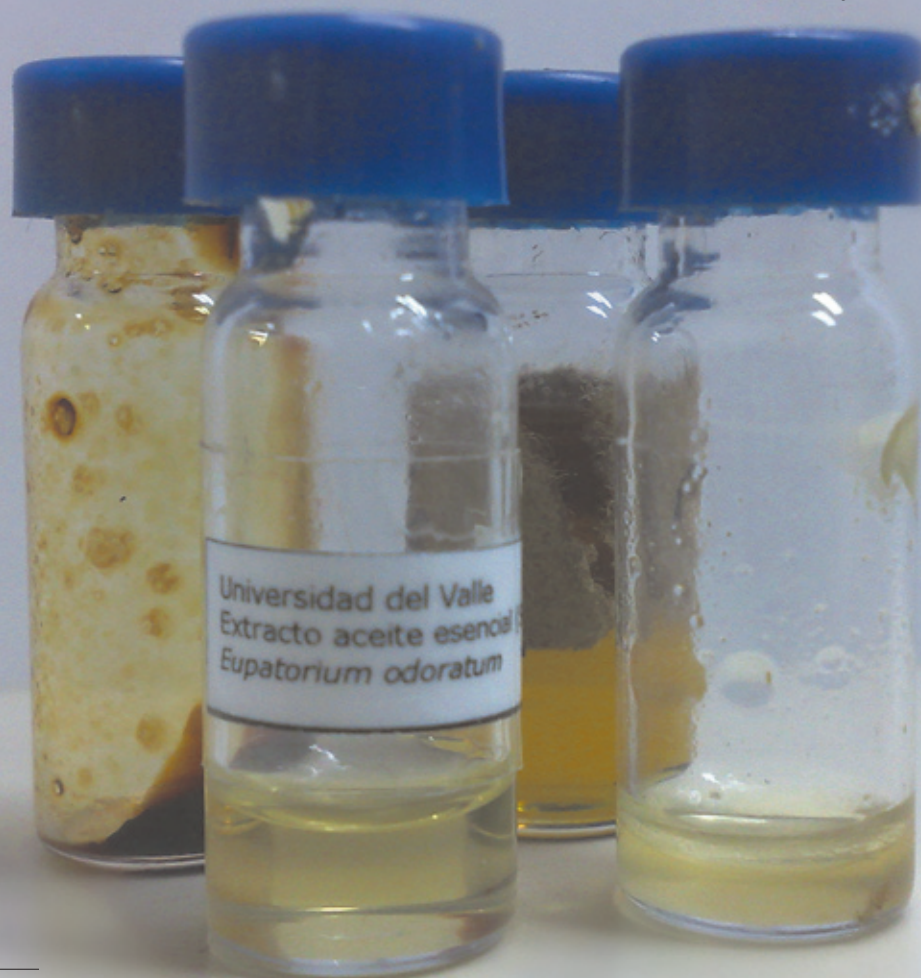


Comparación de la composición de aceites esenciales de salvia amarga (*Eupatorium odoratum*) obtenidos por hidrodestilación y dióxido de carbono supercrítico.

RUBÉN A. SÁNCHEZ A.*
JAIME RESTREPO O.**



* Químico. Director del Laboratorio de Análisis industriales de la Universidad del Valle. rubensan@univalle.edu.co

** Ph.D. en Química. Profesor titular del Departamento de Química de la Universidad del Valle. jarestre@univalle.edu.co.

Resumen

Se presentan los resultados experimentales de la extracción del aceite esencial de la especie vegetal *Eupatorium odoratum* usando hidrodestilación y dióxido de carbono supercrítico. Las condiciones experimentales de la extracción con CO₂ supercrítico fueron 1500 psi, 40 °C y 3 minutos de extracción. Se obtuvo un rendimiento de extracción del 0,12% (CV 14%) de aceite esencial usando hidrodestilación y un 0,20% (CV 26%) usando CO₂ supercrítico. El aceite esencial obtenido por hidrodestilación resultó ser rico en sesquiterpenos (65,2%), monoterpenos (30,5%), sesquiterpenos oxigenados (3,9%) y monoterpenos oxigenados (0,3%), mientras que el aceite obtenido con CO₂ supercrítico resultó ser rico en sesquiterpenos (52,4%), sesquiterpenos oxigenados (34,4%) y monoterpenos (2,6 %); se extrajeron además, otras sustancias de peso molecular entre 350 y 600 g/mol (11,7 %) presumiblemente ceras cuticulares de la planta.

Palabras clave: Aceite esencial, fluido supercrítico, hidrodestilación, *E. odoratum*, dióxido de carbono.

Abstract

Experimental results of supercritical CO₂ and hydrodistillation extraction of essential oils from *Eupatorium odoratum* are presented. Experimental conditions of supercritical CO₂ extraction were 1500 psi, 40°C and 3 minutes of extraction. The yield of the extraction were 0,12% (RSD 14%) obtained by hydrodistillation and 0,20% (RSD 26%) obtained by supercritical CO₂. The essential oil obtained by hydrodistillation was found to

be rich in sesquiterpenes (65.2%), oxygenated monoterpenes (30,5%), sesquiterpenes (3,9 %) and oxygenated monoterpenes (0,3%), whereas the oil obtained using supercritical CO₂ turned out to be rich in sesquiterpenes (52,4%), Sesquiterpenes oxygenated (34,4%) and monoterpenes (2,6 %); in addition, other substances were extracted from the plant with molecular weight between 350 and 600 g/mol (11,7 %) presumably cuticular waxes.

Key words: Essential oil, supercritical fluids, hydrodistillation, *E. odoratum*, carbon dioxide.

Introducción

Las plantas del género *Eupatorium*, familia *compositae*, abarcan casi 600 especies distribuidas en regiones tropicales, principalmente de América y África.¹

En Colombia, la planta crece de forma silvestre y recibe los nombres vulgares de almordaruz, salvio amargo, jarilla, chilco, amarguero y carrasposa, dependiendo de la zona en que se encuentre y es usada frecuentemente por la medicina popular en el tratamiento de infecciones, inflamaciones y tumores.²

Los estudios fitoquímicos con plantas de este género, incluyendo especies colombianas, se han encaminado, desde tiempo atrás, al aislamiento de flavonoides, lactonas, sesquiterpenlactonas y otros compuestos que son biológicamente activos.^{3,4,5} Sin embargo los aceites esenciales de especies predominantemente colombianas no se encuentran reportadas. Bamba y colaboradores publicaron la extracción de aceites esenciales de una variedad de *E. odoratum* cultivada en Bingerville (Ivory Coast), en la

que encontraron que el 88% del aceite son compuestos terpénicos, de los cuales el 12% son aldehídos y compuestos hexénicos;⁶ en otro estudio fueron analizados los aceites esenciales de dos variedades de *E. odoratum* procedentes de Camerún y el Congo en una publicación de Gerard L. y colaboradores, cuyos resultados muestran la presencia de monoterpenos y sesquiterpenos principalmente.⁷

En los últimos años se ha reportado la extracción de aceites esenciales de otras especies del género *eupatorium*, principalmente de África y especies cultivadas en Brasil.¹ El interés de los investigadores por los aceites esenciales radica en su uso en la industria cosmética, alimentaria, y en la medicina. Se ha encontrado que muchos de los aceites esenciales de muchas plantas tienen actividad biológica, principalmente como agentes antimicrobiales, Bamba D. y colaboradores establecieron la actividad bacteriológica del aceite esencial de *E. odoratum* contra bacterias gramnegativas.⁶

Un aspecto que ha ido cobrando un alto interés en la química de los aceites esenciales han sido los métodos de extracción; se ha determinado que la calidad del mismo depende en gran medida de la técnica utilizada.⁸ El método convencional para la extracción de aceites esenciales ha sido la destilación con vapor o la hidrodestilación;⁹ sin embargo las altas temperaturas que se manejan en estos métodos, hacen que se pierdan los compuestos más volátiles del aceite o se descompongan aquellos que son termolábiles, Reverchon *et al.*, publicaron un trabajo en el que describieron como el aceite esencial de manzanilla (*Chamomila recutita*) presenta en su composición chamuzaleno, un compuesto producto de la degradación térmica de la matricida.¹⁰

Otra técnica utilizada en la obtención de aceites esenciales es la extracción con solventes, tipo hexano; el solvente residual con el que queda el extracto es de difícil remoción, siendo en algunos casos imposible de eliminar, deteriorando la calidad de los aceites. Una técnica de extracción que ha sido investigada exhaustivamente en las dos últimas décadas ha sido aquella en la que se usa un fluido supercrítico como medio extractor.^{11,12}

Desde que se publicó la primera patente en 1939 (Howart) para la concentración de jugos usando fluidos supercríticos, numerosos trabajos se han editado utilizando esta tecnología en la extracción de diversos tipos de metabolitos secundarios, entre ellos los aceites esenciales.

El dióxido de carbono es el más apropiado para usarse como solvente en la extracción con fluidos supercríticos. Sus condiciones críticas son 31,1°C y 73,8 bar las cuales lo hacen muy atractivo para la extracción de compuestos termolábiles. Adicionalmente es un solvente inerte, no inflamable, no explosivo, sin olor ni color y no costoso. Su baja difusibilidad hace que la tasa de extracción sea mayor que la de aquellos usados convencionalmente en métodos de extracción como soxhlet o hidrodestilación.¹³

En 1990, Ondarza y Sánchez publicaron un trabajo en el que reportan la utilización de dióxido de carbono supercrítico como solvente de extracción, obteniendo un aceite rico en monoterpenos oxigenados y sesquiterpenos principalmente, a diferencia del aceite obtenido por hidrodestilación en el que la cantidad de monoterpenos era significativa.¹¹

Trabajos posteriores han reportado el uso de la extracción con fluidos supercríticos y comparándola

con resultados obtenidos por hidrodestilación o arrastre con vapor, con resultados similares.^{14, 15, 16}

Hasta ahora no se ha encontrado el reporte de un trabajo en el que se haya extraído aceite esencial de la especie *E. odoratum* colombiana empleando un fluido supercrítico.

El objetivo de esta investigación es la obtención del aceite esencial de la especie *E. odoratum* usando dióxido de carbono supercrítico y comparándola con la tradicional hidrodestilación.

Materiales y Metodología

Material vegetal

La planta se colectó en los lugares donde crece silvestre, en la ciudad de Cali (970 msnm). La recolección se hizo durante los meses de junio a septiembre, temporada seca en la ciudad. Se utilizaron las partes aéreas de la planta para todos los experimentos y los procedimientos fueron aplicados sobre muestra fresca y recién colectada.

Extracción de aceites esenciales por hidrodestilación

Una muestra de 100 g de planta fresca fue sometida a hidrodestilación con un destilador en vidrio tipo Clevenger, durante cuatro horas, de acuerdo con el procedimiento descrito por Domínguez.⁹ El aceite obtenido fue secado con sulfato de sodio anhidro y almacenado a 4°C hasta su respectivo análisis. Los experimentos se realizaron con repeticiones de cinco veces y los valores reportados corresponden a la media.

Extracción de aceites esenciales con CO₂ supercrítico

Para la extracción con CO₂ supercrítico se utilizó un equipo fabricado en el Taller de Mecánica

Fina del Departamento de Física de la Universidad del Valle, cuyo diseño fue publicado por López e Iglesias,¹⁷ y consta de 1) Cilindro de dióxido de carbono, 2) Celda de carbón activado, 3) Vaso de alta presión, 4) Disco de seguridad, 5) Sistema de calentamiento, 6) Celda de extracción, 7) Capilar (restringidor de flujo), 8) Vial de recolección y 9) Medidor de flujo (ver Figura 1).

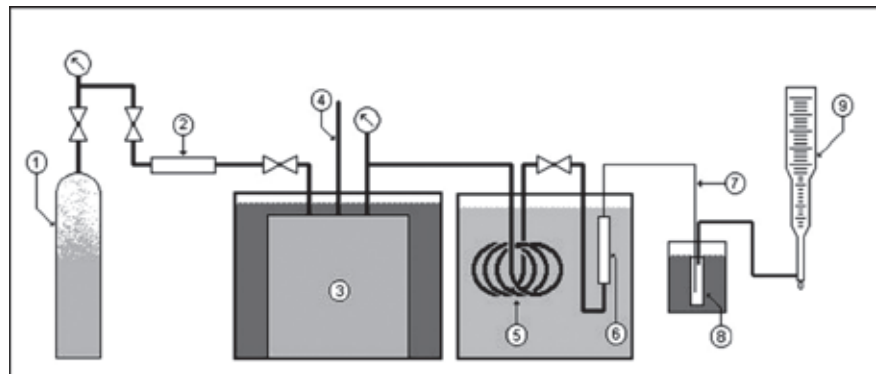


Figura 1. Esquema del equipo usado en la extracción con CO₂ supercrítico

Para la extracción de los aceites, se colocaron 10 g de muestra fresca y recién colectada en la celda de extracción a 40° C (6, en la Figura 1) y se hizo pasar CO₂ a diferentes presiones desde el vaso de alta presión (3), el aceite extraído se colectó en el vial de recolección (8), posteriormente se procedió a secar con sulfato de sodio anhidro y almacenar en refrigeración para su posterior caracterización.

La temperatura del CO₂ supercrítico utilizada fue de 40° C y se mantuvo como una constante durante todos los experimentos. La presión del CO₂ supercrítico y el tiempo fueron variables que se determinaron en el estudio, las presiones utilizadas estuvieron entre 1100 psi y 2500, escogidas con base en reportes anteriores.¹⁸

Análisis de los aceites esenciales

Los extractos fueron separados previamente en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard serie 5890A,

columna capilar SE-30 de polidimetilsiloxano, de 30 m de longitud y 0,45 μm de espesor, con detector de ionización de llama. La temperatura del horno se mantuvo a 50° C por dos minutos, posteriormente se elevó hasta 200° C a una tasa de 4°C/min y se mantuvo en 200° C por seis minutos, las temperaturas del inyector y detector fueron 200° C y 220° C respectivamente.

Estas mismas condiciones se usaron para la caracterización por cromatografía de gases - masas, en un cromatógrafo Hewlett-Packard 5890A con detector selectivo de masas 5971-In con energía de ionización de 70eV y un rango de masas de 50 a 600 uma.

Los porcentajes de los terpenos fueron calculados mediante el método de normalización de áreas. Los compuestos de los aceites fueron determinados por comparación con los tiempos de retención de algunos patrones comerciales (Sigma Aldrich) y verificados con la librería de espectros de masas publicada por *The International Centre for Science and High Technology of the United Nations Industrial Development Organization (ICS-UNIDO)*.¹⁹

Resultados y discusión

Optimización de condiciones experimentales

La primera etapa del estudio consistió en encontrar las condiciones experimentales para la extracción con CO₂ supercrítico de manera óptima, para lo cual hubo dos parámetros: la presión del CO₂ supercrítico y el tiempo de extracción, con temperatura constante a 40° C.

La Figura 2 muestra el comportamiento del proceso de extracción a diferentes presiones. Se observa, en todos los casos, que a medida que la presión se hace mayor, la cantidad de extracto aumenta de forma brusca hasta alcanzar un máximo de 1500 psi, a partir del cual comienza a descender hasta volverse casi constante, en todos estos experimentos se obtuvo un máximo de extracto de ~0,2 % a 1500 psi, a presiones mayores se evidencia pérdida del aceite o una menor eficiencia en la extracción. La presión de 1.500 psi figura dentro de las presiones promedio encontradas por otros investigadores en trabajos similares, las cuales oscilan entre 1300 y 3600 psi.²⁰

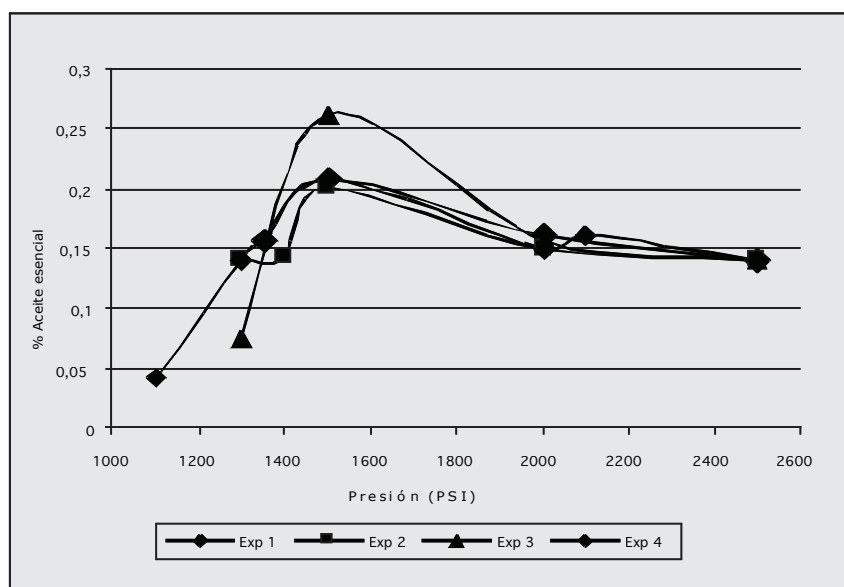


Figura 2. Aceite esencial extraído de *E. odoratum* en función de la presión de CO₂ supercrítico

La Figura 3 muestra el comportamiento de la extracción en función del tiempo, en condiciones de ensayo (presión 1500 psi, temperatura 40° C).

Se observa que a medida que el tiempo aumenta, el porcentaje de extracto se incrementa hasta obtener un máximo de aceite extraído de aproximadamente 0.2% hacia los 3.0 minutos; a partir de este tiempo la concentración de aceite se vuelve constante.

Para experimentos posteriores se trabajó con las condiciones experimentales encontradas: temperatura 40° C, presión 1500 psi y tiempo de extracción 3 minutos. En la extracción de aceite esencial con hidrodestilación se trabajó con un tiempo de destilación hasta de cuatro horas, en el cual se obtenía el máximo de extracto. Al tener tiempos menores de extracción, los fluidos supercríticos aventajan a la hidrodestilación que requiere tiempos, generalmente, en horas.²¹

Extracción del aceite esencial de *Eupatorium odoratum*

El método de hidrodestilación permitió obtener un aceite de color amarillento de las hojas frescas de la especie, en una concentración de 0,12%, una desviación estándar de 0,02% (n=5) y un coeficiente de variación de 14 %, mientras que la extracción usando CO₂ supercrítico permitió obtener un aceite de color amarillento, con un olor penetrante y en una concentración ligeramente mayor: 0,20%, una desviación estándar de 0,05 (n=5) y un coeficiente de variación de 26%.

La Tabla 1 resume los resultados de las extracciones con ambos métodos; se observa que el coeficiente de variación de la técnica de fluidos supercríticos es mayor que la de hidrodestilación. Para determinar si existe una diferencia significativa

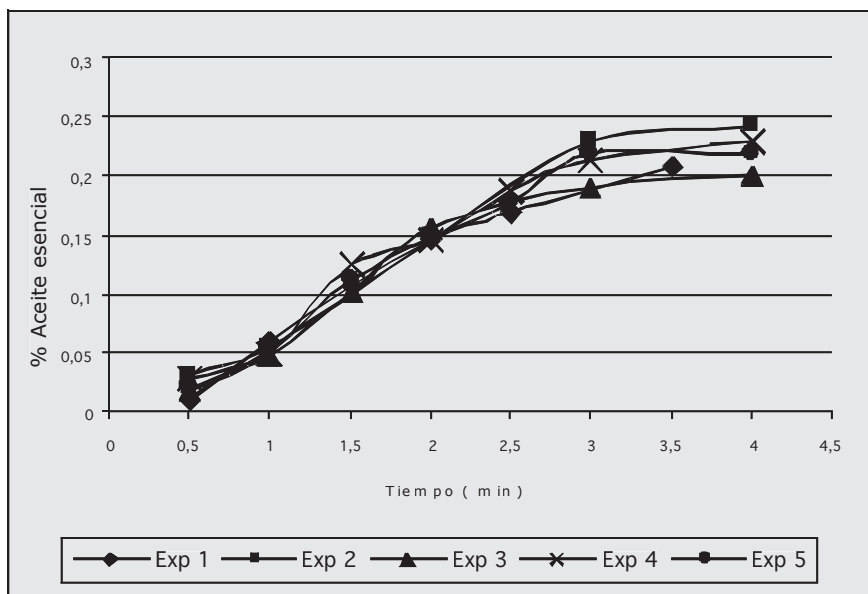


Figura 3. Aceite esencial extraído de *E. odoratum* en función del tiempo

entre ambas desviaciones se efectuó una prueba F. La Tabla 2 muestra que las varianzas de ambos métodos son estadísticamente comparables, lo que hace suponer que la diferencia se debe a errores aleatorios en los experimentos.

Tabla 1. Porcentaje de aceite esencial obtenido por hidrodestilación y por extracción con CO₂ supercrítico

Corrida	Aceite esencial, en % (m/m)	
	Hidrodestilación	CO ₂ supercrítico
1	0,11	0,17
2	0,11	0,23
3	0,10	0,20
4	0,13	0,13
5	0,14	0,26
Promedio	0,12	0,20
Desviación estándar	0,02	0,05
Coefficiente de variación	14 %	26 %

Con el fin de determinar si los dos métodos extraen la misma cantidad de aceite, se efectuó una prueba t-student de comparación de medias, arrojando los resultados expuestos en la Tabla 2, existen diferencias significativas (P=0,05) entre ambos métodos, lo cual sugiere que las diferencias entre ambas medias no son atribuibles a desviaciones aleatorias, por lo tanto, son diferen-

tes, es decir ambas técnicas extraen cantidades de aceite esencial que difieren estadísticamente.

Pese a que estadísticamente las varianzas no son diferentes, el alto valor del coeficiente de variación del método de fluidos supercríticos es atribuible a la dependencia de un eficiente sistema de recolección del aceite.

Otros investigadores han tenido resultados similares, en los que la concentración de aceite esencial obtenido por fluidos supercríticos es ligeramente mayor al que se extrae con hidrodestilación, una posible explicación a este fenómeno es la presencia de algunos compuestos, generalmente hidrocarburos, presumiblemente ceras cuticulares, existentes en la cortezas de las hojas de las plantas. Reverchon *et al.* habían reportado la presencia y la extracción de este tipo de compuestos en otras familias de plantas cuando se intenta extraer aceites usando CO₂ supercrítico.¹⁸

La cantidad de aceite esencial encontrada de la especie colombiana es comparable con otras reportadas en la literatura, Lamaty *et al.* reportan una concentración de aceite de 0,25% de esta misma especie para una variedad de Camerún y 0,1% para una variedad del Congo, utilizando el método de hidrodestilación,⁷ los cuales se encuentran muy cercanos a los obtenidos para la variedad colombiana de la región del Valle del Cauca.

Caracterización del aceite esencial

Las Figuras 4 y 5 muestran los cromatogramas del aceite obtenido por hidrodestilación y con CO₂ supercrítico, respectivamente; se observa un total de 39 compuestos en el cromatograma del aceite obtenido por hidrodestilación y 52 compuestos en el cromatograma del aceite obtenido con CO₂ supercrítico, muchos de los cuales se hallan en muy pequeña concentración. Este mayor número de compuestos obtenidos por extracción con dióxido de carbono supercrítico confirma que hay sustancias que mediante hidrodestilación no son extraíbles.

Los composiciones de los aceites esenciales se caracteriza por tener compuestos de pesos moleculares bien definidos: monoterpenos, 136 g/mol, monoterpenos, 154 g/mol, sesquiterpenos, 204 g/mol, sesquiterpenos, 220 – 222 g/mol, además de otros compuestos, como hidrocarburos de bajo peso molecular.

Algunos de los terpenos que fueron identificados se muestran en la Tabla 3.

Los espectros de masas de cada uno de los cromatogramas arrojan una composición de especies de peso molecular 136, 154, 204, 220 y 222 g/mol, pesos moleculares correspondientes a terpenos, sesquiterpenos y terpenos oxigenados.⁸ Estos compuestos se encuentran tanto en

Tabla 2. Resumen de los estadísticos en la extracción de aceite esencial de *E. odoratum*

	Aceite esencial, en % (m/m)	
	Hidrodestilación	CO ₂ supercrítico
Promedio (x)	0,12	0,20
n	5	5
Desviación estándar (s)	0,02	0,05
Coefficiente de variación, en %	14	26
Varianza (s ²)	0,00027	0,00257
Ho	No existe diferencia significativa entre las varianzas de ambas técnicas	
F calculado	9,52	
F _{4,4} tabulado	9,605	
Conclusión	Se acepta Ho: No existe diferencia significativa entre las varianzas de ambas técnicas	
Ho	No existe diferencia significativa entre las medias de ambas técnicas	
T calculado	3,36	
T tabulado, 8 GL	2,31	
Conclusión	Se rechaza Ho: Existe diferencia significativa entre las medias de ambas técnicas	

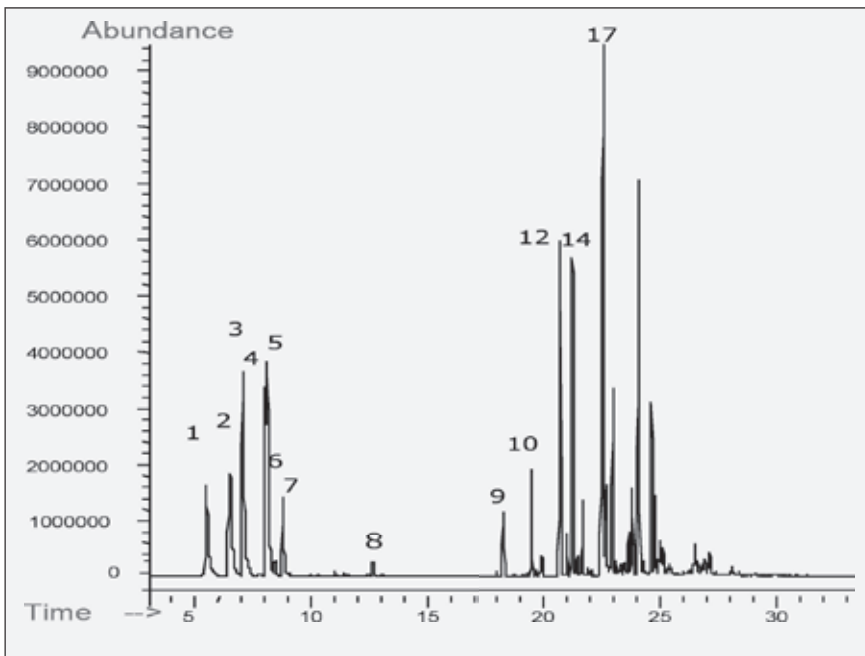


Figura 4. Cromatograma del aceite esencial de *E. odoratum* extraído por hidrodestilación

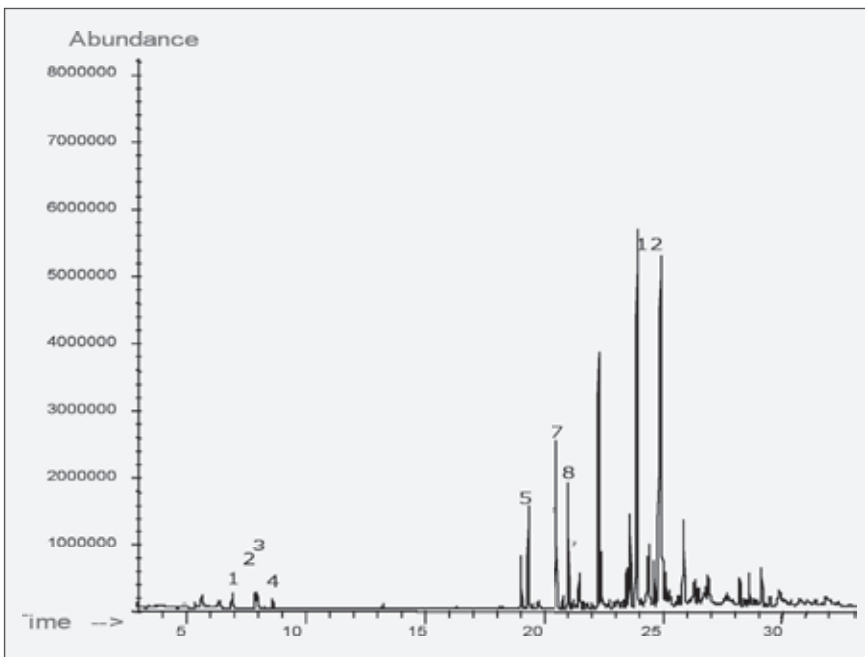


Figura 5. Cromatograma del aceite esencial de *E. odoratum* extraído con CO₂ supercrítico

el aceite obtenido por hidrodestilación como por extracción con CO₂ supercrítico; se observaron, adicionalmente, otros compuestos con peso molecular entre 350 y 600 g/mol en el aceite esencial obtenido usando CO₂ supercrítico, los cuales se presume serían ceras cuniculares u otro tipo de hidrocarburos. La Tabla 4 muestra la relación porcentual

de cada grupo de terpenos extraídos por ambos métodos, de acuerdo con el peso molecular obtenido de los espectros de masas.

Un hecho interesante es la diferencia existente entre los cromatogramas del aceite obtenido por hidrodestilación y el obtenido usando CO₂ supercrítico, en relación con la concentración de monoterpenos;

el porcentaje de monoterpenos (compuestos con peso molecular de 136) es de 30,5 %, mientras que en el segundo la concentración de éstos es tan sólo del 2,6 %.

Tabla 3. Relación de los terpenos identificados en *E. odoratum*

Aceite obtenido por hidrodestilación			Aceite obtenido usando CO ₂ supercrítico		
Pico No.	t _R	Compuesto	Pico No.	t _R	Compuesto
1	5,485	α-pineno	1	7,061	Mirceno
2	6,517	β-pineno	2	8,036	β-felandreno
3	7,055	Mirceno	3	8,102	Limoneno
4	8,033	β-felandreno	4	8,778	E-β-ocimeno
5	8,107	Limoneno	5	19,496	α-cubeneno
6	8,425	E-β-ocimeno	6	19,502	α-copaeno
7	8,763	Z-β-ocimeno	7	20,699	β-cariofileno
8	12,642	Terpinen-4-ol	8	21,006	γ-cadineno
9	18,309	δ-elemeno	9	21,215	γ-elemeno
10	19,493	α-copaeno	10	21,673	α-humeleno
11	19,946	β-elemeno	11	22,496	β-cubeneno
12	20,722	β-cariofilleno	12	24,614	Germacreno-B
13	21,008	γ-cadineno			
14	21,247	γ-elemeno			
15	21,683	α-humeleno			
16	21,891	Alloaroma dendreno			
17	22,556	Germacreno D			
18	23,131	α-muoreleno			
19	23,451	δ-cadineno			
20	26,933	β-eudesmol			

Tabla 4. Composición porcentual de terpenos en el aceite esencial de *E. Odoratum*

Método de extracción	Composición porcentual de terpenos				
	1	2	3	4	5
Hidrodestilación	30,5	0,3	65,2	3,9	-
CO ₂ Supercrítico	2,6	-	51,4	34,4	11,7
Monoterpenos C ₁₀ H ₁₆ , 136g/mol					
Monoterpenos oxigenados, C ₁₀ H ₁₈ O, 154 g/mol					
Sesquiterpenos, C ₁₅ H ₂₄ , 204 g/mol					
Sesquiterpenos oxigenados C ₁₅ H ₂₆ O, 220-222 g/mol					
Compuestos de peso molecular entre 350 – 600 g/mol					

Este hecho lo habían observado Ondarza, M. y Sánchez, en un trabajo similar realizado sobre especies mexicanas de plantas aromáticas. Se afirma, además, que la concentración alta de monoterpenos afecta las características organolépticas del aceite, enmascarando o degradando el sabor y aroma del aceite esencial¹¹ y es por esta razón que aquellos aceites esenciales usados en la industria alimentaria se deben desterpenizar.²²

En la Tabla 4 se puede observar la alta composición de sesquiterpenos oxigenados de peso molecular 220-222 g/mol en el aceite obtenido con CO₂ supercrítico, los cuales no son posibles de conseguir por hidrodestilación, ya que la temperatura de ebullición no permite su eficiente extracción. Estas diferencias de composición de monoterpenos y sesquiterpenos oxigenados afectan las propiedades físico-químicas del aceite: el aceite más rico en sesquiterpenos oxigenados será más estable a la temperatura, de características más polares y de mayor punto de ebullición, mientras que el más rico en monoterpenos será un aceite más volátil, menos polar y de menor punto de ebullición.

Existe un 11,7 % de compuestos cuyo pesos moleculares oscilan entre 350 y 600 g/mol, los cuales no corresponden a terpenos, los que se consideran son las ceras cuticulares; estos compuestos no se presentan en el aceite obtenido por hidrodestilación, debido a que sus puntos de ebullición no permiten su extracción a 100 °C; su presencia en los aceites no es agradable, razón por la cual Reverchon *et al.* han trabajado en el diseño de sistemas de separación de estos compuestos, una vez extraído el aceite, logrando obtener aceites con menor proporción de ceras cuticulares.¹⁸

Conclusiones

Fueron estandarizados dos parámetros para la extracción del aceite esencial de la especie *Eupatorium odoratum*: la presión del CO₂ en estado supercrítico de 1500 psi (103,4 bar) y el tiempo de extracción de 3,0 minutos, para obtener los mejores resultados, bajo las condiciones del ensayo.

El porcentaje de extracto obtenido por los dos métodos empleados resultó ser de 0,12 % por hidrodestilación y 0,20 % con dióxido de carbono supercrítico, las cuales son estadísticamente diferentes; no obstante, la diferencias en la desviación estándar resultó ser atribuible a errores aleatorios.

La diferencia en la composición del aceite radica en el contenido de monoterpenos (136 g/mol) del extracto obtenido por hidrodestilación, resultando ser casi diez veces mayor que el obtenido con CO₂ supercrítico, mientras que los valores de sesquiterpenos oxigenados (220-222 g/mol) fueron 10 veces menores; estas diferencias afectan las propiedades físico-químicas del aceite. Sin embargo, ambos aceites resultaron tener sesquiterpenos (204 g/mol) en mayor proporción en relación con los demás terpenos.

En la extracción con dióxido de carbono supercrítico se obtienen compuestos de alto peso molecular, siendo aproximadamente el 11,7 % del aceite, presumiblemente ceras cuticulares, las cuales deben ser eliminadas utilizando sistemas de separación. ⚙️

Bibliografía

1. Maia, J. G. S., *et al.* Essential oils composition of *Eupatorium* species growing wild in the Amazon; *Biochemical Systematics and Ecology*, 30, 1071-1077, 2002
2. Pérez, E., *Plantas útiles de Colombia*, Librería Colombiana Camacho Roldán, Bogotá, 1956
3. Bose, P.K., *et al.* Flavonoids constituents of *Eupatorium odoratum*, *Phytochem.*, 12, 3, 667-668, 1973.
4. Talapatra, S.K., Bhar, D.S., Talapatra, B., Flavonoid and terpenoid constituents of *Eupatorium odoratum*, *Phytochem.*, 13, 1, 284-285, 1974.
5. Correa, C.F.M., Estudio fotoquímico de *Eupatorium odoratum*, *Tesis de maestría*, Universidad del Valle, Cali, 1991.
6. Bamba, D. *et al.* Essential oils of *Eupatorium odoratum*, *Planta Med.*, 59, 2, 184-185, 1993.
7. Lamaty, G., *et al.* Aromatic plants of tropical central Africa IV. essential oils of *Eupatorium odoratum* L. from Cameroon and Congo, *J. Ess. Oil Res.*, 4, 101-105, 1992.
8. Dey, P.M., Harborne, J.B., *Plant Biochemistry*, Academic Press, 417-434, 1997.
9. Dominguez, X.A., *Métodos de investigación fotoquímica*, Limusa S.A., México, 80-88, 1973.
10. Reverchon, E., Donsi, G., Sesti, O.L.; Modeling of supercritical fluid extraction from herbaceous matrices, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 32, 2721-2726, 1993.
11. Ondarza, M.; Sánchez, A.; Steam distillation and supercritical fluid extraction of some mexican spices, *Chromatographia*, 30, (1-2), 16-19, 1990.
12. Ndiomu, D.P.; Simpson, C.F.; Some applications of supercritical fluid extraction; *Analytica Chimica Acta*, 213, 237-243, 1988.
13. Pellerin, P.; Supercritical fluid extraction of natural raw materials for the flavor and perfume industry; *Perfumer & Flavorist* 1991, 16, 37-9.
14. Yang, C. C.; Lee, M. R.; Hsu, S. L.; Chang, C. M. J.; Supercritical fluids extraction of capillarisin from *Artemisia capillaris* and its inhibition of *in vitro* growth of hepatoma cells, *J. of Supercritical Fluids*, 42, 96-103, 2007.
15. del Valle, J.M., *et al.* Extraction of boldo (*Peumus boldus* M.) leaves with supercritical CO₂ and hot pressurized water, *Food Research International*, 38, 203-213, 2005.
16. Sovová, H., *et al.*, Supercritical fluids extraction of lignans and cinnamic acid from *Schisandra chinensis*, *J. of Supercritical Fluids*, 42, 88-95, 2007.
17. López, S., Iglesias, E., Diseño de un equipo de laboratorio para extracción supercrítica, *IX Congreso Colombiano de Química*, Santa Marta, 1994.
18. Revechon, E., Porta, D.G., Supercritical CO₂ extraction and fractionation of lavender essential oil and waxes, *J. Agric. Food Chem.*, 43, 1654-1658, 1995.
19. http://www.ics.trieste.it/MAPs/EssentialOils_CompoundsList.aspx (visitada noviembre 2008)
20. Yepes, B., Rivera, A., López, S., Extracción de aceite esencial de limoncillo (*cymbopogon citratos*) con dióxido de carbono supercrítico, *XXI Congreso Colombiano de Ingeniería Química*, Santa fe de Bogotá, Agosto 15 a 17 de 2001.
21. Khajeh, M., *et al.* Comparison of essential oils compositions of *Nepeeta persica* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and steam distillation methods, *Food Bioprod Process* (2009), oi:10.1016/j.fbp.2008.11.003.
22. Braverman, J.B.S., *Introducción a la bioquímica de los alimentos*, 3ª edición, Ediciones Omega, Barcelona, 274-291, 1980