

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA



Composición química, fraccionamiento y actividad *in vitro* del aceite esencial de *Aloysia citriodora* Palau (“Cedrón”) sobre las bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*

Donny David Rudas Gonzales

Tesis para obtener el título de Licenciado en Química

Lima-Perú

2017

Asesora

Rosario Elena Rojas Durán MD, PhD

Miembros del jurado

M.Sc. LILY CHANG FANG - Presidenta

Ing. GILMA FERNANDEZ ZÚÑIGA - Vocal

M.Sc. CAROLINA PONCE DE LEÓN - Secretaria

Dedicatoria

A mis padres quienes siempre me han acompañado e indirectamente han creado este trabajo. Es para ustedes y es fruto de su esfuerzo de tantos años.

A mis hermanos para animarlos a que en el camino que escojan, siempre investiguen y aprendan de sus errores y aciertos.

Agradecimientos

A la Dra. Rosario Rojas por su paciencia en la corrección de la tesis, por compartir vastos conocimientos conmigo y por darme la oportunidad de aprender de su trabajo en el laboratorio.

Al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú) del Ministerio de la Producción por su apoyo en el cofinanciamiento de la presente tesis, ejecutada en el marco del Convenio N° 249-FINCYT-FIDECOM-PIPEI-2014.

A mis padres, por todo. Su apoyo siempre será invaluable.

CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN.....	12
II.	MARCO TEÓRICO.....	14
2.1	Generalidades sobre aceites esenciales.....	14
2.1.1	Aplicaciones de los aceites esenciales en la industria:.....	14
2.1.2	Composición química de los aceites esenciales.....	15
2.1.3	Parámetros que influyen en la composición:.....	15
2.2	Características de <i>Aloysia citriodora</i> (Cedrón).....	16
2.2.1	Características botánicas.....	17
2.2.2	Usos del cedrón.....	18
2.2.3	Actividades biológicas.....	18
2.2.4	Información sobre los principales compuestos en el aceite esencial de <i>Aloysia citriodora</i> (Cedrón).....	19
2.2.5	Métodos cromatográficos para el estudio de aceites esenciales.....	20
2.3	Índice de retención aritmético (IA) usos y ejemplos.....	21
III.	OBJETIVOS.....	22
3.1	General.....	22
3.2	Específicos.....	22
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
4.1	Material vegetal y tratamiento de la muestra.....	23
4.2	Obtención del aceite esencial de <i>Aloysia citriodora</i> Palau.....	23
4.3	Propiedades fisicoquímicas del aceite esencial de cedrón.....	23
4.4	Composición química del aceite esencial (GC-MS).....	25
4.5	Evaluación de actividad antibacteriana.....	26
4.6	Fraccionamiento del aceite esencial.....	28
V.	RESULTADOS.....	30
5.1	Obtención de aceite esencial y características fisicoquímicas.....	30
5.2	Composición química del aceite esencial de <i>Aloysia citriodora</i> Palau.....	31

5.3	Composición química de las fracciones del aceite esencial de cedrón	34
5.3.1	Fracción AE1	35
5.3.2	Fracción AE2	35
5.3.3	Fracción AE3	36
5.4	Actividad antimicrobiana del aceite esencial del cedrón y fracciones	38
VI.	DISCUSIÓN	40
VII.	CONCLUSIONES	43
VIII.	RECOMENDACIONES	44
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
X.	ANEXOS	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribución de las muestras en la microplaca de 96 pozos	27
Figura 2: Cromatograma de gases del aceite esencial de Cedrón (<i>Aloysia citrodora</i>)	31
Figura 3: Cromatogramas de gases de: Fracción AE1 (3-a), Fracción AE2 (3-b), y Fracción AE3 (3-c)	34
Figura 4: Espectros de masas de 4-a) α -Citral y del 4-b) β -Citral.....	36

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Detectores acoplados a la cromatografía de gases que son usados más comúnmente con aceites esenciales	20
Tabla 2: Sistemas de elución y volúmenes utilizados para la cromatografía de columna.....	29
Tabla 3: Mediciones de índice refracción del aceite esencial de cedrón.....	30
Tabla 4: Composición química de compuestos volátiles del aceite esencial del cedrón	32
Tabla 5: Composición química de compuestos volátiles de la fracción AE1	35
Tabla 6: Composición química de compuestos volátiles de la fracción AE2.....	36
Tabla 7: Composición química de compuestos volátiles de la fracción AE3.....	37
Tabla 8: Concentración mínima inhibitoria en % (v/v) de las muestras para <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella typhimurium</i>	38
Tabla 9: Actividad bactericida contra <i>E. coli</i> y <i>S. typhimurium</i> del aceite esencial de cedrón, sus fracciones y estándares.	39

ABREVIATURAS

% : Porcentaje

λ : Longitud de onda

°C : Grados Celsius

cm : Centímetros

etc. : Etcétera

g : Gramos

GC-MS : Gas Chromatography-mass spectrometry (Cromatografía de Gases-Espectrometría de masas)

HPLC : High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de Alta Eficacia)

msnm : Metros sobre el nivel del mar

mg : Miligramos

min : Minutos

MIC : Concentración mínima inhibitoria

mL : Mililitros

mm : Milímetros

N_D : Índice de refracción

pH : Potencial de Hidrógeno

R_F : Factor de retención

t_R : Tiempo de retención

UFC : Unidades Formadoras de Colonias

μg : Microgramos

μL : Microlitros

μm : Micrómetros

RESUMEN

Los aceites esenciales son sustancias obtenidas de productos naturales que han creado interés por las distintas aplicaciones que se les puede dar en medicina, industria farmacéutica, cosmética y alimentaria. La especie *Aloysia citriodora* Palau (Cedrón) es una planta ampliamente cultivada en el Perú, es consumida habitualmente en infusiones, y su aceite esencial es de agradable aroma cítrico y penetrante.

El objetivo del presente trabajo fue conocer la composición química del aceite esencial de *Aloysia citriodora* Palau de la región de Huarochiri, Lima, Lima y realizar un fraccionamiento biodirigido con el fin de conocer la actividad *in vitro* del aceite esencial y sus fracciones contra *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*.

La composición del aceite esencial fue determinada por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, los compuestos mayoritarios presentes fueron: α -Citral (22.13%), 9,10-dehidro-isolongifoleno (15.46%), β -Citral (14.06%) y limoneno (10.28%). Para la identificación de los compuestos se realizó una comparación entre los espectros de masas obtenidos con los presentes en las bibliotecas del cromatógrafo. También se calcularon los índices aritméticos de retención y se los compararon con los de la biblioteca de espectros de masas de Adams.

El aceite esencial de *Aloysia citriodora* mostró actividad antibacteriana *in vitro*, la concentración mínima inhibitoria tanto para *Escherichia coli* como para *Salmonella typhimurium* fue 1.6%.

Por medio de cromatografía de columna en fase normal se logró fraccionar al aceite esencial en 3 fracciones claramente diferenciadas: AE1, AE2 y AE3. La fracción con mejor actividad antibacteriana fue la AE2, la cual presentó un MIC de 1.6% contra las bacterias *E. coli* y *S. typhimurium*.

El compuesto mayoritario en la fracción AE2 fue el citral, el cual es el principal responsable de la actividad antibacteriana encontrada en el aceite esencial de *Aloysia citriodora*.

Con el presente estudio se contribuye con la caracterización del aceite esencial de *Aloysia citriodora* Palau proveniente de Huarochiri, Lima, Lima, Perú y con la identificación de su principal compuesto activo contra *Escherichia coli* y para *Salmonella typhimurium*.

ABSTRACT

Essential oils are substances obtained from natural products that have created interest in different applications that can be given in medicine, pharmaceuticals, cosmetics and food. The species *Aloysia citriodora* Palau (Cedrón) is a plant widely cultivated in Peru, it is usually consumed in infusions and its essential oil has a pleasant citrus and penetrating aroma.

The objective of the present work was to determine the chemical composition of the essential oil of *Aloysia citriodora* Palau of the region of Huarochiri, Lima, Lima and to carry out a bioassay-guided fractionation in order to know the *in vitro* activity of the essential oil and its fractions against the bacteria *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*.

The composition of the essential oil was determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry, the major compounds present were α -Citral (22.13%), 9,10-dehydro-isolongifolene (15.46%), β -Citral (14.06%) and limonene (10.28%). For the identification of the compounds a comparison was made between mass spectra obtained with those present in the chromatograph libraries. Arithmetic retention indexes were also calculated and compared with those of the Adams mass spectra library.

The essential oil of *Aloysia citriodora* showed good antibacterial activity *in vitro*, the minimum inhibitory concentration (MIC) for both *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* was 1.6%.

By means of normal phase column chromatography, the essential oil was divided into 3 distinct fractions: AE1, AE2 and AE3. The fraction with the best antibacterial activity was AE2, which presented a MIC of 1.6% against *E. coli* and *S. typhimurium*.

The major compound in the AE2 fraction was citral, which is mainly responsible for the antibacterial activity found in the essential oil of *Aloysia citriodora*.

The present study contributes with the characterization of the essential oil of *Aloysia citriodora* Palau from Huarochiri, Peru and with the identification of its main active compound against *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*.

I.INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales tienen un amplio espectro de aplicaciones, y su uso se ha ido incrementando en los últimos años. El potencial de muchas plantas nativas al ser poco estudiadas es desconocido, sobre todo debido a la existencia de quimiotipos. El cedrón (*Aloysia citriodora*) es encontrado en abundancia en el Perú, por lo que es importante conocer en envergadura los usos que pueda tener su aceite esencial.

El rendimiento del aceite esencial es variable dependiendo de la localidad de origen del cultivo y de las condiciones de siembra y cosecha, como demostró Di Lero Lira, 2001, en un estudio de la composición de hojas de plantas de cedrón de 23 áreas distintas de Argentina ¹. Se busca determinar las propiedades del aceite esencial y la concentración de sus constituyentes principales. La existencia de un componente biológicamente activo en alta concentración (>75%) puede ser aprovechable. Estudios previos a la composición química del aceite esencia de cedrón muestran al citral como su principal constituyente, en menor proporción se encuentran también presentes geranial y neral, entre otros dependiendo del lugar del cultivo. ²

Muchos microorganismos, exhiben resistencia a las drogas causado por un uso inadecuado de los antibióticos, etc. Es por esto que existe necesidad del descubrimiento de sustancias alternativas a partir de fuentes naturales, incluyendo los aceites esenciales de las plantas.

El cedrón es usado comúnmente como antiséptico, antiespasmódico, carminativo, detoxificante, digestivo, hepatobiliario, estimulante, sedativo y estomático. Sin embargo, solo se han demostrado algunas de estas aplicaciones.

Las investigaciones biológicas son escasas, y a pesar de su difusión, el uso principal que se le da al aceite esencial del cedrón es de aromatizante o para la preparación de infusiones. Algunos de los estudios biológicos previos muestran actividad antimicrobiana ante *E. coli*, *M. tuberculosis*, y *S. aureus*. ³

En 2011, en un estudio realizado por F. Romero, se evaluó la actividad antimicrobiana de algunos aceites esenciales comercialmente disponibles, entre ellos, el cedrón. El mayor componente del aceite esencial de cedrón fue el geranial (41%), seguido por neral y 1,8-cineol. La actividad antimicrobiana de sus aceites esenciales se evaluó

sobre la supervivencia y el crecimiento de algunos microorganismos considerados peligrosos para el consumo humano: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua* mediante el método de difusión de disco. De esta manera, el cedrón fue clasificado extremadamente sensible para el *S. aureus*, y sensible para *E. coli* y *Listeria innocua*.⁴

Así mismo en 2004, Sartoratto, A., estudió la composición y la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de algunas plantas que se encuentran en Brasil, entre ellas, el cedrón. La composición del aceite esencial de cedrón obtenido fue abundante en geranial 21.83% y neral 17.45% y se llegaron a identificar 81.9% de los componentes. Se evaluó la actividad microbiana con el método bioautográfico. El aceite esencial fue eficaz contra *Enterococcus faecium* y *Salmonella choleraesuis* y presentó una inhibición moderada contra *Staphylococcus aureus*. El mismo estudio demuestra que el aceite esencial de cedrón también muestra actividad antifúngica, probada en la levadura *Cándida albicans*.⁵

Se conoce también que el aceite esencial de cedrón tiene actividad antiparasitaria dada por sus constituyentes: α -Tuyona, cis-carveol, carvona y limoneno.⁶ En 2008, Gillili et al. demostraron el uso del aceite esencial del cedrón como repelente contra *A. aegypti*.⁷ sin embargo, su uso se encuentra limitado por la fotosensibilidad que causa el geranial en la piel.³

Si bien se conoce la composición de algunas muestras de aceite esencial de cedrón, esta puede variar dependiendo de muchos factores entre los cuales destaca el lugar de cosecha, precipitaciones, cuidados, biomasa disponible, tiempo de cosecha y siembra, etc.

Se busca conocer la composición del aceite esencial del cedrón local (*Aloysia citriodora*) y su actividad contra dos bacterias: *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. Con este estudio se podrían aprovechar sus propiedades organolépticas para distintas aplicaciones en distintas industrias, y su actividad biológica para la creación de aditivos derivados.

II.MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades sobre aceites esenciales

De acuerdo a la Farmacopea Europea, un aceite esencial es un “producto oloroso, por lo general de composición compleja, obtenido a partir de materia prima de una planta botánicamente definida mediante destilación con vapor, destilación en seco o un proceso mecánico adecuado sin calentamiento.”⁸

Los aceites esenciales son los principios volátiles, odoríferos presentes en muchas partes de las plantas, indicativo de sus propiedades físicas y químicas. Son mezclas muy complejas, de hasta 200 sustancias orgánicas diferentes, donde algunos de estos componentes son más volátiles que otros. Debido a su naturaleza hidrófoba y a su densidad (en su mayoría inferior a la del agua), por lo general son lipófilos, solubles en disolventes orgánicos e inmiscibles con agua. Luego de la destilación, los aceites esenciales son por lo general separados de la fase acuosa mediante un proceso físico. Sus rendimientos de extracción varían alrededor del 1% dependiendo de la planta.⁹ Se pueden encontrar ejemplos de rendimiento desde 0.01% en flores de jazmín hasta 4-6% en semillas de culantro o anís.¹⁰ Para el caso del cedrón, se han reportado medias de rendimientos de 0.2 a 1.7% en 11 localidades de Argentina.¹¹

Son productos que pueden ser almacenados por mucho tiempo al ser bastante estables. La composición de los aceites esenciales varía dependiendo del origen geográfico, y esto tiene efecto en su demanda y precio ya que tanto las características organolépticas como las químicas cambian.¹⁰

2.1.1 Aplicaciones de los aceites esenciales en la industria:

Los aceites esenciales tienen su mayor aplicación, sobre todo, en las industrias cosméticas, de productos de limpieza, de los alimentos y farmacéutica:

- En la industria cosmética destacan en los perfumes, lociones, cremas para la piel y desodorantes.
- En productos de limpieza son usados en productos de aseo, aromatizantes, desodorantes, jabones y shampoos.
- En la industria alimenticia los aceites esenciales son usados como saborizantes y aromatizantes de productos procesados como en la confitería, preparación de bebidas: (gasificadas, jugos y licores), galletas, panes, queques, etc. En productos crudos sirven como conservantes, este es el caso

de los lácteos y de las carnes. También son usados en los condimentos (paprika, pimienta).

- En la industria farmacéutica son utilizados en medicamentos como aromatizantes.
- En la industria tabacalera como aromatizantes y para enmascarar sabores fuertes y amargos.⁹

Aplicaciones biológicas de los aceites esenciales:

Los aceites esenciales son también comúnmente usados como: Biocidas, bactericidas, insecticidas, antihelmínticos, antiparasitarios. Otros aceites esenciales tienen actividad farmacológica que le permite actuar como antisépticos, rubefacientes, sedantes, antiinflamatorios, tranquilizantes, y euforizantes.¹⁰

2.1.2 Composición química de los aceites esenciales

Se conocen más de 3000 aceites esenciales diferentes. La composición de un aceite esencial condiciona sus propiedades fisicoquímicas. Están compuestos por metabolitos secundarios lipofílicos y altamente volátiles. Entendemos, por tanto, que la masa molar de estos compuestos será menor a 300 g/mol.⁷

Los componentes existen en distinta cantidad en el aceite y van desde las partes por billón, hasta las partes por millón. Aquellas que se hallan en mayor proporción pueden ser aprovechados al determinar sus propiedades antimicrobianas, entre otras. Así como también pueden ser aprovechados los componentes presentes a nivel de trazas, las cuales también son importantes por su contribución a las propiedades organolépticas. Los aceites esenciales se conforman principalmente por terpenos, aunque también están presentes otros metabolitos como grasas, cumarinas, antraquinonas y ciertos alcaloides, los cuales son también destilables. Existen unas pocas especies donde los componentes predominantes son principios aromáticos.⁷ La biodiversidad en el Perú puede ser una fuente importante de aislamiento de moléculas para la obtención de productos derivados.

2.1.3 Parámetros que influyen en la composición:

Existen algunos parámetros que influyen en la composición de los aceites esenciales. Los quimiotipos, por ejemplo, son las diferentes composiciones químicas de plantas pertenecientes a la misma especie y que son indistinguibles morfológicamente. Los quimiotipos en muchos casos son organolépticamente distintos. Por ejemplo, las plantas de “prontoalivio” (*Lippia alba*) muestran diferente comportamiento dependiendo

de su quimiotipo: El tipo “carvona” se puede cosechar en cualquier momento del día, el quimiotipo “citral” presenta mayor cantidad de citral y neral con hojas destiladas lo más pronto posible.¹⁰

También, el tiempo de cosecha puede afectar la composición del aceite esencial. Por ejemplo, para la *Artemisia vulgaris*, el contenido de 1,8-cineol y β -pineno varía dependiendo de la época de cosecha, estando presente en mayores cantidades después del florecimiento, lo cual determina que la mejor época para la cosecha será después de este.¹²

El lugar de origen de la planta también es un factor importante, pues las precipitaciones, hora de riego, riqueza de nutrientes de la tierra y sembrío tecnificado pueden variar las características químicas del aceite esencial. Un estudio por Di Lero lira¹ en 11 localidades de Argentina demuestra esta variabilidad para el cedrón, incluso los rendimientos son diferentes (Anexo 1).

Se debe evitar la fermentación de las plantas causada por un mal secado o almacenado en condiciones que no garanticen la conservación adecuada del producto. Por ejemplo, el “ylang-ylang” (*Cananga odorata*) se debe destilar lo más pronto posible después de su recolección o la composición se verá alterada.¹⁰

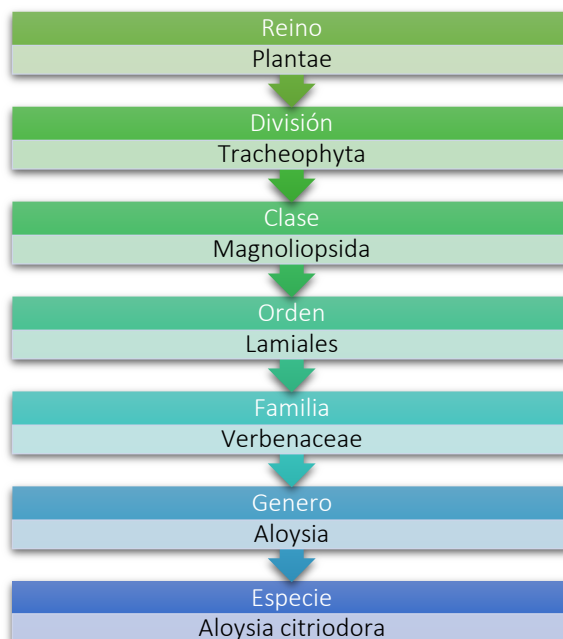
Finalmente, el tiempo de destilación, pues al inicio el agua puede extraer compuestos de mayor polaridad, de bajo peso molecular, mientras que al final los compuestos con alto peso molecular y polaridad baja pueden ser recuperados sin que importe que estos puedan ser más volátiles, de esta manera, el tiempo de destilación cambia también la composición de los aceites esenciales.¹²

2.2 Características de *Aloysia citriodora* (Cedrón)

Conocida como cedrón, la especie *Aloysia citriodora* Palau es una planta perteneciente a la familia Verbenaceae, perenne, que crece hasta cinco metros, con tallo leñoso, bastante fragante y de color verde pálido.

2.2.1 Características botánicas

Clasificación taxonómica de *Aloysia citriodora*: ¹⁴



Esta especie crece de forma nativa en Sudamérica, en las regiones montañosas del noreste de Argentina y norte de Chile. También se encuentra presente en Centroamérica y en Europa al haber sido introducida al continente por exploradores españoles y portugueses. Se encuentra también cultivada en la región mediterránea y en Irán, Túnez y Argelia. ²

Algunos sinónimos para esta especie son *Aloysia triphylla*, *Lippia citrodora*, *Lippia triphylla*, *Verbena triphylla* y *Zappania citrodora*. ¹⁵

La planta es conocida en el Perú como cedrón y en el sur de Sudamérica (en donde es nativa) como hierba luisa en honor a María Luisa (1751-1819), princesa de Parma y esposa del Rey Carlos IV de España. ¹⁶ Crece en climas subtropicales y es encontrada desde los 500 hasta 4000 msnm.

El aroma es delicado pero penetrante, cítrico, por lo que tiene usualmente un uso ornamental y para preparar infusiones por su aroma agradable. ¹⁷

Se trata de un arbusto penene de tallos leñosos, rectos, cuadrangulares transversalmente, que asciende de 0.5 a 7 metros de altura, pubescente, de superficie lisa. ¹⁸

Las hojas son siempre verdes, lanceoladas, arregladas en grupos de tres, opuestas, raramente alternadas, espatuladas y ovadas con márgenes serrados. Presentan tricomas glandulares unicelulares.¹⁸

Tiene una inflorescencia paniculiforme, racemosa a menudo en grupos de 3 a 6. La flor presenta brácteas, son completas, hermafroditas, zigomórficas, pentámeras, hipóginas. El cáliz está formado por 5 sépalos unidos, generalmente lobulados o dentados; la corola presenta 5 pétalos unidos en forma de bandeja, de colores blancos, lavandas, púrpuras, rosas o azules. Tiene también 4 estambres de 0.15-0.50 mm de largo que se alternan con los lóbulos de la corola. No presenta estambre posterior; sólo 2 de los estambres son fértiles y 3 estaminodios los acompañan.¹⁹

Los frutos son elipsoides a ovoides, más o menos cordados, basalmente truncados, con el ápice redondeado y bilobulado, el fruto también tiene dos mericarpios.¹⁹

2.2.2 Usos del cedrón

Su aceite esencial se produce principalmente en Francia y el norte de África. La planta se ha utilizado tradicionalmente en Europa como un remedio para los trastornos gastrointestinales y respiratorios. También es utilizada como relajante durante las primeras etapas del insomnio pues se asumen acciones sedativas. Para restaurar el hígado durante sensación de resaca y también es un buen repelente de mosquitos.²⁰

Se ha aprobado su uso en brebajes y bebidas alcohólicas en países como Estados Unidos, donde se la considera GRAS ("*Generally Regarded as Safe*"). De esta forma tradicionalmente se usa en la preparación de alimentos: jaleas, postres, entre otros.²

Si la planta es secada y almacenada, en un recipiente metálico, las hojas pueden conservar su aroma durante años.¹³ El aceite esencial de cedrón ya no se usa para la perfumería porque produce sensibilidad a la piel al exponerla al sol.¹⁵

2.2.3 Actividades biológicas

La planta contiene principalmente flavonas hidroxiladas en el carbono 6 como el principal constituyente, además de éteres metílicos. El aceite esencial está compuesto principalmente por citral, (-)-limoneno, metilheptona, (-)-carvona, linalol, geraniol, β -pineno y glicósidos de iridoides. Algunas especies han demostrado ser antipalúdicos, antivirales y citostáticos.²⁰

Se cultiva al sur de Brasil y es utilizada como relajante para la ansiedad y el insomnio, en Ecuador las hojas se hierven y el líquido resultante se toma con bicarbonato de sodio para aliviar dolores en la parte baja del vientre, en México se utiliza en el tratamiento de la diarrea y en Colombia como un expectorante y antiespasmódico.¹⁹

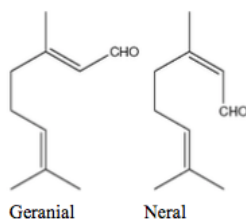
2.2.4 Información sobre los principales compuestos en el aceite esencial de *Aloysia citriodora* (Cedrón)

Citral

Es un aldehído derivado del isopreno, con fórmula $C_{10}H_{16}O$. Es un líquido amarillento, traslucido con PE. 228 °C. Consiste de dos isómeros, Geranial (α -citral) y Neral (β -citral). La diferencia del aroma en los distintos aceites esenciales depende de la razón entre el contenido de geranial y neral en cada aceite.

El citral es el mayor constituyente en los aceites esenciales de hierba luisa, limón, lima, naranja y mandarina, entre otros.

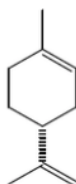
Es usado en la síntesis de la vitamina A y ionona, aromatizantes y saborizantes cítricos.²¹



Limoneno

Es un hidrocarburo monoterpenoide, con fórmula $C_{10}H_{16}$, incoloro, con punto de ebullición de 320°C. Tiene dos isómeros ópticamente activos *d* y *l*-limoneno. Se encuentra presente hasta en 90% en algunos aceites esenciales de plantas cítricas.

Su aroma es cítrico Y fresco. Se usa como aromatizante, en algunos saborizantes, solventes industriales y caseros, también como un insecticida botánico.²¹

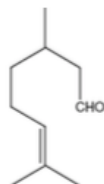


Citronelal

Es un aldehído incoloro, con fórmula $C_{10}H_{18}O$, presenta un punto de ebullición de 201-204°C.

Se encuentra en las plantas de los géneros *Corymba*, y *Citriodora*. Tiene un aroma similar al de la rosa. Es soluble en etanol y poco soluble en agua. ²¹

Se usa generalmente en perfumes, en pequeñas cantidades. También como repelente contra insectos y agente antifúngico. ²¹



2.2.5 Métodos cromatográficos para el estudio de aceites esenciales

El método más usado para la separación e identificación de los aceites es el uso de un cromatógrafo de gases acoplado a un detector.

Tabla 1: Detectores acoplados a la cromatografía de gases que son usados más comúnmente con aceites esenciales ¹⁰

Detector	Aplicaciones
Detector de conductividad térmica	Detector universal, de sensibilidad relativamente baja
Detector de ionización en la llama	Usado sobre todo en el análisis cuantitativo
Detector selectivo de nitrógeno y fósforo	Usado para la detección selectiva de los componentes nitrogenados en el aceite esencial también para el registro de residuos de pesticidas organofosforados
Detector fotométrico de llama	Usado para la detección selectiva de compuestos azufrados y residuos de pesticidas organofosforados.
Detector de captura de electrones	Detector altamente sensible a compuestos con grupos electronegativos, halogenados, nitrados, azufrados y residuos de pesticidas organoclorados.
Detector de espectrometría de masas	Obtienen espectros de masas que son indispensables para la identificación de los compuestos del aceite

10

2.3 Índice de retención aritmético (IA) usos y ejemplos.

El índice de retención aritmético de un analito es un índice basado en la escala propuesta por Kovats, que compara a un analito con una escala de índices de retención de estándares homólogos. Se determina por interpolación de los tiempos de retención de un analito y de los tiempos de retención de compuestos estándares. Para ello, se requiere que exista un incremento sistemático en la retención de los estándares, es decir que estos sean una serie homóloga de n-alcanos, que provea una escala de incrementos regulares en los picos de referencia.

El índice de retención se usa en distintos tipos de cromatografía, con variaciones en su fórmula donde los tiempos de retención ajustados pueden ser reemplazados por volúmenes de retención. Con ayuda del índice aritmético se pueden comparar los picos obtenidos con estándares encontrados en la bibliografía, estableciendo una relación entre ellos con el fin de identificar a los compuestos.

Estos índices son usados, por ejemplo, para determinar el poder de retención de una serie de componentes de una sustancia, y como apoyo en la identificación de compuestos en separaciones cromatográficas donde su uso ha sido ampliamente difundido: para la cromatografía líquida, de fluidos supercríticos, y más recientemente para separaciones electroforéticas micelar capilar.²²

III.OBJETIVOS

3.1 General

Conocer el potencial del aceite esencial de cedrón (*Aloysia citriodora* Palau) como un producto natural con actividad sobre las bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*.

3.2 Específicos

- Determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* del aceite esencial de *Aloysia citriodora* contra *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*.
- Determinar la composición química del aceite esencial de *Aloysia citriodora* por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
- Fraccionar el aceite esencial y determinar la composición química de cada fracción por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
- Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de las fracciones contra *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*.

IV.MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material vegetal y tratamiento de la muestra

El material vegetal, tallos y hojas fueron colectados el 4 de abril del 2015 en la localidad de Huarochirí, Lima, Perú. Se obtuvieron 6 Kg de material vegetal que fue identificado por la bióloga Patricia Álvarez-Loayza como *Aloysia citriodora* Palau. La muestra fue registrada con el número de voucher IS-001 y fue depositada en el herbario de Oxapampa-Missouri.

La planta fue secada al aire libre, bajo sombra, extendida en parillas de madera durante 2 semanas. De esta forma se buscó evitar su exposición a la humedad o lluvia.

4.2 Obtención del aceite esencial de *Aloysia citriodora* Palau

Para el proceso de destilación por arrastre de vapor, se colocaron 5.3 Kg de hojas de cedrón secas en un equipo de destilación de acero inoxidable. En el proceso, se calentó agua a ebullición, el vapor de agua pasó a través de la muestra que se encontraba en la parte superior del destilador arrastrando el aceite esencial. La mezcla de vapor de agua y aceite esencial pasó entonces por un tubo refrigerante donde se condensó. Luego, fue recogida en un Florentino y posteriormente, en una pera de separación, se separó al aceite esencial de la fase acuosa tomando en cuenta sus inmiscibilidades. La fase orgánica fue deshidratada con sulfato de sodio anhidro, y filtrada. El aceite esencial colectado fue almacenado en un frasco ámbar a temperaturas de 4-5 °C.

4.3 Propiedades fisicoquímicas del aceite esencial de cedrón

Análisis organoléptico

El análisis organoléptico fue llevado a cabo tomando en cuenta el color, claridad, olor y apariencia.

Densidad relativa

La densidad se obtuvo por medio del método del picnómetro. Se usó un picnómetro de vidrio limpio y seco de aproximadamente 5 mL. Primero, se pesó el picnómetro vacío con ayuda de un vaso de precipitados de 150 mL. Después se colocó agua destilada en el picnómetro hasta llenarlo completamente y se volvió a pesar el picnómetro.

Se vació el contenido del picnómetro y se secó en una estufa, fue pasado a un desecador y se determinó el peso del picnómetro a temperatura ambiente (21 °C).

Se agregó el aceite esencial de *Aloysia citriodora* hasta llenar el picnómetro y se volvió a pesar. Todos los pesos realizados fueron llevados a cabo en una balanza analítica Adventurer Analytical AX224 con 4 decimales de precisión. Tanto el aceite esencial como el agua destilada usados fueron dejados a temperatura ambiente (aproximadamente 21 °C) por 1 hora antes de ser pesados.

Por medio de los pesos obtenidos se pudo calcular la gravedad específica del aceite esencial a temperatura ambiente ($t^{\circ}\text{C}$), de acuerdo a la siguiente fórmula: ²³

$$\text{Gravedad específica, } d_{t^{\circ}\text{C}}^{t^{\circ}\text{C}} = \frac{\text{Peso del aceite esencial a } t^{\circ}\text{C}}{\text{Peso de un volumen igual de agua a } t^{\circ}\text{C}}$$

La densidad del aceite esencial fue considerada como su gravedad específica referida a un volumen igual de agua a 4 °C: ²³

$$d_{4^{\circ}\text{C}}^{t^{\circ}\text{C}} = d_{t^{\circ}\text{C}}^{t^{\circ}\text{C}} \cdot \frac{D_{\text{H}_2\text{O}}^{t^{\circ}\text{C}}}{D_{\text{H}_2\text{O}}^{4^{\circ}\text{C}}}$$

Donde:

$d_{4^{\circ}\text{C}}^{t^{\circ}\text{C}}$: Densidad del aceite esencial

$d_{t^{\circ}\text{C}}^{t^{\circ}\text{C}}$: Gravedad específica a temperatura ambiente ($t^{\circ}\text{C}$)

$D_{\text{H}_2\text{O}}^{t^{\circ}\text{C}}$: Densidad del agua a la temperatura ambiente ($t^{\circ}\text{C}$)

$D_{\text{H}_2\text{O}}^{4^{\circ}\text{C}}$: Densidad del agua a 4°C, equivalente a 1.0000 g /mL. ²⁴

Índice de Refracción

El índice de refracción del aceite esencial fue calculado con ayuda de un refractómetro digital Reichert Abbe Mark III con rango de medición de 1.3106 a 1.7000 y precisión de ± 0.0001 . Para ello, se limpió con unas gotas de acetona ambos prismas móviles del refractómetro. Se secaron las superficies y se colocaron 3 gotas de la muestra sobre el prisma inferior de modo que se cubrió su superficie. Se observó por el ocular realizando los ajustes necesarios para que la línea de contraste que divide los dos campos se viera nítida (bien enfocada). También se ajustó el refractómetro para que la línea de contraste intersecte con el centro del aspa que se ve en el ocular. Luego, se realizó una calibración midiendo el índice de refracción de unas gotas de agua destilada.

Finalmente se hizo la medición del índice de refracción del aceite esencial, por duplicado y limpiando los prismas móviles con unas gotas de acetona. Para las mediciones, el refractómetro digital se dejó calentando una hora antes de realizar la medición.

4.4 Composición química del aceite esencial (GC-MS)

Para la identificación de los compuestos existentes en el aceite esencial se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890A GC-System acoplado a un detector de masas MS Agilent Technologies 5975C inert XL-MSD. Se utilizó una columna DB-5ms La temperatura se programó en gradiente, de acuerdo al siguiente programa:

- Se mantiene a 100 °C por 10 minutos
- Aumento de 5 °C/min hasta alcanzar 120 °C
- Aumento de 10 °C/min hasta alcanzar 180 °C
- Aumento de 3 °C/min hasta alcanzar 220 °C
- Se mantiene a 220 °C por 1 minuto
- Aumento de 3 °C/min hasta alcanzar 260 °C
- Se mantiene a 260 °C por 5 minutos

Se realizó una dilución de 5 µL del aceite esencial en 1 mL de diclorometano, a partir de este volumen se tomó 1µL como volumen de inyección. El gas de arrastre fue Helio a un flujo de 1 mL/min y la razón de Split de 10:1.

La identificación de los compuestos fue llevada a cabo por comparación de sus espectros de masas con los espectros de masas contenidos en las bibliotecas FLAVOUR2 y NIST08 incluidas en el cromatógrafo.

También se calculó el índice aritmético de retención (IA) por medio de una serie de estándares de referencia de hidrocarburos de C₈ a C₂₀, éste índice fue comparado con los índices encontrados en la biblioteca de Adams. El índice aritmético fue determinado de acuerdo a la siguiente fórmula:²⁵

$$IA = 100 \cdot Pz + 100 \left(\frac{t_{RX} - t_{R(Pz)}}{t_{R(Pz+1)} - t_{R(Pz)}} \right)$$

Donde:

IA: Índice aritmético de retención.

Pz: Número de átomos de carbono que eluyen antes del compuesto de interés.

$t_{R(X)}$: Tiempo de retención del compuesto de interés.

$t_{R(Pz)}$: Tiempo de retención de un hidrocarburo lineal que eluye antes del compuesto de interés.

$t_{R(Pz+1)}$: Tiempo de retención de un hidrocarburo lineal que eluye después del compuesto de interés

Finalmente, para confirmar la identidad de los compuestos detectados, además, se compararon los tiempos de retención y espectros de masas de los compuestos del aceite esencial y sus fracciones con los de los estándares de citral, citronelal, mirceno y limoneno.

4.5 Evaluación de actividad antibacteriana

Los ensayos fueron llevados a cabo en el laboratorio de nutrición e inocuidad alimentaria de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia (FAVEZ) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, bajo la supervisión del Dr. Carlos Shiva.

El ensayo se basó en el método descrito por Eloff, ²⁶ que utiliza microplacas estériles de 12 x 8 pozos de fondo en U.

Para la evaluación de la actividad inhibitoria de crecimiento bacteriano se prepararon dos tipos de soluciones:

Solución 1: 5 mL de medio Brain Heart Infusion (BHI) con agar agar al 2%.

Solución 2: 160 μ L del aceite esencial (o de la fracción del aceite) en 5 mL del medio BHI con agar agar al 2%. La solución resultante tuvo una concentración de 3.2% (v/v).

Se colocaron 50 μ L de la solución 1 en todos los pocillos de las columnas 2 a la 12.

En la columna 1 se colocó:

- 100 μ L de la solución 2 (aceite esencial, AE0) de cedrón en los pozos de las filas A-B.
- 100 μ L de la solución 2 (fracción AE1) en los pozos de las filas C-D.
- 100 μ L de la solución 2 (fracción AE2) en los pozos de las filas E-F.
- 100 μ L de la solución 2 (fracción AE3) en los pozos de las filas G-H.

Se tomaron con una pipeta multicanal 50 μ L de todas las filas de la columna 1 y se pasaron a la columna 2, se mezcló y se tomó 50 μ L que se llevaron a la columna 3. Se

procedió de manera similar, realizando diluciones 1:2, hasta la columna 11. Los últimos 50 µL fueron descartados.

Luego se prepararon las soluciones stock para cada bacteria (*Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*) en medio BHI.

Se realizaron diluciones sucesivas de 1 mL del inóculo en tubos con 9 mL de agua destilada, hasta alcanzar una concentración de $1-2 \times 10^8$ UFC/mL o 0.5 en escala de Mc Farland, lo cual fue determinado por un espectrofotómetro a $\lambda = 625$ nm. El rango de absorbancia aceptado para esta concentración es 0.080-0.120. Las absorbancias obtenidas para las soluciones de *E. coli* y *S. typhimurium* fueron 0.114 y 0.111, respectivamente.

Se tomaron 50 µL de la solución preparada y se agregaron a los pozos de todas las filas de la columna 1 a la 11. En la columna 12 se agregaron desde la fila A hasta la D, 50 µL del medio BHI con agar agar al 2% y 50 µL de la solución stock de la bacteria, lo cual representó el control positivo. Desde la fila E hasta la H, se agregó 100 µL del medio BHI con agar agar al 2%; esto representó el control del medio. El siguiente diagrama resume la distribución de las soluciones en los pozos.

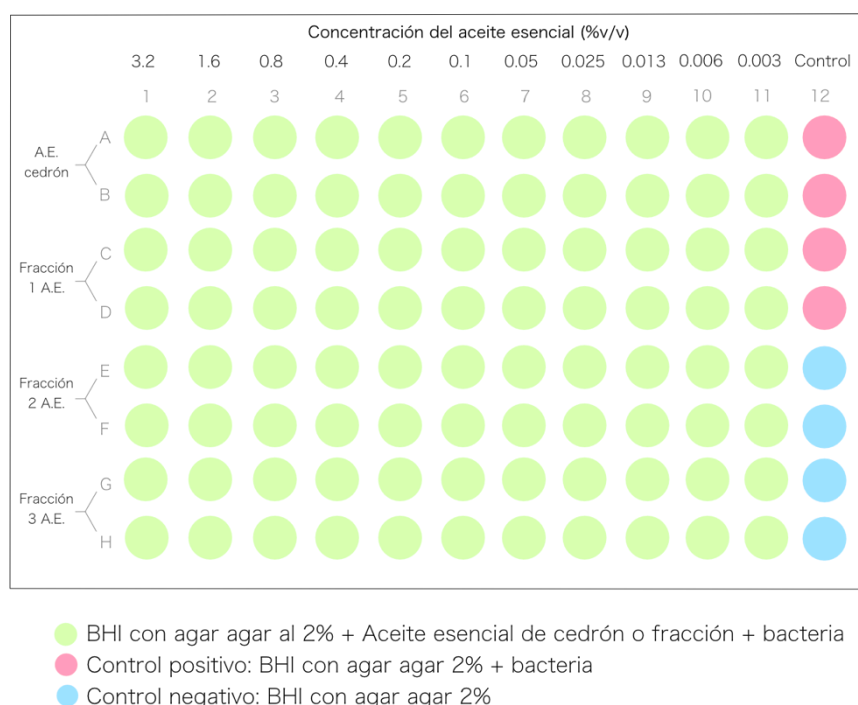


Figura 1: Distribución de las muestras en la microplaca de 96 pozos

Las placas fueron incubadas por 24 horas a 37 °C aproximadamente. La turbidez es un indicador de crecimiento bacteriano, así que se comparó dicha turbidez de los

pozos que contenían solo el medio de cultivo (sin turbidez) y los pozos que contenían medio + bacteria (con turbidez). La Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de la muestra se define como la concentración más baja en la cual no se observó turbidez (crecimiento bacteriano) en el pozo.

Actividad bactericida

Se determinó la actividad bactericida en las concentraciones donde se presentó inhibición de crecimiento bacteriano. Para ello, se procedió a sembrar asepticamente con un asa de siembra estéril al inóculo en medio BHI con el aceite esencial en su concentración mínima inhibitoria. La siembra se realizó por duplicado en placas de Petri que contenían agar agar. El procedimiento fue realizado en una campana de flujo laminar, usando un mechero Bunsen, de forma que se evite la contaminación de la placa de Petri durante el sembrado. Luego, estas placas fueron incubadas a 37 °C por 48 horas aproximadamente para confirmar la actividad bactericida. La presencia de un halo plateado mostró crecimiento bacteriano y por tanto la actividad del aceite o fracción a esa concentración fue solamente inhibitoria; en cambio, la ausencia del halo plateado indicaba ausencia de crecimiento bacteriano y que la actividad del aceite o fracción a esa concentración fue bactericida.

Todo el procedimiento descrito anteriormente fue realizado también para los estándares de citral, limoneno, mirceno, óxido de cariofileno y para el antibiótico cloranfenicol.

4.6 Fraccionamiento del aceite esencial

Cromatografía de columna

El fraccionamiento del aceite esencial fue llevado a cabo por medio de cromatografía de columna, para lo cual se utilizó sílica gel 60 (40-63 μm). Se pesó 100 g de sílica gel con lo cual se relleno una columna de vidrio de 4.2 cm de diámetro y 32 cm de longitud sostenida en un soporte universal. Se controló el flujo del eluyente por una llave en la salida en la parte inferior de la columna.

Se vertió 260 mL éter de petróleo en la columna de forma que el nivel del eluyente estuviera 3 cm por encima del nivel del adsorbente.

Se abrió la llave de la columna y antes de que el solvente bajara al nivel superior del adsorbente, se agregó 5 mL del aceite esencial de *Aloysia citriodora* con ayuda de una

pipeta Pasteur. Luego se abrió la llave, cuidando de agregar volúmenes consecutivos del eluyente. Se colectaron los volúmenes del eluyente en tubos de ensayo de 20 cm.

A medida que se hacían las colecciones en los tubos (cada 5 tubos colectados), la llave se cerraba y se realizaban perfiles cromatográficos en capa fina para conocer el cambio del R_F de los compuestos obtenidos; al presentarse una caída grande de estos valores, se cambió al siguiente sistema de solventes, de acuerdo a la Tabla 2 y se continuó con la colección en los tubos de ensayo.

Tabla 2: Sistemas de elución y volúmenes utilizados para la cromatografía de columna.

Sistema	Proporción	Volumen utilizado (mL)
I	Éter de petróleo 100%	320
II	Éter de petróleo-Acetato de etilo (100:1)	180
III	Éter de petróleo-Acetato de etilo (100:3)	300
IV	Éter de petróleo-Acetato de etilo (10:1)	350
V	Acetato de etilo 100%	250

Para la cromatografía de capa fina se utilizaron placas de sílica gel F254 de fase normal de 8 x 10 cm. Con ayuda de un capilar se realizaron 5 siembras del aceite en una placa.

Las placas cromatográficas fueron reveladas con solución de vainillina en ácido sulfúrico concentrado al 3%, previa observación con luz ultravioleta de $\lambda = 254$ y 264 nm.

El lavado final de la columna fue llevado a cabo con 250 mL de acetato de etilo, colectando el eluyente en 10 tubos de ensayo.

En total se colectaron 96 tubos de ensayo los cuales fueron agrupados en 3 fracciones, de acuerdo a sus perfiles cromatográficos.

Con ayuda de un rotavapor Buchi V-850 se evaporaron los solventes dejando únicamente los compuestos contenidos en las fracciones rotuladas como AE1, AE2 y AE3; que finalmente fueron almacenadas a 5 °C hasta su evaluación.

V.RESULTADOS

5.1 Obtención de aceite esencial y características fisicoquímicas

Se obtuvieron 9.4 mL de aceite esencial a partir de 5.37 Kg de hojas secas de cedrón. El rendimiento del aceite esencial fue 0.18% (v/w).

$$\text{Rendimiento} = \left(\frac{9.4 \text{ mL}}{5370 \text{ g}} \right) \cdot 100$$

$$\text{Rendimiento} = 0.18\%$$

El aceite esencial de *Aloysia citriodora* es un líquido de color amarillo claro, translúcido, de apariencia oleosa y fragancia cítrica.

Su densidad es de 0.9494 g/mL y su índice de refracción es 1.4894.

Cálculo de la densidad a 21 °C (Temperatura ambiente):

$$d_{4^{\circ}\text{C}}^{t^{\circ}\text{C}} = d_{t^{\circ}\text{C}}^{t^{\circ}\text{C}} \cdot \frac{D_{\text{H}_2\text{O}}^{t^{\circ}\text{C}}}{D_{\text{H}_2\text{O}}^{4^{\circ}\text{C}}}$$
$$d_{4^{\circ}\text{C}}^{21^{\circ}\text{C}} = 0.9514 \cdot \frac{0.9980 \text{ g/ml}}{1.0000 \text{ g/ml}}$$
$$\boxed{d_{4^{\circ}\text{C}}^{21^{\circ}\text{C}} = 0.9494 \text{ g/mL}}$$

*Datos de la densidad del agua a 21 °C y 4 °C obtenidos del Handbook de Perry. ²⁴

En la tabla 3 se muestran las mediciones del índice de refracción realizado al aceite esencial.

Tabla 3: Mediciones de índice refracción del aceite esencial de cedrón.

N.º	Temperatura (°C)	Índice de refracción
1	24.90	1.4894
2	24.89	1.4894
Promedio	24.90	1.4894

$$\boxed{n_D = 1.4894}$$

5.2 Composición química del aceite esencial de *Aloysia citriodora* Palau

En la figura 2 se muestra el perfil cromatográfico del aceite esencial de *Aloysia citriodora* Palau (Cedrón-AE0). Se identificaron 34 picos, que suman un área del 100% del total. Solamente se muestran los nombres de los compuestos identificados con porcentaje de probabilidad mayor o igual al 90% y con porcentaje de área mayor o igual a 0.1%.

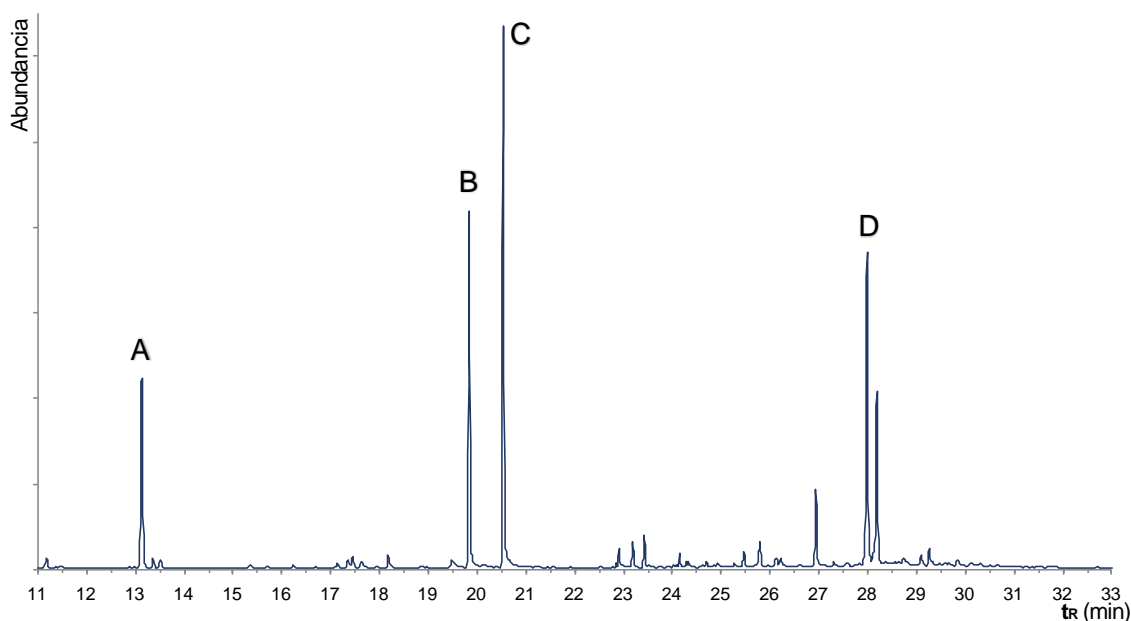


Figura 2: Cromatograma de gases del aceite esencial de Cedrón (*Aloysia citriodora*)

En la tabla 4 se muestra la composición química de los compuestos volátiles del aceite esencial de cedrón.

Los compuestos mayoritarios fueron identificados como A: limoneno $t_R=13.23$ min (10.28%), B: β -Citral $t_R=19.88$ min (14.06%), C: α -Citral $t_R=20.58$ min (22.13%) y D: 9,10-dehidro-isolongifoleno $t_R=28.02$ min (15.46%).

Tabla 4: Composición química de compuestos volátiles del aceite esencial del cedrón

#	Compuesto (FLAVOUR2 y NIST08)	t _R	% Área	I.A.*
1	α-Pineno	9.96	0.33	942.7
2	β-tujeno	11.18	0.61	982.2
3	Limoneno	13.23	10.28	1039.5
4	Eucaliptol	13.48	0.62	1046.0
5	(Z)-Ocimeno	13.61	0.63	1049.5
6	Desconocido (C ₁₀ H ₁₆ O)	17.20	0.26	1153.1
7	Citronelal	17.40	0.57	1159.4
8	Desconocido (C ₁₀ H ₁₆ O)	17.50	0.70	1162.6
9	Desconocido (C ₁₀ H ₁₆ O)	17.67	0.53	1168.0
10	Desconocido (C ₁₀ H ₁₆ O)	18.22	0.79	1185.5
11	Desconocido (C ₁₀ H ₁₈ O)	19.53	0.80	1234.2
12	β-Citral	19.88	14.06	1248.2
13	α-Citral	20.58	22.13	1276.2
14	Desconocido (C ₁₀ H ₁₈ O)	20.70	0.39	1281.0
15	3-Careno	22.96	2.75	1379.7
16	α-Copaeno	23.28	0.99	1393.9
17	β-Bourboneno	23.51	1.23	1404.3
18	β-Cariofileno	24.37	2.43	1444.0
19	β-Cedreno	24.57	0.45	1453.2
20	(E)-Ocimeno	24.95	0.29	1470.7
21	Alloaromadendreno	25.29	0.77	1486.4
22	α-Curcumeno	25.44	1.30	1493.3
23	Germacreno D	25.72	0.67	1506.0
24	Desconocido (C ₁₅ H ₂₄)	26.04	1.29	1520.3
25	α- Cubebeno	26.38	0.55	1535.6
26	Cedreno	26.48	0.52	1540.0
27	β-Farneseno	27.13	6.62	1569.1

* Índice de retención aritmética

28	Desconocido (C ₁₅ H ₂₄ O)	27.43	0.31	1582.5
29	9,10-dehidro-isolongifoleno	28.02	15.46	1608.4
30	Óxido de cariofileno	28.22	9.47	1616.8
31	Desconocido (C ₂₁ H ₃₄ O ₂)	28.86	0.59	1643.8
32	Desconocido (C ₁₅ H ₂₂)	29.26	0.64	1660.6
33	2-isopropil-5-metil-9-metilen-Biciclo[4.4.0]dec-1-eno	29.42	0.65	1667.4
34	β-Carofileno	29.96	0.34	1690.1

La identificación de los compuestos se dio con ayuda del índice aritmético de retención y algunos de los compuestos fueron comparados con estándares químicos. Por ejemplo, se comparó el espectro de masas del aceite esencial del limoneno con el espectro del estándar de limoneno. Se procedió de manera similar para los estándares que se pudieron conseguir del mercado (Mirceno, limoneno, citral y citronelal).

Nuestra principal fuente de identificación es la comparación del espectro de masas del pico con el espectro de la biblioteca de referencia del espectrómetro. Se sabe que la identificación no es absoluta, pero es muy probable.

5.3 Composición química de las fracciones del aceite esencial de cedrón

Se obtuvieron 3 fracciones del aceite esencial que fueron agrupadas de acuerdo a su perfil cromatográfico. En la figura 3 se muestran los cromatogramas de gases de las fracciones AE1, AE2 y AE3. Se puede observar una buena separación de los principales picos encontrados.

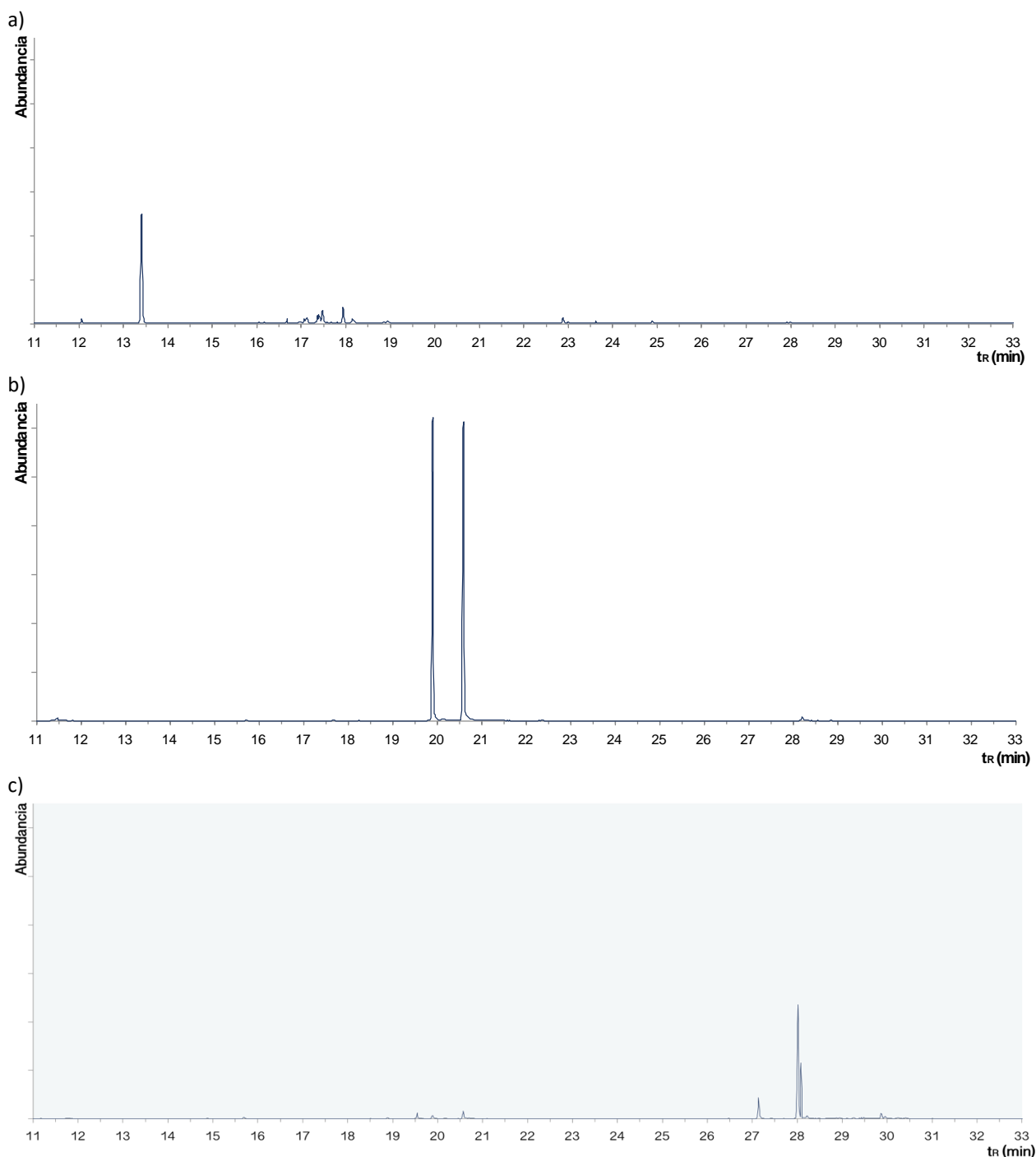


Figura 3: Cromatogramas de gases de: Fracción AE1 (3-a), Fracción AE2 (3-b), y Fracción AE3 (3-c)

5.3.1 Fracción AE1

La fracción 1 estuvo conformada por 16 compuestos, su caracterización química se muestra en la tabla 5. Los compuestos mayoritarios fueron identificados como Limoneno $t_R=13.49$ min (63.45%) y 4-piridinol $t_R=17.96$ min (7.41%).

Tabla 5: Composición química de compuestos volátiles de la fracción AE1

#	Compuesto (FLAVOUR2 y NIST08)	t_R (min)	% Área	I.A.*
1	Limoneno	13.49	63.45	1046.3
2	Desconocido (C ₁₀ H ₁₈ O ₂)	16.24	0.82	1122.5
3	Desconocido (C ₁₀ H ₁₈)	17.06	1.40	1148.6
4	Perillol	17.14	1.58	1151.2
5	Desconocido (C ₁₀ H ₁₆ O)	17.20	2.26	1153.1
6	Desconocido (C ₁₀ H ₁₈ O)	17.41	5.76	1159.7
7	Desconocido (C ₁₀ H ₁₆ O)	17.45	4.20	1161.0
8	Desconocido (C ₁₀ H ₁₆ O)	17.50	5.38	1162.6
9	4-Piridinol	17.96	7.41	1177.2
10	Desconocido (C ₁₀ H ₁₆ O)	18.23	2.10	1185.8
11	Desconocido (C ₁₀ H ₁₆ O)	18.92	0.73	1209.8
12	Desconocido (C ₁₂ H ₂₀ O)	19.02	1.47	1213.8
13	3-Careno	22.96	1.44	1379.7
14	β -Mirceno	24.96	1.07	1471.2
15	Desconocido (C ₁₅ H ₂₂ O)	27.98	0.52	1606.7
16	Desconocido (C ₁₅ H ₂₂ O)	28.08	0.41	1610.9

5.3.2 Fracción AE2

La fracción AE2 estuvo conformada por 4 compuestos, sus composiciones químicas se muestran en la tabla 6.

Los compuestos mayoritarios fueron identificados como β -Citral $t_R=19.9$ min (45.91%) y α -Citral $t_R=20.59$ min (48.50%).

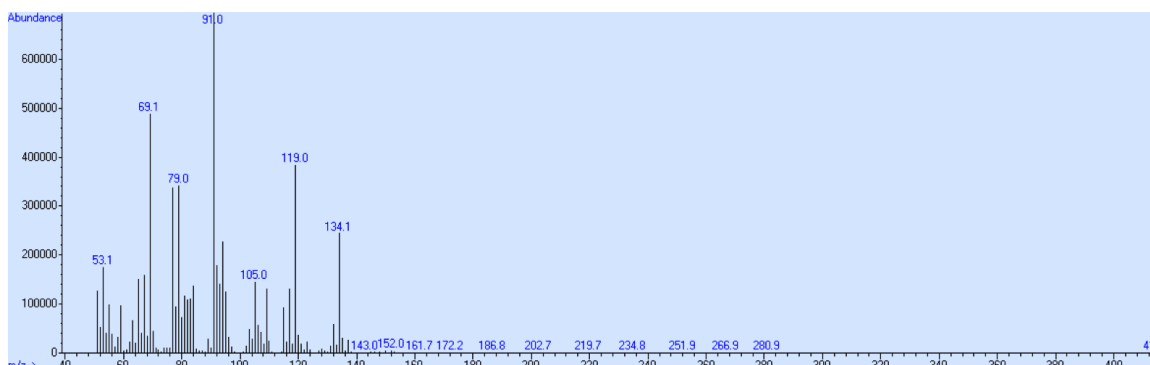
* Índice de retención aritmética

Tabla 6: Composición química de compuestos volátiles de la fracción AE2

#	Compuesto (FLAVOUR2 y NIST08)	t _R (min)	% Área	I.A.*
1	Desconocido (C ₁₀ H ₁₆)	11.46	1.28	991.3
2	β-Citral	19.90	45.91	1249.0
3	α-Citral	20.59	48.50	1276.6
4	Desconocido (C ₁₅ H ₂₄ O)	28.21	4.31	1616.4

En la figura 4 se muestran los espectros de masas de los compuestos α-Citral y β-Citral.

a)



b)

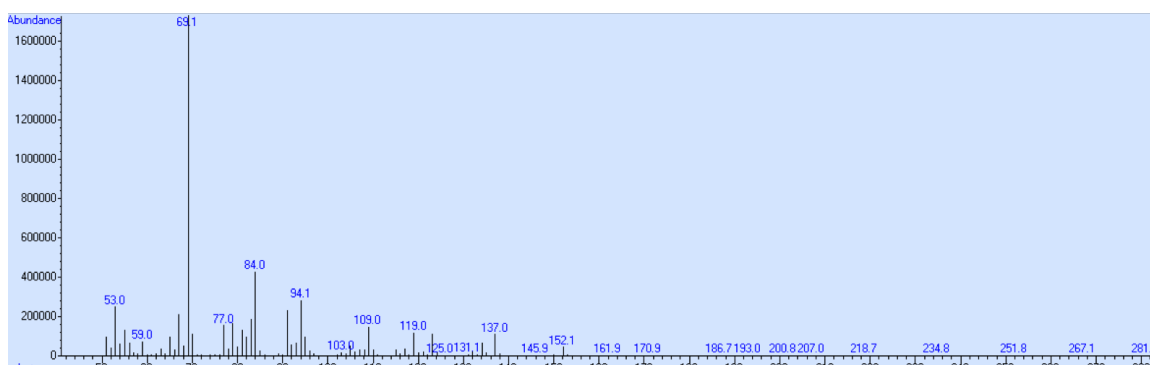


Figura 4: Espectros de masas de 4-a) α-Citral y del 4-b) β-Citral

5.3.3 Fracción AE3

La fracción AE3 estuvo conformada por 11 compuestos, cuyas composiciones químicas se muestran en la tabla 7.

* Índice de retención aritmética

Los compuestos mayoritarios fueron identificados como β -Farneseno $t_R=27.13$ min (10.76%), 10-dehidro-isolongifoleno $t_R=28.02$ min (48.44%) y óxido de cariofileno $t_R=28.22$ min (25.83%).

Tabla 7: Composición química de compuestos volátiles de la fracción AE3

#	Compuesto (FLAVOUR2 y NIST08)	tR	% Área	I.A.*
1	Desconocido (C ₁₀ H ₁₆)	17.50	0.25	1105.4
2	Desconocido (C ₁₀ H ₁₆ O)	18.24	0.21	1186.1
3	Desconocido (C ₁₀ H ₁₈ O)	19.54	0.42	1234.6
4	β -Citral	19.89	2.89	1248.6
5	α -Citral	20.58	2.73	1276.2
6	β -Farneseno	27.13	11.76	1569.1
7	9,10-dehidro-isolongifoleno	28.02	48.64	1608.4
8	Óxido de cariofileno	28.22	26.63	1616.8
9	Desconocido (C ₁₅ H ₂₂)	29.25	2.09	1660.2
10	2-isopropil-5-metil-9-metileno-Biciclo[4.4.0]dec-1-eno	29.42	1.46	1667.4
11	β -Carofileno	29.96	2.92	1690.1

* Índice de retención aritmética

5.4 Actividad antimicrobiana del aceite esencial del cedrón y fracciones

En la tabla 8 se resumen los resultados del análisis de actividad inhibitoria del aceite esencial del cedrón y sus fracciones y estándares de citral, citronelal, mirceno, limoneno además de cloranfenicol.

Tabla 8: Concentración mínima inhibitoria en % (v/v) de las muestras para *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*.

Muestra	CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (% v/v)	
	E. coli	S. typhimurium
Aceite esencial (E0)	1.6	1.6
Fracción 1 (E1)	>3.2	>3.2
Fracción 2 (E2)	1.6	1.6
Fracción 3 (E3)	3.2	3.2
Citral Std. (A)	0.8	0.8
Citronelal Std. (B)	>3.2	>3.2
Mirceno Std. (C)	>3.2	>3.2
Limoneno Std. (D)	>3.2	>3.2
Cloranfenicol (AntiB.)	1.6	1.6

El aceite esencial de cedrón mostró actividad inhibitoria a 1.6 %, la fracción 2 tuvo actividad inhibitoria a la misma concentración, y el estándar de citral a una menor concentración. Los resultados sugieren que el responsable de la actividad inhibitoria del aceite esencial es en mayor medida la combinación de α -Citral y β -Citral, componente mayoritario del aceite esencial que se encuentra presente tanto en la fracción AE2 como en el estándar. El estándar de citral muestra una mejor actividad inhibitoria que el antibiótico estudiado, cloranfenicol, contra ambas bacterias. En cambio, la fracción 2 mostró actividad inhibitoria a la misma concentración que el antibiótico.

Actividad bactericida

En la tabla 9 se resumen los resultados de las incubaciones en placa de Petri para las muestras que presentaron actividad inhibitoria.

Tabla 9: Actividad bactericida contra *E. coli* y *S. typhimurium* del aceite esencial de cedrón, sus fracciones y estándares.

Muestra	Concentración (%v/v)	Crecimiento bacteriano	
		<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>
Aceite esencial (E0)	1.6	Sí	Sí
Fracción 2 (E2)	1.6	No	No
Fracción 3 (E3)	3.2	No	No
Citral Std. (A)	0.8	No	No
Cloranfenicol (AntiB.)	1.6	No	No

El aceite esencial del cedrón no mostró actividad bactericida contra *E. coli* y *S. typhimurium* en las placas Petri a diferencia de las fracciones 2, 3, el estándar de citral y el antibiótico cloranfenicol. Los resultados de la inhibición son los mismos para ambas bacterias a las mismas concentraciones.

VI.DISCUSIÓN

El rendimiento del aceite esencial de cedrón fue 0.18%, el cual fue similar a lo encontrado por Di Leo Lira, 2001, donde se presentaron rendimientos de 0.10-0.42% con una media de 0.21%.¹ El mismo estudio detalla que las condiciones de crecimiento: precipitaciones, horas de luz, temporada de recolección, afectan directamente al rendimiento.

En el presente trabajo, el secado fue llevado a cabo al aire libre durante dos semanas, bajo sombra; en estas condiciones aún puede existir agua contenida en partes de la muestra, lo cual podría reducir el rendimiento de obtención de aceite esencial. Se sugiere en lo sucesivo probar un secado en estufa a una temperatura controlada para evitar la descomposición de los componentes del aceite esencial. Para maximizar el rendimiento se podrían hacer extracciones con solventes orgánicos en el destilado de arrastre por vapor para poder separar los compuestos solubles en agua; posteriormente el solvente se separaría del aceite esencial con una destilación.

Organolépticamente, el aroma es penetrante, cítrico y agradable. El aroma más intenso, es percibido también con intensidad en la fracción AE2 y en el estándar de citral, por lo que depende de los componentes mayoritarios y sus proporciones α -Citral (22.13%) y β -Citral (14.06%). El aroma cítrico, que también se siente en la primera fracción, se puede deber al limoneno, que se encuentra presente en gran cantidad en el aceite (10.28%); el aroma característico del aceite esencial depende también de la mezcla de los componentes minoritarios (trazas).

La densidad del aceite esencial de cedrón (0.9494 g/mL) se encuentra dentro de lo habitual para este tipo de muestras, es decir inferior a la densidad del agua.⁹ El índice de refracción determinado (1.4894) es similar a los de los aceites esenciales de *Ocimum basilicum* (1.4995), *Citrus reticulata* (1.4596), *Citrus sinensis* (1.4631) y *Citrus paradisi* (1.4634).²⁷

La composición fue determinada por medio de 3 métodos para confirmar la identidad de los compuestos encontrados. El índice aritmético, que fue calculado por la comparación de los tiempos de retención de los picos encontrados con una serie de estándares de alcanos, nos permite corroborar lo encontrado con resultados bibliográficos, independientemente del equipo utilizado en la investigación, eliminando de esta forma errores propios de las condiciones de uso del equipo.

El aceite esencial de la especie *Aloysia citriodora* colectada está compuesta principalmente por α -Citral y β -Citral seguidos por 9,10-dehidro-isolongifoleno, limoneno, óxido de cariofileno y α -Curcumeno. Estos componentes coinciden con lo encontrado por F. Romero, 2011, quien reporta como componentes principales del aceite esencial al α -Citral (41.9%), β -Citral (39.2%) y 1,8-cineol (6.4%)

Di Leo Lira, 2001, comparó 23 muestras de cedrón de 16 localidades y obtuvo rangos de concentración de α -Citral (17-36%), β -Citral (14-27%) y limoneno (10-30%). Otros componentes encontrados en la mayoría de las muestras fueron 6-methyl-5-hepten-2-ona (<3.5%) y citronelal (<0.5%).¹ La muestra estudiada en esta investigación contenía principalmente α -Citral (22.13%), β -Citral (14.06%), limoneno (10.28%) y citronelal (0.57%). Esto muestra la similitud de la composición del aceite esencial investigado y la reportada en la literatura, hecho que ayuda a reafirmar la presencia de estos compuestos.

El aceite esencial obtenido fue separado en tres fracciones de acuerdo a su tiempo de retención y con el fin de estudiar la actividad antibacteriana de sus principales componentes. El fraccionamiento, realizado por una cromatografía de columna con fase normal, logró separar claramente 3 fracciones que son diferentes químicamente, lo cual se evidencia con los resultados de la cromatografía de capa fina (Anexo 2) y de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (Figura 3).

La segunda fracción AE2 fue aislada con facilidad y está compuesta casi en su totalidad por α -Citral (48.50%) y β -Citral (45.91%). Si se quisiera separar el β -Citral del α -Citral con el fin de probar la actividad antimicrobiana de los compuestos por separado, podría hacerse otra cromatografía de fase normal o fase reversa; Esto no se pudo llevar a cabo en esta investigación por falta de material, dado el bajo rendimiento del aceite esencial.

La concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Aloysia citriodora* fue de 1.6% para *E. coli*. En estudios anteriores, K. Yasunaka, 2005, encontró una MIC de 1.02% para el aceite esencial de *Aloysia citriodora* colectado en distintas localidades del estado de Veracruz, México²⁸. En otra investigación, M. Duarte, 2007, obtuvo resultados de MIC en un rango de 0.5-1% para 12 serotipos diferentes de *E. coli*, cabe mencionar que para algunos serotipos el valor de MIC >1% pues fue la mayor concentración estudiada²⁹. No se encontraron estudios anteriores acerca de la actividad antibacteriana del aceite esencial contra *S. typhimurium*.

Se ha demostrado la capacidad antibacteriana del citral en estudios anteriores; J. Kim, 1995, demostró la actividad antimicrobiana del citral contra *S. typhimurium*, con una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 0.5%³⁰, mientras que la MIC encontrada en esta investigación para el estándar de citral fue de 0.8%; ambas concentraciones son cercanas, la diferencia puede depender de los intervalos de concentraciones escogidos para cada estudio. Existen también investigaciones sobre la actividad antibacteriana del citral contra *E. coli*. Como demostró G. Onawunmi, 1989, hay inhibición de crecimiento de esta bacteria a concentraciones mayores a 0.5%.³¹

Existe una diferencia entre la concentración mínima inhibitoria encontrada para la fracción AE2 y para el estándar de citral, los cuales fueron estudiados bajo las mismas condiciones. Uno de los factores principales es que la fracción 2, no está compuesta en su totalidad por citral, contiene otros compuestos y por tanto la cantidad total de citral en el mismo volumen estudiado es menor en el caso de la fracción. Existe también una diferencia por la escala de concentraciones usada para la determinación del MIC. Para esta investigación, la diferencia entre cada concentración estudiada estuvo razón de un medio. Así, la siguiente concentración analizada después de 1.6%, es 0.8% y cualquier concentración entre estas dos no es tomada en cuenta. Para conocer la diferencia del MIC entre la fracción AE2 y el citral con mayor precisión, se pueden estudiar las concentraciones en escalas con mayor resolución en alguna investigación futura.

Al encontrarse en abundancia en el aceite esencial del cedrón, el α y β -Citral son los principales componentes del aceite esencial (36.19% del total), y de la fracción AE2 (94.41%). Los resultados de la actividad antibacteriana para el aceite y la fracción AE2 son similares a los encontrados en la literatura en estudios del aceite esencial contra *E. coli* por K. Yasunaka, 2005, y M. Duarte, 2007. Además, la misma fracción (AE2) mostró la mejor actividad inhibitoria contra *S. typhimurium* con respecto a las otras fracciones; Por lo tanto, se comprueba que el α -Citral y β -Citral son los principales compuestos de actividad antibacteriana y ambos son potenciales candidatos a antibióticos naturales de uso veterinario, como aditivos.

VII.CONCLUSIONES

El aceite esencial del cedrón (*Aloysia citriodora* Palau) tiene potencial como un producto natural con actividad contra las bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*.

El aceite esencial de *Aloysia citriodora* demostró actividad inhibitoria, la concentración mínima inhibitoria para *Escherichia coli* fue 1.6% y para *Salmonella typhimurium* 1.6%.

Por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se determinó que el aceite esencial de *Aloysia citriodora* se compone principalmente por α -Citral (22.13%), 9,10-dehidro-isolongifoleno (15.46%), β -Citral (14.06%) y limoneno (10.28%).

Se logró una separación en tres fracciones bien diferenciadas por medio de cromatografía en columna en fase normal. Por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se determinó que los componentes principales de la fracción AE1 son: Limoneno (63.45%) y 4-piridinol (7.41%). De la fracción AE2: β -Citral (45.91%) y α -Citral (48.50%). Y de la fracción AE3: 10-dehidro-isolongifoleno (48.44%) y óxido de cariofileno (25.83%).

La actividad antibacteriana *in vitro* de la fracción AE2 es la mayor contra *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* por su alto contenido de α -Citral y β -Citral, quienes son los principales compuestos responsables de actividad antibacterial.

VIII.RECOMENDACIONES

Dada la poca disponibilidad de estudios sobre el cedrón que crece en el Perú, se sugiere evaluar el rendimiento y la composición del aceite esencial de cedrón con muestras provenientes de otras regiones del país, pues la diversidad en suelos y precipitaciones, así como niveles de radiación solar en cada región podría mostrar variabilidad en los rendimientos obtenidos. Las composiciones también serían diferentes y una comparación de éstas permitiría conocer las condiciones óptimas para obtener un aceite esencial con mayor cantidad de citral.

Al comprobarse que los compuestos α -Citral y β -Citral son los principales compuestos de actividad antibacterial, ambos son potenciales candidatos a antibióticos naturales de uso en la industria farmacéutica. En el caso de la industria veterinaria, podría usarse en productos derivados como por ejemplo aditivos alimentarios. *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* son bacterias que se pueden encontrar en las aves de corral. En posteriores investigaciones podría hacerse uso del aceite esencial de *Aloysia citriodora* (Cedrón) como fuente de α - y β -citral para bacterias obtenidas del tracto gastrointestinal de aves de corral y evaluar su eficacia.

IX.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Di Leo Lira, P.; Van Baren, C. M.; Retta, D.; Bandoni, A. L.; Gil, A.; Gattuso, M.; Gattuso, S. Characterization of Lemon Verbena (*Aloysia citriodora* Palau) from Argentina by the Essential Oil. *Journal of Essential Oil Research* **2001**, *20* (4), 350-353.
2. Lawless, J. *The Encyclopedia of Essential Oils*, 2nd ed.; Red Wheel Weiser Conari: San Francisco, **2002**.
3. Murray, H. *Essential Oils: Art, Agriculture, Science, Industry and Entrepreneurship (A Focus On The Asia-Pacific Region)*; Nova Science Publishers: Nueva York, **2009**.
4. Romero, F. V.; De Luca, S.; Piscopo, A.; Poiana, M. Antimicrobial Effect of Some Essential Oils. *Journal of Essential Oil Research* **2011**, *20* (4), 373-393.
5. Sartoratto, A.; Machado, A. L. M.; Delarmelina, C.; Figueira, G. M.; Duarte, M. C.; Rehder, V. L. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* **2004**, *35* (20), 275-280.
6. Duschatzky, C. B.; Martinez, A. N.; Almeida, N. V.; Bonivardo, S. L. Nematicidal activity of the essential oils of several Argentina plants against the root-knot nematode. *Journal of Essential Oils Research* **2004**, *16*, 626-628.
7. Preedy, V. E. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, 1st ed.; Elsevier: Londres, **2016**, 74-75.
8. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). *European pharmacopoeia*, 8th ed.; Council of Europe: Strasbourg, 2013; Vol. I.
9. A., El Asbahani *et al* Essential oils: From extraction to encapsulation (Review). *International Journal Of Pharmaceutics* **2015**, *483* (1-2), 220-41.
10. Stashenko, E. E. *Aceites Esenciales*, 1st ed.; División de Publicaciones UIS: Bucaramanga Colombia, **2009**; p 18.
11. Gil, A.; Van Baren, C. M.; Di Leo Lira, P. M.; Bandoni, A. L. Identification of the Genotype from the Content and Composition of the Essential Oil of Lemon Verbena (*Aloysia citriodora* Palau). *Journal Of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55* (21), 8664-8669.
12. Can Baser, H. K.; Bauchbauer, G. *Handbook of Essential Oils-Science, Technology and Applications*, 1st ed.; CRC Press: Boca Raton, Florida, **2016**; p 135-136, 144-145.

13. Sharma, O. *Plant Taxonomy*, 2da ed.; McGraw-Hill: Nueva Delhi, **2009**.
14. Integrated Taxonomic Information System. *ITIS Standard Report Page: Aloysia citriodora*.
URL:https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=832759&print_version=PRT&source=to_print (accessed May 30, 2017).
15. Pauwels, I.; Gerty, C. *Herbs*, 1st ed.; New Holland Publishing: Cape Town, **2006**.
16. Quattrocchi, H. *CRC World Dictionary of Medicinal and Poisonous Plants*, 1st ed.; CRC Press: Boca Ratón, **2012**.
17. Kubeczka, K. H.; Formáček, V. *Essential Oil Analysis by Capillary Gas Chromatography and Carbon-13 NMR Spectroscopy*, 2nd ed.; John Wiley & Sons: Chichester, **2002**.
18. Roberts, M. *A-Z of Herbs*, 3rd ed.; New Hollan Publishing: Cape Town, **2000**.
19. Siedo, S. *Systemtics of Aloysia (Verbenaceae)*; ProQuest Information and Learning Company: Austin, Texas, **2006**.
20. Thormar, H. *Lipids and Essential Oils as Antimicrobiological Agents*; John Wiley & Sons: Chichester, **2011**.
21. Hunter, M. *Essential Oils: Art, Agriculture, science, industry and entrepreneurship*; Nova Science Publishers: New York, **2009**; Vol. 13, pp 133, 153-133, 154.
22. Smith, R. M. *Retention and Selectivity in Liquid Chromatography: Prediction, Standardisation and Phase Comparisons*, 1era ed.; Elsevier: Leicestershire, **1995**; Vol. 57, pp 97-99.
23. Vogel, A. *A textbook of Practical Organic Chemistry*, 3rd ed.; Longman, **1974**.
24. Poling, B.; Thomson G.; Friend D.; Rowley, R.; Wilding W. *Perry's Chemical Engineers' Handbook*, 8th ed.; McGraw-Hill, **2008**.
25. Adams, R. P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4th ed.; Allured Publishing Corporation: Carol Stream, **2007**.
26. Eloff, J. N. A Sensitive and Quick Microplate Method to Determine the Minimal Inhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria. *Planta Medica* **1998**, 64 (8), 711-713.
27. Anwar, F.; Kamal, G. M.; Sarri, A. I.; Ashraf, M. Y. Yield and chemical composition of Citrus essential oils as affected by drying pre-treatment of peels. *International Food Research Journal* **2011**, 18 (4), 1275-1282.
28. Yasunakaa, K.; Abe, F.; Nagayama, A.; Okabe, H.; Lozada-Perez, L.; Lopez, E.; Estrada, E.; Aguilar, A.; Reyes, R. Antibacterial activity of crude extracts from

Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthenes. *Journal Of Ethno-Pharmacology* **2005**, 97 (2), 293-299.

29. Duarte, M.; Leme, E.; Delarmelina, C.; Almeida, A.; Mara, G.; Sartoratto, A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *Journal of Ethnopharmacology* **2007**, 111 (2), 197-201.
30. Kim, J.; Marshall, M.; Cornell, J.; Preston, J.; Wei, C. Antibacterial Activity of Carvacrol, Citral, and Geraniol against *Salmonella typhimurium* in Culture Medium and on Fish Cubes. *Journal Of Food Science* **1995**, 60 (6), 1364-1368.
31. Onawumi, G. Evaluation of the antimicrobial activity of citral. *Letters In Applied Microbiology* **1989**, 1989 (9), 105-108.

X.ANEXOS

Anexo1: Tabla de composición porcentual del aceite esencial de *Aloysia citriodora* en argentina agrupadas en tres quimiotipos ¹

Compound	Type of lemon verbena oil		
	A	B	C
α -pinene	-	1.4	0.8
sabinene	-	11.2	4.3
1-octen-3-ol	0.1	-	-
myrcene	-	0.4	0.2
β -pinene	-	0.5	0.2
6-methyl-5-hepten-2-one	0.5	0.9	-
p-cymene	-	-	0.1
limonene	10.3	40.3	0.5
1,8-cineole	-	Tr	9.6
2,6-dimethyl-5-heptenal	-	0.5	-
γ -terpinene	-	-	0.1
<i>cis</i> -sabinene hydrate	-	-	1.1
linalool	0.5	-	-
α -thujone	-	-	1.1
β -thujone	0.1	-	73.4
<i>trans</i> -p-menth-2,8-dienol	0.4	0.5	2.4
<i>cis</i> -limonene oxide	0.5	0.5	-
photocitral A	0.4	-	-
<i>trans</i> -limonene oxide	-	1.0	-
<i>trans</i> -verbenol	0.1	-	-
neoisothujyl alcohol	-	-	0.1
citronellal	-	21.6	-
pinocarvone	-	-	1.3
δ -terpineol	-	-	0.2
terpinen-4-ol	-	-	0.4
α -terpineol	0.2	tr	1.8
<i>trans</i> -carveol	-	0.6	-
nerol	1.1	-	-
neral	20.0	3.0	-
carvone	1.0	0.9	0.2
carvotanacetone	-	-	0.1
piperitone	0.2	-	-
geraniol	0.5	-	-
geranial	29.0	4.0	-
neryl acetate	3.0	-	-
geranyl acetate	3.9	-	-
β -caryophyllene	0.7	1.2	0.4
geranyl propionate	0.3	-	-
ar-curcumene	2.6	2.3	-
germacrene D	-	-	0.1
(<i>Z</i>)-nerolidol	0.3	-	-
spathulenol	2.6	0.7	0.1
ar-turmerol	0.4	-	-
caryophyllene oxide	11.1	1.0	0.5
humulene epoxide II	0.2	-	-

Anexo 2: Cromatografía en capa fina del aceite esencial de Aloysia citriodora AE0 y las fracciones AE1, AE2 y AE3.

