

ESTUDIO DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALYPTUS CITRIODORA BAILEY

* Marlene Adames
* Edith Mendoza
** Luz Stella Ospina de Nigrinis

I. INTRODUCCION

El uso de las fragancias para propósitos ornamentales, rituales y medicinales data desde los comienzos de la civilización.

En la actualidad los aceites esenciales, como tales, y los compuestos que por destilación o por otros medios se obtienen a partir de éstos son ampliamente utilizados, no sólo por sus propiedades medicinales sino por sus características aromatizantes; industrialmente se emplean para la alimentación humana y animal, en cosmetología, en insecticidas, pinturas, adhesivos, etc, con el objeto de saborizar y proporcionar un aroma agradable.

El presente estudio tiene por objeto determinar los principales componentes del aceite esencial de **Eucalyptus citriodora** procedente de Cundinamarca y de los Llanos Orientales, extraído de las hojas por destilación con arraste de vapor, y conocer sus propiedades fisicoquímicas y biológicas.

La información que se tiene sobre el aceite esencial de **Eucalyptus citriodora** se refiere a ejemplares cultivados en Australia, India, España y Brasil.

II. MATERIALES Y METODOS

Materiales:

1. Material vegetal

La recolección del material (hojas), se hizo en los municipios de San Francisco en Cundinamarca y de Puerto López en los Llanos Orientales, regiones localizadas entre 2.000 y 2.300 metros sobre el nivel del mar (Muestras Nos. 1 y 2).

Los ejemplares fueron clasificados en el Herbario Nacional Colombiano con el número 49263.

* Estudiantes de Tesis

** Profesora Asociada - Departamento de Farmacia

2. Material biológico

Las cepas bacterianas elegidas para llevar a cabo las pruebas microbiológicas de las muestras de aceite esencial de **Eucalyptus citriodora** Bailey fueron:

Staphylococcus albus, **Staphylococcus aureus**, **Escherichia coli** y **Proteus vulgaris**, procedentes del Laboratorio de Microbiología del Departamento de Farmacia, U. Nal.

Métodos

1. Extracción del aceite esencial de la planta.

El método de obtención de los aceites esenciales a partir del material vegetal varía de acuerdo a factores como: composición química de la esencia, constitución física del material y materia prima que se va a tratar (1,2).

Los métodos más utilizados son:

Obtención por expresión (1,3,4); con disolventes (5); por infusión (1,3,6); por absorción (1,3,4); por destilación (7,8,9); destilación con agua (10,1); destilación con agua y vapor (11,12); y destilación por arrastre con vapor de agua.

El método más utilizado en este estudio fue el de destilación por arrastre con vapor de agua; se utilizaron 8 kilos de hojas frescas uniformemente divididas. Se obtuvieron 400 ml. de aceite los cuales se envasaron en recipientes oscuros y se almacenaron a baja temperatura (5 °C). Se marcaron como muestras No. 1 y No. 2.

2. Estudio Físicoquímico

2.1. Examen organoléptico

2.2. Constantes físicas

La determinación de las constantes físicas de un aceite esencial permite conceptuar sobre la calidad y la pureza.

A las muestras objeto de este estudio se les determinó, la gravedad específica por el método del picnómetro (13); el índice de refracción a 20°C (14); la rotación específica, para lo cual se empleó un polarímetro Carl Zeiss y celdas de 1,5 dcm de longitud; el punto de ebullición; la solubilidad en disulfuro de carbono, cloroformo, bisulfito de sodio y en etanol (15, 16, 17, 18, 19) y el residuo de evaporación (20).

2.3. Constantes químicas

Acidez libre (21) índice de ésteres (22)

3. Análisis preliminar del aceite

3.1. Cromatografía en capa fina

Para conocer la composición aproximada del aceite de **Eucalyptus citriodora**, las muestras No. 1 y No. 2 se sometieron a una separación cromatográfica en capa fina y se emplearon capas de 0.250 mm.

Se utilizaron los sistemas de solventes recomendados en la bibliografía (23) entre los cuales se pueden citar:

A: Cloroformo; B: Cloroformo - Acetato de Etilo en las siguientes proporciones: 95:5; 90:10; 85:15; 80:20; C: Benceno; D: Benceno - Acetato de Etilo 95:5; 90:10; 85:15; 80:20.

Como reveladores se emplearon los reactivos de:

1: 2,4 Dinitro fenil hidrazina; 2: ácido fosfomolibdico; 3: Anisaldehído-ácido sulfúrico; 4: Yoduro de Potasio - almidón; 5: tricloruro de antimonio; 6: Pentacloruro de antimonio; 7: Tricloruro de antimonio-pentacloruro de antimonio; 8: Vainillina - ácido sulfúrico; 9: Acido sulfanílico diazotado; 10: Verde de bromocresol; 11: Verde de bromocresol- azul de bromofenol. Para su preparación se siguió la técnica propuesta en la bibliografía (24, 25, 26, 27, 28, 29, 30).

3.2. Estudio espectroscópico

Con el objeto de comprobar la presencia de algunos grupos funcionales observados en los cromatogramas al emplear los diferentes reveladores, se determinó el espectro de absorción molecular al ultravioleta (UV) y al infrarrojo (IR). El espectro al ultravioleta de las dos muestras fue obtenido en un espectrofotómetro Beckman modelo BD-G. El espectro al infrarrojo se obtuvo en un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo 700 entre 4.000 y 650 cm^{-1} .

4. Identificación, aislamiento y valoración de los principales componentes del aceite.

4.1. De acuerdo a la información obtenida en la literatura y con el objeto de identificar los principales componentes del aceite, se procedió a hacer un estudio cromatográfico en capa fina a partir de las dos muestras de aceite, frente a los siguientes patrones de comparación: Citronelal, Citronelol, Alfa- terpineol, Citral y Geraniol. Las condiciones del ensayo fueron: Adsorbente: Silica gel G (placas de 0.250 mm);

solvente: Benceno- Acetato de Etilo: 85:15; concentración de las muestras: Los patrones fueron diluidos en propanona 1:10. Las muestras del aceite esencial se diluyeron en el mismo solvente en la proporción 1:7; volumen colocado: 3 microlitros; reveladores: 1 y 8.

Según lo observado en el ensayo anterior, se comprobó la presencia de sustancias con valores R_f muy cercanos, por lo cual se procedió a hacer cromatografía funcional (31) y bidimensional.

4.2. Cromatografía funcional.

Esta técnica cromatografía es de gran importancia, pues las sustancias a separar son transformadas por los diferentes reactivos en derivados con propiedades muy diferentes a las que poseían las sustancias iniciales, razón por la cual se pueden separar sustancias de R_f semejante mediante esta técnica. Algunas veces no es necesario el uso del revelador ya que los productos de reacción tienen coloración propia, como en el caso de los compuestos carbonílicos que al reaccionar con la 2,4 Dinitrofenilhidrazina forman las 2,4 Dinitrofenilhidrazonas correspondientes que tienen coloración propia (31).

Las condiciones que se utilizaron para llevar a cabo la cromatografía funcional fueron: Colocación de la muestra: reacción en el punto de aplicación de la cromatoplaque; muestra: los aceites fueron diluidos con propanona (R.A.) (1:1); los patrones (citral y citronelal (9:1)) fueron diluidos con propanona (R.A.)(1:1); solventes: se utilizaron los sistemas: A y D.; reactivo: 2, 4- Dinitrofenilhidrazina.

4.3. Cromatografía bidimensional en capa fina

Las condiciones de la técnica bidimensional fueron las siguientes: Adsorbente sílica gel G; muestras: aceite No. 1 y 2 en propanona (1:1); patrones: mezcla de citral y citronelal (1:1) en propanona (1:9); solvente: primer recorrido Benceno- acetato Etilo: 85:15; segundo recorrido: Benceno- Acetato de Etilo: 95:5; 2: primer recorrido: Benceno- Acetato Etilo: 85:15; segundo recorrido: Benceno; 3: primer recorrido: Benceno- Acetato Etilo: 95:5; segundo recorrido: Cloroformo; 4: primer recorrido: Cloroformo- Acetato Etilo: 95:5; segundo recorrido: Cloroformo; 5: primer recorrido: Cloroformo; segundo recorrido: cloroformo- Acetato de Etilo: 80:20; Revelador No. 1

4.4. Aislamiento de Citronelal y de Geraniol

Una vez ubicados e identificados los principales componentes de las muestras en estudio (citronelal y geraniol) por cromatografía en capa fina en sus diferentes modalidades, comparando con patrones, se procedió a aislarlos para comprobar su identidad.

Cromatografía preparativa en capa fina

Se trabajó en placas de 20 x 20 cms en las siguientes condiciones: Adsorbente: Sílica gel HF 254 (capas de 0.5 mm); solvente: Benceno-Acetato de Etilo 85:15; revelador: luz UV de 254 nm; muestras: aceite No. 1 y No. 2.

Se demarcaron las zonas cuya posición correspondió a los patrones de comparación (citronelal y geraniol), se rasparon cuidadosamente y se eluyeron con etanol del 96%. El solvente fue removido, y el residuo obtenido en cada caso fue sometido a pruebas de pureza y de identidad como: cromatografía en capa fina, (mono y bidimensional), índice de refracción y espectroscopia al UV e IR.

4.5. Valoración de Citronelal y de Geraniol

Comprobada la presencia de citronelal y de geraniol se procedió a su cuantificación en las dos muestras, para lo cual se utilizaron los siguientes métodos:

4.5.1. Valoración del Citronelal:

Espectrofotometría al UV

El método se aplicó previa separación de los componentes empleando cromatografía en capa fina, en las condiciones de trabajo indicadas en 4.4.

La determinación espectrofotométrica se hizo a 222.5 nm dentro de valores de concentración que mostraron el cumplimiento de la ley de Lambert- Beer. Como patrón se utilizó citronelal Lucta y como solvente etanol de 96%.

Cromatografía en fase gaseosa

La valoración de citronelal en las dos muestras de aceite esencial de **Eucalyptus citriodora**, se llevó a cabo en las siguientes condiciones: Instrumento: Cromatógrafo Perkin Elmer modelo 880 detector de ionización de llama; flujo de nitrógeno: 30.15 ml/ min.; columna: HB 2.000 Uconoil 50 polar; temperatura de inyector: 170°C; temperatura del detector: 170°C; temperatura de la columna: programa entre 85°C y 110°C, velocidad 6°C por minuto; volumen de inyección: 0,5 microlitros; estandar interno: n- Hexanol; solvente: propanona; soporte: Chromosorb- W-HMDS; la identificación del citronelal se hizo comparando los tiempos de retención del patrón y de las muestras en estudio. Para la curva de calibración se utilizó citronelal Lucta.

4.5.2. Valoración del Geraniol

Espectrofotometría al UV

Este método se realizó en la misma forma como en el caso del citronelal, previa separación cromatográfica y posterior determinación de la absorbancia de los elautos del patrón y del problema en el espectrofotómetro a 205 nm.

Cromatografía en fase gaseosa: Las condiciones en las que se llevó a cabo la determinación fueron las mismas que para el citronelal a excepción de la temperatura la cual fue programada desde 85°C hasta 140°C a una velocidad de 10°C/min, manteniéndola un minuto isotérmica. La identificación se hizo por comparación de los tiempos de retención.

5. Estudio de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Eucalyptus citriodora*.

En vista de las propiedades antibacterianas que presentan algunos aceites esenciales se procedió a su comprobación en las muestras objeto de estudio. Para el efecto se llevaron a cabo tres tipos de ensayos:

5.1. Método bioautográfico

El método consiste básicamente en una separación cromatográfica previa del aceite esencial y posterior inoculación de las placas con varios microorganismos siguiendo diferentes técnicas (35).

La técnica seguida para el ensayo fue la siguiente: en placas de vidrio de 2.5 cm por 7.0 cm cubiertas con sílica gel HF254 de 0.250mm. de espesor se colocaron 50 microlitros de una dilución al 50% de cada uno de los aceites; las cromatoplacas se desarrollaron utilizando el solvente Benceno - Acetato de Etilo 85:15 el cual se dejó evaporar completamente, una vez desarrolladas las placas. Las cromatoplacas fueron cubiertas después con agar nutritivo previamente inoculado al 2% con un cultivo de 18 horas de crecimiento de cada uno de los microorganismos citados en el numeral 2 de la parte de "materiales y métodos" y luego incubadas a 37°C durante 24 horas al cabo de las cuales se observó si se presentaban zonas de inhibición.

5.2. Método de difusión en gel

Este método permitió ver la acción antimicrobiana que presenta el aceite completo. La técnica seguida para su desarrollo fue la siguiente:

En caja de Petri de 10 cm de diámetro se colocaron 20 ml. de agar nutritivo previamente inoculado al 2% con un cultivo de 18 horas de crecimiento de cada uno de los microorganismos; una vez solidificado se hicieron tres orificios de 0.5 cm de diámetro los cuales se llenaron con 0.1 ml de las diluciones al 50 y 75% del aceite en etanol y del aceite esencial puro (100%).

Las cajas se dejaron a la temperatura ambiente durante 45 minutos, como tiempo de predifusión y luego fueron incubadas a 37°C durante 24 horas, al cabo de las cuales se observó si se presentaban zonas de inhibición.

5.3. Método de difusión en placas colocando discos de papel impregnados con las muestras en estudio.

Con este método al igual que con el anterior se puede observar la acción antimicrobiana del aceite completo.

Para su desarrollo se llevó a cabo la siguiente técnica: en cajas de Petri de 10 cm de diámetro se colocaron 20 ml de agar nutritivo estéril; una vez solidificado, se inoculó con 0.1 ml de un cultivo del microorganismo al 2% en la superficie del agar con ayuda de un aza de Drigalsky. Luego se colocaron en la superficie inoculada, dos discos de papel de filtro estériles de 0.5 cm de diámetro los cuales habían sido previamente impregnados con el aceite dejándolos secar a la temperatura ambiente en condiciones estériles. Se incubaron las cajas a 37°C durante 24 horas al cabo de las cuales se observaron zonas de inhibición.

Para todos los ensayos microbiológicos se elaboraron cultivos para controlar el crecimiento y buen estado de los microorganismos durante el desarrollo en las diferentes pruebas. Los microorganismos utilizados fueron los mencionados en el numeral 2 de la parte de materiales y métodos'' (36, 37, 38, 39, 40, 41).

III. RESULTADOS Y DISCUSION

1. Rendimiento

El rendimiento obtenido aplicando el método de extracción con arrastre de vapor fué del 1.92%.

2. Propiedades físicas y químicas del aceite

El examen organoléptico de las muestras corresponde a un líquido transparente, color amarillo tenue, el cual puede tornarse verdoso con el tiempo, poco viscoso y de olor agradable.

Las propiedades físicas y químicas de las muestras estudiadas figuran en las tablas I y II.

TABLA I
CONSTANTES FISICAS Y QUIMICAS
DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALYPTUS
CITRIODORA.

Constante	Aceite 1	Aceite 2	Valor dado en la literatura
Gravedad específica a 15°C	0.8654	0.8670	0.8658 a 0.8740
Rotación óptica	-1.26	-1.29	2.48 a -2.48
Indice de refracción a 20 °C	1.4516	1.4520	1.4510 a 1.4560
Punto de ebullición a 560 mm de Hg	229°C	231 °C	No se encuentra reportado
Residuo de evaporación	1.2%	1.33%	No se encuentra reportado
Acidez libre	3.2	3.5	No se encuentra reportado
Indice de ésteres antes de acetilación	18.5	17.8	12 a 60
Indice de ésteres después de acetilación	252.3	243.6	230 a 292

TABLA II
SOLUBILIDAD DEL ACEITE ESENCIAL
DE EUCALYPTUS CITRIODORA

Solvente	Aceite 1	Aceite 2
Agua	insoluble	insoluble
Disulfuro de carbono	soluble	soluble
Cloroformo	soluble	soluble
Bisulfito de sodio	soluble*	soluble*
Etanol 50%	insoluble	insoluble
Etanol 60%	insoluble	insoluble
Etanol 65%	insoluble	insoluble
Etanol 70%	insoluble	insoluble
Etanol 75%	soluble en 2,9 vol	soluble en 3.0 vol.
Etanol 80%	soluble en 1.4 vol.	soluble en 1.6 vol.
Etanol 90%	soluble en 0.6 vol.	soluble en 0.7 vol.
Etanol 95%	soluble en 0.1 vol.	soluble en 0.2 vol.

* Solubilidad después de 10 minutos de calentamiento.

Los valores encontrados se ajustan a las especificaciones dadas en la literatura para este aceite (27, 29, 42).

La solubilidad en disulfuro de carbono y en cloroformo indican ausencia de humedad en las muestras.

3. Análisis preliminar del aceite

3.1. Cromatografía en capa fina.

De acuerdo con lo observado al emplear diferentes condiciones en cuanto a concentración de las muestras, sistemas de solventes y reveladores, las mejores condiciones fueron las siguientes:

Concentración: 3 microlitros de una dilución al 50% del aceite esencial en propanona (R.A.)

Reveladores: 1: 2, 4 Dinitrofenilhidrazina característico para compuestos carbonílicos. Con este revelador se observaron 3 compuestos, uno de los cuales está en gran proporción; 2: Acido fosfomolibdico; 3: Anisaldehído- ácido sulfúrico; 6: Pentacloruro de Antimonio; 8: Vainilla- ácido sulfúrico.

De acuerdo a la intensidad y al tamaño de las manchas observadas con los reveladores anteriores, se pudo apreciar la presencia de por lo menos 9 compuestos, 2 de ellos están en una proporción muy superior a los demás.

3.2. Espectroscopía al infrarrojo

Los espectros de absorción molecular al IR de las dos muestras se compararon con los datos reportados por la literatura (42, 43) para este aceite esencial; se apreció gran concordancia entre los valores encontrados y los reportados.

3.3. Los espectros de absorción molecular al ultra violeta para las muestras No. 1 y No. 2 presentaron dos bandas de absorción a 220 y 236,5 nm.

Analizando y asociando los datos obtenidos en 3.1, 3.2. y 3.3. del capítulo de resultados y discusión de resultados se llegó a la conclusión de que los aceites tienen en su composición compuestos carbonílicos, fenoles, terpenos y sesquiterpenos.

4. Identificación, aislamiento y valoración de los principales componentes del aceite.

4.1. Cromatografía en capa fina

La tabla III resume los resultados obtenidos en este ensayo.

TABLA III
VALORES R_f* DE LOS DIFERENTES COMPONENTES DEL
ACEITE ESENCIAL DE EUCALYPTUS CITRIODORA
Y DE ALGUNOS PATRONES

Revelador	Muestra	Compuesto No.						
		1	2	3	4	5	6	7
1	Citronelal	90						
	Citral	79						
8	Aceite 1	90	80	53				
	Aceite 2	90						
	Citronelol	43						
	Terpineol	41						
	Geraniol	50						
	Aceite 1	90	68	57	50	38	10	6
	Aceite 2	90	67	58	50	37	10	6

Adsorbente: Silica Gel G;
Solvente: benceno- Acetato de Etilo 85:15; *R_f x 100

4.2. Cromatografía funcional en capa fina

La cromatografía funcional ensayada para la separación adecuada de citronelal y citral mostró un resultado igual al obtenido por cromatografía en capa fina.

4.3. Cromatografía bidimensional en capa fina

De los sistemas de solventes ensayados los que mostraron una separación bien definida del citral y del citronelal fueron: Benceno-Acetato de Etilo: 85:15 para el primer recorrido y Benceno para el segundo recorrido. Los R_f obtenidos figuran en la tabla IV.

TABLA IV
VALORES R_f* PARA CITRONELAL CITRAL Y ACEITE ESENCIAL
DE EUCALYPTUS CITRIODORA POR
CROMATOGRAFIA BIDIMENSIONAL

Revelador	Muestra	Compuesto No.					
		1		2		3	
		1o. re- corrido	2o. re- corrido	1o. re- corrido	2o. re- corrido	1o. re- corrido	2o. re- corrido
1	Citronelal	90	81				
	Citral	80	58				
	Aceite 1	90	82	80	58	54	6
	Aceite 2	90	80	89	43	89	6

Adsorbente: Sílica Gel G.; *R_f x 100

Teniendo en cuenta el tamaño e intensidad de las manchas obtenidas se pudo observar que el citral está presente en el aceite en cantidades muy bajas.

4.4. Aislamiento de Citronelal y de Geraniol

Los compuestos aislados por cromatografía preparativa y los patrones de comparación usados y tratados en las mismas condiciones presentaron las propiedades reportadas en la tabla V.

<p style="text-align: center;">TABLA V PROPIEDADES DE LOS COMPUESTOS AISLADOS DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALYPTUSCITRIODORA, DEL CITRONELAL Y DEL GERANIOL</p>						
Muestra	Compuesto aislado	Rf* cromatografía capa fina	Indice de refracción a 20°C	Tiempo de retención cromat. fase gaseosa (minutos)	Rf. cromatografía bidimensional	
					1o. recorrido	2o. recorrido
Aceite 1	1	89	1.4499	1.3	90.3	81.5
Aceite 1	2	50	1.4690	2.5	—	—
Aceite 2	1	89	1.4498	1.3	90.6	81.8
Aceite 2	2	50	1.4691	2.5	—	—
Citronelal		90	1.4499	1.3	90.5	81.8
Geraniol		50	1.4692	2.5	—	—

* Rf x 100

La cromatografía bidimensional se le hizo solamente al compuesto aislado No. 2 (citronelal) con el fin de comprobar la ausencia de citral.

El espectro al infrarrojo de los compuestos aislados es igual al obtenido a partir de los patrones de citronelal y de geraniol.

El espectro al ultravioleta de los patrones de citronelal (λ 222,5 y 242,5 nm) y geraniol (λ 205 nm) coinciden exactamente con los compuestos aislados.

Los tiempos de retención de estos compuestos en los aceites 1 y 2 son exactamente iguales a los de la mezcla de los patrones de citronelal y geraniol (Fig. 1, 2, 3).

Los ensayos cromatográficos en capa fina realizados a los compuestos aislados y a los patrones presentaron los siguientes resultados:

a) La cromatografía de una mezcla 1:1 de citronelal aislado y citronelal patrón presentó una sola mancha de Rf 90.0; la realizada simultáneamente con citronelal patrón y el citronelal aislado mostró en cada caso una sola mancha con un Rf de 90.0

b) La cromatografía hecha a la mezcla 1:1 de geraniol patrón y geraniol aislado presentó una mancha de Rf 50.0; la realizada simultáneamente al geraniol patrón y geraniol aislado mostró cada cual una mancha con un Rf de 50.0

De acuerdo a los resultados obtenidos se considera que los dos componentes principales del aceite son citronelal y geraniol.

4.5. Valoración de citronelal y de geraniol

4.5.1. Valoración de citronelal

Método espectrofotométrico al UV

Cromatografía en fase gaseosa.

Los resultados de la valoración de citronelal por el método espectrofotométrico y por cromatografía en fase gaseosa se aprecian en la tabla VI.

TABLA VI PORCENTAJE DE CITRONELAL EN EL ACEITE ESENCIAL DE EUCALYPTUS CITRIODORA		
Método	Porcentaje de citronelal Aceite 1	Porcentaje de citronelal Aceite 2
Espectrofotométrico	65.5	56.5
Cromatografía en fase gaseosa	70.0	60.0

4.5.2. Valoración de Geraniol

Método espectrofotométrico al UV

Cromatografía en fase gaseosa

Los resultados obtenidos en la valoración de geraniol por espectrofotometría al ultravioleta, y por cromatografía en fase gaseosa se pueden observar en la tabla VII.

TABLA VII PORCENTAJE DE GERANIOL EN EL ACEITE ESENCIAL DE EUCALYPTUS CITRIODORA		
Método	Porcentaje de geraniol Aceite 1	Porcentaje de geraniol Aceite 2
Espectrofotométrico	11.0	13.5
Cromatografía en fase gaseosa	12.0	14.0

Las diferencias encontradas entre los resultados obtenidos con los dos métodos empleados tanto para la valoración de citronelal como para la de geraniol, se podrían deber en primer lugar a que el método espectrofotométrico aplicado es precedido de una separación cromatográfica en capa fina y posterior elución y en segundo término a que la cromatografía en fase gaseosa es un método mucho más sensible y específico para sustancias volátiles.

5. Estudio general de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Eucalyptus citriodora*.

5.1. Método bioautográfico

En los ensayos realizados se encontraron zonas de inhibición que indican la actividad antimicrobiana de algunos de los componentes del aceite.

Para obtener resultados reproducibles se controlaron los siguientes parámetros:

Concentración del aceite, población microbiana, espesor de la capa de sílica, tamaño de la cromatoplaque, residuos del solvente, condiciones de humedad durante el crecimiento del microorganismo y tiempo de incubación del microorganismo.

Estos parámetros deben definirse para cada germen y para cada especie vegetal a ensayar.

5.2. Método de difusión en gel

Los resultados encontrados por este método se resumen en la tabla VIII.

<p style="text-align: center;">TABLA VIII ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALYPTUS CITRIODORA POR EL METODO DE DIFUSION EN GEL</p>						
Microorganismo	Zonas de inhibición					
	Aceite: 100%		Aceite: 75%		Aceite: 50%	
	Aceite 1	Aceite 2	Aceite 1	Aceite 2	Aceite 1	Aceite 2
Staphylococcus albus	+	+	+	+	+	+
Staphylococcus aureus	+	+	+	+	+	+
Escherichia coli	+	+	+	+	+	+
Proteus vulgaris	+	+	+	+	+	+

Se hace notar que al afirmar la presencia de zonas de inhibición, se está haciendo referencia a cualquier tamaño o intensidad de inhibición observada en el ensayo, respecto a los controles de crecimiento que se tenían.

5.3. Métodos de difusión en placa colocando discos de papel de filtro impregnados con las muestras en estudio.

En la tabla IX se observan los resultados obtenidos en este ensayo.

TABLA IX		
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE EUCALYPTUS CITRIODORA POR EL METODO DE DIFUSION EN PLACA		
Microorganismo	Zonas de inhibición	
	Aceite 1	Aceite 2
Staphylococcus albus	+	+
Staphylococcus aureus	+	+
Escherichia coli	+	+
Proteus vulgaris	+	+

Como en el caso anterior, la afirmación comprende únicamente la presencia o no de zonas de inhibición.

Como se puede observar, no hay diferencia entre los resultados obtenidos con los diferentes métodos. La inhibición de crecimiento en estos ensayos, nos indican que las muestras en estudio sí poseen actividad antimicrobiana, la cual sería interesante estudiar con mayor detalle.

Por la intensidad de la inhibición que presentó el aceite sobre los diferentes microorganismos se puede establecer cualitativamente que el orden de sensibilidad, de mayor a menor, de los microorganismos ensayados al aceite es el siguiente:

Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Staphylococcus albus, Proteus vulgaris.

IV. CONCLUSIONES

Después de analizar las propiedades y la composición de las dos muestras de aceite esencial de **Eucalyptus citriodora** Bailey, no se encontró una marcada diferencia a pesar de tener distinta procedencia.

La composición encontrada indica que el compuesto que está en mayor cantidad es el citronelal, el cual le proporciona la fragancia característica.

Por la calidad, por sus propiedades antimicrobianas y el uso industrial que se le puede dar al aceite esencial de **Eucalyptus citriodora** Bailey, su cultivo y explotación a nivel industrial es una buena perspectiva para el país.

RESUMEN

Se estudiaron desde el punto de vista fitoquímico y microbiológico dos muestras de aceite esencial de **Eucalyptus citriodora** Bailey, procedentes de dos regiones diferentes de Colombia.

Para el aislamiento, identificación y cuantificación de citronelal y de geraniol, se empleó la cromatografía en capa fina, funcional, en fase gaseosa, espectrofotometría al ultravioleta y al infrarrojo.

Al aceite completo se le hicieron pruebas preliminares para evidenciar su posible actividad antimicrobiana, empleando diferentes métodos, pudiéndose observar un efecto inhibitorio por parte de las dos muestras estudiadas frente a: **Staphylococcus aureus**, **Escherichia coli**, **Staphylococcus albus** y **Proteus vulgaris**.

SUMMARY

Phytochemical and microbiological studies of two samples of the essential oil of **Eucalyptus citriodora** Bailey, from two different Colombian regions were achieved.

Citronellal and geraniol were isolated from the essential oil and further identified and quantified by means of thin layer, functional and gas chromatography along with infra-red and ultraviolet spectroscopy.

Different methods were used in order to prove the antimicrobial activity of the oil. The two samples which were assayed, showed activity against **Staphylococcus aureus**, **Escherichia coli**, **Staphylococcus albus** and **Proteus vulgaris**.

BIBLIOGRAFIA

1. De Miguel, J., Manual práctico para la fabricación de Perfumes, Glen, Buenos Aires, 88, 1944.
2. Bedoukian, S., Perfumery, Sintethics and Isolaty, Van Nostrand C°, N.Y., 431, 1951.
3. Shreve, N., Chemical Process Industries, Mac Graw Hill Book C°, N.Y., 573, 1956.
4. Poucher, W., Perfums Cosmetics and Soaps, Van Nostrand C°, N.Y., 44, 1941.
5. Calderon, E., Conferencias de Farmacia Química, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 343, 1959.
6. Braverman, J., Los Agrios y sus Derivados, Aguilar S.A., Madrid, 220, 1952.
7. Jones, A., Wood, W., Preparation of Pure Geraniol, Ind. Eng. Chem., 34, 488, 1942.
8. Berl, E., D'ans, J., Métodos de Análisis Químico Industrial, Labor S.A. Barcelona, 1961.
9. Naves; Masuyer, Les Perfums Naturelles, Gautier Villards, Paris, 50, 1939.
10. Guenther, E., The Essential Oils, Van Nostrand C°, N.Y., I, 87, 1949.
11. Young, S., Distillation Principles and Processes, Mac Millan & C°, London, 460, 1922.
12. Guenther, E., The Essential Oils, Van Nostrand C°, N.Y., I, 120, 1949.
13. Ibid, 236, 1949.
14. Ibid, 245, 1949.
15. Ibid, 253, 1949.
16. The United States Pharmacopeia, rev. XVIII, 1970.
17. The National Formulary, XIII, 1970.
18. The British Pharmacopeia, 1968.

19. Guenther, E., *The Essential Oils*, Van Nostrand C°, N.Y., I, 250, 1949.
20. *Ibid*, 259, 1949.
21. *Ibid*, 263, 1949.
22. *Ibid*, 267, 1949.
23. Randerath, K., *Cromatografía de capa fina*, Ediciones Urmo S.A., Bilbao, 3, 1970.
24. Penfold, W., *The Eucalyptus*, Leonard Hill Books Limited, London, 35, 1961.
25. Proenca da Cunha, A., Campos, M., *Análise do Oleo Essencial de Eucalyptus citriodora de Angola*, Bol. Fac. Farm., Univ. Coimbra, 29, 38, 1969.
26. García M., Hidalgo, A., y col, *Dosage Spectrophotométrique dans L'infrarouge du Cineol, du p-Cymene et de 1, α - pinéne dans les huiles essentielles de diverses especes d'Eucalyptus cultivées en Espagne; identification d'autres composants*, Parfum., Cosmet., Savons, 12, 26, 1969.
27. Baslas, K., Baslas R., *Chemical Examination of Essential Oils from some Exotics Plants Raised in Kumaon, Indian Parfum*, 11, 13, 1967.
28. Talalaj. S., *Essential Oil of Eucalyptus citriodora grown in Ghana*, African Pharmacist, 8, 117, 1966.
29. Randerath, K., *Cromatografía de capa fina*, Ediciones Urmo S.A. Bilbao, 207, 1970.
30. Sthal, E., Bolliger, H.R. y col., *Thin Layer Chromatography*, Academic Press Inc, Publishers, N.Y., 485- 502, 1965.
31. Mathis, C., *Application de la Chromatographie Fonctionale sur couche mince a L'identification des substances Organiques*, Annales Pharmaceutiques Francaises, 23, 331, 1965.
32. Guenther, E., *The Essential Oils*, Van Nostrand C°, N.Y., I, 279, 1949.
33. *Ibid*, 283, 1949.
34. *Ibid*, 285, 1949.
- Ibid*, 275, 1949.

35. Meyers, E.; Smith, D.A., Bioautography of Antibiotic Spread-Layer Chromatograph, *Journal Chromatography*, 14, 129, 1964.
36. Jain, S.R., Kar, A., The Antibacterial Activity of Some Essential Oils and their Combinations, *Planta Médica*, 20, 118, 1971.
37. Jain, S.R.; Jain, M.R., Antifungal Studies on some Indigenous Volatile Oils and other Combinations, *Planta Médica*, 22, 136, 1972.
38. Jains, S.R., Jain, M.R. Effect of some Common Essential Oils on Pathogenic Fungi, *Planta Médica*, 24, 127, 1973.
39. Vanhaelen, R.; Fastré, Constitution et Propietes Antibacteriennes de L'huile Essentielle de Cnicus benedictus, *Planta Médica* 24, 165, 1973.
40. Stevens, K.L.; Jurd, L. y col The Antimicrobial Activity of Citral, *Experientia* 15, 600, 1971.
41. Low, D., Rawal, B.D. y col, Antibacterial action of the Essential Oils of some Australian Myrtaceae with special references to the activity of chromatographic fractions of Oil of *Eucalyptus citriodora*, *Planta Médica*, 26, 184, 1974.
42. Guenther, E., *The Essential Oils*, Van Nostrand Co, N.Y., IV, 472, 1949.
43. Bauer, L. De Assis, G., O Oleo Essencial de *Eucalyptus citriodora* Hooker do Rio Grande do Sul, *Revista Brasileira de Farmacia*, 6, 283, 1971.