

Comparación de la Hidro-destilación Asistida por Radiación de Microondas (MWHD) con Hidro-destilación Convencional (HD) en la Extracción de Aceite Esencial de *Minthostachys mollis*

Miladys E. Torrenegra*; Clemente Granados; María R. Osorio y Glicerio León

Universidad de Cartagena, Facultad de Ingeniería, Programa de Ingeniería de Alimentos, Avenida el Consulado, Calle 30 No. 48-152. Cartagena, Bolívar-Colombia (e-mail: mtorrenegraa@hotmail.com)

* Autor a quien debe ser dirigida la correspondencia

Recibido May. 15, 2014; Aceptado Jul. 22, 2014; Versión final recibida Ago. 26, 2014

Resumen

Se ha extraído y caracterizado aceite esencial obtenido de las hojas de la especie vegetal *Minthostachys mollis* mediante hidro-destilación (HD) e hidro-destilación asistida por radiación con microondas (MWHD). Se determinó densidad relativa a 20°C, índice de refracción y solubilidad de los aceites esenciales en etanol (70% v/v). La composición química se evaluó mediante cromatografía de gases/espectrómetro de masa. El aceite esencial presentó rendimientos con valores de 0.09% (HD) y 0,92% (MWHD). El aceite fue analizado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Los compuestos principales encontrados en el aceite obtenido por MWHD fueron el timol y carvacrol con porcentajes relativos de 73.36% y 10.94%, respectivamente, mientras que en el aceite obtenido por HD fueron acetato de eudesmol (22.44%) y acetato de isolongifolol (21.75%). Se concluye que la MWHD es una técnica rápida, eficiente y relativamente económica en comparación con la HD convencional.

Palabras clave: aceite esencial, Minthostachys mollis, hidro-destilación, radiación con microondas

Method Comparison of Microwave Radiation-assisted Hydro-distillation (MWHD) with Conventional Hydro-distillation (HD) in the Extraction of Essential Oil of *Minthostachys mollis*

Abstract

Essential oil obtained from the leaves of the vegetal species *Minthostachys mollis* was extracted and characterized by hydro-distillation (HD) and radiation-assisted microwave hydro-distillation (RAMH). Relative density at 20°C, refractive index and solubility of the essential oils in ethanol (70% v/v) were determined. The chemical composition was determined using gas chromatography/ mass spectrometer. The essential oil presented values yields of 0.09 % (HD) and 0.92% (MWHD). The oil was analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry. The main compounds found in the oil obtained by MWHD were thymol and carvacrol with relative rates of 73.36% and 10.94%, respectively, while in the oil obtained by HD were eudesmol acetate (22.44%) and isolongifolol acetate (21.75%). According to the results the MWHD is a fast, efficient and relatively economical technique compared to the conventional HD.

Keywords: essential oil, Minthostachys mollis, hydro-distillation, microwave radiation

INTRODUCCION

Colombia es un país que posee una gran diversidad de ecosistemas y microclimas, lo cual hace que su vegetación sea muy variada, enriquecida con especies endémicas y diversidad genética muy alta. Algunas de las plantas que se pueden encontrar poseen aceites esenciales y actividad biológica, de amplias perspectivas para llevar a cabo la investigación y el desarrollo de nuevos productos (Granados *et al.*, 2012). Aprovechando la gran biodiversidad que posee Colombia, estimada en 51.220 especies de plantas vasculares dentro se encuentra *Minthostachys mollis* (Lamiaceae), una especie promisoría por sus aceites esenciales, esta planta es nativa de la cordillera de los Andes desde Venezuela hasta Bolivia, con amplio rango altitudinal (1000-3400 m.), es un subarbusto aromático de hasta 50cm de altura, leñoso hasta la base, con hojas ovadas y pubescentes e inflorescencias axilares en cimas. *M. mollis* es conocida como muña en el Perú, orégano en Colombia, y es utilizada en medicina popular para tratar los cólicos estomacales y ciertos trastornos gripales.

Los AE son considerados metabolitos secundarios de las plantas, estos son fracciones líquidas volátiles que proporcionan aromas y sabores característicos, constituidos por mezclas complejas de hidrocarburos, compuestos oxigenados y residuos no volátiles. Están contenidos en glándulas o vesículas secretoras inmersas en los tejidos de las hojas, flores, corteza (pericarpio) y semillas de los frutos de muchas especies. Las plantas pueden producir aceite esencial para diversos fines: por un lado protegen a la planta de plagas, enfermedades e inclusive de la invasión de otras plantas; y para atraer insectos y aves (polinizantes). Estas cualidades de protección y atracción, se ven reflejadas en propiedades antisépticas, antiinflamatorias, antidepresivas, afrodisíacas y otras, presentes en mayor o menor grado en la totalidad de los aceites.

Los principales métodos de extracción de AE son hidrodestilación (HD), destilación por arrastre con vapor de agua, destilación-extracción con solvente (DES), Head-space (HS) y destilación con fluidos supercríticos (FSC); este último método ha adquirido gran importancia debido a la utilización de CO₂ como solvente (Matiz *et al.*, 2012), puesto que este gas (no es tóxico, ni explosivo, además es fácil de remover y no deja residuos tóxicos en el AE, su uso facilita las diferentes operaciones de separación de los productos extraídos. Sin embargo, gracias al crecimiento constante de la química analítica hacia el desarrollo de técnicas de preparación de muestras, han surgido ideas innovadoras las cuales nos proporcionan nuevas alternativas, dentro de la que se encuentra hidrodestilación asistida por la radiación con microondas (MWHD), en la cual el AE que se encuentra generalmente en bolsas (glándulas secretoras) que contienen diferentes cantidades de agua, son irradiadas por ondas que interactúan selectivamente con agua y causan calentamiento localizado.

El resultado es un aumento repentino no uniforme de la temperatura hasta el punto de ebullición e incluso por encima, produciéndose una expansión en volumen dentro del sistema provocando la ruptura de las paredes. El contenido orgánico fluye libremente hacia el solvente circundante, este proceso mejora la calidad de los AE y reduce los costos de operación (Golmakani y Rezaei, 2008). En esta investigación se realizó un estudio comparativo de la eficiencia de extracción, y composición química de los aceites esenciales de *Minthostachys mollis*, extraídos mediante hidrodestilación (HD) e hidrodestilación asistida por la radiación con microondas (MWHD).

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección del material vegetal:

Las muestras de orégano fueron recolectadas en el municipio de Pamplona en Norte de Santander (Colombia). Cabe resaltar que la etapa de muestreo de la especie vegetal, se llevó a cabo durante la puesta del sol, para evitar que las altas temperaturas pudieran volatizar algunos componentes presentes en las muestras. El material vegetal se empacó en un contenedor de poliestireno expandido (icopor) y se preservó a 25°C (Granados *et al.*, 2012). Las hojas de la planta Orégano (*Minthostachys mollis*), fueron identificadas en el Herbario Gabriel Gutierrez V. (MEDEL), registro nacional de colecciones biológicas.

Procesamiento del material vegetal:

Las hojas colectadas fueron lavadas con agua y seleccionadas para garantizar buen estado; seguidamente se trocearon, pesaron y se sometieron al proceso de extracción.

Extracción del aceite esencial:

Se realizó por dos métodos: hidrodestilación por arrastre con vapor de agua convencional (HD) e hidrodestilación asistida por microondas (MWHD). Se empleó un equipo de hidrodestilación con capacidad para 4 L (balón de destilación). Se pesaron 500 g de material vegetal, seleccionado y troceado, y fueron introducidos en el balón de extracción, el cual contenía 500 mL de agua destilada. En el proceso de arrastre con vapor empleando manta de calentamiento el tiempo de extracción fue de 4 horas, mientras en

el que se empleó asistencia con microondas fue de 1 hora. Como fuente de radiación microondas se empleó un horno convencional (Samsung) modificado, con un ciclo de irradiación de 60 minutos y a una potencia del 70% (Chemat *et al.*, 2006). En ambos casos, el AE se colectó en un recipiente tipo Dean Stark. El AE se separó por decantación e inmediatamente fue almacenado en un vial ámbar de 4 mL.

Determinación de propiedades físicas del aceite esencial:

A la muestra de AE se le determinó las siguientes propiedades físicas: a) densidad relativa del aceite esencial a 20°C; b) índice de refracción de los aceites esenciales; c) solubilidad de los AE en etanol (70% v/v): en un eppendorf de 1,5 mL se adicionaron 100 µL de etanol al 70% (v/v) y 2 µL del AE. La mezcla se homogenizó en un voltex a 20 rpm hasta que la muestra quedó totalmente homogénea.

Análisis por Cromatografía de Gases/Espectrómetro de Masa (GC/MS):

La determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales se efectuó mediante la técnica instrumental de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masa (GC/MS), utilizando un equipo GC/MS 7890A/5975C Agilent, en interfase con un detector selectivo de masas HP5973 Network conectado en línea con un sistema HP-MS ChemStation y la base de datos NIST-2008. Esta técnica se realizó en las siguientes condiciones: columna capilar HP-5MS 5% Phenyl Methyl Silox (30m x 250 µm x 0.25 µm), temperatura inicial 45 °C, temperatura de la línea de transferencia de 280°C y volumen de inyección 1.0 µL a modo split (20:1), con temperatura del inyector de 250°C. (Tomy *et al.*, 1997; Baharum *et al.*, 2010). La identidad de los componentes se asignó por comparación del espectro de masas obtenido experimentalmente para cada componente, con los reportados en la base de datos NIST-2008.

Análisis de Resultados:

Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como la media ± DE (desviación estándar). Las diferencias significativas se determinaron mediante el análisis con el Test de student o de ANOVA seguido del test de Dunnett o de Tukey, o según el caso. ** $p < 0,01$ y * $p < 0,05$ comparado con el control.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se muestra el rendimiento obtenido en la extracción y las propiedades físicas del AE, obtenido por el método de hidrodestilación por arrastre de vapor (HD) e hidrodestilación asistida por microondas (MWHD). Filas sin ninguna letra en común presentaron diferencias estadísticas significativas a un nivel de confianza (< 0.05). La extracción mediante MWHD presentó rendimiento del 0.0919%, y por el método HD el valor encontrado es de 0.95%, lo anterior es acorde con lo reportado en la literatura para *Minthostachys mollis*, con valores que fluctúan entre el 0.1 a 1.2% del aceite volátil (Pascual, 2001).

Tabla 1: Rendimiento y propiedades físicas del AE, aplicando el método de hidrodestilación por arrastre de vapor (HD) e hidrodestilación asistida por microondas (MWHD)

Análisis	Orégano (<i>Minthostachys mollis</i>)	
	HD	MWHD
Rendimiento (%)	0.0919±0.00028 a	0.9500±0.0050 b
Índice de refracción 20°C	1.4700±0.00002 a	1.4655±0.0010 b
Solubilidad EtOH (70% v/v)	Positiva	Positiva
Densidad (g/mL) a 20°C	0.9211±0.00122 a	0.9917±0.00026 b

De acuerdo con Golmakani y Rezaei, 2008, la técnica MWHD es más efectiva en la extracción de los metabolitos secundarios volátiles que la HD. Esta técnica presenta algunas ventajas destacables en cuanto a la disminución del tiempo de proceso, igualmente hay mejoría en la cantidad de calentamiento efectivo requerido y el tamaño del equipo es reducido, resaltado que las microondas involucran un flujo de calor más eficiente, que el obtenido por los métodos clásicos de calentamiento conductivo, estas pueden calentar toda la muestra casi simultáneamente y a un ritmo muy alto, generando un menor consumo de energía (Golmakani y Rezaei, 2008).

Igualmente existen otros factores que probablemente pudieron influir sobre el rendimiento de los AE como son: los métodos de cultivo y las condiciones geobotánicas: clima, altitud, tipo de suelo, luminosidad,

pluviosidad, temperatura; método de extracción del aceite, época de recolección y edad de las plantas (Stashenko, *et al.*, 2010).

En el análisis estadístico de los valores de densidad se observaron diferencias estadísticas significativas estos son similares a los reportados por Golmakani y Rezaei, 2008. La semejanza en los resultados fortalece lo dicho por Golmakani y Rezaei, sobre la densidad como un parámetro de aceptación para los AE de orégano. Según lo reportado en la literatura, los AE con índices de refracción mayores a 1.47 y densidades superiores a 0.9 g/mL, tienen en su composición cantidades importantes de compuestos oxigenados aromáticos o alicíclicos (Granados *et al.*, 2012).

La prueba de solubilidad en etanol al 70%, fue positiva para el AE de orégano, obtenido por los métodos de HD y MWHD. El comportamiento de solubilidad es semejante al reportado por Granados (2012). Lo anterior se debe principalmente al contenido de compuestos oxigenados en los AE. La presencia de compuestos oxigenados aumenta la afinidad por el solvente, y, adicionalmente, los aldehídos y alcoholes poseen la capacidad de formar puentes de hidrógeno, Por tal razón, el contenido de compuestos oxigenados, además de proveer las notas aromáticas agradables a los AE, aumentan su solubilidad en etanol, haciéndolos más aptos para su aplicación en la industria. En la Tabla 2 se presenta la composición química relativa de los AE de *Minthostachys mollis*, obtenida mediante CG-EM.

Tabla 2: Componentes mayoritarios detectados en los AE obtenidos mediante HD y MWHD. En la Tabla, NP es "No detectado en la muestra".

Compuesto	Orégano (<i>Minthostachys mollis</i>)	
	% Abundancia relativa, (t_R , min)	
	HD	MWHD
α -pineno	1,20 (7,334)	0,05(6,274)
β -Mirceno	N.P	0,17 (6.274)
α -Terpineno	N.P	0,17 (6.485)
p-cimeno	N.P	7,28 (7,065)
Carvacrol	N.P	10,94 (7.766)
Eucaliptol	11,04 (10,120)	N.P
Timol	N.P	73,36 (13.176)
Germacreno-D	12.75 (43,211)	N.P
Acetato de eudesmol	22.44 (47,677)	N.P
Acetato de isolongifolol	21.75 (48,999)	N.P
Total compuestos identificados	69,18%	84,69%

Por el método de HD se obtuvo que en el AE de *Minthostachys mollis* (orégano) el 22.44% corresponde al acetato de eudesmol, seguido acetato de isolongifolol con un 21.75%, germacreno-D 12.75%, y eucaliptol 11,04%; se destaca la composición del AE obtenido por el método de HD que es notoriamente diferente con respecto a la composición del obtenido por el método de MWHD, en éste último predomina el timol y carvacrol con un 73,36% y 10,94% respectivamente. Se reportan otros estudios donde utilizan los métodos de HD e MWHD, reportando que la cantidad de compuestos del tipo de los fenilpropanoides es mayor cuando se utiliza este último método de obtención (Golmakani y Rezaei, 2008).

Cabe resaltar que las condiciones agroecológicas del cultivo y los parámetros operacionales del proceso de extracción, son variables que inciden sobre la composición y el rendimiento de los AE. Stashenko *et al.* (2007), indican que las variaciones en las condiciones agroecológicas inducen cambios morfológicos, histológicos y fisiológicos en la planta, mientras que la eficiencia de la HD está relacionada con los parámetros operacionales, tales como tiempo, temperatura de la extracción y cantidad de agua empleada, entre otros. Los AE obtenidos mediante HD, normalmente presentan notas más fuertes y un color más oscuro con respecto a los producidos por otros métodos.

Cabe resaltar que el método de HD requiere un período de tiempo de 4 horas para realizar el proceso de extracción completa del AE. Sin embargo, MWHD requiere sólo 1 hora. Por lo tanto, por este último método existe un ahorro significativo en el tiempo de extracción. Además, los requisitos de energía para llevar a cabo la extracción, basado en el consumo máximo de energía de la manta de calentamiento para HD y

horno microondas MWHD durante el período total de extracción, fueron de 6,00 kWh para HD y 1,20 kWh para MWHD. Asimismo, los niveles emitidos de CO₂ a la atmosfera fueron de 3900 g de CO₂ para HD y 780 g para MWHD, estos resultados correlacionan con el estudio realizado por Ferhat *et al.* (2006), donde estima que para obtener un 1g aceite esencial se emite 1600 g de CO₂ para HD y 990 g para MWHD.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados y la discusión presentada se pueden obtener las siguientes conclusiones principales:

- 1.- El rendimiento de los AE de *Minthostachys mollis* depende del método de extracción, obteniéndose un mayor contenido de AE por el método hidro-distilación asistida por microondas (MWHD)
- 2.- La técnica MWHD es muy rápida y relativamente económica en comparación con la HD
- 3.- Igualmente, MWHD puede ser sugerido como método de extracción amigable con el medio ambiente, puesto que evita el uso de disolventes orgánicos y la cantidad de CO₂ emitida es mucho menor en comparación con la hidro-distilación convencional.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de Cartagena por facilitar espacio, recursos y tiempo de los investigadores.

REFERENCIAS

- Baharum, S., H. Bunawan, M. Ghani, W. Mustapha and N. Noor. *Analysis of the Chemical Composition of the Essential Oil of Polygonum minus Huds. Using Two-Dimensional Gas Chromatography-Time-of-Flight Mass Spectrometry (GC-TOF MS)*, *Molecules*: 15, 7006-7015 (2010).
- Chemat, F., M.E. Lucchesi, J. Smadja, L. Favretto, G. Colnaghi and F. Visinoni. *Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: A rapid, clean and environmentally friendly approach*. *Analytica Chimica Acta*: 555(1), 157-160 (2006).
- Golmakani, M. and K. Rezaei. *Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from Thymus vulgaris L.* *Food Chemistry*: 109 (4), 925-930 (2008).
- Granados, C., Y. Yáñez y G. Santafé. *Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de Calycolpus moritzianus y Minthostachys mollis de Norte de Santander*. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*: 10(1), 12-23 (2012).
- Ferhat, AM., Y.B. Meklati, J. Smadja, F. Chemat. *An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel*. *Journal of Chromatography A*: 1112, pp 121-126 (2006).
- Matiz, G., M.R. Osorio, M. Atencia, J. Herazo y G. Camacho. *Diseño y evaluación in vivo de formulaciones antiacné tipo gel, a base de los aceites esenciales de naranja (Citrus Sinensis), albahaca (Ocimum Basilicum L) y de ácido acético*. *Biomédica*: 32, 125-33 (2012).
- Pascual, M.E., K. Slowing, M.E. Carretero and A. Villar. *“Antiulcerogenic activity of Lippia alba (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae)”*. *Fármaco*: 56(5-7), 501-504 (2001).
- Stashenko, E., C.A. Ruíz, G. Arias, D.C. Durán, W. Salgar, M. Cala and M.R. Martínez. *Lippia organoides chemotype differentiation based on essential oil GC-MS analysis and PCA*. *J. Sep. Sci.*: 33, 93-103 (2010).
- Stashenko, E., N. Quiroz and J. Martínez. *Study of Colombian Ylang-Ylang (Cananga odorata) oils obtained by different extraction techniques*. *J. High Resol. Chromatogr.* 19(6):353-358 (2007).
- Tomy, G., G. Stern, D. Muir, A. Fisk, C. Cymbalisty and J. Westmore. *Quantifying C10-C13 Polychloroalkanes in Environmental Samples by High-Resolution Gas Chromatography/Electron Capture Negative Ion High-Resolution Mass Spectrometry*. *Analytical Chemistry*: 69, 262-2771 (1997).

