

Información Importante

La Universidad Santo Tomás, informa que el(los) autor(es) ha(n) autorizado a usuarios internos y externos de la institución a consultar el contenido de este documento a través del catálogo en línea, página web y Repositorio Institucional del CRAI-USTA, así como en las redes sociales y demás sitios web de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad.

Se permite la consulta a los usuarios interesados en el contenido de este documento, para todos los usos que tengan **finalidad académica**, siempre y cuando mediante la correspondiente cita bibliográfica se le dé crédito al trabajo de grado y a su autor, nunca para usos comerciales.

De conformidad con lo establecido en el Artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, la Universidad Santo Tomás informa que “los derechos morales sobre documento son propiedad de los autores, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.”

Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación, CRAI-USTA
Universidad Santo Tomás, Bucaramanga

Perfil químico y biológico de los aceites esenciales de *Cymbopogon nardus* y *Cymbopogon martinii*

Mabel Gricelda Céspedes Navarro

Trabajo de grado para optar por el título de Química Ambiental

Directora

Martha Cervantes Díaz

Química, M.Sc

Codirector(es)

Laura Viviana Herrera Sandoval

Bact y L.C, M.Sc

Ricardo Restrepo Manrique

Biólogo, Esp.

Universidad Santo Tomás, Bucaramanga

División de Ingenierías y Arquitectura

Facultad de Química Ambiental

2020

Agradecimientos

A la X Convocatoria de la Universidad Santo Tomás, Seccional Bucaramanga por el financiamiento de este proyecto (Código Del Proyecto: GIFQCAAMBODONTP52017), y al Grupo De Investigación Ambiental Para El Desarrollo Sostenible- GIADS- de la facultad de Química Ambiental e igualmente al Grupo De Investigación Sistema Estomatognático y Morfofisiología de la Facultad De Odontología por hacer posible el desarrollo de este trabajo.

A los directores del proyecto Martha Cervantes, Ricardo Restrepo y Laura Herrera por su valiosa dedicación, entendimiento, apoyo y experiencia brindada en la ejecución de la tesis.

Asimismo, a la Universidad Santo Tomás y la Facultad de Química Ambiental por brindarme una formación académica con el enfoque científico e investigativo en el área Ambiental.

Agradecimientos infinitos a mis padres, por un apoyo incondicional ofrecido durante toda la carrera; a mis compañeras de trabajo junto a laboratoristas por la ayuda brindada a la culminación de esta tesis.

Tabla de contenido

Introducción	18
1. Perfil químico y biológico de los aceites esenciales de <i>Cymbopogon nardus</i> y <i>Cymbopogon martinii</i>	22
1.1 Objetivos	22
1.1.1 Objetivo general.....	22
1.1.2 Objetivos específicos	22
2. Marco referencial	23
2.1 Marco conceptual.....	23
2.1.1 Aceites esenciales: generalidades.	23
2.1.2 Método de extracción de los aceites esenciales.	24
2.1.3 Propiedades biológicas de los aceites esenciales.	27
2.2 Marco de antecedentes.....	37
3. Diseño metodológico	42
3.1 Caracterización de los aceites esenciales.....	43
3.2 Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales	44
3.2.1 Preparación de caldos de cultivo.	44
3.2.2 Preparación de inóculo.....	44
3.2.3 Tratamiento de cepas de referencia.....	45
3.2.4 Determinación de la actividad antibacteriana de aceites esenciales.	46
3.2.5 Rangos de concentración de aceites esenciales y compuestos de referencia.....	46
3.2.6 Compuestos de referencia.	48
3.2.7 Prueba de susceptibilidad. L	49
3.2.8 Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de los aceites esenciales.	50

3.3 Determinación de la fitotoxicidad de aceites esenciales	50
3.3.1 Preparación de soluciones.....	50
3.3.2 Determinación de la toxicidad de aceites esenciales mediante semillas de repollo (<i>Brassica oleracea</i>) y tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>).	50
3.3.3. Determinación de la toxicidad de aceites esenciales empleando bulbos de <i>Allium cepa</i>	51
4. Análisis de Resultados	53
4.1 Caracterización de los aceites esenciales por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	53
4.2 Compuestos de referencia empleados en la determinación de la actividad antimicrobiana ...	58
4.3 Determinación de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales.....	60
4.4 Determinación de Fitotoxicidad de los aceites esenciales en <i>Allium cepa</i>	64
4.5 Concentración efectiva media en semillas <i>Lycopersicon esculentum</i> y <i>Brassica oleracea</i>	72
5. Conclusiones	76
6. Consideraciones éticas	77
Referencias bibliográficas.....	78
Apéndices.....	86

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. <i>Métodos comunes para la determinación de actividad antimicrobiana</i>	28
Tabla 2. <i>Mecanismos de acción de algunos compuestos químicos frente a Microorganismos patógenos</i>	33
Tabla 3. <i>Aceites esenciales con sus respectivas propiedades biológicas, compuestos mayoritarios y estructuras químicas</i>	37
Tabla 4. <i>Condiciones y características de crecimiento de los microorganismos a evaluar</i> ...	45
Tabla 5. <i>Condiciones de crecimiento para determinación de MIC</i>	46
Tabla 6. <i>Rangos de concentración para la determinación actividad antimicrobiana</i>	48
Tabla 7. <i>Condiciones estándares para ensayo Allium cepa.</i>	52
Tabla 8. <i>Composición del aceite esencial de citronela (Cymbopogon nardus).</i>	54
Tabla 9. <i>Composición del aceite esencial de C.martinii.</i>	56
Tabla 10. <i>Resultados de actividad antimicrobiana para el microorganismo Porphyromonas gingivalis y Enterococcus faecalis.</i>	61
Tabla 11. <i>Concentración efectiva media 50 de los aceites esenciales evaluados frente a Allium Cepa.</i>	64
Tabla 12. <i>Aberraciones cromosómicas encontradas en las concentraciones evaluadas de los AE</i>	69
Tabla 13. <i>Comparación de la cantidad de aberraciones cromosómicas presentes en las fases mitóticas de los AE</i>	70
Tabla 14. <i>Aberraciones presentes en los extendidos evaluados.</i>	72

Tabla 15. CE50 y porcentaje de inhibición de los aceites esenciales frente a semillas de <i>Lycopersicon esculentum</i> y <i>Brassica oleracea</i>	73
Tabla 16. Comparación de la actividad antimicrobiana y fitotoxicidad de los aceites esenciales	75

Lista de figuras

	Pág.
<i>Figura 1.</i> Planta <i>Cymbopogon martinii</i> (Palmarosa).....	24
<i>Figura 2.</i> Planta <i>Cymbopogon nardus</i> (Citronela).	24
<i>Figura 3.</i> Métodos destilativos para la obtención de aceites esenciales.....	26
<i>Figura 4.</i> Colonia de <i>Enterococcus faecalis</i>	29
<i>Figura 5.</i> Colonias de <i>Porphyromonas gingivalis</i>	30
<i>Figura 6.</i> Estructura química de la ampicilina, compuesto de referencia usado para la determinación de actividad antibacteriana en <i>E.faecalis</i>	31
<i>Figura 7.</i> Estructura química del Metronidazol.....	32
<i>Figura 10.</i> Mecanismo de acción de los compuestos mayoritarios del AE timol y carvacrol	33
<i>Figura 9.</i> Esquema general de las fases del ciclo celular.	34
<i>Figura 10.</i> Aberraciones cromosómicas en <i>Allium cepa</i> . Imagen observada en 60X. A) normal metafase; b) normal anafase; c) normal telofase; d) c-mitosis; e) anomalías del huso en anafase; f) puente anafásico; g) puente en telofase; h) fragmento en telofase; i) célula en interfase; j) micronúcleo en célula de interfase.....	36
<i>Figura 11.</i> Número de publicaciones por año relacionados con actividad antimicrobiana en el período 2007 – 2020 (Consultado en septiembre del 2019).	39
<i>Figura 12.</i> Relación de actividad antimicrobiana con los AE durante el período 2007 – 2020 (Consultado en septiembre del 2019).	40
<i>Figura 13.</i> Diseño de distribución de AE en placa Elisa de 96 pocillos. El control (+) contendrá caldo + inóculo, mientras que el control –, solo contendrá caldo.	49

<i>Figura 14.</i> Perfil cromatográfico (corriente iónica total reconstruida) del aceite esencial de citronela (<i>Cymbopogon nardus</i>), obtenido mediante GC-MS (modo <i>full scan</i>).....	53
<i>Figura 15.</i> Espectro de masas citronelal, compuesto mayoritario presente en el aceite esencial de citronela (<i>Cymbopogon nardus</i>),.....	55
<i>Figura 16.</i> Perfil cromatográfico (corriente iónica total reconstruida) del aceite esencial de palmarrosa (<i>Cymbopogon martinii</i>), obtenido mediante GC-MS (modo <i>full scan</i>)	57
<i>Figura 17.</i> Espectro de masas geraniol, compuesto mayoritario presente en el aceite esencial de palmarrosa (<i>Cymbopogon martinii</i>),	57
<i>Figura 18.</i> Espectro Infrarrojo experimental del Metronidazol.....	58
<i>Figura 19.</i> Espectro Infrarrojo experimental de Ampicilina	60
<i>Figura 20.</i> Esquema de la metodología empleada para la determinación de actividad antimicrobiana de aceites esenciales por el método de microdilución en placa.	61
<i>Figura 21.</i> Montaje de Ensayo de cebolla <i>Allium cepa</i>	65
<i>Figura 22.</i> Campo en división celular de <i>Allium cepa</i>	66
<i>Figura 23.</i> Índice mitótico del aceite esencial <i>C.nardus</i> y controles en las concentraciones evaluadas.....	67
<i>Figura 24.</i> Índice mitótico del aceite esencial <i>C.martinii</i> y controles en las concentraciones evaluadas.....	68
<i>Figura 25.</i> Anormalidades presentes en <i>C.nardus</i>	71
<i>Figura 26.</i> Anormalidades presentes en <i>C.martinii</i>	71
<i>Figura 27.</i> Montaje semilla de repollo y tomate.....	72

Lista de Apéndices

Apéndice A. Metodología para la determinación de la actividad antimicrobiana (CMI, CBM) y Toxicidad de los aceites esenciales.....	86
Apéndice B. Espectro IR del metronidazol reportado por Sravini.	87
Apéndice C. Espectro IR de la ampicilina reportado por INAME.	88
Apéndice D. Datos experimentales en semillas de repollo y tomate del aceite esencial palmarosa	89
Apéndice E. Datos experimentales en semillas de repollo y tomate del aceite esencial citronela.....	91
Apéndice F. Datos experimentales en <i>Allium</i> cepa del aceite esencial citronela.....	93
Apéndice G. Datos experimentales de <i>Allium</i> cepa del aceite esencial palmarosa.....	94
Apéndice H. Curva Dosis - Respuesta del AE <i>C.nardus</i> frente a semillas de Tomate para la raíz.....	95
Apéndice I . Curva Dosis - Respuesta del AE <i>C.martinii</i> frente a semillas de Tomate para la raíz.....	96
Apéndice J. Curva Dosis- Respuesta del AE <i>C.martinii</i> frente a semillas de tomate para el embrión.	97
Apéndice K. Curva Dosis- Respuesta del AE <i>C.martinii</i> frente a semillas de repollo para el la raíz.....	98

Siglas, símbolos y acrónimos

AC	Aberraciones cromosómicas
AE	Aceites esenciales.
CE₅₀	Concentración Efectiva media
DMSO	Dimetil sulfoxido
GC/MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
IM	Índice Mitótico
MIC	Siglas en inglés (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>)
MBC	Siglas en inglés (<i>Minimal Bactericidal Concentration</i>)
t_R	Tiempo de retención

Glosario

Aberraciones cromosómicas: las aberraciones cromosómicas (ACS) se caracterizan por los cambios cromosomales que pueden sufrir las estructuras genéticas o el total de los cromosomas y pueden generarse espontáneamente tanto por agentes químicos como físicos. (Restrepo et al., 2012)

Aceite esencial: fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas (Cerutti y Neumayer, 2004).

Antimicrobiano: medicamentos que destruyen los microorganismos o impiden su multiplicación o desarrollo. (Matute, 2018)

Concentración efectiva media: concentración, calculada estadísticamente, de una sustancia en el medio, que se espera que produzca un determinado efecto en el 50% de los organismos de experimentación de una población dada, bajo un conjunto de condiciones definidas. (Ramírez, 2017)

Concentración mínima bactericida (CBM): mínima concentración de antimicrobiano (en µg/mL que elimina a más del 99,9% de los microorganismos viables después de un tiempo determinado de incubación (generalmente 24 horas) (Horna et al., 2005)

Concentración mínima inhibitoria (CIM): se define como la mínima concentración de antimicrobiano (en µg/ml) que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación a 37° C. (Horna et al., 2005)

Contaminante emergente: estos comprenden una amplia gama de compuestos químicos, productos farmacéuticos, productos de cuidado personal, agentes tensoactivos, plastificantes y

aditivos industriales, tienen el potencial de acarrear un impacto ecológico, así como efectos adversos sobre la salud. (Gil et al., 2012)

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas: la cromatografía de gases-masas es una técnica que combina la capacidad de separación que presenta la cromatografía de gases con la sensibilidad y capacidad selectiva del detector de masas. Esta combinación permite analizar y cuantificar compuestos trazas en mezclas complejas con un alto grado de efectividad. Esta técnica es indicada para la separación de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles. (Sarria, 2017)

Epicótilo: porción del eje comprendida entre el punto de inserción de los cotiledones y las primeras hojas. (Agrosíntesis, 2016)

Índice mitótico: número de células por unidad que sufren mitosis durante un determinado periodo de tiempo de exposición. (Restrepo et al., 2012)

Patógeno: organismo que tiene la capacidad de causar enfermedad. Esa capacidad depende de diversos factores, que incluyen: la dosis infectante del germen, la puerta de entrada al organismo y especialmente la susceptibilidad del huésped. (Torres, 2015)

Resumen

Se obtuvieron los perfiles cromatográficos (corrientes reconstruidas) de los aceites evaluados mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Los principales compuestos de los aceites esenciales de acuerdo con los porcentajes de áreas relativas son: citronelal 19.4 %, geraniol 18.1 % y citronelol 14.9 % correspondientes a *C.nardus*; por otra parte en el aceite esencial *C.martinii*, los compuestos mayoritario son: geraniol 64 % y acetato de geranilo 14.8 %

Se evaluó la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales mediante el método de microdilución en placa con la finalidad de establecer la concentración mínima inhibitoria (MIC) frente a *Porphyromonas gingivalis* y *Enterococcus faecalis*. En el caso de *P.gingivalis*, los aceites evaluados presentaron actividad antimicrobiana con una MIC de 250-500 µg/mL y una CBM de 500 µg/mL. Por el contrario, ninguno de los aceites esenciales presentó actividad antimicrobiana frente a *Enterococcus faecalis*, teniendo presente que no se evidenció una inhibición de crecimiento bacteriano.

Se determinó la fitotoxicidad de los aceites esenciales mediante la CE₅₀, usando bioindicadores como semillas de repollo (*Brassica oleracea*), tomate (*Lycopersicon esculentum*) y bulbos de cebolla (*Allium cepa*). Se obtuvo que el aceite esencial *C.nardus* generó una inhibición de elongación de raíz del 65 % a una CE₅₀ de 418.54 ppm en semilla de *Lycopersicon esculentum* mientras que para el embrión no presentó efecto inhibitorio CE₅₀>1000 ppm. Así mismo, este aceite no presentó ningún efecto inhibitorio frente a la semilla *Brassica oleraceae*.

Por el contrario, el aceite esencial *C.martinii* reportó una inhibición del 65 % en la elongación de la raíz para la semilla *Lycopersicon esculentum* una CE₅₀ de 154 ppm y para *Brassica oleracea*

una inhibición del 55 % a una CE_{50} de 778.9 ppm. Así también, el AE presentó una inhibición del 67% para el crecimiento del embrión en *Lycopersicon esculentum* a una CE_{50} de 407 ppm.

Por otra parte, se evaluó el efecto genotóxico de los aceites esenciales en bulbos de *Allium cepa*. Se identificaron diferentes aberraciones cromosómicas en los aceites esenciales evaluados, identificados como: puentes en anafase, células binucleadas, cromosomas vagabundos en anafase y telofase. También, se identificó una CE_{50} de 712 ppm para el aceite esencial *C.martinii* y una CE_{50} de 3.90 ppm para *C.nardus*.

Palabras Clave: *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon martinii*, CIM, CE_{50} , fitotoxicidad, antimicrobianos.

Abstract

The chromatographic profiles (reconstructed streams) of the oils evaluated were obtained by gas chromatography coupled to mass spectrometry. The main major compounds of essential oils according to the percentages of relative areas are: citronelal 19.4%, geraniol 18.1% and citronellol 14.9% corresponding to *C. nardus*, on the other hand, the compounds: geraniol 64 % and 14.8% geranyl acetate were found in greater proportion in the *C.martinii* essential oil.

The antimicrobial activity of the essential oils was evaluated by the plate microdilution method in order to establish the minimum inhibitory concentration (MIC) against *Porphyromonas gingivalis* and *Enterococcus faecalis*. In the case of *P. gingivalis*, both oils evaluated showed antimicrobial activity with a MIC of 250-500 µg / mL and a CBM of 500 µg / mL. On the contrary, none of the essential oils presented antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis*, bearing in mind that no inhibition of bacterial growth was evident.

The phytotoxicity of essential oils was determined by EC50, using bioindicators such as cabbage seeds (*Brassica oleracea*), tomato (*Lycopersicon esculentum*) and onion bulbs (*Allium cepa*). It was obtained that the *C. nardus* essential oil generated a 65% root elongation inhibition at an EC50 of 418.54 ppm in *Lycopersicon esculentum* seed while for the embryo it did not show an inhibitory effect EC50> 1000 ppm. Likewise, this oil did not show any inhibitory effect against the *Brassica oleraceae* seed.

In contrast, the *C. martinii* essential oil reported a 65% inhibition in root elongation for the *Lycopersicon esculentum* seed an EC50 of 154 ppm and for *Brassica oleracea* a 55% inhibition at an EC50 of 778.9 ppm. Also, the AE presented a 67% inhibition for embryo growth in *Lycopersicon esculentum* at an EC50 of 407 ppm.

On the other hand, the genotoxic effect of the essential oils in bulbs of *Allium cepa* was evaluated. Different chromosomal aberrations were identified in the essential oils evaluated, identified as: bridges in anaphase, binucleated cells, stray chromosomes in anaphase and telophase. Likewise, an EC₅₀ of 712 ppm was identified for the *C. martinii* essential oil and an EC₅₀ of 3.90 ppm for *C. nardus*.

Keywords: *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon martinii*, MIC, EC₅₀, Phytotoxicity, antimicrobials

Introducción

Los contaminantes emergentes son compuestos de distinto origen y naturaleza química, cuya presencia en el medio ambiente no se considera significativa en términos de distribución y/o concentración, por lo que pasan inadvertidos; no obstante, ahora están siendo ampliamente detectados y tienen el potencial de acarrear un impacto ecológico, así como efectos adversos sobre la salud (Gil et al., 2012). La característica de estos grupos de contaminantes es que no necesitan encontrarse en grandes concentraciones en el ambiente para causar efectos negativos, puesto que sus altas tasas de transformación/remoción se pueden compensar por su introducción continua en el ambiente (Gil et al., 2012). Se ha establecido que estos compuestos entran en el ambiente a través de algunas fuentes y vías, tales como aguas residuales de tipo doméstico e industrial (Daughton, 2004) de los residuos de las plantas de tratamiento (Kolpin, 2002) , de los efluentes hospitalarios (Kummerer, 2001) , de las actividades agrícolas y ganaderas (Watanabe, 2010), los cuales contienen un gran número de componentes orgánicos específicos. Entre ellos se encuentran productos de cuidado personal, agentes tensoactivos (Terzic, 2008) , plastificantes (Moreno & Nuñez, 2012). Incluyendo, el grupo de antimicrobianos tipo antibióticos (Ramos, 2005), desinfectantes (Ramos, 2006)

La evidencia científica confirma que los estrógenos son responsables de alteraciones endocrinas en ambientes acuáticos (Petrovic *et al.* 2008). Algunas de las alteraciones documentadas son hermafroditismo en peces, desarrollo de órganos sexuales deformados en reptiles (lagartos y tortugas), comportamiento de anidación anormal, cascarones delgados, y disfunciones en el sistema inmune y reproductivo en focas grises (Eliades y Eliades, 2014).

Especial atención refieren los antimicrobianos, cuyos efectos como emergentes destaca un aumento de la resistencia de microorganismos patógenos. (Moreno, 2009)

Hoy en día, están en aumento los reportes de cepas principalmente bacterianas resistentes a los antimicrobianos de amplio uso en medicina humana. Entre ellos se documenta a *E. coli*, *S. aureus* y *E. faecalis*. (Rincón et al., 2014) Otros patógenos humanos presentan alta resistencia innata y se convierten en verdaderos retos para su eliminación tales como *P. gingivalis*.

Dicha resistencia puede estar asociada a la exposición permanente de los microorganismos en sus nichos a los antimicrobianos de amplio uso en operaciones concentradas de producción de animales, ganados, cerdos, pollos, incluso por el hombre especialmente por su contaminación emergente (Soulsby, 1999). Por lo anterior, se considera un problema de abordaje multidisciplinario incluyendo el abordaje ambiental.

Desde hace algunos años, las plantas y sus metabolitos secundarios, entre ellos los AE, son ampliamente estudiados con actividades biológicas (Rincón et al., 2012) (Gómez et al., 2009). Si bien se avanza en el reconocimiento de sus propiedades antimicrobianas, pero pocos abordan el estudio integral de estudios fitotóxicos y genotóxicos.

Ante este panorama, se propone la evaluación de los aceites esenciales provenientes de plantas de fácil acceso y empleadas tradicionalmente como una posible solución de minimizar el impacto ambiental generado por los antimicrobianos. Entre ellos, los AE de *Cymbopogon nardus* y *Cymbopogon martinii*, pertenecientes a la familia *Poaceae*, han sido reportados con efectos antiséptico, antiespasmódico, bactericida y antimicrobianas (Koba et al., 2008) (Seong y Wei, 2013). Sin embargo, aún no se han reportado estudios fito y genotóxicos de los mismos en semillas como *Lycopersicon esculentum* y *Brassica oleracea*.

Por tal motivo, se espera encontrar aceites esenciales con alta actividad biológica frente a microorganismos patógenos y no generen un impacto ambiental.

Dados los potenciales efectos de los contaminantes emergentes, son requeridas con urgencia estrategias para disminuir su impacto ambiental.

Con el aumento de la resistencia a los antimicrobianos entre otros como resultado de su carácter de contaminantes emergentes y el mencionado fin de la era de los antibióticos (OMS,2018) es totalmente pertinente avanzar en la búsqueda de nuevas fuentes de compuesto con actividad biológica que generen baja resistencia.

El estudio de los AE como productos naturales y su potencial como agentes antimicrobianos han demostrado una importante actividad bactericida frente a microorganismos gram positivos y gram negativos. (Kalemba y Kunicka, 2003) (Burt,2004)

Estudios realizados con *Cymbopogon* frente al microorganismo *P. gingivalis* demuestran actividad antibacteriana, siendo responsable los componentes citronelol, D-limoneno y geraniol con un valor de MIC de 20 µl / ml. (Paul et al., 2019)

Por otra parte, *C. citratus* presenta tres componentes principales en su composición que son geranial, neral y mirceno. Se demuestra que geranial y neral presentan actividad antimicrobiana contra las bacterias gram positivas y negativas (Onawunmini,1989). Hammer en el año 1999 obtuvo del aceite esencial *C.citratus* una MIC de 0.06 % frente a los microorganismos *S.aureus* y *Candida albicans*.

Siendo *Cymbopogon*, una especie común con uso en especial con efectos antimicrobianos reportados, lo que lo hace promisorio para continuar los estudios en relación con sus propiedades y usar modelos biológicos que validen su fitotoxicidad y genotoxicidad.

Realizar ensayos en semillas es importante ya que se pueden evaluar los efectos fitotóxicos de los compuestos puros o de mezclas complejas en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento, mediante la determinación de la inhibición en la germinación y elongación de la radícula e hipocótilo (Castillo et al; 2004). De igual modo realizar ensayos de citotoxicidad y genotoxicidad con *Allium cepa* permite evaluar diferentes puntos finales genéticos que pueden causar daño al ADN de los humanos caracterizándose por ser una prueba sensible a comparación de otras pruebas al detectar toxicidad y genotoxicidad (Bosio & Dail, 2012)

1. Perfil químico y biológico de los aceites esenciales de *Cymbopogon nardus* y *Cymbopogon martinii*

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo general. Determinar la composición química y la actividad biológica medida a partir de la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la Concentración Efectiva Media (CE₅₀) de aceites esenciales obtenidos de citronela (*Cymbopogon nardus*) y de palmarosa (*Cymbopogon martinii*).

1.1.2 Objetivos específicos

- Determinar la composición química de los aceites esenciales obtenidos de *Cymbopogon nardus* y *Cymbopogon martinii*, empleando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS).
- Establecer la concentración mínima inhibitoria y bactericida (CIM, CBM) de los aceites esenciales bajo estudio frente a los microorganismos patógenos *Porphyromonas gingivales* y *Enterococcus faecalis*, empleando el método de microdilución en placa.
- Evaluar la fitotoxicidad de los aceites esenciales de citronela y palmarosa mediante la determinación de la CE₅₀ e Índice Mitótico (IM), así como también la identificación de Aberraciones Cromosómicas (AC), empleando como bioindicadores semillas de repollo (*Brassica oleracea*) y tomate (*Lycopersicon esculentum*) y bulbos de cebolla (*Allium cepa*).

2. Marco referencial

2.1 Marco conceptual

2.1.1 Aceites esenciales: generalidades. Los aceites esenciales- también llamados esencias, aceites volátiles o aceites etéreos- son una mezcla de compuestos de carácter aromático y alifático. Se encuentran presentes en forma de minúsculas gotas en las hojas, en la piel de la fruta, en la resina, en las ramas o en la madera. Las plantas poseen pequeñas cantidades de aceite esencial respecto a su masa vegetal. Estos aceites tienen la característica que son olorosos y muy volátiles, es decir, que se evaporan rápidamente al entrar en contacto con el aire. (Husnu y Buschbauer, 2009)

En su composición química se pueden encontrar terpenoides, principalmente de monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanoides. Gracias a sus componentes mayoritarios, pueden llegar a brindar propiedades antifúngicas (Pattnaik et al., 1995), antimicrobiana (Farag et al., 1989)

***Cymbopogon martinii*.** Conocida como Palmarosa (Figura 1), perteneciente de la subfamilia *Panicoideae*, familia *Poaceae* y género *Cymbopogon*, es una planta perenne, ampliamente distribuido en tropicales y subtropicales regiones (Khanuja et al., 2005). Se encuentra en el sur y el sudeste de Asia, especialmente India, donde es cultivada por su aceite. Es un aceite volátil con propiedades antisépticas, desodorantes, insecticidas, tónicas y estimulantes (Shahi y Tava, 1993). Entre sus componentes principales en los tallos y las hojas se encuentran geraniol (20.4%) y acetato de linalilo (15.6%) mediante el método de hidrodestilación asistida por microondas (Khanuja et al., 2005).



Figura 1. Planta *Cymbopogon martinii* (Palmarosa)

***Cymbopogon nardus*.** Popularmente conocida como Citronela (Figura 2), de la orden *Poales*, familia *Poacea* y género *Cymbopogon*.

Es cultivada en regiones subtropicales y tropicales de Asia, África y América. Las hojas son largas, anchas y lisas de las cuales se obtiene el aceite esencial, con características como un líquido amarillo o amarillo parduzco que en contacto con el aire toma una coloración verdosa (Petrokimica, 2018). Posee propiedades biológicas como lo son antimicrobiana, antioxidante y anticonvulsivante (Sharma, 2019)

Los principales componentes encontrados en las hojas son citronelal (45.7%), geraniol (20.4%), limoneno (7%) (Zambon et al., 2015)



Figura 2. Planta *Cymbopogon nardus* (Citronela).

Fuente: Green Leaves, s.f.

2.1.2 Método de extracción de los aceites esenciales. Los aceites esenciales se pueden obtener principalmente mediante métodos destilativos (Figura 3), entre los que se encuentran destilación

por arrastre de vapor e hidrodestilación asistida por microondas. A continuación, se describen las técnicas mencionadas anteriormente.

Destilación por arrastre de vapor: El procedimiento consiste en hacer pasar un flujo de vapor a través de la materia prima, de modo que arrastre consigo los aceites esenciales. Posteriormente, estos vapores se enfrían y se condensan, dando lugar al destilado líquido formado por dos fases inmiscibles, la acuosa y la orgánica, que es aceite esencial (Villaverde, 2018). La condición más importante para que este tipo de destilación pueda ser empleada consiste en que tanto el componente volátil como una impureza sean insolubles en agua, ya que el producto destilado (volátil) formará dos fases al condensarse, lo cual permitirá la separación del producto y del agua fácilmente (Peredo et al., 2009).

Hidrodestilación asistida por microondas: método que consiste en sumergir material vegetal en agua y someterlo a radiaciones de microondas, ocurriendo así el rompimiento de las glándulas que dan paso a la liberación de los compuestos del aceite esencial; los compuestos volátiles en fase gaseosa son arrastrados hasta el condensador en donde se forman dos capas, una rica en aceite y otra es hidrolato, los cuales se separan por decantación. (Gelvez & Soto, 2015)

El uso de hidrodestilación asistida por microondas para la extracción de aceites esenciales e hidrolatos ha demostrado ser ambientalmente eficiente, ya que, al emplearse agua como vehículo de extracción, se elimina el uso de solventes tóxicos y dañinos al medio ambiente, así como la degradación térmica ocasionada por el uso del vapor de agua. Además, se eliminan solventes tóxicos, la biomasa residual se puede compostar o bien convertir en una fuente energética como combustible y aminorar costos operativos disminuyendo el consumo energético en el tiempo. (Guarin & Barajas, 2015)



Figura 3. Métodos destilativos para la obtención de aceites esenciales.

2.1.2.1 Métodos de caracterización de aceites esenciales. Una vez obtenido el aceite esencial, es necesario realizar la caracterización de este con el fin de conocer sus componentes mayoritarios y minoritarios, y a su vez, poder realizar ensayos microbiológicos que permitan corroborar sus propiedades tanto biológicas como en diversas áreas de la química especializada (química sintética y de los materiales).

Por su parte, cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, es una técnica analítica dedicada a la separación, identificación y cuantificación de mezclas de sustancias volátiles y semivolátiles. La separación de dichas sustancias depende de la diferente distribución de las sustancias estudiadas entre las fases móvil y estacionaria que conforman el sistema. (UV,2020)

2.1.3 Propiedades biológicas de los aceites esenciales. A continuación, se presentan las actividades biológicas estudiadas en este trabajo para los aceites esenciales, a saber: actividad antimicrobiana y fitotoxicidad.

2.1.3.1 Actividad antimicrobiana de aceites esenciales. La actividad antimicrobiana que presentan los aceites esenciales se debe en gran parte a la presencia de compuestos denominados terpenoides, estudios realizados indican el orden de la actividad generada por los terpenoides; en primer lugar, están aquellos que contienen grupos alcoholes, luego los que poseen aldehídos y finalmente los que tienen grupos cetónicos. La actividad antimicrobiana de los AE puede variar, desde una inhibición completa o parcial del crecimiento microbiano, hasta la acción bactericida o fungicida (Maguna, 2006)

2.1.3.2 Métodos de evaluación de actividad antimicrobiana. Teniendo en cuenta el NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) entre la variedad de métodos para evaluar la actividad antimicrobiana, dos utilizados son: dilución en agar y microdilución en placa. Dilución en agar es un método bien establecido para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos. (NCCLS,2012)

El agente antimicrobiano se incorpora dentro del medio con agar, de manera tal que cada placa contenga una concentración de antibiótico diferente. Los inóculos de los distintos microorganismos se pueden aplicar rápida y simultáneamente sobre la superficie del agar utilizando replicadores. Finalmente, los microorganismos en prueba previamente diluidos son inoculados en los agares e incubados a su temperatura y tiempo óptimos. (NCCLS,2012)

Otro de los métodos importantes es el microdilución en placa, el cual el aceite esencial se maneja en una microplaca de múltiples pocillos con concentraciones crecientes. El microorganismo es inoculado en pocillo de la microplaca contenido con diluciones de antibiótico.

Tras de incubación a determinada temperatura, se evalúa la capacidad de crecimiento de la bacteria en presencia del antimicrobiano para valoración de la turbidez del medio (Picazo,2013) A diferencia de los métodos de difusión, el procedimiento de microdilución en placa, maneja un aumento de la sensibilidad para cantidades pequeñas (Langfield et al., 2004).

En la tabla 1 se puede observar un breve resumen de los métodos comunes para la determinación de actividad antimicrobiana.

Tabla 1. *Métodos comunes para la determinación de actividad antimicrobiana*

	Dilución en agar	Macrodilución	Microdilución
Tipo de medio	Sólido	Líquido	Líquido
Antimicrobiano	Suspensión	Incorporado al medio. Discos de papel	Suspensión
Inóculo	0,5 McFarland.	10 ⁶	2×10 ⁸
Ventajas	El estudio de grupos de grandes cepas y resultados cuantitativos.	La posibilidad de lograr el cultivo estandarizado de la mayoría de los microorganismos y también permite reproducir resultados. (Sánchez & Delgado, 2010)	Gracias a su diseño de placa, permite una protección de las muestras a una posible contaminación externa e interna, se permite el estudio de microorganismos frente a varios antimicrobianos, se implementan pipetas multicanal (Picazo,2013)
Desventajas	Trabajo muy laborioso, moderadamente automatizable y ese centra en estudios epidemiológicos. (OCW,s.f).	resulta engorroso, por la cantidad de material, de manipulación y del trabajo requerido para preparar los tubos de dilución en caldo (Sánchez & Delgado, 2010)	Requieren disponer del antimicrobiano puro con potencia conocida, la preparación de al menos 4 diluciones del fármaco a ensayar y exigen destinar bastante tiempo a la lectura e informe de los resultados (García, 2002)

2.1.3.3 Microorganismos de interés. Entre el grupo de bacterias Gram positivas se encuentra *E. faecalis* y en el grupo Gram negativo *P.gingivalis*. A continuación, se expondrá las características pertenecientes a cada uno.

Enterococcus faecalis perteneciente a la familia *Enterococcaceae*, habitan en el interior del tracto gastrointestinal de una variedad de organismos, incluyendo al hombre. Pueden encontrarse también en el tracto genitourinario y en la saliva. (Díaz et al., 2010) Han sido identificados como patógenos oportunistas para los humanos, pudiendo causar diferentes enfermedades dentro de las que se encuentran las endocarditis, infecciones del tracto urinario, neonatales, del sistema nervioso central, intrabdominal y pélvica (Díaz et al., 2010). Otros sitios donde es posible encontrar esta bacteria es en el suelo, agua o alimentos, lo cual indica contaminación fecal. Su morfología se caracteriza por ser cocos de tamaño $0,6-2,0 \times 0,6-2,5 \mu\text{m}$, Gram positivos que se distribuyen en cadenas cortas o en pares. No forman esporas. Son anaerobios facultativos. Sus colonias se caracterizan por ser tener un tamaño entre 0.5 y 1 mm, a menudo blanco, tal como se observa en la figura 4. Su temperatura óptima de crecimiento es 35°C (Díaz et al., 2010)



Figura 4. Colonia de *Enterococcus faecalis*.

Porphyromonas gingivalis perteneciente a la familia *Porphyromonadaceae*, es un cocobacilo anaerobio facultativo Gram negativo, anaerobio estricto, mide $1 - 3,5 \mu\text{m}$ de largo por $0,5 - 0,8 \mu\text{m}$ de ancho. Sus colonias (Figura 5) son uniformes de coloración verdosas, pardas o negras debido a la hemina que almacena en la superficie celular (Martínez, 2006) Su pared celular presenta a nivel

de la membrana externa las endotoxinas, son capsulados, no esporulados, sin flagelos. Tiene la capacidad de inducir alteraciones y destrucción del tejido periodontal. También produce múltiples enzimas con capacidad de degradar compuestos proteicos (Ramos et al., 2011). Las bacterias Gram negativas mueren por la desintegración de la membrana externa, cuando se liberan los polisacáridos incrementando la permeabilidad en la membrana plasmática al ATP (Canaval, 2017).

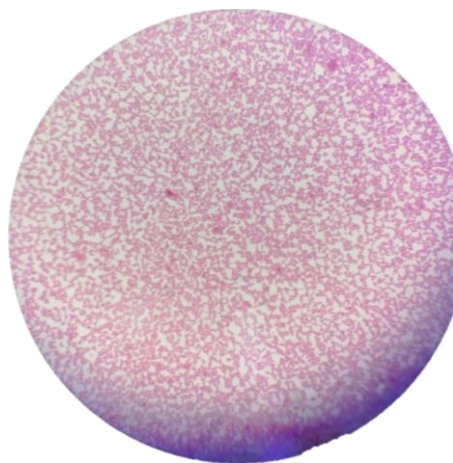


Figura 5. Colonias de Porphyromonas gingivalis.

2.1.3.4 Compuestos de referencia y mecanismo de acción. La ampicilina presenta acción bactericida, que actúa inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana, uniéndose a unas proteínas específicas PBPs (*Penicillin-Binding Proteins*) que se localizan en la pared celular, impidiendo que la pared celular se construya correctamente y provoque la lisis o destrucción de la bacteria (Arroyo y Gálvez, 2017)

Por otra parte, este compuesto de referencia tiene como fórmula molecular $C_{16}H_{19}N_3O_4S$, peso molecular 349.406 g/mol, punto de fusión 208 °C y soluble en Agua (Mensa et al., 2018) En su estructura química se encuentra un sulfuro (-S-), además, 1 grupo funcional amina. También cuenta con 3 dobles enlaces, un ciclo butano y un anillo aromático. En la figura 6 se presenta su estructura química.

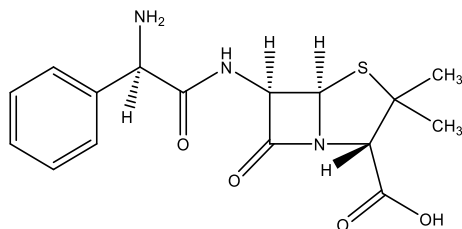


Figura 6. Estructura química de la ampicilina, compuesto de referencia usado para la determinación de actividad antibacteriana en *E.faecalis*.

Adaptado de: Bautista, 2015.

Por otra parte, se encuentra el Metronidazol (Figura 7), principal componente de la familia de los 5-nitroimidazoles (Bendesky & Menéndez, 2001). Los principales metabolitos oxidativos son 1-(2-hidroxietil)-2- hidroximetil-5-nitroimidazol (“hidroxi” metabolito), que posee actividad antibacteriana. (AEMPS, 2016) Es uno de los fármacos más eficaces frente a las bacterias anaerobias y, en combinación con otros antibióticos, se utiliza para la erradicación del *Helicobacter pylori* (Lau et al., 1986). Los efectos secundarios que trae consigo son vómitos, náuseas, diarrea y en casos extremos, convulsiones. (Medline,2017)

Mecanismo de acción: El metronidazol tiene propiedades amebicidas, bactericida, y tricomonicida. Una vez que entra en el interior de la célula, es reducido por el metabolismo intracelular (proteínas de transporte electrónico). Debido a esta alteración de la molécula de metronidazol, se mantiene un gradiente de concentraciones que promueve el transporte intracelular del fármaco. Los radicales libres formados interaccionan con el ADN celular produciendo una pérdida de la estructura helicoidal, rotura de la cadena con la inhibición resultante de la síntesis de ácidos nucleicos y muerte celular. (AEMPS,2016)

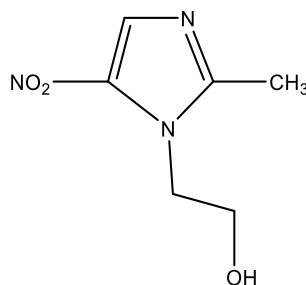


Figura 7. Estructura química del Metronidazol.
Fuente: Alamy, 2017.

2.1.3.5 Mecanismo de acción de los aceites esenciales. Los principales constituyentes de los AE son los terpenos de bajo y medio peso molecular como los monoterpenos, los sesquiterpenos y, en menor medida, los diterpenos. (Palá, 2002) Los monoterpenos son las moléculas más abundantes, llegando a representar hasta el 90% del aceite. Estos terpenos se sintetizan a partir de las 5 unidades de carbono del isopentenil pirofosfato (IPP), también denominado isopreno, siendo éste el precursor de las series de monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀) (Usano et al., 2014)

Otro grupo constituyente de los AE son los compuestos fenólicos, los cuales se definen como un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos arilo sustituidos por funciones hidroxílicas, aquí se pueden encontrar quinonas, saponinas, flavonoides, taninos, entre otras (Camones, 2009)

En el año 2003, reportaron estudios con timol y Eugenol y se determinó un efecto bactericida contra microorganismos gram negativos y positivos, provocando daño en la membrana celular y salida de los componentes intracelulares (Walsh et al., 2003).

Algunos artículos reportan la fuerte acción antimicrobiana del timol y carvacrol asociada a la presencia del radical hidroxilo, debido a que *p*-cimeno, precursor biológico de estos componentes carece de este hidroxilo y presenta menor actividad. (Lopez Ambrocio, Ruiz Posada, & Delgadillo Martinez, 2016)

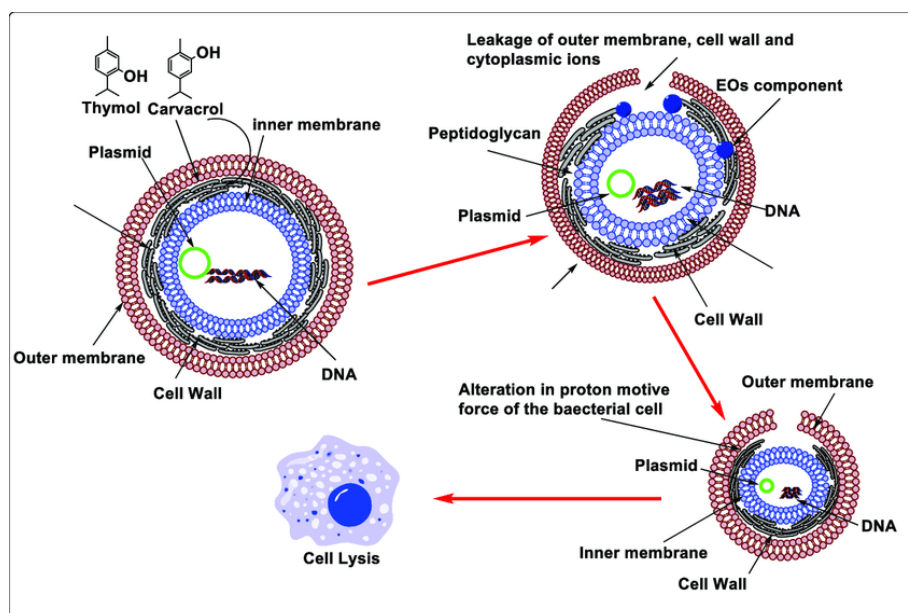


Figura 8. Mecanismo de acción de los compuestos mayoritarios del AE timol y carvacrol

En la tabla 2 se presenta un resumen de la composición química de los terpenoides presentes en los aceites esenciales y su mecanismo de acción frente a microorganismos patógenos.

Tabla 2. *Mecanismos de acción de algunos compuestos químicos frente a Microorganismos patógenos.*

Compuesto	Clasificación química	Mecanismo
Timol	Monoterpenoide	Membrana celular alterada. Composición lipídica afectada
Citronelol, Linalol, Geranial	Monoterpeno	Membranas permeabilizadas
Limoneno	Terpenoide	Membrana permeabilizada
Carvacrol	Monoterpeno	Dañada la morfología celular
	Fenol monoterpenoide	Transitorios de Ca^{2+} aumento Membranas celulares permeabilizadas y vesículas

Adaptado de: Cimanga et al., 2002., Baratta et al., 1998., Bouhdid et al., 2009.

2.1.3.6 Fitotoxicidad. Para la determinación del efecto tóxico y genotoxicidad de los aceites esenciales, se utilizan bioindicadores como *Allium cepa* y semillas de *Lycopersicon esculentum* y *Brassica oleracea*.

El bioensayo de toxicidad con semillas es una prueba estática de toxicidad aguda (120 h de exposición), para evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos puros o de mezclas complejas de éstos, en el proceso de germinación de semillas y en el desarrollo de plántulas durante los primeros días de crecimiento (Bagur-González et al., 2011).

Es importante que, durante el período de germinación y los primeros días de desarrollo de la plántula, ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia tóxica puede interferir en la supervivencia y el desarrollo normal de la planta. (Sobrero & Ronco, 2008)

Por esta razón, la germinación es una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos adversos (Sobrero y Ronco, 2008).

Ahora bien, el ciclo celular es una serie de eventos moleculares secuenciales y unidireccionales cuya función es la duplicación del ácido desoxirribonucleico (ADN) para generar dos células hijas, cada una con una copia idéntica de material genético. En la figura 9 se observa un esquema ilustrativo del ciclo celular.

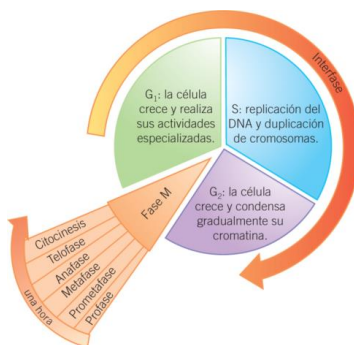


Figura 9. Esquema general de las fases del ciclo celular.

Fuente: Salazar, Rodríguez y Borunda, 2013

Los pasos secuenciales que comprende el ciclo son cuatro: una fase en la que la célula se asegura de que existen las condiciones idóneas para poder dividirse, denominada Gap1 (G1); una fase de replicación de ADN nuclear, Fase S (S); otra fase donde se verifica que la duplicación de ADN se realizó de manera completa y sin errores, denominada Gap2 (G2); y finalmente, una fase de segregación de las cromátidas (Fase M o mitosis). (Garza et al., 2014) La mitosis, a su vez, se lleva a cabo en cuatro fases: profase, metafase, anafase y telofase/citocinesis. Durante la profase ocurre la ruptura de la membrana nuclear y la condensación de cromatina para formar los cromosomas (cromátidas hermanas unidas por el centrómero). En la metafase, los cromosomas se localizan en el plano ecuatorial de la célula mediante el huso mitótico. En la anafase las cromátidas hermanas se separan y migran hacia los polos opuestos de la célula. Finalmente, en la telofase, las dos nuevas envolturas nucleares rodean a cada juego de los cromosomas separados, éstos se descondensan y expanden en el nuevo núcleo generando dos células hijas mediante un proceso denominado citocinesis. (Garza et al., 2014)

Por otra parte, la prueba de *Allium cepa* ha sido utilizada para evaluar daños en el ADN, como aberraciones cromosómicas, alteraciones en el ciclo mitótico y diferentes puntos finales. Las aberraciones cromosómicas pueden ser inducidas por varios factores como el rompimiento del ADN o la inhibición de la síntesis y replicación del ADN alterado. Muchas de las ACs (Aberraciones cromosómicas) son consecuencia de una segregación anormal de los cromosomas, generado por la acción de agentes aneugénicos o clastogénicos) (Restrepo et al., 2012).

Con respecto a las anomalías cromosómicas relacionadas con los puentes cromosómicos, estas son causantes de la rotura de los brazos cromosómicos en el momento de la división celular (telofase) y pertenecen al grupo de alteraciones clastogénicas. (Segovia et al., 2016).

De igual modo es preciso señalar la naturaleza pegajosa de los cromosomas que dan como resultado, cromosomas que no pueden llegar a los polos y permanecen dispersos en el citoplasma, presentándose de modo condensado y pegajoso. En añadidura, la presencia de c-metáfase, es causante de un bloqueo del ciclo celular en metafase (Berrocal et al.,2013)

En la figura 10, se pueden observar los diferentes tipos de aberraciones cromosómicas, identificadas como c-mitosis, célula binucleada, fragmento cromosómico y puente anafásico.

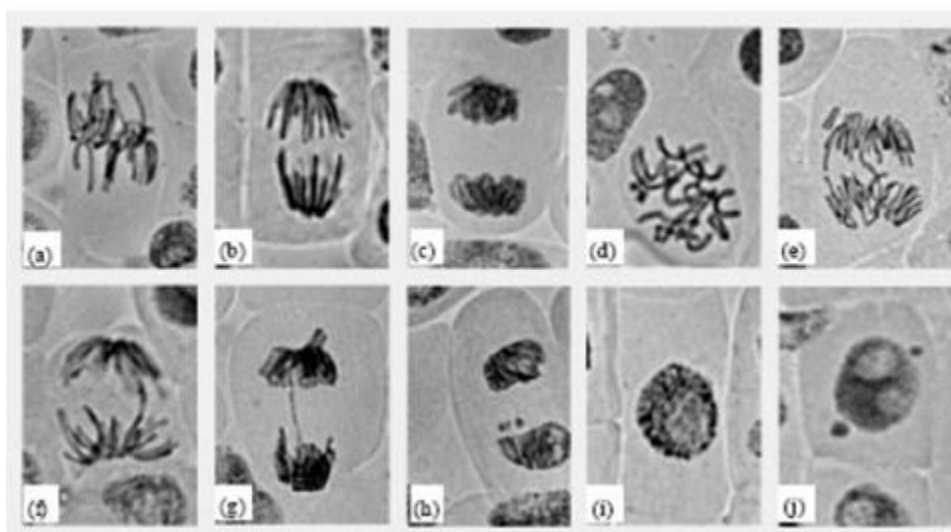


Figura 10. Aberraciones cromosómicas en *Allium cepa*. Imagen observada en 60X. A) normal metafase; b) normal anafase; c) normal telofase; d) c-mitosis; e) anormalidades del huso en anafase; f) puente anafásico; g) puente en telofase; h) fragmento en telofase; i) célula en interfase; j) micronúcleo en célula de interfase.

Fuente: Dragoeva et al, 2012.

El índice mitótico se define el número de células por unidad (normalmente 1.000) (Fiskesjo,1985) que sufren mitosis durante un determinado período de tiempo de exposición (120 horas) y se utiliza principalmente como estimación de la velocidad del crecimiento tisular (Restrepo et al., 2012).

Valores del índice mitótico (IM) que se encuentren inferiores al valor del control negativo (agua) indican alteraciones inhibitorias, derivadas de las sustancias químicas utilizadas en el

ensayo. Caso contrario, valores del IM superiores al control negativo indican un incremento en la división celular, mostrando un desorden en la proliferación celular. (Restrepo et al., 2012).

El principal propósito de realizar estudios de toxicidad aguda es establecer una relación causa-efecto entre la exposición a una sustancia tóxica y la consecuencia observada para determinar un nivel de exposición seguro. Uno de los aspectos importantes en toxicología y ecotoxicología es la relación entre la concentración de un compuesto químico a la cual se expone un organismo y el consecuente efecto perjudicial que le produce. Esta relación, es conocida como dosis-respuesta, el cual constituye la base para la evaluación del peligro y el riesgo generado por las sustancias químicas en el medio ambiente. (Ramírez, 2017)

2.2 Marco de antecedentes

En la tabla 3 se muestran los compuestos químicos, estructuras y propiedades biológicas de los aceites esenciales *Cymbopogon nardus* y *Cymbopogon martinii*.

Tabla 3. Aceites esenciales con sus respectivas propiedades biológicas, compuestos mayoritarios y estructuras químicas.

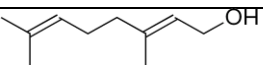
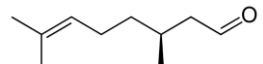
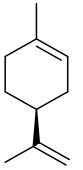
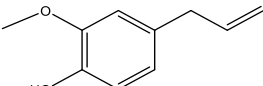
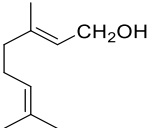
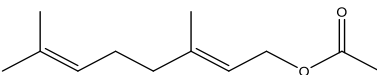
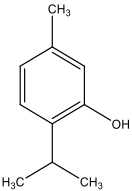
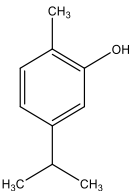
Aceite esencial	Compuestos químicos	Estructura	Propiedades biológicas del aceite esencial	Referencia
<i>C. Nardus</i>	Geraniol (20.04%)		Actividades antivirales, antibacterianas, antifúngica y antisépticas.	Pérez et al.,2006 Zambon et al.,2015 Quintanilla et al.,2012
	Citronelal (45.7)			
	R-(+)-Limoneno (7 %)			
	Eugenol (1,3%)			

Tabla 3. (Continuación)

<i>C.Martinii</i>	Geraniol (69.7 %)		Propiedades antisépticas, antibacterianas, antiinflamatorias y antimicrobiana	Stashenko et al., 2012 Quintanilla et al., 2012
	Acetato de geraniol (14.8 %)			Maguna et al., 2006
	Timol (0,1%)			
	Carvacrol (0,1%)			

Para determinar la importancia de la actividad antimicrobiana en los últimos años, se realizó una búsqueda en la base de datos Scopus con la siguiente ecuación *TITLE-ABS KEY (antimicrobial AND activity) AND PUBYEAR > 2007 AND PUBYEAR < 2020* ; en la cual se obtuvieron 97.777 documentos en un periodo de tiempo del 2007-2020. En la Figura 11 se puede observar la tendencia en publicaciones científicas acerca del tema mencionado, notándose que la mayor cantidad de documentos corresponde al año 2018 con un total de 10997 artículos, lo cual permite destacar que es un campo de investigación activo.

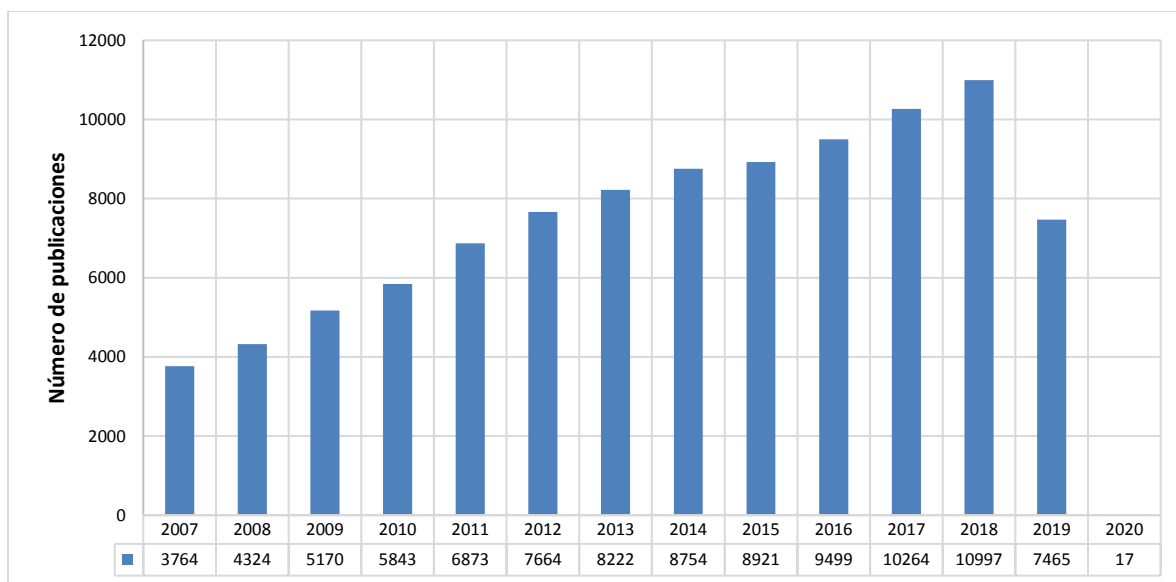


Figura 11. Número de publicaciones por año relacionados con actividad antimicrobiana en el período 2007 – 2020 (Consultado en septiembre del 2019).

Fuente: Base de datos Scopus (Elsevier, B.V., 2019), Crai Biblioteca USTABUCA.

Por otra parte, en la Figura 12, se observa una relación entre la actividad antimicrobiana y los aceites esenciales, en la cual se realizó una búsqueda en la base de datos Scopus con la siguiente ecuación (*TITLE-ABS-KEY (antimicrobial AND activity) AND TITLE-ABS-KEY (essential AND oil) AND PUBYEAR > 2007 AND PUBYEAR < 2020*) obteniéndose así mismo una cantidad de 6.811 documentos publicados en un rango de 2007 hasta 2020.

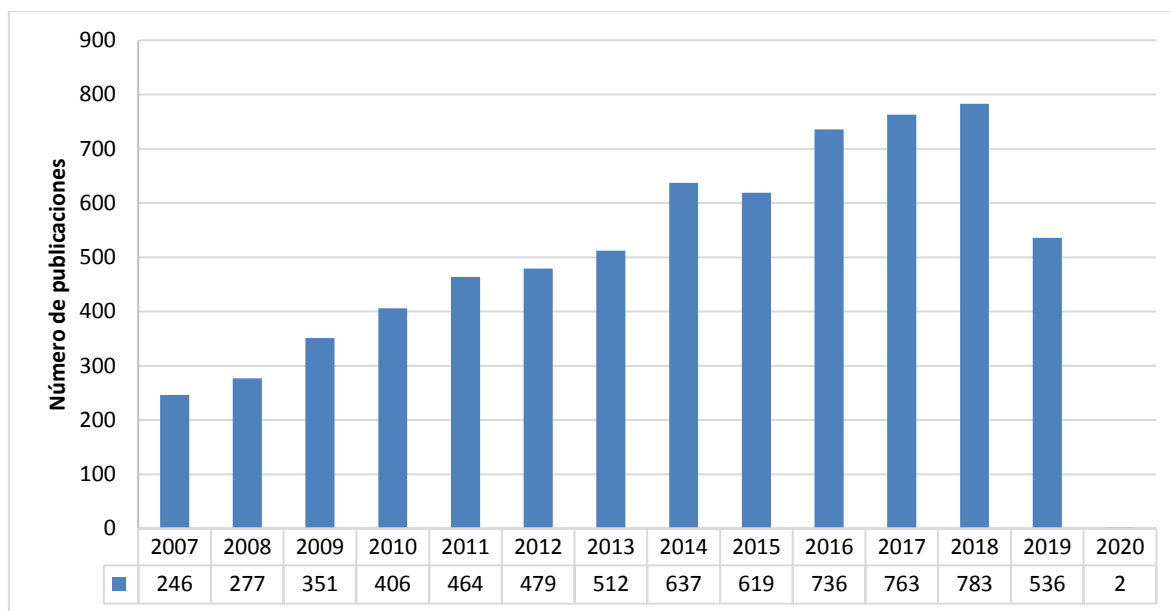


Figura 12. Relación de actividad antimicrobiana con los AE durante el período 2007 – 2020 (Consultado en septiembre del 2019).

Fuente: Base de datos Scopus (Elsevier, B.V., 2019), Crai Biblioteca USTABUCA.

Se puede observar una tendencia creciente en el estudio de relación entre actividad antimicrobiana frente a los aceites esenciales, consiguiéndose 783 publicaciones en el año 2018, lo cual da a entender la relevancia que tiene este tema en la actualidad.

Una investigación reciente sobre la variedad de aceites esenciales entre los que se encontraba *Cymbopogon nardus* para determinar la actividad antimicrobiana contra *Enterococcus faecalis* usando las hojas de planta y el método de dilución en agar, obtuvieron un resultado de MIC para *Enterococcus faecalis* 1.0 %V/V (Hammer, Carson & Riley, 2001)

En Malasia determinaron la composición química y su actividad antibacterial de aceites esenciales de *Cymbopogon nardus* y *Cymbopogon citratus* contra *Enterococcus faecalis* obtenido por el método de hidrodestilación, la composición química se determinó por acoplamiento de cromatografía de gases y espectrometría de masas y su prueba de sensibilidad antibacteriana para

E. faecalis fue hecho por el método de difusión del disco. Se obtuvo una CIM de *C. nardus* contra el microorganismo una concentración de 31.25 mg/ml (Subramanan et al., 2015).

En el año 2009 se realizó un estudio acerca de las actividades antimicrobianas del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (hierba de limón) contra algunos patógenos periodontales, *Porphyromonas gingivalis*. Entre sus componentes mayoritarios se encontraba neral, linalol y geraniol. Esto se evaluó mediante el método de dilución en caldo, determinándose la concentración mínima inhibitoria la cual se obtuvo como resultado una CIM de 0,22 mg / mL (Khongkhunthian et al., 2009).

En el año 2014 con el trabajo titulado *Antimicrobial activity of Cymbopogon martinii essential oil associated with chitosan in Enterococcus faecalis strains*, evaluaron la actividad antimicrobiana del aceite esencial *Cymbopogon martinii* frente al microorganismo *Enterococcus faecalis* por el método de microdilución, se obtuvo una concentración bactericida mínima e inhibitoria, obteniéndose 7.5µL/mL como MIC y MBC frente a *Enterococcus faecalis* (Barboza et al., 2014).

En el año 2014, con el trabajo titulado *action of essential oils from Brazilian native and exotic medicinal species on oral biofilms*, evaluaron la actividad antimicrobiana del aceite esencial *Cymbopogon martinii* frente a *Porphyromonas gingivalis* mediante el método de microdilución, ellos obtuvieron la concentración mínima inhibitoria y bactericida, obteniendo un resultado de 0.250 mg/ mL frente al microorganismo (Bersan et al., 2014).

En el año 1998, estudios científicos indicaron que el carvacrol y el timol desintegran la membrana celular de las bacterias Gram-negativas, ocasionando la liberación de polisacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana al ATP. (Helander et al., 1998)

Estudios en el año 2002, referentes a la inhibición de *Bacillus cereus* por el compuesto carvacrol, muestran que dicho componente interactúa con la membrana celular, en la que se

disuelve en la bicapa de los fosfolípidos y se ordena entre las cadenas de los ácidos grasos; la distorsión de la estructura física de la membrana celular ocasiona su expansión e inestabilidad. (Ultee et al., 2002)

Una investigación científica realizada en el año 2018, explican que el compuesto carvacol afecta la permeabilidad de la membrana de los microorganismos gram positivos, provocando que se alteren los procesos de difusión y de transporte de activos, además de modificar la permeabilidad, y provocar la salida de iones potasio, elementos esenciales para la vida bacteriana, o la entrada de otros que a altas concentraciones alteran el metabolismo bacteriano normal. (Mendoza, 2018)

Un estudio realizado en el año 2018 relacionado con la genotoxicidad de meristemas de raíces en *Allium cepa* con los aceites esenciales *C. nardus* y *C. martinii*, obtuvieron que los aceites esenciales no presentaron actividad genotóxica, pero sí evidenciaron anomalías con daño clastogénico, células binucleadas y el aumento en el tamaño del núcleo. (Marisol, 2018)

En el año 2017, evaluaron la actividad fitotóxica de *C. nardus* frente a *Lactuca sativa*, y encontraron que ésta sustancia, logró una inhibición significativa mayor al 50 % en la germinación de la semilla, atribuyendo el efecto fitotóxico al compuesto *N*- octanoil tiramina. (Ohno et al, 2017)

3. Diseño metodológico

Se recomienda realizar ensayos con solventes orgánicos que no generen genotoxicidad, para verificar que los aceites esenciales sean los posibles causantes de efectos genotóxicos.

Reactivos. Se usaron: Ampicilina (Casa comercial: Sigma- Aldrich) y Metronidazol (Casa comercial: AMEGIAR). DMSO (Casa comercial: Honeywell). Agar nutritivo (OXOID). Agar Sangre (OXOID)

Equipos menores. Los equipos empleados durante la investigación se relacionan a continuación: placa de calentamiento (Radley Tech), autoclave (Technistro), microscopio marca OLYMPUS CX23, rotoevaporador (Heidolph), incubadora (Mettmert)

Técnicas analíticas

Espectroscopia infrarroja: los espectros de infrarrojo se llevaron a cabo en el espectrómetro Shimadzu Affinity-1. Los espectros se realizaron mediante el uso del soporte ATR MIRacle; para los compuestos sólidos se empleó la punta plana. Se reportaron las bandas de absorción más características, expresadas en cm^{-1} .

3.1 Caracterización de los aceites esenciales.

La obtención y caracterización de los aceites esenciales se realizó mediante la prestación de servicios técnicos en el Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas (CROM-MASS), adscrito la Escuela de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad Industrial de Santander –UIS.

Para la obtención del aceite se empleó el método de destilación por arrastre de vapor, bajo las siguientes condiciones experimentales: Presión de caldera: 80 psi, temperatura del destilador 96-98°C, flujo del condensador: 800 mL/min, tiempo de destilación 90 minutos, densidad de empaquetamiento del material vegetal: 230 kg/m^3

Las condiciones de análisis de las muestras de aceites esenciales fueron: Método acreditado con la ISO/IEC 17025:2005 por el ONAC, con el código de acreditación 10-LAB-067: Análisis de aceites esenciales por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS); documento normativo: Norma ISO 7609-1985 (E): *Essential oils – Analysis by gas chromatography on capillary columns – general method*; empleando como material de referencia

la mezcla certificada de hidrocarburos $C_6 - C_{25}$ (*AccuStandard, New Haven, CT*). La preparación de las muestras se realizó mediante dilución e inyección directa de los aceites esenciales al equipo cromatográfico. El análisis cromatográfico se realizó en un cromatógrafo de gases AT 6890 *Series plus* (*Agilent Technologies, Palo Alto, California, EE. UU.*), acoplado a un detector selectivo de masas (*Agilent Technologies, MSD 5975*) operado en el modo de barrido completo de radiofrecuencia (*full scan*). La columna empleada en el análisis fue DB-5MS (*J & W Scientific, Folsom, CA, EE. UU.*) [5%-fenil-poli(dimetilsiloxano), 60m x 0,25 mm x 0,25 μ m]. La inyección se realizó en modo *Split* (30:1), $V_{iny} = 2 \mu$ L.

3.2 Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales

3.2.1 Preparación de caldos de cultivo. Los caldos de cultivo utilizados fueron Agar sangre y Agar nutritivo.

Para la preparación de agar sangre, se añadieron 20 g de agar sangre a 500 mL de agua destilada, la cual se llevó a ebullición hasta la completa disolución. Posteriormente, se agitó y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Se dejó enfriar a 45-50 °C y se añadieron 7% de sangre estéril. Se mezcló pausadamente por rotación y se vertió la mezcla en placas Petri.

Se realizó el mismo procedimiento para el agar nutritivo, con la diferencia de que no fue necesario la adición de la sangre. (I.C.T, S.L, s.f.)

3.2.2 Preparación de inóculo. La preparación del inóculo de cada microorganismo se realizó mediante la selección de tres a cinco colonias del mismo tipo morfológico encontradas en el medio de cultivo. A continuación, se tocó la parte superior de cada colonia con un asa y se transfirió el

crecimiento a un tubo de 4 a 5 mL de caldo Muller Hinton. Posteriormente, el cultivo se incubó a una temperatura de 35 °C hasta que alcanzara o superara la turbidez del estándar de 0.5 de McFarland. (Hindler et al., 1990)

3.2.3 Tratamiento de cepas de referencia. Para el presente estudio se utilizaron las cepas de referencia que se pueden observar en la tabla 4, utilizadas para la determinación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales junto con sus condiciones y características de crecimiento que se observan en la tabla 5.

Tabla 4. *Condiciones y características de crecimiento de los microorganismos a evaluar.*

Microorganismo	<i>P. Gingivalis</i>	<i>E. Faecalis</i>
Cepa	ATCC 33277	ATCC 29212
Medio de cultivo	Agar Sangre y Columbia (OXOID)	Agar Sangre – Agar nutritivo (OXOID)
Atmósfera de incubación	Anaerobia: 80% N ₂ , 10% CO ₂ y 10% H ₂	Aerobia
Tiempo de incubación	7-14 días	24 h
Temperatura de incubación	37	37
Colonia	Esféricas	Esféricas u ovaladas
Coloración	Amarillo o crema, después de 4 días negras desde el borde hacia el centro	Blanco o crema.
Textura	Lisa	Lisa
Tipo de bacteria y coloración	Gram negativo: rosado	Gram positivo: morado
Longitud de onda	405	406
Citas bibliográficas	Kotoku et al., 2009.	NCCLS, 2012

Disponible en el laboratorio de Ciencias Básicas de la Universidad Santo Tomás, seccional Bucaramanga.

Tabla 5. Condiciones de crecimiento para determinación de MIC

Microorganismo	Medio de cultivo en placa ELISA	Tiempo de incubación (h)	Temperatura de incubación (°C)	Referencia bibliográfica
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	BHI*	48	35	NCCLS,2012
<i>Enterococcus faecalis</i>	CMH**	24	35	NCCLS,2012

*Brain Heart Infusion. * Caldo Mueller-Hinton
Adaptado de: NCCLS, 2012.

3.2.4 Determinación de la actividad antibacteriana de aceites esenciales. La evaluación de la actividad antibacteriana de cada aceite evaluado frente a los microorganismos de estudio (*Porphyromonas gingivalis* [ATCC 33277] y *Enterococcus faecalis* [29212]), se realizó teniendo en cuenta el protocolo M7-A9 (NCCLS) estipulado en la *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) y el Laboratorio de Investigación y Ciencias Básicas de la Universidad Santo Tomás. (NCCLS,2012)

Todos los materiales utilizados fueron previamente esterilizados mediante calor húmedo (autoclave) (NCCLS, 2012).

3.2.5 Rangos de concentración de aceites esenciales y compuestos de referencia. Los rangos de concentración de los aceites esenciales evaluados se determinaron de acuerdo con la susceptibilidad bacteriana observada en pruebas preliminares. La solución *stock* se realizó disolviendo el aceite esencial en DMSO 99%, ajustando a 10 veces la primera concentración a evaluar en cada caso, teniendo en cuenta los datos de la tabla 5. En esta solución, la concentración final del DMSO fue de 0.38%, concentración no tóxica frente a las bacterias evaluadas. (Torrenegra et al., 2017)

En cuanto a los compuestos de referencia, la solución *stock* se realizó disolviendo el antimicrobiano en el medio de cultivo correspondiente, proceso sugerido por la NCCLS.

Los aceites esenciales de interés y compuestos de referencias fueron evaluados teniendo en cuenta el rango de concentraciones que se presenta en la tabla 6. Estas concentraciones fueron establecidas de acuerdo con protocolo establecido por la NCCLS y estudios previos realizados en el grupo de investigación donde se evaluaron otros aceites esenciales (Quintero y Rangel, 2016) (Torres y Torres, 2018).

Para las diluciones seriadas de la actividad antimicrobiana, se pesaron aproximadamente 40 o 60 mg de cada AE, dependiendo de la concentración inicial a evaluar, es decir, 2.000 o 3.000 $\mu\text{g/mL}$. A continuación, se le agregó al AE pesado, 1000 μL de DMSO al 99%, con la finalidad de obtener una solución *stock* con concentración de 40.000 o 60.000 $\mu\text{g/mL}$. A partir de esta solución, se realizó una dilución 1:5, en una placa de 24 pocillos, agregando 200 μL de la solución *stock* en 800 μL de medio de cultivo, obteniendo diluciones de concentración de 8.000 o 12.000 $\mu\text{g/mL}$. Con estas diluciones se realizó una de relación 1:2, añadiendo 500 μL de la dilución 1:5 en 500 μL de medio de cultivo, dando lugar a diluciones con concentración de 4.000 o 6.000 $\mu\text{g/mL}$. En la placa de 96 pocillos, se realizaron diluciones seriadas 1:2, a partir de la dilución 1:2 realizada en la placa de 24 pocillos, iniciando la evaluación de la actividad a una concentración de 2.000 o 3000 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla 6. Rangos de concentración para la determinación actividad antimicrobiana

<i>Porphyromonas gingivalis</i>			<i>Enterococcus faecalis</i>	
Aceite esencial	Ci (µg/mL)	Cf (µg/mL)	Ci (µg/mL)	Cf (µg/mL)
/compuesto de referencia				
<i>C.nardus</i>	3000	1.46	2000	0.98
<i>C.martinii</i>	3000	1.46	2000	0.98
<i>Ampicilina</i>	NA	NA	64	0.03
<i>Metronidazol</i>	256	0.12	NA	NA

Ci: Concentración inicial, Cf: Concentración final., NA: No aplica

3.2.6 Compuestos de referencia. Los compuestos de referencia fueron establecidos en *The Clinical and Laboratory Standards Institute* en el protocolo M7-A9 (NCCLS), además de revisiones bibliográficas. Se evaluaron concentraciones iniciales de 256 µg/mL para metronidazol y 64 µg/mL para ampicilina. (Quintero & Rangel, 2016) (Santos et al., 2002)

La purificación de metronidazol se realizó mediante la disolución de tres tabletas de 500 mg del compuesto en 150 mL de acetona. Luego, se filtró la solución y se llevó a rotoevaporación con el fin de eliminar el exceso de solvente. El sólido se cristalizó adicionando 20 mL de acetona y se dejó la solución en un baño de agua-hielo durante 20 minutos. Seguidamente se filtró la muestra, y el sólido obtenido se secó a 120 °C durante 20 minutos, obteniéndose un rendimiento de 30%. (Romero, 2012)

Finalmente, los compuestos se caracterizaron mediante Espectroscopia Infrarrojo por Transformada de Fourier.

3.2.7 Prueba de susceptibilidad. La CIM se llevó acabo teniendo en cuenta lo establecido por *The Clinical and Laboratory Standards Institute* para el protocolo M27-A3(NCCLS). Se empleó el método de microdilución en placas estériles de ELISA de 96 pozos fondo redondo distribuidos para la adición de cada uno de los aceites esenciales, compuesto de referencia, control positivo y negativo. En la figura 13, se presenta el diseño de la placa de ELISA, donde las sustancias 1 y 2 corresponden a los aceites esenciales; el control positivo contiene caldo de cultivo y el microorganismo de control y el control negativo contiene solo caldo de cultivo.

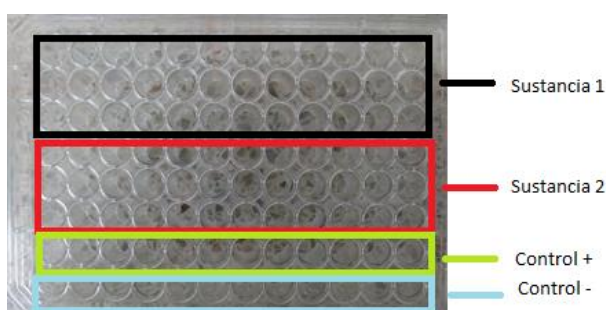


Figura 13. Diseño de distribución de AE en placa Elisa de 96 pocillos. El control (+) contendrá caldo + inóculo, mientras que el control –, solo contendrá caldo.

El método empleado fue microdilución en placas estériles de 96 pozos fondo redondo distribuidos como se observa en la figura 10. Cada pozo contuvo 50 μL de caldo BHI para *P. gingivalis* y caldo Müller Hinton para *E. faecalis*. A continuación, se agregaron 50 μL de aceite esencial en la concentración inicial previamente definida. Además, se añadieron 50 μL de inóculo a una concentración de $1,5 \times 10^8$ microorganismos/mL establecido por el 0.5 de la escala de McFarland. Finalmente, las placas se incubaron teniendo en cuenta las condiciones establecidas en la tabla 5, una vez transcurrido el tiempo de incubación, la CIM se determinó de manera visual iniciando desde el pozo de menor concentración. Las placas estériles de 96 pozos no se pasaron por un lector de placas a razón de que las bacterias evaluadas son anaerobias, es decir, al estar en contacto con el aire, ocurre la muerte de estas y por tal motivo no se obtuvieron datos estadísticos.

3.2.8 Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de los aceites esenciales. Una vez determinada la CIM, se procedió a la determinación de la CBM, la cual se llevó a cabo mediante la inoculación de 6-8 pozos de cada muestra en agares selectivos y no selectivos siguiendo los parámetros de la NCCLS M7-A9 y condiciones establecidas en la tabla 5 para cada microorganismo. La lectura de los resultados obtenidos para la CBM se realizó en aquellas placas de menor concentración de cada solución donde no se evidenció el crecimiento bacteriano.

3.3 Determinación de la fitotoxicidad de aceites esenciales

3.3.1 Preparación de soluciones. Se prepararon soluciones de los aceites esenciales de *Cymbopogon nardus* y *Cymbopogon martinii* con concentraciones de 1, 10, 100 y 1000 ppm con la finalidad de tener un mayor rango de análisis.

3.3.2 Determinación de la toxicidad de aceites esenciales mediante semillas de repollo (*Brassica oleracea*) y tomate (*Lycopersicon esculentum*). Las semillas fueron adquiridas en un establecimiento de insumos agrícolas. Para la realización de los ensayos, se colocaron 20 semillas de repollo sobre un papel filtro y en cajas Petri, luego, para cada concentración evaluada y controles, se le añadieron 2 mL de sustancia (Aceite esencial + DMSO). Luego, se sellaron las diferentes cajas de Petri con una película transparente de PVC y papel aluminio en un lugar fresco ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) en total oscuridad por un periodo de 8 días.

Una vez transcurrido el tiempo, se hicieron las mediciones y observaciones de las plántulas, registrando todos los datos, para el análisis estadístico. El ensayo se realizó por triplicado. Este procedimiento se ejecutó de igual forma para las semillas de tomate.

3.3.3. Determinación de la toxicidad de aceites esenciales empleando bulbos de *Allium cepa*. Se eligieron cebollas (*Allium cepa*) con un tamaño similar de promedio ± 20 g para cada concentración a evaluar. Seguidamente se les quitó la primera capa y se limpió su base radicular con cuidado de tal manera que no se eliminaran las raíces y se dejaron sumergidas en agua sin cloro por 2 horas. Una vez transcurrido el tiempo, cada cebolla se colocó en contacto con las soluciones de los aceites esenciales a distintas concentraciones (1, 10, 100 y 1000 ppm), control positivo utilizando DMSO (dimetilsulfóxido) al 0.38% y control negativo utilizando agua embotellada comercial, para luego dejarse en oscuridad por un periodo de tiempo de 5 días con el fin de permitir nuevo desarrollo radicular. Los experimentos se realizaron con tres repeticiones a temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ\text{C}$). (Sobrero y Ronco, 2008)

Una vez culminado el tiempo de exposición de las cebollas, se determinó el porcentaje de inhibición de crecimiento de las raíces, mediante la comparación de la longitud promedio de las raíces expuestas a cada concentración con las raíces que germinaron en los controles, luego se calculó la CE_{50} teniendo en cuenta la regresión lineal de curva dosis-respuesta a partir de datos probit. Para establecer la genotoxicidad, se cortó el ápice de 2-3 mm de la punta de la raíz, correspondientes a raíces que midieran menos de 2.5 cm. Seguido, se sumergieron los ápices en ácido clorhídrico 1N por 20 min. Una vez transcurrido el tiempo, se lavó cuidadosamente tres veces con agua destilada los ápices con el fin de eliminar el ácido y se sumergió en colorante de aceto-orceína durante 20 min para su coloración. Se colocaron las puntas de las raíces

coloreadas sobre láminas porta objetos, y se cubrió con una laminilla, de tal manera que se ejerció presión fuerte sobre ellas con el dedo pulgar (“Squash”) y la raíz expusiera una capa fina del tejido vegetal. Las observaciones de las fases mitóticas se llevaron a cabo en un microscopio. Las condiciones estándares implementadas para el ensayo *Allium cepa* se presentan en la tabla 7.

Ecuación 1. Índice mitótico

$$IM = \frac{\text{Número de células en división}}{\text{Número total de células}} * 100$$

Tabla 7. Condiciones estándares para ensayo *Allium cepa*.

Concentraciones para evaluar	1, 10, 100 y 1000 ppm
Control positivo	DMSO 0.38 %
Control negativo	Agua comercial
Condición de Temperatura	Ambiente
Tiempo de análisis	5 días
Condición de almacenamiento	Oscuridad

Además, se identificaron las Aberraciones Cromosómicas (AC) presentes en las etapas mitóticas.

4. Análisis de Resultados

A continuación, se presentan los resultados del proceso de investigación para la determinación de la actividad antimicrobiana de dos aceites esenciales frente a *Porphyromonas gingivalis* y *Enterococcus faecalis*, así como también, se presenta la fitotoxicidad y genotoxicidad de los aceites esenciales.

4.1 Caracterización de los aceites esenciales por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

En la Figura 14 se presenta el cromatograma (corriente iónica total reconstruida) correspondiente del aceite esencial de citronela (*Cymbopogon nardus*), obtenido mediante análisis realizado por GC-MS.

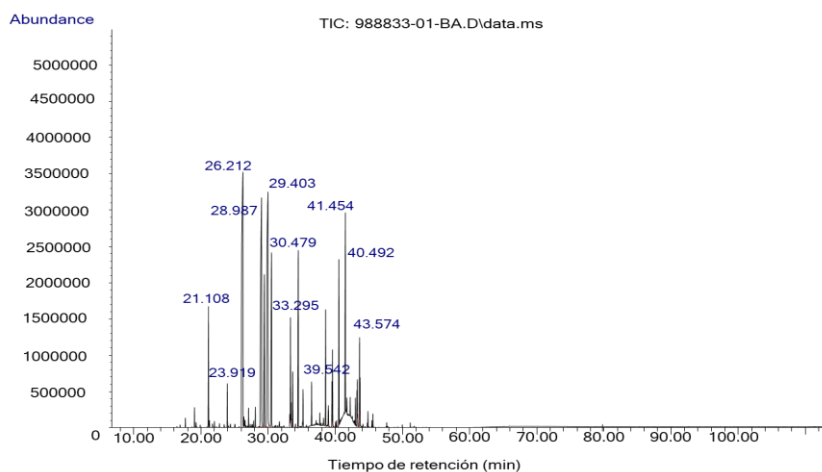
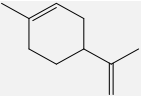
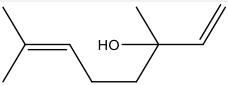
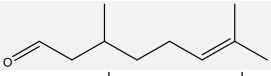
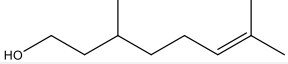
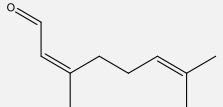
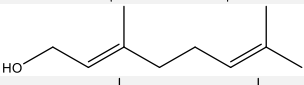
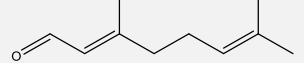
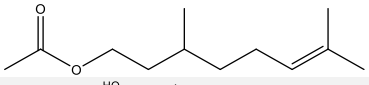
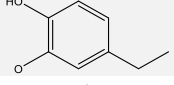
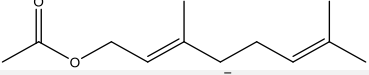
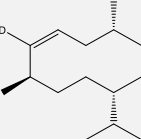
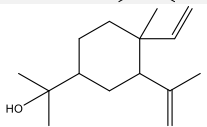
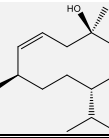


Figura 14. Perfil cromatográfico (corriente iónica total reconstruida) del aceite esencial de citronela (*Cymbopogon nardus*), obtenido mediante GC-MS (modo *full scan*)

Se identificaron 31 componentes, de los cuales se presentan los más representativos en la Tabla 8. De acuerdo con el % de abundancia relativa, los compuestos mayoritarios son: citronelal

(19,4%), citronelol (14,9%), geraniol (18,1%), geranial (6,2%) y acetato de geranilo (5,0%), entre otros.

Tabla 8. Composición del aceite esencial de citronela (*Cymbopogon nardus*).

Orden de elución	Compuesto	Estructura	Cantidad relativa, %
1	Limoneno		2,3
2	Linalol		0,8
3	Citronelal		19,4
4	Citronelol		14,9
5	Neral		4,7
6	Geraniol		18,1
7	Geranial		6,2
8	Acetato de citronelilo		2,3
9	Eugenol		1,3
10	Acetato de geranilo		5,0
11	Germacreno D		2,4
12	Elemol		3,9
13	Germacreno - 4-ol		5,8
Total			87,1

En la Figura 15, se presenta el espectro de masas y la posible ruta de fragmentación del citronelal, componente mayoritario del AE de citronela.

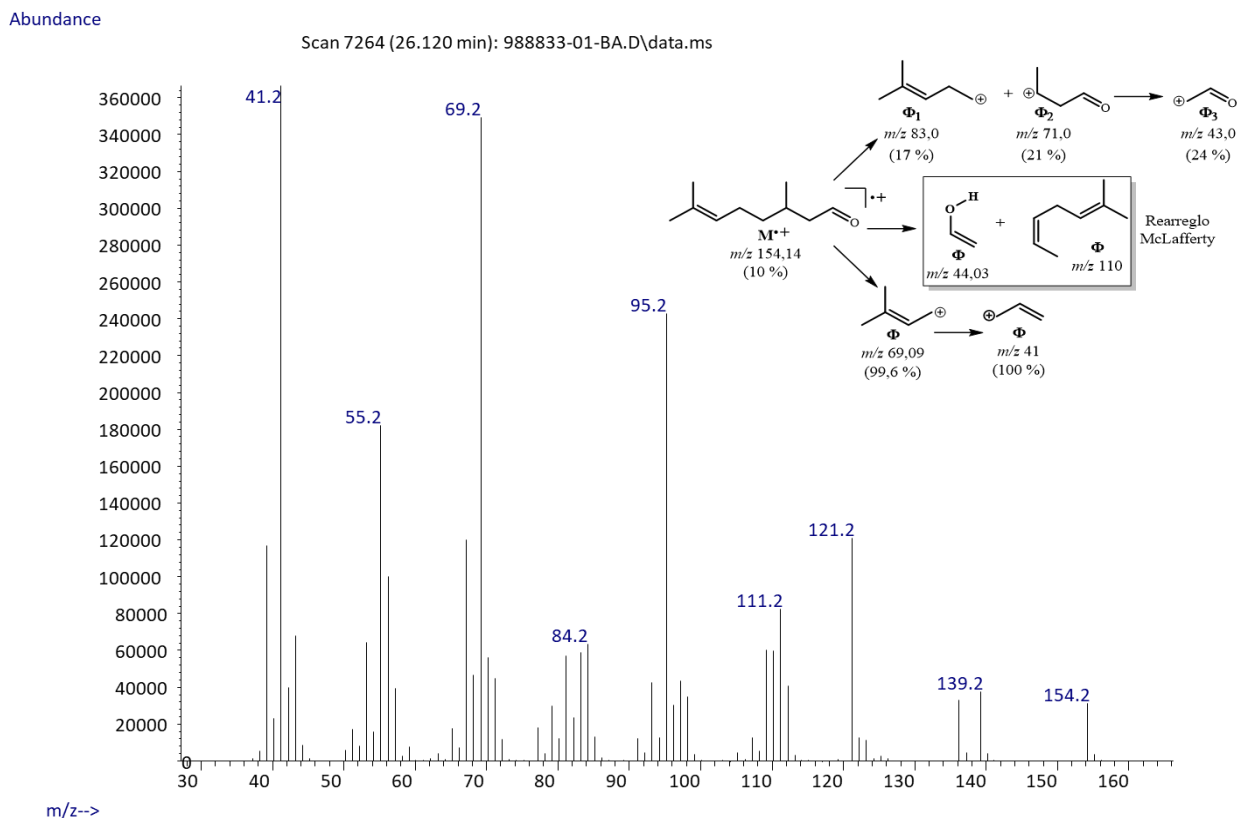


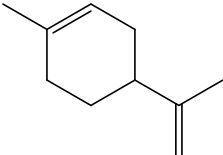
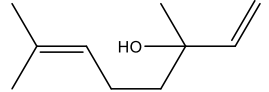
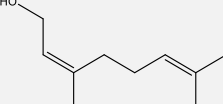
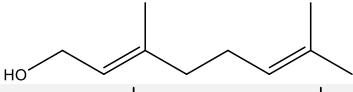
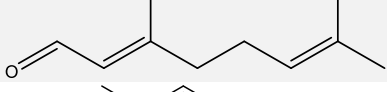
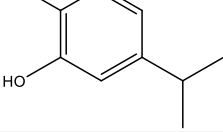
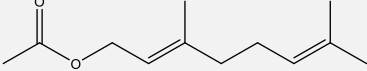
Figura 15. Espectro de masas citronelal, compuesto mayoritario presente en el aceite esencial de citronela (*Cymbopogon nardus*),

En el espectro de masas se registra el ion molecular con una relación m/z de 154, a partir de este y producto de una ruptura homoalílica se puede explicar la formación de los fragmentos con m/z 83 y 71 los cuales se identificaron como Φ_1 y Φ_2 respectivamente. A partir de Φ_2 mediante la pérdida de etileno o directamente desde el ion molecular se puede explicar la formación del fragmento Φ_3 con una m/z de 43. Los fragmentos Φ_4 y Φ_5 con relaciones m/z de 44 y 110 respectivamente, provienen de un rearreglo tipo McLafferty en el cual un átomo de hidrógeno del carbono δ a un doble enlace se reacomoda. El fragmento Φ_6 con una m/z de 69 corresponde a la

ruptura alílica en el carbono 5, el cual genera un catión alílico bastante estable, lo que explica su alta intensidad; a partir de este fragmento se da la pérdida de etileno para formar el fragmento Φ_7 igualmente alílico con una m/z de 41, siendo este el ion pico de base.

Se identificaron 32 componentes, de los cuales los más representativos se presentan en la Tabla 9, de acuerdo con el % de abundancia relativa, los mayoritarios son: linalool (4,7%), geraniol (64,0%), y acetato de geranilo (14,8%). En la Figura 16 se presenta el cromatograma (corriente iónica total reconstruida) correspondiente del aceite esencial de palmarrosa (*Cymbopogon martinii*), obtenido mediante análisis realizado por GC-MS.

Tabla 9. Composición del aceite esencial de *C.martinii*.

Orden de elución	Compuesto	Estructura	Cantidad relativa, %
1	Limoneno		0,2
2	<i>trans</i> - β -Ocimeno		3,2
3	Linalol		4,7
4	Nerol		0,6
5	Geraniol		64,0
6	Geranial		1,8
7	Carvacol		0,1
8	Acetato de geranilo		14,8
Total			89,4

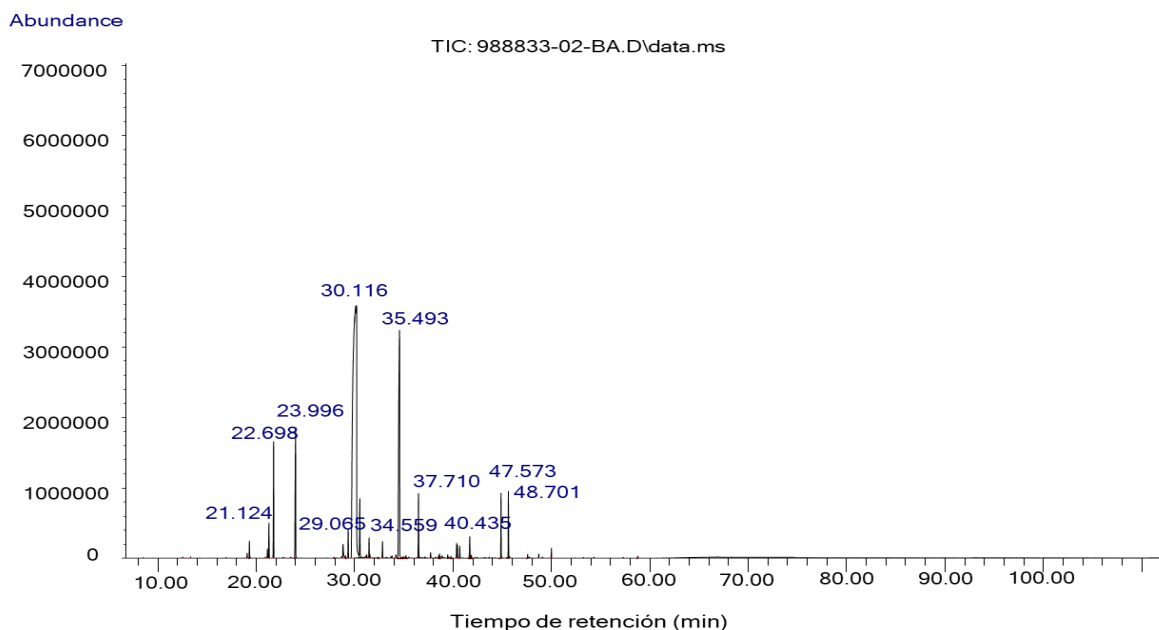


Figura 16. Perfil cromatográfico (corriente iónica total reconstruida) del aceite esencial de palmarrosa (*Cymbopogon martinii*), obtenido mediante GC-MS (modo *full scan*)

En la Figura 17, se presenta el espectro de masas y la posible ruta de fragmentación del geraniol, componente mayoritario del AE de palmarrosa.

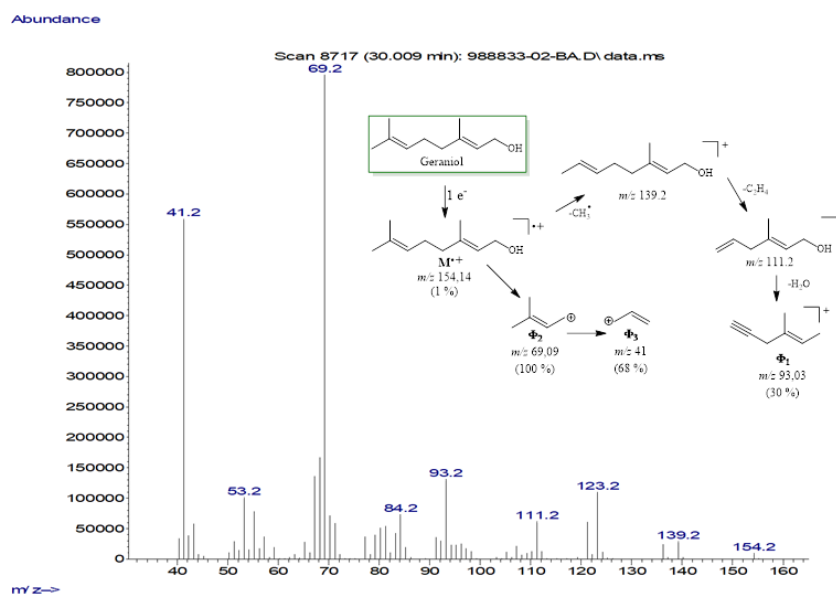


Figura 17. Espectro de masas geraniol, compuesto mayoritario presente en el aceite esencial de palmarrosa (*Cymbopogon martinii*),

En el espectro de masas correspondiente al geraniol (Figura 17) se puede observar la aparición del ion molecular con una relación m/z de 154; a partir de este se da una pérdida de un radical metilo la cual lleva a la formación del catión con m/z de 139.2, este ion pierde etileno formando así el catión con m/z de 111.2, el cual finalmente pierde agua para formar Φ_1 con una relación m/z de 93. Por otra parte, el ion pico de base identificado como Φ_2 proviene de una ruptura alílica en el carbono 5 el cual propicia la formación de un catión de alta estabilidad con una relación m/z de 69; este a su vez pierde una molécula de etileno para llegar así al catión Φ_3 con una relación m/z de 41.

4.2 Compuestos de referencia empleados en la determinación de la actividad antimicrobiana

En las Figuras 18 y 19, se presentan los espectros infrarrojos del metronidazol y la ampicilina, los cuales fueron comparados con los encontrados en la literatura, estos últimos se encuentran en los Anexo D y E.

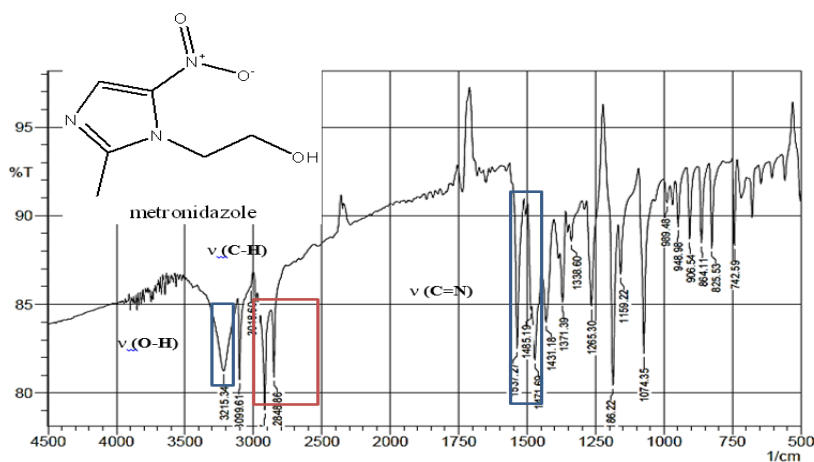


Figura 18. Espectro Infrarrojo experimental del Metronidazol

El análisis por espectroscopía de infrarrojo permitió, corroborar los grupos funcionales del núcleo imidazólico y sus respectivos sustituyentes. La inspección de las señales en el espectro IR muestran la señal en la región de absorción propia del grupo hidroxilo, en 3215 cm^{-1} , correspondiente a la vibración de tensión (ν) del enlace O-H, principal evidencia de la estructura de la molécula. En la región de 1537 cm^{-1} se aprecia una banda intensa de tensión asimétrica del $\text{N}=\text{O}$ debido a que se trata de un nitrocompuesto aromático.

La naturaleza alifática de los sustituyentes alquilo del anillo aromático de imidazol se pudo apreciar debido a las bandas de vibración de tensión simétricas y asimétricas en la región comprendida entre $2848\text{--}2916\text{ cm}^{-1}$. Igualmente, la sustitución sobre el anillo aromático del metronidazol se pudo apreciar en la región comprendida entre $878\text{--}695\text{ cm}^{-1}$, modos vibracionales de tipo flexión (γ). También, se identificaron bandas de tensión en la región de $3018\text{--}3099\text{ cm}^{-1}$ propias de los enlaces C-H_{Ar} , y -CH . Por su parte, el modo vibracional correspondiente a la tensión simétrica del grupo nitro (-NO_2) aparece en 1371 cm^{-1} y la tensión asimétrica en 1537 cm^{-1} .

Por su parte, para el fármaco comercial Ampicilina, también se llevó a cabo una inspección de las señales de su correspondiente espectro infrarrojo. El análisis por espectroscopía de infrarrojo evidenció los grupos funcionales de la estructura molecular del fármaco, confirmándose así la banda de vibración de tensión del grupo amino primario (N-H) en 3332 cm^{-1} , que, aunque en la mayoría de los casos se solapa con la banda de absorción del ácido carboxílico, es característica en los espectros de este tipo de compuestos. Así mismo, se observa la banda de vibración de tensión del enlace S-H en 2632 cm^{-1} .

En la región de 1770 cm^{-1} hay una banda fuerte que podría pertenecer al estiramiento $\text{C}=\text{O}$ de los carbonilos, mientras que las presumibles vibraciones de flexión de tipo aleteo de los grupos

CH y CH₃ y de la vibración de tensión del enlace C-H_{Ar} se registran en los rangos de 1309 - 1380 y 646 - 729 cm⁻¹, respectivamente.

En la figura 19, se ilustra la asignación de las bandas de absorción más relevantes de la ampicilina.

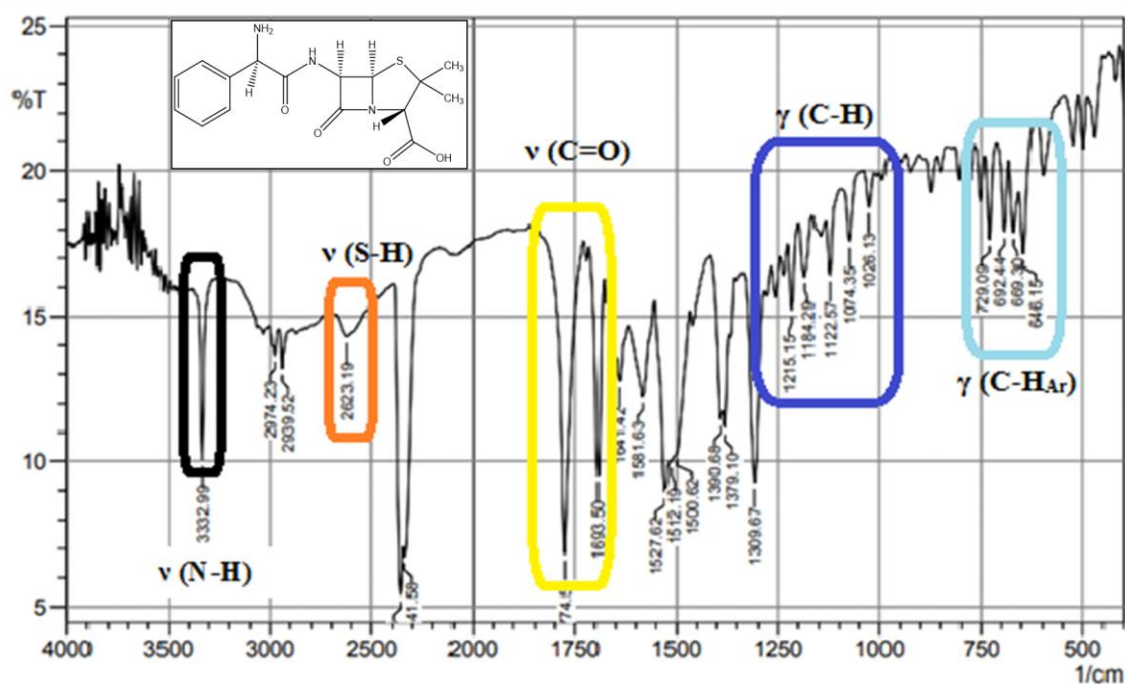


Figura 19. Espectro Infrarrojo experimental de Ampicilina

4.3 Determinación de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales

En la Figura 20 se presenta un esquema del procedimiento experimental realizado para la determinación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales.

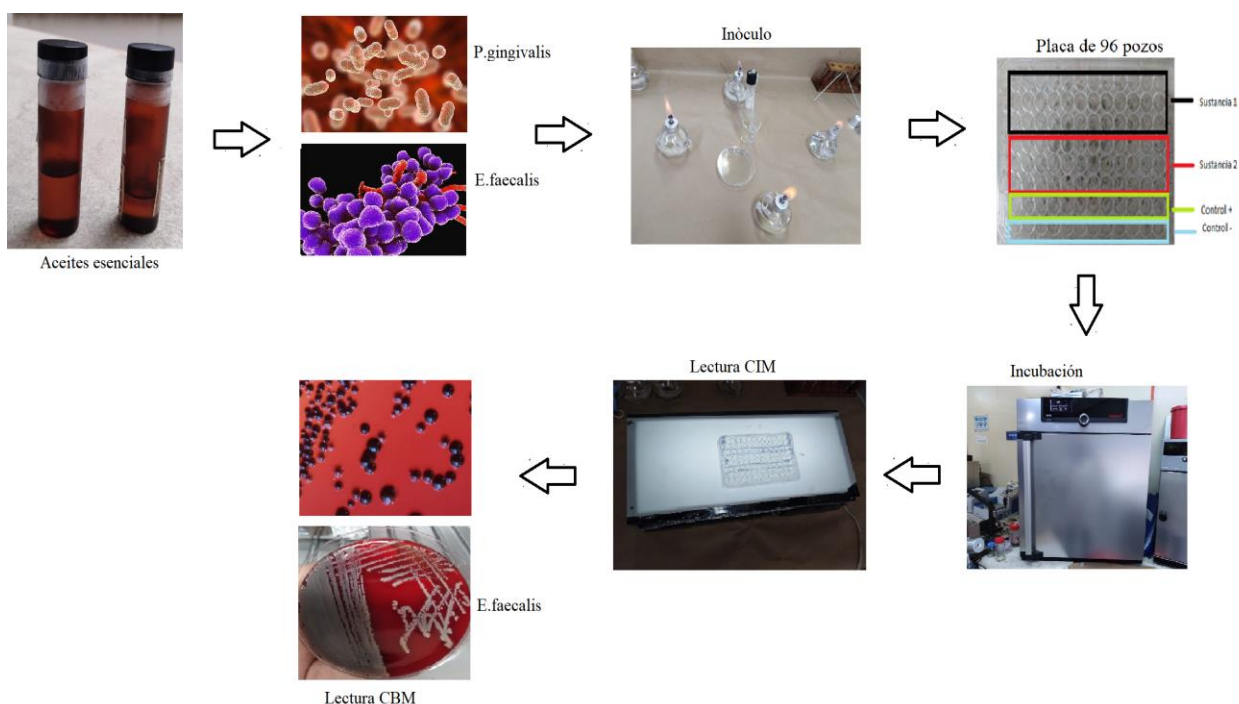


Figura 20. Esquema de la metodología empleada para la determinación de actividad antimicrobiana de aceites esenciales por el método de microdilución en placa.

En la tabla 10, se evidencia que los AEs de *Cymbopogon nardus* y *Cymbopogon martinii* mostraron actividad antimicrobiana frente a *Porphyromonas gingivalis*, presentando una CIM que oscila entre el rango 250-500 $\mu\text{g/mL}$, y CBM de 500 $\mu\text{g/mL}$. El metronidazol presentó una CIM de 256 $\mu\text{g/mL}$ y CBM de 128 $\mu\text{g/mL}$ y la ampicilina una CIM y CBM de 2 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla 10. Resultados de actividad antimicrobiana para el microorganismo *Porphyromonas gingivalis* y *Enterococcus faecalis*.

Aceite esencial-compuesto de referencia	<i>Porphyromonas gingivalis</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>	
	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Cymbopogon nardus</i>	250-500	500	>2000	>2000
<i>Cymbopogon martinii</i>	250-500	500	>2000	>2000
Metronidazol	256	128	NA	NA
Ampicilina	NA	NA	2	2

Nota: CIM: Concentración inhibitoria mínima, CBM: Concentración bactericida mínima.
NA: No aplica.

Teniendo en cuenta los resultados descritos anteriormente, se determinó que los aceites esenciales *C. nardus* y *C. martinii* son activos para *P. gingivalis* expresado en la capacidad de inhibir el crecimiento de las cepas a las concentraciones probadas. Por otro modo, dichos aceites no presentaron actividad antibacteriana frente a *E. faecalis*.

La inhibición del microorganismo *P. gingivalis* por el aceite *C. nardus* puede estar relacionada con la presencia de terpenoides en su composición química; entre sus propiedades biológicas, este presenta actividad antimicrobiana (Sánchez et al., 2007) De igual forma, algunos estudios demuestran que los componentes de menor proporción tienen un papel crítico en la actividad antimicrobiana, posiblemente debido a un efecto sinérgico entre ellos. (Usano et al., 2014) Uno de ellos es el compuesto citronelal, que fue identificado como componente mayoritario en las fracciones volátiles del aceite; su mecanismo de acción se basa en la participación en disrupción de la membrana por compuestos lipofílicos (Maguna et al., 2008) Por otra parte, algunos de los compuestos químicos de los aceites esenciales pueden penetrar en las células microbianas y producir alteraciones en la estructura y funcionalidad de estas. (Andrews et al., 1980).

Uno de los principales mecanismos de acción propuestos para los terpenoides, entre los cuales se puede encontrar el citronelol, geraniol y eugenol, consiste en la disrupción de la membrana celular bacteriana mediante tres posibles vías: aumentando la permeabilidad de la membrana a iones pequeños, afectando la estabilidad estructural de la membrana y desestabilizando el empaquetamiento de la bicapa lipídica, cualquiera de estos efectos produce la muerte en la célula bacteriana. (Maguna et al., 2008)

Otro compuesto importante de *C. nardus* es el Geraniol, el cual es un monoterpeno, cuya función es reforzar el efecto antimicrobiano de citronelal. (Bermúdez et al., 2019) De otro lado, el compuesto eugenol inhibe la producción de amilasas y proteasas, así como el deterioro de la pared

celular y una elevada ruptura celular (Thoroski, 1989). Además, estudios realizados por Wendakoon y Sakaguchi determinaron que el grupo hidroxilo del eugenol se enlaza a las proteínas, bloqueando la acción enzimática.

Trombetta y colaboradores en el año 2005, describen que la actividad antimicrobiana de los compuestos terpénicos es el resultado de su difusión a través de la membrana citoplasmática, alterando la permeabilidad y fluidez de esta, así como también alteran el transporte de iones. Compuestos hidrocarbonados como el limoneno pueden producir la expansión y cambios en la fluidez sobre la membrana, además de la disrupción de las interacciones lípido proteína afectando el intercambio de iones (Sikkema 1994).

Por otra parte, la inhibición del aceite *Cymbopogon martinii* frente a *P. gingivalis* podría estar relacionada con la presencia de compuestos como el geraniol y linalol, los cuales actúan rompiendo los lípidos de la membrana, favoreciendo el flujo de electrones y de otros contenidos celulares. La pérdida prolongada de estas partículas y compuestos conduce a la muerte del microorganismo. (Gómez, 2009)

Cabe destacar que la estructura química de los componentes de los aceites esenciales afecta su modo de acción y actividad antimicrobiana, por lo que se confirma la importancia de la presencia del grupo hidroxilo (-OH) en los compuestos fenólicos como el carvacrol y timol (Gómez et al., 2009). El carvacrol puede inducir a una alteración de la membrana externa de las bacterias *Gram* negativas y con ello permite la salida de lipolisacaridos e incrementa la permeabilidad de la membrana citoplasmática (Lambert et al., 2001), provocando así la salida del ATP, inhibición de la actividad de las ATPasas y la disminución de la fuerza motriz del protón (Burt et al., 2007).

La respuesta de inhibición de crecimiento por diferentes fracciones del aceite esencial *C. martinii* está relacionada con la forma de acción química de los compuestos carvacrol y timol

ante las células bacterianas; toda vez que la composición, la estructura, así como también el grupo funcional de los aceites juegan un papel importante en la determinación de su actividad antimicrobiana (Celikel & Kavas, 2008). El carvacrol y el timol actúan en la bicapa de fosfolípidos de la membrana celular, provocando su desestabilización e incrementando su permeabilidad (Ultee *et al.*, 2002; Lambert *et al.*, 2001). El carvacrol une las proteínas hidrofóbicas de la membrana mediante puentes de hidrógeno y cambia sus características de permeabilidad. (Juven *et al.*, 1994).

Ahora bien, como se observa en la tabla 11, los aceites esenciales *C.nardus* y *C.martinii* no presentaron actividad antimicrobiana frente a *E.faecalis* a las concentraciones evaluadas, esto se puede evidenciar recurriendo a estudios previos del aceite frente a *E.faecalis*, el cual las concentraciones evaluadas por investigaciones anteriores fueron mayores en comparación con las trabajadas en este proyecto, y por tal motivo no hubo actividad. Además de la resistencia tan alta del microorganismo.

Tabla 11. *Concentración efectiva media 50 de los aceites esenciales evaluados frente a Allium Cepa.*

Aceite esencial	CE ₅₀ Raíz
<i>Cymbopogon nardus</i>	3.90 ppm
<i>Cymbopogon martinii</i>	712.44 ppm

4.4 Determinación de Fitotoxicidad de los aceites esenciales en *Allium cepa*

Concentración Efectiva Media: Concentración calculada estadísticamente, de una sustancia en el medio, que se espera que produzca un determinado efecto en el 50% de los organismos de experimentación de una población dada, bajo un conjunto de condiciones definidas (Ramírez, 2017).

En la figura 21 se puede observar el montaje realizado del ensayo de toxicidad en cebolla *Allium cepa*. Además, la tabla 7 describe las condiciones estándares de esta.



Figura 21. Montaje de Ensayo de cebolla Allium cepa.

Nota: Sustancia 1 corresponde al aceite esencial *C.nardus*; Controles : DMSO 0.38 % y agua cristal; Sustancia 2: Aceite esencial *C.martinii*.

En los anexos D,E,F y G se pueden observar los datos de triplicados de los aceites esenciales realizados en *Allium cepa* y semillas *Brassica oleracea* y *Lycopersicon esculentum*. Para la selección de CE_{50} , se escogieron aquellas concentraciones que tuvieran un valor alto, con el fin de establecer la concentración máxima de inhibición. Así mismo, se tuvo en cuenta la regresión lineal de dosis-respuesta de los ensayos realizados, teniendo presente que el r^2 fuera cercano a 1.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos de los aceites esenciales frente a la CE_{50} de la raíz, a concentraciones de 3.90 ppm y 712.44 ppm correspondientes a *C.nardus* y *C. martinii* en el ensayo de *Allium cepa*, se manifiesta una inhibición del 50% de crecimiento para la raíz, por lo cual, los AE son inhibitorios radicales a partir de las concentraciones mencionadas anteriormente. Además, se evidencia que el aceite *C. nardus* manifiesta un efecto inhibitorio radicular mayor que el AE de *C. martinii*.

Índice Mitótico: El IM en el ensayo *Allium cepa* a diferentes concentraciones de los aceites esenciales de *Cymbopogon nardus* y *Cymbopogon martinii* se calculó utilizando la ecuación 1.

Las células del campo a evaluar se contaron una a una mediante la observación, seguidamente se registraron en una libreta la cantidad de fases mitóticas encontradas por cada concentración. Se tuvo presente que las células se encontraban en división por la presencia de diferentes fases mitóticas (anafase, telofase, citocinesis, mitosis). En la figura 22 se puede observar un campo en división celular.

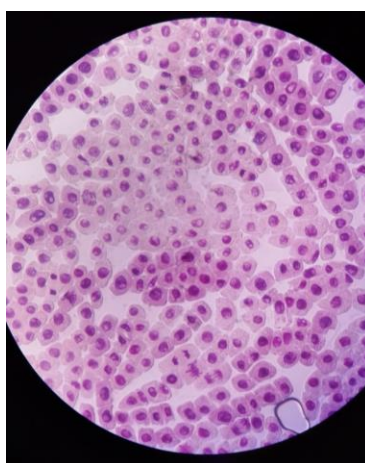


Figura 22. Campo en división celular de *Allium cepa*

El valor reportado de DMSO (0.38%) corresponde al control positivo y el valor del agua, al control negativo y de comparación.

Al analizar los resultados obtenidos, para *C.nardus* se observó una tendencia inversamente proporcional entre las concentraciones evaluadas y el índice mitótico; esto quiere decir que mientras la concentración aumentó, el IM disminuyó. Por consiguiente, se causó una inhibición de la función mitótica en *Allium cepa*, es decir, una acción inhibitoria sobre la división celular. (Restrepo et al., 2012)

La concentración de 1 ppm mostró un IM de 5.54 y 5.82 de *C.nardus* y *C.martinii* respectivamente, los cuales revelaron una leve acción inhibitoria sobre el proceso mitótico en comparación con el control negativo (agua). A concentraciones de 10 y 100 ppm para ambos aceites se mostró una acción inhibitoria más activa para *C. nardus* (IM= 4.35 y 3.06). Y para *C.martinii* (IM= 5.71 y 5.61) en comparación con el control negativo.

Así mismo, en la concentración de 1000 ppm se refleja una acción inhibitoria y destructiva en las células meristemáticas de la raíz de *Allium cepa* por ambas sustancias, con un IM de 0.48 para el aceite esencial *C.nardus* (citronela) y un IM de 0.25 para el *C.martinii* (aceite palmarosa).

En las figuras 23 y 24, el valor del IM del control negativo (agua) fue mayor a diferencia de los resultados encontrados en el control positivo DMSO. De esta forma se evidenciaron los efectos del DMSO sobre los procesos de reproducción en las células de cebolla, lo cual demostró una acción genotóxica.

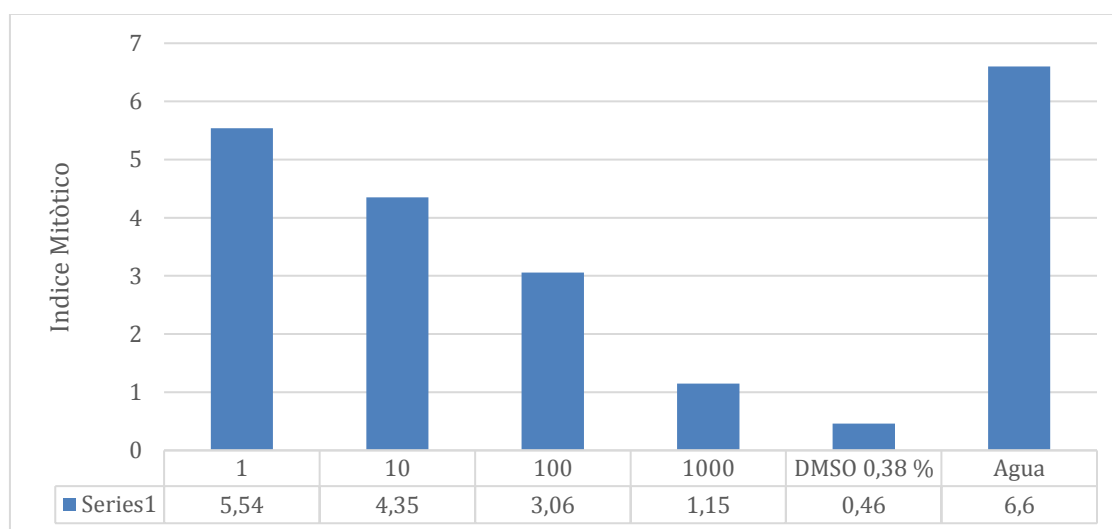


Figura 23. Índice mitótico del aceite esencial *C.nardus* y controles en las concentraciones evaluadas.

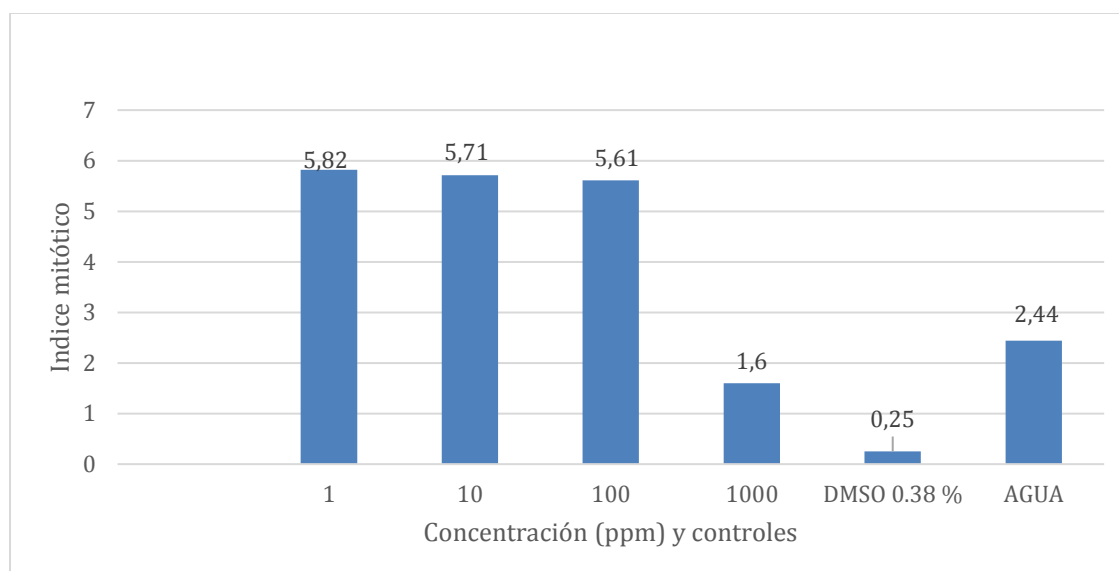


Figura 24. Índice mitótico del aceite esencial *C.martinii* y controles en las concentraciones evaluadas.

Así mismo, los aceites esenciales presentan un efecto antagónico frente al DMSO, puesto que el aceite genera un estímulo en las fases mitóticas, demostrando valores de IM superiores al IM del DMSO. La acción del DMSO es generar una alta inhibición en el proceso de mitosis, confirmando su bajo IM.

En síntesis, al realizar la comparación de los IM de cada concentración evaluada con respecto al control (agua) se determinó que existe una acción inhibitoria.

De igual forma, se observó la presencia de anomalías en el ciclo celular producidas por la citotoxicidad de los aceites esenciales. En consecuencia, se reconocen distintos tipos de aberraciones o anomalías cromosómicas. Particularmente, los principales tipos de aberraciones cromosómicas halladas en cada concentración evaluada detectadas fueron trastornos anormales de metafase, anafase y telofase. Estas se muestran en la tabla 12. A su vez, en la tabla 13 se presenta una cantidad de anomalías en metafase superior a la ocurrida en anafase, a medida que aumenta la concentración.

Por otra parte, al realizar una comparación de aberraciones cromosómicas encontradas en diferentes concentraciones junto con el control de DMSO, se obtiene que el aceite esencial *C.martinii* genera una aberración de binúcleo, el cual en el DMSO no se presenta dicha anomalía. En consecuencia, se le puede atribuye un efecto genotóxico al aceite esencial.

Al realizar una comparación numérica entre las aberraciones cromosómicas inducidas por el DMSO y las concentraciones evaluadas, compuestas por DMSO más aceite esencial, se interpreta que, por haber un porcentaje mayor de aberraciones en las concentraciones, a diferencia del DMSO, la inhibición del crecimiento radicular se debe al aceite esencial, según se observa en los datos de la tabla 12.

Tabla 12. *Aberraciones cromosómicas encontradas en las concentraciones evaluadas de los AE.*

Aberraciones cromosómicas	Agente causante							
	<i>C.nardus</i>				<i>C.martinii</i>			
	Concentraciones evaluadas							
	1	10	100	1000	1	10	100	1000
Puente en Anafase	X	X	X		X	X	X	
Metafase pegajosa	X	X	X		X	X	X	
Cromosoma vagabundo en Anafase		X			X			
Cromosoma vagabundo en telofase			X		X			
Células Binucleadas								X

Tabla 13. Comparación de la cantidad de aberraciones cromosómicas presentes en las fases mitóticas de los AE.

Aceite esencial	Concentración	Aberraciones			Control DMSO	
		Metafase	Anafase	Telofase	Metafase	Anafase
<i>Cymbopogon nardus</i>	1	7	2	0	3	2
	10	10	4	0		
	100	12	6	2		
	1000	9	0	0		
<i>Cymbopogon martinii</i>	1	3	1	0		
	10	4	2	0		
	100	5	3	0		
	1000	7	0	0		

En la tabla 14 se detallan las fotos de las anomalías más comunes encontradas en los aceites esenciales, entre ellas se encuentran puentes anafásicos, célula binucleada, metafase pegajosa y cromosoma vagabundo en anafase y telofase.

Ahora bien, la presencia de cromosomas pegajosos puede deberse a los cromosomas que no pueden llegar a los polos y permanecen dispersos en el citoplasma, por lo cual se presentan de modo condensado y pegajoso (Ajay y Sarbhoy, 1988); de igual forma, la rigidez de los cromosomas surge debido a la doblez impropia de fibras de los cromosomas en una sola cromátida y, por lo tanto, son una mezcla de fibras. Esto hace que los cromosomas se adhieran uno al otro mediante puentes de cromatina (Klasterska et al., 1976). De igual modo, la presencia de cromosomas liberados tempranamente se debe a la acción anaugénica. Por otra parte, los puentes anafásicos se deben a la interacción entre el aceite esencial y el ADN, con lo cual genera un efecto clastogénico a nivel de las regiones teloméricas del ADN. (Araujo, 2012; Díaz, 2011; Fajardo, 2011)

Se debe agregar que la presencia de células binucleadas obedece a un proceso irregular de citocinesis, en el cual el aceite esencial inhibe la fusión de vesículas del Aparato de Golgi, de

manera que obstaculiza la formación de fragmoplasto, responsable de la nueva pared celular durante la telofase (Beltrán & Gonzáles, 1995) (Prieto et al., 2005)

Se les atribuye a los aceites esenciales una acción inhibitoria de aberraciones en *Allium cepa* frente a las generadas por el DMSO. Esto se puede observar en las figuras 25 y 26.

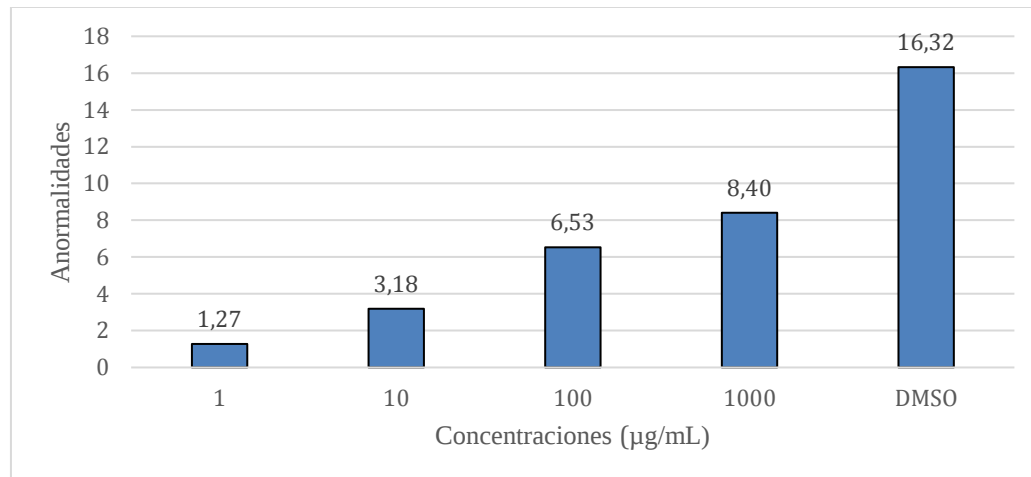


Figura 25. Anormalidades presentes en *C.nardus*

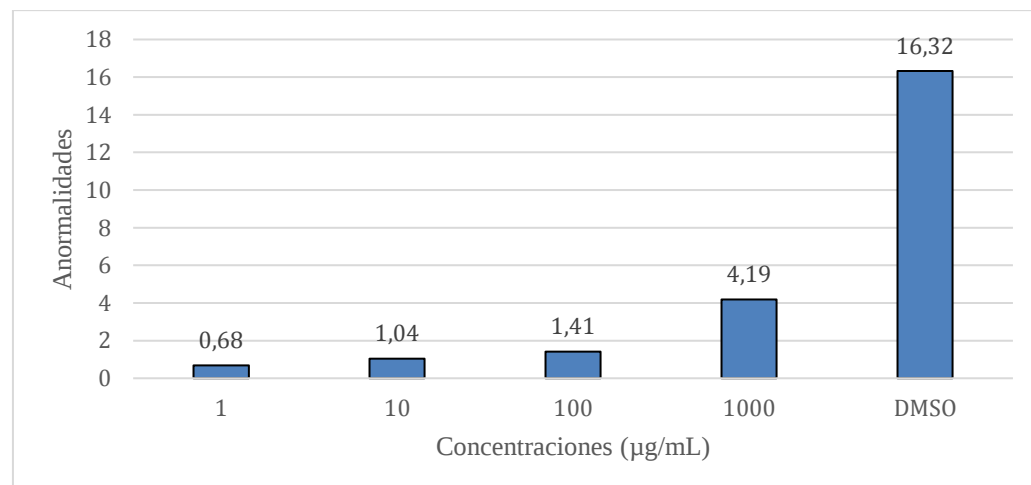


Figura 26. Anormalidades presentes en *C.martinii*

Tabla 14. Aberraciones presentes en los extendidos evaluados.

Agentes causantes	Imágen observada	Cambios genéticos
<i>Cymbopogon nardus</i> <i>Cymbopogon martinii</i>		Puente en Anafase
		Cromosoma vagabundo en anafase
		Cromosoma vagabundo en telofase
		Cromosoma pegajoso y estrellado
<i>Cymbopogon martinii</i>		Células con doble núcleo

4.5 Concentración efectiva media en semillas *Lycopersicon esculentum* y *Brassica oleracea*.

En la figura 27 se presenta el montaje utilizado para las semillas de repollo y tomate utilizados en los ensayos de fitotoxicidad.

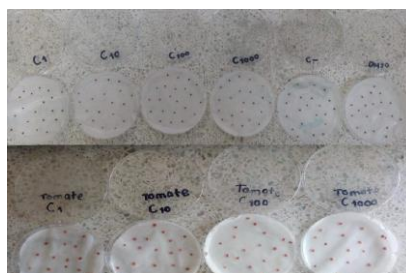


Figura 27. Montaje semilla de repollo y tomate

Tabla 15. CE_{50} y porcentaje de inhibición de los aceites esenciales frente a semillas de *Lycopersicon esculentum* y *Brassica oleracea*.

Aceite esencial	Semillas	% inhibición raíz	CE_{50} Raíz	% inhibición embrión	CE_{50} Embrión
<i>C. nardus</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomate)	65 %	418.54 ppm	-	$CE_{50} > 1000$ ppm sin efecto
	<i>Brassica oleracea</i> (repollo)	-	$CE_{50} > 1000$ Sin efecto	-	$CE_{50} > 1000$ Sin efecto
<i>C. martinii</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomate)	66 %	154 ppm	67 %	407 ppm
	<i>Brassica oleracea</i> (repollo)	55 %	778.9 ppm	-	-

Nota: El signo (-) representa que no hubo inhibición tanto en raíces como embrión en *Allium cepa*.

A partir de los datos obtenidos, se interpreta que el aceite esencial *C. nardus* produce un efecto tóxico para la semilla de tomate, generando una relación directa entre reacción tóxica y cantidad sustancia, lo cual quiere decir que a mayor cantidad de sustancia aumentará la reacción tóxica. Se destaca el 50 % de inhibición en raíces (radícula) a una concentración de 418.54 ppm, manifestando inhibición del 65 %. Para el embrión (hipocótilo), el aceite esencial no presenta efecto tóxico. El efecto tóxico se manifiesta a través de síntomas como la reducción del crecimiento de la raíz, el embrión y la presencia de manchas en dichas áreas.

En semillas de repollo no se generó un efecto inhibitorio para raíz ni embrión por parte del aceite esencial *C. nardus*. De esta manera, se da a entender que las semillas de tomate presentan una sensibilidad alta frente a *Lycopersicon esculentum* y *Brassica oleracea*.

Ahora bien, el aceite esencial *C. martinii* genera una inhibición en el embrión en semillas de tomate, representada con un de 67 % a una CE_{50} de 407.38 ppm. Esto demuestra el efecto tóxico causado por el aceite esencial *C. martinii* frente a dicha especie.

Además, el aceite *C. martinii* usado en el ensayo de semillas de repollo, obtuvo una CE_{50} de 778.94 ppm, y una inhibición del 55 % para la raíz. Esto demuestra una inhibición para la radícula a una concentración alta. Por otra parte, el aceite no presentó efecto inhibitorio para las semillas de tomate.

Como resultado, se tiene que el aceite *C.martinii* en semillas de tomate a comparación de *C.nardus* genera un efecto más potente, evidenciando una inhibición tanto en raíz como en embrión. De la misma manera, ocurre en semillas de repollo, debido a que el AE genera una inhibición radicular, de tal forma que no ocurre lo mismo en el aceite *C.nardus*. La inhibición que se produce para la raíz, pero no para embrión de *C. martinii*, señala que, cuando la raíz está en contacto directo con la sustancia (AE) su efecto sobre ella será mayor y, en consecuencia, presentará una toxicidad aguda y daños en el crecimiento normal de la planta.

Se resalta que las concentraciones necesarias para la inhibición del crecimiento de la raíz y embrión superiores al 50% son valores elevados, obtenidos a partir de una extrapolación de los datos.

Finalmente, en los apéndices H,I,J,K se pueden observar los datos dosis-respuesta de los aceites esenciales *C.nardus* y *C.martinii* frente a la raíz y embrión en semillas de repollo y tomate.

En la tabla 16 se presenta un resumen de la actividad antimicrobiana y fitotoxicidad de los aceites esenciales evaluados. Los aceites esenciales *C. nardus* y *C. martinii* fueron efectivos como agentes antimicrobianos frente a la bacteria *P.gingivalis* y presentaron acción fitotóxicos en las semillas *Lycopersicon esculentum* y *Brassica oleracea* como así también acción genotóxica para *Allium cepa*. El AE de *C. martinii* presentó acción bactericida en un rango de CIM 250-500 $\mu\text{g/mL}$ frente *P.gingivalis* y de igual modo acción inhibitorio frente a la raíz de las semillas tomate y

repollo e inhibición de embrión en semilla de repollo e inhibición de longitud de raíz en *Allium cepa*.

Así también, el AE *C.nardus* presentó actividad bactericida frente a *P.gingivalis* en el rango de CIM 250-500 µg/mL e inhibición de la raíz en semilla *Lycopersicon esculentum* y en *Allium cepa*. El desarrollo del sistema radicular de los bulbos de cebolla evaluados fue más sensible frente a la presencia de las concentraciones evaluadas de los AE de citronela y palmarosa, en comparación con el desarrollo de la radícula y el hipocótilo de las semillas de tomate y repollo.

Los aceites evaluados son factibles para continuar con su desarrollo en la investigación y así mismo generar nuevas pruebas toxicológicas que ayuden a complementar la toxicidad de estos. Se considera necesario realizar otros estudios sobre el mecanismo de acción de los componentes antibacterianos presentes en los aceites esenciales y su respuesta específica ante las comunidades bacterianas potencialmente patógenas, con el fin de conocer su efectividad y alcance como posibles antimicrobianos.

Tabla 16. Comparación de la actividad antimicrobiana y fitotoxicidad de los aceites esenciales

AEs	Actividad antimicrobiana (CIM)		Fitotoxicidad				
	<i>P.gingivalis</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>Brassica oleracea</i>		<i>Lycopersicon esculentum</i>		<i>Allium cepa</i>
			Raíz	Embrión	Raíz	Embrión	
<i>C.nardus</i>	250-500 µg/mL	>2000	CE50>1000 ppm	CE50>1000 ppm	418.54 ppm	CE50>1000 ppm	3.90 ppm
<i>C.martinii</i>	250-500 µg/mL	>2000	778,9 ppm	CE50>1000 ppm	154 ppm	407 ppm	280.6 ppm

5. Conclusiones

- Los compuestos mayoritarios identificados en los aceites de acuerdo con el porcentaje de área relativa, fueron: citronelal 19.4 %, geraniol 18.1 % y citronelol 14.9 %, para el aceite esencial *C. nardus* y geraniol 64 % junto con acetato de geraniol 14.8 % para *C. martinii*. Estos compuestos han sido reportados en literatura con actividad antimicrobiana.
- Los aceites esenciales *C. nardus* y *C. martinii* presentaron alta actividad antimicrobiana frente a *P. gingivalis* en un rango de (CIM: 25-500 µg/mL) y (CBM: 250-500 µg/mL), la cual está posiblemente relacionada con los compuestos citronelal, geraniol y eugenol del aceite esencial *C. nardus* y geraniol, carvacrol y timol de *C. martinii*. En tanto, que para *Enterococcus faecalis* (patógeno altamente resistente) no presentaron dicha actividad
- El aceite esencial *C. martinii* mostró un efecto inhibitorio, representado en un alto valor de inhibición en el crecimiento de la radícula e hipocótilo en las semillas de *Lycopersicon esculentum* y *Brassica oleracea* en comparación del aceite esencial *C. nardus*.
- El aceite citronela carece de efecto fitotóxico en semilla de *Brassica oleracea* debido a que su CE₅₀ fue superior a 1000 ppm.
- Los AE de citronela y palmarosa presentaron genotoxicidad frente a las células de las raíces de bulbos de cebolla. Sin embargo, estos resultados se vieron posiblemente influenciados por la acción del DMSO.

- El AE de citronela presentó mayor efecto inhibitorio de la división celular que el AE de palmarosa considerando el índice mitótico establecido en cada caso. Este efecto se vio reflejado en los datos del crecimiento del sistema radicular de los bulbos expuestos a las diferentes soluciones de AE. Tanto el AE de citronela como el AE de palmarosa indujeron a una mayor cantidad de aberraciones cromosómicas, entre las cuales se encontraban puentes en anafase, cromosomas vagabundos en anafase y telofase. Destacándose en el aceite esencial de palmarosa la presencia de una célula binucleada.

6. Consideraciones éticas

Teniendo en cuenta el título IV, capítulo I de la resolución 8430 de 1993 relacionado con la investigación con microorganismos patógenos o material biológico que pueda contenerlos, se certifica que la Universidad Santo Tomás cuenta con un laboratorio clasificado como “laboratorio de seguridad microbiológica” según lo referido en el artículo 64 y cumple con lo establecido en el artículo 63, en cuanto a las instalaciones, equipos adecuados y normas técnicas que garantizan el manejo adecuado de los microorganismos. El proyecto seguirá el protocolo establecido en el artículo 65 de “*National Committee For Clinical Laboratory Standards*”, (NCCLS).

Referencias bibliográficas

- Agrosíntesis (2016). *Tipos de germinación*. Consultado el 12 de septiembre de 2019, de la fuente: https://www.agrosintesis.com/tipos-de-germanizacion/#.XUTzL_JKhdi
- Ajay, K., Sarbhoy, R. (1988). Cytogenetic studies on the effect of some chlorinated pesticides. *Cytology* 53, 427-436.
- Alamy. (2017). *Antibiótico metronidazol nitroimidazole (clase) molécula fórmula esquelética*. Consultado el 15 de agosto de 2019, de la fuente <https://www.alamy.es/foto-antibiotico-metronidazol-nitroimidazole-clase-molecula-formula-esqueletica-167704581.html>
- Andrews, R., Parks, L. y Spence, K. (1980). Some Effects of Douglas Fir Terpenes on Certain Microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 40(2), 301-304.
- Araujo, J. (2012). Efecto protector del extracto etanolico de *Annona muricata* sobre la citotoxicidad y genotoxicidad del Sorbato de potasio en meristemos radiculares de *Allium cepa*. Tesis de grado. Universidad Nacional de Trujillo.
- Bautista, D. (2015). Determinación de la eficacia antibiótica de los complejos de asociación ampicilina-polímero PAM 18Na2 en cepas de *Staphylococcus aureus*. Tesis de pregrado. Universidad ICESI.
- Beltran, R., L. Gonzales. (1995). Inducción de puentes cromosómicos permanentes en meristemos de *Allium cepa*. *Rebiol* 15(1 y 2), 9 -17.
- Bermúdez, M., Granados, F. y Molina, A. (2019). Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Psidium guajava* y *Cymbopogon citratus*. *Agronomía Mesoamericana*, 30(1).doi: [10.15517/am.v30i1.33758](https://doi.org/10.15517/am.v30i1.33758)

- Bersan, S., Galvao, L., Goes, V., Sartoratto, A., Figueira, G., Rehder, V., Alencar, S., Duarte, R., Rosalen, P y Duarte, M. (2014). Acción de los aceites esenciales de las especies medicinales nativas y exóticas brasileñas sobre las biopelículas orales. *BMC Medicina complementaria y alternativa* 14.
- Bendesky, A; Menendez, D. (2001). Metronidazol : una vision integral. *Revista de la Facultad de Medicina* 44(6)
- Burt, S., Van der Zee, R., Koets, A., De Graaff, A., Van Knapen, F., Gastra, W., Haagsman, H. y Veldhuizen, J. (2007). Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology* 73(14), 4480-4490. doi: 10.1128/AEM.00340-07
- Camones, M. (2009). Actividad antioxidante y antimicrobiana de los compuestos fenólicos del extracto hidroalcohólico de la corteza de *Triplaris americana* L. (Tangarana colorada) Tesis de grado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.p.
- Canabal, A. (2017). Evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales y de bacterias endófitas extraídas de *Lippia alba* y *Lippia origanoides* contra *Burkholderia glumae*. Trabajo de grado. Universidad de Sucre.p.
- Diaz, A. (2011). Efecto protector del extracto etanolico de *Glycine max* sobre la citotoxicidad y genotoxicidad del dicromato de potasio en meristemas radiculares de *Allium cepa*. Tesis de grado. Universidad Nacional de Trujillo.p.
- Diaz, M., Rodriguez, C., & Zhurbenko, R. (2010). Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. *Revista Cubana Hig Epidemiol* 48(2), 147-161.

- Fajardo, K. (2011). Efecto protector del extracto etanolico de *Lupinus mutabilis* sobre la citotoxicidad y genotoxicidad del dicromato de potasio en meristemos radiculares de *Allium cepa*. Tesis de grado. Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- García, P. (2002). Ventajas y problemas de los métodos automatizados de estudio de susceptibilidad in vitro. *Rev Chill Infect* 19 (2), 96-100.
- Gil, J., Soto, M., Usma, J. & Gutiérrez. (2012). Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Producción + Limpia* 7(2), 52-73.
- Gomez, A & Lopez, A. (2009). Potencial antimicrobiano de los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare*) y canela (*Cinnamomum zeylanicum*). *Temas Selectos de Ingenieria de Alimentos* 3(1), 33-45.
- Green Leaves. (s.f.). *Hojas verdes patrón de Cymbopogon nardus en el jardín*. Consultado el 4 de septiembre de 2019, de la fuente https://www.123rf.com/photo_102483089_green-leaves-pattern-of-cymbopogon-nardus-in-the-garden.html
- Hammer, K., Carson, C., Riley, T. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* 86(6), 985-990. doi: [10.1046/j.1365-2672.1999.00780.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00780.x)
- Helander, I., Alakomi, H., Latva, K., Mattila, S., Pol, I., Smid, E., Gorris, L. y Von, A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(9), 3590-3595. Doi: [10.1021/jf980154m](https://doi.org/10.1021/jf980154m)
- Juven, B., Skandamins, P., Coote, P. y Nychas, G. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oils and its active constituents. *Journal of Applied Microbiology* 76(6), 626-631. Doi: [10.1111/j.1365-2672.1994.tb01661.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb01661.x)

- Klasterka, I., Natarajan, A., Ramel, C. (1976). An interrelation of the origin of subchromatid aberrations and chromosome stickiness as a category of chromatid aberrations. *Hereditas* 83(2),153-162.doi: 10.1111/j.1601-5223.1976.tb01581.x
- Kotoku, Y., Kato, J., Akashi, G., Hirari, Y. y Ishihara, K. (2009). Bactericidal effect of a 405 nm diode laser on *Porphyromonas gingivalis*. *Laser Physics letters* 6 (5),153-162.doi: 10.1111/j.1601-5223.1976.tb01581.x
- Khongkhunthian, S., Sookkhee, S y Siriporn, O. (2009). Antimicrobial Effect of Lemongrass Oil against Oral Malodor Microorganisms and the Pilot Study of Safety and Efficacy of Lemongrass Mouthrinse on Oral Malodor. *Journal of Applied Microbiology*, 118(1), 11-17.
- Lambert, R., Skandamis, P., Coote, P. y Nychas, G. (2001) . A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* 91(7),453-462. Doi: [10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x)
- Langfield, R., Scarano, F., Heitzman, M., Kondo, M. y Hammond, G. (2004). Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galiodes*. *J. Ethnopharmacol* 94(2-3), 279-281. Doi: [10.1016/j.jep.2004.06.013](https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.06.013)
- Lau, A., Chang, C., Sabatini, S. (1986). Hemodialysis clearance of metronidazole and its metabolites. *Antimicrob Agents Chemother*, 29(2),235-238.doi:[10.1128/aac.29.2.235](https://doi.org/10.1128/aac.29.2.235)
- Maguna, F., Romero, A., Garro, O. y Okulik, N. (2006). Actividad antimicrobiana de un grupo de Terpenoides. Consultado el 13 de octubre de 2019, de la fuente : http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962012000200005

- Marisol, Y. (2018). “Estudio comparativo de la composición química de los aceites esenciales de *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon cf. martini*, *Cymbopogon cf. nardus* aplicado en perfumería”. Tesis de grado. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.p.
- Martinez, P. (2006). Actividad biocida de un propolis chileno frente a *Porphyromonas gingivalis*: estudio in vitro. Tesis de grado. Universidad de Chile.
- Matute. (2018). *Antimicrobianos*. Consultado el 17 de octubre de 2019, de la fuente <http://cidbimena.desastres.hn/RFCM/pdf/2008/pdf/RFCMVol5-2-2008-11.pdf>
- NCCLS. (2012). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition. CLSI Document M7-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- OCW. (s.f.). *Métodos de estudio de antimicrobianos*. Consultado el 25 de Julio de 2019, de la fuente http://ocw.usal.es/ciencias-biosanitarias/laboratorio-clinico-de-microbiologia/contenidos/pdfs/Antimicrobianos_internet.pdf
- Ohno, O., Suwitchayanon, P., Suenaga, K., Kato, H. (2017). N-octanoil tiramina, un compuesto fitotóxico en las raíces de *C. nardus*. *Acta Physiologiae Plantarum* 39(123). Doi: [10.1007/s11738-017-2419-4](https://doi.org/10.1007/s11738-017-2419-4)
- Pérez, W., Ávila, L., Chacón, Y., Mesa, J. & Munera, M.(2006). Composición química del aceite esencial de las hojas de *Cymbopogon nardus* y *Cymbopogon citratus*. *Revista Momentos de Ciencia* 3(1), 44-50.
- Petrokimica. (2018). *Ficha tecnica de Citronela*. Consultado el 14 de Marzo de 2019, de la fuente <https://www.protokimica.com/wp-content/uploads/2018/07/FT-CITRONELA-FRAGANCIA-44322..pdf>
- Picazo, J. (2013). *Métodos basicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos*. Consultado el 12 de abril de 2019, de la fuente

seimc.org/documents/M%C3%A9todosB%C3%A1sicos_SensibilidadAntibioticos.pdf

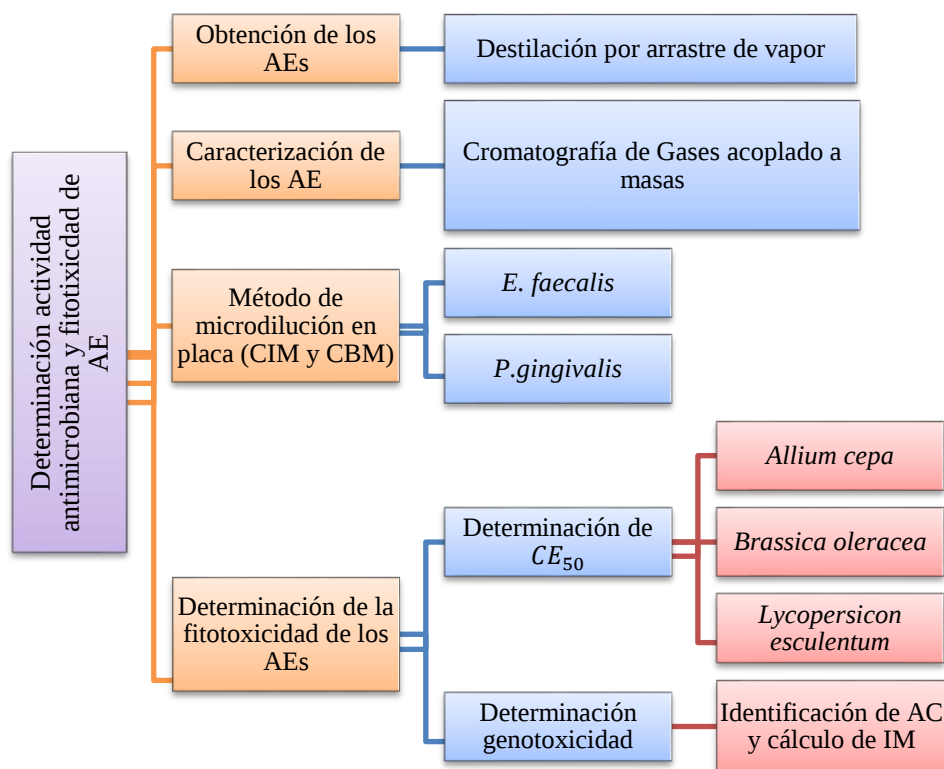
- Prieto, Z; Fernández, R., Polo, E., Quijano, C., León, J., Villegas, L., Tirado, A., Vallejo, R. & Gallardo, J. (2005). Daño cromosómico en meristemas radiculares de *Allium cepa* L, por efecto de azida de sodio. *Rebiol* 25(1-2),31 - 36.
- Quintanilla, G., Ruiz, C., Arias, G., Casto, H; Martinez, J. & Stashenko, E. (2012). Estudio comparativo de la composición de los aceites esenciales de cuatro especies del género *Cymbopogon* (Poaceae) cultivadas en Colombia. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 11(1), 77-85.
- Radaelli, M., Parraga, B., Weidlich, L., Hoehne, L., Flach, A. & Miranda, E. (2016). Antimicrobial activities of six essential oils commonly used as condiments in Brazil against *Clostridium perfringens*. *Brazilian Journal of Microbiology* 47(2),424-430. Doi: 10.1016/j.bjm.2015.10.001
- Rajeswara, R., Rajput, D. & Patel, R. (2009). Essential oil profiles of different parts of palmarosa (*Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats. var. *motia* Burk.). *Journal of Essential Oil Research* 21(6), 519 –521.doi: 10.1080/10412905.2009.9700233
- Ramírez, D. (2017). Determinación de la concentración efectiva CE50 de dos plaguicidas comerciales con dimetoato como ingrediente sobre plántulas de lechuga (*Lactuca sativa* fam asteraceae) variedad “Batavia”. Tesis de pregrado. Universidad Santo Tomás.p.
- Ramos, D., Moromi, H. & Martinez, E. (2011). *Porphyromonas gingivalis*: patógeno predominante en la periodontitis crónica. *Odontol. Sanmarquina* 14(1),34-38. Doi: [10.15381/os.v14i1.2907](https://doi.org/10.15381/os.v14i1.2907)

- Restrepo, R., Reyes, D., Rojas, F., & Kouznetsov, V. (2012). Aberraciones cromosomales en bulbos de cebolla *Allium cepa* inducidas por moléculas híbridas 4-aminoquinolónicas. *Universitas Scientiarum* 17(3),253-261. Doi: [10.11144/javeriana.SC17-3.aceb](https://doi.org/10.11144/javeriana.SC17-3.aceb)
- Rodríguez, E. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*,7(1), 153-170.
- Sobrero, C & Ronco, A. (2008). *Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga Lactuca sativa L.* Consultado el 3 de septiembre de 2019, de la fuente <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/573/cap4.pdf>
- Stashenko, E., Moyano, G., Salazar, H., Quintanilla, R. & Martinez, J. (2012). Estudio comparativo de la composición de los aceites esenciales de cuatro especies del género *Cymbopogon* (Poaceae) cultivadas en Colombia. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 11(1), 77-85.
- Subramanian, P., Imanina, C., & Ahmad, Z. (2015). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* y *Cymbopogon nardus* contra *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Biosciences* 6(9), 9-17.
- Thoroski, J; Blank,G. & Biliaderis, C. (1989). Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection* 52(6), 399-403. Doi: [10.4315/0362-028X-52.6.399](https://doi.org/10.4315/0362-028X-52.6.399)
- Torres, E. (2015). *Relación huésped parásito: mecanismos de defensa del huésped*. Consultado el 27 de agosto de 2019, de la fuente <http://higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2015.pdf>
- Ultee, A., Bennink, M., Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 68(4), 1561-1568. Doi: [10.1128/AEM.68.4.1561-1568.2002](https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1561-1568.2002)

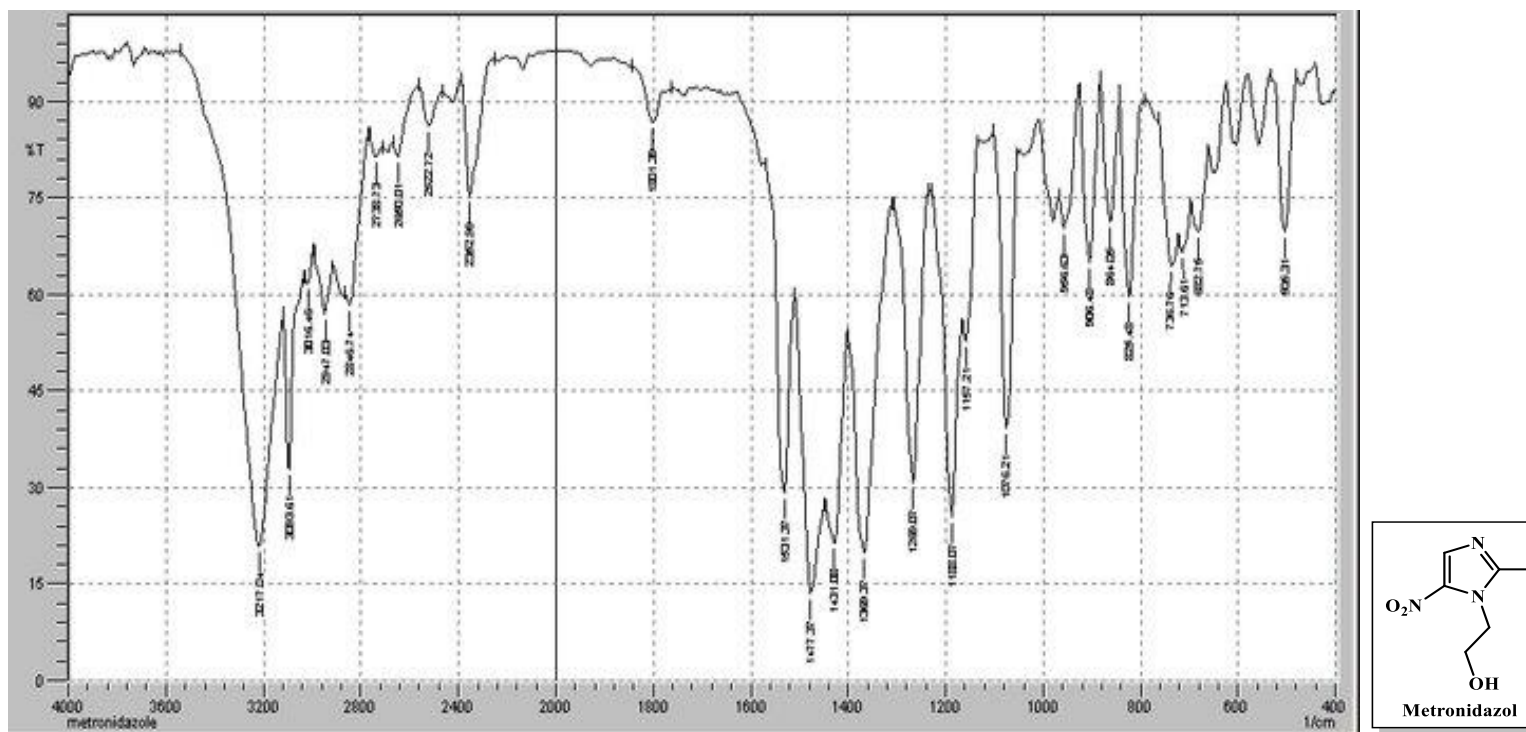
- Usano, J., Palá, J. & Diaz,S.(2014). Aceites esenciales: conceptos básicos y actividad antibacteriana. *Reduca Serie Botánica* 7(2),60-70.
- Walsh,S., Maillard,J., Russell,A., Catrenich,C., Charnonneaus,D. & Bartolo, R. (2003). Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram positive and negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 94(2), 240-247. Doi: [10.1046/j.1365-2672.2003.01825.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01825.x)
- Zambon, S., Chamorro, E., & Casuscelli, S. (2015). Estudio de la Pureza Óptica de Citronelal presente en los Aceites Esenciales obtenidos de Citronela y de Eucalipto Citriodora. *Revista Informacion Tecnologica* 26(4), 29-35. Doi: 10.4067/S0718-07642015000400005

Apéndices

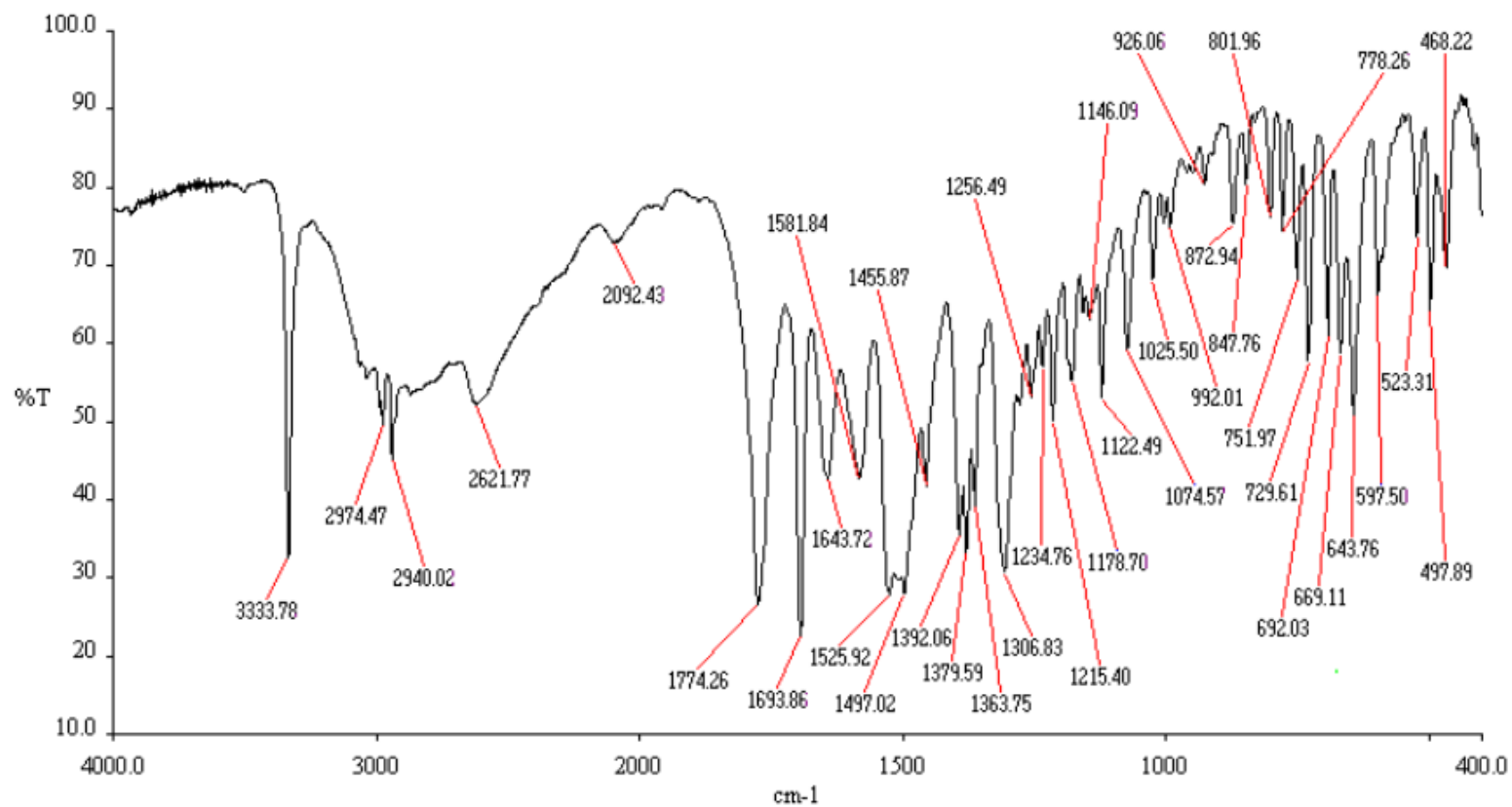
Apéndice A. Metodología para la determinación de la actividad antimicrobiana (CMI, CBM) y Toxicidad de los aceites esenciales.



Apéndice B. Espectro IR del metronidazol reportado por Sravini.



Apéndice C. Espectro IR de la ampicilina reportado por INAME.



Apéndice D. Datos experimentales en semillas de repollo y tomate del aceite esencial palmarosa

Ensayo semilla de repollo AE palmarosa							
Concentración		Bulbos de cebolla		Promedio embrion	Promedio raíz	Desviación embrion	Desviación raíz
		Embrion	Raíz				
1 ppm	1 ensayo	4.3-4.3-3.5-4.7-5.6-4	5.1-5-3-3.5-3.5-3-3.6	4.4	3.8	0.7	0.8
	2 ensayo	3-4-5-4- 3.6	4-4.8-4.3-3	3.9	4	0.7	0.7
	3 ensayo	2-2.5-2.3- 2.5	2.9-2.4-2.3-2.9-2.6	2.3	2.6	0.2	0.2
10 ppm	1 ensayo	5.5-5-4.5-4-4-4.7-6.5	3-4.3-4-3-2.6-4-4-4.5-2	4.8	3.4	0.8	0.8
	2 ensayo	2.5-2,1-2.5-2.3-3	1.8-3.2-3.4-2-3.8	2.4	2.8	0.3	0.8
	3 ensayo	3.1-3-2-2.1	2-3-2.1-2.3	2.5	2.3	0.5	0.4
100 ppm	1 ensayo	5.7-3.6-5-4-3.8	4-3-3.7-3-3-3.9-3-3.6	4.4	3.4	0.8	0.4
	2 ensayo	3.5-3.5-3.7-4.5-3.1-2.1-2-3.5-2	2.8-2.6-2.3-3-2.5-2.7-2.5	3.1	2.6	0.8	0.2
	3 ensayo	3.2-2-3.3-2.7-3-3.5	2.5-2.4-2-2-2.2-2.2-1.1	2.8	2	0.5	0.4
1000 ppm	1 ensayo	4-3-3.5	1.6-1.3-1.3	3.5	1.4	0.5	0.1
	2 ensayo	3-3-1.5-2-1	2.1-1.6-1.2-1.6	2.1	1.6	0.8	0.3
	3 ensayo	3.5-3.5-3	1.4-1.4-1.2	3.3	1.3	0.2	0.1
C+	1 ensayo	4.2-4.5-4.5-4-5-4-2.5-5.6-4	5-3.6-3.5-3.5-4.5-3.6	4.2	3.9	0.8	0.6
	2 ensayo	3.5-4.5-3.1-4.5-4.2-3.5	4-5-4.5-5.5-3.5	3.8	4.5	0.5	0.7
	3 ensayo	4.7-5-3.7-3.2	3-2.1-3-2.4-3.5-4	4.1	3	0.8	0.6
C-	1 ensayo	3.6- 4-3.1-3-4-4.2-3.5-4-3-4.5	3.6-4-3.2-3.5-2.7-3.6-3-2.8-3.6-3.5	3.6	3.5	0.5	0.7
	2 ensayo	4.7-4.2-3.2-5-3.9-3.1-4.1-3-4.7	2.7-3-2.3-4.7-3.8-3.2-2.6-3-4	3,9	3.3	0.7	0.5
	3 ensayo	4-4.1-3-2.1-3-3-3-6	3-4-3.2-3-4.2-2-3.5	3.2	3.2	0.6	0.7

Ensayo semilla de tomate AE palmarosa							
Concentración		Bulbos de cebolla		Promedio embrion	Promedio raiz	Desviación embrion	Desviación raiz
		Embrion	Raiz				
1 ppm	1 ensayo	5-4.5-4.5-4.4-4.3-4.2-4.3-4.1-5	5.3-3.2-2.7-3.2-4.4-4.6-3.6	4.3	3.8	0.5	0.8
	2 ensayo	4.5-4.2-5.5-4.5-5-4.6-4-4.5-3.4	4-3.8-4-3.6-3-2.8-4.3-2.4-2.3-2	4.4	3.2	0.6	0.8
	3 ensayo	3.2-3.5-4-2.6-2-2.6-4-2.8-4.4	4.2-4.5-4.8-5-4.3-4-4.5-3.6-5.3-3.6	3.2	4.3	0.7	0.5
10 ppm	1 ensayo	3.6-2.5-3.2-3.2-2.5-4-3-4-3.6-3-3	3-2.5-2.5-2-3-1.2	3.2	2.3	0.5	0.6
	2 ensayo	2-3-3-3-3.5-4-3-2.5-2-3-4.7	1.9-2-3-3.8-4-4.2-4.2-2.6-2.8-2-4	3	3.1	0.7	0.9
	3 ensayo	3.6-2.8-3-2-2.8-2-2.7-2-4.5-4	4-3.2-3.4-3.4-5-5.2-3.1	2.9	3.9	0.8	0.8
100 ppm	1 ensayo	3.2-3-2-2.2-2.3-2-1.6-2-2.5-1.7	3-2.1-2.3-3.2-2	2.2	2.5	0.5	0.5
	2 ensayo	1.7-2.7-2-3-4-2-3.5	3.6-3.5-3-3-3-2.3-2.7	2.7	3	0.8	0.4
	3 ensayo	3.4-3-3.2-2.8-2-3-2.2-3-2.3-2.5-2	3-4-3-3.8-3.2-3.1-3.2-3.8-3.6-3-3.5	2.6	3.3	0.4	0.3
1000 ppm	1 ensayo	1-1-1.3-1.7-1.5-1-3-1.5-1.2-1.4-2	1.2-1.5-2-2.2-1.2-1-2-1.3-1.6	1.5	1.5	0.5	0.4
	2 ensayo	2.2-1.5-1.6-0.7-0.5-0.5-1.5-2-0.6-1-1-0.7	1.3-1.2-1.5-1.2-1.4-2-1.2-2.7-2.5-2.5-1.9-2	1.1	1.7	0.6	0.5
	3 ensayo	2.2-1.5-1.6-0.7-0.5-0.5-1.5-2-0.6-1-1-0.7	2-1.5-1-3.5-1.4-2-2.5-1.5	1.1	1.9	0.6	0.7
C+	1 ensayo	2.5-3-3-3.5-3-4.7-4-3.5-3.5-2.5	1.6-1-1.3-2.1-3.5-1.7-3-1.3	3.3	1.9	0.6	0.8
	2 ensayo	3.6-3.7-3-3-3.5-3.8-3.2-4.5-2-3.2-3-3.5-3.5-3.5-3.2-1.7-1.8	5.5-5-5.5-3.5-5-4.8-3.8-4.6	3.1	4.7	0.7	0.7
	3 ensayo	3-3-2.2-3.5-4-3.5-4.5-5-2.7-3-4.6	6.2-5.2-6.4-5-6.2	3.5	5.8	0.8	0.6
C-	1 ensayo	4-5-4.7-5-4-5.5-4-4.2-4.2-3.6-3	3-3.5-3.2-3-3-3.4-1-3.4-2-3.1-3.5-3.4	4.3	2.9	0.7	0.7
	2 ensayo	4-4.4-4-3-3.5-3.5-4.5-4.2-5.5-4.5-5-5.7-4-4.5-4	3-3.6-2.6-5-4-2.9-3-3.6-3.5-3-3-4-3.6-5-3-2	4.2	3.4	0.7	0.8
	3 ensayo	4.8-4-5-4.5-4.8-4	2-2.7-4-3.5-2.4-2.9-4.1-2-3.7-3.2-3.7-4-2.7-4-3.4	4.5	3.2	0.4	0.7

Apéndice E. Datos experimentales en semillas de repollo y tomate del aceite esencial citronela

Ensayo semilla de repollo AE citronela							
Concentración		Bulbos de cebolla	Raíz	Promedio embrion	Promedio raíz	Desviación embrion	Desviación raíz
		Embrion					
1 ppm	1 ensayo	5-3.5-3-3.5-4-3.7-2.1	3.5-3.5-2-3-2	3.5	2.8	0.8	0.7
	2 ensayo	4.2-3-2.4-3.7-4.5-4.2	1.9-2.1-2-3.2	3.6	2.3	0.8	0.6
	3 ensayo	3.6-4.5-4-3	2-1.5-2-1.5-0.1	3.7	1.4	0.6	0.7
10 ppm	1 ensayo	3-2.5-2-2	1.5-1.5-1-1.5	2.3	1.3	0.4	0.2
	2 ensayo	4.1-5.9-4.3-5.5	2.5-4.2-3.8	4.9	3.5	0.8	0.8
	3 ensayo	4.5-3.7-4-4.5-4.5-4.7-2.8-5-4	4.1-3-3-2.8-2.9-5	4.1	3.4	0.6	0.8
100 ppm	1 ensayo	4.5-5.5-4.5-5-5.3	2.9-3.4-3-2	4.9	2.8	0.4	0.5
	2 ensayo	4.6-5.2-4-4.5-5.6	2.3-3.8-1.9-2.5-1.2-1.5-2.6-2.2	4.7	2.2	0.6	0.7
	3 ensayo	4-3.7-4.5-4.1-5.5	1.3-2-2.2-2.6-3.5	4.3	2.3	0.6	0.8
1000 ppm	1 ensayo	4-4-3.2	1.5-1-1.5-2-1.8	3.7	1.5	0.4	0.3
	2 ensayo	3.7-2.3-3.7-3.2-2	4.1-4.5-2.7-3.4-2.8	2.9	3.5	0.7	0.7
	3 ensayo	3.2-4.5-4.5-5.4-3.8	3-2.5-1-1.6-1.5	4.2	1.9	0.8	0.8
C+	1 ensayo	5-3.5-3-3.5-4-3.7	3.5-3.5-2-2-3-2.5	3.7	2.7	0.6	0.6
	2 ensayo	3.2-4.5-4.6-5.7-4-2.8-4.3-3.8	2.2-3-3.1-4-4-4.3	4.1	3.4	0.8	0.8
	3 ensayo	4.5-4-4-4.5-5.4-4	2-4-2-3-2-3-2	4.4	2.5	0.5	0.7
C-	1 ensayo	3-4.4-2.9-4.5	2-2-1.1-1.5	3.7	1.6	0.8	0.4
	2 ensayo	3-4-3.4-2.1-4-4.2-4.4-3.3-2	2.7-3.5-3.8-2.9-2.9-2.8-1.5	3.3	2.8	0.8	0.7
	3 ensayo	3.6-3-3.6-3.5-3.6-2.2-2.5-4.3	2-2.6-3-4-4.2-2.6-2.5-3.2	3.2	3	0.6	0.7

Ensayo semilla de tomate AE citronela							
Concentración		Bulbos de cebolla		Promedio embrion	Promedio raiz	Desviación embrion	Desviación raiz
		Embrion	Raiz				
1 ppm	1 ensayo	4.5-3.5-6-4.5-4-3.5-4.5-4.6-4.7-3.5-5.1	4-4-4-3.5-3.1-4-3.2-2-2.5-3	4.4	3.3	0.7	0.7
	2 ensayo	3.4-3.2-3.5-3.2-5.3-4	3-4-3-3	3.7	3.2	0.8	0.5
	3 ensayo	5-5-6.5-4.5-3.7-4.2-5-3.5-4.2-3.4-3.6-4.7	3.1-3.5-4-4.8-4.5	4.4	3.9	0.8	0.6
10 ppm	1 ensayo	4.5-4.5-3.7-4.5-3-5-4-2.5-5.1-4.2-3.2-3.2-3.2-2.3	2.2-2.3-4.2-4-3.8-3-2.8-2.9-2	3.7	3	0.8	0.8
	2 ensayo	5-4.1-3.7-4.8-5.8-4.7-3.3-4.4-4-4.5	5-5.3-4.4-4.2-3-4.6-5.5-4	4.4	4.5	0.7	0.8
	3 ensayo	5.5-5-5.5-3.6-5-4.5-4-3.5-3.5	3.4-2.6-4-3.6-3.3	4.4	3.5	0.8	0.8
100 ppm	1 ensayo	5-3.8-5-5-4.3-1.5-4-4-4.5-4.5-2.9-4.2-3.5-3.2-4-4-4-4	2.5-2-3.4-1.2-1.7-2-3-1.5-3.5-2.5-3.2-3.9-3.3-3.6-1.7	3.9	2.6	0.8	0.8
	2 ensayo	3.7-3-2-3	3.5-4-3.9-3.5-2.5	2.9	3.4	0.6	0.5
	3 ensayo	2.1-3.5-4.6-2.6-3.5-2.5-3.2	3-3-3-3-3.5-5-4.5-3	3.1	3.5	0.8	0.8
1000 ppm	1 ensayo	1-4-3-2.3-3.5-3.3-2.7-2-3.2-4.5-2-3.2-3.2-3.5	0.4-0.8-0.7-1.2-1.7-3.2-2-1-0.6-0.3-0.5	2.9	1.1	0.8	0.8
	2 ensayo	1.4-1.5-2.5-0.8-1.5-1.5-1-2.3-0.5-3.3-2	1.9-1.5-1-1.5-1.6-1-1-2.6-1-1.8-1	1.6	1.4	0.8	0.5
	3 ensayo	0.7-2.3-2-2-2.2-2.5-2.8-2.7-2.5	1.8-1.7-1.8-1.5-1.7-1.9-1.4-1.3-1.2	2.1	1.5	0.6	0.2
C+	1 ensayo	4-5.5-4.5-5-6-5.5-4-3.5-4.5-4.5-6-3.7-4-4.2	3-4-4-4.5-2.5-2.5-4.5-4-4.5	4.6	3.7	0.8	0.8
	2 ensayo	3.7-3.5-4	2.2-2.3-2.3	3.7	2.2	0.2	0.05
	3 ensayo	4.5-3.6-3.2-5.2-4.6-4.5-5.2-4.5-3.2-4-4.7-3.6	4.2-4.8-5-3.7-5-5	4.2	4.6	0.7	0.5
C-	1 ensayo	4.5-4-3.6-3-4.1-4.5-4-2-3.6	1-0.8-0.2-0.1-0.2-0.2-0.1-0.5-0.8-0.5-0.2-1-1.2-0.5-0.2-0.2	3.7	0.3	0.7	0.4
	2 ensayo	4-3.5-4.3-4.7-5.7-3-4-3.7	4.3-2.4-3.2-2.7-2.9-4.7-3.5-3.2-3.3-2.5	4	3.2	0.9	0.7
	3 ensayo	4.5-4.5-5.5-3.5-4-4.3-5-5-6.5-4	6.5-4.1-6-5.5-6.5-6.9-5.5-6.2	4.6	5.9	0.8	0.8

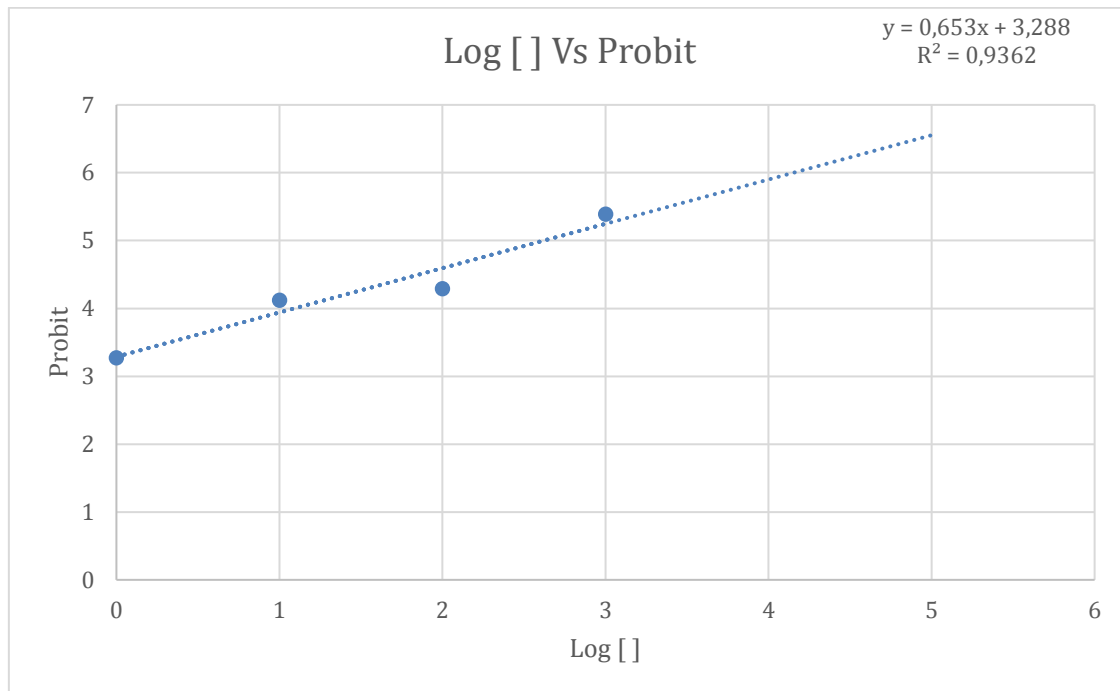
Apéndice F. Datos experimentales en *Allium cepa* del aceite esencial citronela

<i>Allium cepa</i> citronela				
Concentración		Longitud de raíces	Promedio	Desviación
1 ppm	1 ensayo	3-4-4.5-3.5-2.5-3.5	3.5	0.6
	2 ensayo	4. 6-4. 5-4.4-1. 5-4.1-4.7-4-4-5-3. 6-2. 5-5-5-2. 5-3. 5-3. 5-3. 5-3	3.9	0.9
	3 ensayo	3-3-3.5-3-4-7-5-4-7-5-2-3.5-4-4-2. 5	3.8	0.8
10 ppm	1 ensayo	2.5-3.7-2.8-2.8-2.8-3-2.7-3.8-3.8-3.8-3.5-3.5-3.7-3.4	3.2	0.4
	2 ensayo	4,5-3,9-4,4-2,5-2,7-2,9-2,6-4-2,5-5-4,7-4-3,5	3.7	0.8
	3 ensayo	4-2.5-4.5-2.5-2.6	3.2	0.9
100 ppm	1 ensayo	2.5-3.2-2.8-2.5-3-2.7-3.2-2.8-3-3.5-4-3.2-3.5	3	0.4
	2 ensayo	4.5-4-3.7-3.5-3.3-4-3-3	3.6	0.5
	3 ensayo	2.6-4-3-2.5-3-5-2	2.5	0.6
1000 ppm	1 ensayo	0.5-0.6-0.7	0.6	0.1
	2 ensayo	0.5-1-0.2-0.4-1	0.6	0.3
	3 ensayo	0.4-0.5-0.2-0.5	0.4	0.1
Control	1 ensayo	3.2-3-3.2-2.6-2.8	2.9	0.2
	2 ensayo	1.9-3-1.7-2.1-2-2-1.7-3.5	2	0.7
	3 ensayo	2.2-0.-2	1.5	0.5

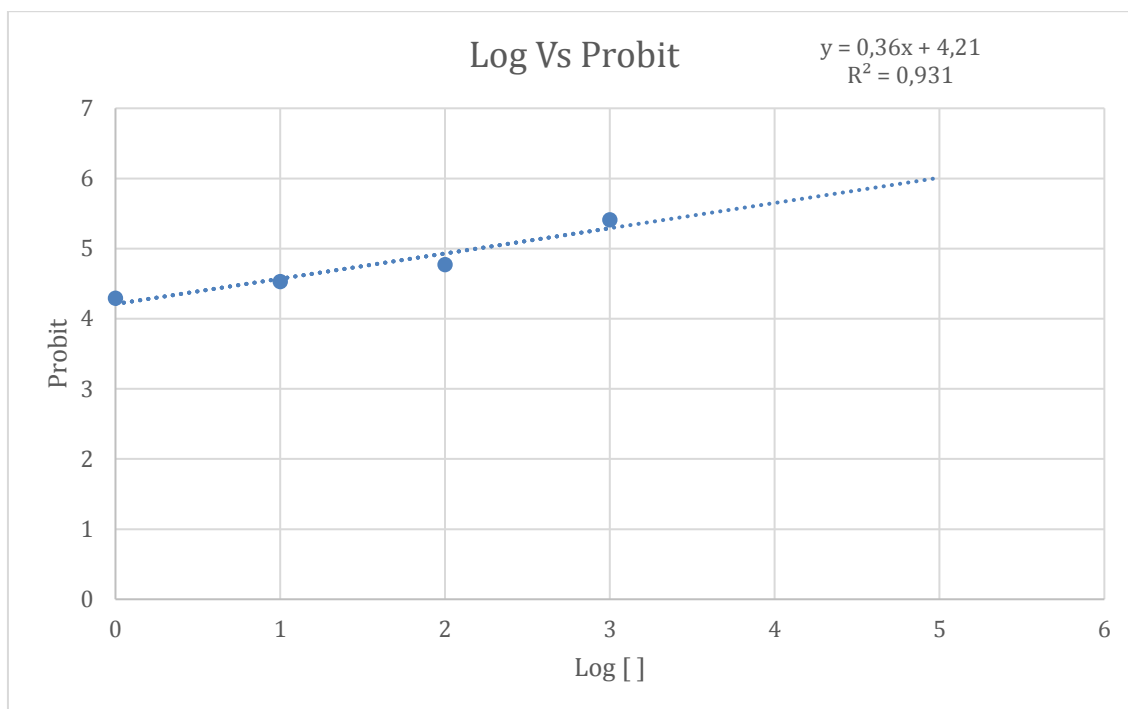
Apéndice G. Datos experimentales de *Allium cepa* del aceite esencial palmarosa

<i>Allium cepa</i> palmarosa				
Concentración		Longitud de raíces	Promedio	Desviación
1 ppm	1 ensayo	4.6-3-3.4-2.6-2.7-2.9-2.9-3.5-2	3	0.7
	2 ensayo	4-3-3-3-5-3	3.5	0.8
	3 ensayo	1-2.5-1.8-2-1.5-1.8-1-1.5-1.7	1.6	0.4
10 ppm	1 ensayo	2-1-0.3-0.7-2.5-2.5-1.5-2.1-1	1.5	0.8
	2 ensayo	2.7-2.7-4.2-3.1-3.6	3.2	0.6
	3 ensayo	1.2-2.2-2.1-2.3-0.7-1.2-1.8-1.2-1.7-1-0.7-2.4-2.3-2.4-2.7-2.5-0.7	1.7	0.7
100 ppm	1 ensayo	0.8-2-0.5-1.5-0.5-1.5-2.5-1.5-1.9-0.2-1.5-1.2-1.6-2.2-1.8-0.2-1.6	1.3	0.6
	2 ensayo	1.5-1.2-2-0.2-1-2.5-1.2-2-2-1.5-2.5-2-1.3-1.3-1.1-0.4-2-2.2-1.6	1.5	0.5
	3 ensayo	1.5-3.6-0.7-1.6-2-0.2-2-2-1-1.8-1.8-1-2.2-1-1.6-1.6-2-1.6	1.6	0.7
1000 ppm	1 ensayo	0.6-0.3-0.4-0.2-0.6-0.6-0.5-0.2	0.4	0.1
	2 ensayo	0.6-0.5-0.4-0.2-0.3-0.9-0.9-0.6-0.3-0.5	0.5	0.2
	3 ensayo	0.5-0.4-0.1-0.7-0.4-0.7-1-0.8-0.5-0.7-0.4-0.4	0.5	0.2
Control	1 ensayo	0.5-1.3-1.6-2-0.6-1.9-1.1-0.7-2-2	1.3	0.6
	2 ensayo	3.2-4-3-2.5-3.2	2.6	0.5
	3 ensayo	1-0.5-0.5-0.2-0.2-1.3-1.7-2-1.9-2.2	1.1	0.7

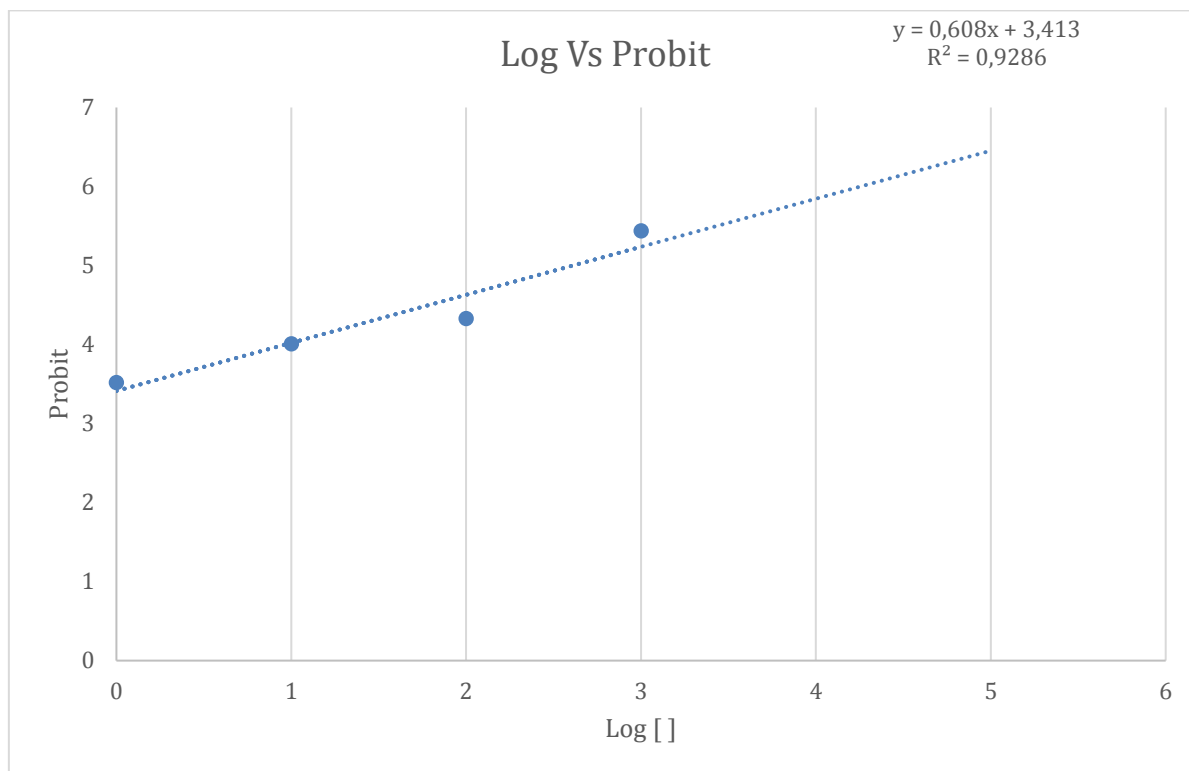
Apéndice H. Curva Dosis - Respuesta del AE *C.nardus* frente a semillas de Tomate para la raíz.



Apéndice I . Curva Dosis - Respuesta del AE *C.martinii* frente a semillas de Tomate para la raíz.



Apéndice J. Curva Dosis- Respuesta del AE *C.martinii* frente a semillas de tomate para el embrión.



Apéndice K. Curva Dosis- Respuesta del AE *C.martinii* frente a semillas de repollo para el la raíz.

