

PROTECCIÓN INDIVIDUAL

Boletín de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental
Vol XXX. Nº1-4. Marzo – Diciembre, 1990.

PROTECCIÓN PERSONAL CON UN REPELENTE NATURAL CONTRA *LUTZOMYIA YOUNGI*, VECTOR DE LEISHMANIASIS CUTÁNEA URBANA EN VENEZUELA.

Elina Rojas y José Vicente Scorza.

RESUMEN

Ante la actividad hematofágica intradomiciliar de *Lutzomyia youngi*, principal transmisor de leishmaniasis cutánea urbana en la ciudad de Trujillo, Venezuela, se ensaya el uso de repelentes como protectores personales.

Se compara la actividad del aceite de limón obtenido por los autores con la del citronellal y el deet, tanto en experiencias de laboratorio como de campo. La actividad protectora en el laboratorio fue de 70, 63 y 33 para el aceite esencial, deet y el citronellal respectivamente. La dosis efectiva media (DE₅₀) para el aceite esencial fue de 7,46 µg/cm² de piel con efecto similar al deet. Los coeficientes de protección en condiciones de campo, usando tres voluntarios, fueron de 84,8 para el aceite esencial y 3,7 para el deet.

Transactions of the Royal Society of Tropical
Medicine and Hygiene 1991. 85, 803.

THE USE OF LEMON ESSENTIAL OIL AS A SANDFLY REPELLENT

Elina Rojas y J.V. Scorza.

SUMMARY

Over sixty years ago NEWHAM (1928) recommended a simple preventive against mosquito bites. That note, appearing in this journal, led us to investigate the effect of a lemon essential oil against *Lutzomyia youngi*, an indoor biting sandfly, incriminated as the vector of leishmaniasis in the Andean region of western Venezuela.

The essential oil was extracted from lemon leaves (*Citrus medica L.*) by steam distillation. The yield obtained was about 13g. of oil from 1kg. of green lemon leaves.

Under laboratory and field conditions the oil's activity was measured and compared with Deet[®] (Aldrich Chemical Co.) and Citronella[®] (Sigma Chemical Co.), using acetone as diluent and control.

For laboratory experiments, 0.05ml. of serial dilutions, ranging from 10mg/ml to 0.01mg/ml, were spread on a circle 28mm. in diameter on the forearms of volunteers. Five, 10 and 60 min. After each application, the treated skin was exposed to the bite of 8-19 sandflies for 20 min, and then the number of bites and/or the number of partially or fully engorged insects was counted.

Under field conditions, in a coffee plantation where sandflies bite a night at rates of about 200/h, the forearms or legs of several volunteers, including the authors', were coated with 10 ml. of a 1/100 solution of Deet[®], Citronella[®] or lemon essential oil, using acetone as a control on the opposite extremity. Thirty minutes after application, the numbers of sandflies that had bitten the treated and untreated skin were counted.

The results revealed that, at identical concentrations, the lemon essential oil gave 70% protection against the bites of *Lu. youngi*, more than that provided by Deet[®] and Citronella[®], which gave 63% and 33% protection respectively. Because of the simplicity of its extraction, its cheapness, and its protective activity, we recommend lemon essential oil to other researchers as an effective repellent for sandflies.

Revista Ambiente Ecológico, 1999

<http://www.ambiente-ecológico.com>

EXTRACCIÓN Y RENDIMIENTO DE ACEITE ESENCIAL DE HOJAS DE *Citrus medica* CON USO PARA LA PROTECCIÓN PERSONAL CONTRA MOSQUITOS TRANSMISORES.

Elina M Rojas

RESUMEN

El limón (*Citrus sp.*) de la familia Rutaceae, es un cítrico de cultivo muy extendido por su variado uso doméstico y porque no exige demasiada atención para su mantenimiento.

Según WEBBER & BASTCHELOR (1943), el limonero fue introducido en Las Antillas con el Segundo Viaje de Cristóbal Colón y desde entonces comenzó su expansión por América. Se cuentan 16 especies del género *Citrus*, con distribución cosmopolita. Esta clasificación es muy controvertida. Poster (1967

Aparte del valor alimenticio e industrial de su fruto, el limonero se cultiva por su importancia para la obtención de aceites esenciales del fruto, con uso industrial como saborante, aromatizante y cosmético, lo cual ha sido bien documentado por GUENTHER (1949). Como repelente lo reporta NEWHAN (1928) para el aceite del fruto y ROJAS & SCORZA (1990 y 1991) para el aceite de las hojas.

En la composición de los aceites esenciales de limón según ZIEGLER (1971), participa un aldehído predominante (citronelal) y otros 24 derivados alcohólicos monoterpénicos y sesquiterpénicos. Estos compuestos comprenden el 1% del aceite esencial, y el 99% restante está integrado por siete fracciones, donde predominan α limoneno, β pineno y terpineno, (datos proporcionados por un análisis químico industrial elaborado por Supelco Inc; 1978 en Lanças (1990).

Desde el punto de vista comercial, la extracción de los aceites esenciales de limón ha sido problema importante para obtener mayor rendimiento. LAURENT (1979) señala a Venezuela como uno de los países con mayor producción de aceites esenciales de

limón, sin precisar cual es el método empleado para extraerlo, ni la variedad del fruto productor. El método de extracción más antiguo y aún hoy en día usado, es el llamado "di la scorzeta" o exprimido de la cáscara del fruto, absorbido por una esponja natural o sintética (SHAW, 1979). Su extracción por arrastre con corriente de vapor es fácil, práctica, sencilla y económica y puede hacerse a partir de cualquier parte de la planta (DOMINGUEZ,1979).

La extracción de néctares del fruto por medios mecánicos permite también la obtención de aceites por procedimientos secundarios como el centrifugado del agua que queda en el envase que contiene la parte vegetal usada y que rinde aceites esenciales, usados como base para la elaboración de pinturas.(Richard, 1983, Benincara, 1990)

En los últimos años, la aparición de resistencia a algunos insecticidas en mosquitos transmisores de enfermedades del hombre, así como exageradas críticas ecologistas, han propiciado un regreso a métodos anteriormente usados para combatir molestias transmitidas por insectos plagas por medios naturales. La búsqueda de productos naturales para el control de plagas y vectores de enfermedades se ha hecho más importante al demostrarse que algunos componentes de estos aceites esenciales, tienen propiedad repelente para algunos dipteros de importancia en salud pública. ROJAS & SCORZA (1990 y 1991) han demostrado que el aceite esencial obtenido por corriente de vapor de agua de hojas de *Citrus medica*, a partir de hojas cosechadas en horas vespertinas tiene, aparte de su alto rendimiento, efecto repelente cuando se lo usa disuelto en acetona.

Este aceite esencial tiene alta actividad repelente en condiciones de laboratorio y de campo contra *Lutzomyia youngi*, vector de leishmaniasis cutánea en la ciudad de Trujillo, hallazgo éste deducido a partir de las observaciones de NEWHAN (1928) y realizado por Rojas y Scorza (1990, 1991) y además por Rosas (1994) en condiciones de laboratorio, contra *Anopheles albimanus*, *Aedes aegypti* y *Lutzomyia youngi*.

La actividad repelente del aceite esencial de *Citrus medica* en bajas concentraciones y la extraordinaria facilidad para extraerlo, hacen pensar que su obtención y comercialización puede ser una alternativa probable ante el alto costo de los repelentes sintéticos, algunos muy tóxicos y de duración poco efectiva. El aceite esencial

de hojas de limón no sería contaminante para el medio ambiente (Med. Letter, 31 (Nº.792): 45-46, 1989).

En este trabajo reportamos los resultados obtenidos al usar la técnica de extracción por corriente de vapor, simplificando la metodología y midiendo el rendimiento de las hojas de limón cosechadas a diferentes horas del día, con el objetivo de extraer aceite esencial para uso como repelente personal y como fumigante de uso doméstico.

METODOLOGÍA

I MATERIAL BIOLÓGICO

- a. Hojas de *Citrus medica* recolectadas de plantas cultivadas con más o menos 6 años, procedentes del sector El Roble, Estado Trujillo, Venezuela, a 1.100 m.s.n.m., con una temperatura media de 24°C.

Las hojas fueron cosechadas en las mismas horas de la mañana, del mediodía y de la tarde, de forma manual y se depositaron en bolsas de plástico negro para su traslado hasta el sitio de extracción.

Las cosechas (3) se realizaron en el mismo día y los lotes (4) se realizaron en tiempo de poda y en un mismo árbol de edad media productiva.

Se pesaron 1000gr. de hojas por cada cosecha, separándoles el pecíolo y colocándolas en un recipiente **ad hoc**, de 3lts. para hacerle pasar corriente de vapor por cinco horas, con la subsiguiente obtención parcial de aceite extraído.

II MÉTODO DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE HOJAS DE LIMÓN

Empleamos el método de arrastre por corriente de vapor por ser éste uno de los más antiguos y sencillo para alto rendimiento (DOMINGUEZ, 1979). En este método, se utilizan trozos de hojas vegetales, preferiblemente frescas, para evitar la volatilización

de los componentes químicos del aceite. El material se introduce en un envase de vidrio "pyrex" de capacidad, según el peso de la materia prima a utilizar, haciéndole pasar vapor de agua proveniente de una caldera, calentado hasta el punto de evaporación de cada uno de los componentes del aceite esencial. Este aceite es arrastrado por el vapor de agua hacia un serpentín refrigerado que, al enfriarse por efecto refrigerante con agua a temperatura ambiental, permite su colecta en una trampa de vidrio construida para tal fin (Fig.1). Hicimos modificaciones al diseño original de extracción para ajustarlo a las condiciones de pequeños laboratorios, quedando integrado por:

1. Fuente de calor y de vapor, de una olla de esterilización provista de un termostato una válvula de presión manométrica, con capacidad para producir hasta 14lbs. de presión a partir de un volumen de 6lts. de agua demineralizada. La válvula de seguridad fue sustituida por una tubería de cobre y un sistema de manguera que permitió *el libre* paso de la corriente de vapor al sistema de extracción (Fig.2a).
2. Balón de tres bocas de extracción convencional con 3lts. de capacidad para alimentación del sistema, reforzado con manta eléctrica de calentamiento (entrada de vapor, salida de vapor y respiración) (fig.2b).
3. Sistema de condensación compuesto por dos refrigerantes de 24 pulgadas, uno liso y otro con serpentín, que desemboca en un sistema de recolección o trampa, donde se deposita el aceite extraído.
4. La evaporación del aceite esencial se inicia una vez que se alcanza la temperatura de volatilización del mismo; éste se enfría y se almacena, gota a gota, en la trampa. Mediante la apertura de la llave de salida de la trampa, se colecta en un vial prepesado, la capa de aceite sobrenadante, previa evacuación del agua de vapor que lo arrastró hasta el depósito (Fig.2c). Esta maniobra evita el uso de desecantes empleados en el método tradicional de extracción. Al finalizar la extracción, al cabo de unas cinco horas, nuevamente se pesa el vial con aceite y se procede a calcular el rendimiento de la extracción. La fracción de aceite se almacena, debidamente identificada, en

frascos ámbar con capacidad para 3ml. por separado y bajo refrigeración hasta el momento de usarlo en las pruebas como protector contra el ataque de las plagas.

RESULTADOS

1.- Identificación del material vegetal empleado.

El estudio morfológico de los frutos, hojas y flores del limón empleado para la extracción del aceite esencial, conocido localmente como chinoto, se realizó con las claves de identificación de SWINGLE (1949) para subgéneros y especies del género *Citrus*, reconociéndoselo como *Citrus medica* por presentar pecíolos sin alas unidos directamente a la lámina de la hoja y con flores grandes de dos tipos, perfectas o frecuentemente masculinas con ovarios abortados. Frutos grandes con pericarpio muy grueso.

2.- Extracción del aceite esencial de hojas de limón.

Se hicieron cuatro sesiones de extracción de aceite esencial con cuatro diferentes lotes de hojas, cosechadas durante la mañana, al mediodía y por la tarde, midiendo al final de cada hora de extracción, el volumen de aceite extraído, entre el comienzo de la extracción, esto es, al inicio del arrastre por vapor hasta cinco (5) horas, período de tiempo de evaporación de la mitad útil del volumen de agua contenida en la olla de presión.

En la Gráfica 1 mostramos los volúmenes de extracción y su curva media, calculada para tres lotes de hojas y cinco medidas de aceite. La mayor extracción ocurre entre la tercera y cuarta horas de destilación y a partir de éstas y hasta la quinta hora no hay incremento en el rendimiento. Nótese que con el lote II, el rendimiento fue mayor.

3.- Rendimiento de extracción de aceite esencial de limón por hojas cosechadas en la mañana (7:00am.), al mediodía (1:00pm.) y por la tarde (6:00pm.).

En la Gráfica 2 presentamos la data experimental para cuatro lotes de hojas cosechadas en la mañana, cuatro a mediodía y cuatro por la tarde. Se incluyen los rendimientos medios para 5 horas de extracción y las desviaciones estándar de cada cosecha. Un análisis de varianza para comparar los rendimientos medios (Cuadro I) revela que no se registran diferencias entre ellos.

A pesar de que el ANOVA no registró diferencias significativas simultáneas para las medias de los valores de aceite esencial por hojas de tres cosechas en horas diferentes, se observa en el Cuadro II que la medida del rendimiento en hojas de la mañana fue la más alta (1,71), siendo menor la de la tarde (1,4). Considerando estos valores únicamente, se hizo otro ANOVA para comparar las diferencias entre medias (0,31) y entre varianzas (0,7). En el Cuadro II se presentan los resultados.

Este mismo análisis, comparando los rendimientos de aceite esencial de hojas cosechadas entre la 7:00 am y la 1:00 pm no detectó diferencias significativas, como tampoco entre las fracciones obtenidas de las hojas cosechadas entre la 1:00pm y las 6:00pm. Las diferencias observadas revelan que las hojas de la mañana rinden más alto volumen de aceite esencial y que éste disminuye en el curso del día, **siendo significativamente menor a la entrada de la noche.**

4.- Comparación del rendimiento de la extracción por dos métodos

El Cuadro III muestra las principales observaciones resultadas del contraste cualitativo y cuantitativo del método de extracción por arrastre de vapor en condiciones industriales y a baja escala.

COMENTARIOS Y CONCLUSIONES

Hemos podido determinar que el volumen del aceite esencial extraído de hojas de limón rinde mayor cantidad cuando las hojas son cosechadas en horas de la mañana. Aunque no son significativas las diferencias al comparar los lotes de hojas cosechadas, se observan que a medida que transcurre el día, la cantidad de aceite recolectado es menor. El mayor rendimiento, en tiempo, se obtiene entre la tercera y cuarta horas de extracción no habiendo incremento a partir de este período. Aunque la muestra es pequeña, se detectaron diferencias significativas entre los volúmenes de aceite esencial de hojas cosechadas en horas matutinas y en horas vespertinas de una misma cosecha.

La materia prima utilizada para la extracción, hojas de *Citrus medica*, es de fácil obtención porque el cultivo no requiere manejo agronómico muy exigente y, por el contrario, se adapta fácilmente al medio ambiente. Como exige podas de formación, las hojas serían material de desecho en las granjas que producen estos frutos. La extracción del aceite esencial es fácil y económica, se puede hacer en espacios pequeños sin necesidad de costosos equipos y el proceso no es tóxico ni contaminante.

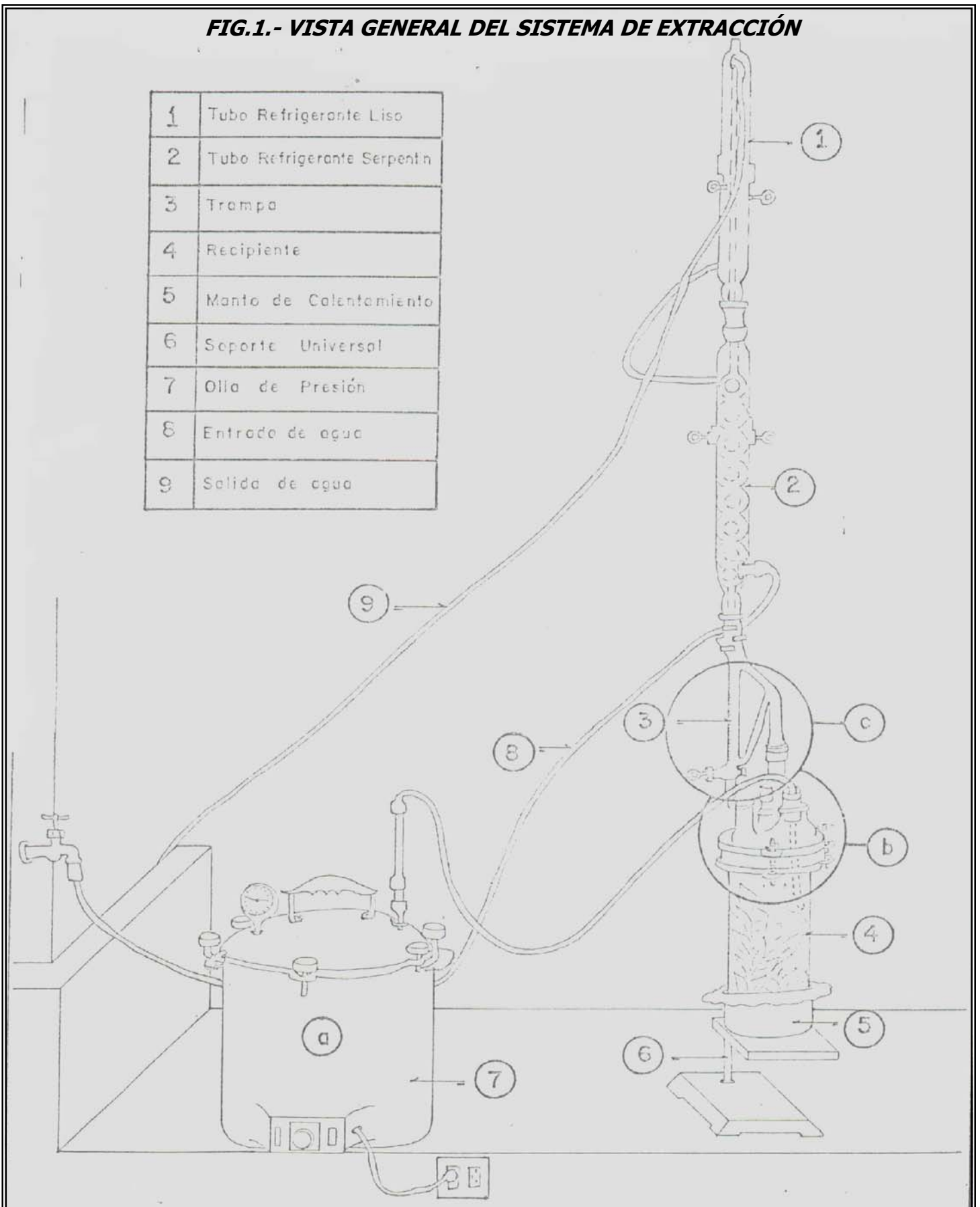
Finalmente, el método modificado presenta mayores ventajas de extracción al reducir el tiempo de calentamiento del sistema y el de funcionamiento lo cual permite ahorrar combustible y producción de vapor por uso manual y puntual según la necesidad del producto.

BIBLIOGRAFÍA

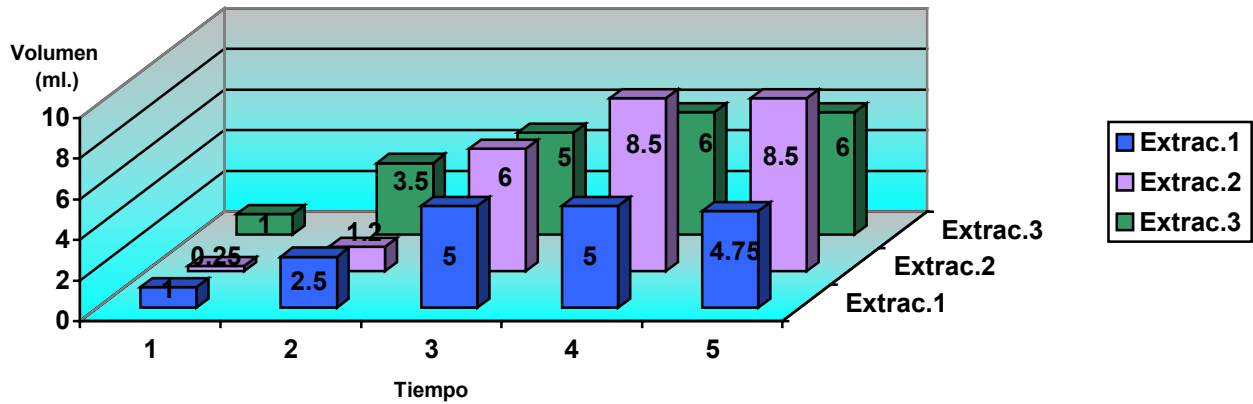
- Benincasa, M., Buiarelli, F., Cartoni, G. P. & Coccioli, F.- Analysis of lemon and bergamot essential oils by HPLC with microbore columns. *Chromatographia*, 30 (5/6): 271-276, 1990.
- Domínguez, X.- Métodos de investigación fitoquímica. Edit. LIMUSA, México, 1979, 281pp.
- Guenther, G.- The essential oils. III vol. D. VanNostrand Co. Inc., 1949.
- Lanças, F.M. & Cavichioli M.- Analysis of the essential oils brazilian citrus fruits by capillary gas chromatography. *J. Of High Chromatograp.*, 13: 207-209, 1990.
- Newham, H.B.- A simple preventive of mosquitos bites. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.*, 21: 247.
- Poster, C.L.- Taxonomy of Flowering Plants. 2da Ed. Freeman, San Francisco, 1967.
- Richard, H.- Developments recents dans le dominae des huiles essentielles. *Fruits*, 38(12): 853-854, 1983.
- Rojas, E. & Scorza, J.V.- Un repelente natural de ***Lutzomyia youngi*** vector natural de leishmaniasis cutánea en Venezuela. *Bol. Dir. Malar y Saneam. Amb.* 20: (31-38), 1990.
- Rojas, E. & Scorza J.V.- The use of lemon essential oil as a sandfly repellent. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.*, 85: 803, 1991.
- Rosas B. Fanny.- Rendimiento de aceite esencial de hojas de ***Citrus medica*** en actividad inhibidora de picaduras por dipteros vulnerantes. Tesis de Grado, NURR, 1994.
- Shaw, P.E.- Review of quantitative analyses of citrus essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, 27: 246-257, 1979.
- Webber, H.J. & Batchelor, L.D.- The citrus industry. Univ. Calif. Press, 1: 1-9, 1943.
- Ziegler, E.- The examination of citrus oil. *Flavour Industr.* 2: 647-653, 1971

FIG.1.- VISTA GENERAL DEL SISTEMA DE EXTRACCIÓN

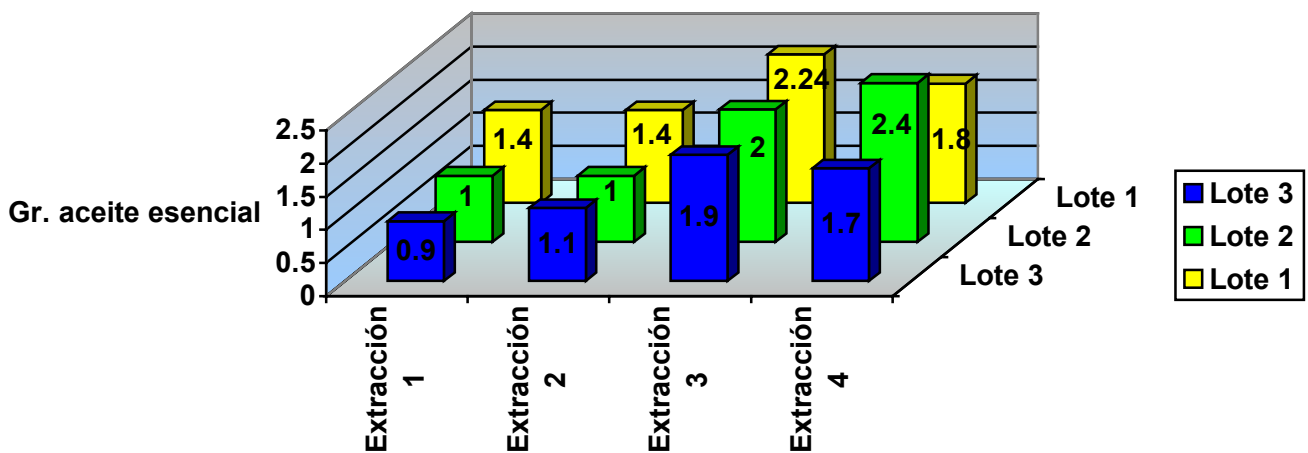
1	Tubo Refrigerante Liso
2	Tubo Refrigerante Serpentin
3	Trampa
4	Recipiente
5	Manto de Calentamiento
6	Soporte Universal
7	Olla de Presión
8	Entrada de agua
9	Salida de agua



Gráfica 1 RENDIMIENTO DE ACEITE ESENCIAL DURANTE EL TIEMPO DE EXTRACCIÓN DE LOTES DE HOJAS DE LIMÓN



Gráfica 2 RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE HOJAS DE *Citrus medica* COSECHADAS A DIFERENTES HORAS DEL DÍA.



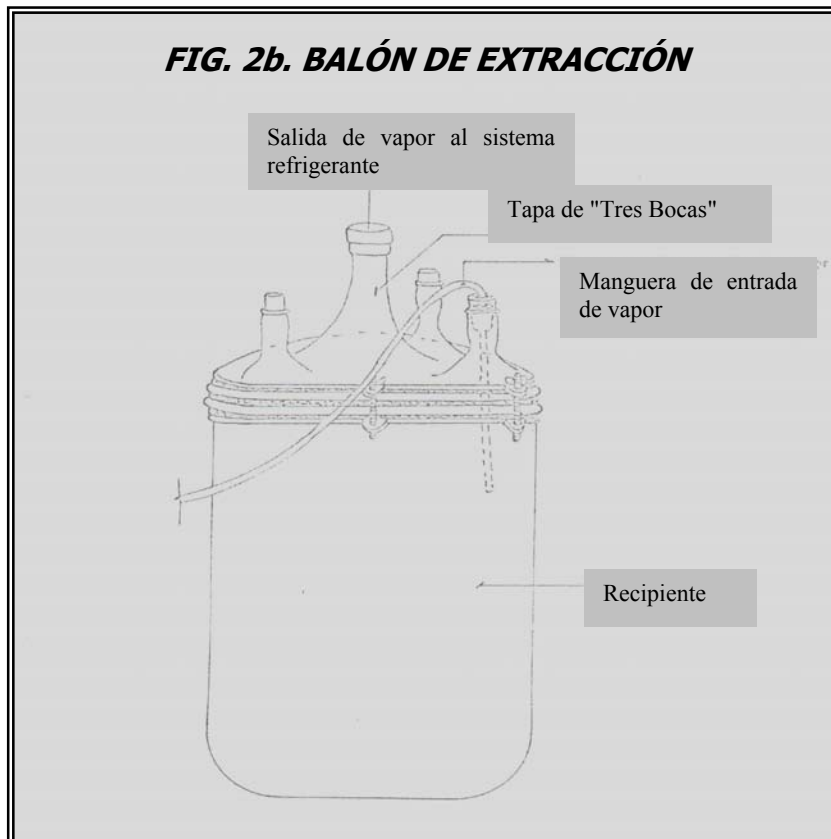
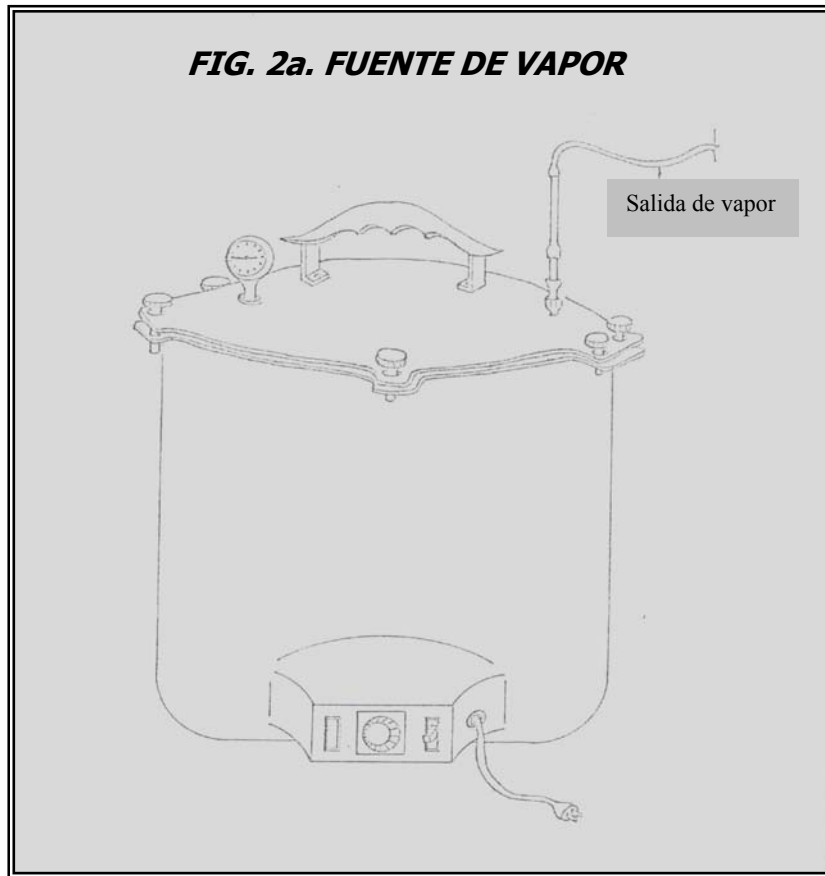
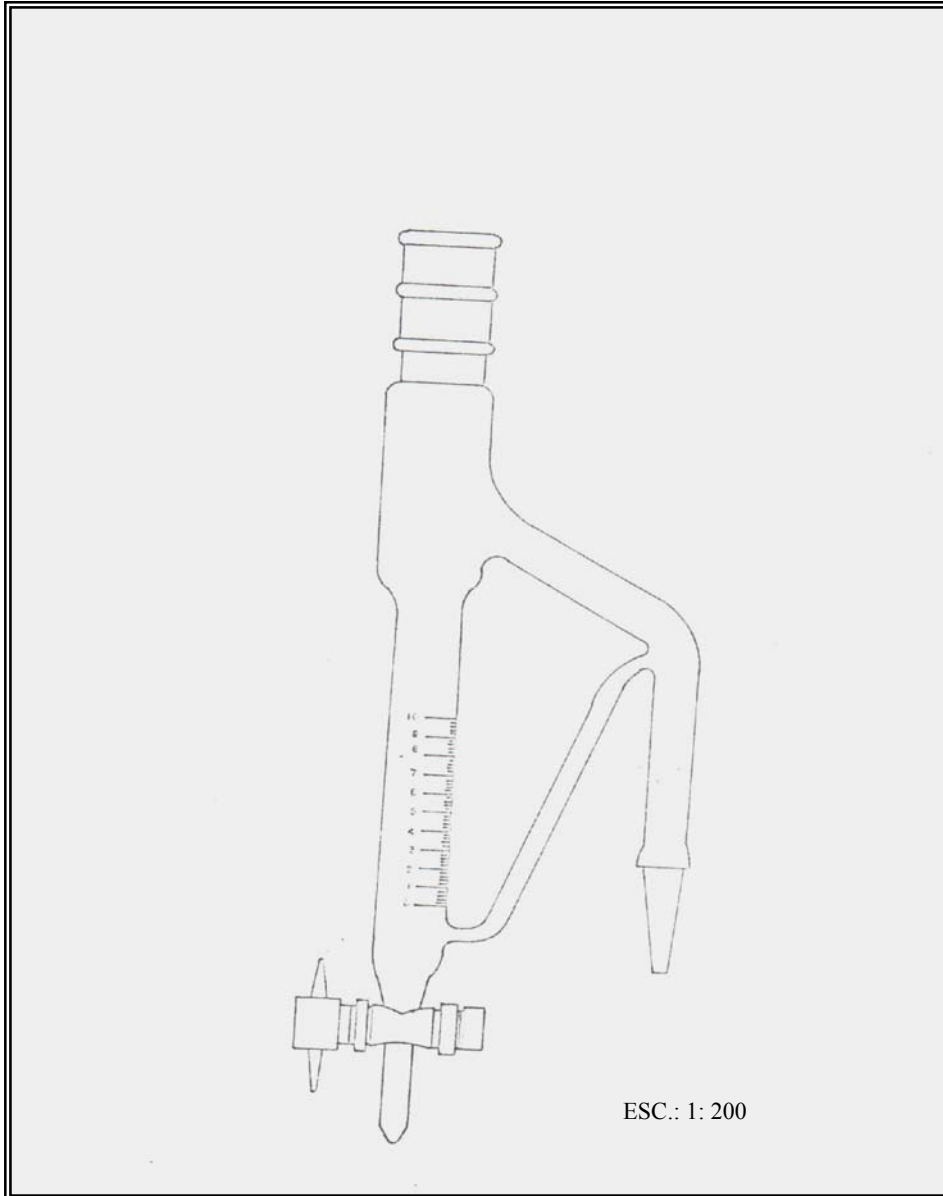


FIG. 2c. TRAMPA DE ALMACENAMIENTO Y COLECTA



CUADRO I

ANÁLISIS DE VARIANZA DE UNA VÍA DE LAS MEDIAS DE RENDIMIENTO DE ACEITE ESENCIAL POR LOTES DE HOJAS COSECHADAS EN LA MAÑANA, AL MEDIODÍA Y POR LA TARDE.

Variable	Lote 1	Lote 2	Lote 3
	7am	1pm.	6pm.
X	1.710000	1.60000	1.40000
σ	0.160400	0.506667	0.22666
F	0.3316452		
SS	2.681196		
$X\sigma$	0.297911		
σX	2.470017E-02		
P	0.7261536		

CUADRO II

ANÁLISIS DE VARIANZA DE DOS VÍAS DE LAS MEDIAS DE RENDIMIENTO DE ACEITE ESENCIAL POR LOTES DE HOJAS COSECHADAS EN LA MAÑANA, AL MEDIODÍA Y POR LA TARDE.

Variable	Lote 1	Lote 2
	7am	6pm.
X	1.710000	1.40000
σ	0.160400	0.22666
FF	27.60105	
SSF	1.120598	
SST	1.353399	
PF	1.098163E-02	
FC	14.20215	
SSC	0.1922016	
PC	3.2697661E-02	

CUADRO III

VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE LIMÓN MEDIANTE CORRIENTE DE VAPOR CON HOJAS DE LIMÓN DE COSECHA MATUTINA.

Extracción por el método tradicional o industrial

Fuente de vapor: Caldera o ignición constante.

Balón de extracción: Cubierto con mantas eléctricas

Tiempo de calentamiento del sistema: Mínimo 5 días

Materia prima para el proceso: 1kgr.

Tiempo inicial para el arrastre: 1/2 hora

Colecta del aceite: Necesario uso de NaSO_4

Tiempo de extracción total: 2 horas

Aceite esencial colectado: 1.8gr.

Extracción por el método modificado

Fuente de vapor: Recipiente para esterilización u olla de presión con manómetro y capacidad de 6lts.

Balón de extracción: Cubierto con manta eléctrica

Tiempo de calentamiento del sistema: 1 hora

Tiempo de funcionamiento del sistema: 5 horas

Materia prima para el proceso: 1kg.

Tiempo inicial para el arrastre del aceite: 1 hora

Colecta del aceite: Sin NaSO_4

Tiempo de extracción total: 5 horas

Aceite esencial colectado: 1.7gr.

AGRADECIMIENTO

La autora desea expresar su agradecimiento por la colaboración prestada para la realización de este trabajo a:

- ◆ Arquitecta Ana Beatriz Mendoza, por la elaboración de las figuras del sistema.
- ◆ Br. Fanny Rosas, por su participación como tesista en los ensayos con el método modificado.
- ◆ Dr. Juan J. Amaro, por permitir el uso de sus instalaciones para la extracción del aceite esencial por el método tradicional.
- ◆ Br. Yasmín Fernández, por transcripción del manuscrito.