

Caracterización fitoquímica del cedrón (*Aloysia citrodora* Paláu, Verbenáceas) en Argentina para su normalización

Farm. Paola Di Leo Lira

Director: Prof. Dr. Arnaldo L. Bandoni

Directora adjunta: Prof. Dra. Catalina M. van Baren



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Cátedra de Farmacognosia

Tesis para optar al título de Doctor de la

Universidad de Buenos Aires

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer al Dr. Coussio, quien me permitió formar parte del IQUIMEFA, hace ya muchos años, y me incentivó a ser Farmacéutica.

Al Dr. Bandoni por haberme guiado, con mucha paciencia y dedicación, en este largo camino y por transmitirme su amor por Farmacognosia.

A la Dra. van Baren por confiar en mí. Por brindarme su apoyo y alentarme siempre. Por tantos momentos compartidos.

A la Dra. Martino y a la Dra. Broussalis por el aliento y el apoyo recibido para la realización de esta tesis.

A la Dra. Daiana Retta por sus charlas, su colaboración, por compartir nuestras vivencias todos los días y por su invaluable apoyo.

A la Dra. Valeria Moscatelli por contar siempre con su ayuda, por su apoyo sincero e incondicional y por sus palabras de aliento.

A la Dra. Valeria Sülsen por todos los momentos compartidos, tanto laborales como personales.

A la Dra. Flavia Redko, por su buena predisposición, por su tiempo y por su desinteresada y valiosa colaboración al final de este camino.

A Rita Lemos por su colaboración en el análisis de las muestras por HPLC y por tantos momentos compartidos.

A Valeria Confessore y María Elena Cincallegro por toda la colaboración que me brindaron a lo largo de todos estos años.

A las Dras. Paula López y Rosario Alonso, por responder mis consultas de HPLC y por aquellas tardes compartidas en el comienzo de nuestras vidas académicas.

A Sara Flores, por sus consejos y por tantos momentos compartidos.

A todos y cada uno de mis compañeros de Farmacognosia con los que comparto muy lindos momentos todos los días.

A Zulema Gonzalez, Juan Carlos Toledo, Andrea Zalazar y Laura Silva por ocuparse de que todo esté en condiciones en nuestro lugar de trabajo.

Al CONICET por facilitarme la infraestructura necesaria para la realización de este trabajo.

A la Universidad de Buenos Aires por el financiamiento de gran parte de los trabajos realizados.

A la Mg. Alejandra Gil por su asesoramiento en los ensayos de cultivo realizados en la Facultad de Agronomía (UBA) y por la provisión y herborización del material vegetal.

A la Dra. Carmen Viturro por su colaboración en parte de este trabajo y por sus palabras de aliento.

Al Dr. Cesar Catalán por su colaboración en la realización en una parte de este trabajo y por la identificación de la sabinona.

A las Dras. Martha y Susana Gattuso, por el envío y la herborización del material vegetal, y por el aporte de la descripción microscópica del cedrón.

Al técnico Miguel Juárez y al Ing. Agr. Miguel Elechosa porque me facilitaron una gran cantidad de aceites esenciales y de material vegetal para poder realizar este trabajo.

Al Ing. Agr. Otto Brutti y a la Ing. Agr. Graciela Farías por su colaboración en una parte de este trabajo y por sus aportes sobre los descriptores morfológicos de cedrón.

A los Ing. Agr. Simón López y a la Ing. Agr. Maricel Bálsamo, del INTA, por las muestras de material vegetal enviadas para la realización de este trabajo.

Por otra parte quería dedicar este trabajo de tesis a toda mi familia, en especial a mis padres, Lili y Armando, por brindarme siempre su apoyo, por darme la libertad de elegir y ser quien soy, y por ser un ejemplo a seguir.

A mi marido, Luis, por su amor y su comprensión. Por brindarme siempre su apoyo incondicional y acompañarme en todo momento.

A mi hija Violeta, por ser la luz y la razón de mi vida.

A Hilda, mi suegra, porque me hubiera gustado compartir este momento con ella.

Y a todos los que de alguna u otra manera colaboraron con este trabajo.

Muchas gracias.

A Lili y Armando

A Luis

A Violeta

Publicaciones relacionadas:

En revistas:

“Northwestern of Argentina: a center of genetic diversity of Lemon verbena (*Aloysia citriodora* Paláu, Verbenaceae)”. Di Leo Lira, P., van Baren, C., López, S., Molina, A., Heit, C., Viturro, C., de Lampasona, M., Catalán, C., Bandoni, A. (2013). *Chemistry and Biodiversity* 10 (2), 251-261. ISSN 1612-1872.

“Characterization of Lemon verbena (*Aloysia citriodora* Palau) from Argentine by the Essential Oil”. Di Leo Lira, P., van Baren, C.M., Retta, D., Gil, A., Gattuso, M., Gattuso, S., Bandoni, A.L. (2008). *Journal of Essential Oil Research* 20, 350-353. ISSN: 1041-2905.

“Identification of the Genotype from Contents and Composition of the Essential Oil of Lemon verbena (*Aloysia citriodora* Palau)”. Gil, A., van Baren, C.M., Di Leo Lira, P.M., Bandoni, A.L. (2007). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 8664-8669 ISSN: 0021-8561.

Capítulos de libros:

Capítulo: Cedrón (*Aloysia citriodora* L.). Gil, A., Morvillo, C., Bandoni, A., van Baren, C., Di Leo Lira, P. En: *Cultivos Industriales, Sección 5: Medicinales*. de la Fuente, E., Gil, A., Giménez, P., Kantolic, A., López Pereira, M., Ploschuk, E., Sorlino, D., Vilariño, P., Windauer, L. (Eds.). Editorial Facultad de Agronomía de la UBA (2006). ISBN: 950-29-0954-2.

Monografías Farmacopeicas

Monografía de Cedrón. *Farmacopea Argentina VII Edición*. 2003. Anmat (no oficial).

Presentaciones a Congresos:

- XXII Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina. Puntarenas, Costa Rica, 2 al 6 de septiembre de 2013.

“Normalización del cedrón para su utilización medicinal en la Argentina”. Di Leo Lira P., Retta, D., van Baren, C., Bandoni, A. Revista Clínica UCR-HSJD de la Escuela de Medicina de la Universidad de Costa Rica, vol 3, N°11. ISSN: 2215-2741.

- XXXIV Jornadas Nacionales de Botánica. La Plata, 2-6 de septiembre de 2013.
“Diversidad química en una población de *Aloysia citriodora* Palau en Chilcayo, Jujuy”. Juárez M. A., Viturro C. I., Di Leo Lira P., van Baren C., Molina A. C., Elechosa M. A., Martínez A.J., Bandoni A.L. Bol. Soc. Argent. Bot. 48 (Supl.) 2013: 201. ISSN 0373-580X.

- VI SBOE-SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, Campinas, San Pablo, Brasil, 9 al 11 de noviembre de 2011.

“Genotipificación de accesiones de *Aloysia citriodora* Palau presentes en un banco de Germoplasma mediante la técnica de DNA fingerprinting por RAPD”. de Pino, V., Di Leo Lira, P., Farías, G., Brutti, O., Moreno S., Bandoni, A., van Baren, C.

- XXXIV Congreso Argentino de Horticultura, Buenos Aires, del 27 al 29 de septiembre de 2011.

“Variación de la composición química (aceite esencial y verbascósido) de *Aloysia citriodora* Palau (cedrón) a lo largo del año cultivada en la provincia de Misiones”. Di Leo Lira, P., Bálsamo, M., van Baren, C., Fit, M., Bandoni, A.L.

- II Jornadas Nacionales de Plantas Aromáticas Nativas y sus Aceites Esenciales, 9 y 10 de diciembre de 2010, Jardín Botánico Arturo E. Ragonese, Instituto de Recursos Biológicos - Inta, Castelar.

“Descriptor de Caracterización de Clones de “cedrón” *Aloysia citriodora* (Verbenáceas) del Banco de Germoplasma del Litoral Argentino”. Farías, G., Di Leo Lira, P., Brutti, O., Grau, R., van Baren, C., Bandoni, A.L.

- 58th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research. Berlin, Alemania, del 29 de agosto al 2 de septiembre de 2010.

“Phytochemical variability of populations of *Aloysia citriodora* from Argentina”. Di Leo Lira P., Retta, D., van Baren, C., Gorzalczany, S., Bandoni, A.

- XV Congreso Italo-latinoamericano de Etnomedicina. La Plata, Argentina, del 4 al 7 de septiembre de 2007.

“Actividad a nivel del tracto gastrointestinal de la infusión liofilizada de cedrón (*Aloysia citriodora* Palau)”. Gorzalczany, S., Di Leo Lira, P., van Baren, C., Acevedo, C., Bandoni, A.

- V Reunión de La Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica, I Congreso de Fitoterápicos del Mercosur. Montevideo, Uruguay, del 28 de noviembre al 2 de diciembre del 2005.

"Contribución a la Normalización Farmacopeica del Cedrón en Argentina". C.M. van Baren, P. Di Leo Lira, A.L. Bandoni.

- II Reunión Binacional de Ecología. Mendoza, Argentina, del 31 de octubre al 5 de noviembre del 2004.

"Elección de genotipos en *Aloysia citriodora*: interacción genotipo-ambiente". Abate, G., Gil, A., Di Leo Lira, P., van Baren, C., Bandoni, A., Suarez, S., Viturro, C., Brutti, O.

- II Simposio Brasileiro De Oleos Essenciais. Campinas, San Pablo, Brasil, del 3 al 5 de noviembre de 2003.

“*Aloysia citriodora*: presencia de quimiotipos en ejemplares provenientes de Argentina y Chile”. Di Leo Lira, P., van Baren, C., Gil, A., Bandoni, A.L.

- III World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare (WOCMAP III), Thailand, del 3 al 7 de febrero de 2003.

“Biomass and Essential Oil Yield and Composition in *Aloysia triphylla* from Argentina and Chile”. Gil, A., Conde, C., Brutti, O., di Fabio, A., Di Leo Lira, P., van Baren, C.M., Bandoni, A.L.

Resumen

El cedrón (*Aloysia citrodora*) es la especie aromática nativa más difundida en el mundo. Actualmente su comercialización se provee de cultivos existentes en varios países, como Marruecos, Portugal, Francia, Vietnam, Paraguay y Chile. En los últimos años han surgido varias normas de calidad para el cedrón, justamente como una necesidad debida a esta expansión. Es una de las plantas medicinales y aromáticas de mayor venta en la herboristería local. Existe, además, una creciente demanda para otras aplicaciones industriales además del uso medicinal, como la elaboración de mezclas para infusiones, bebidas a base de hierbas, aguas saborizadas, licores, productos cosméticos, fragancias y en aromaterapia, entre otras.

La fracción volátil es una de las características más destacadas del cedrón. El principal componente de su aceite esencial (AE) es el citral (mezcla de neral y geranial), que, junto con el limoneno, son los responsables del olor característico de esta especie aromática.

Sin embargo, y desde el punto de vista de su uso como medicinal, también es importante su fracción no volátil, ya que la misma se encuentra fuertemente relacionada con los usos medicinales tradicionales atribuidos a esta droga vegetal y con actividades biológicas demostradas. El verbascósido, un glicósido perteneciente a la familia de los fenilpropanoides, ha sido determinado como uno de los compuestos característicos de esta fracción, que sería además el principal responsable de sus distintas bioactividades.

Por este motivo se investigó tanto la fracción volátil como la fracción no volátil (verbascósido) del cedrón de la Argentina.

Este trabajo fue diseñado y desarrollado en 6 ensayos con diferentes características:

Evaluación de la variabilidad del aceite esencial de cedrón bajo las mismas condiciones de cultivo; Determinación de marcadores de calidad para un aceite esencial de cedrón típico; Evaluación química de los metabolitos de mayor interés en cedrón a lo largo de un ciclo de cultivo en la Estación Experimental Agropecuaria INTA Cerro Azul, provincia de Misiones, zona potencialmente productora; Análisis de los metabolitos de mayor interés en muestras de cedrón de un Banco de

Germoplasma, situado en la provincia de Entre Ríos; Evaluación de la calidad de distintos materiales de cedrón cultivados en la Estación Experimental Agropecuaria INTA Cerrillos, en la provincia de Salta; Evaluación química de poblaciones silvestres recolectadas en el noroeste argentino (NOA).

- Se determinó en total **el contenido de AE en 135 muestras** provenientes de muy diversos orígenes, y de materiales cultivados y silvestres o muestras comerciales del mercado local.

- Se determinó la **composición química** por cromatografía de gases acoplado a detector de masas (GC-MS) de las **135 muestras de AEC**.

- El **análisis** de los resultados obtenidos mediante el uso de diferentes métodos **estadísticos multivariados**, permitió establecer la existencia de diferentes **quimiotipos**:

1) AE con altos contenidos de limoneno y citral, perfil típico descrito para cedrón, siendo el más utilizado en todo el mundo.

2) AE con alto contenido de limoneno, siendo posiblemente una variedad primigenia del anterior, desde el punto de vista biosintético.

3) AE con alto contenido de linalol, quimiotipo que ha sido detectado por primera vez en el cedrón.

4) AE con alto contenido de carvona y derivados (cis y trans-dihidrocarvona).

5) AE con alto contenido de tuyonas (α + β -tuyona).

6) AE con alto contenido de citronelal.

- En función de la composición química típica del AEC, se establecieron los **marcadores positivos y negativos y sus rangos de aceptación** para ser incluidos en una norma de calidad:

Marcadores positivos: limoneno 5-30%, neral 14-27%, geranial 17-36%, ar-curcumeno mayor a 1%. Marcadores negativos: 1,8-cineol menor a 1%, 6-metil-5-hepten-2-ona menor a 3.5%, citronelal menor a 0.5%, α -tuyona + β -tuyona menor a 0.5%.

- Se **identificó por primera vez** en un aceite esencial la presencia del compuesto **sabinona**, cetona terpénica que había sido propuesta teóricamente como intermediaria en la biosíntesis de las tuyonas, pero nunca había sido aislada, solamente sintetizada.
- Se contribuyó a la **caracterización química** de los materiales de cedrón depositados en el **Banco de Germoplasma de la provincia de Entre Ríos** con la finalidad de conocer su rendimiento y composición de AE y contenido de verbascósido.
- Se determinó la **variación cualitativa y cuantitativa** de los principios activos en un **cultivo en la provincia de Misiones**. Este ensayo fue realizado a lo largo de **un año**. El AE presentó un perfil típico. Teniendo en cuenta el contenido de AE y el de verbascósido, se justificaría la colecta en los meses de diciembre-enero ya que ambos resultados fueron óptimos en ese período.
- Se determinó el **contenido de verbascósido por HPLC** según Farmacopea Europea 8.0 en 52 muestras de hojas de cedrón, dando como resultado promedio 2.1% P/P. Estos valores representativos del cedrón en la Argentina podrían ser incorporados en una monografía farmacopeica para su uso medicinal.

El desarrollo de este trabajo de tesis permitió conocer la variabilidad fitoquímica del cedrón en poblaciones silvestres y cultivadas en la Argentina y establecer parámetros fitoquímicos de calidad para sus diferentes usos. Con esta información se espera contribuir con la redacción de normas de calidad para el cedrón argentino. La normalización del cedrón contribuirá, por un lado, a optimizar la elección del material genético para su cultivo y, en consecuencia, contribuir a un buen manejo agrícola y a competir con la oferta de otros países.

INDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
2	ANTECEDENTES	6
2.1	Antecedentes de la familia	6
2.2	Antecedentes del género	9
2.3	Antecedentes de <i>Aloysia citrodora</i>	11
2.3.1	Generalidades	11
2.3.2	Composición química de la fracción volátil	17
2.3.3	Bioactividades de la fracción volátil	34
2.3.4	Composición química de la fracción no volátil	52
2.3.5	Bioactividades de la fracción no volátil	63
2.3.6	Aspectos regulatorios	70
3	OBJETIVOS	74
3.1	Objetivos generales.....	74
3.2	Objetivos específicos	74
4	PARTE EXPERIMENTAL.....	77
4.1	Solventes y reactivos	77
4.2	Material Vegetal	77
4.3	Obtención y análisis del aceite esencial.....	87
4.4	Obtención y análisis de verbascósido	92
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	94
6	CONCLUSIONES	149
7	BIBLIOGRAFIA	160



Aloysia citriodora (Lam.) Ortega ex Pers. [as *Verbena triphylla* L'Hérit.]
Collection des vélins du Muséum National d'Histoire Naturelle, vol. 19: t. 16 (c.1782?) [G.
van Spaendonck]
http://plantillustrations.org/ILLUSTRATIONS_thumbnails/258968.jpg

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años, el consumo de plantas aromáticas y medicinales ha aumentado notablemente debido no solo a la mayor demanda por parte de la población por consumir productos naturales, sino también porque a nivel industrial se buscan nuevas materias primas para la producción de medicamentos herbarios, suplementos dietarios, sabores, cosméticos, perfumería y productos para la higiene personal (Cañigüeral *et al.*, 2003). La producción de plantas aromáticas y medicinales en la Argentina proviene en gran medida de la recolección de plantas silvestres, aunque para ciertas especies de mayor consumo existen cultivos controlados.

El cedrón (*Aloysia citrodora* Paláu, Verbenáceas) es una de las plantas medicinales y aromáticas con mayor demanda en la herboristería local de la Argentina (Chifa y Ricciardi, 2001). Existe, además, una creciente demanda para otras aplicaciones industriales además del uso medicinal, como la elaboración de mezclas para infusiones, bebidas a base de hierbas, aguas saborizadas, licores, productos cosméticos, fragancias y en aromaterapia, entre otras. Esto ha originado una mayor oferta de cedrón en el mercado local, no solo para uso interno sino también para la exportación, lo que ha influido en la decisión de realizar cultivos en nuestro país, en forma esporádica y en escala limitada. Por motivos tanto de calidad como de costos de producción, no se afianzaron ni se expandieron, a diferencia de lo que puede observarse que ocurrió en otros países.

Algunos autores (da Silva *et al.*, 2006) han mencionado que la Argentina podría ser la región donde posiblemente se hubiera originado esta especie, lo que permitiría suponer que exista una gran diversidad fitoquímica en las poblaciones silvestres. Ya sea por este motivo o por la alta biodiversidad intraespecífica que presentan las plantas aromáticas, sería lógico esperar la aparición en el mercado local de materiales de diversa calidad, en concomitancia con la fuerte demanda.

La fracción volátil es una de las características más destacadas del cedrón. El principal componente del aceite esencial (AE) es el citral (mezcla de neral y geranial). Se conocen en el mercado local variedades de cedrón conteniendo otros compuestos mayoritarios distintos al citral y otras con morfología foliar distinta a la

típica. Como es sabido, los materiales vegetales pueden presentar un alto grado de variabilidad genética y, por lo tanto, también presentan variaciones en la composición química, en el contenido de principios activos y en la morfología, que dificultan su correcta identificación. La abundancia de publicaciones sobre el cedrón que abordan diferentes aspectos demuestra la importancia de esta especie a nivel mundial. Existen numerosos antecedentes acerca de la variabilidad de la composición química del aceite esencial de cedrón (AEC) ya sea en muestras de origen nacional (Zygadlo *et al.*, 1994; López *et al.*, 2004; Duschatzky *et al.*, 2004; Duschatzky *et al.*, 2005; Gillij *et al.*, 2008; Benzi *et al.*, 2009; Oliva *et al.*, 2010; Werdin González *et al.*, 2010; Ricciardi *et al.*, 2011) como en muestras provenientes de otros orígenes geográficos (Carnat *et al.*, 1999; Stashenko *et al.*, 2003; de Figueiredo *et al.*, 2004; Sartoratto *et al.*, 2004; Diaz *et al.*, 2007; Olivero-Verbel *et al.*, 2009; Escobar *et al.*, 2010; Ocazonez *et al.*, 2010; Oliva *et al.*, 2010; Rojas *et al.*, 2010; Paulus *et al.*, 2013). En algunos de estos trabajos se informa la presencia de compuestos con actividad neurotóxica, como las tuyonas, que han motivado el rechazo de los materiales comerciales por el mercado europeo.

Las hojas de cedrón fueron incluidas como droga vegetal en la Farmacopea Nacional Argentina V edición en el año 1966 y se mantuvo en la VI edición de 1978. Los ensayos de calidad allí codificados solo hacen referencia a su identificación botánica macroscópica. Asimismo, en el año 2008, la monografía de cedrón fue incluida en la Farmacopea Europea 6.0, en donde, además de indicar los ensayos de identificación botánica y el perfil cromatográfico por cromatografía en capa delgada (CCD) utiliza como parámetro de calidad la determinación del contenido de verbascósido por HPLC, por ser considerado un componente marcador activo de la fracción no volátil en esta especie. En cuanto a la fracción volátil solo exige la determinación del contenido de aceite esencial, el que debe ser mayor al 0.3% V/P para la droga entera y 0.2% V/P para la droga fragmentada. No hace mención a la composición química del mismo. Actualmente, en la versión 8.0 (2016), permanece vigente la misma monografía.

Consideramos que es importante la caracterización de ambas fracciones ya que tanto la fracción volátil como la no volátil son de interés comercial. Por este motivo planteamos la importancia de realizar estudios de materiales silvestres y de cultivo

que se encuentran distribuidos en la Argentina para poder caracterizar fitoquímicamente las fracciones de interés medicinal y comercial del cedrón, con el objetivo final de abordar la redacción de normas que garanticen tanto la calidad del cedrón nacional, como su competitividad a nivel internacional, teniendo en cuenta las normas ya existentes en otros mercados. Esta problemática dio origen a la investigación que dio como resultado final este trabajo de tesis.

Finalmente, los resultados obtenidos pretenden ser transferidos al sector productivo para orientarlos en la selección de los materiales a cultivar.



Lectotipo de *Aloysia citrodora* Paláu (1784)

En el año **1784**, Paláu realizó nuevamente la descripción de esta especie en una obra en colaboración con Ortega, donde incluyó un dibujo de excelente calidad, (realizado por el famoso dibujante Bruno Salvador y Carmona), actualmente tomado como lectotipo de la especie y aceptado como válido según las normas de la última versión del Código Internacional de Taxonomía Botánica.

ANTECEDENTES

2 ANTECEDENTES

2.1 Antecedentes de la familia

Verbenáceas es una familia cosmopolita que se distribuye principalmente en las regiones tropicales del hemisferio sur (Figura 1). Tradicionalmente esta familia está subdividida en dos subfamilias: Verbenoideae y Viticoideae (Troncoso, 1974). En el mundo comprende alrededor de 100 géneros y 2.000 especies de árboles, arbustos y hierbas. Está siendo evaluado si la familia Verbenáceas se reduce estrictamente a la subfamilia Verbenoideae, mientras que los géneros de la subfamilia Viticoideae pasarían a formar parte de la familia Lamiáceas (Múlgura de Romero *et al.*, 2003).



Figura 1. Distribución mundial de la familia Verbenáceas (Heywood, 1985)

Algunos géneros y especies de Verbenáceas se cultivan con fines ornamentales, como *Lantana*, *Glandularia*, *Clerodendum* y *Verbena*, cuyas plantas son herbáceas y presentan flores decorativas. En otros países se cultiva *Tectona grandis* para la utilización de su madera. Varias especies de los géneros *Aloysia*, *Lippia*, *Verbena* y *Acantholippia* se emplean y cultivan con fines medicinales (Fester *et al.*, 1961; Toursarkissian, 1980; Ratera y Ratera, 1980; Calvo, 2006).

La familia Verbenaceas se caracteriza por la presencia de aceites esenciales (Soler *et al.*, 1986; Terblanché y Kornelius, 1996; Ghisalberti, 2000; Pascual *et al.*, 2001; da Silva *et al.*, 2006; Hennebelle *et al.*, 2008), aunque también se aislaron

saponinas (Toyota *et al.*, 1990; Ahmed *et al.*, 2009; Farías *et al.*, 2010b), taninos (Pascual *et al.*, 2001; Montiel Herrera *et al.*, 2004), quinonas (Ghisalberti, 2000) e iridoides (Rimpler y Sauerbier, 1986; von Poser *et al.*, 1997). Es rara la presencia de alcaloides (Hegnauer, 1973).

En la Argentina, está representada por 26 géneros y 191 especies (Múlgura de Romero, 1999), entre los cuales se pueden nombrar *Lippia*, *Acantholippia* y *Aloysia* como los de mayor importancia. En el año 2006, Siedo realizó una revisión del género *Aloysia* en todo el mundo, utilizando, en el caso del cedrón, plantas recolectadas en las provincias de Catamarca, Jujuy, La Rioja, Salta y Tucumán.

Géneros de la familia Verbenáceas, subfamilia Verbenoideae, Tribu Lantaneae
(Múlgura de Romero *et al.*, 2003)

VERBENACEAS Adans.

Subfamilia I. **VERBENOIDEAE** Briq. (23 géneros y 5 tribus)

Tribu **Lantaneae** Endl. (11 gén.)

Lantana L.

Neosparton Griseb.

Xeroaloyisia Tronc.

Lippia L.

Phyla Lour.

***Aloysia* Paláu**

Acantholippia Griseb.

Bouchea Cham.

Stachytarpheta Vahl

Diostea Miers

Lampaya Phil.

Clave taxonómica del Género *Aloysia*

Tribu LANTANEAE Endl.

- 1'. Fruto esquizocárpico, seco, separándose a la madurez en clusas.

- 2'. Hierbas, generalmente no rastreras, ni radicales, subarbustos o arbustos, sinpubescencia malpigiácea.

- 3'. Arbustos, subarbustos, o sufrútices, de porte variado. Inflorescencias complejas con o sin espiga terminal o espigas solitarias.

- 4'. Arbustos o sufrútices, con hojas normales, no de aspecto retamoide.

- 5'. Arbustos generalmente aromáticos, o sufrútices. Hojas margen aserrado, lobulado, rara vez enteras, no carnosas.

6. Espigas contraídas o laxas. Flores perfectas, cáliz tubuloso, corola 4-lobada, levemente zigomorfa.

2. Aloysia

2.2 Antecedentes del género

El género *Aloysia* comprende principalmente arbustos aromáticos. Su distribución se extiende desde el sur de Estados Unidos y México hasta Chile y centro de la Argentina. Comprende alrededor de 30 especies, de las cuales unas 12 se encuentran en nuestro país. Pueden hallarse ejemplares de este género en las provincias de Catamarca, Jujuy, La Rioja y Salta (Múlgura de Romero, 1999). Probablemente se haya originado en la parte meridional de América del Sur (Uruguay, Argentina, Chile), considerándose posible su centro de evolución en la Argentina (da Silva *et al.*, 2006).

La fitoquímica del género muestra principalmente la presencia de aceites esenciales. Numerosos monoterpenos y sesquiterpenos presentes en los mismos han sido identificados en las especies más estudiadas: *Aloysia gratissima* (Soler *et al.*, 1986; Zygadlo *et al.*, 1995; da Silva *et al.*, 2006; Ricciardi *et al.*, 2006), *Aloysia polystachya* (Zygadlo *et al.*, 1995; Cabanillas *et al.*, 2003), *Aloysia virgata* (Ricciardi *et al.*, 2005) y *Aloysia citrodora* (ver punto 2.3). Otros compuestos de naturaleza no volátil, como glucósidos iridoides (Rimpler y Sauerbier, 1986; von Poser *et al.*, 1997) y compuestos polifenólicos, tales como verbascósido (un derivado del ácido cinámico), isoverbascósido; flavonoides derivados de la apigenina, de la luteolina, también han sido identificados dentro de este género (Carnat *et al.*, 1995; Taoubi *et al.*, 1997; da Silva *et al.*, 2006; Bilia *et al.*, 2008; Vandresen *et al.*, 2010).

Clave taxonómica de la especie *Aloysia citrodora* (Múlgura de Romero *et al.*, 2003)

Este género encuentra su nombre en honor de María Luisa de Parma (1754-1819) esposa de Carlos IV, rey de España.

Aloysia Paláu

1. Hojas opuestas o verticiladas. Flores mayores de 3 mm. Espigas cilíndricas, mayores de 2 cm long.
- 2'. Hojas ternadas, muy raramente en algún nudo opuestas
- 3'. Inflorescencias con espiga terminal. Hojas enteras o aserradas

4'. Hojas de 3,5-7,5 x 1-1,5 cm angostamente elípticas o angostamente ovadas, enteras o aserradas

3. *A. citrodora*

2.3 Antecedentes de *Aloysia citrodora*

2.3.1 Generalidades

Aloysia citrodora Paláu (sin.: *Aloysia citrodora* Paláu, *Aloysia citriodora* Ortega ex Pers., *Aloysia sleumeri* Moldenke, *Aloysia triphylla* (L'Hér.) Britton, *Lippia citriodora* (Lam.) Kunth, *Lippia triphylla* (L'Hér.) Kuntze, *Verbena citriodora* Cav., *Verbena triphylla* L'Hér., *Zapania citriodora* Lam.) es conocida vulgarmente, según los diferentes países, con el nombre de “cedrón”, “hierba luisa”, “hierba de la princesa”, “verbena olorosa”, “verbena citronela”, “lemon verbena”, “zitronenstrauch”, “cidrão”, “erva-cidreira”, “cidró”, “cidró-pessegueiro”, “erva-luisa”, “cidrozinho”, “verveine odorante”, “Chaqesayasaya”, “Huarippampacay” (Bassols y Gurni, 1996; Dellacasa y Bandoni, 2003; Múlgura de Romero *et al.*, 2003).

Es un arbusto erecto que puede alcanzar los 3 metros de altura, muy aromático y ramificado. Las hojas son simples, con pecíolos cortos. Tienen forma estrecha, lanceoladas y 3 hojas por cada nodo de los tallos. La lámina es de color verde pálido, de 5 a 10 cm de largo. La inflorescencia es una panícula terminal delgada, las flores consisten en un pequeño cáliz, tubular con 4 dientes largos y estrechos y una corola pálida, verde-malva divididos en 4 lóbulos acuminados (Foto 1) (Figura 2). Las hojas secas son delgadas y frágiles, de color verde. Poco pecioladas, ovadas-lanceoladas, acuminadas, con pelos glandulares, poco pilosas en el envés. La hoja presenta epidermis adaxial con tricomas cistolíticos, cónicos, unicelulares, de paredes gruesas verrucosas; cada uno se halla rodeado por una roseta de células basales conteniendo cistolitos (Gattuso *et al.*, 2008) (Figura 3).



Foto 1. Inflorescencias de *Aloysia citrodora* (Técnico M.A. Juárez)

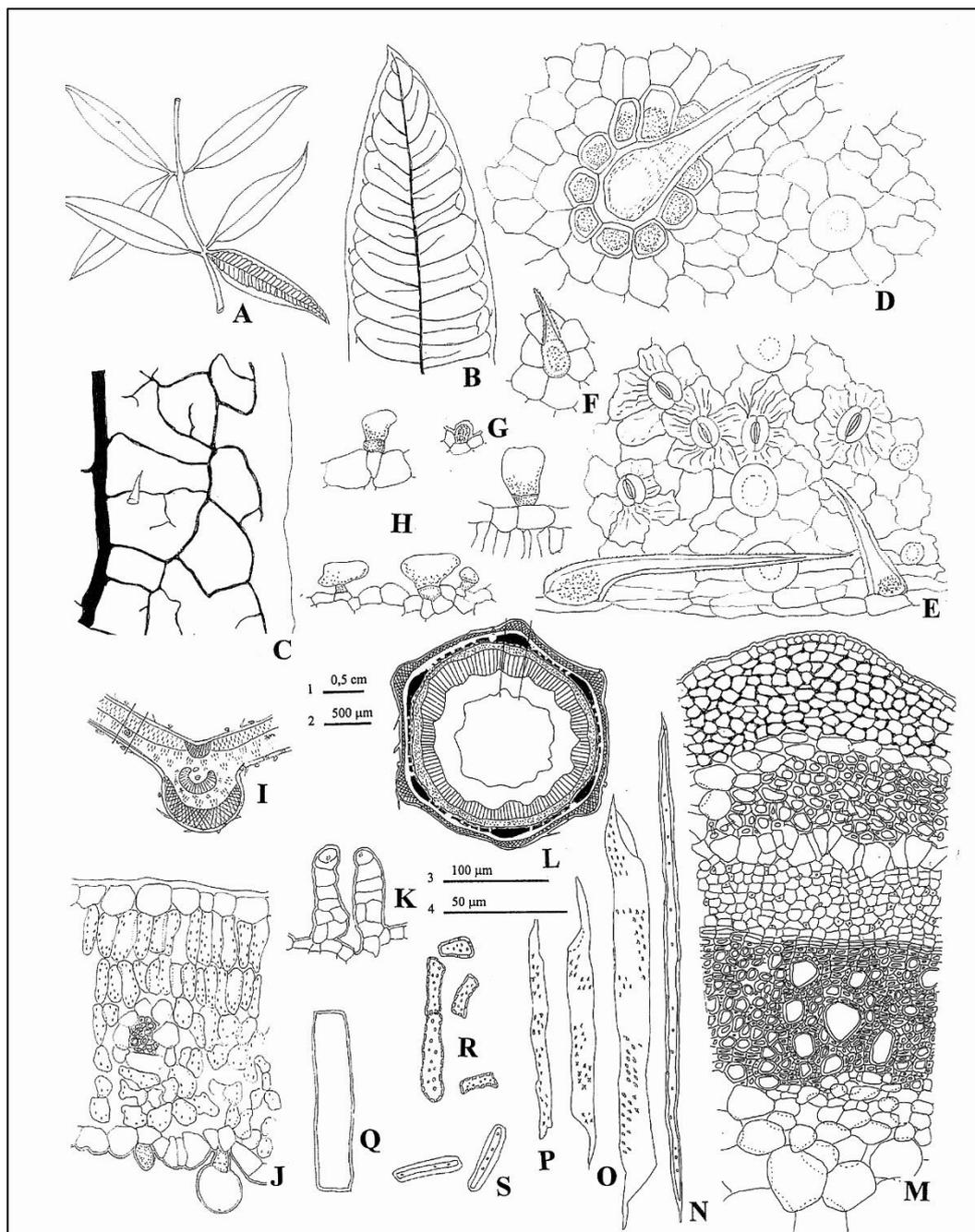


Figura 2. Descripción botánica de *Aloysia citrodora* Paláu. A-K Hoja. **A**, rama al estado vegetativo. **B-F**, vista superficial de la lámina. **B**, arquitectura foliar. **C**, última venación marginal areolada. **D**, epidermis adaxial con tricomas cistolíticos, cónicos, unicelulares, de paredes gruesas, verrucosas; cada uno se halla rodeado por una roseta de células basales conteniendo cistolitos. **E**, epidermis abaxial. **F**, tricomas simples, ligeramente verrucosos, con cistolitos de carbonato de calcio. **G-M**, sección transversal. **G**, tricoma glandular con cabeza unicelular, ubicados en depresiones de la superficie de la hoja. **H**, tricoma glandular con pie unicelular y cabeza de 1-2 células. **I**, representación esquemática del limbo. **J**, detalle del limbo indicado en **I**. **K**, estoma en columna. **L-M**, tallo en sección transversal. **L**, representación esquemática del tallo. **M**, detalle del tallo indicado en **L**. **N-R**, elementos celulares disociados. **N**, fibra. **O**, vaso. **P**, traqueidas. **Q**, células parenquimáticas. **R**, parénquima xilemático. **S**, células colenquimáticas. Las escalas representan 1 a B. 2 a I, L. 3 a D-H, J-K, M-S. 4 a C. (Gattuso *et al.*, 2008)

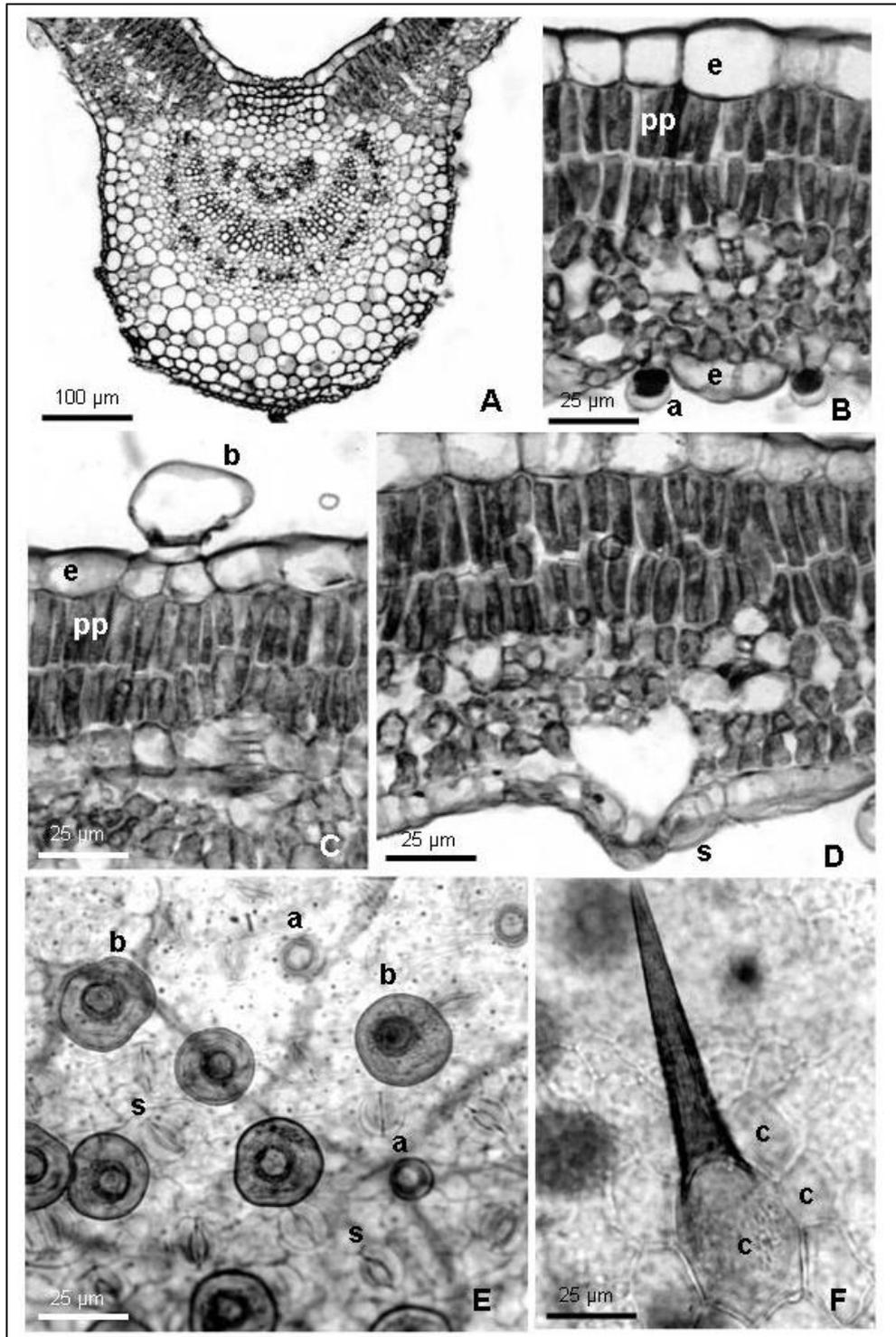


Figura 3. **A-E**: Fotomicrografías por microscopio óptico, MO. Sección transversal de la hoja. **A**, nervio medio, **B**, **C**, **D** mesófilo. **B**, pelos glandulares en depresiones de la superficie de la hoja. **C**, tricoma glandular con pie unicelular y cabeza 1-2 celular. **D**, estoma en columna. **E-F**, lámina en vista superficial. **E**, epidermis adaxial con tricomas cistolíticos, cónicos, unicelulares, de paredes gruesas verrucosas; cada uno se halla rodeado por una roseta de células basales conteniendo cistolitos. **a**, tricoma glandular con cabeza unicelular, en depresiones de la superficie de la hoja. **b**, tricoma glandular con pie unicelular y cabeza 1-2 celular. **c**, cistolitos. **e**, epidermis. **pp**, parénquima en empalizada. **s**, estoma. (Gattuso *et al.*, 2008)

Se introdujo en Europa a fines del siglo XVIII, y desde entonces se cultiva en países del centro y este de Europa, en África (Dellacasa y Bandoni, 2003) y en países de clima templado como Vietnam y Marruecos. En América crece o se cultiva en Paraguay, México, Venezuela, Colombia, Brasil, Bolivia, Perú, Uruguay, Chile y en la Argentina. En Paraguay, el cedrón es la principal planta aromática cultivada y exportada según un informe de la Empresa Usaid Paraguay Vende (2010).

En nuestro país se la encuentra en las provincias de Jujuy, Salta, Chaco, Tucumán, La Rioja, Catamarca, San Juan, Santiago del Estero, Mendoza, Buenos Aires, Córdoba, San Luis, Santa Fé, Misiones, Corrientes y Entre Ríos (Sorarú y Bandoni, 1978; Ratera y Ratera, 1980; Del Vitto *et al.*, 1997; Múlgura de Romero, 1999; Chifa y Ricciardi, 2001; Pascual *et al.*, 2001; Ricciardi *et al.*, 2011) (Figura 4).

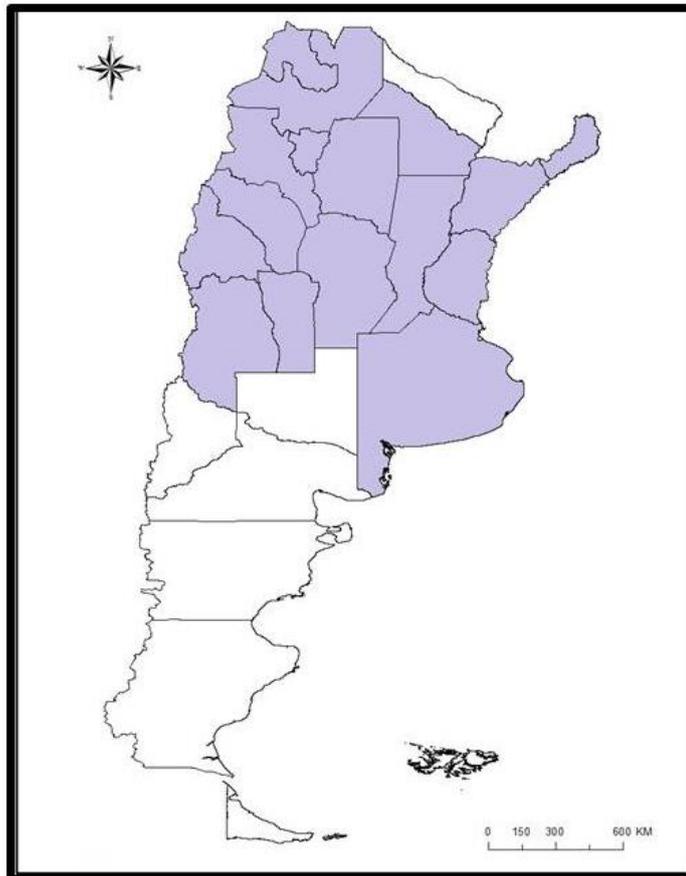


Figura 4. Distribución del cedrón en la Argentina

Se consumen habitualmente las hojas frescas o secas en forma de infusión.

La medicina tradicional le atribuye al cedrón propiedades antiespasmódicas, diuréticas, antipiréticas, sedantes, carminativas, digestivas, expectorantes, contra el dolor de cabeza, cardíaca, antihistamínica, emenagoga, (Ratera y Ratera, 1980; Toursarkissian, 1980; Duke, 1985; Bassols y Gurni, 1996; Carnat *et al.*, 1999; Chifa y Ricciardi, 2001; Pascual *et al.*, 2001; Roig, 2001; Santos Gomes *et al.*, 2005; Cerón Martínez, 2006; Tene *et al.*, 2007). Hieronymus (1882) la describe como estimulante suave en enfermedades nerviosas, melancolía, hipocondría, dolores y espasmo de estómago, flojedad de los intestinos. Con las hojas se fabrica un licor que se usa para las fiebres intermitentes.

Debido a sus propiedades aromáticas, diversos autores han estudiado materiales vegetales provenientes de diferentes orígenes geográficos. Los principales compuestos identificados fueron citral (mezcla de neral y geranial) y limoneno (Bellakhdar *et al.*, 1994; Ozek *et al.*, 1996; Carnat *et al.*, 1999; Pascual *et al.*, 2001; Santos Gomes *et al.*, 2005; Argyropoulou *et al.*, 2007; Gillij *et al.*, 2008; Oliva *et al.*, 2010). Sin embargo, existen trabajos en los que se ha determinado la presencia de α -tuyona (Zygadlo *et al.*, 1994; Duschatzky *et al.*, 2005; Gillij *et al.*, 2008), terpeno que puede presentar cierta toxicidad según la dosis y forma de uso de la planta (Lachenmeier y Uebelacker, 2010). Se ha observado que la composición química del AEC varía dependiendo de la región donde la planta crece, así como de su fenología (Argyropoulou *et al.*, 2007). Por otro lado, algunos autores determinaron que la composición del AE obtenido de una misma planta se mantiene constante en las mismas condiciones de medio ambiente (Santos Gomes *et al.*, 2005).

Los componentes no volátiles mayoritarios identificados en cedrón son polifenoles, siendo el principal el verbascósido (Lamaison *et al.*, 1993; Nakamura *et al.*, 1997; Carnat *et al.*, 1999). Algunos autores han determinado que este tipo de compuestos se encuentran en mayor concentración en extractos obtenidos a partir de hojas jóvenes que en los obtenidos de hojas adultas (Ricco *et al.*, 2011). Además de este compuesto, se han identificado algunos derivados, como ser isoverbascósido, β -hidroxi-verbascósido y β -hidroxi-isoverbascósido (Bilia *et al.*, 2008; Quirantes-Piné *et al.*, 2009). Los principales flavonoides descritos para esta especie son: salvigenina, eupatorina, eupafolina, luteolina, 6-hidroxiluteolina, cinarósido, hispidulina, cirsimaritina, diosmetina, chrysoeriol, apigenina, cirsiliol,

nepetina, jaceocidina y luteolín-7-diglucurónido, entre otros (Tomás-Barberán *et al.*, 1987; Skaltsa y Shammas, 1988; Lamaison *et al.*, 1993; Carnat *et al.*, 1995, Carnat *et al.*, 1999; Valentão *et al.*, 1999; Bilia *et al.*, 2008; Funes *et al.*, 2009; Cruz *et al.*, 2010; Funes *et al.*, 2010b). Ragone *et al.* (2007), informaron la presencia de los flavonoides vitexina e isovitexina, demostrando que el primero sería el responsable de la actividad espasmolítica reportada para esta especie. Por otra parte, se ha señalado la presencia de ácido cafeico, ácido ferúlico e hidroxitirosol (Proestos *et al.*, 2006). También se han identificado compuestos de naturaleza esteróidea como estigmasterol, β -amirina, β -sitosterol, ácido ursólico, ácido oleanólico y ácido betulínico (Bheemasankara *et al.*, 1979; Ono *et al.*, 2008).

2.3.2 Composición química de la fracción volátil

Bajo la denominación de aceite esencial se agrupan sustancias de carácter volátil, obtenidos por diferentes métodos físicos a partir de especies vegetales aromáticas. Presentan una composición química compleja, en la que son predominantes los derivados mono y sesquiterpenos y derivados fenilpropanoicos. Es el grupo de sustancias que le confiere aroma y sabor a las especies vegetales que los poseen. Debido a que son liposolubles y se evaporan a relativamente baja temperatura, se denominan también aceites volátiles. Pese a que los aceites esenciales de distintas plantas son diferentes, tienen como característica en común que son arrastrables por vapor de agua y suelen ser poco hidrosolubles. En esta propiedad se basa el método de hidrodestilación, que es el más utilizado a escala laboratorio. Este método se encuentra codificado en la Farmacopea Argentina 7^o Edición (2003), y utiliza una trampa tipo Clevenger para la obtención y cuantificación de un aceite esencial.

No se puede dejar de mencionar que existen diversos factores que pueden afectar la composición química cuali-cuantitativa de una esencia, como puede ser el estado vegetativo de la planta en el momento de recolección o las características edáficas y climáticas de la zona en donde se desarrolla la especie aromática, además de los factores genéticos.

Para una mejor comprensión se detallarán en forma separada las composiciones obtenidas a partir de material vegetal de la Argentina, de Sudamérica y de otros orígenes del mundo.

Argentina

El aceite esencial de cedrón (AEC) ha sido investigado en nuestro país, desde los años 60, cuando se iniciaron los primeros estudios seriados sobre plantas aromáticas nativas, utilizando las más modernas técnicas analíticas desarrolladas por entonces.

En 1961, el grupo de Fester y colaboradores, pioneros en el estudio de plantas aromáticas en la Argentina, reportaron como compuesto principal el citral en una concentración entre 20 y 35%, además de limoneno, metilheptenona, carvona, linalol y geraniol.

En el año 2009, Chapman en su trabajo de tesis doctoral, analizó la composición química de hojas de cedrón de las provincias de Catamarca, Salta y La Rioja. Para ello analizó por CCD la fracción dietil-éter de un extracto metanólico. Dos de las tres poblaciones estudiadas (Catamarca y Salta) no presentaron citral como componente principal y el limoneno no pudo ser confirmado por ese método. Encontraron citronelal y β -citronelol en muchos individuos de Salta, mientras que la β -tuyona fue considerada un marcador para las plantas de Catamarca.

Utilizando técnicas más modernas, como es la cromatografía de gases y la cromatografía de gases acoplada a un detector de masas, varios autores determinaron con mayor detalle las composiciones químicas de los AE provenientes de distintos lugares de nuestro país. Los resultados de estos estudios se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 1: Principales compuestos identificados en AEC de la Argentina

Referencias N°	Córdoba						Merlo	San Luis	Salta	Mendoza	Buenos Aires
	Río Primero	Río Primero	Río Segundo	Córdoba	Traslasierra	La Paz					
Referencias N°	1,3	7	2*	6	6	7	4,5	7	7	7	8,9,10
Compuestos	Porcentajes										
α -pineno	-	1.2	1.0	1.1	tr	0.8	-	tr	1.5	tr	2.3
sabineno	0.8	-	1.4	-	-	-	-	-	-	-	22.9
6-metil-5-hepten-2-ona	-	-	-	-	-	tr	-	tr	1.7	tr	-
<i>p</i> -cimeno	0.1	0.4	0.3	0.2	tr	tr	-	tr	tr	tr	1.8
limoneno	6.9	6.9	9.0	7.0	19.7	2.9	12.7	17.9	21.3	14.2	7.4
1,8-cineol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
linalol	-	0.3	-	0.5	0.2	0.5	-	0.3	2.2	tr	-
alcanfor	4.1	4.1	5.4	5.2	0.0	-	-	-	-	-	-
mircenona	36.5	-	31.0	-	-	-	-	-	-	-	-
citronelal	-	0.1	-	-	-	tr	-	tr	1.1	tr	51.3
α -tuyona	13.1	13.1	17.1	14.2	0.3	0.5	22.9	0.2	1.7	tr	-
α -terpineol	0.1	0.5	tr	0.4	tr	-	-	-	2.4	-	-
<i>trans</i> -carveol	0.3	0.5	tr	-	-	-	-	-	3.3	-	-
<i>cis</i> -carveol	0.1	0.4	tr	0.1	0.2	-	17.5	-	1.1	-	-
neral	-	18.7	-	19.4	14.0	20.0	-	13.0	12.4	31.5	-
carvona	1.3	1.2	1.6	0.8	0.2	-	13.2	-	13.1	-	-
geranial	-	21.3	-	22.7	21.0	29.2	-	18.5	3.3	22.6	-
β -cubebeno	-	0.2	-	0.3	0.1	tr	-	tr	4.2	tr	-
α -cedreno	0.5	3.2	-	3.0	2.8	0.9	-	3.2	tr	tr	-
<i>trans</i> - β -cariofileno	-	0.4	0.1	0.4	0.3	0.6	-	0.4	tr	tr	2.4
ar-curcumeno	-	0.1	-	-	-	tr	-	tr	3.3	tr	9.6
germacreno D	4.3	4.3	0.1	3.3	6.9	2.3	-	6.9	tr	tr	-
biclogermacreno	3.8	3.8	-	4.1	8.0	4.2	-	7.2	tr	3.9	-
δ -cadineno	-	0.2	-	0.2	tr	0.3	-	0.2	4.2	3.2	-
<i>trans</i> -nerolidol	0.1	0.5	-	0.5	1.0	0.6	-	0.9	tr	9.6	-
lippifoli-1(6)-ene-5-ona	8.9	-	9.4	-	-	-	-	-	-	-	-
espatulenol	5.2	0.9	3.3	0.9	9.9	8.9	-	10.1	6.6	4.4	-
óxido de cariofileno	-	1.0	-	0.9	7.7	7.0	-	10.0	6.9	4.5	-
viridiflorol	-	0.5	-	-	-	2.5	-	1.1	tr	tr	-

* Flores

** No existen antecedentes sobre un aceite esencial obtenido por destilación con arrastre con vapor con más cantidad de neral que de geranial.

tr: porcentaje menor a 0.05%.

1- Zygadlo *et al.*, 1994; 2- Zygadlo *et al.*, 1995; 3- López *et al.*, 2004; 4- Duschatzky *et al.*, 2004; 5- Duschatzky *et al.*, 2005; 6- Gillij *et al.*, 2008; 7- Oliva *et al.*, 2010; 8- Benzi *et al.*, 2009; 9- Werdin González *et al.*, 2010; 10- Benzi *et al.*, 2014.

En el año 2011, Ricciardi *et al.*, evaluaron la variación en la composición química de plantas silvestres de la provincia de Corrientes obteniendo el AE en tres épocas diferentes del año: otoño (I), primavera (II) y verano (III). Además, para comparar la influencia del ambiente ecológico, plantas seleccionadas de una población de San Lorenzo fueron cultivadas bajo condiciones controladas en un campo experimental de la Universidad Nacional del Nordeste (cult I, otoño). Los autores observaron que no se produjeron cambios en la composición cualitativa del AE analizado en función de la época de recolección. Los mayores cambios se observaron al comparar la muestra silvestre y la cultivada, en donde disminuyó considerablemente el contenido de limoneno, aumentando los porcentajes de neral y geranial. Los resultados obtenidos se detallan a continuación:

Tabla 2. Principales compuestos obtenidos por Ricciardi *et al.*, 2011

	I	Cult I	II	III
Rendimiento AEC (%V/P)	0.2	0.5	0.7	0.6
Compuestos	Porcentajes			
sabineno	5.7	-	15.1	8.5
6-metil-5-hepten-2-ona	0.9	0.8	2.2	0.9
limoneno	21.7	0.6	37.7	31.0
α -tuyona	0.5	-	0.3	0.6
<i>cis</i> -óxido de limoneno	0.1	0.5	0.1	0.2
<i>trans</i> -óxido de limoneno	0.5	tr	0.3	0.4
citronelal	0.3	-	0.3	0.2
óxido de β -pineno	0.6	1.0	0.2	0.5
<i>cis</i> -dihidrocarvona	0.8	tr	0.3	0.7
neral	12.1	31.7	11.2	11.3
geranial	17.5	37.7	14.8	15.3
α -copaeno	0.6	-	0.2	0.5
β -bourboneno	1.1	1.7	0.3	0.7
α -cedreno	0.4	-	0.1	0.3
<i>trans</i> - β -cariofileno	3.6	0.5	2.3	4.2
<i>alloaromadendreno</i>	0.8	-	0.2	0.3
germacreno D	0.4	-	0.2	0.5
α -curcumeno	4.8	1.0	2.1	4.7
biclogermacreno	2.5	tr	1.4	1.6
γ -cadineno	0.5	-	tr	0.3

	I	Cult I	II	III
Rendimiento AEC (%V/P)	0.2	0.5	0.7	0.6
Compuestos	Porcentajes			
<i>trans</i> -nerolidol	1.5	0.1	0.3	0.6
óxido de cariofileno	12.3	tr	1.0	2.8
globulol	tr	11.4	1.2	2.9
epi- α -cadinol	1.3	-	0.3	0.9
Total identificado	92.1	87.0	93.0	91.3

tr: porcentaje menor a 0.05%.

Como conclusión del análisis de los distintos trabajos científicos citados se observó que en las muestras provenientes de la República Argentina se encontraron perfiles muy diferentes a los típicos. Zygadlo *et al.* (1994; 1995) analizaron un material de cultivo en floración de la provincia de Córdoba informando una composición muy distinta a la detectada por otros autores, cuyo AE presentó alcanfor, mircenona, α -tuyona y lippifoli-1(6)-ene-5-ona. Estos compuestos no habían sido reportados hasta el momento en esta especie. El compuesto α -tuyona también fue detectado en muestras de Córdoba (Oliva *et al.*, 2010) y San Luis (Duschatzky *et al.*, 2004; 2005). En estas últimas publicaciones se informó una composición química atípica en una muestra proveniente de Merlo, siendo los compuestos mayoritarios α -tuyona (22.9%), *cis*-carveol (17.5%), carvona (13.2%) y limoneno (12.7%).

Por otra parte, Benzi *et al.* (2009) y Werdin González *et al.* (2010) detectaron como compuestos mayoritarios sabineno (22.9%) y citronelal (51.3%) en muestras de Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires. Ambos compuestos no habían sido encontrados hasta el momento en tan alta concentración. Oliva *et al.* (2010) encontró en muestras de Las Viñas (Salta) un alto contenido de carvona (13.1%).

Los datos acerca de las composiciones químicas poco habituales de AEC de material vegetal cultivado en Argentina se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Compuestos poco comunes reportados para AEC de la Argentina

	Córdoba				San Luis	Salta	Buenos Aires
	Río Primero	Río Primero	Río Segundo	Córdoba	Merlo	Las Viñas	Bahía Blanca
Referencias N°	1,3	7	2*	6	4,5	7	8,9,10
Compuestos	Porcentaje						
sabineno	0.8	-	1.4	-	-	-	22.9
alcanfor	4.1	4.1	5.4	5.2	-	-	-
mircenona	36.5	-	31	-	-	-	-
citronelal	-	0.1	-	-	-	1.1	51.3
α -tuyona	13.1	13.1	17.1	14.2	22.9	1.7	-
cis-carveol	0.1	0.4	tr	0.1	17.5	1.1	-
carvona	1.3	1.2	1.6	0.8	13.2	13.1	-
lippifoli-1(6)-ene-5-ona	8.9	-	9.4	-	-	-	-

tr: porcentaje menor a 0.05%.

*flores

1-Zygodlo *et al.*, 1994; 2-Zygodlo *et al.*, 1995; 3-López *et al.*, 2004; 4-Duschatzky *et al.*, 2004; 5-Duschatzky *et al.*, 2005; 6-Gillij *et al.*, 2008; 7-Oliva *et al.*, 2010; 8-Benzi *et al.*, 2009; 9-Werdin González *et al.*, 2010; 10-Benzi *et al.*, 2014.

Dada la gran variación reportada en la composición química del AEC argentino, es de vital importancia para poder redactar una norma de calidad realizar un estudio de los AE de una cantidad de muestras significativa de diferentes poblaciones. A su vez, se podrían establecer parámetros fitoquímicos para la determinación de la calidad de dicha especie en función de los requerimientos comerciales, lo que favorecerá una correcta selección de los materiales a multiplicar para cultivos.

América

En el año 1979, Silva *et al.* publicaron uno de los primeros trabajos de AEC de origen americano. Estudiaron la composición de muestras cultivadas en Río Grande do Sul, Brasil, recolectadas durante la época de floración. El rendimiento de aceite esencial obtenido fue de 0.2% V/P y los componentes principales encontrados fueron 1,8-cineol (15.4%), neral (22.3%), geranial (37.1%) y geraniol (10.6%).

Presentó muy bajo contenido de limoneno (0.9%) por lo que no sería un aceite esencial típico de cedrón.

Posteriormente, Vogel *et al.*, en 1997, determinaron la variación en el contenido de AE en distintas épocas del año de un cultivo ubicado en Talca, Chile. Observaron que el mayor rendimiento fue 0.9% V/P, obtenido en el mes de octubre y el menor fue 0.1% V/P en el mes de diciembre. El compuesto principal encontrado en todos los casos fue citral, con un contenido que varió entre 34-64%, dependiendo del mes de recolección. Determinaron también la variación en el contenido de citral a diferentes horas del día, encontrando que el contenido va aumentando a lo largo del día, siendo 47% a la mañana, 52% al mediodía y 55% a la tarde.

Otras composiciones de AE de cedrón de materiales provenientes de Chile, Colombia, Brasil, Venezuela y Paraguay fueron publicados posteriormente. Los principales compuestos encontrados por diferentes autores se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4: Principales constituyentes identificados en el AEC de América del Sur

Compuestos	Chile		Colombia					Brasil		Venezuela	Paraguay	
	Sin especificar	Bolívar	Cundinamarca	Antioquia	Bucaramanga	Quindío	Botucatu	Campinas	Mérida	Sin especificar		
	1	5	5	5	7	8	2	6-7	3	4	9	10
	Porcentajes											
sabineno	1.1	1.2	-	1.3-1.6	-	-	-	-	-	-	-	-
6-metil-5-hepten-2-	-	2.1	2.1	2.4-3.0	2.8	-	0.4	1.5	4.0	-	1.8	tr
limoneno	12.8	7.9	4.3	7.5-8.9	8.4	10.7	0.6	10.7	15.9	11.0	3.0	19.1
1,8-cineol	5.7	2.3	-	3.5-4.0	3.6	5.0	0.4	5.0	-	-	1.4	-
<i>cis</i> - β -ocimeno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.5	tr
<i>trans</i> - β -ocimeno	-	-	-	-	3.0	-	0.2	1.8	2.9	-	-	-
linalol	0.5	0.6	0.8	0.6-0.8	0.8	-	0.4	0.7	-	1.1	0.5	0.6
mentol	-	-	-	-	-	-	0.5	-	-	-	1.3	-
α -tuyona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6
citronelol	5.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>cis</i> -carveol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.1	-

	Chile							Colombia	Brasil		Venezuela	Paraguay
	Sin especificar	Bolívar	Cundinamarca			Antioquia	Bucaramanga	Quindío	Botucatu	Campinas	Mérida	Sin especificar
	1	5	5	5	7	8	2	6-7	3	4	9	10
Compuestos	Porcentajes											
nerol	0.4	1.3	4.6	2.2-5.1	5.1	2.0	4.7	2.0	-	-	4.9	-
neral	17.6	20.8	17.6	14.4-18.6	15.0	15.6	19.3	15.6	27.0	17.5	22.5	15.5
geraniol	0.3	0.8	7.6	1.7-4.4	4.4	2.7	5.4	2.7	4.0	-	6.2	-
geranial	23.5	25.3	20.5	17.5-22.0	17.5	18.9	38.1	18.9	29.5	21.8	27.3	19.5
acetato de geranilo	-	1.8	2.0	1.8-1.9	-	1.3	-	-	4.0	3.3	1.9	-
β -burboneno	-	0.7	0.9	0.7-1.1	0.7	-	1.2	0.8	-	-	-	0.8
α -cedreno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.8
<i>trans</i> - β -cariofileno	0.9	2.5	2.2	2.5-3.1	2.6	2.3	2.8	2.3	2.9	6.7	2.1	0.7
α -curcumeno	-	3.8	2.8	2.7-4.1	2.8	-	3.1	3.9	-	5.1	-	tr
germacreno D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.6	5.3
α -zingibereno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	0.3
biciclogermacreno	-	-	-	-	-	-	3.4	1.3	2.0	-	5.2	6.8
<i>cis</i> -nerolidol	1.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>trans</i> -nerolidol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.6
espatulenol	5.1	6.6	2.8	4.2-7.0	4.2	4.7	3.6	4.7	tr	4.3	4.5	11.1
<i>trans</i> sesqui-sabineno hidrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.1	-
óxido de cariofileno	6.3	0.4	0.8	1.8-4.1	1.8	-	1.4	5.0	0.8	7.0	2.3	10.5

tr: porcentaje menor a 0.05%.

1- Carnat *et al.*, 1999; 2- Stashenko *et al.*, 2003; 3- de Figueiredo *et al.*, 2004; 4- Sartoratto *et al.*, 2004; 5- Diaz *et al.*, 2007; 6- Olivero-Verbel *et al.*, 2009; 7- Escobar *et al.*, 2010; 8- Ocazonez *et al.*, 2010; 9- Rojas *et al.*, 2010; 10- Oliva *et al.*, 2010.

Numerosos autores realizaron estudios comparativos de la fracción volátil obtenida por distintos métodos de extracción sobre diferentes fracciones. Tal es el caso descrito por Carnat *et al.* (1999) en el que realizaron un estudio cuali-cuantitativo comparativo de distintos procedimientos de extracción del AE a partir de las hojas de cedrón originarias de Chile. Para ello, determinaron por cromatografía de gases la composición química de tres fracciones diferentes (Tabla 5). Las muestras fueron obtenidas por arrastre con vapor de agua. La primera destilación se realizó sobre una muestra de hojas de cedrón, obteniendo de esta forma el aceite

esencial (A). La segunda muestra se obtuvo destilando una infusión, obteniendo la fracción volátil de la misma (B). Posteriormente se realizó la destilación sobre el marco de la infusión (C).

Tabla 5. Principales compuestos identificados en las diferentes fracciones (Carnat *et al.*, 1999)

Compuestos	Hojas antes de la infusión (A) (% P/P)	Infusión (B) (% P/P)	Hojas después de la infusión (C) (% P/P)
limoneno	12.8	1.3	1.7
1,8-cineol	5.7	3.4	0.0
β -cariofileno	0.9	0.7	1.8
neral	17.6	31.3	6.1
acetato de α -terpinilo	1.0	2.0	0.2
geranial	23.5	45.6	10.4
citronelol	5.3	0.0	15.2
óxido de cariofileno	6.3	2.5	13.9
<i>cis</i> -nerolidol	1.1	0.3	3.1
espatulenol	5.1	4.0	10.6

La composición de la fracción volátil obtenida de la infusión está enriquecida en citral en un 77%. La presencia de citral sigue siendo importante también en la muestra obtenida a partir de las hojas después de la infusión (16.5%) (marco).

Otras metodologías de extracción han sido utilizadas con el fin de comparar los compuestos volátiles del cedrón. De esta manera, Stashenko *et al.*, en 2003, estudiaron los metabolitos secundarios obtenidos por diferentes técnicas de extracción de plantas cultivadas en Bucaramanga, Colombia. Las técnicas utilizadas fueron: hidrodestilación (HD) utilizando un equipo tipo Clevenger (tabla 6); hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHD) usando el mismo equipo descrito para HD, pero empleando un horno a microondas; destilación con vapor-extracción con solvente simultánea (SDE), que se llevó a cabo en un equipo diseñado por Likens Nickerson y la extracción con fluidos supercríticos (SFE) que se realizó utilizando un extractor Soxhlet de alta presión. También utilizaron diferentes métodos de obtención de volátiles, como ser *headspace* dinámico de purga y trampa (P & T), *headspace* estático (S-HS), o por microextracción en fase sólida en modo *headspace* (HS-SPME). Observaron que el neral y el geranial fueron siempre los

compuestos mayoritarios en las mezclas de volátiles, a excepción del obtenido por S-HS.

Por otra parte, el aceite esencial de las hojas de cedrón proveniente de Campinas (San Pablo, Brasil) fue obtenido por extracción de fluidos supercríticos a diferentes presiones y temperaturas por Pereira y Meireles, en el año 2007. Observaron que la composición del extracto varía en función de la temperatura y la presión utilizadas en la extracción. El mayor contenido de neral (12.1%), se obtuvo a 150 bar y 45°C, lo mismo que para el geranial (3.9%). En cambio, para el óxido de cariofileno la mayor cantidad extraída se observó para una presión de 150 bar y 35°C, observándose diferentes solubilidades de los compuestos a distintas densidades de los fluidos supercríticos.

Rebekah Chapman, 2009, en su trabajo de tesis doctoral, determinó la composición química de plantas de cedrón cultivadas en un vivero en Georgia, Estados Unidos. Analizó por cromatografía de gases-masa los compuestos presentes en un extracto hexánico. Los monoterpenos encontrados en mayor cantidad fueron neral y geranial, seguidos de limoneno, β -ocimeno y δ -3-careno; mientras que los sesquiterpenos predominantes fueron germacreno D, *trans*-cariofileno, biciclogermacreno y ar-curcumeno. También estudió el cambio en la composición de los terpenos durante el período de cosecha (julio-agosto) observando que dicha composición no varió cualitativamente. Las concentraciones de mono y sesquiterpenos aumentaron hasta un máximo en la época de floración, disminuyendo durante el resto de la temporada de crecimiento.

En el año 2013, Paulus *et al.* determinaron el contenido de aceite esencial y la composición química del mismo a lo largo de un año (octubre 2010-septiembre 2011), como se muestra en Tabla 6. El cedrón analizado fue cultivado en la Universidad Tecnológica de Paraná, Curitiba, Brasil, observándose que en el mes de febrero se obtuvo el mayor rendimiento de aceite esencial (0.58% V/P) y el menor rendimiento fue en el mes de mayo (0.17% V/P) (tabla 6).

Tabla 6. Composición química del AEC según Paulus *et al.* (2013)

Compuestos	Fecha de recolección										
	oct-10	nov-10	dic-10	ene-11	feb-11	mar-11	abr-11	may-11	jun-11	ago-11	sep-11
	Porcentajes										
α -pineno	0.90	-	-	0.60	0.64	-	-	-	-	0.10	0.10
sabineno	-	-	-	-	1.75	-	-	0.34	-	-	-
β -pineno	1.60	0.71	0.74	-	1.81	0.73	0.76	0.83	1.38	0.90	1.40
mirceneno	-	-	-	-	0.44	-	-	-	-	0.40	0.40
limoneno	13.52	14.24	14.10	13.82	15.77	13.35	12.45	9.21	11.20	9.70	12.80
<i>trans</i> - β -ocimeno	0.84	0.62	0.96	0.48	2.40	0.47	0.50	-	-	2.10	1.60
linalol	0.90	0.93	0.87	0.92	0.87	1.05	0.76	0.67	0.72	0.70	0.60
<i>cis</i> -óxido limoneno	0.38	0.33	0.31	0.37	0.29	0.29	0.30	0.27	0.33	0.30	0.40
<i>trans</i> -óxido limoneno	1.00	0.81	0.81	1.01	0.74	0.68	0.60	0.44	0.53	1.30	1.50
terpinen-4-ol	0.68	0.71	1.01	0.75	1.07	0.77	0.75	0.85	0.61	1.50	1.70
α -terpineol	0.25	-	0.44	0.36	1.06	-	1.40	1.45	0.53	0.40	0.30
neral	28.40	28.60	28.19	29.31	25.13	29.04	25.50	20.30	18.02	35.80	35.50
geranial	36.54	36.96	35.17	37.16	31.11	37.35	34.40	29.39	26.11	27.80	27.10
acetato de geranilo	2.68	2.72	2.32	2.35	1.24	2.70	2.20	1.87	2.98	2.00	2.10
cariofileno*	2.42	2.57	2.56	-	2.27	1.79	1.75	1.70	0.54	2.80	2.20
germacreno D	-	-	1.66	-	1.72	-	-	-	-	-	-
ar-curcumeno	1.35	1.42	-	1.62	1.42	1.09	5.07	6.24	2.36	2.70	2.20
zingibereno	0.90	0.80	0.95	0.22	2.33	0.27	-	-	-	2.12	1.40
nerolidol*	4.37	4.58	5.23	6.58	2.68	6.14	10.70	14.90	24.34	2.30	2.20

*isómeros no identificados por los autores

La composición química de los AE analizados fue cualitativamente similar durante todo el período estudiado. Los compuestos principales encontrados fueron limoneno (9.21%-15.77%), neral (18.02%-35.8%) y geranial (26.11%-37.35%). En el invierno (agosto y septiembre) se observó un inusual contenido de neral, siendo mayor al de geranial.

Europa, Asia y África

Domínguez, en 1928, haciendo referencias a otros autores europeos, informó el contenido de AEC siendo 0.195% V/P para las hojas, 0.132% V/P en ramas floríferas, 0.014% V/P en raíces y 0.007% V/P en tallos.

En 1952, Guenther informó sobre constantes fisicoquímicas y composición química de material vegetal proveniente del norte de Africa, entre otros orígenes. Los

compuestos principales encontrados fueron metil-heptenona, carvona, neral, geranial, cineol, limoneno, β -cariofileno, borneol, linalol, α -terpineol, nerolidol y cedrol.

En el año 1961, Montes señaló al citral (20% a 35.4%) como compuesto principal del AE de una muestra de origen español. Otros compuestos informados en ese trabajo fueron: verbenona (1.0-5.0%), metilheptenona, citronelol, geraniol, limoneno y cariofileno. El rendimiento en esencia reportado fue de 0.2% V/P para las hojas y 0.1% V/P para las inflorescencias.

Kaiser y Lamparsky (1976b) describieron el aceite esencial de *Aloysia citrodora*, sin indicar el origen del material vegetal, informando la presencia de fotocitral A, epi-focitral A, fotocitral B, *trans* fotocitral y algunos de sus derivados, 2,5-dimetil-2-vinil-4-hexenal, un nuevo óxido de cariofileno (el óxido de 2,6- β -cariofilano). Buil *et al.* (1975) y Garnero (1977), estudiaron la composición de cultivos provenientes de la región de Provenza, al sur de Francia. La composición química de la esencia resultó ser típica, siendo los compuestos principales detectados citral (38.0%), geraniol (6.0%), nerol (5.2%), limoneno (4.2%) y espatulenol (2.5%).

Posteriormente, Bellakhdar *et al.* (1994), estudiaron la composición del AEC cultivado en Marruecos. Los principales compuestos identificados fueron 1,8-cineol (12.4%), metilheptenona (7.4%), neral (6.9%), geranial (9.9%), ar-curcumeno (4.6%), óxido de cariofileno (5.5%) y espatulenol (5.2%).

En 1996, Ozek *et al.* estudiaron la composición de plantas cultivadas en Turquía. Una muestra fue obtenida por destilación de las hojas (A) y otra a partir de ramas con hojas (B). Los principales compuestos encontrados fueron limoneno (18.6%-14.8%), neral (6.0%-8.1%), geranial (11.9%-19.1%) y ar-curcumeno (4.9%-5.7%) para A y B respectivamente.

En el año 2003, Crabas *et al.*, realizaron un estudio comparativo entre dos métodos distintos de obtención de AEC. Obtuvieron el aceite de las hojas de muestras comerciales (ABOCA, Italia) por hidrodestilación (HD) por un lado y por extracción con fluidos supercríticos (SFE) por el otro. Los compuestos volátiles principales obtenidos por SFE fueron fitol (11.6%), espatulenol (7.1%), óxido de cariofileno (5.6%) y ar-curcumeno (4.6%) mientras que por HD fueron espatulenol

(23.2%), ar-curcumeno (7.7%), geranial (3.2%), *trans*-nerolidol (3.8%) y neral (2.2%). En el mismo año, Ohno *et al.*, analizaron la composición de muestras comerciales de cedrón de origen francés (Laboratoire Sanoflore, Lozeron, Francia), determinando que los compuestos principales eran: limoneno (17.3%), neral (12.0%) y geranial (18.5%).

Kim y Lee, en el año 2004, compararon los compuestos volátiles obtenidos utilizando 6 fibras diferentes por SPME (micro extracción en fase sólida). Las fibras usadas en esa oportunidad fueron las siguientes: 100 μm polidimetilsiloxano (PDMS), 30 μm PDMS, 7 μm PDMS, 85 μm poliacrilato (PA), 65 μm carbowax-divinilbenceno (CW-DVB) y 50/30 μm divinilbenceno-carboxén-polidimetilsiloxano (DVB-CAR-PDMS). Las muestras analizadas fueron hojas obtenidas en una herboristería de Corea. Los compuestos principales detectados fueron neral, geranial y limoneno, independientemente de la fibra utilizada. Además, en este trabajo se realizó la determinación enantiomérica de compuestos quirales mediante el análisis por GC con una columna quiral de ciclodextrinas. Se estableció la preponderancia de los isómeros quirales de 3 compuestos: α -pineno fue (+), limoneno fue (-) y alcanfor fue (-). Los autores no indican la riqueza isotópica de cada uno de los compuestos determinados.

Posteriormente, en el año 2005, un grupo de trabajo de Portugal (Santos-Gomes *et al.*), determinaron la composición química de AEC de hojas y flores por separado de muestras silvestres de la localidad de Merelin. Por otra parte, prepararon estacas de la misma muestra que fueron enraizadas y transplantadas en la localidad de Arcos de Valdevez, situada a 40 km del lugar de origen. Obtuvieron el AE solamente de las hojas, de muestras en julio, septiembre, diciembre y junio. De los compuestos identificados, solamente el 1-octen-3-ol apareció en las flores y no en las hojas. Para todas las muestras analizadas los compuestos principales fueron limoneno, neral y geranial, sin observarse cambios respecto de la parte de la planta utilizada para obtener la esencia. Los perfiles cromatográficos se mantuvieron a lo largo de un año, a pesar de que la planta había sido transplantada a otro lugar, variando su composición química solo cuantitativamente (ver tabla 7).

Tabla 7. Compuestos identificados en AEC por Santos-Gomes *et al.* (2005)

Lugar	Merelim		Arcos de Valdevez			
			verano	otoño	invierno	primavera
			julio	sept	dec	junio
	flores	hojas	hojas	hojas	hojas	hojas
Compuestos	Porcentajes					
1-octen-3-ol	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
α -pineno	1.1	1.1	0.7	0.4	0.2	0.4
sabineno	2.7	2.9	1.9	1.2	0.5	1.2
limoneno	20.6	15.4	14.7	8.2	5.7	9.8
1,8-cineol	4.5	1.6	0.2	0.1	0.1	0.1
<i>cis</i> - β -ocimeno	4.0	1.5	2.6	1.6	1.8	1.8
neral	20.8	22.9	23.3	26.1	29.6	25.9
geranial	26.8	29.5	31.9	36.4	38.3	33.7
β -cariofileno	1.3	1.3	2.4	2.8	1.7	1.8
germacreno-D	0.8	0.4	2.5	3.4	1.9	2.2
ar-curcumeno	1.5	2.2	1.1	1.1	1.2	1.3
α -zingibereno	0.8	0.3	3.0	3.9	2.4	2.9
espatulenol	1.0	2.2	0.1	0.1	0.1	0.1
óxido de cariofileno	1.1	1.8	2.5	2.1	3.3	2.7
Total identificado	87.9	83.1	86.9	87.4	86.8	83.9

A continuación, Gomes *et al.*, en 2006, estudiaron la composición química de plantas provenientes de Portugal. Más de setenta compuestos fueron identificados por GC y GC-MS en los AEC analizados con intervalos de alrededor de dos meses durante un año (Tabla 8). En esta oportunidad fueron destiladas las hojas y los tallos por separado. Los rendimientos de AE fueron del 0.8% V/P para las hojas y 0.08% V/P para los tallos, ambos expresados sobre peso seco. En los dos casos, geranial, neral y limoneno fueron los principales compuestos representando el 69-72% y 53-69% en hojas y tallos, respectivamente. La variación de composición de los aceites esenciales de los tallos es más amplia que en las hojas. No hubo diferencias significativas entre la composición de hojas y tallos para la misma época.

Tabla 8. Principales compuestos determinados por Gomes *et al.* (2006) en AEC.

Fecha de recolección	jul-99	sep-99	nov-99	abr-00	jun-00
Compuesto	Porcentajes				
sabineno	1.1	0.8	0.7	0.7	1.1
6-metil-5-hepten-2-ona	0.3	0.3	0.7	0.4	0.4
limoneno	9.6	5.6	7.3	7.3	9.8
1,8-cineol	0.1	0.1	0.2	0.2	0.1
<i>trans</i> - β -ocimeno	2.0	2.6	2.7	3.1	1.5
linalol	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
α -tuyona	0.2	0.1	0.4	0.2	0.4
<i>trans</i> -óxido de limoneno	0.7	0.5	1.0	0.7	1.1
citronelal	0.5	0.6	0.9	0.6	0.7
α -terpineol	0.3	0.1	0.2	0.3	-
neral	25.8	26.2	27.4	25.7	25.7
geranial	36.3	38.5	35.0	36.2	33.7
acetato de geranilo + β -bourboneno	0.9	1.1	1.3	1.3	1.2
α -cedreno	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2
<i>trans</i> - β -cariofileno	2.3	2.1	1.8	1.5	2.5
<i>trans</i> - β -farneseno	0.2	0.3	0.3	0.2	0.3
germacreno D	2.7	3.9	2.0	3.1	2.8
α -curcumeno	1.0	0.6	1.0	0.8	1.7
α -zingibereno	2.8	4.4	3.0	5.7	3.7
γ -cadineno	1.0	1.0	0.6	0.9	1.1
<i>trans</i> -nerolidol	tr	tr	tr	tr	tr
espatulenol	0.1	0.1	3.3	0.8	2.2
óxido de cariofileno	2.5	1.6	3.3	0.8	2.2

tr: porcentaje menor a 0.05%.

Argyropoulou *et al.* (2007) estudiaron la composición química del AE extraído de las hojas provenientes de Atenas, Grecia. Las muestras fueron recolectadas, por un lado en mayo, cuando la tasa de crecimiento es máxima en dicha región y por otro lado, en septiembre, en plena floración. En ambas muestras los principales compuestos fueron limoneno, geranial y neral, constituyendo el 66.3% de la composición química total de aceite en mayo, aumentando a 69% en septiembre (ver tabla 9). La diferencia más significativa entre las dos etapas de desarrollo estudiadas fue el cambio en los porcentajes de citral y limoneno. La variación de los porcentajes

está posiblemente relacionada con la floración, cuando la defensa de la planta contra los supuestos enemigos aumenta, también podría tener el propósito de disuadir o atraer a los insectos o microorganismos para resistir algunos patógenos que podrían afectar a la planta durante esta etapa. Los autores sostienen que otra posible razón podría ser la diferencia en el estado fenológico de las hojas utilizadas. En mayo, no todas las hojas se habían expandido, mientras que en septiembre solo había hojas maduras, donde los tricomas glandulares podrían acumular más limoneno que citral. Se ha informado que la variación en la composición de un AE se puede relacionar con la edad de las hojas (Gershenzon *et al.*, 2000; Dudai *et al.*, 2001). En este trabajo también se analizaron los distintos aceites esenciales por espectrometría FT-IR para la determinación cualitativa de los compuestos principales, lo que representa una huella digital y se podría utilizar para el control de calidad de *A. citrodora*.

En el año 2008, Romeo *et al.*, analizaron muestras comerciales proveniente de la empresa Polichimica, Bolonia. Los compuestos principales fueron 1,8-cineol (6.4%), neral (36.2%) y geranial (41.9%) (ver Tabla 9). En el mismo año, Ali *et al.* analizaron por GC-MS la composición química del AEC de plantas provenientes de Marruecos. Los compuestos principales determinados en esta oportunidad fueron 1,8-cineol (9.1%), isomentona (6.4%), mentol (5.1%), β -cariofileno (10.7%), α -bergamoteno (5.3%), citral (14.2%) y citronelol (8.9%), entre otros. No existen otros trabajos en la literatura que indiquen la presencia de eugenol e isomentona, entre otros compuestos citados en este artículo para AEC.

En el año 2015, Bensabah *et al.* evaluaron el cambio en la composición química del AE de cedrón utilizando para el riego agua purificada y agua residual depurada de la ciudad de Settat, Marruecos. Después del riego por las aguas residuales observaron leves cambios en los principales compuestos que estaban presentes en el AE: disminución del neral (de 15.29% a 14.34%), geranial (de 15.63% a 14.75%) y aumento de limoneno (de 23.39% a 25.86%).

Tabla 9. Resumen de compuestos principales encontrados en AEC en Europa, Asia y África

	(Francia)	Francia Comercial	Italia Comercial	Italia comercial	Merelim (Portugal)	(Portugal)	Marruecos	Marruecos	Marruecos	Grecia	Grecia
Referencia	1	4	3	8	6	6	5	2	9	7(mayo)	7(sept)
Componentes	Porcentajes										
α -pineno	-	-	-	-	-	-	0.7	-	0.9	-	-
sabineno	tr	2.5	-	-	2.9	1.9	-	0.2	2.2	0.7	1.8
1-octen-3-ol	-	-	-	-	-	-	5.4	-	-	-	-
6-metil-5-hepten-2-ona	1.7	-	0.6	-	1.0	0.5	-	7.4	-	0.4	0.5
limoneno	4.2	17.3	0.5	-	15.4	14.7	10.1	3.7	23.4	5.8	17.7
1,8-cineol	3.0	2.4	0.9	6.4	1.6	0.2	6.1	12.4	-	-	-
<i>cis</i> - β -ocimeno	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	1.3	1.9
<i>trans</i> - β -ocimeno	0.8	3.5	-	-	-	-	-	-	2.4	-	-
linalol	0.5	-	0.5	1.5	0.4	0.3	0.6	1.3	-	0.3	0.4
α -tuyona	-	-	-	-	0.5	0.2	-	0.3	-	-	-
α -terpineol	2.5	-	1.6	0.4	0.5	0.3	1.2	2.3	-	0.9	1.8
citronelol	1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
nerol	5.2	-	0.5	-	-	-	11.9	-	1.6	0.9	0.8
neral	12.0	12.0	2.2	36.2	22.9	23.3	-	6.9	15.3	24.5	21.8
carvona	-	-	0.5	-	-	-	-	0.8	-	-	-
geraniol	6.0	-	0.8	-	-	-	15.4	0.5	-	6.0	0.8
geranial	26.0	18.5	3.2	41.9	29.5	31.9	-	9.9	15.6	38.7	26.8
acetato de nerilo	-	-	-	-	-	-	-	-	4.8	-	-
acetato de geranilo	1.8	1.3	1.6	3.9	-	-	2.0	1.6	-	1.1	0.8
β -burboneno	-	-	tr	-	-	-	0.8	0.8	-	-	-
α -copaeno	-	-	-	-	0.8	0.9	0.9	-	2.6	-	-
α -cedreno	0.3	-	0.6	-	0.2	0.2	-	0.4	-	0.2	0.3
<i>trans</i> - β -cariofileno	3.0	6.3	0.4	-	1.3	2.4	-	0.4	3.5	1.8	1.6
ar-curcumeno	4.5	-	7.7	-	2.2	1.1	5.9	4.6	9.4	3.1	2.5
germacreno D	1.8	4.0	-	-	0.4	2.5	-	-	-	-	-
α -zingibereno	-	-	-	-	0.3	3.0	-	-	-	0.6	0.3
biclogermacreno	4.8	-	-	-	-	-	-	-	-	2.4	1.2
farneseno*	-	5.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
γ -cadineno	-	-	-	-	-	-	-	-	3.9	-	-
<i>trans</i> -nerolidol	1.3*	-	3.8	-	0.4	tr	2.1	1.2*	-	0.9	0.9
espatulenol	2.5	-	23.2	-	2.2	0.1	13.1	5.2	6.3	0.9	3.1
óxido de cariofileno	-	-	tr	-	1.8	2.5	5.6	5.5	6.4	0.8	0.9

*isómero no identificado. tr: porcentaje menor a 0.05%.

1-Buil *et al.*, 1975; 2-Bellakhdar *et al.*, 1994; 3-Crabas *et al.*, 2003; 4-Ohno *et al.*, 2003; 5-Chebli *et al.*, 2004; 6-Santos-Gomes *et al.*, 2005; 7-Argyropoulou *et al.*, 2007; 8-Romeo *et al.*, 2008; 9-Bensabah *et al.*, 2015.

La fracción volátil es la característica más destacada del cedrón. Su rendimiento en AE varía entre 0.2 y 1.0%, dependiendo de diversos factores.

El principal compuesto presente en la esencia es el citral (mezcla de los isómeros neral y geranial). Los aceites esenciales provenientes de América, Europa, Asia y África muestran, en su gran mayoría, este perfil típico.

Sin embargo, como se detalló en la tabla 3 diferentes autores encontraron en la Argentina AEC con composiciones químicas diferentes. Este fue uno de los motivos que originó el desarrollo de este trabajo de tesis.

2.3.3 Bioactividades de la fracción volátil

Se sabe que los productos vegetales son una fuente interesante para el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos o con bioactividades aplicables en la industria. Los constituyentes presentes en la fracción volátil de las plantas suelen ser en este sentido recursos muy buscados, debido a la facilidad con que pueden ser aislados y muchas veces purificados. A continuación se resumen las distintas actividades evaluadas en aceite esencial de cedrón.

2.3.3.1 Actividad insecticida

En el año 2006, Amer y Mehlhorn probaron la actividad del AE contra larvas de *Aedes aegypti*. El ensayo se realizó a una concentración de 50 ppm y en 4 condiciones diferentes de almacenamiento: abierto, cerrado, con luz y en la oscuridad, durante 1 mes. No reportan datos sobre la composición química. Se observó que el AE eliminó solamente el 30% de las larvas, cualquiera sea la condición de almacenamiento. La actividad se mantuvo durante una semana únicamente si se almacenaba el AEC cerrado en oscuridad.

Gillij *et al.* (2008) evaluaron la actividad insecticida del AEC proveniente de plantas de la provincia de Córdoba (Tabla 1) contra el mosquito *Aedes aegypti*, seleccionado debido a que es el vector transmisor del dengue y de la fiebre amarilla. El estudio fue realizado con seres humanos. Se utilizó el antebrazo, en donde a un círculo de 30 mm de la piel expuesta se le aplicaron 60 µl del producto a analizar. Se utilizó etanol como control. Las pruebas se realizaron mediante la colocación de los

antebrazos en una jaula en donde se encontraban los mosquitos, durante 5 min, 10 min después de la aplicación del aceite y luego cada 30 minutos hasta que el sujeto recibió una picadura de mosquito. La protección en tiempo se registró como el tiempo transcurrido entre la aplicación de repelentes y la observación de la picadura. Si no se produjeron picaduras a los 90 minutos, las pruebas se suspendieron y la protección en tiempo fue registrado como 90 min. Se midió el tiempo de repelencia, siendo para la muestra de Córdoba de 50.0 ± 10 min y para la de Traslasierra de 90.0 ± 0 min. La diferencia de concentraciones de limoneno puede explicar, según los autores, las diferencias de tiempo encontradas entre las dos muestras, ya que este compuesto es considerado un repelente eficaz contra el *A. aegypti*. Los autores seleccionaron la muestra de Traslasierra para ser probada a distintas concentraciones ya que el tiempo de repelencia obtenido fue el más promisorio. Se obtuvieron los siguientes resultados de tiempos de repelencia: para una concentración de 50%= 70 ± 20 min, para una concentración de 25%, el tiempo fue de 90 ± 0 min y para una concentración de 12.5% fue de 90 ± 0 min. Esta esencia sería potencialmente útil como repelente del mosquito, según los autores, ya que a bajas concentraciones (12%) sigue manteniendo acción repelente.

En 2009, Benzi *et al.* evaluaron la actividad insecticida y repelente del AEC contra *Rhizopertha dominica*, un pequeño escarabajo de color café oscuro y cuerpo cilíndrico, que pertenece a la familia Bostrichidae. Es considerado una plaga de importancia comercial ya que la larva puede entrar en las semillas y desarrollarse en su interior. En este ensayo se compararon las actividades de AEC, cuya composición química está informada en la tabla 1, AE de *Aloysia polystachya* y AE de *Schinus molle*. En las pruebas de uso tópico el AEC presentó la menor eficacia de las 3 esencias analizadas. En el caso de los ensayos de repelencia, el AEC fue informado como el más eficaz de los 3 AE ensayados frente a *R. dominica*.

En la Argentina, la soja [*Glycine max* (L.) Merrill] es un cultivo muy importante que se ha expandido desde su introducción hace 40 años. La chinche verde del sur, *Nezara viridula* L., causa importantes daños a los cultivos de soja desde el estadio de ninfa secundaria hasta adulta. Puede causar retraso en la maduración de los cultivos y reducir la cantidad y calidad de semillas viables. El control de esta plaga se basa principalmente en el uso intensivo de pesticidas químicos. En la Argentina el

insecticida más utilizado es el endosulfán puro o mezclado con piretroides. En los últimos años, se han detectado algunos fracasos con este tipo de tratamientos. En la búsqueda de nuevas alternativas para el control de esta plaga, Werdin González *et al.* (2010) determinaron la composición química, la actividad ovicida, la acción fumigante, la toxicidad por contacto y el efecto repelente de AE de cedrón obtenido a partir de hojas de plantas cultivadas en Bahía Blanca contra los huevos y ninfas de *Nezara viridula*. Los principales compuestos encontrados (ver Tabla 1) fueron citronelal (51.3%) y sabineno (22.9%). La actividad ovicida del aceite se puso a prueba mediante la aplicación tópica en diferentes concentraciones siendo el porcentaje de inhibición de la eclosión del 100% para una dosis de 12.5 µg/huevo. Se demostró que la CL₅₀ fue de 1,9 µg/huevo. La actividad fumigante a la concentración más alta probada (176 µg/ml de aire) demostró ser capaz de causar la mortalidad de más del 40% después de 6 h y 100% después de 12 h de exposición. Se determinó la CL₅₀, siendo de 29.9 µg/ml de aire, 24 h después del tratamiento. La toxicidad de contacto contra ninfas de *N. viridula* mostró 100% de mortalidad a 45 µg/cm² a las 2 h. Según estos resultados los autores sugieren que el AEC podría ser aplicado al control de las poblaciones de *Nezara viridula*. En el año anterior, Palacios *et al.* (2009) informaron que un AEC proveniente de la provincia de Córdoba, del cual los autores no publicaron datos sobre la composición química, no presentó actividad contra la mosca doméstica, *Musca domestica* L.

Tolosa *et al.* (2010) reportaron actividad del AEC contra *Pediculus capitis* (piojo de la cabeza) de plantas de origen nacional. No se indica cuál fue el lugar de recolección ni cuál la composición química de la esencia estudiada. Distinguen entre 2 quimiotipos, sin brindar ningún dato adicional. Uno de los dos quimiotipos resultó activo y el otro no. Obsérvese la importancia de indicar la composición química de la esencia analizada, ya que sin estos resultados no es posible sacar alguna conclusión válida acerca de la relación entre la actividad y la composición.

En un trabajo comparativo entre el AE de *Aloysia citrodora* y de *A. polystachya*, Benzi *et al.* (2014), demostraron que ambos aceites tenían propiedades repelente y bioinsecticida contra *Tribolium castaneum* (Herbst) y *Tribolium confusum* (Jacqueline du Val), plagas que atacan productos almacenados. Los compuestos principales

detectados en el AE fueron: citronelal 51.3%, sabineno 22.9%, ar-curcumeno 9.6%, limoneno 7.4%, cariofileno 2.4%, α -pineno 2.3%, γ -cedreno 2.3% y p-cimeno 1.8%.

2.3.3.2 Actividad antiparasitaria

Duschatzky *et al.* (2004) evaluaron la actividad contra nematodos *Meloidogyne* sp. (nematodo agallador), gusanos microscópicos no segmentados, constituyendo el grupo más abundante en el suelo. El aceite ensayado mostró una alta actividad nematicida, matando más del 80% de los jóvenes nematodos *Meloidogyne* sp., con una concentración de 667 μ l/l. Los compuestos principales están detallados en la Tabla 1. Según los autores, estos resultados sugieren que los aceites, o tal vez sus compuestos principales, podrían servir como nematicidas promisorios, pero que deberían realizarse más pruebas para poder confirmar esta afirmación.

2.3.3.3 Actividad antiviral

Con el objetivo de encontrar nuevos agentes antivirales, Duschatzky *et al.* (2005) evaluaron esta actividad en AEC, cuya composición química se informa en la tabla 1, contra los virus *herpes simplex* tipo 1 (HSV-1); *arenavirus* Junín (JUNV), agente de la fiebre hemorrágica argentina y el virus del dengue (DENV), el más importante virus transmitido por artrópodos en términos de enfermedad y de mortalidad en las regiones tropicales y subtropicales. Se realizó un estudio comparativo entre los aceites esenciales provenientes de *Aloysia citrodora*, *Pectis odorata*, *Gaillardia megapotamica*, *Heterothalamus alienus*, *Artemisia mendozana*, *Jungia polita* y *Buddleja cordobensis* recolectadas en las provincias de Córdoba, San Luis y San Juan. Entre todos los materiales evaluados, el AEC fue el único inactivo contra los tres virus.

En el año 2010, Ocazonez *et al.* estudiaron el efecto inhibitor *in vitro* de AEC en la replicación del virus del dengue en 4 serotipos (DENV-1, 2, 3 y 4). Se utilizaron estacas de plantaciones silvestres de las regiones de Cundinamarca y Antioquia, Colombia. Las mismas se transplantaron en el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales y

Agroindustrial Tropicales, ubicado en el campus principal de la Universidad Industrial de Santander (Bucaramanga). El AE de composición química reportada en tabla 4, presentó actividades similares contra DENV-1, DENV-2 y DENV-3, pero fue mucho menos activo contra DEN-4. El AE parece penetrar la piel y actuar dentro de la célula para bloquear la replicación viral. Según los autores, el uso tópico del aceite podría ser estudiado para la prevención de la infección por el virus a través de la picadura de los mosquitos vectores.

2.3.3.4 Actividad antichagásica y antileishmánica

En la búsqueda de alternativas terapéuticas para el tratamiento de estas enfermedades, Escobar *et al.* (2010) ensayaron diferentes AE provenientes de distintas especies de la familia Verbenáceas contra las formas libres e intracelulares de *Leishmania chagasi* y parásitos de *Trypanosoma cruzi*. La composición química de los AE también fue determinada. Se probaron aceites esenciales de *A. citrodora*, *Lippia alba*, *L. dulcis*, *L. micromera* y *L. origanoides* contra las formas epimastigotes y amastigotes de *L. chagasi* y la forma promastigote de *T. cruzi*, además de las líneas celulares Vero y THP-1. La composición química del AEC está citada en la Tabla 4. Observaron que el proveniente de Armenia presentó mayor actividad tripanocida y menor actividad leishmanicida que el de Río Negro. Además, ambos aceites esenciales no presentaron toxicidad frente a células Vero y THP-1.

Con la finalidad de continuar con la búsqueda de nuevas opciones para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, un grupo de Lima, Perú, realizó un trabajo de investigación acerca del efecto del AEC contra la forma epimastigotes de *T. cruzi*. El aceite analizado, del que lamentablemente no se reportó dato alguno de su composición, inhibió el crecimiento de la forma epimastigote con una CI_{50} (concentración requerida para producir el 50% de inhibición) de 96.49 $\mu\text{g/ml}$. No demostró tener efecto citotóxico contra células mamíferas, por lo cual podría ser probado en futuros ensayos clínicos (Rojas *et al.*, 2010). Posteriormente, otros autores, Rojas *et al.* (2012), determinaron la actividad anti-*Trypanosoma cruzi* del AEC en ratones, el que produjo una reducción significativa del 85.4% del pico de parasitemia con la dosis de 250 mg/kg; también produjo reducción del número de

amastigotes. Tampoco hay información acerca de la composición química del AE utilizado.

2.3.3.5 Actividad antifúngica

Fusarium verticillioides es el hongo más frecuentemente aislado en granos de maíz en la Argentina. El principal problema de las podredumbres de espiga y grano causadas por este hongo es la contaminación con micotoxinas, principalmente fumonisinas. Entre estos compuestos, la fumonisina B1 (FB1) es el metabolito más abundante. Su producción es variable, pues existen cepas que no producen esta toxina y otras que lo hacen en niveles muy altos. La toxina es muy estable por lo que es posible encontrarla también en alimentos altamente procesados. Por lo tanto, la obtención de sustancias o mezclas de sustancias eficaces para inhibir su crecimiento resultaría importante para el desarrollo de los cultivos en óptimas condiciones.

Con el objeto de encontrar nuevos antifúngicos, López *et al.*, en 2004, evaluaron la actividad de 4 aceites esenciales, a diferentes concentraciones, contra *Fusarium verticillioides* M 7075 (*F. moniliforme* Sheldon): *Origanum vulgare*, *Aloysia citrodora*, *A. polystachya* y *Mentha x piperita*. *A. citrodora* demostró tener el mayor efecto inhibitorio para el desarrollo micelar de *F. verticillioides* a 250 µl/l. A partir de estos resultados, evaluaron el efecto en la producción de FB1 utilizando el grano de maíz (*Zea mays*) como sustrato. El AE fue insertado a los 5, 10, 15 y 20 días posteriores a la inoculación con conidios de *F. verticillioides* en los granos de maíz. El aceite se aplicó en una concentración final de 45 ppm. Cuando el aceite fue inoculado los días 5, 10 y 15 se observó que se produce una disminución en la producción de FB1 con respecto al control (maíz sin tratamiento). Sin embargo, cuando éste fue inoculado el día 20, se observó un aumento en la producción de la fumonisina, aproximadamente al doble del observado para el control. Los compuestos principales característicos de esta esencia están citados en la Tabla 1. Estos compuestos mostraron propiedades antioxidantes (Koroch *et al.*, 2007) por lo que el incremento en los niveles de producción de FB1 podría deberse, según los autores, a un probable aumento de la peroxidación lipídica.

La actividad fungicida contra *Botrytis cinerea* y *Phytophthora citrophthora* fue evaluada por Chebli *et al.* (2004). *B. cinérea* es un hongo patógeno de muchas especies vegetales, aunque su hospedador económicamente más importante es la vid. *P. citrophthora* es uno de los hongos más importantes que ataca a los cítricos. El estudio consistió en la evaluación de 19 aceites esenciales de plantas medicinales provenientes de Marruecos. El AEC mostró una actividad antifúngica moderada a 250 ppm con el 68% y el 69% de inhibición de crecimiento micelar de *P. citrophthora* y *B. cinerea*, respectivamente. La composición química del AE está informada en la tabla 9.

2.3.3.6 Actividad antimicrobiana

La actividad contra *Helicobacter pylori* fue determinada por Ohno *et al.* (2003), demostrando la capacidad del AEC para el tratamiento de úlceras. Para el estudio *in vitro* se utilizaron siete cepas de *H. pylori* (ATCC43504, KP142B, KP143B, KP146B, KP206B, KP223B y CPY2052). El aceite ensayado inhibió el crecimiento de cinco de las siete cepas (excepto las cepas KP146B y KP223B) a una concentración de 0.01% V/V. Los compuestos principales de la esencia analizada fueron limoneno (17.3%), neral (12.0%), geranial (18.5%) (Tabla 9). En este trabajo los autores demostraron que los AE conteniendo citral, como son el AE de lemongrass y de cedrón, tienen fuertes efectos bactericidas sobre el crecimiento de *H. pylori*, susceptibles a antibióticos y cepas resistentes, incluso bajo condiciones ácidas.

Posteriormente un estudio comparativo de la actividad antimicrobiana de esencias de cedrón de diferentes orígenes silvestres fue llevado a cabo por Oliva *et al.* (2010). Los microorganismos ensayados fueron: bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* (leche), *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus cereus* (arroz). Bacterias Gram-negativas: *Escherichia coli* (agua), *Proteus mirabilis* (orina), *Klebsiella pneumoniae* (compost de aves de corral) y *Pseudomonas aeruginosa* (agua). Las levaduras *Candida albicans* (boca), *Rhodotorula* sp. (cereales) y *Hansenula* sp. (cereales) fueron utilizados con el fin de evaluar actividad antifúngica. Las muestras analizadas provenían de Río Primero y La Paz (Córdoba); Las Viñas (Salta);

Paraguay; Mendoza y San Luis. Los compuestos identificados están citados en la Tabla 4. Los estudios antimicrobianos se llevaron a cabo por la técnica de difusión en disco. Los compuestos principales encontrados fueron limoneno, neral y geranial en todos los aceites analizados, pero presentaron diferencias cuantitativas en el resto de los compuestos. La mayor relación citral/limoneno (16.9) y la mejor actividad antimicrobiana fue obtenida con el AE de La Paz. Las levaduras fueron los microorganismos más sensibles al ser inhibidas por todos los aceites estudiados. La muestra proveniente de La Paz mostró las zonas de mayor inhibición, con diámetros de 39 mm frente a *C. albicans* y 34 mm contra *Rhodotorula sp*, mientras que la de San Luis mostró la zona más pequeña. Las otras muestras de aceites mostraron diferentes grados de actividad de inhibición contra las levaduras. Los mejores valores de CIM para *C. albicans* fueron obtenidas con la muestra de Las Viñas (7 mg/ml) y los mejores valores de CIM para *Rhodotorula sp.* y *Hansenula sp.* se obtuvieron con las muestras de La Paz y Paraguay (7 mg/ml). Para las bacterias Gram positivas los mejores valores se obtuvieron con La Paz con valores de 28.1 mg/ml para *S. aureus* y *S. epidermidis* y 7 mg/ml para *M. luteus* y *B. cereus*. Las bacterias Gram negativas no presentaron inhibición con la excepción de *P. mirabilis* que presentó una CIM de 450 mg/ml con la muestra de La Paz. Diversos autores han reportado la actividad antimicrobiana de citral y limoneno compuestos (Onawunmi, 1989; Pattnaik *et al.*, 1996; Demo *et al.*, 2001). La actividad individual de estos compuestos, según Oliva *et al.*, podría estar sugiriendo que la relación entre ellos podría ser determinante en la actividad antimicrobiana. La muestra de La Paz mostró la mayor relación citral/limoneno y la mejor actividad antimicrobiana mientras que la de Las Viñas presentó la menor relación y la menor actividad. Las diferencias en la actividad biológica ensayada podrían atribuirse a la proporción de estos compuestos y a las posibles asociaciones entre ellos.

Sartoratto *et al.* (2004) evaluaron la actividad antimicrobiana contra las siguientes bacterias: *P. aeruginosa* (Schroeter) ATCC13388, *Salmonella choleraesuis* (Smith) CT4296, *Rhodococcus equi* (Magnussom) CCT0541, *Micrococcus luteus* (Schroeter) CCT2692, *S. aureus* (Rosenbach) CCT2740, *S. epidermidis* (Winslow & Winslow) ATCC12228, *E. coli* CCT0547, *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn CCT2576, *Enterococcus faecium* ATCC10541 (Orla-Jensen)

Schleifer and Kilpper-Balz, *E. faecium* (Orla Jensen) CCT5079 y contra el hongo *C. albicans* (Robin) Berkhout ATCC 10231. Las plantas utilizadas fueron recolectadas del campo experimental del Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas - CPQBA/UNICAMP, Campinas, Brasil. Se utilizaron las hojas recogidas en el mes de marzo, en plena floración. Las pruebas de actividad antibacteriana se llevaron a cabo por bioautografía. La actividad frente a *C. albicans* (Robin) Berkhout solo fue evaluada determinando la CIM. Los principales compuestos encontrados están citados en la tabla 4. Por los resultados de la bioautografía y CIM, el AEC estudiado demostró tener actividad contra seis de los microorganismos ensayados. Como información relevante, presentó un valor de CIM de 0.05 mg/ml contra *E. faecium* ATCC 10541, menor a la obtenida para el cloranfenicol (0.12 mg/ml) utilizado como control positivo, demostrando el potencial uso como antimicrobiano de esta esencia. Según los autores, debería hacerse un estudio bio guiado con el fin de aislar e identificar los compuestos responsables de dicha actividad.

Motivados por el incremento de patógenos genito-uritarios multirresistentes, Rojas *et al.*, en el año 2010, evaluaron la actividad antibacteriana del AEC contra 9 microorganismos patógenos asociadas a infecciones del tracto urinario, 11 aislados asociados a vaginosis bacteriana y 5 cepas de referencia por el método de difusión en agar con discos. La composición química determinada por GC-MS esta citada en la tabla 4. Fue importante la actividad del aceite observada contra dos cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), *E. coli* BLEE (URO 1) y *Klebsiella ozaenae* BLEE (URO 7), y una cepa de *Klebsiella ozaenae* multirresistente (URO 11), con valores de CIM de 20 µg/ml, 50 µg/ml y 20 µg/ml, respectivamente. Basado en el efecto inhibitorio contra bacterias multirresistentes y la bajas CIM demostradas, los autores sugieren que este AEC sería importante como fuente de obtención de sustancias con alta actividad antibacteriana, con posibles aplicaciones en preparaciones farmacéuticas para el tratamiento de infecciones causadas por estos microorganismos.

Un trabajo con una muestra comercial de AEC fue realizado por Romeo *et al.* (2008), donde evaluaron la capacidad antimicrobiana contra *E. coli*, *S. aureus* y *Listeria innocua*. Los compuestos principales detectados fueron: 1,8-cineol (6.4%),

neral (36.2%) y geranial (41.9%). Probaron la actividad a diferentes concentraciones: puro, al 10%, al 5%, al 1%, al 0.1% y al 0.01%. El aceite puro fue muy activo contra *S. aureus* mientras que contra *E. coli* fue poco sensible a todas las dosis ensayadas. Contra *L. innocua* se observó solo acción bacteriostática.

Paralelamente, Ali *et al.*, 2008, determinaron la actividad antimicrobiana de un AE de plantas provenientes de Marruecos contra *B. subtilis*, *Listeria monocytogenes* (NCIMB 50007), *S. aureus* (ATCC 29213), *Salmonella spp.*, *P. aeruginosa*, *E. coli* (ATCC 25922), *C. albicans*, *Phanerochaete chrysosporium* (NRRL 6361), *Trichoderma reesei* (NRRL 11236) y *T. viride* (EMCC 107). Los compuestos principales encontrados en esta esencia fueron: citral (14.2%) y β -cariofileno (10.7%). La muestra analizada solo presentó actividad contra *B. subtilis* y contra *C. albicans* con un halo de inhibición de 15 mm y 8 mm de diámetro respectivamente.

Se probaron contra *Aeromona* sp. 5 muestras provenientes de extracciones por fluidos supercríticos de hojas de cedrón en diferentes condiciones. Los extractos se obtuvieron a partir de las hojas secas mediante una extracción con CO₂ presurizado a 30, 50 y 70°C, y 100, 150 y 200 bar. La actividad antibacteriana se ensayó por el método de microdilución. El rendimiento, composición química y la actividad antibacteriana de los extractos resultaron dependientes de las condiciones de extracción. Mono y sesquiterpenos fueron los principales constituyentes de todos los extractos (neral, geranial, ar curcumeno y óxido de cariofileno). Todos los extractos ensayados presentaron moderada actividad antibacteriana contra *Aeromonas* sp. (Parodi *et al.*, 2013).

Existen trabajos acerca de la actividad antimicrobiana que presentan reiteradamente ciertos inconvenientes. Por ejemplo, Demo *et al.*, (2005), evaluaron la actividad antibacteriana y antifúngica de aceites esenciales obtenidos de plantas medicinales de Río Primero, Córdoba, contra diferentes microorganismos, utilizando el método de difusión del disco. El AE fue ensayado contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. cereus*, *Micrococcus luteus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *Klebsiella sp.*, *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis* y la levadura *C. albicans*, presentando actividad contra todos los microorganismos ensayados menos contra *P. aeruginosa*. El problema nuevamente es que en este trabajo no hay referencia alguna a la composición química de la esencia, con lo cual el mismo tiene una validez restringida, no

pudiéndose comparar con otros trabajos que reportan la misma actividad (Bandoni *et al.*, 2009).

Lo mismo sucede con un trabajo realizado por Guarrera *et al.* (1995) que se refiere a la actividad antimicótica del AE obtenido de hojas de plantas del jardín botánico de la Universidad “La Sapienza”, en Roma. Los microorganismos testeados fueron: *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Tricophyllum mentagrophytes*, *C. albicans*, *Aspergillus niger*. El microorganismo más sensible resultó ser *M. gypseum* con un halo de inhibición de 10.2 mm a una concentración de 600 ppm. La actividad contra *C. albicans* fue despreciable y no fue activo contra *A. niger* a ninguna concentración. No hay referencia de la composición química del aceite utilizado.

Un trabajo muy citado por diversos autores es el de Teixeira-Duarte *et al.* (2005) en el que se evaluó la actividad antimicrobiana de plantas de origen brasilero contra *C. albicans*. El primer problema que presenta este trabajo es que la composición química de la esencia analizada está incompleta, ya que la suma total de los compuestos identificados alcanza solo el 75.3% del total, pero además observaron la presencia de geranial, pero no de neral, algo que es poco probable que ocurra en la naturaleza. Además, los autores dicen que el aceite estudiado presenta actividad moderada frente a *C. albicans*, lo que no concuerda con lo publicado en la tabla de dicho trabajo.

2.3.3.7 Capacidad antioxidante

La investigación de las propiedades antioxidantes de plantas medicinales lleva décadas marcando un crecimiento sostenido. Un número importante de productos obtenidos del reino vegetal, como los aceites esenciales, alcaloides y los polifenoles, posee efectos antioxidantes, los que son evidenciados mediante diferentes ensayos *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, resulta difícil armonizar y extrapolar los resultados reportados, dada la gran variedad de ensayos empleados y las limitaciones asociadas a cada uno de ellos.

Diversos investigadores estudiaron las capacidades antioxidantes del AEC. Tal es el caso de Stashenko *et al.* (2003), quienes realizaron la evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro* del AE reportado en la tabla 4. La capacidad

antioxidante *in vitro* fue medida en un sistema lipídico modelo (emulsión de ácido linoleico). El efecto protector del AE se incrementó con el aumento de su concentración. A valores de concentración de 10 g/l mostró un poder antioxidante *in vitro* igual o mayor que la vitamina E y el BHA.

Pereira y Meireles (2007), analizaron la capacidad antioxidante de extractos obtenidos por fluidos supercríticos. Todos los extractos obtenidos por esta tecnología presentaron mayor capacidad antioxidante que el control (β -caroteno). La misma estuvo comprendida entre 65 y 86%, después de 2 horas de tiempo de reacción, siendo el de mayor actividad el obtenido a 35°C y 150 bar. Esto puede deberse a que en las condiciones de temperatura utilizadas (35°C) la degradación de compuestos es mínima.

En el año 2009, Poblete *et al.*, evaluaron la capacidad antioxidante de la infusión, utilizando dos metodologías: empleando fluoresceína (ORAC-FL) y rojo de pirogalol (ORAC-PGR). Los valores ORAC-FL se asocian con la concentración de polifenoles de la muestra. Por otro lado, los valores ORAC-PGR se refieren a la cantidad y la calidad media de los antioxidantes presentes en la muestra ensayada. Los resultados obtenidos fueron 0.20 ± 0.01 equivalentes de ácido gálico (EAG) para ORAC-PGR y 9.45 ± 0.24 EAG para ORAC-FL.

2.3.3.8 Actividad anestésica

El interés en anestésicos naturales se ha incrementado en el campo comercial referido a la acuicultura, ya que reducen el número de lesiones en peces durante la captura, manejo y transporte. Según Daniel *et al.*, 2014, ejemplares de *Rhambdia quelen*, conocido vulgarmente como bagre, que han sido colocados en agua conteniendo una concentración de 40 μ l/l de AEC, mostraron un retraso en la pérdida de frescura y un mayor tiempo de conservación en hielo, aumentando su vida útil luego de ser congelado. En el AE utilizado para este ensayo se identificaron 29.4% neral, 20.8% geranial, 11.9% limoneno, 5.6% cariofileno, 3.3% cubenol, 3.0% acetato de geranilo y 2.3% de óxido de cariofileno.

Dentro del mismo grupo de trabajo, Parodi *et al.*, 2014, demostraron que los bagres pueden llegar a un estado de anestesia profunda utilizando concentraciones

de AEC que varían entre 100-800 µl/l, sin observarse mortalidad, siendo 200 µl/l la mejor concentración encontrada.

2.3.3.9 Actividad antiespasmódica

En el año 1985, Torrent Martí realizó el estudio de la actividad antiespasmódica *in vitro* del AEC de La Florida, Barcelona, recolectado en prefloración. Realizó el ensayo en duodeno y en íleon aislados de rata. Comprobó que el mismo posee marcado efecto espasmolítico de naturaleza musculotrópica. La acción directa del aceite sobre la musculatura duodenal provocó relajación potente frente al Cl₂Ba (tóxico muscular). La actividad anticolinérgica se manifestó por la disminución del estímulo provocado por la acetilcolina. No hay datos acerca de la composición química del AE.

2.3.3.10 Actividad antidiarreica

En un trabajo publicado en el año 1998, Pérez *et al.*, le atribuyen al aldehído C₉, nonanal, la propiedad de ser antidiarreico *in vivo*. En trabajos previos, estos autores habían evaluado la actividad antidiarreica de una esencia de cedrón comercial proveniente de Sonora, México. Al afirmar que la esencia poseía nonanal, decidieron evaluar la actividad del aldehído puro. Encontraron que el mismo presentó dicha actividad y entonces le atribuyeron al AEC la capacidad de ser antidiarreico. No hay ningún otro trabajo que reporte nonanal como compuesto del AEC, por lo que es probable que esa muestra comercial analizada estuviera adulterada o alterada.

2.3.3.11 Citotoxicidad

La composición del AEC de plantas recolectadas en la ciudad de Armenia, Quindío (Colombia) y su citotoxicidad fue evaluada frente a *Artemia franciscana* por Olivero-Verbel *et al.* (2009). La muestra analizada mostró una CL₅₀ de 8.72 µg/ml y 3.44 µg/ml, luego de 24 y 48 h de exposición, respectivamente, demostrando tener alta toxicidad. La composición de la misma está informada en la tabla 4.

2.3.3.12 Toxicidad

La International Fragrance Association (IFRA), constituida en Ginebra fue fundada en 1973 y representa los intereses colectivos de los productores de fragancias. La membresía está abierta a las asociaciones de fabricantes de perfumes de todos los países y regiones, y en la actualidad incluye a miembros de Asia, Europa y América. IFRA desarrolla e implementa un código de prácticas, ofreciendo recomendaciones para las buenas prácticas y guías sobre la evaluación de seguridad de cada ingrediente utilizado en perfumería e incluye normas de seguridad que pueden limitar o prohibir el uso de ciertas materias primas. El Código ha sido utilizado en todo el mundo desde 1973. Es vinculante para todos los miembros y es considerado en las normativas de muchos países, incluso en el Mercosur.

Dentro de este contexto, se evaluó el absoluto de cedrón, cuyos compuestos incluyen limoneno, 1,8-cineol, octen-3-ol-1, β -cariofileno, neral, geranial, α -terpineol, acetato de geranilo, ar-curcumeno, nerol, geraniol, alcohol feniletílico y óxido de cariofileno para evaluar su probable toxicidad.

Toxicidad aguda:

La DL_{50} vía oral de esta esencia fue mayor a 5 g/kg y DL_{50} vía dérmica fue mayor a 5 g/kg, ambas probadas en ratas. Se reportaron 0/10 muertes.

Irritación dérmica: La muestra pura en una concentración de 5 g/kg provocó, en conejos, irritación de leve a moderada después de una aplicación durante 24 hs. La aplicación en 52 voluntarios de un parche con una concentración de 12% del absoluto en vaselina no produjo irritación. La misma prueba se realizó al 2% de concentración en 27 voluntarios, obteniéndose igual resultado.

Una mezcla de absoluto:limoneno (80:20) fue testada en 28 voluntarios. Se les colocó un parche con una concentración de 15% durante 24 horas. La muestra no provocó irritación.

Sensibilización: se probaron 3 muestras diferentes, todas al 12%, en 79 voluntarios. La primera muestra produjo 2/26 (8%) reacciones de sensibilización. La segunda provocó 1/26 (3,8%) reacciones positivas. La tercera muestra no provocó alguna reacción a las 27 personas restantes. Una mezcla de absoluto:limoneno (80:20) fue

testada en un test de maximización, en una concentración al 15%, en 28 voluntarios. Solo una reacción fue observada.

Fototoxicidad: dos muestras diferentes se aplicaron sin diluir en ratones sin pelo. Se irradió la zona con rayos UVA. Ningún efecto fototóxico fue observado.

Como conclusión de estos resultados, IFRA recomienda el uso del absoluto de cedrón (pero no del concreto) solamente hasta el 0.2% en productos cosméticos y 2.0% en los productos que no se apliquen en la piel.

IFRA también evaluó el AE de cedrón, cuyos compuestos incluyen: limoneno, 1,8-cineol, neral, geranial, geraniol, citronelol, nerol, acetato de geranilo, α -pineno, metil-heptenona, sabineno, *trans*-ocimeno, linalol, α -terpineol, β -cariofileno y óxido de cariofileno con los siguientes resultados:

Toxicidad aguda:

La DL₅₀ vía oral de 2 muestras diferentes fue mayor a 5 g/kg, reportándose 0/10 y 1/10 muertes respectivamente. La DL₅₀ dérmica, probada en cobayos, fue mayor a 5 g/kg reportándose 0/10 muertes. También se probó la DL₅₀ dérmica en conejos, siendo de 1.25 g/kg y 0/2 muertes, mientras que a 5 g/kg las muertes fueron 2/2. También está reportada que a DL₅₀ de 5 g/kg y 0/5 muertes.

Irritación dérmica: dosis de 1.25 o 5 g/kg de AEC puro produjeron de moderado a marcado edema y eritema en conejos después de una aplicación ocluida por 24 hs. En cobayos, una dosis de 5 g/kg provocó edema moderado y eritema.

La aplicación en 159 voluntarios de un parche por 48 hs, con una concentración de 12% de 6 aceites esenciales diferentes, vehiculizados en vaselina, provocó 2 reacciones de irritación (1.25%).

Sensibilización: se realizó el ensayo de maximización utilizando diferentes muestras, todas al 12%. La primera muestra provocó 0/30 reacciones de sensibilización y 1/30 reacciones de irritación, la segunda 13/25 (50%) de sensibilización, la tercera 18/25 (72%) de sensibilización, la cuarta 2/28 casos de sensibilización y 1/28 de irritación, la quinta provocó 15/25 de sensibilización y la sexta 4/26 de sensibilización. La concentración utilizada para este ensayo estuvo basada en que el máximo reportado para productos de consumo era de 1.2%.

Fototoxicidad: seis muestras diferentes fueron probadas. Tres muestras no produjeron efectos fototóxicos cuando se aplicaron sobre la piel de ratones sin pelo o cobayos seguidos de irradiación con rayos UVA. Otra muestra probada pura provocó fototoxicidad, pero diluida al 12% en metanol, no causó efecto alguno. Una muestra de origen marroquí provocó irritación y fototoxicidad en las mismas condiciones de ensayo. Sin embargo, diluida al 50% en metanol fue irritante pero no fototóxica.

Como resultados de estos ensayos IFRA no recomienda el uso del AE de cedrón en productos cosméticos, sin considerar la notable variación en los resultados obtenidos con las diferentes muestras, de las cuales nada se informa acerca de su composición química.

Tabla 10. Resumen de actividades reportadas para el AEC

Actividad	Blanco ensayado	Observaciones	Composición química	Referencias
Insecticida	<i>Aedes aegypti</i> (+)	<i>in vivo</i>	no informada	Amer <i>et al.</i> (2006)
	<i>Aedes aegypti</i> (+)	<i>in vivo</i>	Tabla 1	Gillij <i>et al.</i> (2008)
	<i>Rhizopertha dominica</i> (+)	<i>in vivo</i>	Tabla 1	Benzi <i>et al.</i> (2009)
	<i>Nezara viridula</i> (+)	<i>in vivo</i>	Tabla 1	Werdin Gonzalez <i>et al.</i> (2010)
	<i>Musca domestica</i> (var.)	<i>in vivo</i>	no informada	Palacios <i>et al.</i> (2009)
	<i>Pediculus capitis</i> (+)	<i>in vivo</i>	no informada	Tolozza <i>et al.</i> (2010)
	<i>Tribolium castaneum</i> (+) <i>Tribolium confusum</i> (+)	<i>in vivo</i>	Tabla 1	Benzi <i>et al.</i> (2014)
Antiparasitaria	<i>Meloidogyne sp</i> (+)	<i>in vivo</i>	Tabla 1	Duschatzky <i>et al.</i> (2004)
Antiviral	<i>Virus Herpes simplex</i> tipo I (-), <i>Arenavirus Junin</i> (-), <i>Virus del dengue</i> (-)	<i>in vivo</i>	Tabla 1	Duschatzky <i>et al.</i> (2005)
	<i>Virus del dengue</i> (+)	<i>in vivo</i>	Tabla 4	Ocazonez <i>et al.</i> (2010)
Antichagásica y antileishmanica	<i>Leishmania chagasi</i> (+), <i>Trypanosoma cruzi</i> (+)	<i>in vivo</i>	Tabla 4	Escobar <i>et al.</i> (2010)
	<i>Trypanosoma cruzi</i> (+)	<i>in vivo</i>	no informada	Rojas <i>et al.</i> (2012)
Antifúngica	<i>Fusarium verticilloides</i> (+)	<i>in vitro</i>	Tabla 1	López <i>et al.</i> (2004)

Actividad	Blanco ensayado	Observaciones	Composición química	Referencias
Antimicrobiana	<i>Microsporum canis</i> (+), <i>M. gypseum</i> (++) , <i>T. mentagrophytes</i> (+), <i>C. albicans</i> (-), <i>A. niger</i> (-)	<i>in vitro</i>	no informada	Guarrera <i>et al.</i> (1995)
	<i>Helicobacter pylori</i> (+)	<i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>	Tabla 9	Ohno <i>et al.</i> (2003)
	<i>P. aeruginosa</i> (-), <i>S. choleraesuis</i> (+), <i>R. equi</i> (+), <i>M. luteus</i> (+), <i>S. aureus</i> (+), <i>S. epidermidis</i> (-), <i>E. coli</i> (-), <i>B. subtilis</i> (+), <i>E. faecium</i> (+), <i>C. albicans</i> (m)	<i>in vitro</i>	Tabla 4	Sartoratto <i>et al.</i> (2004)
	<i>S. aureus</i> (+), <i>S. epidermidis</i> (+), <i>B. cereus</i> (+), <i>M. luteus</i> (+), <i>E. faecalis</i> (+), <i>E. coli</i> (+), <i>Klebsiella sp</i> (+), <i>P. mirabilis</i> (+), <i>P. aeruginosa</i> (-), <i>C. albicans</i> (+)	<i>in vitro</i>	no informada	Demo <i>et al.</i> (2005)
	<i>Candida albicans</i> (+)	<i>in vitro</i>	Incompleta	Teixeira-Duarte <i>et al.</i> (2005)
	<i>B. subtilis</i> (+), <i>L. monocytogenes</i> (-), <i>S. aureus</i> (tr), <i>Salmonella spp.</i> (-), <i>P. aeruginosa</i> (-), <i>E. coli</i> (-), <i>C. albicans</i> (+), <i>P. chrysosporium</i> (tr), <i>T. reesei</i> (tr), <i>T. viride</i> (-)	<i>in vitro</i>	No incluida	Ali <i>et al.</i> (2008)
	<i>E. coli</i> (+++*), <i>S. aureus</i> (+-), <i>L. innocua</i> (+*)	<i>in vitro</i>	Tabla 9	Romeo <i>et al.</i> (2008)
	<i>S. aureus</i> (var.), <i>S. epidermidis</i> (var.), <i>M. luteus</i> (+), <i>E. faecalis</i> (var.), <i>B. cereus</i> (+), <i>E. coli</i> (var.), <i>P. mirabilis</i> (var.), <i>K. pneumoniae</i> (var.), <i>P. aeruginosa</i> (-), <i>C. albicans</i> (+), <i>Rhodotorula sp</i> (var.) y <i>Hansenula sp</i> (+).	<i>in vitro</i>	Tabla 1 Tabla 4	Oliva <i>et al.</i> (2010)
<i>S. aureus</i> (+), <i>E. faecalis</i> (+), <i>E. coli</i> (+), <i>K. pneumoniae</i> (+), <i>P. aeruginosa</i> (-), <i>K. ozaenae</i> (+), <i>E. aerogenes</i> (+), <i>P. mirabilis</i> (+), <i>E. faecium</i> (+)	<i>in vitro</i>	Tabla 4	Rojas, L. <i>et al.</i> (2010)	
Antioxidante	Presentan actividad	<i>in vitro</i>	Tabla 4	Stashenko <i>et al.</i> (2003)
		<i>in vitro</i>	No incluida	Pereira <i>et al.</i> (2007)
		<i>in vitro</i>	No informada	Poblete <i>et al.</i> , (2009)
Antiespasmódica	Presenta actividad	<i>in vitro</i>	No informada	Torrent Marti (1985)

Actividad	Blanco ensayado	Observaciones	Composición química	Referencias
Citotoxicidad	<i>Artemia franciscana</i> (+)	<i>in vitro</i>	Tabla 4	Olivero-Verbel <i>et al.</i> (2009)

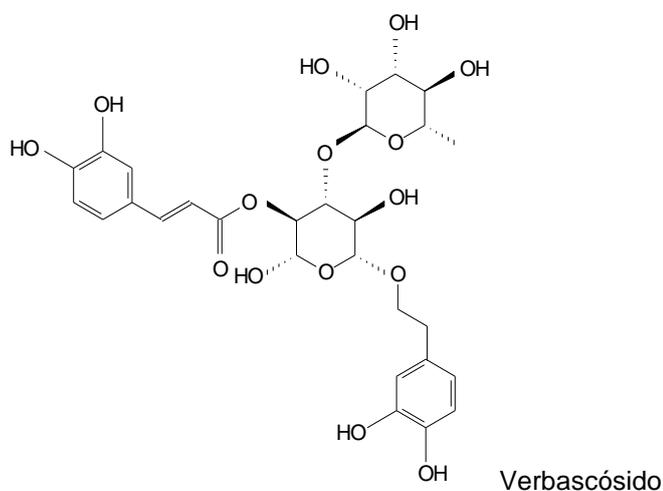
+++ muy activo, ++ actividad media, + activo, - inactivo, var. Variable (depende del AE ensayado), * AE puro

Como conclusión del análisis de los distintos trabajos científicos citados se puede observar que es muy importante la determinación de la composición química del aceite esencial para lograr una bioactividad específica, ya que es determinante en los resultados obtenidos, variable que no siempre es tomada en cuenta (Bandoni *et al.*, 2009). Además, muchos de los trabajos bibliográficos se refieren al análisis de muestras comerciales únicas, sin determinar el lugar ni la época de cultivo. Este es otro parámetro importante que también debería ser tomado en cuenta, debido a que la composición química de la esencia puede variar en función del origen y del estado fenológico de la planta (Santos-Gomes *et al.*, 2005).

Es difícil comparar todos los resultados obtenidos debido a las diferencias en cuanto a la composición química que presentan todos los AEC analizados. Probablemente estas variaciones se deban a la existencia de distintos quimiotipos, diferentes épocas de cosecha, diferentes métodos de extracción, etc. La información descrita muestra claramente cómo influye la composición química de cada AE en todas y cada una de las actividades ensayadas. Esto también sugiere que la composición química del genotipo se debe tomar en cuenta en el momento de realizar cualquier tipo de ensayo. Es muy importante conocer el origen, la fecha de recolección, el estado fenológico de la planta y fundamentalmente la composición química de la esencia antes de realizar cualquier ensayo farmacológico.

2.3.4 Composición química de la fracción no volátil

Los compuestos no volátiles mayoritarios identificados en el cedrón pertenecen al grupo de los polifenoles, siendo el principal compuesto encontrado el verbascósido, también llamado acteósido, que es un glicósido presente en numerosas especies (Alipieva *et al.*, 2014). Es un disacárido cafeoil ester, caracterizado por la presencia en su molécula de un resto de ácido cafeico y un resto feniletanólico unidos a la ramnosa del disacárido α -ramnopiranosil- β -glucopiranososa. Los polifenoles constituyen un grupo de compuestos orgánicos que son biosintetizados a partir de la fenilalanina.



Además de este compuesto, muchos flavonoides y algunas otras sustancias han sido aisladas e identificadas en esta especie. A continuación, se describe la búsqueda realizada sobre estos antecedentes, ordenando la información de acuerdo a la región geográfica comprendida, considerando que varios factores exógenos (latitud, suelo, altitud, clima) pueden influir en los resultados encontrados.

Argentina

Mendiondo *et al.*, (1973), en una marcha fitoquímica reconocieron en las hojas de cedrón la presencia de aminoácidos, esteroides o triterpenos y flavonoides.

Ragone *et al.* (2007) estudiaron la composición química de cedrón proveniente de muestras comerciales argentinas. Determinaron por HPLC la presencia de los flavonoides vitexina e isovitexina. Posteriormente, Wernert *et al.* (2009), evaluaron la composición de hojas de cedrón provenientes de un cultivo controlado en Barreal, Provincia de San Juan. Para ello determinaron el contenido de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu y compararon los valores obtenidos por infusión y cocimiento. Los contenidos fueron: para infusión 51.85 ± 3.17 mg equivalente de ácido tánico (EAT)/g material seco y para cocimiento 51.53 ± 3.49 mg EAT/g material seco. También cuantificaron los taninos totales, siendo para la infusión de 5.95 ± 0.65 mg EAT/g material seco y para el cocimiento: 8.90 ± 0.90 mg EAT/g material seco. Los resultados de la cuantificación de flavonoides totales fueron para infusión: 20.82 ± 1.80 mg equivalente de rutina (ER)/g material seco y para el cocimiento: 20.67 ± 1.70 mg ER/g material seco. No detectaron la presencia de taninos condensados.

También en el año 2009, Dadé *et al.* determinaron la capacidad antioxidante y el contenido de fenoles totales de 21 extractos acuosos de plantas nativas (comerciales) del Valle de Traslasierra, entre ellos el cedrón. El contenido de flavonoides totales para la infusión dio 0.50 ± 0.04 EAC (equivalentes de rutina)/mg de material seco. El contenido de polifenoles totales dio 1.70 ± 0.19 equivalentes de ácido cafeico/mg de material seco.

Rodríguez Vaquero *et al.* (2010), también determinaron el contenido de polifenoles totales, mediante el método de Folin-Ciocalteu, de una infusión preparada con una muestra comercial de nuestro país. Los resultados expresados como equivalentes de ácido gálico (EAG), fueron de 533 mg EAG/l, de los cuales 479 mg EAG/l eran flavonoides.

Para determinar la dinámica de polifenoles en el cedrón, Ricco *et al.* (2011) determinaron la variación que existe entre la composición química de infusiones provenientes de hojas jóvenes y adultas. En esta oportunidad consideraron como hojas jóvenes aquellas con una longitud menor a los 3 cm y como hojas adultas aquellas con una longitud promedio de 6 cm (material fresco en ambos casos). La concentración de fenoles totales en las hojas jóvenes es aproximadamente un 89% mayor respecto del contenido presente en las hojas adultas. En el análisis de los

flavonoides totales, el contenido es aproximadamente 21.5% mayor en las hojas jóvenes. La concentración de los derivados de ácidos hidroxicinámicos en las hojas jóvenes fue aproximadamente 77.5% mayor respecto de las adultas. La cuantificación de fenoles totales se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu, la de taninos totales fue determinada por el mismo método, previa remoción de los taninos mediante su precipitación con solución de seroalbúmina bovina (BSA); la cuantificación de flavonoides, realizando una curva de calibración con rutina y la cuantificación de ácidos hidroxicinámicos totales, determinando la absorbancia a 328 nm, previa realización de una curva de calibración con ácido clorogénico. El material vegetal se obtuvo de un cultivo controlado proveniente de la localidad de Barreal, Provincia de San Juan.

América

Rimpler y Saubier, en 1986, determinaron la presencia de glicósidos iridoides en muestras del género *Aloysia*. Para el cedrón proveniente de California, encontraron la sal sódica del ácido geniposídico en una concentración de 200 ppm en hojas y de 350 ppm en raíces, además de genipósido en 210 ppm y mussaenósido en 7 ppm también en raíces.

Carnat *et al.*, en 1995, aislaron e identificaron por CCD, UV y HPLC luteolina-7-diglucurónido, en una concentración de 0.8% P/P (sobre peso seco) en muestras comerciales de hojas de cedrón.

Nakamura *et al.*, en 1997, aislaron verbascósido a partir de hojas y tallos de un extracto metanólico de cedrón por un ensayo bio guiado midiendo la actividad analgésica utilizando cromatografía en columna. El material utilizado fue de origen peruano y el rendimiento de verbascósido fue de 0.4% P/P.

Posteriormente, en 1999, Carnat *et al.* realizaron un estudio cuali-cuantitativo comparativo de hojas de cedrón de origen chileno. Para ello realizaron 3 determinaciones. Inicialmente, determinaron la composición de polifenoles por HPLC-DAD antes y después de realizada una infusión. Luego determinaron el contenido de flavonoides totales por espectrofotometría UV acomplejando la muestra

con cloruro de aluminio hexahidratado y utilizando como estándar luteolín-7-diglucurónido. Por último, determinaron el contenido total de ácidos hidroxicinámicos por espectrofotometría UV, utilizando el reactivo de Arnou y verbascósido como estándar. Los resultados se encuentran en la siguiente tabla:

Tabla 11. Determinaciones realizadas por Carnat *et al.* (1999), % expresado sobre peso seco

	Hojas antes de la infusión	Infusión	Hojas después de la infusión
Flavonoides totales	2.3	1.6	0.6
Luteolín 7-diglucurónido	1.4	1.1	0.3
Ácidos hidroxicinámicos	8.2	5.1	2.2
Verbascósido	6.5	3.9	1.9

Zheng y Wang (2001), determinaron el contenido de fenoles totales en una muestra obtenida a partir de la droga vegetal congelada y extraída con un buffer fosfato (75 mM, pH=7) por el método de Folin-Ciocalteu, dando como resultado 1.55 mg equivalentes de ácido gálico/g de droga fresca. Las muestras de cedrón fueron recolectadas en el National Herb Garden, perteneciente al U. S. National Arboretum, en Washington.

En el año 2008, Ono *et al.*, aislaron 25 compuestos a partir de un extracto metanólico de material cultivado de origen peruano. Los compuestos aislados fueron: 3 glucósidos fenilpropanoicos: eugenil- β -glucósido, 4-alil-2,6-dimetoxifenol glucósido, juniperósido, siete flavonoides: apigenina, hispidulina, jaceosidina, circilineol, eupatorina, hispidulín-7-O- β -D-glucósido, jaceosidín-7- β -glucósido, cinco glicósidos feniletanoicos: verbascósido, isoverbascósido, leucosceptósido A, martinósido, *cis*-martinósido, cinco lignanos: isolariciresinol, lioniresinol, (+)-isolariciresinol 3 α -O- β -D-glucopiranósido, (+)-lioniresinol 3 α -O- β -D-glucopiranósido, (-)-lioniresinol 3 α -O- β -D-glucopiranósido, dos sesquiterpenos: 4b,10a-dihidroxiaromadendrano, 4-bis,10-bis-dihidroxiaromadendrano y tres triterpenos: ácido ursólico, ácido oleanólico y ácido betulínico.

Galvez Ranilla *et al.* (2010), determinaron el contenido de polifenoles totales, calculados por el método de Folin-Ciocalteu, también en material vegetal proveniente de Perú. En este análisis la concentración de polifenoles totales fue de 50 mg equivalentes de ácido gálico/g.

Europa, Asia y África

En el año 1976, Torrent Martí realizó una marcha fitoquímica de hojas de cedrón de origen español, revelando la presencia de taninos hidrolizables, mucílagos, ácidos fenólicos libres y combinados, flavonoides y alcaloides. Posteriormente, con el fin de investigar la composición química de los tallos de cedrón, un grupo perteneciente a la India determinó la presencia de compuestos de naturaleza esteróidea. Los compuestos determinados en esa oportunidad fueron estigmasterol, β -amirina y β -sitosterol (Bheemasankara *et al.*, 1979).

En 1987 Tomás-Barberán *et al.* determinaron por electroforesis capilar y análisis ultravioleta, la presencia de 7-glucuronilglucósidos derivados de la luteolina, de la diosmetina y de la apigenina. La muestra analizada fueron hojas de cedrón cultivadas en el Jardín Botánico de la Universidad de Reading, Inglaterra.

En 1988, Skaltsa y Shammass analizaron las hojas de muestras comerciales del mercado griego. Para ello utilizaron cromatografía en columna y en capa delgada. El análisis de las fracciones obtenidas se realizó por UV, H-NMR y espectrometría de masas. Los flavonoides determinados fueron: salvigenina, eupatorina, eupafolina, 6-hidroxluteolina, luteolina, luteolín-7-O- β -glucósido, hispidulina, cirsimaritina, diosmetina, crisoeriol, apigenina, pectolarigenina y cirsiliol.

Es sabido que las hojas de cedrón son ampliamente utilizadas en Francia. Lamaison *et al.*, en 1993, determinaron por HPLC que la concentración promedio de verbascósido en 9 muestras comerciales fue de 5.3% P/P. En este trabajo también se determinó que la concentración de derivados hidroxicinámicos totales promedio, expresado como ácido clorogénico, fue de 7.1% P/P. Por CCD adujeron la presencia de verbascósido, ácido clorogénico y luteolín-7-glucuronilglucósido en dichas muestras.

Posteriormente en 1999, Valentão *et al.* determinaron el perfil de aglucones flavonoides de hojas de cedrón por HPLC. El extracto utilizado en este ensayo fue éter etílico, porque según los autores con este solvente se obtenían los mejores resultados. Se utilizaron muestras de 28 plantas recolectadas en distintas zonas de la región norte y central de Portugal. Los compuestos determinados fueron: luteolina, nepetina, hispidulina, jaceosidina, circimaritina, circilineol y eupatorina. Calcularon también el contenido total de flavonoides, que varió entre 300 y 2150 mg/kg sobre base seca. Los valores promedio individualmente obtenidos fueron: luteolina 44.7 mg/kg, nepetina 26.0 mg/kg, hispidulina 291.4 mg/kg, jaceosidina 344.8 mg/kg, circimaritina 45.2 mg/kg, circilineol 191.0 mg/kg y eupatorina 116.5 mg/kg.

Abu-Hamdah *et al.*, 2005, determinaron por CCD que el cedrón proveniente de Jordania contenía flavonoides y saponinas y determinaron la ausencia de alcaloides y cumarinas.

Asimismo, se ha señalado la presencia de ácido cafeico, ácido ferúlico e hidroxitirosol (Proestos *et al.*, 2006) en muestras comerciales adquiridas en Grecia.

Yoo *et al.*, 2008, determinaron el contenido de polifenoles totales en hojas de origen silvestre, recolectadas en Corea. Para realizarlo utilizaron el método de Folin-Ciocalteu y expresaron el resultado como equivalente de ácido gálico (EAG), el cual fue de 770.7 mg EAG/100 g. El contenido de flavonoides totales, expresado como equivalente de catequina (EC) fue de 431.6 EC mg/100 g de droga fresca.

Bilia *et al.*, 2008, realizaron un análisis comparativo entre diferentes preparaciones. Utilizaron hojas de cedrón cultivadas en Aboca, Italia. Realizaron 2 decocciones, ambas al 5% P/V, pero la primera (DEC1) la calentaron durante 20 minutos y la segunda (DEC2) solo 5 minutos. Por otro lado realizaron una infusión al 5% P/V (INF). Prepararon un extracto etanólico (EtOH) al 2.7% P/V, con un rendimiento del 6.97% P/P, a temperatura ambiente. Los análisis de todos los extractos obtenidos fueron realizados por HPLC, obteniéndose perfiles similares. El mayor contenido de verbascósido se obtuvo para el extracto etanólico, siendo aproximadamente del 12%.

Por otra parte, Quirantes-Piné *et al.* (2009) determinaron la composición química de un extracto comercial utilizando HPLC-MS acoplado a dos diferentes sistemas de

detección: con analizador en tiempo de vuelo (TOF) y con trampa de iones (IT). Estos procedimientos fueron útiles para determinar simultáneamente muchos compuestos fenólicos conocidos que están presentes en el cedrón como son verbascósido y sus derivados, derivados de la apigenina y la luteolina y eukovósido. También se determinaron gardósido, cistanósido F, tevéside, campneósido I, crisoeriol-7-diglucurónido, forsitósido A y acacetín-7-diglucurónido.

Paralelamente, Funes *et al.*, 2009, evaluaron la capacidad antioxidante *in vivo* de un extracto estandarizado de cedrón, conteniendo 25% P/P de verbascósido. Otros compuestos determinados por HPLC-ESI-MS-MS fueron isoverbascósido, luteolín-7-diglucurónido, martinósido, apigenín-7-diglucurónido, crisoeriol-7-diglucurónido y eukovósido.

Artemitina y hesperidina fueron aislados por primera vez de material proveniente de Jordania por Qnais *et al.*, en 2009. La identificación se realizó por comparación con espectros de H-NMR de bibliografía. De estos compuestos aislados evaluaron la actividad antinociceptiva utilizando el ensayo de la plancha caliente. Ambos compuestos dieron resultados positivos.

Poblete *et al.*, 2009, determinaron el contenido de polifenoles totales por Folin Ciocalteu en plantas de origen chileno. El resultado obtenido fue de 2.67 ± 0.01 EAG determinado en una infusión.

Analizando extractos estandarizados en el contenido de verbascósido, Funes *et al.*, (2010a), evaluaron la actividad antioxidante *in vivo* de un extracto de cedrón con 10% P/P de verbascósido, que además contenía luteolín-7-diglucurónido, crisoeriol-7-diglucurónido, isoverbascósido, acacetín-7-diglucurónido, martinósido.

Cruz *et al.* (2010), para desarrollar un método simple para la síntesis biológica de Ag nanopartículas (AGNPS), utilizaron un extracto acuoso de hojas de cedrón como agente reductor. La muestra utilizada fue comercial, adquirida en Portugal. Con el fin de identificar los compuestos responsables de la biorreducción de iones Ag^+ y la estabilización de la síntesis biológica de nanopartículas de plata AGNPS formadas, estudiaron los compuestos del extracto. Determinaron que los compuestos principales presentes por HPLC-MS/MS fueron luteolín-7-O-diglucurónido, verbascósido, crisoeriol-7-O-diglucurónido e isoverbascósido. Los

datos obtenidos sugieren que el isoverbascósido sería el responsable de la reducción de los iones Ag^+ .

Carrera Quintanar *et al.* (2010) analizaron un extracto comercial utilizado por su capacidad antioxidante como protector del tejido muscular y de las células sanguíneas del daño oxidativo, así como sus posibilidades para el mantenimiento de las articulaciones (PLX[®]- Monteloeder, España) determinando un contenido de 10 % de verbascósido y 5-8 % de otros derivados fenilpropanoicos como martinósido, eukovósido e isoverbascósido. Además, fueron encontradas pequeñas cantidades de derivados diglucurónidos de la luteolina, acacetina y crisoeriol.

La luteína es un compuesto químico perteneciente al grupo de las xantófilas. Es un pigmento amarillo encontrado en plantas, algas y bacterias fotosintéticas. Se encuentra en muchos alimentos (porotos, puerros, arándanos, brócoli, yema de huevo, espinacas, acelga, repollo, col, maíz, banana, perejil, apio, papa blanca, flor de calabaza y naranja). Debido a que los animales no producen luteína, se incluye dentro de los complementos alimentarios como antioxidante. En 2010, Loranty *et al.*, evaluaron el contenido de luteína en muestras comerciales de cedrón adquiridas en Portugal. Los resultados obtenidos fueron 8.37 ± 0.75 μg luteína/200ml infusión (equivalente a 0.4 mg % de material vegetal), siendo que el contenido de luteína en maíz es, por ejemplo, 3 mg %.

En el año 2015, Cheurfa y Allem determinaron la concentración de fenoles totales y el contenido de flavonoides de una infusión y de un extracto hidroalcohólico obtenidos a partir de hojas de cedrón de Argelia. El resultado de fenoles totales se expresó en miligramos de ácido gálico (AG) por gramo de planta. La concentración de flavonoides se expresó en mg de quercetina (Q) por gramo de planta. El extracto hidroalcohólico presentó valores de fenoles totales significativamente mayor a los calculados para la infusión. En el caso del extracto hidroalcohólico, el contenido de fenoles totales fue de 61.13 ± 0.0 mg eq AG / g y el de flavonoides fue de 6.81 ± 0.1 mg eq Q / g. En cambio, para la infusión los resultados fueron 30.84 ± 0.1 mg eq AG / g y 6.42 ± 0.1 mg eq Q / g respectivamente.

Compuestos no volátiles identificados para cedrón

A continuación se presentan los compuestos identificados en cedrón y ordenados por grupos para su mejor comprensión (Tabla 12).

Flavonoides

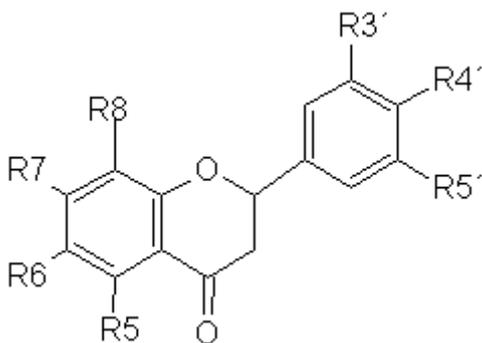


Tabla 12. Flavonoides informados para cedrón

R3'	R4'	R5'	R5	R6	R7	R8	Nombre	Publicación
H	OCH3	H	OH	H	O DIGLU	H	Acacetín 7 diglucurónido	Quirantes-Piné <i>et al.</i> (2009); Carrera Quintanar <i>et al.</i> (2010); Funes <i>et al.</i> (2010a).
H	OH	H	OH	H	OH	H	Apigenina	Skaltsa <i>et al.</i> (1988); De Vicenci <i>et al.</i> (1995); Ono <i>et al.</i> (2008).
H	OH	H	OH	H	O DIGLU	H	Apigenina 7 diglucurónido	Bilia <i>et al.</i> (2008); Funes <i>et al.</i> (2009); Quirantes-Piné <i>et al.</i> (2009).
H	OH	H	OH	H	O GLUCU	H	Apigenina 7 glucurónido	De Vicenci <i>et al.</i> (1995).
H	OH	H	OH	H	O GLUCUGLU	H	Apigenina 7 glucuronil glucósido	Tomás Barberán <i>et al.</i> (1987).
OCH3	OH	H	OH	OCH3	OCH3	H	Cirsilineol	Valentão <i>et al.</i> (1999); Ono <i>et al.</i> (2008).
OH	OH	H	OH	OCH3	OCH3	H	Cirsiliol	Skaltsa <i>et al.</i> (1988); De Vicenci <i>et al.</i> (1995).
H	OH	H	OH	OCH3	OCH3	H	Cirsimaritina	Skaltsa <i>et al.</i> (1988); De Vicenci <i>et al.</i> (1995); Valentao <i>et al.</i> (1999).
OCH3	OH	H	OH	H	OH	H	Crisoeriol	Skaltsa <i>et al.</i> (1988); De Vicenci <i>et al.</i> (1995).
OCH3	OH	H	OH	H	O DIGLU	H	Crisoeriol 7	Funes <i>et al.</i> (2009); Quirantes-Piné

Antecedentes

R3'	R4'	R5'	R5	R6	R7	R8	Nombre	Publicación
							diglucurónido	<i>et al.</i> (2009); Carrera Quintanar <i>et al.</i> (2010); Cruz <i>et al.</i> (2010); Funes <i>et al.</i> (2010a).
OH	OCH3	H	OH	H	OH	H	Diosmetina	Skaltsa <i>et al.</i> (1988); De Vicenci <i>et al.</i> (1995).
OH	OCH3	H	OH	H	O GLUCUGLU	H	Diosmetín 7 glucuronil glucósido	Tomás Barberán <i>et al.</i> (1987).
OH	OH	H	OH	OCH3	OH	H	Eupafolín/nepetina	Skaltsa <i>et al.</i> (1988); De Vicenci <i>et al.</i> (1995); Ono <i>et al.</i> (2008).
OH	OCH3	H	OH	OCH3	OCH3	H	Eupatorina	Skaltsa <i>et al.</i> (1988); De Vicenci <i>et al.</i> (1995); Valentão <i>et al.</i> (1999).
OH	OCH3	H	OH	H	O RUT	H	Hesperidina	Qnais <i>et al.</i> (2009).
H	OH	H	OH	OCH3	OH	H	Hispidulina	Skaltsa <i>et al.</i> (1988); De Vicenci <i>et al.</i> (1995); Valentao <i>et al.</i> (1999); Ono <i>et al.</i> (2008).
H	OH	H	OH	OCH3	O GLU	H	Hispidulín 7 glucósido	Ono <i>et al.</i> (2008).
H	OH	H	OH	GLU	OH	H	Isovitexina	Ragone <i>et al.</i> (2007).
OCH3	OH	H	OH	OCH3	OH	H	Jaceosidina	Valentão <i>et al.</i> (1999); Ono <i>et al.</i> (2008).
OCH3	OH	H	OH	OCH3	O GLU	H	Jaceosidín 7 glucósido	Ono <i>et al.</i> (2008).
OH	OH	H	OH	H	OH	H	Luteolina	Skaltsa <i>et al.</i> (1988); De Vicenci <i>et al.</i> (1995); Valentão <i>et al.</i> (1999).
OH	OH	H	OH	OH	OH	H	6 hidroxiluteolina	Skaltsa <i>et al.</i> (1988); De Vicenci <i>et al.</i> (1995).
OH	OH	H	OH	H	O DIGLU	H	Luteolín 7 diglucurónido	Carnat <i>et al.</i> (1999); Bilia <i>et al.</i> (2008); Funes <i>et al.</i> (2009); Quirantes-Piné <i>et al.</i> (2009); Carrera Quintanar <i>et al.</i> (2010); Cruz <i>et al.</i> (2010); Funes <i>et al.</i> (2010a).
OH	OH	H	OH	H	O GLU	H	Luteolín 7 glucósido (Cinarósido)	Skaltsa <i>et al.</i> (1988); Carnat <i>et al.</i> (1995); De Vicenci <i>et al.</i> (1995).
OH	OH	H	OH	H	O GLUCU	H	Luteolín 7 glucurónido	Carnat <i>et al.</i> (1995); De Vicenci <i>et al.</i> (1995).
OH	OH	H	OH	H	O GLUCUGLU	H	Luteolín 7 glucuronil glucósido	Tomás Barberan <i>et al.</i> (1987); Lamaison <i>et al.</i> (1993).
OH	OH	H	OH	OCH3	OH	H	Nepetina	Valentão <i>et al.</i> (1999).
H	OCH3	H	OH	OCH3	OH	H	Pectolinaringenina	Skaltsa <i>et al.</i> (1988); De Vicenci <i>et al.</i> (1995).
H	OCH3	H	OH	OCH3	OCH3	H	Salvigenina	Skaltsa <i>et al.</i> (1988).

R3´	R4´	R5´	R5	R6	R7	R8	Nombre	Publicación
H	OH	H	OH	H	OH	GLU	Vitexina	Ragone <i>et al.</i> (2007).

Tabla 13. Resumen de los derivados hidroxicinámicos determinados en cedrón

	Cruz <i>et al.</i> , 2010	Carnat <i>et al.</i> , 1999	Lamaison <i>et al.</i> , 1993	Nakamura <i>et al.</i> , 1997	Ono <i>et al.</i> , 2008	Bilia <i>et al.</i> , 2008	Funes <i>et al.</i> , 2009	Quirantes-Piné <i>et al.</i> , 2009
isoverbascósido	+				+		+	+
verbascósido	+	3.9-6.5% P/P droga	5.3% P/P droga	0.4% P/P droga	+		25% (estandarizado)	++
β OH verbascósido						+		+
β OH isoverbascósido						+		+
eukovósido						+	+	

+ detectado

Tabla 14. Otras determinaciones realizadas en cedrón

	Lamaison <i>et al.</i> , 1993	Zheng & Wang, 2001	Yoo <i>et al.</i> , 2008	Wernert <i>et al.</i> , 2009	Galvez Ranilla <i>et al.</i> , 2010	Rodríguez Vaquero <i>et al.</i> , 2010	Ricco <i>et al.</i> , 2011	Cheurfa y Allem, 2015
Fenoles totales Folin Ciocalteu		1.55 mg E AG/g de droga vegetal	770 mg E AG/100g de droga vegetal	51.5 mg ácido tánico/g material seco	50 mg E AG/g de droga vegetal	533 mg E AG/l de infusión	26.43-50.02 mg ácido tánico/g material seco	61.13 mg E AG/g (hidroalc.) 30.84 mg E AG/g (infusión)
Taninos totales				5.95-8.9 mg ácido tánico/g material seco.			15.90-16.12 mg ácido tánico/g material seco	
Flavonoides totales			431.6 mg EC/100g de droga fresca	20.7 mg rutina/g material seco.		479 mg EAG/l de infusión	20.51-24.91 mg rutina/g material seco	6,81 mg EQ/g (hidroalc) 6,42 mg EQ/g (infusión)
Ác. Hidroxicinámicos totales	7.1% P/P, expresado como ácido clorogénico						19.72-35.01 mg ácido clorogénico/g material seco	

EAG equivalente de ácido gálico. E C equivalente de catequina. E Q equivalente de quercetina

2.3.5 Bioactividades de la fracción no volátil

2.3.5.1 Actividad analgésica

Realizando un ensayo bioguiado, Nakamura *et al.* (1997) aislaron verbascósido a partir de un extracto metanólico de hojas de cedrón. Una vez obtenido el verbascósido, evaluaron su actividad analgésica en ratones mediante el método de las contorsiones inducidas por ácido acético y el test de pinzamiento de cola. La administración oral de 100, 300 y 500 mg/kg fue positiva mostrando ser dosis dependiente en el test de contorsiones. Lo mismo ocurrió con el test de pinzamiento de cola a dosis de 100 y 300 mg/kg.

2.3.5.2 Actividad espasmolítica

Los efectos espasmolíticos de un extracto acuoso de cedrón fueron estudiados en duodenos aislados de rata por Ragone *et al.* en el año 2007. El efecto antiespasmódico observado pudo ser explicado por inhibición no competitiva de la afluencia de Ca^{2+} . A bajas concentraciones, el extracto acuoso inhibió el metabolismo aeróbico. Los autores sugieren que la vitexina, pero no la isovitexina, contribuiría al efecto observado. Suponen que otros compuestos estarían implicados en el efecto espasmolítico observado. Ambos flavonoides no fueron encontrados por otros autores utilizando técnicas similares y aún más sofisticadas.

2.3.5.3 Actividad sedante

Nakamura *et al.* (1997) evaluaron la actividad sedante de verbascósido aislado a partir de un extracto metanólico de hojas de cedrón. El compuesto presentó efecto sedante leve al ser efectivo en la prolongación del efecto anestésico inducido por pentobarbital y en la disminución de la locomoción inducido por metanfetamina.

Por otro lado, también fue evaluado un extracto acuoso que produjo un importante efecto sedante en ratones, por un mecanismo de tipo benzodiazepínico (Ragone *et al.*, 2010).

2.3.5.4 Actividad quimioprotectora

Se ha probado el efecto quimioprotector de la infusión de hojas de cedrón contra el daño genético inducido por la administración de cisplatino y acrilamida (Zamorano Ponce *et al.*, 2006).

2.3.5.5 Actividad antimicrobiana

Oskay *et al.* (2005), determinaron la actividad antibacteriana frente a diferentes microorganismos, evaluando un extracto etanólico realizado a partir de hojas provenientes del Jardín Botánico de la Universidad de Celal Bayar, Turquía. Los microorganismos ensayados fueron *S. aureus* ATCC 6538P, *B. cereus* CM99, *Klebsiella pneumoniae* CCM 2318, *E. coli* ATCC 11230, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *P. fluorescens*, *Proteus vulgaris* ATCC 6997, *Salmonella typhimurium* CCM 5445, *Enterobacter faecalis* ATCC 29212, *C. albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*, *Geotrichum penicillatum*. La máxima inhibición fue presentada contra *S. aureus* y *C. albicans*, con halos de inhibición de 16 y 22 mm, respectivamente.

En el mismo año, Alanís *et al.* (2005) estudiaron la actividad antibacteriana de las partes aéreas de cedrón proveniente de México. Probaron la actividad de extractos metanólico y acuoso contra diferentes microorganismos enteropatógenos (*E. coli* ATCC 25922, *E. coli* 0157:H7, *Shigella sonnei*, *S. flexneri* y *Salmonella sp.*). Los dos extractos presentaron mediana actividad contra los microorganismos ensayados.

En 2005, Yasunaka *et al.* evaluaron la actividad contra *E. coli* K12 C600, *S. aureus* meticilín sensible (MSSA) FDA 209P y dos *S. aureus* meticilín resistentes (MRSA) N° 3208 y N° 80401. El extracto analizado fue metanólico, obtenido de muestras de origen mexicano. La CIM fue de 1024 µg/ml para *E. coli* y de 64 µg/ml para *S. aureus* 209P, 3208 y 80401.

Akroum *et al.* (2009), estudiaron plantas recolectadas en distintas localidades de Argelia o importado. El extracto metanólico analizado presentó actividad contra *S. aureus* y *B. cereus* (0.045 mg/ml) y contra *E. coli* (0.09 mg/ml).

Rodríguez Vaquero *et al.* (2010), evaluaron la actividad antibacteriana contra *E. coli* de una infusión preparada a partir de muestras comerciales de la Argentina. No presentó actividad.

2.3.5.6 Capacidad antioxidante

Diversos autores han estudiado la capacidad antioxidante de la fracción no volátil del cedrón. En todos los casos los ensayos realizados arrojaron resultados positivos.

Zheng y Wang, 2001, determinaron la capacidad antioxidante (oxygen radical absorbance capacity, ORAC) de una infusión de cedrón, siendo el valor obtenido de 17.38 μmol equivalentes de Trolox/g de droga fresca.

Posteriormente, Valentão *et al.*, 2002, evaluaron la capacidad antioxidante de material recolectado en Portugal. Considerando los resultados obtenidos, los autores llegaron a la conclusión que la infusión tiene una potente actividad antioxidante, por la actividad frente a los radicales superóxido, hidroxilo y ácido hipocloroso, aunque posee un efecto pro-oxidante en altas concentraciones.

Bilia *et al.*, 2008, observaron que tanto el verbascósido como la infusión son más activos que Trolox. Además, el verbascósido puro es menos activo que la infusión a la misma concentración de verbascósido. Este comportamiento se debe probablemente a un efecto sinérgico de compuestos fenilpropanoides presentes en el extracto.

En el mismo año, Ono *et al.* (2008), evaluaron la actividad antioxidante por el método de DPPH contra estándar de tocoferol, siendo el verbascósido y el isoverbascósido aislados los compuestos que presentaron una actividad 3 veces mayor al testigo. También se determinó la actividad de otros compuestos aislados de un extracto metanólico: leucosceptósido A, martinósido, *cis* martinósido, isolariciresinol, lioniresinol, (+)-iso-lariciresinol 3 α -O- β -D-glucopiranosido, (+)-lioniresinol 3 α -O- β -D-glucopiranosido, (-)-lioniresinol 3 α -O- β -D-glucopiranosido. Todos ellos presentaron similar actividad antioxidante al tocoferol.

Hojas recolectadas en su ambiente natural en Jangwon, Corea, fueron analizadas por Yoo *et al.* (2008). La capacidad antioxidante total, expresada como miligramos equivalentes de vitamina C (EVC) fue de 839.4 mg EVC / 100 g de droga fresca.

En el año 2009, Dadé *et al.* determinaron la capacidad antioxidante de 21 extractos acuosos de plantas nativas (comerciales) del Valle de Traslasierra, y entre ellos estudiaron al cedrón. La evaluación de la capacidad antioxidante de la infusión se determinó con diferentes metodologías: ABTS (2,2-azinobis-[3etilbenzotiazolín-6-sulfónico]), DPPH (1,1-difenil 2-picrilhidracilo), FRAP (ferric reducing/antioxidant power). Los resultados obtenidos fueron 0.52 ± 0.05 equivalentes de Trolox/mg de extracto seco, 0.35 ± 0.06 equivalentes de Trolox/mg de extracto seco y 2.92 ± 0.25 equivalentes de ácido ascórbico/mg de extracto seco, respectivamente.

Akroum *et al.*, (2009), estudiaron plantas recolectadas en distintas localidades de Argelia. El extracto metanólico analizado presentó actividad antioxidante solamente a la más alta concentración ensayada (1000 µg/ml).

Extractos estandarizados en su contenido de verbascósido (25% P/P) (Monteloeder S.L. (Elche, España) fueron ensayados *in vivo* por Funes *et al.* (2009), con el objeto de evaluar su capacidad antioxidante. El extracto de cedrón, conteniendo verbascósido como compuesto bioactivo más importante fue administrado a ratas. El verbascósido fue el único metabolito detectado en plasma por HPLC-MS. La correlación entre la concentración más alta de verbascósido en plasma y la capacidad antioxidante máxima se observó a los 20 minutos. Observaron que dicho extracto es más activo que el verbascósido puro. Por otra parte, no presentó pruebas de toxicidad oral aguda, ni se observaron efectos adversos en los ratones cuando el extracto fue utilizado en una dosis de 500 mg/kg.

Carrera Quintanar *et al.* (2010) también evaluaron *in vivo* la capacidad antioxidante de cápsulas elaboradas con el extracto estandarizado de cedrón PLX[®] Monteloeder, S.L. (Elche, España), que contiene 10% de verbascósido y 5-8% de otros derivados fenilpropanoicos, como martinósido, eukovósido e isoverbascósido. Además fueron encontradas pequeñas cantidades de derivados diglucurónidos de la luteolina, acetina y crisoeriol. El propósito de dicho estudio fue determinar la capacidad antioxidante de PLX[®] sobre el plasma y los glóbulos rojos de deportistas

universitarios que realizaron un ejercicio aeróbico (90 min de carrera) tres veces por semana durante 21 días. Se utilizó un diseño aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo y se realizó en un total de 15 voluntarios que recibieron PLX[®] o placebo. El grupo que tomó PLX[®] mostró un aumento del colesterol HDL (“colesterol bueno”). También se observó en este grupo un aumento de la actividad de la enzima glutatión reductasa (una enzima antioxidante) en glóbulos rojos y linfocitos. El grupo que tomó PLX[®] también mostró menores niveles del daño oxidativo originado por el ejercicio, tales como el malonildialdehído derivado de la peroxidación lipídica y los carbonilos proteicos en muestras de plasma sanguíneo. En resumen, este estudio demostró las propiedades antioxidantes *in vivo* de PLX[®] a través de la modulación de la actividad de la glutatión reductasa en linfocitos y glóbulos rojos y protegiendo el plasma del daño oxidativo ocasionado por el ejercicio físico intenso.

En el mismo año, Funes *et al.* (2010) , realizaron otro estudio sobre el mismo extracto con un diseño similar al anterior, pero en el que fueron determinados otros parámetros. El estudio demostró que la suplementación con PLX[®] en deportistas reduce el daño oxidativo inducido por la práctica de ejercicio físico intenso sobre proteínas y lípidos sanguíneos en neutrófilos (células blancas), así como disminuye su capacidad antiinflamatoria a través de la disminución de la actividad mieloperoxidasa. Además, los deportistas que consumieron PLX[®] mostraron niveles más bajos de transaminasas séricas, lo que indica un efecto protector sobre el tejido muscular. Los deportistas que consumieron PLX[®] mostraron mayor protección de los neutrófilos contra el estrés oxidativo, así como menores signos de daño muscular en pruebas de carrera de fondo sin bloquear la adaptación celular endógena inducida por el ejercicio físico.

Gálvez Ranilla *et al.* (2010), evaluaron la capacidad antioxidante de extractos acuosos de material vegetal proveniente de Perú. Observaron que la misma es directamente proporcional al contenido de polifenoles totales, calculado por el método de Folin-Ciocalteu. En este análisis la concentración de polifenoles totales fue de 50 mg equivalentes de ácido gálico/g y la actividad antioxidante medida mediante el ensayo de DPPH fue del 60%.

Rodríguez Vaquero *et al.* (2010), evaluaron la capacidad antioxidante de cocimiento obtenido a partir de una muestra comercial argentina por dos métodos. El

primero, evaluando la reacción con el radical DPPH. Este ensayo arrojó como resultado un 73% de inhibición del radical. El segundo ensayo consistió en la medida de la capacidad reductora sobre el hierro (FRAP), dando como resultado 940 $\mu\text{M}/\text{FeSO}_4$.

Cheurfa y Allem (2015) evaluaron la capacidad antioxidante de una infusión y de un extracto hidroalcohólico obtenidos a partir de hojas de cedrón de Argelia. La capacidad antioxidante fue determinada utilizando el radical DPPH. La CI_{50} determinada para la infusión ($27,40 \pm 0,1 \text{ mg/ml}$) fue significativamente mayor a la determinada para el extracto hidroalcohólico ($23,52 \pm 0,035 \text{ mg/ml}$). Sin embargo, la CI_{50} para BHT ($6,96 \pm 0,1 \text{ mg/ml}$) fue significativamente menor a la determinada para ambos extractos. También midieron la capacidad antioxidante total por el método del ácido fosfomolibdico, expresando los resultados en miligramos de equivalentes de ácido ascórbico por gramo de extracto ($\text{mg eq AA} / \text{g de extracto}$). La capacidad antioxidante total determinada para la infusión fue de $173.50 \pm 0.044 \text{ mg eq AA} / \text{g de extracto}$, mientras que para el extracto hidroalcohólico fue de $270.14 \pm 0.1 \text{ mg Eq AA} / \text{g}$.

2.3.5.7 Actividad antitumoral

Akroum *et al.*, 2009, probaron la actividad contra las células FL (línea de células epiteliales de líquido amniótico humano). El extracto metanólico exhibió notable actividad citotóxica con valores de CI_{50} menores a $100 \mu\text{g/ml}$. Por este resultado podría inferirse que este extracto podría presentar actividad antitumoral.

En la siguiente tabla se resumen las actividades evaluadas en cedrón

Tabla 15. Resumen de actividades evaluadas en fracciones no volátiles de hojas de cedrón

Actividad	Extracto	Observaciones	Compuestos activos informados	Referencias
Espasmolítica	acuoso	<i>in vivo</i>	vitexina	Ragone <i>et al.</i> (2007).

Antecedentes

Actividad	Extracto	Observaciones	Compuestos activos informados	Referencias
Analgésica	metanólico	<i>in vivo</i>	verbascósido	Nakamura <i>et al.</i> (1997).
Sedante	metanólico	<i>in vivo</i>	verbascósido	Nakamura <i>et al.</i> (1997).
	acuoso	<i>in vivo</i>	vitexina	Ragone <i>et al.</i> (2010).
Antinociceptiva	etanólico	<i>in vivo</i>	artemítina, hesperidina	Qnais <i>et al.</i> (2009).
Reducción de iones Ag	acuoso	<i>in vitro</i>	isoverbascósido	Cruz <i>et al.</i> (2010).
Inotrópica negativa	acuoso	<i>in vivo</i>	vitexina	Ragone <i>et al.</i> (2010).
Quimio protectora	acuoso	<i>in vivo</i>	No informados	Zamorano Ponce <i>et al.</i> (2006).
Antibacteriana	etanólico	<i>in vitro</i>	No informados	Oskay <i>et al.</i> (2005).
	metanólico y acuoso	<i>in vitro</i>	No informados	Alanís <i>et al.</i> (2005).
	metanólico	<i>in vitro</i>	No informados	Yasunaka <i>et al.</i> (2005); Akroum <i>et al.</i> (2009).
Antioxidante	acuoso	<i>in vitro</i>	No informados	Zheng y Wang, (2001).
	infusión	<i>in vitro</i>	verbascosido, derivados de la luteolina	Valentão <i>et al.</i> (2002).
	infusión	<i>in vitro</i>	verbascósido	Bilia <i>et al.</i> (2008).
	metanólico	<i>in vitro</i>	verbascósido, isoverbascósido	Ono <i>et al.</i> (2008); Akroum <i>et al.</i> (2009).
	70% metanol en agua	<i>in vitro/in vivo</i>	No informados	Yoo <i>et al.</i> (2008).
	Infusión	<i>in vitro</i>	No informados	Dadé <i>et al.</i> (2009).
	estandarizado	<i>in vivo</i>	verbascósido	Funes <i>et al.</i> (2009).
	estandarizado	<i>in vivo</i>	verbascósido	Carrera Quintanar <i>et al.</i> (2010).
acuoso	<i>in vitro</i>	polifenoles	Galvez Ranilla <i>et al.</i> (2010).	

Actividad	Extracto	Observaciones	Compuestos activos informados	Referencias
	estandarizado	<i>in vivo</i>	verbascósido y otros	Funes <i>et al.</i> (2010b).
	acuoso (cocimiento)	<i>in vitro</i>	No informados	Rodríguez Vaquero <i>et al.</i> (2010).
	acuoso hidroalcohólico	<i>in vitro</i> <i>in vitro</i>	No informados	Cheurfa y Alem (2015)
Antitumoral	metanólico	<i>in vitro</i>	No informados	Akroum <i>et al.</i> (2009).

2.3.6 Aspectos regulatorios

Situación regulatoria

Las industrias farmacéutica, alimenticia y cosmética requieren materias primas con precisas normas de calidad. Dada la amplia utilización de cedrón a nivel mundial en estas industrias, se han elaborado diversas normas para su utilización en distintas aplicaciones, con distintos criterios de calidad:

Uso general en la industria:

En nuestro país existen las normas IRAM 37611 para las hojas e IRAM 185/73 para el AE. Los únicos parámetros que se exigen para esta última son las constantes fisicoquímicas del AE y su contenido de citral. Actualmente se encuentra en discusión la actualización de la norma IRAM en donde se pretende incorporar un perfil cromatográfico por GC, teniendo en cuenta la experiencia lograda en el presente estudio.

Uso alimenticio:

El cedrón está registrado en el Código Alimentario Argentino, en el capítulo XVI: Correctivos y Coadyuvantes (art. 1215): “Con los nombres de Cedrón y Yerba Luisa, se entienden las hojas sanas, limpias y frescas o secas del *Lippia citriodora* Kunth. Las hojas secas de Cedrón no deben tener mas de 7% de humedad a 100-105°C; 6% de cenizas totales a 500-550°C, y de 1% de cenizas insolubles en ácido clorhídrico al 10%”.

La reglamentación chilena lo incluyó como hierba aromática en el Reglamento Sanitario Alimentario (1996).

Está incluida en la lista estadounidense GRAS (Generally Recognized as Safe) para consumo humano en preparados de bebidas alcohólicas (Newall *et al.*, 1996).

El cedrón es una de las plantas más comúnmente utilizadas en Europa. Por este motivo, está incluida entre las normas redactadas por la European Herbal Infusions Association (EHIA).

Uso en cosmética:

El uso del AE de *Aloysia citrodora* no está recomendado en perfumería para aplicación sobre la piel, debido a los estudios realizados por IFRA (International Fragrance Association) de los antecedentes de AEC sobre problemas de irritación y fototoxicidad dérmica. Sin embargo, permite el uso del absoluto de cedrón siempre y cuando su contenido no exceda del 0.2% en el producto cosmético terminado (IFRA, Directiva 2009/164/EU; Ford *et al.* 1992 a, b).

Uso Medicinal:

Las hojas de cedrón fueron incluidas como droga vegetal en la Farmacopea Nacional Argentina V edición en el año 1968 y se mantuvo en la VI edición de 1978. Los ensayos de calidad codificados solo hacen referencia a su identificación macroscópica. Por otra parte, en la resolución (MSyAS) N° 144/98 está incluida en el listado positivo de drogas vegetales (Anexo III de la disposición 2673/99 del ANMAT). En cuanto a otros países sudamericanos, forma parte del Listado de Medicamentos Herbarios Tradicionales de Chile (2009) y de otros países, para su venta libre. En Europa, el cedrón se encontraba codificado en la Farmacopea Francesa X (Pharmacopee Française, 2002) como “*Verbain odorante*” y solo incluía los ensayos botánicos macroscópicos y microscópicos, además de exigir un rendimiento mínimo de AE de 0.4%. Incluía, además, la determinación de la presencia de citral en el AE mediante un ensayo por CCD. A partir de año 2008, la monografía fue suprimida en esta Farmacopea (Journal Officiel de la République Française - NOR: SJSP0773887A). El cedrón fue incluido en la Farmacopea Europea 6.0 (2008). Actualmente continúa codificado en la Farmacopea Europea 8.0 (2016), en donde, además de incluir los ensayos de identificación botánica ilustrados

con iconografías, utiliza como parámetro de calidad la determinación del contenido de verbascósido por HPLC. Establece que debe ser mayor al 2.5%, utilizando ácido ferúlico como sustancia de referencia. Otro ensayo de identificación incluido en esta Farmacopea es la determinación de ausencia de contaminación o adulteración con *Verbena officinalis* utilizando CCD.

En cuanto a la fracción volátil, solo exige la determinación del contenido del AE, el cual debe ser mayor al 0.3% V/P para droga entera y 0.2% V/P para droga fragmentada. No hace mención a la determinación de la composición química del mismo.



Verbena triphylla

L'Héritier de Brutelle, C.L., *Stirpes novae aut minus cognitae*, t. II (1784).
En el año **1784**, Charles Louis L'Heritier, usando un ejemplar existente en el Jardín Botánico de París, utilizó el binomial *Verbena triphylla* para identificar a esta especie

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

De acuerdo a los antecedentes encontrados y las necesidades observadas, los objetivos que se plantearon para el presente trabajo fueron:

3.1 *Objetivos generales*

Conocer la variabilidad fitoquímica del cedrón en poblaciones silvestres y cultivadas en la Argentina.

Establecer parámetros fitoquímicos de calidad para sus diferentes usos.

Contribuir a la redacción de normas de calidad farmacéutica para el cedrón en la Argentina.

La normalización del cedrón contribuirá, por un lado, a optimizar la elección del material genético para su cultivo, y en consecuencia, contribuir a un buen manejo agrícola y a competir con la oferta de otros países. De esta manera, contribuirá a homogeneizar su calidad para uso medicinal, alimenticio o cosmético. Para ello, primero hay que conocer la variabilidad fitoquímica del material local. Con las variaciones observadas en nuestro país y teniendo en cuenta las normas existentes en el mundo, se planteará encontrar parámetros de calidad que avalen una calidad óptima y competitiva a nivel nacional e internacional.

Debido a que el cedrón es una especie aromática y medicinal, el análisis de la composición química del AE (fracción volátil) resulta indispensable para evaluar la calidad de la droga vegetal. Sin embargo, el análisis de la fracción no volátil también es necesario, ya que se encuentra fuertemente relacionado con los usos medicinales y tradicionales que se le dan a esta planta y con las actividades biológicas demostradas.

3.2 *Objetivos específicos*

Determinar la composición química de la fracción volátil y su contenido de verbascósido en la fracción no volátil, en poblaciones silvestres y de cultivo de cedrón, esto último teniendo en cuenta las normas europeas.

Seleccionar los marcadores que caractericen a la fracción volátil.

Establecer los intervalos de variación de los mismos que resulten más adecuados para definir la mejor calidad.

Generar especificaciones que permitan seleccionar los mejores materiales vegetales para iniciar un cultivo comercial y redactar normas de calidad farmacéutica.



Verbena triphylla

En The Botanical Magazine, William Curtis en **1797** observa errores en el dibujo de L'Heritier y reconoce la nomenclatura de Palau, a pesar de mantener la forma de L'Heritier.

<http://www.biodiversitylibrary.org/item/7352#page/16/mode/1up>

PARTE EXPERIMENTAL

4 PARTE EXPERIMENTAL

En este capítulo se detallarán todos los elementos y metodologías utilizadas en la parte experimental de este trabajo de tesis. No obstante, cabe aclarar que como el trabajo experimental se desarrolló en 6 ensayos diferentes y consecutivos, se describirá, por un lado, los métodos generales aplicados en todos los ensayos y, por el otro, lo concerniente a cada uno de los mismos por separado.

4.1 Solventes y reactivos

Los solventes utilizados para obtener los extractos fueron de calidad pro análisis.

La serie homóloga en alcanos (C_8 - C_{28}) utilizada para la determinación de los índices de retención (IR) de los compuestos presentes en los aceites esenciales fue adquirido en Sigma (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA).

Para el análisis por HPLC se utilizaron solventes calidad HPLC.

Para la determinación del contenido de verbascósido por HPLC se utilizó ácido ferúlico como estándar externo (Fluka).

Los testigos α -pineno, β -pineno, limoneno, 1,8-cineol, citronelal, citral, acetato de geranilo, timol, carvona, α -terpineol, terpinenol-4 y β -cariofileno fueron provistos por Vasana SACAI FyM, Villa Martelli, Argentina; el compuesto sabineno fue donado por la Dra. Ingrid Loayza, Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba, Bolivia; 6-metil-5-hepten-2-ona por Aromática SA, Buenos Aires, Argentina; α -tuyona fue adquirido en Sigma-Aldrich, Argentina; p-cimeno fue provisto por Soaljo SA; piperitona por RC Treatt & Co., Suffolk, Reino Unido) y óxido de cariofileno fue adquirido a Extrasynthese, Genay, Francia.

4.2 Material Vegetal

Para cumplir con los objetivos propuestos se analizaron muestras de material vegetal de distintos orígenes de la Argentina y dos materiales provenientes de Chile, ya sea silvestre o de cultivo. Por un lado, se evaluó la variabilidad de la

composición química de los aceites esenciales por cromatografía GC-MS. Por otro lado, se determinó el contenido de verbascósido por HPLC en algunas muestras, ya que, a partir del año 2006, su cuantificación es un ensayo requerido por la Farmacopea Europea.

Se realizaron en total 6 ensayos con diferentes características. Los materiales vegetales empleados en cada uno de los ensayos se detallan a continuación:

Ensayo A: Evaluación de la variabilidad del aceite esencial de cedrón bajo las mismas condiciones de cultivo.

Ensayo B: Determinación de marcadores de calidad para un aceite esencial de cedrón típico.

Ensayo C: Evaluación química de los metabolitos de mayor interés en cedrón a lo largo de un ciclo de cultivo en la Estación Experimental Agropecuaria INTA Cerro Azul, provincia de Misiones.

Ensayo D: Análisis de los metabolitos de mayor interés en muestras de cedrón de un Banco de Germoplasma, situado en la provincia de Entre Ríos.

Ensayo E: Evaluación de la calidad del cedrón cultivado en la Estación Experimental Agropecuaria INTA Cerrillos, en la provincia de Salta.

Ensayo F: Evaluación química de poblaciones silvestres recolectadas en el noroeste argentino (NOA).

A continuación, se detalla el material vegetal utilizado en cada uno de los ensayos realizados:

Ensayo A: Evaluación de la variabilidad del aceite esencial de cedrón bajo las mismas condiciones de cultivo.

A raíz de la variabilidad encontrada en la composición química de los AEC de diferentes regiones de la Argentina, se decidió investigar si dicha variabilidad era debida a factores ambientales o a factores genéticos. Para ello, en el año 2000 se

obtuvieron estacas de material vegetal proveniente de plantas de cultivo (C) y de colecciones botánicas (B) y (M), así como de plantas silvestres (S) ubicadas en diferentes sitios geográficos de la Argentina y de Chile y se plantaron en un mismo sitio. Las plantas cultivadas denominadas (B) se encontraban en el Jardín Botánico “Lucien Hauman” de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires y las denominadas (M) en el Inta La Consulta, Mendoza. Al resto de las muestras se les asignaron los siguientes nombres: San Luis (L, Ar), Salta (S, Ar), Rancagua (R, Ch) y Talca (T, Ch), como se detalla en la siguiente tabla:

Tabla 16. Identificación de las muestras vegetales

País	Región	Origen
Argentina	Buenos Aires (B)	Jardín Botánico (B)
Argentina	Mendoza (M)	Colección botánica (B)
Argentina	San Luis (L)	Cultivo (C)
Argentina	Salta (S)	Silvestre (S)
Chile	Rancagua (R)	Silvestre (S)
Chile	Talca (T)	Silvestre (S)

A partir de las plantas de cada uno de los orígenes se obtuvieron estacas, que fueron almacenadas en papel mojado, envueltas en papel de aluminio y transportadas a una temperatura constante (5°C), hasta que fueron plantadas en el vivero ubicado en la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Argentina. Muestras de cada espécimen fueron depositados en el Herbario del Instituto Darwinion (SI 25028 a 25032), San Isidro, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

Después de un lapso de 40 días, una planta madre de cada accesión fue transplantada a macetas de 30 L, rellenas con 25% de arena y 75% topsoil. De cada uno de los orígenes cultivados (Tabla 16) se obtuvieron cinco plantas. Cada maceta con una planta fue considerada como una unidad experimental. Cada una de las

plantas fue cosechada en los períodos primavera-verano 2001-2002 y 2002-2003, destilada y analizada por separado. El resultado informado es un promedio de las cinco determinaciones. La cantidad de hojas utilizadas para realizar cada destilación fue de 30 g de cada material vegetal.

El experimento realizado durante la temporada 2001-2002 (experimento 1) no incluyó la muestra proveniente de Salta, que recién fue incorporada en el bienio 2002-2003 (experimento 2). Los materiales utilizados en los años siguientes provenían de las mismas plantas parentales. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con cinco repeticiones de cada muestra.

Obtención de estacas:

Para la propagación por estacas, una parte del tallo se separó de la planta madre, se colocó bajo condiciones ambientales favorables y se lo indujo a formar raíces y tallos, para producir así una nueva planta independiente, que es idéntica a la planta de la cual procede. Entre las ventajas de este tipo de propagación se sabe que se pueden iniciar muchas plantas en un espacio limitado partiendo de unas pocas plantas madres; el costo no es elevado; el método es rápido y sencillo, no se requieren técnicas especiales que se emplean para los injertos; no presentan problemas por incompatibilidad entre patrón e injerto y lo más importante es que la planta progenitora suele reproducirse con exactitud sin variación genética.

Se tomaron muestras de suelo antes de la fecha del trasplante para determinar el pH, el carbono orgánico, el fósforo intercambiable, el nitrógeno total y el nivel de potasio intercambiable. Las condiciones meteorológicas (temperatura y radiación solar) fueron tomadas en la estación meteorológica de Villa Ortúzar, situada a 200 m de distancia del sitio de cultivo dentro del Campo Experimental.

Para realizar este ensayo se obtuvieron y analizaron 55 AEC. Del total de estos aceites, 20 provenían del material vegetal cultivado durante el bienio 2001-2002 y 25 provenían del mismo material vegetal cultivado durante el bienio 2002-2003 más el agregado de 5 muestras cultivadas en Salta. De todos estos materiales fueron extraídos los AE y posteriormente analizados por GC-FID-MS.

Ensayo B: Determinación de marcadores de calidad de aceite esencial de cedrón

Para este ensayo se utilizaron muestras de distinta procedencia: a) siete muestras procedentes de Buenos Aires, Mendoza, Salta, San Luis, Jujuy y Entre Ríos; b) nueve muestras procedentes de cultivos comerciales de las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Salta, Mendoza y Entre Ríos; c) tres muestras comerciales; d) cuatro muestras de material silvestre recolectado en las provincias de Buenos Aires y Santa Fe. Todas las muestras fueron botánicamente identificadas (Dra. M. Gattuso, Dra. S. Gattuso e Ing. A. Gil). Se depositaron los materiales de herbario en la Universidad Nacional de Rosario (UNR) (S 781, S 785, S 676, M 137) y en el Herbario del Instituto Darwinion (SI 25028 a 25032), San Isidro, provincia de Buenos Aires. Los AE se obtuvieron por hidrodestilación a partir de 30g de material vegetal.

Para realizar este ensayo se extrajeron y analizaron por GC FID-MS un total de 23 aceites esenciales.

Ensayo C: Evaluación química de los metabolitos de mayor interés en cedrón a lo largo de un ciclo de cultivo en la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) INTA Cerro Azul, provincia de Misiones

Para este ensayo las muestras se obtuvieron al azar sobre 3 plantas provenientes de un cultivo de 15 años de edad situado en la EEA INTA Cerro Azul (Misiones). Se cosecharon las hojas de ramas jóvenes a lo largo de un año, de enero a junio y de octubre a diciembre en horas de la mañana. Por tratarse de una especie caduca, no hubo material disponible en los meses de julio, agosto y setiembre. El cultivo presentó una densidad de 16 mil plantas/ha con un marco de plantación de 1 x 1,5 m. Fue fertilizado con cama de pollo a razón de 1 kg/m² en el mes de agosto. Para la obtención del AE se utilizaron 30 g de material vegetal. De todas las cosechas también se determinó el contenido de verbascósido por HPLC.

En este ensayo se analizaron un total 10 muestras de hojas de cedrón para evaluar su variación a lo largo de un año. Por un lado, se obtuvieron los AE que fueron analizados por GC FID-MS para determinar el contenido y la composición química. Por otro lado, se realizó la determinación del contenido de verbascósido por HPLC.

Ensayo D: Análisis de los metabolitos de mayor interés en muestras de cedrón de un Banco de Germoplasma, situado en la provincia de Entre Ríos

Se trabajó en colaboración con integrantes del Banco de Germoplasma de la provincia de Entre Ríos, convenio Escuela Agrotécnica Las Delicias – Secretaria de la Producción de Entre Ríos – Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNER, ubicado en el Departamento Paraná, Provincia de Entre Ríos, Argentina (S 31° 55' 03"; O 60° 25' 22").

En este Banco existen 10 accesiones de cedrón cuyo origen genético es desconocido en la mayoría de ellos. De estas de plantas madres seleccionadas se obtuvieron estacas, las que luego se hicieron enraizar en perlita en condiciones de invernadero en el invierno del año 2007. Las estacas enraizadas se implantaron en las parcelas de tierra con un espaciamiento de 0.60 m entre plantas. Los clones se denominaron: clon 1, clon 2, clon 3 clon 4, clon 5, clon 6, clon 7, Guerrero (provincia de Jujuy) y Salta. Además de las accesiones clonales obtenidas se incluyó en este ensayo una muestra procedente de semilla. La cosecha de cada material vegetal se realizó en el mes de febrero, en plena floración. Los AE se obtuvieron a partir de 30g material vegetal para determinar el contenido y composición química. En todas las muestras mencionadas también se realizó la cuantificación de verbascósido por HPLC según Farmacopea Europea 8.0.

En este ensayo también se realizó la caracterización morfológica de las hojas de cedrón. Para ello se elaboró un listado de 8 descriptores (color, forma, ápice, base, contorno, longitud, latitud y pecíolo) que fueron evaluados al alcanzar la etapa reproductiva de cada una de las plantas.

En este ensayo se analizaron un total de 10 muestras de cedrón. Los AE fueron obtenidos por hidrodestilación y analizados por GC-FID-MS para la determinación de las composiciones químicas. Por otro lado, en todas las muestras determinó el contenido de verbascósido por HPLC.

Ensayo E: Evaluación de la calidad del cedrón cultivados en la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) INTA Cerrillos, en la provincia de Salta

Este ensayo se realizó en conjunto con otros grupos de trabajo que también se especializan en el análisis de aceites esenciales. Desde hace ya varios años, en la EEA INTA Cerrillos, se encuentran cultivados materiales de cedrón provenientes de distintas localidades de la zona, según se detalla en la tabla 17. Durante el año 2010, se cosecharon, destilaron y analizaron 12 muestras denominadas 14D-25D. Seis de esos materiales (14D-19D) ya habían sido analizados previamente por el grupo de trabajo del Dr. César Catalán, INQUINOA-CONICET, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán, en el año 2003/2004, denominados 14C al 19C.

Se incluyó en este estudio, con fines comparativos, el análisis de 13 muestras (1V-13V) de origen silvestre recolectadas en las provincias de Salta y Jujuy y analizadas por el grupo de trabajo de la Dra. Carmen Viturro, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Jujuy.

En este ensayo se determinó en total la composición química de 31 aceites esenciales, de los cuales 12 fueron analizados por nuestro grupo. El contenido de verbascósido fue determinado por HPLC en las muestras 14D a 25D.

Tabla 17. Detalle de las muestras utilizadas en este ensayo

Muestra	Fecha de recolección	Origen		
		Localidad	Población	Cultivo

Parte Experimental

Muestra	Fecha de recolección	Origen		
		Localidad	Población	Cultivo
1V	febrero 2003	San Salvador de Jujuy	Alto Comedero (JU)	si
2V	febrero 2003	San Salvador de Jujuy	Alto Comedero (JU)	si
3V	febrero 2003	San Salvador de Jujuy	Los Perales (JU)	si
4V	febrero 2003	San Salvador de Jujuy	San Pedrito (JU)	si
5V	marzo 2003	Salta	Salta (SA)	si
6V	febrero 2003	El Carmen	Severino (JU)	no
7V	febrero 2003	Tilcara	Tilcara (JU)	no
8V	mayo 2003	Humahuaca	Chuculezna (JU)	no
9V	mayo 2003	Humahuaca	Chuculezna (JU)	no
10V	marzo 2003	San Antonio	Los Alisos (JU)	si
11V	febrero 2003	Tilcara	Juella (JU)	no
12V	febrero 2003	Guerrero	Guerrero (JU)	no
13V	marzo 2003	El Carmen	El Carmen (JU)	si
14C	marzo 2003	Chicoana Quebrada de Escoipe	San Martín (SA)	si
14D	enero 2010	Chicoana Quebrada de Escoipe	San Martín (SA)	si
15C	marzo 2003	Chicoana Quebrada de Escoipe	Quebrada el Sunchal (SA)	si
15D	enero 2010	Chicoana Quebrada de Escoipe	Quebrada el Sunchal (SA)	si
16C	marzo 2003	Chicoana Quebrada de Escoipe	San Martín (SA)	si
16D	enero 2010	Chicoana Quebrada de Escoipe	San Martín (SA)	si
17C	marzo 2003	Chicoana Quebrada de Escoipe	Quebrada La Apacheta (SA)	si
17D	enero 2010	Chicoana Quebrada de Escoipe	Quebrada La Apacheta (SA)	si
18C	marzo 2004	Chicoana Quebrada de Escoipe	Quebrada La Apacheta (SA)	si

Muestra	Fecha de recolección	Origen		
		Localidad	Población	Cultivo
18D	enero 2010	Chicoana Quebrada de Escoipe	Quebrada La Apacheta (SA)	si
19C	marzo 2004	Chicoana Quebrada de Escoipe	Quebrada el Sunchal (SA)	si
19D	enero 2010	Chicoana Quebrada de Escoipe	Quebrada el Sunchal (SA)	si
20D	enero 2010	Chicoana Quebrada de Escoipe	Quebrada el Sunchal (SA)	si
21D	enero 2010	Chicoana Quebrada de Escoipe	Quebrada La Apacheta (SA)	si
22D	enero 2010	Chicoana Quebrada de Escoipe	Quebrada el Sunchal (SA)	si
23D	enero 2010	Chicoana Quebrada de Escoipe	Quebrada el Sunchal (SA)	si
24D	enero 2010	Chicoana Quebrada de Escoipe	San Martín (SA)	no
25D	enero 2010	San Carlos	La Punilla (SA)	no

Ensayo F: Evaluación química de poblaciones silvestres recolectadas en el noroeste argentino (NOA)

Considerando que el NOA podría ser la región más trascendente en cuanto al centro de origen de esta especie, se decidió muestrear y estudiar diferentes poblaciones silvestres que crecen en esa región. Se recolectaron muestras (Tabla 18) en las provincias de Salta (El Maray, La Paya, El Sunchal, El Alisal y Chorrillos), Jujuy (Chilcayo y San Roque), Catamarca (Mutquín y Colana) y Tucumán (Amaicha del Valle), durante noviembre (inicio de la floración) y abril (final de la floración).

Se recogió la mitad superior de las ramas florecidas de cada planta por separado debido a la gran diversidad de aromas encontrado *in situ*. Las plantas fueron recolectadas e identificadas por el Ing. Agrónomo M.A. Elechosa, por el Técnico INTA M.A. Juárez y por la Dra. A. Molina, todos pertenecientes al INTA Castelar. Debido a la amplia experiencia en recolección de plantas aromáticas que posee el citado grupo, pudieron separar en una misma población aquellas plantas de cedrón

que presentaron aromas diferentes y a los que caracterizaron como “salvia”, “menta”, “citronela”, “cítrico” y “boldo”. Cada una de las plantas con un aroma diferente fue tratada como una muestra distinta. De cada material vegetal se utilizaron 50 g para obtener el aceite esencial. El muestreo se repitió durante tres temporadas en Chilcayo, Jujuy, para poder confirmar los resultados. Los ejemplares de herbario de cada una de las muestras fueron depositados en el Herbario del Instituto de Recursos Biológicos del INTA, Hurlingham, Provincia de Buenos Aires, Argentina (Tabla 18).

Tabla 18. Sitios, fecha de recolección y ejemplares de herbario de las muestras analizadas en este ensayo

Muestra	Provincia	Lugar/altitud (m)	Mes y año de recolección	Ejemplar de herbario
1	JUJUY	Chilcayo/2290	Nov-2008	Juárez294 (BAB)
2	“”	“”	“”	Juárez 295 (BAB)
3	“”	“”	“”	Juárez 296 (BAB)
4	“”	“”	Abril-2008	Juárez 524 (BAB)
5	“”	“”	“”	Juárez 521 (BAB)
6	“”	“”	“”	Juárez 523 (BAB)
7	“”	“”	“”	Juárez 522 (BAB)
8	“”	“”	“”	Juárez 520 (BAB)
9	“”	“”	“”	Juárez 519 (BAB)
10	“”	“”	“”	Juárez 518 (BAB)
11	“”	“”	Abril-2009	Molina 6690 (BAB)
12	“”	“”	“”	Molina 6692 (BAB)
13	“”	“”	“”	Molina 6691 (BAB)
14	“”	“”	“”	Molina 6689 (BAB)
15	“”	San Roque/2916	Abril-2008	Juárez 517 (BAB)
16	“”	“”	“”	Juárez 515 (BAB)
17	“”	“”	“”	Juárez 516 (BAB)
18	“”	“”	“”	Juárez 514 (BAB)
19	“”	“”	Abril-2009	Molina 6683 (BAB)

Muestra	Provincia	Lugar/altitud (m)	Mes y año de recolección	Ejemplar de herbario
20	"	"	"	Molina 6682 (BAB)
21	"	"	"	Molina 6681 (BAB)
22	SALTA	El Maray/2373	Noviembre-2008	Juárez 301 (BAB)
23	"	La Paya/2428	"	Juárez 306 (BAB)
24	"	El Sunchal/1922	"	Juárez 299 (BAB)
25	"	"	"	Juárez 302 (BAB)
26	"	"	"	Juárez 303 (BAB)
27	"	El Alisal/1730	Abril-2008	Juárez 495 (BAB)
28	"	"	"	Juárez 494 (BAB)
29	"	Chorrillos/2013	"	Juárez 501 (BAB)
30	"	"	"	Juárez 500 (BAB)
31	"	"	"	Juárez 499 (BAB)
32	CATAMARCA	Mutquin/1489	Mayo-2009	Molina 6721 (BAB)
33	"	"	"	Molina 6720 (BAB)
34	"	Colana /1694	Mayo-2009	Molina 6724 (BAB)
35	"	"	"	Molina 6725 (BAB)
36	TUCUMAN	Amaicha del Valle/2650	Abril-2008	Juárez 529 (BAB)

Para la realización de este ensayo se determinó la composición química de 31 aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación, de los cuales 12 fueron analizados por nuestro grupo. Además, de las muestras 4, 5, 15, 27, 28, 29, 30 y 36 se determinó el contenido de verbascósido por HPLC.

4.3 Obtención y análisis del aceite esencial

Para la extracción por hidrodestilación y determinación del contenido de AE se utilizó una trampa tipo Clevenger codificada en la Farmacopea Argentina VII edición (2003) (ver Figura 5). El tiempo de destilación de cada una de las muestras fue de 3 h.

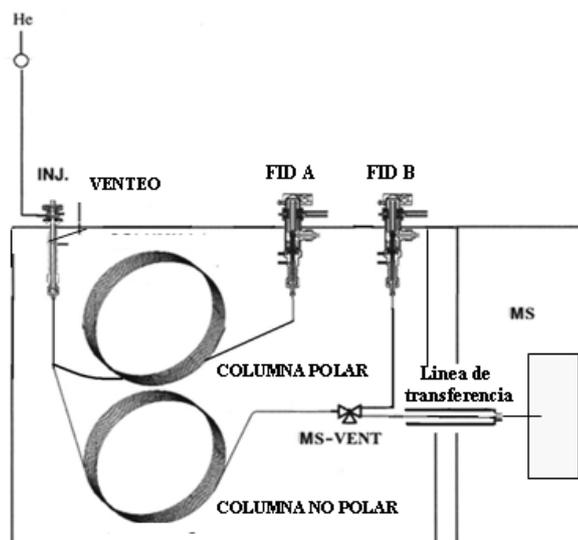


Figura 6. Esquema del GC-FID-MS Perkin Elmer Clarus 500 empleado en el análisis cuali-cuantitativo de AE.

Condiciones analíticas:

Fase móvil: He a 1.87 ml/min

Inyector tipo *split* (relación 1:100)

Programación de temperaturas: 90°C, 3°C/min hasta los 250°C, tiempo final 20 min.

Tiempo total de corrida: 60 min.

Temperaturas de inyector y detectores FID: 255°C y 275°C respectivamente.

Temperatura de la línea de transferencia: 180°C.

Temperatura de la fuente de iones: 150°C.

Rango de masas escaneado: 40-400 Da.

Cantidad inyectada: 0.2 µl de una dilución al 10% en etanol.

La identificación de los compuestos de los AE 14C-19C del ensayo E fue realizado por GC-MS utilizando un equipo Agilent AGC/MS HP 6890 conectado a un detector de masas HP 5973. Columna 5% fenil 95% dimetilpolisiloxano (Elite 5 MS, Perkin Elmer; 30 m x 0.25 mm, 0.25 µ de espesor de capa de fase estacionaria).

Condiciones analíticas:

Fase móvil: He a 1.0 ml/min.

Inyector tipo *split* (relación 1:80).

Programación de temperaturas: 60°C (1min), 1.5°C/min hasta los 185°C (1min), 9°C/min hasta 275 (2 min).

Temperaturas de inyector: 250°C.

Temperatura de la línea de transferencia: 280°C.

Temperatura de la fuente de iones: 230°C.

Cantidad inyectada: 0.2 µl.

El análisis cuantitativo de estas muestras se realizó con un equipo Hewlett Packard 5890 Series II equipado con un detector FID. Columna 5% fenil 95% dimetilpolisiloxano (HP-5, Hewlett Packard; 30 m x 0.25 mm, 0.25 µ de espesor de capa de fase estacionaria).

Condiciones analíticas:

Fase móvil: N₂, 1.2 ml/min.

Inyector tipo *split* (relación 1:70).

Programación de temperaturas: 60°C (1min), 1.5°C/min hasta los 185°C (1min), 9°C/min hasta 275 (2 min).

Temperatura del inyector: 250°C.

Temperatura del detector: 280°C.

Cantidad inyectada: 0.2 µl.

El análisis cualitativo de los AE 1V-13V del ensayo E y las muestras 1-3, 18 y 20-26 del ensayo F fue realizado por GC-MS utilizando un equipo Hewlett Packard GC 6890/5972. Columna 5% fenil 95% dimetilpolisiloxano (HP-5, Hewlett Packard; 30 m x 0.25 mm, 0.25 µ de espesor de capa de fase estacionaria).

Condiciones analíticas:

Fase móvil: H₂ a 0.7 ml/min.

Programación de temperaturas: 60°C (5min), 6°C/min hasta 230°C.

Temperaturas de inyector: 250°C.

Temperatura de la línea de transferencia: 300°C.

Cantidad inyectada: 0.2 µl.

La cuantificación de estas muestras se realizó con un equipo GC-FID KONIK KNK 3000G. Columna 5% fenil 95% dimetilpolisiloxano (HP-5, Hewlett Packard; 30 m x 0.25 mm, 0.25 µ de espesor de capa de fase estacionaria).

Condiciones analíticas:

Fase móvil: H₂, 1.2 ml/min.

Programación de temperaturas: 60°C (5min), 6°C/min hasta 230°C.

Temperatura del inyector: 250°C.

Temperatura del detector: 300°C.

Cantidad inyectada: 0.2 µl.

La identificación de los compuestos de los AE fue realizada por comparación de sus espectros de masa con los que figuran en bases de datos computarizadas (Adams 2007; Wiley/Nist Mass Spectral Library, 2008; base de datos propia) y por comparación de sus índices de retención lineal obtenidos en las dos columnas empleadas, respecto de una serie homóloga de alcanos (C₈-C₂₈), con los obtenidos con estándares propios y/o con los que figuran en la bibliografía. La composición porcentual fue determinada por el método de porcentaje de áreas considerando que el factor de respuesta para todos los compuestos era igual a 1. Cuando se utilizaron simultáneamente dos columnas se considero la menor respuesta obtenida para cada compuesto.

Los resultados obtenidos en diferentes equipos fueron comparables ya que una misma muestra fue analizada en ambos equipos obteniéndose cuantificaciones similares. Los resultados se expresaron como porcentaje (%).

4.4 Obtención y análisis de verbascósido

La determinación del contenido de verbascósido se realizó siguiendo el procedimiento descrito en la monografía *Lemon verbena* de la Farmacopea Europea 8.0 (2016).

El análisis fue realizado por HPLC, con un equipo marca Perkin Elmer Serie 200, provisto de un inyector automático y un detector espectrofotométrico uv/visible con arreglo de fotodiodos.

Para ello, cada muestra de droga vegetal a analizar fue secada al aire y molida. Se preparó una solución de referencia pesando exactamente 10 mg de ácido ferúlico en un matraz de 100 ml. Se llevó a volumen con etanol 60% V/V. A 1.0 g de la droga vegetal exactamente pesada en un matraz de 50 ml se le añadieron 30 ml de la solución de referencia. Esta solución se agitó durante 2 horas, luego se llevó a volumen con la misma solución de referencia. La muestra se centrifugó durante 15 minutos y se filtró a través de una membrana de 0,4 µm. Cada una de las muestras vegetales se procesó por duplicado. Cada duplicado obtenido se inyectó 2 veces.

El método de cuantificación utilizado fue el método del estándar externo, utilizando ácido ferúlico como estándar de referencia. Los resultados se expresaron como % P/P.

Condiciones analíticas:

Columna: Lichrosorb RP₁₈, 250 x 4 mm (tamaño de partículas de 5 µm).

Fase móvil: A: 0,3% V/V ácido fosfórico, B: acetonitrilo

Gradiente (ver el siguiente gráfico).

Tiempo	A	B
0-20	93-83	7-17
20-30	83	17
30-35	83-75	17-25
35-40	75-20	25-80
40-45	20-93	80-7

Flujo: 1,0 ml/min.

Detector espectrofotométrico uv/visible con arreglo de fotodiodos.

Longitud de onda de lectura: 330 nm

Volumen de inyección: 20 μ l.

Tiempo total de corrida: 60 min.



Verbena triphylla

Duhamel du Monceau, H.L., *Traité des arbres et arbustes, Nouvelle édition* [Nouveau Duhamel], vol. 4: t. 6 (1809) Dibujó P.J. Redouté
http://plantillustrations.org/ILLUSTRATIONS_HD/250369.jpg

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se presentan los resultados y la discusión para cada uno de los ensayos realizados

Ensayo A: Evaluación de la variabilidad del aceite esencial de cedrón bajo las mismas condiciones de cultivo

Dada la gran variabilidad encontrada (ver antecedentes) en la composición química de aceites esenciales de cedrón de diferentes procedencias de la Argentina, se decidió investigar si dicha variación era debida a factores genéticos o si era una respuesta al medio ambiente, es decir fenotípica.

Análisis de los aceites esenciales

De cada material vegetal se utilizaron 30 g para la obtención de los AE por destilación. Los rendimientos fueron calculados sobre droga seca. Los resultados correspondientes a los bienios 2001/02 y 2002/03 se presentan en la tabla 19.

Tabla 19. Rendimientos (% V/P) de aceite esencial

Lugar	CHILE				ARGENTINA						
	Rancagua		Talca		San Luis		Buenos Aires		Mendoza		Salta
Fecha	2001/02	2002/03	2001/02	2002/03	2001/02	2002/03	2001/02	2002/03	2001/02	2002/03	2002/03
Contenido de aceite esencial %V/P	1.6	1.1	0.7	0.9	1.4	1.4	1.6	0.8	1.7	1.1	1.4

La mayor variación en el contenido de aceite esencial se observó para la muestra de Buenos Aires, cuyo rendimiento disminuyó un 50%. En cambio, la muestra proveniente de San Luis mantuvo el rendimiento de aceite esencial en los dos períodos analizados.

Según la Farmacopea Europea el rendimiento de AE debe ser mayor a 0.2% V/P para droga fragmentada. En todos los casos se observó que las muestras analizadas cumplieron con ese requisito.

Con el fin de estudiar la composición química que caracterizaba a cada población se analizaron los distintos aceites esenciales por GC-FID-MS. Se identificaron 42 compuestos, de los cuales 19 fueron los más representativos para estas muestras por estar presentes cada uno de ellos en más de 0.05 % en por lo menos una muestra (Tabla 20). Estos compuestos representaron más del 75% del total analizado.

Tabla 20. Principales compuestos del AEC analizadas en este ensayo

Compuesto	CHILE				ARGENTINA						
	Rancagua		Talca		San Luis		Buenos Aires		Mendoza		Salta
	2001/02	2002/03	2001/02	2002/03	2001/02	2002/03	2001/02	2002/03	2001/02	2002/03	2002/03
α -pineno	0.7	1.1	0.8	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0
sabineno	1.6	2.5	1.5	1.3	0.1	0.2	0.1	0.2	2.3	2.7	5.9
6-metil-5-hepten-2-ona	0.6	0.8	0.3	0.7	0.8	0.6	0.8	0.7	0.7	1.0	0.4
<i>para</i> -cimeno	0.1	1.1	0.1	0.0	0.0	1.1	0.0	1.6	0.1	0.0	0.0
limoneno	12.1	16.8	13.9	13.1	21.0	21.9	20.1	20.3	12.7	12.3	0.2
1,8-cineol	5.8	6.9	7.6	5.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>cis</i> sabineno hidrato	1.3	0.7	0.7	0.4	0.8	0.4	0.7	0.3	0.5	0.2	0.3
α -tuyona	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.2	0.2	1.0
citronelal	0.6	0.4	0.6	0.0	0.1	0.6	0.1	0.0	0.1	0.4	3.0
neral	17.7	17.9	15.5	19.5	21.5	21.5	21.6	21.0	23.5	23.9	22.6
piperitona	0.6	0.6	0.7	0.5	0.5	0.4	0.5	0.5	0.5	0.5	0.6
geranial	21.3	22.6	18.3	25.4	25.2	26.8	25.7	27.1	30.8	32.2	28.9
acetato de geranilo	1.0	0.7	1.0	1.2	2.2	2.1	2.3	2.2	0.5	0.6	1.9
β -cariofileno	1.7	1.4	1.3	1.0	3.0	1.8	2.4	1.5	1.8	1.4	0.2
<i>ar</i> -curcumeno	4.0	3.3	3.7	3.5	1.9	2.0	1.8	1.9	2.3	1.9	1.6
<i>epi</i> -cubebol	0.0	0.5	0.0	0.1	0.3	0.3	0.1	0.3	0.3	0.7	0.0
óxido de cariofileno	5.4	4.0	4.9	4.3	3.0	2.7	3.4	3.2	4.9	4.1	3.8
espatulenol	4.0	3.0	4.2	2.7	5.1	5.6	5.9	5.7	3.7	3.7	5.2
tau-cadinol	1.4	0.9	1.3	0.9	1.8	1.2	2.0	1.3	1.4	0.7	0.1
Total identificado	80.3	85.2	76.4	80.5	87.2	89.6	87.3	87.9	86.4	86.3	76.1

Se observaron perfiles cromatográficos diferentes. Todas las muestras analizadas presentaron como compuestos principales: neral (15.5%-23.9%) y geranial (18.3%-32.2%). Sin embargo, las muestras de Chile (Rancagua y Talca) se caracterizaron por presentar un porcentaje alto de 1,8 cineol (5.0%-7.6%), compuesto que no está presente en el resto de las muestras analizadas. En todas las muestras el tercer compuesto mayoritario fue el limoneno (12.1%-20.3%) con excepción de la esencia procedente de Salta, en la que este compuesto fue encontrado en muy baja concentración (0.2%). Esta última presentó un alto contenido de sabineno (5.9%) y citronelal (3.0%) con respecto al resto de las muestras.

Los perfiles cromatográficos obtenidos pueden observarse en la Figura 7.

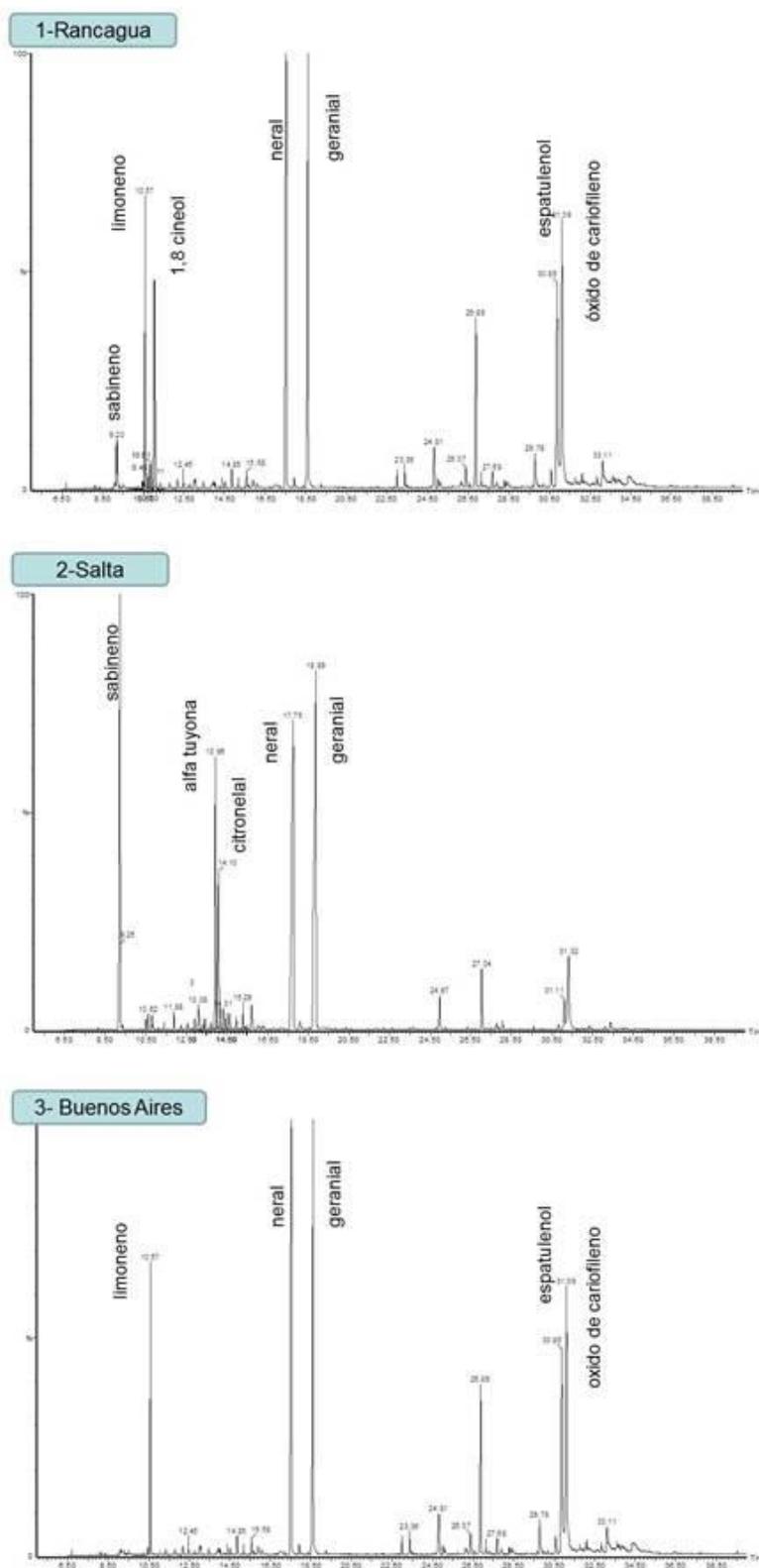


Figura 7. Perfiles cromatográficos en columna no polar de las muestras analizadas

Las composiciones químicas de todas las muestras fueron analizadas simultáneamente utilizando un método multivariado como lo es el análisis de componentes principales (ACP).

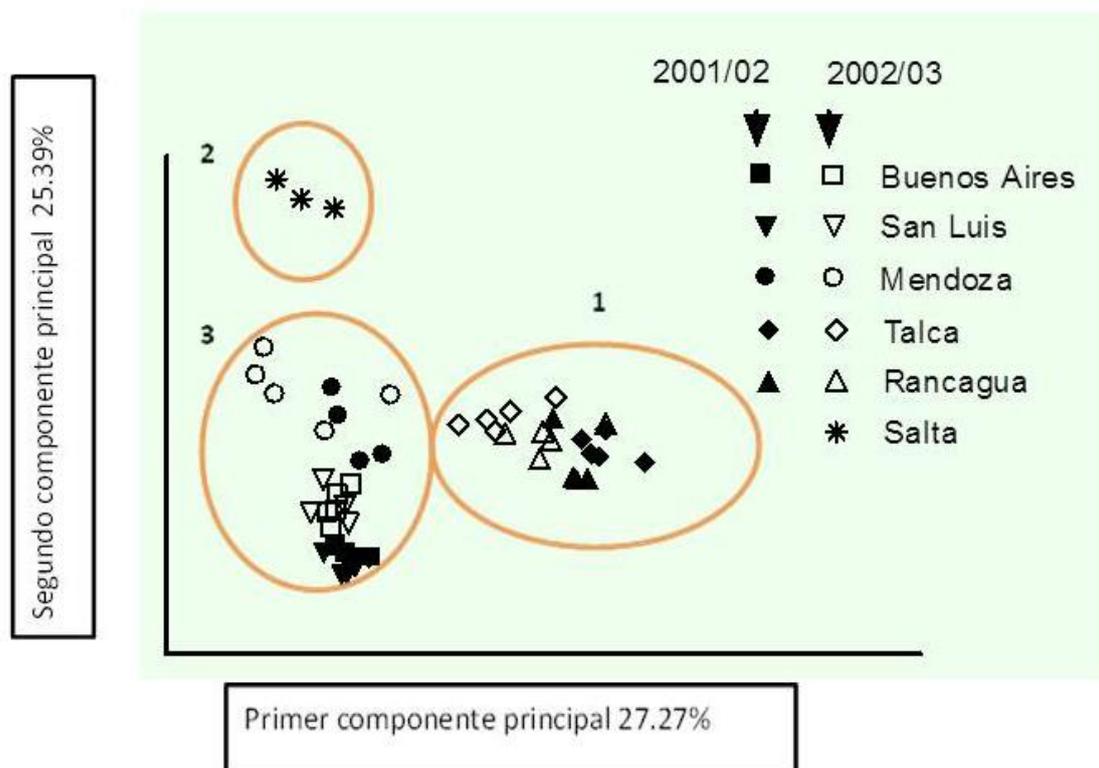


Figura 8. Agrupamiento obtenido por ACP a partir del análisis estadístico de la composición química de los aceites esenciales analizados en esta parte del trabajo.

Este análisis permitió ver los compuestos discriminantes: 1,8-cineol, neralgeranial, α -pineno, ar-curcumeno, sabineno, α -tuyona, citronelal y limoneno.

En el gráfico resultante (Figura 8) se observa que las muestras conformaron 3 grupos diferentes:

- Quimiotipo 1: caracterizado por la presencia de 1,8-cineol, un menor contenido de citral (neral y geranial) y un mayor porcentaje de α -pineno y ar-curcumeno (accesiones de Rancagua y Talca).
- Quimiotipo 2: caracterizado por un alto porcentaje de sabineno, α -tuyona y citronelal, con bajo contenido de limoneno (muestra de Salta).

- Quimiotipo 3: caracterizado por el perfil químico más representativo, con altos porcentajes de limoneno, neral y geranial. Estas muestras presentaron bajo contenido o ausencia de 1,8-cineol, citronelal y α -tuyona (accesiones de Mendoza, San Luis y Buenos Aires).

La composición de los aceites esenciales de Mendoza, Buenos Aires y San Luis (quimiotipo 3) fue similar a la reportada por diferentes autores, tanto para muestras de origen nacional (Gillij *et al.*, 2008; Oliva *et al.*, 2010) (ver tabla 1), como también de otros orígenes (Buil *et al.*, 1975; Ohno *et al.*, 2003; de Figueiredo *et al.*, 2004; Sartoratto *et al.*, 2004; Santos-Gomes *et al.*, 2005; Diaz *et al.*, 2007; Argyropoulou *et al.*, 2007; Olivero-Verbel *et al.*, 2009; Escobar *et al.*, 2010; Bensabah *et al.*, 2015) (ver tablas 1, 2 y 5).

Las muestras de Rancagua y Talca, Chile, se diferenciaron de las otras muestras por su preponderancia de α -pineno, 1,8-cineol y ar-curcumeno y en los contenidos más bajos de neral y geranial, en detrimento de su perfil aromático.

La muestra de Salta presentó altos contenidos de sabineno, α -tuyona, y citronelal.

Los resultados obtenidos en este ensayo muestran claramente la variabilidad genotípica intraespecífica del cedrón. El hecho de que todas las plantas fueran cultivadas durante dos años bajo las mismas condiciones ambientales y fueran analizadas utilizando las mismas metodologías permitió una verdadera evaluación de las manifestaciones genotípicas, independientemente de otras posibles influencias. Es decir que las diferencias encontradas en la composición química del aceite esencial se deben a que son distintos genotipos.

Al mismo tiempo, este ensayo proporcionó información sobre las muestras que crecen en la Argentina, demostrando no solo que las provenientes de San Luis cumplen con el patrón aromático requerido por el mercado para esta especie, sino también que Buenos Aires y Mendoza pueden ser considerados como lugares de los que se podría obtener un buen material para cultivo.

Ensayo B: Determinación de marcadores de calidad de aceite esencial de cedrón

Ya confirmada la presencia de diferentes quimiotipos de cedrón en la Argentina, se realizó un segundo estudio con el objetivo de establecer marcadores fitoquímicos que caracterizaran la calidad típica de cedrón argentino en función de la composición química de su AE. Para esto se amplió la zona de muestreo con respecto al trabajo realizado anteriormente, incluyendo también material de origen comercial.

Análisis de los aceites esenciales.

Veintitrés muestras de partes aéreas de cedrón de origen argentino fueron destiladas para obtener su AE, los que posteriormente fueron analizados por GC-FID-MS para determinar su composición química. Se identificaron más de 50 compuestos de los cuales 44 fueron los más representativos para estas muestras (Tabla 21). Los mismos representaron más del 90% del total analizado y se encontraban por lo menos en alguna muestra con un porcentaje mayor al 0.05%.

La mayoría de las muestras de procedencia argentina, así como las de Paraguay, mostraron un perfil cromatográfico similar, en donde se observó una composición química típica para el cedrón de la Argentina, representada en la tabla 21 en la columna A. En esta oportunidad se encontraron, además, dos aceites esenciales con composición química diferente al patrón típico: el tipo B, caracterizado por la presencia de sabineno, limoneno y citronelal y el tipo C caracterizado por la presencia de 1,8-cineol y un alto contenido de β -tuyona (Tabla 21). El tipo B fue de una muestra comercial proveniente de la provincia de Buenos Aires. El tipo C estuvo restringido principalmente a material procedente de las provincias de Salta y Jujuy.

Tabla 21. Composición química del AEC analizado en este ensayo

Compuesto	A	B	C
sabineno	-	11.2	4.3
1-octen-3-ol	0.1	-	-
mirreno	-	0.4	0.2
β -pineno	-	0.5	0.2
6-metil-5-hepten-2-ona	0.5	0.9	-
p-cimeno	-	-	0.1
limoneno	10.3	40.3	0.5
1,8-cineol	-	tr	9.6
2,6-dimetil-5-heptenal	-	0.5	-
γ -terpineno	-	-	0.1
cis-hidrato de sabineno	-	-	1.1
linalol	0.5	-	-
α -tuyona	-	-	1.1
β -tuyona	0.1	-	73.4
<i>trans</i> -p-menta-2,8-dien-1-ol	0.4	0.5	2.4
<i>cis</i> -óxido de limoneno	0.5	0.5	-
fotocitral A	0.4	-	-
<i>trans</i> -óxido de limoneno	-	1.0	-
<i>trans</i> -verbenol	0.1	-	-
citronelal	-	21.6	-
pinocarvona	-	-	1.3
δ -terpineol	-	-	0.2
terpinen-4-ol	-	-	0.4
α -terpineol	0.2	tr	1.8
<i>trans</i> -carveol	-	0.6	-
nerol	1.1	-	-
neral	20.0	3.0	-
carvona	1.0	0.9	0.2
carvotanacetona	-	-	0.1
piperitona	0.2	-	-
geraniol	0.5	-	-
geranial	29.0	4.0	-
acetato de nerilo	3.0	-	-
acetato de geranilo	3.9	-	-
β -cariofileno	0.7	1.2	0.4
propionato de geranilo	0.3	-	-

Compuesto	A	B	C
ar-curcumeno	2.6	2.3	-
germacreno D	-	-	0.1
trans-nerolidol	0.3	-	-
espatulenol	2.6	0.7	0.1
ar-turmerol	0.4	-	-
óxido de cariofileno	11.1	1.0	0.5
epoxi humuleno II	0.2	-	-
α -murolol	1.7	0.5	-
Total identificado	91.7	91.6	98.1

A partir de estos resultados se buscó determinar qué compuestos podrían utilizarse como marcadores de calidad positivos y negativos del AE de cedrón, con el fin de redactar normas de calidad.

El citral se considera el compuesto más representativo de este aceite ya que presenta un sabor característico a limón. Sin embargo y a pesar de la opinión de algunos autores (Kaiser y Lamparsky, 1976a), que consideran que los fotocitrales A y B, serían los responsables del olor característico, en esta oportunidad fueron detectados en baja cantidad en todas las muestras analizadas. Además, es sabido que estos derivados del citral se forman y descomponen en presencia de luz UV (Iwanami *et al.*, 1997). Por ese motivo no sería un indicador de calidad adecuado.

El limoneno es el segundo constituyente más abundante en todas las muestras analizadas, por lo tanto, podría ser considerado un buen indicador de calidad.

Se detectaron, además, citronelal, α y β tuyona en cantidades significativas en algunas muestras, principalmente de las regiones del NOA. Estos perfiles constituyen quimiotipos atípicos. Por otra parte, el aroma de estas esencias es muy diferente al típico, que es alimonado. En el caso de contener citronelal el aroma es fuertemente herbáceo y cítrico. Si el AE tiene tuyona, el perfil aromático es herbáceo y verde agreste. Es importante señalar que las tuyonas son potencialmente tóxicas. Por esta razón fueron usados como marcadores negativos.

Otros monoterpenos, tales como sabineno, p-cimeno, nerol y geraniol fueron descartados como posibles marcadores, debido a su baja incidencia en el perfil

aromático. Sin embargo, se encontró que el 1,8-cineol podría ser utilizado como marcador para muestras provenientes de Chile, Europa y África (Bellakhdar *et al.*, 1994; Santos Gomes *et al.*, 2005; Gil *et al.*, 2007)

La 6-metil-5-hepten-2-ona se consideró también como un marcador con incidencia negativa. Es un compuesto que se produce fácilmente por descomposición del citral (Wolken *et al.*, 2000) en el momento de la extracción. Un alto contenido de este compuesto puede deberse a una destilación deficiente o a condiciones de almacenamiento inadecuadas. En estas muestras no se detectó en cantidades importantes.

El sesquiterpeno más comúnmente detectado fue el ar-curcumeno, que está presente en todas las muestras en cantidades significativas, coincidiendo con los trabajos sobre muestras portuguesas realizadas por Santos Gomes *et al.* (2005). Esta característica nos permite utilizarlo como marcador distintivo para diferenciarlo de otras especies que contienen citral, “*citral bearing plants*”, con perfiles aromáticos similares como *Cymbopogon citratus*, *Litsea cubeba* o *Melissa officinalis*.

Para establecer los rangos de variación de cada marcador (tabla 22) se postuló como criterio que el 90% de las muestras analizadas estuviera dentro del rango para el caso de los marcadores positivos (citral, limoneno y ar-curcumeno) y en el caso de los marcadores negativos se estableció como límite que no se encontraran en el 95% de las muestras analizadas.

Tabla 22. Rangos establecidos para los diferentes marcadores de calidad

Marcador	Compuesto	Rango de aceptación (%)
Positivo	limoneno	10 a 30
Positivo	neral	14 a 27
Positivo	geranial	17 a 36
Positivo	ar-curcumeno	> 1
Negativo	1,8-cineol	< 1
Negativo	6-metil-5-hepten-2-ona	< 3,5

Marcador	Compuesto	Rango de aceptación (%)
Negativo	citronelal	< 0,5
Negativo	α -tuyona + β -tuyona	< 0,5

Una vez establecidos los rangos para cada marcador, se redactó la monografía de Cedrón para la Farmacopea Argentina, teniendo en cuenta los antecedentes para esta especie, el trabajo de Gattuso *et al.*, 2008, considerando los procedimientos de redacción utilizados en dicha norma.

Monografía propuesta para cedrón. Farmacopea Argentina 7ª Edición. No oficial

CEDRÓN, hoja

Definición - Cedrón está constituido por hojas enteras o fragmentadas de *Aloysia citrodora* Paláu (Verbenaceae). La droga entera debe contener no menos de 0,2 por ciento de aceite esencial. La droga fragmentada debe contener no menos de 0,15 por ciento de aceite esencial.

Cedrón debe cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos bien cerrados, almacenados en sitio fresco y seco.

ENSAYOS

Identificación

A- Características macroscópicas - Hojas enteras, con borde ligeramente aserrado, lanceoladas, de ápice acuminado, de 4 a 12 cm de longitud y 1 a 2,5 cm de ancho, brevemente pecioladas, ásperas al tacto y quebradizas. Cara superior de color verde oliva y cara inferior más clara. Nervadura media prominente en la cara inferior y con numerosas nervaduras secundarias, notablemente paralelas entre sí. Posee aroma cítrico característico y sabor ligeramente dulzaíno.

B - Características microscópicas - En vista superficial se observa una epidermis superior con células poliédricas, de paredes anticlinales mas bien rectas, cutícula lisa, y pelos unicelulares, verrucosos, silicificados, cistolíticos, adpresos, rodeados de una roseta de alrededor de 8 células poligonales, las que contienen cada una un cistolito de carbonato de calcio, y de pelos unicelulares de paredes gruesas, verrucosos, en forma de colmillo.

Los pelos glandulares pueden ser con una célula basal, una de pie y una cabeza secretora unicelular y pelos glandulares sésiles con cabeza unicelular. La epidermis inferior presenta células de paredes anticlinales sinuosas, con tricomas similares a los descriptos, pero en mayor cantidad, con estomas elevados de tipo anomocítico y cutícula estriada sobre las nervaduras. El corte transversal pone de manifiesto a ambas epidermis uniestratificadas. El

mesófilo es dorsiventral con 1 a 2 hileras de parénquima en empalizada y 3 a 4 hileras de parénquima esponjoso. En la región del nervio medio, se observa colénquima angular en relación con ambas epidermis. El haz vascular es colateral, con floema hacia ambas caras.

C - Droga en polvo - Polvo color verde claro. Muestra fragmentos de epidermis superior sin estomas y de epidermis inferior con estomas, pelos con los caracteres ya descritos y fragmentos de nervaduras.

D - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver 100. Cromatografía) recubierta con gel de sílice con indicador de fluorescencia, de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Tolueno y acetato de etilo (96:4).

Solución estándar - Transferir 0,1 ml de citral a un matraz aforado de 10 ml y completar a volumen con etanol.

Solución muestra - Transferir 0,1 ml de la porción de aceite esencial obtenida en Valoración a un matraz aforado de 10 ml y completar a volumen con etanol.

Revelador - Anisaldehído sulfúrico (SR).

Procedimiento- Aplicar por separado 5 µl de la Solución estándar y 5 µl de la Solución muestra. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartas partes de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara y dejar secar a temperatura ambiente. Examinar la placa bajo la luz ultravioleta a 254 nm. La banda mayoritaria en el cromatograma obtenido a partir de la Solución muestra debe ser similar a la obtenida con la Solución estándar, correspondiente al citral.

Rociar sobre la placa con Revelador y calentar entre 5 a 10 minutos a una temperatura comprendida entre 100 y 105 °C. Examinar la placa bajo luz natural. La banda mayoritaria de color violeta grisáceo en el cromatograma obtenido con la Solución muestra debe ser similar en valor de R_f y color a la obtenida con la Solución estándar.

Materia extraña (ver 630. Métodos de Farmacognosia)
No debe contener más de 2 %.

Pérdida por secado (ver 630. Métodos de Farmacognosia)
No debe contener más de 11 %.

Cenizas totales (ver 630. Métodos de Farmacognosia)
No debe contener más de 10 %.

Control higiénico (ver 630. Métodos de Farmacognosia)
Debe cumplir con los requisitos.

Determinación de aflatoxinas <110>
Debe cumplir con los requisitos.

Aceites esenciales y perfil cromatográfico

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de gases con un detector de ionización a la llama, un inyector de flujo dividido y una columna capilar de 30 m × 0,25 mm de sílice fundida recubierta con fase estacionaria constituida por polietilenglicol de peso molecular aproximadamente 20.000 y de 0,25 µm de espesor.

Mantener la temperatura de columna a 60 °C durante 10 minutos y programar un aumento de 2 C por minuto hasta alcanzar 180 °C y mantener a esta temperatura durante por lo menos 5 minutos.

Mantener el inyector y el detector a aproximadamente 220 °C. Se debe emplear nitrógeno como gas transportador y la velocidad lineal debe ser aproximadamente 35 cm por minuto. Ajustar la relación de división del inyector en 1:100.

Solución estándar - Disolver 100 mg de limoneno, 100 mg de eucaliptol, 200 mg de citral y 100 mg de citronelal en 5 ml de ciclohexano.

Solución muestra - Emplear una porción de aceite esencial obtenida en ciclohexano en Valoración.

Aptitud del sistema (ver 100. Cromatografía) - Cromatografiar la solución estándar y registrar las respuestas de los picos según se indica en Procedimiento: la resolución R entre los picos correspondientes a limoneno y eucaliptol no debe ser menor de 1,5 y el número de platos teóricos calculado a partir del pico de limoneno debe ser mayor a 30.000.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 1 µl) de la Solución estándar y de la Solución muestra. Registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los todos los picos. Determinar los tiempos de retención relativos al pico de geranial (trr) y determinar el contenido en porcentaje de cada uno de los constituyentes por el método de normalización porcentual.

El contenido en porcentaje de aceites esenciales son los indicados en la siguiente tabla:

Compuesto	Contenido (%)
Limoneno	Entre 10 y 30 %
1,8 cineol	Menor de 1,0 %
6-metil-5-hepten-2-ona	Menor de 3,5 %
<i>cis</i> -tuyona + <i>trans</i> -tuyona	Menor de 0,5 %
Citronelal	Menor de 0,5 %
Neral	Entre 14 y 27 %
Geranial	Entre 17 y 36 %
ar-Curcumeno	Mayor de 1,0%

VALORACIÓN

Pesar 25,0 g de Cedrón recientemente reducido a polvo y transferir a un balón de 1 litro. Destilar con 300 ml de agua y 0,5 ml de ciclohexano en el tubo graduado, a una velocidad de 2 a 3 ml por minuto durante 2 horas. (ver Determinación de aceites esenciales en 630. Métodos de Farmacognosia.

Ensayo C: Evaluación química de los metabolitos de mayor interés en cedrón a lo largo de un ciclo de cultivo en la Estación Experimental Agropecuaria INTA Cerro Azul, provincia de Misiones

El objetivo de este trabajo fue evaluar las variaciones en el contenido y calidad del AE y la variación en el contenido de verbascósido durante un año en muestras cultivadas en el mismo sitio. El cultivo del cedrón utilizado para este ensayo fue desarrollado en la EEA INTA Cerro Azul, Misiones que se encuentra a S 27° 39', O 55° 26', a 281 m.s.n.m. El clima en ese lugar es subtropical húmedo, con un régimen pluviométrico isohigro, las deficiencias hídricas se producen a fines de primavera y en la primera mitad del verano. El invierno es relativamente benigno, aunque suelen producirse heladas de moderada intensidad (Olinuck, 1998).

Análisis de los aceites esenciales

De cada una de las muestras recolectadas a lo largo de un año, se obtuvo el AE por hidrodestilación. Se determinó el contenido de AE utilizando 30 g de cada material. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 23: Rendimiento (% V/P) de AEC a lo largo de un año

	Fecha de recolección								
	nov-09	dic-09	ene-10	feb-10	abr-10	may-10	jun-10	oct-10	nov-10
Rendimiento de aceite esencial (% V/P)	1.1	1.6	1.3	0.7	1.0	0.4	0.4	0.3	1.0

Se pudo observar una variación en el contenido anual de AE (0.3-1.6% V/P).

Para las características agroecológicas de Cerro Azul, Misiones, el contenido de AE fue bueno durante todo el año, cumpliendo con lo requerido por la Farmacopea Europea 8.0. El máximo rendimiento obtenido (1.6% V/P) fue para el mes de diciembre, a diferencia de lo determinado por Vogel *et al.* (1997) que el mayor rendimiento lo obtuvo en el mes de octubre (0.9% V/P). Esto puede deberse a que el

suelo y el clima de Talca, Chile, es muy diferente al de la provincia de Misiones. La producción de AE disminuyó cuando la radiación solar fue menor en los meses de mayo y junio (Figura 9), al igual que lo observado por Paulus *et al.*, (2013). La radiación solar es un factor importante que puede interferir directamente en el crecimiento y desarrollo de la planta e indirectamente en la producción de biomasa y la calidad del AE (Sangwan *et al.*, 2001).

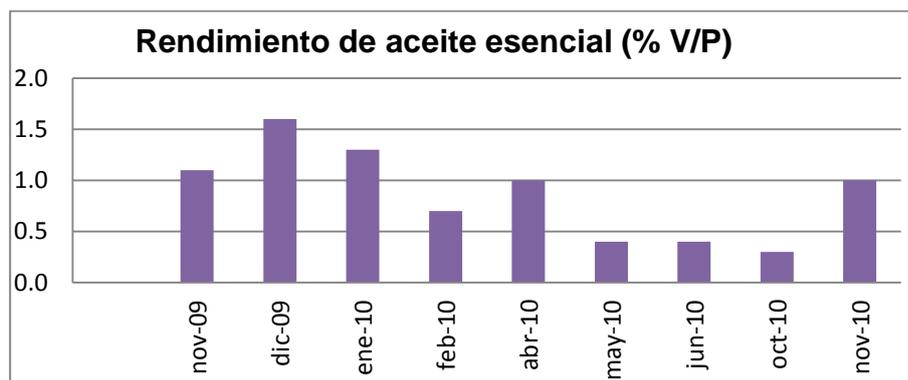


Figura 9: Variación del contenido de aceite esencial de cedrón en el ensayo

De cada uno de los AE obtenidos se realizó la determinación de la composición química por GC-FID-MS. Se observó que los perfiles cromatográficos (Figura 12) fueron similares durante todo el año. Se identificaron alrededor de 30 compuestos. Los 14 compuestos mayoritarios figuran en la tabla 24, representaron entre el 72.4% y el 90.8% del total de la esencia. El perfil químico del AE de este cultivo de cedrón (Figura 12) fue la de un cedrón típico, con alto contenido de limoneno, neral y geranial. Las variaciones observadas solo fueron cuantitativas, observándose los contenidos óptimos para neral y geranial (citrál) durante todos los meses ensayados, con excepción del mes de junio, en el que fue muy bajo 8.4% y 11.4% respectivamente (Figuras 10 y 11). En cambio, el contenido de limoneno fue bajo durante todo el año, con valores entre 3.1 y 7.7%. Ninguna muestra cumplió con el valor establecido en el ensayo B (Tabla 22), en donde se propuso que el contenido debería estar entre 10 y 30%.

Tabla 24. Composición química del AE de hojas de *A. citrodora* analizados en este ensayo

Compuestos	Fecha de recolección								
	nov-09	dic-09	ene-10	feb-10	abr-10	may-10	jun-10	oct-10	nov-10
	Porcentaje								
sabineno	1.1	1.0	1.1	1.0	1.2	1.1	0.3	0.5	1.3
6-metil-5-hepten-2-ona	3.4	1.0	1.3	1.2	5.3	1.7	0.3	2.8	3.7
limoneno	4.2	4.1	5.1	7.7	4.6	5.1	7.4	3.9	7.0
<i>cis</i> - β -ocimeno	0.4	0.1	0.2	0.0	0.3	0.1	0.0	0.0	0.2
α -tuyona	0.0	0.0	0.0	0.2	0.1	0.3	0.0	0.0	0.1
citronelal	0.2	0.0	0.1	0.0	0.3	0.2	0.0	0.2	0.3
neral	25.7	30.3	28.9	17.4	23.9	28.8	8.4	14.7	21.9
geranial	34.5	39.4	37.3	23.6	32.7	37.6	11.4	22.1	30.1
β -cariofileno	2.4	2.8	2.3	1.3	3.0	1.4	1.2	2.3	0.0
ar-curcumeno	1.3	1.5	1.6	0.0	1.7	2.1	9.0	5.9	2.7
germacreno D	1.5	1.4	1.2	5.4	0.9	0.1	0.4	0.6	0.4
<i>trans</i> -nerolidol	1.6	1.5	0.6	1.5	2.3	2.0	2.5	3.7	1.8
espatulenol	3.7	2.7	3.0	7.6	3.3	3.9	15.8	13.8	6.1
óxido de cariofileno	1.3	1.8	3.0	8.6	3.2	4.2	13.1	7.1	4.2
Total identificado	83.1	89.8	88.6	76.4	84.6	90.8	72.4	79.2	81.3

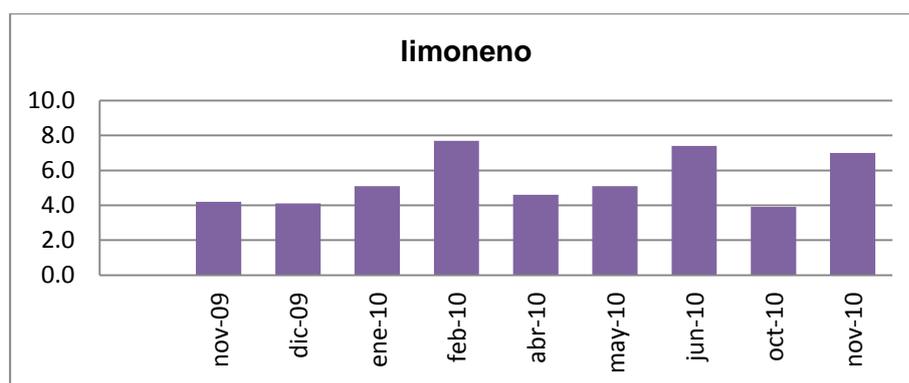


Figura 10. Variación del contenido de limoneno en el período ensayado

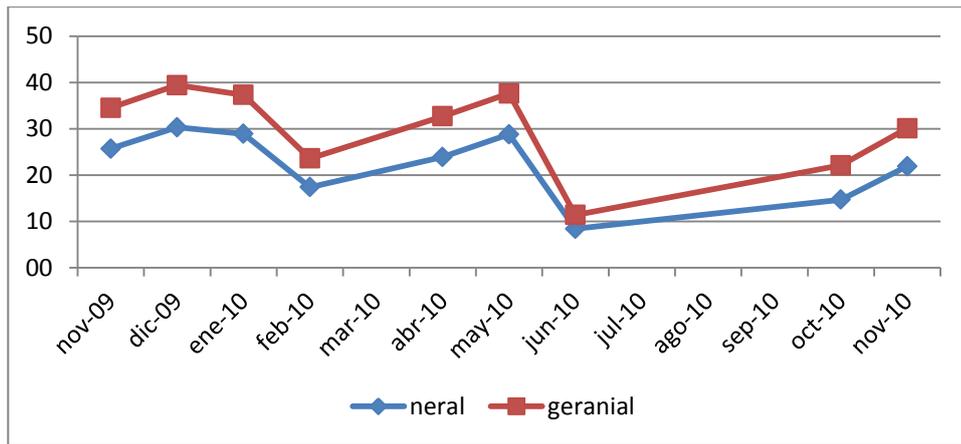


Figura 11. Variación del contenido de citral en el período ensayado

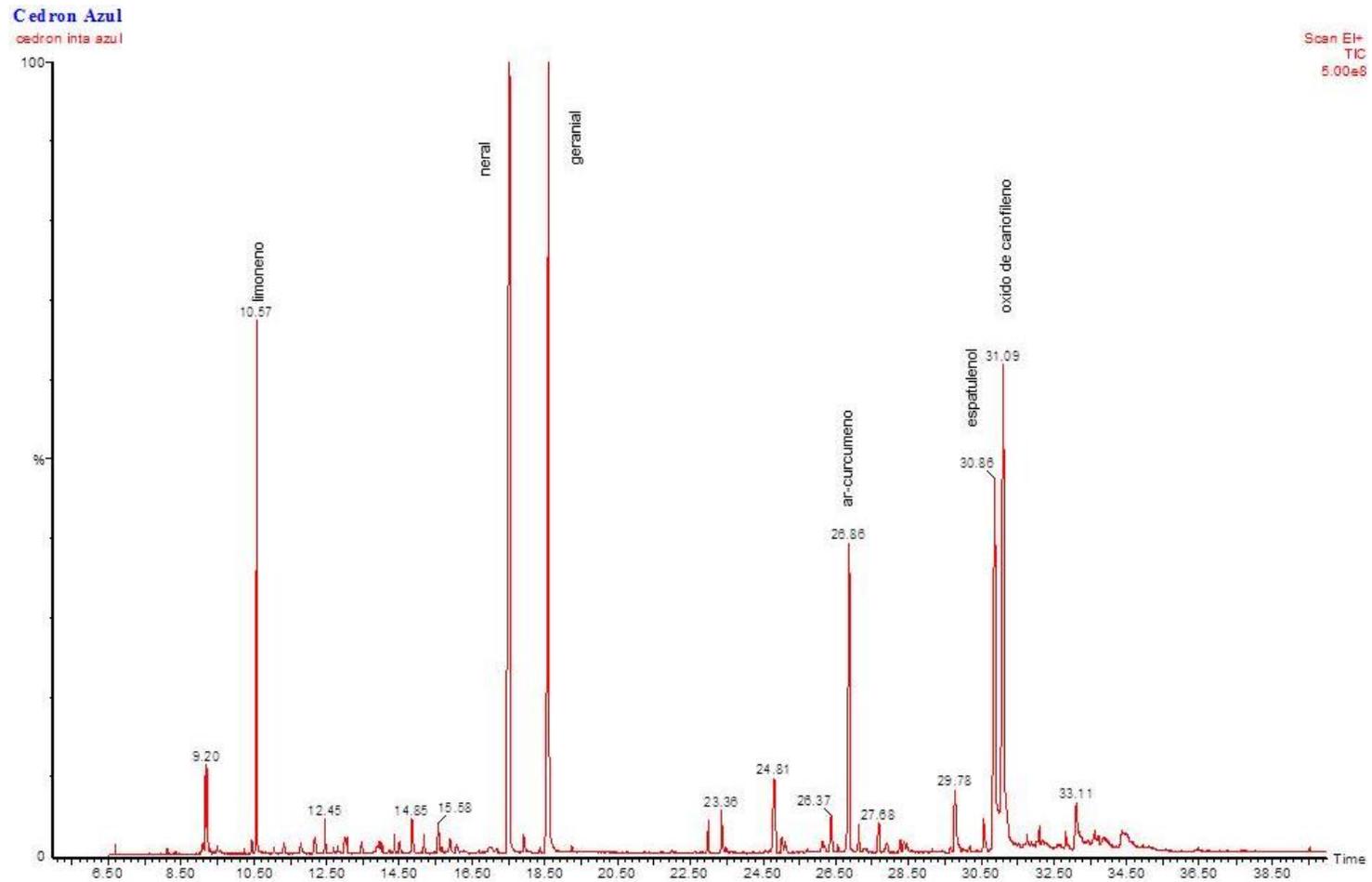


Figura 12. Perfil cromatográfico en columna no polar del aceite esencial de cedrón cultivado en Misiones. Observación: solo se incluye el cromatograma de una muestra

Análisis de la fracción no volátil

De todas las muestras analizadas se determinó además el contenido de verbascósido por HPLC (Tabla 26, Figura 13) según Farmacopea Europea 8.0 (2016), ya que, a partir de su 6° edición del año 2008, considera a este constituyente como un marcador de calidad a los fines de su uso medicinal.

El perfil cromatográfico observado fue el mismo durante todo el período ensayado (Figura 13), presentando variaciones en el contenido de verbascósido (Tabla 26). El mayor contenido se observó en la muestra cosechada en el mes de enero (2.9%) y el menor en el mes de febrero (0.9%) (Tabla 26).

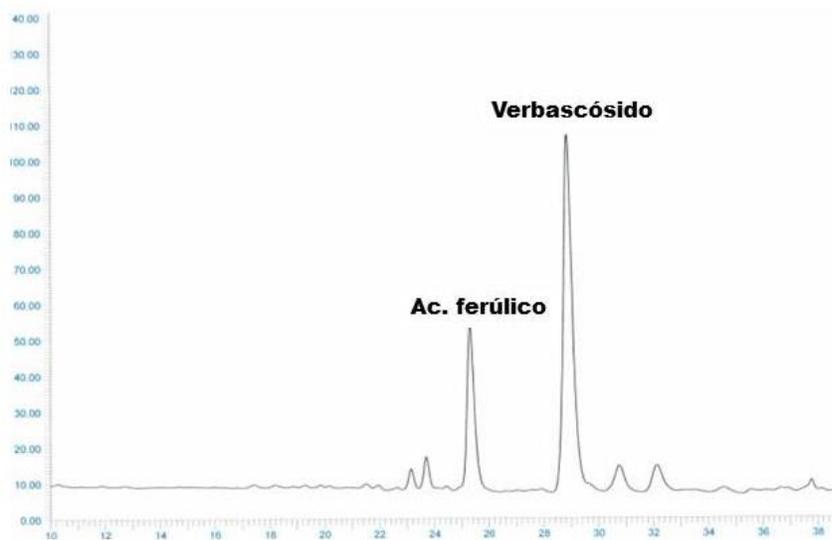


Figura 13. Perfil cromatográfico por HPLC de hojas de *Aloysia citrodora* cultivado en Misiones, determinado según Farmacopea Europea 8.0

Tabla 26. Variación anual del contenido de verbascósido de hojas de cedrón cultivado en Misiones

	Fecha de recolección								
	nov-09	dic-09	ene-10	feb-10	abr-10	may-10	jun-10	oct-10	nov-10
Contenido de verbascósido (% P/P)	1.8	2.2	2.9	0.9	1.8	2.2	2.6	1.6	1.5

Como puede visualizarse en la Figura 14, el contenido de verbascósido cumplió con lo exigido por las normas europeas (> 2.5%) solamente en los meses de enero y junio.

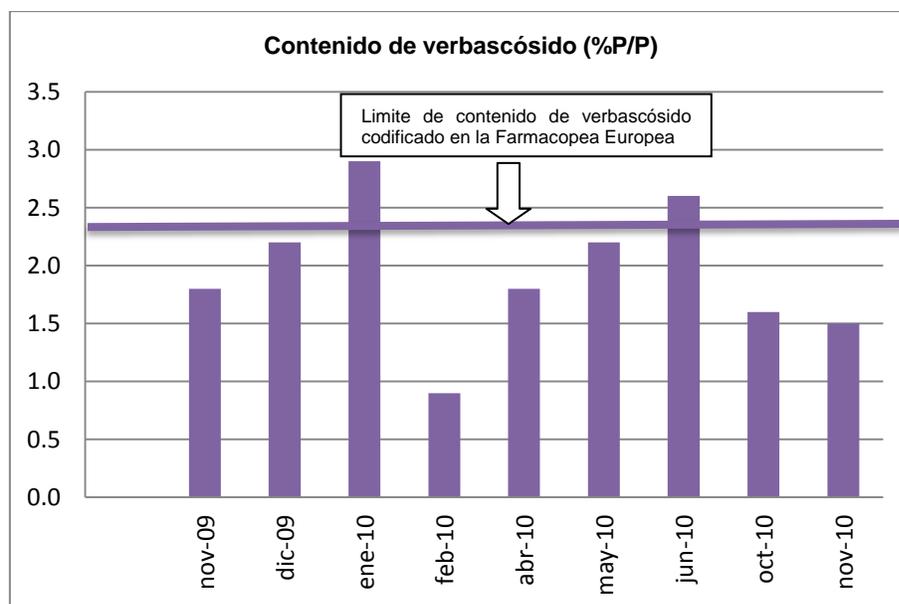


Figura 14. Variación anual del contenido de verbascósido de cedrón de Misiones

Teniendo en cuenta ambas determinaciones, el contenido de AE y el de verbascósido, se justificaría la colecta de cedrón en Misiones en los meses de diciembre-enero ya que ambos resultados fueron óptimos en ese período.

Ensayo D: Análisis de los metabolitos de mayor interés en muestras de cedrón de un Banco de Germoplasma, situado en la provincia de Entre Ríos

Como una contribución por la experiencia adquirida debido a los trabajos previamente realizados, se realizó un trabajo en colaboración con el Banco de Germoplasma de la provincia de Entre Ríos, convenio Escuela Agrotécnica Las Delicias – Secretaria de la Producción de Entre Ríos – Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNER, ubicado en el Departamento Paraná, Provincia de Entre Ríos, Argentina (S 31° 55' 03"; O 60° 25' 22"). Un banco de germoplasma es una reserva activa de material genético donde se conserva y estudia la variabilidad natural de las plantas. Los bancos de germoplasma de plantas poseen colecciones de material vegetal, con el objeto de mantenerlas vivas y preservar sus características para el futuro beneficio de la humanidad y del ambiente. Esto permite conocer las diferentes especies vegetales y poder llevar a cabo su aprovechamiento eficiente. Este banco cuenta con especies exóticas naturalizadas, como el romero, y nativas, como el cedrón.

Las plantas se evaluaron al alcanzar la etapa reproductiva. La cosecha se realizó en el mes de febrero, en plena floración.

Con el fin de seleccionar los mejores clones de cedrón para distintas aplicaciones, se determinó el contenido y calidad de sus aceites esenciales como así también el contenido de verbascósido (Tabla 29 a 31).

Por otra parte, los investigadores del Banco de Germoplasma generaron un listado de descriptores morfológicos con el fin de facilitar su identificación y caracterización morfoanatómica (Farías *et al.*, 2010a). (Ver Figura 15, Tabla 27).

Morfología de las muestras analizadas

Para diferenciar los clones se realizaron en una primera etapa las observaciones morfológicas de las hojas y se evaluaron 8 descriptores: color, forma, ápice, base, contorno, longitud, latitud y pecíolo (Figura 15). Además se realizó una tabla

comparativa para relacionar las similitudes y las diferencias entre los distintos clones estudiados (Tabla 27).



Figura 15. Hojas de cedrón analizadas en este ensayo

Descriptores utilizados

Hoja Color: Determinado en etapa de crecimiento y plena madurez

1. Verde claro
2. Verde amarillento
3. Verde intenso
4. Verde azulado
5. Verde grisáceo
6. Otro (especificar)

Hoja Forma – Contorno: Observada en el sector medio de la rama del año expuestos a la luz solar.

1. Lanceolada
2. Oblanceolada
3. Elíptica
4. Oval

Hoja Forma Ápice: Observada en el sector medio de la rama del año expuestos a la luz solar.

1. Agudo
2. Atenuado
3. Otro (especificar)

Hoja Forma Base:

1. Aguda
2. Atenuada
3. Obtusa

Hoja – Bordes:

1. Entero – liso
2. Ondulado
3. Dentado a todo lo largo
4. Entero, con algunos dientes
5. Otro (especificar)

Hoja tamaño – Longitud:

1. Pequeñas: menos de 8 cm
2. Medianas: de 8 a 10 cm
3. Grandes: más de 10 cm

Hoja tamaño – Latitud:

1. Angostas: menos de 2cm
2. Medianas: 2 a 3 cm
3. Anchas: más 3 cm

Hoja Pecíolo Longitud:

1. Corto: hasta 5 mm
2. Mediano: 5 a 10 mm

Tabla 27. Descriptores de cedrón aplicado a las muestras del Banco de Germoplasma de Entre Ríos

Clones	1	2	3	4	5	6	7	Salta	Guerrero	Semilla
1- Hoja color										
1. Verde claro						x				
2. Verde amarillento					x					
3. Verde intenso	x	x	x	x			x			x
4. Verde azulado								x	x	
Hoja forma-contorno										
1. Lanceolado	x		x	x	x	x	x	x	x	

Resultados y discusión

Clones	1	2	3	4	5	6	7	Salta	Guerrero	Semilla
2. Oblanceolado		x								x
Hoja forma-ápice										
1. Agudo	x	x		x	x		x			
2. Atenuado			x			x		x	x	
3. Obtuso										x
Hoja forma-base										
1. Aguda	x			x	x					
2. Atenuada		x				x		x	x	x
3. Redondeada			x							
Hoja bordes										
1. Entero – liso				x					x	
2. Ondulado		x	x							
3. Dentado a todo lo largo					x	x	x	x		
4. Entero, con algunos dientes	x									x
Hoja tamaño-longitud										
1. Pequeñas: menos de 8 cm					x	x	x			
2. Medianas: entre 8 y 10 cm	x			x						x
3. Grandes: más de 10 cm		x	x					x	x	
Hoja tamaño-latitud										
1. Angostas: menos de 2 cm			x	x	x	x	x			
2. Medianas: entre 2 y 3 cm	x							x	x	
3. Anchas: más de 3 cm		x								x
Hoja pecíolo-longitud										
1. Corto: hasta 5 mm	x				x	x	x		x	
2. Mediano: de 5 a 10 mm		x	x	x				x		x

Tabla 28. Relación de caracteres coincidentes para los diferentes clones cultivados en el Banco de Germoplasma

Clones	1	2	3	4	5	6	7	"Salta"	"Guerrero"	"semilla"
1		2	2	5	3	2	4	2	3	3
2	2		4	3	1	1	3	2	2	5
3	2	4		4	2	2	3	4	3	2
4	5	3	4		4	2	4	2	2	3
5	3	1	2	4		5	6	2	2	0
6	2	1	2	2	5		5	4	4	1
7	4	2	3	4	6	5		2	2	1
"Salta"	2	2	4	2	2	4	2		6	2
"Guerrero"	3	2	3	2	2	4	2	6		1
"Semillas"	3	5	2	3	0	1	1	2	1	
Suma de coincidencias	26	20	26	29	25	26	30	26	25	18

Como se observa en la tabla 28, las hojas que mayor similitud morfológica presentaron fueron los clones 5 - 7 y Guerrero - Salta. El clon que más se diferenció del resto fue Semillas.

Análisis del aceite esencial

Cada una de las muestras fue destilada para obtener el AE. Los rendimientos fueron calculados sobre droga seca. Los resultados correspondientes, expresados como % V/P, se presentan en la tabla 29.

Tabla 29: Rendimientos (% V/P) de aceite esencial de hojas de cedrón del Banco de Germoplasma

	Clon 1	Clon 2	Clon 3	Clon 4	Clon 5	Clon 6	Clon 7	Semilla	Guerrero	Salta
Rendimiento de AE	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.2	1.0	0.5	1.0	0.7

En general, el rendimiento de aceite esencial fue bajo, 0.2% V/P, pero cumplió con lo exigido por la Farmacopea Europea 8.0 (mayor a 0.2%). Los mayores rendimientos fueron obtenidos para las muestras denominadas Clon 7 y Guerrero (1.0% V/P)

Los AE fueron analizados por GC-FID-MS. Se identificaron más de 30 compuestos siendo los principales los detallados en la tabla 30, que son los que estaban presentes en una concentración mayor a 0.05% en al menos una muestra. Se determinó que los compuestos principales en todas las muestras fueron limoneno, neral y geranial con excepción de la muestra procedente de Guerrero (Jujuy), en la que el compuesto principal fue β -tuyona (75.2%), al igual que la informada como tipo C en el ensayo B (tabla 21). La muestra denominada semillas a pesar de que presentó neral y geranial como compuestos principales, el contenido de limoneno fue muy bajo (0.5%) y el de sabineno fue muy alto (16%) con respecto al resto de los clones analizados. La muestra denominada Salta presentó un alto contenido de limoneno (36%) con respecto al resto de las muestras. En la Figura 16 se muestran los perfiles cromatográficos más representativos de este ensayo.

Tabla 30. Principales compuestos de AEC de muestras provenientes del Banco de Germoplasma (Universidad de Entre Ríos)

	Clon 1	Clon 2	Clon 3	Clon 4	Clon 5	Clon 6	Clon 7	Semilla	Guerrero	Salta
Compuesto	Porcentaje									
sabineno	tr	0.3	2.4	1.8	tr	0.1	1.9	16.0	5.0	0.1
6-metil-5-hepten-2-ona	1.1	0.8	3.2	2.7	0.8	0.6	1.9	0.1	0.1	1.5

	Clon 1	Clon 2	Clon 3	Clon 4	Clon 5	Clon 6	Clon 7	Semilla	Guerrero	Salta
Compuesto	Porcentaje									
limoneno	13.8	20.1	9.2	9.5	26.4	34.7	8.9	0.5	0.1	36.0
1,8-cineol	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.9	2.6
cis- β -ocimeno	0.3	0.4	0.0	0.0	0.2	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0
α -tuyona	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.2	0.0
β -tuyona	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	75.2	0.0
citronelal	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0	3.5
neral	21.4	17.8	21.7	22.6	18.2	13.7	26.7	15.7	0.0	17.4
geranial	28.8	22.0	26.4	29.3	24.3	17.2	35.9	23.2	0.0	26.8
acetato nerilo	0.3	tr	0.0	0.0	0.4	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0
acetato geranilo	2.3	1.7	tr	tr	2.1	1.3	0.0	0.0	0.0	0.0
β -cariofileno	1.7	1.8	0.9	0.2	1.7	1.9	0.8	1.4	0.0	0.0
ar-curcumeno	1.9	2.9	1.9	2.0	3.1	3.1	1.8	4.8	0.5	1.8
germacreno D	tr	tr	0.3	tr	0.3	0.1	0.4	0.0	0.0	0.0
trans-nerolidol	tr	tr	1.6	1.8	0.2	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0
espatulenol	2.6	3.3	6.5	5.9	2.9	2.7	4.3	13.1	0.0	1.9
óxido de cariofileno	4.2	7.0	4.3	4.7	7.5	9.3	2.8	10.4	0.3	5.4
Total identificado	78.4	78.1	78.4	80.5	88.1	85.0	86.6	85.4	83.3	97.0

tr: <0.05%

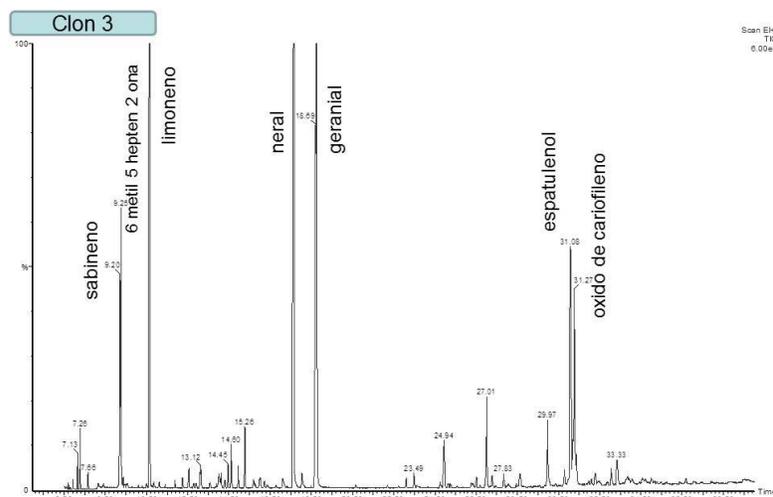


Figura 16. Perfiles cromatograficos en columna no polar de los AEC mas representativos del Banco de Germoplasma de Entre Ríos.

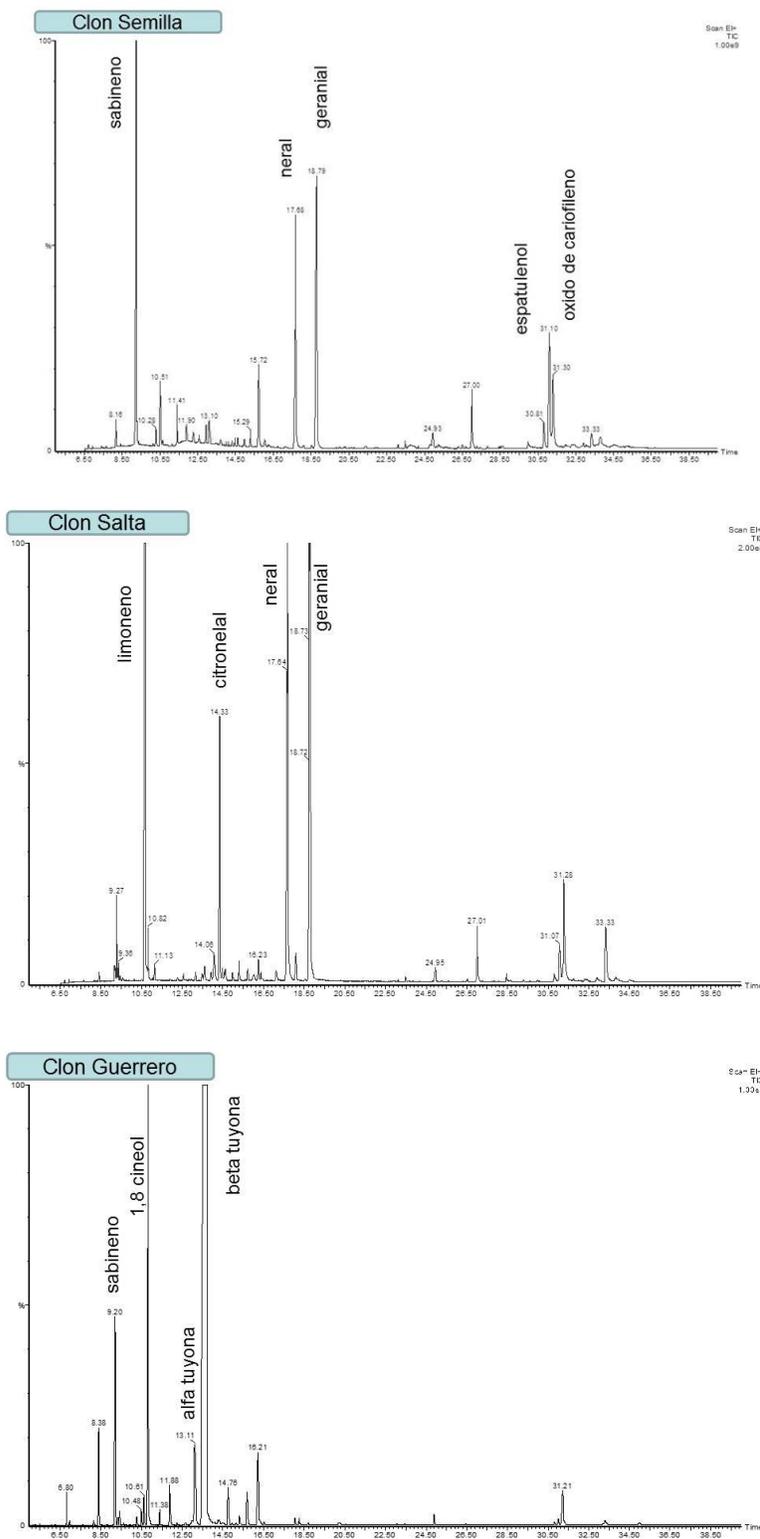


Figura 16 continuación. Perfiles cromatograficos en columna no polar de los AEC más representativos del Banco de Germoplasma de Entre Ríos.

Análisis de la fracción no volátil

El contenido de verbascósido por HPLC, según la Farmacopea Europea 8.0, fue determinado en todas estas muestras (Tabla 31). Los perfiles cromatográficos obtenidos fueron similares (Figura 17). Se observó que solamente las muestras denominadas Clon 6, Clon 7 y Semilla cumplieron con las especificaciones requeridas (mayor al 2.5%).

Tabla 31. Contenido de verbascósido en muestras provenientes del Banco de Germoplasma (Universidad de Entre Ríos)

	Clon 1	Clon 2	Clon 3	Clon 4	Clon 5	Clon 6	Clon 7	Semilla	Guerrero	Salta
Contenido de verbascósido (% P/P)	1.4	1.7	1.0	1.7	1.9	3.5	3.1	2.5	1.9	2.3

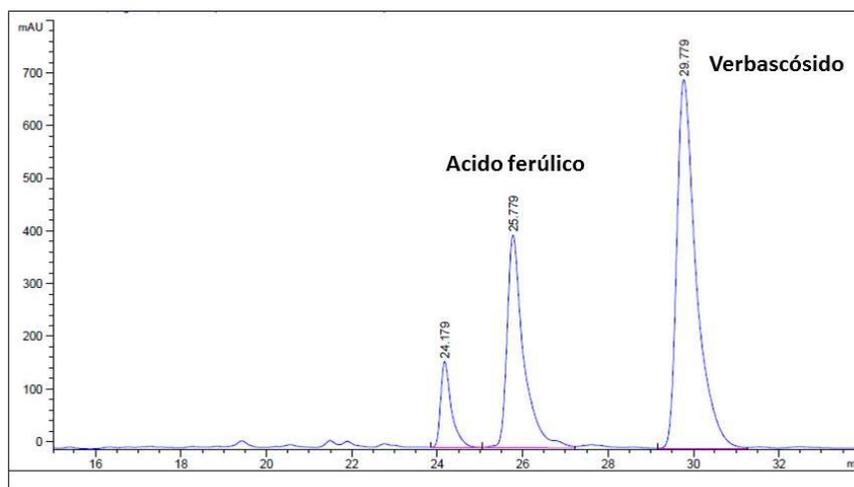


Figura 17. Perfil cromatográfico por HPLC de hojas de *Aloysia citrodora* cultivado en el Banco de Germoplasma, determinado según Farmacopea Europea 8.0.

Estudios previos describieron los elementos histo-morfológicos y los correspondientes parámetros cuantitativos para identificar al cedrón (Barbosa *et al.*, 2001; Albrecht *et al.*, 2005; Gattuso *et al.*, 2008). En este ensayo se detalló la caracterización morfológica macroscópica de los distintos clones analizados, permitiendo optimizar en el campo la selección de materiales de cedrón para cultivo, por tamaño, color y apariencia de las hojas. Sin embargo, estos estudios no reemplazan el análisis fitoquímico, porque no se pudo observar una relación entre las variaciones fenotípicas y el perfil fitoquímico de los distintos materiales analizados.

Desde el punto de vista fitoquímico, el clon 7 sería el más interesante para ser usado en la industria farmacéutica, por su alto contenido de aceite esencial y verbascósido y el perfil de su fracción volátil. Sin embargo, las dimensiones reducidas de sus hojas podrían influir en su rinde de biomasa por hectárea.

Si bien varios clones cultivados en el Banco de Germoplasma no se corresponden con la calidad de cedrón que actualmente demanda el mercado, es importante conservarlos para evaluar otras posibles aplicaciones, tanto en la industria de fragancias como alimenticia y como fuente de variabilidad genética.

Ensayo E: Evaluación de la calidad del cedrón cultivado en la Estación Experimental Agropecuaria INTA Cerrillos, en la provincia de Salta

El noroeste de la Argentina (NOA) ha sido propuesto como el centro de dispersión de esta especie (Siedo, 2006; da Silva *et al.*, 2006). Por esta razón, se decidió profundizar el estudio de la composición química del AE de 25 poblaciones de cedrón, tanto de origen silvestre como de cultivos experimentales que crecen en esta región. De 12 de estas muestras (14D-25D) también se determinó el contenido de verbascósido.

Morfología de las muestras analizadas

Se observaron diferencias morfológicas en las hojas de cedrón utilizadas para la realización de este ensayo. El menor tamaño de hojas lo presentaron las muestras 14D, 18D y 25D (Figura 18).



Figura 18. Hojas de cedrón analizadas en este ensayo

Análisis de los aceites esenciales

Se realizó la destilación de los 12 materiales vegetales. Los rendimientos de AE se calcularon sobre droga seca. Los mismos variaron entre 0.4 y 2.1% V/P (tabla 32). Las muestras fueron analizadas por GC-FID-MS. Sólo se indican los compuestos que se encontraron en una concentración mayor al 5% en alguna de las muestras. Los porcentajes por debajo de 0.05% o no detectados se muestran como "0". Se detectaron diferencias cualitativas y cuantitativas significativas en la composición química de los distintos aceites esenciales. Además, en seis casos (los pares de muestras marcadas 14C-14D a 19C-19D, respectivamente) la calidad se mantuvo estable durante el período en estudio (2003-2010).

Los perfiles cromatográficos de las distintas muestras presentaron diferencias cuali-cuantitativas como se observa en la figura 19.

Tabla 32. Principales compuestos y contenido de AEC analizados en este ensayo

Muestra	1V	2V	3V	4V	5V	6V	7V	8V	9V	10V	11V	12V	13V
Contenido de aceite esencial (%V/P)	0.7	0.8	2.1	0.7	1.2	1.0	0.7	1.1	0.4	0.7	0.5	1.9	1.0
Compuestos	Porcentaje												
sabineno	0.3	6.0	0.3	0.1	0.1	0.4	0.3	0.6	6.5	1.2	0.0	2.2	0.1
santolina alcohol	0.0	0.6	0.4	0.0	0.0	0.0	5.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
limoneno	17.9	0.1	0.4	34.8	30.2	26.5	4.4	14.5	2.4	0.6	0.0	0.3	25.2
1,8-cineol	0.0	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	9.2	0.0
α -tuyona	0.7	1.3	1.1	0.3	0.2	0.7	0.0	0.2	4.1	1.4	2.8	3.0	0.3
β -tuyona	0.0	0.0	1.4	0.0	0.1	0.0	0.2	0.2	57.3	0.0	0.9	59.8	0.0
<i>trans</i> -óxido de limoneno	0.1	0.0	0.0	0.3	0.1	0.3	0.0	0.5	0.0	0.3	0.0	0.0	0.2
citronelal	7.5	12.0	42.9	1.4	19.4	0.9	38.3	52.2	0.2	25.8	0.0	0.2	20.7
sabinona	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.4	0.0	0.0	3.7	0.0
<i>cis</i> -dihidrocarvona	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>trans</i> -dihidrocarvona	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.6	0.0	0.4	0.0
neral	9.2	16.7	6.9	8.8	9.0	14.5	2.1	2.2	0.1	8.3	1.2	0.1	8.5
carvona	0.4	0.0	1.5	1.0	0.4	0.7	0.9	0.3	0.1	0.7	16.7	0.9	0.5
geranial	12.5	21.6	8.7	10.4	10.8	18.6	2.8	2.5	0.0	9.5	1.2	0.2	9.9
timol	1.5	0.4	0.9	0.1	0.3	0.2	0.4	0.2	0.2	0.0	8.7	0.7	0.1
piperitenona	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.1	0.0	0.0	0.0
ar-curcumeno	2.3	0.0	0.0	1.1	0.9	2.2	2.3	2.0	0.8	1.7	0.9	0.5	1.1
espatulenol	5.2	2.3	2.4	0.7	2.1	2.3	0.5	1.4	0.2	4.0	3.5	0.3	1.5
óxido de cariofileno	1.3	0.0	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.8	0.5	0.0
Total	58.9	61.2	67.8	59.1	73.6	67.3	58.8	76.8	74.9	54.2	41.7	82.0	68.1

Resultados y discusión

Muestra	14C	14D	15C	15D	16C	16D	17C	17D	18C	18D	19C	19D	20D	21D	22D	23D	24D	25D
Contenido de aceite esencial (% V/P)	0.9	1.1	0.8	0.9	0.6	0.7	0.5	1.0	0.5	0.8	0.4	0.6	0.9	0.7	0.9	0.9	1.0	0.5
Compuesto	Porcentaje																	
sabineno	13.1	16.1	0.8	0.3	18.3	26.6	0.6	0.3	0.3	0.3	9.3	6.1	0.3	28.0	5.8	0.3	0.8	13.1
santolina alcohol	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
limoneno	0.1	0.2	37.7	55.2	0.1	1.1	25.9	29.8	42.2	52.5	0.3	0.3	47.1	0.2	0.2	58.5	42.6	0.2
1,8-cineol	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.4	0.2	0.9	0.7	0.4	0.5	2.1	0.6	0.4	0.3	0.3
α -tuyona	1.1	1.7	0.0	0.1	1.4	2.3	6.0	5.9	1.6	1.7	46.8	59.0	0.4	2.8	79.0	0.1	3.0	1.2
β -tuyona	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.1	0.1	0.2	0.0	26.6	20.4	0.4	0.6	1.5	0.0	0.0	0.0
<i>trans</i> -óxido de limoneno	0.0	0.0	2.5	0.9	0.0	0.0	6.6	3.3	0.4	0.0	0.0	0.0	0.9	0.0	0.0	1.0	0.3	0.0
citronelal	75.7	56.8	23.3	9.5	70.7	41.9	1.8	0.4	0.0	0.0	0.0	0.1	10.3	37.1	0.3	7.6	0.9	58.7
sabinona	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	5.2	5.6	0.0	0.1	4.4	0.0	0.0	0.0
<i>cis</i> -dihidrocarvona	0.0	0.1	0.0	0.6	0.0	0.1	11.6	10.6	0.0	0.6	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.7	5.2	0.1
<i>trans</i> -dihidrocarvona	0.0	0.1	0.0	0.2	0.0	0.0	35.2	31.8	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.5	0.0
neral	0.6	0.6	9.6	5.5	1.2	2.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	7.3	0.2	0.0	4.6	0.0	0.6
carvona	0.0	1.3	0.0	1.6	0.0	0.2	1.1	2.0	37.0	30.7	0.0	0.2	1.8	0.3	0.1	2.2	24.3	1.4
geranial	0.1	0.8	10.2	6.7	0.1	2.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	8.9	0.2	0.0	5.6	0.0	0.8
timol	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
piperitenona	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.6
ar-curcumeno	0.3	1.2	0.6	0.9	0.0	1.5	0.1	0.9	0.0	0.0	0.1	0.7	1.3	0.1	0.5	0.8	1.1	1.2
espatulenol	0.3	0.4	0.5	1.1	0.7	2.1	0.2	0.9	0.0	0.0	0.3	0.2	1.1	1.1	0.4	1.2	0.7	1.6
óxido de cariofileno	0.0	0.0	0.7	1.4	0.0	0.0	0.4	0.5	0.6	0.9	0.0	0.1	1.7	0.3	0.2	1.5	0.2	3.3
Total identificado	91.3	80.7	85.9	88.2	93.5	84.8	89.6	88.7	82.5	91.4	89.3	95.6	85.0	75.3	95.5	88.2	85.0	83.1

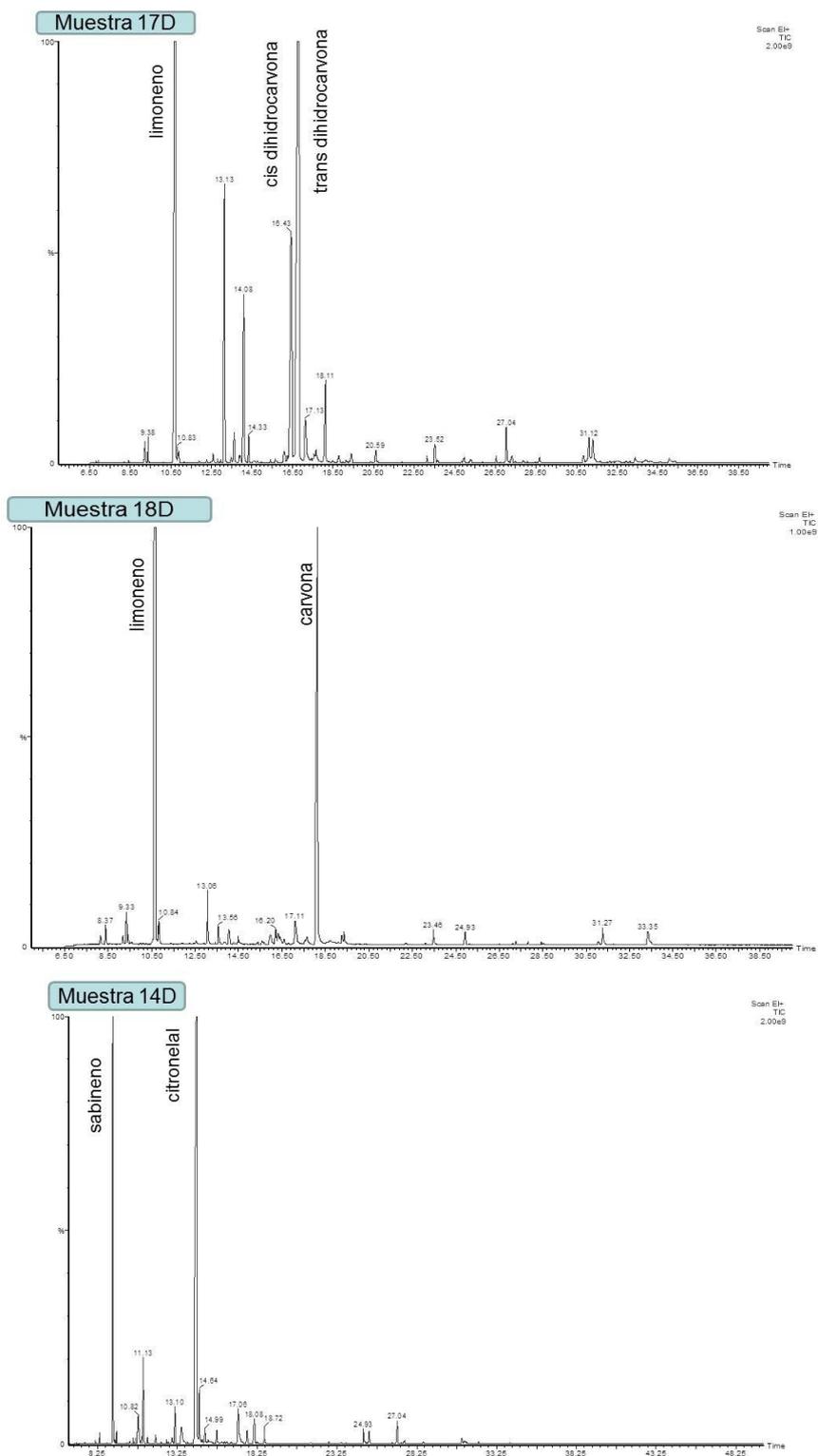


Figura 19. Perfiles cromatográficos en columna no polar de algunos de los aceites esenciales de cedrón analizados en este ensayo

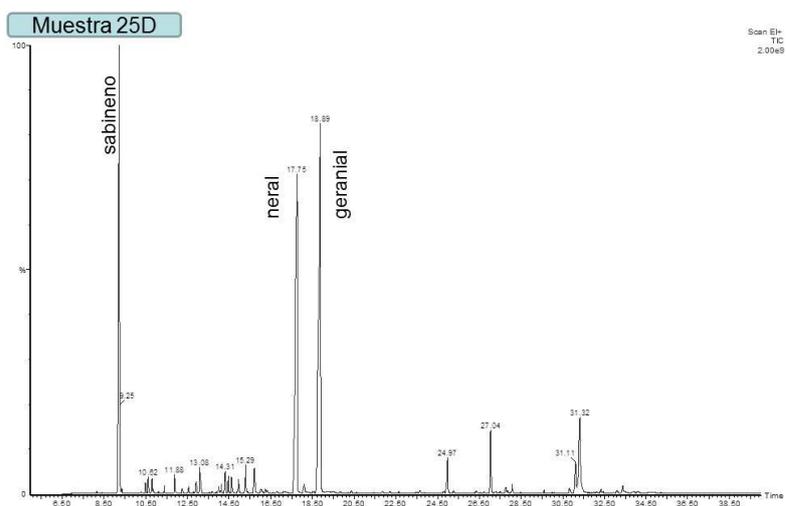
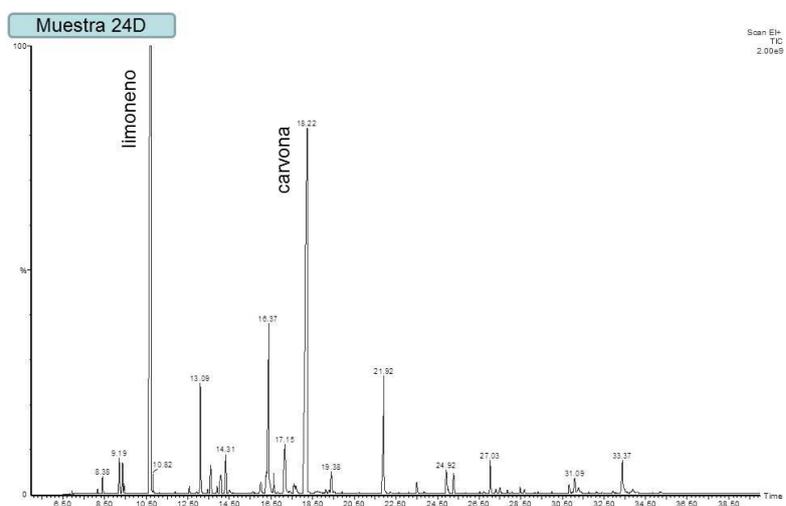
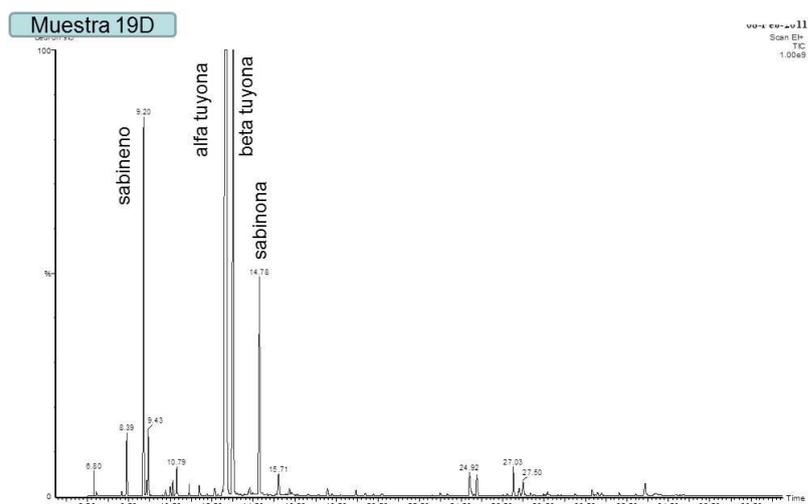


Figura 19 continuación. Perfiles cromatograficos en columna no polar de algunos de los aceites esenciales de cedrón analizados en este ensayo

Con la finalidad de establecer alguna correlación entre estos datos, se aplicó un análisis de conglomerados (CA), que mostró cuatro grupos principales (Figura 20).

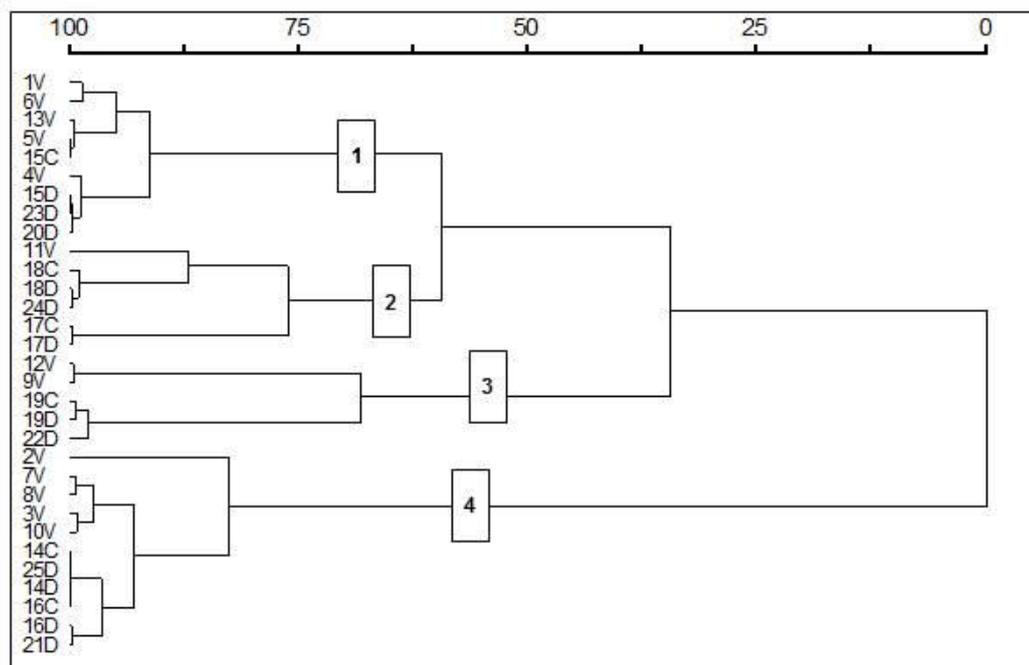


Figura 20. Dendrograma obtenido por análisis de conglomerados a partir del análisis de las muestras de aceites esenciales de cedrón analizadas en este ensayo.

Las similitudes más altas, más del 99%, se encontraron en 5V y 15C; 15D, 23D y 20D; 18A, 18D y 24D; 17C y 17D; 12V y 9V; 19C y 19D; 7V y 8V; 3V y 10V, 14C 25D, 14D y 16C; 16D y 21D (Figura 19) . Las muestras con números iguales y letras diferentes (C y D) corresponden a las mismas colecciones, pero diferentes cosechas: las C fueron cosechadas en 2003/2004 y las D en el año 2010. La estabilidad del perfil químico durante siete años en las plantas cultivadas en la misma parcela sugiere la presencia de quimiotipos verdaderos, probablemente cuatro. Con más del 75% de similitud, las muestras analizadas se agruparon en los siguientes grupos:

Grupo 1 - tipo limoneno (17.9%-58.5%), representado por las muestras 1V, 6V, 13V, 5V, 15C, 4V, 15D, 23D, 20D.

Grupo 2 - tipo carvonas, que incluye las muestras con alto contenido de *cis* y *trans* dihidrocarvona y carvona: 11V, 18C, 18D, 24D (carvona 16.7%-37.0%); 17C, 17D (*cis* + *trans* dihidrocarvona 42.4%-46.8%).

Grupo 3 - tipo sabinona (2.4%-5.6%) - tuyonas (suma de α y β tuyona 61.4%-80.5%), representado por las muestras 9V, 12V, 19C, 19D, 22D.

Grupo 4 - tipo citronelal (12.0%-75.5%) - citral (0.4%-38.8%), representado por las muestras 2V, 7V, 8V, 3V, 10V, 14C, 25D, 14D, 16C, 16D, 21D.

A diferencia de lo que se observa en otras áreas de nuestro país, se encontraron diferencias cuali-cuantitativas en el perfil de compuestos volátiles del cedrón recolectado en la región noroeste de la Argentina. Como se muestra en la Tabla 32, los aceites esenciales de todas las muestras analizadas presentaron composiciones químicas muy diferentes al perfil típico de AEC, con altas cantidades de limoneno y citral. La mayoría de los AEC analizados presentaron como compuestos principales citronelal y citral. No se encontró una correlación entre las variables morfológicas de las hojas y la composición química de las mismas.

Identificación de sabinona.

El compuesto sabinona no pudo ser identificado en una primera instancia ya que ni su espectro de masas ni su índice de retención en GC estaban disponibles en la bibliografía (Adams, 2007; Willey, 2008). Aunque el espectro de masas de la sabinona (véase la Figura 21) mostró algunas similitudes con los de umbellulona y pinocarvona (Adams, 2007; Willey, 2008), los índices de retención (IR: 1154 en columna no polar; 1594 en columna polar) mostraron ser levemente diferentes a los informados para umbellulona (IR no polar: 1167; IR polar: 1644) y pinocarvona (RI no polar: 1160; IR polar: 1561). Además, el espectro UV en etanol 96° de muestras de AE 19C, 19D y 22D que contiene sabinona presenta un máximo de absorción a 258 nm que no es coincidente con el máximo de absorción de umbellulona (λ -max 265 nm) o pinocarvona (λ -max 242 nm) (Moore y Fisher, 1956). El espectro de masas de nuestra cetona demostró ser idéntica a la de sabinona sintética obtenida

con clorocromato de piridinio (PCC) por oxidación de sabinol (espectro gentilmente proporcionado por el Dr. Patrick Covello, Instituto de Biotecnología Vegetal, Consejo Nacional de Investigaciones, Canadá).

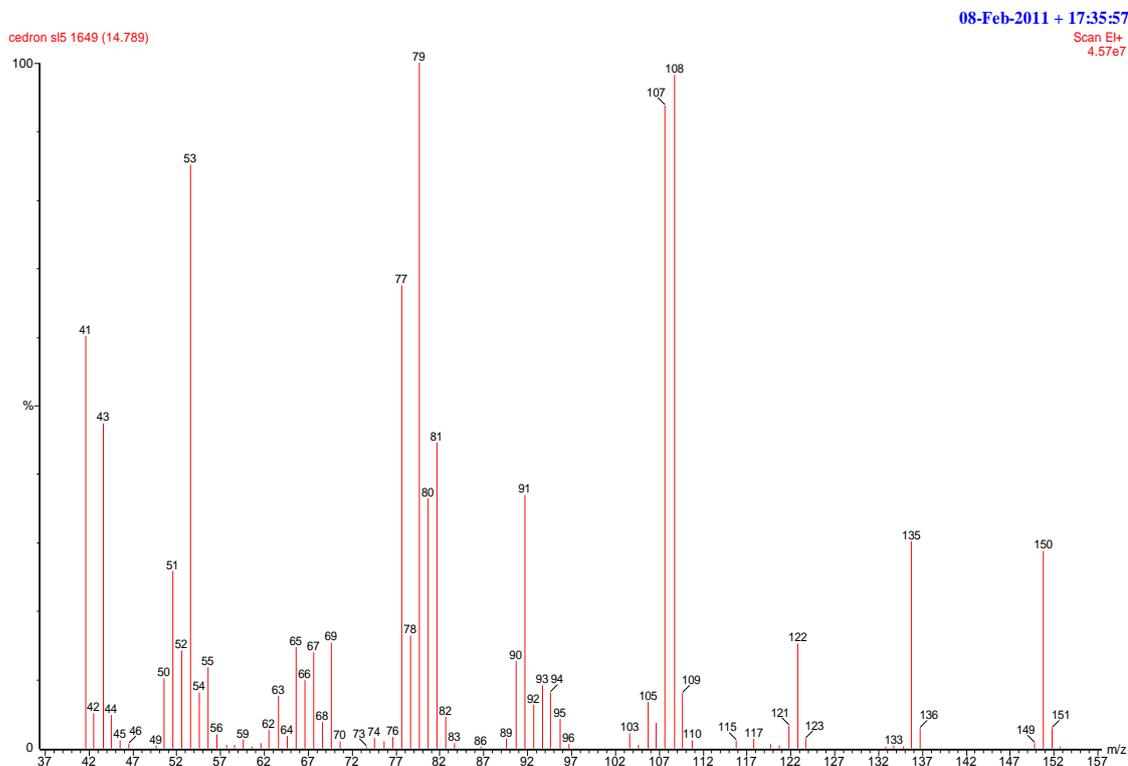


Figura 21. Espectro de masa de sabinona obtenida en este ensayo

La confirmación final de la identidad de sabinona se realizó mediante ^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3) en una muestra aislada por cromatografía en columna del AE 19D: 5,74 s y 5,25 s (H-10a y 10b-H), 2,47 dd (19 y 2,7 Hz; H-2 α), 2,28 d (19 Hz; H-2 β), 2,01 (dd 3,5 y 8,1 Hz; H-5), 1,46 hept (6,7 Hz; H-7), 1,04 ddd (8,1, 5,3 y 2,7 Hz; H-6 exo), 0,95 d y 0,90 d (6,7 Hz; Me-8 y Me-9), 0,40 (dd 5,3, 3,5 Hz; H-6 endo), idéntica a la reportada para la sabinona sintética (Mamane *et al.*, 2004).

Esta fue la primera vez que se aisló e identificó sabinona de un AE, a pesar de que ya había sido propuesto su rol como intermediario en la biosíntesis de tuyonas. Además de α -tuyona, β -tuyona y sabinona, los cinco aceites esenciales de Grupo III (muestras de 9V, 12V, 19C, 19D y 22D) contenían sabineno y menor cantidad de

sabinol. La co-ocurrencia de estos cinco compuestos corroboraría lo propuesto por Croteau: que las tuyonas se biosintetizan siguiendo una ruta similar a la biogénesis de tuyonas de la salvia (*Salvia officinalis*), del tanaceto común (*Tanacetum vulgare*) y del ajeno (*Artemisia absinthium*), es decir, sabineno → sabinol → sabinona → tuyona, según lo propuesto anteriormente por otros autores (Karp y Croteau, 1982; Dehal y Croteau, 1987; Karp *et al.*, 1987).

Determinación del contenido de verbascósido

Se determinó el contenido de verbascósido por HPLC en las muestras 14D a 25D (tabla 33). Los perfiles cromatográficos de todas las muestras fueron similares (Figura 22). De las 12 muestras analizadas solamente 6 arrojaron como resultado un contenido de verbascósido mayor a 2.5%, valor mínimo requerido por la Farmacopea Europea 8.0.

Tabla 33. Contenido de verbascósido (% P/P) en las muestras 14D-25D

Muestra	14D	15D	16D	17D	18D	19D	20D	21D	22D	23D	24D	25D
Contenido de verbascósido (%P/P)	1.4	2.9	4.0	1.8	3.6	2.4	3.0	2.2	2.5	3.6	0.5	0.6

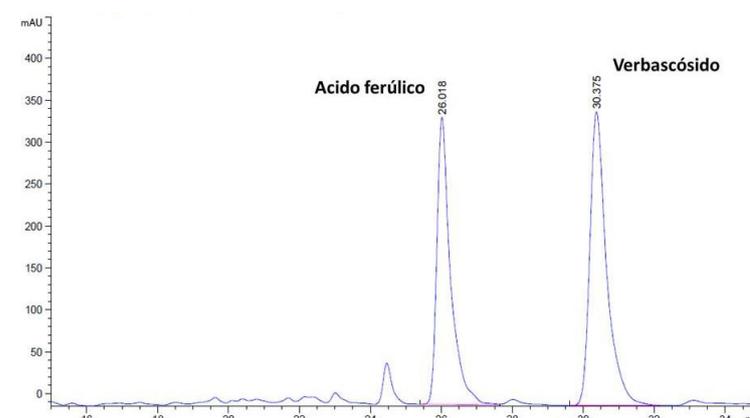


Figura 22. Perfil cromatográfico por HPLC de hojas de *Aloysia citrodora* cultivado Salta, determinado según Farmacopea Europea 8.0

Es de destacar que ninguna de las muestras estudiadas en este ensayo cumplió con la especificación acerca de la composición del AE, ya que ninguna presentó el perfil típico con alto contenido de citral y limoneno, pero sí seis de ellas (15D, 16D, 18D, 20D, 22D y 23D) cumplieron con las normas europeas en cuanto al contenido de verbascósido. Por esta razón, sería necesario ampliar las especificaciones de las normas europeas, incluyendo el perfil de la fracción volátil para dar mayor precisión a la calidad química del material vegetal. Esto es al menos, una exigencia de calidad en nuestro país, dada la gran biodiversidad encontrada en la fracción volátil.

Ensayo F: Evaluación química de poblaciones silvestres recolectadas en el noroeste argentino (NOA)

De acuerdo a los resultados informados y habiéndose observado que los aceites esenciales de las muestras procedentes del (NOA) tenían una composición química muy diferente a la típica, se recolectaron 36 muestras silvestres de esta región durante los años 2006, 2008 y 2009. Las hojas del material vegetal recolectado fueron destiladas con el fin de obtener su AE para ser analizado por GC-FID-MS. De algunas muestras se realizó, además, la determinación del contenido de verbascósido según la Farmacopea Europea 8.0.

Análisis de los aceites esenciales

Los aceites esenciales fueron obtenidos por hidrodestilación. Los rendimientos fueron calculados sobre droga seca. Los resultados correspondientes se presentan en la tabla 34. Todas las muestras analizadas presentaron un contenido mayor a 0.2% V/P, que es el mínimo valor requerido por la Farmacopea Europea. El mayor rendimiento en AE fue 1.9% V/P para la muestra 33, proveniente de la provincia de Catamarca.

Los AE fueron analizados por GC-FID-MS (Figura 23). Se detectaron diferencias cuantitativas significativas en la composición química de los mismos. Se identificaron más de 65 compuestos considerando solo aquellos que están por encima del 5% en por lo menos una muestra. La suma de los mismos representó entre el 77.3% y el 98.9% del total (tabla 34).

En la tabla 34 se muestran la composición química de los AE de las 21 muestras provenientes de Jujuy. En la tabla 35 se muestran los valores obtenidos para las muestras recolectadas en Salta y en la tabla 36 los valores correspondientes a las provincias de Catamarca y Tucumán.

Tabla 34. Compuestos principales (% P/P) del AEC de las muestras provenientes de Jujuy analizadas en este ensayo

Lugar	CHILCAYO														SAN ROQUE						
Año de recolección	2006			2008							2009				2008				2009		
Muestra Nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Rendimiento de aceite esencial (%V/P)	0.5	0.3	0.7	0.4	0.5	0.3	0.2	0.5	0.2	0.4	0.4	0.4	0.3	0.4	0.8	0.2	0.2	0.4	1.4	0.9	0.3
Compuesto	Porcentaje																				
sabineno	1.4	1.3	1.1	5.4	0.1	1.9	4.2	3.3	-	1.1	23.5	0.3	0.8	1.7	3.5	-	-	18.0	5.0	0.4	1.0
limoneno	tr	tr	2.2	0.3	25.2	tr	0.2	0.3	11.5	tr	1.9	37.5	0.1	4.4	0.2	3.1	11.0	-	-	7.0	-
1,8-cineol	8.7	3.0	8.6	4.9	0.8	-	3.0	6.6	-	-	6.5	0.8	0.1	5.6	0.1	0.5	0.8	22.8	0.2	..	13.1
linalol	0.7	-	tr	0.2	0.5	tr	0.5	0.4	0.3	0.2	0.4	0.2	0.5	0.2	0.1	0.5	0.5	-	0.2	-	-
α-tuyona	1.6	2.0	3.2	3.1	tr	2.1	0.2	1.3	tr	2.5	tr	0.6	3.2	0.1	4.1	-	0.2	1.5	3.8	-	-
β-tuyona	12.1	tr	65.7	75.4	tr	62.6	2.1	37.9	2.5	86.2	1.9	tr	83.0	1.0	86.3	1.9	4.5	-	86.5	2.3	1.7
citronelal	-	54.4	-	tr	-	-	47.2	-	tr	-	37.3	0.3	-	-	0.0	0.7	7.0	33.6	-	39.0	41.2
trans-sabinol	50.1	-	0.9	0.4	2.5	25.0	-	40.3	-	0.8	-	1.2	4.0	56.7	0.7	tr	-	-	0.3	0.1	tr
sabinona	tr	-	0.1	2.0	-	2.0	-	1.5	tr	3.2	-	0.1	1.5	0.4	0.7	0.2	-	-	0.8	tr	-
cis-dihidrocarvona	tr	0.8	0.5	tr	0.1	-	-	-	0.4	-	0.1	-	-	-	-	-	0.4	-	tr	-	0.1
trans-dihidrocarvona	tr	1.0	0.4	-	0.1	tr	-	0.1	0.2	0.1	-	0.1	0.1	-	0.1	-	0.3	-	-	-	-
citronelol	tr	2.9	0.1	tr	-	-	4.5	-	-	-	1.8	-	0.1	-	-	tr	tr	5.6	0.1	5.6	3.8
trans-carveol	0.1	-	-	tr	50.9	0.1	-	-	0.5	0.1	-	30.2	-	0.6	-	tr	1.6	-	-	-	tr
neral	tr	1.4	0.1	tr	-	-	1.0	0.1	-	-	2.8	-	-	-	tr	19.9	2.3	0.3	tr	0.1	tr
carvona	0.1	-	5.0	tr	0.4	-	-	tr	70.9	0.1	-	12.2	0.1	11.4	tr	1.4	48.2	-	-	0.1	-
geranial	tr	1.9	-	0.1	-	tr	1.6	-	-	-	3.9	-	-	-	0.1	34.4	2.0	0.6	0.1	-	1.4

Resultados y discusión

Lugar	CHILCAYO														SAN ROQUE						
Año de recolección	2006			2008							2009				2008				2009		
Muestra Nº	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
acetato de geranilo	0.1	-	0.1	tr	-	-	0.6	-	tr	-	0.2	-	-	-	tr	4.7	-	-	0.1	-	-
β-cariofileno	0.6	-	-	0.2	0.5	-	0.5	0.4	-	0.5	-	-	0.2	0.2	tr	-	tr	0.8	tr	-	-
ar-curcumeno	0.8	2.2	2.2	0.3	1.1	0.2	1.2	0.5	0.6	0.2	1.4	0.8	0.5	0.6	0.2	2.0	0.7	0.4	0.1	3.1	1.8
germacreno D	0.4	-	0.4	0.3	1.2	0.6	0.3	0.4	-	0.5	0.2	0.5	0.2	0.3	tr	-	-	-	-	-	-
biciclogermacreno	-	0.3	0.1	0.4	1.5	0.8	-	0.5	tr	0.3	0.2	0.5	-	0.1	tr	-	-	-	-	-	-
espatulenol	-	2.2	0.2	0.2	0.6	0.3	1.8	0.1	-	0.4	0.8	0.9	0.4	0.4	0.2	5.0	1.3	1.1	0.3	3.6	2.4
Total identificado	98.3	91.9	98.9	97.1	92.4	96.1	77.3	98.3	96.4	98.2	91.3	94.1	96.4	91.1	98.6	83.6	89.2	96.2	98.9	93.0	95.8

Tr: <0.05%

Tabla 35. Principales compuestos de AEC determinados en muestras provenientes de Salta analizados en este ensayo

Lugar	SALTA									
Muestra N°	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
Rendimiento de aceite esencial (%V/P)	0.7	0.8	0.5	0.7	0.4	0.3	0.3	0.5	0.6	0.6
Compuesto	Porcentaje									
sabineno	1.7	30.5	4.7	-	6.6	0.2	tr	-	6.3	9.4
limoneno	9.0	tr	tr	18.9	-	57.2	18.5	5.3	0.3	-
1,8-cineol	13.3	2.7	1.4	-	2.1	0.3	-	0.4	-	-
linalol	0.2	0.4	0.2	-	0.5	0.5	0.3	79.5	0.3	0.4
α -tuyona	29.5	1.7	2.5	0.6	11.1	tr	-	-	0.7	0.2
β -tuyona	1.9	-	76.8	2.6	6.7	1.2	0.3	tr	0.2	1.0
citronelal	tr	35.4	-	-	41.2	0.3	46.6	0.6	66.7	48.5
<i>trans</i> -sabinol	-	-	0.5	-	0.2	-	0.1	-	-	0.1
sabinona	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>cis</i> -dihidrocarvona	1.4	1.6	-	26.1	-	6.2	tr	0.1	tr	-
<i>trans</i> -dihidrocarvona	0.5	-	0.1	27.1	-	0.6	-	0.1	-	-
citronelol	-	-	0.1	-	2.0	-	3.2	-	3.8	1.2
<i>trans</i> -carveol	-	-	-	0.8	-	0.8	-	0.2	-	-
neral	tr	-	-	-	-	-	0.7	0.4	1.7	4.7
carvona	25.0	-	0.1	1.9	-	12.8	0.4	0.4	-	-
geranial	tr	0.4	-	-	0.7	tr	1.0	0.5	2.3	6.1
acetato de geranilo	0.1	tr	0.1	-	0.1	tr	tr	0.1	0.1	0.4
β -cariofileno	0.2	0.1	-	0.3	-	0.5	2.7	0.4	0.8	0.6
ar-curcumeno	2.1	3.8	1.4	1.8	2.0	1.8	6.4	2.8	1.5	1.9
germacreno D	0.4	0.5	0.6	0.6	0.6	0.1	0.5	0.4	-	-
biciclogermacreno	-	-	1.6	0.4	1.7	0.4	0.1	0.3	1.3	0.2
espatulenol	0.2	0.2	0.1	0.7	2.3	0.5	0.4	0.8	2.2	0.9
Total identificado	98.9	98.8	98.6	97.6	96.0	93.9	88.9	95.2	92.0	84.4

Tr: <0.05%

Tabla 36. Principales compuestos determinados en muestras provenientes de Catamarca y Tucumán.

Lugar	CATAMARCA				TUCUMAN
Muestra N°	32	33	34	35	36
Rendimiento aceite esencial (% V/P)	1.6	1.9	0.5	0.7	0.4
Compuesto	Porcentaje				
sabineno	1.8	0.3	0.8	1.2	16.0
limoneno	-	4.0	1.6	3.9	0.1
1,8-cineol	0.1	0.3	0.1	0.4	0.5
linalol	-	82.3	85.1	78.2	0.7
α -tuyona	86.7	-	0.5	0.3	3.8
β -tuyona	1.4	tr	0.1	0.1	0.2
citronelal	-	tr	tr	tr	0.2
<i>trans</i> -sabinol	-	0.1	-	0.1	tr
sabinona	4.0	-	-	-	-
<i>cis</i> -dihidrocarvona	-	-	0.1	tr	0.1
<i>trans</i> -dihidrocarvona	tr	0.1	-	-	-
citronelol	-	-	-	tr	0.1
<i>trans</i> -carveol	tr	tr	0.1	tr	tr
neral	-	0.1	-	2.3	21.0
carvona	0.1	-	-	-	-
geranial	-	0.1	-	2.9	30.0
acetato de geranilo	-	0.1	-	-	0.1
β -cariofileno	2.0	1.9	0.9	1.2	1.6
<i>ar</i> -curcumeno	-	-	0.2	-	0.5
germacreno D	0.2	0.3	-	-	0.2
biciclogermacreno	-	0.3	0.5	0.3	-
espatulenol	0.3	1.2	1.9	2.3	1.5
Total identificado	97.7	93.6	93.8	95.7	83.6

Tr: <0.05%

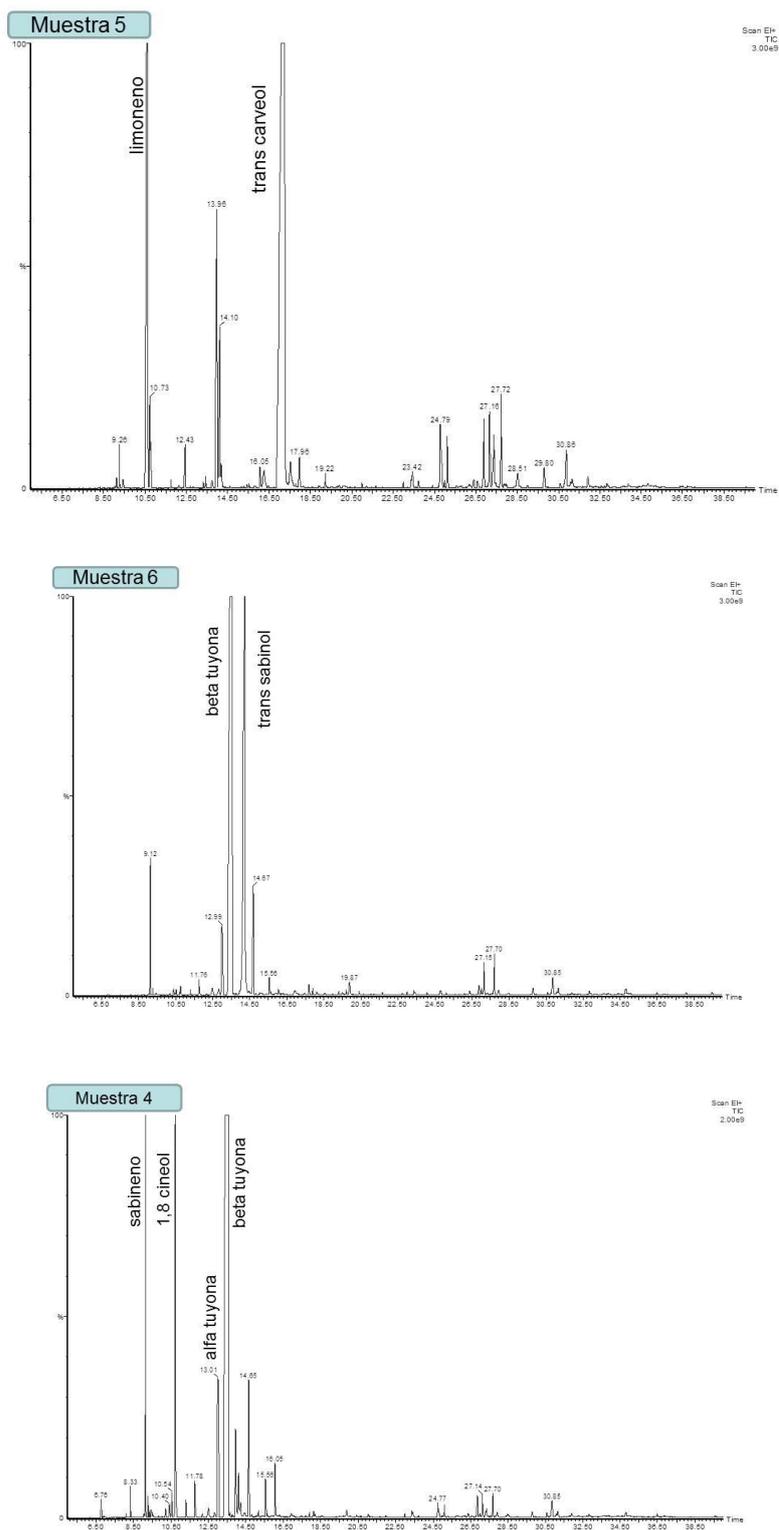


Figura 23. Perfiles cromatograficos en columna no polar de algunos de los aceites esenciales de cedrón analizados en este ensayo

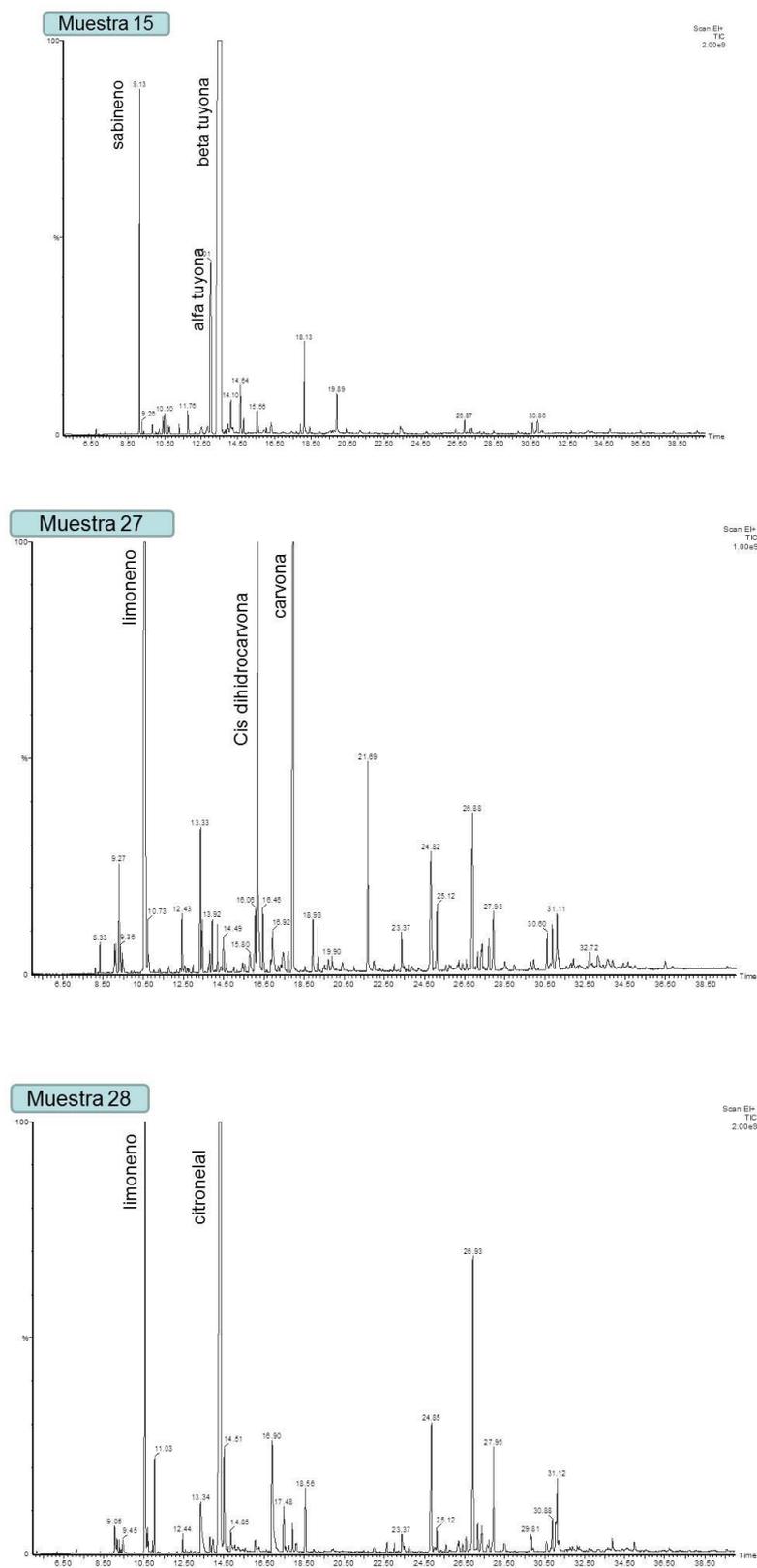


Figura 23 continuación. Perfiles cromatográficos en columna no polar de algunos de los aceites esenciales de cedrón analizados en este ensayo

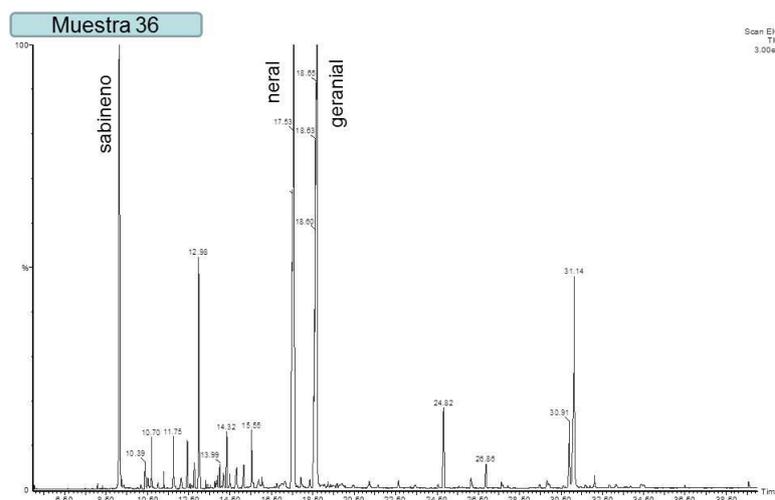


Figura 23 continuación. Perfiles cromatograficos en la columna no polar de algunos de los aceites esenciales de cedrón analizados en este ensayo

De todas las muestras analizadas, solamente dos, la muestra 16 procedente de la localidad de San Roque y la muestra 36 procedente de Tucumán, presentaron como compuesto principal citral. Sin embargo, ninguna de las dos muestras presentó el perfil típico esperado para AEC ya que no contienen limoneno en altas concentraciones.

Como se observa en la tabla 34, la composición química de las muestras provenientes de Chilcayo se mantuvo durante los 3 periodos analizados, siendo los compuestos principales: *trans*-sabinol (muestras N° 1, 8, 14), citronelal (muestras N° 2, 7, 11), β -tuyona (muestras N° 3, 4, 6, 10, 13) y *trans*-carveol (muestras N° 5 y 12).

Las muestras 29, proveniente de Salta y 33, 34 y 35, recolectadas en Catamarca, presentaron alto contenido de linalol (78.2%-85.1%). Esta es la primera vez que se encuentra este compuesto en tan alta cantidad en un AEC.

De todos los aceites esenciales analizados, ninguno presentó un perfil típico para cedrón, en donde los compuestos mayoritarios esperados son limoneno (10-30%), neral (14-27%) y geranial (17-36%), según los valores establecidos en el ensayo B).

Para el análisis estadístico de los datos de este ensayo se utilizó el análisis por conglomerados (Infostat, 2008) (Figura 22) utilizando 14 componentes (compuestos

que se encontraron en una concentración mayor al 5% en por lo menos una muestra), considerando como tuyonas a la suma de α + β tuyona, como dihidrocarvonas a la suma de *cis* + *trans* dihidrocarvona y considerando citral como la suma de neral + geranial.

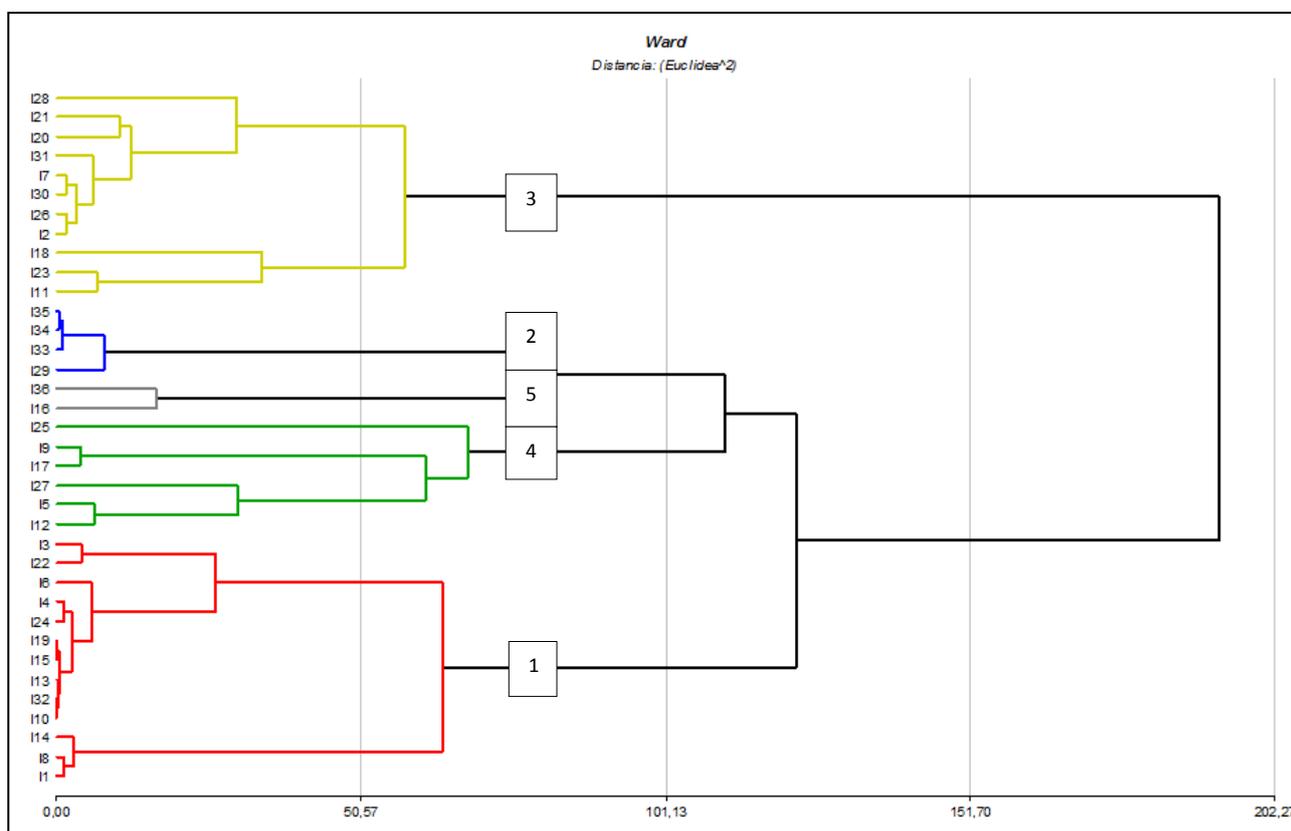


Figura 22. Dendrograma obtenido por análisis de conglomerados a partir del análisis de muestras de AEC silvestres del Noroeste Argentino

El dendrograma obtenido agrupa las muestras en cinco grupos, con un 65% de similitud:

Grupo 1 - tipo tuyonas, representado por las muestras N° 3, 22, 6, 4, 24, 19, 15, 13, 32, 10, 14, 8 y 1. Las últimas tres muestras presentan un contenido significativo de *trans*-sabinol (40.3% - 56.7%) y menor contenido de tuyonas (1.1% - 39.2%) que las otras muestras, por lo tanto, se podrían separar formando un subgrupo.

Grupo 2 - tipo linalol, representado por las muestras N°: 35, 34, 33 y 29.

Grupo 3 - tipo citronelal, (39.0% - 66.7%), representado por las muestras N°: 28, 21, 20, 31, 7, 30, 26, 2, 18, 23 y 11. Los últimas tres muestras con un contenido significativo de sabineno (18,0% -30,5%) y 1,8-cineol (22,8%) y menor contenido de citronelal (33,3% -37,3%) por lo que formarían un subgrupo.

Grupo 4 - tipo carvona, que incluye 2 subgrupos: "A" - representado por las muestras N° 25, 9 y 17, con alto contenido de carvona y menos de limoneno y subgrupo muestras "B", N° 27, 5 y 12 con alta concentración de limoneno y menos carvona y dihidrocarvona.

Grupo 5 - tipo citral (51,0-54,3%), representado por las muestras N° 36 y 16.

La formación de estos grupos podría ser explicada a partir del análisis de las diferentes rutas biosintéticas que dan origen a los distintos compuestos (Karp y Croteau, 1982; Dehal y Croteau, 1987; Karp *et al.*, 1987; Sanwang *et al.*, 2001; Iijima *et al.*, 2004;. Degenhardt *et al.*, 2009). De esta manera, a partir del geranil difosfato podría o bien desplazarse el metabolismo hacia la biosíntesis de tujona, dando origen a las muestras cuya composición química se encuadra dentro del grupo 1, desplazarse hacia la síntesis de linalol dando origen a las muestras agrupadas dentro del grupo 2 o bien sintetizar limoneno, precursor a partir del cual se sintetizan los demás compuestos, generando los grupos 3, 4 y 5 (ver Figura 23).

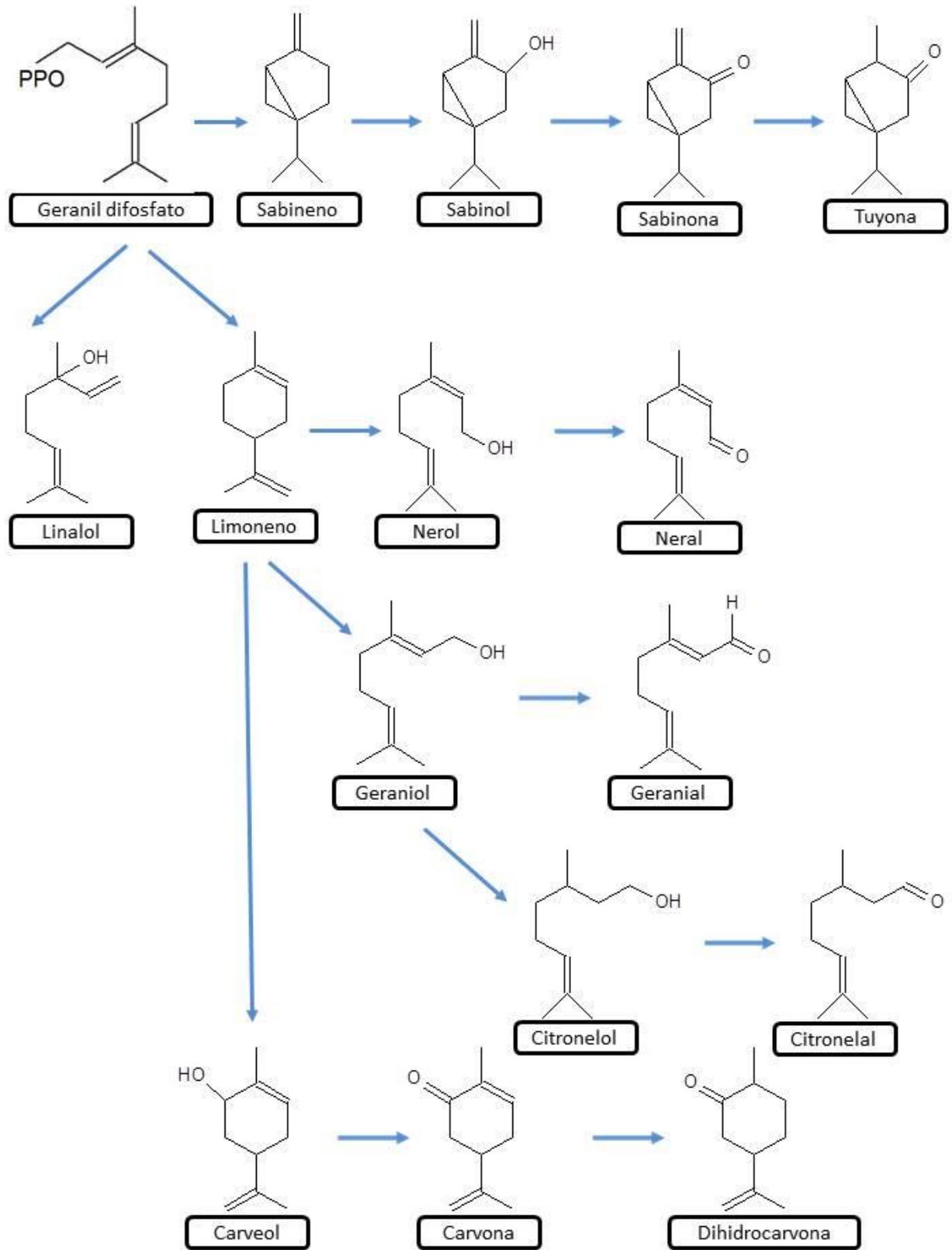


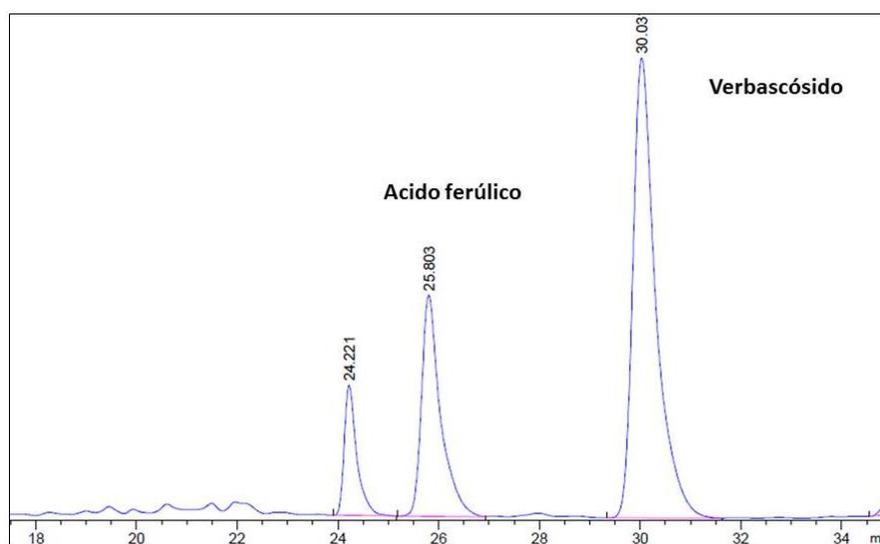
Figura 23. Biosíntesis de monoterpenos

Determinación del contenido de verbascósido

El contenido de verbascósido fue calculado para 8 muestras: 4, 5, 15, 27, 28, 29, 30 y 36 (Tabla 37, Figura 24). Como resultado se observó que solamente las muestras 4, 27 y 29 cumplieron con las especificaciones requeridas por la Farmacopea Europea 8.0, observándose un contenido mayor al 2.5% P/P.

Tabla 37. Contenido de verbascósido (% P/P)

Muestra	4	5	15	27	28	29	30	36
Contenido de verbascósido (% P/P)	3.7	0.6	0.8	3.5	1.8	3.5	1.5	0.5

Figura 24. Perfil cromatográfico por HPLC de hojas de *Aloysia citrodora* del NOA, determinado según Farmacopea Europea 8.0



Aloysia triphylla (L'Her.) Britton (Isotipo de *A. citriodora* Ort.)
 Museo de Historia Natural de Estocolmo (1947)
 Ortega, coautor con Palau de la obra que contiene la descripción original, escribió de su puño y letra (no se indica la fecha) "*Aloysia citriodora*". Material utilizado por Moldenke en 1947 para renombrar a la especie como *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britt., y describiéndola como isotipo de *A. citriodora* Ortega.

CONCLUSIONES

6 CONCLUSIONES

El cedrón es la especie aromática nativa más difundida en el mundo. Actualmente su comercialización se provee de cultivos existentes en varios países, como Marruecos, Portugal, Francia, Vietnam, Paraguay, Chile, etc. En los últimos años han surgido varias normas de calidad para el cedrón, justamente como una necesidad de esta expansión en su demanda.

Es paradójico que nuestro país, considerado como posible región de origen para esta especie, esté casi ausente en este mercado. Las causas pueden ser dos: falta de competitividad por costos, pero fundamentalmente la falta de homogeneidad en la oferta, como consecuencia de una muy variable calidad, que muchas veces no cumple con las normativas de los distintos mercados. Desde hace casi una década se han recibido numerosas solicitudes de productores, acopiadores e industrias usuarias de esta especie, para conocer la calidad de la misma, debido a los problemas de comercialización que presentaba. Todo esto hizo que se considerara prioritario lograr los objetivos que se habían planteado en esta investigación.

Este fue el marco con que se encaró este trabajo, aportando el conocimiento necesario para individualizar la variabilidad natural de la especie en nuestro país, y proponiendo especificaciones de calidad que contribuyan a una mejor oferta del producto, ya sea a la industria farmacéutica como a la alimentaria o cosmética.

Como toda planta aromática, históricamente se puso el mayor énfasis en identificar la calidad de su aceite esencial. No obstante, los numerosos trabajos aparecidos en los últimos años sobre las actividades biológicas del cedrón, enfatizan la importancia de la fracción no volátil, específicamente por la presencia del verbascósido, cuantitativamente el principal constituyente de esta fracción.

En función de este contexto, si bien el trabajo se inició con la evaluación de la fracción volátil, hubo que agregar, durante la investigación, la valoración del verbascósido, debido a que es el principal marcador desde el punto de vista farmacológico.

En nuestro país, se están actualizando las monografías farmacopeicas y las normas de calidad de los aceites esenciales nativos, para adecuarlas a los adelantos científicos y para aportar una mejor evaluación de las calidades de cedrón

necesarias en las distintas industrias. Estas políticas también impulsaron la concreción de este trabajo.

Para llevar a cabo los objetivos propuestos y conocer la variabilidad fitoquímica de la fracción volátil del cedrón nacional, se determinó el contenido de AE en 135 muestras provenientes de muy diversos orígenes, y de materiales cultivados y silvestres o muestras comerciales del mercado local. En todas las muestras analizadas el rendimiento obtenido fue mayor a 0.2% V/P, límite exigido por la Farmacopea Europea. El valor promedio fue de 0.8% V/P.

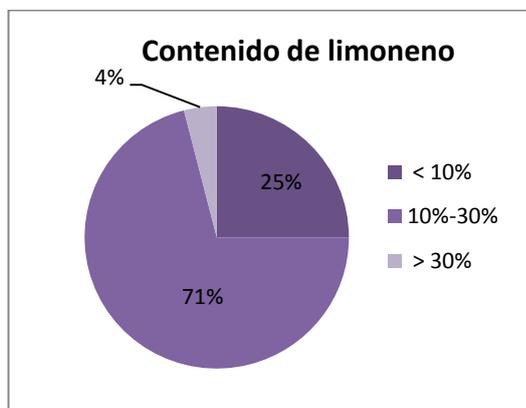
Por medio del análisis de los distintos AE pudo confirmarse la presencia de diferentes quimiotipos de cedrón de la Argentina, en función de sus compuestos principales y la relación biosintética entre los mismos:

- 1) AE con altos contenidos de limoneno y citral, perfil típico descripto para cedrón y es el que se emplea en todo el mundo.
- 2) AE con alto contenido de limoneno, siendo posiblemente una variedad primigenia desde el punto de vista biosintético.
- 3) AE con alto contenido de linalol, quimiotipo detectado por primera vez.
- 4) AE con alto contenido de carvona y derivados (*cis* y *trans* dihidrocarvona).
- 5) AE con alto contenido de tuyonas (α + β tuyona). Esta variedad es muy importante caracterizarla, porque fue la causa de algunos rechazos de exportaciones (por sus posibles efectos indeseables), y es muy común que se exija determinar su ausencia en cada partida.
- 6) AE con alto contenido de citronelal, variedad que fue reiteradamente usada en cultivos industriales en nuestro país, al confundir su perfil aromático con el característico del cedrón tradicional. Es comercializado esporádicamente para infusiones.

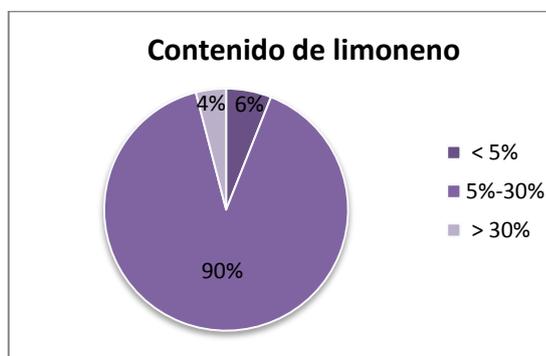
El perfil típico de AEC, con altos contenidos de citral y limoneno solamente fue observado en 68 muestras, lo que representa el 50% de la totalidad de los aceites analizados. El resto de los quimiotipos encontrados provinieron del NOA argentino. El cedrón típico (alto citral y limoneno) es el difundido por todo el mundo y el considerado, hasta ahora, el de mejor calidad. Teniendo en cuenta la gran

variabilidad observada en el perfil aromático de esta especie medicinal en nuestro país, es que se propone incluir la determinación de la composición química del AEC en las distintas normas de calidad.

Para dar mayor precisión a su caracterización, se determinó cuáles pueden ser los marcadores positivos y negativos y sus rangos de aceptación, dando las bases para la redacción de futuras normas de AEC. Después de revisar todos los AEC analizados, se observó que sería recomendable modificar el valor especificado inicialmente para el limoneno (10%-30%), ya que de las muestras de AE de composición típica, solo el 71% de las muestras se encontró dentro de ese rango. El 25% de las muestras analizadas arrojó un valor menor a 10%. El 4% de las muestras analizadas arrojó un valor mayor a 30%.



Para que el 90% de las muestras analizadas cumpla con una nueva especificación, podría modificarse dicho rango y establecerlo entre 5% y 30%.



Es importante destacar que durante el estudio de este AEC se identificó por primera vez en un aceite esencial la presencia del compuesto sabinona, cetona terpénica que había sido propuesta teóricamente como intermediaria en la biosíntesis de la tuyonas, pero nunca había sido aislada, solamente sintetizada.

Se analizó un cultivo de cedrón en Misiones, zona potencialmente productora, a lo largo de un año, determinando el contenido y composición del AE y el contenido de verbascósido. Considerando ambos parámetros se determinó que el momento óptimo para su cosecha serían los meses de diciembre y enero.

Se contribuyó también a la caracterización química de los materiales de cedrón depositados en el Banco de Germoplasma de la provincia de Entre Ríos con la finalidad de conocer su rendimiento y composición de AE y contenido de verbascósido. De esta manera se cuenta con material factible de ser multiplicado por productores.

En cuanto al contenido de verbascósido se realizó la determinación en 52 muestras de hojas de cedrón. Solamente 14 muestras dieron como resultado un contenido mayor a 2.5% V/P, lo que significa que solo el 27% cumplió con lo exigido por la actual Farmacopea Europea. El valor promedio de todas las muestras analizadas fue de 2.1% P/P. De ser incluida su determinación en la monografía de cedrón hojas de la Farmacopea Argentina deberá considerarse una disminución en ese valor para que sea más representativo de las poblaciones locales.

Se observó que el contenido de verbascósido no guarda relación alguna con la calidad del aceite esencial. Hemos encontrado muestras que presentaron un aceite esencial de calidad típica, con altos contenidos de limoneno y citral, que dieron bajo contenido de verbascósido. Y las muestras con perfiles aromáticos atípicos de AEC, presentaron valores variables.

Habiendo analizado una gran cantidad de muestras de hojas de cedrón de Argentina, ya sea en lo que se refiere a la composición química del AEC y a la determinación del contenido de verbascósido, se sugiere introducir modificaciones en la monografía de Cedrón propuesta para la Farmacopea Argentina. En su momento se establecieron valores de concentración de marcadores positivos y de marcadores negativos (ver ensayo B) para una serie de compuestos relevantes para

AEC. Al finalizar este trabajo de tesis se observó que la mayoría de los porcentajes establecidos deberían seguir siendo los mismos, con excepción del limoneno. Este compuesto se encontró en menor concentración en la mayoría de los AEC analizados. Se sugiere entonces modificar ese valor, estableciendo que el contenido del mismo sea entre 5-25%.

En la monografía planteada anteriormente se incluyó el análisis por CCD del AEC. Esta determinación no tendría sentido ya que el análisis por cromatografía de gases del AEC es más específico y brinda mayor información que la CCD. En cambio, sería de mayor utilidad incluir la determinación del contenido de verbascósido por HPLC, ya que es un valor a tener en cuenta en función de su uso como planta medicinal.

Los resultados obtenidos permiten plantear especificaciones de calidad para el uso del cedrón en la industria alimentaria y cosmética.

Como corolario de este trabajo se adjunta una propuesta de monografía de cedrón:

CEDRÓN, hoja

Definición - Cedrón está constituido por hojas enteras o fragmentadas de *Aloysia citrodora* Paláu (Verbenaceae). La droga vegetal debe contener no menos de 2.1% de verbascósido expresado como ácido ferúlico; no menos de 0,20 por ciento de aceite esencial para droga entera y no menos de 0,15 por ciento de aceite esencial para droga fragmentada.

Cedrón debe cumplir con las siguientes especificaciones.

CONSERVACIÓN

En envases inactínicos bien cerrados, almacenados en sitio fresco y seco.

ENSAYOS

Identificación

A- Características macroscópicas - Hojas enteras, con borde ligeramente aserrado, lanceoladas, de ápice acuminado, de 4 a 12 cm de longitud y 1 a 2,5 cm de ancho, brevemente pecioladas, ásperas al tacto y quebradizas. Cara superior de color verde oliva y cara inferior más clara. Nervadura media prominente en la cara inferior y con numerosas

nervaduras secundarias, notablemente paralelas entre sí. Posee aroma cítrico característico y sabor ligeramente dulzaíno.

B - Características microscópicas - En vista superficial se observa una epidermis superior con células poliédricas, de paredes anticlinales mas bien rectas, cutícula lisa, y pelos unicelulares, verrucosos, silicificados, cistolíticos, adpresos, rodeados de una roseta de alrededor de 8 células poligonales, las que contienen cada una un cistolito de carbonato de calcio, y de pelos unicelulares de paredes gruesas, verrucosos, en forma de colmillo.

Los pelos glandulares pueden ser con una célula basal, una de pie y una cabeza secretora unicelular y pelos glandulares sésiles con cabeza unicelular. La epidermis inferior presenta células de paredes anticlinales sinuosas, con tricomas similares a los descritos, pero en mayor cantidad, con estomas elevados de tipo anomocítico y cutícula estriada sobre las nervaduras. El corte transversal pone de manifiesto a ambas epidermis uniestratificadas. El mesófilo es dorsiventral con 1 a 2 hileras de parénquima en empalizada y 3 a 4 hileras de parénquima esponjoso. En la región del nervio medio, se observa colénquima angular en relación con ambas epidermis. El haz vascular es colateral, con floema hacia ambas caras.

C - Droga en polvo - Polvo color verde claro. Muestra fragmentos de epidermis superior sin estomas y de epidermis inferior con estomas, pelos con los caracteres ya descritos y fragmentos de nervaduras.

Materia extraña (ver 630. Métodos de farmacognosia)

No debe contener más de 2 %.

Pérdida por secado (ver 630. Métodos de farmacognosia)

No debe contener más de 11 %.

Cenizas totales (ver 630. Métodos de farmacognosia)

No debe contener más de 10 %.

Control higiénico (ver 630. Métodos de farmacognosia)

Debe cumplir con los requisitos.

Determinación de aflatoxinas <110>

Debe cumplir con los requisitos.

Valoración

-Verbascósido.

Sistema cromatográfico

Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 330 nm y una columna de 25 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas porosas de sílice de 3 a 10 µm de diámetro. El caudal debe ser aproximadamente 1 ml por minuto.

Fase móvil A: Preparar una solución de 0.3% V/V de ácido fosfórico en agua.

Fase móvil B: Acetonitrilo.
Filtrar y desgasificar ambas soluciones.

Tiempo	A	B
0-20	93-83	7-17
20-30	83	17
30-35	83-75	17-25
35-40	75-20	25-80
40-45	20-93	80-7

Preparación solución de referencia: preparar una solución al 10% de ácido ferúlico en etanol 60% V/V.

Preparación muestra: A 1.0 g de cedrón en polvo exactamente pesado agregarle 50 ml de la solución de referencia. Agitar durante 2 hs con agitador magnético. Centrifugar 15 minutos. Filtrar el sobrenadante a través de un filtro de membrana de 0.45µm de diámetro nominal de poro.

Procedimiento - Inyectar por separado volúmenes iguales (20 µl) de la Preparación solución de referencia y de la Preparación muestra, registrar los cromatogramas y medir las respuestas correspondientes al ácido ferúlico y al verbascósido.

Calcular el porcentaje de verbascósido expresado como ácido ferúlico, usando la siguiente fórmula:

$$\frac{A1 \times m2 \times p \times 0.5 \times 3.1}{A2 \times m1}$$

Donde

A1: área el pico del verbascósido en el cromatograma obtenido con la solución muestra.

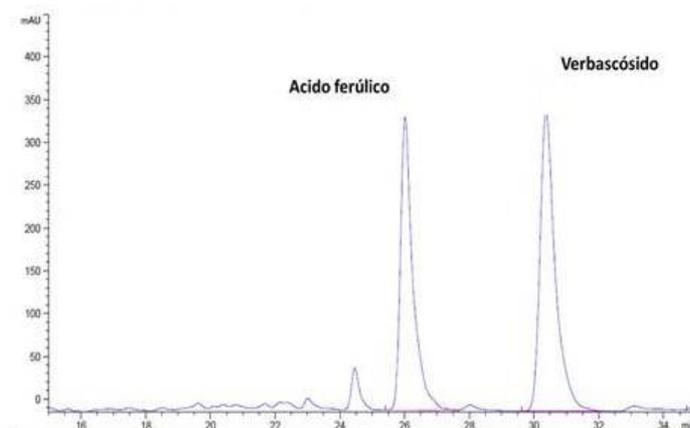
A2: área del pico del ácido ferúlico en el cromatograma obtenido con la preparación solución de referencia.

m1: masa, en g, de la droga vegetal utilizada en la preparación muestra.

m2: masa, en g, del ácido ferúlico utilizado en la preparación solución de referencia.

p: pureza del ácido ferúlico.

3.1: factor de correlación entre el verbascósido y el ácido ferúlico.



Perfil cromatográfico (HPLC) del extracto de *Aloysia citrodora*

- Aceites esenciales y perfil cromatográfico

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de gases con un detector de ionización a la llama, un inyector de flujo dividido y una columna capilar de 30 m × 0,25 mm de sílice fundida recubierta con fase estacionaria constituida por polietilenglicol de peso molecular aproximadamente 20.000 y de 0,25 μm de espesor.

Mantener la temperatura de columna a 60 °C durante 10 minutos y programar un aumento de 2 C por minuto hasta alcanzar 180 °C y mantener a esta temperatura durante por lo menos 5 minutos.

Mantener el inyector y el detector a aproximadamente 220 °C. Se debe emplear nitrógeno como gas transportador y la velocidad lineal debe ser aproximadamente 35 cm por minuto. Ajustar la relación de división del inyector en 1:100.

Solución estándar - Disolver 100 mg de limoneno, 100 mg de eucaliptol, 200 mg de citral y 100 mg de citronelal en 5 ml de ciclohexano.

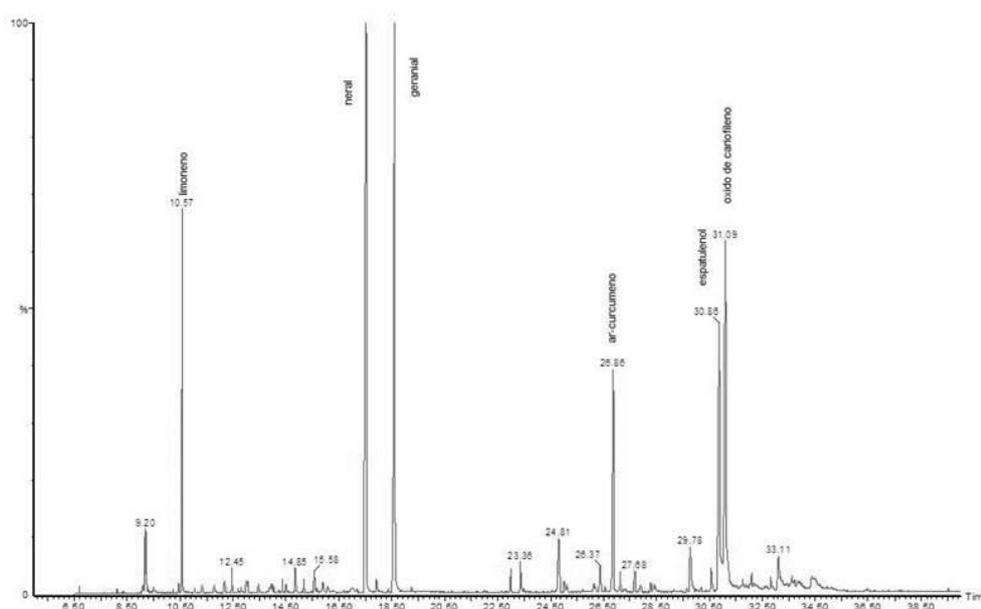
Solución muestra - Emplear una porción de aceite esencial obtenida en ciclohexano en Valoración.

Aptitud del sistema (ver 100. Cromatografía) - Cromatografiar la solución estándar y registrar las respuestas de los picos según se indica en Procedimiento: la resolución R entre los picos correspondientes a limoneno y eucaliptol no debe ser menor de 1,5 y el número de platos teóricos calculado a partir del pico de limoneno debe ser mayor a 30.000.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 1 μl) de la Solución estándar y de la Solución muestra. Registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los todos los picos. Determinar los tiempos de retención relativos al pico de geranial (trr) y determinar el contenido en porcentaje de cada uno de los constituyentes por el método de normalización porcentual.

El contenido en porcentaje de aceites esenciales son los indicados en la siguiente tabla:

Compuesto	Contenido (%)
Limoneno	Entre 5 y 30 %
1,8 cineol	Menor de 1,0 %
6-metil-5-hepten-2-ona	Menor de 3,5 %
<i>cis</i> -tuyona + <i>trans</i> -tuyona	Menor de 0,5 %
Citronelal	Menor de 0,5 %
Neral	Entre 14 y 27 %
Geranial	Entre 17 y 36 %
ar-Curcumeno	Mayor de 1,0%



Perfil cromatográfico (GC) del extracto de *Aloysia citrodora*

VALORACIÓN

Pesar 25,0 g de cedrón recientemente reducido a polvo y transferir a un balón de 1 litro. Destilar con 300 ml de agua y 0,5 ml de ciclohexano en el tubo graduado, a una velocidad de 2 a 3 ml por minuto durante 2 horas. (ver Determinación de aceites esenciales en 630. Métodos de Farmacognosia).

Desde el punto de vista alimenticio, esta especie es ampliamente utilizada como infusión y saborizante en bebidas alcohólicas, y para este fin, y en función de los resultados obtenidos, es evidente la necesidad de asegurar la falta de tuyonas por un lado, y la posibilidad de generar nuevos perfiles aromáticos al utilizar quimiotipos distintos al típico. En este sentido, ya se ha experimentado con muestras de cedrón con alto contenido de citronelal, por su aroma cítrico y herbáceo más pronunciado que el cedrón tradicional.

En cuanto al potencial uso del cedrón en cosmética, su aprovechamiento industrial puede estar orientado no solo a encontrar nuevos perfiles aromáticos en las quimiotipos novedosos encontrados, como se planteó en el párrafo anterior, si no también las actividades biológicas de su fracción no volátil, caracterizada fundamentalmente por su contenido de verbascósido.

En resumen, la biodiversidad fitoquímica caracterizada en la fracción volátil de esta especie dentro de la Argentina y el análisis de su fracción no volátil, justifican la implementación de pautas especiales para su normalización, aportando características propias a la oferta local. Bien planificado, se puede crear valor agregado o competitividad por la presencia de diferentes calidades, lo que puede materializarse en una denominación de origen. Por otro lado, abre nuevas posibilidades para la generación de nuevas alternativas de producción, desde el sector agrícola hasta en la elaboración de diferentes artículos industriales.



BIBLIOGRAFIA

7 BIBLIOGRAFIA

Abu-Hamdah, S., Afifi, F., Shehadeh, M., Khalid, S. 2005. Simple quality-control procedures for selected medicinal plants commonly used in Jordan. *Pharmaceutical Biology* 43 (1), 1-7.

Adams, R. P. 2007. *Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy*, Allured Publishing Corp., Carol Stream, IL.

Ahmed, W., Mohamed, M., El-Dib, R., Hamed, M. 2009. New triterpene saponins from *Duranta repens* Linn. and their cytotoxic activity. *Molecules* 25, 1952-1965.

Akroum, S., Satta, D., Lalaoui, K. 2009. Antimicrobial, antioxidant, cytotoxic activities and phytochemical screening of some algerian plants. *European Journal of Scientific Research* 31 (2), 289-295.

Alanís, A., Calzada, F., Cervantes, J., Torres, J., Ceballos, G. 2005. Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology* 100, 153-157.

Albrecht, R.A., Bassols, G.B., Gurni, A.A., 2005. Aplicación de parámetros cuantitativos en el estudio de *Aloysia citrodora* Paláu (Verbenaceae). *Acta Farmacéutica Bonaerense* 24, 239-241.

Ali, H., El Beltagi, H., Nasr, N. 2008. Assessment of volatile components, free radical-scavenging capacity and anti-microbial activity of Lemon verbena leaves. *Research Journal of Phytochemistry* 2, 84-95.

Alpieva, K., Korkina, L., Orhan, I.E., Georgiev, M.I. 2014. Verbascoside-a review of its occurrence, (bio)synthesis and pharmacological significance. *Biotechnology Advances* 32(6), 1065-76.

Amer, A., Mehlhorn, H. 2006. Persistency of larvicidal effects of plant oil extracts under different storage conditions. *Parasitology Research* 99, 473-477.

ANMAT. Disposición 2673/99. 1999. Normas para la implementación del Registro de Especialidades Medicinales. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica.

Argyropoulou, C., Daferera, D., Tarantilis, P., Fasseas, C., Polissiou, M. 2007. Chemical composition of the essential oil from leaves of *Lippia citriodora* H.B.K. (Verbenaceae) at two developmental stages. *Biochemical Systematics and Ecology* 35, 831-837.

Bandoni, A., Retta, D., Di Leo Lira, P., van Baren, C. 2009. ¿Son realmente útiles los aceites esenciales? *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 8 (5), 317-322.

Barbosa, G., Bonzani, N., Filippa, E., Luján, M., Morero, R., Bugatti, M., Decolatti, N., Arizar Espinar, L., 2001. Atlas histo-morfológico de plantas de interés medicinal de uso corriente en Argentina. Museo Botánico de Córdoba, Ed. Graphyon, Córdoba, Argentina.

Bassols, G., Gurni, A. 1996. Especies del género *Lippia* utilizadas en medicina popular latinoamericana. *Dominguezia* 13 (1), 7-25.

Bellakhdar, J., Idrissi, A., Cañigual, S., Iglesias, J., Vila, R. 1994. Composition of lemon verbena (*Aloysia triphylla* (L'Herit.) Britton) oil of Moroccan origin. *Journal of Essential Oil Research* 6, 523-526.

Bensabah, F., Lamiri, A., Naja, J. 2015. Effect of purified wastewater from the city of Settat (Morocco) on the quality of *Lippia citriodora* essential oil and infusion. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 14, 101-108.

Benzi, V., Murray, A., Ferrero, A. 2009. Insecticidal and insect-repellent activities of essential oils from *Verbenaceae* and *Anacardiaceae* against *Rhizopertha dominica*. *Natural Product Communications* 4 (9), 1287-1290.

Benzi, V., Stefanazzi, N., Murray, A., Werdin González, J., Ferrero, A. 2014. Composition, repellent, and insecticidal activities of two South American plants against the stored grain pests *Tribolium castaneum* and *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *ISRN Entomology*, Volume 2014, Article ID 175827.

Bheemasankara, R., Vijayakumar, E., Rama Krishna, R. 1979. Chemical examination of the stems of *Lippia citriodora*. *Linn. Current Science* 48 (12), 534-535.

Bilia, A., Giomi, M., Innocenti, M., Gallori, S., Vincieri, F. 2008. HPLC-DAD-ESI-MS analysis of the constituents of aqueous preparations of verbena and lemon

verbena and evaluation of the antioxidant activity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 46, 463-470.

Buil, P., Garnero, J., Guichard, G. 1975. Composition chimique del'huile essentielle de verveine de Provence. *Riv. It. EPPOS* 57, 455-466.

Cabanillas, C., López, M., Daniele, G., Zygadlo, J. 2003. Essential oil composition of *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke under rust disease. *Flavour and Fragrance Journal* 18 (5), 446-448.

Calvo, M. 2006. Anti-inflammatory and analgesic activity of the topical preparation of *Verbena officinalis*. *Journal of Ethnopharmacology* 107 (3), 380-382.

Cañigüeral, S., Dellacassa, E., Bandoni, A. 2003. Plantas medicinales y Fitoterapia: ¿indicadores de dependencia o factores de desarrollo? *Acta Farmacéutica Bonaerense* 22 (3), 265-278.

Carnat, A., Carnat, A.P., Chavignon, O., Heitz, A., Wylde, R., Lamaison, J. 1995. Luteolin 7-diglucuronide, the major flavonoid compound from *Aloysia triphylla* and *Verbena officinalis*. *Planta Médica* 61, 490.

Carnat, A., Carnat, A.P., Fraisse, D., Lamaison, J. 1999. The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea. *Fitoterapia* 70, 44-49.

Carrera-Quintanar, L., Funes, L., Viudes, E., Tur, J., Micol, V., Roche, E., Pons, A. 2010. Antioxidant effect of lemon verbena extracts in lymphocytes of university students performing aerobic training program. *Scandinavian Journal of Medicinal Science in Sports* 22 (4), 454-61.

Cerón Martínez, C. 2006. Plantas medicinales de los Andes ecuatorianos. *Botánica Económica de los Andes Centrales* 285-293.

Chapman, R.E. 2009. Terpene chemistry of lemon verbena (*Aloysia citriodora*): natural variation and response to ecological and agricultural variables (Tesis doctoral-Universidad de Georgia, USA).

Chebli, B., Hmamouchi, M., Achouri, M., Idrissi Hassani, M. 2004. Composition and *in vitro* fungitoxic activity of 19 essential oils a two post-harvest pathogens. *Journal of Essential Oil Research* 16, 507-511.

Cheurfa, M., Allem, R. 2015. Évaluation de l'activité anti-oxydante de différents extraits des feuilles d'*Aloysia triphylla* (L'Hérit.) d'Algérie *in vitro*.

Chifa, C., Ricciardi, A. 2001. Plantas de uso en medicina vernácula del centro del Chaco argentino. Miscelánea 117. Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina.

Código Alimentario Argentino. Capítulo XVI: Correctivos y Coadyuvantes. Artículo 1215. www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp (revisado abril 2016).

Coronel, A., Cerda-García-Rojas, C.M., Nathan, P., Catalán, C. 2006. Chemical composition, seasonal variation and a new sesquiterpene alcohol from the essential oil of *Lippia integrifolia*. Flavour and Fragrance Journal 21, 839-847.

Crabas, N., Marongiu, B., Piras, A., Pivetta, T., Porcedda, S. 2003. Extraction, separation and isolation of volatiles and dyes from *Calendula officinalis* L. and *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton by supercritical CO₂. Journal of Essential Oil Research 15 (5), 350-355.

Cruz, D., Fale, P., Mourato, A., Vaza, P., Serralheiro, M., Lino, A. 2010. Preparation and physicochemical characterization of Ag nanoparticles biosynthesized by *Lippia citriodora* (Lemon verbena). Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 81, 67-73.

Dadé, M., Fioravanti, D., Schinella, G., Tournier, H. 2009. Total antioxidant capacity and polyphenol content of 21 aqueous extracts obtained from native plants of Traslasierra valley (Argentina). Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 8 (6), 529-539.

da Silva, C., Vandresen, F., de Oliveira, C., Kato, L., Tanaka, C., Ferreira, H. 2006. Chemical composition of *Aloysia gratissima* (Gill. et Hook.) Tronc. (Verbenaceae). Biochemical Systematics and Ecology 34, 593-595.

Daniel, A., Veeck, A., Klein, B., Ferreira, L., da Cunha, M., Parodi, T., Zeppenfeld, C., Schmidt, D., Caron, B., Heinzmann, B., Baldisserotto, B., Emanuelli, T. 2014. Using the essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit.) Britton to sedate silver catfish (*Rhamdia quelen*) during transport improved the chemical and sensory qualities of the fish during storage in ice. Journal of Food Science 79 (6), 1205-1211.

de Figueiredo, R., Stefanini, M., Ming, L., Marques, M., Facanali, R. 2004. Essential oil composition of *Aloysia triphylla* (L'Herit.) Britton leaves cultivated in Botucatu, São Paulo, Brazil. *Acta Horticulturae* 629, 131-134.

de Lampasona, M.E.P., de Fenik, I.S., Catalán, C.A.N., Dartayet, G.H., Gros, E.G., Cerda-García-Rojas, C.M., Mora-Pérez, Y., Joseph-Nathan, P. 1999. Constituents of the essential oil of *Lippia integrifolia* (Griseb.) Hieron. (Verbenaceae). *Acta Horticulturae* 500, 81-88.

de Vicenci, M., Maialetti, F., Dessi, M.R. 1995. Monographs on botanical flavouring substances used in foods. Part IV. *Fitoterapia* 66 (3), 203-210.

Degenhardt, J., Köllner, T., Gershenzon, J. 2009. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry* 70, 1621-1637.

Dehal, S.S., Croteau, R. 1987. Metabolism of monoterpenes: specificity of the dehydrogenases responsible for the biosynthesis of camphor, 3-thujone, and 3-isothujone. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 258 (1), 287-291.

Del Vitto, L., Petenatti, E.M., Petenatti, M.E. 1997. Recursos herbolarios de San Luis (República Argentina). Primera parte: plantas nativas. *Multequina* 6, 49-66.

Dellacassa, E., Bandoni, A. 2003. Hierbaluisa - *Aloysia citriodora* Palau. *Revista de Fitoterapia* 3, 19-25.

Demo, M., Oliva, M., Ramos, B., Zygadlo, J. 2001. Determinación de actividad antimicrobiana de componentes puros de aceites esenciales. *Revista Higiene Alimentaria* 15, 87-90.

Demo, M., Oliva, M., López, M., Zunino, M., Zygadlo, J. 2005. Antimicrobial activity of essential oils obtained from aromatic plants of Argentina. *Pharmaceutical Biology* 43, 129-134.

Díaz, O., Duran, D., Martínez, J., Stashenko, E. 2007. Estudio comparativo de la composición química de los aceites esenciales de *Aloysia triphylla* (L'Herit.) Britton cultivada en diferentes regiones de Colombia. *Scientia et Technica* 13 (33), 351-353.

Directiva 2009/164/EU. Official Journal of the European Union (23/12/2009) 341-344.

Domínguez, J.A. 1928. Contribuciones a la Materia Médica Argentina. Bs. As. Editorial Peuser.

Dudai, N., Larkov, O., Ravid, U., Putievsky, E., Lewinsohn, E., 2001. Developmental control of monoterpene content and composition in *Micromeria fruticosa* (L.) Druce. *Annals of Botany* 88, 349-354.

Duke, J.A. 1985. *Handbook of Medicinal Herbs*. CRC Press. Boca Raton, FL.

Duschatzky, C., Martínez, A., Almeida, N., Bonivardo, S. 2004. Nematicidal activity of the essential oils of several Argentina plants against the root-knot nematode. *Journal of Essential Oil Research* 16 (6), 626-628.

Duschatzky, C., Possetto, M., Talarico, L., García, C., Michis, F., Almeida, N., de Lampasona, M., Schuff, V., Damonte, E. 2005. Evaluation of chemical and antiviral properties of essential oils from South American plants. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* 16, 247-251.

EHIA (European Herbal Infusions Association). <http://www.ehia-online.org/> revisado 25/11/2015.

Escobar, P., Leal, S., Herrera, L., Martínez, J., Stashenko, E. 2010. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp. essential oils and their major components. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz* 105 (2), 184-190.

Farías, G., Di Leo Lira, P., Brutti, O., Grau, R., van Baren, C., Bandoni, A.L. 2010a. Descriptores de Caracterización de Clones de "cedrón" *Aloysia citriodora* (Verbenáceas) del Banco de Germoplasma del Litoral Argentino. Resúmenes de las II Jornadas Nacionales de Plantas Aromáticas Nativas y sus Aceites Esenciales. Jardín Botánico Arturo E. Ragonese, Instituto de Recursos Biológicos - Inta, Castelar, 9 y 10 de diciembre de 2010.

Farías, M., Pértile, R., Correa, M., de Almeida, M., Palermo, J., Schenkel, E. 2010b. Triterpenoid saponins from *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 21, 927-933.

Farmacopea Nacional Argentina V Ed., 1966. Comisión Permanente de la Farmacopea Nacional Argentina. Buenos Aires, Argentina.

Farmacopea Nacional Argentina VI Ed., 1978. Comisión Permanente de la Farmacopea Nacional Argentina. Buenos Aires, Argentina.

Farmacopea Argentina VII Ed., 2003. ANMAT. Buenos Aires, Argentina. <http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/fna.asp> (revisado en agosto de 2016)

Farmacopea Europea 6.0 - 2008. Monografía: *Lemon verbena leaf*. Council of Europe, Strasbourg, Francia.

Farmacopea Europea 8.0 - 2016. Monografía: *Lemon verbena leaf*. Council of Europe, Strasbourg, Francia.

Fester, G., Martinuzzi, E., Retamar, J., Ricciardi, A. 1961. Aceites esenciales de la República Argentina. Academia Nacional de Ciencias, Córdoba.

Ford, R., Api, A., Letizia, C. 1992a. Verbena Oil. *Food and Chemical Toxicology* 30 (Suppl.), 1375-1385.

Ford, R., Api, A., Letizia, C. 1992b. Verbena Absolute. *Food and Chemical Toxicology* 30 (Suppl.), 1355.

Funes, L., Fernández-Arroyo, S., Laporta, O., Pons, A., Roche, E., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Micol, V. 2009. Correlation between plasma antioxidant capacity and verbascoside levels in rats after oral administration of lemon verbena extract. *Food Chemistry* 117, 589-598.

Funes, L., Carrera-Quintanar, L., Cerdán Calero, M., Ferrer, M., Drobnic, F., Pons, A., Roche, E., Micol, V. 2010a. Effect of lemon verbena supplementation on muscular damage markers, proinflammatory cytokines release and neutrophils oxidative stress in chronic exercise. *European Journal of Applied Physiology* 111 (4), 695-705.

Funes, L., Laporta, O., Cerdán Calero, M., Micol, V. 2010b. Effects of verbascoside, a phenylpropanoid glycoside from lemon verbena, on phospholipid model membranes. *Chemistry and Physics of Lipids* 163, 190-199.

Galvez Ranilla, L., Kwon, Y., Apostolidis, E., Shetty, K. 2010. Phenolic compounds, antioxidant activity and *in vitro* inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioresource Technology* 101, 4676-4689.

Garnero, J. 1977. L'huile essentielle de verveine de Provence. *Parfums Cosmetiques Aromes* 13, 29-39.

Gattuso, S., van Baren, C., Gil, A., Bandoni, A., Ferraro, G., Gattuso, M. 2008. Morpho-histological and quantitative parameters in the characterization of lemon verbena (*Aloysia citriodora* Palau) from Argentina. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 7 (4), 190-198.

Gershenzon, J., McConkey, M., Croteau, R. 2000. Regulation of monoterpene accumulation in leaves of peppermint. *Plant Physiology* 122, 205-213.

Ghisalberti, E.L. 2000. *Lantana camara* L. Verbenaceae. *Fitoterapia* 71, 467-486.

Gil, A., van Baren, C., Di Leo Lira, P., Bandoni, A. 2007. Identification of the genotype from contents and composition of the essential oil of Lemon verbena (*Aloysia citriodora* Palau). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 8664-8669.

Gillij, I., Gleiser, R., Zygadlo, J. 2008. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. *Bioresource Technology* 99, 2507-2515.

Gomes, P., Oliveira, H., Vicente, A., Ferreira, M. 2006. Production, transformation and essential oils composition of leaves and stems of lemon verbena (*Aloysia triphylla* (L'Herit.) Britton) grown in Portugal. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s 8, 130-135.

Grein, B., Huffer, M., Scheller, G., Schreier, P. 1993. 4-Hydroxy-2-alkenals and other products formed by water-mediated oxidative decomposition of α,β -unsaturated aldehydes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41 (12), 2385-2390.

Guarrera, P., Leporatti, M., Foddai, S., Moretto, D., Mercantini, R. 1995. Antimycotic activity of essential oil of *Lippia citriodora* Kunt (*Aloysia triphylla* Britton). *Riv. It. EPPOS* 15, 23-25.

Guenther, E. 1952. *The Essential Oils*, volumen VI, 37-41. Ed. van Nostrand, New York.

Hanna, F., El-Beltagi, H., Nasr, N. 2011. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of *Aloysia triphylla*. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* 10 (8), 2689-2699.

Hegnauer, R. 1973. Chemotaxonomie Der Pflanzen: Eine Übersicht über die Verbreitung und die systematische Bedeutung der Pflanzenstoffe. Vol 6. Birkhauser Verlag, Basilea y Stuttgart.

Hennebelle, T., Sahpaz, S., Joseph, H., Bailleul, F. 2008. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. Journal of Ethnopharmacology 116, 211-222.

Heywood V.H. 1985. Las Plantas con Flores. Editorial Reverté S.A. España.

Hieronymus, J. 1882. Plantae diaphoricae florum argentinæ. Academia Nacional de Ciencias de Córdoba.

IFRA (International Fragrance Association). 2009. Code of Practice. Verbena oil, Verbena absolute. Basilea.

Iijima, Y., Gang, D.R., Fridman, E., Lewinsohn, E., Pichersky E. 2004. Characterization of geraniol synthase from the peltate glands of Sweet basil. Plant Physiology 134, 370-379.

InfoStat, Versión 2008. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Editorial Brujas Argentina. Córdoba, Argentina.

IRAM 185/73. 1970. Aceites esenciales. Aceite de verbena.

IRAM 37611. 2011. Hierbas medicinales: "Cedrón", *Aloysia citrodora* Palau – Verbenaceae. Documento en revisión.

Iwanami, Y., Tateba, H., Kodama, N., Katsumi, K. 1997. Changes of lemon flavor components in an aqueous solution during UV Irradiation. Journal of Agricultural Food Chemistry 45, 463-466.

Journal Officiel de la Republique Francaise - NOR: SJSP0773887A. 2007.

Kaiser, R., Lamparsky, D. 1976a. Natural occurrence of photocitrals and some of their derivatives. Constituents of Verbena oil, 1st communication. Helvetica Chimica Acta 59 (5), 1797-1802.

Kaiser, R., Lamparsky, D. 1976b. Caryophyllane-2,6- β -oxide, a new sesquiterpenoid compound from the oil of *Lippia citriodora* Kunth. Constituents of Verbena oil, 2nd communication. Helvetica Chimica Acta 59 (5), 1803-1808.

Karp, F., Croteau, R. 1982. Evidence that sabinene is an essential precursor of C(3)-oxygenated thujane monoterpenes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 216 (2), 616-624.

Karp F., Harris, J., Croteau, R. 1987. Metabolism of monoterpenes: demonstration of the hydroxylation of (+)-sabinene to (+)-cis-sabinol by an enzyme preparation from sage (*Salvia officinalis*) leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 256 (1), 179-193.

Kim, N., Lee, D. 2004. Headspace solid-phase microextraction for characterization of fragrances of lemon verbena (*Aloysia triphylla*) by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Separation Science* 27, 96-100.

Koroch A., Juliani H.R., Zygadlo J.A. 2007. Bioactivity of essential oils and their components. In: Berger R. G. (Ed.), *Flavours and fragrances chemistry, bioprocessing and sustainability*. Springer, Berlin, Alemania, 87-115.

Lachenmeier, D., Uebelacker, M. 2010. Risk assessment of thujone in foods and medicines containing sage and wormwood. Evidence for a need of regulatory changes? *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 58 (3), 437-443.

Lamaison, J., Petitjean-Freytet, C., Carnat, A. 1993. Le verbascoside, compose phenolique majeur del feuilles de frene (*Fraxinus excelsior*) et de verveine (*Aloysia triphylla*). *Plantes medicinales et Phytotherapie* 26 (3), 225-233.

Listado de Medicamentos Herbarios Tradicionales. 2009. Resolución N° 548-09. Ministerio de Salud de Chile.

López, A., Theumer, M., Zygadlo, J., Rubinstein, H. 2004. Aromatic plants essential oils activity on *Fusarium verticillioides*. Fumonisin B1 production in corn grain. *Mycopathologia* 158, 343-349.

Loranty, A., Rembalkowska, E., Rosa, E. A., Bennett, R. N. 2010. Identification, quantification and availability of carotenoids and chlorophylls in fruit, herb and medicinal teas. *Journal of Food Composition and Analysis* 23 (5), 432-441.

Mamane, V., Gress, T., Krause, H., Furstner, A. 2004. Platinum and gold catalyzed cycloisomerization reactions of hydroxylated enynes. *Journal of the American Chemical Society* 126, 8654-8655.

Mendiondo, M.E., Rondina, R., Coussio, J.D. 1973. Estudio fitoquímico de plantas indígenas argentinas. Revista de Investigaciones Agropecuarias Serie 2 (3), 137-141.

Montes A. 1961. Analítica de los Productos Aromáticos. Colección Científica del INTA. Buenos Aires

Montes, M., Valenzuela, L., Wilkomirsky, T., Arrivé, M. 1973. Sur la composition de l'essence d'*Aloysia triphylla* ("cedrón"). Planta Medica 23 (2), 119-124.

Montiel-Herrera, M., Camacho-Hernández, I., Ríos-Morgan, A., Delgado-Vargas, F. 2004. Partial physicochemical and nutritional characterization of the fruit of *Vitex mollis* (Verbenaceae). Journal of Food Composition and Analysis 17, 205-215.

Moore, R.N., Fisher, G.S. 1956. The effect of strained rings on ultraviolet absorption spectra. Journal of the American Chemical Society 78, 4362-4364.

Múlgura de Romero, M. E. 1999. Verbenaceae. En Zuloaga, F. y O. Morrone. Catálogo de las Plantas Vasculares de la República Argentina. Verbenaceae. II. Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. Missouri Botanical Garden Press, Saint Louis. 74, 1136-1170.

Múlgura de Romero, M., Atkins, S., Rotman, A. 2003. Verbenaceae, parte I. Subfamilia I. Verbenoideae, parte 1. Tribu II. Parte A., en A. T. Hunziker (ed.), Flora Fanerogámica Argentina, volumen 84, 1-46. Córdoba. Programa PROFLOA-CONICET.

Nakamura, T., Okuyama, E., Tsukada, A., Yamazaki, M., Satake, M., Nishibe, S., Deyama, T., Moriya, A., Maruno, M., Nishimura, H. 1997. Acteoside as the analgesic principle of cedron (*Lippia triphylla*), a Peruvian medicinal plant. Chemical Pharmaceutical Bulletin 45 (3), 499-504.

Newall, C., Anderson, L., Phillipson, J. 1996. Herbal Medicines: A Guide for Health-Care Professionals. Pharmaceutical Press. London.

Ocazonez, R., Meneses, R., Torres, F., Stashenko, E. 2010. Virucidal activity of Colombian *Lippia* essential oils on dengue virus replication *in vitro*. Memorias del Instituto Oswaldo Cruz 105 (3), 304-330.

Ohno, T., Kita, M., Yamaoka, Y., Imamura, S., Yamamoto, T., Mitsufuji, S., Kodama, T., Kashima, K., Imanishi, J. 2003. Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 8 (3), 207-215.

Olinuck, J.A. 1998. El clima de la localidad de Cerro Azul. Período 1967-1996. Estación Experimental Agropecuaria Cerro Azul. Informe Técnico N° 68.

Oliva, M., Beltramino, E., Gallucci, N., Casero, C., Zygadlo, J., Demo, M. 2010. Antimicrobial activity of essential oils of *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton from different regions of Argentina. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 9 (1), 29-37.

Olivero-Verbel, J., Güette-Fernández, J., Stashenko, E. 2009. Acute toxicity against *Artemia franciscana* of essential oils isolated from plants of the genus *Lippia* and *Piper* collected in Colombia. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 8 (5), 419-427.

Onawunmi, G. O. 1989. Evaluation of the antimicrobial activity of citral. *Letters in Applied Microbiology* 9, 105-108.

Ono, M., Oda, E., Tanaka, T., Iida, Y., Yamasaki, T., Masuoka, C., Ikeda, T., Nohara, T. 2008. DPPH radical-scavenging effect on some constituents from the aerial parts of *Lippia triphylla*. *Journal of Natural Medicines* 62, 101-106.

Oskay, M., Tamer, A., Ay, G., Sari, D., Aktas, K. 2005. Antimicrobial activity of the leaves of *Lippia triphylla* (L'Herit.) O. Kuntze (Verbenaceae) against on bacteria and yeast. *Journal of Biological Sciences* 5, 620-622.

Ozek, T., Kirimer, N., Baser, K., Tumen, G. 1996. Composition of the essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit.) Britton grown in Turkey. *Journal of Essential Oil Research* 8 (5), 581-583.

Page, A., Miller, R., Keeney, D. 1982. *Methods of Soil Analysis. Chemical and microbiological properties.* American Society of Agronomy. Madison, WI.

Palacios, S., Bertoni, A., Rossi, Y., Santander, R., Urzúa, A. 2009. Insecticidal activity of essential oils from native medicinal plants of Central Argentina against the house fly, *Musca domestica* (L.). *Parasitology Research* 106, 207-212.

Parodi, T., Vargas, A., Krewer, C., Flores, E., Baldisserotto, B., Heinzmann, B., Oliveira, J., Popiolski, M., Minozzo, M. 2013. Chemical composition and antibacterial activity of *Aloysia triphylla* (L'Herit.) Britton extracts obtained by pressurized CO₂ extraction. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 56 (2), 283-292.

Parodi, T., Cunha, M., Becker, A., Zeppenfeld, C., Martins, D., Koakoski, G., Barcellos, L., Heinzmann, B., Baldisserotto, B. 2014. Anesthetic activity of the essential oil of *Aloysia triphylla* and effectiveness in reducing stress during transport of albino and gray strains of silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Fish Physiology and Biochemistry* 40 (2), 323-334.

Pascual, M., Slowing, K., Carretero, E., Sánchez, M., Villar, A. 2001. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology* 76 (3), 201-214.

Pattnaik, S., Subramanyam, V. R., Bapaji, M., & Kole, C. R. 1996. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios* 89 (358), 39-46.

Paulus, D., Valmorbidia, R., Toffoli, E., Nava, G.A. 2013. Teor e composição química de óleo essencial de cidrô em função da sazonalidade e horário de colheita. *Horticultura Brasileira* 31, 203-209.

Pereira, C., Meireles, M. 2007. Evaluation of global yield, composition, antioxidant activity and cost of manufacturing of extracts from lemon verbena (*Aloysia triphylla* (L'Hérit.) Britton) and mango (*Mangifera indica* L.) leaves. *Journal of Food Process Engineering* 30 (2), 150-173.

Pérez, S., Zavala, M., Vargas, R., Pérez, C., Pérez, R. 1998. Antidiarrhoeal activity of C-9 aldehyde isolated from *Aloysia triphylla*. *Phytotherapy Research* 12 (S1), 45-46

Pharmacopée Française 2002, X Edición y actualizaciones. París.

Poblete, A., López-Alarcón, C., Lissi, C., Campos, A. 2009. Oxygen radical antioxidant capacity (orac) values of herbal teas obtained employing different methodologies can provide complementary data. *Journal of the Chilean Chemical Society* 54 (2), 154-157.

Proestos, C., Sereli, D., Komaitis, M. 2006. Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. *Food Chemistry* 95, 44-52.

Qnais, E., Safieh, K., Dieyeh, M., Abdulla, F. 2009. Antinociceptive effect of two flavonoids from *Aloysia triphylla* L. *Jordan Journal of Biological Sciences* 2 (4), 167-170.

Quirantes-Piné, R., Funes, L., Micol, V., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. 2009. High-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight and ion-trap tandem mass spectrometry to identify phenolic compounds from a lemon verbena extract. *Journal of Chromatography A* 1216 (28), 5391-5397.

Ragone, M.A., Sella, M., Conforti, P., Volonté, M.G., Consolini, A.E. 2007. The spasmolytic effect of *Aloysia citriodora* Palau (South American cedrón) is partially due to its vitexin but not isovitexin on rat duodenum. *Journal of Ethnopharmacology* 113, 258-266.

Ragone, M.I., Sella, M., Pastore, A., Consolini, A.E. 2010. Sedative and cardiovascular effects of *Aloysia citriodora* Palau, on mice and rats. *Latin American Journal of Pharmacy* 29 (1), 79-86.

Ratera, E. y Ratera M. 1980. Plantas de la flora argentina empleadas en medicina popular. Hemisferio Sur. Buenos Aires.

Reglamento Sanitario de los Alimentos. Decreto Supremo N° 977/96. Chile.

Ricciardi, G., Torres, A., van Baren, C., Di Leo Lira, P., Ricciardi, A., Dellacassa, E., Lorenzo, D., Bandoni, A. 2005. Composition of the essential oil of *Aloysia virgata* var. *platyphylla* (Briquet) Moldenke from Corrientes (Argentina). *Flavour and Fragrance Journal* 20 (6), 645-649.

Ricciardi, G., van Baren, C., Di Leo Lira, P., Ricciardi, A., Lorenzo, D., Dellacassa, E., Bandoni, A. 2006. Volatile constituents from aerial parts of *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. var. *gratissima* growing in Corrientes, Argentina. *Flavour and Fragrance Journal* 21 (4), 698-703.

Ricciardi, G., Torres, A., Bubenik, A.L, Ricciardi, A., Lorenzo, D., Dellacassa, E. 2011. Environmental effect on essential oil composition of *Aloysia citriodora* from Corrientes (Argentina). *Natural Products Communication* 6 (11), 1711-1714.

Ricco, R., Wagner, M., Gurni, A. 2011. Dinámica de polifenoles de “Cedrón” (*Aloysia citrodora* Palau -Verbenaceae-) en relación al desarrollo foliar. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 10 (1), 67-74.

Rimpler, H. y Sauerbier, H. 1986. Iridoid glucosides as taxonomic markers in the genera *Lantana*, *Lippia*, *Aloysia* and *Phyla*. *Biochemical Systematics and Ecology* 14 (3), 307-310.

Roig, F. 2001. Flora medicinal mendocina. Editorial Ediunc.

Rodríguez Vaquero, M.J., Tomassini Serravalle, L.R., Manca de Nadra, M.C., Strasser de Saad, A.M. 2010. Antioxidant capacity and antibacterial activity of phenolic compounds from argentinean herbs infusions. *Food Control* 21 (5), 779-785.

Rojas, J., Palacios, O., Ronceros, S. 2012. Efecto del aceite esencial de *Aloysia triphylla* Britton (cedrón) sobre el *Trypanosoma cruzi* en ratones. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 29 (1), 61-68.

Rojas, L., Velasco, J., Díaz, T., Gil Otaiza, R., Carmona, J., Usubillaga, A. 2010. Composición química y efecto antibacteriano del aceite esencial de *Aloysia triphylla* (L'Hér.) Britton contra patógenos genito-uritarios. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 9 (1), 56-62.

Romeo, F., De Luca, S., Piscopo, A., Poiana, M. 2008. Antimicrobial effects of some essential oils. *Journal of Essential Oils Research* 20 (4), 373-379.

Sangwan, N., Farooqi, A., Shabih, F., Sangwan, R.S. 2001. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation* 34, 3-21.

Santos-Gomes, P., Fernandes-Ferreira, M., Vicente, A. 2005. Composition of the essential oils from flowers and leaves of Vervain (*Aloysia triphylla* (L'Herit.) Britton) grown in Portugal. *Journal of Essential Oils Research* 17 (1), 73-78.

Sartoratto, A., Machado, A., Delarmelina, C., Figueira, G., Duarte, M., Rehder, V. 2004. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 35 (4), 275-280.

Siedo, S. J. 2006. Systematics of *Aloysia* (Verbenaceae). Tesis. Universidad of Texas, Austin.

Silva, G. de Assis Brasil, Bauer, L., Saraiva de Siqueira, N., Moreira Bacha, C., Santana, B. 1979. O oleo essencial de *Lippia citriodora* Kunth. do Rio Grande do Sul. Tribuna Farmacéutica 47 (1), 3-5.

Skaltsa, H., Shamma, G., 1988. Flavonoids from *Lippia citriodora*. Planta Medica 54, 465.

Soler, E., Dellacassa, E., Moyna, P, 1986. Composition of *Aloysia gratissima* flower essential oil. Planta Medica 52, 488-490.

Sorarú, S., Bandoni, A. 1978. Plantas de la medicina popular argentina. Editorial Albatros. Buenos Aires, Argentina.

Stashenko, E., Jaramillo, B., Martínez, J. 2003. Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales 27 (105), 579-598.

Taoubi, K., Fauvel, M., Gleye, J., Moulis, C. Fourasté, I. 1997. Phenypropanoid glycosides from *Lantana camara* and *Lippia multiflora*. Planta Medica 63, 192-193.

Teixeira Duarte, M., Figueira, G., Sartoratto, A., García Rehder, V., Delarmelina, C. 2005. Anti-candida activity of Brazilian medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology 97, 305-311.

Tene, V., Malagón, O., Vita Finzi, P., Vidari, G., Armijos, C., Zaragoza, T. 2007. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipe, Ecuador. Journal of Ethnopharmacology 111 (1), 63-81.

Terblanché, F., Kornelius, G. 1996. Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae): A literature review. Journal of Essential Oil Research 8 (5), 471-485.

Tolosa, A.C., Zygadlo, J., Biurrun, F., Rotman, A., Picollo, M. 2010. Bioactivity of Argentinean essential oils against permethrin-resistant head lice, *Pediculus humanus capitis*. Journal of Insect Science 10: artículo 185.

Tomás-Barberán, F., Harborne, J., Self, R. 1987. Twelve 6-oxygenated flavone sulphates from *Lippia nodiflora* and *L. canescens*. Phytochemistry 26 (8), 2281-2284.

Torrent Martí, M.T. 1976. Algunos aspectos farmacognósticos y farmacodinámicos de *Lippia citriodora* HBK. Revista de la Real Academia de Farmacia de Barcelona 14, 39-55.

Torrent Martí, M.T. 1985. Acción farmacológica de algunas esencias de origen biológico. Revista de la Real Academia de Farmacia de Barcelona 1, 43-56.

Toursarkissian, M. 1980. Plantas medicinales de la Argentina. Sus nombres botánicos, vulgares, usos y distribución geográfica. Hemisferio Sur, Buenos Aires.

Toyota, M., Msonthi, J., Hostettmann, K. 1990. A molluscicidal and antifungal triterpenoid saponin from the roots of *Clerodendrum wildii*. Phytochemistry 29 (9), 2849-2851.

Troncoso, N. S. 1974. Los géneros de Verbenáceas de Sudamérica extratropical (Argentina, Chile, Bolivia, Paraguay, Uruguay y sur de Brasil). Darwiniana 18 (3-4), 295-412.

Troncoso, N., Botta, S. 1993. *Verbenaceae*. En A.L. Cabrera. Flora de la Provincia de Jujuy. Colección Científica INTA, Buenos Aires, 1-117.

Usaid Paraguay Vende. 2010. Plantas Medicinales y Aromáticas. Una alternativa de producción comercial.

Valentão, P., Andrade, P., Areias, F., Ferreres, F., Seabra, R. 1999. Analysis of vervain flavonoids by HPLC/diode array detector method. Its application to quality control. Journal of Agricultural Food Chemistry 47, 4579-82.

Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Andrade, P. Seabra, R., Bastos, M. 2002. Studies on the antioxidant activity of *Lippia citriodora* infusion: scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. Biological and Pharmaceutical Bulletin 25 (10), 1324-1327.

Vandresen, F., Schmitt, E., Kato, L., Alves de Oliveira, C., Bersani Amado, C., da Silva, C. 2010. Constituintes químicos e avaliação das atividades antibacteriana e antiedematogênica de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. e *Aloysia virgata* (Ruiz & Pav.) Pers., Verbenaceae. Revista Brasileira de Farmacognosia 20 (3), 317-321.

Velasco-Negueruela, A., Pérez-Alonso, M., Guzmán, C., Zygadlo, J., Ariza-Espinar, L., Sanz, J., García-Vallejo, M. 1993. Volatile constituents of four *Lippia* species from Córdoba (Argentina). *Journal of Essential Oil Research* 5 (5), 513-524.

Vogel, H., Silva, M.L., Razmilic I. 1997. Seasonal fluctuation of essential oil content in lemon verbena (*Aloysia triphylla*). *ISHS Acta Horticulturae* 500, 75-79.

von Poser, G., Toffoli, M., Sobral, M., Henriques, A. 1997. Iridoid glucosides substitution patterns in *Verbenaceae* and their taxonomic implication. *Plant Systematics and Evolution* 205 (3-4), 265-287.

Werdin González, J., Gutiérrez, M., Murray, A., Ferrero, A. 2010. Biological activity of essential oils from *Aloysia polystachya* and *Aloysia citriodora* (*Verbenaceae*) against the soybean pest *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). *Natural Product Communications* 5 (2), 301-306.

Wernert, M., Wagner, M., Gurni, A., Carballo, M., Ricco, R. 2009. Estudio de polifenoles de infusiones y cocimientos de hojas de "Cedrón" (*Aloysia citrodora* Palau) y "Poleo" (*Lippia turbinata* Griseb.) - *Verbenaceae*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 8 (4), 308-311.

Wiley/NIST, The Wiley/NBS registry of mass spectral data, 8th Ed., J. Wiley & Sons, Inc., Nueva York. 2008.

Wittstein, G. C. 1852. *Etymologischbotanisches Handwörterbuch*. Ansbach. Verlag von Carl Junge.

Wolken, W.A., ten Have, R., van Der Werf, M.J.J. 2000. Amino acid-catalyzed conversion of citral: *cis-trans* isomerization and its conversion into 6-methyl-5-hepten-2-one and acetaldehyde. *Agricultural Food Chemistry* 48 (11), 5401-5405.

Yasunaka, K., Abe, F., Nagayama, A., Okabe, H., Lozada-Pérez, L., López-Villafranco, E., Estrada Muñiz, E., Aguilar, A., Reyes-Chilpa, R. 2005. Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthenes. *Journal of Ethnopharmacology* 97 (2), 293-299.

Yoo, K., Lee, C., Lee, H., Moon, B., Lee, C. 2008. Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. *Food Chemistry* 106 (3), 929-936.

Zamorano-Ponce, E., Morales, C., Ramosa, D., Sepúlveda, C., Cares, S., Rivera, P., Fernández, J., Carballo, M. 2006. Anti-genotoxic effect of *Aloysia triphylla* infusion against acrylamide-induced DNA damage as shown by the comet assay technique. *Mutation Research* 603 (2), 145-150.

Zheng, W., Wang, S. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (11), 5165-5170.

Zygodlo, J., Lamarque, A., Maestri, D., Guzmán, C., Lucini, E., Grosso, N., Ariza-Espinar, L. 1994. Volatile constituents of *Aloysia triphylla* (L'Herit.) Britton. *Journal of Essential Oil Research* 6 (4), 407-409.

Zygodlo, J., Lamarque, A., Guzmán, C. Grosso, N. 1995. Composition of the flowers oils of some *Lippia* and *Aloysia* species from Argentina. *Journal of Essential Oil Research* 7 (6), 593-595.