gamma$ -Glutamyl peptides in the biosynthesis of S-alk(en)yl-L-cysteine sulphoxides (flavour precursors) in *Allium*. *Phytochem.* 28, 455-460.
- Lancaster J.E., Shaw M.L., Pither Joyce M.D., McCallum J.A., McManus M.T. (2000). A novel alliinase from onion roots. Biochemical characterization

- and cDNA cloning. *Plant Physiol.* 122, 1269-1280.
- Lange B.H., Croteau R. (1999). Isopentenyl diphosphate biosynthesis via a mevalonate-independent pathway: Isopentenyl monophosphate kinase catalyzes the terminal enzymatic step. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 13714-13719.
- Lichtenthaler H.K. (1999). The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 47-66.
- Lucker J., Tamer M.K., Schwab W., Verstappen F.W.A., Van der Plaf L.M.W., Bowmeester H.J., Verhoeven H.A. (2002). Monoterpene biosynthesis in lemon cDNA isolation and functional analysis of four monoterpene synthases. *Eur. J. Biochem.* 269, 3160-3171.
- Mahmoud S.S., Croteau R.B. (2002). Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci* 7, 366-373.
- McCaskill D., Croteau R. (1995). Monoterpene and sesquiterpene biosynthesis in glandular trichomes of peppermint (*Mentha x piperita*) rely exclusively on plastid-derived isopentenyl diphosphate. *Planta* 197, 49-56.
- Martin D., Fäldt J., Bohlmann J. (2004). Functional characterization of nine Norway spruce TPS genes and evolution of gymnosperm terpene synthases of the TPS-d subfamily. *Plant Physiol.* 135, 1908-1927.
- Matsui K., Nishioka M., Ikeyoshi M., Matsumara Y., Mori T., Kajiwara T. (1998). Cucumber root lipoxygenase can act on acyl groups in phosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta* 1390, 8-20.
- Matsui K. (2006). Green leaf volatiles: Hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 274-280.
- McManus M.T., Leung S., Lambert A., Scott R.W., Pither-Joyce M., Chen B., McCallum J. (2005). Molecular and biochemical characterisation of a serine acetyl transferase of onion, *Allium cepa* (L.). *Phytochem.* 66, 1407-1416.
- Newman J. D., Chappell J. (1999). Isoprenoid biosynthesis in plants: Carbon partitioning within the cytoplasmic pathway. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 34, 95-106.
- Osorio S., Muñoz C., Valpuesta V. (2010). Physiology and Biochemistry of Fruit Flavors. En: *Handbook of Fruit and Vegetable Flavors*, Hui Y.H. (Ed.). John Wiley & Sons, Inc., Hoboken. pp. 25-43.

- Pichersky E., Noel J.P., Dudareva N. (2006). Biosynthesis of plant volatiles: Nature's diversity and ingenuity. *Science* 311, 808-811.
- Qureshi, N., Porter, W. (1981). Conversion of acetyl-coenzyme A to isopentenyl pyrophosphate. En: Porter J.W., Spurgeon S.L. (Eds.), *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds*. John Wiley & Sons, New York, pp. 47-94.
- Reineccius G. (2006). *Flavor Chemistry and Technology*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Robbins R. (2003). Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2866-2887.
- Rodriguez-Concepcion M., Boronat A. (2002). Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol.* 130, 1079-1089.
- Rohmer M. (1999). The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat. Prod. Rep.* 16, 565-574.
- Rohdich F., Hecht S., Bacher A., Eisenreich W. (2003). Deoxyxylulose phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. Discovery and function of ispDEFGH genes and their cognate enzymes. *Pure Appl. Chem.* 75, 393-405.
- Sanz C., Olías J.M., Pérez A.G. (1997). Aroma biochemistry of fruits and vegetables. En: *Phytochemistry of Fruits and Vegetables*. Barberan T., Robins R.J. (Eds.), Clarendon Press, Oxford, pp. 125-155.
- Sanz C., Pérez A.G. (2010). Plant metabolic pathways and flavor biosynthesis. En: *Handbook of Fruits and Vegetables Flavors*. Hui Y.H. (Ed.), John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, pp. 129-155.
- Schreier P. (1986). Biogenesis of plant aromas. En: *Development in Food Flavour*. Birch G.G., Lindley M.G. (Eds.), Amsterdam, Elsevier Science Publishing, pp. 89-106.
- Schwab W., Williams D.C., Davis E.M., Croteau R. (2001). Mechanism of monoterpene cyclization: Stereochemical aspects of the transformation of non-cyclizable substrate analogs by recombinant (-)limonene synthase, (+)bornyl diphosphate synthase and (-)pinene synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* 392, 123-136.
- Shaw M.L., Pither-Joyce M.D., McCallum J.A. (2005). Purification and cloning of a gamma-glutamyl transpeptidase from onion (*Allium cepa*). *Phytochem.*

66, 515-522.

- Shimon L.J.W., Rabinkov A., Miron T., Mirelman D., Wilchek M., Frolov F. (2002). Alliin lyase (alliinase) from garlic (*Allium sativum*): Crystallization and preliminary X-ray characterization. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 58, 1335-1337.
- Tavaria F.K., Dahl S., Carballo F.J., Malcata F.X. (2002). Amino acid catabolism and generation of volatiles by lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 85, 2462-2470.
- Trapp S.C., Croteau R.B. (2001). Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. *Genetics* 158, 811-832.
- Tressl R., Albrecht W. (1986). Biogenesis of aroma compounds through acyl pathways. En: *Biogeneration of Aromas*. Parliament T.H., Croteau R. (Eds.), ACS, Washington D.C., pp. 114-133.
- Vancanneyt G., Sanz C., Farmaki T., Paneque M., Ortego F., Castanera P., Sanchez-Serrano J.J. (2001). Hydroperoxide lyase depletion in transgenic potato plants leads to an increase in aphid performance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 8139-8144.
- Vick B.A., Zimmerman D.C. (1987). Pathways of fatty acid hydroperoxide metabolism in spinach leaf chloroplasts. *Plant Physiol.* 85, 1073-1078.
- Wang J., Dudareva N., Bhakta S., Raguso R.A., Pichersky E. (1997). Floral scent production in *Clarkia breweri* (Onagraceae). II. Localization and developmental modulation of the enzyme SAM:(Iso)Eugenol O-methyltransferase and phenylpropanoid emission. *Plant Physiol.* 114, 213-221.
- Wang Y., Raghavam S., Ho C.T. (2008). Process flavour of allium vegetables. En: *Fruit and Vegetable Flavour*. Bruckner B., Wyllie S.G. (Eds.), Woodhead Publishing, Cambridge, England, pp. 200-228.

## 4.- FACTORES QUE AFECTAN LA COMPOSICIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

### Introducción

Hoy en día se ha acumulado una gran cantidad de información sobre la composición química de numerosos aceites esenciales. Los componentes mayoritarios de los aceites esenciales económicamente más importantes están resumidos por Bauer *et al.* (2001). Los aceites esenciales pueden estar constituidos hasta por más de 50 compuestos químicos. Los componentes mayoritarios pueden representar hasta más del 85% de la composición, mientras que otros constituyentes están en concentraciones trazas.

La comparación de la composición de aceites esenciales reportada en diferentes estudios es, en ocasiones, difícil de hacer, si no imposible, no solamente debido a procedimientos distintos de aislamiento y análisis, sino también cuando se evalúan diferentes partes de la planta y están involucrados distintos estados de desarrollo. Con vista a determinar el mejor momento de recolección de la planta en términos de composición y rendimiento, es importante conocer los factores que influyen la producción y los requerimientos específicos.

El contenido y composición de un aceite esencial puede estar afectado por varios factores, desde la formación de la planta hasta el aislamiento final del producto. Muchos de estos factores han sido estudiados, particularmente para los aceites esenciales comerciales, con el fin de optimizar las condiciones de cultivo y tiempo de cosecha para lograr altos rendimientos y alta calidad en los aceites esenciales. Esta variabilidad en contenido y composición puede ser también importante cuando se estudian a los componentes volátiles con fines quimotaxo-

nómicos. Estos incluyen: variación fisiológica, condiciones ambientales, variaciones geográficas, así como factores genéticos y evolutivos (Marotti *et al.*, 1994; McGimpsey *et al.*, 1994; Senatore, 1996; Usai *et al.*, 1996; Russo *et al.*, 1998; Cosentino *et al.*, 1999; Juliano *et al.*, 2000; Jerkovic *et al.*, 2001; Delaquis *et al.*, 2002; Faleiro *et al.*, 2002; Gil *et al.*, 2002; Massoti *et al.*, 2003; Mirjana *et al.*, 2004; Gang, 2005; Angioni *et al.*, 2006; Figueiredo *et al.*, 2008; Petronilho *et al.*, 2011).

Los compuestos químicos son sintetizados en la planta durante su desarrollo y corresponden en cada especie a una composición específica dentro de límites predecibles. Por esta razón, se han establecido perfiles de composición y especificaciones de calidad para los aceites esenciales.

Los principales factores que afectan la producción y composición de los metabolitos secundarios de las plantas se resumen en la Tabla 4.1.

**Tabla 4.1 Factores que influyen en la producción y composición de los metabolitos secundarios de las plantas**

---

**Variaciones fisiológicas**

- Desarrollo de los órganos
- Ciclo de actividad del polinizador
- Parte de la planta
- Tipo de estructura secretora
- Daños mecánicos o químicos

**Condiciones ambientales**

- Clima
- Polución
- Enfermedades y plagas
- Factores edáficos

**Variaciones geográficas**

**Factores genéticos y evolutivos**

**Almacenamiento**

**Condiciones políticas y sociales**

**Acceso al material vegetal y necesidad de labores manuales y espacio**

---

## Variaciones fisiológicas

### Desarrollo de los órganos

**E**l estado de desarrollo del órgano de la planta (hoja, flor y fruta) puede ser determinante en la composición del aceite esencial, lo que es un aspecto a tener en cuenta para determinar el tiempo de recolección cuando estos tienen importancia económica. En muchas ocasiones, ocurre un incremento en el contenido de los compuestos volátiles durante la maduración de la flor. La composición puede sufrir cambios drásticos, pues los compuestos volátiles tienden a acumularse antes de que la flor se expanda completamente. Así por ejemplo, para *Crithmum maritimum*, se encontró que durante el periodo de floración el componente dominante fue sabineno, mientras que  $\gamma$ -terpineno lo fue durante el resto del año (Barroso et al., 1994). En *Achillea millefolium*, los hidrocarburos sesquiterpénicos fueron los constituyentes mayoritarios durante el periodo vegetativo, mientras que en el periodo de floración los hidrocarburos monoterpénicos fueron los más abundantes (Figueiredo et al., 1992). Müller-Riebau et al. (1997) reportaron que los fenoles timol y carvacrol del aceite esencial de *Satureja thymbra* incrementaron gradualmente su concentración con el desarrollo de la planta. En *Artemisia molinieri*, durante la floración, las proporciones de los componentes mayoritarios cambia, con el incremento del ascaridol mientras que el  $\alpha$ -terpineno disminuye (Massoti et al., 2003). La correlación entre estos dos constituyentes puede ser debida a la vía biosintética del ascaridol, pues según estudios en *Chenopodium ambrosioides*, el  $\alpha$ -terpineno pasa a ascaridol con un enzima peroxidasa (Johnson y Croteau, 1984). Para *Satureja cuneifolia*, el estudio de su aceite esencial de las hojas en tres estados vegetativos distintos (antes, entre y después de la floración) arrojó que el carvacrol, p-cimeno y  $\beta$ -cariofileno alcanzan un máximo durante la floración (Skočibušić et al., 2004). Así, es fácil concluir que el estado fenológico puede influir la regulación de la biosíntesis del aceite esencial.

Las fluctuaciones diurnas observadas en la composición y rendimiento de aceite esencial, así como los cambios en la composición con el desarrollo del órgano o de la planta han sido considerados como un movimiento metabólico normal. Mientras que en las fluctuaciones

diurnas, el movimiento de los terpenos depende de la fotosíntesis y de la utilización de fotosintetasas, en los cambios relacionados con el desarrollo, el contenido de monoterpenos decrece como resultado de los cambios del material almacenado (Figueiredo *et al.*, 2008). La conversión de los compuestos volátiles en su forma glicosídica es también un sistema de detoxificación eficiente para evitar la autotoxicidad, dado que convierte las agliconas en productos hidrosolubles e inactivos (Belhatab *et al.*, 2005).

Es importante señalar que las diferencias observadas en el rendimiento y composición con el desarrollo del órgano pueden ser parcialmente aplicadas por los tipos diferentes de estructuras secretorias. Las plantas con estructuras secretorias externas pueden secretar con la maduración del órgano debido a ruptura de la cutícula del tricoma, mientras que las plantas con estructuras secretorias internas generalmente mantienen un rendimiento y composición más estables.

### Ciclo de actividad del polinizador

Los volátiles tienen una función importante en las interacciones entre las plantas y su alrededor, particularmente para atraer a los polinizadores; la mayoría de los cuales son insectos, pero no es exclusivo de ellos. La combinación única de los volátiles que hacen las pequeña y no tan pequeñas diferencias entre las flores de diferentes especies pueden ser detectadas por los receptores olfativos de las antenas de los insectos permitiéndoles encontrar y visitar sus flores preferidas (Raguso, 2001; Dobson *et al.*, 2005). En algunos casos, la emisión de la fragancia floral muestra un ritmo diurno; las flores que son polinizadas en la noche por murciélagos, ratones o escarabajos nocturnos, generalmente tienden a tener un pico de emisión en la noche, mientras que en las flores que se polinizan en el día, la situación es a la inversa. Mientras que en las emisiones nocturnas los compuestos son controlados por un reloj circadiano endógeno, las emisiones por el día en muchos casos es controlada directamente por la luz. No obstante, se ha encontrado control circadiano de fragancias en algunas plantas que emiten por el día (Vainstein *et al.*, 2001).

La mayoría de las flores zoófilas (cuya polinización es por animales) poseen fragancias, con excepción de las flores ornitófilas (cuya polini-

zación es por pájaros). Aparte del color y la forma de las flores, el olor es la señal más importante para la atracción de los polinizadores a largas distancias y orientación entre las diferentes partes de las flores, en particular de los insectos nocturnos (Williams, 1983). El tipo de olor permite a los insectos diferenciar entre las flores y realizar el comportamiento necesario para que ocurra la polinización. Las orquídeas son un ejemplo de los sistemas altamente especializados con producción de simuladores de feromonas. Las abejas son los principales polinizadores de estas especies. Dodson *et al.* (1969) reportaron que el 1,8-cineol está presente en alrededor del 60% de las fragancias de las orquídeas y este compuesto atrae a las abejas.

Otro ejemplo en el que las feromonas y la fragancia de las flores afectan el comportamiento de los insectos es *Cassia fistulosa* y *Zieria smithii*. Estas plantas producen el fenilpropeno metileugenol, que atrae a la mosca de la fruta *Daucus dorsalis* (Figueiredo *et al.*, 1997). El metileugenol es emitido por los órganos florales como el estigma y pétalos de *Clarkia breweri* cuando la flor es receptiva a la polinización por insectos (Raguso y Pichersky, 1995).

Algunas orquídeas mimetizan los receptores femeninos para una especie polinizadora, con el fin de que ocurra una pseudocopulación, que es cuando el insecto masculino trata de copular con la flor, lo que se conoce como mimetismo pouyaniano (Schiestl *et al.*, 2000; Ayasse *et al.*, 2003). Las flores de las orquídeas del género *Ophrys* no solo imitan la forma, tamaño y color de las hembras de sus polinizadores, sino que también emiten una fragancia que incluye varios compuestos que se encuentran en las feromonas sexuales de las hembras. Se han comparado los compuestos volátiles emitidos por *Ophrys iricolor* y las feromonas femeninas de su especie polinizadora, *Andrena morio*, tanto desde el punto de vista químico como electrofisiológico y se han reportado más de 40 compuestos, entre ellos alcanos, alquenos y ésteres. Casi todos esos compuestos se hallaron en similares proporciones tanto en los extractos florales de *O. iricolor* como en los extractos de la superficie cuticular de las hembras de *A. morio* (Stöckl *et al.*, 2007).

## Parte de la planta

En general, solo algunas pocas especies puede producir composiciones similares de los aceites esenciales en diferentes órganos, pero lo más común es que esta composición difiera en dependencia de la parte de la planta utilizada: flores, hojas, corteza, madera, fruto completo, pericarpio del fruto, semillas o raíces (Pino *et al.*, 1996, 2001, 2003, 2008, 2009, 2010a,b,c; Olawore *et al.*, 2005; Novak *et al.*, 2005; García-Rojas *et al.*, 2009, 2010; Sandoval *et al.*, 2010; Delgado *et al.*, 2010; Bonaccorsi *et al.*, 2011).

Esta variabilidad es más evidente en las flores entomófilas, donde los componentes volátiles funcionan como indicios y así los compuestos emitidos por las flores o partes de ellas son distintos a los del resto de la planta. Por ejemplo, en *Achillea ptarmica*, casi no hay presentes monoterpenos en los aceites esenciales de las partes verdes (hojas y tallos) y raíces, mientras que abundan en las flores (Kuropka *et al.*, 1991). De forma similar, la composición de las flores de *Lavandula pinnata* fue diferente en comparación con la de las hojas y tallos durante los estados de floración y vegetativo (Figueiredo *et al.*, 1995). El estudio de los aceites esenciales de hojas y flores de *Ridolfia segetum* mostró que el de las flores fue más rico en compuestos que el obtenido de las hojas, así como que el dillapiol (2.6-3.3%) solo se encontró en las flores (Fleisher y Fleisher, 1996). La comparación entre el aceite volátil obtenido de flores y hojas de *Ocimum gratissimum* arrojó que, aunque ambos aceites poseen los mismos compuestos, existen diferencias cuantitativas para algunos de ellos, en particular para el componente mayoritario timol, cuyo contenido fue mucho mayor en el aceite volátil de la flor (Pino *et al.*, 1996).

En *Piper nigrum*, el contenido de monoterpenos es mucho mayor en el aceite esencial de los tallos en comparación con el obtenido a partir de las hojas (Pino *et al.*, 2003). Los componentes mayoritarios del aceite esencial de las hojas fueron globulol (49.7%) y  $\alpha$ -pineno (21.7%), mientras que en el aceite esencial de los tallos fueron (*E*)-cariofileno (19.5%),  $\alpha$ -terpineno (12.7%) y globulol (12.6%).

Se ha demostrado que diferentes partes de las flores emiten fragancias distintas y que estos compuestos volátiles no necesariamente están

correlacionados con los compuestos almacenados en los tejidos secretorios. Flamini *et al.* (2002a) estudiaron los constituyentes volátiles en polen, flores masculinas y femeninas de *Laurus nobilis* para determinar las diferencias de las composiciones emitidas por ellas. En los volátiles de las flores femeninas se identificaron 45 compuestos, mientras que en las masculinas fueron solo 39 componentes. Ambos tipos estuvieron constituidos principalmente por terpenos (96.2% y 92.8% en flores femeninas y masculinas, respectivamente). La fracción volátil estuvo dominada por (*E*)-ocimeno, que constituyó 65.3% de la fragancia de la flor femenina y 45.7% de la masculina, así como por 1,8-cineol (20.5% y 26.3%, respectivamente). Otros compuestos importantes encontrados en las flores masculinas fueron linalol y sus óxidos (7.1%). Las  $\alpha$ -metilcetonas solo estuvieron presentes en el polen.

En general, las cantidades de terpenoides son usualmente mayores en las estructuras reproductivas e inmediatamente antes y durante la antesis. Teniendo en cuenta la función defensiva de estos constituyentes, es también frecuente que se encuentren contenidos altos de los metabolitos secundarios en órganos jóvenes con respecto a órganos viejos (Figueiredo *et al.*, 2008).

### Tipo de estructura secretoria

Las diferencias encontradas en la composición de aceites esenciales obtenidos de diferentes partes de las plantas puede ser parcialmente explicado por la existencia de distintas estructuras secretorias que están distribuidas a lo largo de la planta. Estas pueden ser externas (trichomas y osmóforos) o internas (idioblastos, cavidades y canales). Los compuestos volátiles son generados en estructuras secretorias especializadas que minimizan el riesgo de autotoxicidad y simultáneamente permiten la presencia de altos contenidos de compuestos metabólicos en sitios donde la función defensiva o atractiva puede ser vital.

### Daños mecánicos y químicos

La emisión de compuestos volátiles además de tener un objeto como estimulante y de atracción, también tiene un objeto defensivo. Las plantas producen, bajo condiciones normales una cantidad de

metabolitos secundarios que son considerados como producción constitutiva. Una vez que sufren un daño, ya sea una herida, infestación por depredadores o tratamiento de herbicida, comienzan a producir nuevos compuestos que previamente no estaban presentes, lo que se conoce como producción inducida. Como afirmaron Figueiredo *et al.* (2008), esta diferencia entre ambas producciones puede ser ambigua pues los compuestos volátiles comúnmente desprendidos por las plantas sanas son inducidos después del daño. En la mayoría de los casos, lo que ocurre es que aumenta la producción de tales compuestos y cambian sus proporciones cuantitativas. La respuesta inducida depende del estado de desarrollo, la accesibilidad al agua, luz, etc.

El efecto del control de las malas hierbas por vía mecánica, química o combinada fue estudiado en *Mentha piperita* y *Mentha arvensis* var. *piperascens*, demostrándose que el rendimiento de aceite esencial fue mayor con el tratamiento mecánico o combinado. Además se encontró una disminución del contenido de mentofurano en el aceite esencial de *M. piperita* como resultado del tratamiento con herbicida (Zheljazkov *et al.*, 1996).

El efecto del daño por presencia de depredadores es particularmente importante en las plantas productoras de oleorresinas, que acumulan resina en las estructuras secretorias internas, como es el caso de las Coníferas. De acuerdo a Figueiredo *et al.* (1997), en *Pinus pinaster* se ha demostrado que después de la perforación de la corteza, ocurre un incremento en 2.5 veces del contenido de aceite esencial, mientras que tras la inoculación del micelio de *Verticicladiella* sp., el rendimiento aumenta en 60 veces. En *Picea* spp., la resina del tallo se acumula en los canales axiales en la corteza y como consecuencia del daño mecánico, infestación por insectos o daño fúngico, lo hace en los conductos de resina dañados (Martin *et al.*, 2002).

Numerosos estudios han demostrado que las plantas se auto-protegen mediante la producción de compuestos volátiles en respuesta al daño o ataque de herbívoros. Los olores emitidos por las plantas atacadas por herbívoros son mezclas complejas (Dicke y van Loon, 2000). Los compuestos volátiles emitidos pueden afectar directamente la fisiología del herbívoro y su comportamiento debido a propiedades tóxicas, repelentes o disuasivas (Bernasconi *et al.*, 1998; De Moraes *et al.*, 2001;

Kessler y Baldwin, 2001; Vancanneyt *et al.*, 2001; Aharoni *et al.*, 2003). Estos metabolitos secundarios también pueden atraer enemigos de los herbívoros atacantes, tales como avispas, moscas o ácaros, los cuales pueden proteger a la planta de daños graves (Dicke *et al.*, 1990; Turlings *et al.*, 1990; Vet y Dicke, 1992; Pare y Tumlinson, 1997; Drukker *et al.*, 2000; Kessler y Baldwin, 2001).

Se ha demostrado que es posible mediante mutagénesis por radiaciones gamma lograr cambios en la emisión absoluta de compuestos volátiles y reducir la cantidad total de compuestos emitidos en flores de *Jasminum polyanthum Pepita* in situ (Christensen *et al.*, 1997).

## Condiciones ambientales

### Clima

**E**n general, la producción de aceites esenciales es dependiente de las condiciones climáticas. Cualquier cambio climatológico como los huracanes, inundaciones, sequías y nevadas, puede causar afectaciones en la industria de aceites esenciales.

En *Pinus sylvestris* y *Picea abies* se ha comprobado que, bajo condiciones de estrés inducidas por sequedad, la cantidad total de terpenos y ácidos resinoides se incrementa, en coincidencia con una disminución del crecimiento de las plantas (Turtola *et al.*, 2003). El estrés hídrico parece estar relacionado directamente con el incremento de la producción de compuestos volátiles en varias especies, tales como *Anethum graveolens*, *Artemisia dracunculus* y *Ocimum basilicum*, mientras que en *Artemisia annua*, *Coriandrum sativum* y *Thymus vulgaris* se incrementa solamente el rendimiento con una irrigación normal o elevada (Figueiredo *et al.*, 1997).

Los compuestos terpénicos volátiles son capaces de proteger a las plantas del daño por calor al mantener la velocidad de fotosíntesis y de esta forma, favorecer la termotolerancia a temperaturas elevadas (Sharkey *et al.*, 2001; Loreto *et al.*, 1998; Copolovici *et al.*, 2005; Penuelas *et al.*, 2005; Sharkey y Yeh, 2001).

## Polución

**D**e acuerdo a Figueiredo *et al.* (2008), aunque es conocido que ocurre, el efecto perjudicial de la polución del aire en la producción de compuestos volátiles es difícil de evaluar, debido a que la respuesta puede confundirse con otros tipos de estrés. El ozono es considerado uno de los mayores agentes de polución de las plantas. Los compuestos terpénicos volátiles pueden ser antioxidantes que protejan a las plantas contra efectos de estrés oxidativo inducido por el ozono (Loreto *et al.*, 2001; Loreto y Velikova, 2001) y la acumulación de oxígeno singlete (Affek y Yakir, 2002). Al frenar la emisión de monoterpenos mediante la fosmidomicina, las hojas de *Quercus ilex* fueron susceptibles al ozono resultando en una reducción rápida y significativa de la fotosíntesis, acumulación de especies reactiva de oxígeno y peroxidación de la membrana (Loreto *et al.*, 2004).

El efecto de otros agentes de polución, tales como los gases de combustión de los vehículos y fuegos, puede ser incrementado por el viento, lluvia y la temperatura. Este efecto ha sido poco estudiado y en ocasiones sus resultados difieren de acuerdo al agente (Judzentiene *et al.*, 2007).

## Enfermedades y plagas

**E**s obvio que la existencia de distintas enfermedades y plagas pueden causar inestabilidad en los mercados de productos aromáticos. Así por ejemplo, en el cultivo de *Piper nigrum* en la India, alrededor de 30-40% de la cosecha se ha perdido por la acción del escarabajo *Longitarsus nigripennis* (Weiss, 1997).

El virus del mosaico, transmitido por áfidos, infecta al *Agastache anethiodora* y causa una reducción del 88% en el rendimiento de aceite esencial, así como cambios en la composición (Bruni *et al.*, 2007).

La infección de la raíz de *Arabidopsis thaliana* con la bacteria *Pseudomonas syringae* o el hongo *Alternaria brassicola*, así como el ataque de insectos (*Diuraphis noxia*) causa una rápida emisión de 1,8-cineol (Steeghs *et al.*, 2004), monoterpeno oxigenado con reconocida actividad antimicrobiana (van Vuuren y Viljoen, 2007). Este compuesto

también exhibe un efecto disuasivo y tóxico ante ciertos insectos (Tripathi *et al.*, 2001).

Se ha demostrado que los compuestos volátiles emitidos por las raíces de *Thuja occidentalis* ante el ataque de la larva del gorgojo (*Otiorhynchus sulcatus*) atraen al nematodo entomopatogénico *Heterorhabditis megidis* (Boff *et al.*, 2001; van Tol *et al.*, 2001). En un comportamiento similar, la infestación de las raíces del nabo con la larva de *Delia radicum* provoca un desprendimiento de compuestos volátiles que atraen al parásito *Trybliographa rapae* (Neveu *et al.*, 2002).

La planta de maíz al ser atacada por la larva del escarabajo *Diabrotica virgifera virgifera* genera (*E*)- $\beta$ -cariofileno. Se ha identificado a este hidrocarburo sesquiterpénico como la primera señal de raíz atacada por insecto que atrae al nematodo entomopatogénico *Heterorhabditis megidis* (Rasmann *et al.*, 2005).

### Factores edáficos

**E**l tipo y composición del suelo es un factor determinante en el rendimiento de aceite esencial y su composición química.

Del análisis del aceite esencial de cuatro poblaciones de *Thymus caespitius* recolectadas en un rango de 200 m en una misma ladera de una montaña en Azores y la ausencia de diferencias morfológicas se sugirió que los factores genéticos y edáficos fueron los responsables de las diferencias en composición (Pereira *et al.*, 2000).

Es conocido que el crecimiento y supervivencia de muchas especies vegetales es afectado cuando se cultivan en suelos secos, con la consiguiente reducción de la cosecha y el rendimiento de aceite esencial, así como cambios en la composición del aceite esencial (Figueiredo *et al.*, 2008). El suplemento al suelo de nitrógeno, fósforo y potasio causa un incremento en el rendimiento de aceite esencial, aunque adicionados de forma separada, se obtienen resultados diferentes en cuanto a rendimiento y composición química (Hornok, 1988). Por otra parte, en otros estudios el contenido de nitrógeno del suelo no ha tenido influencia en la composición química del aceite esencial (Figueiredo *et al.*, 1997).

## Variaciones geográficas

Es un hecho demostrado que las variaciones geográficas influyen en el rendimiento y composición de los aceites esenciales, causando en muchas ocasiones, el desarrollo de distintas razas químicas o quimotipos. Algunos ejemplos son los estudios en *Anethum graveolens* (Badoc y Lamarti, 1991), *Zingiber officinale* (Weiss, 1997), *Crithmum maritimum* (Pateira *et al.*, 1999), *Thymus carnosus* (Miguel *et al.*, 2005) y *Thymus caespititius* (Santos *et al.*, 2005).

El estudio de Pino *et al.* (1993a) con relación a la composición del aceite esencial de cilantro (*Coriandrum sativum*) de cuatro países arrojó algunas diferencias cuantitativas (Tabla 4.2), lo que era de esperar de acuerdo a la variabilidad reportada para esta especie (Pino y Borges, 1999). La concentración más baja de linalol fue para el aceite esencial de cilantro cosechado en la India. Otras diferencias fueron mayor contenido de p-cimeno y (Z)-óxido de linalol, así como menor contenido de  $\gamma$ -terpineno para las muestras de Italia e India. Sensorialmente, los aceites esenciales del cilantro cosechado en Rusia y Albania fueron superiores al resto, principalmente debido a una nota sensorial más frutal.

Para el laurel (*Laurus nobilis*), el aceite esencial de cuatro países europeos reflejó diferencias cuantitativas en su composición (Tabla 4.3) (Pino *et al.*, 1993b). El aceite esencial del laurel de Albania tuvo el mayor contenido de alcoholes, ésteres y bencenoides, así como el menor contenido de hidrocarburos y 1,8-cineol. Los compuestos bencenoides tienen un gran aporte sensorial a la calidad del aceite esencial de laurel, lo que fue confirmado pues el aceite esencial de Albania fue sensorialmente superior al resto de los aceites esenciales.

**Tabla 4.2 Composición (%) del aceite esencial de cilantro de diferentes orígenes (1)**

Compuesto	Rusia	Italia	Albania	India
$\alpha$ -Pino	4.9	3.1	3.1	5.4
Canfeno	1.8	<0.1	0.4	1.3
Sabineno	0.2	<0.1	<0.1	<0.1
$\beta$ -Pino	0.4	<0.1	0.2	<0.1
Mirceno	1.3	<0.1	1.2	<0.1
<i>p</i> -Cimeno	3.9	13.0	4.1	14.7
Limoneno	3.8	3.1	3.6	2.9
$\alpha$ -Terpineno	8.8	1.0	5.6	<0.1
(Z)-Óxido de linalol	<0.1	2.4	<0.1	3.2
Terpinoleno	1.0	1.7	0.5	2.6
Linalol	58.8	56.0	57.4	49.2
Alcanfor	6.6	9.9	4.8	9.6
Borneol	0.5	1.0	0.7	1.9
$\alpha$ -Terpineol	0.5	1.0	0.7	2.9
Citronelol	<0.1	-	1.1	<0.1
Geraniol	2.5	3.4	4.6	2.6
Acetato de geraniol	4.2	2.4	2.6	0.6
$\beta$ -Cariofileno	<0.1	-	0.2	-

(1) Según Pino et al. (1993a)

**Tabla 4.3 Composición (%) del aceite esencial de laurel de diferentes orígenes (1)**

Grupo	Albania	Francia	Italia	España
Hidrocarburos monoterpénicos	19.8	24.3	32.6	24.0
1,8-Cineol	26.7	43.5	38.1	43.0
Alcoholes	21.0	11.5	12.3	10.3
Ésteres	13.0	9.5	7.8	8.6
Hidrocarburos sesquiterpénicos	2.6	2.1	1.0	0.4
Bencenoides	9.2	4.0	6.0	5.0

(1) Según Pino *et al.* (1993a)

El potencial productivo de dos diferentes ecotipos de *Rosmarinus officinalis* (Cevoli y Lunigiana) cultivados en un área del litoral de Pisa (Italia) fue estudiado con relación al rendimiento de aceite esencial y su composición química (Flamini *et al.*, 2002b). El contenido de aceite esencial promedio de ambos ecotipos fue similar, pero hubo marcadas diferencias con respecto a las partes de la planta. La mayor diferencia entre ambos aceites esenciales fue en el contenido de 1,8-cineol (6.6%

para *Cevoli* y 37.9% para *Lunigiana*). Otras diferencias fueron mayor concentración de alcanfor,  $\alpha$ -pineno, mirceno y borneol en el aceite esencial de *Cevoli* con respecto al obtenido de *Lunigiana*. Las plantas de *Lunigiana* pueden ser definidas como quimotipo 1,8-cineol, mientras que las de *Cevoli* pueden ser consideradas como quimotipo  $\alpha$ -pineno / borneol.

De acuerdo a Figueiredo *et al.* (2008) las diferentes composiciones de aceites esenciales de especies de distintos orígenes reflejan las condiciones ambientales diferentes de cada lugar y las condiciones culturales. Además, las diferencias por el origen geográfico también pueden ser consecuencia de diferencias genéticas y del procesamiento del material vegetal después de la cosecha.

## Factores genéticos y evolutivos

La composición de los aceites esenciales es controlada genéticamente de acuerdo a los estudios genéticos reportados. Los estudios en diferentes especies del género *Mentha* han mostrado el control genético en la conversión de  $\alpha$ -terpineol a limoneno y su oxidación posterior a carvona. Asimismo, otro genotipo produce un mentadieno que es convertido a pulegona y mentol. Para otras especies como *Abies*, *Achillea*, *Clarkia*, *Cupressus*, *Juniperus*, *Perilla*, *Pinus*, *Salvia* y *Thymus*, también se ha comprobado que la composición química de sus aceites esenciales está determinada genéticamente (Croteau, 1988; Figueiredo *et al.*, 1997; Theis y Lerda, 2003; Nemeth, 2005; Gang, 2005).

En los últimos años se han hecho progresos significativos en la identificación de genes y enzimas involucradas en la biosíntesis de compuestos volátiles y en la manipulación del perfil de compuestos volátiles en las plantas (Dudareva y Negre, 2005; Dudareva y Pichersky, 2008). Sin embargo, las manipulaciones metabólicas rinden a menudo resultados impredecibles, lo que refleja la falta de conocimiento del funcionamiento de las redes metabólicas y su regulación en las plantas, así como la limitada noción de la organización de la cadena metabólica, la localización subcelular de las enzimas y las vías metabólicas. La caracte-

rización molecular y bioquímica en combinación con el análisis de flujo metabólico y la modelación deben aplicarse para dar una fundamentación teórica a la manipulación exitosa del perfil de compuestos volátiles y para identificar los puntos críticos para la ingeniería metabólica futura. La identificación de los compuestos llave compuestos involucrados en las defensas de la planta, así como la atracción de insectos y sus efectos en la conducta del insecto en estudios del campo, también contribuirán grandemente a la selección del objetivo.

## Almacenamiento

El almacenamiento del material vegetal puede afectar también la composición del aceite esencial. El método de secado usado puede causar modificaciones físicas y químicas que influyen en la calidad del material vegetal, tales como cambios en apariencia y olor, estos últimos debido a pérdidas de compuestos volátiles. Por otra parte, el secado minimiza la posibilidad de contaminación microbiana y previene de algunas reacciones bioquímicas negativas. Factores tales como la luz, humedad, temperatura, contaminaciones, oxidación, entre otros, pueden afectar el rendimiento y composición de los compuestos volátiles. El tipo de estructura secretoria es importante a tener en cuenta con relación al almacenamiento. Las estructuras secretorias internas son menos propensas a la transformación de los compuestos volátiles que las estructuras externas (*trichomas*) que pueden sufrir rupturas y hacen más vulnerable al material vegetal en la transportación y almacenamiento. Especies como *Anethum graveolens*, *Cananga odorata*, *Carum carvi*, *Chamomila recutita*, *Jasminum grandiflorum*, *Ocimum basilicum*, *Sassafras albidum* y *Zingiber officinale* disminuyen el rendimiento en aceite esencial y se afecta su composición química durante el almacenamiento y secado; mientras que otras no se afectan o mejoran su calidad sensorial como sucede con *Vanilla planifolia* (Figueiredo *et al.*, 1997). En esta especie, las enzimas hidrolíticas ( $\beta$ -glucosidasa y otras glicosil hidrolasas) y los sustratos (glucovainillina y otros precursores del aroma) están separados espacialmente. El curado de las vainas permite el

contacto entre los sustratos y las enzimas, de forma tal que la vainillina y otros constituyentes volátiles son generados.

## Condiciones políticas y sociales

**D**e acuerdo a Verlet (1993), el 55% de la producción de aceites esenciales corresponde a países en desarrollo, 35% a países industrializados y 10% a los países de Europa oriental. Es indudable que debido a la riqueza de la flora natural y los bajos costos de la labor manual, los países en desarrollo son la fuente principal de material vegetal para la producción de aceites esenciales. Sin embargo, la inestabilidad política, la insuficiente capacidad de inversión y de control de calidad limitan el suministro estable de aceites esenciales (Figueiredo *et al.*, 2008).

## Acceso al material vegetal y necesidad de labores manuales y espacio

**E**l acceso al material vegetal y la necesidad de labores manuales y espacio para el procesamiento, aunque no afectan directamente la producción de compuestos volátiles, tienen una incidencia en la comercialización debido a la disponibilidad y precio.

El desarrollo de la técnica con la introducción de la mecanización ha permitido bajar costos de producción.

## Referencias

- Affek H.P., Yakir D. (2002). Protection by isoprene against singlet oxygen in leaves. *Plant Physiol.* 129, 269-277.
- Aharoni A., Giri A.P., Deuerlein S., Griepink F., de Kogel W.J., Verstappen F.W.A., Verhoeven H.A., Jongsma M.A., Schwab W., Bouwmeester H.J. (2003).

Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic Arabidopsis plants. *Plant Cell* 15, 2866-2884.

- Angioni A., Barra A., Coroneo V., Dessi S., Cabras P. (2006). Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. spp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *J. Agric. Food Chem.* 54, 4364-4370.
- Ayasse M., Schiestl F.P., Paulus H.F., Ibarra F., Francke W. (2003). Pollinator attraction in a sexually deceptive orchid by means of unconventional chemicals. *Proc. Royal Soc. B* 270 (1514), 517-522.
- Badoc A., Lamarti A. (1991). A chemotaxonomic evaluation of *Anethum graveolens* L. (dill) of various origins. *J. Essent. Oil. Res.* 3 (3), 269-278.
- Barroso J.G., Pedro L.G., Figueiredo A.C., Pais M.S.S., Scheffer J.J.C. (1994). Seasonal variation in the composition of the essential oil of *Crithmum maritimum* L. *Flavour Fragr. J.* 7 (3), 147-150.
- Bauer K., Garber D., Surburg H. (2001). *Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses*. 2<sup>nd</sup> edn., Wiley-VCH, Weinheim.
- Belhattab R., Larous L., Figueiredo A.C., Santos P.A.G., Barroso J.G., Pedro L.G. (2005). *Origanum glandulosum* Desf. grown wild in Algeria: Essential oil composition and glycosidic bound volatiles. *Flavour Fragr. J.* 20, 209-213.
- Bernasconi M.L., Turlings T.C.J., Ambrosetti L., Bassetti P., Dorn S. (1998). Herbivore-induced emissions of maize volatiles repel the corn leaf aphid, *Rhopalosiphum maidis*. *Entomol. Exp. Appl.* 87, 133-142.
- Boff M.I.C., Zoon F.C., Smits, P.H. (2001). Orientation of *Heterorhabditis megidis* to insect hosts and plant roots in a Y-tube sand olfactometer. *Entomol. Exp. Appl.* 98, 329-337.
- Bonaccorsi I., Dugo P., Mondello L., Sciarrone D., Dugo G., Haro-Guzmán L. (2011). Analytical characterization of industrial essential oils from fruits and leaves of *C. aurantifolia* Tan. and *C. latifolia* Swing. *J. Ess. Oil Res.* 23, 68-79.
- Bruni R., Bianchi A., Bellardi M.G. (2007). Essential oil composition of *Agastache anethiodora* Britton (Lamiaceae) infected by cucumber mosaic virus (CMV). *Flavour Fragr. J.* 22 (1), 66-70.
- Christensen L.P., Jakobsen H.B., Kristiansen K., Møller J. (1997). Volatiles emitted from flowers of  $\gamma$ -radiated and nonradiated *Jasminum polyanthum* Franch. *in situ*. *J. Agric. Food Chem.* 45, 2199-2203.

- Copolovici L.O., Filella I., Llusia J., Niinemets U., Penuelas J. (2005). The capacity for thermal protection of photosynthetic electron transport varies for different monoterpenes in *Quercus ilex*. *Plant Physiol.* 139, 485-496.
- Cosentino S., Tuberoso C.I.G., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E., Palmas F. (1999). In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiol.* 29, 130-135.
- Croteau R (1988). Catabolism of monoterpenes in essential oil plants. En: *Flavors and Fragrances: A World Perspective*. Lawrence B.M., Mookherjee B.D., Willis B.J. (Eds). Elsevier, Amsterdam, pp. 65-84.
- Delaquis P.J., Stanich K., Girard B., Mazza G. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *Int.. J. Food Microbiol.* 74, 101-109.
- Delgado P.A., Quijano C.E., Morales G., Pino J. (2010). Composition of the essential oil from leaves and fruits of *Hedyosmum colombianum* Cuatrec. grown in Colombia. *J. Essent. Oil Res.* 22 (3), 234-236.
- De Moraes C.M., Mescheer M.C., Tumlinson J.H. (2001). Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel nonspecific females. *Nature* 410, 577-580.
- Dicke M., Abelson M.W., Takabayashi J., Bruin J., Posthumus M.A. (1990). Plant strategies of manipulating predator-prey interactions through allelochemicals: Prospects for application in pest control. *J. Chem. Ecol.* 16, 3091-3117.
- Dicke M., van Loon J.J.A. (2000). Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. *Entomol. Exp. Appl.* 97, 237-249.
- Dodson C.H., Dressler R.L., Hills H.G., Adams R.M., Williams N.H. (1969). Biologically active compounds in orchid fragrances. *Sci.* 164 (3885), 1243-1249.
- Dobson H.E.M., Raguso R.A., Knudsen J.T., Ayasse M. (2005). Scent as an attractant. En: *Dafni A., Kevan P.G., Husband B.C. (Eds.), Practical Pollination Biology*. Enviroquest, Ltd., Cambridge, Ontario, Canada, pp. 197-199.
- Drukker B., Bruin J., Jacobs G., Kroon A., Sabelis M.W. (2000). How predatory mites learn to cope with variability in volatile plant signals in the environment of their herbivorous prey. *Exp. Appl. Acarol.* 24, 881-895.
- Dudareva N., Negre F. (2005). Practical applications of research into the regulation of plant volatile emission. *Current Opinion in Plant Biology* 8,

113-118.

- Dudareva N., Pichersky E. (2008). Metabolic engineering of plant volatiles. *Current Opinion in Biotechnology* 19,181-189.
- Faleiro M.L., Miguel M.G., Ladeiro F., Venancio F., Tavares R., Brito J.C., Figueiredo A.C., Barroso J.G., Pedro L.G. (2002). Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Letters in Applied Microbiol.* 36, 35-40.
- Figueiredo A.C., Barroso J.G., Pais M.S.S., Scheffer J.J.C. (1992). Composition of the essential oils from leaves and flowers of *Achillea millefolium* L. ssp. *millefolium*. *Flavour Fragr. J.* 7 (4), 219-222.
- Figueiredo A.C., Barroso J.G., Pedro L.G., Sevinante-Pinto I., Antunes T., Fontinha S.S., Looman A., Scheffer J.C. (1995). Composition of the essential oil of *Lavandula pinnata* L. fil. var. *pinnata* grown on Madeira. *Flavour Fragr. J.* 10 (2), 93-96.
- Figueiredo A.C., Barroso J.G., Pedro L.G., Scheffer J.J.C. (1997). Physiological aspects of essential oil production. En: *Essential Oils: Basic and Applied Research: Proceedings of the 27<sup>th</sup> International Symposium on Essential Oils*, Franz Ch., Máthé Á., Buchbauer G. (Eds.). Allured, Carol Stream, IL., pp. 95-107.
- Figueiredo A.C., Barroso J.G., Pedro L.G., Scheffer J.J.C. (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour Fragr. J.* 23, 213-226.
- Flamini G., Cioni P.L., Morelli I. (2002a). Differences in the fragrances of pollen and different floral parts of male and female flowers of *Laurus nobilis*. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4647-4652.
- Flamini G., Cioni P.L., Morelli I., Macchia M., Ceccarini L. (2002b). Main agronomic-productive characteristics of two ecotypes of *Rosmarinus officinalis* L. and chemical composition of their essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3512-3517.
- Fleisher Z., Fleisher A. (1996). Volatiles of leaves and flowers of *Ridolfa segerum* L. Moris. *Aromatic plants of the Holy Land and the Sinai. Part XII. J. Essent. Oil Res.* 8 (2), 189-191.
- Gang D.R. (2005). Evolution of flavors and scents. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 301-325.
- García-Rojas A., Quijano C.E., Morales G., Pino J. (2009). Composition of the

- essential oil from leaves and fruits of *Margyricarpus pinnatus* (Lam.) O. Kuntze grown in Colombia. J. Essent. Oil Res. 21 (6), 17-19.
- García-Rojas A., Fontecha-García J., Peralta-Bohórquez A., Quijano C.E., Morales G., Pino J. (2010). Composition of the essential oil from leaves and fruits of *Salvia palaefolia* Kunth grown in Colombia. J. Essent. Oil Res. 22 (4), 369-370.
- Gil A., De la Fuente E.B., Lenardis A.E., López Pereira M., Suárez S.A., Bandoni A., Van Baren C., Di Leo Lira P., Ghersa C.M. (2002). Coriander essential oil composition from two genotypes grown in different environmental conditions. J. Agric. Food Chem. 50, 2870-2877.
- Hornok L. (1988). Effect of environmental factors on the production of some essential oil plants. En: Flavors and Fragrances: A World Perspective. Lawrence B.M., Mookherjee B.D., Willis B.J. (Eds). Elsevier, Amsterdam, pp. 129-140.
- Jerkovic I., Mastelic J., Milos M. (2001). The impact of both the season of collection and drying on the volatile constituents of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* grown wild in Croatia. Int. J. Food Sci. Technol. 36, 649-654.
- Johnson M.A., Croteau R. (1984). Biosynthesis of ascaridole: iodide peroxidase-catalyzed synthesis of a monoterpene endoperoxide in soluble extracts of *Chenopodium ambrosioides* fruit. Arch. Biochem. Biophys. 235, 254-266.
- Judzentiene A., Stikliene A., Kupcinskiene E. (2007). Changes in the essential oil composition in the needles of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) under anthropogenic stress. Sci. World J. 7 (Suppl. 1), 141-150.
- Juliano C., Mattana A., Usai M. (2000). Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-barona* Loisel growing wild in Sardinia. J. Essent. Oil Res. 12, 516-522.
- Kessler A., Baldwin I.T. (2001). Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. Science 291, 2142-2143.
- Kuropka G., Neugebauer M., Glombitza K.-W. (1991). Essential oils of *Achillea ptarmica*. Planta Med. 57 (5), 492-494.
- Loreto F., Forster A., Durr M., Csiky O., Seufert G. (1998). On the monoterpene emission under heat stress and on the increased thermotolerance of leaves of *Quercus ilex* L. fumigated with selected monoterpenes. Plant Cell Environ. 21, 101-107.
- Loreto F., Velikova V. (2001). Isoprene produced by leaves protects the

- photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiol.* 127, 1781-1787.
- Loreto F., Mannozi M., Maris C., Nascetti P., Ferranti F., Pasqualini S. (2001). Ozone quenching properties of isoprene and its antioxidant role in leaves. *Plant Physiol.* 126, 993-1000.
- Loreto F., Pinelli P., Manes F., Kollist H. (2004). Impact of ozone on monoterpene emissions and evidence for an isoprene-like antioxidant action of monoterpenes emitted by *Quercus ilex* leaves. *Tree Physiol.* 24, 361-367.
- Marotti M., Piccaglia R., Giovanelli E. (1994). Effects of planting time and mineral fertilization on peppermint (*Mentha piperita* L.) essential oil composition and its biological activity. *Flavour Fragr. J.* 9, 125-129.
- Martin D., Tholl D., Gershenzon J., Bohlmann J. (2002). Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of Norway spruce stems. *Plant Physiol.* 129 (3), 1003-1018.
- Massoti V., Juteau F., Bessière J.M., Viano J. (2003). Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7115-7121.
- McGimpsey J.A., Douglas M.H., Van Klink J.L., Beauregard D.A., Perry N.B. (1994). Seasonal variation in essential oil yield and composition from naturalized *Thymus vulgaris* L. in New Zealand. *Flavour Fragr. J.* 9, 347-352.
- Miguel M.G., Duarte J., Figueiredo A.C., Barroso J.G., Pedro L.G. (2005). *Thymus carnosus* Boiss.: Effect of harvesting period, collection site and type of plant material on essential oil composition. *J. Essent. Oil Res.* 17 (4), 422-426.
- Mirjana S., Nada B., Valerija D. (2004). Variability of *Satureja cuneifolia* Ten. essential oils and their antimicrobial activity depending on the stage of development. *Eur. Food Res. Technol.* 218, 367-371.
- Müller-Riebau F.J., Berger B.M., Yegen O., Cakir C. (1997). Seasonal variations in the chemical compositions of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. *J. Agric. Food Chem.* 45, 4821-4825.
- Nemeth E. (2005). Essential oil composition of species in the genus *Achillea*. *J. Essent. Oil Res.* 17, 501-512.
- Neveu N., Grandgirard J., Nenon J.P., Cortesero A.M. (2002). Systemic release of

- herbivore-induced plant volatiles by turnips infested by concealed root-feeding larvae *Delia radicum* L. J. Chem. Ecol. 28, 1717-1732.
- Novak J., Draxler L., Göhler I., Franz C.M. (2005). Essential oil composition of *Vitex agnus-castus* - Comparison of accessions and different plant organs. Flavour Fragr. J. 20 (2), 186-192.
- Olawore N.O., Ogunwande I.A., Ekundayo O., Adeleke K.A. (2005). Chemical composition of the leaf and fruit essential oils of *Murraya paniculata* (L.) Jack. (Syn. *Murraya exotica* Linn.). Flavour Fragr. J. 20 (1), 54-56.
- Paré P.W. Tumlinson J.H. (1997). De novo biosynthesis of volatiles induced by insect herbivory in cotton plants. Plant Physiol. 114, 1161-1167.
- Pateira L., Nogueira T., Antunes A., Venâncio F., Tavares R., Capelo J. (1999). Two chemotypes of *Crithmum maritimum* L. from Portugal. Flavour Fragr. J. 14 (5), 333-343.
- Penuelas J., Llusia J., Asensio D., Munne-Bosch S. (2005). Linking isoprene with plant thermotolerance, antioxidants and monoterpene emissions. Plant Cell Environ. 28, 278-286.
- Pereira S.I., Santos P.A.G., Barroso J.G., Figueiredo A.C., Pedro L.G., Salgueiro L.R., Deans S.G., Scheffer J.J.C. (2000). Chemical polymorphism of the essential oils from populations of *Thymus caespitius* grown on the island S. Jorge (Azores) Phytochem. 55, 241-246.
- Petronilho S., Maraschin M., Delgadillo I., Coimbra M.A., Rocha S.M. (2011). Sesquiterpenic composition of the inflorescences of Brazilian chamomile (*Matricaria recutita* L.): Impact of the agricultural practices. Industrial Crops and Products 34, 1482-1490.
- Pino J., Borges P., Roncal E. (1993a). Compositional differences of coriander fruit oils from various origins. Nahrung/Foods 37 (2), 119-122.
- Pino J., Borges P., Roncal E. (1993b). The chemical composition of laurel leaf oil from various origins. Nahrung/Foods 37 (6), 592-595.
- Pino J., Rosado A., Fuentes V. (1996). Composition of the essential oil from the leaves and flowers of *Ocimum gratissimum* L. grown in Cuba. J. Essent. Oil Res. 8(2), 139-141.
- Pino J., Borges P. (1999). Los componentes volátiles de las especias. VII. Cilantro. Alimentaria (301), 75-78.
- Pino J., Marbot R., Agüero J., Fuentes V. (2001). Essential oil from buds and leaves of clove (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry) grown in Cuba.

- J. Essent. Oil Res. 13 (4), 278-279.
- Pino J., Agüero J., Fuentes V. (2003). Chemical composition of the aerial parts of *Piper nigrum* L. from Cuba. J. Essent. Oil Res. 15 (3), 209-210.
- Pino J., Perera W., Sarduy R., Oviedo R., Quijano C.E. (2008). Essential oil from the stems, leaves and flowers of *Pluchea rosea* Godfrey and *Pluchea purpurascens* (Sw.) DC. J. Essent. Oil Res. 20 (6), 497-501.
- Pino J., Cuevas-Glory L., Sauri-Duch E. (2009). Volatile constituents of peel and leaf oils from calamondin. J. Essential Oil-Bearing Plants 12 (6), 656-660.
- Pino J., Cuevas-Glory L., Sauri-Duch E. (2010a). Volatile constituents of peel and leaf oils from *Citrus limetoides* Tan. J. Essent. Oil Bearing-Plants 13 (3), 292-296.
- Pino J., Cuevas-Glory L., Sauri-Duch E. (2010b). Volatile constituents of peel and leaf oils from Cajel orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck). J. Essent. Oil Bearing-Plants 13 (6), 742-745.
- Pino J., Regalado E., Rodríguez J.L., Fernández M.D. (2010c). Phytochemical analysis and in vitro free radical scavenging activities of the essential oils from leaf and fruit of *Melaleuca leucadendra* L. Chem. & Biodiver. 7, 2281-2288.
- Raguso R.A., Pichersky E. (1995). Floral volatiles from *Clarkia breweri* and *C. concina* (Onagraceae): recent evolution of floral scent and moth pollination. Plant. Syst. Evol. 194, 55-67.
- Raguso R.A. (2001). Floral scent, olfaction, and scent-driven foraging behavior. En: Chittka L., Thompson J.D. (Eds.), Cognitive Ecology of Pollination. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 83-105.
- Rasmann S., Kollner T.G., Degenhardt J., Hiltbold I., Toepfer S., Kuhlmann U., Gershenzon J., Turlings T.C.J. (2005). Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize. Nature 434, 732-737.
- Russo M., Galletti G.C., Bocchini P., Carnacini A. (1998). Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) letswaart): A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis: 1. Inflorescences. J. Agric. Food Chem. 46, 3741-3746.
- Sandoval J.S., Quijano C.E., Morales G., Pino J. (2010). Composition of the essential oil from the leaves and fruits of *Morella pubescens* (Humb. et Bonpl. ex Willd.) Wilbur grown in Colombia. J. Essent. Oil Res. 22 (2), 133-

- Santos P.A.G., Barroso J.G., Figueiredo A.C., Pedro L.G., Salgueiro L.R., Fontinha S.S., Deans S.G., Scheffer J.J.C. (2005). Chemical polymorphism of populations of *Thymus caespititius* grown on the islands Corvo, Flores, São Miguel and Terceira (Azores) and on Madeira, assessed by analysis of their essential oils. *Plant Sci.* 169 (6), 1112-1117.
- Schiestl F.P., Ayasse M., Paulus H.F., Löfsted, C., Hansson B.S., Ibarra F., Francke W. (2000). Sex pheromone mimicry in the early spider orchid (*Ophrys sphegodes*): Patterns of hydrocarbons as the key mechanism for pollination by sexual deception. *J. Comp. Physiol. A* 186 (6), 567-574.
- Senatore F. (1996). Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in Campania (Southern Italy). *J. Agric. Food Chem.* 44, 1327-1332.
- Sharkey T.D., Chen X.Y., Yeh S.S. (2001). Isoprene increases thermotolerance of fosmidomycin-fed leaves. *Plant Physiol.* 125, 2001-2006.
- Sharkey T.D., Yeh S.S. (2001). Isoprene emission from plants. *Annu. Rev. Plant. Phys.* 52, 407-436.
- Skočibušić M., Bezić N., Dunkić V. (2004). Variability of *Satureja cuneifolia* Ten. essential oils and their antimicrobial activity depending on the stage of development. *Eur. Food Res. Technol.* 218, 367-371.
- Steeghs M., Bais H.P., de Gouw J., Goldan P., Kuster W., Northway M., Fall R., Vivanco J.M. (2004). Proton-transfer-reaction mass spectrometry (PTR-MS) as a new tool for real time analysis of root-secreted volatile organic compounds (VOCs) in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 135, 47-58.
- Stökl J., Twele R., Erdmann D.H., Francke W., Ayasse M. (2007). Comparison of the flower scent of the sexually deceptive orchid *Ophrys iricolor* and the female sex pheromone of its pollinator *Andrena morio*. *Chemoecol.* 17 (4), 231-233.
- Theis N., Lerda M. (2003). The evolution of function in plant secondary metabolites. *Int. J. Plant Sci.* 164, 93-102.
- Tripathi A.K., Prajapati V., Aggarwal K.K., Kumar S. (2001). Toxicity, feeding deterrence, and effect of activity of 1,8-cineole from *Artemisia annua* on progeny production of *Tribolium castaneum* (Coleoptera:Tenebrionidae). *J. Econ. Entomol.* 94, 979-983.

- Turlings T.C.J., Tumlinson J.H., Lewis W.J. (1990). Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science* 250, 1251-1253.
- Turtola S., Manninen A.-M., Rikala R., Kainulainen P. (2003). Drought stress alters the concentration of wood terpenoids in Scots pine and Norway spruce seedlings. *J. Chem. Ecol.* 29 (9), 1981-1995.
- Usai M., Picci V., Arras G. (1996). Influence of cultivar on the composition of lemon peel oil. *J. Essent. Oil Res.* 8, 149-158.
- Vainstein A., Lewinsohn E., Pichersky E., Weiss D. (2001). Floral fragrance. New inroads into an old commodity. *Plant Physiol.* 127, 1383-1389.
- Vancanneyt G., Sanz C., Farmaki T., Paneque M., Ortego F., Castanera P., Sanchez-Serrano J.J. (2001). Hydroperoxide lyase depletion in transgenic potato plants leads to an increase in aphid performance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 8139-8144.
- Van Tol R.W.H.M., van der Sommen A.T.C., Boff M.I.C., van Bezooijen J., Sabelis M.W., Smits P.H. (1990). Plants protect their roots by alerting the enemies of grubs. *Ecol. Lett.* 4, 292-294.
- Van Vuuren S.F., Viljoen A.M. (2007). Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole alone and in combination. *Flavour Fragr. J.* 22, 540-544.
- Verlet N. (1993). En: *Volatile Oil Crops: Their Biology, Biochemistry and Production*. Hay K.M., Waterman G. (Eds.). Longman Scientific & Technical, London, pp. 137-174.
- Vet L.E.M., Dicke M. (1992). Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. *Annu. Rev. Entomol.* 37, 141-172.
- Weiss E.A. (1997). *Essential Oil Crops*. CAB International, Wallingford, UK.
- Williams N.H. (1983). Floral fragrances as cues in animal behaviour. En: *Handbook of Experimental Pollination Biology*. Jones C.E., Little R.J. (Eds.), Academic Press, New York, pp. 50-72.
- Zheljazkov V., Yankov B., Topalov V. (1996). Effect of mechanical and chemical weed control on the growth, development and productivity of *Mentha piperita* and *M. arvensis* var. *piperascens* grown for planting material. *J. Essent. Oil. Res.* 8 (2), 171-176.

## 5.- OBTENCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

### Introducción

Los aceites esenciales pueden ser obtenidos de las semillas, raíces, flores, hojas, cortezas y cáscaras de las frutas por procesos destilativos o mecánicos. Estos son procesos muy simples, pero en particular, la destilación sufre de varios inconvenientes: degradación térmica, hidrólisis y solubilización en agua que pueden alterar el olor y sabor de muchos aceites esenciales extraídos por esta técnica.

La obtención de los aceites esenciales puede ser con fines analíticos o comerciales, lo que definirá la escala del procedimiento a utilizar. Es evidente que para fines analíticos se requiere mucho menos material vegetal y garantizar que el aceite esencial obtenido represente, lo más genuinamente posible, la composición original en el material vegetal; mientras que para fines industriales se requiere de una cantidad de material vegetal abundante y de un proceso tecnológico que garanticen una buena rentabilidad económica.

### Preparación del material vegetal

La obtención de un aceite esencial comienza por la preparación del material vegetal que se recolecta antes, durante o tras la floración. Se recolectan las hojas, flores, tallos y rizomas, según sea el material de interés. En la mayoría de los casos se requiere de una preparación del material antes de la destilación. Estas pueden ser: limpieza, trituración, remojo (en los casos en que el material es muy duro) y secado.

Si es necesario el material vegetal puede ser triturado antes de la destilación. La trituración del material provoca su calentamiento que puede llegar hasta los 95°C en dependencia del molino utilizado, el tamaño de partícula que se desea y la naturaleza del material a triturar. La temperatura crítica del posible deterioro por la pérdida de compuestos volátiles y oxidación es entre 32 y 36°C, por lo que en ocasiones es conveniente utilizar molinos refrigerados mediante circulación de agua o algún líquido refrigerado.

En los casos que se requiere secar el material antes de la destilación, por lo general, se deja secar en literas al aire, aunque pueden usarse equipos de secado a temperaturas preferentemente no superiores a 40°C. Si el material no es secado correctamente pueden aparecer hongos cuyos metabolitos imparten un olor “terroso” al aceite esencial.

Teniendo en cuenta que el producto de la extracción puede variar en calidad, cantidad y composición en dependencia de diversos factores, es necesario controlar el material vegetal y las condiciones de extracción para obtener un aceite esencial de características homogéneas (Masotti *et al.*, 2003; Angioni *et al.*, 2006).

## Métodos de obtención a escala industrial

Los métodos comerciales más comunes para la obtención de los aceites esenciales pueden clasificarse en: enflorado, prensado, expresión y destilación.

En el enflorado (*enfleurage* por su nombre original en francés) se utilizan grasas naturales con temperaturas de ablandamiento alrededor de 40°C, normalmente manteca de cerdo refinada, blanqueada y desodorizada. La grasa se extiende en bandejas de profundidad no mayor a 0,5 cm y sobre ellas se coloca el material vegetal de donde se van a extraer los componentes aromáticos. El contacto puede durar de 3 a 5 días. Pasado ese tiempo, el material vegetal es retirado y reemplazado por material fresco, repitiendo la operación hasta la saturación de la grasa. Posteriormente, la grasa impregnada del principio activo se lava con etanol. El etanol se filtra y se destila a vacío (20 mm de Hg) hasta

recuperar un 80% del volumen de etanol, separándolo así del residuo, que se conoce como aceite absoluto. Es un método aplicado para las flores de jazmín y lavanda.

En el prensado, el material vegetal es sometido a presión, bien sea en prensas discontinuas (tipo *batch*) o continuas. Para los cítricos, en la antigüedad se empleaba el método manual de la esponja, que consistía en exprimir manualmente las cáscaras de la fruta con una esponja hasta que se empapa de aceite. Posteriormente se exprimía la esponja y se liberaba el aceite esencial. Aunque se considera que es el método que proporciona los aceites esenciales de mayor calidad, en la actualidad no se usa comercialmente.

La expresión o expresión en frío es usada en las frutas cítricas y consiste en exprimir mecánicamente las cortezas de las frutas para liberar el aceite esencial a temperatura ambiente. El pericarpio de las frutas es presionado y el fluido que contiene el aceite esencial es separado. Generalmente se usa agua para mejorar la remoción del aceite esencial de los residuos sólidos. El aceite esencial es separado de la emulsión obtenida mediante gravedad, centrifugación o destilación fraccionada. Existen diferentes equipos comerciales diseñados para tal fin. Los aceites esenciales obtenidos por prensado y exprimido se comercializan como “exprimidos en frío”. La mayoría de los cítricos se procesan comercialmente por esta vía, con la excepción de la lima mexicana (*Citrus aurantifolia*) cuyo aceite esencial mayormente se obtiene como subproducto de la obtención del jugo y es recobrado por destilación de la mezcla aceite esencial-jugo al triturar la fruta entera. Hasta principios del siglo XVIII, la producción industrial del aceites esenciales exprímidos en frío se hacía manualmente, pero posteriormente se incorporaron equipos mecanizados para este fin como son: “*Sfumatrici*”, “*Pellatrici*”, “*Brown oil extractor*” y “*FMC whole fruit process*”.

La destilación es uno de los procedimientos más empleados para la obtención de aceites esenciales, debido a su simplicidad en cuanto a equipos a utilizar y al bajo costo. La destilación puede ser definida como una operación en la cual una mezcla de sustancias es separada en sus componentes mediante el uso de calor. En el caso particular de los aceites esenciales, industrialmente son varios los métodos utilizados de

acuerdo a la manera en que estén en contacto el agua y el material vegetal: hidrodestilación, destilación por arrastre con agua-vapor, destilación por arrastre con vapor y destilación seca.

Todas estas destilaciones están basadas en el principio de que en un sistema heterogéneo formado por dos líquidos inmiscibles, tales como el agua y un aceite esencial, los vapores emitidos por cada uno de ellos no se influyen y por tanto, sus presiones de vapor se adicionan totalmente. Al ir calentando al sistema llegará un momento en el cual la presión se iguala a la presión atmosférica y entonces el sistema entrará en ebullición. La presión parcial de cada vapor será inferior la presión externa, de forma tal que los líquidos ebullicarán a temperaturas inferiores a sus puntos de ebullición, bajo la presión actual. Como consecuencia, todo líquido no miscible con el agua puede ser arrastrado por este a una temperatura más baja que su punto de ebullición.

La hidrodestilación es un proceso en el que el material vegetal se sumerge completamente en agua en estado de ebullición. El agua penetra en los tejidos de la planta, disuelve parte del aceite esencial presente en los distintos órganos de la planta y pasa a ser posteriormente recolectado por condensación en un separador de aceite esencial (denominado comúnmente como vaso florentino), el cual puede ser para aceites esenciales más o menos denso que el agua (Figura 5.1). Este método requiere tiempos largos de calentamiento y la utilización de grandes cantidades de agua, lo cual incrementa el costo y tiempo de la destilación, pero no requiere de un generador de vapor.

Acerca de los métodos generales de destilación, poca investigación se ha hecho del proceso en el cual el vapor de agua aísla los compuestos volátiles del aceite esencial. Frecuentemente se asume que el vapor de agua penetra en los tejidos del material vegetal y vaporiza todas las sustancias volátiles. Si esto fuera cierto, el aislamiento del aceite esencial de las plantas por hidrodestilación sería un proceso bastante simple que solo requeriría una cantidad suficiente de vapor de agua. Sin embargo, este modelo en ocasiones no es capaz de describir la etapa de extracción en el proceso y por tanto, la predicción completa de la destilación a partir de la matriz sólida mediante modelos matemáticos es bastante difícil (Pessoa *et al.*, 2010). En el proceso también ocurre hidrodifusión pues el vapor de agua penetra en el tejido de la planta y disuelve parte del aceite

esencial presente, proceso que se ve favorecido para los compuestos más polares. Este proceso continua hasta que todo el aceite esencial es removido del tejido. Por esta razón, la dinámica de la destilación muestra que los compuestos oxigenados, a pesar de tener mayores puntos de ebullición, destilan antes que los hidrocarburos terpénicos (Koedam, 1980).

Se han descrito distintos modelos para el proceso de hidrodestilación (Benyoussef *et al.*, 2002; Hanci *et al.*, 2003; Sovová y Aleksovski, 2006; Milojević *et al.*, 2008; Sowbhagya *et al.*, 2007, 2008; Babu y Singh, 2009; Stanisavljević *et al.*, 2010; Benyoussef y Saibi, 2013) y para arrastre con vapor de agua (Koul *et al.*, 2004; Romdhane y Tizaoui, 2005; Cerpa *et al.*, 2008; Cassel *et al.*, 2009; Xavier *et al.*, 2011). Todos estos modelos están basados en:

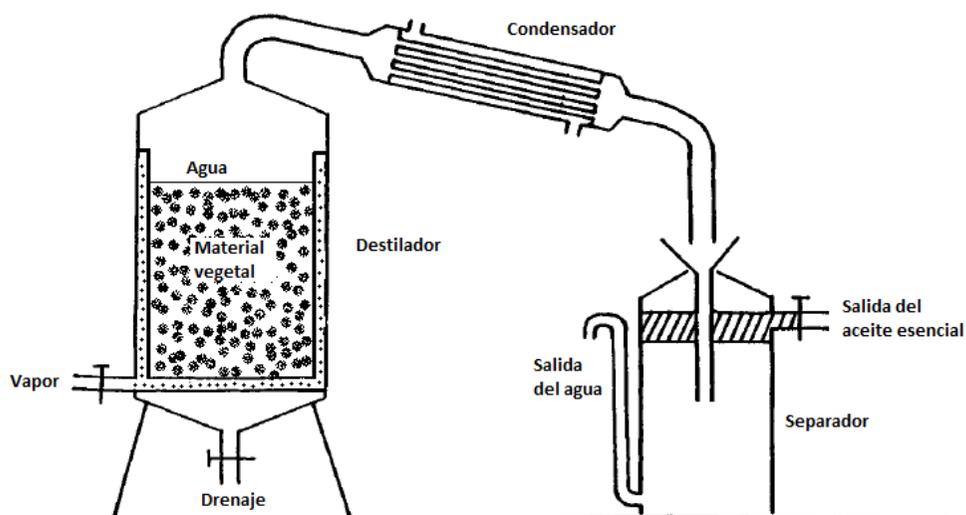
- (i) el aceite esencial es un pseudo-componente con propiedades constantes durante el proceso;
- (ii) las partículas de la planta son iguales en tamaño, forma y contenido inicial de aceite esencial;
- (iii) el agua hirviendo con las partículas de la planta es simulado como una cama fluidizada; y
- (iv) resistencia a la transferencia de masa insignificante entre el agua hirviendo y la fase vapor, de forma tal que el equilibrio se alcanza instantáneamente entre las fases (Benyoussef y Saibi, 2013).

Los aceites esenciales obtenidos mediante hidrodestilación presentan, por lo general, olores fuertes y colores más oscuros, en comparación con los producidos por otros métodos. Este olor “a quemado” tiende a disminuir durante el almacenamiento del aceite esencial (Wright, 1999). Además, pueden tener menor calidad, ya que algunos componentes, como los ésteres, pueden experimentar la hidrólisis, algunos hidrocarburos monoterpénicos o aldehídos son susceptibles a la polimerización y los compuestos oxigenados, como los fenoles, tienden a ser algo solubles en agua.

Existen infinidad de ejemplos de la alteración en la composición química debido a la hidrodestilación. Así por ejemplo, el clavo (*Eugenia caryophyllata*) proporciona por hidrodestilación un aceite esencial que

contiene 90% de eugenol y 5 a 12% de  $\beta$ -cariofileno; mientras que el producto obtenido por extracción con benceno no contiene este hidrocarburo sesquiterpénico y muestra una pequeña proporción de óxido de cariofileno (Garnero, 1976).

Una alteración química que ha sido bien estudiada es la que ocurre con los aceites esenciales ricos en acetato de linalilo, como el de lavanda, donde en función del tiempo y pH del medio acuoso de la hidrodestilación puede ocurrir al hidrólisis del éster con la consiguiente liberación del alcohol linalol (Schmaus y Kubeczka, 1985). También ocurre con el acetato de  $\alpha$ -terpinilo en el aceite esencial de cardamomo, con la consiguiente liberación del alcohol  $\alpha$ -terpineol.

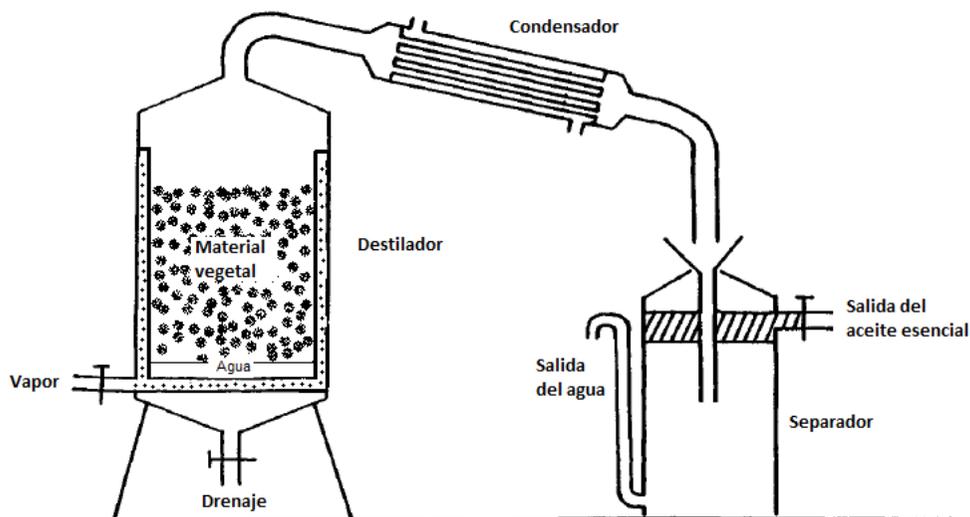


**Figura 5.1 Diagrama de un hidrodestilador típico**

Otro ejemplo es la formación del chamazuleno, un sesquiterpene bicíclico de color azul, presente en el aceite esencial destilado a partir de la flor de manzanilla alemana (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert) y que se forma por degradación de la matricina en una serie de reacciones químicas complejas.

En la destilación con agua y vapor, el material vegetal se coloca sobre un fondo perforado o criba, la cual está ubicada a cierta distancia del fondo del destilador. La parte más baja contiene agua hasta una altura algo menor que el nivel de la criba. El principio de la destilación con agua

y vapor es llevar el agua a su estado de ebullición, en donde el vapor generado a baja presión atraviesa el material vegetal, arrastrando los compuestos volátiles, de tal manera, que todos los vapores generados puedan ser posteriormente condensados y recolectados (Figura 5.2). El tiempo total de destilación es función de la naturaleza de los componentes presentes en el aceite esencial. Cuando el aceite contiene compuestos con puntos de ebullición altos, entonces el tiempo de destilación será muy largo.



**Figura 5.2 Diagrama de un destilador típico de arrastre con vapor y agua**

La destilación por arrastre con vapor de agua es el procedimiento más antiguo y más usado industrialmente. Es similar al proceso anterior, solo que en este se genera el vapor por separado en una caldera y se inyecta por debajo del recipiente que contiene el material vegetal atravesándolo, así extrae y arrastra el aceite esencial que pasa por el condensador y se separa en el separador (Figura 5.3). Este vapor de agua puede ser saturado o sobresaturado y en este último caso, fluye a una presión más alta.

Su uso se radica en el bajo consumo energético y no ocasiona transformación química en los componentes del aceite esencial. Su fundamento es que por efecto de la temperatura del vapor (100°C) en un

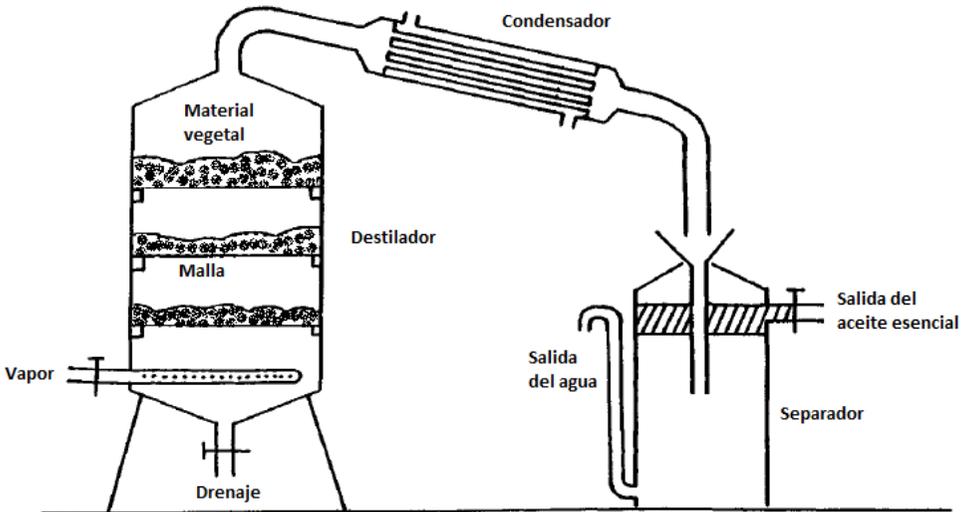
cierto tiempo, el tejido vegetal se rompe liberando el aceite esencial, el cual presenta en estas condiciones una presión de vapor:

$$P_T = P_T + P_a$$

La fracción de aceite esencial en la mezcla de vapor será:

$$Y_a = P_a / P_T$$

en donde:  $P_T$  = presión total,  $P_v$  = presión parcial de vapor y  $P_a$  = presión parcial del aceite.



**Figura 5.3 Diagrama de un destilador típico de arrastre con vapor**

Este método que requiere mayor sofisticación pues es necesario con un generador de vapor externo, en este caso, un caldero, el cual genera vapor que puede ser transportado por tuberías hacia la cámara de extracción, este vapor puede ser seco o húmedo y puede estar a presiones entre 3 y 6 kg-f/cm<sup>2</sup> (Guenther, 1972-1998).

De manera general, la extracción por arrastre de vapor se describe de la siguiente manera: la materia prima vegetal es cargada en un extractor, de manera que forme un lecho fijo compactado. El vapor de agua es inyectado por la parte inferior, próximo a su base y con la presión suficiente para vencer la resistencia hidráulica del lecho. La generación del vapor es remota mediante una caldera de vapor. Conforme el vapor entra en contacto con el lecho, el material vegetal se calienta y va

liberando el aceite esencial contenido y éste, a su vez, debido a su alta volatilidad se va evaporando. Al ser soluble en el vapor circundante, es “arrastrado”, corriente arriba hacia el tope del extractor. La mezcla, vapor saturado y aceite esencial, fluye hacia un condensador, mediante un “cuello de cisne” o prolongación curvada del conducto de salida del extractor. En el condensador, la mezcla es condensada y enfriada, hasta la temperatura ambiental. A la salida del condensador, se obtiene una mezcla que es separada en un separador de aceite esencial (Guenther, 1972-1998).

Este procedimiento de destilación requiere, por lo general, de instalaciones fijas por la necesidad de una caldera de vapor. Sin embargo, en el sistema “en sitio” (*on-site*) se produce el aceite esencial en camiones cisternas adaptados donde se carga el material vegetal en el propio campo y son posteriormente conducidos a un centro de destilación donde se encuentra la caldera de vapor. Esto se aplica para la menta, salvia, lavanda y árbol del té.

Los rendimientos de aceite esencial generalmente varían entre menos del 1% a unos pocos por cientos, basado en el peso del material de partida (Bauer *et al.*, 2001).

En casi todos los procedimientos de destilación, el agua del condensador debe reciclarse a una torre de enfriamiento por medio de una bomba. El agua del proceso puede realimentarse al hervidor para aumentar los rendimientos intentando obtener parte del aceite esencial que pudo ser arrastrado o disuelto parcialmente en el primer destilado (cohobación). De esta forma se logra un mayor rendimiento y un producto final más balanceado. El material exhausto o residuo puede usarse como compost y abonos.

En la aplicación de este método pueden existir algunos problemas técnicos que deben ser controlados. Uno de ellos está relacionado con el olor “a cocinado” en el producto final. Las razones de este defecto se deben no sólo a que parte del material pueden ser secados por el vapor, sino también a que porciones del vapor inyectado se condensan en el destilador, extraen compuestos hidrosolubles que fluyen hacia el serpentín por donde emerge el vapor y causan la descomposición de

estos compuestos. Este daño puede ser minimizado si se drena el destilador periódicamente (Pruthi, 1980).

Otro daño posible es que los aceites esenciales recién destilados poseen un olor asociado “a alambique”. Tanto este defecto como el anterior pueden ser eliminados pasando una corriente de algún gas inerte a través del aceite esencial. Sin embargo, este tratamiento puede causar la pérdida de las notas frescas del producto.

Un problema que puede ocurrir durante la destilación es la formación de canales en el material vegetal, lo que causa bajos rendimiento, obstrucción en el destilador y sobrecalentamientos, los cuales pueden ser evitados con una selección adecuada del tamaño de partículas durante la molienda.

El tiempo de destilación es una variable que debe ser controlada pues afecta el rendimiento y la composición del aceite esencial (Cannon *et al.*, 2013; Zheljzkov *et al.*, 2013a,b,c).

Un aspecto importante es la separación eficiente de la fase acuosa del destilado. La separación del aceite esencial y del agua destilada depende de los factores siguientes (Kashchenko *et al.*, 1971): composición del aceite esencial, temperatura del destilado, velocidad de la destilación y diseño del separador. En la medida que aumenta la temperatura del destilado, la densidad y viscosidad del aceite esencial disminuyen considerablemente en comparación con el agua. La efectividad (K) de la separación entre las dos fases puede representarse por la fórmula siguiente:

$$K = W_2 / W_1$$

donde  $W_1$  es la velocidad a la cual las partículas del aceite esencial entran en el separador y  $W_2$  es la velocidad de las partículas de aceite esencial que ascienden hasta la superficie.

Las velocidades  $W_1$  y  $W_2$ , así como su variación durante la destilación dependen de no sólo del diseño del separador y de la velocidad de destilación, sino también de la temperatura del destilado. Sin embargo, no existe una relación proporcional entre la temperatura del destilado y la eficiencia de la separación. La mayor eficiencia en el proceso se logra entre 25 y 35°C.

La destilación seca sólo es conveniente para unos pocos aceites esenciales y es empleada usualmente para destilar el aceite esencial de exudados tales como los bálsamos. La destilación destructiva causa la formación de compuestos químicos no presentes en el material vegetal original. Un ejemplo típico es el aceite esencial de brea de enebro, producido a partir de la destilación seca de la madera del junípero o enebro rojo (*Juniperus oxycedrus*).

Con el incremento del precio de la energía, se buscan tecnologías innovativas que reduzcan el consumo de energía, con la consiguiente reducción de los costos y sin disminuir la calidad del producto final. En este sentido, se ha propuesto el uso de microondas en combinación con la destilación por arrastre con vapor (Ferhat *et al.*, 2007; Farhat *et al.*, 2011), la hidrodifusión combinada con microondas y gravedad (Vian *et al.*, 2008; Bousbia *et al.*, 2009a), difusión con vapor y microonda (Farhat *et al.*, 2009) y extracción sin disolvente y con microonda (Lucchesi *et al.*, 2007). Los procesos asistidos con microondas brindan varias ventajas en el aislamiento de aceites esenciales como son tamaño reducido del equipamiento, facilidad de uso, velocidad y facilidad de control del proceso, todos los cuales contribuyen a reducir el impacto ambiental y costos. No obstante todo lo anterior, estos procedimientos solo se reportan en estudios a escala de laboratorio (Périno-Issartier *et al.*, 2013).

## Métodos de obtención a escala de laboratorio

Los métodos más comunes para la obtención de los aceites esenciales con fines analíticos están basados, en su inmensa mayoría, en la hidrodestilación. A pesar de las desventajas antes mencionadas que posee este método, el hecho de que pueda estandarizarse el aparato y el procedimiento operativo ha favorecido su aceptación por organizaciones importantes como AOAC, FAO y todas las Farmacopeas del mundo. Además, es un método por el cual se obtienen aceites esenciales con composiciones similares a las que se logran en la destilación por arrastre con vapor que es el método comercial comúnmente empleado.

Existen otros procedimientos de aislamiento como son la extracción con fluido supercrítico, extracción con disolvente orgánico, hidrodestilación asistida con microondas, destilación-extracción simultáneas, turbohidrodestilación y microextracción en fase sólida, entre otras (Lo Presti *et al.*, 2005; Salehi *et al.*, 2007; Bousbia *et al.*, 2009b; Silva y Câmara, 2013; Périno-Issartier *et al.*, 2013; Mohamadi *et al.*, 2013), que si bien pueden tener, en algunos casos, como ventaja un menor tiempo de operación, todas adolecen del problema de la representatividad de la composición obtenida con relación al aceite esencial que se obtendría por destilación por arrastre con vapor.

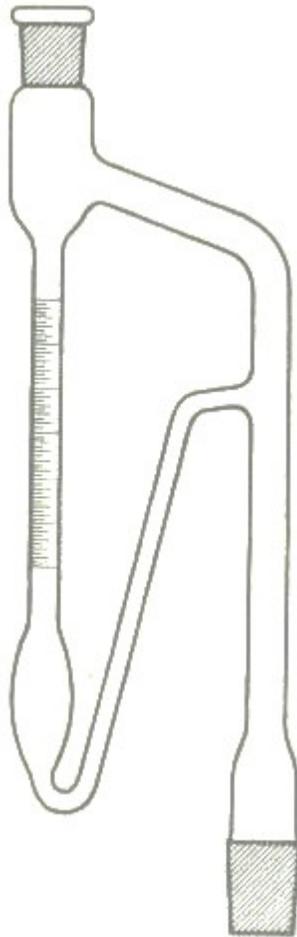
Para medir el volumen de aceite esencial destilado se requiere de una trampa especial, en dependencia de si el aceite esencial es menos o más denso que el agua. En el primer caso se usa la trampa de Clevenger (Figura 5.4) y en el segundo caso, la trampa de Bidwell-Sterling (Figura 5.5). En cualquiera de los dos casos, se coloca suficiente material vegetal, previamente tarado, en un matraz de destilación y se adiciona suficiente agua destilada para cubrir el material y ebulliciones. Puede adicionarse algún agente antiespumante si el material lo requiere. Entonces se conecta la trampa y un condensador con recirculación de agua a temperatura ambiente al matraz para calentar hasta reflujo por 2 a 4 h. El volumen de aceite esencial presente en la muestra se lee directamente en la escala graduada de la trampa.

La expresión para determinar el contenido de aceite esencial es la siguiente:

$$\text{Contenido de aceite esencial (\% v/m)} = V \times 100 / M (100-H)$$

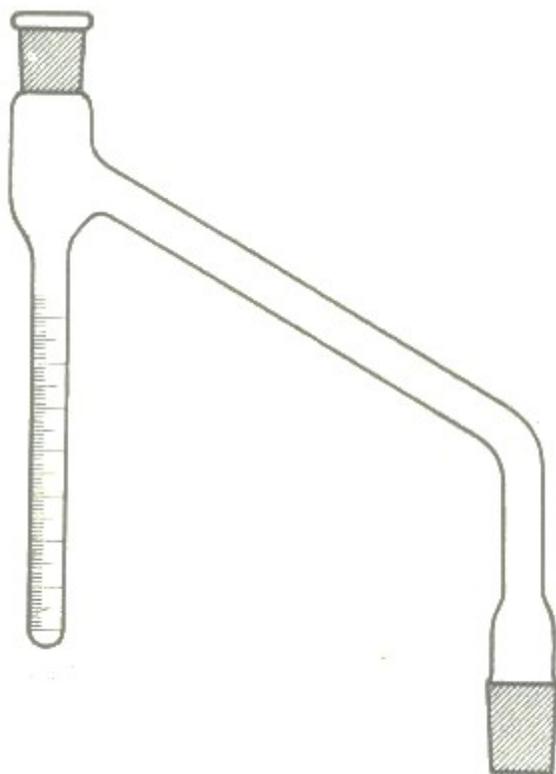
donde V es el volumen de aceite esencial recolectado (mL), M es la masa de material vegetal (g) y H es la humedad del material vegetal (%).

En esta expresión se incluye la humedad del material vegetal, que debe ser determinada cuando el material no es recién recolectado y ha estado sometido a algún proceso de secado previo antes de la determinación de aceite esencial.



**Figura 5.4 Aparato de hidroddestilación simple para aceites menos densos que el agua**

La obtención de muy pequeñas cantidades de aceites esenciales puede ser imprescindible cuando se cuenta con poca muestra vegetal y puede ser muy útil en investigaciones. Bicchi *et al.* (1983) describieron una modificación del equipo de Marcusson que con solo 0.2 a 3 g de material vegetal suspendido en 50 mL de agua puede ser destilado y colectado en 100  $\mu$ L de alg un disolvente volátil. Los resultados analíticos demuestran que el aceite esencial obtenido es similar al que se obtiene por la destilación convencional.



**Figura 5.5 Aparato de hidroddestilación simple para aceites más densos que el agua**

Una nueva dimensión en la obtención de aceites esenciales fue la introducción de la destilación-extracción simultáneas, desarrollada por Likens y Nickerson (1964) (Figura 5.6). Esta técnica permite, como principal ventaja, una concentración en miles de veces de los compuestos volátiles, en una sola etapa, el gran interés de esta técnica se comprueba por las amplias aplicaciones en numerosos laboratorios. Diferentes modificaciones se han hecho de la versión original del aparato (Schultz *et al.*, 1977; Bemelmans, 1979; Godefroot *et al.*, 1981; Chaintreau, 2001).

La principal desventaja de esta técnica que combina en una sola etapa la destilación y la extracción es precisamente que requiere del empleo de un disolvente, no importa si con mayor o menor densidad que el agua, pero que requiere una alta pureza y preferentemente volátil

pues, en la mayoría de los casos, se requiere su eliminación, ya sea porque se haya partido de una pequeña porción del material o que tenga poco aceite esencial y entonces el extracto inicial esté muy diluido o porque se necesite determinar el contenido de aceite esencial para lo cual se requiere del peso final de la muestra. Es por ello, que el contenido de aceite esencial se reporta en porcentaje masa/masa a diferencia del método convencional de hidrodestilación donde se reporta en porcentaje volumen/masa. A pesar de ello, el método se emplea frecuentemente en materiales vegetales con bajo contenido de aceite esencial.

Se había mencionado antes que es necesario tener en cuenta el contenido de humedad en la determinación de contenido de aceite esencial, particularmente cuando el material vegetal no es fresco. Históricamente, la determinación de humedad se ha hecho mediante la técnica de destilación azeotrópica, pues no pueden utilizarse los métodos gravimétricos de secado en estufa, pues junto con el agua se pierde los componentes más volátiles del aceite esencial. De acuerdo a la técnica destilativa, una cantidad tarada del material vegetal (10 a 20 g) se coloca en un matraz de destilación y se cubre con suficiente disolvente, generalmente tolueno, aunque para materiales con alto contenido de azúcares como *Capsicum* y *Aliaceae* es mejor usar n-hexano. Se coloca al matraz una trampa de Bidwell-Sterling y un condensador por el que circula agua a temperatura ambiente, y se comienza a calentar hasta reflujo durante 2 a 4 h. El volumen de agua presente en la muestra se lee directamente en la escala graduada de la trampa.

La expresión para determinar la humedad es la siguiente:

$$\text{Humedad (\% m / m)} = V \times 100 / M$$

donde V es el volumen de agua recolectada (mL) y M es la masa de material vegetal (g).

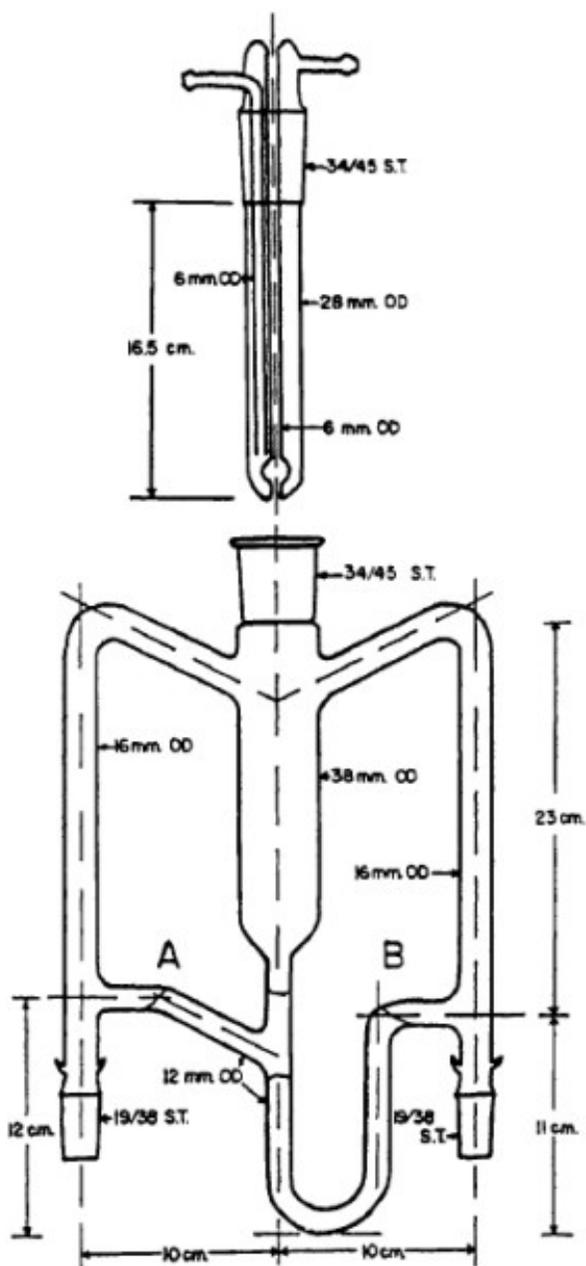


Figura 5.6 Equipo de destilación-extracción simultaneas según Likens y Nickerson (1964)

## Envasado y almacenamiento

Los aceites esenciales tienen diferentes usos, entre los que se destacan: alimentario, farmacéutico, cosmética y perfumería, muestras de referencia y materias primas industriales. De acuerdo con el uso que se les vaya a dar, es necesario emplear el envase apropiado, el cual debe cumplir con los requisitos nacionales e internacionales. La norma ISO / TR 210 (2006) recoge las reglas generales para el envasado de aceites esenciales.

Los aceites esenciales deben envasarse en recipientes que por su naturaleza, no causen la alteración del producto y lo protejan de cualquier agresión externa. En general, los materiales de envase deben ser inertes ante el aceite esencial a fin de prevenir cualquier daño simultáneo del producto y del material.

De acuerdo a las especificaciones de la norma ISO / TR 210 (2006) pueden ser: vidrio cálcico sódico, acero inoxidable (con un mínimo de 13% de cromo), aluminio (con pureza mínima de 99%) y estaño (con pureza mínima de 97%). Además pueden usarse plásticos y barnices, pero deben realizarse ensayos de compatibilidad entre el envase y el contenido antes de utilizar estos materiales, así como materiales cerámicos, vitrificados o esmaltados como recubrimientos interiores. Estos materiales no deben desprender plomo y cadmio en cantidades mayores que las fijadas por los reglamentos nacionales o internacionales vigentes en el país en cuestión.

Los envases destinados a contener aceites esenciales varían en forma, naturaleza y capacidad. Deben ser apropiados para su uso siguiendo las recomendaciones, en relación con los materiales mencionados antes. Los tipos de envases más frecuentes son los siguientes: frascos, latas, cubetas, bidones y cisternas.

Con relación al acondicionamiento, los envases destinados a contener aceites esenciales deben ser nuevos o estar en buenas condiciones, limpios y secos (secados con vapor seco) y perfectamente herméticos. En el caso de que hayan servido para otros usos, debe

asegurarse que no contiene ningún producto que pudiera alterar la calidad del aceite esencial. Los envases de cristal que no sean de vidrio coloreado anti-actínico deben protegerse de la luz. Los envases no deben llenarse completamente. Debe dejarse un espacio libre, cuyo volumen se determina en base a los cambios en las condiciones de temperatura previstos durante el transporte (en general, estos representan un máximo del 5 al 10% según la capacidad del envase). Este espacio libre entre el aceite esencial y el envase debe llenarse con nitrógeno u otro gas inerte en el momento del llenado. En el caso de retirar una cantidad grande de aceite esencial del envase, el aceite restante debe trasvasarse a un envase más pequeño para su almacenamiento.

En cuanto al almacenamiento, los aceites esenciales son líquidos fácilmente inflamables, por lo que deben almacenarse en lugares especiales. Es necesario, además, comprobar que los envases que contienen los aceites esenciales no tenga ninguna fuga de líquido o vapor. Los envases deben protegerse de cualquier rotura fortuita. Deben almacenarse en un lugar protegido de la luz y del calor y debe mantenerse a una temperatura constante.

## Etiquetado y marcado

**L**a norma ISO / TR 211 (2006) recoge los requisitos del etiquetado y marcado de los aceites esenciales.

El etiquetado es el proceso que permite la identificación y caracterización del contenido de un envase por medio de una etiqueta, una cinta, una inscripción, sin que ello forme parte integrante del mismo.

El marcado es el proceso que permite la identificación y caracterización del contenido de un envase por medio de una marca, sello o dibujo, formando parte integrante del mismo.

El etiquetado y marcado debe ser fácilmente comprensible, figurar en un sitio visible y ser claramente legible e indeleble. El etiquetado y marcado no debe estar disimulado por otras letras o dibujos, inducir error al comprador en lo que se refiere a propiedades, naturaleza, identidad, calidad, composición, fecha de caducidad, fuente, proce-

dencia, método de producción o requisitos, ni citar efectos o propiedades que el aceite esencial no tenga datos que deban figurar en el etiquetado o marcado.

El etiquetado o marcado debe mencionar lo siguiente:

1. El nombre comercial del aceite esencial, el nombre botánico (incluyendo la autoridad botánica) de la planta y la parte de la planta de donde se ha obtenido. La norma ISO 3218 (1976) recoge todos los aspectos relacionados con la nomenclatura de los aceites esenciales.
2. El nombre o nombre registrado y la dirección del fabricante o distribuidor.
3. El proceso de producción o cualquier tratamiento particular (por ejemplo: expresión, destilación, etc.).
4. El porcentaje del componente principal, si el valor comercial del aceite esencial depende de ello.
5. El peso bruto, tara y peso neto.
6. Las condiciones específicas de conservación (tales como la temperatura de almacenamiento), si el aceite esencial se ha decantado y las instrucciones de uso.
7. El número de lote o la fecha de producción que permita disponer de toda la información sobre el origen y el método de producción del aceite esencial, en caso de reclamación o no conformidad con las especificaciones.
8. El país de origen o procedencia.
9. Los símbolos e indicaciones de peligrosidad relativos a la sustancia, las indicaciones sobre los riesgos particulares.
10. El punto de inflamación, si lo tuviera, para el almacenamiento en un local o área reservada a productos inflamables.
11. Para aceites esenciales destinados a consumo humano debe aparecer la fecha límite de caducidad hasta la cual el aceite esencial mantiene todas sus propiedades y si es necesario, el contenido de uno o varios componentes cuya adición a productos

alimenticios esté cuantitativamente limitada, atendiendo a la legislación vigente, o cualquier otra indicación que permita al comprador cumplir con estas regulaciones.

## Referencias

- Angioni A., Barra A., Coroneo V., Dessi S., Cabras P. (2006). Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. spp. *stoechas* essential oils from stem / leaves and flowers. J. Agric. Food Chem. 54, 4364-4370.
- Babu G.D.K., Singh B. (2009). Simulation of *Eucalyptus cinerea* oil distillation: A study on optimization of 1,8-cineole production. Biochem. Eng. J. 44 (2-3), 226-231.
- Bauer K., Garber D., Surburg H. (2001). Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses. 2<sup>nd</sup> edn., Wiley-VCH, Weinheim.
- Bemelmans J.M.H. (1979). Review of isolation and concentration techniques. En: Progress in Flavour Research. Land D.G., Nursten H.E. (Eds.). Applied Science Publishers Ltd., London, pp. 79-98.
- Benyoussef E.-H., Hasni S., Belabbes R., Bessiere J.-M. (2002). Mass transfer modelling during coriander essential oil extraction. Chem. Eng. J. 85 (1), 1-5.
- Benyoussef E.-H., Saibi S. (2013). Influence of essential oil composition on water distillation kinetics. Flavour Fragr. J. 28, 300-308.
- Bicchi, C., Sandra, P. (1987). Microtechniques in essential oil analysis. En: Capillary Gas Chromatography in Essential Oil Analysis. Sandra P., Bicchi C. (Eds.), Alfred Huethig Verlag, Heidelberg, pp. 85-122.
- Bousbia N., Vian M.A., Ferhat M.A., Meklati B.Y., Chemat F. (2009a). A new process for extraction of essential oil from *Citrus* peels: Microwave hydrodiffusion and gravity. J. Food Eng. 90 (3), 409-413.
- Bousbia N., Vian M.A., Ferhat M.A., Petitcolas E., Meklati B.Y., Chemat F. (2009b). Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. Food Chem. 114, 355-362.
- Cassel E., Vargas R.M.F., Martinez N., Lorenzo D., Dellacassa E. (2009). Steam

- distillation modeling for essential oil extraction process. *Ind. Crops Prod.* 29 (1), 171-176.
- Cerpa M.G., Mato R.B., Cocero M.J. (2008). Modeling steam distillation of essential oils: Application to lavandin super oil. *AIChE J.* 54 (4), 909-917.
- Chaintreau A. (2001). Simultaneous distillation-extraction: from birth to maturity – review. *Flav. Fragr. J.* 16, 136-148.
- Cannon J.B., Cantrell C.L., Astatkie T., Zheljzkov V.D. (2013). Modification of yield and composition of essential oils by distillation time. *Ind. Crop. Prod.* 41, 214-220.
- Farhat A., Ginies C., Romdhane M., Chemat F. (2009). Eco-friendly and cleaner process for isolation of essential oil using microwave energy. Experimental and theoretical study. *J. Chromatogr. A* 1216, 5077-5085.
- Farhat A., Fabiano-Tixier A.-S., Maataoui M.E., Maingonnat J.-F., Romdhane M., Chemat F. (2011). Microwave steam diffusion for extraction of essential oil from orange peel: Kinetic data, extract's global yield and mechanism. *Food Chem.* 125, 255-261.
- Ferhat M.A., Meklati B.Y., Chemat F. (2007). Comparison of different isolation methods of essential oil from *Citrus* fruits: Cold pressing, hydrodistillation and microwave 'dry' distillation. *Flavour Fragr. J.* 22 (6), 494-504.
- Garnero J. (1976). Quelques problemes recontrés au cours de l'obtention, du controle et de l'étude de la composition d'une huile essentielle. *Riv. Ital. Essenze, Profumi, Piante Off., Saponi, Aromi, Cosm., Aerosol* 58, 105-127.
- Godefroot M., Sandra P., Verzele M. (1982). New method for quantitative essential oil analysis. *J. Chrom.* 203, 325-335.
- Guenther E. (1972-1998). *The Essential Oils*, Vol. 1-6, Allured Pub. Corp., Carol Stream, IL., <http://www.allured.com/pf/peoeg.html> .
- Hanci S., Sahin S., Yilmaz L. (2003). Isolation of volatile oil from thyme (*Thymbra spicata*) by steam distillation. *Nahrung-Food* 47 (4), 252-255.
- ISO/TR 210 (2006). International Organization for Standardization. Essentials oils  
 ٧٥ General rules for packaging, conditioning and storage.
- ISO/TR 211 (2006). International Organization for Standardization. Essentials oils  
 ٤١ General rules for labeling and marking of containers.
- ISO 3218 (1976). International Organization for Standardization. Essential Oils. Principles of nomenclature.

- Kashchenko G.F., Akimov Y.A., Volchenkov V.F., Boitsov E.N. (1971). Temperature conditions for the decantation of some essential oils. *Maslo-Zhir. Prom.* 37 (10), 24-29.
- Koedam W.A.P.A. (1980). Comparative study of isolation procedures for essential oils. Hydrodistillation vs. solvent extraction. Doctor thesis. Rijks University, Leiden.
- Koul V.K., Gandotra B.M., Koul S., Ghosh S., Tikoo C.L., Gupta A.K. (2004). Steam distillation of lemon grass (*Cymbopogon* spp.). *Indian J. Chem. Technol.* 11 (1), 135-139.
- Likens S.T., Nickerson G.W. (1964). Detection of certain hop oil constituents in brewing products. *Am. Soc. Brew. Chem. Proc.* 5-13.
- Lo Presti M., Ragusa S., Trozzi A., Dugo P., Visinoni F., Fazio A., Dugo G., Mondello L. (2005). A comparison between different techniques for the isolation of rosemary essential oil. *J. Sep. Sci.* 28, 273-280.
- Lucchesi M.E., Smadja J., Bradshaw S., Louw W., Chemat F. (2007). Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L.: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. *J. Food Eng.* 79 (3), 1079-1086.
- Massoti V., Juteau F., Bessièrè J.M., Viano J. (2003). Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7115-7121.
- Milojević S.Z., Stojanović T.D., Palić R., Lazić M.L., Veljković V.B. (2008). Kinetics of distillation of essential oil from comminuted ripe juniper (*Juniperus communis* L.) berries. *Biochem. Eng. J.* 39 (3), 547-553.
- Mohamadia M., Shamsपुरa T., Mostafavi A. (2013). Comparison of microwave-assisted distillation and conventional hydrodistillation in the essential oil extraction of flowers *Rosa damascena* Mill. *J. Ess. Oil Res.* 25 (1), 55-61.
- Périno-Issartier S., Ginies C., Cravotto G., Chemat F. (2013). A comparison of essential oils obtained from lavender via different extraction processes: Ultrasound, microwave, turbohydrodistillation, steam and hydrodistillation. *J. Chromatogr. A* 1305, 41-47.
- Pessoa F.L.P., Mendes M.F., Queiroz E.M., Vieira de Melo S.A.B. (2010). Extraction and Distillation. En: *Handbook of Fruit and Vegetable Flavors*, Hui Y.H. (Ed.). John Wiley & Sons, Inc., Hoboken. pp. 195-210.
- Pruthi Y. (1980). Spices and Condiments. Chemistry, Microbiology and

Technology. Academic Press, New York.

- Romdhane M., Tizaoui C. (2005). The kinetic modelling of a steam distillation unit for the extraction of aniseed (*Pimpinella anisum*) essential oil. J. Chem. Technol. Biotechnol. 80 (7), 759-766.
- Salehi P., Fakhari A.R., Ebrahimi S.N., Heydari R. (2007). Rapid essential oil screening of *Rosmarinus officinalis* L. by hydrodistillation-headspace solvent microextraction. Flavour Fragr. J. 22, 280-285.
- Schultz T.H., Flath R.A., Mon T.R., Egging S.B., Teranishi R. (1977). Isolation of volatile components from a model system. J. Agric. Food Chem. 25, 446-449.
- Schmaus G., Kubecka K.H. (1985). The influence of isolation conditions on the composition of essential oils containing linalool and linalyl acetate. En: Essential Oils and Aromatic Plants. Svendsen A.B., Scheffer J.J. (Eds.), Dr W. Junk Publishers, Dordrecht.
- Silva C.L., Câmara J.S. (2013). Profiling of volatiles in the leaves of Lamiaceae species based on headspace solid phase microextraction and mass spectrometry. Food Res. Int. 51, 378-387.
- Sovová H., Aleksovski S.A. (2006). Mathematical model for hydrodistillation of essential oils. Flavour Fragr. J. 21 (6), 881-889.
- Sowbhagya H.B., Sampathu S.R., Krishnamurthy N. (2007). Evaluation of size reduction on the yield and quality of celery seed oil. J. Food Eng. 80 (4), 1255-1260.
- Sowbhagya H.B., Sathyendra Rao B.V., Krishnamurthy N. (2008). Evaluation of size reduction and expansion on yield and quality of cumin (*Cuminum cyminum*) seed oil. J. Food Eng. 84 (4), 595-600.
- Stanisavljevič I.T., Lazić M.L., Veljković V.B., Stojičević S.S., Velickovic D.T., Ristić M.S. (2010). Kinetics of hydrodistillation and chemical composition of essential oil from cherry laurel (*Prunus iaurocerasus* L. var. *serbica* Pančić) leaves. J. Ess. Oil Res. 22 (6), 564-567.
- Vian M.A., Fernandez X., Visinoni F., Chemat F. (2008). Microwave hydrodiffusion and gravity, a new technique for extraction of essential oils. J. Chromatogr. A 1190, 14-17.
- Wright J. (1999). Essential oils. En: Food Flavorings. Ashurst P.H. (Ed.), Dr. RR. Ashurst & Associates, Kingstone, United Kingdom, pp. 1-38.
- Xavier V.B., Vargas R.M.F., Cassel E., Lucas A.M., Santos M.A., Mondin C.A.,

- Santarem E.R., Astarita L.V., Sartor T. (2011). Mathematical modeling for extraction of essential oil from *Baccharis* spp. by steam distillation. *Ind. Crops Prod.* 33 (3), 599-604.
- Zheljazkov V.D., Astatkie T., Jeliaskova E.A., Tatman A.O., Schlegel V. (2013a). Distillation time alters essential oil yield, composition and antioxidant activity of female *Juniperus scopulorum* trees. *J. Ess. Oil Res.* 25 (1), 62-69.
- Zheljazkov V.D., Cantrell C.L., Astatkie T., Jeliaskova E.A. (2013b). Distillation time effect on lavender essential oil yield and composition. *J. Oleo Sci.* 62 (4), 195-199.
- Zheljazkov V.D., horgan T., Astatkie T., Schlegel V. (2013c). Distillation time modifies essential oil, composition, and antioxidant capacity of fennel oil (*Foeniculum vulgare* Mill.). *J. Oleo Sci.* 62 (9), 665-672.

## 6.- PROCESAMIENTO DE LOS ACEITES ESENCIALES

### Introducción

Los hidrocarburos terpénicos se caracterizan por su relativa insolubilidad en soluciones alcohólicas diluidas y su facilidad a oxidarse y polimerizarse con el consiguiente deterioro en las propiedades sensoriales de los aceites esenciales. Estos problemas se hacen más críticos en los aceites esenciales de cítricos donde, por lo general, estos constituyentes representan más del 90% de la composición química (Guenther 1972-1998).

Para minimizar estas dificultades, los hidrocarburos terpénicos se eliminan parcial o totalmente. De esta manera, atendiendo a dicha eliminación, surgen tres tipos de aceites esenciales:

- (i) aceites concentrados;
- (ii) aceites desterpenados; y
- (iii) aceites desesquiterpenados.

Cuando en un aceite esencial se eliminan parcialmente los hidrocarburos monoterpénicos, este se denomina aceite concentrado. Si es total la eliminación de esta fracción, entonces se designa como aceite desterpenado y si también se eliminan los hidrocarburos sesquiterpénicos, entonces se denomina aceite desesquiterpenado.

Estos aceites procesados presentan ciertas ventajas en comparación con los de partida, como son: mayor solubilidad en soluciones hidroalcohólicas diluidas, mayor estabilidad, menor volumen a almacenar, facilidad para microencapsular, etc. (Wright, 1999). Además, los excedentes de hidrocarburos terpénicos separados son una nueva

fuelle de materia prima a partir de los cuales se pueden obtener por la vía de la síntesis otros productos más valiosos. No obstante, debe señalarse que aunque los hidrocarburos terpénicos poseen un aporte al aroma y sabor pobre, sería incorrecto suponer que su eliminación no causa efectos en la calidad sensorial del aceite esencial. Generalmente, los aceites esenciales procesados carecen de las notas frescas que tiene el aceite esencial original (Reineccius, 2006).

El grado de concentración generalmente se mide por el número de veces que la masa del aceite esencial se ha reducido. Por ejemplo, si se parten de 100 kg de aceite esencial y se obtienen 20 kg de aceite concentrado, entonces este tendrá un grado de concentración de 5X. Esta concentración no necesariamente representa el incremento de la potencia aromatizante del aceite esencial. Así, se plantea que para el aceite esencial de naranja exprimido en frío, una concentración mayor de 10X provoca cambios en su carácter sensorial (Temelli *et al.*, 1988). También es posible evaluar el grado de concentración mediante cromatografía de gases o por sus características físicas y químicas, como son la densidad, poder rotatorio, índice de refracción y contenido de aldehídos, etc. (Pino y Tápanes, 1984; Sánchez y Pino, 1999).

Los métodos de eliminación de hidrocarburos terpénicos o de desterepenación se clasifican en:

- (i) destilación;
- (ii) destilación con etanol;
- (iii) extracción con disolvente;
- (iv) extracción con fluidos supercríticos; y
- (v) cromatográficos.

## Destilación

Es conocido que el punto de ebullición, a presión atmosférica, de los hidrocarburos monoterpénicos se encuentra entre 150 y 180°C, mientras que el de los hidrocarburos sesquiterpénicos está entre 240 y

280°C. El punto de ebullición de la mayoría de los componentes oxigenados se encuentra entre los de ambos tipos de hidrocarburos. Esta diferencia en los puntos de ebullición es lo que permite usar la destilación fraccionada como método de separación.

Como el calor causa un deterioro en el aroma del aceite esencial, este efecto puede minimizarse mediante la destilación a bajas presiones, del orden de 1.33 a 3.99 kPa (10 a 30 mm de Hg), para bajar el punto de ebullición de las sustancias a destilar. Es conveniente hacer la destilación con columnas de fraccionamiento y una cabeza de destilación adecuadas para mejorar el fraccionamiento. Se han reportado estudios con la aplicación de este procedimiento (Vora *et al.*, 1983; Calvarano y DiGiacomo, 1984; Sánchez *et al.*, 1994; Lopes *et al.*, 2003).

La principal ventaja del método es el corto tiempo del proceso, pero también posee algunas desventajas. La primera es que algunos compuestos oxigenados, tales como los aldehídos de bajo peso molecular, pueden tener puntos de ebullición similares o inferiores a los que poseen los hidrocarburos monoterpénicos, con la consiguiente pérdida de los mismos y afectación a la calidad sensorial.

Otra desventaja de la destilación fraccionada es el mal efecto que causa el incremento de la temperatura en el aceite esencial, pues a pesar del vacío, es necesario calentar hasta 90-100°C, lo que le imparte al aceite esencial un olor “picante” generalmente asociado a “quemado”. Para eliminar esta última dificultad se recomienda la agitación del aceite esencial mientras durante el proceso.

Como los hidrocarburos sesquiterpénicos poseen muy poca volatilidad, este método no se usa para su eliminación.

Otra variante consiste en la destilación por arrastre con vapor de agua. Esta destilación puede hacerse a presión reducida para disminuir el efecto dañino del calor, aunque entonces la relación másica aceite esencial / agua se incrementa debido a que la presión de vapor del agua decrece más rápido que la de los componentes del aceite esencial (Guenther, 1972-1998).

Una ventaja de esta variante es que el aceite esencial no es calentado por encima del punto de ebullición del agua y esto es una

ventaja con respecto a la destilación fraccionada. Otra ventaja es que se disminuyen los calentamientos intensivos pues el agua conduce parcialmente el calor hacia las paredes del destilador.

Las desventajas del método son:

- (i) el proceso requiere un período de tiempo más largo, particularmente cuando el aceite esencial posee una alta proporción de compuestos de alto punto de ebullición;
- (ii) ciertos constituyentes hidrosolubles como es el caso del alcohol terciario  $\alpha$ -terpineol pueden perderse parcialmente por solubilización, por lo que es recomendable hacer una destilación del agua condensada; y
- (iii) el calentamiento prolongado del aceite esencial en presencia de agua puede causar la hidrólisis de los ésteres, por lo que es recomendable minimizar el tiempo y la cantidad de agua en contacto con el aceite esencial.

Un procedimiento interesante para obtener aceite esencial de lima parcialmente concentrado fue reportado por Pino y Tápanes (1983), mediante el cual se combinaron una destilación fraccionada a presión reducida en presencia de agua con otra destilación fraccionada del destilado. De esta forma se obtuvo un aceite con bajo contenido de  $\alpha$ -terpineno y p-cimeno. El p-cimeno se forma por la oxidación del  $\alpha$ -terpineno y es el principal responsable del deterioro sensorial de este aceite esencial.

## Destilación con alcohol

**E**ste método se basa en la diferencia de solubilidad de los hidrocarburos monoterpénicos y los compuestos oxigenados en disolventes polares. El aceite esencial se destila con tres o cuatro veces su volumen en un disolvente polar como el metanol o etanol diluido al 30-35% v/v en un equipo de destilación al que se acopla un separador especial que permite retornar parte del destilado al separarse en dos capas. Durante el proceso, destila la mezcla hidrocarburos monoter-

pénicos-alcohol. La fracción de hidrocarburos es insoluble en el alcohol y se separa como una capa superior, mientras que la capa hidroalcohólica inferior retorna al destilador. Así se continúa el proceso hasta que la capa de hidrocarburos monoterpénicos no se incrementa más, entonces se desconecta el separador y se continúa la destilación para eliminar el disolvente (Pino y Tápanes, 1978).

La principal ventaja de este método radica en que opera a una baja temperatura, lo que favorece mantener la calidad sensorial del aceite esencial. Tiene como desventajas que la separación no es completa debido a que pequeñas cantidades de hidrocarburos se disuelven en el alcohol y que requiere un tiempo más prolongado en comparación con los otros métodos destilativos.

## Extracción con disolvente

**E**n vista de las desventajas de los métodos anteriormente descritos, se han ideado otros procesos basados en la diferencia de solubilidad de los hidrocarburos terpénicos y los compuestos oxigenados. El principio del método está regido por la ley de distribución que plantea que la relación entre las concentraciones de una sustancia en dos disolventes inmiscibles cuando se alcanza el estado de equilibrio a una temperatura dada, es igual a una constante denominada coeficiente de distribución o de reparto.

Evidentemente, la extracción será tanto más eficaz cuanto mayor sea el coeficiente de distribución con respecto a la unidad, en favor del segundo disolvente, es decir, mientras más afín sea la sustancia a extraer con el segundo disolvente, mejor será esta extracción. Así, los compuestos oxigenados, tales como alcoholes, aldehídos, ésteres y otros serán capaces de asociarse a un disolvente polar considerando como si ellos estuviesen disueltos en los hidrocarburos terpénicos.

La variante más antigua del método consiste en añadir al aceite esencial, un volumen dado de etanol diluido, agitar la mezcla y extraer en la capa alcohólica a los constituyentes oxigenados disueltos, quedando en la capa inmiscible los hidrocarburos terpénicos. Este proceso se repite,

al menos, una vez más con la capa de hidrocarburos para garantizar un buen recobrado de los compuestos oxigenados.

Owusu-Yaw *et al.* (1986) extrajeron el aceite esencial de naranja dulce con etanol para remover los hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpénicos, y reportó que la relación 1:3 de aceite esencial: disolvente fue la mejor para lograr un aceite desesquiterpenado, aunque con un bajo recobrado. Pino *et al.* (1992) evaluaron la desterpenación del aceite esencial de pimienta negra con etanol al 60% y tres relaciones aceite esencial: disolvente (1:2, 1:5 y 1:10). La relación 1:2 mostró el más bajo recobrado, pero el aceite esencial obtenido fue el más desesquiterpenado.

Generalmente se forman emulsiones que traen como consecuencia que la separación de las dos capas lleve un tiempo. Esto puede minimizarse por enfriamiento de la mezcla, adición de alguna sal inorgánica, adición de pequeñas cantidades de algún disolvente apolar como éter de petróleo de bajo punto de ebullición.

A la solución alcohólica con los compuestos oxigenados se le elimina el disolvente por destilación fraccionada a presión reducida hasta que solo quedan el agua y el aceite esencial como residuos, los que se separan físicamente.

En ocasiones se usa directamente la solución alcohólica, denominada esencia, para la preparación industrial de bebidas refrescantes (Muñoz *et al.*, 2007).

## Extracción con fluidos supercríticos

La extracción en estado supercrítico, conocida también como extracción por fluidos densos, extracción por alta presión y otros términos es un procedimiento de separación, basado en la utilización como agente separador de un fluido inerte en condiciones supercríticas. A pesar de que este método de extracción se conoce desde 1822, no adquirió importancia relevante hasta 1965, en que se comenzó a usar en la separación de numerosas sustancias a partir de materiales naturales (Moyler, 1984; Pellerin, 1991).

Este método, particularmente cuando se usa dióxido de carbono como disolvente, tiene como ventajas:

- (i) la recuperación del disolvente y el soluto a partir de las soluciones supercríticas es relativamente fácil;
- (ii) los compuestos termolábiles no sufren daño a las bajas temperaturas de trabajo;
- (iii) puede lograrse la separación de compuestos que por otras técnicas son difíciles;
- (iv) no hay residuos dañinos;
- (v) el CO<sub>2</sub> es un disolvente barato;
- (vi) los extractos poseen una mayor calidad; y
- (vii) la selectividad del CO<sub>2</sub> puede modificarse acorde con las necesidades del proceso mediante variaciones de presión y temperatura.

Por esta última ventaja puede hacerse la extracción fraccionada (Pourmortazavi y Hajimirsadeghi, 2007).

La desventaja más importante es el elevado costo de inversión, ocasionado por el equipamiento a altas presiones.

La extracción con fluidos supercríticos es una extensión en el campo de las extracciones clásicas, en el cual el estado termodinámico del material auxiliar (gas) es caracterizado por los valores de presión y temperatura en la región del punto crítico. Este proceso posee algunas de las características de la destilación y la extracción clásicas (Shen *et al.*, 2002).

Para obtener buenas extracciones, no solo debe ser tomada en cuenta la solubilidad de los compuestos a extraer, sino también la resistencia a la transferencia de masas debido a la estructura del material y la localización específica de los compuestos a ser extraídos tienen importancia (Reverchon y De Marco, 2006).

La destilación de los aceites esenciales mediante extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico ha sido descrita en varios trabajos (Temelli *et al.*, 1988; Vieira de Melo *et al.*, 1997; Budich *et al.*, 1999). La solubilidad de los

compuestos en un fluido supercrítico está dada principalmente por la presión de vapor, polaridad y peso molecular de dichos compuestos. Los hidrocarburos monoterpénicos poseen las mayores presiones de vapor y en general, los menores pesos moleculares en un aceite esencial (Weast *et al.*, 1986). Debido a que el CO<sub>2</sub> no tiene momento dipolar y tiene una gran afinidad por los solutos apolares, los hidrocarburos monoterpénicos serán favorecidos en la solubilización con respecto a los monoterpénicos oxigenados debido a su baja polaridad, menor presión de vapor y peso molecular.

Debe señalarse que la separación de los hidrocarburos sesquiterpénicos y los monoterpénicos oxigenados es difícil debido a que su solubilidad y presiones de vapor son muy similares y solo se puede hacer a partir de sus diferentes polaridades y por saturación del CO<sub>2</sub> con agua para hacerlo más polar.

En general, los hidrocarburos monoterpénicos pueden ser extraídos de los aceites esenciales de cítricos en condiciones cercanas al punto crítico del CO<sub>2</sub>. Las temperaturas deben estar entre 30 y 70°C y las presiones entre 7.4 y 13.0 MPa.

## Cromatografía de columna

El uso de la cromatografía de columna como método de destilación tiene ventajas con respecto a los métodos antes discutidos, particularmente, que se obtiene un aceite desesquiterpenado con un olor delicado y fino (Kirchner y Miller, 1952; Braverman y Solomiansky, 1957).

El método consiste en pasar al aceite esencial por una columna rellena con un adsorbente como el gel de sílice (70-230 *mesh*), seguido de un disolvente apolar como el n-hexano. Este disolvente arrastra a todos los hidrocarburos terpénicos y los compuestos oxigenados pueden ser recuperados del adsorbente pasando algún disolvente polar como acetato de etilo u otro de bajo punto de ebullición. El disolvente polar es eliminado por destilación fraccionada a presión reducida (Tzamtzis *et al.*, 1990).

Es necesario para evitar isomerizaciones y transformaciones químicas de algunos compuestos terpénicos, que el pH y la actividad del adsorbente sean los adecuados.

Pino (1992) evaluó la desterpenación del aceite esencial de pimienta negra mediante este método en tres relaciones másicas aceite esencial / gel de sílice (1:0.5, 1:1 y 1:2). Con las tres relaciones hubo una apreciable desterpenación. La relación 1:2 produjo un aceite desesquiterpenado, pero con un recobrado menor que con la relación 1:1. Esta última relación fue la propuesta para lograr una máxima economía y calidad del producto. En este mismo reporte, se estudió la recuperación del gel de sílice usado en la desterpenación con el fin de hacer más económico el proceso. El tratamiento por ebullición con solución de NaOH al 1%, lavado con agua destilada hasta neutralidad, ebullición con solución de HCl al 1% y nuevamente lavado con agua destilada hasta neutralidad, activación a 120°C por 3 h, desactivación por adición de 10% de agua destilada, logra restablecer las características del adsorbente para usarlo nuevamente.

Pino y Quijano (2007) estudiaron la desterpenación del aceite esencial de mandarina con el empleo de gel de sílice en tres relaciones másicas aceite esencial / adsorbente (1:3, 1:6 y 1:9). El proceso con la relación 1:9 produjo un aceite desesquiterpenado con menor contenido de hidrocarburos.

Se han reportado trabajos en los que se emplea CO<sub>2</sub> en estado supercrítico para eluir las columnas con gel de sílice (Dugo *et al.*, 1995; Shen *et al.*, 2002).

## Referencias

Braverman J.B.S., Solomiansky L. (1957). Separation of terpeneless essential oils by chromatographic methods. *Perf. Ess. Oil Rec.* 48, 284-287.

Budich M., Heilig S., Wesse T., Leibkühler V., Brunner G. (1999). Countercurrent deterpenation of citrus oils with supercritical CO<sub>2</sub>. *The Journal of Supercritical Fluids* 14, 105-114.

Calvarano I., DiGiacomo A. Composición química del aceite esencial de limón

- desterpenado. *Ess. Deriv. Agrum.* 54 (2), 145-151.
- Dugo P., Mondello L., Bartle K.D., Clifford A.A., Breen G.P.A. (1995). Deterpenation of sweet orange and lemon essential oils with supercritical carbon dioxide using silica gel as an adsorbent. *Flav. Fragr. J.* 10, 51-58.
- Guenther E. (1972-1998). *The Essential Oils*, Vol. 1-6, Allured Pub. Corp., Carol Stream, Il., <http://www.allured.com/pf/peoeg.html> .
- Kirchner J.G., Miller J.M. (1952). Preparation of terpeneless essential oils by a chromatographic process. *Ind. Eng. Chem.* 44, 318-321.
- Lopes D., Raga A.C., Stuart G.R., De Oliveira J.V. (2003). Influence of vacuum distillation parameters on the chemical composition of a five-fold sweet orange oil (*Citrus sinensis* Osbeck). *J. Ess. Oil Res.* 15 (6), 408-411.
- Moyler D.A. (1984). Carbon dioxide extracted ingredients for fragrances. *Perfum. Flavorist* 9 (2), 109-111.
- Owusu-Yaw J., Matthews R.F., West P.F. (1986). Alcohol deterpenation of orange oil. *J. Food Sci.* 51, 1180-1182.
- Muñoz Y., Lorde T., Pino J., Ortega A., Roncal E., Rogert E. (2007). Obtención de una esencia hidroalcohólica de mandarina. *Cienc. Tecnol. Alim.* 17 (1), 25-30.
- Pellerin P. (1991). Supercritical fluid extraction of natural raw materials for the flavor and perfume industry. *Perf. Flavorists* 16, 37-39.
- Pino J., Tápanes R. (1978). Desterpenación de los aceites esenciales de limeta destilado y naranja dulce centrifugado producidos en Cuba. *Rev. CENIC* 9 (2), 173-183.
- Pino J., Tápanes R. (1983). Evaluation of a process for obtaining partially concentrated distilled lime oil. *J. Food Technol.* 18, 523-528.
- Pino J., Tápanes R. (1984). Evaluación objetiva del grado de concentración de aceites esenciales de cítricos producidos en Cuba. *Rev. Cienc. Quím.* 15 (1), 17-24.
- Pino J. (1992). Studies on the chromatographic deterpenation of black pepper oil. *Nahrung/Foods* 36, 170-174.
- Pino J., Borges P., Sánchez R. (1992). Alcohol deterpenation of black pepper oil. *Int. J. Food Sci. Technol.* 27, 551-555.
- Pino J., Quijano C.E. (2007). Chromatographic deterpenation of mandarin cold-pressed oil. *J. Essent. Oil-Bearing Plants* 10 (6), 504-509.
- Pourmortazavi S.M., Hajimirsadeghi S.S. (2007). Supercritical fluid extraction in

- plant essential and volatile oil analysis. *J. Chromatogr. A* 1163, 2-24.
- Reineccius G. (2006). *Flavor Chemistry and Technology*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Reverchon E., De Marco I. (2006). Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *J. Supercritical Fluids* 38, 146-166.
- Sánchez M., Pino J., Rogert E., Roncal E. (1994). Obtención de aceites esenciales de limón concentrados mediante destilación a vacío y estudio de su composición. *Alimentaria* (254), 71-73.
- Sánchez M., Pino J. (1999). Evaluación del grado de concentración de aceites esenciales de cítricos. *Alimentaria* (301), 111-113.
- Shen Z., Mishra V., Imison B., Palmer M., Fairclough R. (2002). Use of adsorbent and supercritical carbon dioxide to concentrate flavor compounds from orange oil. *J. Agric. Food Chem.* 50, 154-160.
- Temelli F., Braddock R.J., Chen C.S., Nagy S. (1988). Supercritical carbon dioxide extraction of terpenes from orange essential oil. *ACS Symposium Ser.* 366, 9-20.
- Tzamtzis N.E., Liodakis S.E., Parissakis G.K. (1990). The deterpenation of orange and lemon oils using preparative adsorption chromatography. *Flav. Fragr. J.* 5, 57-67.
- Vieira de Melo A.B., Uller A.M.C., Pessoa F.L.P. (1997). Supercritical CO<sub>2</sub> deterpenation of orange peel oil is investigated in a semi-batch extractor. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 17 (4), 475-480.
- Vora J.D., Matthews R.F., Crandall P.G., Cook R. (1983). Preparation and chemical composition of orange oil concentrates. *J. Food Sci.* 48, 1197-1199.
- Weast R.C., Astle M.J., Beyer W.H. (1986). *Handbook of Chemistry and Physics*. 67<sup>th</sup> edition. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- Wright J. (1999). Essential oils. En: *Food Flavorings*. Ashurst P.R. (Ed.). Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland. pp. 1-38.

## 7.- ANÁLISIS DE LOS ACEITES ESENCIALES

### Introducción

Los métodos analíticos usados para el análisis de los aceites esenciales dependen del fin que se persiga. Si se desea determinar la cantidad de sus constituyentes volátiles se necesita de la cromatografía de gases con detector de llama (GC-FID), mientras que si se requiere de la identificación de los compuestos entonces se necesita la cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS). A pesar de que otras técnicas instrumentales pueden ser también empleadas, como la resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopía infrarroja (IR), etc., la mayoría de las investigaciones se realizan con las dos primeras. Por otra parte, cuando se requiere de un control de calidad deberán incluirse las determinaciones de una serie de métodos físicos y químicos tradicionalmente usados, junto con la evaluación sensorial.

### Muestreo

El muestreo es la recolección de una porción pequeña (denominada muestra) representativa de las propiedades y composición del lote del aceite esencial a muestrear. La norma ISO 212 (1973) establece todo lo concerniente al muestreo de los aceites esenciales.

Es muy importante que la muestra usada para los analistas sea representativa del lote de materia prima, producto en proceso o producto terminado.

Todos los aparatos para la toma de muestras deberán estar limpios y secos. Los aparatos serán de un material que no sea atacado por el aceite esencial a muestrear.

Los aparatos empleados serán los usuales de laboratorio. En el caso de aceites esenciales líquidos serán: agitadores, jeringa, pipetas, pipeta con válvula, sondas, bombas y sifones. En el caso de aceites esenciales sólidos o pastosos serán: espátulas, sondas helicoidales y sondas acanaladas.

Los recipientes para las muestras deberán ser frascos de vidrio protegidos de la luz. Estos envases deberán ser de tal capacidad que puedan ser llenados completamente y deberán ser herméticamente cerrados. Para sustancias sólidas o pastosas, los envases deberán ser de boca ancha.

## Preparación de la muestra de ensayo

**L**a norma ISO 356 (1996) recoge todo lo relacionado con la preparación de la muestra de ensayo.

El procedimiento a seguir para aceites esenciales que son sólidos o parcialmente sólidos a temperatura ambiente es el siguiente: se licua el aceite esencial colocándolo en una estufa mantenida a la menor temperatura que permita la licuefacción en menos de 10 min. Esta temperatura es usualmente cerca de 10°C por encima del punto de congelación supuesto. Durante la operación, especialmente en el caso de aceites esenciales que contengan aldehídos se debe evitar la entrada de aire al recipiente que contiene al aceite esencial. Para lograr esto, se afloja la tapa sobre el recipiente que contiene el aceite esencial pero sin retirarla. Se traspasa el aceite esencial licuado hacia un matraz cónico, previamente calentado en la estufa a la temperatura indicada anteriormente, de forma tal que el frasco no esté lleno más de las dos terceras partes. Durante las siguientes operaciones, el aceite esencial deberá ser mantenido a la más baja temperatura en que se mantenga licuado.

El procedimiento a seguir para aceites esenciales que son líquidos a temperatura ambiente es el siguiente: se transfiere el aceite esencial hacia un matraz cónico a la misma temperatura, de forma tal que no se llenen más de las dos terceras partes del mismo.

En los dos casos indicados, se adiciona al matraz una masa de agente desecante (sulfato de magnesio o sulfato de sodio) igual al 15% de la masa del aceite esencial. Se agita de vez en cuando y vigorosamente por un período de 2 h. Se filtra la muestra. Se verifica la acción del agente desecante por la adición de un 5% de sulfato de magnesio o sulfato de sodio se esperan 2 h y se filtra. El agente desecante deberá aún estar en forma de polvo y el aceite esencial deberá estar claro y transparente. En el primer caso, se realiza la filtración en la estufa a la temperatura adecuada, pero sin mantener el aceite esencial en la estufa más tiempo del necesario.

Estas operaciones deberán realizarse inmediatamente antes del análisis. En caso contrario, el aceite esencial filtrado deberá mantenerse en un lugar fresco y protegido de la luz, en un recipiente seco y cerrado herméticamente. Este método no puede usarse con muestras en las que las que se vaya a determinar el contenido de agua.

## Métodos de control de calidad

**E**l control de calidad es muy importante en la industria de aceites esenciales. Se espera que los productores proporcionen productos de constante alta calidad a sus compradores. El control de calidad abarca tres áreas: métodos físicos y químicos, métodos cromatográficos y métodos sensoriales.

Los métodos físicos generales usados habitualmente son: densidad específica a 20°C (ISO 279:1998), índice de refracción a 20°C (ISO 280:1998), rotación óptica a 20°C (ISO 592:1998) y miscibilidad en etanol (ISO 875:1999).

Otros métodos físicos de aplicación limitada son: residuo por evaporación (ISO 4715:1978) y punto de congelación (ISO 1041:1973). En el primer caso, lo que se determina es el porcentaje del aceite esencial

que no se evapora a 100°C y es una técnica muy usada para evaluar aceites esenciales cítricos. El segundo método generalmente se aplica en aceites esenciales que contienen un componente mayoritario, como por ejemplo el aceite esencial de clavo que contiene 90% de eugenol. En este caso, esta determinación puede servir para conocer el contenido de este compuesto.

Para los aceites esenciales de cítricos también pueden evaluarse el residuo de destilación a presión reducida (ISO 5991:1979) y valor CD por análisis espectrofotométrico en UV (ISO 4735:2002).

Los métodos químicos para constituyentes específicos son: valor de acidez (ISO 1242:1999), valor de carbonilos (ISO 1271:1983 e ISO 1279:1996), valor de ésteres (ISO 709:2001), valor de ésteres (antes y después de la acetilación) y contenido de alcoholes libres y total (ISO 1241:1996), contenido de alcoholes libres por determinación del valor de éster después de la acetilación en aceites esenciales con alcoholes terciarios (ISO 3794:1976), contenido de alcoholes primarios y secundarios por acetilación en piridina (ISO 3793:1976), fenoles (ISO 1272:2000), contenido de 1,8-cineol (ISO 1202:1981) y contenido de agua (ISO 11021:1999).

## Métodos de evaluación sensorial

**E**s evidente que en el control de calidad de los aceites esenciales es de suma importancia la evaluación sensorial, o sea de que los productos cumplan con las especificaciones físico-químicas, deben ser también aceptadas por sus cualidades de color, olor y sabor, las cuales deben ser similares a una muestra de referencia aprobada anteriormente. Muchas veces sucede que un aceite esencial cumple perfectamente con las especificaciones físico-químicas, pero al ser evaluado sensorialmente, se rechaza por tener notas más fuertes o más tenues a las originales, o bien por percibirse notas ajenas al aceite esencial.

Un buen número de pruebas sensoriales con distinto grado de complejidad son aplicables en las investigaciones y control de calidad de

los aceites esenciales. La discusión detallada de estas pruebas se sale del marco de este texto y para ello se recomiendan revisar las obras de Muñoz *et al.* (1992) y Meilgaard *et al.* (1999).

El empleo de la evaluación sensorial permite la obtención de información en tres cuestiones básicas:

- (i) ¿Existe alguna diferencia perceptible en el aroma o sabor de las muestras?
- (ii) De existir, ¿en qué atributo y en qué magnitud son estas diferencias? y
- (iii) ¿Son estas diferencias en preferencia o aceptación de las muestras?

La respuesta a cualquiera de estas interrogantes requiere un tipo diferente de prueba sensorial. La elección de la prueba más adecuada dependerá del objetivo perseguido, del costo de la evaluación y de la composición y características de los jueces evaluadores. Estas pruebas se dividen en: de diferencia (responden a la primera pregunta), descriptivas (responden a la segunda pregunta), así como de preferencia y hedónica (responden a la última pregunta).

## Cromatografía de gases

**E**l avance más significativo en el análisis de los aceites esenciales fue, sin dudas, la introducción de la GC. En sus inicios, con el empleo de columnas rellenas tuvo solo una resolución limitada, pero fue la primera técnica que permitió hacer un análisis cuantitativo a la mezcla compleja que constituye un aceite esencial. Hoy en día, la GC es el método instrumental más empleado en el análisis de aceites esenciales, debido a los grandes avances tecnológicos que permiten el uso de columnas capilares de alta resolución y el acoplamiento con infinidad de detectores, en particular con los detectores de masas selectivos (Costa *et al.*, 2010; Tranchida *et al.*, 2012a).

La cromatografía de gases como técnica no será discutida en este texto pues existen excelentes obras con relación al tema (Kitson *et al.*, 1996; Jennings *et al.*, 1997; Scott, 1997; McNair y Miller, 1998).

Existen dos normas ISO que regulan el procedimiento para el análisis por GC capilar de los aceites esenciales. La norma ISO 11024-1 (1998) recoge las directrices generales sobre los perfiles cromatográficos para su presentación en las normas, mientras que la ISO 11024-2 (1998) establece las directrices generales sobre la utilización de los perfiles cromatográficos de muestras de aceites esenciales.

### Análisis cualitativo

**E**l objetivo del análisis de un aceite esencial por cromatografía de gases es lograr que la separación de sus constituyentes sea lo más completa posible, para poder realizar la identificación (análisis cualitativo) por algún medio apropiado. La volatilidad y polaridad de los constituyentes de los aceites esenciales hacen a la cromatografía de gases capilar como la técnica de elección para su análisis, pues los aceites esenciales son, en general, mezclas complejas de componentes con características físico-químicas similares. La única desventaja que tiene el empleo de las columnas capilares es su baja capacidad de muestra. Se requiere de una buena capacidad de muestra para poder recolectar en trampas frías los compuestos separados para su análisis posterior por otras técnicas como RMN, IR, etc. Aunque la capacidad se ha mejorado con el incremento del grosor de las fases estacionarias que permiten a la columna separar hasta 500 ng de cada compuesto, la capacidad es aún un problema a resolver. Un trabajo reciente de Nojima *et al.* (2004) describe una técnica eficiente para la preparación de muestras para RMN de compuestos volátiles con el uso de GC preparativa. No obstante, con la GC capilar se logran excelentes separaciones en un corto tiempo de análisis (Marriott *et al.*, 2001) y la GC preparativa sigue siendo una poderosa técnica para el fraccionamiento analítico de los aceites esenciales o sus fracciones (Dugo *et al.*, 2005).

Para el análisis cualitativo se utilizan diversos procedimientos, los cuales pueden ser cromatográficos y no cromatográficos. Los procedimientos basados en las técnicas cromatográficas se basan en la comparación de parámetros de retención de los compuestos por

identificar del aceite esencial y de sustancias patrones, analizados ambos en iguales condiciones cromatográficas.

Los índices de retención más comúnmente usados son los definidos por Kováts (1958) y que se calculan a partir del análisis cromatográfico en condiciones isotérmicas:

$$I_x = 100_n + 100[\log(t_x) - \log(t_n)] / [\log(t_{n+1}) - \log(t_n)] \quad [\text{ec. 1}]$$

En general, como siempre se opera en condiciones de temperatura programada para mejorar la resolución, pues se emplea la expresión propuesta por Van den Dool y Kratz (1963):

$$I_x = 100_n + 100(t_x - t_n) / (t_{n+1} - t_n) \quad [\text{ec. 2}]$$

donde  $t_n$  y  $t_{n+1}$  son tiempos de retención de los hidrocarburos saturados de cadena lineal (n-alcános) que eluyen inmediatamente antes y después del compuesto químico X y  $t_x$  es el tiempo de retención del compuesto X.

Los valores calculados mediante la **ec. 1** son comúnmente denominados en la literatura como índices de retención (IR o RI en inglés) e índices de retención de Kováts (IK o KI en inglés); mientras que los calculados mediante la **ec. 2** se llaman índices de retención (I), índices de retención relativos (IRL o LRI en inglés), índices de retención con temperatura programada (IRTP o PTRI en inglés) (d'Acampora *et al.*, 2008).

El uso de los IRL como criterio interactivo de identificación además de la comparación de los espectros de masas puede ser muy útil, dado que ofrece una herramienta independiente para la identificación de un compuesto (Mondello *et al.*, 1995; Shellie *et al.*, 2003). Más aun, los IRL se basan en una propiedad química de la sustancia, la naturaleza de la cual es completamente diferente de su espectro de masas.

Un procedimiento analítico por GC con una columna capilar específica requiere de un conjunto de variables operacionales, tales como grosor de la fase estacionaria, dimensiones de la columna, flujo de gas portador, programación de la temperatura, entre otros, las cuales pueden alterar el tiempo de retención del analito y esto hace que la reproducibilidad de los índices de retención entre laboratorios sea aun en la actualidad un problema sin resolver. Cuando los programas de

temperatura son usados con una velocidad de calentamiento constante durante toda la corrida cromatográfica, los IRL calculados son confiables; pero cuando se introducen períodos isotérmicos en el programa o la velocidad de calentamiento cambia durante la propia corrida cromatográfica, entonces el uso de los IRL puede no dar resultados seguros. Debe señalarse que las diferencias encontradas entre los IRL de diferentes autores pueden también estar dadas por el empleo de columnas que han sido impregnadas con la misma fase estacionaria, pero manufacturada por compañías distintas.

Los sistemas de índices de retención han sido discutidos por diferentes autores (Budahegyi *et al.*, 1983; Tarján *et al.*, 1989; d'Acampora *et al.*, 2008). Aunque existen muchos trabajos publicados con datos de IRL, en algunos de ellos no se han estandarizado los programas de temperatura, ni se ha reportado el grosor de la película de fase estacionaria usada, por lo que su certeza para usarlo como comparación es limitada. Merece señalarse la compilación de IRL de 400 compuestos monoterpénicos y sesquiterpénicos, en las fases metil silicona y Carbowax 20M (Davies, 1990).

Existen libros publicados con compilaciones de IRL de compuestos volátiles comunes en aceites esenciales, entre los que cabe destacar los de los autores siguientes: Jennings y Shibamoto (1980), Sadtler Research Laboratories (1984), Shibamoto (1987), Joulain y König (1998) y Adams (2007). En el primero de ellos se reportan 1150 compuestos volátiles con sus respectivos IRL en las fases metil silicona y Carbowax 20M (adipato de polietilenglicol), mientras que en el segundo se compilan IRL de 2000 compuestos en tres fases estacionarias. En el libro de Shibamoto (1987) se reportan los IRL y los índices de ésteres en la fase estacionaria Carbowax 20M de 183 constituyentes de aceites esenciales. En el libro de Joulain y König (1998) se listan 307 hidrocarburos sesquiterpénicos con sus espectros de masas e IRL en la fase CpSil 5 (dimetil polisiloxano 100%) y en libro de Adams (2007) se reportan los espectros de masas e IRL en la fase DB-5 (5% difenil: 95% dimetil polisiloxano) de 2205 compuestos de aceites esenciales.

En Internet existen varias bases de datos, pero cuya certeza no es confiable. Entre ellas, las más aceptadas son: Flavornet ([www.flavornet.org/flavornet.html](http://www.flavornet.org/flavornet.html)), LRI & Odour Database ([www.odour.org.uk/](http://www.odour.org.uk/)

index.html), Pherobase ([www.pherobase.com](http://www.pherobase.com)) y NISTwebbook (<http://webbook.nist.gov/chemistry.html>). En esta última base también aparecen los espectros de masas junto con otras propiedades físicas de los compuestos.

Con relación al uso combinado de espectrotescas de masas e IRL, las más importantes son la FFNSC MS Library ver. 1.3 (Chromaleont, Messina, Italia), la base desarrollada por Adams (Allured Publishing, Carol Stream, IL, USA) y la NIST 05-NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA).

La mejor opción siempre será que el analista cree su propia base de para la identificación. En tal caso, el espectro de masas y los valores de IRL en diferentes columnas de compuestos conocidos son introducidos en una base. La creación de una base propia requiere un tiempo prolongado, pero una vez creada es más confiable que cualquier otra. Un ejemplo de ello es nuestra propia base Flavorlib con más de tres mil compuestos típicos de aceites esenciales.

Adicionalmente al uso de los IRL, cuando en el aceite esencial bajo estudio se sospecha que un constituyente ya identificado corresponde a un pico cromatográfico se añade a la muestra una pequeña dosis de la sustancia de referencia y se realiza otro análisis (co-inyección). Si en el registro obtenido aparece el pico del componente aumentado en su dimensión, entonces se ha acertado en la predicción, pero si aparece un nuevo pico o aumenta el área de otro no contemplado inicialmente como el probable compuesto, entonces no se ha acertado en la identificación.

Los procedimientos basados en la comparación de índices de retención y co-inyección de sustancias de referencia serán más efectivos con la utilización de columnas con fases estacionarias de polaridades diferentes. Es de esperar que al variar la naturaleza de la fase se logren interacciones componente-fase diferentes y por tanto, retenciones distintas. Por lo general, se hace el estudio cualitativo en dos columnas de diferente polaridad, preferentemente una polar y otra apolar. Las fases estacionarias apolares más usadas están basadas en metilpolisiloxanos (SE-30, OV-1, OV-101, DB-1, HP-1, RTX-1, CP-Sil 5CB, etc.) y metilfenil-polisiloxanos (SE-52, SE-54, DB-5, HP-5, RTX-5, CP-Sil 8CB, etc.)

y como fase polar en polietilenglicol (PEG-20M, CW-20M, DB-Wax, etc.) (Rubiolo *et al.*, 2010).

Algunos de los estudios analíticos más completos han empleado la cromatografía bidimensional, en donde una parte recolectada de una primera separación (heart-cuts) es recromatografiada en otra columna con diferente fase estacionaria, con lo que se logra una mayor selectividad (Borg-Karlson *et al.*, 1993; Rubiolo *et al.*, 2010).

En años recientes, se desarrollaron los sistemas multidimensionales (MDGC en inglés) que consisten en el acople de dos columnas capilares convencionales conectadas en serie y caracterizadas por diferente selectividad (por ejemplo apolar-apolar, polar-quiral, etc.) (Sciarrone *et al.*, 2010). En general, las dos columnas pueden estar en el mismo horno o en dos hornos, permitiendo esta última variante una mayor flexibilidad. Se requiere de un sistema de transferencia entre las dos dimensiones para permitir el paso de las bandas cromatográficas desde la primera columna a la segunda. Una críotrampa, situada entre las dos columnas brinda las ventajas siguientes:

- (i) mejora de la sensibilidad por la reconcentración del compuesto,
- (ii) incremento de la capacidad del pico por reducción del ancho de las bandas cromatográficas de la primera columna y
- (iii) la concentración de los compuestos en concentraciones bajas que co-eluyen o no con los otros componentes.

Los sistemas de transferencia desarrollados pueden clasificarse en tres tipos:

- (i) válvulas en línea,
- (ii) válvulas fuera de línea y
- (iii) sistemas sin válvulas, menos comunes.

En el primer tipo, una válvula hace de interfase entre las dos columnas directamente; en el segundo tipo válvulas fuera de la línea son usadas para regular la dirección del flujo de gas portador hacia la interfase de la columna. Cuando un sistema MDGC (con válvula en línea o fuera de línea) está en modo inicial, se desarrolla un análisis dimensional, pero cuando la configuración se pasa a modo de corte, el efluente de la

primera columna capilar es dirigido hacia la segunda columna. Una excelente revisión de estos sistemas fue reportada por Tranchida *et al.* (2012b).

Los sistemas GCxGC fueron la primera variante desarrollada de MDGC y consiste en dos columnas con diferente polaridad conectadas directamente a un modulador criogénico del efluente. Cada pico cromatográfico que eluye de la primera columna es “cortado” en finas rebanadas durante un tiempo fijado (4 a 8 s) por enfoque criogénico. Cada rebanada es inyectada en línea en la segunda columna donde es analizada en el mismo tiempo de la modulación. Como consecuencia, un sistema GCxGC convencional generalmente consiste en una columna de 0.25 mm d.i. que produce picos con anchos de 6 a 8 s combinada con una columna corta de <1.5 a 2 m para analizar cada rebanada de pico que produce cada período de modulación. Esta técnica combinada con la MS es un sistema muy poderoso de separación (Marriott *et al.*, 2003; Di *et al.*, 2004; Mondello *et al.*, 2005; Rubiolo *et al.*, 2010; Tranchida *et al.*, 2011).

Otro desarrollo aplicado en el análisis de aceites esenciales es la GC rápida (fast-GC). Mediante esta técnica se realiza un análisis en un tiempo muy corto con una eficiencia comparable con la cromatografía de gases convencional (Matisova y Domotorova, 2003; Mondello *et al.*, 2004a,b; Rubiolo *et al.*, 2008, 2010; Tranchida *et al.*, 2006, 2008). Así por ejemplo, Mondello *et al.* (2003) lograron con esta técnica una resolución excelente del aceite esencial de limón en tan solo 9 min a diferencia de los 47 min que requirieron en una columna capilar convencional. Asimismo se ha reportado con éxito el uso de esta técnica combinada con un espectrómetro de masas cuadrupolo de alta velocidad, con un tiempo de análisis para un aceite esencial de cítricos de tan solo 17 min (Tranchida *et al.*, 2013).

El único inconveniente es que requiere cambios de temperaturas rápidos y altas presiones a la entrada de la columna capilar. Para una detección eficiente se requiere de detectores de masas de tiempo de vuelo (TOF-MS) en lugar de detectores de masas cuadrupolos, pues se necesita generar espectros de masas instantáneos, en combinación con algoritmos de deconvolución de picos para incrementar la velocidad de

adquisición de los datos del espectro de masas (hasta 5 mil espectros de masas) y se pueda identificar picos solapados.

Debido a que los aceites esenciales son una mezcla de compuestos de diversa naturaleza química con numerosos isómeros, un simple análisis por GC-MS puede no ser suficiente para una completa identificación. La espectrometría de masas en tándem (MS-MS) se ha desarrollado para poder hacer análisis separados de compuestos en una mezcla compleja de picos cromatográficos (Granero *et al.*, 2004; Ragunathan *et al.*, 1999). En esta técnica, los iones de interés (iones padres) son seleccionados por sus masas y fragmentados por colisión con un gas neutro seguido de un análisis de masas de los iones resultantes producidos.

El análisis por GC-MS puede ser complementado también por la cromatografía de gases con espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (GC-FTIR). Esta técnica espectroscópica permite diferenciar los isómeros geométricos con mayor eficacia que la MS (Ragunathan *et al.*, 1999). La utilidad de la GC-FTIR está limitada por dificultades en la cuantificación y por el consumo excesivo de tiempo en la interpretación de los resultados, pues las bases de espectros IR en fase gaseosa son limitadas, debido a que los espectros de las moléculas en fase vapor pueden ser muy diferentes a los correspondientes espectros en la fase condensada.

Un procedimiento diferente fue publicado por Reedy *et al.* (1985), mediante congelación del efluente de la columna cromatográfica mezclado con un gas inerte (generalmente argón) dentro de un disco rotatorio mantenido a la temperatura del He líquido con el fin de formar una matriz sólida. Después de la separación, se obtienen los espectros de absorción por reflexión. Otra técnica reportada fue por atrapamiento subambiental, en donde el efluente cromatográfico es congelado en una ventana transparente para IR de seleniuro de zinc (ZnSe) (Bourne *et al.*, 1990). Una ventaja de esto es que pueden usarse las librerías de espectros IR convencionales, además de que se alcanza una alta sensibilidad.

Además de la identificación de la estructura de los compuestos, es interesante determinar su quiralidad, debido a que la composición enan-

tiomérica de los constituyentes puede ser importante para determinar posibles orígenes geográficos, autenticidades y características sensoriales que aporta el compuesto. El reconocimiento quiral de los constituyentes de los aceites esenciales fue uno de los avances más importantes logrados en el análisis de aceites esenciales en las últimas décadas.

En la actualidad existen distintas columnas capilares enantioselectivas con fases quirales como derivados de la ciclodextrina (Bicchi *et al.*, 1999, 2008; Schurig, 2001; König y Hochmuth, 2004). En general, se prefieren los derivados de la ciclodextrina acilados para separar compuestos polares y derivados de la ciclodextrina pre-alquilados para los compuestos apolares. Como no existe un derivado de la ciclodextrina capaz de separar todos los racematos, debido al mecanismo intrínseco de reconocimiento quiral, se recomienda que un laboratorio debe tener, al menos, dos columnas con diferentes derivados de la ciclodextrina para permitir la separación enantiomérica del 80% de los racematos más comunes (Rubiolo *et al.*, 2010).

El empleo de la separación quiral en el análisis de aceites esenciales está bien documentado (Maas *et al.*, 1994; Schreier *et al.*, 1995; König *et al.*, 1992; Wüst y Mosandl, 1999; König y Hochmuth, 2004).

Shellie *et al.* (2004) demostraron que el empleo de un sistema con dos columnas acopladas (la primera de dietil-*tert*-butilsilil- $\beta$ -ciclodextrina y una segunda de baja polaridad, Rtx5-MS) mejora la resolución de los analitos de otras interferencias en la mezcla. De esta forma analizaron 13 aceites esenciales de plantas de la familia Mirtácea y determinaron la distribución enantiomérica del  $\beta$ -pineno, sabineno,  $\alpha$ -felandreno, limoneno, hidrato de *trans*- y *cis*-sabineno, linalol, terpinen-4-ol y  $\alpha$ -terpineol.

Finalmente, la elucidación de la estructura de los compuestos volátiles merece algunos comentarios generales. Se deben considerar etapas analíticas múltiples para la determinación inequívoca de los compuestos del aceite esencial. Si el investigador necesita un análisis de GC rápido o requiere mejorar la resolución de una muestra, como se ha descrito anteriormente, tiene que decidirlo sobre la base de caso por caso. Sin embargo, los avances continuados en la tecnología de la GC

mejorarán la eficiencia de la separación y el tiempo del análisis, aún en el análisis de rutina.

### Análisis cuantitativo

**E**l conocimiento de la composición cuantitativa de un aceite esencial puede ser necesaria por varias razones: estudios químico-taxonómicos de plantas, investigaciones de plantas no estudiadas, control de calidad de producciones comerciales, etc. Para todas estas aplicaciones se requiere de resultados cuantitativos confiables y reproducibles, con la menor variabilidad entre un instrumento y otro, así como de un laboratorio a otro. Un trabajo reciente de la composición del aceite esencial de *Tarhonanthus camphoratus* mostró claramente que las proporciones de hidrocarburos y compuestos oxigenados son muy diferentes si se usan los datos originales del porcentaje de área determinado por FID (45 y 38%, respectivamente) a cuando se emplean las áreas corregidas con factores de respuesta (39 y 43%, respectivamente) (Costa *et al.*, 2008).

Los aspectos cuantitativos del análisis de un aceite esencial no son tan simples, no solo debido a que la cuantificación ha sido considerada menos importante que la identificación de los compuestos químicos, sino también a que distintos aspectos de la cuantificación han sido históricamente ambiguos. Históricamente, la composición cuantitativa de un aceite esencial se ha informado en términos de abundancia relativas porcentuales, pero este proceder es de un valor limitado como se discutirá más adelante (Bicchi *et al.*, 2008; Cicchetti *et al.*, 2008). No obstante, la complejidad de los aceites esenciales, el número de aplicaciones y las respuestas cuantitativas que se requieren en el tema dificultan el uso de un solo procedimiento cuantitativo. Diferentes procedimientos son posibles en dependencia de su uso y destino para el análisis cuantitativo de un aceite esencial. En general, los procedimientos más comunes son:

- (i) abundancia relativa porcentual,
- (ii) abundancia porcentual normalizada con estándar interno, que incluye además la caracterización cualitativa del perfil cromatográfico, y

(iii) cuantificación real de uno o más compuestos mediante un método validado.

Un procedimiento cuantitativo de un aceite esencial tiene dos etapas principales: preparación de la muestra y el propio análisis. En cuanto a la preparación de la muestra, cualquiera que sea el método usado para aislar la fracción volátil (destilación por arrastre con vapor, hidrodestilación y extracción mecánica) deben tenerse en cuenta la variabilidad del material vegetal, tanto en la recolección de la planta y en su preparación, así como que debe analizarse un número de muestras para lograr resultados representativos (composición promedio de al menos tres muestras de diferentes poblaciones).

La cuantificación de los compuestos de un aceite esencial es muy dependiente del detector usado en la determinación cromatográfica. Se pueden usar distintos tipos de detectores (universales, selectivos o específicos), en dependencia de la aplicación. Los detectores universales son considerados los más apropiados para el análisis con fines cuantitativos debido a la naturaleza química de los compuestos presentes. Los detectores más usados son los de ionización por llama de hidrógeno (FID) y de espectrometría de masas (MSD).

Los requerimientos más importantes de un detector para ser usado en la cuantificación de aceites esenciales son alta sensibilidad y robustez, rango de linealidad extenso, bajo costo de operación y que tenga factores de respuesta cercanos a la unidad para todos los analitos. Este último requerimiento generalmente es subestimado. Así por ejemplo, numerosos estudios usan al MSD en modo de barrido (scan mode) para hacer simultáneamente la identificación y la cuantificación como porcentaje de área, sin tener en cuenta que la abundancia de fragmentos de la molécula es específica de la estructura de cada sustancia y esto no es igual para todos los compuestos del aceite esencial. El detector que cumple mejor el requerimiento de consistencia en el factor de respuesta es el de termoconductividad (TCD en inglés), pero posee como limitación su baja sensibilidad que es de un orden inferior a la alcanzada con el FID. Esto limita su uso cuando existen componentes trazas o en la GC rápida.

El FID es el detector más popular en el análisis cuantitativo de aceites esenciales, debido a que es universal, su alta sensibilidad y robustez. Sin

embargo, los factores de respuesta que genera pueden tener hasta un 60% de variación en dependencia de la estructura química de los compuestos presentes (d'Acampora *et al.*, 2008). Es de esperar que si el aceite esencial posee sustancias no volátiles, el empleo de las áreas cromatográficas causará un sobre-estimación de las concentraciones de las sustancias volátiles si no se usa un estándar interno, dado que las sustancias no volátiles no eluirán por la columna cromatográfica y por tanto, no habrá señales.

Para comprobar el desempeño de los métodos usuales de cuantificación, Cicchetti *et al.* (2008) reportaron un estudio con una solución modelo con distintos compuestos comunes en aceites esenciales. Los métodos de cuantificación usados fueron:

- (i) normalización interna o semi-cuantificación con FID (asumiendo factores de respuesta unitarios,
- (ii) semi-cuantificación con MSD,
- (iii) estándar interno con FID y
- (iv) estándar interno con MSD.

El método de semi-cuantificación con MSD mostró los peores resultados. Las áreas del MSD son producto de la suma de los iones resultantes de la ionización y fragmentación de un compuesto químico y por tanto, las señales serán diferentes de un compuesto a otro. Además, el potencial de ionización varía entre compuestos y las intensidades dependen de muchos factores, tales como limpieza y temperatura de la fuente, voltaje del repeedor, condiciones del filamento, entre otros (Millard, 1978).

La cuantificación con las áreas del FID dio mejores resultados que con el MSD. El mecanismo de ionización del FID se debe principalmente a la formación de iones  $\text{HCO}^+$ , por lo que su respuesta es casi una función del número de átomos de carbono en el compuesto. Muchos factores de respuesta relativos son cercanos a la unidad (Jorgensen *et al.*, 1990; Katrizky *et al.*, 1994; Cicchetti *et al.*, 2008), lo que permite justificar parcialmente el uso de la semi-cuantificación con FID.

Debe ser enfatizado que la cuantificación verdadera de todos los constituyentes de un aceite esencial es, en general, irrealizable. En ello influyen:

- (i) tiempos de análisis prolongados son inaceptables;
- (ii) no existen comercialmente estándares puros de todos los compuestos; y
- (iii) se requiere de suficiente aceite esencial para poder hacer las curvas de calibración.

Por tanto, la normalización del área de los picos cromatográficos puede hacerse cuando todos los componentes del aceite esencial son separados y detectados (es decir, no hay presencia de compuestos no volátiles), la respuesta del detector es lineal para todos los compuestos y no ocurre pérdida de muestra por discriminación en el inyector ni absorción irreversible en la columna.

El empleo de un estándar interno (en el estudio referenciado fue octanoato de metilo) dio los mejores resultados con ambos tipos de detectores. Independientemente del detector, las áreas de los picos cromatográficos fueron corregidas con los factores de respuesta relativos.

Como la señal del detector GC depende no solo de la concentración sino también de la estructura química y la composición elemental de los compuestos presentes, esto provoca que la respuesta del detector sea distinta y deba introducirse un factor de respuesta relativo para normalizar los resultados y hacerlos más fidedignos.

Los factores de respuesta relativos se calculan por la ecuación siguiente:

$$FRR = \frac{M_c A_{ei}}{M_{ei} A_c} \quad [\text{ec. 3}]$$

donde  $M_c$  y  $A_c$  son la masa y área cromatográfica del compuesto,  $M_{ei}$  y  $A_{ei}$  son la masa y el área cromatográfica del estándar interno.

La composición de un aceite esencial puede llegar a ser muy compleja y la determinación de los factores de respuesta puede llegar a ser muy tediosa. Cicchetti *et al.* (2008) demostraron que se puede crear

una base de factores de respuesta relativos que resulta válida para usos futuros, aún con pequeñas variaciones de los parámetros experimentales. Asimismo, se han propuesto procedimientos para predecir, a partir de entalpías de combustión, factores de respuesta de sustancias (de Saint Laumer *et al.*, 2010; Tissot *et al.*, 2012).

Por otra parte, Costa *et al.* (2008) propusieron el uso de factores de respuesta de acuerdo al grupo funcional a partir de la determinación de varios compuestos representativos de esos grupos y con n-nonano como estándar interno. Este procedimiento reporta los siguientes valores de factores de respuesta relativos al n-nonano; hidrocarburos mono- y sesquiterpénicos (1.0), aldehídos, alcoholes, éteres y cetonas con un sólo átomo de oxígeno (1.3) y para compuestos terpénicos con dos átomos de oxígeno, como los ésteres (1.6). Con estos factores de respuesta relativos, pueden cuantificarse los compuestos de un aceite esencial según la ecuación siguiente:

$$C = \frac{A_c C_{ei} \times FR}{A_{ei} M_a} \times 100 \quad \text{[ec. 4]}$$

donde C es la concentración del compuesto (g/100 g),  $A_c$  es el área cromatográfica del compuesto,  $M_a$  es la masa de aceite esencial (g),  $C_{ei}$  y  $A_{ei}$  son la masa y el área cromatográfica del estándar interno y FR el factor de respuesta del compuesto.

## Cromatografía de capa fina

El desarrollo de las técnicas de cromatografía de capa fina (TLC) no puede estar desligado de sus múltiples aplicaciones en el análisis de aceites esenciales. La TLC es aun, en la actualidad, una técnica válida para obtener rápidamente y de una forma económica un perfil de una matriz compleja como es un aceite esencial. En combinación con métodos densitométricos y espectroscópicos, la cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC) continua teniendo aplicaciones en el control de

calidad a pesar de los avances logrados, principalmente, por la GC (Franz, 2010).

Se han utilizado diferentes tipos de adsorbentes en la TLC, pero sin duda, el más usado ha sido el gel de sílice G, que contiene entre 5 y 15% de sulfato de calcio como aglutinante. Es importante controlar la actividad del adsorbente, de forma tal que se eviten isomerizaciones en los terpenos.

Una aplicación interesante de esta técnica es en el fraccionamiento de los aldehídos y cetonas a partir de sus derivados con la 2,4-dinitrofenilhidrazina (Beyer y Kargl, 1972; Pino, 1982; Sass-Kiss *et al.*, 1989).

## Cromatografía de columna

El método más simple de fraccionar un aceite esencial es por la técnica de cromatografía de columna. Básicamente, una porción del aceite esencial es pasada a través de una columna que contiene un adsorbente adecuado y es eluida con disolventes de diferente polaridad. Esto fracciona al aceite esencial de acuerdo a la polaridad de los constituyentes presentes. El empleo de la fase móvil puede ser tan simple como usar un disolvente apolar al principio para aislar los componentes apolares y otro polar para recuperar de la columna los componentes más polares (Pino, 1982; Pino y Rosado, 1988; Pino *et al.*, 1989a, 1989b; Pino *et al.*, 1990, 1991, 1993, 1994; Borges *et al.*, 1990; Borges y Pino, 1993) o con un gradiente de polaridad para lograr diferentes fracciones (Scheffer *et al.*, 1977; Pino y Montalvo, 1986a). Esta última variante parece más interesante, pero tiene la desventaja que un mismo compuesto puede estar en más de una fracción lo que dificulta su cuantificación y recobrado completo.

El adsorbente más comúnmente usado es el gel de sílice, pero también se han empleado otros como la alúmina.

Relaciones de carga de aceite esencial / gel de sílice se han reportado desde 0.003 hasta 800% (Kirchner y Miller, 1952; Braverman y

Solomiansky, 1957; Ferrer y Matthews, 1987; Tzamtzis *et al.*, 1990; Yamauchi y Saito, 1990).

Braverman y Solomiansky (1957) compararon la capacidad de adsorción para el aceite esencial de naranja con otros adsorbentes. Una mezcla de alúmina y kieselguhr tuvo la misma capacidad de adsorción que el gel de sílice, basado en la relación de volumen del aceite esencial adsorbido / aceite esencial despojado de compuestos oxigenados. Para ambos adsorbentes la relación másica fue 1:6 y en base peso, la capacidad de adsorción del gel de sílice fue 3.2 g de aceite esencial / g de adsorbente. Ferrer y Matthews (1987) determinaron que la capacidad de adsorción del Florisil fue 2.2 g de aceite esencial / g de adsorbente, calculada como la cantidad máxima de aceite esencial adicionado a la columna que dio negativo a un ensayo de aldehídos al eluato. Para el gel de sílice, una relación de carga aceite esencial / adsorbente de 4.4 fue considerada como la máxima capacidad de adsorción. Tzamtzis *et al.* (1990) informaron una relación de carga de 7.9; mientras que Yamauchi y Saito (1990) reportaron la ventaja de usar bajas relaciones de carga, tales como 20%, para separar los componentes del aceite esencial de limón en diferentes fracciones.

El mayor problema con este método radica en la posibilidad de degradación de algún componente con la formación de otros (comúnmente llamados “artefactos”), por lo que se debe tener cuidado en el control de la actividad y pureza del adsorbente, control de la temperatura, pH del proceso y en minimizar el contacto entre los componentes del aceite esencial y el adsorbente. Con el uso de gel de sílice de alta pureza, actividad 2-3 (5 a 7% de agua) y operando a 20°C se evitan isomerizaciones de los monoterpenos (Pino y Montalvo, 1986b).

Algunas reglas útiles para el buen desempeño de la técnica son:

- (i) el llenado de la columna con el adsorbente resulta mejor si se hace con el adsorbente suspendido en una parte del primer disolvente mientras se golpea suavemente el tubo de vidrio y se va drenando lentamente la columna, para de esta forma evitar la inclusión de burbujas de aire;
- (ii) recubrir la parte superior del adsorbente con una pequeña cantidad (1 cm) de sulfato de sodio anhidro para ejercer un

efecto deshidratante sobre el aceite esencial y los disolventes, lo que garantiza el poder de adsorción de la columna;

- (iii) la velocidad de paso del disolvente una vez iniciada la separación cromatográfica depende del tipo de adsorbente y de las dimensiones de la columna, pero en general, una velocidad de flujo de 40-50 gotas / min es adecuada;
- (iv) nunca debe usarse vacío para acelerar el proceso pues esto puede producir un desplazamiento irregular de las zonas;
- (v) cuando se emplean disolventes muy volátiles debe refrigerarse la columna de vidrio para evitar grietas que disminuyen la eficiencia del proceso; y
- (vi) es importante establecer la proporción adecuada de adsorbente y aceite esencial que debe emplearse en el procedimiento.

En el caso del gel de sílice, la proporción másica de aceite esencial / adsorbente no debe ser nunca menor de 1:10.

Un procedimiento simple de la técnica por cromatografía de columna consiste en utilizar una microjeringa de inyección para GC de 25  $\mu\text{L}$  y colocar en su interior un volumen de gel de sílice de aproximadamente 10  $\mu\text{L}$ . A continuación se pasa una alícuota del aceite esencial (80 a 100  $\mu\text{L}$ ) y se eluyen los compuestos apolares con 20  $\mu\text{L}$  de n-pentano y los compuestos polares con otros 20  $\mu\text{L}$  de éter etílico.

La cromatografía de columna también se ha utilizado para separar hidrocarburos sesquiterpénicos de acuerdo a los dobles enlaces presentes mediante el uso de gel de sílice impregnado con nitrato de plata. Primero eluyen los compuestos con enlaces endocíclicos y después los que tienen enlaces exocíclicos (Maarse y Van Os, 1973).

## Cromatografía líquida de alta eficiencia

**L**a cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC en inglés), en especial en su modalidad de fase inversa, que es la más usada, se apoya en un reducido número de rellenos cromatográficos. Su gran

aplicabilidad se debe a que la fase móvil interviene de forma decisiva en el proceso de separación cromatográfica y prácticamente se puede lograr una fase móvil diferente para cada problema analítico.

La HPLC es un método atractivo para el fraccionamiento de aceites esenciales debido a que usa diferentes propiedades físicas para la separación que las que emplea la GC (Lawrence y Shu, 1993), pero su mayor aplicación ha sido en la separación de los compuestos no volátiles presentes en los aceites esenciales (Dugo *et al.*, 2000; 2005a,b, 2008; Russo *et al.*, 2012).

El uso de la HPLC tiene la ventaja de que la separación se realiza a temperatura ambiente a diferencia de la GC, pero tiene como desventaja la baja sensibilidad en la detección con los detectores refractométricos y UV cuando las sustancias no tienen grupos cromóforos.

Es evidente que se pueden lograr análisis más rápidos y con mayor resolución cromatográfica con una reducción del tamaño de partícula del adsorbente, lo que a su vez conduce al empleo de mayores presiones de entrada de la fase móvil y el uso de columnas más cortas. Este tipo de aplicación ha sido reportada en el análisis de fracciones no volátiles (cumarinas, psoralenos y flavonas polimetoxiladas) de aceites esenciales de cítricos (Bonaccorsi *et al.*, 1999). La separación en menos de 7 min se logró con una columna de 3 cm x 4.6 mm rellena con la fase C18 con 3  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula y con un flujo de 2 mL/min. Un análisis convencional hubiera tardado 16 min.

El desarrollo de las técnicas de ionización a presión atmosférica (API en inglés) ha permitido una expansión de la detección por MS en la HPLC. Entre las interfaces basadas en API, la ionización por electrospray (ESI) y la ionización química a presión atmosférica con nebulizador calentado (HN-APCI), se complementan una a otra con relación a la polaridad, masa molecular de los analitos y parámetros cromatográficos. ESI es útil para moléculas entre 100 y 150 000 Da, mientras que APCI se utiliza para moléculas apolares y de mediana polaridad con pesos entre 100 y 2000 Da (Niessen, 1999). Las flavonas polimetoxiladas, que son más polares que las cumarinas y psoralenos, pueden ser analizadas con ambos ESI (Dugo *et al.*, 2000).

## Técnicas destilativas

La destilación se ha utilizado como forma de lograr una primera separación para simplificar la composición compleja de un aceite esencial. Generalmente se realiza con columna de fraccionamiento, a bajas presiones y en presencia de algún gas inerte. Aunque es poco usual en la actualidad encontrar reportes con el empleo de la destilación fraccionada para aislar compuestos puros, esta técnica mantiene su vigencia como técnica preparativa. Con el desarrollo de columnas de fraccionamiento muy eficientes pueden fraccionarse cantidades de hasta 100  $\mu$ L de aceite esencial a bajas presiones.

La mayor limitación de esta técnica es que raramente se obtienen compuestos completamente puros y que siempre es posible que puedan ocurrir isomerizaciones u oxidaciones de los compuestos más termolábiles.

Una aplicación de esta técnica es para la separación de la fracción de hidrocarburos terpénicos (previamente obtenida por separación en cromatografía de columna) en monoterpénicos y sesquiterpénicos (Correa *et al.*, 1985).

## Técnicas de separación química

Las reacciones químicas selectivas son otra forma de simplificar la muestra. Los ácidos, fenoles y las menos comunes bases, pueden ser separados por la formación de sales hidrosolubles (Lawrence y Shu, 1993). Los ésteres y lactonas pueden ser hidrolizados y los ácidos resultantes ser separados como sales alcalinas. Los compuestos carbonílicos pueden aislarse por reacción con sulfito ácido de sodio o reactivo Girard T y los alcoholes primarios y secundarios pueden separarse como ésteres del ácido ftálico.

Estas reacciones químicas logran su mayor potencialidad cuando se hacen como marchas analíticas (Armenteros y Pérez, 1978; Correa *et al.*, 1985; Pino, 1995).

No obstante, debe tenerse en cuenta que la aplicación de estas reacciones químicas puede causar otras transformaciones que pudieran alterar la composición original del aceite esencial.

## Referencias

- Acree T., Arn H. Flavornet. Cornell University, NYSAES: New York: <http://www.flavornet.com> (acceso 10 Oct 2013).
- Adams R.P. (2007). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Allured, Carol Stream, IL.
- Armenteros M., Pérez J. (1978). Analysis of centrifugated sweet orange peel oil produced in Cuba. Rev. CENIC 9, 183-193.
- Beyer C.F., Kargl T.E. (1972). Separation of 2,4-dinitrophenylhydrazones into classes by TLC on zinc carbonate. J. Chromatogr. 65, 435-437.
- Bicchi C., D'Amato A., Rubiolo P. (1999). Cyclodextrin derivatives as chiral selectors for direct gas chromatographic separation of enantiomers in the essential oil, aroma and flavour fields. J. Chromatogr. A 843, 99-121.
- Bicchi C., Liberto E., Cagliero C., Cordero C., Sgorbini B., Rubiolo P. (2008). Conventional and narrow bore short capillary columns with cyclodextrin derivatives as chiral selectors to speed-up enantioselective gas chromatography and enantioselective gas chromatography-mass spectrometry analyses. J. Chromatogr. A 1212, 114-123.
- Bicchi C., Liberto E., Matteodo M., Sgorbini B., Mondello L., d'Acampora Zellner B., Costa R., Rubiolo P. (2008). Quantitative analysis of essential oils: a complex task. Flavour Fragr. J. 23, 382-391.
- Bonaccorsi I., McNair H.M., Brunner L.A., Dugo P., Dugo G. (1999). Fast HPLC for the analysis of oxygen heterocyclic compounds of citrus essential oils. J. Agric. Food Chem. 47, 4237-4239.
- Borg-Karlson A.K., Lindstroem M., Norin T., Persson M., Valterova I. (1993). Enantiomeric composition of monoterpene hydrocarbons in different tissues of Norway Spruce, *Picea abies* (L.) Karst. A multi-dimensional gas chromatography study. Acta Chem. Scand. 47, 138-144.
- Borges P., Pino J., Rosado A. (1990). The isolation of volatile oil from coriander fruit by steam distillation. Nahrung/Foods 34 (9), 831-834.

- Borges P., Pino J. (1993). The isolation of volatile oil from cumin seeds by steam distillation. *Nahrung/Foods* 37(2), 123-126.
- Bourne S., Haefner A.M., Norton K.L., Griffi ths. P.R. (1990). Performance characteristics of a real-time direct deposition gas chromatography/Fourier transform infrared system. *Anal. Chem.*, 62, 2448-2452.
- Braverman J.B.S., Solomiansky L. (1957). Separation of terpeneless essential oils by chromatographic methods. *Perf. Ess. Oil Rec.* 48, 284-287.
- Budahegyi M.V., Lombosi E.R., Lombosi T.S., Mészáros S.Y., Nyiredy Sz., Tarján G., Timár I., Takács J.M. (1983). Twenty-fifth anniversary of the retention index system in gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 271, 213-307.
- Cicchetti E., Merle P., Chaintreau A. (2008). Quantitation in gas chromatography: usual practices and performances of a response factor database. *Flavour Fragr. J.* 23, 450-459.
- Correa M., Tápanes M., Pino J. (1985). Analysis of Cuban grapefruit peel oil. *Acta Alimentaria* 14 (4), 303-308.
- Costa R., d'Acampora Zellner B., Crupi M.L., De Fina M.R., Valentino M.R., Dugo P., Dugo G., Mondello L. (2008). GC-MS, GC-O and enantio-GC investigation of the essential oil of *Tarhomonanthus camphoratus* L. *Flavour Fragr. J.* 23, 40-48.
- Costa R., Dugo P., Santi L., Dugo G., Mondello L. (2010). Advances of modern gas chromatography and hyphenated techniques for analysis of plant extracts. *Curr. Org. Chem.* 14 (16), 1752-1768.
- d'Acampora Zellner B., Bicchi C., Dugo P., Rubiolo P., Dugo G., Mondello L. (2008). Linear retention indices in gas chromatographic analysis: a review. *Flavour Fragr. J.* 23, 297-314.
- Davies N.W. (1990). Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. *J. Chromatogr.* 503, 1-24.
- de Saint Laumer J.-Y., Cicchetti E., Merle P., Egger J., Chaintreau A. (2010). Quantification in gas chromatography: Prediction of flame ionization detector response factors from combustion enthalpies and molecular structures. *Anal. Chem.* 82, 6457-6462.
- Di X., Shellie R.A., Marriott P.J., Huie C.W. (2004). Application of headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and comprehensive two-dimensional

- gas chromatography (GC x GC) for the chemical profiling of volatile oils in complex herbal mixtures. *J. Sep. Sci.* 27, 451-458.
- Dugo P., Mondello L., Dugo L., Stancanelli R., Dugo G. (2000). LC-MS for the identification of oxygen heterocyclic compounds in citrus essential oils. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24, 147-154.
- Dugo G., Tranchida P.Q., Cotroneo A., Dugo P., Bonaccorsi I., Marriott P., Shellie R., Mondello L. (2005a). Advanced and innovative chromatographic techniques for the study of citrus essential oils. *Flavour Fragr. J.* 20, 249-264.
- Dugo P., Lo Presti M., Öhman M., Fazio A., Dugo G., Mondello L. (2005b). Determination of flavonoids in citrus juices by micro-HPLC-ESI/MS. *J. Sep. Sci.* 28, 1149-1156.
- Dugo P., Herrero M., Giuffrida D., Kumm T., Dugo G., Mondello L. (2008). Application of comprehensive two-dimensional liquid chromatography to elucidate the native carotenoid composition in red orange essential oil. *J. Agric. Food Chem.* 56, 3478-3485.
- El-Sayed A.M. The Pherobase: Database of Insect Pheromones and Semiochemicals. HortResearch, Lincoln, New Zealand: <http://www.pherobase.com> (acceso 10 Oct 2013).
- Ferrer O.J., Matthews R.F. (1987). Terpene reduction in cold-pressed orange oil by frontal analysis-displacement adsorption chromatography. *J. Food Sci.* 52, 801-805.
- Franz C.M. (2010). Essential oil research: past, present and future. *Flavour Fragr. J.* 25, 112-113.
- Gäbler, A., Boland, W., Preiss, U., Simon, H. (1991). Stereochemical studies on homoterpene biosynthesis in higher plants; mechanistic, phylogenetic, and ecological aspects. *Helv. Chim. Acta* 74, 1773-1789.
- Granero A.M., Gonzalez F.J.E., Frenich A.G., Sanz J.M.G., Vidal J.L.M. (2004). Single step determination of fragrances in *Cucurbita* flowers by coupling headspace solid-phase microextraction low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1045, 173-179.
- ISO 212 (1973). International Organization for Standardization. Essential Oils. Sampling.
- ISO 279 (1998). International Organization for Standardization. Essential Oils. Determination of relative density at 20 °C. Reference Method.

- ISO 280 (1998). International Organization for Standardization. Essential Oils. Determination of refractive index.
- ISO 356 (1996). International Organization for Standardization. Essential Oils. Preparation of test samples.
- ISO 592 (1998). International Organization for Standardization. Essential oils. Determination of optical rotation.
- ISO 709 (2001). International Organization for Standardization. Essential oils. Determination of ester value.
- ISO 875 (1999). International Organization for Standardization. Essentials oils. Evaluation of miscibility in ethanol.
- ISO 1041 (1973). International Organization for Standardization. Essential oils. Determination of freezing point value.
- ISO 1202 (1981). International Organization for Standardization. Essential oils. Determination of 1,8-cineole content.
- ISO 1241 (1996). International Organization for Standardization. Essential oils. Determination of ester values, before and after acetylation, and evaluation of the contents of free and total alcohols.
- ISO1242 (1999). International Organization for Standardization. Essential oils. Determination of acid value.
- ISO 1271 (1983). International Organization for Standardization. Essential oils. Determination of carbonyl value-Free hydroxylamine method.
- ISO 1272 (2000). International Organization for Standardization. Essential oils. Determination of content of phenols.
- ISO 1279 (1996). International Organization for Standardization. Essential oils. Determination of carbonyl value-Potentiometric methods using hydroxylammonium chloride.
- ISO 3793 (1976). International Organization for Standardization. Essential oils. Estimation of primary and secondary free alcohols by acetylation in pyridine.
- ISO 3794 (1976). International Organization for Standardization. Essential oils (containing tertiary alcohols). Estimation of free alcohols content by determination of ester value after acetylation.
- ISO 4715 (1978). International Organization for Standardization. Essential oils. Quantitative evaluation of residue on evaporation.

- ISO 4735 (2002). International Organization for Standardization. Oils of citrus. Determination of CD value by ultraviolet spectrometric analysis.
- ISO 5991 (1979). International Organization for Standardization. Essential oils. Determination of residue from distillation under reduced pressure.
- ISO 11021 (1999). International Organization for Standardization. Essential oils. Determination of water content. Karl Fischer method.
- ISO 11024-1 (1998). International Organization for Standardization. Essentials oils. General guidance on chromatographic profiles—Part 1: Preparation of chromatographic profiles for presentation in standards.
- ISO 11024-2 (1998). International Organization for Standardization. Essentials oils. General guidance on chromatographic profiles—Part 2: Utilization of chromatographic profiles of samples of essential oils.
- Jennings W.M., Shibamoto T. (1980). Qualitative Analysis of Flavour and Fragrance Volatiles by Glass Capillary Gas Chromatography. Academic Press, New York.
- Jennings W.M., Mittlefehldt E., Stremple P. (1997). Analytical Gas Chromatography, 2<sup>nd</sup> ed., Academic Press, San Diego.
- Jorgensen A.D., Picel K.C., Stamoudis V.C. (1990). Prediction of gas chromatography flame ionization detector response factors from molecular structures. *Anal. Chem.* 62, 683-689.
- Joulain D., König W.A. (1998). The Atlas of Spectral Data of Sesquiterpene Hydrocarbons. E.B.-Verlag, Hamburg.
- Alexander G., Juvancz Z., Szejtli J. (1987). Cyclodextrins and their derivatives as stationary phases in gc capillary columns. *J. High Res. Chromatogr.* 11, 110-113.
- Kirchner J.G., Miller J.M. (1952). Preparation of terpeneless essential oils  a chromatographic process. *Ind. Eng. Chem.* 44, 318-321.
- Kitson F.G., Larsen B.S., McEwen C.N. (1996). Gas Chromatography and Mass Spectrometry. A Practical Guide. Academic Press, New York.
- König W.A., Kruger A., Icheln D., Runge T. (1992). Enantiomeric composition of the chiral constituents in essential oils 1. Monoterpene hydrocarbons. *J. High Res. Chromatogr.* 15, 184-189.
- König W.A., Hochmuth D.H. (2004). Enantioselective gas chromatography in flavor and fragrance analysis: strategies for the identification of known and unknown plant volatiles. *J. Chromatogr. Sci.* 42, 423-439.

- Kováts E. (1958). Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. *Helv. Chim. Acta* 41 (7), 1915-1932.
- Katritzky A., Ignatchenko E.S., Barcock R.A., Lobanov V.S., Karelson M. (1994). Prediction of gas chromatographic retention times and response factors using a general qualitative structure-property relationships treatment. *Anal. Chem.* 66, 1799-1807.
- Lawrence B., Shu C.-K. (1993). Essential oils as components of mixtures: analysis and differentiation. En: Flavor Measurement. Ho C.-T., Manley C. (Eds.), Marcel Dekker Inc., New York, pp. 267-328.
- Maarse H., Van Os F.H.L. (1973). Volatile oil of *Origanum vulgare* L. spp. *vulgare*. I. Qualitative composition of the oil. *Flav. Ind.* 4 (11), 477-481.
- Maas B., Dietrich A., Mosandl A. (1994). Collection of enantiomer separation factors obtained by capillary gas chromatography on chiral stationary phases. *J. High Res. Chromatogr.* 17, 169-173.
- Marriott P.J., Shellie R., Cornwell C. (2001). Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *J. Chromatogr. A* 936, 1-22.
- Matisova E., Domotorova M. (2003). Fast gas chromatography and its use in trace analysis. *J. Chromatogr. A* 1000, 199-221.
- McNair H.M., Miller J.M. (1998). Basic Gas Chromatography: Techniques in Analytical Chemistry. Wiley Publishing, New York.
- Meilgaard M., Civille G.V., Carr B.T. (1999). Sensory Evaluation Techniques. 3<sup>rd</sup> ed., CRC Press, Boca Raton, Fl.
- Millard B.J. (1978). Quantitative Mass Spectrometry. Gaillard, Great Yarmouth, UK.
- Mondello L., Dugo P., Basile A., Dugo G., Bartle K.D. (1995). Interactive use of linear retention indices, on polar and apolar columns, with a MS-library for reliable identification of complex mixtures. *J. Microcol. Sep.* 7, 581-591.
- Mondello L., Casilli A., Tranchida P.Q., Cicero L., Dugo P., Dugo G. (2003). Comparison of fast and conventional GC analysis for citrus essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 51, 5602-5606.
- Mondello L., Casilli A., Tranchida P.Q., Costa R., Dugo P., Dugo G. (2004a). Fast GC for the analysis of citrus oils. *J. Chromatogr. Sci.* 42, 410-416.
- Mondello L., Tranchida P.Q., Casilli A., Favoino O., Dugo P., Dugo G. (2004b). Fast

- GC analysis with a 50  $\mu\text{m}$  ID column: Theory, practical aspects, and application to a highly complex sample. *J. Sep. Sci.* 27, 1149-1156.
- Mondello L., Casilli A., Tranchida P.Q., Dugo P., Dugo G. (2005). Comprehensive two-dimensional GC for the analysis of citrus essential oils. *Flavour Fragr. J.* 20, 136-140.
- Mottram R. The LRI and Odour Database. Flavour Research Group, School of Food Biosciences, University of Reading, UK: <http://www.odour.org.uk> (acceso 10 Oct 2013).
- Muñoz A.M., Civille G.V., Carr B.T. (1992). *Sensory Evaluation in Quality Control*. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Niessen W.M.A. (1999). En: *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry*. 2nd edn. Chromatographic Science Series, Vol. 79. New York, Marcel Dekker.
- Nojima S., Kiemle D.J., Webster F.X., Roelofs W.L. (2004). Submicro scale NMR sample preparation for volatile chemicals. *J. Chem. Ecol.* 30, 2153-2161.
- Petro-Turza M., Szárföldi-Szalma I. (1982). Examination of the volatile carbonyl fraction of fresh tomatoes and tomato preparations I. Thin-layer chromatographic separation. *Acta Alimentaria* 11 (1), 75-86.
- Pino J. (1982). Analysis of cold-pressed orange oil and of the essential oil present in aqueous condensate obtained from orange juice concentration. *Acta Alimentaria* 11 (2), 117-123.
- Pino J., Montalvo D. (1986a). Análisis de los constituyentes volátiles del condensado acuoso obtenido en la concentración del jugo de toronja. II. Separaciones cromatográficas. *Rev. Cienc. Quím.* 17 (3), 146-150.
- Pino J., Montalvo D. (1986b). Influencia de los parámetros de la cromatografía líquido-sólido con sílica gel sobre la isomerización de los hidrocarburos monoterpénicos presentes en los aceites esenciales de cítricos. *Rev. Cienc. Quím.* 17 (3), 122-124.
- Pino J., Rosado A. (1988). Analysis of Persian lime essence oil. *Nahrung/Foods* 32 (10), 977-980.
- Pino J., Rosado A., Baluja R., Borges P. (1989). Analysis of the essential oil of Mexican oregano (*Lippia graveolens* HBK). *Nahrung/Foods* 33 (3), 289-296
- Pino J., Rosado A., González A. (1989). Analysis of the essential oil of pimento berry (*Pimenta dioica* L.). *Nahrung/Foods* 33 (8), 717-720.
- Pino J., Rodríguez-Feo G., Borges P., Rosado A. (1990). Chemical and sensory properties of black pepper oil (*Piper nigrum* L.). *Nahrung/Foods* 34 (6),

555-560.

- Pino J., Borges P., Mollinedo B. (1991). Aceite esencial de nuez moscada (*Myristica fragrans* H.): Obtención y caracterización de su composición química. *Rev. Agroquím. Tecnol. Alimentos* 31 (3), 411-416.
- Pino J., Borges P., Roncal E. (1993). Diferenciación del aceite esencial de cuatro especies de orégano por cromatografía gas-líquido. *Alimentaria* (244), 105-107.
- Pino J., Rosado A., Goire I., Roncal E. (1994). The essential oil of *Ocimum basilicum* L. from Cuba. *J. Essent. Oil Res.* 6, 89-90.
- Pino J. (1995). Principios y Métodos para el Análisis del Aroma de los Alimentos. Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria, La Habana.
- Ragunathan N., Krock K.A., Klawun C., Sasaki T.A., Wilkins C.L. (1999). Gas chromatography with spectroscopic detectors. *J. Chromatogr. A* 856, 349-397.
- Reedy G.T., Ettinger D.G., Schneider J.F., Bourne S. (1985). High-resolution gas chromatography/matrix isolation infrared spectrometry. *Anal. Chem.* 57, 1602-1609.
- Rubiolo P., Liberto E., Sgorbini B., Russo R., Veuthey J.L., Bicchi C. (2008). Fast-GC - Conventional quadrupole mass spectrometry in essential oil analysis. *J. Sep. Sci.* 31, 1074-1084.
- Rubiolo P., Sgorbini B., Liberto E., Cordero C., Bicchi C. (2010). Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis. *Flavour Fragr. J.* 25 (5), 282-290.
- Russo M., Torre G., Carnovale C., Bonaccorsi I., Mondello L., Dugo P. (2012). A new HPLC method developed for the analysis of oxygen heterocyclic compounds in *Citrus* essential oils. *J. Ess. Oil Res.* 24 (2), 119-129.
- Sadtler Research Laboratories. The Sadtler Standard Gas Chromatography Retention Index Library. Sadtler Research Laboratories: Philadelphia, PA, 1984.
- Sass-Kiss A., Petró-Turza M., Szárföldi-Szalma I., Pino J., Rosado A. (1989). Investigation on the volatile oil of Makó onions. *Nahrung/Foods* 33 (5), 413-421.
- Scheffer J.J., Koedam A., Schusler M., Svendsen A.B. (1977). Improved gas chromatographic analysis of naturally occurring oxygen-containing monoterpenes following prefractionation by liquid-solid chromatography.

Chromatographia 10 (11), 669-677.

- Schreier P., Bernreuther A., Huffner A. (1995). Analysis of Chiral Organic Molecules, Methodology and Applications. de Gruyter, Berlin.
- Schurig V. (2001). Separation of enantiomers by gas chromatography. J. Chromatogr. A 906, 275-299.
- Sciarrone D., Schipilliti L., Ragonese C., Tranchida P.Q., Dugo P., Dugo G., Mondello L. (2010). Thorough evaluation of the validity of conventional enantio-gas chromatography in the analysis of volatile chiral compounds in mandarin essential oil: A comparative investigation with multidimensional gas chromatography. J. Chromatogr. A 1217, 1101-1105.
- Scott R.P.W. (1997). Introduction to Analytical Gas Chromatography, 2<sup>nd</sup> ed., Marcel Dekker, New York.
- Shellie R., Marriott P., Zappia G., Mondello L., Dugo G. (2003). Interactive use of linear retention indices on polar and apolar columns with an MS-library for reliable characterisation of Australian tea tree and other *Melaleuca* sp. oils. J. Essent. Oils Res. 15 (5), 305-312.
- Shellie R., Mondello L., Dugo G., Marriott P. (2004). Enantioselective gas chromatographic analysis of monoterpenes in essential oils of the family *Myrtaceae*. Flavour Fragr. J. 19, 582-585.
- Shibamoto T. (1987). Capillary Gas Chromatography in Essential Oil Analysis. Bicchi C., Sandra P. (Eds.). Huethig Verlag, Heidelberg.
- Tarján G., Nyiredy Sz, Györ M, Lombosi E.R, Lombosi T.S., Udahegyi M.V., Meszaros S. Y., Takacs J.M.J. (1989). Thirtieth anniversary of the retention index according to Kovats in gas-liquid chromatography. J. Chromatogr. 472, 1-92.
- Tissot E., Rochat S., Debonneville C., Chaintreau A. (2012). Rapid GC-FID quantification technique without authentic samples using predicted response factors. Flavour Fragr. J. 27, 290-296.
- Tranchida P.Q., Presti M.L., Costa R., Dugo P., Dugo G., Mondello L. (2006). High-throughput analysis of bergamot essential oil by fast solid-phase microextraction-capillary gas chromatography-flame ionization detection. J. Chromatogr. A 1103 (1), 162-165.
- Tranchida P.Q., Costa R., Dugo P., Dugo G., Mondello L. (2008). Micro-bore column fast gas chromatography-mass spectrometry in essential oil analysis. Nat. Prod. Comm. 3 (7), 1161-1164.

- Tranchida P.Q., Purcaro G., Dugo P., Mondello L. (2011). Modulators for comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Trends Anal. Chem.* 30 (9), 1437-1460.
- Tranchida P.Q., Bonaccorsi I., Dugo P., Mondello L., Dugo G. (2012a). Analysis of Citrus essential oils: state of the art and future perspectives. A review. *Flavour Fragr. J.* 27, 98-123.
- Tranchida P.Q., Sciarrone D., Dugo P., Mondello L. (2012b). Heart-cutting multidimensional gas chromatography: A review of recent evolution, applications, and future prospects. *Anal. Chim. Acta* 716, 66-75.
- Tranchida P.Q., Zoccali M., Franchina F.A., Bonaccorsi I., Dugo P., Mondello L. (2013). Fast gas chromatography combined with a high-speed triple quadrupole mass spectrometer for the analysis of unknown and target citrus essential oil volatiles. *J. Sep. Sci.* 36, 511-516.
- Tzamtzis N.E., Liodakis S.E., Parissakis G.K. (1990). The deterpenation of orange and lemon oils using preparative adsorption chromatography. *Flav. Fragrance J.* 5, 57-67.
- Van den Dool H., Kratz P.D. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr.* 11, 463-471.
- Wüst M., Mosandl A. (1999). Important chiral monoterpenoid ethers in flavours and essential oils - enantioselective analysis and biogenesis. *Eur. Food Res. Technol.* 209, 3-11.
- Yamauchi Y., Saito M. (190). Fractionation of lemon-peel oil by semipreparative supercritical fluid chromatography. *J. Chromatogr.* 505, 237-246.

## 8.- EFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS ACEITES ESENCIALES

### Introducción

Desde la Edad Antigua, los aceites esenciales han sido usados como bactericidas, virucidas, fungicidas, antiparasitarios, insecticidas, medicinas y aplicaciones cosméticas. En la actualidad también se emplean en las industrias farmacéutica, sanitaria, cosmética, agricultura y alimentos. Debido al modo de obtención, generalmente por destilación, los aceites esenciales contienen sustancias volátiles tales como terpenos y terpenoides, compuestos aromáticos bencenoides y fenilpropanoides y compuestos alifáticos. Si bien estos usos tan antiguos no han cambiado, en el presente se conocen mucho mejor los mecanismos de acción de estos compuestos.

El desarrollo de la síntesis orgánica permitió la producción de medicinas sintéticas a partir del siglo XX y el uso de los aceites esenciales con fines medicinales disminuyó en comparación con el empleo en cosméticos y alimentos. En la actualidad, la demanda de medicinas alternativas naturales y seguras como consecuencia del interés del público acerca de la toxicidad de los productos sintéticos (Gaysinsky y Weiss, 2007). En estos casos la extracción por destilación por arrastre con vapor o por expresión en el caso de los cítricos, es preferida. Para usos en perfumería, la extracción con disolventes lipofílicos o CO<sub>2</sub> supercrítico puede ser favorecida. De esta forma, la composición química del aceite esencial puede diferir de acuerdo al método de obtención. Los productos extraídos pueden variar en calidad, cantidad y composición de acuerdo al clima, características del suelo, órgano de la planta y estado vegetativo, entre otros (Masotti *et al.*, 2003; Angioni *et al.*, 2006), por lo que es

importante controlar todos estos aspectos para garantizar una composición constante.

En la literatura existen excelentes revisiones bibliográficas con relación a los efectos biológicos y bioactividad de los aceites esenciales que pueden también ser consultadas (Burt, 2004; Koroch *et al.*, 2007; Bakkali *et al.*, 2008; Lang y Buchbauer, 2012; Shaaban *et al.*, 2012; Saad *et al.*, 2013).

## Citotoxicidad

Los estudios sobre la composición química de los aceites esenciales han mostrado que las propiedades bioactivas son el resultado de la unión de muchos de sus componentes (Carson *et al.*, 2002). Sus características les confieren la capacidad de atravesar la pared celular y las membranas citoplasmáticas, alterando la estructura química de polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos y permeabilizando las membranas.

En las bacterias, la permeabilización de las membranas está asociada a una pérdida de iones, reducción del potencial de membrana, colapso en el bombeo de protones y una disminución de la reserva de ATP (Knobloch *et al.*, 1989; Sikkema *et al.*, 1994; Helander *et al.*, 1998; Ultee *et al.*, 2000, 2002; Di Pascua *et al.*, 2006; Turina *et al.*, 2006). Los aceites esenciales pueden penetrar en el citoplasma (Gustafson *et al.*, 1998) y provocar daños intracelulares al entrar en contacto con lípidos y proteínas (Ultee *et al.*, 2002; Oussalah *et al.*, 2006). Los daños en la pared celular y en la membrana citoplasmática pueden dar lugar a la fuga de macromoléculas y a la lisis (Gustafson *et al.*, 1998; Cox *et al.*, 2000; Lambert *et al.*, 2001; Juven *et al.*, 2004; Oussalah *et al.*, 2006).

En células eucariotas, los aceites esenciales pueden causar la despolarización de las membranas mitocondriales, con la consiguiente disminución del potencial de membrana, que afecta a los canales de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  (Richter y Schlegel, 1993; Vercesi *et al.*, 1997) y otros canales iónicos, reduciendo así el gradiente de pH y afectando el bombeo de protones y las reservas de ATP. Estos cambios en la fluidez de membrana

hacen que se vuelvan permeables y causen la fuga de radicales, Citocromo C, iones de  $\text{Ca}^{2+}$  y proteínas. Se ha planteado que estos efectos sobre la membrana mitocondrial externa e interna pueden dar lugar a la muerte celular por apoptosis y necrosis (Yoon *et al.*, 2000; Armstrong, 2006). Parece ser que las reacciones en cadena en la pared celular o en la membrana celular exterior invaden toda la célula, a través de las membranas de los diferentes organelos como la mitocondria y peroxisomas. Estos efectos sugieren una actividad prooxidante de tipo fenólica (Sakagami y Satoh, 1997; Sakagami *et al.*, 1999; Fukumoto y Mazza, 2000; Sakihama *et al.*, 2002; Burt, 2004; Barbehenn *et al.*, 2005).

Las alteraciones de la estructura celular en células tratadas con aceites esenciales ha sido demostrada por diferentes autores (Parveen *et al.*, 2004; Soylyu *et al.*, 2006; Santoro *et al.*, 2007a,b; Di Pasqua *et al.*, 2007).

La citotoxicidad de los aceites esenciales depende tanto de su composición química como del estado de crecimiento celular y puede ser atribuida principalmente a la presencia de fenoles, aldehídos y alcoholes (Recio *et al.*, 1989; Helander *et al.*, 1998; Bruni *et al.*, 2003; Sachetti *et al.*, 2005; Reichling *et al.*, 2006). Generalmente, las células en división son más sensibles a los AE que las células en estado latente. Los aceites esenciales son generalmente más inhibitorios contra las bacterias Gram-positivas que las Gram-negativas (Marino *et al.*, 2002; Chorianopoulos *et al.*, 2004; Gutierrez *et al.*, 2008). Mientras que esto es cierto para la mayoría de los aceites esenciales, existen algunos que son efectivos para ambos grupos, tales como los de orégano, clavo y canela (Sivropoulou *et al.*, 1996; Skandamis *et al.*, 2002; Kim y Fung, 2004). La citotoxicidad de compuestos como eugenol, isoeugenol, metileugenol y safrol también ha sido demostrada en células hepáticas de ratas y ratones (Burkey *et al.*, 2000).

Los mecanismos de esta acción citotóxica de los aceites esenciales han sido descritos, sin embargo, no se conocen con exactitud los mecanismos por los cuales pueden aparecer resistencia o adaptación microbiana (Burt, 2004).

Esta propiedad citotóxica es de gran importancia para el empleo de los aceites esenciales contra patógenos humanos o animales, parásitos y

productos agrícolas, entre otros. Los aceites esenciales o algunos de sus constituyentes son efectivos contra un gran número de organismos, entre los que se incluyen bacterias (Hong *et al.*, 2004; Rota *et al.*, 2004; Holley y Dhaval, 2005; Si *et al.*, 2006; Sonboli *et al.*, 2005, 2006 a,b; Schelz *et al.*, 2006; Basile *et al.*, 2006, Duarte *et al.*, 2007; van Vuuren y Viljoen, 2007; Bajpai *et al.*, 2008; Gutierrez *et al.*, 2008; Galluci *et al.*, 2009; Gilles *et al.*, 2010; Quijano *et al.*, 2010; Pino *et al.*, 2010; Gaviria *et al.*, 2011; Nedorostova *et al.*, 2011; Chibani *et al.*, 2013), hongos (Rodríguez *et al.*, 1996; Manohar *et al.*, 2001; Hammer *et al.*, 2002; Pitarokili *et al.*, 2002; Velluti *et al.*, 2003, 2004; Hong *et al.*, 2004; Kosalec *et al.*, 2005; Serrano *et al.*, 2005; Cavaleiro *et al.*, 2006; Pawar y Thaker, 2006; Soyly *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2008; Tripathi *et al.*, 2008), protozoos (Monzote *et al.*, 2006), parásitos (Boyom *et al.*, 2003; Moon *et al.*, 2006; Priestley *et al.*, 2006; Nibret y Wink, 2010), acáridos (Pontes *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2003, 2004; Choi *et al.*, 2004; Rim y Jee, 2006; Abdelgaleil *et al.*, 2009; Araujo *et al.*, 2010; Neves *et al.*, 2011; De Moraes *et al.*, 2012), larvas (Traboulsi *et al.*, 2002; Hierro *et al.*, 2004; Pavela, 2005; Tchoumboungang *et al.*, 2005; Morais *et al.*, 2006; Amer y Mehlhorn, 2006a,b; Ravi Kiran *et al.*, 2006; Senthilkumar y Venkatesalu, 2010; Silva *et al.*, 2010; Ramazani *et al.*, 2010, Akhtar *et al.*, 2012), gusanos e insectos (Lamiri *et al.*, 2001; Yang y Ma, 2005; Burfield y Reekie, 2005; Kouninki *et al.*, 2005; Sim *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2006; Chaiyasit *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2007), moluscos (Lahlou y Berrada, 2001), ADN y virus (Hayashi *et al.*, 1995; De Logu *et al.*, 2000; Jassin y Naji, 2003; García *et al.*, 2003; Allahverdiyev *et al.*, 2004; Reichling *et al.*, 2005; Duschatzky *et al.*, 2005; Bicchi *et al.*, 2009), células tumorales (Manosroi *et al.*, 2006) y levaduras (Harris, 2002; Hammer *et al.*, 2004; Duarte *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005; Carson *et al.*, 2006; Pauli, 2006; van Vuuren y Viljoen, 2007; Kunicka-Styczyńska, 2011).

Distintas investigaciones han reportado que los aceites esenciales poseen actividad antibacteriana contra un amplio rango de cepas, tales como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteria*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *S. typhimurium* (Hulin *et al.*, 1998). Esto es debido a la presencia de constituyentes activos, que incluyen a los hidrocarburos terpénicos, sus derivados oxigenados y fenoles. El carácter

lipofílico del esqueleto de los hidrocarburos terpénicos y el carácter hidrofílico de sus grupos funcionales son muy importantes para la acción antimicrobiana de los constituyentes de los aceites esenciales y de esta forma se ha propuesto el orden de actividad siguiente: fenoles > aldehídos > cetonas > alcoholes > ésteres > hidrocarburos (Kalemba y Kunicka, 2003).

Se ha comprobado que los isómeros enantioméricos pueden no tener la misma actividad antimicrobiana. Así, Lis-Balcnin *et al.* (1999) demostraron que en 18 de 25 cepas de bacterias diferentes, el enantiómero (-)- $\alpha$ -pineno fue más efectivo, mientras que para *Listeria monocytogenes* fue más efectivo el enantiómero (+).

La importancia del grupo hidroxilo de los fenoles ha sido reconocida como muy importante (Gulluce *et al.*, 2003; Bagamboula *et al.*, 2004; Başer *et al.*, 2008). El timol y carvacrol, fenoles comunes en muchos aceites esenciales, poseen una alta actividad contra un amplio número de microorganismos (Kalemba y Kunicka, 2003; Gulluce *et al.*, 2003). Ambos inhiben bacterias patogénicas como *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella choleraesuis* y *S. typhimurium* (Burt, 2004). Ambos fenoles también poseen actividad contra hongos en alimentos tales como *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* (Razzaghi-Abyaneh *et al.*, 2009). El eugenol, terpinen-4-ol y carvacrol mostraron actividad inhibitoria contra el crecimiento de cuatro cepas de *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* (Santoyo *et al.*, 2006).

Las especias e hierbas aromáticas han sido usadas históricamente como preservativos para el control de patógenos en los alimentos. Sin embargo, solo unos pocos aceites esenciales, tales como el de *Nandina domestica*, son conocidos como alternativa de los preservativos sintéticos (Bajpai *et al.*, 2008). Tiwari *et al.* (2009) publicaron una revisión con relación a las fuentes de antimicrobianos a partir de plantas, así como su aplicación potencial en alimentos.

La composición compleja de los aceites esenciales puede variar en función de las condiciones de crecimiento de cultivo de la planta, del modo de extracción y de otros factores que hacen que éstos tengan diferente grado de actividad antibacteriana (Dorman y Deans, 2000).

Los métodos comúnmente usados para evaluar la actividad antimicrobiana de aceites esenciales han sido discutidos por Holley y Patel (2005), así como Rios y Recio (2005).

Las aflatoxinas son micotoxinas altamente tóxicas, mutagénicas, teratogénicas y carcinogénicas, cuya presencia en alimentos contaminados resulta en un serio riesgo para la salud de las personas y animales. Se ha demostrado que los aceites esenciales de *Carum carvi*, *Thymus vulgaris* y *Citrus aurantifolia* (Razzaghi-Abyaneh *et al.*, 2009), *Origanum vulgare* (Ceker *et al.*, 2012a) y *Curcuma longa* (Ferreira *et al.*, 2013) poseen actividad anti-aflatoxigénica.

El virus *Herpes simplex* (HSV; tipo 1, 2), que causa una de las infecciones virales más comunes en las personas ha sido tratado con aceites esenciales. El aceite esencial de *Melissa officinalis*, que contiene citral y citronelal, inhibió la replicación del HSV; tipo 1, 2 (Allahverdiyev *et al.*, 2004). Los aceites esenciales de *Ridolfia segetum* y *Oenanthe crocata* (*Apiaceae*), mostraron inhibición a la polimerasa DNA dependiente, una enzima asociada a la actividad de la transcriptasa reversa HIV-1. Los principales constituyentes de *R. segetum* fueron  $\alpha$ -felandreno,  $\alpha$ -terpinoleno,  $\beta$ -felandreno y dillapiol, mientras que de *O. crocata* fueron sabineno, (*E*)- $\beta$ -ocimeno, (*Z*)- $\beta$ -ocimeno y  $\beta$ -pineno (Bicchi *et al.*, 2009).

## Fototoxicidad

Muchos aceites esenciales contienen moléculas fototóxicas como las furocumarinas. Estos compuestos son metabolitos secundarios de las plantas con actividad tóxica en presencia de luz, pues se activan en presencia de luz UV. Al ser activados, sus electrones alcanzan un estado de energía que les permite insertarse en la doble hélice del ADN, bloqueando su transcripción y reparación e incluso a veces provocando la muerte celular (Bakkali *et al.*, 2008).

Algunos aceites esenciales muestran actividad citotóxica y no fototóxica, como es el aceite esencial de sándalo (*Fusanus spicatus*), mientras que otros aceites esenciales, como los de *Citrus aurantium dulcis* y *Cymbopogon citratos* son citotóxicos y fototóxicos (Dijoux *et al.*,

2006), por lo que no puede concluirse que las dos actividades sean antagónicas. En el caso de la citotoxicidad, los aceites esenciales dañan las membranas celulares y de orgánulos al actuar como prooxidantes en proteínas y ADN, y producir especies reactivas de oxígeno. Una exposición a la luz no añade mucho más efecto sobre la reacción global, pero en el caso de la fototoxicidad, los aceites esenciales penetran en la célula sin causar daños en las membranas celulares, proteínas o ADN. Las reacciones de radicales se producen en presencia de luz por excitación de ciertas moléculas dando lugar a oxígeno singlete. Esto puede causar daños en orgánulos celulares y, en algunos casos, provocando la formación de aductos de ADN, de proteínas y de lípidos de membrana. La citotoxicidad o fototoxicidad parece ser dependiente del tipo de moléculas presentes en el aceite esencial y los diferentes tipos productores de radicales con o sin exposición a la luz (Edris, 2007).

## Mutagenicidad nuclear

Diferentes trabajos han demostrado el efecto mutagénico nuclear de los aceites esenciales. Así por ejemplo, el aceite esencial de *Artemisia dracunculus* tiene este efecto sobre *Bacillus subtilis* (Zani *et al.*, 1991). El aceite esencial de hierbabuena (*Mentha spicata*) y el de *Anethum graveolens* también mostraron genotoxicidad en *Drosophila melanogaster* (Franzios *et al.*, 1997; Karpouhtsis *et al.*, 1998). Los aceites esenciales extraídos de *Pinus sylvestris* y *Mentha piperita*, provocaron daños en linfocitos (Lazutka *et al.*, 2001).

También se ha estudiado la actividad individual de varios constituyentes aislados de los aceites esenciales. El eugenol ha mostrado genotoxicidad en células V79 (Maralhas *et al.*, 2006), no así el estragol (Muller *et al.*, 1994). Otros compuestos que han mostrado también genotoxicidad son la asarona y anetol (Hasheminejad y Caldwell, 1994), mentona (Franzios *et al.*, 1997) y terpineol (Gomes-Carneiro *et al.*, 1998). Sin embargo, otros como el cinamaldehído, carvacrol, timol y carvona demostraron un débil efecto mutagénico (Stanmati *et al.*, 1999).

La actividad genotóxica de 15 constituyentes comunes en aceites esenciales fue evaluada en *Drosophila melanogaster* y se encontró que 10 de ellos: d-neomentol, nerol, 1-octen-3-ol,  $\alpha$ -terpineol, acetato de nerilo, acetato de terpinilo, p-cimeno,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno y  $\alpha$ -terpineno no tuvieron actividad mutagénica a las concentraciones evaluadas; sin embargo, el (1R)-( $\alpha$ )-mirtenol y acetato de linalilo tuvieron efectos positivos débiles aun a la menor concentración evaluada (2.5  $\mu$ L/mL). Para el acetato de mirtenilo se detectó efecto positivo débil a la mayor concentración (10  $\mu$ L/mL), pero no a las más bajas. Los hidrocarburos monoterpénicos  $\alpha$ -terpineno y terpinoleno no mostraron actividad genotóxica a bajas concentraciones, pero para las más altas incrementaron su actividad mutante. Estos resultados demuestran claramente las diferencias en la actividad de los isómeros posicionales tales como el  $\alpha$ - y  $\alpha$ -terpineno, y terpinoleno (Mademtoglou *et al.*, 2013).

Los estudios de Gomes-Carneiro *et al.* (2005) sugirieron que el mirceno,  $\alpha$ -terpineno, así como (+) y (-)- $\alpha$ -pineno no son mutagénicos según el ensayo de Ames. En un estudio similar, también se comprobó que el óxido de  $\beta$ -cariofileno, un compuesto que la Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria reportó pendiente su aprobación para usar, no es mutagénico de acuerdo al ensayo de Ames (Di Soto *et al.*, 2013). La Tabla 8.1 recoge ejemplos de algunos aceites esenciales que no han mostrado mutagenicidad.

La mutagenicidad y carcinogenicidad se determinan por el ensayo de Ames *et al.* (1975) que fue posteriormente revisado por Maron y Ames (1983). Los estudios realizados hasta la fecha confirman la necesidad de realizar este tipo de ensayo si se persigue un uso comercial del aceite esencial.

**Tabla 8.1. Algunos de los aceites esenciales sin efecto mutagénico**

Aceite esencial	Organismo	Referencia
<i>Cinnamomum cassia</i> , <i>Chrysanthemum sibiricum</i> , <i>Paeonia moutan</i> , <i>Allium sativum</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	Park (2002)
<i>Helichrysum italicum</i> , <i>Ledum groenlandicum</i> , <i>Ravensara aromatica</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	Idaomar et al. (2002)
<i>Origanum onites</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	Ipek et al. (2005) Fletcher et al. (2005)
<i>Melaleuca alternifolia</i>	<i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Escherichia coli</i>	Evandri et al. (2005)
<i>Origanum compactum</i> , <i>Artemisia herba-alba</i> , <i>Cinnamomum camphora</i> , <i>Coriandrum sativum</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Bakkali et al. (2005)
<i>Salvia officinalis</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	Vukovic-Gacic et al. (2006)
<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	Stajković et al. (2007), Berić et al. (2008)
<i>Origanum compactum</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	Mezzoug et al. (2007)
<i>Ocimum selloi</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	de Paula et al. (2007)
<i>Artemisia campestris</i> var. <i>glutinosa</i> , <i>Artemisia herba-alba</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	Aicha et al. (2008)
<i>Ocimum basilicum</i> , <i>Hyssopus officinalis</i> , <i>Lavandula angustifolia</i> , <i>Melissa officinalis</i> , <i>Origanum vulgare</i> , <i>Salvia officinalis</i> , <i>Thymus vulgaris</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	De Martino et al. (2009)
<i>Cinnamum zeylanicum</i> , <i>Thymus vulgaris</i> , <i>Zataria multiflora</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	Shoeibi et al. (2009)
<i>Teucrium ramosissimum</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	Sghaier et al. (2010)
<i>Lavandula angustifolia</i> , <i>Elettaria cardamomum</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	Rahimifard et al. (2010)
<i>Orogranum rotundifolium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	Ceker et al. (2012b)
<i>Curcuma longa</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	Liju et al. (2013)

## Mutagenicidad citoplasmática

La mayoría de los estudios mutagénicos y de anti-mutagenicidad de aceites esenciales han sido llevados a cabo en bacterias, células hepáticas, linfocitos, insectos y levaduras, dando lugar a distintos resultados (Bakkali *et al.*, 2008).

Las levaduras, como organismos anaerobios facultativos, pueden sobrevivir con daños mitocondriales e incluso sin mitocondrias. Esto contrasta con lo observado en bacterias y en células de mamíferos, donde la inducción de defectos en la cadena respiratoria está asociada directamente a la muerte celular. Dada las ventajas del sistema de las levaduras, se ha demostrado que las mitocondrias son el objetivo diana de muchos aceites esenciales. Se ha reportado una relación directa entre el deterioro de la mitocondria y cambios inmediatos del metabolismo respiratorio de *Sacharomyces cerevisiae* tratada con el aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* (Schmolzt *et al.*, 1999). El tratamiento con aceite esencial de canela, clavo, ajo, cebolla y orégano sobre células de la misma especie de levadura mostró un retraso en la producción de etanol (Conner *et al.*, 1984). Por otro lado, la mitocondria en plantas no pueden realizar el metabolismo oxidativo en presencia de  $\alpha$ -pineno (Abraham *et al.*, 2003).

## Carcinogenicidad

Muchos aceites esenciales, o algunos de sus componentes, pueden ser considerados como carcinógenos secundarios después de su activación metabólica. Así, los aceites esenciales de *Salvia sclarea* y *Melaleuca quinquenervia*, que provocan la secreción de estrógenos, que pueden inducir la aparición de cáncer estrógeno dependiente (Guba, 2001).

Otros aceites esenciales contienen moléculas fotosensibles como flavinas, cianinas, porfirinas e hidrocarburos, que pueden causar eritemas o cáncer. Ejemplos de componentes específicos con actividad carcinogénica son el psoraleno es una compuesto fotosensible que se

encuentra en el aceite esencial de *Citrus bergamia* que puede inducir la formación de cáncer de piel por la formación de aductos de ADN bajo la acción de luz UV-A o luz solar (Averbeck y Averbeck, 1998). El safrol es el compuesto mayoritario de los aceites esenciales de *Sassafras albidum* y *Ocotea pretiosa* y ha demostrado inducir el metabolismo carcinogénico en roedores (Miller *et al.*, 1983; Burkey *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2000). El metileugenol es un constituyente del aceite esencial de *Laurus nobilis* que ha demostrado actividad carcinogénica en roedores (Burkey *et al.*, 2000). La pulegona es un componente característico en muchas especies de menta, que puede inducir la carcinogénesis generando una disminución de glutatión y una disminución de la protección celular frente a especies como radicales libres y peróxidos (Zhou *et al.*, 2004). El limoneno, como componente de los aceites esenciales de especies del género *Citrus*, y el estragol, como constituyente de los aceites esenciales de *Ocimum basilicum* y *Artemisia dracuncululus*, han mostrado actividad carcinogénica en ratas y ratones (Miller *et al.*, 1983; Anthony *et al.*, 1987).

## Actividad antimutagénica

Las mutaciones pueden ser prevenidas de varias formas, entre las que se incluyen la inhibición a la penetración de los mutágenos en las células, adición de antioxidantes que inactivan los radicales libres producidos por los mutágenos, activación de enzimas antioxidantes celulares y detoxificación de mutágenos por activación de enzimas mediante extractos de plantas (Ramel *et al.*, 1986; Hartman y Shankel, 1990; Shankel *et al.*, 1993; Waters *et al.*, 1996; Odin, 1997; Sharma *et al.*, 2001; Ipek *et al.*, 2005; Gomes-Carneiro *et al.*, 2005). Se han reportado estudios relacionados con la antimutagenicidad por reparación del ADN en *Escherichia coli* mediante compuestos terpénicos y fenólicos de aceites esenciales (Kada y Shimoi, 1987; Kuroda e Inoue, 1988). Sghaier *et al.* (2010) reportaron un efecto antimutagénico del aceite esencial de *Teucrium ramosissimum* contra la azida de sodio, aflatoxina B1, benzo[a]pireno y 4-nitro-o-fenilenediamina, posiblemente debido a reparación del ADN en *Salmonella typhimurium*. De igual forma, Aicha *et*

*al.* (2008) informaron un efecto antimutagénico de los aceites esenciales de *Artemisia campestris* y *Artemisia herba-alba* contra benzo[a]pireno.

Algunas investigaciones han demostrado que compuestos como el  $\alpha$ -terpineno, limoneno, 1,8-cineol,  $\alpha$ -terpineol, alcanfor, citronelal y citral modulan la actividad mono-oxigenasa hepática por interacción con promutágenos o biotransformación xenobiótica procarcinogénica (De Oliveira *et al.*, 1997). También se ha encontrado que el daño mitocondrial y la apoptosis / necrosis en *Saccharomyces cerevisiae* se reduce por la acción de aceites esenciales (Edris, 2007). Otros estudios han demostrado que algunos aceites esenciales poseen actividad antimutagénica en la mutación por luz UV (Vuković-Gaćić *et al.*, 2006; Bakkali *et al.*, 2008).

## Actividad anticancerígena

Es conocido que compuestos no-nutricionales en la dieta humana, entre los que se incluyen los terpenos, inhiben la carcinogénesis (Shaaban *et al.*, 2012). Distintos experimentos y estudios basados en la población indican que los terpenos tienen importancia en la reducción de la incidencia del cáncer (Trichopoulou *et al.*, 2000; Guba, 2001; Greenwald *et al.*, 2001). Se ha reportado que el limoneno inhibe la isoprenilación de proteínas (Moura *et al.*, 2001; Abdalla *et al.*, 2007).

Recientemente, Suhail *et al.* (2011) mostró que el aceite esencial de *Boswellia sacra* suprime rasgos malignos importantes de células del tumor, como la invasión y el crecimiento esferoidal del tumor multicelular.

Otros estudios han demostrado que la actividad antioxidante de los aceites esenciales es muy eficiente en la reducción del volumen del tumor o la proliferación celular del tumor por apoptosis o necrosis (Legault *et al.*, 2003; Hata *et al.*, 2003; Salim y Fukushima, 2003; Mazières *et al.*, 2003, 2004; Carvalho de Sousa *et al.*, 2004; Carnesecchi *et al.*, 2004; Kloog y Cox, 2004; Shen *et al.*, 2004; Yoo *et al.*, 2005; Dudai *et al.*, 2005; Paik *et al.*, 2005; Tsuneki *et al.*, 2005; Sylvestre *et al.*, 2005, 2006; Manosroi *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006; Kachadourian y Day, 2006).

Los aceites esenciales, debido a su capacidad de interferir con las funciones mitocondriales, pueden accionar como pro-oxidantes y convertirse así en agentes antitumorales.

## Actividad antioxidante

La actividad antioxidante es una de las más estudiadas en las investigaciones de aceites esenciales debido a que la oxidación daña distintas sustancias y lo que provoca la aparición de enfermedades, entre las que se incluyen el cáncer, envejecimiento, diabetes, aterosclerosis, artritis, inflamación, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y SIDA. Por esta razón, muchas enfermedades se tratan con antioxidantes para prevenir un daño oxidativo (Moon y Shibamoto, 2009).

Como resultado de ello, se realizan investigaciones en aceites esenciales para encontrar antioxidantes naturales seguros. La actividad antioxidante de algunos aceites esenciales es de esperar dada la presencia de fenoles. Es bien conocido que casi todos los fenoles funcionan como antioxidantes de la peroxidación de lípidos debido a que atrapan los radicales peroxilos (Pietta, 2000).

El aceite esencial de *Thymus capitata* posee el mayor poder antioxidante entre 25 aceites esenciales evaluados, seguido de los aceites esenciales de la hoja de clavo, hoja de canela, albahaca, eucalipto y manzanilla (Wei y Shibamoto, 2010). Otros estudios también han confirmado la actividad antioxidante de estos aceites esenciales (Tomaino *et al.*, 2005; El-Ghorab *et al.*, 2008). La actividad antioxidante de los aceites esenciales generalmente se asocia a los fenoles, tales como el timol y carvacrol, como sucede con el aceite esencial de *Th. capitata* (Miguel *et al.*, 2003a); sin embargo, otros aceites esenciales como los de *Th. albicans*, *Th. mastichina* y *Th. carnosus*, constituidos principalmente por 1,8-cineol, linalol, borneol y terpinen-4-ol mostraron la capacidad de prevenir la la peroxidación lipídica del aceite de girasol y su actividad antioxidante fue superior a la del BHT (Miguel *et al.*, 2003b).

Varios constituyentes típicos de los aceites esenciales son contribuyentes de sus actividades antioxidantes (Wei y Shibamoto, 2010),

entre los que se incluyen el  $\alpha$ -terpineno,  $\beta$ -terpineno y terpinoleno en el aceite esencial de *Melaleuca alternifolia*; 1,8-cineol en *Mentha aquatica*, *M. longifolia* y *M. piperita*; mentona e isomentona en *M. longifolia* y *M. piperita*; timol, eugenol y linalol en comino, canela y jengibre (El-massry y El-Ghorab, 2006); citral, citronelal, isomentona y mentona en *Melissa officinalis* (Mimica-Dukic *et al.*, 2004). Estos reportes sugieren que los aceites esenciales son fuentes de antioxidantes naturales que pueden ser empleados como alternativas efectivas o complementos de los antioxidantes sintéticos (Yanishlieva-Maslarova, 2001).

Una revisión de las técnicas más usadas para la determinación de actividad antioxidante en componentes de plantas fue reportada por Moon y Shibamoto (2009), así como Miguel (2010).

Debe señalarse que debido a los diferentes métodos de determinación de la actividad antioxidante *in vitro*, basados en reacciones completamente diferentes, la interpretación de los resultados es compleja cuando se trata de hacer comparaciones. Como consecuencia, los resultados de actividad antioxidante de los aceites esenciales de una misma especie pueden variar grandemente (Ruberto *et al.*, 2000; Puertas-Mejía *et al.*, 2002; Pizzale *et al.*, 2002; Kulisic *et al.*, 2005a,b). De los métodos existentes de determinación de actividad antioxidante, no existe uno que sea “universal”.

## Actividad digestiva

Es popularmente conocido que ciertas plantas aromáticas son usadas para problemas digestivos (Sandhar *et al.*, 2011). Ciertos estudios han confirmado que los aceites esenciales y sus constituyentes poseen actividad digestiva, aunque puede que otros componentes no volátiles también contribuyan a esta actividad (Meister *et al.*, 1999). El aceite esencial de lavanda tiene un efecto gastrointestinal mediante activación del nervio vago (Barocelli *et al.*, 2004). La estimulación olfativa por la fragancia del aceite esencial y su constituyente mayoritario linalol actúan en el nervio gástrico que mejora la ingesta de alimentos en pruebas con roedores.

Las plantas aromáticas son comúnmente procesadas como infusiones y de esta forma su acción es directa en el sistema gastrointestinal. En particular, los constituyentes activos actúan como inhibidores de la movilidad gástrica (antiespasmódico) (Shen *et al.*, 2005).

Algunos estudios de esta actividad en aceites esenciales que merecen ser citados son: *Satureja obovata*, con alcanfor, linalol y acetato de linalilo (Cruz *et al.*, 1990); *Satureja hortensis*, con  $\alpha$ -terpineno y carvacrol (Hajhashemi *et al.*, 2000); *Croton zehnerii*, con estragol y anetol (Coelho de Souza *et al.*, 1998); *Melissa officinalis*, con citral (Sadraei *et al.*, 2003); *Plectantrus barbatus*, con  $\alpha$ -pineno y cariofileno (Cámara *et al.*, 2003); *Pycnocycla spinosa*, con isopentanoato de geranilo y óxido de cariofileno (Sadraei *et al.*, 2003) y *Acalypha phleoides*, con timol, alcanfor y  $\alpha$ -terpineno (Astudillo *et al.*, 2004); *Thymus fallax* con carvacrol (Goze *et al.*, 2009); *Origanum acutidens* con carvacrol (Goze *et al.*, 2010); *Zingiber chrysanthum*, con  $\beta$ -humuleno, terpinen-4-ol,  $\beta$ -felandreno, sabineno y  $\beta$ -cariofileno (Arora *et al.*, 2010); *Juniperus excelsa* subsp. *excelsa*, con  $\alpha$ -pineno (Atas *et al.*, 2012) y *Rosa damascena*, con  $\beta$ -citronelol y geraniol (Sadraei *et al.*, 2013).

## Actividad analgésica

Ciertos aceites esenciales tienen un efecto antinociceptivo (para el tratamiento del dolor) atribuido a la presencia de determinados constituyentes en su composición química. El más conocido de todos, tal vez sea, los aceites esenciales de especies de menta con alto contenido del alcohol monoterpénico (-)-mentol, pues el (+)-mentol no posee actividad analgésica (Galeotti *et al.*, 2002). Otros compuestos con actividad analgésica son el óxido monoterpénico 1,8-cineol, presente en los aceites esenciales de *Eucalyptus tereticornis* y *E. globulus* (Silva *et al.*, 2003); el fenilpropanoide metileugenol, presente en el aceite esencial de *Asiasari radix* (Yano *et al.*, 2006); el alcohol monoterpénico (-)-linalol (Batista *et al.*, 2008), presente en el aceite esencial de *Lavandula hybrida* (Peana *et al.*, 2003) y la cetona monoterpénica (-)-carvona, presente en el aceite esencial de *Mentha spicata* (Souza *et al.*, 2013).

Otros aceites esenciales con actividad analgésica demostrada son los de *Satureja hortensis* (Hajhashemi *et al.*, 2002), *Rosmarinus officinalis* (Takaki *et al.*, 2008), *Mentha x villosa* (Sousa *et al.*, 2009), *Cyperus esculentus* y *Cyperus rotundus* (Biradar *et al.*, 2010), *Ocimum micranthum* (De Pinho *et al.*, 2012), *Pinus negra* subs. *pallsiana* (Gulcin *et al.*, 2003), *Zingiber zerumbet* (Khalid *et al.*, 2011), *Ocimum gratissimum* (Paula-Freire *et al.*, 2012), *Citrus aurantifolia* (Spadaro *et al.*, 2012), *Croton adamantinus* (Ximenes *et al.*, 2013) y *Pogostemon cablin* (He *et al.*, 2013).

## Actividad anti-inflamatoria

Los aceites esenciales se han usado tradicionalmente como para el tratamiento de inflamaciones por su efecto anti-inflamatorio. Un ejemplo de ellos es el aceite de manzanilla que posee una baja actividad inhibitoria de la lipoxigenasa a 0.5 µg/mL, pero es muy fuerte a 5 µg/mL (Wei y Shibamoto, 2010). Otros aceites esenciales con probada actividad anti-inflamatoria son los de *Glycyrrhiza uralensis* (Tanaka y Shibamoto, 2008), *Rosmarinus officinalis* (Takaki *et al.*, 2008; De Melo *et al.*, 2011), *Cyperus esculentus* y *Cyperus rotundus* (Biradar *et al.*, 2010), *Curcuma longa* (Liju *et al.*, 2011), así como *Cymbopogon citratus* y *Eucalyptus citriodora* (Gbenou *et al.*, 2013).

## Otras actividades

Existen otras actividades de los aceites esenciales y sus constituyentes además de las descritas anteriormente. Entre ellas pueden mencionarse la actividad antiosteoporótica, demostrada en la inhibición de la resorción en ratas experimentales por la acción de monoterpenos (Muhlbauer *et al.*, 2003); la prevención en la pérdida ósea en pacientes tratados con aceite esencial de pino y monoterpenos tales como borneol, timol y alcanfor (Muhlbauer *et al.*, 2003) y la actividad antiosteoporótica del ácido (2E,6R)-8-hidroxi-2,6-dimetil-2-octenoico, monoterpeno obtenido del aceite esencial de *Cistanche salsa* (Yamaguchi *et al.*, 1999).

La actividad para disminuir el progreso de la enfermedad de Alzheimer se ha demostrado en un estudio en el que se administró por vía oral el aceite esencial de *Salvia lavandulaefolia* (Perry *et al.*, 2003). Asimismo, en pruebas de inhibición de  $\beta$ -secretasa se encontró una alta efectividad con el aceite esencial de *Lavandula luisieri*. Esta enzima actúa en la primera etapa de la enfermedad de Alzheimer (Videira *et al.*, 2013). La administración de aceite esencial de limón moduló la respuesta neuronal relacionada con la nocicepción, dolor y ansiedad (Aloisi *et al.*, 2002; Ceccarelli *et al.*, 2004).

Con la *Angelica sinensis* se produce un tónico femenino importante en la farmacopea china. Con el tratamiento a ratas con el aceite esencial se demostró que posee un efecto similar al ansiolítico (Chen *et al.*, 2004). Dobetsberger y Buchbauer (2011) publicaron una excelente revisión con relación a la acción de los aceites esenciales en el sistema nervioso central de trabajos presentados en el período 2008-2010.

El control de insectos mediante aceites esenciales puede ser una vía para disminuir el consumo de insecticidas químicos cuyo uso trae aparejados problemas contaminantes y a la salud (Nerio *et al.*, 2010). En los últimos 50 años, miles de plantas han sido evaluados como fuentes potenciales de repelentes e insecticidas naturales (Sukumar *et al.*, 1991). La mayoría de los estudios se han hecho con la especie *Diptera*, particularmente aquellas pertenecientes al género *Aedes*, *Anopheles* y *Culex*, las que están relacionadas con enfermedades tales como la malaria, dengue, fiebre amarilla y encefalitis viral. Los géneros estudiados que parecen ser más prometedores con actividad repelente son *Cymbopogon*, *Ocimum* y *Eucalyptus*. Entre los constituyentes de estos aceites esenciales con mayor actividad aparecen el  $\alpha$ -pineno, limoneno, citronelol, citronelal, alcanfor y timol (Nerio *et al.*, 2010). Aunque desde el punto de vista económico, los insecticidas de origen sintético siguen siendo más utilizados, los aceites esenciales son un potencial eficiente y con menos daño al medio ambiente y a la salud humana que está por explotar.

El empleo de algunos compuestos presentes en aceites esenciales como semioquímicos en trampas masivas es también una posibilidad. El ipsenol [(S)-2-metil-6-metilenoct-7-en-4-ol] e ipsdienol [(4S)-2-metil-6-metilidenocta-2,7-dien-4-ol] junto con los hospederos etanol y  $\alpha$ -pineno

retienen significativamente más a los escarabajos *Monochamus scutellatus* y *M. clamator* que las trampas cebadas solamente con los hospederos (Allison *et al.*, 2003).

Prasad *et al.* (2005) estudiaron el efecto de extractos de *Syzygium aromaticum* sobre insulina y células hepáticas. Los resultados indicaron una reducción de la expresión de enzimas como fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa y glucosa-6-fosfatasa, ambas implicadas en la síntesis de glucosa, así como que la insulina y el aceite esencial regulan la expresión de genes de manera similar.

Los aceites esenciales de *Cyperus esculentus* y *Cyperus rotundus* poseen actividad anti-artrítica (Biradar *et al.*, 2010).

Un número apreciable de aceites esenciales son corrientemente usados en aromaterapia como agentes para aliviar la ansiedad, *stress* y la depresión. Entre ellos están los aceites esenciales de lavanda (*Lavandula angustifolia*), rosa (*Rosa damascena*), naranja (*Citrus sinensis*), bergamota (*Citrus aurantium* subsp. *bergamia*), limón (*Citrus limon*), sándalo (*Santalum album*), salvia (*Salvia sclarea*), manzanilla romana (*Anthemis nobilis*) y geranio (*Pelargonium* spp.)(Setzer, 2009).

Lu *et al.* (2013) evaluaron la actividad antimicrobiana y la inducción de cambios morfológicos en los patógenos del tabaco *Alternaria alternata*, *Colletotrichum destructivum* y *Phytophthora parasitica* en 29 aceites esenciales de plantas chinas. Los resultados demostraron que la inhibición del crecimiento micelar es ampliamente dependiente de la composición y concentración de los aceites esenciales. Las mayores actividades antimicrobianas se encontraron para los aceites esenciales de canela, geranio, comino, tomillo, albahaca y cañasanta. Los aceites esenciales de canela y tomillo tuvieron la mayor actividad contra el crecimiento micelar de los tres patógenos.

## Seguridad toxicológica

Los aceites esenciales y sus constituyentes han tenido un uso histórico en perfumería y como saborizantes (Wright, 1999). Históricamente, los aspectos relativos a la seguridad de su empleo le

correspondieron al grupo de evaluación de agentes saborizantes al Comité de Expertos de Aditivos Alimentarios de FAO/WHO (JECFA, 1998) y a la Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria (EFSA, 2004), aunque ya en 1996, JEFCA inició la revisión de los agentes saborizantes usados en alimentos. El procedimiento empleado por JEFCA para la evaluación de la seguridad de sustancias saborizantes reúne información relacionada con la ingesta, metabolismo y relaciones estructura-actividad con datos de toxicidad (JECFA, 1993, 1995, 1998, 2003). Para la evaluación de la seguridad, las sustancias saborizantes fueron primero compiladas en grupos de sustancias relacionadas estructuralmente, denominados Grupos genéricos. Los miembros de un mismo grupo congénico se espera tengan rutas comunes de metabolismo y por tanto, una toxicidad similar (Antignac *et al.*, 2011).

De acuerdo a JEFCA, las sustancias con estructura simple, que es conocido o se presume que serán metabolizadas en productos inocuos, pueden ser evaluadas sin datos de toxicidad. Por el contrario, la evaluación de seguridad de las sustancias que tienen su metabolismo poco definido o que se espera que se metabolicen en productos reactivos requieren de datos de toxicidad. El metabolismo o los datos de toxicidad son raramente accesibles para todos los miembros del grupo congénico, y la evaluación de las sustancias sin información depende de la disponibilidad de datos de otros miembros del grupo. Con esta metodología, la seguridad de más de 1400 sustancias saborizantes fue evaluada entre 1996 y 2004 (Munro y Kennepohl, 2001; Munro y Danielewska-Nikiel, 2006).

Los constituyentes de los aceites esenciales se forman a partir de cinco o seis vías biosintéticas (Smith *et al.*, 2004). Dado que todas estas vías funcionan en la mayoría de las plantas, los mismos o similares constituyentes están presentes en una amplia variedad de aceites esenciales. Este número limitado de vías biosintéticas conduce a un número limitado de variaciones estructurales en los compuestos químicos presentes. Los aceites esenciales contienen de 5 a 10 clases de estructuras químicas o sea grupos congénicos. De este sistema de evaluación de la seguridad puede afirmarse que el agrupamiento químico es también una herramienta útil para la evaluación de los aceites esenciales.

## Referencias

- Abdalla A.E.M., Darwish S.M., Ayad E.H.E., El-Hamahmy R.M. (2007). Egyptian mango by-product 2: Antioxidant and antimicrobial activities of extract and oil from mango seed kernel. *Food Chem.* 103, 1141-1152.
- Abdelgaleil S.A.M., Mohamed M.I.E., Badawy M.E.I., El-Arami S.A.A. (2009). Fumigant and contact toxicities of monoterpenes to *Sitophilus oryzae* (L.) and *Tribolium castaneum* (Herbst) and their inhibitory effects on acetylcholinesterase activity. *J. Chem. Ecol.* 35 (5), 518-525.
- Abraham D., Francischini A.C., Pergo E.M., Kelmer-Bracht A.M., Ishii-Iwamoto E.L. (2003). Effects of  $\alpha$ -pinene on the mitochondrial respiration of maize seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* 41, 985-991.
- Aicha N., Ines S., Mohamed B.S., Ines B., Soumaya K., Kamel G., Mohamed N., Imed C., Mohamed H., Leila C.-G. (2008). Chemical composition, mutagenic and antimutagenic activities of essential oils from Tunisian: *Artemisia campestris* and *Artemisia herba-alba*. *J. Ess. Oil Res.* 20 (5), 471-477.
- Akhtar Y., Pages E., Stevens A., Bradbury R., da Camara C.A.G., Isman M.B. (2012). Effect of chemical complexity of essential oils on feeding deterrence in larvae of the cabbage looper. *Physiol. Entomol.* 37, 81-91.
- Allahverdiyev A., Duran N., Ozguven M., Koltas S. (2004). Antiviral activity of the volatile oils of *Melissa officinalis* L. against *Herpes simplex virus* type-2. *Phytomedicine* 11, 657-661.
- Allison J.D., Morewood W.D., Borden J.H., Hein K.E., Wilson I.M. (2003). Differential bio-activity of *Ips* and *Dendroctonus* (Coleoptera: Scolytidae) pheromone components for *Monochamus clamator* and *M. scutellatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Environm. Entomol.* 32 (1), 23-30.
- Aloisi A.M., Ceccarelli I., Masi F., Scaramuzzino A. (2002). Effects of the essential oil from *Citrus lemon* in male and female rats exposed to a persistent painful stimulation. *Behav. Brain Res.* 136, 127-135.
- Amer A., Mehlhorn H. (2006a). Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae). *Parasitol. Res.* 99, 466-472.
- Amer A., Mehlhorn H. (2006b). Repellency effect of forty-one essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* mosquitoes. *Parasitol. Res.* 99, 478-490.

- Ames B.N., McCann J., Yamasaki E. (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian microsome mutagenicity test. *Mutation Res.* 31 (6), 347-364.
- Angioni A., Barra A., Coroneo, V., Dessi S., Cabras P. (2006). Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *J. Agric. Food Chem.* 54, 4364-4370.
- Anthony A., Caldwell G., Hutt A.G., Smith R.L. (1987). Metabolism of estragole in rat and mouse and influence of dose size on excretion of the proximate carcinogen l'-hydroxyestragole. *Food Chem. Toxicol.* 25, 799-806.
- Antignac E., Nohynek G.J., Re T., Clouzeau J., Toutain H. (2011). Safety of botanical ingredients in personal care products/cosmetics. *Food Chem. Toxicol.* 49, 324-341.
- Araújo Jr. C.P., Da Camara C.A.G., Neves I.A., De Carvalho Ribeiro N., Gomes C.A., De Moraes M.M., De Sousa Botelho P. (2010). Acaricidal activity against *Tetranychus urticae* and chemical composition of peel essential oils of three *Citrus* species cultivated in NE Brazil. *Nat. Prod. Comm.* 5 (3), 471-476.
- Arora M., Pal J., Prakash O., Pant A.K., Mathela C.S., Kanaujia S. (2010). *Zingiber chrysanthum* Rosc.: Essential oil composition, antioxidant and antispasmodic activity on isolated rat duodenum. *Int. J. Ess. Oil Therapeutics* 4 (1-2), 29-34.
- Armstrong J.S. (2006). Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. *BioEssays* 28, 253-260.
- Astudillo A., Hong F., Bye R., Navarrete A. (2004). Antispasmodic activity of extracts and compounds of *Acalypha phleoides* Cav. *Phytother. Res.* 18, 102-106.
- Atas A.D., Goze I., Alim A., Cetinus S.A., Durmus N., Vural N., Cakmak O. (2012). Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and antispasmodic activities of the essential oil of *Juniperus excelsa* subsp. *excelsa*. *J. Ess. Oil-Bearing Plants* 15 (3), 476-483.
- Averbeck D., Averbeck S. (1998). DNA photodamage, repair, gene induction and genotoxicity following exposures to 254 nm UV and 8-methoxypsoralen plus UVA in a eukaryotic cell system. *Photochem. Photobiol.* 68, 289-295.
- Bagamboula C.F., Uyttendaele M., Debevere J. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene

towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. Food Microbiol. 21, 33-42.

- Bajpai V.K., Rahman A., Kang S.C. (2008). Chemical composition and inhibitory parameters of essential oil and extracts of *Nandina domestica* Thunb. to control foodborne pathogenic and spoilage bacteria. Int. J. Food Microbiol. 125, 117-122.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Zhiri A., Idaomar M. (2005). Cytotoxicity and gene induction by some essential oils in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Mutat. Res. 585, 1-13.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. Food and Chemical Toxicology 46, 446-475.
- Lis-Balcnin M., Ochocka R.J., Deans S.G., Asztemborska M., Hart S. (1999). Differences in bioactivity between the enantiomers of  $\alpha$ -pinene. J. Ess. Oil Res. 11 (3), 393-397.
- Barbehenn R., Cheek S., Gasperut A., Lister E., Maben R. (2005). Phenolic compounds in red oak and sugar maple leaves have prooxidant activities in the midgut fluids of *Malacosoma disstria* and *Orgyia leucostigma* caterpillars. J. Chem. Ecol. 31, 969-988.
- Barocelli E., Calcina F., Chiavarini M., Impicciatore M., Bruni R., Bianchi A., Ballabeni V. (2004). Antinociceptive and gastroprotective effects of inhaled and orally administered *Lavandula hybrida* Reverchon 'Grosso' essential oil. Life Sci. 76, 213-223.
- Başer K.H.C. (2008). Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. Curr. Pharm. Design 14, 3106-3120.
- Basile A., Senatore F., Gargano R., Sorbo S., Del Pezzo M., Lavitola A., Ritieni A., Bruno M., Spatuzzi D., Rigano D., Vuotto M.L. (2006). Antibacterial and antioxidant activities in *Sideritis italica* (Miller) Greuter et Burdet essential oils. J. Ethnopharmacol. 107, 240-248.
- Batista P.A., Werner M.F.d.P., Oliveira E.C., Burgos L., Pereira P., Brum L.F.d.S., Santos A.R.S.d. (2008). Evidence for the involvement of ionotropic glutamatergic receptors on the antinociceptive effect of (-)-linalool in mice. Neurosci. Lett. 440 (3), 299-303.
- Berić T., Nikolić B., Stanojević J., Vuković-Gačić B., Knežević-Vukčević J. (2008). Protective effect of basil (*Ocimum basilicum* L.) against oxidative DNA damage and mutagenesis. Food Chem. Toxicol. 46 (2), 724-732.
- Bicchi C., Rubiolo P., Ballero M., Sanna C., Matteodo M., Esposito F., Zinzula L.,

- Tramontano E. (2009). HIV-1-inhibiting activity of the essential oil of *Ridolfia segetum* and *Oenanthe crocata*. *Planta Med.* 75 (12), 1331-1335.
- Biradar S., Kangralkar V.A., Mandavkar Y., Thakur M., Chougule N. (2010). Antiinflammatory, antiarthritic, analgesic and anticonvulsant activity of *Cyperus* essential oils. *Int. J. Pharmacy Pharm. Sci.* 2 (4), 112-115.
- Boutaghane N., Kabouche A., Touzani R., Maklad Y.A., El-Azzouny A., Bruneau C., Kabouche Z. (2011). GC/MS analysis and analgesic effect of the essential oil of *Matricaria pubescens* from Algeria. *Nat. Prod. Comm.* 6 (2), 251-252.
- Boyom F.F., Ngouana V., Zollo P.H.A., Menut C., Bessiere J.M., Gut J., Rosenthal P.J. (2003). Composition and anti-plasmodial activities of essential oils from some Cameroonian medicinal plants. *Phytochem.* 64, 1269-1275.
- Bruni R., Medici A., Andreotti E., Fantin C., Muzzoli M., Dehesa M. (2003). Chemical composition and biological activities of Isphingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. *Food Chem.* 85, 415-421.
- Burfield T., Reekie S.L. (2005). Mosquitoes, malaria and essential oils. *Inter. J. Aromather.* 15, 30-41.
- Burkey J.L., Sauer J.M., McQueen C.A., Sipes I.G. (2000). Cytotoxicity and genotoxicity of methyleugenol and related congeners – a mechanism of activation for methyleugenol. *Mutat. Res.* 453, 25-33.
- Burt S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223-253.
- Cámara C.C., Nascimento N.R.F., Macedo-Filho C.L., Almeida F.B.S., Fonteles M.C. (2003). Antispasmodic effect of the essential oil of *Plectranthus barbatus* and some major constituents on the Guinea-pig ileum. *Planta Med.* 69, 1080-1085.
- Carnesecchi S., Bras-Gonçalves R., Bradaia A., Zeisel M., Gossé F., Poupon M.F., Raul F. (2004). Geraniol, a component of plant essential oils, modulates DNA synthesis and potentiates 5-fluorouracil efficacy on human colon tumor xenografts. *Cancer Lett.* 215, 53-59.
- Carson C.F., Mee B.J., Riley T.V. (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1914-1920.
- Carson C.F., Hammer K.A., Riley T.V. (2006). *Melaleuca alternifolia* (Tea tree) oil: a

review of antimicrobial and other medicinal properties. Clin. Microbiol. Rev. 19, 50-62.

- Carvalho de Sousa A., Sales Alviano D., Fitzgerald Blank A., Barreto Alves P., Sales Alviano C., Rocha Gattass C. (2004). *Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. J. Pharm. Pharmacol. 56, 677-681.
- Cavaleiro C., Pinto E., Goncalves M.J., Salgueiro L. (2006). Antifungal activity of Juniperus essential oils against dermatophyte, *Aspergillus* and *Candida* strains. J. Appl. Microbiol. 100, 1333-1338.
- Ceccarelli I., Lariviere W.R., Fiorenzani P., Sacerdote P., Aloisi A.M. (2004). Effects of long-term exposure of lemon essential oil odor on behavioral, hormonal and neuronal parameters in male and female rats. Brain Res. 1001, 78-86.
- Ceker S., Agar G., Nardemir G., Anar M., Kizil H.E., Alpsoy L. (2012a). Investigation of anti-oxidative and anti-genotoxic effects of *Origanum vulgare* L. essential oil on human lymphocytes in vitro. J. Ess. Oil-Bearing Plants 15 (6), 997-1005.
- Ceker S., Nardemir G., Alpsoy L., Agar G., Mete E. (2012b). Anti-genotoxic and anti-oxidant effects of *Origanum rotundifolium* on human lymphocytes in vitro. J. Ess. Oil-Bearing Plants 15 (3), 415-423.
- Chaiyasit D., Choochote W., Rattanachanpichai E., Chaithong U., Chaiwong P., Jitpakdi A., Tippawangkosol P., Riyong D., Pitasawat B. (2006). Essential oils as potential adulticides against two populations of *Aedes aegypti*, the laboratory and natural field strains, in Chiang Mai province, northern Thailand. Parasitol. Res. 99, 715-721.
- Chen S.W., Min L., Li W.J., Kong W.X., Li J.F., Zhang Y.J. (2004). The effects of angelica essential oil in three murine tests of anxiety. Pharmacol. Biochem. Behav. 79, 377-382.
- Cheng S.S., Chang H.T., Wu C.L., Chang S.T. (2007). Anti-termitic activities of essential oils from coniferous trees against *Coptotermes formosanus*. Bioresour. Technol. 98, 456-459.
- Chibani S., Amira L., Kabouche A., Semra Z., Smati F., Aburjai T., Kabouche Z. (2013). Antibacterial activity and chemical composition of essential oil of *Santolina rosmarinifolia* L. (Asteraceae) from Algeria. Der Pharmacia Lettre 5 (2), 238-241.
- Choi W.-I., Lee S.-G., Park H.-M., Ahn Y.-J. (2004). Toxicity of plant essential oils to *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and *Phytoseiulus persimilis*

(Acari: Phytoseiidae). J. Econ. Entomol. 97 (2), 553-558.

- Chorianopoulos N., Kalpoutzakis E., Aligiannis N., Mitaku S., Nychas G.J., Haroutounian S.A. (2004). Essential oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* species: Chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. J. Agric. Food Chem. 52, 8261-8267.
- Coelho de Souza A.N., Criddle D.N., Leal-Cardoso J.H. (1998). Selective modulatory effects of the essential oil of *Croton zehntneri* on isolated smooth muscle preparations of the guinea-pig. Phytother. Res. 12, 189-194.
- Conner D.E., Beuchat L.R., Worthington R.E., Hitchcock H.L. (1984). Effects of essential oils and oleoresins of plants on ethanol production, respiration and sporulation of yeasts. Inter. J. Food Microbiol. 1, 63-74.
- Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R., Wyllie S.G. (2000). The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). J. Appl. Microbiol. 88, 170-175.
- Cruz T., Cabo M.M., Jiménez J., Zarzuelo A. (1990). Composition and pharmacological activity of the essential oil of *Satureja obovata*. II. Spasmolytic activity. Fitoterapia 61, 247-251.
- De Logu A., Loy G., Pellerano M.L., Bonsignore L., Schivo M.L. (2000). Inactivation of HSV-1 and HSV-2 and prevention of cell-to-cell virus spread by *Santolina insularis* essential oil. Antivir. Res. 48, 177-185.
- De Martino L., De Feo V., Nazzaro F. (2009). Chemical composition and in vitro antimicrobial and mutagenic activities of seven Lamiaceae essential oils. Molecules 14, 4213-4230.
- De Melo G.A.N., Grespan R., Fonseca J.P., Farinha T.O., Silva E.L., Romero A.L., Bersani-Amado C.A., Cuman R.K.N. (2011). *Rosmarinus officinalis* L. essential oil inhibits in vivo and in vitro leukocyte migration. J. Med. Food 14 (9), 944-949.
- De Moraes M.M., Da Camara C.A.G., Dos Santos M.L., Fagg C.W. (2012). Essential oil composition of *Eugenia langsdorffii* O. Berg.: Relationships between some terpenoids and toxicity against *Tetranychus urticae*. J. Braz. Chem. Soc. 23 (9), 1647-1656.
- De Oliveira A.C.A.X., Ribeiro-Pinto L.F., Paumgarten F.J.R. (1997). In vitro inhibition of CYP2B1 monooxygenase by  $\beta$  myrcene and other monoterpenoid compounds. Toxicol. Lett. 92, 39-46.

- De Paula J.P., Farago P.V., Ribas J.L.C., Spinardi G.M.S., Döll P.M., Artoni R.F., Zawadzki S.F. (2007). In vivo evaluation of the mutagenic potential of estragole and eugenol chemotypes of *Ocimum selloi* Benth. essential oil. Latin American J. Pharm. 26 (6), 846-851.
- De Pinho J.P.M., Silva A.S.B., Pinheiro B.G., Sombra I., De Carvalho Bayma J., Lahlou S., Da Cunha Sousa P.J., Magalhães P.J.C. (2012). Antinociceptive and antispasmodic effects of the essential oil of *Ocimum micranthum*: Potential anti-inflammatory properties. Planta Med. 78 (7), 681-685.
- Dijoux N., Guingand Y., Bourgeois C., Durand S., Fromageot C., Combe C., Ferret P.J. (2006). Assessment of the phototoxic hazard of some essential oils using modified 3T3 neutral red uptake assay. Toxicol. in Vitro 20, 480-489.
- Di Pasqua R., Hoskins N., Betts G., Mauriello G. (2006). Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. J. Agric. Food Chem. 54, 2745-2749.
- Di Pasqua R., Betts G., Hoskins N., Edwards M., Ercolini D., Mauriello G. (2007). Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. J. Agric. Food Chem. 55, 4863-4870.
- Di Sotto A., Maffei F., Hrelia P., Castelli F., Sarpietro M.G., Mazzanti G. (2013). Genotoxicity assessment of  $\beta$ -caryophyllene oxide. Regulatory Toxicol. Pharmacol. 66 (3), 264-268.
- Dobetsberger C., Buchbauer G. (2011). Actions of essential oils on the central nervous system: An updated review. Flavour Fragr. J. 26, 300-316.
- Dorman H.J.D., Deans S.G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J. App. Microbiol. 88, 308-316.
- Duarte M.C., Figueira G.M., Sartoratto A., Rehder V.L.G., Delarmelina C. (2005). Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. J. Ethnopharmacol. 97, 305-311.
- Duarte M.C., Leme E.E., Delarmelina C., Soares A.A., Figueira G.M., Sartoratto A. (2007). Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. J. Ethnopharmacol. 111, 197-201.
- Dudai N., Weinstein Y., Krup M., Rabinski T., Ofir R. (2005). Citral is a new inducer of caspase-3 in tumor cell lines. Planta Med. 71, 484-488.
- Duschatzky C.B., Possetto M.L., Talarico L.B., Garcia C.C., Michis F., Almeida N.V., De Lampasona M.P., Schuff C., Damonte E.B. (2005). Evaluation of

- chemical and antiviral properties of essential oils from South American plants. *Antivir. Chem. Chemother.* 16, 247-251.
- Edris A.E. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents. *Phytother Res.* 21, 308-323.
- EFSA (2004). Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food, 2004. Opinion on Flavouring Group FGE.03 Acetals of branched- and straight-chain aliphatic saturated primary alcohols and branched- and straight-chain saturated aldehydes, and an orthoester of formic acid, from chemical groups 1 and 2. Opinion expressed on 7 October 2004. At: <http://www.efsa.europa.eu/en/ceftopics/topic/flavourings.htm>.
- El-massry K.F., El-Ghorab A.H. (2006). Effect of essential oils and non-volatile extracts of some aromatic plants on Cu induced oxidative modification of human low-density lipoprotein (LDL). *J. Essent. Oil Bear. Plants* 3, 292-299.
- Evandri M.G., Battinelli L., Daniele C., Mastrangelo S., Bolle P., Mazzanti G. (2005). The antimutagenic activity of *Lavandula angustifolia* (lavender) essential oil in the bacterial reverse mutation assay. *Food Chem. Toxicol.* 43, 1381-1387.
- Ferreira F.D., Kimmelmeier C., Arrotéia C.C., Da Costa C.L., Mallmann C.A., Janeiro V., Ferreira F.M.D., Mossini S.A.G., Silva E.L., Machinski Jr. M. (2013). Inhibitory effect of the essential oil of *Curcuma longa* L. and curcumin on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* Link. *Food Chem.* 136 (2), 789-793.
- Fletcher J.P., Cassella J.P., Hughes D., Cassella S. (2005). An evaluation of the mutagenic potential of commercially available tea tree oil in the United Kingdom. *Int. J. Aromatherapy* 15 (2), 81-86.
- Franzios G., Mirotsoy M., HatziaPOSTOLOU E., Kral J., Scouras Z.G., Mavragani-Tsipidou P. (1997). Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 45, 2690-2694.
- Fukumoto L.R., Mazza G. (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 48, 3597-3604.
- Galeotti N., Di Cesare Mannelli I., Mazzanti G., Bartolini A., Ghelardini C. (2002). Menthol: A natural analgesic compound. *Neurosci. Lett.* 22, 145-148.
- Gallucci M.N., Oliva M., Casero C., Dambolena J., Luna A., Zygadlo J., Demo M. (2009). Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus*

*cereus*. Flavour Fragr. J. 24, 348-354.

- Garcia C., Talarico L., Almeida N., Colombres S., Duschatzky C., Damonte B. (2003). Virucidal activity of essential oils from aromatic plants of San Luis, Argentina. *Phytother. Res.* 17, 1073-1075.
- Gaviria M., Quijano C.E., Pino J., Madriñán S. (2011). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Drimys granadensis* L.f. leaves from Colombia. *Chem. & Biodiver.* 8, 532-538.
- Gaysinsky S., Weiss J. (2007). Aromatic and spice plants: Uses in food safety. *Stewart Post Harvest Rev.* 4, 1-9.
- Gbenou J.D., Ahounou J.F., Akakpo H.B., Laleye A., Yayi E., Gbaguidi F., Baba-Moussa L., Darboux R., Dansou P., Moudachirou M., Kotchoni S.O. (2013). Phytochemical composition of *Cymbopogon citratus* and *Eucalyptus citriodora* essential oils and their anti-inflammatory and analgesic properties on Wistar rats. *Molecular Biol. Rep.* 40 (2), 1127-1134.
- Gilles M., Zhao J., An M., Agboola S. (2010). Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. *Food Chem.* 119, 731-737.
- Gomes-Carneiro M.R., Felzenszwalb I., Paumgarten F.J.R. (1998). Mutagenicity testing of ( $\pm$ )-camphor, 1,8-cineole, citral, citronellal, (-)-menthol and terpineol with the *Salmonella*/microsome assay. *Mutat. Res.* 416, 129-136.
- Gomes-Carneiro M.R., Dias D.M.M., De-Oliveira A.C.A.X., Paumgarten F.J.R. (2005). Evaluation of mutagenic and antimutagenic activities of  $\alpha$ -bisabolol in the *Salmonella*/microsome assay. *Mutat. Res.* 585, 105-112.
- Goze I., Alim A., Cetinus S.A., Durmus N., Vural N., Goze H.M. (2009). Chemical composition and antioxidant, antimicrobial, antispasmodic activities of the essential oil of *Thymus fallax* Fisch. *Mey. J. Med. Plants Res.* 3 (3), 174-178.
- Goze I., Alim A., Cetinus S.A., Çetin A., Durmus N., Atas A.T., Vural N. (2010). In vitro antimicrobial, antioxidant, and antispasmodic activities and the composition of the essential oil of *Origanum acutidens* (Hand.-Mazz.) letsvaart. *J. Medicinal Food* 13 (3), 705-709.
- Greenwald P., Clifford C.K., Milner J.A. (2001). Diet and cancer prevention. *Eur. J. Cancer* 37, 948-965.
- Guba R., 2001. Toxicity myths – essential oils and their carcinogenic potential.

Int. J. Aromather. 11, 76-83.

- Gülçin I., Büyükokuroğlu M.E., Oktay M., Küfrevioğlu O.I. (2003). Antioxidant and analgesic activities of turpentine of *Pinus nigra* Arn. subsp. *palsiana* (Lamb.) Holmboe. J. Ethnopharmacol. 86 (1), 51-58.
- Gulluce M., Sokmen M., Daferera D., Agar G., Ozkan H., Kartal N., Polisiou M., Sokmen A., Sahin F. (2003). In vitro antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L. J. Agric. Food Chem. 52, 3958-3965.
- Gutiérrez J., Rodríguez G., Barry-Ryan C., Bourke P. (2008). Efficacy of plant essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria associated with ready-to-eat vegetables: Antimicrobial and sensory screening. J. Food Prot. 71 (9), 1846-1854.
- Gutierrez J., Barry-Ryan C., Bourke P. (2008). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. Int. J. Food Microbiol 124, 91-97.
- Gustafson J.E., Liew Y.C., Chew S., Markham J.L., Bell H.C., Wyllie S.G., Warmington J.R. (1998). Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. Lett. Appl. Microbiol. 26, 194-198.
- Hajhashemi V., Sadrael H., Ghannadi A.R., Mohseni M. (2000). Antispasmodic and anti-diarrhoeal effect of *Satureja hortensis* L. essential oil. J. Ethnopharmacol. 71 (1-2), 187-192.
- Hajhashemi V., Ghannadi A., Pezeshkian S.K. (2002). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Satureja hortensis* L. extracts and essential oil. J. Ethnopharmacol. 82 (2-3), 83-87.
- Hammer K.A., Carson C.F., Riley T.V. (2002). In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi. J. Antimicrob. Chemother. 50, 195-199.
- Hammer K.A., Carson C.F., Riley T.V. (2004). Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. J. Antimicrob. Chemother. 53, 1081-1085.
- Harris R. (2002). Progress with superficial mycoses using essential oils. Int. J. Aromather. 12, 83-91.
- Hartman P.E., Shankel D.M. (1990). Antimutagens and anticarcinogens: a survey

- of putative interceptor molecules. *Environ. Mol. Mutagen.* 15, 145-182.
- Hasheminejad G., Caldwell J. (1994). Genotoxicity of the alkenylbenzenes  $\alpha$ - and  $\beta$ -asarone, myristicin and elimicin as determined by the UDS assay in cultured rat hepatocytes. *Food Chem. Toxicol.* 32, 223-231.
- Hata T., Sakaguchi I., Mori M., Ikeda N., Kato Y., Minamino M., Watabe K. (2003). Induction of apoptosis by *Citrus paradisi* essential oil in human leukemic (HL-60) cells. *In Vivo* 17, 553-559.
- Hayashi K., Kamiya M., Hayashi T. (1995). Virucidal effects of the steam distillate from *Houttuynia cordata* and its components on HSV-1, influenza virus, and HIV. *Planta Med.* 61, 237-241.
- He J.-J., Chen H.-M., Li C.-W., Wu D.-W., Wu X.-L., Shi S.-J., Li Y.-C., Chen J.-N., Su Z.-R., Lai X.-P. (2013). Experimental study on antinociceptive and anti-allergy effects of patchouli oil. *J. Ess. Oil Res.* 25 (6), 488-496.
- Helander I.M., Alakomi H.L., Latva-Kala K., Mattila-Sandholm T., Pol I., Smid E.J., Gorris L.G.M., Von Wright A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 46, 3590-3595.
- Hierro I., Valero A., Pérez, P., Gonzalez P., Cabo M.M., Montilla M.P., Navarro M.C. (2004). Action of different monoterpenic compounds against *Anisakis simplex* s.l. L3 larvae. *Phytomedicine* 11, 77-82.
- Holley R.A. y Patel D. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiol.* 22, 273-292.
- Hong E.J., Na K.J., Choi I.G., Choi K.C., Jeung E.B. (2004). Antibacterial and antifungal effects of essential oils from coniferous trees. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 863-866.
- Hulin V., Mathot A., Mafart P. (1998). Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. *Sci. Aliments* 18, 563-582.
- Idaomar M., El Hamss R., Bakkali F., Mezzoug N., Zhiri A., Baudoux D., Munoz-Serrano A., Liemans V., Alonso-Moraga A. (2002). Genotoxicity and antigenotoxicity of some essential oils evaluated by wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 513, 61-68.
- Ipek E., Zeytinoglu H., Okay S., Tuylu B.A., Kurkcuoglu M., Başer K.H.C. (2005). Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames *Salmonella* / microsomal test. *Food Chem.* 93, 551-556.

- Jassim S.A., Naji M.A. (2003). A review. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *J. Appl. Microbiol.* 95, 412-427.
- JECFA (1993). Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. Safety evaluation of flavouring agents. En: Forty-first Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series 837. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- JECFA (1995). Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. Safety evaluation of flavouring agents. En: Forty-fourth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Technical Report Series 859, 2-3, World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- JECFA (1998). Safety evaluation of certain food additives and contaminants. En: 49<sup>th</sup> Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. World Health Organization (WHO), International Programme on Chemical Safety (IPCS), WHO Food Additives Series, No. 40. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- JECFA (1999). Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. Procedure for the safety evaluation of flavouring agents. En: Fortyninth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, WHO Technical Report Series 884, 3-6. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- JECFA (2003). Summary of Evaluations Performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA 1956–2003). En: First through sixty-first meetings. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Juven B.J., Kanner J., Schved F., Weisslowicz H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J. Appl. Bacteriol.* 76, 626-631.
- Kada T., Shimoi K. (1987). Desmutagens and bio-antimutagens – Their modes of action. *Bioessays* 7, 113-116.
- Kalembe D., Kunicka A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* 10, 813-829.
- Karpouhtsis I., Pardali E., Feggou E., Kokkini S., Scouras Z.G., Mavragani-Tsipidou P. (1998). Insecticidal and genotoxic activities of oregano essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 46, 1111-1115.
- Kachadourian R., Day B.J. (2006). Flavonoid-induced glutathione depletion: potential implications for cancer treatment. *Free Radic. Biol. Med.* 41, 65-76.

- Khalid M.H., Akhtar M.N., Mohamad A.S., Perimal E.K., Akira A., Israf D.A., Lajis N., Sulaiman M.R. (2011). Antinociceptive effect of the essential oil of *Zingiber zerumbet* in mice: Possible mechanisms. *J. Ethnopharmacol.* 137 (1), 345-351.
- Kim E.-H., Kim H.-K., Ahn Y.-J. (2003). Acaricidal activity of plant essential oils against *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridae). *J. Asia-Pacific Entomol.* 6 (1), 77-82.
- Kim S., Fung D.Y. (2004). Antibacterial effect of water soluble arrowroot (*Puerariae radix*) tea extract on foodborne pathogens in ground beef and mushroom soup. *J. Food Prot.* 67, 1953-1956.
- Kim S.-I., Yi J.-H., Tak J.-H., Ahn Y.-J. (2004). Acaricidal activity of plant essential oils against *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae). *Vet. Parasitol.* 120 (4), 297-304.
- Kloog Y., Cox A.D. (2004). Prenyl-binding domains: potential targets for Ras inhibitors and anti-cancer drugs. *Semin. Cancer Biol.* 14, 253-261.
- Knobloch K., Pauli A., Iberl B., Weigand H., Weis N. (1989). Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *J. Essen. Oil Res.* 1, 119-128.
- Koroch A.R., Juliani H.R., Zygadlo J.A. (2007). Bioactivity of essential oils and their components. En: *Flavors and Fragrances. Chemistry, Bioprocessing and Sustainability.* Berger R.G. (Ed.). Springer Verlag, Berlin. pp. 87-116.
- Kosalec I., Pepeljnjak S., Kustrak D. (2005). Antifungal activity of fluid extract and essential oil from anise fruits (*Pimpinella anisum* L., Apiaceae). *Acta Pharm.* 55, 377-385.
- Kouninki H., Haubruge E., Noudjou F.E., Lognay G., Malaisse F., Ngassoum M.B., Goudoum A., Mapongmetsem P.M., Ngamo L.S., Hance T. (2005). Potential use of essential oils from Cameroon applied as fumigant or contact insecticides against *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 70, 787-792.
- Kulisic T., Radonic A., Milos M. (2005a). Inhibition of lard oxidation by fractions of different essential oils. *Grasas y Aceites* 56, 284-291.
- Kulisic, T., Radonic, A., Milos, M. (2005b). Antioxidant properties of thyme (*Thymus vulgaris* L.) and wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) essential oils. *Italian J. Food Sci.* 17 (3), 315-324.
- Kunicka-Styczyńska A. (2011). Activity of essential oils against food-spoiling

- yeast. A review. *Flavour Fragr. J.* 26, 326-328.
- Kuroda Y., Inoue T. (1988). Antimutagenesis by factors affecting DNA repair in bacteria. *Mutat. Res.* 202, 387-391.
- Lahlou M., Berrada R. (2001). Potential of essential oils in schistosomiasis control in Morocco. *Int. J. Aromather.* 11, 87-96.
- Lambert R.J.W., Skandamis P.N., Coote P., Nychas G.J.E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* 91, 453-462.
- Lamiri A., Lhaloui S., Benjilali B., Berrada M. (2001). Insecticidal effects of essential oils against Hessian fly, *Mayetiola destructor* (Say). *Field Crops Res.* 71, 9-15.
- Lang G., Buchbauer G. (2012). A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour Fragr. J.* 27, 13-39.
- Lazutka J.R., Mierauskien J., Slap G., Dedonyt V. (2001). Genotoxicity of dill (*Anethum graveolens* L.), peppermint (*Mentha piperita* L.) and pine (*Pinus sylvestris* L.) essential oils in human lymphocytes and *Drosophila melanogaster*. *Food Chem. Toxicol.* 39, 485-492.
- Lee Y.-S., Kim J., Shin S.-C., Lee S.-G. Park I.-K. (2008). Antifungal activity of Myrtaceae essential oils and their components against three phytopathogenic fungi. *Flavour Fragr. J.* 23, 23-28.
- Legault J., Dahl W., Debiton E., Pichette A., Madelmont J.C. (2003). Antitumor activity of balsam fir oil: production of reactive oxygen species induced by alpha-humulene as possible mechanism of action. *Planta Med.* 69, 402-407.
- Liju V.B., Jeena K., Kuttan R. (2011). An evaluation of antioxidant, anti-inflammatory, and antinociceptive activities of essential oil from *Curcuma longa* L. *Indian J. Pharmacol.* 43 (5), 526-531.
- Liju V.B., Jeena K., Kuttan R. (2013). Acute and subchronic toxicity as well as mutagenic evaluation of essential oil from turmeric (*Curcuma longa* L.). *Food Chem. Toxicol.* 53, 52-61.
- Liu C.J., Chen C.L., Chang K.W., Chu C.H., Liu T.Y. (2000). Safrole in betel quid may be a risk factor for hepatocellular carcinoma: case report. *Can. Med. Ass. J.* 162, 359-360.
- Liu C.H., Mishra A.K., Tan R.X., Tang C., Yang H., Shen Y.F. (2006). Repellent and

- insecticidal activities of essential oils from *Artemisia princeps* and *Cinnamomum camphora* and their effect on seed germination of wheat and broad bean. *Bioresour. Technol.* 97, 1669-1673.
- Lu M., Han Z., Xu Y., Yao L. (2013). Effects of essential oils from Chinese indigenous aromatic plants on mycelial growth and morphogenesis of three phytopathogens. *Flavour Fragr. J.* 28, 84-92.
- Mademtzoglou D., Pavlidou T., Bazioti M.-G., Koutsonikou C., Lioulia E., Akmoutsou P., Drosopoulou E., Vokou D., Mavragani-Tsipidou P. (2013). Assessment of the genotoxic potential of essential oil constituents by the *Drosophila* wing spot test. *Flavour Fragr. J.* 28, 188-194.
- Manohar V., Ingram C., Gray J., Talpur N.A., Echard B.W., Bagchi D., Preuss H.G. (2001). Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biochem.* 228, 111-117.
- Manosroi J., Dhumtanom P., Manosroi A. (2006). Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. *Cancer Letters* 235, 114-120.
- Maralhas A., Monteiro A., Martins C., Kranendonk M., Laires A., Rueff J., Rodrigues A.S. (2006). Genotoxicity and endoreduplication inducing activity of the food flavouring eugenol. *Mutagenesis* 21, 199-204.
- Marino M., Bersani C., Comi G. (2002). Impedance measurement to study antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *Int. J. Food Microbiol.* 67, 187-195.
- Maron D.M., Ames B.N. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res.* 113, 173-215.
- Masotti V., Juteau F., Bessièrre J.M., Viano J. (2003). Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7115-7121.
- Mazières J., Pradines A., Favre G. (2003). Les inhibiteurs de farnésyl transférase: une cible peut en cacher une autre. *Médecine / Sciences* 19, 211-216.
- Mazières J., Pradines A., Favre G. (2004). Perspectives on farnesyl transferase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Lett.* 206, 159-167.
- Meister A., Bernhardt G., Christoffel V., Buschauer A. (1999). Antispasmodic activity of *Thymus vulgaris* extract on the isolated guinea-pig tracea: Discrimination between drug and ethanol effects. *Planta Med.*, 65, 512-516.

- Mezzoug N., Elhadri A., Dallouh A., Amkiss S., Skali N.S., Abrini J., Zhiri A., Baudoux D., Diallo B., El Jaziri M., Idaomar M. (2007). Investigation of the mutagenic and antimutagenic effects of *Origanum compactum* essential oil and some of its constituents. *Mutat. Res.* 629, 100-110.
- Miguel M.G. (2010). Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. *Flavour Fragr. J.* 25, 291-312.
- Miguel M.G., Figueiredo A.C., Costa M.M., Martins D.S., Barroso J.G., Pedro L. (2003a). Effect of the essential volatile oils isolated from *Thymbra capitata* (L.) Cav. on olive and sunflower oils. *Grasas y Aceites* 54 (3), 219-225.
- Miguel, M.G., Figueiredo, A.C., Costa, M.M., Martins, D., Duarte, J., Barroso, J.G., Pedro, L.G. (2003b). Effect of the volatile constituents isolated from *Thymus albicans*, *Th. mastichina*, *Th. carnosus* and *Thymbra capitata* in sunflower oil. *Nahrung/Foods* 47 (6), 397-402.
- Miller E.C., Swanson A.B., Phillips D.H., Fletcher T.L., Liem A., Miller J.A. (1983). Structure–activity studies of the carcinogenicities in the mouse and rat of some naturally occurring and synthetic alkenylbenzene derivatives related to safrole and estragole. *Cancer Res.* 43, 1124-1134.
- Mimica-Dukic N., Bozin B., Sokovic M., Simin N. (2004). Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. *J. Agric. Food Chem.* 52, 2485-2489.
- Monzote L., Montalvo A.M., Almanonni S., Scull R., Miranda M., Abreu J. (2006). Activity of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* grown in Cuba against *Leishmania amazonensis*. *Chemotherapy* 52, 130-136.
- Moon T., Wilkinson J.M., Cavanagh H.M. (2006). Antiparasitic activity of two Lavandula essential oils against *Giardia duodenalis*, *Trichomonas vaginalis* and *Hexamita inflata*. *Parasitol. Res.* 99, 722-728.
- Moon J.-K., Shibamoto T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *J. Agric. Food Chem.* 57, 1655-1666.
- Morais S.M., Cavalcanti E.S., Bertini L.M., Oliveira C.L., Rodrigues J.R., Cardoso J.H. (2006). Larvicidal activity of essential oils from Brazilian *Croton* species against *Aedes aegypti* L. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 22, 161-164.
- Moura I.C., Wunderlich G., Uhrig M.L., Couto A.S., Peres V.J., Katzin A.M., Kimura E.L.A. (2001) Limonene arrests parasite development and inhibits isoprenylation of proteins in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* 45(9), 2553-2558.

- Muhlbauer R.C., Lozano A., Palacio S., Reinli A., Felix R. (2003). Common herbs, essential oils, and monoterpenes potently modulate bone metabolism. *Bone* 32, 372-380.
- Muller L., Kasper P., Muller-Tegethoff K., Petr T. (1994). The genotoxic potential in vitro and in vivo of the allyl benzene etheric oils estragole, basil oil and trans-anethole. *Mutat. Res.* 325, 129-136.
- Munro I.C., Kennepohl E. (2001). Comparison of estimated daily per capita intakes of flavouring substances with no-observed-effect levels from animal studies. *Food Chem. Toxicol.* 39, 331-354.
- Munro I.C., Danielewska-Nikiel B. (2006). Comparison of estimated daily intakes of flavouring substances with no-observed-effect levels. *Food Chem. Toxicol.* 44, 758-809.
- Nedorostova L., Kloucek P., Urbanova K., Kokoska L., Smid J., Urban J., Valterova I., Stolcova M. (2011). Antibacterial effect of essential oil vapours against different strains of *Staphylococcus aureus*, including MRSA. *Flavour Fragr. J.* 26, 403-407.
- Nerio L.S., Olivero-Verbel J., Stashenko E. (2010). Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technol.* 101, 372-378.
- Neves I. de A., da Camara C. A. G., de Oliveira J. C. S. (2011). Acaricidal activity and essential oil composition of *Petiveria alliacea* L. from Pernambuco (Northeast Brazil). *J. Ess. Oil Res.* 23 (1), 23-26.
- Nibret E., Wink M. (2010). Trypanocidal and antileukaemic effects of the essential oils of *Hagenia abyssinica*, *Leonotis ocymifolia*, *Moringa stenopetala*, and their main individual constituents. *Phytomedicine* 17, 911-920.
- Odin A.P. (1997). Vitamins as antimutagens: Advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action. *Mutat. Res.* 386, 39-67.
- Oussalah M., Caillet S., Lacroix M. (2006). Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 69, 1046-1055.
- Paik S.Y., Koh K.H., Beak S.M., Paek S.H., Kim J.A. (2005). The essential oils from *Zanthoxylum schinifolium* pericarp induce apoptosis of HepG2 human hepatoma cells through increased production of reactive oxygen species. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 802-807.

- Park H.-J. (2002). Mutagenicity of the essential oils in Ames test. *Korean J. Pharmacog.* 33 (4), 372-375.
- Park I.K., Kim L.S., Choi I.H., Lee Y.S., Shin S.C. (2006). Fumigant activity of plant essential oils and components from *Schizonepeta tenuifolia* against *Lycoriella ingenua* (Diptera: Sciaridae). *J. Econ. Entomol.* 99, 1717-1721.
- Parveen M., Hasan M.K., Takahashi J., Murata Y., Kitagawa E., Kodama O., Iwahashi H. (2004). Response of *Saccharomyces cerevisiae* to a monoterpene: evaluation of antifungal potential by DNA microarray analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* 54, 46-55.
- Paula-Freire L.I.G., Andersen M.L., Molska G.R., Köhn D.O., Carlini E.L.A. (2012). Evaluation of the antinociceptive activity of *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae) essential oil and its isolated active principles in mice. *Phytotherapy Res.* 27 (8), 1220-1224.
- Pauli A. (2006). Anticandidal low molecular compounds from higher plants with special reference to compounds from essential oils. *Med. Res. Rev.* 26, 223-268.
- Pavela R. (2005). Insecticidal activity of some essential oils against larvae of *Spodoptera littoralis*. *Fitoterapia* 76, 691-696.
- Pawar V.C., Thaker V.S. (2006). In vitro efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*. *Mycoses* 49, 316-323.
- Peana A.T., D'Aquila P.S., Chessa M.L., Moretti M.D.L., Serra G., Pippia P. (2008). (-)-Linalool produces antinociception in two experimental models of pain. *European J. Pharmacol.* 460 (1), 37-41.
- Perry N.S., Bollen C., Perry E.K., Ballard C. (2003). *Salvia* for dementia therapy: Review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 75, 651-659.
- Pietta P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 63, 1035-1042.
- Pino J., Quijano C.E., Gaviria M. (2010). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Callistemon viminalis* (Gaertn.) G. Don leaves from Colombia. *J. Essent. Oil Bearing-Plants* 13 (6), 710-716.
- Pitarokili D., Couladis M., Petsikos-Panayotarou N., Tzakou O. (2002). Composition and antifungal activity on soil-borne pathogens of the essential oil of *Salvia sclarea* from Greece. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6688-6691.
- Pizzale L., Bortolomeazzi R., Vichi S., Überegger E., Conte L.S. (2002). Antioxidant

activity of sage (*Salvia officinalis* and *S. fruticosa*) and oregano (*Origanum onites* and *O. indercedens*) extracts related to their phenolic compound content. *J. Sci. Food Agric.* 82, 1645-1651.

Pontes W.J.T., De Oliveira J.C.S., Da Câmara C.A.G., Gondim Jr. M.G.C., De Oliveira J.V., Schwartz M.O.E. (2007). Acaricidal activity of the essential oils of leaves and fruits of *Xylopiya sericea* St. Hill. on the two spotted spide mite (*Tetranychus urticae* Koch). *Quim. Nova* 30 (4), 838-841.

Prasad R.C., Herzog B., Boone B., Sims L., Waltner-Law L. (2005). An extract of *Syzygium aromaticum* represses genes encoding hepatic gluconeogenic enzymes. *J. Ethnopharmacol.* 96, 295-301.

Priestley C.M., Burgess I.F., Williamson F.M. (2006). Lethality of essential oil constituents towards the human louse, *Pediculus humanus*, and its eggs. *Fitoterapia* 77, 303-309.

Puertas-Mejía M., Hillebrand S., Stashenko E., Winterhalter P. (2002). In vitro radical scavenging activity of essential oils from Colombian plants and fractions from oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil. *Flavour Fragr. J.* 17, 380-384.

Quijano C.E., Gaviria M., Vanegas-López C., Ontiveros I., Echeverri L., Morales G., Pino J. (2010). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Retrophyllum rospigliosii* (Pilger) C.N. Page fruits from Colombia. *Nat. Prod. Comm.* 5 (7), 1133-1134.

Rahimifard N., Hajimehdipoor H., Pirouz B., Bagheri F., Bagheri O., Mirdamadi K.S. (2010). The mutagenic and antimutagenic activity of *Lavandula angustifolia* and *Elettaria cardamomum* essential oils in the bacterial reverse mutation assay. *J. Med. Plants* 9 (35), 139-142.

Ramazani A., Sardari S., Zakeri S., Vaziri B. (2010). *In vitro* antiplasmodial and phytochemical study of five *Artemisia* species from Iran and in vivo activity of two species. *Parasitol. Res.* 107, 593-599.

Ramel C., Alekperov U.K., Ames B.N., Kada T., Wattenberg L.W. (1986). Inhibitors of mutagenesis and their relevance to carcinogenesis. *Mutat. Res.* 168, 47-65.

Ravi Kiran S., Bhavani K., Sita Devi P., Rajeswara Rao B.R., Janardhan Reddy K. (2006). Composition and larvicidal activity of leaves and stem essential oils of *Chloroxylon swietenia* DC against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. *Bioresour. Technol.* 97, 2481-2484.

Razzaghi-Abyaneh M., Shams-Ghahfarokhi M., Rezaee M.-B., Jaimand K.,

- Alinezhad S., Saberi R., Yoshinari T. (2009). Chemical composition and anti aflatoxigenic activity of *Carum carvi* L., *Thymus vulgaris* and *Citrus aurantifolia* essential oils. *Food Control* 20, 1018-1024.
- Recio M.C., Wost J.L., Villar A. (1989). A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978-1988. *Phytotherapy Res.* 3 (4), 117-125.
- Reichling J., Koch C., Stahl-Biskup E., Sojka C., Schnitzler P. (2005). Virucidal activity of a beta-triketone-rich essential oil of *Leptospermum scoparium* (manuka oil) against HSV-1 and HSV-2 in cell culture. *Planta Med.* 71, 1123-1127.
- Reichling J., Suschke U., Schneele J. Geiss H.K. (2006). Antibacterial activity and irritation potential of selected essential oil components – Structure-activity relationship. *Nat. Prod. Comm.* 1 (11), 1003-1012.
- Richter C., Schlegel J. (1993). Mitochondrial calcium release induced by prooxidants. *Toxicol. Lett.* 67, 119-127.
- Rim I.S., Jee C.H. (2006). Acaricidal effects of herb essential oils against *Dermatophagoides farinae* and *D. pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae) and qualitative analysis of a herb *Mentha pulegium* (pennyroyal). *Korean J. Parasitol.* 44, 133-138.
- Rios J.L., Recio M.C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.* 100, 80-84.
- Rodríguez M., García D., García M., Pino J., Hernandez L. (1996). Actividad antimicrobiana de *Pimenta dioica*. *Alimentaria* (274), 107-110.
- Rota C., Carraminana J.J., Burillo J., Herrera A. (2004). In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *J. Food Prot.* 67, 1252-1256.
- Ruberto G., Baratta M.T., Deans S.G., Dorman H.J.D. (2000). Antioxidant and antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* and *Crithmum maritimum* essential oils. *Planta Med.* 66, 687-693.
- Saad N.Y., Muller C.D., Lobstein A. (2013). Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour Fragr. J.* 28, 269-279.
- Sacchetti G., Maietti S., Muzzoli M., Scaglianti M., Manfredini S., Radice M., Bruni R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in food.

Food Chem. 91, 621-632.

- Sadraei H., Asghari G., Naddafi A. (2003). Relaxant effect of essential oil and hydro-alcoholic extract of *Pycnocycla spinosa* Decne. exBoiss. on ileum contractions. *Phytother. Res.* 17, 645-649.
- Sadraei H., Asghari G., Emami S. (2013). Inhibitory effect of *Rosa damascena* Mill, flower essential oil, geraniol and citronellol on rat ileum contraction. *Res. in Pharm. Sci.* 8 (1), 17-23.
- Sakagami H., Satoh K. (1997). Prooxidant action of two antioxidants: ascorbic acid and gallic acid. *Anticancer Res.* 17, 221-224.
- Sakagami H., Oi T., Satoh K. (1999). Prevention of oral diseases by polyphenols (Review). *In vivo* 13, 155-172.
- Sakihama Y., Cohen M.F., Grace S.C., Yamasaki H. (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* 177, 67-80.
- Salim E.I., Fukushima S. (2003). Chemopreventive potential of volatile oil from black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds against rat colon carcinogenesis. *Nutr. Cancer.* 45, 195-202.
- Sandhar H.K., Kumar B., Prasher S., Tiwari P., Salhan M., Sharma P. (2011). A review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. *Int. Pharm. Sci.* 1, 25-41.
- Santoro G.F., Cardoso M.G., Guimaraes L.G., Mendonca L.Z., Soares M.J. (2007a). *Trypanosoma cruzi*: Activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. *Exp. Parasitol.* 116, 283-290.
- Santoro G.F., das Gracas Cardoso M., Guimaraes L.G., Salgado A.P., Menna-Barreto R.F., Soares M.J. (2007b). Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. *Parasitol. Res.* 100, 783-790.
- Santoyo S., Cavero S., Jaime L., Ibañez E., Senorans J., Reglero G. (2006). Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with antimicrobial activity from *Origanum vulgare* L.: Determination of optimal extraction parameters. *J. Food Prot.* 69, 369-375.
- Schelz Z., Molnar J., Hohmann J. (2006). Antimicrobial and antiplasmodial activities of essential oils. *Fitoterapia* 77, 279-285.

- Schmolz E., Doebner R., Auste R., Daum R., Welge G., Lamprecht I. (1999). Bioenergetic investigations on tea-tree and related essential oils. *Thermochim. Acta* 337, 71-81.
- Senthilkumar A., Venkatesalu V. (2010). Chemical composition and larvicidal activity of the essential oil of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng against *Anopheles stephensi*: a malarial vector mosquito. *Parasitol Res* 107, 1275-1278.
- Serrano M., Martinez-Romero D., Castillo S., Guillén F., Valero D. (2005). The use of natural antifungal compounds improves the beneficial effect of MAP in sweet cherry storage. *Innov. Food Sci. Emerg. Tech.* 6, 115-123.
- Setzer W.N. (2009). Essential oils and anxiolytic aromatherapy. *Nat. Prod. Comm.* 4 (9), 1305-1316.
- Sghaier M.B., Boubaker J., Neffati A., Limem I., Skandrani I., Bhourri W., Bouhlel I., Kilania S., Chekir-Ghedira L., Ghedira K. (2010). Antimutagenic and antioxidant potentials of *Teucrium ramosissimum* essential oil. *Chem. & Biodiv.* 7, 1754-1763.
- Shaaban H.A.E., El-Ghorab A.H., Shibamoto T. (2012). Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components: Review. *J. Essen. Oil Res.* 24, 203-212.
- Shankel D.M., Kuo S., Haines C., Mitscher L.A. (1993). Extracellular interception of mutagens. *Basic Life Sci.* 61, 65-74.
- Sharma N., Trikha P., Athar M., Raisuddin S. (2001). Inhibition of benzo(*a*)pyrene- and cyclophosphamide-induced mutagenicity by *Cinnamomum cassia*. *Mutat. Res.*, 179-188.
- Shen S.C., Ko C.H., Tseng S.W., Tsai S.H., Chen Y.C. (2004). Structurally related antitumor effects of flavonones in vitro and in vivo: involvement of caspase 3 activation, p21 gene expression, and reactive oxygen species production. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 197, 84-95.
- Shoeibi Sh., Rahimifard N., Pirouz B., Yalfani R., Pakzad S.R., Mirab Samiee S., Piralí Hamedani M. (2009). Mutagenicity of four natural flavors: Clove, cinnamon, thyme and *Zataria multiflora* Boiss. *J. Med. Plants* 8 (SUPPL. 5), 89-96.
- Si W., Gong J., Tsao R., Zhou T., Yu H., Poppe C., Johnson R., Du Z. (2006). Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 100, 296-305.

- Sikkema J., De Bont J.A.M., Poolman B. (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269, 8022-8028.
- Silva J., Abebe W., Sousa S.M., Duarte V.G., Machado M.I.L., Matos F.J.A. (2003). Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. *J. Ethnopharmacol.* 89 (2-3), 277-283.
- Silva A.G., Almeida D.L., Ronchi S.N., Bento A.C., Scherer R., Ramos A.C., Cruz Z.M.A. (2010). The essential oil of Brazilian pepper, *Schinus terebinthifolia* Raddi in larval control of *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762). *Parasites & Vectors* 3, 79-85.
- Sim M.J., Choi D.R., Ahn Y.J. (2006). Vapor phase toxicity of plant essential oils to *Cadra cautella* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* 99, 593-598.
- Sivropoulou A., Papanikolaou E., Nikolaou C., Kokkini S., Lanaras T., Arsenakis M. (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of Origanum essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 44, 1202-1205.
- Skandamis P., Tsigarida E., Nychas G.-J.E. (2002). The effect of oregano essential oil on survival/death of *Salmonella typhimurium* in meat stored at 5 °C under aerobic, VP/MAP conditions. *Food Microbiol.* 19, 97-103.
- Smith R.L., Adams T.B., Cohen S.M., Doull J., Feron V.J., Goodman J.I., Hall R.L., Marnett L.J., Portoghese P.S., Waddell W.J., Wagner B.M. (2004). Safety evaluation of natural flavour complexes. *Toxicol. Lett.* 149 (1-3), 197-207.
- Sonboli A., Eftekhari F., Yousefzadi M., Kanani M.R. (2005). Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of *Grammosciadium platycarpum* Boiss. from Iran. *Z. Naturforsch.* 60c, 30-34.
- Sonboli A., Mirjalili M.H., Hadian J., Ebrahimi S.N., Yousefzadi M. (2006a). Antibacterial activity and composition of the essential oil of *Ziziphora clinopodioides* subsp. *bungeana* (Juz.) Rech. f. from Iran. *Z. Naturforsch.* 61c, 677-680.
- Sonboli A., Babakhani B., Mehrabian A.R. (2006b). Antimicrobial activity of six constituents of essential oil from *Salvia*. *Z. Naturforsch.* 61, 160-164.
- Sousa P.J.C., Linard C.F.B.M., Azevedo-Batista D., Oliveira A.C., Coelho-de-Souza A.N., Leal-Cardoso J.H. (2009). Antinociceptive effects of the essential oil of *Mentha x villosa* leaf and its major constituent piperitenone oxide in mice. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 42 (7), 655-659.
- Souza F.V.M., Barbosa da Rocha M., de Souza D.P., Moretti Marçal R. (2013). (-)-Carvone: Antispasmodic effect and mode of action. *Fitoterapia* 85, 20-24.

- Soylu E.M., Soylu S., Kurt S. (2006). Antimicrobial activity of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia* 161, 119-128.
- Spadaro F., Costa R., Circosta C., Occhiuto F. (2012). Volatile composition and biological activity of key lime *Citrus aurantifolia* essential oil. *Nat. Prod. Comm.* 7 (11), 1523-1526.
- Stajković O., Beric-Bjedov T., Mitić-Ćulafić D., Stanković S., Vuković-Gačić B., Simić D., Knežević-Vukčević J. (2007). Antimutagenic properties of Basil (*Ocimum basilicum* L.) in *Salmonella typhimurium* TA100. *Food Technol. Biotechnol.* 45 (2), 213-217.
- Stammati A., Bonsi P., Zucco F., Moezelaar R., Alakomi H.L., von Wright A. (1999). Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays. *Food Chem. Toxicol.* 37, 813-823.
- Suhail M.M., Wu W., Cao A., Mondalek F.G., Fung K.-M., Shih P.-T., Fang Y.-T., Woolley C., Young G., Lin H.-K. (2011). *Boswellia sacra* essential oil induces tumor cellspecific apoptosis and suppresses tumor aggressiveness in cultured human breast cancer cells. *Complem. Alternat. Med.* 11, 129-142.
- Sukumar K., Perich M.J., Boobar L.R. (1991). Botanical derivatives in mosquito control: a review. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 7, 210-237.
- Sylvestre M., Legault J., Dufour D., Pichette A. (2005). Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myrica gale* L. *Phytomed.* 12, 299-304.
- Sylvestre M., Pichette A., Longtin A., Nagau F., Legault J. (2006). Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. *J. Ethnopharmacol.* 103, 99-102.
- Takaki I., Bersani-Amado L.E., Vendruscolo A., Sartoretto S.M., Diniz S.P., Bersani-Amado C.A., Cuman R.K.N. (2008). Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in experimental animal models. *J. Med. Food* 11 (4), 741-746.
- Tanaka A., Shibamoto T. (2008). Antioxidant and antiinflammatory activities of licorice root (*Glycyrrhiza uralensis*): Aroma extract. En: *Functional Food and Health*. T. Shibamoto, K. Kanazawa, F. Shahidi y C.-T. Ho (Eds.), ACS Symposium Series 993, pp. 229-237.
- Tchoumboungang F., Zollo P.H., Dagne E., Mekonnen Y. (2005) In vivo antimalarial activity of essential oils from *Cymbopogon citratus* and

*Ocimum gratissimum* on mice infected with *Plasmodium berghei*. *Planta Med* 71(1), 20-23.

- Tiwari B.K., Valdramidis V.P., O' Donnell C.P., Muthukumarappan K., Bourke P., Cullen P.J. (2009). Application of natural antimicrobials for food preservation. *J. Agric. Food Chem.* 57, 5987-6000.
- Traboulsi A.F., Taoubi K., El-Haj S., Bessiere J.M., Rammal S. (2002). Insecticidal properties of essential plant oils against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae). *Pest Manag. Sci.* 58 (5), 491-495.
- Trichopoulou A., Lagiou P., Keper H., Trichopoulou D. (2000). Cancer and Mediterranean dietary traditions. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 9, 869-873.
- Tripathi P., Dubey N.K., Shukla A.K. (2008). Use of some essential oils as postharvest botanical fungicides in the management of grey mold of grapes caused by *Botrytis cinerea*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 39-46.
- Tsuneki H., Ma E.L., Kobayashi S., Sekizaki N., Maekawa K., Sasaoka T., Wang M.W., Kimura I. (2005). Antiangiogenic activity of beta-eudesmol in vitro and in vivo. *Eur. J. Pharmacol.* 512, 105-115.
- Turina A.V., Nolan M.V., Zygadlo J.A., Perillo M.A. (2006). Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. *Biophys. Chem.* 122, 101-113.
- Ultee A., Kets E.P., Alberda M., Hoekstra F.A., Smid E.J. (2000). Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Arch. Microbiol.* 174, 233-238.
- Ultee A., Bennik M.H., Moezelaar R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1561-1568.
- van Vuuren S.F., Viljoen A.M. (2007). Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole alone and in combination. *Flavour Fragr. J.* 22, 540-544.
- Velluti A., Sanchis V., Ramos A.J., Egidio J., Marin S. (2003). Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. *Int. J. Food Microbiol.* 89, 145-154.
- Velluti A., Sanchis V., Ramos A.J., Turon C., Marin S. (2004). Impact of essential oils on growth rate, zearalenone and deoxynivalenol production by

- Fusarium graminearum* under different temperature and water activity conditions in maize grain. J. Appl. Microbiol. 96, 716-724.
- Vercesi A.E., Kowaltowski A.J., Grijalba M.T., Meinicke A.R., Castilho R.F. (1997). The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. Biosci. Rep. 17, 43-52.
- Videira R., Castanheira P., Grãos M., Salgueiro L., Faro C., Cavaleiro C. (2013). A necrodane monoterpene from *Lavandula luisieri* essential oil as a cell-permeable inhibitor of BACE-1, the  $\beta$ -secretase in Alzheimer's disease. Flavour Fragr. J. 28, 380-388.
- Vuković-Gačić B., Nikcevic S., Beric-Bjedov T., Knezevic-Vukcevic J., Simic D. (2006). Antimutagenic effect of essential oil of sage (*Salvia officinalis* L.) and its monoterpenes against UV-induced mutations in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. Food Chem. Toxicol. 44, 1730-1738.
- Wang S.Y., Chen P.F., Chang S.T. (2005). Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves against wood decay fungi. Biores. Technol. 96, 813-818.
- Waters M.D., Stack H.F., Jackson M.A., Brockman H.E., De Flora S. (1996). Activity profiles of antimutagens: in vitro and in vivo data. Mutat. Res. 350, 109-129.
- Wei A., Shibamoto T. (2010). Antioxidant/lipoxygenase inhibitory activities and chemical compositions of selected essential oils. J. Agric. Food Chem. 58, 7218-7225.
- Wright J. (1999). Essential oils. En: Food Flavorings. Ashurst P.R. (Ed.). Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland. pp. 1-38.
- Wu X.J., Stahl T., Hu Y., Kassie F., Mersch-Sundermann V. (2006). The production of reactive oxygen species and the mitochondrial membrane potential are modulated during onion oil-induced cell cycle arrest and apoptosis in A549 cells. J. Nutr. 136, 608-613.
- Ximenes R.M., De Moraes Nogueira L., Cassundé N.M.R., Jorge R.J.B., Dos Santos S.M., Magalhães L.P.M., Silva M.R., De Barros Viana G.S., Araújo R.M., De Sena K.X.D.F.R., De Albuquerque J.F.C., Martins R.D. (2013). Antinociceptive and wound healing activities of *Croton adamantinus* Müll. Arg. essential oil. J. Nat. Med. 67 (4), 758-764.
- Yamaguchi K., Shinohara C., Kojima S., Sodeoka M., Tsuji T. (1999). (2E, 6R)-8-Hydroxyl-2, 6-dimethyl-2-octenoic acid, a novel anti-osteoporotic

monoterpene, isolated from *Cistanche salsa*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 63, 731-735.

Yang P., Ma Y. (2005). Repellent effect of plant essential oils against *Aedes albopictus*. J. Vector. Ecol. 30, 231-234.

Yanishlieva-Maslarova N. (2001). Sources of natural antioxidants: Vegetables, fruits, herbs, spices and teas. En: Antioxidant in Food: Practical Applications. N. Yanishlieva, J. Pokorny y M. Gordon (Eds.), pp. 210-249, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge.

Yano S., Suzuki Y., Yuzurihara M., Kase Y., Takeda S., Watanabe S., Aburada M., Miyamoto K.-I. (2006). Antinociceptive effect of methyleugenol on formalin-induced hyperalgesia in mice. European J. Pharmacol. 553 (1-3), 99-103.

Yoo C.B., Han K.T., Cho K.S., Ha J., Park H.J., Nam J.H., Kil U.H., Lee K.T. (2005). Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. Cancer Lett. 225, 41-52.

Yoon H.S., Moon S.C., Kim N.D., Park B.S., Jeong M.H., Yoo Y.H. (2000). Genistein induces apoptosis of RPE-J cells by opening mitochondrial PTP. Biochem. Biophys. Res. Commun. 276, 151-156.

Zani F., Massino G., Benvenuti S., Bianchi A., Albasini A., Melegari M., Vampa G., Bellotti A., Mazza P. (1991). Studies on the genotoxic properties of essential oils with *Bacillus subtilis* rec-assay and *Salmonella*/microsome reversion assay. Planta Med. 57, 237-241.

Zhou S., Koh H.L., Gao Y., Gong Z.Y., Lee E.J. (2004). Herbal bioactivation: the good, the bad and the ugly. Life Sci. 74, 935-968.

## 9.- ADULTERACIÓN DE ACEITES ESENCIALES

### Introducción

Los aceites esenciales se han utilizado por el hombre durante cientos de años y en algunos casos, su comercialización ha alcanzado un alto valor como materia prima por su exquisita fragancia para preparar saborizantes, alimentos, cosméticos y en aromaterapia, entre otros usos. Este continuado uso comercial ha llevado a las adulteraciones. Es indudable que es un incentivo económico muy grande el mezclar materiales menos costosos o sintéticos para comercialarlos como aceites esenciales genuinos. Las adulteraciones se producen por varias razones:

- (i) el productor quiere vender más producto que el que realmente ha producido;
- (ii) los precios en el mercado no costean al producto; y
- (iii) el producto debe cumplir determinados índices de calidad de acuerdo al mercado o al comprador.

Algunos aceites esenciales son difíciles de adulterar debido a que sus componentes principales no son comercialmente disponibles, como sucede con los aceites esenciales de pachulí (*Pogostemon cablin*), vetiver (*Vetiveria zizanioides*) y jengibre (*Zingiber officinale*). Otros, por lo general, tienen un precio de venta tan bajo que no se justifica su adulteración, como son los aceites esenciales de naranja dulce (*Citrus sinensis*), de hoja y tallo de clavo (*Syzygium aromaticum*), citronela (*Cymbopogon* spp.), alcanfor (*Cinnamomum camphora*), hierba buena (*Mentha arvensis*), eucalipto (*Eucalyptus globulus*) y árbol del té (*Melaleuca alternaria*). Esto puede estar sujeto a cambios en dependencia del mercado, pero en cualquier caso, es importante dominar las formas de

adulteraciones más comunes y cómo es posible detectarlas mediante métodos de control adecuados.

## Tipos de adulteraciones

**E**n la actualidad existen varias categorías de adulteraciones en función del fin que se persiga.

### Adición de un diluyente

**E**sta forma simple de adulteración se puede dividir convenientemente en dos grupos ya sean que pueden o no ser detectadas por cromatografía de gases.

Algunos de los materiales usados que no pueden ser detectados directamente por la técnica instrumental son el aceite mineral y aceites grasos inodoros, aunque esto no es completamente así pues el área cromatográfica de los componentes propios del aceite esencial debe sufrir una reducción debido a la dilución al adicionar aceite mineral y el aceite graso puede determinarse si se hace una derivatización para determinar los ácidos grasos como derivados volátiles.

Los diluyentes que pueden ser detectados directamente por la cromatografía de gases incluyen variados disolventes orgánicos, tales como: etanol, abitol (un alcohol primario del hidroabietol usado para extender resinoides), alcohol bencílico, benzoato de bencilo, carbitol [2-(2-etoxietoxi)etanol], alcohol de diacetona (4-hidroxi-4-metilpentan-2-ona), glicol de dipropileno [2-(2-hidroxi-propoxi)-propan-1-ol], éter metílico del glicol de dipropileno, isopar (mezcla de isoparafinas), miristato de isopropilo, ftalato de dietilo, ftalato de dibutilo y triacetina.

En todos los casos el material agregado es simplemente un diluyente y no hace ninguna contribución al olor del aceite esencial. La adición hasta un 14% de tales materiales puede pasar inadvertida si el producto es evaluado contra un estándar conservado solamente sobre la base del olor.

## Adición de aceites esenciales de menor costo y sus componentes

La adición de aceites esenciales de menor costo y de sus componentes, ya sean extraídos de un aceite esencial u obtenidos por vía sintética, es una práctica común en las adulteraciones de aceites esenciales más valiosos. Algunos ejemplos muy comunes se reportan en la Tabla 9.1 (König *et al.*, 1997; Singhal *et al.*, 1997).

**Tabla 9.1. Adulteraciones de aceites esenciales con otros aceites esenciales de menor costo**

Aceite a adulterar	Aceite u otro material usado como extensor
Toronjil ( <i>Melissa officinalis</i> )	Citronela tipo Java ( <i>Cymbopogon winterianus</i> ), eucalipto ( <i>Eucalyptus citriodora</i> )
Bergamota ( <i>Citrus aurantium</i> subsp. <i>bergamia</i> )	Limón ( <i>Citrus limon</i> ), naranja dulce ( <i>Citrus sinensis</i> ), limoneno + linalol y acetato de linalilo sintéticos
Toronja ( <i>Citrus paradisi</i> )	Naranja dulce o sus terpenos + nootkatona y otros
Limón ( <i>Citrus limon</i> ) exprimido en frío	Terpenos de naranja dulce + terpenos de limón + citral sintético
Menta ( <i>Mentha x piperita</i> )	Hierba buena ( <i>Mentha arvensis</i> )
Mandarina ( <i>Citrus deliciosa</i> ) exprimido en frío	Naranja dulce o sus terpenos, mandarina destilada, terpenos de naranja dulce + antranilato de N-metilo + $\gamma$ -terpineno + timol
Canela ( <i>Cinnamomum zeylanicum</i> ) corteza	Hojas de canela + cinamaldehído
Clavo ( <i>Eugenia caryophyllata</i> ) hojas	Tallo del clavo
Cilantro ( <i>Coriandrum sativum</i> )	Linalol sintético
Eneldo ( <i>Anethum graveolens</i> )	Naranja destilado + terpenos
Litsea cubeba	Citral sintético
Rosa ( <i>Rosa damascena</i> )	Citronelol + geraniol
Romero ( <i>Rosmarinus officinalis</i> )	Fracciones de eucalipto + alcanfor
Anis estrellado ( <i>Illicium verum</i> )	Anetol
Eneldo ( <i>Anethum graveolens</i> )	Terpenos de naranja dulce destilada

## Cambio de un aceite esencial por otro

En esta categoría se incluyen los siguientes aceites esenciales:

- Aceite esencial de *Cinnamomum camphora* (tipo 1,8-cineol) como aceite esencial de *Eucalyptus globulus*.

- Aceite esencial de *Mentha arvensis* var. *piperascens* como aceite esencial de menta (*Mentha x piperita*).
- Aceites esenciales de *Micromeria fruticosa* y *Hedeoma pulegioides* como aceite esencial de *Mentha pulegium*.
- El aceite esencial de *Illicium verum* como aceite esencial de anís (*Pimpinella* spp.).
- El aceite esencial desterpenado de Petitgrain bigarade (*Citrus aurantium* subsp. *aurantium*) como aceite esencial de *Aniba rosaeodora*.

## Detección de las adulteraciones

La detección de las adulteraciones requiere de técnicas analíticas para diferenciar el origen botánico y aun el geográfico, así como para detectar el origen natural o sintético de determinadas sustancias. Desde hace algunos años aparecen en la literatura científica información con relación a la autenticación del origen botánico o geográfico de aceites esenciales que se comercializan en el mercado mundial (König *et al.*, 1997; Juliani *et al.*, 2006; Nhu-Trang *et al.*, 2006; Dugo *et al.*, (2011); Bonaccorsi *et al.*, 2011; Schipilliti *et al.*, 2010, 2012). Asimismo se requiere del desarrollo constante de métodos instrumentales que sean capaces de detectar las adulteraciones que, cada día, se hacen más sofisticadas.

Las técnicas analíticas usadas para detectar adulteraciones pueden agruparse como: sensoriales, físico-químicas, químicas e instrumentales.

Una simple prueba de olor con una tira de papel por un perfumista, saborista o especialista en aceites esenciales puede ser suficiente para determinar si una muestra tiene un olor pobre o no característico al esperado, sin necesidad de acudir a técnicas analíticas complejas.

Las técnicas químico-físicas útiles para determinar posibles adulteraciones son las mismas que se emplean en el control de calidad: densidad específica, índice de refracción y rotación óptica. Tales análisis

deben ser considerados como presuntivos y debe ser confirmado por otras técnicas más específicas.

Las técnicas químicas útiles para detectar adulteraciones incluyen fundamentalmente al valor de acidez, valor de carbonilos y valor de ésteres. De forma similar a lo comentado antes para los métodos químico-físicos, estos análisis deben ser confirmados por otras técnicas, como por ejemplo la GC.

El método instrumental comúnmente usado para estos fines es la GC-MS, aunque existen otros como la resonancia magnética nuclear, espectroscopía infrarroja y la determinación de isótopos por espectrometría de masas. Estas técnicas son indudablemente útiles, pero a un costo alto por el tiempo de un operador entrenado y la necesidad de equipos sofisticados.

Una combinación de cromatografía de gases multidimensional acoplada a espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier y espectrometría de masas (MDGC/FT-IR/MS) fue evaluada para el análisis del aceite esencial de eucalipto con resultados satisfactorios para determinar adulteraciones (Krock *et al.*, 1994).

La técnica de infrarrojo cercano (NIR) se ha aplicado a los productos naturales para la determinación rápida del contenido de aceite esencial y de sus constituyentes en plantas medicinales (Steuer *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2001; Steuer y Schulz, 2003). Juliani *et al.* (2006) demostraron en varios aceites esenciales de origen africano que la técnica es válida para la detección de adulteraciones.

La quiralidad puede ser usada como criterio de diferenciación entre componentes naturales y sintéticos, así como de diferentes orígenes de plantas y geográficos. El potencial que tiene la cromatografía de gases capilar enantioselectiva para el control de la autenticidad de los aceites esenciales ha sido demostrado en muchos aceites esenciales (König *et al.*, 1997; Sciarrone *et al.*, 2010). Esta puede ser usada acoplada con la espectrometría de masas de radioisótopos (Nhu-Trang *et al.*, 2006; Schipilliti *et al.*, 2010, 2012; Bonaccorsi *et al.*, 2012).

## Referencias

- Bonaccorsi I., Sciarrone D., Cotroneo A., Mondello L., Dugo P., Dugo G. (2011). Enantiomeric distribution of key volatile components in Citrus essential oils. *Brazilian J. Pharmacog.* 21 (5), 841-849.
- Bonaccorsi I., Sciarrone D., Schipilliti L., Dugo P., Mondello L., Dugo G. (2012). Multidimensional enantio gas chromatography/mass spectrometry and gas chromatography–combustion-isotopic ratio mass spectrometry for the authenticity assessment of lime essential oils (*C. aurantifolia* Swingle and *C. latifolia* Tanaka). *J. Chromatogr. A* 1226, 87- 95.
- Dugo P., Ragonese C., Russo M., Sciarrone D., Santi L., Cotroneo A., Mondello L. (2010). Sicilian lemon oil: Composition of volatile and oxygen heterocyclic fractions and enantiomeric distribution of volatile components. *J. Sep. Sci.* 33, 3374-3385.
- Dugo P., Bonaccorsi I., Ragonese C., Russo M., Donato P., Santi L., Mondello L. (2011). Analytical characterization of mandarin (*Citrus deliciosa* Ten.) essential oil. *Flavour Fragr. J.* 26, 34-46.
- Juliani H.R., Kapteyn J., Jones D., Koroch A.R., Wang M., Charles D., Simon J.E. (2006). Application of near-infrared spectroscopy in quality control and determination of adulteration of African essential oils. *Phytochem. Anal.* 17, 121-128.
- König W.A., Fricke C., Saritas Y., Momeni B., Hohenfeld G. (1997). Adulteration or natural variability? Enantioselective gas chromatography in purity control of essential oils. *J. High Resol. Chromatogr.* 20, 55-61.
- Krock K., Ragunathan N., Wilkins C.L. (1994). Multidimensional gas chromatography coupled with infrared and mass spectrometry for analysis of Eucalyptus essential oils. *Anal. Chem.* 66, 425-430.
- Nhu-Trang T.-T., Casabianca H., Grenier-Loustalot M.-F. (2006). Authenticity control of essential oils containing citronellal and citral by chiral and stable-isotope gas-chromatographic analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 386, 2141-2152.
- Schipilliti L., Tranchida P.Q., Sciarrone D., Russo M., Dugo P., Dugo G., Mondello L. (2010). Genuineness assessment of mandarin essential oils employing gas chromatography-combustion-isotope ratio MS (GC-C-IRMS). *J. Sep. Sci.* 33, 617-625.
- Schipilliti L., Dugo P., Bonaccorsi I., Mondello L. (2012). Authenticity control on

lemon essential oils employing gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry (GC–C-IRMS). *Food Chem.* 131, 1523-1530.

Sciarrone D., Schipilliti L., Ragonese C., Tranchida P.Q., Dugo P., Dugo G., Mondello L. (2010). Thorough evaluation of the validity of conventional enantio-gas chromatography in the analysis of volatile chiral compounds in mandarin essential oil: A comparative investigation with multidimensional gas chromatography. *J. Chromatogr. A* 1217, 1101-1105.

Singhal R.S., Kulkarni P.R., Rege D.V. (1997). Quality indices for spice essential oils. En: *Handbook of Herbs and Spices*, Peter K.V. (Ed.). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, pp. 22-28.

Steuer B., Schulz H., Lager E. (2001). Classification and analysis of citrus oils by NIR spectroscopy. *Food Chem.* 72, 113-117.

Steuer B., Schulz H. (2003). Near-infrared analysis of fennel (*Foeniculum vulgare* Miller) on different spectrometers—basic considerations for a reliable network. *Phytochem. Anal.* 14, 285-289.

Wilson N.D., Watt R.A., Moffat A.C. (2001). A near-infrared method for the assay of cineole in Eucalyptus oil as an alternative to the official BP method. *J. Pharm. Pharmac.* 53, 95-102.

Página deliberadamente dejada en blanco

Página deliberadamente dejada en blanco

Página deliberadamente dejada en blanco



**J**orge Antonio Pino Alea, Químico y Dr. Cs., Investigador Titular del Departamento de Aromas del Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria, en La Habana, Cuba. Se graduó de Licenciado en Química en la Universidad de La Habana en 1975, recibió su grado de

Doctor en Ciencias Técnicas en 1980 en el Centro Nacional de Investigaciones Científicas en La Habana y el grado de Doctor en Ciencias en 2011 en el Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de La Habana. En 1985, en el Centro Nacional de Investigaciones Científicas recibe el grado de Investigador Titular. Estudia los aceites esenciales y el aroma de los alimentos. Ha publicado más de 500 artículos científicos en prestigiosas revistas científicas. Es editor y miembro de Consejo Editorial de varias revistas científicas internacionales. Es miembro de la Academia de Ciencias de Cuba, del Comité del Programa de Doctorado en Ciencias de los Alimentos y del Comité del Programa de Doctorado en Química. Ha recibido la Medalla Juan Tomás Roig (2001), el Premio Nacional de Química (2011), el Premio del Ministerio de Educación Superior a la Mejor Tesis de Doctorado en Ciencias en el 2012, el Premio Nacional de Ciencias 2012 otorgado por la Academia de Ciencias de Cuba y la Orden Carlos J. Finlay otorgada por el Consejo de Estado de Cuba.