



UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

MAESTRIA EN BIOMEDICINA

Trabajo de Fin de Maestría titulado:

Evaluación del efecto leishmanicida de aceites esenciales de *Cistus ladaniferus*, *Peperomia inaequalifolia* y *Tagetes minuta* en *Leishmania infantum* y *Leishmania mexicana* por medio de análisis *in vitro* e *in silico*

Realizado por:

DAYANARA ALEJANDRA DELGADO LÓPEZ

Director de tesis:

LINO ARISQUETA

Como requisito para la obtención del título de:

MASTER EN BIOMEDICINA

Quito, 23 de agosto de 2022

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, DAYANARA ALEJANDRA DELGADO LÓPEZ, con cédula de identidad Nro. 0105954861, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado a calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.



Dayanara Alejandra Delgado López

0105954861

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

“EVALUACION DEL EFECTO LEISHMANICIDA DE ACEITES ESENCIALES DE *CISTUS LADANIFERUS*, *PEPEROMIA INAEQUALIFOLIA* Y *TAGETES MINUTA* EN *L. INFANTUM* Y *L. MEXICANA* POR MEDIO DE ANALISIS *IN VITRO* E *IN SILICO*”

Realizado por:

DAYANARA ALEJANDRA DELGADO LÓPEZ

Como requisito para la obtención del título de:

MÁSTER EN BIOMEDICINA

Dirigido por el profesor:

LINO ARISQUETA HERRANZ, PhD



Quien considera que constituye un trabajo original de su autor

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

Andrés López

Jaime Gía

Después de revisar el trabajo presentado,

lo han calificado como apto para su defensa oral ante el tribunal examinador



Andrés López



Jaime Gía

Quito, 23 de agosto de 2022

DEDICATORIA

El presente trabajo lo dedico:

A mi familia, por brindarme todo su amor, apoyo y comprensión en esta increíble etapa universitaria.

A mis amigos y profesores de la maestría en Biomedicina por hacer este tiempo más llevadero y ameno.

Al Dr. Lino por toda la paciencia, apoyo y guía para el desarrollo de esta investigación.

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer a mi familia, compañeros, amigos, profesores y tutores de la maestría en Biomedicina de la UISEK, por brindarme todo su apoyo y orientación para poder culminar este proyecto de investigación.

To be submitted:

Para ser enviado:

“Evaluación del efecto leishmanicida de aceites esenciales de *Cistus ladaniferus*, *Peperomia inaequalifolia* y *Tagetes minuta* en *L. infantum* y *L. mexicana* por medio de análisis *in vitro* e *in silico*”

Dayanara Delgado¹, Lino Arisqueta¹

¹Universidad Internacional SEK, Maestría en Biomedicina, Facultad de Ciencias de la Salud,

Quito, Ecuador

23 de agosto del 2022

***Autor de correspondencia:** Lino Arisqueta, PhD.

Universidad Internacional SEK, Facultad de Ciencias de la Salud, Quito, Ecuador.

Teléfono: 0983104230; email: lino.arisqueta@uisek.edu.ec

Título corto

Running title: Efecto leishmanicida de aceites esenciales en *L. infantum* y *L. mexicana*.

Resumen:

La leishmaniasis es una enfermedad zoonótica que afecta a una población vulnerable económica y socialmente. Su transmisión se da principalmente por la picadura de un flebótomo hembra que causa alteraciones en la piel (leishmaniasis cutánea), mucosa (leishmaniasis mucocutánea) y vísceras (leishmaniasis visceral). Existen medicamentos para esta enfermedad, sin embargo presentan varios efectos secundarios. *Cistus ladaniferus*, *Peperomia inaequalifolia* y *Tagetes minuta* son plantas endémicas del Ecuador, que usualmente son usadas en la región amazónica del país. Con el propósito de encontrar nuevos tratamientos para esta enfermedad, se estudiaron los efectos de los tres aceites esenciales sobre *Leishmania mexicana* y *Leishmania infantum*. Por lo tanto el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto leishmanicida de estos aceites esenciales en *L. infantum* y *L. mexicana*, mediante ensayos *in vitro*.

Para ensayos de viabilidad, se determinó la concentración inhibitoria (IC₅₀) de los aceites esenciales en promastigotes de *L. mexicana* y *L. infantum* por medio del ensayo colorimétrico MTT.

Los resultados mostraron que los aceites esenciales de *C. ladaniferus*, *P. inaequalifolia* y *T. minuta* presentan un efecto inhibitorio sobre *L. mexicana* (IC₅₀ = 13.87 µg/mL, 29.58 µg/mL y 20.23 µg/mL) respectivamente. Mientras que para *L. infantum* los efectos inhibitorios son (IC₅₀ = 13.46 µg/mL, 20.17 µg/mL y 29.25 µg/mL) para los mismos aceites esenciales.

En conclusión, los aceites esenciales de las tres plantas endémicas inhiben el crecimiento de promastigotes de *L. mexicana* y *L. infantum* en análisis *in vitro* e *in silico*

Palabras clave: aceites esenciales, leishmaniasis, IC₅₀, apoptosis.

Abstract

Leishmaniasis is a zoonotic disease that affects an economically and socially vulnerable population. Its transmission occurs mainly through the bite of a female sandfly that causes alterations in the skin (cutaneous leishmaniasis), mucosa (mucocutaneous leishmaniasis) and viscera (visceral leishmaniasis). There are several medications for this disease, however they have side effects. *Cistus ladanifer*, *Peperomia inaequalifolia* and *Tagetes minuta* are endemic plants of Ecuador, which are normally used in the Amazon region of the country. In order to find new treatments for this disease, the effects of the three essential oils on *Leishmania mexicana* and *Leishmania infantum* will be studied. Therefore, the goal of this study was to determine the leishmanicidal effect of these essential oils in *L. infantum* and *L. mexicana*, through *in vitro* tests.

For viability tests, the inhibitory concentration (IC_{50}) of the essential oils in promastigotes of *L. mexicana* and *L. infantum* will be determined through MTT colorimetric assay.

The results showed that the essential oils of *C. ladaniferus*, *P. inaequalifolia* and *T. minuta* have an inhibitory effect on *L. mexicana* ($IC_{50} = 13.87 \mu\text{g/mL}$, $29.58 \mu\text{g/mL}$ and $20.23 \mu\text{g/mL}$), respectively. While for *L. infantum* the inhibitory effects are ($IC_{50} = 13.46 \mu\text{g/mL}$, $20.17 \mu\text{g/mL}$ and $29.25 \mu\text{g/mL}$) for the same essential oils.

In conclusion, the essential oils of the three endemic plants inhibit the growth of promastigotes of *L. mexicana* and *L. infantum* in *in vitro* and *in silico* analyses.

Keywords: essential oils, leishmaniasis, IC_{50} , apoptosis.

1. INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es considerada en la actualidad como una enfermedad desatendida. Estas enfermedades son un conglomerado de enfermedades infecciosas que se encuentran principalmente en las comunidades pobres y vulnerables del mundo (1). Se estima que aproximadamente mil millones de personas padecen alguna de estas enfermedades y, millones más, están en riesgo de contraerlas (2,3).

La leishmaniasis es causada por el parásito *Leishmania*, perteneciente a la familia Trypanosomatidae, orden Kinetoplastida y género *Leishmania* (4,5). Esta enfermedad se transmite por la picadura de un flebótomo hembra perteneciente al género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo, y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo (6–8). En el continente americano, estas enfermedades son zoonóticas, con tres ciclos de transmisión distintos: selvático, domestico urbano y domestico rural.

El ciclo de vida depende del parásito y de las condiciones adecuadas para su desarrollo. Estos presentan distintas morfologías celulares: promastigotes que se caracterizan por un flagelo móvil y forma alargada; mientras que la forma amastigote tiene un flagelo inmóvil y estructura celular más pequeña (9). La forma infecciosa del parásito es promastigote, que contagia al mamífero mediante picaduras del insecto previamente infectado (5,8,10).

En zonas donde los mosquitos vectores son endémicos, es imperativo luchar contra el vector ya sea mediante el uso de insecticidas, ropa protectora y el uso de toldos al momento de dormir (10,11). Los reservorios vertebrados naturales implicados en el ciclo de transmisión de las leishmaniasis son los perros (*Canis familiaris*), zarigüeyas (*Didelphis marsupialis*), osos perezosos (*Choloepus spp*), y roedores (4).

Esta enfermedad presenta tres tipos clínicos conocidos como: leishmaniasis cutánea (LC), leishmaniasis mucocutánea (LMC) y leishmaniasis visceral (LV). La LC presenta lesiones crónicas en la piel que normalmente sanan por si solas y tienden a desfigurar a las personas que

la padecen (6,10,12) y es causada por *Leishmania mexicana* y *Leishmania infantum* (11,13). La LMC se da principalmente por la diseminación de la picadura de la zona cutánea a los vasos linfáticos por medio de la sangre. Causa destrucción de las cavidades oro-nasales y faríngeas, y está asociada a *L. infantum* (10–12). La LV es el tipo más severo de leishmaniasis y se da cuando los parásitos de *Leishmania* se diseminan y localizan en las vísceras y, al no estar tratadas, representa el 95% de casos fatales (10–12). La especie causante de LV es *L. infantum* (8,14,15).

Según la literatura, la LC y LM son endémicas de Ecuador con un total de 144, 92, 86 y 85 casos en las provincias de Pichincha, Morona Santiago, Esmeraldas y Santo Domingo respectivamente (7,16). Las 5 provincias con la tasa de leishmaniasis por 10000 habitantes más altas corresponden al oriente ecuatoriano: Morona Santiago, Pastaza, Napo, Orellana y Sucumbíos con 4.784, 3.505, 2.901, 2.508 y 2.484 casos respectivamente (16).

El diagnóstico de laboratorio de los tipos de leishmaniasis es diverso y su utilidad varía de acuerdo a la forma clínica que presenta. Existen exámenes microscópicos y parasitológicos específicos que son obtenidos de raspados, biopsias y aspirados que sirven para diagnosticar los tres tipos de leishmaniasis. Sin embargo, la sensibilidad es aproximadamente 40%. Para LV se utiliza la detección de anticuerpos ELISA, ya que presenta una especificidad alta del 96% y sensibilidad del 87% en zonas endémicas. Por último, para el diagnóstico de los tres tipos de leishmaniasis se puede realizar una técnica de biología molecular, reacción en cadena de la polimerasa PCR que presenta una especificidad y sensibilidad alta, sin embargo, su costo es alto por lo que no es el primer método de diagnóstico de los países en vía de desarrollo (5,11,17).

Los tratamientos existentes varían dependiendo el tipo clínico, especie de *Leishmania* asociada a la enfermedad, ubicación de las lesiones, posición geográfica, medicamentos disponibles y estado de salud del paciente. La medicación de preferencia para tratar LC y LMC son los antimoniales pentavalentes. Existen también otras opciones disponibles como anfotericina B liposomal, anfotericina B y miltefosina (8).

Sin embargo, estos medicamentos presentan ciertos efectos secundarios como: dolor de cabeza, tos, vomito, dolor general y pérdida de apetito (10,18). Por otro lado, el uso prolongado de estos tratamientos puede provocar daño renal, depresión en la medula ósea y resistencia (10,19). Además de contar con un costo alto de adquisición y promedio de curación de apenas el 50% (8,16,20).

Tradicionalmente se han utilizado productos naturales o extractos de plantas para el desarrollo de medicamentos en aproximadamente 80% del mundo (21,22). En el país existen más de 5 600 especies de plantas endémicas colocando al Ecuador en el quinto país con mayor diversidad de América (23,24).

Cistus ladaniferus pertenece a la familia Cistaceae y genero *Cistus*. Es una planta conocida como jara del ládano o solamente jara, (23) y ha sido utilizada mayormente como tratamiento natural ya que presenta efectos antiinflamatorios, antibióticos, antiparasitarios, antimicrobianos y ayuda a disminuir los niveles de colesterol, triglicéridos y glucosa (25–28).

Peperomia inaequalifolia es parte de la familia Piperaceae con alrededor de 111 especies endémicas que han sido de uso frecuente por comunidades ancestrales como remedios tradicionales. Esta planta es conocida como congona o canelón, y según la literatura, presenta efectos sedantes, analgésicos, antiparasitarios, antibacterianos, sirve para tratar el dolor de oído, gingivitis, migraña y esterilidad (23,25,28,29).

Tagetes minuta corresponde a la familia Asteraceae con alrededor de 361 especies endémicas. Esta hierba aromática es conocida como huacatay o menta negra, y ha sido usada en el ámbito medicinal en las áreas rurales de América del Sur donde se elaboran bebidas y tes a partir de ellas (23,24). Según la literatura, a su aceite esencial se le atribuyen propiedades antimicrobianas, digestivas, antiabortivas, insecticidas y sirve para aliviar dolores estomacales más bronquitis (30–32).

En base a todo lo expuesto anteriormente, surge el interés de buscar alternativas terapéuticas para aliviar esta enfermedad mediante el uso de extractos de tres aceites esenciales obtenidos de plantas endémicas de Ecuador. Por lo tanto, esta investigación analizó el efecto citotóxico de 3 extractos de aceites esenciales de plantas endémicas de Ecuador (*C. ladaniferus*, *P. inaequalifolia*, y *T. minuta*) sobre promastigotes de *L. infantum* y *L. mexicana*.

Los extractos de *C. ladaniferus*, *P. inaequalifolia* y *T. minuta* fueron analizados previamente mediante cromatografía de gases, obteniendo su composición. Además, se evaluó su efecto citotóxico mediante ensayo MTT y análisis microscópico obteniendo la IC₅₀ para cada uno de los extractos. A partir de los datos obtenidos, se realizó un análisis bioinformático del aceite esencial con valores más altos de inhibición para predecir posibles dianas moleculares relacionadas con la viabilidad de estas dos especies de *Leishmania*.

HIPÓTESIS

Los aceites esenciales de *Cistus ladaniferus*, *Peperomia inaequalifolia* y *Tagetes minuta* presentan actividades leishmanicidas en un rango de concentración terapéutico.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el potencial efecto leishmanicida de aceites esenciales de *Cistus ladaniferus*, *Peperomia inaequalifolia* y *Tagetes minuta* sobre *Leishmania mexicana* y *Leishmania infantum* mediante ensayos *in vitro* e *in silico*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener aceites esenciales de composición definida con actividad leishmanicida por arrastre de vapor.

- Analizar la potencia y la eficacia leishmanicida de los aceites esenciales sobre *L. mexicana* y *L. infantum* mediante ensayo MTT.
- Identificar posibles dianas moleculares que interactúan con los compuestos bioactivos del aceite esencial con mayor potencia y eficacia leishmanicida, mediante herramienta de predicción ligando-proteínas.
- A partir de las dianas predichas, identificar las rutas metabólicas o vías de señalización implicadas en la apoptosis o muerte celular programada mediante análisis de enriquecimiento.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

Los materiales, reactivos y equipos fueron suministrados por el laboratorio de investigación de la Universidad Internacional SEK (UISEK): **Tablas 1,2.**

Tabla 1. Reactivos

Nombre	Fórmula	Casa Comercial
Cultivo: Medio de cultivo de insectos Schneider's Drosophila		Sigma Aldrich, S9895
Hidróxido de sodio 100%	(NaOH)	Merck
Ácido clorhídrico 1%	(HCL)	Merck
Cloruro de sodio 10%	(NaCL)	J. T. Baker
Bicarbonato de sodio 99.7%	(NaHCO ₃)	--
Cloruro de calcio dihidratado 99%	(CaCl ₂ -2H ₂ O)	--
Dimetilsulfóxido (DMSO) 99.9%	((CH ₃) ₂ SO)	--
Suero fetal bovino inactivado		Eurobio scientific
Anfotericina B		Sigma-Aldrich (A2942)
Penicilina / Estreptomicina		--
MTT		Sigma-Aldrich

Azul de tripán	--
SDS-HCL	--

Tabla 2. Equipos

Equipo	Modelo	Marca
Cabina de flujo laminar	Miniflow 120	Instrulab Q
Incubadora 26°C	--	Memmert
Agitador magnético	--	--
Autoclave	25X-1	All American
Balanza analítica	BAS31PLUS	Boeco
PHmetro	ORION STAR A111	ThermoScientific
Bomba al vacío	R-300	BOECO
Microscopio binocular	CX-21	Olympus
Centrífuga	XC-2450	Premiere
Lector de microplacas	Multiskan Sky / Go	ThermoScientific
Refrigeradora	2015KLXB	Durex

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Material vegetal y aceite esencial

Los aceites esenciales de las especies *C. ladaniferus*, *P. inaequalifolia* y *T. minuta* fueron proporcionadas por la empresa Aromavida S.A. ubicada en Guayllabamba, en el norte Quito-Pichincha-Ecuador.

La cosecha de los tallos y flores de la especie vegetal *T. minuta* y cosecha de hojas de *C. ladaniferus* y *P. inaequalifolia* se realizaron en el campo de las instalaciones de Aromavida. Se realizó un proceso de selección del material vegetal en estado fresco, que consistió en eliminar las impurezas como tierra e insectos, dejándolo apto para la extracción del aceite esencial.

2.2.1.1. Determinación de la humedad

Para determinar la humedad del material vegetal se empleó un Analizador de Humedad marca Boeco BMAI50. El equipo definió el peso exacto de la muestra del material vegetal que fue colocada en el plato, sometió la muestra a altas temperaturas y comprobó constantemente la pérdida de su masa. Los datos que arrojó el equipo corresponden al contenido de humedad de la muestra analizada.

2.2.1.2. Obtención de los aceites esenciales

La extracción de los aceites esenciales se llevó a cabo empleando un equipo de destilación. Se colocó agua en el tanque de cocción, que contenía una malla perforada sobre la cual se ubicó el material vegetal, a este método se le denomina destilación por arrastre de vapor de agua. El vapor atravesó el material vegetal, rompiendo las células oleíferas de las plantas y permitiendo así la volatilización de los componentes del aceite esencial hacia el serpentín del condensador, para posteriormente recolectar el condensado en un embudo de separación (33).

El proceso de destilación se realizó por aproximadamente tres horas, al finalizar este período el aceite esencial se separó del agua por decantación.

2.2.1.3. Rendimiento

Para calcular el porcentaje del rendimiento del aceite esencial, se correlacionó el volumen de aceite esencial obtenido en la destilación con la cantidad de materia vegetal procesada.

Cálculo:

$$\%R = \frac{V (mL)}{P (g)} * 100$$

Dónde:

% R: porcentaje de rendimiento;

V: volumen del aceite esencial extraído (mL);

P: peso de la materia vegetal antes del proceso de destilación(g).

2.2.1.4. Densidad relativa

La densidad relativa del aceite esencial se determinó empleando la norma AFNOR NF T75-111 (ISO 279:1998).

Se procedió a pesar un picnómetro vacío en una balanza analítica, en segundo lugar se pesó el picnómetro conteniendo agua destilada a 20°C, por último se realizó el mismo procedimiento con el aceite esencial en lugar del agua destilada. Con los valores resultantes se puede calcular la media y la desviación estándar de las muestras de los aceites esenciales.

Cálculos:

$$d = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

Dónde:

d: densidad relativa a 20 °C, referido al agua a 20 °C;

m₀: masa en gramos del picnómetro vacío;

m₁: masa en gramos del picnómetro con agua;

m₂: masa en gramos del picnómetro con aceite esencial.

2.2.1.5. Índice de refracción

El índice de refracción se realizó según la norma AFNOR NF T 75-112 (ISO 280: 1998): Para ello se empleó un refractómetro de mano, marca BOECO 32195. Primero se llevó a cabo la calibración del instrumento, constatando el valor del índice de refracción del agua destilada (1,3330). Después se colocó una gota de aceite esencial y se efectuó la lectura correspondiente. Todo el procedimiento se llevó a cabo a 20°C.

2.2.2. Determinación de la composición química del aceite esencial por Cromatografía de gases

Este análisis se realizó en los Laboratorios Sarl Pyrenessences Analysis (Belcaire, Francia). La identificación cualitativa y cuantitativa de los compuestos de los aceites esenciales se llevó a cabo empleando un cromatógrafo de gases Agilent serie 7890, acoplado a un espectrómetro de masas Agilent serie 5973 (GC/MS).

Por otro lado, también se realizó una identificación cuantitativa de los compuestos de los aceites esenciales empleando un detector de ionización de llama Agilent serie 6890 (GC/FID).

En ambos casos se utilizó la columna de polietilenglicol de alta polaridad, VF WAX (60 m × 0,25 mm × 0,25 µm). Las condiciones con las que se operó el programa de temperatura del horno del equipo fueron de 60 °C durante 5 min, con una rampa de 2 °C/min hasta aumentar a 250 °C y se mantuvo a 250 °C durante 15 minutos.

2.2.2.1. Preparación de la muestra

En el cromatógrafo de gases se inyectó 1 µl de una solución de aceite esencial al 10% en hexano. Para contrastar los datos de retención en la cromatografía de gases, se emplearon hidrocarburos (alcanos de C8 a C29).

Se utilizó un sistema de inyección modo split con un ratio de partición para aceite de 1:25 y ratio de partición de hidrocarburos 1:1. La temperatura de la inyección en el cromatógrafo fue de 250 °C y se empleó el He como gas portador con una presión inicial nominal de 23 psi/MS y 30 psi/FID.

2.2.2.2. Identificación cualitativa y cuantitativa de los compuestos de los aceites esenciales en espectrometría de masas (MS) y en el detector de ionización de llama (FID)

En espectrometría de masas, los compuestos de los aceites esenciales se identificaron mediante el cálculo de sus índices de retención y se compararon los datos arrojados por la biblioteca interna del laboratorio Pyrenessences con la base de datos electrónica National Institute of Standards and Technology (NIST). También se usaron los espectros de masa de los compuestos del aceite esencial identificados por la base de datos NKS, los mismos que

proporcionaron información sobre la estructura de las moléculas.

En el detector de ionización de llama, los porcentajes de cada uno de los compuestos se calcularon a partir de las áreas de los picos de los compuestos proporcionadas por el detector, no se utilizó un factor de corrección.

2.2.3. Cultivo de *Leishmania infantum* y *Leishmania mexicana*

2.2.3.1. Crecimiento de parásitos

L. mexicana y *L. infantum* fueron donados por la Universidad Central del Ecuador. Los promastigotes se mantuvieron en *flasks* para cultivo celular conteniendo 5 mL de medio *Schneider's Drosophila* (Sigma-Aldrich, S9895), suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (FBS), más 1 µg/mL de penicilina-estreptomicina como antibiótico (5,7,19).

La temperatura de incubación de cultivo fue de 26°C (5). Los promastigotes se subcultivaron cada 3 o 4 días de cultivo, con una dosis de 300 µL en 5 mL de medio *Schneider* completo para *L. mexicana*; y 500 µL en 5 mL de medio *Schneider* completo para *L. infantum*.

2.2.3.2. Conteo de parásitos

Se realizaron alícuotas de 10 µL de *L. mexicana* y *L. infantum* para posteriores diluciones. En *L. mexicana* las diluciones fueron $1/_{100}$ con PBS 1x, y se fijaron con formalina al 1%; mientras que en *L. infantum* las diluciones fueron $1/_{80}$ con PBS 1x. La tinción utilizada para el conteo de los parásitos fue 25 µL de azul de tripán más 75 µL de las diluciones señaladas anteriormente.

El número de promastigotes de *L. mexicana* y *L. infantum* se determinaron mediante cámara de Neubauer bajo observación en un microscopio óptico. La ecuación utilizada para los cálculos posteriores y elaboración de placa fue la siguiente:

$$\text{Concentración de parásitos/mL} = \frac{\# \text{ parásitos}}{4} \times 10.000 \times \text{factor de dilución} \times \text{volumen final}$$

2.2.4. Ensayo de viabilidad celular mediante MTT

2.2.4.1. Diseño de la placa de 96 pocillos con concentraciones crecientes de *Cistus Ladaniferus*, *Peperomia inaequalifolia* y *Tagetes Minuta* para el ensayo MTT

Los promastigotes de *L. mexicana* y *L. infantum* se cultivaron en *flasks* de cultivo celular con 5 mL de medio Schneider's Drosophila completo (10% de suero fetal bovino y 1 µg/mL de penicilina-estreptomicina) e incubados a 26°C. Los parásitos utilizados para conteo y plaqueo deben estar en fase estacionaria, es decir después del tercer o cuarto día.

La placa de 96 pocillos estéril contenía 1 x 10⁶ promastigotes de *L. mexicana* y *L. infantum* en un volumen de 80 µL. Los extractos de los aceites esenciales, *C. ladaniferus*, *P. inaequalifolia* y *T. minuta* en concentraciones crecientes fueron añadidos a los pocillos en un volumen de 20 µL. Por lo tanto, el volumen final por pocillo fue 100 µL.

La distribución de la placa contiene un blanco (B): 100 µL de DMSO más medio. Control positivo (C+): 80 µL de *Leishmania*, DMSO más medio y anfotericina B (5.0 µg/mL y 2.0 µg/mL) para *L. mexicana* y *L. infantum* respectivamente. Control negativo (C-): 80 µL de *Leishmania* y 20 µL de DMSO más medio. C1-C6: concentraciones crecientes de los aceites esenciales. Todos los pocillos contenían la misma concentración de DMSO (**Figura 1**). En cada placa se analizaron dos AE para una especie de *Leishmania*.

La placa se llevó a incubación a 26°C por 72 horas (7,34). Luego se añadió 10 µL de solución MTT (5 mg/mL) (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) en cada pocillo y se incubó a 26°C por 3 horas (35). Después de este tiempo, se disolvieron los

cristales de formazán creados por las células viables con 100 µL de solución SDS-HCL y se lo incubó a 26°C por 24 horas. Se realizó la lectura en un lector de placas a 570 nm y 630 nm.

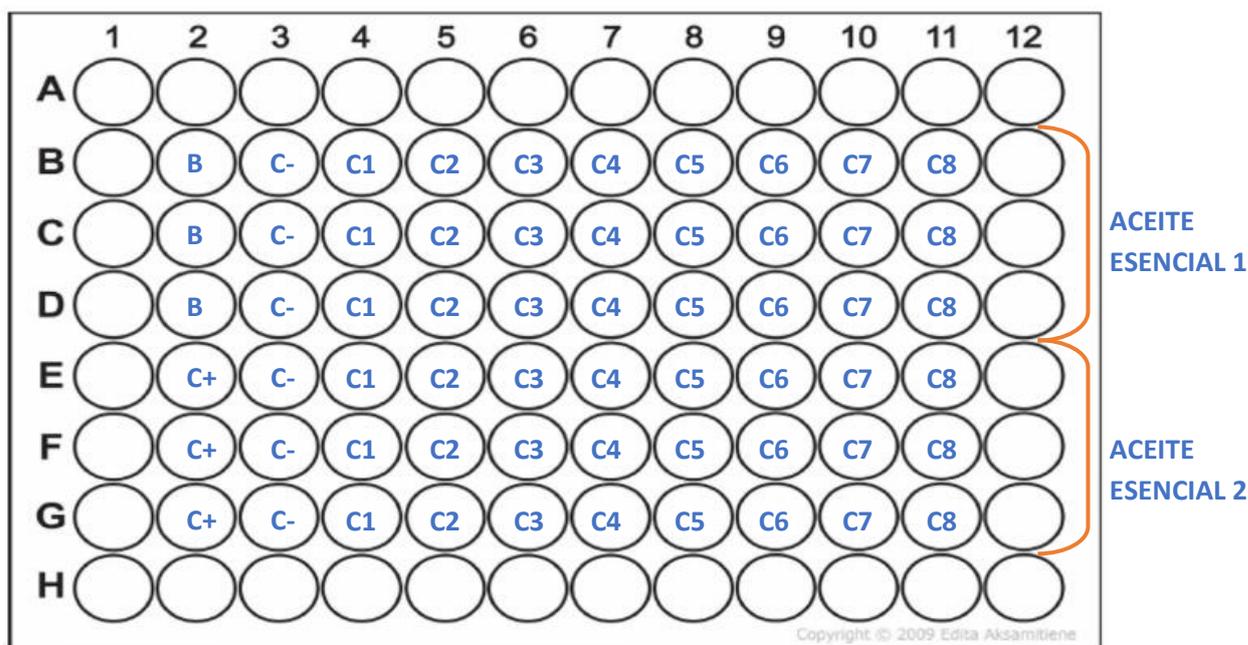


Figura 1. Diseño de placa para evaluar el efecto leishmanicida de aceites esenciales en *L. mexicana* y *L. infantum* con concentraciones crecientes. B: blanco (DMSO más medio $1/100$). C+: control positivo (*Leishmania*, DMSO y anfotericina B). C-: control negativo (*Leishmania*, DMSO). C1-C8: concentraciones crecientes de aceites esenciales.

2.2.5. Herramientas bioinformáticas para evaluación *in silico*

2.2.5.1. Predicción de interacciones ligando-proteínas

Se realizó a partir de la lista de compuestos bioactivos del aceite esencial *C. ladaniferus*, debido a que como se explica en el apartado de resultados fue el aceite con mayor potencia y eficacia. Se llevó a cabo una predicción ligando-proteínas para determinar las dianas relacionadas con cada uno de los compuestos por medio de las siguientes herramientas bioinformáticas: Similarity Ensemble Approach (36), MoltraPred (37), Swiss Target Prediction (38), Prediction Charite (39). Así, se obtuvieron listas de dianas con sus respectivos valores de significancia.

2.2.5.2. Agrupamiento de moléculas químicas

Se llevó a cabo un agrupamiento de moléculas químicas por medio de la herramienta ChemMine (40) generando 2 diferentes grupos o clústeres de compuestos basados en sus similitudes químicas y estructurales.

2.2.5.3. Normalización

Como cada herramienta bioinformática de Target Fishing usó diferentes métodos y ordenamientos en sus predicciones, se llevó a cabo una normalización para ajustar estos valores estadísticos medidos en diferentes escalas, respecto a una escala común.

Se le asignó a cada proteína “i”, cada método de predicción “j”, para cada compuesto “k”, y un número de ordenamiento ($ranking_{i,j}$) en función a su valor de significancia. Con estos valores se calculó el puntaje de cada proteína “i” en el método “j” ($Score_{i,j,k}$)

Ecuación:

$$Score_{i,j,k} = \frac{(\max ranking_{j,k}) - ranking_{i,j,k}}{(\max ranking_{j,k}) - (\min ranking_{j,k})}$$

Posteriormente se realizó un consenso del puntaje final de cada proteína predicha “i” para cada compuesto “k” ($Final Score_{i,k}$), se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

Ecuación:

$$Final Score_{i,k} = \sqrt{\frac{n_i}{N} \sum_{j=1}^N Score_{i,j,k}}$$

Donde N es el número de métodos empleados (4) y n es el número de métodos que identificaron a la proteína “i”. Estas ecuaciones y el método empleado se encuentra detallado por López-Cortés y Tejera (41,42).

Así, se obtuvo finalmente una lista de proteínas predichas por todas las herramientas de target fishing, de cada compuesto bioactivo con la misma escala de puntaje estadístico.

A continuación, se realizó una segunda normalización de las listas de proteínas predichas, para este proceso se tomó en cuenta el número de clústeres y el número de

compuestos por cada clúster, donde se reposicionaron aquellas proteínas que se encontraban en varias listas de predicción de cada compuesto que pertenecía al mismo clúster. Se obtuvo una lista final de posibles proteínas implicadas en el mecanismo de cada clúster de compuestos, en base a un mismo puntaje de significancia (Final Score).

Esta segunda puntuación de la proteína “i” en el grupo “m” ($Score_{F_{i,m}}$) se realizó mediante la siguiente ecuación .

Ecuación:

$$Score_{F_{i,m}} = \sqrt[2]{\frac{nc}{nc_m} \sum_{k=1}^{nc_m} Final\ Score_{i,k}}$$

Donde: nc es el número de moléculas en el grupo “m” que interactúan con la proteína “i” y nc_m es el número de moléculas en el grupo “m”.

2.2.5.4. Análisis de enriquecimiento

Por medio de la plataforma David Bioinformatic se realizó un análisis de enriquecimiento para identificar las dianas que se encuentran agrupadas o relacionadas entre sí mediante 2 tipos de enriquecimientos:

- Enriquecimiento biológico, de gene ontology (GO) para simplificar el elevado número de dianas y mantenerlo con la mayor especificidad posible.
- Enriquecimiento biológico, de rutas metabólicas de la base de datos mediante la Enciclopedia de Kioto de Genes y Genomas (KEGG).

De cada análisis se tomó en cuenta los valores de: significancia estadística (valor-p) del enriquecimiento, enriquecimiento de pliegues (Fold Enrichment), el cual indica cuantas veces fue enriquecido el proceso biológico o ruta metabólica, en contraste con una selección aleatoria. Tasa de descubrimiento falso (False Discovery Rate, FDR), la cual indica la probabilidad de error tipo II en el análisis. Peso de los enriquecimientos (WPx), ponderado de las rutas metabólicas y procesos biológicos enriquecidos en función de las dianas que estaban presentes

en cada proceso/ruta utilizando los valores ([ScoreF] _(i,m)) obtenidos de cada diana en la normalización.

Ecuación.

$$WP_x = \frac{\sum \text{score de diana presente en el proceso/ruta}}{\sum \text{score de diana humana del cluster}}$$

En conjunto estos análisis nos permitieron determinar posibles mecanismos de acción involucrados con los compuestos bioactivos de *C. ladaniferus*, *P. inaequalifolia* y *T. minuta*.

2.3. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de las placas se expresan como media aritmética \pm desviación estándar (SD). Para la comparación de más de un grupo (análisis del efecto de los aceites esenciales en función de la concentración) se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test de Dunnet en el cual se comparó cada concentración con el control negativo.

En estos test estadísticos, se consideró que las diferencias eran estadísticamente significativas cuando el valor P fue menor a 0.05 ($p < 0.05$). Para la elaboración de los gráficos y el análisis estadístico se utilizó el programa informático GraphPad Prism de la casa comercial GraphPad Software (EEUU).

Cálculo de IC₅₀

Los valores de IC₅₀ se obtuvieron de los valores de inhibición (%) de los parásitos. Se generó una tabla XY, donde el eje X corresponde al logaritmo de las concentraciones ascendentes de los tres aceites esenciales, mientras que el eje Y representa los porcentajes de inhibición de los parásitos. El programa GraphPad Prism realizó una regresión logarítmica para datos normalizados en el cual nos dio como resultado el valor IC₅₀.

3. RESULTADOS

3.1. Composición y características de los aceites esenciales de las plantas *Cistus ladaniferus*, *Peperomia inaequalifolia* y *Tagetes minuta*

3.1.1. Determinación de la humedad de las tres plantas mencionadas

El porcentaje de humedad de las hojas de la planta *C. ladaniferus* fue de 75.74%, *P. inaequalifolia* de 92.26% y *T. minuta* de 62.24%.

3.1.2. Propiedades físicas y organolépticas de los aceites esenciales

Propiedades físicas y organolépticas de los aceites esenciales de *C. ladaniferus*, *P. inaequalifolia* y *T. minuta*.

La tabla 3 detalla las propiedades físicas

Características de los aceites esenciales	<i>Cistus ladanifer</i>	<i>Peperomia inaequalifolia</i>	<i>Tagetes minuta</i>
Rendimiento (%)	0.69	0.16	0.070
Aspecto	Fluido y limpio	Fluido y limpio	Fluido y limpio
Color	Amarillo	Amarillo	Amarillo – dorado
Olor	Intenso, balsámico	Dulce	Frutal
Densidad (g/mL)	0.909	1.01	0.897
Índice de refracción	1.473	1.514	1.513

3.1.3. Composición química de los aceites esenciales

Mediante GC/MS se identificaron y reportaron los compuestos presentes en los aceites esenciales en concentraciones >0,01%. El aceite *C. ladaniferus* posee 179 compuestos que representan el 99.73%. En el aceite *P. inaequalifolia* se identificaron 161 compuestos, que forman un total de 99.89%. El aceite *T. minuta* presenta 185 compuestos para un total de 99.64%.

En la **tabla 4** se observan los compuestos mayoritarios (>5%) de los aceites esenciales mencionados previamente. Los análisis cromatográficos y tablas de compuestos se detallan en ANEXO I-III.

Tabla 4. Compuestos mayoritarios (%) obtenidos mediante cromatografía de gases de *Cistus ladaniferus*, *Peperomia inaequalifolia* y *Tagetes minuta*

Compuestos	<i>Cistus ladanifer</i>	<i>Peperomia inaequalifolia</i>	<i>Tagetes minuta</i>
2,2,6-trimethylcyclohexanone	7.65	-	-
Dihydrotagetone	-	-	11.52
Germacrene d	-	15.11	-
Safrole	-	8.37	-
Limonene	-	-	6.60
Cis-beta-OCIMENE	-	-	17.35
Alpha-PINENE	9.10	-	-
Camphene	22.45	-	-
Z-tagetone	-	-	16.23
E-methyleugenol	-	5.07	-
Acetate de bornyle	13.91	-	-
E-tagetenone	-	-	5.26
Z-tagetenone	-	-	5.26
Elemicine	-	22.94	-
Myristicine	-	9.76	-
Viridiflorol	6.76	-	-

3.2. Los aceites esenciales de *Cistus ladaniferus*, *Peperomia inaequalifolia* y *Tagetes minuta* muestran efectos leishmanicidas sobre *Leishmania spp.*

El efecto leishmanicida de los aceites esenciales sobre *L. mexicana* y *L. infantum in vitro* se analizó mediante ensayo MTT. Se analizaron concentraciones crecientes de los tres aceites esenciales, por triplicado en placa de 96 pocillos, durante 72 h de incubación.

Las concentraciones de los aceites esenciales para las dos especies varían desde 0 a 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El control negativo consistió en parásitos con DMSO más medio, mientras que el control positivo consistió en promastigotes en presencia de DMSO más medio y anfotericina B.

3.2.1. El aceite esencial de *Cistus ladaniferus* posee un efecto leishmanicida sobre *L. mexicana* y *L. infantum* dependiente de la dosis.

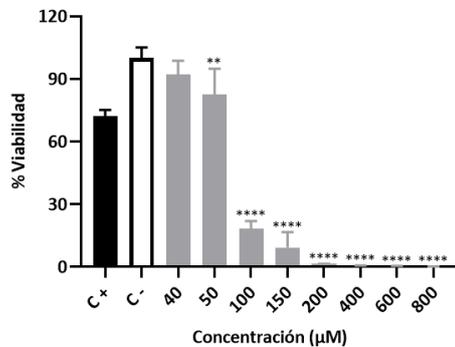
En la **Figura 2** se observa como el aceite esencial de *C. ladaniferus* redujo de manera extremadamente significativa la viabilidad de *L. mexicana* y *L. infantum* (ANOVA $p < 0.0001$). Para *L. mexicana*, las concentraciones que mostraron un efecto significativo empezaron a partir de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que en *L. infantum* iniciaron a partir de la concentración 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

A partir de los valores obtenidos previamente, se calcularon los porcentajes de inhibición (con respecto al control negativo) que provocaron concentraciones crecientes del aceite esencial. De los gráficos obtenidos se calculó la IC_{50} para ambas especies de parásitos, utilizando una regresión no lineal de las concentraciones, como se describe en la sección de análisis estadístico de la metodología.

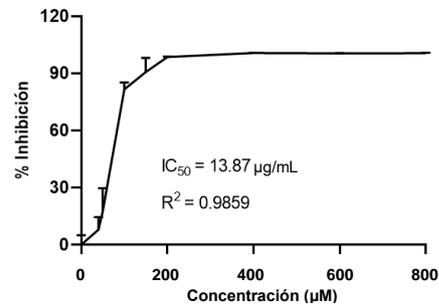
El aceite esencial de *C. ladaniferus* fue altamente eficaz contra ambas especies de *Leishmania spp.* Para *L. mexicana* la eficacia es del 100% de inhibición, en comparación con el 93% de inhibición de *L. infantum* (**Fig. 2B, 2D**). La potencia del aceite esencial de *C. ladaniferus* fue muy similar para ambas especies de parásitos con IC_{50} de 13.87 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *L. mexicana* y 13.46 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *L. infantum* respectivamente.

A) *L. mexicana*

ANOVA $p < 0.0001$

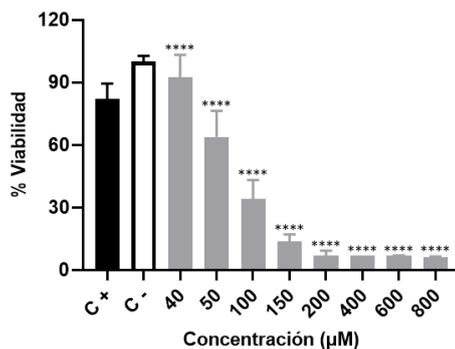


B) *L. mexicana*



C) *L. infantum*

ANOVA $p < 0.0001$



D) *L. infantum*

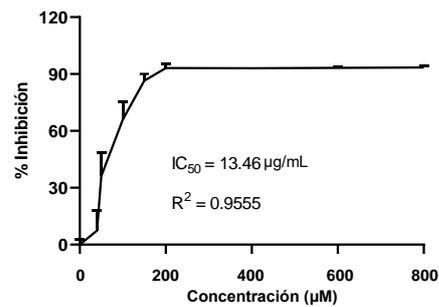


Figura 2. Efecto del extracto de *Cistus ladaniferus* sobre la viabilidad de *Leishmania* spp. A-B: *L. Mexicana*. C-D: *L. Infantum*. C+: control positivo (*Leishmania*, DMSO y anfotericina B). C-: control negativo (*Leishmania*, DMSO). La significancia estadística de los post test de Dunnet se indica mediante asteriscos: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.**

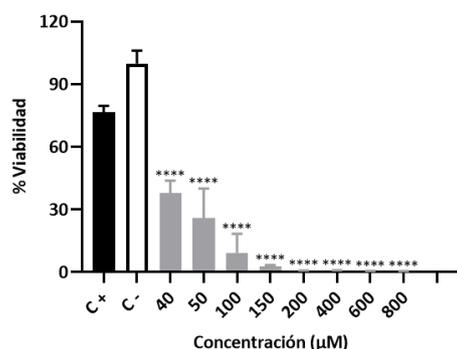
3.2.2. El aceite esencial de *Peperomia inaequalifolia* posee un efecto leishmanicida sobre *L. mexicana* y *L. infantum* dependiente de la dosis

La **Figura 3** muestra como el aceite esencial de *P. inaequalifolia* disminuyó muy significativamente la viabilidad de *L. mexicana* y *L. infantum* (ANOVA $p < 0.0001$). Para ambas especies *L. mexicana* y *L. infantum*, el efecto leishmanicida inició a partir de la concentración 40 $\mu\text{g/mL}$.

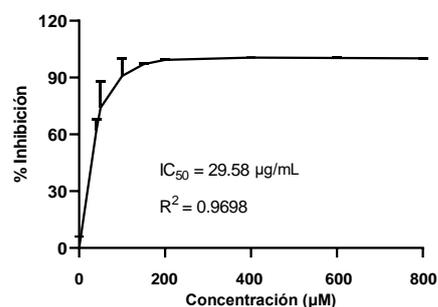
La eficacia máxima conseguida por *L. mexicana* es del 100%, frente al 93% de inhibición presentada en *L. infantum*. La potencia en este caso fue superior para *L. infantum* que para *L. mexicana*, con valores de IC₅₀ de 20.17 y 29.58 µg/mL respectivamente (**Fig. 3B, 3D**).

A) *L. mexicana*

ANOVA p < 0.0001

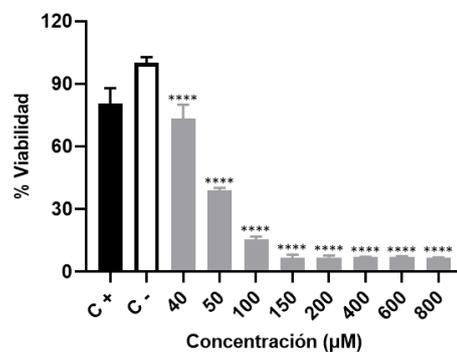


B) *L. mexicana*



C) *L. infantum*

ANOVA p < 0.0001



D) *L. infantum*

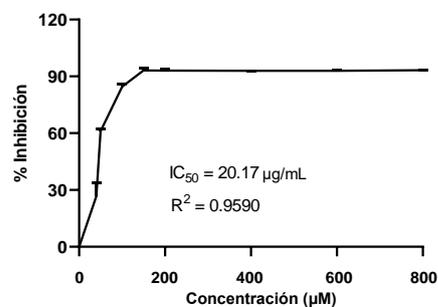


Figura 3. Efecto del extracto de *Peperomia inaequalifolia* sobre la viabilidad de *Leishmania spp.* A-B: *L. Mexicana*. C-D: *L. Infantum*. C+: control positivo (*Leishmania*, DMSO y anfotericina B). C-: control negativo (*Leishmania*, DMSO). La significancia estadística de los post test de Dunnet se indica mediante asteriscos: * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001; **** P < 0.0001.

3.2.3. El aceite esencial de *Tagetes minuta* posee un efecto leishmanicida sobre *L. mexicana* y *L. infantum* dependiente de la dosis

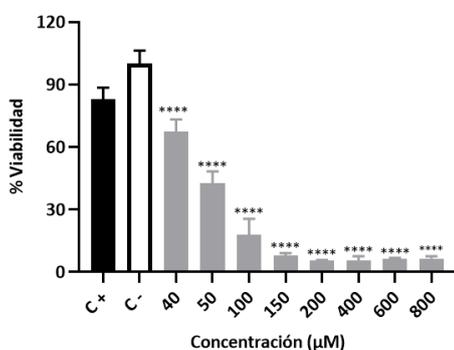
Por último, se evaluó el efecto del aceite esencial de *T. minuta*. Tal y como muestra la **Figura 4**, el aceite esencial de esta planta disminuye de manera extremadamente significativa

la proliferación de ambas especies de *Leishmania spp* (ANOVA $p < 0.0001$). En *L. mexicana* y *L. infantum* el efecto significativo se dio a partir de la concentración 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

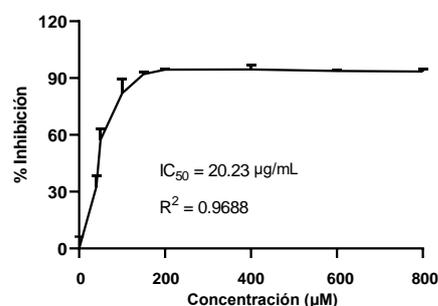
El porcentaje de eficacia máxima obtenida para *L. mexicana* fue del 94%, mientras que el porcentaje de *L. infantum* fue del 97%. La potencia fue mayor para *L. mexicana* con un valor IC_{50} de 20.23 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que para *L. infantum* fue de 29.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (Fig. 4B, 4D).

A) *L. mexicana*

ANOVA $p < 0.0001$

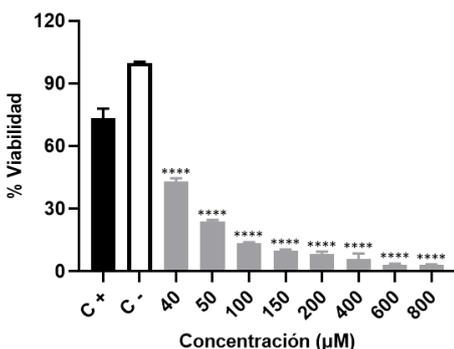


B) *L. mexicana*



C) *L. infantum*

ANOVA $p < 0.0001$



D) *L. infantum*

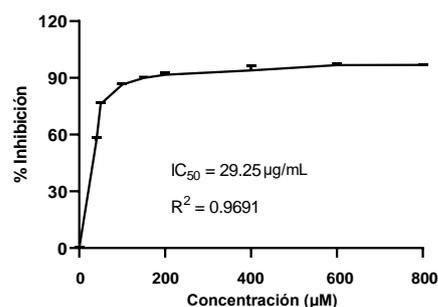


Figura 4. Efecto del extracto de *Tagetes minuta* sobre la viabilidad e inhibición de *Leishmania spp*. A-B: *L. Mexicana*. C-D: *L. Infantum*. C+: control positivo (*Leishmania*, DMSO y anfotericina B). C-: control negativo (*Leishmania*, DMSO). La significancia estadística de los post test de Dunnet se indica mediante asteriscos: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.**

En resumen, el aceite con mayor potencia y eficacia sobre la viabilidad de *L. mexicana* y *L. infantum*, fue el de *C. ladaniferus*, con porcentajes de inhibición en torno al 100% e

IC₅₀ menores a 15 µg/mL. Los aceites esenciales de *T. minuta* y *P. inaequalifolia* tuvieron una potencia similar con IC₅₀ entre 20 y 30 µg/mL y eficacias superiores al 90%.

3.3. Predicción de dianas moleculares del aceite esencial *Cistus ladaniferus*

En vista de que el aceite con mayor actividad leishmanicida fue el de *C. ladaniferus*, éste fue el que se seleccionó para la predicción bioinformática de dianas moleculares de los componentes químicos del aceite esencial y los procesos en los que éstas están implicadas.

3.3.1. Agrupación de moléculas químicas según clústeres

Mediante la herramienta ChemMine Tools se obtuvo 11 compuestos que se agruparon según sus pesos moleculares y estructuras. El clúster 1 fue constituido por 3 compuestos, y un total de 649 proteínas predichas. Mientras que el clúster 2 fue organizado en 8 compuestos, y 648 proteínas predichas.

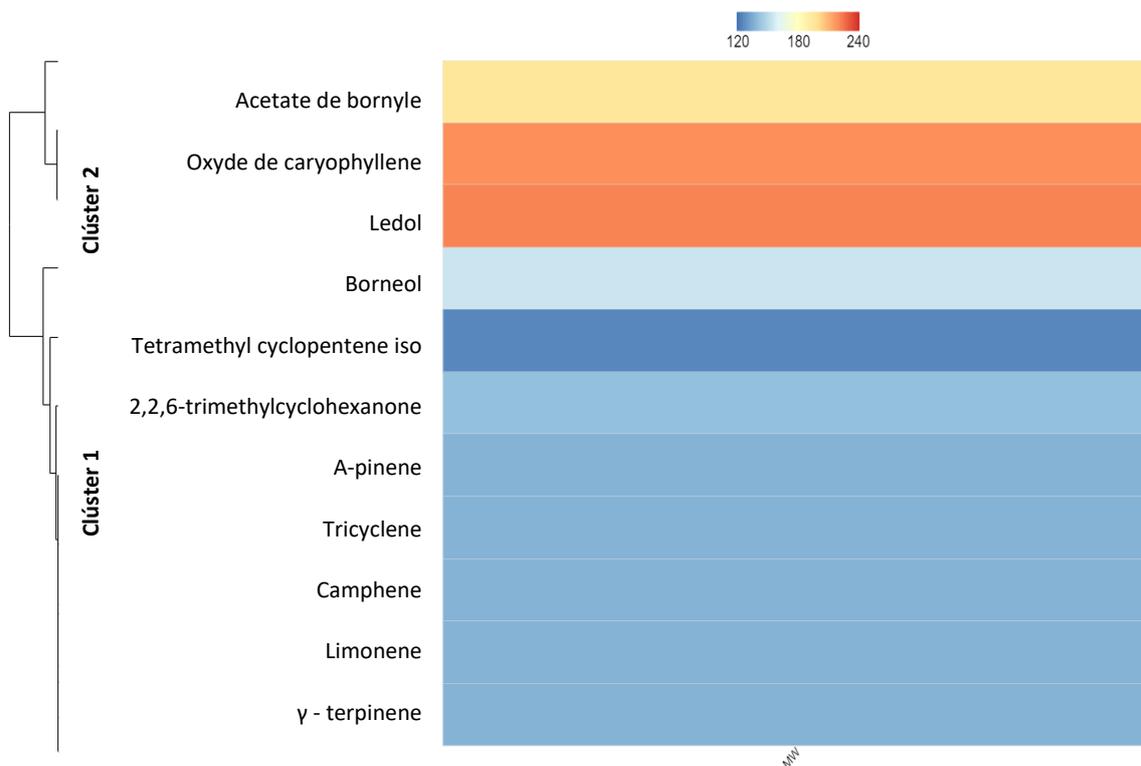


Figura 5. Clusterización de compuestos del aceite esencial *Cistus ladaniferus*. Agrupación jerárquica de los compuestos mayoritarios del aceite esencial según el peso molecular (MW) y estructura química, imagen realizada mediante herramienta bioinformática ChemMineTools.

3.3.2. Identificación de procesos biológicos enriquecidos a partir de dianas moleculares predichas para el aceite esencial *Cistus ladaniferus*

Se realizó un análisis de enriquecimiento mediante el cual se determinó la importancia de las dianas moleculares predichas en ciertos procesos biológicos. Así, las dianas moleculares predichas para el clúster 1 se asociaron a 254 procesos biológicos, mientras que las del clúster 2 a 558 procesos.

En la **Tabla 5** se muestran los principales procesos biológicos del clúster 1 asociados a la apoptosis, con significancia estadística ($p < 0,05$), mientras que los principales procesos biológicos relacionados con la muerte celular del clúster 2 ($p < 0,05$) se observan en la **Tabla 6**.

Tabla 5. Procesos biológicos enriquecidos a partir de dianas moleculares predichas del clúster 1 formado por compuestos del aceite esencial *Cistus ladaniferus*.

Código	Procesos Biológicos	Fold Enrichment	WPx	Valor-p	FDR
GO:0006508	Proteólisis	5.3	1.02E-01	6.81E-13	2.09E-10
GO:0006874	Homeostasis de iones de calcio celular	9.1	4.54E-02	4.39E-09	5.21E-07
GO:0043410	Regulación positiva de la cascada MAPK	7.2	6.12E-02	7.13E-09	8.04E-07

Nota: Código: identificación de cada proceso biológico; Fold Enrichment: cantidad de veces que el proceso biológico fue enriquecido; WPx: peso dado a los enriquecimientos en base a las dianas predichas; Valor-p: significancia estadística de los procesos; FDR: probabilidad de erros (False Discovery Date); MAPK: vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos.

Tabla 6. Procesos biológicos enriquecidos a partir de dianas moleculares predichas del clúster 2 formado por compuestos del aceite esencial *Cistus ladaniferus*.

Código	Procesos Biológicos	Fold Enrichment	WPx	P-valor	FDR
GO:0007204	Regulación positiva de las concentraciones de iones de calcio citosólico	8.6	6.65E-02	9.11E-12	2.28E-09
GO:0043065	Regulación positiva de procesos apoptóticos	3.3	5.36E-02	2.16E-04	4.31E-03
GO:0043406	Regulación positiva de la actividad MAPK	8.1	3.25E-02	1.55E-05	4.72E-04

Nota: Código: identificación de cada proceso biológico; Fold Enrichment: cantidad de veces que el proceso biológico fue enriquecido; WPx: peso dado a los enriquecimientos en base a las dianas predichas; Valor-p: significancia estadística de los procesos; FDR: probabilidad de erros (False Discovery Date); MAPK: vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos.

3.3.3. Rutas metabólicas enriquecidas de la base KEGG de dianas moleculares predichas del aceite esencial *Cistus ladaniferus*

Por medio del programa DAVID Bioinformatic Resources se observaron 46 rutas metabólicas en las que están implicadas las dianas predichas del clúster 1 y 98 rutas metabólicas del clúster 2.

En las **Tablas 7, 8** se detallan las principales rutas metabólicas relacionadas con apoptosis, con un significancia estadística ($p < 0,05$).

Tabla 7. Rutas metabólicas relacionadas a dianas moleculares predichas del clúster 1 formado por compuestos del aceite esencial *Cistus ladaniferus*.

Código	Rutas Metabólicas	Fold Enrichment	WPx	Valor-p	FDR
hsa04020	Vía de señalización del calcio	3.8	1.06E-01	3.55E-09	1.3E-07
hsa00590	Metabolismo del ácido araquidónico	7.5	5.32E-02	2.61E-08	7.9E-07
hsa01100	Vías metabólicas	1.4	2.74E-01	2.70E-03	0.01958

Nota: Código: identificación de cada proceso biológico; Fold Enrichment: cantidad de veces que el proceso biológico fue enriquecido; WPx: peso dado a los enriquecimientos en base a las dianas predichas; Valor-p: significancia estadística de los procesos; FDR: probabilidad de erros (False Discovery Date).

Tabla 8. Rutas metabólicas asociadas a dianas moleculares predichas del clúster 2 del aceite esencial *Cistus ladaniferus*.

Código	Rutas Metabólicas	Fold Enrichment	WPx	Valor-p	FDR
hsa04020	Vía de señalización del calcio	4.2	9.60E-02	1.10E-09	4.7E-08
hsa04210	Apoptosis	8.2	1.12E-02	2.79E-03	1.4E06
hsa04024	Vía de señalización de AMPc	3.5	8.65E-02	2.31E-07	5.5E-06

Nota: Código: identificación de cada proceso biológico; Fold Enrichment: cantidad de veces que el proceso biológico fue enriquecido; WPx: peso dado a los enriquecimientos en base a las dianas predichas; Valor-p: significancia estadística de los procesos; FDR: probabilidad de erros (False Discovery Date); AMPc: Adenosín monofosfato cíclico.

4. DISCUSION

Ecuador pertenece a un grupo selecto de países megadiversos, que cuentan con una flora y fauna de fama a nivel mundial (23). La región de la amazonia cuenta con una amplia cantidad de plantas endémicas de la zona. Tradicionalmente, las zonas rurales hacían uso de estas plantas como tratamientos naturales para una variedad de afecciones (23). Las plantas *C. ladaniferus*, *P. inaequalifolia* y *T. minuta* presentan propiedades antiinflamatorias,

antiparasitarias, antibacterianas, entre otras, convirtiéndolas en una alternativa potencial para el tratamiento de la leishmaniasis (24–33).

En la presente investigación se evidenció que los aceites esenciales de *C. ladaniferus*, *P. inaequalifolia* y *T. minuta* provocaron una disminución significativa en la viabilidad celular de promastigotes de *L. mexicana* y *L. infantum*. De acuerdo a los análisis bioinformáticos realizados sobre los compuestos del aceite esencial *C. ladaniferus* existen ciertas dianas moleculares relacionadas a procesos de muerte celular que explicarían los resultados *in vitro* obtenidos.

El tratamiento escogido como control positivo en esta investigación es la anfotericina B, cuya baja eficacia se ve reflejada en los experimentos *in vitro*, ya que no provocó mucho efecto inhibitorio en comparación con los aceites esenciales. Es importante destacar que actualmente no existen investigaciones centradas en los efectos de aceites esenciales sobre la leishmaniasis a pesar de ser una de las enfermedades desatendidas endémicas del país (2,13,43).

De los tres aceites antes mencionados y examinados, se llegó a la conclusión que el aceite con mayor eficacia y potencia sobre las especies de *Leishmania spp.* fue el aceite *C. ladaniferus*, por lo que es el aceite que se empleó para la parte de predicción bioinformática de dianas del presente trabajo.

Cabe indicar que no se emplearon bases de datos específicas de *Leishmania*, sino de eucariotas en general, por lo que pudiera haber diferencias entre lo que se produciría en estas células o en humanos. Sin embargo, como varios procesos están muy conservados, sirve como indicativo.

El proceso de clusterización de componentes mayoritarios obtuvo 11 compuestos que se agruparon en dos clústeres diferentes dependiendo de su peso molecular y estructura. El primer clúster formado por 3 compuestos, y el segundo clúster conformado por 8 compuestos (Fig. 5).

El proceso biológico y la ruta metabólica común en los clústeres 1 y 2 relacionadas con la muerte celular es la regulación positiva de la cascada MAPK (GO:0043410) (GO:0043406) y la vía de señalización del calcio (hsa04020). La ruta de MAPK tiene un rol significativo en diferentes procesos biológicos como apoptosis, proliferación, diferenciación y migración celular. Una de sus subfamilias, la ruta de p38 MAPK tiene relación directa con la apoptosis celular, por lo tanto, la inhibición de la misma estimula la apoptosis (44–46). Por su parte, la vía de señalización de calcio tiene estrecha relación con la muerte celular, esto debido a la presencia de niveles elevados de iones de calcio (Ca^{+2}) en las etapas tempranas y tardías del proceso apoptótico (47).

Por otra parte, los procesos biológicos específicos al clúster 1 son la proteólisis (GO:0006508) y la homeostasis de iones de calcio celular (GO:0006874) (**Tabla 5**).

La cascada de activación proteolítica es propia de la apoptosis, donde una caspasa corta y activa a la caspasa siguiente (48,49). Estas caspasas inactivan las proteínas involucradas en la reparación, replicación de ADN y transcripción de ARNm (50). Adicional, los iones de calcio juegan un importante papel como segundo mensajero implicado en varios procesos celulares como excitabilidad, permeabilidad y transporte de iones a través de la membrana plasmática incluida la apoptosis (47,51). También es un efector alostérico que regula la actividad de muchas enzimas que participan en el catabolismo de una gran variedad de biomoléculas afectando al metabolismo celular. Es por eso que a través de su interacción con el metabolismo del calcio, el aceite de *C. ladaniferus* podría afectar negativamente la viabilidad de *Leishmania spp.*

En cuanto a las rutas metabólicas enriquecidas relacionadas con la muerte celular son el metabolismo del ácido araquidónico (hsa00590) y vías metabólicas (hsa01100) (**Tabla 7**). La ruta del ácido araquidónico, lleva a la producción de prostaglandinas por oxidación de este ácido graso poliinsaturado. La literatura sostiene que el metabolismo del ácido araquidónico juega un rol importante en la regulación de la apoptosis debido a la activación de caspasas (52–54).

Por otro lado, los procesos biológicos particulares correspondientes al clúster 2 son la regulación positiva de las concentraciones de iones de calcio citosólico (GO:0007204) y la regulación positiva de procesos apoptóticos (GO:0043065) (**Tabla 6**).

La regulación positiva de las concentraciones de iones de calcio citosólico tiene relación directa con la apoptosis, ya que la presencia de los mismos estimula las proteasas que son parte clave para la muerte celular (47,51,55,56). Por otra parte, los procesos apoptóticos pueden ser activados por una inducción negativa (disminución de actividad supresora), o una inducción positiva como una unión de un ligando a un receptor de muerte. (57).

Las rutas metabólicas asociadas a estos procesos biológicos son la vía de la apoptosis (hsa04210) y la vía de señalización de AMPc (hsa04024) (**tabla 8**). AMPc es un segundo mensajero vital para la regulación de procesos biológicos como migración, proliferación y diferenciación celular, además de apoptosis (58). La vía de señalización de AMPc junto a la proteína quinasa A efectora regulan la apoptosis celular (59).

La interrelación de rutas metabólicas observadas en el clúster 1 y 2 demuestra que la muerte de los parásitos de *Leishmania spp* pueden ser producto de más de un mecanismo de acción.

5. CONCLUSIONES

- Los aceites esenciales de *C. ladaniferus*, *P. inaequalifolia* y *T. minuta* poseen actividad leishmanicida sobre *L. mexicana* y *L. infantum*.
 - El aceite esencial de *C. ladaniferus* es el aceite con mayor potencia y eficacia sobre ambas especies
 - La especie más susceptible a los aceites esenciales de *C. ladaniferus*, *P. inaequalifolia* es *L. infantum*, mientras que para el aceite *T. minuta* es *L. mexicana*.

- De los estudios *in silico* inferimos que los efectos observados podrían deberse a una inducción de la muerte celular programada a partir de la interacción de los compuestos del aceite *C. ladaniferus* con los siguientes procesos o vías de señalización:
 - Regulación positiva de la cascada MAPK y,
 - Vía de señalización del calcio.

6. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios *in vivo* en ratones, para demostrar el potencial terapéutico de los extractos de los tres aceites esenciales por vía tópica.
 - Ratones BALBc infectados en las almohadillas de las patas tratados con fármacos de referencia, sin tratar y tratados con aceites esenciales.
 - Observación de la lesión.
 - Determinación de marcadores proinflamatorios.
- Análisis *in silico* del resto de aceites para conocer los mecanismos moleculares y celulares.
- Validación *in vitro* de las dianas predichas *in silico*:
 - Análisis de la expresión genética de las proteínas diana que intervienen en los procesos o vías de señalización obtenidos en los análisis *in silico*.
 - Uso de inhibidores específicos de vías o procesos obtenidos *in silico* para verificar que los efectos se deben a la activación de los mismos.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. Enfermedades Desatendidas, Tropicales y Transmitidas por Vectores [Internet]. 2018 [cited 2022 May 24]. Available from: https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5398:neglected-tropical-vector-borne-diseases-information&Itemid=1074&lang=es
2. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. Plan of action to strengthen the surveillance and control of leishmaniasis in the Americas 2017-2022 [Internet]. OPS/OMS. 2017. Available from: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/34147>
3. Salud OP de la. Módulo de Principios de Epidemiología para el Control de Enfermedades (MOPECE). 2002.
4. Muskus CE, Marín Villa M. Metaciclología: un proceso fundamental en la biología de Leishmania. *Biomédica*. 2002;22(2):167.
5. Montalvo A, Fraga J, Monzote L, García M, Fonseca L. Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN. *Rev Cubana Med Trop* [Internet]. 2012 [cited 2021 Dec 3];64(2):108–31. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602012000200002
6. Kevric I, Cappel MA, Keeling JH. New World and Old World Leishmania Infections: A Practical Review. *Dermatol Clin*. 2015;33(3):579–93.
7. Machado M, Santoro G, Sousa MC, Salgueiro L, Cavaleiro C. Activity of essential oils on the growth of *Leishmania infantum* promastigotes. *Flavour Fragr J*. 2010;25(3):156–60.
8. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. Leishmaniasis en las Américas. Aspectos clínicos y diagnósticos diferenciales. Organización Mundial de la Salud. 2020. 1–582 p.

9. Sunter J, Gull K. Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: From textbook descriptions to biological understanding. *Open Biol.* 2017;7(9).
10. Pereira Á, Pérez M. Leishmaniosis. *Parasitología.* 2018;21(9):116–24.
11. Aronson N, Herwaldt BL, Libman M, Pearson R, Lopez-Velez R, Weina P, et al. Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). *Clin Infect Dis [Internet].* 2016 Dec 15 [cited 2021 Nov 18];63(12):202–64. Available from: <https://www.msmanuals.com/es-ec/professional/enfermedades-infecciosas/protozoos-extraintestinales/leishmaniasis>
12. Desjeux P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2004;27(5):305–18.
13. Organización Mundial de la Salud. Leishmaniasis [Internet]. 2021 [cited 2021 Nov 18]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
14. Dantas-Torres F. The role of dogs as reservoirs of Leishmania parasites, with emphasis on Leishmania (Leishmania) infantum and Leishmania (Viannia) braziliensis. *Vet Parasitol.* 2007;149(3–4):139–46.
15. Rosal Rabes T, Baquero-Artigao F, García Miguel MJ. Leishmaniasis cutánea. *Revista Pediatría Atención Primaria [Internet].* 2010 [cited 2021 Dec 3];12(46):263–71. Available from: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1139-76322010000300009&lng=es&nrm=iso&tlng=es
16. Ministerio de Salud Pública. Subsistema de vigilancia sive-alerta enfermedades transmitidas por vectores en Ecuador. 2019.
17. Santos L da S, Torres RM, Machado-de-Assis GF, Bahia MT, Martins HR, Teixeira-Carvalho A, et al. In-house ELISA method to analyze anti-Trypanosoma cruzi IgG reactivity for differential diagnosis and evaluation of Chagas disease morbidity. *Rev Soc*

- Bras Med Trop. 2012;45(1):35–44.
18. Falcão S, Vale N, Cos P, Gomes P, Freire C, Maes L, et al. In Vitro Evaluation of Portuguese Propolis and Floral Sources for Antiprotozoal , Antibacterial and Antifungal Activity. *Phyther Res.* 2013;
 19. Andrade M, Azevedo C dos S, Motta FN, Dos Santos ML, Silva C, Santana JM, et al. Essential oils: in vitro activity against *Leishmania amazonensis*, cytotoxicity and chemical composition. *BMC Complement Altern Med.* 2016 Nov 8;16(444):1–8.
 20. Pereira Á, Pérez M. Leishmaniosis. *Offarm [Internet].* 2002 Oct 1 [cited 2021 Dec 3];21(9):116–24. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-leishmaniosis-13038008>
 21. Ruffell S, Netzband N, Bird C, Young AH, Juruena MF. The pharmacological interaction of compounds in ayahuasca: a systematic review. *Brazilian J Psychiatry.* 2020;42(6):646–56.
 22. Ullah N, Nakhman A, Siddiq S, Mehwish S, Islam A, Jafri L, et al. Plants as Antileishmanial Agents: Current Scenario. *Phyther Res.* 2016;30(12):1905–25.
 23. Ulloa C. *Guías de plantas de Ecuador.* 2019. 1–10 p.
 24. León-Yáñez S, Valencia R, Pitman N, Endara L, Ulloa C, Navarrete H. *Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador.* Publicaciones del Herbario QCA. 2011. 1–960 p.
 25. De la Torre L, Navarrete H, Muriel P, Macía MJ, Balslev H. *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador (con extracto de datos) [Internet].* Herbario QCA & Herbario AAU. 2008. 245–246 p. Available from: https://www.researchgate.net/publication/310828407_Enciclopedia_de_las_Plantas_Utiles_del_Ecuador
 26. Zalegh I, Akssira M, Bourhia M, Mellouki F, Rhallabi N, Salamatullah AM, et al. A Review on *Cistus* sp.: Phytochemical and Antimicrobial Activities. *Plants [Internet].* 2021 Jun 15

[cited 2022 Jul 19];10(6):1214. Available from: <https://www.mdpi.com/2223-7747/10/6/1214/htm>

27. Köse MD, Tekin BN, Bayraktar O, Duman ET, Başpınar Y. Antioxidant and Antimicrobial Properties of *Cistus Ladanifer*. *Int J Second Metab*. 2017;4(2):434–44.
28. Balslev H, Navarrete H, De la Torre L, Macía MJ. *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador*. Vol. 1, Herbario QCA & Herbario AAU. 2008. 142 p.
29. Noriega P, Mosquera T, Baldisserotto A, Abad J, Aillon C, Cabezas D, et al. Chemical Composition and in-vitro biological activities of the essential oil from leaves of *Peperomia inaequalifolia* Ruiz & Pav. *Am J Essent Oils Nat Prod*. 2015;2(4):29–31.
30. Gakuubi MM, Wanzala W, Wagacha JM, Dossaji SF. Bioactive properties of *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) essential oils: A review. *Am J Essent Oils Nat Prod*. 2016;4(2):27–36.
31. Igwaran A, Iweriebor BC, Ofuzim Okoh S, Nwodo UU, Obi LC, Okoh AI. Chemical constituents, antibacterial and antioxidant properties of the essential oil flower of *Tagetes minuta* grown in Cala community Eastern Cape, South Africa. *BMC Complement Altern Med* [Internet]. 2017 Jul 5 [cited 2022 Jul 20];17(1):1–10. Available from: <https://bmccomplementmedtherapies.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12906-017-1861-6>
32. Kyarimpa CM, Böhmendorfer S, Wasswa J, Kiremire BT, Ndiege IO, Kabasa JD. Essential oil and composition of *Tagetes minuta* from Uganda. Larvicidal activity on *Anopheles gambiae*. *Ind Crops Prod*. 2014 Dec 1;62:400–4.
33. Bandoni A. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica: su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. *Los Recur Veg aromáticos en Latinoamérica* [Internet]. 2003 [cited 2022 Jul 20];405. Available from:

https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/38725277/Bandoni_LOS_RECURRENTE_SOS_VEGETALES_AROMATICOS_EN_LATINOAMERICA.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOYYYGZ2Y53UL3A&Expires=1557948629&Signature=HSrHJHTfUTjWnWxvgbz7eEm3WPg%25253D&response-content-disposition=inline

34. Monzote L, Herrera I, Satyal P, Setzer W. In-vitro evaluation of 52 commercially-available essential oils against leishmania amazonensis. *Molecules*. 2019;24(7):1–11.
35. Dutta A, Bandyopadhyay S, Mandal C, Chatterjee M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. *Parasitol Int*. 2005;54(2):119–22.
36. Keiser MJ, Roth BL, Armbruster BN, Ernsberger P, Irwin JJ, Shoichet BK. Relating protein pharmacology by ligand chemistry. *Nat Biotechnol* 2007 252 [Internet]. 2007 Feb 7 [cited 2022 Jul 23];25(2):197–206. Available from: <https://www.nature.com/articles/nbt1284>
37. Peón A, Naulaerts S, Ballester PJ. Predicting the Reliability of Drug-target Interaction Predictions with Maximum Coverage of Target Space. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2022 Jul 23];7(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28630414/>
38. Gfeller D, Grosdidier A, Wirth M, Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2014 Jul 1 [cited 2022 Jul 23];42(Web Server issue). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24792161/>
39. Nickel J, Gohlke BO, Erehman J, Banerjee P, Rong WW, Goede A, et al. SuperPred: Update on drug classification and target prediction. *Nucleic Acids Res*. 2014 Jul 1;42(W1).
40. Karthikeyan M, Vyas R. Open-Source Tools, Techniques, and Data in Chemoinformatics. *Pract Chemoinformatics*. 2014;1–92.

41. Tejera E, Cruz-Monteaquedo M, Burgos G, Sánchez ME, Sánchez-Rodríguez A, Pérez-Castillo Y, et al. Consensus strategy in genes prioritization and combined bioinformatics analysis for preeclampsia pathogenesis. *BMC Med Genomics*. 2017;10(1):1–19.
42. López-Cortés A, Paz-y-Miño C, Cabrera-Andrade A, Barigye SJ, Munteanu CR, González-Díaz H, et al. Gene prioritization, communality analysis, networking and metabolic integrated pathway to better understand breast cancer pathogenesis. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–15.
43. WHO-PAHO. Leishmaniasis: Informe epidemiológico de las Américas. Núm. 9, diciembre del 2020. *Inf Leishmaniasis* [Internet]. 2020;4:3–7. Available from: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51742>
44. Lu Z, Xu S. ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB Life* [Internet]. 2006 Nov 1 [cited 2022 Jul 21];58(11):621–31. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1080/15216540600957438>
45. Guo Y, Pan W, Liu S, Shen Z, Xu Y, Hu L. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). *Exp Ther Med* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2022 Jul 21];19(3):1997–2007. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2020.8454/abstract>
46. Yue J, López JM. Understanding MAPK Signaling Pathways in Apoptosis. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2022 Jul 21];21(7). Available from: </pmc/articles/PMC7177758/>
47. Pinton P, Giorgi C, Siviero R, Zecchini E, Rizzuto R. Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis. *Oncogene* [Internet]. 2008 Oct 10 [cited 2022 Jul 21];27(50):6407. Available from: </pmc/articles/PMC2844952/>
48. Raj DSC, Shah H, Shah VO, Ferrando A, Bankhurst A, Wolfe R, et al. Markers of Inflammation, Proteolysis, and Apoptosis in ESRD. *Am J Kidney Dis*. 2003;42(6):1212–

- 20.
49. Utz PJ, Anderson P. Life and death decisions: regulation of apoptosis by proteolysis of signaling molecules. *Cell Death Differ* 2000 77 [Internet]. 2000 Jun 27 [cited 2022 Jul 21];7(7):589–602. Available from: <https://www.nature.com/articles/4400696>
50. Santini MT, Rainaldi G, Indovina PL. Apoptosis, cell adhesion and the extracellular matrix in the three-dimensional growth of multicellular tumor spheroids. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2000;36(2–3):75–87.
51. Patergnani S, Danese A, Bouhamida E, Aguiari G, Previati M, Pinton P, et al. Various Aspects of Calcium Signaling in the Regulation of Apoptosis, Autophagy, Cell Proliferation, and Cancer. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Nov 6 [cited 2022 Jul 21];21(21):8323. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/21/8323/htm>
52. Cao Y, Pearman AT, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(21):11280–5.
53. Li J, Li O, Kan M, Zhang M, Shao D, Pan Y, et al. Berberine induces apoptosis by suppressing the arachidonic acid metabolic pathway in hepatocellular carcinoma. *Mol Med Rep* [Internet]. 2015 Sep 1 [cited 2022 Jul 21];12(3):4572–7. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2015.3926/abstract>
54. Claria J. Regulation of Cell Proliferation and Apoptosis by Bioactive Lipid Mediators. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*. 2008;1(3):369–82.
55. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: The calcium-apoptosis link. *Mol Cell Biol*. 2003;4(7):552–65.
56. Hajnóczky G, Davies E, Madesh M. Calcium signaling and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;304(3):445–54.
57. Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Alessia Garufi, D’Orazi G. Apoptosis as anticancer

- mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)* [Internet]. 2016 [cited 2022 Jul 23];8(4):603–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27019364/>
58. Zhang F, Zhang L, Qi Y, Xu H. Mitochondrial cAMP signaling. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2016 May 28 [cited 2022 Jul 21];73(24):4577–90. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-016-2282-2>
59. Insel PA, Zhang L, Murray F, Yokouchi H, Zambon AC. Cyclic AMP is both a pro-apoptotic and anti-apoptotic second messenger. *Acta Physiol (Oxf)* [Internet]. 2012 Feb [cited 2022 Jul 23];204(2):277. Available from: </pmc/articles/PMC3125423/>

8. ANEXOS

Anexo I.

Tabla de compuestos de cromatografía de gases de *Cistus ladaniferus*

Pics	TR (min)	Constituants	%	Norme (%)	Allergènes (%)
1	4.66	ACETONE	0.07		
2	4.75	DIMETHYL HEPTADIENE ISOMERE	0.01		
3	5.95	TETRAMETHYL CYCLOPENTENE ISOMERE	0.90		
4	6.30	TETRAMETHYL CYCLOPENTENE ISOMERE	0.11		
5	6.32	METHYL METHYLETHENYL CYCLOHEXANE	0.04		
6	6.78	CYCLOPENTENE DÉRIVÉ	0.01		
7	7.46	TRICYCLENE	4.78		
8	7.87	alpha-PINENE	9.10		
9	7.90	alpha-THUYENE	0.16		
10	8.90	alpha-FENCHENE	0.40		
11	9.32	CAMPHENE	22.45		
12	10.71	beta-PINENE	0.70		
13	11.22	SABINENE	0.05		
14	11.39	PINADIENE	0.31		
15	11.61	COMPOSÉ Mw=152	0.02		
16	13.13	beta-MYRCENE	0.68		
17	13.24	alpha-PHELLANDRENE	0.03		
18	13.54	psi-LIMONENE	0.06		
19	13.97	alpha-TERPINENE	0.14		
20	14.39	2,3-DEHYDRO-1,8-CINEOLE	0.01		
21	14.80	MENTHATRIENE ISOMERE	0.04		
22	14.98	LIMONENE	1.05	1.05	
23	15.33	1,8-CINEOLE	0.07		
24	15.45	beta-PHELLANDRENE	0.07		
25	15.86	MENTHATRIENE ISOMERE	0.07		
26	16.90	Cis-beta-OCIMENE	0.10		
27	16.96	6-METHYL-2-HEPTANONE	0.07		
28	17.59	gamma-TERPINENE	0.30		
29	17.69	MENTHATRIENE ISOMERE	0.05		
30	17.93	Trans-beta-OCIMENE	0.01		
31	18.35	STYRENE	0.01		
32	19.00	p-CYMENE	0.29		
33	19.81	TERPINOLENE	0.14		
34	20.46	DIMETHYLSTYRENE ISOMERE	0.01		
35	20.57	ALCOOL CYCLOTERPENIQUE	0.02		
36	21.91	2,2,6-TRIMETHYLCYCLOHEXANONE	7.65		
37	22.02	PINOL (6,8-EPOXYMENTH-1-ENE)	0.06		
38	22.16	ESTER ALIPHATIQUE	0.02		
39	23.07	6-METHYL-5-HEPTEN-2-ONE	0.04		
40	23.72	METHYLPROIOPHENONE Mw=148	0.03		
41	24.37	COMPOSÉ CYCLOHEXENIQUE	0.02		
42	25.95	OXYDE D'alpha-PINENE	0.02		
43	26.37	COMPOSÉ Mw=150	0.01		

44	26.76	2-NONANONE	0.04		
45	26.86	COMPOSÉ ACETYL TERPENIQUE	0.19		
46	27.17	ISOPHORONE	0.39		
47	27.41	COMPOSÉ CÉTONIQUE	0.03		
48	28.72	OXYDE TERPENIQUE	0.10		
49	28.95	ESTER ALIPHATIQUE	0.02		
50	29.52	alpha,p-DIMETHYLSTYRENE	0.17		
51	29.69	Cis-OXYDE DE LINALOL	0.03		
52	29.80	CÉTONE TERPENIQUE	0.02		
53	29.99	COMPOSÉ Mw=138	0.11		
54	30.70	CAMPHENILONE	0.05		
55	31.04	alpha-CUBEBENE	0.17		
56	31.32	VITISPIRANE Mw=192	0.46		
57	31.72	Trans-OXYDE DE LINALOL	0.02		
58	31.86	OXYDE DE NERYLE	0.05		
59	32.23	CYCLOSATIVENE	0.05		
60	32.58	ISOLEDENE	0.43		
61	32.86	alpha-CAMPHOLENAL	0.73		
62	33.25	alpha-COPAENE	0.35		
63	33.83	ALCOOL TERPENIQUE Mw=154	0.06		
64	34.26	alpha-PINOCAMPHONE	0.12		
65	34.33	CAMPHRE	0.54		
66	34.49	3-NONEN-2-ONE	0.05		
67	34.66	ALCOOL TERPENIQUE Mw=154	0.03		
68	34.88	ALCOOL TERPENIQUE Mw=154	0.06		
69	35.40	ALCOOL CAMPHOLENIQUE	0.58		
70	35.65	beta-BOURBOENNE	0.16		
71	36.15	alpha-GURJUNENE	0.09		
72	36.31	ALCOOL TERPENIQUE	0.23		
73	36.51	beta-ISOPINOCAMPHONE	0.12		
74	36.98	beta1-CUBEBENE	0.02		
75	37.19	TRIMETHYL CYCLOHEXENOL ISOMERE	0.03		
76	37.67	PINOCARVONE	0.14		
77	38.23	FORMATE DE BORNYLE	0.07		
78	38.81	ACETATE DE BORNYLE	13.91		
79	38.98	ACETATE D'ISOBORNYLE	0.28		
80	39.48	6-METHYL-3,5-HEPTADIENE-2-ONE	0.12		
81	39.58	HYDRATE DE CAMPHENE	0.16		
82	39.84	beta-CARYOPHYLLENE	2.50		
83	39.91	2,6-DIMETHYL CYCLOHEXANOL	0.21		
84	40.19	TERPINENE-4-OL	0.11		
85	40.38	6,9-GUAIADIENE	0.06		
86	40.63	AROMADENDRENE	0.12		
87	41.02	SESQUITERPENE	0.07		
88	41.42	CETONE TERPENIQUE Mw=152	0.18		
89	41.57	MYRTENAL	0.20		
90	41.91	COMPOSÉ AROMATIQUE Mw=190	0.11		
91	42.47	CADINA-3,5-DIENE	0.11		
92	42.73	ALLO-AROMADENDRENE	0.70		
93	43.08	Trans-PINOCARVEOL	0.23		
94	43.36	ESTRAGOL	0.05		
95	43.67	ACETATE TERPENIQUE	0.67		

96	44.00	ZONARENE	0.19		
97	44.17	alpha-HUMULENE	0.60		
98	44.45	ACETATE DE Trans-SABINYLE	0.05		
99	44.54	ALCOOL 2,4-DIMETHYLPHENYLIQUE	0.03		
100	44.97	ACETATE MYRTENYLE	0.04		
101	45.38	gamma-MUUROLENE	0.53		
102	45.65	alpha-TERPINEOL	0.20		
103	45.85	LEDENE	0.83		
104	45.90	BORNEOL	1.06		
105	46.18	GERMACRENE D	0.08		
106	46.81	MUUROLENE ISOMERE	0.10		
107	46.95	CADINENE ISOMERE	0.06		
108	47.12	beta-SELINENE	0.15		
109	47.41	ACETATE DE NERYLE	0.18		
110	47.51	alpha-MUUROLENE + alpha-SELINENE	0.30		
111	47.65	CARVONE	0.13		
112	47.98	ALCOOL TERPENIQUE	0.03		
113	48.50	ACETATE DE CARVYLE	0.04		
114	48.80	ALCOOL TERPENIQUE	0.06		
115	49.26	ACETATE DE GERANYLE	0.06		
116	49.49	delta-CADINENE	1.56		
117	49.74	gamma-CADINENE	0.05		
118	50.12	CUMINAL	0.06		
119	50.51	beta-SESQUIPELLANDRENE	0.06		
120	50.84	MYRTENOL	0.15		
121	51.21	CADINA-1,4-DIENE	0.16		
122	51.42	Trans-p-MENTHA-1,8-DIEN-2-OL	0.04		
123	51.66	NEROL	0.03		
124	51.85	ESTER HEXENYLIQUE	0.02		
125	52.62	DEHYDRO-alpha-IONONE	0.04		
126	53.27	Trans-ANETHOL	1.15		
127	53.60	Trans-CARVEOL	0.08		
128	53.63	CALAMENENE	0.13		
129	53.93	p-CYMENE-8-OL	0.05		
130	56.23	CÉTONE ALIPHATIQUE	0.03		
131	56.34	COMPOSÉ AROMATIQUE	0.04		
132	56.56	COMPOSÉ Mw=274	0.04		
133	56.74	COMPOSÉ AROMATIQUE	0.02		
134	58.20	PENTAMETHYL DIHYDRO INDENE Mw=188	0.10		
135	58.23	alpha-CALACORENE	0.43		
136	58.82	PALUSTROL	0.26		
137	59.06	EPOXYDE SESQUITERPENIQUE	0.16		
138	59.37	CUBEBOL	0.11		
139	59.91	COMPOSÉ AROMATIQUE	0.02		
140	60.51	beta-CALACORENE	0.07		
141	61.30	OXYDE D'ISOCARYOPHYLLENE	0.11		
142	61.72	OXYDE DE CARYOPHYLLENE	1.49		
143	62.05	SESQUITERPENOL	0.07		
144	62.61	METHYLEUGENOL	0.06		
145	63.31	SESQUITERPENOL	0.04		
146	63.58	EPOXYDE SESQUITERPENIQUE	0.07		
147	64.15	LEDOL	1.65		

148	64.46	Epoxy-6,7-HUMULENE	0.04		
149	64.66	EPOXYDE SESQUITERPENIQUE	0.17		
150	65.40	GLEENOL	0.14		
151	65.66	Épi-CUBENOL	0.09		
152	65.96	CUBENOL	0.30		
153	66.17	SESQUITERPENOL	0.03		
154	66.39	GLOBULOL	0.20		
155	67.05	VIRIDIFLOROL	6.76		
156	67.35	COMPOSÉ MENTHADIENIQUE	0.10		
157	67.82	SPATHULENOL	0.21		
158	68.85	EPOXYDE SESQUITERPENIQUE	0.24		
159	70.11	EUGENOL	0.13	0.13	
160	71.22	THYMOL	0.04		
161	71.58	LEVOJUNENOL	0.66		
162	72.06	alpha-MUUROLOL	0.24		
163	72.54	delta-CADINOL	0.07		
164	72.72	CARVACROL	0.09		
165	73.37	SESQUITERPENOL	0.10		
166	73.79	CADALENE	0.18		
167	74.01	alpha-BISABOLOL	0.04		
168	74.11	ISOSPATHULENOL	0.04		
169	74.39	alpha-CADINOL	0.08		
170	75.36	COMPOSÉ AROMATIQUE	0.14		
171	75.55	SESQUITERPENONE Mw=218	0.06		
172	77.15	GERANYL-alpha-TERPINENE	0.13		
173	77.59	ACIDE 3-CAMPHENILANE CARBOXYLIQUE	0.22		
174	77.90	COMPOSÉ AROMATIQUE	0.12		
175	78.20	COMPOSÉ AROMATIQUE	0.07		
176	78.93	EPOXYDE SESQUITERPENIQUE	0.09		
177	80.74	COMPOSÉ AROMATIQUE	0.08		
178	83.28	DITERPENE Mw=272	0.08		
179	85.90	BENZOATE DE BENZYLE	0.04		0.04
		TOTAL	99.73		1.22

Anexo II.

Tabla de compuestos de cromatografía de gases de *Peperomia inaequalifolia*

Pics	TR (min)	Constituants	%	Norme (%)	Allergènes (%)
1	8,4	alpha-PINENE	0,56		
2	9,5	CAMPHENE	0,08		
3	10,8	beta-PINENE	0,91		
4	11,2	SABINENE	0,29		
5	12,8	beta-MYRCENE	0,29		
6	13,0	alpha-PHELLANDRENE	0,14		
7	13,6	alpha-TERPINENE	0,02		
8	14,5	LIMONENE	0,68		0,68
9	15,0	1,8-CINEOLE + beta-PHELLANDRENE	1,44		
10	15,2	1,3,8-p-MENTHATRIENE	0,01		
11	16,1	Cis-beta-OCIMENE	0,56		
12	16,7	gamma-TERPINENE	0,09		
13	17,1	Trans-beta-OCIEMENE	2,96		

14	17,3	3-OCTANONE	0,06		
15	18,0	p-CYMENE	0,11		
16	18,7	TERPINOLENE	0,04		
17	24,1	ALLO-OCIMENE	0,01		
18	25,1	2-NONANONE	0,09		
19	27,8	CAPRYLATE D'ETHYLE	0,01		
20	29,5	alpha-CUBEBENE	0,03		
21	30,1	SESQUITERPENE	0,03		
22	30,3	ALCOOL ALIPHATIQUE	0,03		
23	30,8	COMPOSE TERPENIQUE	0,11		
24	31,1	ESTER ALIPHATIQUE	0,01		
25	31,2	YLANGENE	0,02		
26	31,6	DIHYDROEDULAN ISOMERE	0,05		
27	31,7	alpha-COPAENE	0,32		
28	32,7	CAMPHRE	0,02		
29	32,8	alpha-BOURBONENE	0,05		
30	33,1	2-NONANOL	0,02		
31	33,3	beta-BOURBONENE	0,79		
32	33,7	COMPOSE AROMATIQUE Mw=162	0,05		
33	33,8	alpha-GURJUNENE	0,11		
34	34,5	beta1-CUBENENE	0,12		
35	34,6	LINALOL	0,06		0,06
36	34,8	SESQUITERPENE	0,03		
37	35,9	PINOCARVONE	0,02		
38	36,2	alpha-trans-BERGAMOTENE	0,05		
39	36,5	SESQUITERPENE	0,01		
40	36,6	epsilon-CADINENE + ACETATE DE BORNYLE	0,32		
41	36,8	SESQUITERPENE	0,05		
42	37,3	CALARENE ISOMERE	0,02		
43	37,6	beta-ELEMENE	0,75		
44	38,0	beta-CARYOPHYLLENE	3,23		
45	38,2	2-UNDECANONE	0,12		
46	38,4	SESQUITERPENE	0,04		
47	38,5	SESQUITERPENE	0,03		
48	38,8	AROMADENDRENE	0,80		
49	39,0	SESQUITERPENE	0,01		
50	39,1	COPACAMPHENE	0,04		
51	39,2	CUBEBENE ISOMERE	0,04		
52	39,5	ESTER ALIPHATIQUE	0,02		
53	39,7	ESTER ALIPHATIQUE	0,03		
54	40,1	CADINADIENE ISOMERE	0,01		
55	40,2	ESTER TERPENIQUE	0,02		
56	40,5	FARNESENE ISOMERE	0,04		
57	40,6	GERMACRENE A	0,09		
58	40,7	ALCOOL ALIPHATIQUE	0,01		
59	40,9	ALLO-AROMADENDRENE	0,23		
60	41,4	SESQUITERPENE	0,02		
61	41,8	alpha-HUMULENE	0,17		
62	42,0	ESTRAGOLE	0,15		
63	42,3	E-beta-FARNESENE	3,13		
64	42,5	ACETATE DE CITRONELLYLE	0,10		
65	42,7	Cis-4,5-MUUROLADIENE	0,09		

66	43,2	NERAL	0,04		0,04
67	43,3	Z-beta-FARNESENE	0,03		
68	43,5	gamma-MUUROLENE	0,31		
69	43,7	ACETATE DE TERPENYLE	0,54		
70	43,8	BORNEOL	0,09		
71	44,1	alpha-TERPINEOL	0,40		
72	44,2	LEDENE	0,41		
73	45,1	GERMACRENE D	15,11		
74	45,2	EREMOPHILENE + beta-SELINENE	0,11		
75	45,5	alpha-ZINGIBERENE + alpha-SELINENE	1,04		
76	45,8	beta-BISABOLENE + alpha-MUUROLENE	1,01		
77	46,2	BICYCLOGERMACRENE	2,53		
78	46,5	Cis-alpha-BISABOLENE	0,04		
79	46,8	beta-CURCUMENE	0,01		
80	47,0	alpha-FARNESENE	0,17		
81	47,3	ACETATE DE GERANYLE	0,03		
82	47,4	delta-CADINENE	0,83		
83	47,6	gamma-CADINENE	0,28		
84	47,8	SESQUITERPENE	0,07		
85	48,3	beta-SESQUIPELLANDRENE	0,69		
86	48,4	alpha-CURCUMENE	0,02		
87	48,8	Trans-alpha-BISABOLENE	0,01		
88	49,0	CADINA-1,4-DIENE	0,04		
89	49,5	alpha-AMORPHENE	0,08		
90	49,8	ALCOOL ALIPHATIQUE	0,02		
91	50,0	SESQUITERPENE	0,01		
92	50,4	ESTER ALIPHATIQUE	0,02		
93	50,9	NEROL	0,06		
94	51,5	GERMACRENE B	0,10		
95	51,7	CALAMENENE	0,04		
96	52,0	METHYL PHENYLPROPIONATE Mw=164	0,01		
97	52,7	GERANIOL	0,01		0,01
98	52,9	E-GERANYL ACETONE	0,03		
99	53,5	SAFROLE	8,37		
100	54,4	COMPOSE CETONIQUE	0,04		
101	55,0	Epi-CUBEBOL	0,07		
102	55,4	COMPOSE CETONIQUE	0,02		
103	56,1	alpha-CALACORENE	0,02		
104	56,4	SESQUITERPENOL	0,02		
105	56,5	SESQUITERPENOL	0,01		
106	56,6	SESQUITERPENOL	0,03		
107	57,3	PALUSTROL	0,07		
108	57,8	BISABOLOL ISOMERE	0,07		
109	58,5	ACETATE DE PHYTYLE	0,01		
110	59,1	beta-CALACORENE	0,01		
111	59,6	NEPETALACTONE ISOMERE Mw=166	2,01		
112	60,0	OXYDE DE CARYOPHYLLENE	0,31		
113	60,4	MAALIOL ISOMERE	0,02		
114	60,6	EPOXYDE SESQUITERPENIQUE	0,02		
115	60,7	SESQUITERPENOL	0,09		
116	61,2	E-METHYLEUGENOL	5,07		
117	61,5	Epi-GLOBULOL	0,18		

118	62,2	COMPOSE Mw=220	1,11		
119	62,5	LEDOL	0,13		
120	62,7	EPOX-6,7-HUMULENE	0,26		
121	62,9	NEPETALACTONE ISOMERE Mw=166	0,07		
122	63,4	NEROLIDOL	0,08		
123	63,5	GERMACRENE D-4-OL	0,03		
124	63,7	GLEENOL + EPOXYDE SESQUITERPENIQUE	0,17		
125	64,1	Epi-CUBENOL	0,07		
126	64,7	GLOBULOL	0,78		
127	65,1	VIRIDIFLOROL	0,23		
128	65,4	SESQUITERPENOL	0,04		
129	65,5	COMPOSE CETONIQUE Mw=192	0,18		
130	66,0	10-epi-gamma-EUDESOL	0,14		
131	66,1	EUDESMA-5-EN-11-alpha-OL	0,09		
132	66,5	ROSIFOLIOL	0,06		
133	66,6	beta-SESQUIPELLANDROL	0,11		
134	67,1	SPATHULENOL	0,25		
135	67,2	BENZOATE DE Cis-HEXENYLE	0,05		
136	67,7	ESTER ALIPHATIQUE	0,08		
137	67,9	EPOXYDE SESQUITERPENIQUE	0,04		
138	68,1	TRIMETHYL PENTADECANONE	0,10		
139	68,4	MINT SULFIDE Mw=236	0,06		
140	68,8	GERANYL-alpha-TERPINENE ISOMERE Mw=272	0,57		
141	69,2	gamma-EUDESOL	0,06		
142	69,3	T-CADINOL	0,13		
143	69,6	SESQUITERPENOL	0,04		
144	69,8	SESQUITERPENOL	0,05		
145	70,1	alpha-MUUROLOL	0,17		
146	70,7	delta-CADINOL	0,09		
147	71,3	alpha-EUDESOL	0,04		
148	72,0	ELEMICINE	22,94		
149	72,3	alpha-CADINOL	0,14		
150	72,4	GERANYL p-CYMENE	0,23		
151	73,4	MYRISTICINE	9,76		
152	75,4	SESQUITERPENOL	0,08		
153	76,0	FARNESOL	0,02		0,02
154	77,8	EPOXYDE SESQUITERPENIQUE	0,02		
155	79,7	Trans-ISOELEMICINE	0,03		
156	81,8	COMPOSE AROMATIQUE Mw=270	0,21		
157	89,1	COMPOSE Mw=268	0,05		
158	89,5	PHYTOL	0,55		
159	89,7	EPOXYDE SESQUITERPENIQUE	0,04		
160	94,1	ESTER ALIPHATIQUE	0,02		
161	100,7	ACIDE PALMITIQUE	0,05		
		TOTAL	99,89		0,81

Anexo III.

Tabla de compuestos de cromatografía de gases de *Tagetes minuta*

Pics	TR (min)	Constituants	%	Norme (%)	Allergènes (%)
1	4,5	ACETONE	0,06		
2	5,2	NONANE	0,01		
3	6,8	METHYL ISOBUTYL CETONE	0,01		
4	7,1	ESTER ALIPHATIQUE	0,02		
5	7,5	alpha-PINENE	0,10		
6	7,6	alpha-THUYENE	0,01		
7	7,7	PRENOL	0,01		
8	8,3	2-METHYLBUTYRATE D'ETHYLE	0,05		
9	8,8	CAMPHENE	0,04		
10	10,3	beta-PINENE	0,04		
11	10,7	ACETATE D'ISOAMYLE	0,02		
12	10,8	SABINENE	0,68		
13	11,5	2-METHYLBUTYRATE D'ISOBUTYLE	0,01		
14	12,2	COMPOSÉ Mw=138	0,01		
15	12,5	beta-MYRCENE	0,08		
16	12,7	alpha-PHELLANDRENE	0,07		
17	13,4	alpha-TERPINENE	0,04		
18	14,4	LIMONENE	6,60		6,60
19	14,7	1,8-CINEOLE	0,13		
20	14,8	beta-PHELLANDRENE	0,05		
21	15,0	COMPOSÉ TERPENIQUE Mw=136	0,01		
22	16,3	Cis-beta-OCIMENE	17,35		
23	16,8	gamma-TERPINENE	0,31		
24	17,2	Trans-beta-OCIMENE	0,35		
25	18,2	p-CYMENE	0,28		
26	18,3	ACETATE D'HEXYLE	0,01		
27	18,9	TERPINOLENE	0,09		
28	19,3	OCTANAL	0,05		
29	20,5	DIHYDROTAGETONE	11,52		
30	20,9	ACETATE DE cis-3-HEXENYLE	0,03		
31	21,8	COMPOSÉ Mw=110	0,02		
32	22,1	COMPOSÉ METHOXY HEXADIENIQUE Mw=152	0,54		
33	22,5	COMPOSÉ METHOXY HEXADIENIQUE	0,07		
34	24,2	CETONE ALIPHATIQUE	0,03		
35	24,5	ALLO-OCIMENE	0,30		
36	25,5	2-NOANONE	0,02		
37	25,7	NONANAL	0,05		
38	25,9	ALLO-OCIMENE ISOMERE	0,02		
39	26,3	CETONE ALIPHATIQUE	0,02		
40	27,3	COMPOSÉ METHOXY TERPENIQUE Mw=152	0,31		
41	27,8	COMPOSÉ Mw=152	0,02		
42	28,2	SESQUITERPENE	0,04		
43	28,4	SESQUITERPENE	0,03		
44	29,3	ARTEMISIA CETONE	0,15		
45	29,4	SESQUITERPENE	0,06		

46	29,8	SESQUITERPENE	0,02		
47	30,4	ESTER ALIPHATIQUE	0,10		
48	30,5	SESQUITERPENE	0,06		
49	30,6	SESQUITERPENE	0,02		
50	31,0	SESQUITERPENE	0,01		
51	31,2	SESQUITERPENE	0,02		
52	31,3	ALCOOL ALIPHATIQUE	0,03		
53	31,5	COMPOSÉ Mw=152	0,07		
54	31,7	COMPOSÉ Mw=152	0,02		
55	32,0	CYCLOSATIVENE	0,06		
56	32,2	E-TAGETONE	4,43		
57	32,5	CAMPBRE + SESQUITERPENE	1,42		
58	33,4	Z-TAGETONE	16,23		
59	33,7	COMPOSÉ CÉTONIQUE	0,02		
60	33,9	MODHEPHENE	0,11		
61	34,2	SESQUITERPENE	0,06		
62	34,4	alpha-GURJUNENE	0,33		
63	34,7	alpha-ISOCOMENE	0,03		
64	35,2	beta1-CUBEBENE	0,02		
65	35,5	LINALOL	0,47		0,47
66	36,0	1-OCTANOL	0,04		
67	36,8	SESQUITERPENE	0,02		
68	37,0	ESTER ALIPHATIQUE	0,05		
69	37,5	ACETATE DE BORNYLE	0,03		
70	37,6	TAGETENONE ISOMERE Mw=150	0,24		
71	37,7	SESQUITERPENE + CETONE TERPENIQUE	0,06		
72	38,1	CALARENE	0,02		
73	38,2	TAGETENONE ISOMERE	0,09		
74	38,3	beta-ELEMENE	0,03		
75	38,5	beta-CARYOPHYLLENE	0,71		
76	38,8	TERPINENE-4-OL	0,25		
77	38,9	SESQUITERPENE	0,19		
78	39,2	AROMADENDRENE	1,32		
79	39,4	SESQUITERPENE	0,10		
80	39,5	SESQUITERPENE	0,06		
81	39,7	COPACAMPHENE	0,14		
82	40,4	COMPOSÉ Mw=150	0,04		
83	40,7	SESQUITERPENE	0,04		
84	41,0	SESQUITERPENE	0,02		
85	41,2	SESQUITERPENE	0,03		
86	41,4	ALLO-AROMADENDRENE	0,48		
87	41,5	2-DECENAL	4,29		
88	42,1	SESQUITERPENE	0,06		
89	42,4	ZONARENE	0,23		
90	42,9	alpha-HUMULENE	0,29		
91	43,0	COMPOSÉ Mw=150	0,02		
92	43,3	SESQUITERPENE	0,01		
93	43,9	NERAL	0,03		0,03
94	44,1	SESQUITERPENE	0,04		
95	44,3	E-TAGETENONE	5,26		
96	44,4	SESQUITERPENE	0,07		

97	44,5	LEDENE	1,15		
98	44,7	SESQUITERPENE	0,06		
99	45,2	SESQUITERPENE	0,05		
100	45,5	Z-TAGETENONE	5,26		
101	45,9	GERMACRENE D	0,10		
102	46,2	beta-SELINENE	0,08		
103	46,3	alpha-SELINENE	0,15		
104	46,5	alpha-MUUROLENE	0,10		
105	46,7	BICYCLOGERMACRENE	1,01		
106	47,9	2-UNDECENAL	0,62		
107	48,1	alpha-FARNESENE	0,20		
108	48,2	delta-CADINENE	1,13		
109	48,4	1-DECANOL	0,32		
110	48,8	COMPOSÉ AROMATIQUE Mw=166	0,06		
111	49,0	ESTER ALIPHATIQUE	0,05		
112	49,2	alpha-BISABOLENE	0,01		
113	49,6	CADINA-1,4-DIENE	0,21		
114	50,4	SESQUITERPENE Mw=202	0,04		
115	51,0	E,E-2,6-DIMETHYL-3,5,7-OCTATRIENE-2-OL	0,08		
116	51,5	ALCOOL ALIPHATIQUE	0,49		
117	51,9	Z,Z-2,6-DIMETHYL-3,5,7-OCTATRIENE-2-OL	0,09		
118	52,5	CALAMENENE	0,19		
119	52,7	ISOPIPERITENONE	0,11		
120	54,1	2-DODECENAL	2,22		
121	55,9	ESTER ALIPHATIQUE	0,17		
122	56,3	ESTER ALIPHATIQUE	0,01		
123	56,7	alpha-CALACORENE	0,01		
124	57,0	ALCOOL ALIPHATIQUE	0,02		
125	57,2	EPOXYDE SESQUITERPENIQUE	0,04		
126	57,6	ESTER ALIPHATIQUE	0,10		
127	57,7	EPOXYDE SESQUITERPENIQUE	0,17		
128	58,2	ESTER ALIPHATIQUE	0,09		
129	58,3	ESTER ALIPHATIQUE	0,07		
130	59,4	SESQUITERPENE Mw=202	0,03		
131	60,0	OXYDE DE CARYOPHYLLENE	0,12		
132	60,6	SESQUITERPENOL	0,08		
133	61,4	SESQUITERPENOL	0,05		
134	61,8	SESQUITERPENOL	0,08		
135	62,2	Épi-GLOBULOL	0,26		
136	62,4	SESQUITERPENOL	0,02		
137	62,7	ALCOOL ALIPHATIQUE	0,06		
138	63,0	LEDOL	0,07		
139	63,3	SESQUITERPENOL	0,04		
140	63,5	SESQUITERPENOL	0,10		
141	63,7	NEROLIDOL	0,73		
142	64,3	GLEENOL	0,32		
143	64,5	SESQUITERPENOL	0,16		
144	64,9	CUBENOL	0,36		
145	65,4	GLOBULOL	0,98		
146	65,6	2-TETRADECENAL	1,37		
147	65,8	VIRIDIFLOROL	0,29		

148	66,9	10-épi-gamma-EUDESOL	0,20		
149	67,4	ROSIFOLIOL	0,37		
150	67,8	SPATHULENOL	0,23		
151	68,1	EPOXYDE SESQUITERPENIQUE	0,02		
152	68,8	EPOXYDE SESQUITERPENIQUE	0,06		
153	69,5	EUGENOL	0,03		0,03
154	69,8	SESQUITERPENOL	0,05		
155	70,1	SESQUITERPENOL	0,04		
156	70,4	T-CADINOL	0,03		
157	70,8	THYMOL	0,04		
158	70,9	alpha-MUUROLOL	0,05		
159	71,0	SESQUITERPENOL	0,06		
160	71,3	SESQUITERPENOL	0,02		
161	71,5	delta-CADINOL	0,12		
162	71,8	EPOXYDE SESQUITERPENIQUE	0,03		
163	72,0	EPOXYDE SESQUITERPENIQUE	0,02		
164	72,2	COMPOSÉ AROMATIQUE	0,02		
165	72,4	EPOXYDE SESQUITERPENIQUE	0,01		
166	72,8	beta-NOOTKATOL	0,10		
167	73,0	COMPOSÉ MW=166	0,09		
168	74,0	SESQUITERPENOL	0,02		
169	74,3	SESQUITERPENOL	0,01		
170	75,0	ACIDE CAPRIQUE	0,16		
171	76,1	ESTER ALIPHATIQUE	0,01		
172	76,2	ESTER ALIPHATIQUE	0,04		
173	77,1	COMPOSÉ AROMATIQUE Mw=302	0,02		
174	78,0	COMPOSÉ AROMATIQUE Mw=302	0,02		
175	79,4	COMPOSÉ AROMATIQUE	0,04		
176	79,5	COMPOSÉ AROMATIQUE	0,01		
177	79,8	COMPOSÉ AROMATIQUE Mw=286	0,02		
178	80,0	EPOXYDE SESQUITERPENIQUE	0,04		
179	80,3	COMPOSÉ AROMATIQUE Mw=286	0,04		
180	80,8	COMPOSÉ AROMATIQUE	0,04		
181	82,9	ESTER ALIPHATIQUE	0,12		
182	84,5	COMPOSÉ AROMATIQUE	0,10		
183	84,7	EPOXYDE SESQUITERPENIQUE	0,03		
184	86,7	COMPOSÉ AROMATIQUE Mw=300	0,20		
185	86,9	COMPOSÉ AROMATIQUE Mw=302	0,04		
		TOTAL	99,64		7,13