



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

Separación, aislamiento y evaluación de actividad biológica de isómeros cis y trans citral de aceite esencial de hierba luisa *Cymbopogon citratus*

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:

Ingenieros en Biotecnología

AUTOR: Norelia Deyaneira Troya Manrique

Andrade Argudo Fabián Israel

TUTOR: Christian Fabricio Larenas Uria

Quito - Ecuador

2023

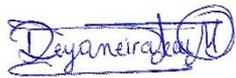
**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Nosotros, Troya Manrique Norelia Deyaneira con documento de identificación N° 1720984911 y Andrade Argudo Fabián Israel con documento de identificación N° 1723626741; manifestamos que:

Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Quito, 02 de agosto del año 2023

Atentamente,



Troya Manrique Norelia Deyaneira

1720984911



Andrade Argudo Fabián Israel

1723626741

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Nosotros, Troya Manrique Norelia Deyaneira con documento de identificación No. 1720984911 y Andrade Argudo Fabián Israel con documento de identificación No. 1723626741, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del Trabajo experimental: “Separación, aislamiento y evaluación de actividad biológica de isómeros cis y trans citral de aceite esencial de hierba luisa *Cymbopogon citratus*”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero en Biotecnología, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 02 de agosto del año 2023

Atentamente,



Troya Manrique Norelia Deyaneira

1720984911



Andrade Argudo Fabián Israel

1723626741

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Christian Fabricio Larenas Uria con documento de identificación N° 1705586046, docente de la Universidad Politécnica Salesiana declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: SEPARACIÓN, AISLAMIENTO Y EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE ISÓMEROS CIS Y TRANS CITRAL DE ACEITE ESENCIAL DE HIERBA LUISA *CYMBOPOGON CITRATUS*, realizado por Troya Manrique Norelia Deyaneira con documento de identificación N° 1720984911 y por Andrade Argudo Fabián Israel con documento de identificación 1723626741, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 02 de agosto del año 2023

Atentamente,



Ing. Christian Fabricio Larenas Uria, PhD

N° 1705586046

Dedicatoria

Este trabajo va dedicado especialmente...

A mis padres, dueños de cada uno de mis logros, motivo esencial de mis esfuerzos, de mis sonrisas y de mi felicidad. Culmino esta etapa de mi vida en honor a ellos y a sus sacrificios constantes para impulsarme diariamente a ser la mujer de la que ellos se sientan orgullosos.

A mi hermana, mi compañera ideal, mi amiga, quien con sus palabras y cuidados me ha dado la guía necesaria para culminar cada etapa de mi vida.

A mi novio por compartir a mi lado esta experiencia con altos y bajos, por recordarme lo valiosa que soy, por protegerme de mis miedos y por darme su tiempo y su amor incondicional, sin duda, la luz de mis ojos.

A mi Pequitas, quien fue un apoyo fundamental en mis días nublados, por haber sido la alegría de mi vida y mi primer amor.

A mi Puchu y mi Pelusa por enseñarme lo que es amar y convertir esos pequeños pasos y esas colitas felices en parte de mi vida.

A cada uno de ellos, porque son quienes me inspiran, me motivan y me enseñan a ser el reflejo de ellos, los seres a los que tanto amo y amaré eternamente.

Norelia Troya M.

A mis padres Marcelo y Begoña, quienes con su paciencia, esfuerzos y apoyo incondicional me han guiado día a día, por darme el ejemplo de perseverancia, responsabilidad, confianza y muchos valores más, ustedes son los pilares fundamentales de lo que hoy en día soy, los amo inmensamente.

A mi hermano por estar en todo momento en este difícil camino, por apoyarme en todas las decisiones tomadas, por brindarme el ánimo para seguir adelante en esta etapa.

A mis abuelos por su constante preocupación y amparo en muchos momentos difíciles de mi vida, a mi abuelita Manuelina que desde el cielo ha seguido cuidándome y guiándome, este logro es para ti.

A toda mi familia y amigos por su paciencia, por su apoyo incondicional, por compartir sus conocimientos y enseñarme la importancia del esfuerzo y dedicación.

A mi novia por creer en mí, brindándome su ayuda y motivación, por guiarme, acompañarme y siempre estar pendiente de mí, tu apoyo y amor es parte de la fuerza que me impulsa día a día.

A mis mascotas por su compañía en todas las noches de desvelo, en especial a Monita, que con su sonrisa, ladridos, besitos y recibimientos calmaba mis tormentos y alegraba mis días.

Fabián Andrade A.

Agradecimiento

Sean mis primeras palabras para agradecer al Hacedor de mi Vida, el Ser Celestial que le da valor y significado a cada uno de mis pasos y mis propósitos.

A la Universidad y mis docentes que han sido el pilar de mi formación académica y determinantes para mi crecimiento personal y espiritual.

A nuestro tutor, el PhD. Christian Larenas, por su valiosa guía, tiempo y su desprendida sabiduría en pos de nuestra formación reflejada en este proyecto.

Al PhD. Paco Noriega por su generosidad y su valioso aporte profesional en la concreción de esta tesis.

Y como agradecimiento especial, a mi familia: mi padre René Troya, mi madre Nohemí Manrique, mi hermana Kathleen Troya, por ser mi incesante motor para cumplir mis sueños y darme el apoyo necesario día a día, a mi novio Sebastián Torres, el hombre que me cambió la vida con su amor y dulzura, y a mí misma, por la constancia frente a los momentos difíciles, la resiliencia que fortaleció mi carácter, el sacrificio que invertí por conquistar mis metas y ambiciones, en definitiva, por creer en mí.

Norelia Troya M.

En primer lugar, agradezco a Dios por ser quien bendice cada uno de mis días, por iluminarme y guiarme por el camino de la verdad y del bien.

Agradezco infinitamente a mi familia por ser quienes se han preocupado de mí, por estar en mis buenos y malos momentos, por confiar en cada paso que he dado, muchas gracias por todo su cariño, apoyo y entrega.

A la Universidad Politécnica Salesiana y a sus prestigiosos docentes por, haberme impartido sus conocimientos en este proceso de formación personal y profesional.

Al PhD. Christian Larenas, tutor de esta Tesis, por sus conocimientos, paciencia, motivación y guía, facultades que permitieron culminar nuestro proyecto.

Al PhD. Paco Noriega por su ayuda profesional e interés en esta investigación.

Y finalmente me agradezco, por no haber perdido la confianza en mí mismo y demostrarme que puedo alcanzar y cumplir todas las metas que me propuse cuando era un niño.

Fabián Andrade A.

Resumen

La investigación realizada tuvo como objetivo evaluar la actividad biológica de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) por medio de sus aceites esenciales (AEs), así como de sus isómeros separados, estas pruebas incluyeron actividad antioxidante y antimicrobiana frente a la bacteria *Pseudomonas fluorescens* causante de varias infecciones en el ser humano, motivo por el cual se evaluaron sus componentes por separado permitiendo determinar el IC50 para cada tipo de aceite (hojas y vainas) obtenido por hidrodestilación. Estos aceites fueron sometidos a pruebas organolépticas y físico químicas, para determinar la composición química se empleó cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) permitiendo encontrar para cada aceite concentraciones diferentes de geraniol (45,72% de hojas y 23,48% para vainas), geranial (19,39% en hojas y 31,99% en vainas) y neral (14,02% en hojas y 21,64 en vainas), permitiendo determinar mediante pruebas estadísticas que estos aceites presentan actividades diferentes, por lo que en las pruebas antioxidantes por DPPH y ABTS se obtuvo como resultado que el AE de hojas presenta mejor efectividad; mientras que para la prueba antibacteriana el test de Duncan denota una diferencia estadística teniendo mejor efectividad el AE de vainas, por otro lado y para esta misma prueba los isómeros de la fracción 2-5 presentaron mejores resultados en la CMI. Los aceites esenciales tanto de hojas como de vainas, indican respuestas biológicas interesantes en relación a la composición química que presentan, permitiendo ser aprovechados para distintos fines en especial medicinales.

Palabras claves: quimiodiversidad, citral, neral, geranial, geraniol, sensibilidad.

Abstract

The objective of the research carried out was to evaluate the biological activity of lemon verbena (*Cymbopogon citratus*) through its essential oils (AEs), as well as its separate isomers, these tests included antioxidant and antimicrobial activity against the bacterium *Pseudomonas fluorescens*, which causes various infections in the human being. human, reason for which its components were evaluated separately allowing to determine the IC50 for each type of oil (leaves and pods) obtained by hydrodistillation. These oils were subjected to organoleptic and physical-chemical tests, to determine the chemical composition, gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) was used, allowing different concentrations of geraniol to be found for each oil (45.72% of leaves and 23.48% for pods), geranial (19.39% in leaves and 31.99% in pods) and neral (14.02% in leaves and 21.64 in pods), allowing to determine through statistical tests that these oils have different activities, so that in the antioxidant tests by DPPH and ABTS it was obtained as a result that the EO from leaves presents better effectiveness; while for the antibacterial test, the Duncan test denotes a statistical difference, with pod AE being more effective, on the other hand, and for this same test, the isomers of fraction 2-5 presented better results in the MIC. The essential oils of both leaves and pods indicate interesting biological responses in relation to the chemical composition they present, allowing them to be used for different purposes, especially medicinal ones.

Keywords: chemodiversity, citral, neral, geranial, geraniol, sensitivity.

Índice de contenidos

1	Introducción.....	1
2	Fundamentación teórica.....	4
2.1	Hierba Luisa (<i>Cymbopogon citratus</i>).....	4
2.1.1	Generalidades.....	4
2.1.2	Aspectos taxonómicos	5
2.2	Aceites esenciales.....	5
2.2.1	Métodos de extracción del aceite esencial	6
2.2.2	Actividad biológica	7
2.2.3	Composición química del aceite esencial	8
2.2.4	Composición química del aceite de hojas	10
2.2.5	Caracterización físico-química del aceite	11
2.3	Actividad antioxidante	12
2.3.1	Métodos de determinación de la actividad antioxidante.....	12
2.3.2	Método ABTS	13
2.4	Actividad antimicrobiana	14
2.4.1	Bacterias Gram positivas	14
2.4.2	Bacterias Gram negativas.....	15
2.4.3	Concentración mínima inhibitoria (CMI)	16
2.5	Técnicas cromatográficas	17
2.5.1	Cromatografía de gases y espectrofotometría de masas	17
2.5.2	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	18

3	Materiales y métodos.....	19
3.1	Recolección del material vegetal.....	19
3.2	Identificación botánica del material vegetal.....	19
3.3	Preparación del material vegetal	19
3.4	Hidrodestilación (Extracción del aceite esencial)	19
3.5	Características fisicoquímicas del aceite esencial	20
3.5.1	Características organolépticas.....	20
3.5.2	Evaluación de su densidad relativa	20
3.5.3	Evaluación del índice de refracción	21
3.5.4	Evaluación del pH.....	21
3.6	Análisis de composición química.....	21
3.6.1	Cromatografía GC-MS en columna apolar	21
3.7	Lectura espectrofotométrica derivada	22
3.8	Actividad antioxidante	24
3.8.1	Método DPPH.....	24
3.8.2	Método ABTS.....	25
3.9	Concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales	26
3.9.1	Preparación de medios	27
3.9.2	Reactivación de cepas bacterianas	27
3.9.3	Preparación del inóculo.....	27
3.9.4	Soluciones de los aceites esenciales.....	28
3.9.5	Preparación del reactivo colorante cloruro de trifeniltetrazolio (TTC)	28
3.9.6	Inoculación en microplacas.....	28

3.10	Bioautografía.....	29
3.11	Separación de los isómeros	30
3.12	Concentración mínima inhibitoria de citral y las fracciones isoméricas de <i>Cymbopogon citratus</i>	31
4	Resultados y discusión.....	33
4.1	Identificación botánica de la planta colectada.....	33
4.2	Extracción y rendimiento del aceite esencial por hidrodestilación	33
4.3	Composición fisicoquímica y calidad de los aceites esenciales.....	34
4.4	Análisis cromatográfico del aceite	36
4.5	Lectura Espectrofotométrica Derivada.....	39
4.5.1	Espectros de segunda derivada	39
4.5.2	Mapa de calor y agrupamiento.....	40
4.5.3	Análisis de componentes principales	42
4.6	Determinación de la capacidad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS.....	43
4.6.1	Resultados de actividad antioxidante por DPPH y ABTS	45
4.7	Determinación de la concentración mínima inhibitoria en aceites (CMI)	47
4.8	Bioautografía antimicrobiana por TLC	49
4.9	Análisis de isómeros obtenidos por HPLC y GC-MS	51
4.10	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de citral y sus fracciones isoméricas.....	53
5	Conclusiones.....	54
6	Recomendaciones	56
7	Bibliografía.....	57

Índice de figuras

Figura 1. Método DPPH (cambio de tonalidad al reaccionar con el sustrato oxidante)	13
Figura 2. Método ABTS (reacción del radical con la molécula antioxidante)	14
Figura 3. Concentraciones para ensayo DPPH	25
Figura 4. Concentraciones para ABTS	26
Figura 5. Distribución de soluciones en los pocillos para la placa CMI de aceites esenciales	29
Figura 6. Distribución de soluciones en los pocillos placa CMI de citral	31
Figura 7. Distribución de soluciones en los pocillos placa CMI de la fracción 1	32
Figura 8. Distribución de soluciones en los pocillos placa CMI de la fracción 2-5	32
Figura 9. Gráfico de barras comparativo en relación a los constituyentes del aceite de hojas y vainas	38
Figura 10. Espectros de segunda derivada: aceite esencial de hojas (h1-h4) y vainas (t1-t4) de <i>Citrus</i> . Intervalo 300-400 nm. Segunda derivada	39
Figura 11. Mapa de calor y agrupamiento de aceite esencial de hojas y vainas con estándar citral. Intervalo 300-400 nm. Segunda derivada	40
Figura 12. Análisis robusto de componentes principales. (PCAr) aceite esencial de hojas, vainas y estándar citral. Intervalo 300-400 nm. Segunda derivada. Varianza explicada 98%	42
Figura 13. Curva de calibración de hojas y vainas para actividad antioxidante	45
Figura 14. Bioautografía directa-TLC de los aehl frente a <i>P. fluorescens</i>	49
Figura 15. Bioautografía directa-TLC de los aehl frente a <i>S.aureus</i>	50
Figura 16. Perfil de HPLC y espectro UV de un patrón de citral	51

Índice de tablas

Tabla 1. Taxonomía de <i>Cymbopogon citratus</i>	5
Tabla 2. Actividades farmacológicas	7
Tabla 3. Componentes del aceite de hojas de hierba luisa	10
Tabla 4. Variación de temperatura para el análisis GC-MS	22
Tabla 5. Concentraciones A B y C para espectrofotometría	23
Tabla 6. Concentraciones D-G con aceites para espectrofotometría	23
Tabla 7. Cálculo del rendimiento del aceite esencial de hojas y vainas	34
Tabla 8. Características fisicoquímicas	34
Tabla 9. Parámetros físicos a 20 °c del aceite esencial <i>C. citratus</i>	35
Tabla 10. Cuadro de componentes mayoritarios en aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i> correspondiente a hojas, vainas y estándar de citral	36
Tabla 11. Capacidad antioxidante del aceite esencial de hojas de <i>C. citratus</i>	43
Tabla 12. Capacidad antioxidante del aceite esencial de vainas de <i>C. citratus</i>	43
Tabla 13. Capacidad antioxidante del aceite esencial de hojas de <i>T. vulgaris</i>	44
Tabla 14. Capacidad antioxidante del aceite esencial BHA	44
Tabla 15. Actividad antioxidante de los aceites esenciales de <i>Cymbopogon citratus</i> stapf con los radicales libres DPPH y ABTS	46
Tabla 16. Test de tukey para DPPH	46
Tabla 17. Test de tukey para ABTS	47
Tabla 18. Análisis de varianza (aceites)	48
Tabla 19. Test de Duncan (aceites)	48
Tabla 22. Componentes obtenidos de la fracción 1 por GC-MS	52
Tabla 20. Análisis de varianza (citrал)	53
Tabla 21. Test de Duncan (citrал)	53

Índice de fórmulas

Fórmula 1. Porcentaje de inhibición.....	13
Fórmula 2. Cálculo de rendimiento AE.....	20
Fórmula 3. Densidad.....	21

Índice de Anexos

Anexos 1. Identificación botánica de la especie vegetal	62
Anexos 2. Análisis estadístico (Shapiro-Wilks) actividad antioxidante con DPPH.....	63
Anexos 3. Análisis de varianza actividad antioxidante con DPPH	63
Anexos 4. Análisis estadístico (Shapiro-Wilks) actividad antioxidante con ABTS.....	63
Anexos 5. Análisis de varianza actividad antioxidante con ABTS	63
Anexos 6. Análisis de varianza (dilución B - aceites)	64
Anexos 7. Test de Duncan (dilución B - aceites)	64
Anexos 8. Análisis de varianza (dilución E - citral).....	64
Anexos 9. Test de Duncan (dilución E - citral)	64
Anexos 10. Bioautografía antimicrobiana para aceites con <i>P. fluorescens</i>	65
Anexos 11. Espectros de masa de fracciones de citral obtenidas por HPLC.....	66

1 Introducción

En los últimos años, las plantas aromáticas, han ocupado un lugar importante en diversas investigaciones médicas al ser un recurso terapéutico de gran impacto por los diversos componentes químicos que poseen y que se han ido descubriendo desde la antigüedad. Las propiedades farmacológicas de estas especies vegetales son desencadenantes esenciales de metabolitos secundarios que al ser una fuente de principios activos a través de sus aplicaciones conducen a la formación de un producto natural y actúan como protectores naturales para la salud humana, esto señala la importancia de la sabiduría ancestral al lograr complementarse con las prácticas biomédicas de la actualidad (Heisler et al., 2015; Huamán et al., 2020).

La hierba luisa, conocida por su nombre científico *Cymbopogon citratus* y comúnmente por otras denominaciones tales como hierba limón, limoncillo, pato de limón, malojillo entre otros, forma parte de la familia Poaceae. Esta es una especie de planta herbácea que tiene la capacidad de cultivarse en la mayor parte de los países tropicales y subtropicales, por lo cual se adapta fácilmente a este tipo de climas, en Ecuador se la puede encontrar con mayor frecuencia en la región litoral y amazónica (Hanna et al., 2012).

El interés por el aceite esencial (AE) proveniente de plantas aromáticas como la hierba luisa, ha experimentado un incremento importante en los últimos años, haciendo hincapié a la quimiodiversidad e importancia biológica que suponen estas esencias, promoviendo respuestas saludables al organismo al ser empleadas como materia prima para distintas industrias (Piedrasanta, 2007), de esta forma las investigaciones por encontrar un método más rápido en la extracción de la sustancia aromática llevan al desarrollo de procesos de destilación obteniendo el aceite esencial para el estudio de las actividades físicas, químicas y bioquímicas de este aroma vegetal (Flores, 2010).

El aceite esencial de esta planta, tiene actividad biológica de gran importancia en la medicina tradicional, resaltándose sus propiedades antifúngicas, antibacterianas, antioxidantes o hasta insecticidas, las cuales son empleadas en distintas aplicaciones de la industria alimentaria y

farmacéutica (Ruktanonchai et al., 2011). Cabe destacar que la esencia de *Cymbopogon citratus* tiene una presencia considerable de citral (3,7-dimetil-2,6- octadienal), una mezcla de isómeros geométricos, E-citral (geranial) y Z-citral (neral), identificándose como el principal componente activo en niveles de 65-85%, lo cual otorga a la planta un característico aroma a limón (Vázquez & Guerrero, 2017; Ruktanonchai et al., 2011; Meier, 2016); sin embargo, es importante mencionar que estos niveles pueden diferir dependiendo de si se trata de aceite extraído de hojas o vainas, esta composición química, así mismo, puede variar por diferentes factores como la interacción con el medio ambiente, el lugar de procedencia de la planta, el método empleado para su extracción junto con el periodo de luz al momento de su recolección (Acevedo et al., 2013a).

En referencia a la actividad antibacteriana de *Cymbopogon citratus*, Fagbemi et al. (2009) y Olorunnisola et al. (2014), señalan que la presencia de los componentes α -citral (geranial) y β -citral (neral) estimulan esta actividad al lograr inhibir a bacterias Gram negativas y Gram positivas (Huamán et al., 2020). Tal es el caso para *Pseudomona fluorescens*, bacteria que es sensible ante la aplicación de aceite esencial de hierba luisa, controlando enfermedades producidas por este tipo de bacterias al determinarse en otros estudios que es un agente antimicrobiano de gran efectividad (C. Ortega & Usca, 2018).

Aun así, existen pocos reportes sobre la composición química del aceite esencial de hojas y sobre todo de vainas de *C. citratus*, tomando en cuenta que sus constituyentes tienden a cambiar en proporción, esta limitante a su vez genera un escaso uso práctico, pues el conocimiento sobre sus modos de acción y los aspectos de aplicación aún son bastante rudimentarios, lo cual retrasa los avances y proyectos biomédicos que se van proponiendo en torno a esta especie vegetal (Leyva et al., 2007). En forma general, la problemática tiene origen en los métodos extractivos y de análisis, al no tener los rendimientos esperado del aceite (Domingo, 1949).

En la investigación realizada por Gallegos Zurita, (2017) en el Ecuador, se menciona que existe muy poco conocimiento de la gran producción de metabolitos secundarios obtenidos de estas, así como su potencial en el área de aplicaciones biomédicas, dado que existe una muy baja tasa de extracción de

aceites que tengan una calidad y pureza necesarias para distintas evaluaciones a nivel de laboratorio dentro del país, por lo tanto Cárdenas & Farfán, (2021) concuerdan que las características de esta planta por medio del aceite esencial brinda actividad antimicrobiana y propiedades antioxidantes, por este motivo se pretende impulsar el estudio e investigación para su aplicación en áreas biomédicas.

Actualmente el Centro de Investigación AgroBioTech publicó un estudio en el que se identificaron los compuestos principales del aceite de hierba luisa obtenido de forma comercial, arrojando un valor alto en cuanto a citral (79,69 %) que a su vez se dividió en dos sustancias mayoritarias: geranial (42,86 %) y neral (39,83 %), este perfil químico se determinó a partir de un cromatógrafo de gases debidamente acoplado a un espectrómetro de masas, mientras que, (Valkova & Hana, 2022) empleó el ensayo de eliminación de radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) para poder medir la actividad antioxidante, siguiendo esta línea (Granados Conde, Yáñez Rueda, & Santafé Patiño, 2012) realizaron la extracción del AE por destilación por arrastre con vapor de agua, así como su identificación con Cromatografía de Gases de Alta Resolución.

Siguiendo esta línea investigativa, en este trabajo se pretende analizar la actividad biológica de isómeros cis y trans citral de dos tipos de aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*), específicamente de hojas y de vainas, extraídos de plántulas frescas colectadas en una finca de San Miguel de los Bancos, provincia de Pichincha. Aplicando la metodología de separación cromatográfica que nos permite identificar los diferentes quimiotipos presentes en el aceite esencial, se podrán obtener las fracciones isoméricas de interés para este proyecto y junto con la evaluación de su actividad antioxidante y la concentración mínima inhibitoria para *Pseudomonas fluorescens*, se obtendrán resultados favorables partiendo de la hipótesis en la que estos isómeros posean actividad antioxidante y biológica de forma homóloga.

2 Fundamentación teórica

2.1 Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus*)

2.1.1 Generalidades

Cymbopogon citratus también conocida como hierba luisa, limoncillo, hierba limón, entre otros, presenta características muy particulares, es una planta aromática con un fuerte olor a limón, se considera robusta al poseer la capacidad de propagarse por esquejes y puede subsistir por más de 2 años al ser perenne (Vázquez & Guerrero, 2017). Esta especie, puede crecer hasta los 3m de altura, presentar rizomas cortos, lucir hojas erectas con vainas muy ramificados y contener glabras planas de 1m de largo y de 5 a 15 mm de ancho (Rojas et al., 2012). Esta planta generalmente no florece; sin embargo, cuando presenta este órgano vegetal se forma como racimos al reunirse en espiguillas de 30-60 cm de longitud (Valverde, 2015^a)

Cymbopogon citratus tiene una característica muy particular debido a su aroma, pues al ser frotada, esta emite un fuerte olor a limón, razón por la que es muy reconocida para su uso, esta hierba al ser estrujada o exhala, emite un fuerte “aroma a limón o alimonado” (Cusme & Tacuri, 2022).

Históricamente, se conoce que la hierba luisa, es una planta arbustiva nativa del Sureste Asiático, específicamente en la India, Ceilán y Malasia; para el siglo XVII ya se introdujo en Europa y actualmente su cultivo se ha propagado en la mayoría de países en el mundo, pues en la actualidad crece alrededor del mundo y se cultiva ampliamente en regiones tropicales y sabanas de África, Asia y América (Morales, 2020; Cruz, 2007). La hierba luisa, se encuentra especialmente en países como Sri Lanka, Taiwán, Guatemala, Honduras, Indonesia y Brasil, cultivándose como planta medicinal (Estrada et al., 2021).

En las zonas tropicales y subtropicales, incluyendo las Islas Canarias, a esta especie vegetal, se le da un aprovechamiento constante de sus propiedades ornamentales y medicinales (Cruz, 2007), puesto que son climas adecuados para su desarrollo, tomando en cuenta la tolerancia media al frío que tiene esta planta (La Mano Verde , 2022). Así mismo, al ser una especie aromática es muy empleada en

distintos sectores de la sociedad; como la industria cosmética, alimenticia, farmacéutica, etc (Gómez & Tito, 2017).

2.1.2 Aspectos taxonómicos

Según Ortiz et al., (2022), la hierba luisa se puede identificar taxonómicamente según se describe en la Tabla 1.

Tabla 1. Taxonomía de *Cymbopogon citratus*

Reino	Cormobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Liliatae (Liliopsida)
Sub-clase	Commelinidae
Orden	Cyperales
Familia	Poaceae / Gramíneas
Género	<i>Cymbopogon</i> Spreng
Especie	<i>citratus</i> Stapf

Fuente: (Ortiz et al., 2022).

2.2 Aceites esenciales

Los aceites esenciales (AEs) son líquidos oleosos y característicamente aromáticos de aspecto fluido o espeso, su color varía dependiendo el tipo de planta del que se realiza la extracción; así mismo, son mezclas de carácter muy complejo desde un punto de vista cuantitativo y cualitativo, dado que se presentan según sea el caso un número incrementado de componente individuales (Dellacassa et al., 2008).

Este tipo de esencias, son segregadas por células que se encuentran en distintas partes de las plantas como hojas (albahaca, moringa, menta piperita), flores (jamaica, lavanda), raíces (zingiber, valeriana, bardana) o semillas (linaza, girasol, cilantro) (HEVEA, 2015).

Los aceites esenciales son diversos y actúan como mensajeros químicos que las plantas aromáticas los usan para lograr interactuar con el entorno en el que viven, permitiendo que puedan actuar como protectores al alejar a los parásitos, frenando enfermedades y protegiéndolas de los rayos del sol; así mismo, son benéficos para el desarrollo de la propia planta interviniendo en procesos importantes de la reproducción, dispersión de especies vegetales y colaborando a la polinización (HEVEA, 2015).

2.2.1 Métodos de extracción del aceite esencial

La extracción de un aceite esencial es el proceso que se le da a las especies vegetales para poder aislar o separar esta sustancia aromática de la planta o materia prima a través de distintas técnicas que varían dependiendo la parte de la planta que se trata, su fragilidad o inestabilidad al proceso y sus características botánicas (Valverde, 2015a).

En *Cymbopogon citratus*, tomando en cuenta el uso de sus hojas y vainas, según el método extractivo, se puede obtener un rendimiento de aceite esencial alrededor de 0.2 – 0.4%, pudiendo alcanzar niveles de hasta 5.0% (Gómez & Tito, 2017).

2.2.1.1 Extracción por hidroddestilación por arrastre de vapor

Este método es considerado uno de los más habituales para extraer aceites esenciales y la razón es que su operatividad es fácil y el producto obtenido es de alta calidad. Esta técnica se basa en volatilizar los líquidos inmiscibles por medio de una corriente directa de vapor de agua a temperaturas más bajas a las de ebullición de cada componente volátil (Armijo et al., 2012). De esta forma, el vapor y el aceite esencial obtenido son condensados y separados pues ambos componentes ejercen su propia presión de vapor (Cerutti & Neumayer, 2004).

2.2.1.2 Prensado en frío

Esta técnica es específica para cítricos, de esta manera es posible extraer un aceite esencial con características odoríferas excelentes partiendo del pericarpio de las cáscaras de estos frutos como limón, naranja, toronja, lima, entre otros. En este caso, se emplean prensas hidráulicas, para conseguir separar seguidamente el aceite esencial de la pulpa en una centrifugadora (HEVEA, 2015).

2.2.1.3 Extracción con solventes volátiles

Este tipo de extracción permiten extraer la esencia teniendo una muestra molida y seca que entra en contacto con solventes como cloroformo o alcohol, permitiendo solubilizar el aceite; sin embargo, no es un proceso útil para obtener un producto puro, debido a que también se separan grasas y ceras. Así mismo, es una técnica que se centra en actividades a pequeña escala como de laboratorio, pues es costoso llevarlo a escala industrial (M. Rodríguez et al., 2012).

2.2.2 Actividad biológica

Los distintos componentes que se encuentran de forma activa en la esencia de *Cymbopogon citratus* como el linalol, citral, neral, citronelol, etc, cumplen un rol primordial en el área de la salud, según se detalla en la Tabla 2.

Tabla 2. Actividades farmacológicas

Actividad farmacológica	Componente bioactivo	Referencia
Actividad antioxidante	Se ha logrado determinar que los componentes flavonoides estabilizan las especies reactivas de oxígeno y actúan como eliminadores de radicales libres, demostrando que esta especie tiene propiedades antioxidantes.	(Fernández et al., 2020).
Actividad antifúngica	Se puede atribuir a componentes como el citral, γ -mirceno, linalol y geraniol encontrados en el aceite esencial, porque provoca la muerte de hongo al inhibir la germinación y desarrollo del micelio.	(Boukhatem et al., 2014) Citado por (Enríquez et al., 2023).

Continuación Tabla 2

Actividad antibacterial	Esta propiedad se confiere en virtud de tres compuestos principales del aceite esencial de hierba luisa: el α -citral, mirceno y el β -citral que de forma individual pueden inhibir bacterias Gram positivas y negativas con gran eficiencia. Por su parte, el neral, mirceno, geraniol y citronelol, se pueden emplear en afecciones de la piel, disminuyendo la actividad de varias cepas de dermatofitos.	(Ekpenyong et al., 2015) Citado por (Enríquez et al., 2023). (Morillo e Ibarra, 2018) Citado por (Enríquez et al., 2023).
-------------------------	--	---

Fuente: (Enríquez et al., 2023; Fernández et al., 2020).

2.2.3 Composición química del aceite esencial

La composición química del aceite esencial puede variar a diferentes factores en los que se encuentre la especie vegetal, es decir, factores ambientales, características del cultivo, así como el tiempo de su cosecha (C. Ruiz et al., 2015), se puede determinar mediante el empleo de la técnica de cromatografía de gases – espectroscopía de masas, los reportes sobre la composición química del aceite esencial de hojas y vainas de *C. citratus* (Valverde, 2015b) se clasifican en:

2.2.3.1 Terpenoides

Son el conjunto de sustancias más difundidas de los grupos fitoquímicos que proceden de la condensación del isopreno y de un hidrocarburo de 5 átomos de carbono con o sin la presencia de oxígeno, estos compuestos pueden tener un origen biosintético común y presentar estructuras químicas variadas (López et al., 2012), así como incluir todas las sustancias químicas derivadas del ácido mevalónico (Palá, 2005).

2.2.3.2 Monoterpenos

Estos se caracterizan por poseer 10 átomos de carbono y dos unidades de isopreno, así como una gran variedad de hidrocarburos, alcoholes, aldehídos y otros compuestos oxigenados que abarcan una gran cantidad de isómeros funcionales, de posición y geométricos (Palá, 2005).

Los monoterpenos pueden ser acíclicos (mirceno, ocimeno), monocíclicos (α y γ -terpineno, ρ -cimeno), bicíclicos (pineno, canfeno, sabineno, β -cadineno) y tricíclicos (α -santaleno) (Luminar, 2013), dependiendo de las uniones que presenten, se conocen como monoterpenos regulares (cabeza-cola) cuando se une el carbono 1 de la primera unidad de IPP y el carbono 4 de la segunda, mientras que los monoterpenos irregulares (cabeza-mitad) se da por la unión del carbono 1 de la primera unidad de isopreno y el carbono 2 o 3 del segundo (Palá, 2005).

2.2.3.3 Sesquiterpenos

Su estructura se caracteriza por poseer 15 átomos de carbono y tres unidades de isopreno (cabeza-cola) (Palá, 2005), que se unen formando cadenas hidrocarbonadas alifáticas abiertas junto con sistemas cíclicos (Almeida & Suárez, 2014).

Los sesquiterpenos presentan gran variabilidad natural encontrando hidrocarburos, alcoholes, cetonas y sus derivados como los ésteres, glicósidos y alcaloides sesquiterpénicos. Al poseer una unidad de isopreno más adquiere mayor plasticidad, por lo que su variabilidad estructural y funcional se incrementa, debido a esto y al número de anillos en la molécula se pueden agrupar en acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos y tetracíclicos (Palá, 2005).

2.2.3.4 Diterpenos

Es un compuesto de 20 átomos de carbono con cuatro unidades de isoprenos, su peso molecular es mayor y su volatilidad menor, debido a esto su extracción por arrastre de vapor se dificulta, razón por la cual no son considerados como componente del aceite esencial, aunque se pueden encontrar derivados del labdano y del esclareol (Palá, 2005).

2.2.4 Composición química del aceite de hojas

Los componentes principales del aceite esencial de hojas de la especie en estudio forman parte del grupo de los monoterpenoides que son los más predominantes, tal y como se indican en la Tabla 3.

Tabla 3. Componentes del aceite de hojas de Hierba luisa

Monoterpenos	Porcentaje
<i>β-mirceno</i>	1.07
<i>citronelal</i>	3.07
<i>citronelol</i>	1.68
<i>neral o citral B</i>	18.77
<i>trans-geraniol</i>	31.55
<i>geranial o citral A</i>	31.23
<i>cis-geraniol o nerol</i>	1.98

Fuente: (D'Armas et al., 2018).

2.2.4.1 Isomería α -citral (geranial)

Conocido como α – citral o trans citral A

Este es un monoterpenoide (2E, 6E)-octa-2, 6-dienal, el cual es sustituido por grupos metilo en las posiciones C - 3 y 7, su importancia incluye el ser un metabolito de la planta y otorgarle una característica volátil al aceite (Poveda et al., 2023).

2.2.4.2 Isomería β -citral (neral)

También conocido como β – citral o cis citral B

Es un enal 3,7 dimetiloctanal, presenta insaturaciones en las posiciones C -2 y 6, este es aislado por su acción como inductor de la apoptosis, al ser aislado se lo identifica por su coloración amarillo

pálido y por su olor a limón, es menos denso e insoluble en agua, es utilizada para la elaboración de diferentes productos químicos de interés médico, su ingestión es toxica (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, 2013).

Es soluble al alcohol al 60% (benzoato de bencilo, dietil ftalato, glicerina, propilenglicol y aceite mineral), presenta solubilidad de 1mL en 7mL a 70% de alcohol.

El citral tiende a ser un compuesto que facilita su absorción, ya sea por vía oral o por vía dérmica, la variación comprende en su excreción que puede ser urinaria o fecal, es decir, el citral presenta un metabolismo rápido y extenso, lo que le permite inducir por lo menos una vía de su propio metabolismo, por lo que, no tiende a producir una bioacumulación significativa en el organismo (Poveda et al., 2023).

2.2.5 Caracterización físico-química del aceite

Los aceites esenciales se caracterizan por la coloración que presentan, estas van desde tonalidades amarillas claras hasta un amarillo intenso u oscuro, presentan elevada afinidad por los disolventes orgánicos y alcoholes, su solubilidad es baja al ser expuesta al agua; la densidad es obligatoriamente menor a la del agua (Maricela & Calva, 2019); su índice de refracción es alta, esto debido a la relación existente entre la velocidad de la luz en el vacío, misma que se presenta en forma de onda electromagnética y la velocidad de luz a través de la sustancia, es decir la relación existente entre aire y sustancia (A. Gutiérrez, 2020).

La calidad de los aceites esenciales está determinada por su composición química, características fisicoquímicas y organolépticas. Por esta razón, la farmacopea europea, octava edición, en sus normas señalan que los parámetros analíticos utilizados en el control de calidad de los aceites deben ser los siguientes:

- Características organolépticas
- Determinación del índice de refracción
- Densidad relativa

- Solubilidad en agua y alcohol (Pauli & Schilcher, 2015).

2.3 Actividad antioxidante

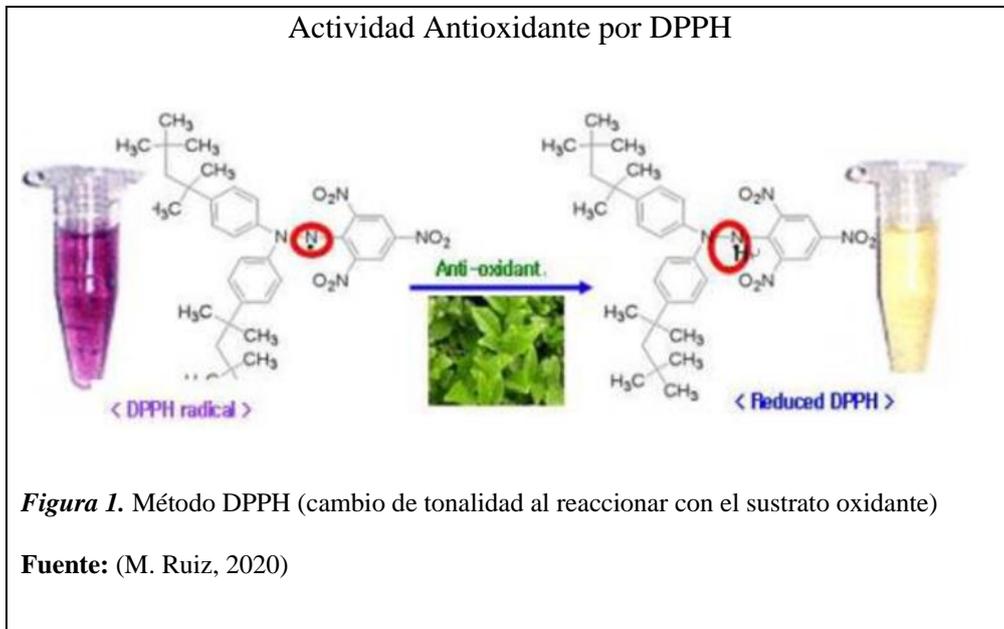
Depende en gran parte de la composición química de los aceites esenciales, es decir, al poseer el contenido de metabolitos secundarios altos, ésta presentará una elevada actividad antioxidante por la acción de los fenoles e hidrocarburos terpénicos, mismos que se encargan de inhibir la oxidación (Marín, 2015), es decir, los antioxidantes son sustancias que ayudan a retardar la acción de los radicales libres como el oxígeno o el nitrógeno, estos radicales libres se definen como una especie química cuya estructura atómica carece de un electrón, estos pueden dañar casi cualquier molécula del cuerpo, debido a su gran facilidad para unirse a otras moléculas (Guerrero & Pozo, 2016).

Actualmente se sabe que γ -terpineno retarda la peroxidación del ácido linoleico y que los fitoconstituyentes de algunos aceites esenciales atrapan el catión-radical 2,2'-azinobis- (3-etilbenzotiazolina-ácido sulfónico) ABTS⁺ y del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo DPPH mejor que los antioxidantes sintéticos como el caso de la vitamina E, el trolox y el ácido ascórbico (Guerrero & Pozo, 2016).

2.3.1 Métodos de determinación de la actividad antioxidante

2.3.1.1 Método DPPH

El DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) fue propuesto por Blois en 1958, este método consiste en la captación de radicales libres por la aceptación de un electrón o un átomo de hidrógeno por la molécula 1,1-difenil-2picrilhidrazina, en solución etanólica presenta una coloración violeta, misma que a una longitud de onda de 517 nm, permite la medida de la absorbancia. La solución DPPH al reaccionar con el sustrato antioxidante cambia de tonalidad, su coloración violeta tiende a desvanecerse y adoptar una coloración amarilla, siendo esta característica de las propiedades antioxidantes de la muestra analizada (M. Ruiz, 2020).



2.3.2 Método ABTS

Este método fue propuesto por Miller y colaboradores en 1993 como un método para medir la capacidad antioxidante de fluidos corporales y soluciones farmacológicas, actualmente este método presenta varios usos en cuanto a materiales biológicos, compuestos puros o extractos vegetales de naturaleza hidrófila o lipófila que permite evaluar la actividad antioxidante mediante la formación del radical $ABTS^+$ partiendo de ABTS (2,2'-azinobis- (3-etilbenzotiazolina-ácido sulfónico)) con persulfato de potasio, se lo deja en reposo a temperatura ambiente por un lapso de 16 horas, posteriormente el radical formado se ajusta de $0,700 \pm 0,200$ a 734nm con ayuda del espectrofotómetro (Kuskoski et al., 2004). Se hace reaccionar el radical con la molécula antioxidante donadora de hidrógeno para medir su absorbancia a 734nm para calcular su porcentaje de inhibición mediante la siguiente Fórmula 1:

Fórmula 1. Porcentaje de inhibición

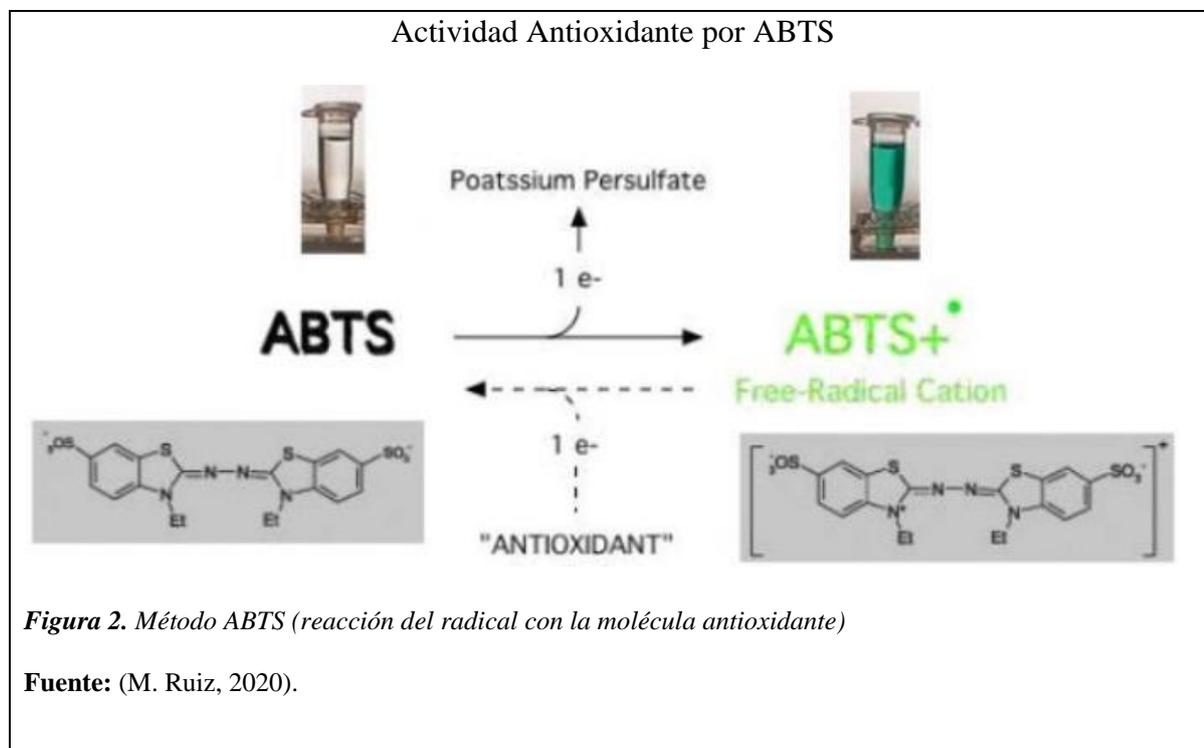
$$\% \text{ Inhibición } ABTS^+ = \frac{Ab - Am}{Ab} \times 100$$

Fuente: (Ojeda & Calderón, 2022).

Teniendo así:

Ab= Absorbancia del blanco

Am= Absorbancia de la muestra (Ojeda & Calderón, 2022).



2.4 Actividad antimicrobiana

La capacidad antibacteriana de una sustancia se basa en la medición de su efecto inhibitorio expuesto a un microorganismo determinado, siendo estos Gram positivos y Gram negativos, mediante la técnica de microdilución en caldo, su evaluación dependerá de la preparación del inóculo, medio de cultivo, así como la temperatura y el tiempo de incubación, para esto se utiliza cepas certificadas (Calderón & Ojeda, 2022).

2.4.1 Bacterias Gram positivas

Se distinguen por su facilidad para teñirse de azul oscuro o violeta aplicando la técnica de tinción Gram. Estas bacterias no poseen una membrana externa que proteja el citoplasma bacteriano, aunque poseen una pared celular gruesa formada por peptidoglicano, esta estructura interfiere en procesos como la fagocitosis y alterar el sistema inmune, por este motivo el empleo de una cepa de

Staphylococcus aureus permitirá comprobar la actividad antimicrobiana del aceite esencial en estudio (Rodríguez & Arenas, 2018).

2.4.1.1 *Staphylococcus aureus*

Desde su descubrimiento por el médico Alexander Ogston en 1880, *Staphylococcus aureus* es considerado un patógeno con gran potencial para causar múltiples infecciones en el humano y en los animales. *S. aureus* es considerada la más virulenta, responsable de un amplio espectro de enfermedades, que van desde infecciones de la piel y tejidos blandos hasta infecciones graves que amenazan con la vida. A través de los años se ha incrementado la tasa de morbilidad y mortalidad a pesar del gran número de antibióticos disponibles que existen. *S. aureus* forma parte de la flora normal del humano, entre 25 y 50% de la población sana está colonizada por esta bacteria, constituyendo un riesgo por su diseminación. Éste puede ser adquirido a través del contacto con otras personas o por exposición al ambiente (Cervantes et al., 2014).

2.4.2 Bacterias Gram negativas

Aplicando la tinción Gram, estas bacterias sufren decoloración y retienen la safranina (Rodríguez & Arenas, 2018), esto se debe a la estructura de su envoltura celular al presentar dos membranas lipídicas que envuelven una fina pared celular formada por peptidoglicano, el empleo de este tipo de bacterias se debe a su capacidad de producir endotoxinas, mismas que son causantes de varios cuadros patógenos, por lo que, esta investigación busca comprobar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* frente a la actividad patógena de *Pseudomonas fluorescens* (Díaz et al., 2021).

2.4.2.1 *Pseudomonas fluorescens*

Es un bacilo Gram negativo cuya fisiología es considerada como una bacteria oportunista, suele ser encontrada en hábitats terrestres, materia orgánica, en la superficie de las raíces y hojas, estas generan afectaciones a la salud y nutrición de las plantas debido a su actividad enzimática al producir degradación aeróbica por la producción de metabolitos tales como sideróforos, antibióticos, compuestos volátiles, enzimas y fitohormonas (Pérez et al., 2015).

Se ha demostrado que *Pseudomonas fluorescens*, es una bacteria con un gran potencial para causar infecciones oportunistas (IO) de carácter agudo en humanos, encontrándose en muestras de sangre, hueso, fluidos cerebrospinales, ojos, pulmones, piel (herida), útero entre otros, siendo el más común el torrente sanguíneo y muchos de estos casos se los atribuye al uso de equipos contaminados en infusiones intravenosas (Scales et al., 2014).

Por otro lado, este bacilo no es patógeno en animales, pues al aplicarse experimentalmente en zonas subcutáneas y en la cavidad peritoneal no ha generado reacciones, así mismo, la ingesta de cultivos bacterianos en animales no ha provocado daños en intestino o estómago (Scales et al., 2014; Kahli et al., 2022).

La capacidad de persistencia de este microorganismo es amplia en una variedad de entornos que van más allá de sus propios huéspedes, incluyendo superficies de suelo, paredes, plantas, rizosferas, además de artículos farmacéuticos y de laboratorio no estériles, esto se debe a las condiciones de frío en las que este bacilo puede prevalecer, teniendo una mayor ventaja frente a otras poblaciones bacterianas (Picot et al., 2001).

2.4.3 Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Permite determinar la concentración de antibiótico necesaria para inhibir el crecimiento de un patógeno, por lo que el valor de CMI generalmente es la concentración más baja (expresada en µg/mL), al ser un método cuantitativo de sensibilidad, nos permitirá elegir el mejor tratamiento aumentando las posibilidades de éxito y reduciendo la resistencia a antibióticos.

La CMI se interpreta según su sensibilidad de forma cualitativa o en función de su concentración, es decir, de forma cuantitativa, teniendo así que según IDEXX, (2022), la clasificación se establece de la siguiente manera:

- S (Sensible): El crecimiento del microorganismo se encuentra inhibido utilizando la concentración y dosis del fármaco recomendada.

- I (Intermedia): el crecimiento del microorganismo se encuentra inhibido aplicando la dosis máxima permitida.
- R (Resistente): el microorganismo es resistente a los niveles más altos del fármaco

Por su parte, Baser & Buchbauer, (2015) propusieron una categorización en cuanto a la concentración inhibitoria obtenida experimentalmente, siendo: muy fuerte (MF) $CMI < 500 \mu\text{g/mL}$, fuerte (F) $CMI \geq 500$, moderado (M) $500 > CMI < 5000$, débil (D) $5000 > CMI < 20000$ y ausente (A) $CMI > 20000$.

2.5 Técnicas cromatográficas

La cromatografía es una técnica analítica de separación, identificación y cuantificación de compuestos presentes en muestras como los aceites esenciales, la separación de los solutos se ve influenciada por la velocidad de desplazamiento al ser arrastrados por la fase móvil a través del lecho cromatográfico de la parte interior de la fase estacionaria, es decir, el aceite esencial (muestra) se disuelve en la fase móvil para pasar a la fase estacionaria que al mantenerse fija sobre la columna de superficie plana distribuirán la muestra entre las dos fases, teniendo así que los compuestos retenidos en fase estacionaria se moverán lentamente sobre el flujo de la fase móvil, por el contrario, los componentes que no han sido retenidos en fase estacionaria se moverán con rapidez en la fase móvil (Flores, 2010).

2.5.1 Cromatografía de gases y espectrofotometría de masas

La cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas es una técnica analítica poderosa, que permite la separación e identificación de los componentes de una muestra en el tiempo y brinda información estructural acerca de los analitos (Valverde, 2015), es decir, la mezcla del compuesto es inyectada en el cromatógrafo de gases, para ser separada por la columna cromatográfica y obtener la elución de los componentes aislados que al pasar por el espectrómetro de masas los registrará en forma de picos cromatográficos identificando así el espectro respectivo para cada componente, además permite registrar la corriente iónica total generada debido al detector cromatográfico representada en la gráfica del cromatograma o TIC (Gutiérrez & Droguet, 2002).

2.5.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica analítica que se encarga de separar mezclas complejas de sustancias de diferente origen como los aceites esenciales, con la finalidad de identificarlas, cuantificarlas y purificarlas, siendo de esta manera una de las técnicas de purificación más versátiles y fiables en la investigación de sustancias de origen vegetal, ya que detecta metabolitos farmacológicamente significativos que se serán aplicados a pruebas químicas bioquímicas y en clínica. Su método consiste en una fase móvil, misma que transporta la muestra (sólida o líquida) hacia la fase estacionaria en donde se retendrá y se separará cada componente de la muestra debido a las fuerzas químicas y físicas que actúan sobre la muestra en estudio, por lo que, los componentes más afines a la fase estacionaria presentan un desplazamiento de menor velocidad en comparación con aquellos que no presentan afinidad con dicha fase (Suarez & Morales, 2018).

Entre sus ventajas se evidencia:

- Su amplia aplicabilidad y disponibilidad de equipos y columnas que permiten el análisis de cualquier muestra.
- La precisión en los resultados.
- La fácil manipulación de los gradientes generados en la fase móvil.
- La sencilla recolección de los compuestos separados (Suarez & Morales, 2018).
- Su alta reproducibilidad para análisis cuantitativos.
- La detección sensible, debido a su poder de separación.
- Su manejo es automatizado y personalizado y flexible (Dong & Llanas, 2013).

3 Materiales y métodos

3.1 Recolección del material vegetal

Se recolectó 50Kg de material vegetal (hierba luisa – *Cymbopogon citratus*) en la finca San Augusto ubicada en el kilómetro 107 1/2 vía Calacalí la Independencia, en el Cantón Pedro Vicente Maldonado, perteneciente a la provincia de Pichincha, en las coordenadas 0°04'27"N 78°58'46"W con precisión horizontal y en elevación de 10m. Se colectaron las hojas y vainas de plantas cuya altura aproximada es de 1m para su correspondiente destilación.

3.2 Identificación botánica del material vegetal

Se trasladó al Herbario de la Universidad Politécnica Salesiana, sede Girón, una plántula de *Cymbopogon citratus*. Se procedió a la elaboración de un voucher de la especie, para esto, las muestras fueron secadas empleando una estufa y se colocaron en láminas de cartulina con una ficha de identificación, la cual indicaba la descripción botánica de la especie y familia a la que pertenece, zona de recolección de la planta, y coordenadas del lugar. De esta forma fueron identificadas a nivel de especie realizando una comparación con vouchers de la colección del Herbario.

3.3 Preparación del material vegetal

Todas las plantas recolectadas fueron trasladadas a los laboratorios Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana sede Quito, Campus El Girón y depositadas en el área de refrigeración para su conservación hasta su uso. Para dar paso a la hidrodestilación, se preparó con anticipación el material vegetal, esto consistió en acomodar todas las muestras de forma horizontal en una superficie plana, tomando en cuenta que las hojas estuvieran en una sola dirección, de esta forma se facilitó la separación de sus vainas con ayuda de una tijera de podar, además se dividió del resto de las muestras las partes de la planta que se encontraban secas o afectadas por algún tipo de plaga o enfermedad y se desecharon. Este proceso fue sustancial para la extracción del aceite esencial.

3.4 Hidrodestilación (Extracción del aceite esencial)

La obtención del aceite esencial se llevó a cabo por arrastre de vapor o hidrodestilación. Para esto se pesó 8 kg de material vegetal (hojas) y se colocó dentro del destilador de capacidad de 60L, el tiempo

de espera para la obtención de la primera gota fue de 2 horas y el proceso de destilación fue de 4 horas. Posteriormente se pesó 5 kg de vainas realizado el procedimiento descrito anteriormente. El destilado obtenido consta de una fase acuosa y otra oleosa, misma que se colocó en un embudo de separación de 100 mL para decantar el hidrolato del aceite. Se obtuvieron un total de 108.4 mL de aceite esencial de hojas y 16.2 mL de aceite esencial de vainas, mismos que fueron almacenados en frascos ámbar a 4°C hasta su posterior uso.

El cálculo del rendimiento fue obtenido mediante la siguiente Fórmula 2:

Fórmula 2. Cálculo de Rendimiento AE

$$\% \text{ de Rendimiento AE} = \frac{\text{Vol. aceite esencial (g)}}{\text{Peso de material vegetal (g)}} \times 100$$

Fuente: (Calderón & Ojeda, 2022).

3.5 Características fisicoquímicas del aceite esencial

3.5.1 Características organolépticas

Estas características son evaluadas mediante percepción de los sentidos, se empieza con la toma de una alícuota de cada aceite esencial, se coloca una gota del mismo sobre la yema del dedo, esto permite a través del sentido del olfato detectar e identificar las sustancias químicas volátiles disueltas en el aire que componen al aceite de hierba luisa, tanto de hojas como de vainas, otorgándole una fragancia muy particular de tipo alimonado, con esta misma prueba se puede determinar otra característica, esta incluye frotar los dedos permitiendo sentir su textura de tipo aceitosa y agradable al tacto, posteriormente se puede probarlo para determinar su sabor, finalmente para la evaluación del color, se deposita una pequeña alícuota de aceite sobre una placa porta objetos, esto permite su correcta interpretación (Quintas, 2021).

3.5.2 Evaluación de su densidad relativa

Se realiza mediante la utilización de un picnómetro, mismo que es pesado en vacío, posteriormente pesado con agua y finalmente pesado con la muestra (aceite esencial), estos resultados son expresados en la siguiente Fórmula 3:

Fórmula 3. Densidad

$$Densidad = \frac{\text{peso picnómetro con muestra (g)} - \text{peso picnómetro vacío}}{\text{peso picnómetro con agua (g)} - \text{peso picnómetro vacío}}$$

Fuente: (Calderón & Ojeda, 2022).

3.5.3 Evaluación del índice de refracción

Se emplea un refractómetro Abbe PCE-ABBE-REF 2, para su ajuste, se emplea una gota de agua destilada, se selecciona la zona de espectro visible, se limpia y se añade la gota de muestra (aceite esencial) en el prisma, se cierra y lee el porcentaje y su grado brix. El proceso se realiza por triplicado (Quintas, 2021).

3.5.4 Evaluación del pH

La medición de pH fue realizada mediante el uso de tiras de pH universal test paper, mismas que son introducidas en cada frasco ámbar humedeciendo la tira de pH. El proceso se realiza por triplicado (Quintas, 2021).

3.6 Análisis de composición química

3.6.1 Cromatografía GC-MS en columna apolar

Los aceites esenciales de hojas y vainas fueron analizados mediante GC-MS empleando el método de (Scalvenzi et al., 2017). La preparación de las muestras consistió en diluir 10 µL de cada aceite en 990 µL de Metanol, por lo cual, se empleó el sistema GC-MS Bruker cromatógrafo modelo 436 SCION® acoplado a un detector de masas triple cuadrupolo modelo TQ-EVOQ, el volumen de inyección fue de 2 µL. Se empleó una columna BR-5ms marca Bruker (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano), de 30m de longitud x 0,25mm de diámetro interno, 0,25 µm de espesor de película, la temperatura máxima de análisis fue de 350°C, el gas transportador utilizado fue helio (99,99%) en una tasa de flujo de 1mL/min con un radio de Split de 1:50 (Osorio, 2020b). La variación de temperatura se detalla en la Tabla 4.

Tabla 4. Variación de temperatura para el análisis GC-MS

<i>Temperatura inicial</i>	<i>Aumento</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Temperatura final</i>
50°C	1°C/min	50min	100°C
100°C	5°C/min	30min	250°C
250°C	-	10min	250°C
Total del Análisis		90min	

Fuente: (Osorio, 2020b)

Las condiciones del espectrómetro de masas aplicadas fueron:

- Corriente de emisión: 10 μ Amp
- Energía de ionización: 70 eV
- Rango de masas: 35-400 Da
- Tasa de escaneo: 1 scaneo/segundo
- Temperatura de línea de transferencia: 260°C
- Temperatura de la trampa: 220°C

La identificación de los diferentes componentes se logró por la comparación de los espectros de masas incluidos en librerías WILEY-NIST 2009 y Adams 2017 mismas que contienen los componentes de aceites esenciales, estos análisis se obtuvieron mediante el software MS_Workstation de Bruker con integración al NIST-MS-Search (Osorio, 2020b).

3.7 Lectura espectrofotométrica derivada

Se prepararon 7 soluciones distintas, etiquetadas de la A – G, las soluciones A-C con 5 diluciones y de la D-G 4 diluciones distintas, los reactivos empleados en cada una fueron; solución A, citral y n-heptano; solución B, aceite esencial de hojas y n-heptano; solución C, aceite de vainas y n-heptano; solución D, citral, aceite de hojas y n-heptano; solución E, citral, la concentración del aceite de vainas preparada en la solución C (50 μ L) y n-heptano; solución F, aceite esencial de hojas, citral y n-heptano y la solución G, la concentración del aceite de vainas preparada en la solución C (50 μ L), citral y n-heptano, lo mencionado se describe en la Tabla 5 y la Tabla 6.

Tabla 5. Concentraciones A B y C para espectrofotometría

N°	Citral μL	n-heptano μL	A
1	10	4990	
2	20	4980	
3	25	4975	
4	30	4970	
5	35	4965	
N°	Citral μL	n-heptano μL	B
1	15	4985	
2	25	4975	
3	35	4965	
4	40	4960	
5	50	4950	
N°	Citral μL	n-heptano μL	C
1	15	4985	
2	25	4975	
3	35	4965	
4	40	4960	
5	50	4950	

Tabla 6. Concentraciones D-G con aceites para espectrofotometría

N°	Citral μL	AEHLh μL	n-heptano μL	D
1	10	20	4970	
2	15	20	4965	
3	20	20	4960	
4	25	20	4955	
N°	Citral μL	AEHLv μL	n-heptano μL	E
1	10	20	4970	
2	15	20	4965	
3	20	20	4960	
4	25	20	4955	
N°	AEHLh μL	Citral μL	n-heptano μL	F
1	10	15	4975	
2	15	15	4970	
3	20	15	4965	
4	25	15	4960	
N°	AEHLv μL	AEHLh μL	n-heptano μL	G
1	10	15	4975	
2	15	15	4970	
3	20	15	4965	
4	25	15	4960	

Una vez que se obtuvieron las distintas soluciones y se almacenaron en frascos ámbar, se procedió a su lectura en un espectrofotómetro Uv-Vis Jasco V-730 tomando en cuenta que el blanco para todas las muestras fue n-heptano, con lo que se realizó su respectivo blanco y auto zero, se midió cada

solución con celdas de cuarzo a una longitud de onda de 300 – 400 nm con un espacio de lectura de 1nm. En cada resultado obtenido se realizó un smoothing para limpiar los errores por ruido o defectos en la curva y se transformó a su respectiva segunda derivada para eliminar las bandas traslapadas, permitiendo obtener los datos más confiables para su posterior análisis.

3.8 Actividad antioxidante

Se analizó la actividad antioxidante y capacidad captadora de radicales empleando dos ensayos con reactivos diferentes: 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) y 2,2- azinobis 3 etilbensotiazolina6- acidossulfónico (ABTS), adaptado a microplacas de 96 pocillos no estériles. Se siguió el protocolo propuesto por Noriega et al. (2015), en el caso de DPPH, y para determinar la capacidad de atrapamiento del catión-radical ABTS, el descrito por Re et al. (1999) modificado en las concentraciones por los autores (Calderón & Ojeda, 2022).

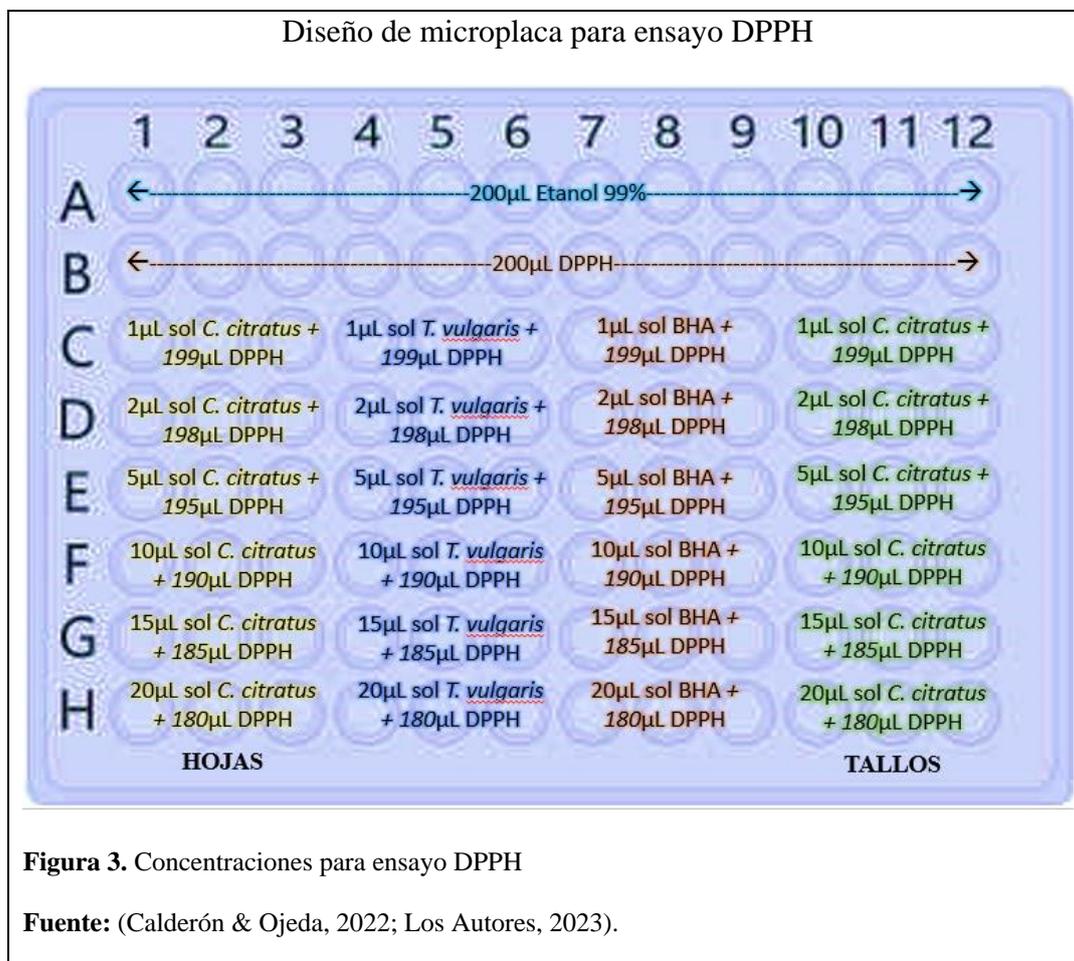
3.8.1 Método DPPH

3.8.1.1 Solución del radical DPPH

Para la solución del radical DPPH se empieza pesando 4 mg del reactivo y se disuelve en 100 mL de etanol absoluto. Para el control positivo Butilhidroxianisol (BHA) se pesó 10 mg y se diluyó en 1 mL de etanol absoluto, ambas soluciones se conservaron en frascos ámbar.

3.8.1.2 Soluciones de aceite esencial

En torno a los aceites, para las soluciones, se tomaron 100 µL de AE y se disuelve cada uno con 900 µ L de etanol absoluto de forma que se obtenga un volumen final de 1mL. Se utilizó una microplaca de 96 pocillos y el ensayo se realizó siguiendo el esquema de la Figura 3 a continuación.



La placa se agitó por 30 minutos previo a su lectura y pasado este tiempo, se procedió a tomar su lectura a una absorbancia de 517 nm (Calderón & Ojeda, 2022).

3.8.2 Método ABTS

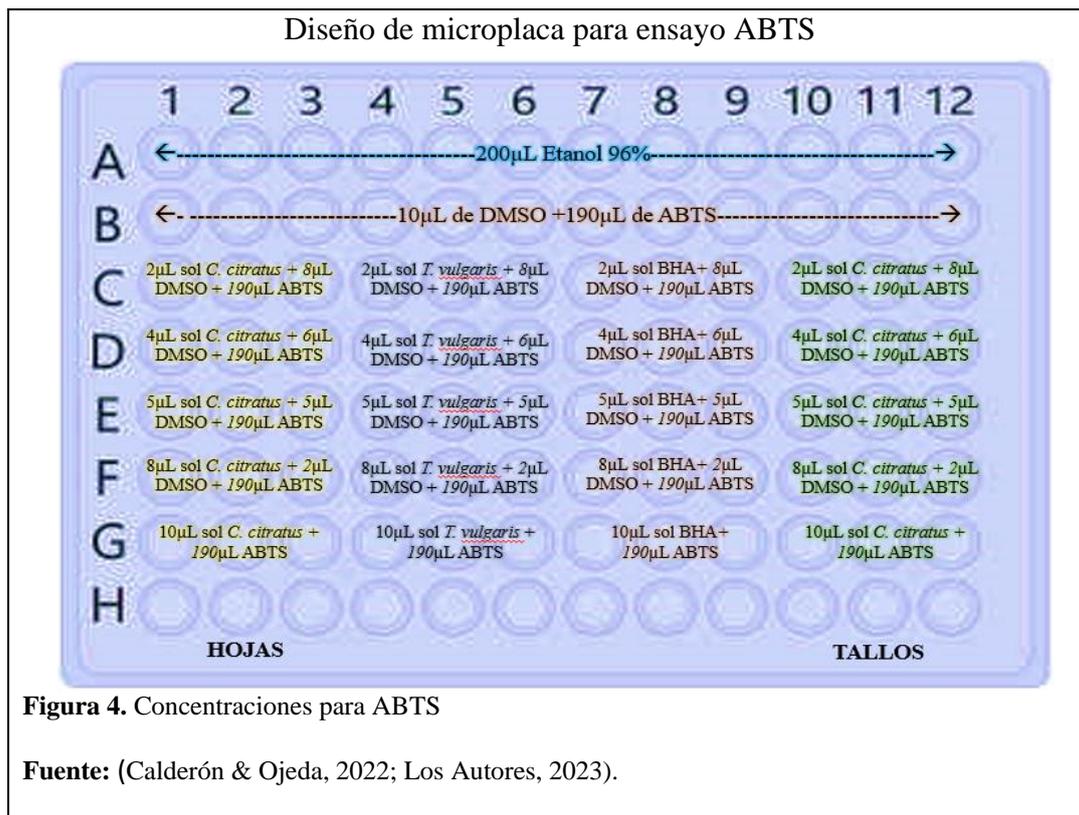
Para este ensayo se pesó 27,51 mg del reactivo radical ABTS⁺ y de persulfato de sodio 188,20 mg, ambos se disolvieron con 24 horas de anticipación en 25 mL y 10 mL agua ultrapura respectivamente.

De la solución de persulfato se colocó 0.25 mL al frasco de la solución ABTS preparada previamente y se mantuvo en refrigeración hasta el momento del ensayo.

Para el aceite, se prepararon las soluciones dispensando en frascos ámbar 100 µL de la esencia con 900 µL de DMSO, por su parte, para el control positivo se pesó 10 mg de Butilhidroxianisol (BHA), y se disolvió en 10 mL de alcohol al 96%.

Se midió su absorbancia a una longitud de onda de 734 nm hasta ajustar a un rango de $0,700 \pm 0,02$ añadiendo etanol absoluto, previo a la ejecución del ensayo (Calderón & Ojeda, 2022), de esta forma, el grado de decoloración presentado por la inhibición del radical $ABTS^+$ está influenciado por la concentración del mismo (Rioja et al., 2018)

Se utilizó una microplaca de 96 pocillos, las disoluciones se realizaron como se detalla a continuación en la Figura 4.



Se realiza la lectura estableciendo una longitud de onda de 734nm (Calderón & Ojeda, 2022).

3.9 Concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales

Para poder determinar y analizar la actividad antimicrobiana con la concentración mínima inhibitoria (CMI50) se desarrolló la técnica de microdilución en caldo, para esto, se emplearon dos cepas certificadas ATCC; las bacterias evaluadas fueron, *Staphylococcus aureus* Gram positiva ATCC 25923TM y *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525TM como Gram negativas (Calderón & Ojeda, 2022).

3.9.1 Preparación de medios

Se pesaron 2,55 mg y 1,78 mg los medios TSA y MHB correspondientemente, se disolvieron con agua destilada estéril caliente para que se logre diluir el medio. Se llevó la mezcla en frascos boecos de tapa rosca azul a una plancha de calentamiento con agitador magnético hasta que llegue a ebullición y se proceda a autoclavar por 15 minutos a 121° C.

3.9.2 Reactivación de cepas bacterianas

Para la reactivación de *P. fluorescens* y *S. aureus* se parte inicialmente de un cultivo puro de la cepa, se colecta con ayuda de un asa de siembra estéril la cantidad de inóculo asociado al diámetro del aro del instrumento y seguidamente en condiciones asépticas se resuspende el cultivo extraído en una placa de agar con medio selectivo para el microorganismo.

Finalmente se almacenan las placas con bacteria en incubadoras a la temperatura de 29°C por 24 horas para *Pseudomonas fluorescens* y 35-37°C por 72 horas para *Staphylococcus aureus*. Pasado este tiempo, las bacterias reactivadas están listas para su uso (CECT, 2012).

3.9.3 Preparación del inóculo

Se realizó la incubación “overnight” para las cepas bacterianas *S. aureus* y *P. fluorescens*, para lo cual, previamente se prepararon dos tubos de ensayo con 13 mL de caldo Mueller Hinton Broth (MHB) estéril, a estos tubos se inocularon las cepas bacterianas previamente reactivadas con ayuda de un asa estéril y se dejó incubar a 35 ± 2 °C durante 24 horas.

Pasado el período de incubación se centrifugaron los tubos inoculados por 30 minutos a 3000 rpm y se desechó el sobrenadante para obtener únicamente el pellet bacteriano.

Para la estandarización de inóculo, se aplicó la metodología de Veloz, (2018). Se utilizó suero fisiológico estéril en el que se disolvió el inóculo obtenido anteriormente, se midió una alícuota en un espectrofotómetro UV marca JASSCO, modelo V-730 con ayuda de celdas de plástico a una longitud de onda de 625 nm hasta alcanzar una absorbancia de 0,08 a 0,12 equivalente a 10^8 UFC/mL.

3.9.4 Soluciones de los aceites esenciales

Se prepararon soluciones del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* y de *Thymus vulgaris* al 5 % como control natural, debido a su eficacia antibacteriana, en este caso, se tomaron 10 µL del aceite esencial y se disolvieron en 190 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Para el control químico antibacteriano se utilizó cloranfenicol 50mg/ mL a un volumen final de 10 mL. (Los Autores, 2023; Calderón & Ojeda, 2022).

3.9.5 Preparación del reactivo colorante cloruro de trifeniltetrazolio (TTC)

El colorante TTC del ensayo se preparó al 2,5 %, para lo cual se pesó 25 mg de (TTC) y se disolvió en 10 ml de agua destilada estéril. El colorante se preparó con 24 horas de anticipación y se conservó en un envase ámbar en refrigeración (Calderón & Ojeda, 2022).

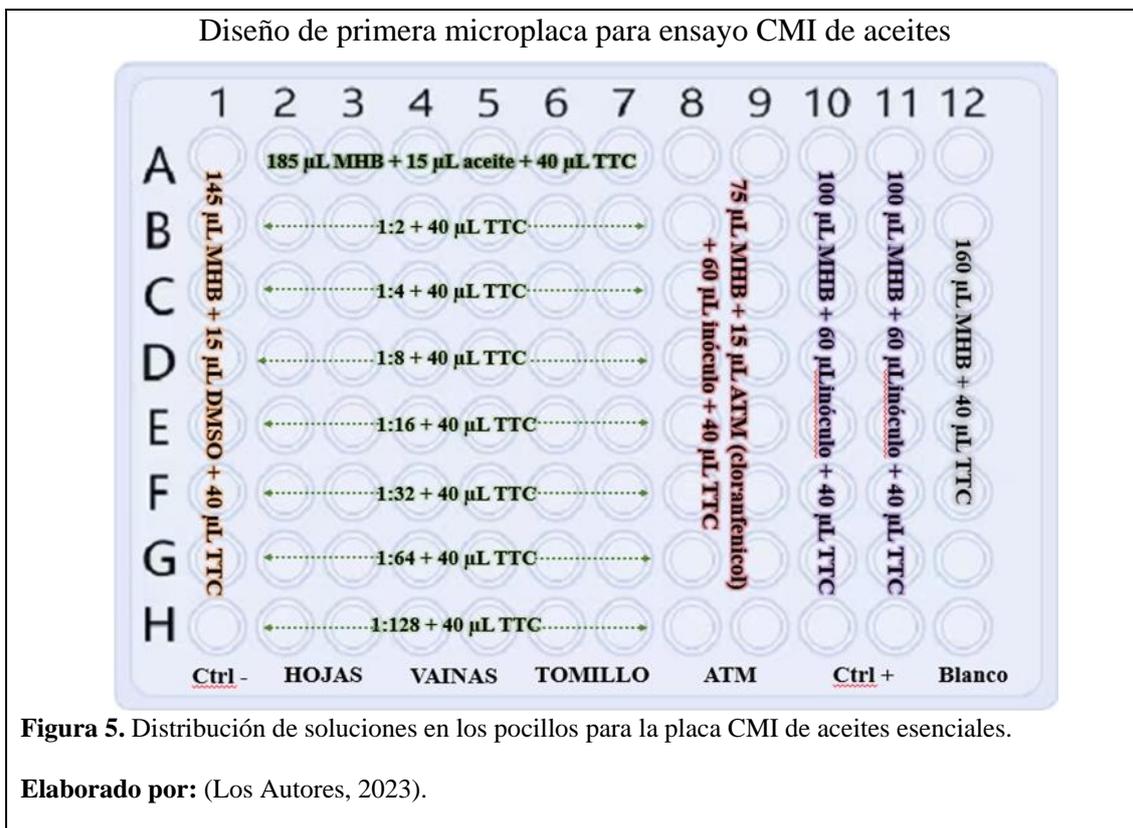
3.9.6 Inoculación en microplacas

Se emplearon dos microplacas de 96 pocillos estériles por cada aceite, y el diseño se realizará como se muestra en la Figura 5 con las siguientes concentraciones; en la columna 1 se colocaron 145 µL del medio MHB más 15 µL de DMSO, como control negativo. En la fila A en los pocillos 2-5 se colocaron 15 µL de la solución madre de aceite esencial de *Cymbopogon citratus*, en los pocillos 6 y 7 se colocaron 15 µL de la solución madre de aceite esencial de *Thymus vulgaris* como control natural y adicionalmente se dispensó 185 µL de caldo de cultivo en dichos pocillos, posteriormente con ayuda de una micropipeta multicanal se añadió 100 µL del caldo de cultivo Mueller Hinton Broth desde la fila B hasta la H en las columnas de los aceites esenciales y se diluyeron las filas B-H pipeteando 100 µL de la solución anterior. En las columnas 8 y 9 se colocaron 75 µL del caldo de cultivo (MHB) más 15 µL de la solución de antimicrobiano y 60 µL del inóculo estandarizado como control positivo de crecimiento. En las columnas 10 y 11 se colocaron 100 µL del caldo de cultivo y 60 µL de inóculo. En la columna 12 se colocaron 160 µL de caldo de cultivo sin inóculo, siendo el blanco del ensayo.

La placa preparada se llevó a incubación por 24 horas a una temperatura de 35 ± 2 °C con agitación a 40 rpm, transcurrido este tiempo se colocaron 40 µL de colorante TTC en toda la placa obteniendo

un volumen total de 200 μL , posteriormente la placa se llevó a incubar por una hora (Veloz, 2018; Calderón & Ojeda, 2022).

Por último, la placa se leyó en un lector de microplacas UV marca Biotek modelo Epoch™ a 615 nm, en este punto se evidenció el crecimiento celular con cambio de coloración y la obtención de los datos (Calderón & Ojeda, 2022).



3.10 Bioautografía

Para esta prueba se prepararon 3 placas TLC de sílica gel 60 de polímero de 10 x 10 cm, adicionalmente se emplearon inóculos de *Pseudomonas fluorescens* y *Staphylococcus aureus*, que se sembraron inicialmente en caldo nutritivo por 24 y 48 horas respectivamente, pasado este tiempo se resuspendió 1 mL del caldo bacteriano en 19 mL de MHB con agar-agar al 0.1%, seguidamente, mediante la escala de Mc Farland se midió la absorbancia con un espectrofotómetro hasta alcanzar un valor cercano o igual a 0.4 con una absorbancia de 600 nm, obteniendo así una suspensión bacteriana estandarizada en 4×10^7 UFC/mL (Osorio, 2020a).

Las placas se señalaron con líneas al inicio y al final con un lápiz de grafito teniendo una distancia de 0.7mm. Se sembraron bandas horizontales de 10 mm de ancho a 0,7 mm del borde de la placa empleando el equipo Linomat 5, para las dos primeras placas, se prepararon soluciones metanólicas con aceite esencial de *Cymbopogon citratus* de hojas y vainas y otra solución con el estándar de citral a una proporción de 1mL/3µL. Para la tercera placa se prepararon las soluciones metanólicas de 3 aceites, *Cymbopogon citratus* y *Thymus vulgaris* a la misma proporción 1mL/3µL. Estas fueron administradas mediante una microjeringa Hamilton de 50 µL y se eluyeron las placas en una cámara cromatográfica saturada con la fase móvil Tolueno/Acetato de etilo/ Éter de petróleo a una concentración 93/7/20 (v/v) con 200 µL de ácido acético glacial. Las placas se secaron completamente con aire frío y se observaron por fluorescencia las bandas eluídas con una cámara Uv a 254 nm y a 366 nm para evidenciar los compuestos separados. Posteriormente las placas se rociaron con la solución bacteriana diluida en MHB, fueron incubadas en cámara de humedad a 37°C por 24 horas para *Pseudomona fluorescens* y 48 horas para *Staphylococcus aureus* (Osorio, 2020a).

Pasado el tiempo de incubación, se roció una solución acuosa de bromuro de 3-(3,4 -dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolio (MTT) con 0.1% de triton X-100 por 60 segundos, se llevaron a incubación en la cámara de humedad a 37°C por 1 hora y transcurrido el tiempo se observó la aparición de bandas (Osorio, 2020a).

3.11 Separación de los isómeros

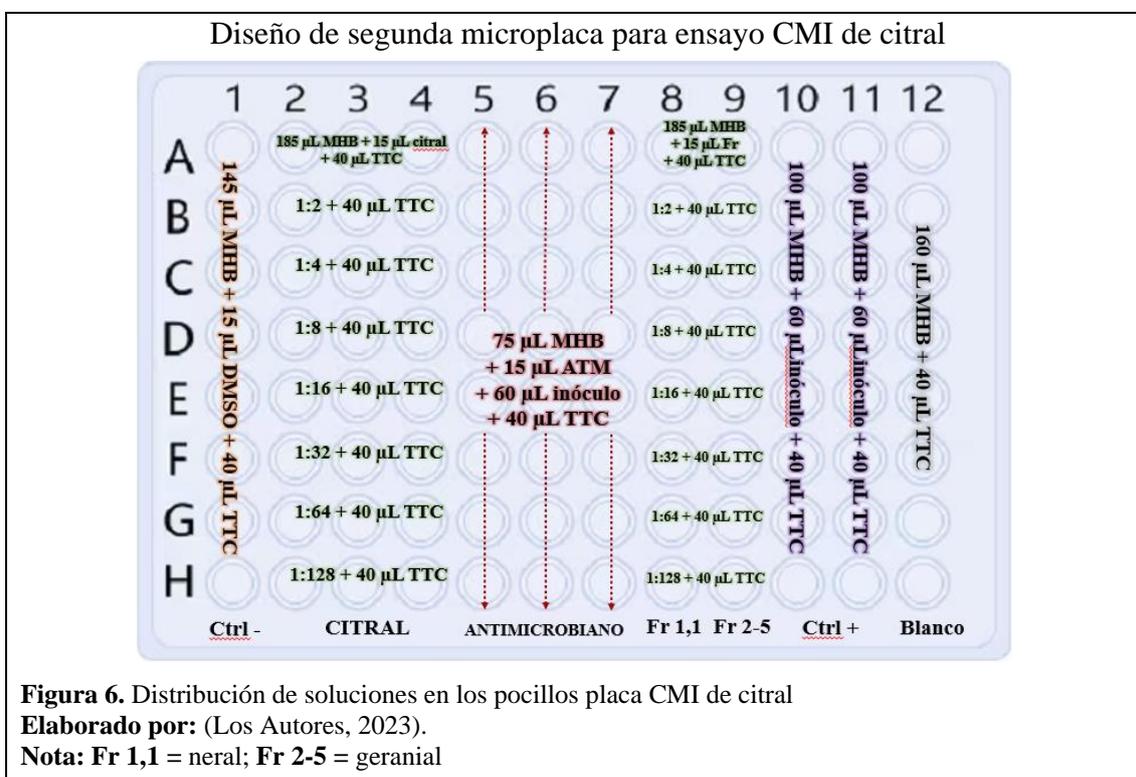
Consiste en el aislamiento del citral con la finalidad de obtener neral y geranial, generalmente se lo realiza en una columna de fase normal (sílica), usando un estándar de citral en dilución 1 en 5 con hexano, inyectando 5 mL en el sistema Reveleris® Prep system (Buchi, n.d.).

Se utilizó una fase móvil binaria hexano y acetato de etilo en hexano (20%), grado HPLC, con flujo de 1mL/min, con bucle de 5mL a una longitud de onda de 240nm, en una corrida total de 45 minutos (Soto et al., 2007), la temperatura se mantuvo a 25°C. La calidad de la purificación es evaluada inyectando las fases obtenidas en un cromatógrafo GC-MS acorde a la técnica descrita anteriormente en el análisis cromatográfico nuevamente el residuo obtenido al HPLC y realizar un barrido espectral

(UV) a 254nm, 265nm y 280nm, para posteriormente ser comparados con la muestra de citral. La concentración relativa de los isómeros contenidos en las fracciones separadas se estima a través del reporte de las áreas obtenidas en el cromatograma GC MS (Soto et al., 2007; Buchi, n.d.).

3.12 Concentración mínima inhibitoria de citral y las fracciones isoméricas de *Cymbopogon citratus*

Para poder determinar y analizar la actividad antimicrobiana se empleó la misma técnica de microdilución en caldo con las mismas cepas certificadas, descrito anteriormente en el apartado 3.9. Cabe mencionar que existe diferencia en el diseño de las placas, como se indica en las Figura 6, Figura 7, Figura 8.



Diseño de segunda microplaca para ensayo CMI de la fracción 1

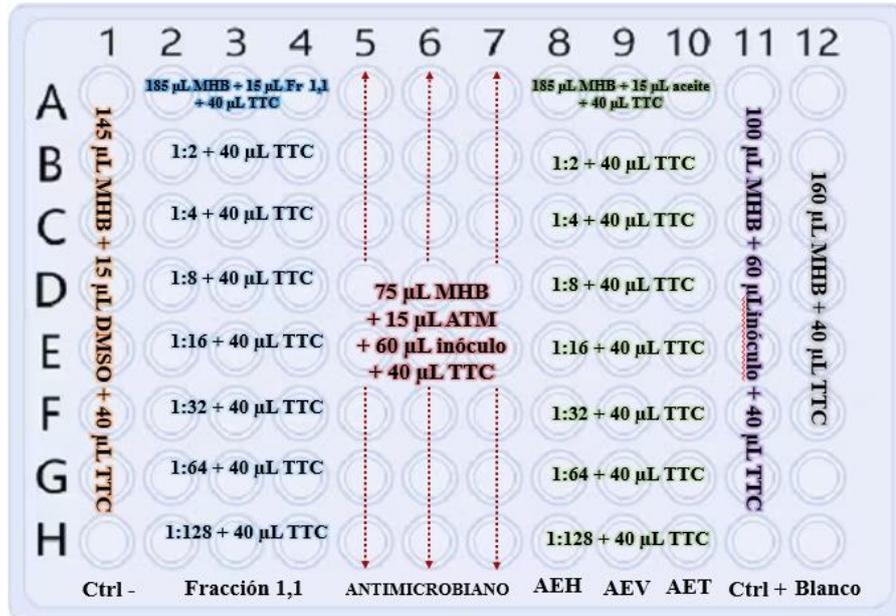


Figura 7. Distribución de soluciones en los pocillos placa CMI de la fracción 1

Elaborado por: (Los Autores, 2023).

Diseño de segunda microplaca para ensayo CMI de las fracciones 2-5

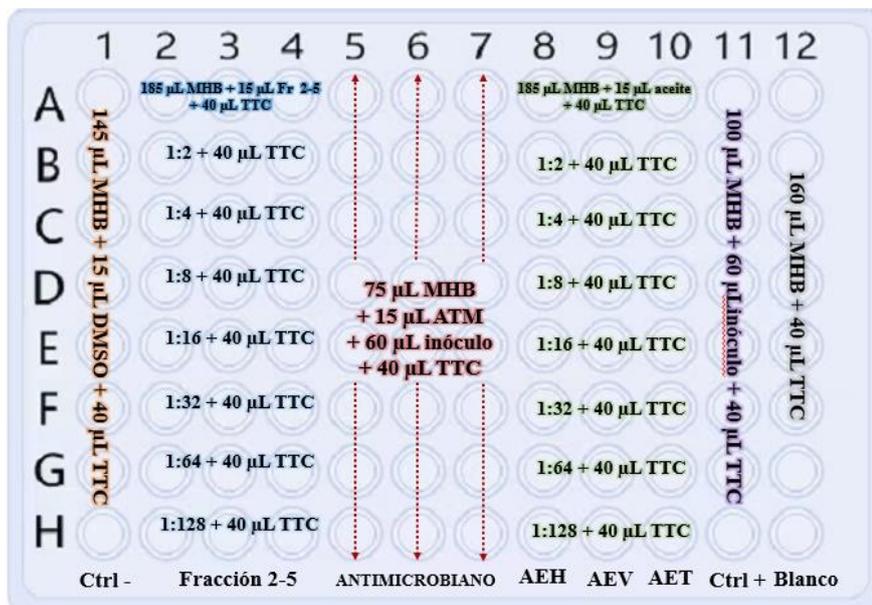


Figura 8. Distribución de soluciones en los pocillos placa CMI de la fracción 2-5

Elaborado por: (Los Autores, 2023).

4 Resultados y discusión

4.1 Identificación botánica de la planta colectada

Las muestras colectadas en el cantón Pedro Vicente Maldonado del género *Cymbopogon*, fueron identificadas en el herbario de la Universidad Politécnica Salesiana sede Girón, en donde se ingresó a la colección y se determinó que las plantas de *C. citratus* destinadas a este proyecto se encuentran dentro de la clasificación científica de la familia Poaceae tal como se indica en el Anexos 1.

4.2 Extracción y rendimiento del aceite esencial por hidrodestilación

El rendimiento obtenido de la destilación de hojas de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf fue de 0,34 % p/v, obteniendo 108,4mL de aceite esencial a partir de 31600g de material vegetal, mientras que, para los vainas, estos fueron previamente separados y destilados, obteniendo así 16,2 mL de aceite esencial a partir de 13800g de material vegetal, obteniendo un rendimiento de 0,11 % p/v para esta especie, como se indica en la Tabla 7, estos cálculos fueron realizados tomando la formula descrita en el apartado 3.4, por lo que, el rendimiento obtenido por parte de hojas puesto en comparación con varios estudios realizados demuestran una aparente similitud, ya que (Quintas, 2021) publica que en la destilación de 20000g de hojas de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf se obtiene un rendimiento de 0,34%, mientras que (Freire, 2018) obtiene un rendimiento de 0,48% al haber destilado 2400g de material vegetal, esto sugiere que el rendimiento obtenido depende de varios factores tales como, la cantidad de material vegetal a destilar, la cantidad de aceite esencial obtenido por destilación, las condiciones y métodos de extracción, así como el tiempo de la cosecha, condiciones edafológicas la altitud con respecto al nivel del mar, el tiempo en llevar a cabo la destilación y el cálculo de su rendimiento. Por otro lado, no se encontró referentes que pongan en comparación el rendimiento del aceite esencial de vainas.

Tabla 7. Cálculo del rendimiento del aceite esencial de hojas y vainas

Indicadores	Peso de hierba luisa (g)	Peso de hierba luisa (g)
	hojas	vainas
Peso hierba luisa (g)	31600 g	13800 g
Cantidad de aceite esencial extraído (mL)	108,4 mL	16,2 mL
Rendimiento (%)	0,34%	0,11%

Elaborado por: (Los Autores, 2023)

4.3 Composición fisicoquímica y calidad de los aceites esenciales

Para la caracterización física y química del aceite esencial de *Cymbopogon citratus*, se determinó la captación organoléptica, pH, densidad relativa y el índice de refracción según lo especificado en las Tabla 8 y Tabla 9, estos parámetros convencionales son indicadores relevantes para determinar la pureza y composición del aceite esencial.

Tabla 8. Características fisicoquímicas

	<i>Físicas</i>	<i>Químicas</i>
Organolépticos	Color	Amarillo cristalino
	Olor	Característico (suigéneris)
	Sabor	Característico (amargo)
	Textura	Aceitosa, oleosa
Densidad relativa hojas	0,88 ± 0,001g/mL	
Densidad relativa vainas	0,89 ± 0,001 g/mL	
Índice de refracción hojas	1,479 ± 0,001	
Índice de refracción vainas	1,480 ± 0,001	

Elaborado por: (Los Autores, 2023)

Los resultados obtenidos de las propiedades fisicoquímicas aplicadas a los aceites esenciales (hojas y vainas) de hierba luisa “*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf” se evidencia características propias, tales como el color amarillo cristalino, su olor suigéneris, que es similar al limón, esto debido a que en su composición química el citronelal proporciona esta característica, así como su sabor amargo, pujante, picante y astringente, su textura aceitosa y oleosa confieren a esta especie vegetal su rasgo propio e inconfundible.

La presente investigación obtuvo un pH de 5 para cada muestra de aceite esencial, la bibliografía comprueba que el pH es idéntico a las investigaciones de (Azaña & Castillo, 2017) y (Quintas, 2021), al reportar el pH de 5, por lo que, podemos corroborar que el pH se encuentra dentro del rango establecido que es de 5-6, de esta manera, al ser ácido comprueba la característica organoléptica del sabor (Quintas, 2021).

Por otro lado, César Moreno, (2017), afirma que, la densidad relativa de aceites minerales y vegetales en su mayoría comprende un valor de entre 0,840 y 0,960, tomando en cuenta que esta propiedad se mide a temperatura ambiente pues a este nivel térmico, estas sustancias grasas se mantienen en estado líquido. Por otro lado, García (2010), establece que para los aceites esenciales los índices de refracción son elevados, teniendo un promedio de 1,4 a 1,5.

En este contexto, la ficha técnica Bay House, (2013), ratifica lo mencionado, reportando que el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* se encuentra con una densidad relativa entre un rango de 0,894-0,904 a 20°C y un índice de refracción que oscila entre 1,479 a 1,489.

Tabla 9. Parámetros físicos a 20 °C del aceite esencial *C. citratus*

Parte de la planta	ρ (g/mL)	η
Hojas	0,885	1.479
Vainas	0,887	1.481

Elaborado por: (Los Autores, 2023)

Nota: ρ : Densidad absoluta; η : Índice de refracción

Los datos obtenidos en esta investigación, presentan similitudes significativas a lo planteado por Bay House, (2013) y ambas muestras se encuentran dentro del rango establecido que determina la calidad y aceptabilidad adecuada de un aceite esencial.

4.4 Análisis cromatográfico del aceite

Tabla 10. Cuadro de componentes mayoritarios en aceite esencial de *Cymbopogon citratus* correspondiente a hojas, vainas y estándar de citral.

Compuestos	Fórmula	Vainas	Hojas	Citral
Methyl-5-hepten-2-one	C ₈ H ₁₄ O	0,79	0,47	0,00
Cineole 1,8	C ₁₀ H ₁₈ O	0,28	0,44	0,00
Citronellal	C ₁₀ H ₁₈ O	5,96	4,03	0,00
cis-Verbenol	C ₁₀ H ₁₆ O	0,00	0,40	0,00
Isocitral<E->	C ₁₀ H ₁₆ O	0,42	0,66	0,00
Decanal<n->	C ₁₀ H ₂₀ O	0,41	0,34	0,00
Citronellol	C ₁₀ H ₂₀ O	4,37	4,06	0,00
Neral	C ₁₀ H ₁₆ O	21,64	14,02	46,65
Geraniol	C ₁₀ H ₁₈ O	23,48	45,72	0,00
Geranial	C ₁₀ H ₁₆ O	31,99	19,39	53,35
Citronellyl acetate	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	0,72	0,00	0,00
Lavandulyl acetate	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	4,26	2,87	0,00
Caryophyllene<Z->	C ₁₅ H ₂₄	0,00	4,21	0,00
Caryophyllene(E-)	C ₁₅ H ₂₄	2,18	0,00	0,00
Naphthalene,1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro	C ₁₅ H ₂₄	0,00	0,22	0,00
Amorphene<delta->	C ₁₅ H ₂₄	0,40	0,50	0,00

Continuación de la Tabla 10:

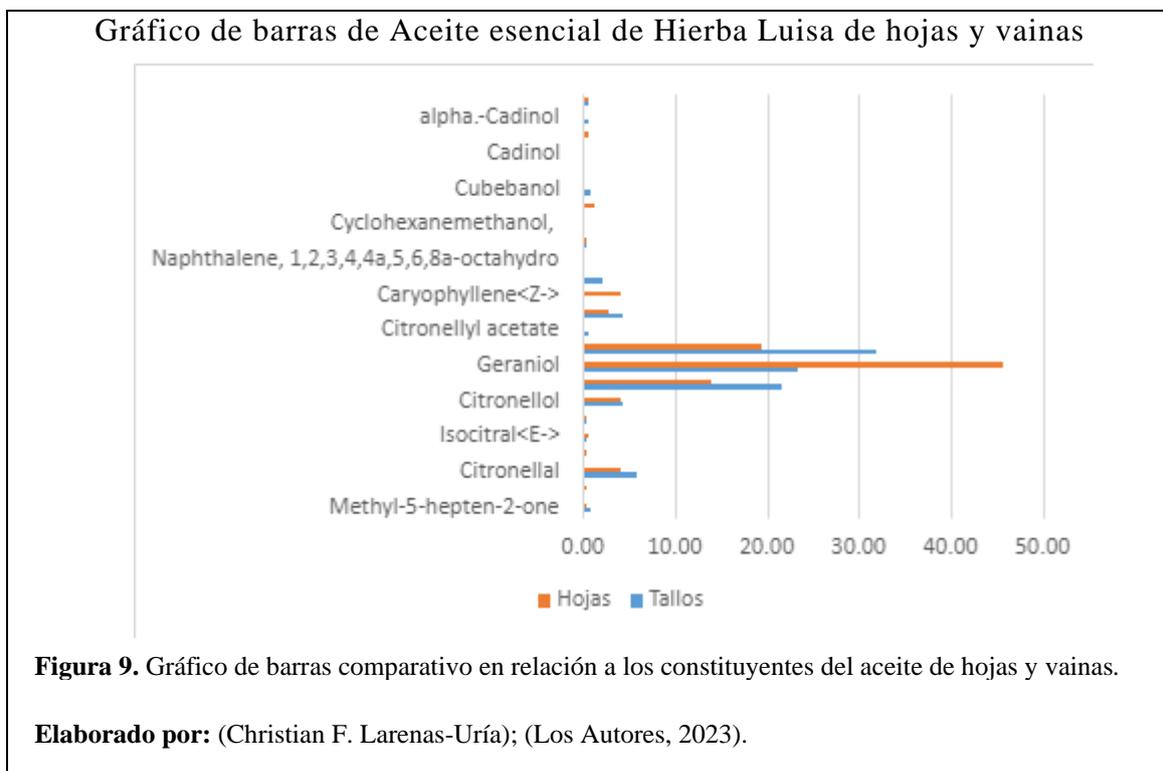
Cyclohexanemethanol,	C ₇ H ₁₄ O	0,21	0,22	0,00
alpha.-Muuroleone	C ₁₅ H ₂₄	0,00	1,31	0,00
Cubebanol	C ₁₀ H ₂₆ O	0,85	0,00	0,00
Caryophyllene oxide	C ₁₅ H ₂₄ O	0,28	0,00	0,00
Cadinol	C ₁₅ H ₂₆ O	0,14	0,00	0,00
Muurolol	C ₁₅ H ₂₆ O	0,24	0,61	0,00
alpha.-Cadinol	C ₁₅ H ₂₆ O	0,62	0,00	0,00
2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, (Z)-	C ₁₀ H ₁₈ O	0,70	0,52	0,00
Total		99,93	99,97	100,00

Elaborado por: (Christian F. Larenas-Uría; Los Autores, 2023).

La Tabla 10 muestra un total de 2 compuestos cuantificados en el estándar de citral, 20 en el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* perteneciente a hojas y 19 componentes de vainas, en total se logran diferenciar 24 componentes diferentes, mismos que presentan una composición media total identificada del 99,95% del contenido de aceite y un 100% identificado del contenido en el estándar de citral.

Dicha composición del aceite presenta grandes similitudes a la presentada por otros estudios, pues la mayoría de constituyentes de este aceite ha sido previamente reportada por algunos autores como Poveda et al., (2023), quienes determinaron 24 componentes bioactivos y 33 constituyentes totales del aceite esencial de *C. citratus*; por su parte, Bassolé et al., (2011) identificaron 2 componentes principales en los aceites de *Cymbopogon citratus* que analizaron, siendo estos los isómeros cis y trans del citral (geranial (48,1%) y neral (34,6%)), los cuales representan el 82,7% del total del aceite, respaldando lo mencionado, Ortega, (2013) en su proyecto de investigación encontró en una considerable proporción al neral en un 50%, y a geranial en un 35%.

Los distintos aceites de hierba luisa evaluados en esta y otras investigaciones comparten una composición cualitativa similar, sin embargo, puede haber diferencias cuantitativas en relación a la proporción de estos; esta variación se puede deber a la variedad cultivada de la planta, el tiempo de recolección, época del año o el área geográfica en la que se cultive (Jordán y col., 2006) citado por (L. Ortega, 2013).

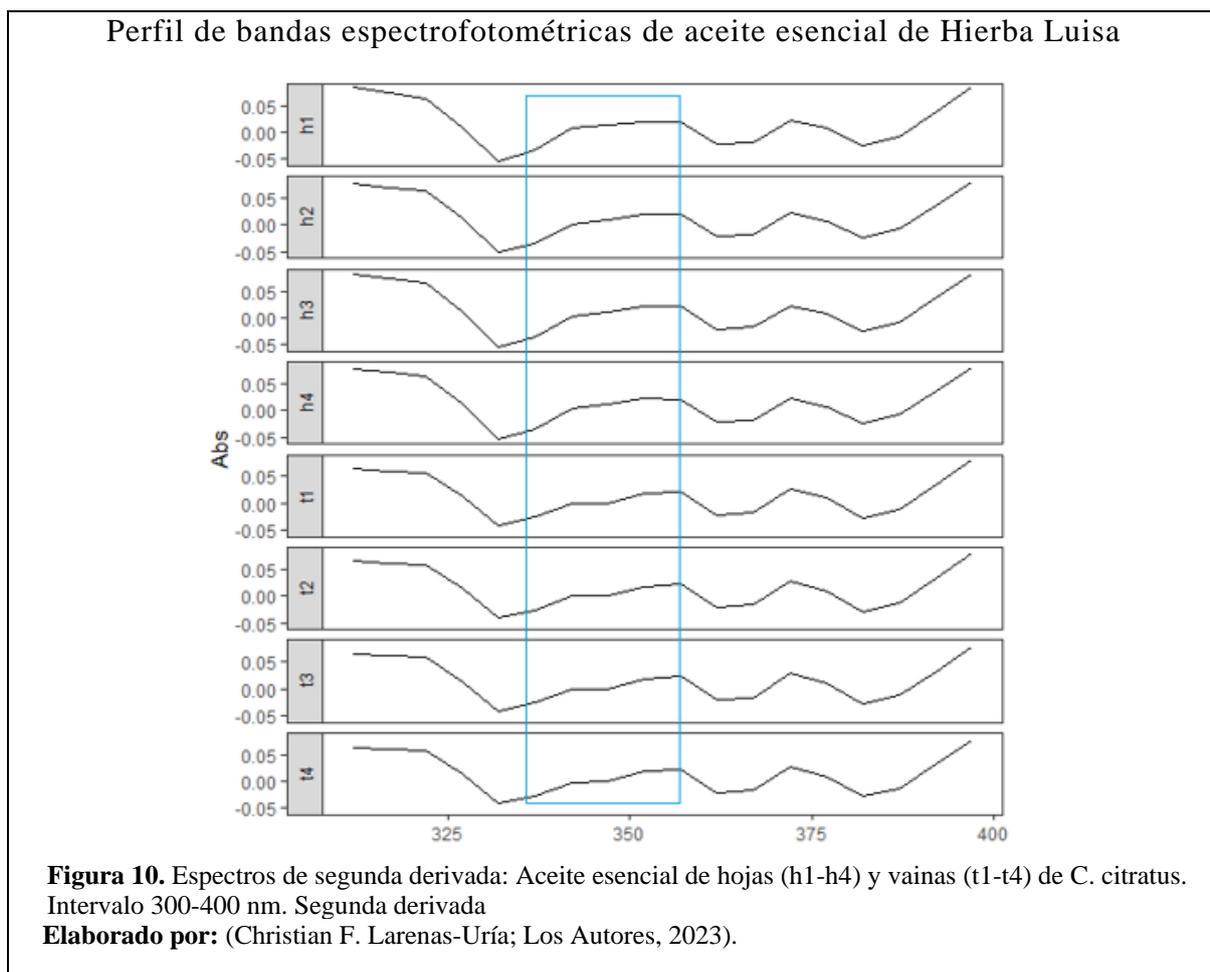


La Figura 9 indica un gráfico de barras que resalta la composición cualitativa de los componentes mayoritarios (> 14,0%) de los aceites esenciales de hojas y vainas analizadas por medio de GC-MS.

Esta gráfica determina que existen dos compuestos mayoritarios, el geraniol (45,72%) para hojas y geranial (31,99%) para vainas, teniendo una alta concentración en el AEHL. Analizando la diferencia de estos compuestos, se sabe que el geraniol es un alcohol monoterpenoide, mientras que geranial es un aldehído y uno de los isómeros de citral; a pesar de ello, el geraniol coexiste con el geranial y con el neral debido a que son los productos de su oxidación, así lo menciona Regev y Cone, (1976) citado por (Chen & Viljoen, 2010).

4.5 Lectura Espectrofotométrica Derivada

4.5.1 Espectros de segunda derivada



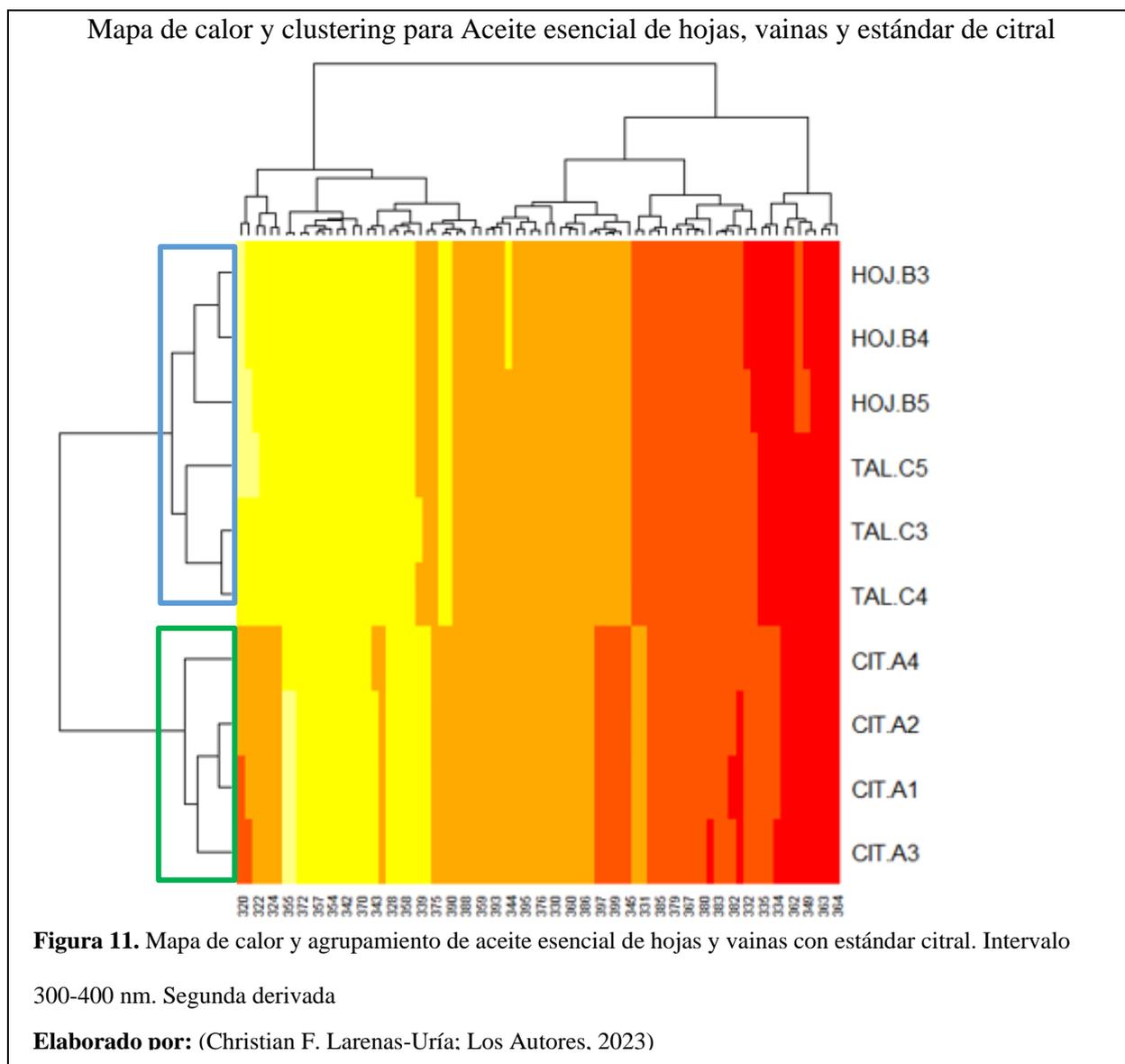
Se obtuvo un espectro UV- Vis de segunda derivada para identificar los máximos de absorbancia, tal como lo menciona Gamboa, (1991), esto permite disminuir significativamente las bandas traslapadas y la interferencia con el ruido de fondo, permitiendo una interpretación más asertiva de las características del espectro y la diferenciación de los aceites con el estándar de citral

Los espectros obtenidos muestran absorbancia vs longitud de onda con respecto al eje de las ordenadas y el eje de las abscisas respectivamente, las longitudes se dispusieron en un rango de 0.1 entre 300 y 400 nm, extrayendo un total de 200 datos por cada muestra analizada y resumido en los perfiles de barrido espectral.

Como se puede constatar en la Figura 10 las 3 muestras comparten 2 compuestos de mayor relevancia siendo neral y geranial, los cuales demuestran una similitud aparentemente visible

en un rango de (300-337 nm) y (356-400 nm); sin embargo los distintos componentes que no concuerdan entre sí, generan una notable distinción produciendo un espectro de UV-Vis en donde se pueden apreciar ligeras pero importantes diferencias, perfectamente observables dentro del rango de (338-355 nm) pues presentan señales discontinuas o irregulares en una serie de pequeños picos.

4.5.2 Mapa de calor y agrupamiento

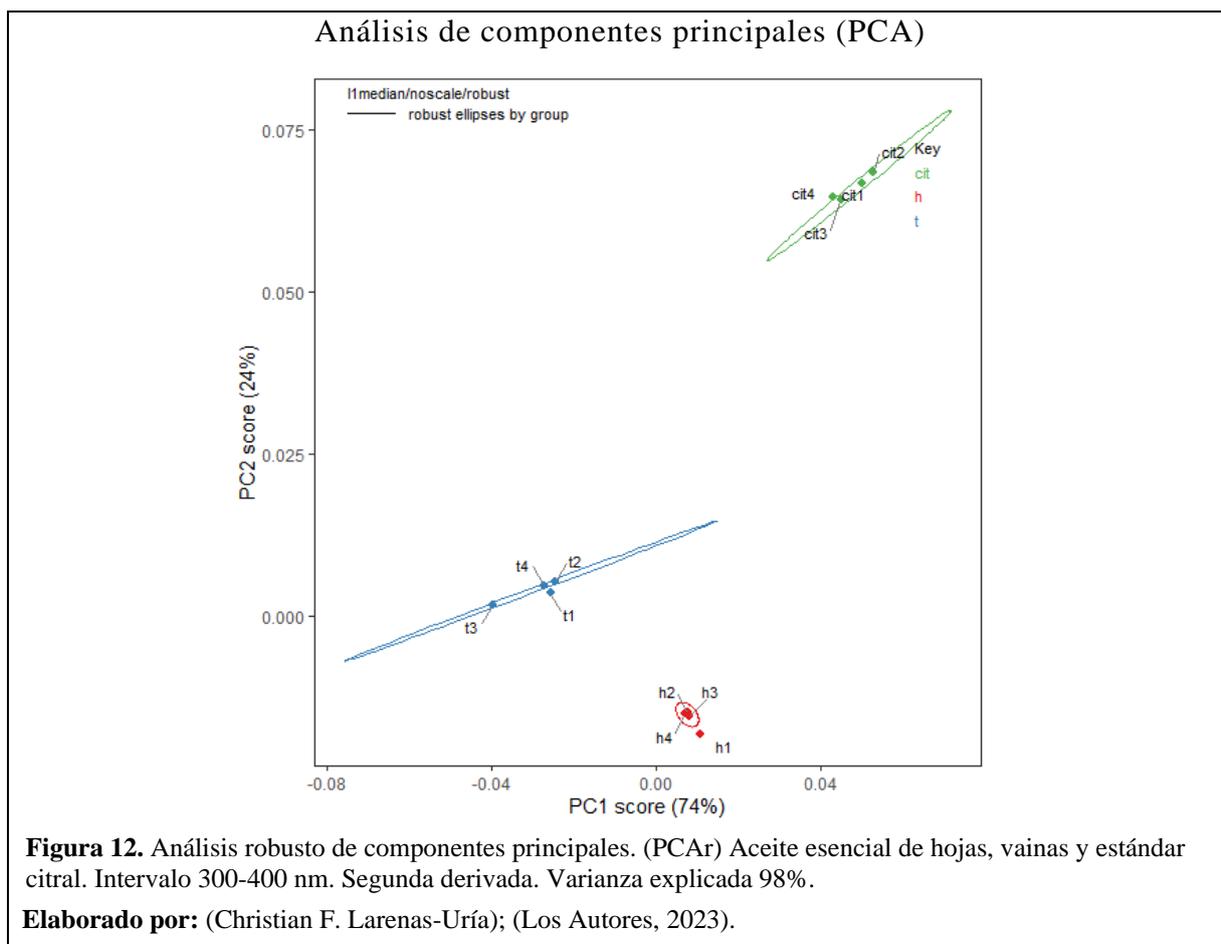


En la Figura 11 se puede constatar los resultados adquiridos al emplearse el modelo de distancias euclidianas o clustering, por medio de este análisis se pudo determinar que las soluciones estándar analizadas de los dos aceites y citral, se clasificaron en 2 grupos principales, siendo parte del primer

clúster (cuadro azul) las muestras que tienen el mayor carácter de identidad entre hojas y vainas, y ubicándose en el segundo clúster las muestras restantes correspondientes a citral; por tanto, es posible reconocer dos conglomerados bien diferenciados; sin embargo, también se sabe que existe una correlación directa de ambas agrupaciones demostrando que tan análogas pueden ser al compartir características diversas y constituyentes entre sí.

Así mismo, el agrupamiento discutido anteriormente, se puede validar a través de un heatmap o mapa de calor, con esta herramienta de visualización de datos, los resultados se agrupan por filas y columnas a través de indicativos de color, para esto, a mayor calidez en el color mayor presencia de constituyentes o a su vez que la proporción de uno de ellos es más alta, lo cual indica que existe una relación directamente proporcional (Patiño, 2017). En el mapa de calor se pueden observar sutiles diferencias entre los aceites, indicando las divergencias entre ambos a partir de las zonas coloreadas, si analizamos por secciones, el aceite de hojas y vainas demuestran que hay constituyentes que demuestran que a pesar de ser extraídos de la misma planta no son exactamente iguales; así mismo, en cuanto al estándar de citral podría haber una relación directa con aceite de hojas y vainas al compartir los constituyentes neral y geranial; sin embargo, esa semejanza es apenas un porcentaje pues la Figura 11 indica que el estándar de citral es el que más disimilitudes presenta en relación a los aceites esenciales.

4.5.3 Análisis de componentes principales



Una vez realizado el método de Análisis de Componentes Principales Robusto (PCAr) tal como se puede verificar en la Figura 12 se pudo evaluar la dispersión y la asociación entre las variables que presentaron mayor relevancia al basarse en la absorción de la radiación ultravioleta-visible de las muestras, tanto de los dos aceites como del estándar de citral. Se identificó claramente como las diversas soluciones probadas se agrupan de forma coherente con la composición de los aceites analizados (Logroño & Lozano, 2019).

Finalmente podemos mencionar que la técnica probada cumple con el propósito de diferenciar la composición de los aceites de *Cymbopogon citratus* y citral con una varianza explicada equivalente al 98%, complementando bien a la técnica cromatográfica GC-MS.

4.6 Determinación de la capacidad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS

La capacidad captadora de radicales libres del aceite esencial de *C. citratus* tanto de hojas y vainas, se evaluó en relación al aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) como control natural, y BHA (butilhidroxianisol) como control químico, de forma que se pueda revelar una comparación favorable con respecto a la concentración al 50% mejor conocida con IC50. Se le puede considerar al aceite esencial de *C. citratus* como un efectivo antioxidante, tomando en cuenta que en los tratamientos evaluados esta capacidad se les atribuye a las hojas a una concentración de 5 y 10 μL Tabla 11 y a vainas a una concentración de 2 y 5 μL Tabla 12, al ser los resultados con más cercanía al IC50 tanto para DPPH como ABTS.

Además, al comparar nuestros resultados con *Thymus vulgaris*, indica que el aceite de *Cymbopogon citratus* posee un potencial de estabilización de radicales superior y llega a ser semejante al antioxidante sintético como BHA, tal como se indica en la Tabla 13 y Tabla 14.

Tabla 11. Capacidad antioxidante del aceite esencial de hojas de *C. citratus*

Concentración (μL)	Absorbancia promedio	Actividad antioxidante
1	0,55	3,206
2	0,511	16,089
5	0,355	42,378
10	0,245	61,090
15	0,196	78,519
20	0,121	94,608

Elaborado por: (Los Autores, 2023)

Tabla 12. Capacidad antioxidante del aceite esencial de vainas de *C. citratus*

Concentración (μL)	Absorbancia promedio	Actividad antioxidante
1	0,494	22,617
2	0,414	42,087

Continuación Tabla 12

5	0,61	44,885
10	0,121	83,066
15	0,125	93,442
20	0,118	94,025

Elaborado por: (Los Autores, 2023)

Tabla 13. Capacidad antioxidante del aceite esencial de hojas de *T. vulgaris*

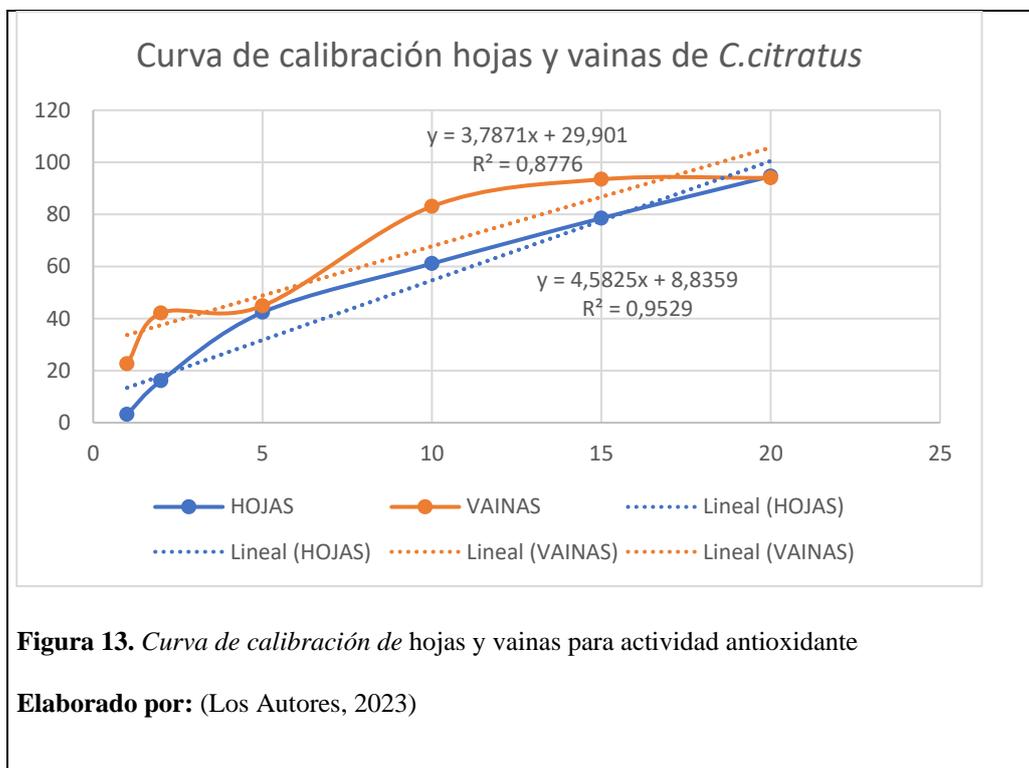
Concentración (μL)	Absorbancia promedio	Actividad antioxidante
1	0,632	5,130
2	0,574	14,923
5	0,482	32,177
10	0,378	48,907
15	0,332	57,884
20	0,3	62,664

Elaborado por: (Los Autores, 2023)

Tabla 14. Capacidad antioxidante del aceite esencial BHA

Concentración (μL)	Absorbancia promedio	Actividad antioxidante
1	0,577	22,734
2	0,355	59,283
5	0,188	80,793
10	0,184	83,358
15	0,176	85,281
20	0,176	85,106

Elaborado por: (Los Autores, 2023)



Para sostener lo mencionado, se desarrolló una curva de calibración (Figura 13) en la cual se evidencia que la actividad antioxidante aumenta en relación a la concentración de los aceites, tanto de hojas como de vainas; no obstante, se puede visualizar que para vainas hay cierta diferencia a la concentración de 2 μ L pero llega al resultado esperado de la técnica.

4.6.1 Resultados de actividad antioxidante por DPPH y ABTS

A través de las curvas de calibración obtenidas con los porcentajes de actividad antioxidante y controles se pudo cuantificar la actividad antioxidante expresada como IC_{50} (mg/mL), que se puede observar en la Tabla 15.

Mediante los resultados obtenidos se puede comprobar que los valores más bajos de IC_{50} en el ensayo con el radical libre DPPH corresponde al AE de *T. vulgaris* ($IC_{50} = 5,61$ mg/mL), seguido por el AE de hojas de *C. citratus* ($IC_{50} = 9,26$ mg/mL), siendo el AE de vainas de *C. citratus* ($IC_{50} = 13,72$ mg/mL) el que presenta menor actividad antioxidante.

Por otra parte, para el ensayo del radical ABTS los resultados obtenidos demostraron que el valor más bajo fue para el AE de vainas de *C. citratus* ($IC_{50} = 9,29$ mg/mL), seguido del AE

de hojas de *C. citratus* ($IC_{50} = 10,62$ mg/mL), siendo el valor más alto el del AE de *T. vulgaris* ($IC_{50} = 11,28$ mg/mL).

Tabla 15. Actividad antioxidante de los aceites esenciales de *Cymbopogon citratus* Stapf con los radicales libres DPPH y ABTS.

	IC ₅₀	
	DPPH	ABTS
AE de hojas <i>C. citratus</i>	9,26	10,62
AE de vainas <i>C. citratus</i>	13,72	9,29
AE de <i>T. vulgaris</i>	5,61	11,28

Elaborado por: (Los Autores, 2023)

Con estos valores y por separado, se realizó un análisis estadístico de normalidad y varianza descritos en los Anexos 2 y Anexos 3 respectivamente, cuyo resultado nos permite determinar que al menos un valor del material estudiado es diferente. Mediante el test de Tukey (Tabla 16) se evidencia que el valor más alto de actividad antioxidante corresponde al AE de hojas de *C. citratus*, mientras que el de menor actividad antioxidante es el AE de vainas; la actividad antioxidante del AE de hojas de *C. citratus* es estadísticamente similar al de *T. vulgaris*.

Tabla 16. Test de Tukey para DPPH

Error: 1,6067 gl: 6

Material	Medias	n	E.E.	
Vaina	13,72	3	0,73	A
Hojas	7,29	3	0,73	B
Tomillo	5,56	3	0,73	B

Elaborado por: (Los Autores, 2023)

Para el análisis de actividad antioxidante mediante el radical ABTS se emplearon las mismas pruebas descritas anteriormente Anexos 4 y Anexos 5, y de igual forma estas pruebas evidencian que por lo menos un valor de material es estadísticamente diferente, por lo que al aplicar el test de Tukey (Tabla 17), se comprueba que el valor más alto (actividad antioxidante menor) corresponde al AE de vainas de *C. citratus* (11,34), seguido del AE de hojas de *C. citratus* (10,64), siendo el AE de *T. vulgaris* (9,38) el que presentó el menor valor de IC₅₀ (mayor actividad antioxidante), siendo estadísticamente igual al valor de AE de hojas.

Tabla 17. Test de Tukey para ABTS

Error: 0,5266 gl: 6

Material	Medias	n	E.E.		
Vaina	11,34	3	0,42	A	
Hojas	10,64	3	0,42	A	B
Tomillo	9,38	3	0,42		B

Elaborado por: (Los Autores, 2023)

4.7 Determinación de la concentración mínima inhibitoria en aceites (CMI)

Los datos de absorbancia obtenidos en el lector de microplacas permitieron generar una base de datos, tanto para las muestras con aceite esencial de *Cymbopogon citratus* y para el estándar de citral, mismas que fueron usadas para inferir la concentración mínima inhibitoria (CMI) contra *Pseudomonas fluorescens*. Se empleó la prueba de Shapiro-Wilks y un posterior análisis de varianza para los tratamientos de cada fila de pocillos con el fin de determinar que valores son estadísticamente similares al control positivo (cloranfenicol). Para las muestras con aceite esencial no existió diferencia estadística con el control antimicrobiano hasta la dilución B (p-valor > 0,05) (Anexos 6 y Anexos 7). Al repetir el procedimiento en la dilución C se encuentran diferencias significativas entre tratamientos aun teniendo un (p-valor > 0,05) y al aplicar el test de agrupamiento de Duncan se comprobó que el aceite esencial de vainas es igual al control antimicrobiano (Tabla 18 y Tabla 19). Estos resultados denotan que la concentración mínima inhibitoria (CMI) de hojas es equivalente a la dilución de

concentración B (33000 µg/mL) en tanto que para vainas es la dilución C (16500 µg/mL). A partir de la dilución D (8250 µg/mL) los dos aceites presentan diferencias significativas notables con el control positivo no teniendo capacidad de inhibición de la actividad.

Con esto podemos concluir que el aceite esencial de vainas tiene una actividad débil en tanto que la actividad de hojas es inexistente, de acuerdo a la categorización propuesta por Baser & Buchbauer (2016).

Tabla 18. Análisis de varianza (aceites)

F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,06	3	0,02	3,19	0,0565
Tratamientos	0,06	3	0,02	3,19	0,0565
Error	0,09	14	0,01		
Total	0,15	17			

Elaborado por: (Los Autores, 2023)

Tabla 19. Test de Duncan (aceites)

Error: 0,0066 gl:14

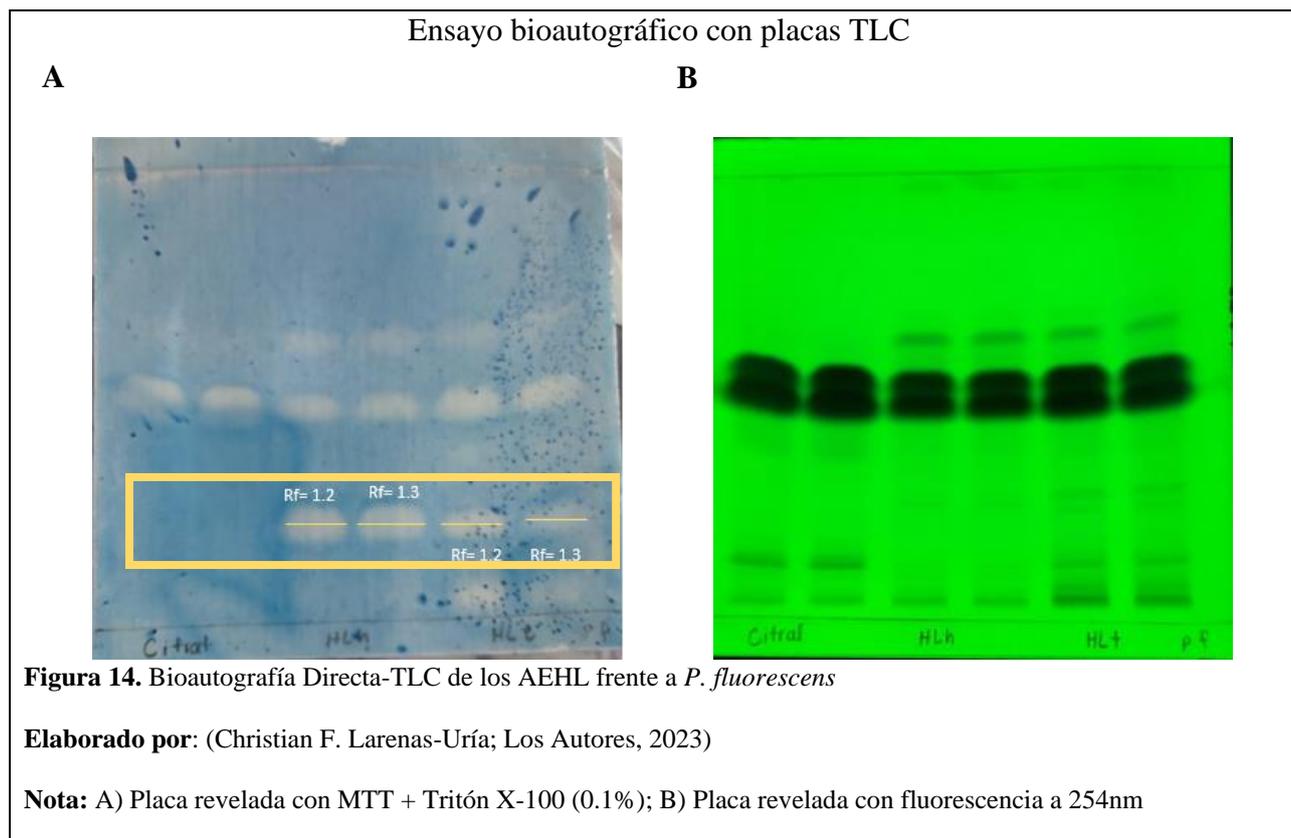
Tratamiento	Medias	n	E.E.		
Tomillo	0,2	4	0,04	A	
Hojas	0,18	4	0,04	A	
Vainas	0,14	4	0,04	A	B
Cloranfenicol	0,05	6	0,03		B

Elaborado por: (Los Autores, 2023)

4.8 Bioautografía antimicrobiana por TLC

La técnica bioautográfica llevada a cabo en TLC frente a *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525TM y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923TM como control comparativo, develó que las bandas implicadas en la actividad antimicrobiana son las moléculas ubicadas en los recuadros señalados en la Figura 14 para bacterias Gram negativas y en la Figura 15 para bacterias Gram positivas, reveladas con el colorante MTT. Estas fracciones están constituidas por aquellos compuestos que interactuaron debido al crecimiento bacteriano a las condiciones requeridas por las bacterias.

En ambas placas, podemos apreciar que el ensayo de bioautografía permite apreciar zonas no coloreadas, mismas que demuestran la acción inhibitoria de crecimiento bacteriano presentes en el aceite esencial de *C. citratus* de hojas y vainas. Este ensayo se pudo convalidar previamente con la técnica de microdilución en placa para CMI.



Ensayo bioautográfico con placas TLC

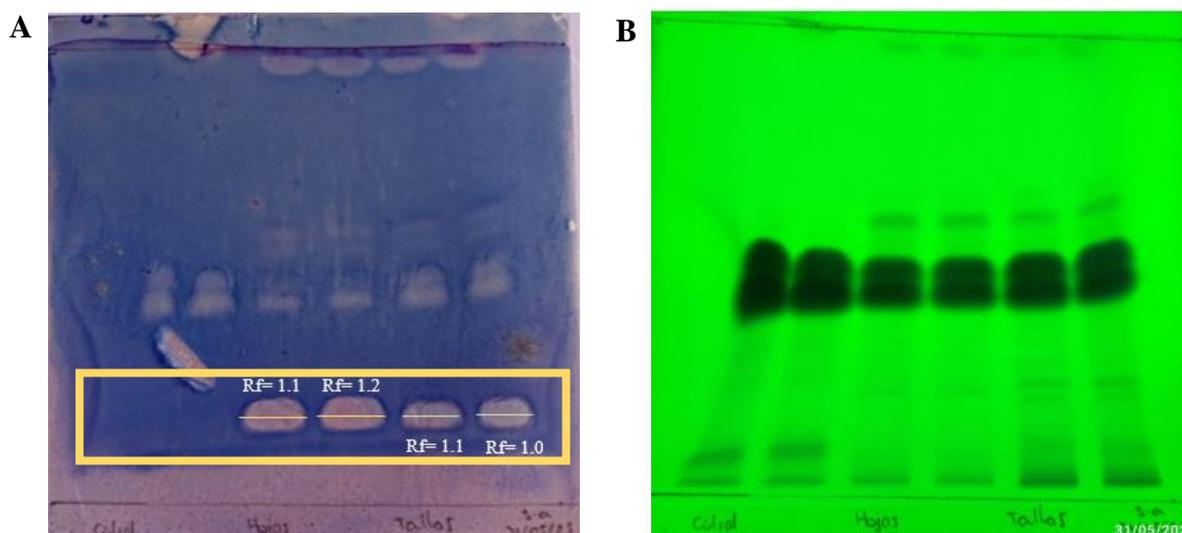


Figura 15. Bioautografía Directa-TLC de los AEHL frente a *S.aureus*

Elaborado por: (Christian F. Larenas-Uría; Los Autores, 2023)

Nota: A) Placa revelada con MTT + Tritón X-100 (0.1%); B) Placa revelada con fluorescencia a 254nm

Analizando la revelación de las placas, en función de la polaridad de los compuestos y su orden de elución los compuestos obtenidos son alcoholes y aldehídos, empezando por la obtención de geraniol para hojas y vainas, como se indica en el recuadro color amarillo, esto se debe a que este constituyente es un alcohol y es retenido en mayor medida por su polaridad, esto se puede confirmar con la placa preparada únicamente para aceites como se indica en el Anexos 10, los citrales corren a menos tiempo al ser menos polares evidenciándose para las 3 muestras distintas; sin embargo, para este estándar la mayor concentración se encuentra en vainas.

Con esta técnica bioautográfica por TLC podemos apoyar los resultados obtenidos por HPTLC, teniendo en cuenta que componentes se pueden presentar en base a citral.

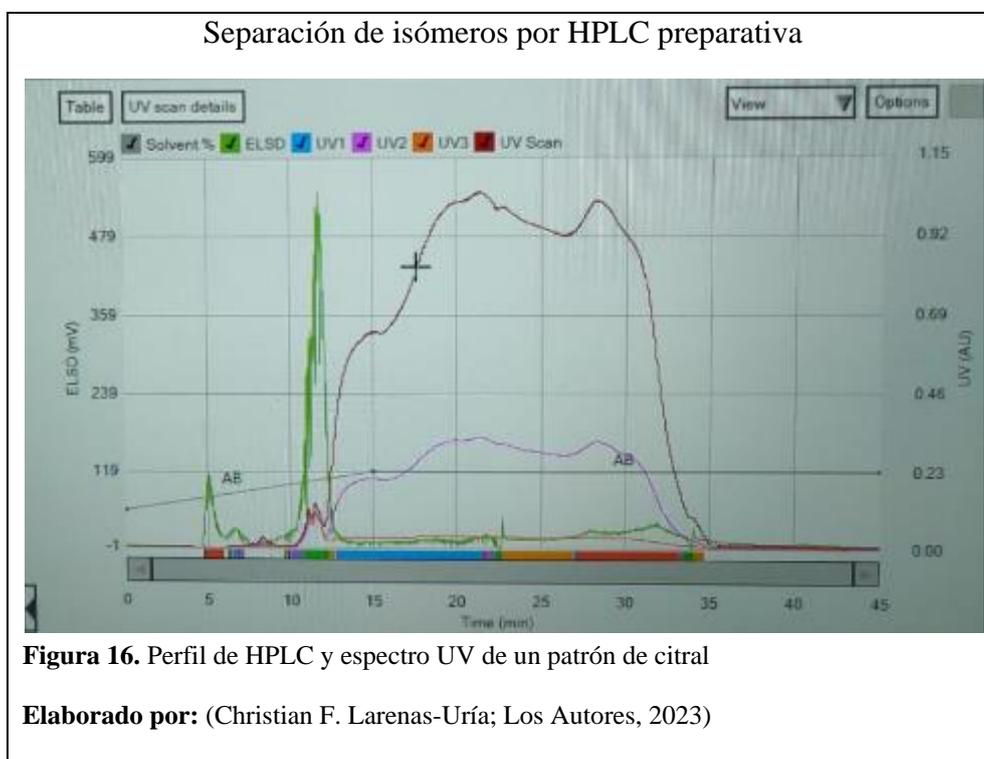
Así mismo, lo mencionado, se demuestra en el estudio de Shah et al., (2011) citado por (Bermúdez et al., 2019), en esta investigación se comprueba la actividad del aceite de *C. citratus* para inhibir a *Staphylococcus aureus*, llegando a tener resultados positivos los cuales se adjudican a tres compuestos característicos que son: el α -citril y el β -citril que actúan de forma individual sobre bacterias Gram positivas y negativas y el mirceno que no presenta actividad antibacteriana

demostrable por sí solo. Así lo confirma Ekpenyong et al., (2015) citado por (Poveda et al., 2023), indicando que la actividad antibacteriana que se le confiere a *Cymbopogon citratus* se le atribuye a α -citral, mircenoy el β -citral.

En la literatura, no se puede encontrar información sobre la inhibición del crecimiento de *Pseudomona fluorescens* por los aceites de *Cymbopogon citratus*.

4.9 Análisis de isómeros obtenidos por HPLC y GC-MS

De acuerdo a los resultados de HPLC preparativa (Figura 16), se obtuvieron 5 fracciones distintas para citral, se consideró que la fracción 1 corresponde al primer grupo de isómeros y la fracción 2-5 corresponde al segundo grupo de isómeros, lo cual se corrobora por el análisis GC-MS.



De acuerdo al ensayo cromatográfico por GC-MS de las 5 fracciones obtenidas por HPLC, la fracción 1 obtuvo los mejores resultados de separación, obteniéndose 17 compuestos de los cuales el componente mayoritario es el neral, isómero perteneciente a la configuración cis, con un porcentaje de separación total del 69,93%, así lo podemos verificar en la Tabla 20.

Tabla 20. Componentes obtenidos de la fracción 1 por GC-MS

Compuesto	Fórmula	Tiempo de retención (min.)	Área	% Total
10,23 Octanone<5-hydroxy-4>	C8H16O2	7.000	5.127e+08	1.626
3-Hepanol	C7H16O	7.358	1,01E+09	3.215
3-Octanol, acetate	C10H20O2	12.305	1,48E+09	4.705
14.06 Isocitral<Z->	C10H16O	14.609	1,60E+09	5.079
14.82 Isocitral<E->	C10H16O	16.187	1,26E+09	4.002
14.82 Isocitral<E->	C10H16O	16.192	1,11E+09	3.531
17.32 Neral	C10H16O	21.339	4,17E+09	13.239
17.32 Neral-Dup1	C10H16O	21.359	1,03E+09	3-271
17.32 Neral-Dup2	C10H16O	21.428	3,73E+09	11.826
17.32 Neral-Dup3	C10H16O	21.478	3,29E+09	10.432
17.32 Neral-Dup4	C10H16O	21.507	2,18E+09	6.917
17.32 Neral-Dup5	C10H16O	21.526	1,29E+09	4.081
17.32 Neral-Dup6	C10H16O	21.547	1,51E+09	4.794
17.32 Neral-Dup7	C10H16O	21.569	2,00E+09	6.336
17.32 Neral-Dup8	C10H16O	21.586	3,25E+09	10.302
2-Methyl-4-pentenoic acid	C6H10O2	21.463	1,15E+09	3.650
2-Methyl-4-pentenoic acid	C6H10O2	21.489	9,44E+08	2.995

Elaborado por: (Los Autores, 2023).

Los espectros de masa extraídos del ensayo GC-MS (Anexos 11), nos permiten diferenciar los isómeros cis y trans citral correspondientes a neral y geranial respectivamente, en donde se da una representación de la separación que se ha producido a partir de la muestra base que es citral, en estos resultados se muestra una secuencia de picos que ascienden en función del tiempo, para ambos isómeros cada pico representa la detección del detector para estos componentes.

4.10 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de citral y sus fracciones isoméricas

Para el caso de las muestras con citral y sus fracciones se realizó un procedimiento igual al descrito en el acápite anterior (análisis de comparación del p valor con el control positivo), observando que el p-valor del Anova ($p < 0,05$) y con el Test de Duncan para la disolución E (Anexos 8) es estadísticamente diferente para todos los tratamientos respecto al control positivo (

Anexos 9). Acorde a esto, se estableció que la dilución D (CMI = 8250 $\mu\text{g/mL}$), teniendo así que, son estadísticamente similares el control positivo con el citral y la fracción geranial, en tanto que la fracción neral tiene una menor capacidad inhibitoria (Dilución C, CMI = 16500 $\mu\text{g/mL}$), tal como se indica en las Tabla 21 y Tabla 22.

Tabla 21. Análisis de varianza (citral)

F. V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,41	3	0,14	2,36	0,1191
Tratamientos	0,41	3	0,14	2,36	0,1191
Error	0,76	13	0,06		
Total	1,18	16			

Elaborado por: (Los Autores, 2023)

Tabla 22. Test de Duncan (citral)

Error: 0,0544 gl: 13

Tratamientos	Medias	n	E.E.		
Neral	0,46	4	0,12	A	
Citral	0,17	3	0,14	A	B
Geranial	0,17	4	0,12	A	B
Cloranfenicol	0,05	6	0,10		B

Elaborado por: (Los Autores, 2023)

5 Conclusiones

En esta investigación se pudo obtener datos relevantes que permitieron la diferenciación de los aceites esenciales de dos estructuras de la especie vegetal *C. citratus* (hojas y vainas), esta diferencia radica no sólo en las características organolépticas sino también se manifiesta en la composición cualitativa y cuantitativa de sus distintos constituyentes y en especial a su relación de composición isomérica que le otorga una actividad biológica singular a las diferentes partes cosechadas de la planta.

En la extracción de los aceites esenciales de hierba luisa por hidrodestilación, se consiguió un rendimiento más alto en hojas que en vainas, alcanzando un 22,91% más de aprovechamiento del material vegetal para la extracción del aceite; esto se debe a que la relación peso/volumen (p/v) interfiere directamente en este proceso; en este contexto, es importante mencionar que se parte inicialmente con la misma cantidad de muestra vegetal; sin embargo, en la separación de sus estructuras se obtuvo un 43,67% menos de vainas que de hojas, al ser de menor tamaño y peso.

Se realizó por primera vez la hidrodestilación y extracción del aceite esencial separando vainas de hojas de *C. citratus*, demostrando que la actividad biológica de estos metabolitos secundarios en particular depende de los constituyentes presentes en la estructura vegetal analizada. Esto se pudo determinar por el ensayo cromatográfico GC-MS dado que las vainas de hierba luisa contienen mayores niveles de citral, prevaleciendo el geranial (isómero E de citral) antes que el neral (isómero Z de citral), en tanto que las hojas son más ricas en geraniol. Además, se pudo comprobar por la técnica bioautográfica por TLC que en las vainas efectivamente hay concentraciones más altas de citral que en hojas y por ende una actividad biológica diferente. A partir de esto, se resalta la importancia del estudio y análisis de estas estructuras vegetales por separado.

La actividad antioxidante frente al radical DPPH, mostró valores para hojas ($IC_{50} = 7,28$), y para vainas ($IC_{50} = 5,55$). Para el radical ABTS, mostró valores para hojas ($IC_{50} = 10,64$) y para vainas ($IC_{50} = 11,34$). Según estos resultados y de acuerdo al análisis estadístico presentado, no existen diferencias significativas entre las actividades antioxidantes de las partes vegetales, sin embargo, comparando con el control natural (aceite esencial de tomillo) y de acuerdo a las pruebas de

agrupación Tukey, se puede concluir que existe una ligera mayor actividad antioxidante en hojas comparado con vainas, lo cual se puede explicar por la mayor concentración de geraniol respecto a los terpenos de tipo aldehído predominantes en las vainas.

Tras la metodología de CMI se identifica para el aceite esencial de hierba luisa un efecto antibacteriano débil sobre la cepa ATCC 13525TM de *Pseudomona fluorescens*. Se puede concluir que el aceite esencial de vainas (33000 ug/mL) tiene una actividad diferente al de hojas (16500 ug/mL) debido a la mayor concentración de moléculas con grupos funcionales aldehído (Mayor concentración de citral en vainas que en hojas). La presencia de los constituyentes principales como citral, geraniol, citronelal, acetato de lavandulilo, entre otros puede contribuir a la actividad inhibitoria de los aceites esenciales. Para *Staphylococcus aureus*, como control comparativo de cepa Gram positiva no se obtuvieron resultados concluyentes en esta investigación. En este mismo contexto, para citral y los isómeros, citral y neral tienen una actividad débil (CMI = 8250 ug/mL) al igual que geraniol con una actividad (CMI = 16500 ug/mL) con respecto al antibiótico.

Los aceites esenciales tanto de hojas como de vainas, indican respuestas biológicas interesantes en relación a la composición química que presentan, permitiendo ser aprovechados para distintos fines en especial medicinales, y los resultados obtenidos en esta y otras investigaciones sobre esta especie permiten dar mayor eficacia a nuevas soluciones de interés social como en la industria farmacéutica para la formulación de fitofármacos puros, en biomedicina como un control cancerígeno, en la industria dermocosmética para prevención de enfermedades de la piel mediadas por el estrés oxidativo, y en el sector agrícola como protector de cultivos y plantas.

6 Recomendaciones

Tomando en cuenta que no existen reportes comprobados previos a esta investigación acerca del aceite de vainas de *Cymbopogon citratus*, se recomienda ampliar la investigación y concretar los resultados vistos en este análisis.

Se sugiere hacer un estudio más detallado tomando en cuenta la estacionalidad y las horas de cosecha.

En relación a los isómeros de los aceites esenciales de hierba luisa, no se pudo realizar su correcta separación debido a la falta de tiempo y sobre todo los problemas instrumentales que se fueron presentando a lo largo del proyecto, con respecto al mantenimiento y buen funcionamiento de los equipos necesarios para esta técnica, es por esto que se recomienda tener a disposición para futuras investigaciones el material y equipo en buenas condiciones.

Se sugiere indagar y desarrollar lo evaluado en esta investigación con respecto a los isómeros con mayor disponibilidad de tiempo y reactivos que cumplan con las normas de calidad.

7 Bibliografía

- Acevedo, D., Navarro, M., & Monroy, L. (2013a). Composición química del aceite esencial de hojas de orégano (*Origanum vulgare*). *Información Tecnológica*, 24(4), 43–48. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642013000400005>
- Acevedo, D., Navarro, M., & Monroy, L. (2013b). Composición química del aceite esencial de hojas de orégano (*Origanum vulgare*). *Información Tecnológica*, 24(4), 43–48. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642013000400005>
- Almeida, G., & Suárez, S. (2014). Estudio de la Actividad Antimicrobiana y Antioxidante del Aceite Esencial del Rizoma de *Renealmia thyrsoidea* subsp. *thyrsoidea* (*Zingiberaceae*).
- Armijo, J., Vicuña, E., Romero, P., Condorhuamán, C., & Hilario, B. (2012). Modelamiento y simulación del proceso de extracción de aceites esenciales mediante la destilación por arrastre con vapor. In *Rev. Per. Quím. Ing. Quím* (Vol. 15, Issue 2).
- Azaña, V., & Castillo, L. (2017). Características fisicoquímicas de los aceites esenciales de las hojas de *Cymbopogon citratus* y determinación del porcentaje relativo de sus componentes hidrocarbonados y oxigenados. Universidad Nacional de Trujillo.
- Baser, H., & Buchbauer, G. (2015). *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications* (Second Edition).
- Bassolé, I. H. N., Lamien-Meda, A., Bayala, B., Obame, L., Ilboudo, A., Franz, C., Novak, J., Nebié, R., & Dicko, M. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. *Phytomedicine*, 18(12), 1070–1074. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.05.009>
- Bay House. (2013). *Safety data sheet*.
- Bermúdez, M., Granados, F., & Molina, A. (2019). Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Psidium guajava* y *Cymbopogon citratus*. *Agronomía Mesoamericana*, 30(1), 147–163. <https://doi.org/10.15517/am.v30i1.33758>
- Buchi. (n.d.). *Separation of Citral Isomers From Lemongrass Oil*.
- Calderón, L., & Ojeda, A. (2022). Composición química y estudios bioautográficos de actividad biológica de la especie *Clinopodium brownei* (Sw.) Kuntze.
- Cardenas, A., & Farfán, P. (2021). Efecto antibacteriano in vitro del extracto hidroetanólico de *Cymbopogon Citratus* (hierba luisa) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 [Tesis]. Universidad César Vallejo.
- CECT. (2012). Instrucciones viales de conservación (bacterias y levaduras). In *Colección Española de Cultivos*. <http://www.cect.org>
- Cerutti, M., & Neumayer, F. (2004). Introducción a la obtención de aceite esencial de limón.
- César Moreno. (2017). Práctica determinación de la densidad en aceites (método picnómetro).
- Chen, W., & Viljoen, A. (2010). Geraniol - A review of a commercially important fragrance material. *South African Journal of Botany*, 76(4), 643–651. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.05.008>
- Cruz, S. (2007). *Hierba Luisa*.

- Cusme, L., & Tacuri, B. (2022). Estudio de la Hierba Luisa y propuesta culinaria para la aplicación de postres Fríos [Universidad de Guayaquil]. <https://secure.urdok.com/view/125740523-921498-105589>
- D'Armas, H., Montesino, K., Jaramillo, C., & León, R. (2018). Composición química de aceites esenciales de las hojas de ocho plantas medicinales cultivadas en Ecuador. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 22(2).
- Dellacassa, E., Lorenzo, D., & Paz, D. (2008). Estudios en domesticación y cultivos de especies medicinales y aromáticas nativas. *Revista de Plantas Medicinales*, 11, 159–167.
- Díaz, J., Díaz, R., & Díaz, C. (2021). Bacterias Gram Positivas y Gram Negativas de Interés Clínico Aisladas en Teléfonos Móviles de Estudiantes de Medicina en una Universidad Peruana. *DIAGNÓSTICO*, 60(3), 1–7.
- Domingo, G. (1949). Composición del aceite esencial de lemon-grass de la Gobernación de Misiones [Tesis]. Universidad de Buenos Aires.
- Dong, M., & Llanas, A. (2013). The Essence of Modern HPLC: Advantages, Limitations, Fundamentals, and Opportunities. *Lc Gc North America*, 31, 472.
- Enríquez, M., Poveda, S., & Alvarado, G. (2023). Bioactivos de la hierba luisa utilizados en la industria. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 14(1), 1–11.
- Estrada, D., Marroquín, R., Saguil, J., Valiente, F., Casasola, A., Suchini, J., & Estrada, K. (2021). Citronela, *Cymbopogon winterianus* - *Cymbopogon nardus*.
- Fernández, M., Cruz, C., Cunalata, G., & Matute, N. (2020). Infusiones de *Moringa oleifera* (moringa) combinada con *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) y *Lippia alba* (mastranto). *Revista Ciencia UNEMI*, 13(34), 114–126.
- Flores, M. (2010a). Investigación de los Aceites Esenciales, sus Características y Finalidad de uso. In *Universidad de Chile* (Issue 564).
- Flores, M. (2010b). *Investigación de los Aceites Esenciales, sus Características y Finalidad de Uso*. Universidad de Chile.
- Freire, Á. (2018). Elaboración de jabón líquido con aceite vegetal de unguirahua (*Oenocarpus bataua*) y aceites esenciales de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*). Universidad Estatal Amazónica.
- Gamboa, N. (1991). El empleo de la derivada en la espectroscopia ultravioleta-visible. *Revista de Química*, 5(2), 179–195.
- García, S. (2010). Caracterización fisicoquímica de aceite esencial de limón de Tucuman. *Cuartas Jornadas de Jóvenes Investigadores UNT*, 1–9.
- Gómez, M., & Tito, V. (2017). Análisis multivariado de componentes terpénicos, en aceite esencial de Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus*), mediante espectrofotometría UV - Visible derivada.
- Guerrero, P., & Pozo, K. (2016). Evaluación de la Actividad Antioxidante Bioautográfica de cinco Variedades de Aceites Esenciales Andinos (*Aristeguietia glutinosa*; *Myrcianthes rhopaloides*; *Ambrosia arborescens*; *Lantana camara*; *Minthostachys mollis*).
- Gutiérrez, A. (2020). Aplicaciones del Índice de Refracción Complejo.
- Gutiérrez, M., & Droguet, M. (2002). La Cromatografía de Gases y la Espectrometría de Masas: Identificación de Compuestos Causantes de mal Olor. In *Nº* (Vol. 122).

- Hanna, M., Sallam, Y., El-Leithy, A., & Safaa, A. (2012). Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as affected by drying methods. *Annals of Agricultural Sciences*, 57(2), 113–116. <https://doi.org/10.1016/j.aosas.2012.08.004>
- Heisler, E., Budó, M., Schimith, M., Badke, M., Ceolin, S., & Heck, R. (2015). Uso de plantas medicinales en el cuidado de la salud: la producción científica de tesis y disertaciones de enfermería brasileña.
- HEVEA. (2015). *Los aceites esenciales*.
- Huamán, H., Balcazar, C., Chávez, S., & Auquiñivin, E. (2020). Evaluación de la capacidad antioxidante y actividad antibacteriana del extracto acuoso y etanólico de *Cymbopogon citratus*. *Revista Científica UNTRM: Ciencias Naturales e Ingeniería*, 3(2), 9–15. <https://doi.org/10.25127/ucni.v3i2.608>
- IDEXX. (2022). Guía Microbiológica para Interpretar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).
- Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. (2013). *Citral*.
- Kahli, H., Béven, L., Grauby-H, Debez, N., Gammoudi, I., Moroté, F., Sbartai, H., & Cohen-Bouhacina, T. (2022). Impact of Growth Conditions on *Pseudomonas fluorescens* Morphology Characterized by Atomic Force Microscopy. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17), 9579. <https://doi.org/10.3390/ijms23179579>
- Kuskoski, E., Asuero, A., García, M., Troncoso, A., & Fett, R. (2004). Actividad Antioxidante de Pigmentos Antociánicos. *Cienc. Tecnol. Aliment., Campinas*, 24(4), 691–693.
- Leyva, M., Martínez, J., & Stashenko, E. (2007). Composición química del aceite esencial de hojas y tallos de *Bursera graveolens* (Burseraceae) de Colombia. *Scientia Et Technica*, 8(33), 201–202.
- Logroño, P., & Lozano, J. (2019). Estudio de diversidad química cualitativa y cuantitativa de aceites esenciales provenientes de diferentes variedades de rosas híbridas de té [Tesis]. Universidad Politécnica Salesiana.
- López, N., Miguel, M., & Alexandre, A. (2012). Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud. *Nutr. Clín. Diet. Hosp*, 32(3), 81–91.
- Luminar, C. (2013). Estudio Fitoquímico de los Frutos de *Protium tovarense pittier* (Burseraceae).
- Maricela, J., & Calva, L. (2019). Estudio de Diversidad Química Cualitativa y Cuantitativa de Aceites Esenciales Provenientes de Diferentes Variedades de Rosas Híbridas de Té.
- Marín, I. (2015). Actividad Antioxidante y Antibacteriana de Aceites Esenciales Ecológicos de Hinojo, Perejil y Lavanda.
- Meier, D. (2016). Separation of citral isomers from lemongrass oil. *XPRT Environmental* .
- Meza, K., & Vargas, G. (2013). Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus* (DC) STAPF), Poaceae en una formulación cosmética con finalidad antiacnéica. [Tesis]. Universidad Politécnica Salesiana.
- Meza, L., & Vargas, G. (2013). Evaluación de la Actividad Antibacteriana in vitro del Aceite Esencial de Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus* (DC) STAPF), Poaceae en una Formulación Cosmética con Finalidad Antiacnéica.

- Morales, C. (2020). Origen, historia natural y usos de las plantas introducidas en Costa Rica. *UNED Research Journal*, 12(2), 1–125. <https://doi.org/10.22458/urj.v12i2.3098>
- Noriega, P., Mosquera, T., Baldisserotto, A., Abad, J., Aillon, C., Cabezas, D., Piedra, J., Coronel, I., & Manfredini, S. (2015). Chemical Composition and in-vitro biological activities of the essential oil from leaves of *Peperomia inaequalifolia* Ruiz & Pav. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, 2(4), 29–31.
- Ojeda, A., & Calderón, L. (2022). Composición Química y Estudios Bioautográficos de Actividad Biológica de la Especie *Clinopodium brownei* (Sw) Kuntzw.
- Ortega, C., & Usca, P. (2018). Evaluación in vitro de la actividad inhibitoria de aceites esenciales y sus mezclas (*Curcuma longa*, *Cymbopogon citratus*, *Ocotea quixos*, *Melaleuca armillaris*, *Zingiber officinale*) en *Aeromona hydrophila*, *Aeromona salmonicida* y *Pseudomona fluorescens* [Tesis]. Universidad Politécnica Salesiana.
- Ortega, L. (2013). *Sinergismo antibacteriano entre compuestos terpénicos de Cymbopogon citratus y azufrados de Allium cepa* [Tesis]. Centro de Investigación en Alimentación Desarrollo A:C.
- Ortiz, R., Vega, G., & Tamajón A. (2022). Instructivo técnico del cultivo de *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf (caña santa). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 7(2).
- Osorio, E. (2020a). *Identificación química y perspectiva medicinal de los aceites esenciales de hojas, semillas y flores de Magnolia pugana*.
- Osorio, E. (2020b). *Identificación química y perspectiva medicinal de los aceites esenciales de hojas, semillas y flores de Magnolia pugana*. Universidad de Guadalajara.
- Palá, J. (2005). *Contribución al conocimiento de los aceites esenciales del género “Eryngium” L, en la Península Ibérica : memoria para optar al grado de doctor*.
- Patiño, W. (2017). *Aceites esenciales como potenciales agentes fitosanitarios para el control de Sitophilus zeamais* [Tesis]. Universidad Nacional de Colombia.
- Pauli, A., & Schilcher, H. (2015). Antioxidative Properties of Essential Oils and Single Fragrance Compounds. In *Handbook of Essential Oils* (Octava Edición, pp. 340–361). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b19393-15>
- Pérez, S., Coto, O., Echemendía, M., & Ávila, G. (2015). *Pseudomonas fluorescens* Migula, ¿control biológico o patógeno? *Rev. Protección Veg*, 30(3), 225–234.
- Picot, L., Abdelmoula, S., Merieau, A., Leroux, P., Cazin, L., Orange, N., & Feuilloley, M. (2001). *Pseudomonas fluorescens* as a potential pathogen: adherence to nerve cells. *Microbes and Infection*, 3(12), 985–995. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01462-9](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01462-9)
- Piedrasanta, R. (2007). Comparación química y rendimiento del aceite esencial de hojas y raíz de *Valeriana prionophylla* Standl. de dos diferentes localidades de Guatemala [Tesis]. Universidad San Carlos de Guatemala.
- Poveda, S., Enriquez, M., & Alvarado, G. (2023). Bioactivos de la hierba luisa utilizados en la industria. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 4(1), 1–11.
- Quintas, R. (2021). *Actividad antioxidante del aceite esencial de Cymbopogon citratus (DC). Stapf. “hierba luisa.”* Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.
- Rioja, A., Vizaluque, B., Aliaga, E., Book, O., Mollinedo, P., & Peñarrieta, M. (2018). Determinación de la Capacidad Antioxidante Total, Fenoles Totales, y la Actividad Enzimática en una bebida

no Láctea en BAsa a Granos de *Chenopodium quinoa*. *Universidad Mayor de San Andrés*, 35(5), 168–176.

Rodríguez, M., Alcaraz, L., & Real, S. (2012). *Procedimientos para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas*. <http://www.cibnor.mx>

Rodríguez, P., & Arenas, R. (2018). *Hans Christian Gram y su tinción*.

Rojas, J., Ronceros, S., Palacios, O., & Sevilla, C. (2012). *Efecto anti- Trypanosoma cruzi del aceite esencial de Cymbopogon citratus (DC) Stapf (hierba luisa) en ratones Balb/c*. 73(1), 7–12.

Ruiz, C., Díaz, C., & Rojas, R. (2015). *Composición Química de Aceites Esenciales de 10 Plantas Aromáticas Peruanas*.

Ruiz, M. (2020). *Guía de Determinación de la actividad antioxidante*.

Ruktanonchai, U., Srinuanchai, W., Saesoo, S., Sramala, I., Puttipipatkachorn, S., & Soottitantawat, A. (2011). Encapsulation of citral isomers in extracted lemongrass oil with cyclodextrins: Molecular modeling and physicochemical characterizations. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 75(12), 2340–2345. <https://doi.org/10.1271/bbb.110523>

Scales, B., Dickson, R., LiPuma, J., & Huffnagle, G. (2014). Microbiology, Genomics, and Clinical Significance of the *Pseudomonas fluorescens* Species Complex, an Unappreciated Colonizer of Humans. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 927–948. <https://doi.org/10.1128/CMR.00044-14>

Scalvenzi, L., Grandini, A., Spagnoletti, A., Tacchini, M., Neill, D., Ballesteros, J., Sacchetti, G., & Guerrini, A. (2017). *Myrcia splendens* (Sw.) DC. (syn. *M. fallax* (Rich.) DC.) (myrtaceae) essential oil from amazonian Ecuador: A chemical characterization and bioactivity profile. *Molecules*, 22(7), 1–12. <https://doi.org/10.3390/molecules22071163>

Soto, V., Camargo, A., González, R., & Galmarini, C. (2007). Síntesis y Purificación de Ajoeno y su Cuantificación en Aceites Comerciales de Ajo. *Revista de La Facultad de Ciencias Agrarias*, XXXIX(1), 93–100. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=382837653009>

Suarez, D., & Morales, Y. (2018). Principios Básicos de la Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento para la Separación y Análisis de Mezclas. *América Revista Semilleros: Formación Investigativa*, 4(1), 7–14.

Valverde, P. (2015a). Composición química, potencial antimicrobiano y letal de los aceites esenciales de las hojas de Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus*), Mastrante (*Ageratum conyzoides*), Guabiduca (*Piper carpunya*), Ajenjo (*Artemisia absinthium*) Y Cedrón (*Lippia citriodora*), cultivados en la República del Ecuador. Universidad Técnica de Machala.

Valverde, P. (2015b). Composición Química, Potencial Antimicrobiano y Letal de los Aceites Esenciales de las Hojas de Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus*), Mastrante (*Ageratum conyzoides*), Guabiduca (*Piper carpunya*), Ajenjo (*Artemisia absinthium*) y Cedrón (*Lippia citriodora*), Cultivados en la República del Ecuador.

Vázquez, M., & Guerrero, J. (2017). Effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in the physicochemical properties of chitosan films. *Scientia Agropecuaria*, 8(4), 401–409. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2017.04.11>

8 Anexos

Anexos 1. Identificación botánica de la especie vegetal



5 de agosto del 2022

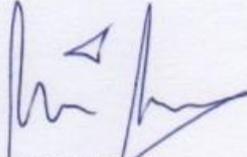
CERTIFICACIÓN

Mediante la presente certifico que las muestras presentadas por los estudiantes Fabián Israel Andrade Argudo y Norelia Deyaneira Troya Manrique colectadas en Provincia de Pichincha, Cantón Pedro Vicente Maldonado, Parroquia San Vicente de Andoas, a 822 m s.n.m., corresponde a la especie:

Nombre común	Ubicación	Nombre científico FAMILIA	CODIGO
Hierba Luisa	0° 05' 28 N 78° 58' 51 " W	<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf POACEAE	01

Es todo cuanto puedo certificar y autorizo a los estudiantes Andrade y Troya hacer uso de este certificado.

Atentamente,



Marco Cerna Ph.D.
CURADOR HERBARIO QUPS
DOCENTE INVESTIGADOR
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

RA DE BIOTECNOLOGÍA

Anexos 2. Análisis estadístico (Shapiro-Wilks) actividad antioxidante con DPPH

Material	Variable	n	Media	D.E.	W*	p (Unilateral D)
Hojas	Inhi	3	7,29	1,99	1,00	0,9064
Tomillo	Inhi	3	13,72	0,21	1,00	0,9043
Vaina	Inhi	3	5,56	0,9	0,88	0,3153

Elaborado por: (Los Autores, 2023)

Anexos 3. Análisis de Varianza actividad antioxidante con DPPH

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	111,08	2	55,54	34,57	0,0005
Material	111,08	2	55,54	34,57	0,0005
Error	9,64	6	1,61		
Total	120,72	8			

Elaborado por: (Los Autores, 2023)

Anexos 4. Análisis estadístico (Shapiro-Wilks) actividad antioxidante con ABTS

Material	Variable	n	Media	D.E.	W*	p (Unilateral D)
Hojas	Inhi	3	10,64	0,44	0,85	0,2503
Tomillo	Inhi	3	3,38	0,6	0,81	0,1441
Vaina	Inhi	3	11,34	1,02	0,94	0,5318

Elaborado por: (Los Autores, 2023)

Anexos 5. Análisis de Varianza actividad antioxidante con ABTS

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	5,98	2	2,99	5,68	0,0413
Material	5,98	2	2,99	5,68	0,0413
Error	3,16	6	0,53		
Total	9,14	8			

Elaborado por: (Los Autores, 2023)

Anexos 6. Análisis de varianza (dilución B- aceites)

F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,02	3	0,01	1,84	0,1860
Tratamientos	0,02	3	0,01	1,84	0,1860
Error	0,05	14	3,3E-03		
Total	0,06	17			

Elaborado por: (Los Autores, 2023)

Anexos 7. Test de Duncan (dilución B - aceites)

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
Vainas	0,13	4	0,03	A
Hojas	0,12	4	0,03	A
Tomillo	0,11	4	0,03	A
Cloranfenicol	0,05	6	0,02	A

Elaborado por: (Los Autores, 2023)

Anexos 8. Análisis de varianza (dilución E - citral)

F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,81	3	0,27	4,97	0,0164
Tratamientos	0,81	3	0,27	4,97	0,0164
Error	0,71	13	0,05		
Total	1,52	16			

Elaborado por: (Los Autores, 2023)

Anexos 9. Test de Duncan (dilución E - citral)

Tratamientos	Medias	n	E.E.		
Geranial	0,62	4	0,12	A	
Neral	0,3	4	0,12	A	B
Citral	0,18	3	0,13		B

Cloranfenicol

0,05

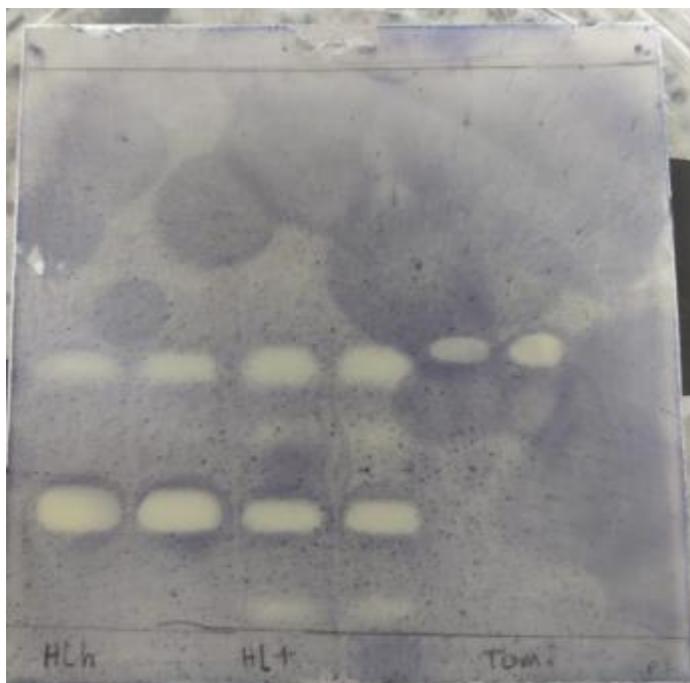
6

0,10

B

Elaborado por: (Los Autores, 2023)

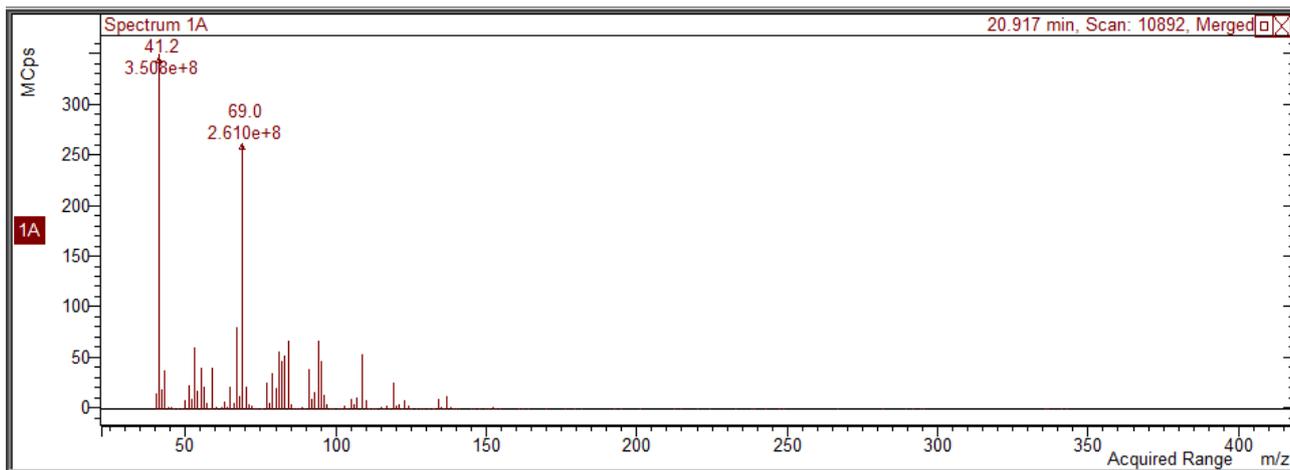
Anexos 10. Bioautografía antimicrobiana para aceites con *P. fluorescens*



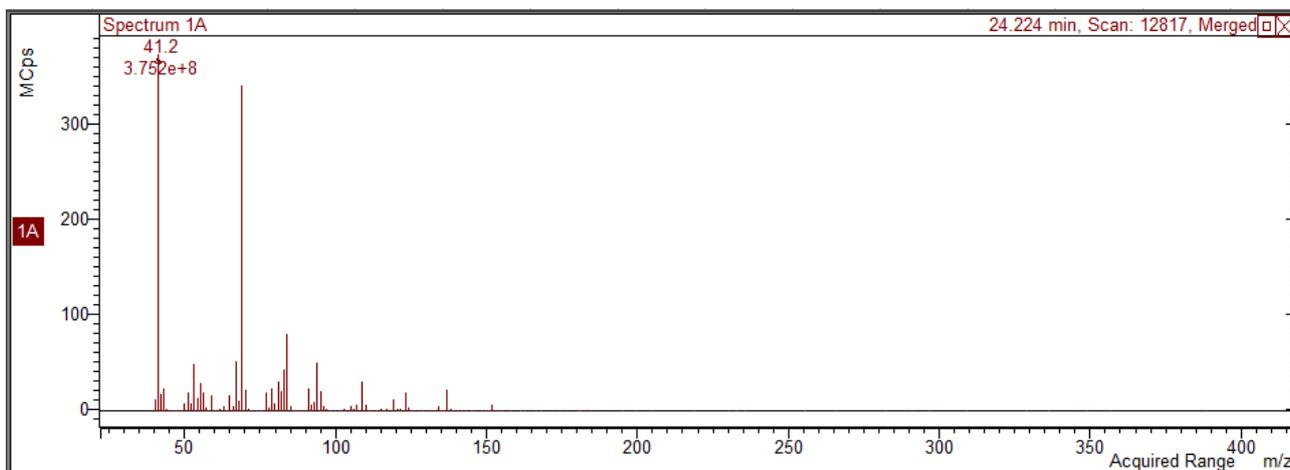
Nota: Placa revelada con MTT + Tritón X-100 al 0.1% con inyección de muestras de aceites HLh: hojas; HL+: vainas; Tom: tomillo

Elaborado por: Los Autores, 2023

Anexos 11. Espectros de masa de fracciones de citral obtenidas por HPLC



Nota: Espectro de masa de neral extraído de la fracción 1



Nota: Espectro de masa de geranial extraído de las fracciones 2-5.