

DETERMINACIÓN DE CONSTITUYENTES VOLÁTILES DE LA ALBAHACA (*Ocimum spp*) MEDIANTE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

Murillo Perea Elizabeth*; Viña Patiño Amparo*

Recibido: Junio 18/98 - Aprobado: Abril 12/99

Keywords: *Ocimum americanum*, *O. basilicum*, *O. minimum*, Lamiaceae, essential oil, hydrodistillation, supercritical fluid, terpenes, chemotypes.

RESUMEN

Se estudió la influencia de dos métodos de extracción: HIDRODESTILACIÓN (HD) Y FLUIDO SUPERCRÍTICO (EFS), en la composición química del aceite esencial de tres especies de albahaca: *Ocimum americanum*, *O. basilicum* y *O. minimum*. Los extractos fueron analizados por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG/EM). Al analizar comparativamente los constituyentes presentes, se encuentran diferencias cualitativas y cuantitativas. Los extractos supercríticos contienen compuestos de alto peso molecular, entre ellos ésteres de linalol, presentes sólo en *O. basilicum* y *O. minimum*. En estas especies el contenido de linalol en sus hidroddestilados es mayor que en los extractos supercríticos, indicando posible hidrólisis de los ésteres en el proceso de HD. Para las tres especies se definió como quimiotipo "Cinamato de metilo", por ser el compuesto más abundante en todos los extractos. En *O. basilicum* y *O. minimum* se determinó

además el subtipo "Cinamato de metilo > linalol", el cual no ha sido reportado en extractos de otros orígenes.

ABSTRACT

The influence of isolation methods on the chemical composition of the mixtures of volatiles in three species of *Ocimum* (*O. americanum*, *O. basilicum*, y *O. minimum*) was studied by comparing the extracts obtained by HYDRODISTILLATION (HD) and SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION (SFE).

The hydrodistilled oils and the supercritical CO₂ extracts were analysed by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). Their composition revealed qualitative and quantitative differences. SFE extracts showed the presence of high molecular weight compounds. *O. basilicum* and *O. minimum* contained linalyl esters. The linalool content of HD oils was found higher than that of SFE extracts (which showed linalyl esters), indicating that a degradation of the latter compounds, during HD, may have occurred. The chemotype defined for all the three species was the "methyl cinnamate" because it was the most abundant

* Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima, Barrio Sta. Elena, Ibagué, Tolima. Tel. 644219 ext. 138, Fax (0982) 644869. E-mail: ut@utolima.ut.edu.co

constituent in each mixture of volatiles. Methyl cinnamate compound prevailed in *O. americanum* while "methyl cinnamate > linalol" subtype, was established for both species *O. basilicum* and *O. minimum*. This subtype has not been previously reported in extracts of other origins.

INTRODUCCIÓN

La albahaca pertenece a la familia Lamiaceae, cuyas especies se caracterizan por su riqueza en aceites esenciales, grupo diverso de productos naturales volátiles utilizados como saborizantes en alimentos y bebidas, y como fragancias en productos farmacéuticos e industriales (1). Muchas especies de albahaca (*Ocimum* spp) han sido cultivadas con fines medicinales, culinarios, como agentes controladores de moscas y murciélagos y como atrayentes de abeja.

En el género *Ocimum* se han realizado numerosas investigaciones en aspectos tales como el químico, fisiológico, agronómico, económico, taxonómico, farmacológico, y de actividad biológica (2). Albahacas de diferentes orígenes y especies han sido objeto de estudios sobre aislamiento y determinación de la composición de sus volátiles, aplicando diferentes métodos de extracción y de identificación de sus constituyentes. Sin embargo, la extracción por fluido supercrítico ha sido de relativa reciente aplicación en matrices herbáceas y existen pocos estudios comparativos sobre HD y EFS como métodos de aislamiento de volátiles de *Ocimum* para determinación de su calidad. Se conocen trabajos de la composición química de aceites obtenidos por destilación al vapor, realizados

por CG Fleisher (3), Bonnardeaux (4), Lawrence (5) (6); de aceites esenciales obtenidos por HD Simon y otros (2); de extractos vegetales en éter etílico Grayer (7), y de extractos de CO₂ supercrítico Reverchon, 1994 (6). Algunos investigadores, tales como Charles y Simon (1), compararon la influencia de la extracción por solventes, de la hidrodestilación y de la destilación al vapor, sobre el rendimiento y composición del aceite esencial obtenido de varias especies de albahaca. En cuanto a estudios comparativos de HD y EFS, se conocen los realizados por Lachowickz y otros (8,9), quienes utilizando CG y CG/EM, caracterizaron los volátiles obtenidos por HD y CO₂ supercrítico, de cinco variedades de albahaca australiana (*Ocimum basilicum* L.): "Anise, Cinnamon, Dark Opal, Bush y Reunion".

En el presente trabajo, se comparó la composición de los volátiles obtenidos por los métodos de HD y EFS de tres especies de *Ocimum*. Teniendo en cuenta el contenido de volátiles se halló el quimiotipo para estas especies aplicando el sistema de clasificación propuesto por Grayer (7), el cual se basa en la combinación de los mayores componentes en lugar de uno sólo dominante y definiendo como mayoritario un contenido cercano al 20%.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal. *Ocimum basilicum*, *O. americanum* y *O. minimum* fue el material vegetal utilizado en este estudio como fuente de aceite esencial. Las plantas se cultivaron, utilizando como abono humus de lombriz, en una granja experimental de la Universidad del Tolima, ubicada a 1150 m.s.n.m., tempera-

tura promedio de 27°C, humedad relativa del 85%, precipitación pluvial de 1800 mm. Se recolectaron manualmente en floración, estado de mayor contenido de aceite esencial (3,4), y se secaron durante una semana (30 - 40°C).

Extracción de Volátiles. Se aplicaron dos métodos de extracción: el de hidrodestilación y el de fluidos supercríticos. 20g de muestra seca (hojas, flores y ramillas) se destilaron con agua (1:20) durante una hora utilizando el equipo de destilación circulatoria de Clevenger, modificado por la nueva farmacopea europea (10). Al finalizar el proceso se midió el volumen del aceite obtenido y se procedió a su deshidratación con Na₂SO₄. Los extractos de fluido supercrítico se obtuvieron a partir de muestras secas entre 4-10 g, con un equipo no comercial; CO₂ fue el fluido extractor y se utilizó un restrictor de 10 µm d.i. y 5 cm de longitud, un rango de temperaturas entre 45-47°C, presiones que oscilaron entre 1400-1500 psi y un tiempo de extracción de dos horas (11,12,13).

Análisis de CG/EM. La composición de los aceites y la cantidad de cada compuesto se verificó a través de un análisis de CG/EM con un CG Hewlett Packard (HP) 5890A Series II en interfase con un detector selectivo de masas HP 5972, conectado en línea a una base de datos NBS75K y Wiley 138 para la identificación espectrométrica de masas de los componentes CG. Se utilizó una columna capilar de sílice fundida DB-1 (J & W Scientific), (30m x 0.25mm d.i.) provista de una fase estacionaria de espesor 0.25µm, compuesta por 5% fenil-polidimetilsiloxano. Las condiciones del He, utilizado como gas de arrastre, fueron:

presión 78kPa, velocidad lineal 20 cm/min y split 1:30. La temperatura del puerto de inyección split/splitless 250°C, línea de transferencia 285°C, cámara de ionización 180°C, volumen de muestra de inyección 1 µl (solución al 20% en CH₂Cl₂). La temperatura del horno se programó a 50°C (5 min), incrementos de 4.5°C /min finalmente se mantuvo a 250°C (10 min). La energía de los electrones ionizantes fue de 70 eV, los espectros de masas fueron obtenidos por barrido automático dentro de un rango de masas m/z de 30 a 300. Los datos cuantitativos fueron suministrados por autointegración del equipo. Los compuestos fueron identificados por comparación de los espectros de masas de cada componente resultante en la CG/EM con los estándares de las bases de datos y con datos reportados en la literatura (14). Se usó como estándar interno el tetradecano.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La composición química de los aceites esenciales de *Ocimum americanum*, *O. basilicum* y *O. minimum*, está dada en la Tabla 1; en ella figuran 62 constituyentes, detectados en las tres especies, dos de los cuales no fue posible identificar, al menos parcialmente. Al agrupárseles por tipo de compuesto se evidencian como: monoterpenos (37.1%), sesquiterpenos (43.5%), fenilpropanoides (8.1%), compuestos de alto peso molecular (8.1%, conformados por hidrocarburos, ésteres y un compuesto nitrogenado); sin identificar, dos compuestos que corresponden al 3.2%.

Se observa que los aceites hidrodestilados de las tres especies poseen más variedad de hidrocarburos terpénicos que

terpenos oxigenados y que fenilpropa-
noides.

Ocimum minimum es la especie con la
mayor variedad de componentes siendo
notorio en sus hidrodestilados, la presen-

Tabla 1. Composición química de volátiles de tres especies de *Ocimum* cultivadas en Ibagué y obtenidos por hidrodestilación (HD) y fluidos supercríticos (EFS).

Compuesto	T _r	<i>O. americanum</i>		<i>O. basilicum</i>		<i>O. minimum</i>	
		HD %	EFS %	HD %	EFS %	HD %	EFS %
α -pineno	7.7	---	---	---	---	0.24	---
β -pineno	9.4	---	---	---	---	0.32	---
β -mirreno	10.1	---	---	---	---	0.19	---
p-cimeno	11.4	---	---	---	---	0.40	---
1,8-cineol *	11.5	0.96	0.52	3.71	1.85	2.20	---
Trans-ocimeno *	12.4	1.07	---	0.24	---	0.85	---
γ -terpino	12.6	---	---	---	---	0.30	---
Hidrato de sabineno	13.1	---	---	0.29	0.39	0.37	---
Fenchona	13.7	0.29	0.40	---	---	---	---
Linalol *	14.6	1.71	1.73	16.95	14.52	22.04	17.5
p-menta-2,5-dien-7-ol	15.9	0.15	---	---	---	0.20	---
4-terpineol *	17.2	---	---	1.99	1.04	3.09	3.28
α -terpineol	17.7	0.31	0.31	0.90	0.50	0.27	---
Metil chavicol *	17.9	3.81	4.65	0.51	0.72	1.77	1.26
Hidrocarburo(M+152)	22.0	---	---	---	---	0.15	---
Acetato de exo-2-hidroxicineol	22.5	---	---	0.17	---	---	---
Cinamato de metilo *	24.3	84.90	76.95	62.70	56.67	43.18	49.79
β -cariofileno *	25.0	0.99	0.79	---	---	0.34	---
Ester (M+204)	25.0	---	---	0.34	---	---	---
Zingibereno *	25.4	0.34	0.58	1.28	0.63	0.27	---
α -guaieno	25.5	---	---	---	---	0.43	0.38
α -humuleno *	25.9	0.93	---	0.42	---	1.22	1.06
Trans- β -farneseno *	26.0	---	1.10	---	---	---	---
β -guaieno	26.2	---	---	---	0.57	---	---
Epibiciclo sesquifelandreno	26.3	---	---	0.21	---	0.28	---
β -cubebeno *	26.8	0.60	0.40	0.44	0.50	1.22	0.92
Germaçreno -B *	27.2	0.40	---	0.24	---	1.15	0.66
δ -guaieno *	27.5	0.42	---	0.40	0.36	1.25	1.25
γ -cadineno *	27.8	0.16	0.24	1.48	1.37	2.33	3.38
Amorfano	28.0	---	---	0.16	---	0.26	---

Continuación Tabla 1

Compuesto	T _r	<i>O. americanum</i>		<i>O. basilicum</i>		<i>O. minimum</i>	
		HD %	EFS %	HD %	EFS %	HD %	EFS %
Hidrocarburo (M ⁺ 204)	28.5	1.71	1.35	0.31	---	---	---
Nerolidol	29.1	---	---	---	---	0.57	0.56
Espatulanol	29.6	---	---	---	---	0.64	0.78
Oxido de cariofileno *	29.7	0.38	1.00	---	---	---	---
Epiglobulol	29.9	---	---	---	---	0.60	---
No identificado	30.4	---	0.32	---	---	0.23	0.45
Copaeno *	30.6	---	---	0.78	0.42	1.32	0.93
δ-cadineno *	31.3	0.63	0.30	5.04	3.04	8.32	5.05
Jazmonato de metilo	31.4	---	0.30	---	---	---	---
β-eudesmol	31.6	---	---	---	---	0.90	0.60
Hidrocarburo tipo decalina	31.7	---	---	0.47	---	0.62	---
Cetona tipo tuyopsano	31.8	---	---	---	---	0.59	---
No identificado	32.5	---	---	---	1.01	---	---
Cis-farnesol	33.2	---	---	---	---	0.50	---
Acetato de geranilo	36.1	---	---	---	---	0.65	0.91
11-dodecen-2-ona	36.2	---	0.26	---	---	---	---
Cetona	36.3	---	---	---	---	0.22	0.49
Palmitato de metilo	38.1	---	0.24	---	---	---	---
C ₁₆ H ₂₃ O ₄	38.9	---	---	---	---	---	0.46
Hidrocarburo	39.9	0.24	0.38	0.34	---	0.31	---
Hidrocarburo	40.4	---	---	0.33	---	0.21	---
Linoleato de metilo	41.9	---	0.43	---	---	---	---
Ester de linalol	42.1	---	---	---	0.57	---	0.54
Ester de linalol	42.3	---	---	---	1.22	---	1.10
Ester de linalol	42.8	---	---	---	1.09	---	0.84
Ester de linalol	43.3	---	---	---	1.23	---	0.79
Neofitadieno	44.3	---	---	---	0.34	---	0.68
Ester de ácido cinámico	46.4	---	4.08	0.30	3.53	---	1.76
Ester de ácido cinámico	46.7	---	2.97	---	3.16	---	1.19
Ester de ácido cinámico	47.0	---	0.70	---	0.75	---	---
Compuesto nitrogenado	50.6	---	---	---	0.63	---	---
Tetracosahexaeno	58.1	---	---	---	3.89	---	3.39
N° Total: 62		19	23	25	25	39	27

* Compuestos mayoritarios (con contenido mínimo del 1%, al menos en una de las especies).

cia de los monoterpenos α -pineno, β -mi-rceno, β -pineno, p-cimeno, γ -terpineno, el sesquiterpeno δ -guaiano y los sesquiterpenos oxigenados farnesol, espatulenol, nerolidol, epiglobulol, eudesmol, y dos cetonas. Los anteriores constituyentes, sugieren la búsqueda de diferentes clases de actividad biológica en esta especie, debido a las funciones de importancia ecológica atribuidas como atrayentes de insectos, alelopáticos y feromonas, así como también funciones de aplicación farmacológica (5), (15).

Los extractos con CO₂ supercrítico de nuevo muestran a *O. minimum* como la especie que presenta diferencias notables, observándose en ella la mayor variedad de terpenos oxigenados, y la menor de fenilpropanoides.

Si se contrastan los resultados que arrojaron los aceites extraídos por los dos métodos, se observan diferencias importantes. Presencia en los extractos supercríticos de compuestos de alto peso molecular, de ésteres del ácido cinámico y mayor proporción de terpenos volátiles en los hidrodestilados, aunque se esperaba mayor presencia de éstos en los extractos de fluido supercrítico puesto que se trabaja a bajas temperaturas. Podría haber contribuido a la pérdida de los volátiles el hecho de haber introducido el vial de recolección en un beaker con agua a temperatura media, con el propósito de eliminar el taponamiento intermitente de la salida del restrictor, provocado por el efecto de expansión del CO₂ al emerger a una temperatura por debajo de los 0°C.

Los mayores componentes encontrados fueron cinamato de metilo y linalol. Se puede observar que en *O. basilicum* y

en *O. minimum* los hidrodestilados muestran mayor contenido en linalol que los extractos de CO₂ supercrítico. En estas especies los ésteres de linalol, presentes únicamente en los extractos de fluido supercrítico, posiblemente sufrieron hidrólisis por las características propias del método HD, afirmación que adquiere mayor validez al realizar el análisis en *O. americanum*; allí no hay presencia de ésteres de linalol y el contenido de linalol en los volátiles obtenidos por ambos métodos es el mismo.

Para un análisis más específico de los resultados, que tenga en cuenta no sólo los contenidos de los constituyentes mayoritarios como tal sino también como pertenecientes a una familia de compuestos, se elaboraron las figuras 1 y 2.

En cada una de las especies el perfil de composición del extracto, en cuanto al tipo de compuesto, no cambió por el método de extracción excepto por la presencia en el extracto de fluido supercrítico de compuestos de alto peso molecular.

En todos los aceites, la clase de compuesto más abundante corresponde a la vía biogenética de los fenilpropanoides, representada por cinamato de metilo, metil chavicol y ésteres de ácido cinámico. Le siguen en orden de abundancia los terpenos oxigenados (de ellos el compuesto más abundante es el linalol) y los hidrocarburos terpénicos (fundamentalmente sesquiterpenos); esta relación en *O. americanum* es inversa, en tanto contiene menos terpenos oxigenados, con poca abundancia de linalol.

En los extractos de CO₂ supercrítico son menos abundantes los hidrocarburos terpénicos (ausencia de monoterpenos)

que en los aceites hidrodestilados y, a diferencia de estos últimos contienen compuestos de alto peso molecular, de conformidad con los resultados de La-

chowickz en variedades de *O.basilicum* (8,9). Sin embargo, Hawthorne y otros (16), en estudio comparativo de extracción de aceites por HD y EFS de tres

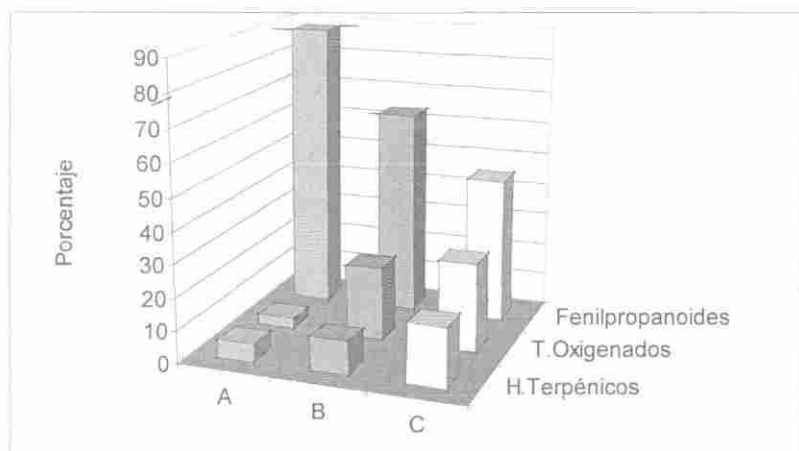


Figura 1. Distribución cuantitativa, por tipo de compuesto, de los constituyentes mayoritarios del aceite esencial obtenido por hidrodestilación de *O. americanum* (A), *O. basilicum* (B), *O. minimum* (C).

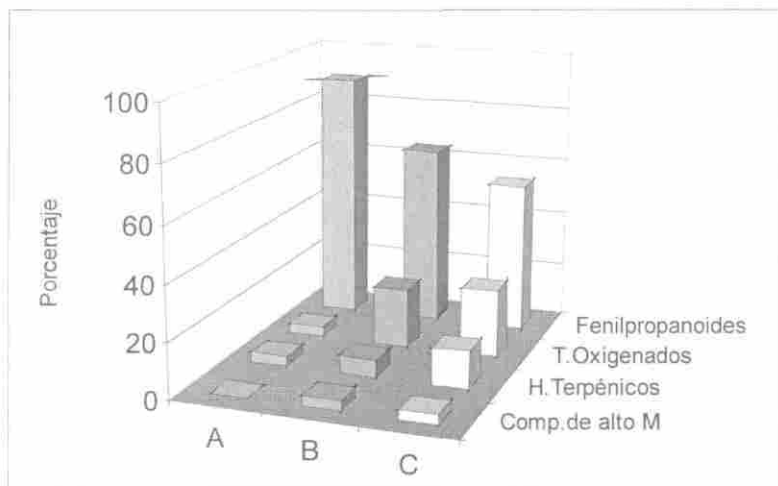


Figura 2. Distribución cuantitativa, por tipo de compuesto, de los constituyentes mayoritarios de los extractos de fluido supercrítico de *O. americanum* (A), *O. basilicum* (B), *O. minimum* (C).

plantas aromáticas (*Satureja hortensis* L., *Dracocephalum moldavica* L., *Mentha piperita* L.) concluyen que componentes volátiles, como monoterpenos, pueden recuperarse cuantitativamente por EFS al coleccionar el extracto sobre cloruro de metileno y el método así aplicado, resulta comparable cuantitativamente al hidrodestilado. En nuestro trabajo, la pobre recuperación de los volátiles puede deberse a baja eficiencia de la recolección y no a una baja extracción, en razón de que el extracto se recibió directamente sobre el vial sin solvente orgánico.

Un análisis comparativo de los dos métodos de extracción, permite hacer algunas anotaciones interesantes:

La hidrodestilación parece ser un buen método para extraer el aceite esencial de albahaca debido a su buen rendimiento (1.2 %), se requiere de menor cantidad de operaciones y de parámetros para controlar que en la extracción por fluido supercrítico. En este estudio se observó que tiempos de 30 a 60 minutos eran suficientes para el agotamiento de la matriz herbácea, lo cual concuerda bastante bien con los conocimientos que se tienen acerca de las Lamiáceas; en estas plantas el aceite está atrapado en pelos glandulares o tricomas, depósitos que estallan por ruptura de la cutícula liberando el aceite el cual a su vez se volatiliza casi inmediatamente. El estudio reveló que tanto en HD como en EFS, la velocidad inicial de extracción fue alta hasta los 15 minutos; después de este tiempo no se observaron cambios apreciables en los volúmenes de aceite extraído a intervalos de tiempo de 15 minutos cada vez (Datos no mostrados). Lo anterior es coincidente con los experimentos de Ernesto Reverchon (12),

quien afirma que la velocidad de extracción inicial de los aceites esenciales es alta pero tiende a cero en la medida en que la concentración del soluto decrece. La extracción de los volátiles utilizando EFS se realizó en una sola etapa, observándose un extracto de color amarillo más intenso y de mayor viscosidad que los hidrodestilados, característico de la coextracción de parafinas y ceras cuticulares.

Quimiotipos

Adoptando el criterio de Grayer (7), las tres especies mostraron el mismo quimiotipo Cinamato de metilo. El contenido significativamente alto de este compuesto en *O. americanum* obliga a que no aparezca un subtipo. No obstante, la presencia de linalol como segundo compuesto mayoritario en *O. basilicum* y *O. minimum*, define un subtipo para estas especies: Cinamato de metilo linalol, aunque en *O. minimum* se observan menores contenidos relativos de cinamato de metilo. Es importante anotar que el subtipo reportado no se ha encontrado en la literatura que hace referencia a *O. basilicum* (5, 6, 7, 17). La composición y el subtipo de *O. basilicum* y de *O. minimum* podrían sugerir que se trata de variedades de la misma especie. Sin embargo, por su diferente perfil químico en flavonoides de superficie, Grayer (18) sustenta que deben ser consideradas especies independientes.

AGRADECIMIENTOS

Damos gracias a la Licenciada Carmen Elisa Velásquez por facilitar el material vegetal, a la Dra. Elena Stashenko por el soporte técnico. El soporte finan-

ciero aportado por el Comité Central de Investigaciones de la Universidad del Tolima es altamente apreciado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Charles, D.J.; Simon, J.E. Comparison of Extraction Methods for the Rapid Determination of Essential Oil Content and Composition of Basil. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **1990**, 115 (3), 458-462.
2. CAB. Abstracts. Medicinal, Essential oil, culinary, herb and pesticidal plants of the Labiatae. Part. I. CAB International. Edit. D.J. Cousins Walling Ford. Oxon Oxio 8 DE UK. **1973-1993**, 167-200.
3. Fleisher, A. Essential Oils from Two Varieties of *Ocimum basilicum* L. Grown in Israel. *J. Sci. Food Agric.* **1981**, 32, 1119-1122.
4. Bonnardeaux, J. The effect of Different Harvesting Methods on the Yield and Quality of Basil Oil in the Ord River Irrigation Area. *J. Ess. Oil Res.* **1992**, 4, 65-69.
5. Lawrence, B.M. A further Examination of the Variation of *Ocimum basilicum* L. Flavors and fragrances: A World Perspective. Proceedings of the 10th International Congress of Essential Oils, Fragrances and Flavors, Washington, DC, U.S.A. 1986. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam. **1988**, 161-169.
6. Lawrence, B.M. Progress in Essential Oils. *Perfum. Flavor.* **1995**, 20, 35-37.
7. Grayer, R.J.; Kite, G.C.; Goldstone, F.J.; Bryan, S.E.; Paton, A.; Putievsky, E. Infraspecific Taxonomy and Essential Oil Chemotypes in Sweet Basil, *Ocimum basilicum*. *Phytochemistry.* **1996**, 43, 1033-1039.
8. Lachowicz, K.J.; Jones, G.P.; Briggs, D.R.; Bienvenu, F.E.; Palmer, M.V.; Ting, S.S.; Hunter, M. Characteristics of Essential Oil from Basil (*Ocimum basilicum* L.) Grown in Australia. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 877-881.
9. Lachowicz, K.J.; Jones, G.P.; Briggs, D.R.; Bienvenu, F.E.; Palmer, M.V.; Mishra, V.; Hunter, M. Characteristics of Plants and Plant Extracts from Five Varieties of Basil (*Ocimum basilicum* L.) Grown in Australia. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 2660-2665.
10. *European Pharmacopoeia*, 2nd ed. Maisonneuve S. A. Sainte Ruffin France. **1980**.
11. Reverchon, E.; Della Porta, G.; Senatore, F. Supercritical CO₂ Extraction and fractionation of Lavender Essential Oil and Waxes. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, 43, 1654-1658.
12. Reverchon, E.; Donsi, G.; Osseo, L.S. Modeling of Supercritical Fluid Extraction from Herbaceous Matrices. *Ind. Eng. Chem. Res.* **1993**, 32, 2721-2726.
13. Gere, D.R.; Derrico, E.M., Hydrodistillation and Supercritical Fluid Extraction for the Determination of Essential Oils in Aromatic Plants. **1994**, 12(5), 352-366.

14. Ramaswami, S.K.; Briscese, P.; Gargiullo, R.J.; and van Geldern, T. in: Lawrence, B.M.; Mookherjee, B.I.; and Willis, B.J. (Editors). *Flavors and Fragrances: A World Perspective*, Proceedings of the 10th International Congress on Essential Oils. *Flavors and Fragrances*, Washington, DC. **1986**, Elsevier, Amsterdam, **1988**, 51.
15. Mann, J.; *Secondary Metabolism*. Oxford Chemical Series General Editors. Oxford, **1978**.
16. Hawthorne, S.B.; Riekkola, M.L.; Serenius, K.; Holm, Y.; Hiltunen, R.; Hartonen, K. *J. Chromatogr.* **1993**, 634, 297-308.
17. Simon, J.E. *Essential Oils and Culinary Herbs. Advances in new crops*. J. Janick and J.E. Simon (eds), Timber Press, Portland, OR. **1990**, 472-483.
18. Grayer, R.J.; Bryan, S.E.; Veitch, N.C.; Goldstone, F.J.; Paton, A.; Wollenweber, E. *External Flavones in Sweet Basil, *Ocimum basilicum*, and Related Taxa. Phytochemistry.* **1996**, 43 (5), 1041-1047.