

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA COMPOSICIÓN Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA
DE LOS ACEITES ESENCIALES EXTRAÍDOS DE *Lippia alba*, *Lippia
origanoides* y *Phyla (Lippia) dulcis*, ESPECIES DE LA FAMILIA *Verbenaceae***

CLARA NATHALIA CELIS MELO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2007**

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA COMPOSICIÓN Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA
DE LOS ACEITES ESENCIALES EXTRAÍDOS DE *Lippia alba*, *Lippia
origanoides* y *Phyla (Lippia) dulcis*, ESPECIES DE LA FAMILIA *Verbenaceae***

CLARA NATHALIA CELIS MELO

Tesis de grado presentada como requisito
parcial para optar al título de Química

Directora:

ELENA E. STASHENKO, Química, Ph.D.

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2007**

*La dicha de la vida consiste en
tener siempre algo que hacer,
alguien a quien amar y
alguna cosa que esperar.*

Tomas Chalmers

AGRADECIMIENTOS

De manera muy sincera, quiero expresarle mi gratitud y admiración a la doctora Elena Stashenko, por sus recomendaciones y opiniones en el desarrollo del trabajo, pero especialmente por sus lecciones de vida y por sus consejos oportunos.

Al doctor Jairo René Martínez, por la orientación y apoyo brindados para superar las dificultades presentadas en el proceso de aprendizaje.

A mi familia, por permitirme alcanzar este logro, por apoyarme y motivarme siempre, por acompañarme en las largas jornadas de trabajo, y muy especialmente por confiar en mí.

A mis queridos compañeros, con quienes compartimos vivencias hermosas en estos años de universidad, a Cami, Toto, Germancho y Nelsiton, muchas gracias por su apoyo incondicional, por su compañía y cariño, sin ustedes las veladas de estudio hubiesen sido menos agradables.

A todos mis compañeros de laboratorio, por su ayuda y apoyo, por su compañía y consejos, especialmente a Geovis y Amner, por las incontables asesorías técnicas, sus consejos y conocimientos.

A los grupos de investigación que estudiaron la bioactividad de los aceites esenciales obtenidos: CINTROP (Universidad Industrial de Santander), Grupo de Polifenoles (Universidad Tecnológica de Pereira) y al Laboratorio de Infección y Cáncer (Universidad de Antioquia).

RESUMEN:

TÍTULO: ESTUDIO COMPARATIVO DE LA COMPOSICIÓN Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS ACEITES ESENCIALES EXTRAÍDOS DE *Lippia alba*, *Lippia organoides* y *Phyla (Lippia) dulcis*, ESPECIES DE LA FAMILIA *Verbenaceae**

Autor: Clara Nathalia Celis Melo**

Palabras Claves: Aceite esencial, *Lippia alba*, *Lippia organoides*, *Phyla (Lippia) dulcis*, antioxidante.

Las aplicaciones etnomédicas y biológicas de los aceites esenciales están directamente determinadas por su composición química, y ésta a su vez varía según la especie vegetal y las condiciones geobotánicas de cultivo. La extensa distribución de las plantas de la familia *Verbenaceae* en el territorio nacional motivó a evaluar la composición química de tres especies y correlacionarlas con sus propiedades biológicas.

Los aceites esenciales de *Lippia alba* (quimiotipos citral y carvona), *Lippia organoides* y *Phyla (Lippia) dulcis* se obtuvieron aplicando hidrodestilación asistida por la radiación de microondas y caracterizados empleando cromatografía de gases-espectrometría de masas. La actividad antioxidante de los aceites se determinó como una medida de su capacidad por atrapar radicales.

Los componentes mayoritarios identificados en los aceites de *L. organoides* y *L. alba*, quimiotipos citral y carvona, corresponden a monoterpenos oxigenados (56, 67 y 44%, respectivamente), entre los cuales los aldehídos α,β -insaturados (neral, 19% y geranial, 23%), las cetonas cíclicas (carvona, 32% y piperitenona, 4%) y los compuestos fenólicos (timol, 14% y carvacrol, 33%), predominan en los aceites de *L. alba* quimiotipos citral y carvona, y *L. organoides*, respectivamente. Por otra parte, el aceite de *Phyla (Lippia) dulcis* se caracterizó por su alto contenido de hidrocarburos sesquiterpénicos: *trans*- β -cariofileno (10%) y δ -cadineno (9%), entre otros. De los aceites estudiados, el obtenido de *L. organoides* presentó la mayor capacidad de atrapamiento radicalario, debido a su alto contenido de compuestos fenólicos. Con el ensayo de citotoxicidad de los aceites esenciales se observó una elevada toxicidad para la esencia de *P. (Lippia) dulcis*, intermedia para los aceites de *L. alba* y nula para el aceite de *L. organoides*. Este último aceite presentó el mayor rendimiento de extracción y el más amplio espectro de actividad biológica, incluyendo efectos inhibitorios sobre *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *E. coli*, *S. aureus* y *S. tiphymurium*.

* Trabajo de grado.

** Facultad de Ciencias, Escuela de química. Directora Elena Stashenko.

ABSTRACT:

TITLE: COMPARATIVE STUDY OF THE COMPOSITION AND BIOLOGIC ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL EXTRACTED FROM *Lippia alba*, *Lippia organoides* AND *Phyla (Lippia) dulcis*, SPECIES OF *Verbenaceae*'s FAMILY*

Author: Clara Nathalia Celis Melo**

Key Words: Essential oil, *Lippia alba*, *Lippia organoides*, *Phyla (Lippia) dulcis*, antioxidant.

The ethno-pharmacologic and biologic applications of the essential oil are determined directly by its chemical composition. The former varies according to the plant specie and the geo-botanic crop conditions. The extensive distribution of the *Verbenaceae* plants along the national territory gave a reason to evaluate the chemical composition of the three species and to relate them with their biologic properties.

The *Lippia alba* essential oil (chemotypes citral and carvone), *Lippia organoides* and *Phyla (Lippia) dulcis* were obtained applying microwave assisted hydro-distillation and characterized by employing gas chromatography–mass spectrometry. The oil antioxidant activity was determined as a measure of its radical scavenging capacity.

The most of components identified in the essential oil of the *L. organoides* and *L. alba*, chemotypes citral and carvone, correspond to oxygenated monoterpenes (56, 67 and 44%, respectively). Among them, the α,β -unsaturated aldehydes (neral, 19% and geranial, 23%), the cyclic ketones (carvone, 32% and piperitenone, 4%) and the phenolic compounds (thymol, 14% and carvacrol, 33%), predominate in the essential oil of the *L. alba* chemotypes citral and carvone, and *L. organoides*, respectively. On the other hand, the oil of *Phyla (Lippia) dulcis* is noticeable for its high sesquiterpenic hydrocarbons content: *trans*- β -caryophyllene (10%) and δ -cadinene (9%), and some others. Of the studied essential oils, the obtained from *L. organoides* presented the best radical scavenging capacity, because of its high phenolic content. Cytotoxicity assays showed high toxicity for the *P. (Lippia) dulcis* essence, medium for the *L. alba* essential oil and void for the *L. organoides* oil. The former get the best extraction yield and the larger spectrum of biologic activity, including inhibitory effects on *Candida* spp, *Aspergillus* spp., *E. coli*, *S. aureus* and *S. tiphymurium*.

* College tesis.

** Science Faculty, School of Chemistry. Directed by Elena Stashenko.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	22
1. ESTADO DEL ARTE	24
1.1. Familia <i>Verbenaceae</i>	24
1.1.1. <i>Lippia alba</i>	25
1.1.2. <i>Phyla (Lippia) dulcis</i>	30
1.1.3. <i>Lippia origanoides</i>	35
1.2. Metabolismo secundario vegetal	39
1.3. Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas	42
1.4. Generalidades de los aceites esenciales	43
1.4.1. Comercio mundial de los aceites esenciales	44
1.4.2. Control de calidad de los aceites esenciales	49
1.5. Cromatografía de gases	52
1.6. Derivatización química	54
1.7. Deterioro oxidativo	55
1.8. Actividad biológica de los aceites esenciales	60
2. METODOLOGÍA	62
2.1. Extracción de los aceites esenciales	62
2.2. Análisis cromatográfico	64
2.2.1. Columna apolar	64
2.2.2. Columna polar	66
2.3. Determinación de la actividad antioxidante	67
2.4. Determinación de propiedades físico-químicas de los aceites	

esenciales	68
2.4.1 Densidad	68
2.4.2 Índice de refracción	69
2.4.3 Solubilidad	69
2.4.4 Rotación específica	69
2.5 Derivatización química	70
2.6 Resultados de actividad biológica	70
3. ANÁLISIS DE RESULTADOS	72
3.1 Descripción morfológica de las especies vegetales	72
3.1.1 <i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E.Brown	72
3.1.2 <i>Phyla (Lippia) dulcis</i> (Trevir) Moldenke	73
3.1.3 <i>Lippia organoides</i> Kunth	74
3.2 Aislamiento y análisis por GC-MS de aceites esenciales	75
3.2.1 <i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E. Brown	75
3.2.2 <i>Phyla (Lippia) dulcis</i> (Trevir) Moldenke	91
3.2.3 <i>Lippia organoides</i> Kunth	102
3.3 Actividad antioxidante de los aceites esenciales	110
3.4 Evaluación de los resultados de actividad biológica de los aceites esenciales	120
3.4.1 Actividad citotóxica de los aceites esenciales en pruebas con células Vero	120
3.4.2 Actividad antiparasitaria de los aceites esenciales	122
3.4.3 Actividad anti- <i>Candida</i>	124
3.4.4 Actividad anti- <i>Aspergillus</i>	125
3.4.5 Actividad antibacterial	127
4. CONCLUSIONES	130
5. RECOMENDACIONES	134
BIBLIOGRAFÍA	136

LISTADO DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Quimiotipos identificados de <i>Lippia alba</i> .	27
Tabla 2. Actividades antifúngica y antibacterial estudiadas en tres quimiotipos de <i>Lippia alba</i> .	29
Tabla 3. Propiedades físicas del AE de <i>Lippia alba</i> , quimiotipo Carvona (Cuba).	29
Tabla 4. Quimiotipos carterizados de <i>Phyla (Lippia) dulcis</i> .	33
Tabla 5. Componentes mayoritarios de los AEs de <i>Lippia organoides</i> .	36
Tabla 6. Cuadro comparativo de los aspectos generales de <i>Lippia alba</i> , <i>Phyla (Lippia) dulcis</i> y <i>Lippia organoides</i> .	38
Tabla 7. Aceites esenciales empleados por los tres principales sectores industriales.	46
Tabla 8. Principales exportadores, consumidores y productores mundiales de aceites esenciales.	47
Tabla 9. Clasificación de los parámetros analíticos aplicados para el control de calidad de los aceites esenciales.	50
Tabla 10. Espectro de actividad antimicrobiana de compuestos fenólicos.	61
Tabla 11. Pruebas de actividad biológica realizadas en los grupos de investigación adscritos al CENIVAM.	71
Tabla 12. Números de <i>Voucher</i> COL de las especies estudiadas.	72
Tabla 13. Cantidad relativa (%), concentración (mg /kg de AE) e identificación por GC-MS de los principales componentes del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> , quimiotipo carvona, aislado por MWHD.	77

Tabla 14.	Propiedades físico-químicas del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> , quimiotipo carvona.	83
Tabla 15.	Cantidad relativa (%), concentración (mg/kg de AE) e identificación por GC-MS de los principales componentes del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> , quimiotipo citral, aislado por MWHD.	86
Tabla 16.	Propiedades físico-químicas del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> , quimiotipo citral.	91
Tabla 17.	Cantidad relativa (%), concentración (mg/kg de AE) e identificación por GC-MS de los principales componentes del aceite esencial de <i>Phyla (Lippia) dulcis</i> , aislado por MWHD.	93
Tabla 18.	Propiedades físico-químicas del aceite esencial de <i>Phyla (Lippia) dulcis</i> .	102
Tabla 19.	Cantidad relativa (%), concentración (mg/kg de AE) e identificación por GC-MS de los principales componentes del aceite esencial de <i>Lippia organoides</i> , aislado por MWHD.	103
Tabla 20.	Propiedades físico-químicas del aceite esencial de <i>Lippia organoides</i> .	108
Tabla 21.	Concentración efectiva media, EC ₅₀ , de los aceites esenciales estudiados.	115
Tabla 22.	Concentración letal media, CL ₅₀ , en células Vero (µg/mL).	121
Tabla 23.	Concentración inhibitoria, en promastigotes de <i>Leishmania chagasi</i> .	122
Tabla 24.	Concentración mínima inhibitoria, CMI, de los AEs de <i>L. alba</i> , <i>Lippia organoides</i> y <i>Phyla (Lippia) dulcis</i> en <i>Candida parapsilosis</i> y <i>Candida krusei</i> (%v de AE/v de DMSO).	125
Tabla 25.	Concentraciones mínimas inhibitorias, CMI, de AEs estudiados en <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Aspergillus fumigatus</i>	

	(% v de AE/v de DMSO).	126
Tabla 26.	Diámetros de inhibición (mm) del aceite esencial de <i>Lippia origanoides</i> en cepas de bacterianas.	127
Tabla 27.	Resultados generales de los ensayos y determinaciones realizadas a los aceites esenciales de <i>Lippia alba</i> , quimiotipo citral y carvona, <i>Phyla (Lippia) dulcis</i> y <i>Lippia origanoides</i> .	132

LISTADO DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Planta de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E. Brown, quimiotipo citral.	26
Figura 2. Planta de <i>Phyla (Lippia) dulcis</i> (Trevir.) Moldenke, quimiotipo hernandulcin.	31
Figura 3. Estructura molecular del hernandulcin.	32
Figura 4. Fórmulas moleculares de: 4a – Lippidulcina A y 4b – <i>epi</i> -Lippidulcina A.	33
Figura 5. Planta de <i>Lippia origanoides</i> Kunth.	35
Figura 6. Fórmulas estructurales de: 6a -Timol y 6b - Carvacrol.	37
Figura 7. Diagrama general de la biosíntesis de metabolitos secundarios en especies vegetales.	41
Figura 8. Equipo de hidrodestilación asistida por la radiación de microondas.	43
Figura 9. Cadena de distribución de aceites esenciales.	48
Figura 10. Cromatógrafo de gases <i>Agilent Technologies 6890 Plus Series GC System</i> acoplado a un detector selectivo de masas <i>Agilent Technologies 5973 Network</i> , equipado con un puerto de inyección <i>split/splitless</i> y un inyector automático <i>Agilent 7863</i> .	65
Figura 11. Cromatógrafo <i>Agilent Technologies 6890N Network Series GC</i> acoplado a un detector selectivo de masas <i>Agilent Technologies 5975</i> , un puerto de inyección <i>split/splitless</i> y un inyector automático <i>Agilent Technologies 7683B, Series Injector</i> .	67
Figura 12. Planta de <i>Lippia alba</i> , quimiotipo carvona.	73
Figura 13. Planta de <i>Lippia alba</i> , quimiotipo citral.	73

Figura 14.	Planta de <i>Phyla (Lippia) dulcis</i> , quimiotipo alcanfor.	74
Figura 15.	Planta de <i>Phyla (Lippia) dulcis</i> , quimiotipo hernandulcin.	74
Figura 16.	Perfil cromatográfico típico del AE de <i>L. alba</i> , quimiotipo carvona, aislado por MWHD. Columna DB-5, 60 m. Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los picos se reporta en la Tabla 13 .	76
Figura 17.	Representación estructural de los isómeros ópticos de la carvona: 17a - (-) R-Carvona; 17b - (+)S-Carvona.	78
Figura 18.	Espectro de masas de la carvona.	79
Figura 19.	Espectro de masas del limoneno.	80
Figura 20.	Espectro de masas del biciclosesquifelandreno.	82
Figura 21.	Perfil cromatográfico típico del AE de <i>L. alba</i> , quimiotipo citral, aislado por MWHD. Columna DB-5, 60 m. Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los picos se reporta en la Tabla 15 .	85
Figura 22.	Estructura molecular del citral (mezcla de dos isómeros): 22a – Geranial + 22b - Neral.	87
Figura 23.	Espectro de masas del geranial.	88
Figura 24.	Espectro de masas del geraniol.	89
Figura 25.	Perfil cromatográfico típico del AE de <i>Phyla (Lippia) dulcis</i> , aislado por MWHD. Columna DB-5, 60 m. Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los picos se reporta en la Tabla 17 .	92
Figura 26.	Espectro de masas del <i>trans</i> - β -cariofileno.	94
Figura 27.	Espectro de masas del δ -cadineno.	96
Figura 28.	Espectro de masas de la 6-metil-5-hepten-2-ona.	98
Figura 29.	Espectro de masas de la 3-metil-2-ciclohexen-1-ona.	99
Figura 30.	Perfil cromatográfico de la masa de reacción del AE de <i>Phyla (Lippia) dulcis</i> y el agente sililante, BSTFA. Columna DB-5 (60 m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV).	100

Figura 31.	Espectro de masas del hernandulcin-TMS.	100
Figura 32.	Perfil cromatográfico típico del AE de <i>Lippia organoides</i> , aislado por MWHD. Columna DB-5, 60 m. Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los picos se reporta en la Tabla 19 .	103
Figura 33.	Espectro de masas del carvacrol.	105
Figura 34.	Espectro de masas del γ -terpineno.	106
Figura 35.	Espectro de masas del <i>p</i> -cimeno.	107
Figura 36.	Distribución de las principales familias de los compuestos en los aceites de <i>Lippias</i> estudiados, M: Monoterpenos, MO: Monoterpenos oxigenados, S: Sesquiterpenos, SO: Sesquiterpenos oxigenados.	109
Figura 37.	Representación estructural de la molécula de vitamina E (α -tocoferol).	112
Figura 38.	Desaparición del radical DPPH \cdot en función de la cantidad de vitamina E (mg) por mg de radical.	113
Figura 39.	Concentración efectiva media, EC ₅₀ , del Trolox [®] , medida en función de la disminución de la cantidad del DPPH \cdot .	114
Figura 40.	Representación estructural del Trolox [®] .	114
Figura 41.	Determinación del estado estacionario de la reacción entre el AE de <i>Lippia alba</i> , quimiotipo carvona, con DPPH \cdot .	116
Figura 42.	Cinética de la reacción del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> , quimiotipo citral, con DPPH \cdot .	117
Figura 43.	Determinación del estado estacionario de la reacción entre el AE de <i>Phyla (Lippia) dulcis</i> con DPPH \cdot .	118
Figura 44.	Determinación del estado estacionario de la reacción del aceite esencial de <i>Lippia organoides</i> con DPPH \cdot .	119
Figura 46.	Relación del contenido de cetonas alifáticas y la concentración inhibitora media en <i>Leishmania chagasi</i> . I: <i>L. alba</i> , quimiotipo carvona, II: <i>Phyla (Lippia) dulcis</i> , III: <i>L. alba</i> , quimiotipo citral,	

	IV: <i>L. origanoides</i> .	124
Figura 47.	Relación del contenido de monoterpenos oxigenados y la concentración mínima inhibitora en <i>Aspergillus fumigatus</i> .	
	I: <i>L. alba</i> , quimiotipo <i>Carvona</i> , II: <i>Phyla (Lippia) dulcis</i> ,	
	III: <i>L. alba</i> , quimiotipo <i>Citral</i> , IV: <i>L. origanoides</i> .	126

LISTA DE ESQUEMAS

		Pág.
Esquema 1.	Reacción de descomposición de (+)-hernandulcin.	34
Esquema 2.	Reacción de sililación.	54
Esquema 3.	Posibles rutas de fragmentación de la carvona.	79
Esquema 4.	Ionización disociativa (EI, 70 eV) del limoneno.	81
Esquema 5.	Rutas de fragmentación del biciclosesquifelandreno.	82
Esquema 6.	Posibles rutas de fragmentación del geranial.	88
Esquema 7.	Posibles rutas de fragmentación del geraniol.	89
Esquema 8.	Posibles rutas de fragmentación del <i>trans</i> - β -cariofileno.	95
Esquema 9.	Posibles rutas de fragmentación del δ -cadineno.	96
Esquema 10.	Ionización disociativa (EI, 70 eV) de la 6-metil-5-hepten-2-ona.	98
Esquema 11.	Posibles rutas de fragmentación del derivado TMS del hernandulcin.	101
Esquema 12	Ionización disociativa (EI, 70eV) del carvacrol.	105
Esquema 13.	Posibles rutas de fragmentación del γ -terpineno.	106
Esquema 14.	Fragmentación del ion molecular del <i>p</i> -cimeno.	108
Esquema 15.	Reacción de reducción de DPPH \cdot (α,α -difenil- β - picrilhidracilo).	111

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AE:	Aceite esencial.
AEs:	Aceites esenciales.
ARP:	<i>Antiradical Power</i> (Poder antirradical).
AO:	Antioxidante(s).
BHA:	<i>Butylated hydroxyanisol</i> [2-(<i>ter</i> -Butil)-4-metoxifenol].
BHT:	<i>Butylated hydroxytoluene</i> [2,6-di(<i>ter</i> -Butil)- <i>p</i> -cresol].
BSTFA:	<i>N,O-bis(Trimethylsilyl)-trifluoro-acetamide</i> [N,O-bis(Trimetilsilil)-trifluoro-acetamida)].
°C:	Grado(s) <i>Celsius</i> .
ca.:	<i>Circa</i> (aproximadamente).
CENIVAM:	Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales.
CI₅₀:	Concentración inhibitoria media.
CIM:	Concentración mínima inhibitoria.
CINTROP:	Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales.
CL₅₀:	Concentración letal media.
d_r:	Espesor de la fase estacionaria, μm.
D.I.:	Diámetro interno, nm.
DMSO:	Dimetilsulfóxido.
DPPH:	<i>α,α-Diphenyl-β-picrylhydrazyl radical</i> (Radical α,α-Difenil-β-picrilhidracilo).
EC:	mg de antioxidante por mg de DPPH [·] .
EC₅₀:	Concentración de antioxidante necesaria para reducir el 50% del DPPH [·] inicial.
e.g.:	<i>Exempli Gratia</i> (Por ejemplo).
EI:	<i>Electron Impact</i> (Impacto con electrones).

eV:	Electrón-Voltio.
FAO:	<i>Food and Agriculture Organization</i> (Organización de Alimentos y Agricultura).
g:	Gramo(s).
GC:	<i>Gas Chromatograph</i> (Cromatógrafo de gases), o <i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases), según el contexto.
GC-MS:	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas).
HPLC:	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia).
i.e.:	<i>In Exempti</i> (es decir, o sea).
Istd:	<i>Internal Standard</i> (Estándar interno).
LC:	Límite de confianza.
m:	Metro(s).
M⁺:	Ion molecular.
min:	Minuto(s).
mL:	Mililitro(s).
mm:	Milímetro(s).
msnm:	Metros sobre el nivel del mar.
MWHD:	<i>Microwave-Assisted Hydrodistillation</i> (Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas).
m/z:	Relación masa/carga.
nm:	Nanómetro.
ppm:	Partes por millón.
% (p/p):	Porcentaje peso a peso.
RDA:	Retro Diels-Alder.
TIC:	<i>Total Ion Current</i> (Corriente iónica reconstruida).
TMS:	<i>Trimethylsilyl</i> (Trimetilsililo).
t_R:	Tiempo de retención (min).
UdeA:	Universidad de Antioquia.

UIS: Universidad Industrial de Santander.
UTP: Universidad Tecnológica de Pereira.
UV-Vis: *Ultraviolet-Visible* (Ultravioleta-visible).
%(v/v): Porcentaje volumen a volumen.
W: Vatio(s).
μL: microlitro(s).
μm: micrómetro(s).

INTRODUCCIÓN

El creciente interés del hombre por el consumo preferencial de productos naturales, así como la tendencia global por reducir el uso de sustancias sintéticas, han llevado a la necesidad de desarrollar la agroindustria de productos naturales en Colombia. Entre los principales productos empleados por el sector empresarial, las plantas aromáticas constituyen un elemento de primordial importancia, bien sea por su empleo en la elaboración de productos culinarios (e.g. en la preparación de salsas, condimentos, comidas preelaboradas, etc.), o cuando éstas son sometidas a procesos destilativos-extractivos, a través de los cuales se obtienen aceites esenciales, resinas, extractos, absolutos, concretos y resinoides, entre otros [1], de amplia aplicación en diferentes ramas de la industria.

Los aceites esenciales (AEs) son el conjunto de componentes volátiles aislados de plantas aromáticas cuando se aplica destilación por arrastre con vapor de agua o hidrodestilación, estos compuestos son los principales responsables del olor de la especie vegetal. El renglón comercial dedicado a la explotación de los AEs, presenta ventajas particularmente llamativas, pues la comercialización de estos productos permite aumentar considerablemente el valor agregado de los derivados vegetales con respecto a las plantas aromáticas frescas o secas; además, genera una cantidad mínima de desechos industriales contaminantes. Este tipo de productos vegetales, presenta un mercado poco explotado, principalmente, manejado por la industria de sabores y fragancias, aunque también son empleados, extensamente, en las industrias farmacéutica, cosmética, de alimentos y productos de aseo. En general, la calidad de los AEs, depende del balance entre las características sensoriales y sus propiedades físico-químicas y de composición [2]. Las diferentes aplicaciones de los AEs, requieren evaluar la seguridad de su

consumo. Para ello, es necesario especificar ciertos parámetros, por ejemplo: el origen, (*i.e.* fuente comercial, procedencia geográfica), parte de la planta empleada para la extracción, edad de la planta y método de extracción. Adicionalmente, hay que conocer las propiedades físico-químicas detalladas del producto [3].

Los aceites esenciales han ganado interés debido a sus múltiples propiedades funcionales. Muchos autores, han reportado para este tipo de productos actividades antifúngica [2], antioxidante [4-6], antimicrobial [8, 7-8], antirradicalaria [9]. Las propiedades biológicas están directamente relacionadas con su composición química. Gracias a estas propiedades, los AEs han sido incluidos en la formulación de productos de limpieza bucal, de tocador, alimentos y agroquímicos [1]. Algunos aceites, en particular, ejercen efectos sobre el sistema nervioso central, digestivo y respiratorio [10-12].

Para algunos fines comerciales se emplean sustancias aisladas de los AEs, como es el caso del eugenol, timol, eucaliptol, farnesol, bisabolol, etc., algunos de ellos son obtenidos de fuentes naturales debido, principalmente, a las configuraciones espaciales o actividad óptica específica, *e.g.* α -(-)-bisabolol, es empleado como antiinflamatorio [1].

Colombia es un país con gran biodiversidad (fauna y flora), con sólo el 0.77% de la superficie terrestre emergida, cuenta con el 10% de las especies conocidas [13]. Debido a esta diversidad tan rica, y a la necesidad de información acerca de especies vegetales promisorias, este trabajo de investigación se encaminó hacia el estudio de tres especies de la familia *Verbenaceae*, la cual se caracteriza por presentar amplia diversidad botánica, extensa distribución en zonas tropicales y subtropicales, amplia variedad de usos y gran variabilidad en la composición de sus aceites esenciales. Se determinaron las composiciones químicas de los aceites esenciales de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br., *Phyla (Lippia) dulcis* (Trevir.)

Moldenke y *Lippia origanoides* (Kunth), así como su actividad antioxidante; se estudiaron y se compararon las actividades antifúngica, antibacterial, antiparasitaria y citotoxicidad, y se hallaron algunas propiedades físico-químicas. Los aceites esenciales fueron aislados empleando la técnica de hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD) y sus composiciones químicas se determinaron por cromatografía de gases – espectrometría de masas (GC-MS). La actividad antioxidante de los AEs se determinó como una medida de su capacidad antirradicalaria mediante el ensayo colorimétrico de DPPH'. Las propiedades físico-químicas determinadas para los AEs, fueron las siguientes: densidad, solubilidad en etanol, índice de refracción y rotación específica. Por otra parte, se analizaron los resultados de los ensayos de actividad biológica (antibacterial, antifúngica, antiparasitaria y citotoxicidad) para cada AE y se correlacionaron con sus composiciones químicas.

Este estudio hace parte del conjunto de investigaciones desarrolladas en el Laboratorio de Cromatografía, del Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales, CENIVAM, que busca identificar especies promisorias, con propiedades funcionales potencialmente explotables por la agroindustria nacional.

Los resultados obtenidos en el desarrollo de este trabajo serán publicados en modalidad de poster en el IX Congreso Colombiano de Fitoquímica, Productos Naturales: Ciencia, Tecnología e Industria, que se realizará en las instalaciones de la Universidad Tecnológica de Pereira (UTP), en mayo 8-11 del 2007.

1. ESTADO DEL ARTE

1.1 FAMILIA *Verbenaceae*

La familia *Verbenaceae* comprende alrededor 75 géneros y 3000 especies, encontrándose distribuidas principalmente en regiones tropicales y subtropicales y en algunas zonas templadas. Estas especies generalmente se encuentran en forma de arbustos, lianas y hierbas, algunas con espinas, presentan hojas opuestas, sin estípulas. Poseen flores normalmente irregulares, bisexuales racemosas o cimosas, axilares o terminales; el cáliz tiene unos 4-5 lóbulos, con el limbo algo bilabiado; el fruto es una drupa, o con menor frecuencia una cápsula o esquizocarpo [14].

Son especies vegetales de interés económico por sus usos diversos, siendo fuentes de aceites o frutos comestibles, especies ornamentales (e.g. el género *Lantana*), se emplean en jardinería, algunas de ellas son utilizadas para aplicaciones etnomédicas [14, 15].

Los AEs de diversas especies de la familia *Verbanaceae*, de acuerdo con Lemos [16], han mostrado actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium smegmaus* y nula contra *Pseudomonas aeruginosa*. Los aceites esenciales de varias especies de *Lippia* han presentado actividad larvicida (contra las larvas de *Aedes aegypti*) [17], junto con actividades antiplasmodia, insecticida, antibacterial, antifúngica y efectos de relajación muscular [10, 18-21].

Todas estas propiedades funcionales son determinadas por la composición química de las especies empleadas. Los efectos biológicos comunes de diferentes

especies de la familia *Verbenaceae* se deben a la presencia de metabolitos comunes que exhiben cierta bioactividad. Los compuestos comúnmente encontrados en los AEs de *Lippia* son: Limoneno, *p*-cimeno, alcanfor, linalool, α -pineno, timol y *trans*- β -cariofileno, entre algunos otros [12, 22].

1.1.1 *Lippia alba*.

Una de las especies más ampliamente distribuidas y estudiadas en América es la *Lippia alba*, clasificada también en el mundo como *Lippia geniculata* H.B.K., *Lantana alba* Mill, *Lantana lipiodes* Hook y Arn, *Phyla germinata* H.B.K., *Lippia havanensis* Jurez; popularmente se conoce como “Pronto alivio” en Antioquia, “Curatodo” en Magdalena y “Cidriera” en el Brasil, entre otros [4, 10, 12].

Esta especie es un subarbusto aromático, nativo de América, crece en altitudes hasta 1800 msnm, desde México hasta Suramérica y el Caribe. El contenido de AE está entre 0.1 a 1.2% [18].

Es un arbusto con ramas largas que caen al suelo. Con una altura o longitud que varía de acuerdo con la región, hasta un máximo de 1.5 m. Tiene hojas pequeñas, de colores verde y gris en la parte superior e inferior, respectivamente (**Figura 1**). Crece en sitios con buena luminosidad, la principal forma de propagación de esta especie es por esquejes (truncos de 20-25 cm y 0.5 cm de diámetro), y presenta una producción foliar de 5ton/ha en cuatro cosechas por año [1].

- **Composición química.** Dentro de los metabolitos identificados para el AE de *L. alba* se reportan el borneol, alcanfor, 1,8-cineol, *p*-cimeno, limoneno, linalool, piperitona, carvona, timol, como principales compuestos monoterpénicos; y α -muuroleno, *trans*- β -cariofileno, β -cubebeno,

biciclosesquifelandreno, óxido de cariofileno, β -elemeno, γ -cadineno y *allo*-aromadendreno como sesquiterpenos más abundantes [6, 22, 23].

Figura 1. Planta de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, quimiotipo citral.



Sin embargo, la composición química de los AEs está influenciada por diferentes factores, tales como ubicación geográfica, condiciones de extracción y características genóticas [1, 24]; así, los diferentes quimiotipos de *Lippia alba* estudiados, se han agrupado de acuerdo con la relación biosintética de

los metabolitos [25]; algunos de los estudios desarrollados para cada quimiotipo se reportan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Quimiotipos identificados de *Lippia alba*.

COMPONENTES MAYORITARIOS	PAÍSES	REFERENCIAS
<ul style="list-style-type: none"> • Limoneno y/o carvona, piperitona, piperitenona, dihidrocarvona, lipiona 	Perú	Leclercq [26]
	Colombia	Stashenko [6]
	Cuba	Pino [27, 28]
	Brasil	Matos [29]
	Guatemala	Senatore [30]
<ul style="list-style-type: none"> • Citral y/o linalool 	Brasil	Frighetto [31]
	India	Bahl [32]
	Uruguay	Lorenzo [33]
	Brasil	Zoghbi [34]
<ul style="list-style-type: none"> • Tagetenona 	Argentina	Ricciardi [35]
<ul style="list-style-type: none"> • Mirceno 	India	Singh [36]
<ul style="list-style-type: none"> • γ-Terpineno 	Brasil	Gomes [37]
<ul style="list-style-type: none"> • Alcanfor 	Uruguay	Dellacassa [38]
<ul style="list-style-type: none"> • Estragol 	EE.UU.	Tucker [39]

En Colombia, se han encontrado tres quimiotipos de esta especie:

- En la región Caribe, el quimiotipo Citral caracterizado por su alto contenido de neral y geranial [40];
- Las especies de *L. alba* recolectadas en la región Andina con altos contenido de carvona (40-57%) y limoneno (24-37%) [4, 6, 40-42];
- En Saravena (Arauca), existe un quimiotipo cuyos componentes mayoritarios son citral (neral + geranial) y carvona (“quimiotipo híbrido”) [42].

Esta especie está representada por diversos quimiotipos. Por tal razón, llama mucho la atención de investigadores en el área, quienes buscan encontrar correlaciones entre las variaciones genéticas y, posiblemente,

morfológicas, y la composición química de cada quimiotipo. Este tipo de relación es evidente, e.g. en el quimiotipo procedente de EE.UU.; es el único reportado con inflorescencias amarillas -el color usual de las flores es rosado-, y presenta como componente mayoritario del AE el estragol [39].

- **Propiedades biológicas.** Estudios desarrollados en 1989 [43] reportaron que el aceite esencial de *Lippia alba* presentó actividades analgésica, antiinflamatoria y antipirética. En 1991, Cáceres y sus colaboradores [44] encontraron que las especies de *Lippia alba* y *Lippia dulcis* inhiben las bacterias gram-positivas responsables de afecciones respiratorias en humanos, e.g. *Staphylococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes*. *Lippia alba* presenta también actividades antiviral y citoestática [45, 46, 47]. El extracto acuoso de esta especie provocó una reducción del ritmo cardíaco, por efectos antihipertensivos; y la infusión de esta especie posee efectos antiulcerosos [11, 12, 48] y sedativos, los cuales están relacionados, posiblemente, con flavonoides presentes en el extracto [18, 49-51].

Estudios de los extractos de dos quimiotipos de *L. alba*, citral y carvona, realizados en Brasil, encontraron efectos analgésico y anti-inflamatorio, siendo el quimiotipo citral más activo por presentar dosis efectivas ligeramente menores que el quimiotipo carvona [52]; igualmente, los AEs de los dos quimiotipos exhibieron efectos ansiolíticos en pruebas realizadas en ratones [53]. En la **Tabla 2** se registran las actividades antifúngica y antibacteriana evaluada para tres quimiotipos de *Lippia alba*, y los microorganismos estudiados. El quimiotipo citral, presenta un espectro de acción biológica más amplio, debido al contenido de compuestos oxigenados, los cuales han mostrado mayor efectividad contra microorganismos que los hidrocarburos análogos [50].

Tabla 2. Actividades antifúngica y antibacterial estudiadas en tres quimiotipos de *Lippia alba*.

MICROORGANISMOS / QUIMIOTIPOS		
CITRAL [50]	LINALOOL [54]	CARVONA [27]
<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Candida parapsilosis</i>		<i>Streptococcus faecalis</i>
<i>Candida guilliermondu</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Cryptococcus neoformans</i>		
<i>Staphylococcus aureus</i>		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		

Todas las bioactividades anteriormente descritas están determinadas por la composición química de los AEs, por esta razón, se han realizado estudios de algunos metabolitos aislados, tales como limoneno, citral y β -mirceno. Estos compuestos demostraron que ejercían interacciones de tipo dopaminérgica, los cuales provocaron efectos sedativos, depresivos y de relajación muscular [10].

- **Propiedades físico-químicas.** Algunas de las propiedades del AE del quimiotipo carvona cultivado en Cuba, fueron determinadas por Pino y sus colaboradores [27], y se exhiben en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Propiedades físico-químicas del AE de *Lippia alba*, quimiotipo carvona (Cuba).

PROPIEDAD	T [°C]	VALOR
Densidad específica	25	0.9218
Índice de refracción	25	1.4977
Rotación óptica	25	(+) 100.5 °
Solubilidad en etanol	20	1:1 (v/v)

- **Actividad antioxidante.** En publicaciones realizadas por Stashenko [55] y Ramos en 2003 [5], se describen los procedimientos y resultados obtenidos de la evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial y el extracto etanólico de *Lippia alba*, respectivamente. El primer trabajo, empleó procedimientos de atrapamiento radicalario [4] (DPPH[•] y ABTS^{•+}) e inhibición de la peroxidación lipídica [6, 55] y determinó que la actividad del AE fue equivalente a la actividad de la vitamina E en concentraciones mayores o iguales a las concentraciones de esta última (el % de disminución del hexanal formado en la peroxidación lipídica de ácido linoleico fue de 73.6 y 62.4 % para el AE de *Lippia alba* y la vitamina E, respectivamente). El segundo trabajo [5], reporta ensayos de atrapamiento radicalario (DPPH[•] y OH[•]) y peroxidación lipídica, junto con pruebas de antimutagénesis en *Escherichia coli*. El extracto inhibió en un 25% la mutagénesis del microorganismo, presentando un ligero grado de toxicidad.

1.1.2 *Phyla (Lippia) dulcis*.

La existencia de varios sistemas taxonómicos descritos por diferentes autores es la causa fundamental de porqué algunas especies no se encuentran claramente clasificadas dentro de un género. Algunas especies de *Lippia* pueden encontrarse dentro de los géneros *Aloysia*, *Lantana*, *Acantholippia*, *Phyla* o *Junellia* [12]. La especie *Phyla dulcis*, según la taxonomía descrita por Moldenke (1971, 1980). está registrada e identificada como *Lippia dulcis* [56, 57], es por eso, que de ahí en adelante se usará *Phyla (Lippia) dulcis*, indistintamente para los datos reportados en trabajos previos y en el presente estudio.

Phyla (Lippia) dulcis es una hierba arrastradera perenne muy aromática, que crece de 46 – 60 cm (**Figura 2**). Endémica de América tropical, distribuida del sur de México hasta Panamá y Colombia, crece en orillas de bosques o riveras de ríos y a altitudes mayores a 1800 msnm.

Figura 2. Planta de *Phyla (Lippia) dulcis* (Trevir.) Moldenke, quimiotipo hernandulcin.



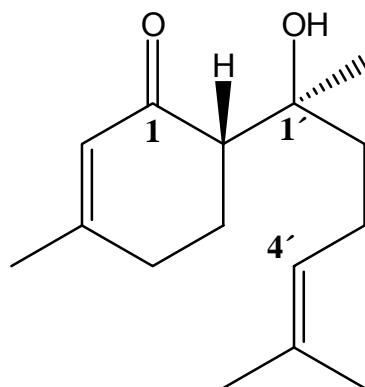
- **Composición química.** Esta especie es particularmente llamativa por su sabor dulce, debido a la presencia de (+)-hernandulcin, compuesto aislado y caracterizado en 1985 por Compadre [58], y estudiado posteriormente por Mori y Kato [59]. Este compuesto, con poder edulcorante 1000 veces mayor que la de la sacarosa, constituye el 0.004% de la hierba seca [60]. En estudios posteriores se aislaron otros sesquiterpenos relacionados, (+)-4 β -hidroxihernandulcin, aminol y (-)-*epi*-hernandulcin [61-66].

El hernandulcin ha sido patentado como un potencial edulcorante no calórico, y recomendado en la preparación de productos dentríficos [63].

Cerca de 75 compuestos edulcorantes de origen vegetal han sido caracterizados estructuralmente, con aproximadamente 20 diferentes esqueletos carbonados, principalmente terpenoides, flavonoides y algunas

proteínas. La molécula de (+)-hernandulcin (**Figura 3**) debe su poder edulcorante al grupo carbonílico en C1, el hidroxilo en C1' y la olefina en C4', funciones esenciales para la mediación de su sabor [62]. La inestabilidad térmica de este compuesto, junto con su ligero sabor amargo, han impedido su producción comercial como sustituto de la sacarosa [58].

Figura 3. Estructura molecular del hernandulcin.



Los siguientes compuestos son los más abundantes encontrados en el AE de *L. dulcis*, alcanfor, canfeno, α -pineno, α -copaeno, lippiol, *trans*- β -cariofileno, limoneno, δ -cadineno, (+)-hernandulcin, (-)-*epi*-hernandulcin, terpinoleno y (+)-4 β -hidroxihernandulcin. Del extracto metanólico de esta especie se aislaron lippidulcina A y *epi*-lippidulcina A (**Figura 4**), junto con varios flavonoides (cirsimaritina, salvigenina, eupatorina), glicósidos (acteosida, isoacteosida, martinósida) y flavonas (eupafolina, 6-hidroxluteolina) [62, 64]. Compadre [65], (México) también reportó la presencia de taninos y una sustancia similar al alcanfor, la cual llamó lippiol.

Trabajos previos han caracterizado dos quimiotipos de *Lippia dulcis*, con aplicaciones diferentes, según se registra en la **Tabla 4**. A pesar de que en cada uno de los trabajos se emplearon diferentes técnicas de extracción, la composición química de los productos obtenidos varía considerablemente.

Figura 4. Fórmulas moleculares de: **4a** – Lippidulcina A y **4b** – *epi*-Lippidulcina A.

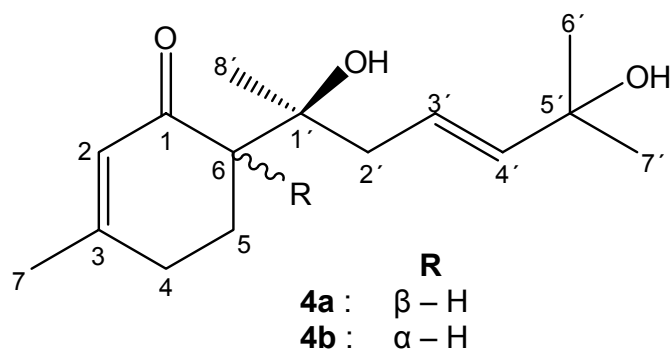
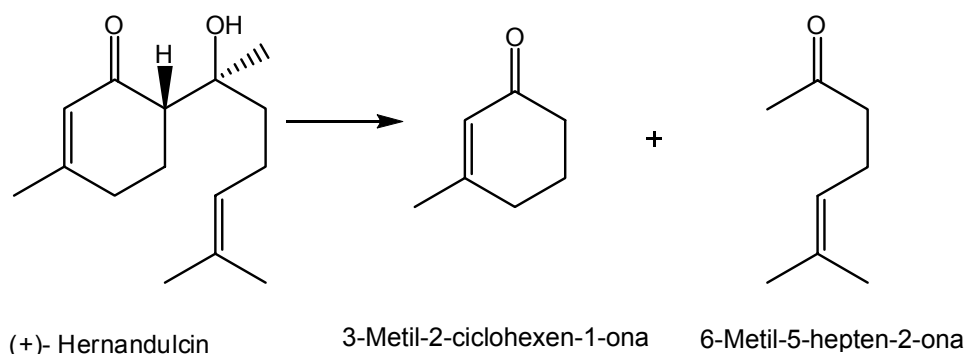


Tabla 4. Quimiotipos caracterizados de *Phylla (Lippia) dulcis*.

PAIS		México [65]	Puerto Rico [60]
NOMBRE VERNÁCULO		Hierba dulce, Salvia santa	Hierba dulce
USOS MEDICINALES		Emenagoga, abortífera	Tos, bronquitis, retención urinaria
MÉTODO DE EXTRACCIÓN		Destilación con vapor	Microfiltración con tubo Craig
CANTIDAD RELATIVA, % EN EL AE	Monoterpenos	30.78	0.62
	Monoterpenos oxigenados	55.51	7.52
	Sesquiterpenos	6.00	4.93
	Sesquiterpenos oxigenados	0.00	15.59
	Hernandulcin	0.50	58.00

El (+)-hernandulcin es un sesquiterpenoide derivado del bisaboleno, poco volátil y termolábil, que se descompone en 6-metil-5-hepten-2-ona y 3-metil-2-ciclohexen-1-ona (**Esquema 1**) [60], estos compuestos también se encuentran en algunos aceites y extractos de otras especies, e.g. *Lepechinia schiedeana*, *Melissa officinalis* [67, 68].

Esquema 1. Reacción de descomposición de (+)-hernandulcin.



(+)-Hernandulcin ha sido sintetizado empleando diferentes rutas [66, 69], a saber:

- Partiendo de ciclohexadieno y empleando enolatos de boro y silicio;
- Por ciclación intramolecular de un óxido de nitrilo, utilizando (2Z,6E)-farnesal;
- Por generación de E-dienil carbamato empleando TiCl_3 como catalizador;
- Por aldocondensación de 3-metil-2-ciclohexen-1-ona y 6-metil-5-hepten-2-ona.

- **Propiedades biológicas.** Los extractos etanólicos de *Phyla (Lippia) dulcis* mostraron actividad anti-inflamatoria y antimicrobiana contra *Salmonella typha* y *Shigella flexneri* [70]; el AE no presentó actividad contra *Vibrio cholera* [71, 72].

Esta especie es popularmente empleada en el tratamiento de afecciones digestivas, respiratorias, edemas, neuropatía, paludismo, cólicos y desórdenes menstruales [65]. También presenta propiedades balsámicas, diaforéticas, emolientes, estimulantes, expectorantes, sus hojas se emplean como saborizante de medicamentos [12].

1.1.3 *Lippia origanoides*.

Es una hierba perenne de 1 a 2 m de altura que presenta hojas ovadas con el ápice redondeado, flores blancas, pequeñas y muy aromáticas (**Figura 5**), el rendimiento de extracción del AE según Dos Santos, es de 4.6 %(p/p) [73]. Algunos de los sinónimos de esta especie botánica, son: *Lippia berterii* Spreng y *Lantana origanoides* H.B.K.

Figura 5. Planta de *Lippia origanoides* Kunth.



- **Composición química.** Los componentes más abundantes reportados para este aceite esencial son: α -terpineno, timol, acetato de timilo, carvacrol, metil carvacrol, γ -terpineno, 1,8-cineole, *p*-cimeno, *trans*- β -cariofileno y umbellunona [73].

Esta especie, al igual que las dos anteriores, presenta variaciones en la composición química de los AEs, como se registran en la **Tabla 5**. γ -Terpineno y *p*-cimeno, son metabolitos comunes en todos los AEs; γ -terpineno es precursor biogénico de *p*-cimeno y timol [74].

Tabla 5. Componentes mayoritarios de los AEs de *Lippia origanoides*.

REFERENCIAS	PAÍSES	AÑO	COMPONENTES MAYORITARIOS
Gallino [76]	Brasil (São Paulo)	1987	γ -Terpineno, <i>p</i> -cimeno, timol,
Velasco-Negueruela [77]	Argentina	1993	Acetato de timolo, γ -terpineno <i>p</i> -cimeno
Dos Santos [73]	Brasil (Cabeceiras)	2004	Carvacrol, <i>p</i> -cimeno, γ -terpineno
Oliveira [78]	Brasil (Oriximiná)	2006	Carvacrol, timol, <i>p</i> -cimeno

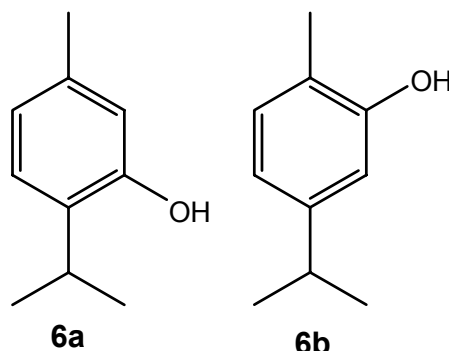
- **Propiedades biológicas.** En 1981, Morton y sus colaboradores [75], reportaron aplicaciones de esta especie en el tratamiento de desórdenes gastrointestinales y respiratorios, así como en preparados culinarios. La infusión de esta especie se consume popularmente, con el fin de aprovechar su efecto expectorante y su eficacia en el tratamiento de afecciones bronquiales y pulmonares; también es recomendada en medicina popular como antiespasmódico, sudorífico, sedante [12].

Estudios de actividad biológica de esta especie demostraron, que el aceite esencial de la planta posee actividad antibacterial contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* MRSA y *Escherichia coli*, y antifúngica contra *Candida albicans* y *Candida tropicalis* [73]. Recientemente, Oliveira (2006) [78], separó diferentes fracciones volátiles del AE de *Lippia origanoides* y determinó su efecto inhibitor del desarrollo de diferentes microorganismos; los resultados obtenidos demuestran que la eficiencia

biológica es mayor para las fracciones con compuestos fenólicos, y va disminuyendo para las fracciones con alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas e hidrocarburos.

- **Actividad antioxidante.** Los fenoles son compuestos interesantes y llaman la atención de investigadores por sus propiedades biológicas, dentro de las cuales su poder antioxidante (AO) es muy alto, por esta razón se reportan diversos estudios sobre la actividad AO de derivados fenólicos. Así, en un estudio enfocado hacia el análisis de timol, **6a**, y carvacrol, **6b** (fenoles presentes en el AE de *Lippia origanoides*), se encontró que el impedimento estérico del grupo hidroxilo por parte del isopropilo juega un rol importante en esta actividad (**Figura 6**), siendo el timol más efectivo que el carvacrol [78-81].

Figura 6. Fórmulas estructurales de: **6a** - Timol y **6b** - Carvacrol.



Diversas especies de los géneros *Thymus* y *Origanum* (Familia *Labiatae*), presentan en su composición timol y carvacrol como componentes mayoritarios, al igual que *Lippia origanoides*. Estudios de actividad antioxidante de estas especies han obtenido resultados positivos, y la actividad antioxidante fue proporcional al contenido de estos fenoles en aceites esenciales [9, 82, 83].

Un cuadro comparativo de los usos, sinónimos y distribución de *Lippia alba*, *Phyla (Lippia) dulcis* y *Lippia origanoides* se ilustra a continuación (**Tabla 6**).

Tabla 6. Cuadro comparativo de los aspectos generales de *Lippia alba*, *Phyla (Lippia) dulcis* y *Lippia origanoides*.

NOMBRE CIENTÍFICO	<i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E. Br.	<i>Phyla (Lippia) dulcis</i> Trevir	<i>Lippia origanoides</i> Kunth
SINÓNIMOS	<i>Lippia geniculata</i> , <i>Lantana alba</i> , <i>Lantana geminata</i> , <i>Lippia geminata</i> .	<i>Phyla scaberrima</i> , <i>Lippia scaberrima</i> , <i>Zapania scaberrima</i> .	<i>Lippia schomburgkiana</i> , <i>Lippia berteri</i> , <i>Lantana origanoides</i> .
NOMBRES COMUNES*	Curatodo, prontoalivio, falsa melissa, carmelitana, erva-cidreira.	Hierba dulce, orozús, orosul, corronchocho.	Orégano, salvia de Marajó, Alecrim d'Angola.
DISTRIBUCIÓN	Centro y Suramérica, y África tropical.	América tropical.	Centroamérica y el norte de Suramérica.
METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES	Borneol, limoneno, linalool, carvona, citral, <i>trans</i> - β -cariofileno, <i>allo</i> -aromadendreno	Alcanfor, α -copaeno, <i>trans</i> - β -cariofileno, δ -cadineno, hernandulcin, 4 β -hidroxi-hernandulcin	<i>p</i> -Cimeno, γ -terpineno, timol, carvacrol, acetato de timilo, <i>trans</i> - β -cariofileno

Continuación de la **Tabla 6.**

USOS **	Analgésico, anti-inflamatorio, antiespasmódico, antipirético, sedativo, antimicrobial, antiviral, en el tratamiento de desórdenes gastrointestinales	Emenagogo, abortífero, sedativo, analgésico, antiinflamatorio, en el tratamiento de bronquitis, asma, desórdenes gastrointestinales.	Tratamiento de influenza, infecciones respiratorias y desórdenes gastrointestinales, empleado como condimento.
BIOACTIVIDADES ESTUDIADAS	<i>Candida albicans</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella typha</i> , <i>Shigella flexneri</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA, <i>Escherichia coli</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Candida tropicalis</i>

* Diferentes países.

** Etnofarmacológicos.

1.2 METABOLISMO SECUNDARIO VEGETAL

Las plantas producen una amplia y variada gama de compuestos orgánicos que parecen no tener relación directa con su crecimiento y desarrollo, los cuales se conocen como metabolitos secundarios.

Estos metabolitos tienen importantes funciones ecológicas en las plantas [84], a saber:

- Protegen las plantas contra animales herbívoros y microbios patógenos;
- Atraen insectos polinizadores o dispersores de semillas;

- Protegen la planta durante los procesos de cicatrización y actividad microbiana;
- Intervienen en la regulación de los procesos de evaporación de agua;
- Sirven de mecanismo de defensa y de comunicación con otros vegetales (alelopatía).

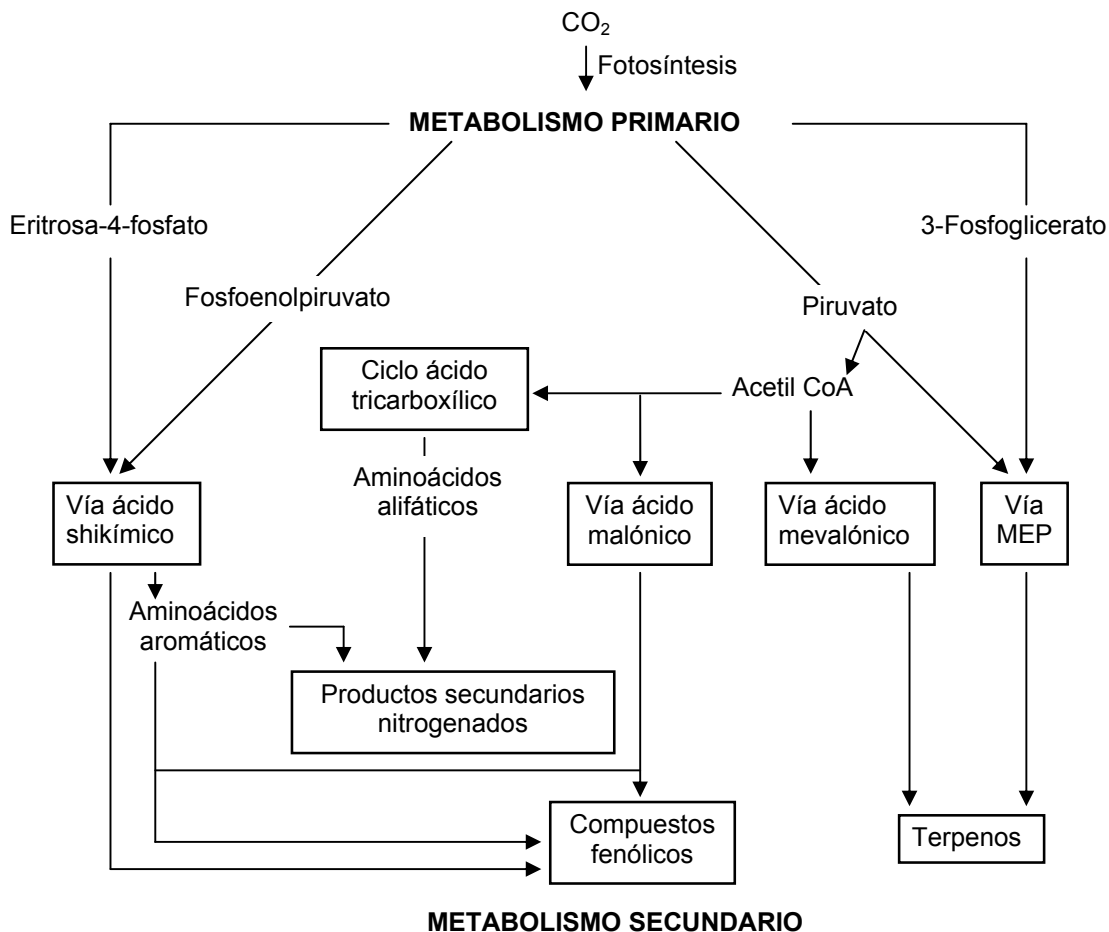
Los mecanismos de protección descritos se alcanzan a través de mutaciones hereditables, selección natural o cambios evolutivos.

Los metabolitos secundarios presentan efectos significativos sobre el metabolismo animal y humano en bajas dosis. Por esta razón, muchos de ellos se emplean como drogas, venenos, saborizantes, materiales industriales, etc. Los metabolitos secundarios se dividen principalmente en tres grupos: terpenos, compuestos fenólicos y nitrogenados, el esquema general de biosíntesis de estos compuestos se ilustra en la **Figura 7** [84].

Los terpenos son probablemente sintetizados por dos rutas metabólicas, la más estudiada es conocida como ruta del ácido mevalónico, en la cual tres moléculas de acetil-CoA se unen para formar el ácido mencionado, que tras sufrir fosforilación y descarboxilación, conduce a la formación del isopentenil difosfato. Esta estructura es la base para la síntesis de terpenos y terpenoides. La segunda ruta catabólica es conocida como ruta del fosfato de metileritrol (MEP), el cual conlleva a la formación del precursor biosintético de terpenos (isopentenil difosfato). La unión sucesiva de estas estructuras produce terpenos de diferentes pesos moleculares, a saber: monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenos, etc [85].

Los compuestos nitrogenados formados del metabolismo secundario de las plantas son principalmente alcaloides y glicósidos cianogénicos, los cuales son usualmente sintetizados a partir de algunos aminoácidos a saber: lisina, tirosina y triptófano. Según sean aminoácidos aromáticos o alifáticos, la biosíntesis sigue o la ruta del ácido shikímico o del ácido tricarbóxico, respectivamente [84].

Figura 7. Diagrama general de la biosíntesis de metabolitos secundarios en especies vegetales [84].



Este tipo de metabolitos pueden ser aislados por diversos métodos, dentro de los cuales se encuentran: destilación-extracción simultánea con solvente (SDE)[85, 87], extracción con fluido supercrítico (SFE) [88], destilación con vapor (SD) [89], hidrodestilación (HD) [73], hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHd) [54, 90], compresión en frío [91,92]. Adicionalmente, se emplean técnicas de *headspace*, purga y trampa (purga de espacio de cabeza con N₂ y trampa en solvente simultánea (P & T), microextracción en fase sólida de la fase vapor (HS-SPME) y *headspace* estático (S-HS) [6, 55]. En el estudio de *L. alba*, se demostró

que la composición de los extractos varía con la técnica de aislamiento aplicada [6].

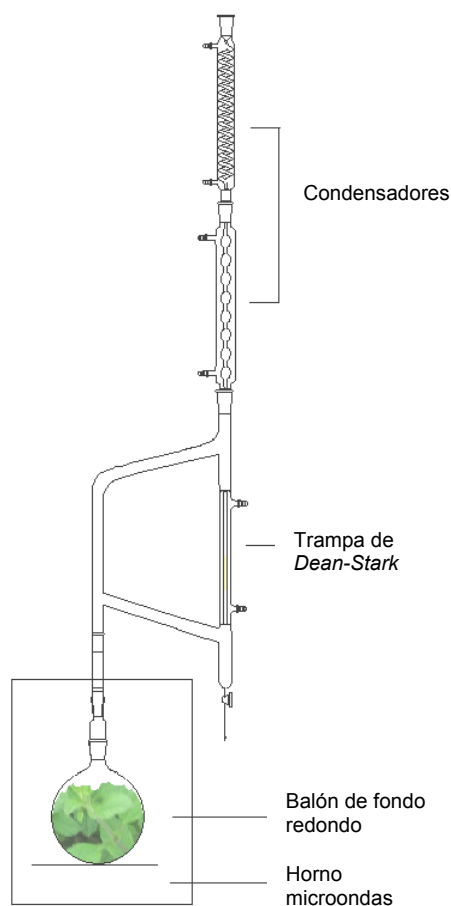
1.3 HIDRODESTILACIÓN ASISTIDA POR LA RADIACIÓN DE MICROONDAS

En términos generales, el procedimiento analítico aplicado a un aceite esencial comprende dos etapas, a saber: extracción del aceite y su análisis cromatográfico o espectroscópico.

Con el fin de aislar el AE de una planta, se debe someter el material vegetal a un proceso de hidrodestilación por el cual, al ebullición del agua, el vapor rompe los receptáculos oleíferos, estableciendo una mezcla azeotrópica que, por efecto de su presión de vapor asciende y al condensarse forma dos capas, una rica en aceite y otra, rica en agua, las cuales, seguidamente, se separan por decantación.

Para llevar a cabo este proceso se sumerge el material vegetal en agua, empleando un equipo de destilación tipo *Clevenger* (**Figura 8**), y se calienta el agua hasta ebullición. Si el calentamiento aplicado es del modo tradicional, utilizando una manta eléctrica, el proceso es lento (ca. cuatro horas). Por esta razón, se implementó una modificación en el calentamiento empleando radiación de microondas [93, 94]. Al aplicar esta energía para el calentamiento, no existe contacto directo entre el material y la fuente de calor, el calentamiento es más efectivo que cuando se emplean mantas de calentamiento convencionales, hay una transferencia de calor más rápida, y los tiempos de extracción se reducen considerablemente, disminuyendo simultáneamente la posibilidad de reacciones paralelas que pueden producir artefactos (sustancias que no se encontraban originalmente en la planta) [93]. Esta técnica mejorada es conocida como hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD) [94], fue patentada por Paré *et al.* [95,96].

Figura 8. Equipo de hidrodestilación asistida por la radiación de microondas.



1.4 GENERALIDADES DE LOS ACEITES ESENCIALES

El interés de la humanidad por preservar los olores de exhalación de las plantas, llevó al hombre a la necesidad de separarlos, y fue, probablemente, en el desarrollo de esta empresa como se descubrió lo que hoy conocemos como aceite esencial. El AE es una mezcla de componentes volátiles, producto del metabolismo secundario de las plantas, responsable de su olor vegetal, constituido generalmente por terpenos, hidrocarburos lineales, derivados del benceno, ésteres, alcoholes, ácidos grasos, fenoles, ceras, acetales, cetonas, aldehídos,

glicósidos (terpenos unidos químicamente a azúcares), alcaloides, cumarinas, esteroides y compuestos heterocíclicos [1]. Son mezclas solubles en etanol y éter, y casi insolubles en agua. Es de destacar la especificidad isomérica en toda biosíntesis natural, que produce compuestos con configuración espacial única. El valor económico y la aplicación industrial de las esencias están directamente relacionados con su composición química, la cual, a su vez, determina todas las propiedades macroscópicas, e.g. físicas (olor, color, apariencia) y de actividad biológica.

Teniendo en cuenta que los aceites esenciales son producto del metabolismo de la planta, la composición de éstos pueden presentar constante cambio, modificándose las proporciones de los analitos, o transformándose unos en otros. Algunos de los factores que afectan la composición química de los AEs son: el estado y procedencia de la planta, las condiciones geobotánicas y agrícolas de su cultivo, el clima (humedad, oxígeno, luz solar), el momento del día, así como también ciertas variables del proceso o método de extracción, su duración, temperatura, y la parte de la planta, entre otros. El quimiotipo depende de la genética de la planta y de las condiciones geobotánicas de su crecimiento [24, 88, 90].

Las industrias de sabores y fragancias presentan grandes demandas de aceites esenciales, debido a las características organolépticas de estas mezclas. El reconocimiento de una estructura química, capaz de generar una propiedad organoléptica, es la ruta para que otras estructuras similares sean exploradas o modificadas con el fin de lograr el mismo efecto.

1.4.1 Comercio mundial de aceites esenciales

Los aceites esenciales ya establecidos y aceptados industrialmente, así como los productos promisorios, presentan oportunidades comerciales a nivel mundial;

siempre teniendo en cuenta datos técnicos de seguridad y características funcionales [97].

El mercado de los AEs comunes presenta una demanda restringida debido a que ésta ya se encuentra satisfecha en el mundo. La tendencia se dirige, por ejemplo hacia aceites de calidad homogénea y hacia variedades cada vez más sofisticadas [98].

Dependiendo de la naturaleza de AEs y sus características, estos productos son empleados en la industria alimenticia, principalmente, como saborizantes o aromatizantes; en la industria perfumística como materia prima base para la elaboración de fragancias y perfumes; en la industria farmacéutica como enmascaradores de olores, y en aromaterapia, para el cuidado de la salud y la belleza [99]. La industria de alimentos presenta una tendencia creciente hacia la demanda de este tipo de productos, en la cual los aceites mayormente empleados se reportan en la **Tabla 7**.

En el mundo, los aceites esenciales de aproximadamente 160 especies han alcanzado reconocimiento comercial, pero de éstos apenas 18 especies constituyen el 75% del valor de la producción mundial. Dentro de los aceites comercialmente mejor posicionados en el mercado se encuentran los de naranja, eucalipto, citronela, limón, lavanda y mentas, con altos volúmenes de producción, y los AEs de rosa, jazmín y vetíver con precios considerablemente altos [97].

De acuerdo con *Dutch Association of Fragrance and Flavour Producers*, el monto total estimado del mercado mundial de AEs fue de €11 billardos en el 2004, de los cuales el 6% fue destinado a investigación [99].

De acuerdo con la FAO, la producción mundial de aceites esenciales fue estimada en 28.2 millones de toneladas en 2003. Los países desarrollados controlan el 85%

del comercio mundial, e.g. en 2004 la Unión Europea (EU) importó €626 millones y exportó €375 millones más. Estos países también adquieren productos naturales de países en vía de desarrollo, los procesan y los reexportan, aumentando de esta manera el valor agregado de los productos finales. En la **Tabla 8** se reportan los principales actores en la economía mundial de los AEs [97].

Tabla 7. Aceites esenciales empleados por los tres principales sectores industriales.

SECTOR	REGLÓN	ACEITES ESENCIALES
Industria cosmética	Cuidado personal	- Limón
	Detergentes y jabones	- Hierbabuena
		- Naranja
	Cuidado dental	- Patchouli
		- Palo de rosa
		- Especias
		- Mentas
	- Eucalipto	
Industria de alimentos	Bebidas	- Cítricos
	Tabaco	- Vainilla
	Confitería	- Aceites florales
	Alimentos procesados y enlatados	- Oleorresinas
		- Hierbabuena
	Gomas de mascar	- Anís
	- Tomillo	
	- Orégano	
Industria farmacéutica	Homeopatía	- Romero
	Cuidado de la salud	- Salvia
		- Manzanilla
	Aromaterapia	- Patchouli
		- Lavanda
	- Geranio	
	- Eucalipto	

Tabla 8. Principales exportadores, consumidores y productores mundiales de aceites esenciales.

EXPORTADORES	IMPORTADORES	PRODUCTORES
Estados Unidos	Estados Unidos	Brasil
Unión Europea (EU)	Francia	China
China	Reino Unido	Egipto
Indonesia	Japón	Indonesia
India	Suiza	Irán
Argentina		Marruecos
Brasil		

China, Brasil, Argentina e India exportaron en 2004 entre 11000 y 32000 toneladas de AEs hacia la EU. Los países en vía de desarrollo juegan un papel importante en la producción de AEs de limón, lima, ylang-ylang, geranio, vetiver y jazmín -en 2004 produjeron más del 50% de la demanda de la Unión Europea de estos productos-, debido posiblemente a los requerimientos ambientales y climáticos de algunas de estas especies.

En 2004, las importaciones de AEs por miembros de la Unión Europea correspondieron a €501 millones, presentando una disminución del 12% con respecto al monto respectivo de 2002. Sin embargo, el volumen de importaciones se mantuvo constante, *i.e.* el precio de los AEs se redujó en este período [99].

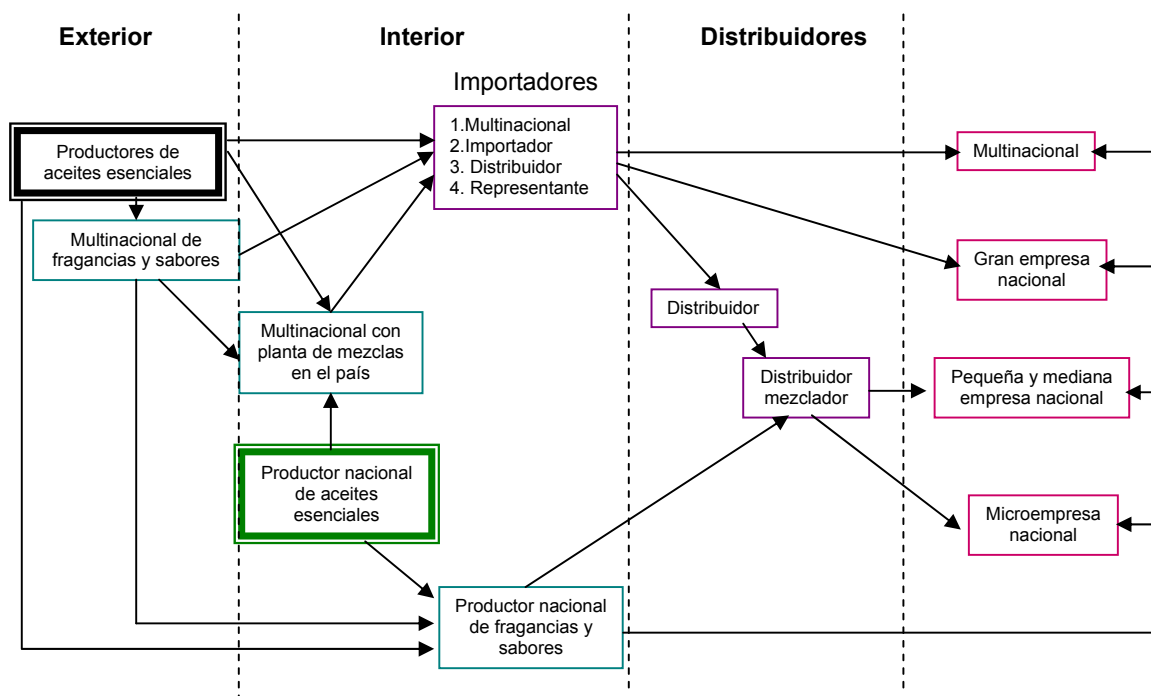
Los precios de los AEs, pueden variar ampliamente dependiendo de:

- **Factores de calidad:** determinados por el país de origen, el clima, la cosecha, la concentración de los metabolitos y el método de extracción;
- **Factores económicos:** basados en la oferta y la demanda.

La reglamentación para la exportación e importación de aceites esenciales, es establecida por cada país, incluyendo los requisitos relacionados con el aspecto ambiental, la salud del consumidor, lo concerniente a seguridad y ámbito social, y

el uso para el cual esté destinado, así e.g. *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients (INCI)*, *Cosmetic Toiletry and Perfumery Association*, *Good Agricultural and Collection Practices (GACP)*, *Good Manufacturing Practice (GMP)*, *HACCP* [100]. Los requisitos para el empaque, transporte, sellado y etiquetado de estos productos se establecen por entidades como la *Internacional Organization for Standardization (ISO)* [1]. La cadena de distribución de los aceites esenciales se presenta en la **Figura 9** [15].

Figura 9. Cadena de distribución de aceites esenciales.



Para los aceites ya posicionados en el mercado internacional existen precios establecidos, pero en el caso de los aceites de *L. alba*, *L. organoides* y *Phyla (Lippia) dulcis*, los precios se establecen directamente con el comprador potencial teniendo en cuenta los costos de producción, exportación, etc. [100].

Estas especies todavía no han sido utilizadas en el mercado mundial, por lo cual su introducción como nuevos productos en la formulación de diversos artículos,

requiere tiempo, costos, esfuerzo, estandarización y aprobación por el consumidor y las industrias.

La producción de aceites esenciales para aislar insumos naturales provee grandes oportunidades para los nuevos mercados en los países en vía de desarrollo, alcanzando incluso a sustituir los productos sintéticos [97]; así por ejemplo, la industria tabacalera presenta una gran demanda de mentol, la industria de pinturas emplea limoneno como solvente biodegradable, y en química fina se utiliza safrol como precursor en la semisíntesis de vainillinas [15]

La demanda de fragancias y aromatizantes naturales continúa creciendo debido a ventajas significativas, como son los bajos costos de producción y, los precios y oferta estables; además, no todos los aceites esenciales son satisfactoriamente reemplazados por sus análogos sintéticos [99].

1.4.2 Control de calidad de los aceites esenciales

Para el empleo de los AEs en el ámbito industrial se requiere desarrollar estudios de factibilidad de su producción y aplicaciones industriales, así como conocer la composición química detallada de estas mezclas. Este conocimiento, junto con las características físicoquímicas y organolépticas, es requisito imprescindible para establecer los parámetros que determinan la calidad de un AE. Adicionalmente, es de anotar la importancia de inocuidad del uso de este tipo de productos.

Según la calidad, los AEs pueden clasificarse en dos grandes grupos, a saber [15]:

- **Aceites esenciales crudos:** A los cuales no se les ha adicionado mayor valor agregado, son utilizados en la elaboración de velas, pebeteros, artículos de aseo y limpieza;
- **Aceites esenciales refinados:** Poseen mayor valor, debido a que han sido sometidos a procesos industriales como, rectificación, fraccionamiento,

desterpenado o descerado, entre otros. Estos productos son empleados en la industria alimenticia, farmaceútica, cosmética y de perfumes.

Cuando los aceites son sometidos a procesos industriales, aumentan también la estabilidad y perdurabilidad de las propiedades organolépticas de estas mezclas aromáticas, y, por ende, su costo [15].

Los principales parámetros analíticos para valorar la calidad de un aceite se reportan en la **Tabla 9**.

Las características organolépticas de los AEs son fundamentales para determinar sus aplicaciones, principalmente en las industrias de sabores y fragancias, cosmética y de perfumes.

Las propiedades físicas permiten hacer deducciones iniciales sobre los componentes presentes en los AEs. Densidades menores de 0.9 g/mL e índices de refracción menores de 1.47 sugieren un alto porcentaje de hidrocarburos terpénicos o compuestos alifáticos. Si la densidad es mayor de 0.9 g/mL y el índice de refracción menor de 1.47 es posible que haya en la mezcla compuestos oxigenados alifáticos. Los hidrocarburos aromáticos tienen densidades menores de 0.9 g/mL, pero sus índices de refracción son mayores de 1.47. Los compuestos oxigenados aromáticos o alicíclicos tienen densidades e índices de refracción superiores a los límites señalados [101].

Aún cuando las constantes físicas permitan determinar la homogeneidad de los AEs en diferentes lotes de producción, no dan razón sobre la composición química de estos productos. Este tipo de ensayos ha sido parcialmente sustituido por determinaciones espectroscópicas, que establecen la composición y permiten identificar las sustancias presentes, adulterantes o diluyentes, entre otros.

Tabla 9. Clasificación de los parámetros analíticos aplicados para el control de calidad de los aceites esenciales.

Características organolépticas	<ul style="list-style-type: none"> • Olor • Color • Apariencia
Determinaciones físicas	<ul style="list-style-type: none"> • Densidad • Poder rotatorio • Índice de refracción • Solubilidad en etanol • Punto de inflamación
Índices químicos	<ul style="list-style-type: none"> • Índice de acidez • Índice de éster • Índice de saponificación • Índice de acetilo • Índice de fenoles
Características cromatográficas	<ul style="list-style-type: none"> • Perfil cromatográfico por GC • Cuantificación de los principales componentes
Características espectroscópicas	<ul style="list-style-type: none"> • Ultravioleta-visible • Infrarrojo
Otras determinaciones	<ul style="list-style-type: none"> • Trazas de pesticidas • Metales pesados

Otras propiedades de los AEs a tener en cuenta son: volatilidad, estabilidad ante la luz y oxígeno, presencia de agentes oxidantes y reductores, pH y tensión superficial. La alta solubilidad en etanol les permite ser utilizados en la elaboración de perfumes y fragancias. Los AEs refractan la luz polarizada, propiedad que es usada para su control de pureza, pues tienen, por ello, un rango de índice de refracción característico. También presentan un poder rotatorio específico, en razón de que poseen en su composición numerosos productos óptimamente activos. La determinación de estas propiedades físicas puede ser de gran utilidad para la detección de adulteraciones o falsificaciones en este tipo de productos [1, 102].

1.5 CROMATOGRAFÍA DE GASES

Anteriormente, la caracterización de un AE se hacía identificando los componentes individuales mediante largas y costosas marchas analíticas, que incluían aislamiento y purificación, mediante cromatografía en capa fina y en columna, para su posterior determinación estructural por métodos químicos convencionales. En la actualidad, estos procedimientos han sido sustituidos por técnicas más versátiles, como la cromatografía de gases (GC) [1].

La cromatografía de gases es una técnica de separación en la que la muestra se volatiliza antes de ingresar a la columna cromatográfica; allí sufre un fenómeno de partición entre una fase móvil (gas inerte) y una fase estacionaria, constituida por un sólido o líquido soportado sobre las paredes de la columna [102]. La columna se encuentra dentro del horno, donde la temperatura se ajusta según los requerimientos de análisis. La temperatura óptima de la columna depende del punto de ebullición de los analitos en la muestra y del grado de separación requerido. Los analitos que eluyen de la columna pasan a un detector, el cual registra las diferentes sustancias y genera una señal proporcional a su cantidad [103, 104].

La caracterización de los aceites esenciales es una tarea fundamental para comprender sus propiedades organolépticas, biológicas y fisico-químicas. Existen diversas herramientas instrumentales para hacer el análisis, entre las cuales se encuentran: espectroscopía de infrarrojo (IR), la cual permite identificar los metabolitos presentes en mayor proporción por la presencia de bandas características de absorción [105]; resonancia magnética nuclear (RMN), empleada en la caracterización de nuevos metabolitos previo su aislamiento [58]; y la más ampliamente aplicada, cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) [9, 102].

En la actualidad, el detector espectrométrico de masas acoplado al cromatógrafo de gases constituye una herramienta indispensable para determinar la composición de una muestra compleja. En esta unión se obtienen espectros de masas de los compuestos que eluyen de la columna cromatográfica. Los constituyentes del aceite se identifican con base en sus patrones de fragmentación e índices de retención, los más frecuentemente usados son los índices de Kovàts (**Ecuación 1**) [106].

Los índices de Kovàts se calculan teniendo en cuenta los tiempos de retención de una serie homóloga de hidrocarburos desde C₈ hasta C₂₅, analizados en el cromatógrafo de gases bajo las mismas condiciones operacionales que los aceites esenciales, empleando generalmente las columnas con fases estacionarias polar y apolar.

Para su determinación se emplea la siguiente fórmula:

$$I_K = 100n + 100 \left(\frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \right) \quad \text{Ecuación 1}$$

donde:

I_K : Índice de Kovàts;

n : Número de átomos de carbono del n -alcano que eluye antes del compuesto de interés;

N : Número de átomos de carbono del n -alcano que eluye después del compuesto de interés;

t_{Rx} : Tiempo de retención del compuesto de interés, x ;

t_{Rn} y t_{RN} : Tiempos de retención de n -alcanos que eluyen antes y después del compuesto x , respectivamente.

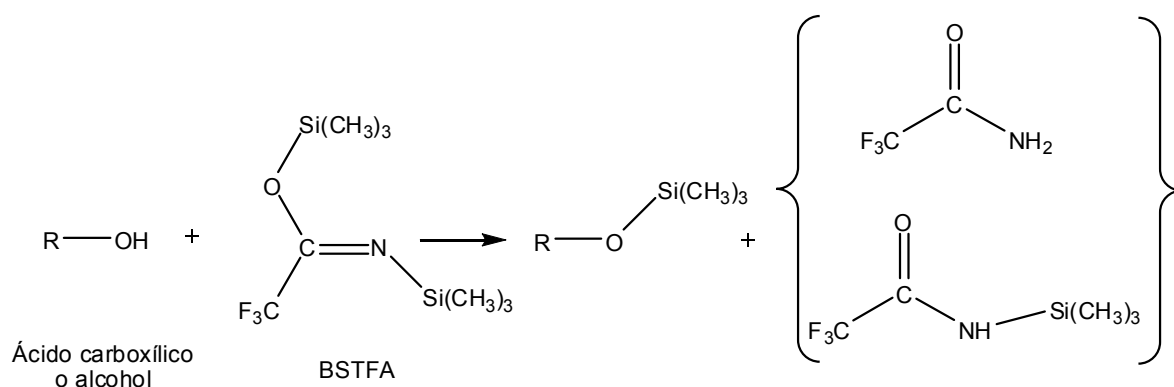
1.6 DERIVATIZACIÓN QUÍMICA

La derivatización es un método químico empleado para eliminar o reducir interacciones no deseadas y degradación térmica de los analitos, este procedimiento permite mejorar la respuesta del detector, aumentar la estabilidad térmica de los analitos y mejorar la simetría de los picos en GC [107].

Consiste en la conversión química de un grupo funcional (-OH, -NH₂, -COOH, -CO) en otro grupo, menos sensible a la temperatura, o más “activo” cromatográficamente. La elección del método de derivación se basa en la naturaleza química del grupo funcional requerido para derivar, en los otros grupos funcionales presentes y, en el objetivo para realizar la reacción [108].

La sililación es un proceso en el cual un hidrógeno activo (-OH, NH₂) es sustituido por un grupo trialquilsililo. Estos derivados presentan mejor volatilidad, estabilidad térmica y simetría en la forma de los picos, para ser analizados por GC. Uno de los agentes derivatizantes más empleados es la N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA), cuyo esquema general de reacción se ilustra en el **Esquema 2** [108, 109].

Esquema 2. Reacción de sililación.



1.7 DETERIORO OXIDATIVO

La reacción espontánea del oxígeno atmosférico con moléculas de lípidos, es conocida como autoxidación; principalmente, los ácidos grasos poliinsaturados son susceptibles a sufrir este tipo de degradación. Tanto sistemas biológicos, como productos alimenticios sufren peroxidación lipídica, la cual conduce a la formación de nuevos radicales, mediante abstracción de un átomo de hidrógeno de una molécula lipídica: esta reacción constituye la etapa de iniciación del deterioro oxidativo de los lípidos [110].

Los radicales son especies químicas, moleculares o atómicas que poseen electrones desapareados en sus orbitales más externos. Los radicales se caracterizan por poseer una configuración que les imparte inestabilidad, alta reactividad química y tiempo de vida media muy corto. Los radicales no siempre reaccionan con especies radicalarias, para formar moléculas más estables; a menudo, reaccionan con especies químicas estables, ya sea cediendo su electrón desapareado (radical reductor), tomando uno de la molécula estable (radical oxidante) o uniéndose a ella [111].

Los radicales son generados continuamente durante los procesos metabólicos. El oxígeno es el principal responsable de la producción de agentes radicalarios en las células del metabolismo aerobio, siendo la mitocondria la principal fuente de radicales a nivel celular.

En la etapa de propagación de estos procesos degradativos los radicales formados reaccionan con el oxígeno molecular conduciendo a la formación de hidroperóxidos y radicales peroxilo. Los hidroperóxidos son compuestos no volátiles e inoloros, bastante inestables, que se descomponen y forman compuestos volátiles, responsables del *off-flavour* en los alimentos. Los radicales peroxilo por su parte, remueven un átomo de hidrógeno de una molécula lipídica.

La entalpía de esta reacción es baja, por lo que, estas reacciones se propagan rápidamente [112].

La fase terminal de esta serie de reacciones, tiene lugar cuando la cantidad de lípidos insaturados se ha reducido considerablemente. Así, los radicales se enlazan unos con otros, formando compuestos estables no radicalarios [112].

Los radicales alcoxi formados por descomposición de hidroperóxidos pueden descomponerse para producir hidrocarburos volátiles, alcoholes y aldehídos, estos últimos aportan notas características del aroma propio del proceso degradativo lipídico (*off-flavour*). Adicionalmente, participan en subsiguientes reacciones con diferentes moléculas, entre ellas los péptidos, provocando inhibición de sus funciones enzimáticas, perturbando procesos de absorción de calcio y alterando el ADN, entre otras consecuencias nocivas [109]. El efecto más significativo de la peroxidación lipídica es el daño de las membranas celulares a nivel estructural y funcional [113].

En sistemas biológicos existen mecanismos de defensa naturales, entre los que se encuentran mecanismos enzimáticos, trazas de minerales y vitaminas.

Las fuentes exógenas de radicales son principalmente radiaciones ionizantes, e.g. el humo de cigarrillo, algunos herbicidas, etanol, óxido de nitrógeno, dióxido de azufre, ozono, hidrocarburos policlorados, óxidos metálicos y metales (Fe, Cu, Mn, Ni, Al, Pb), algunos antibióticos, inhalación de oxígeno puro o exposición a oxígeno hiperbárico [2].

El estrés oxidativo se caracteriza por un desequilibrio del balance entre prooxidantes y antioxidantes, a favor de los primeros, sea por reducción de los niveles de antioxidantes y/o por el incremento de la producción de oxidantes [114]. Algunas de las más importante consecuencias patológicas de este desbalance son

la arteriosclerosis, envejecimiento prematuro, infarto del miocardio, carcinogénesis, accidentes cerebro-vasculares, virosis y artritis, entre otros [115].

Las enfermedades mencionadas, son causados por la presencia de compuestos carbonílicos en la célula, productos de peroxidación lipídica; el grupo carbonilo, debido a sus propiedades electrofilas, puede modificar las bases nitrogenadas y los azúcares del ADN, induciendo procesos de degradación celular que desencadenan estos padecimientos [116].

Las grasas y aceites presentes en los alimentos sufren reacciones de deterioro por causa del calentamiento, largos tiempos de almacenamiento, exposición a la luz y a radiaciones ionizantes. Estas reacciones afectan el valor nutricional y las características organolépticas de los alimentos, sin embargo, pueden ser inhibidas por diversos métodos, a saber: disminuyendo el acceso del oxígeno al producto, empleado bajas temperaturas, inactivando lipoxigenasas, aplicando empaques al vacío y adicionando antioxidantes. Aún cuando los productos alimenticios contienen AO naturales, éstos se pierden parcialmente durante el procesamiento, manipulación y almacenamiento [110].

Un antioxidante se define como cualquier sustancia, de origen natural o sintético, que cuando se encuentra en baja concentración en relación con un sustrato oxidable, retrasa o previene la oxidación de este sustrato [112].

La actividad antioxidante de una sustancia depende, entre otros factores, del sustrato atacado por los radicales y del mecanismo de esta interacción. La acción inhibitoria de la oxidación se describe por dos características cinéticas [81]:

- **Efectividad:** Representa la posibilidad de bloqueo de la reacción de radicales, con radicales peróxido responsables de la etapa de inducción;
- **Fortaleza:** Expresa la posibilidad de que el inhibidor participe en otras reacciones.

Con el fin de retardar la peroxidación lipídica, se adicionan antioxidantes a los productos alimenticios; éstos pueden ser tanto de origen sintético como natural. Los principales AO sintéticos son butil-hidroxitolueno (BHT) y butil-hidroxianisol (BHA), entre otros. Sin embargo, estas sustancias presentan ciertos inconvenientes, *e.g.* la vitamina E en altas concentraciones actúa como prooxidante, y el BHA y el BHT pueden generar células carcinogénicas en ensayos con ratones [81].

Los antioxidantes naturales pueden ser divididos en dos grupos, tocoferoles y ácido ascórbico. La vitamina C y el α -tocoferol presentan sinergismo. Mientras el α -tocoferol es liposoluble y se ubica en el interior de las membranas biológicas, la vitamina C es hidrosoluble. Las reacciones de oxidación en cadena convierten al α -tocoferol en su respectivo radical, poco reactivo, sin habilidad para reaccionar con los ácidos grasos presentes. Sin embargo, el radical tiende a migrar hacia la membrana, reaccionar con la vitamina C y recuperar su estructura [108].

Por estas razones, cierto número de investigaciones han centrado sus esfuerzos en encontrar nuevos antioxidantes naturales, *e.g.* la vainillina es un producto ampliamente empleado por sus características saborizantes, al cual se le han reconocido características antioxidantes [110].

Los extractos vegetales contienen una gran variedad de productos naturales, entre los cuales algunos principios activos son responsables de su capacidad antioxidante.

Existen diversas metodologías para determinar la actividad antioxidante de una mezcla compleja, pero la aplicabilidad de cada uno de los procedimientos está determinada por las propiedades y características del método y de la matriz. Así, por ejemplo, para el grupo de alimentos, suero y fluidos fisiológicos, se aplican

pruebas de absorbancia del radical oxígeno y ensayos de quimioluminiscencia. En 1998, se implementó una modificación de la metodología colorimétrica tradicional del radical DPPH[·], con el fin de determinar la capacidad antirradicalaria para matrices coloreadas. Para el desarrollo de este procedimiento se empleó cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) acoplada a un detector UV-VIS [117].

De igual forma, se han implementado metodologías que determinan la actividad antioxidante *in vivo* de diferentes sustancias, la principal ventaja de este procedimiento es el empleo de sistemas lipídicos celulares, lo que provee mayor información acerca de la toxicidad del antioxidante y de su posible aplicación en productos de consumo humano [5, 118].

Se han estudiado diversas metodologías basadas en principios colorimétricos, bien sea, por monitoreo de reacciones de peroxidación lipídica (decoloración de β-caroteno) [9], o por reducción de radicales coloreados (DPPH[·], ABTS^{·+}, FRAP[·], DMPD[·]) [119-120]. Estas últimas, determinan de manera particular la capacidad de secuestrar radicales, y las ventajas de estos ensayos son, principalmente, su fácil manipulación y evaluación de resultados, y la rápida determinación [121].

Existen diversos parámetros para clasificar los métodos empleados en la determinación de la actividad antioxidante como una medida de la capacidad de atrapar radicales, entre ellos, se encuentran la solubilidad del antioxidante (lipofilicidad o hidrofilicidad), la naturaleza del mismo y su mecanismo de acción (reducción del radical o retraso en la oxidación), entre otros [122].

El método colorimétrico empleado, determina la capacidad de capturar el radical DPPH[·] (2,2-difenil-1-picrilhidracil) en soluciones etanólicas. Este método es aplicable para AO lipo- e hidrosolubles. Cuando el radical DPPH[·] es “atrapado” por un antioxidante a través de donación de un átomo de hidrógeno, el radical se

reduce, para formar la respectiva hidrazina, DPPHH; la absorptividad molar a 514 nm cambia de 9660 a 1640, y el color se torna de púrpura a amarillo. Para determinar el grado en que el AO logra reducir el radical se determina el EC, *i.e.* el número de moles de antioxidante necesarias para reducir una mol del radical, y se expresa así (**Ecuación 2**) [117, 121]:

$EC = \frac{\text{miligramos de antioxidante en el estado estacionario}}{\text{miligramos de DPPH}^{\cdot} \text{ en el estado estacionario}}$	Ecuación 2
--	-------------------

La concentración de antioxidante en el estado estacionario es aquella a la cual la absorbancia medida a través del tiempo no cambia o su variación es menor de 10 %, y la concentración del radical, es la concentración inicial medida antes de agregar la sustancia antioxidante. Posteriormente, la capacidad de atrapar el radical se determina con base en una gráfica de porcentaje remanente de DPPH[·] Vs EC [121].

Los compuestos más efectivos para atrapar radicales, generalmente poseen grupos –OH, –NH₂ o –SH, los cuales pueden presentar dos posibles mecanismos de reacción [123]:

- Abstracción directa de un átomo de H, la cual es gobernada por la entalpía de disociación de los enlaces Rx-H y DPPH-H;
- Transferencia de un electrón, determinada por el potencial de ionización de Rx-H y DPPH[·].

1.8 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS ACEITES ESENCIALES

Las diferentes propiedades biológicas de los aceites esenciales están directamente relacionadas con su composición química. Así, los sesquiterpenos exhiben actividad citotóxica y mutagénica, y son menos efectivos para inhibir el desarrollo de los microorganismos que sus análogos oxigenados. Por su parte, los

fenoles son microbicidas o inhibidores del crecimiento dependiendo de su estructura química, razón por la cual los aceites esenciales con elevado contenido de fenoles presentan actividad antimicrobiana alta (**Tabla 10**) [8].

Los aldehídos alifáticos presentan inhibición del desarrollo o actividad microbicida a bajas concentraciones, si existe un enlace doble cerca del grupo insaturado (aldehídos α,β -insaturados). Estos compuestos son poco frecuentes en los aceites esenciales, y su capacidad de acción depende de la longitud de cadena carbonada y del tipo de microorganismos; así, la longitud óptima contra bacterias gram-positivas es de 6 a 10 átomos de carbono, para bacterias gram-negativas de 6 a 12; contra dermatofitos, de 5 a 10 y contra levaduras, de 7 a 11 átomos de carbono. De esta manera, aldehídos de 10 carbonos presentan muy buen espectro de acción [8].

Tabla 10. Espectro de actividad antimicrobiana de compuestos fenólicos.

TIPO DE FENOL	BACTERIAS		DERMATOFITOS	LEVADURAS
	GRAM-POSITIVAS	GRAM-NEGATIVAS		
Alquil fenoles	X	X	X	X
Butil fenoles	X	X	X	X
1,2- y 1,4-Hidroquinonas	X	X	-	-
Alquilresorcinoles	X	X	X	X
Naftoles	X	X	X	X
Bifenilos	X	X	X	X
Bencilfenoles	X	X	X	X

X: Efecto inhibitor o microbicida en concentraciones superiores a 250 ppm.

2. METODOLOGÍA

La identificación taxonómica de las especies de tres plantas de la familia *Verbenaceae*, se realizó en el Herbario Nacional Colombiano del Instituto de Ciencias Naturales, en la Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. El Prof. Dr. José Luis Fernández realizó la clasificación botánica, y la autora le expresa sus más sinceros agradecimientos.

La metodología seguida para la extracción de los aceites esenciales se describe en el Numeral 2.1. El correspondiente proceso de identificación, caracterización y cuantificación de los metabolitos secundarios presentes en los aceites de *Lippia alba*, *Phyla (Lippia) dulcis* y *Lippia origanoides* se explica detalladamente en el Numeral 2.2. El procedimiento desarrollado para la determinación de la actividad antioxidante se relata en el Numeral 2.3. Finalmente, las metodologías seguidas para determinar las propiedades físico-químicas se encuentran registradas en la Sección 2.4. El desarrollo del presente estudio incluyó el análisis de los resultados de actividades antimicótica, antibacterial, antiparasitaria y estudios de citotoxicidad, obtenidos por el Grupo de Polifenoles (UTP), Laboratorio de Infección y Cáncer (U de A) y Cintrop (Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, UIS), grupos de investigación integrantes de CENIVAM.

2.1 EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES

El material vegetal empleado durante la investigación fue colectado de la zona de cultivos experimentales del Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales, CENIVAM, en el campus principal de la Universidad Industrial de Santander.

El aceite esencial fue extraído de las partes aéreas (hojas, tallos e inflorescencias) de *Lippia origanoides*, *Phyla (Lippia) dulcis*, y dos quimiotipos de *Lippia alba*, carvona y citral, previamente identificados. Los esquejes empleados para la propagación vegetal de estas especies procedían del Cañon del Río Chicamocha (Santander), Piedecuesta (Santander), Bucaramanga (Santander) y Colorado (Bolívar), respectivamente.

Para la extracción se empleó material vegetal fresco, previamente seleccionado y pesado (ca. 250 g). Todas las determinaciones másicas realizadas en el desarrollo del estudio se llevaron a cabo en una balanza analítica METTLER TOLEDO AG 285 (Suiza).

Los metabolitos se aislaron aplicando la técnica de hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD), de acuerdo con el procedimiento descrito en [6]. El material vegetal se sometió a extracción en un equipo de destilación tipo *Clevenger* con reservorio de destilación *Dean-Stark* y adaptación para calentamiento por radiación de microondas a través de un horno doméstico marca *LG-Intelowave* con potencia de salida de 1200 W, empleado experimentalmente al 60% de la potencia del horno (720 W). La metodología desarrollada fue descrita por Stashenko y sus colaboradores [4, 90]. El tiempo total de extracción fue de 40 min. Finalmente, el aceite esencial se separó por decantación, y se secó adicionando a la mezcla Na_2SO_4 anhidro. Del aceite, ya deshidratado, se tomaron 50 μL , y se depositaron en un tubo de reacción al cual se añadieron 4 μL de *Istd* (*n*-tetradecano), la mezcla se aforó a 1 mL con diclorometano. La extracción del AE de cada especie se realizó por triplicado, para obtener datos de reproducibilidad. El aceite aislado fue pesado, y el rendimiento de la extracción se determinó con base en el peso inicial del material vegetal fresco, los valores determinados para cada extracción se promediaron, y la variación en el contenido de aceite se presenta como la desviación estándar.

2.2 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

Con el propósito de realizar una completa caracterización química de los aceites esenciales extraídos, las muestras se sometieron a un proceso de separación cromatográfica, usando dos columnas de diferente polaridad como se describe a continuación.

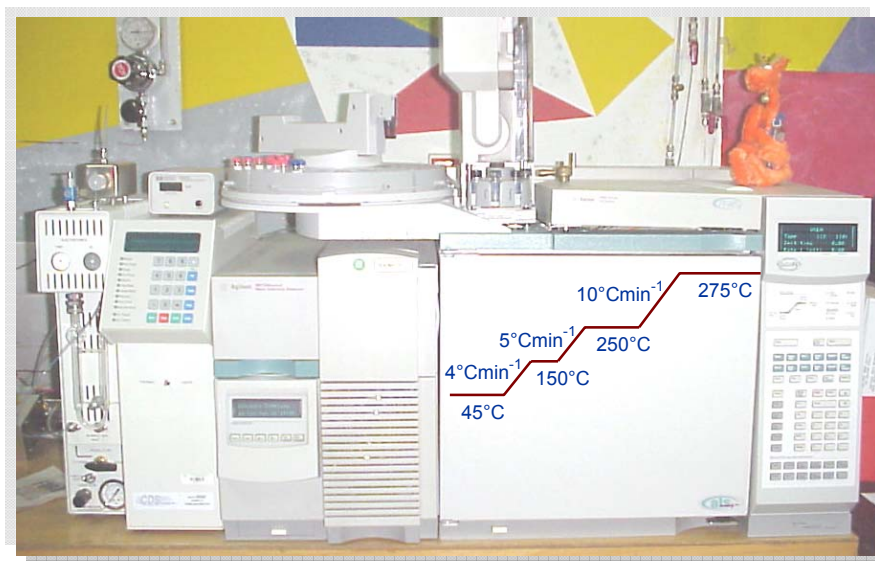
2.2.1 Columna apolar

El análisis cromatográfico se llevó a cabo en un equipo *Agilent Technologies 6890 plus Series GC System* acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 5973 Network* (con analizador de cuádruplo), equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (250°C, relación de *split* 30:1) y un inyector automático *Agilent 7863* (**Figura 10**). La separación de los analitos de la mezcla se realizó en una columna capilar apolar DB5-MS (*J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.*) de 60 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25 μm , d_f , con fase estacionaria de 5%-fenilpoli(metilsiloxano). El gas de arrastre empleado en el análisis fue helio, con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 16.47 psi, y una velocidad de flujo de 1 mL min⁻¹. La temperatura del horno del cromatógrafo de gases se programó así: el calentamiento inició desde 45°C (5 min) hasta 150°C (2 min) @ 4°C min⁻¹, luego hasta 250°C (5 min) @ 5°C min⁻¹ y, finalmente, hasta alcanzar 275°C (15 min) @ 10°C min⁻¹. Con base en los cromatogramas obtenidos se calcularon los índices de Kovàts para cada uno de los picos presentes, según la **Ecuación 2**; la comparación de los índices de retención con los reportados en la literatura provee una identificación tentativa de los metabolitos presentes en el aceite esencial [106].

Los espectros de masas se obtuvieron por impacto de electrones con energía de 70 eV. Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia permanecieron a 230 y 285°C, respectivamente. Los espectros de masas y corrientes iónicas reconstruidas (TIC) fueron obtenidos en un cuádruplo, por medio

de barrido automático de radiofrecuencia (*full scan*), en el rango de masas de m/z 40-350.

Figura 10. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Plus Series GC System* acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 5973 Network*, equipado con un puerto de inyección *split/splitless* y un inyector automático *Agilent 7863*.



La identificación de los metabolitos presentes en los AEs se llevó a cabo comparando sus espectros de masas con los registrados en las librerías (NBS 75K, Wiley 2002 y Adams 2004).

La cuantificación de los metabolitos identificados se realizó mediante estandarización interna, empleando *n*-tetradecano, *Istd*, según la **Ecuación 3**:

$$C_x = \frac{C_{Istd} * A_x}{A_{Istd}}$$

Ecuación 3

Donde:

C_x : Concentración (g/L) del analito en la muestra;

C_{Istd} : Concentración (g/L) de *Istd*;

A_x : Área del pico cromatográfico del analito, cuentas;

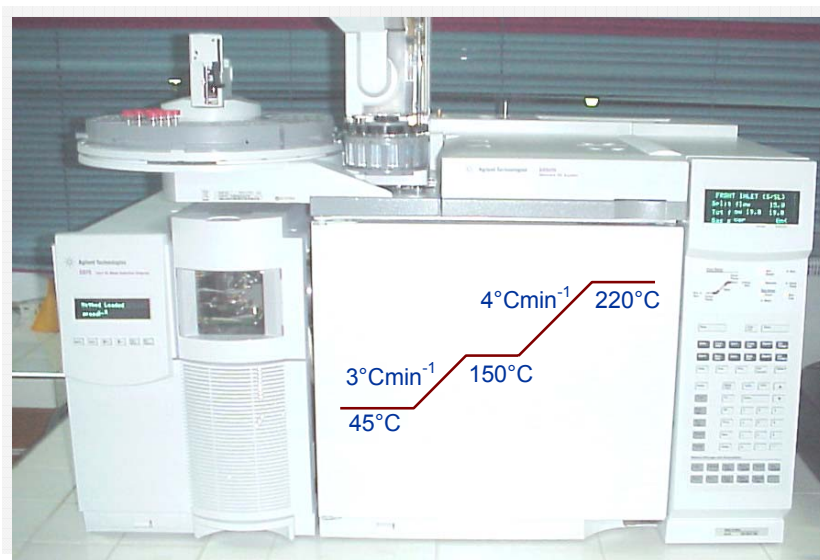
A_{Istd} : Área del pico cromatográfico del *Istd*, cuentas.

2.2.2 Columna polar.

El análisis en columna polar se desarrolló empleando un cromatógrafo *Agilent Technologies 6890N Network Series GC* acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 5975*, con ionización por impacto de electrones; un puerto de inyección *split/splitless* (250 °C, relación de *split* 50:1) y un inyector automático *Agilent Technologies 7683B Series inyector* (**Figura 11**). Los datos fueron adquiridos y procesados en el sistema de datos *MS-ChemStation* (Versión D.02.00.275). El proceso de separación de los metabolitos de la mezcla se llevó a cabo en una columna capilar polar DB-WAX (*J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.*), con fase estacionaria entrecruzada e inmobilizada de poli(etilenglicol), de 60 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25 μm , d_f . El gas de arrastre empleado fue helio, con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 16.47 psi. La programación de temperatura del horno inició desde 45 °C (5 min) hasta 150 °C (3 min) @ 3 °C min^{-1} , seguidamente, se aumentó hasta 220 °C (5 min) @ 4 °C min^{-1} . La identificación tentativa de los metabolitos presentes se realizó por comparación con los espectros de masas reportados en las bases de datos.

Los espectros de masas fueron obtenidos por impacto de electrones con energía de 70 eV. Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia se mantuvieron a 230 y 180 °C, respectivamente. Los espectros de masas y TIC se obtuvieron en un cuádruplo, por medio de barrido automático de radiofrecuencias (*full scan*), en el rango de masas de m/z 40-350.

Figura 11. Cromatógrafo *Agilent Technologies 6890N Network Series GC* acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 5975*, ionización por impacto de electrones, un puerto de inyección *split/splitless* y un inyector automático *Agilent Technologies 7683B Series injector*.



2.3 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La actividad antioxidante se evaluó como una medida de la capacidad de atrapar radicales, siguiendo las concentraciones de los radicales DPPH[•] al reaccionar con Trolox[®], vitamina E y los posibles agentes antioxidantes (aceites estudiados). El procedimiento desarrollado se describe a continuación:

A una solución (2.5 mL) del radical DPPH[•] (color violeta) de 30 ppm, en etanol se adicionaron 0.5 mL de soluciones del aceite y de los antioxidantes de referencia (Trolox[®] y vitamina E) a analizar; inmediatamente, se determinó la absorbancia de la mezcla de reacción a 514 nm, en un espectrofotómetro VIS *Jenway 6300* (Dunmow, Inglaterra) Esta determinación continuó cada minuto, hasta alcanzar el estado estacionario ($\Delta A = 0.002 \text{ min}^{-1}$).

Las concentraciones de DPPH· correspondientes a las absorbancias medidas, se determinaron mediante interpolación en una curva de calibración construida con soluciones de DPPH· de 3.5, 10, 17, 20.5, 24, 27.5 y 30.5 ppm [121].

La concentración del radical DPPH·_{t=0}, es la concentración inicial medida antes de agregar la sustancia antioxidante (Blanco).

Las concentraciones ensayadas de los aceites esenciales y los AO de referencia, se seleccionaron con base en la absorbancia a la cual las mezclas de reacción alcanzaran el estado estacionario, de manera tal que ésta se encontrara entre 0.2 y 0.8.

Para cada concentración de antioxidante se graficó la cinética de reacción (cantidad remanente de DPPH·, %, en función del tiempo). De estas gráficas se determinaron los respectivos porcentajes remanentes del radical en el estado estacionario de cada concentración, y estos datos se graficaron Vs EC, *i.e.* la relación entre los miligramos de antioxidante y miligramos de DPPH·. De esta gráfica, el valor de EC, que reduzca la concentración inicial de DPPH· a la mitad se conoce como EC₅₀.

2.4 DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES

2.4.1 Densidad.

Inicialmente, se realizó la calibración de un picnómetro de 1 mL, tomando las respectivas mediciones en una balanza analítica METTLER TOLEDO AG 285, (Suiza) y teniendo en cuenta la temperatura del ambiente en el momento de realizar las mediciones.

Después del proceso de calibración, se pesó la masa correspondiente al volumen del picnómetro para cada uno de los aceites esenciales. Cada una de las mediciones se realizó cinco veces con el fin de obtener datos de reproducibilidad.

2.4.2 Índice de refracción.

Para determinar el índice de refracción de cada uno de los aceites extraídos, se empleó un refractómetro tipo ABBE NAR-1T, marca ATAGO (Bellevue, EE.UU.), el cual incluía termómetro digital ($\pm 0.1^\circ\text{C}$) y adecuación para baño termostático. Cada determinación se realizó por triplicado.

2.4.3 Solubilidad.

En esta determinación, se evaluó la solubilidad de cada uno de los aceites en soluciones acuosas de etanol al 20, 40, 60 y 80% v/v. De cada solución, se tomaron 0.5 mL, y se les adicionó aceite en volumen de 2 μL , hasta alcanzar el límite de solubilidad, *i.e.* hasta que la mezcla se torna opaca.

2.4.4. Rotación específica.

En la determinación de esta propiedad, se empleó un Polarímetro *SR-6 Full Circle Scale*, fabricado por PolyScience (Illinois, EE.UU.). Se determinó el ángulo de desviación cuando el recipiente estaba vacío y cuando el recipiente estaba lleno con AE, la diferencia entre ambos valores permitió calcular el poder rotatorio de la disolución; este ángulo de rotación observado se denomina α , y la rotación específica ($[\alpha]_D^t$) se determina según la **Ecuación 4**.

$$[\alpha]_D^t = \frac{\alpha}{l \cdot d}$$

Ecuación 4

Donde: l : longitud del portamuestras, dm;
 d : densidad del compuesto, g mL^{-1} .

Este procedimiento se realizó cinco veces para cada uno de los AEs a analizar.

2.5 DERIVATIZACIÓN QUÍMICA

Debido a la inestabilidad térmica del (+)-hernandulcin, este compuesto no fue identificado en el AE de *Phyla (Lippia) dulcis* bajo las condiciones cromatográficas aplicadas en la separación, por tal razón, se llevó a cabo una reacción de derivatización del grupo –OH presente en este compuesto.

En la reacción se empleó BSTFA [*N,O-bis(trimethylsilyl)-trifluoro-acetamide*] como agente sililante: teniendo en cuenta la presencia de alcoholes diferentes al hernandulcin en el aceite (α -bisabolol, espatulenol, linalool, etc.) se adicionó agente sililante en exceso, así, para la reacción se tomaron volúmenes iguales de AE de *Phyla (Lippia) dulcis* y BSTFA (100 μ L) y se disolvieron en 200 μ L de tolueno, a esta mezcla se adicionaron 3 μ L de *n*-tetradecano. La reacción se desarrolló a una temperatura de 50°C durante 1h. Una alícuota de 100 μ L de la masa final de reacción fue diluída hasta 1 mL con tolueno, e inyectada en un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Plus Series GC System* acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 5973 Network* (Figura 10).

2.6 RESULTADOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Las pruebas de actividad biológica desarrolladas por los grupos de investigación adscritos al Centro de Investigación de Excelencia, CENIVAM, se reportan en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Pruebas de actividad biológica realizadas en los grupos de investigación adscritos al CENIVAM

UNIVERSIDAD	U de A ^a	UTP ^b	UIS ^c
GRUPO DE INVESTIGACIÓN	Infección y Cáncer	Polifenoles	CINTROP
INVESTIGADORES	Dres. Ana Cecilia Meza, Gabriel Bueno	Dr. Hipólito Isaza	Dra. Patricia Escobar
ENSAYOS	Antimicótica	Antibacterial y antifúngica	Citotoxicidad
MICROORGANISMOS	<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCCC 27853	<i>Leishmania chagasi</i>
	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>Salmonella tiphymurium</i> ATCC 13311	Células VERO
	<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 204305	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	
	<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 204304	<i>Escherichia coli</i>	

^a Universidad de Antioquia, Medellín.

^b Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira.

^c Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.

3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los pliegos testigo de cada especie identificada, fueron depositados como muestra permanente en el Herbario Nacional Colombiano, Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, con los números de *voucher*, registrados en la **Tabla 12**. El doctor J.L. Fernández (UN, Bogotá) hizo la clasificación botánica de las plantas estudiadas.

Tabla 12. Números de *voucher* COL de las especies estudiadas.

ESPECIE	AUTOR	FAMILIA	No. COL
<i>Phyla (Lippia) dulcis</i>	(Trevir.) Moldenke	Verbenaceae	512079
<i>Lippia origanoides</i>	Kunth	Verbenaceae	512075
<i>Lippia alba</i> , quimiotipo Carvona	(Mill.) N. E. Br.	Verbenaceae	512078
<i>Lippia alba</i> , quimiotipo Citral	(Mill.) N. E. Br.	Verbenaceae	512077

3.1. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA DE LAS ESPECIES VEGETALES.

Las especies empleadas en el presente trabajo de investigación han mostrado la existencia de varios quimiotipos; los quimiotipos son individuos de una misma especie que difieren entre sí por la distinta composición química de sus metabolitos secundarios [1]. Debido a esta variedad de composiciones, es preciso especificar las características morfológicas más destacadas de las plantas empleadas en el presente estudio, con el fin de identificar posibles diferencias entre las plantas de varios quimiotipos.

3.1.1 *Lippia alba* (Mill.) N.E.Brown.

La relación entre las diferencias morfológicas y las variaciones composicionales de las plantas, no son tan claras para algunos quimiotipos de *L. alba*, sin embargo, las plantas bajo estudio presentaron algunas diferencias morfológicas, entre las cuales cabe mencionar:

Figura 12. Planta de *Lippia alba*, quimiotipo carvona.



Las hojas de *L.alba*, quimiotipo carvona, son más anchas y redondeadas que las observadas para el quimiotipo citral, y presentan una coloración ligeramente más amarilla. Los tallos son menos leñosos y crecen de forma ascendente (**Figura 12**).

Figura 13. Planta de *Lippia alba*, quimiotipo citral.



Las plantas de este quimiotipo presentan hojas más angostas y puntiagudas que las del quimiotipo carvona, con un tono verde ligeramente más oscuro. Su crecimiento es particularmente diferente al descrito para el quimiotipo carvona, pues los tallos de esta planta son considerablemente más leñosos y se arquean hacia el suelo (**Figura 13**).

3.1.2 *Phyla (Lippia) dulcis* (Trevir.) Moldenke

Para esta especie han sido caracterizados dos quimiotipos, los cuales fueron descritos en la **Tabla 4**; uno propio de México, con un alto contenido de alcanfor, y

otro, cultivado en Puerto Rico, con una cantidad de hernandulcin relativamente alta. Las descripciones morfológicas de los dos quimiotipos difieren considerablemente, como se ilustra a continuación.

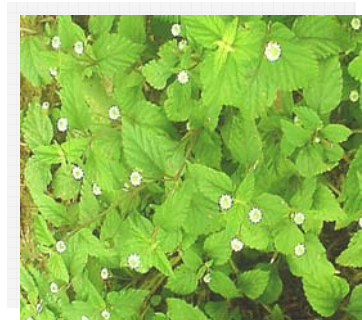
Figura 14. Planta de *Lippia dulcis*, quimiotipo alcanfor [65].



Es una hierba tenue, presenta raíces con vellosidades de las cuales surgen delgados tallos cilíndricos, posee hojas opuestas y flores con pedúnculos alargados, crece ascendentemente como se observa en la **Figura 14** [65].

Figura 15. Planta de *Phyla (Lippia) dulcis*, quimiotipo hernandulcin.

Es una planta rastrera, que crece hasta longitudes de 60 cm, sus hojas y flores presentan sabor dulce (**Figura 15**).



3.1.3 *Lippia origanoides* Kunth.

Es un arbusto o árbol muy aromático que presenta pequeñas flores blancas (**Figura 5**). Para esta especie, aun cuando se han caracterizado aceites con diferencias en sus composiciones químicas, no se han identificado diferencias morfológicas entre plantas de varios quimiotipos.

3.2. AISLAMIENTO Y ANÁLISIS POR GC-MS DE ACEITES ESENCIALES

Los resultados de la caracterización físico-química de los AEs se presentan a continuación.

3.2.1 *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown

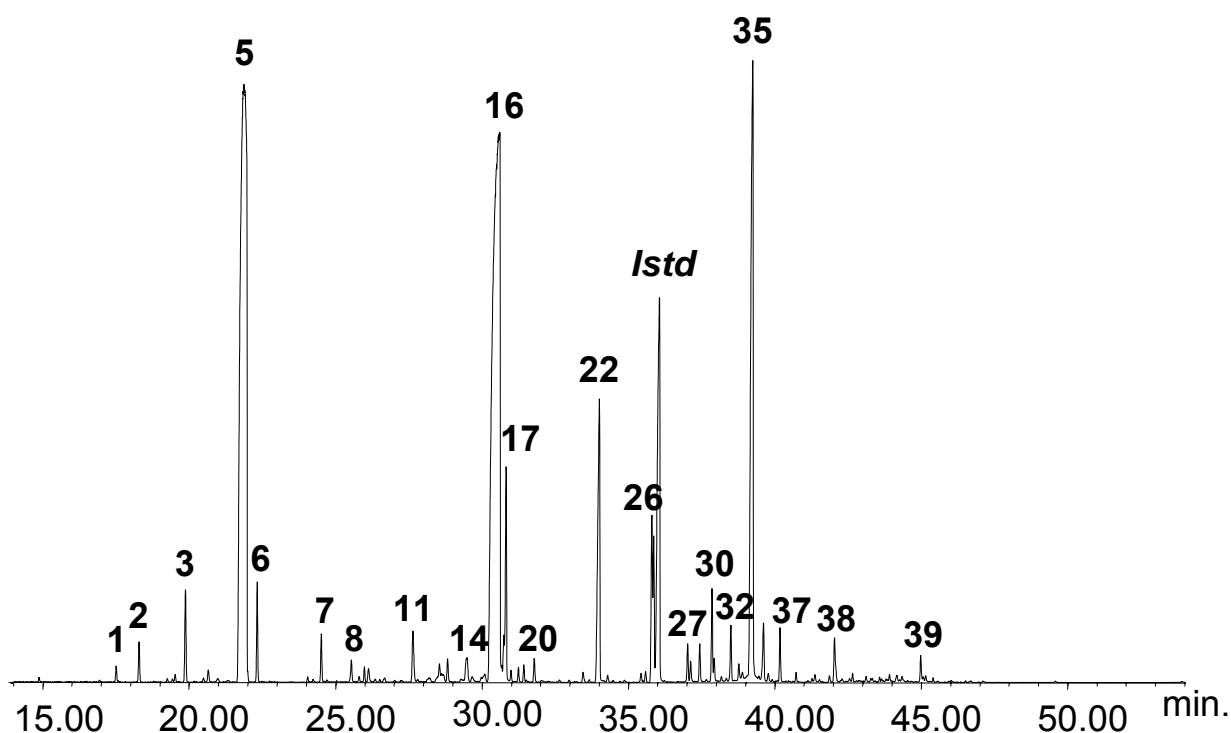
- *Lippia alba*, quimiotipo carvona: el AE obtenido por MWHD presentó un olor intenso y penetrante, y un color traslúcido, ligeramente amarillo. El rendimiento de extracción fue de $0.97 \pm 0.03\%$, siendo ligeramente mayor al reportado previamente por Stashenko (0.69%) [6]. El contenido de aceite en el material vegetal, depende del estado de madurez de la planta y del estrés al que esté sometida.

En la **Figura 16**, se presenta el perfil cromatográfico de los metabolitos secundarios volátiles obtenidos por MWHD de hojas, tallos e inflorescencias de *Lippia alba*, quimiotipo carvona. En la **Tabla 13** se registran los componentes mayoritarios aislados e identificados por GC-MS, según el orden de elución en la columna DB-5 (cantidad relativa, $\geq 0.1\%$), junto con sus índices de retención, olores característicos, cantidades relativas y concentraciones, determinadas utilizando el método de estandarización interna. Se identificaron 39 componentes, representando el 97% de los constituyentes del aceite esencial.

En los aceites esenciales de *Lippia alba*, quimiotipo carvona, se identificaron principalmente metabolitos característicos de tres grupos de compuestos, a saber: monoterpenos (34%), constituidos principalmente por limoneno, β -mirceno y *trans*- β -ocimeno; monoterpenos oxigenados (44%), entre los cuales se destacan las cetonas cíclicas, carvona, piperitona, piperitenona, *cis*- y *trans*-dihidrocarvonas y, finalmente, los sesquiterpenos (19%), siendo su representante más abundante el biciclosesquifelandreno. La caracterización química de la composición del aceite

de *L. alba*, quimiotipo Carvona, concuerda con la reportada previamente por Jaramillo [4] y Durán [90].

Figura 16. Perfil cromatográfico típico del AE de *L. alb,a* quimiotipo carvona, aislado por MWHD. Columna DB-5, 60 m. Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los picos se reporta en la **Tabla 13**.



El componente más abundante presente en el AE obtenido fue la carvona (31.8%). Esta sustancia es empleada principalmente como precursor en la síntesis de decalinas quirales, utilizadas particularmente como insecticidas [(-)-poligodial] y como fijadores en perfumería (Ambrox) [128]. Así mismo, se emplea en la elaboración de jabones y pastas dentríficas [1]. Este compuesto es ópticamente activo y sus enantiómeros son producidos independientemente por dos especies

Tabla 13. Cantidad relativa (%), concentración (mg/kg de AE) e identificación por GC-MS de los principales componentes del aceite esencial de *Lippia alba*, quimiotipo carvona, aislados por MWHD.

Nº Pico Fig 16	Compuesto	I _k ^a		Cantidad relativa, % ^b	Concentración [mg/kg] ^b	Nota odorífera ^c
		DB-5	DB-WAX			
1	α-Pineno	939	1018	0,13	1200	A pino
2	Canfeno	954	1061	0,35	3100	Alcanforada
3	β-Mirceno	991	1163	0,85	7500	Balsámica
4	1,3,8- <i>p</i> -Mentatrieno	1009	1214	0,13	1130	
5	Limoneno	1038	1200	28,97	250000	Cítrica, frutal
6	<i>trans</i> -β-Ocimeno	1048	1251	0,79	6900	Herbácea
7	Linalool	1101	1547	0,42	3700	Floral, dulce
8	<i>trans</i> - <i>p</i> -Menta-2,8-dien-1-ol	1127	1634	0,23	2000	Amentolada
9	<i>cis</i> -Óxido de limoneno	1138	1451	0,12	1090	Frutal
10	<i>cis</i> - <i>p</i> -Menta-2,8-dien-1-ol	1142	1873	0,16	1400	Alcanforada
11	Borneol	1181	1713	0,63	5500	Alcanforada
12	<i>cis</i> -Dihidrocarvona	1204	1618	0,28	3000	A madera
13	<i>trans</i> -Dihidrocarvona	1211	1639	0,18	1600	Alcaravea
14	Etil cumeno	1229	1998	0,41	3700	
15	<i>trans</i> -Carveol	1231	1842	0,11	900	Amentolada
16	Carvona	1260	1753	31,77	280000	A hierba fresca
17	Piperitona	1267	1743	1,40	12000	Amentolada
18	Isopiperitenona	1279	1856	0,12	1000	
19	<i>trans</i> -Óxido de carvona	1284	1809	0,15	1300	
20	Timol	1293	2186	0,22	2000	Medicinal
21	<i>trans</i> -Acetato de carvilo	1337	1706	0,11	970	
22	Piperitenona	1351	1945	4,26	37000	
23	Eugenol	1359	2177	0,06	600	A clavo
24	α-Copaeno	1388	1500	0,09	800	A madera
25	β-Bourboneno	1396	1528	1,61	14000	Herbácea
26	β-Elemeno	1399	1598	1,30	11500	A madera
27	β-Cedreno	1433	1586	0,34	3000	
28	<i>trans</i> -β-Cariofileno	1436	1610	0,19	1700	A madera
29	β-Copaeno	1445	1691	0,33	2900	
30	<i>trans</i> -β-Farneseno	1457	1669	0,87	8000	A pasto fresco
31	<i>allo</i> -Aromadendreno	1459	1661	0,19	1610	
32	γ-Gurjuneno	1476	1739	0,50	4400	
33	γ-Muuroleno	1484	1701	0,17	1600	
34	Germacreno D	1488	1654	0,10	900	A madera
35	Biclosesquifelandreno	1498	1727	11,27	99000	
36	Biclogermacreno	1510	1705	0,65	5700	
37	Cubebol	1528	1955	0,45	3900	
38	Germacreno D-4-ol	1590	2066	0,52	4600	
39	N.I.	1700	2381	0,20	1700	

Continuación **Tabla 13.**

Familia de compuestos	Porcentaje promedio, % (n=3)		
Hidrocarburos monoterpénicos	34,5	±	0,7
Monoterpenos oxigenados	44,3	±	0,3
Hidrocarburos sesquiterpénicos	19,4	±	0,5
Sesquiterpenos oxigenados	1,07	±	0,01
Otros	0,79	±	0,08

^a Índices de Kovàts experimentales.

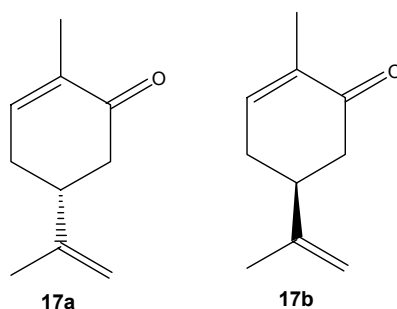
^b Promedio de tres extracciones, n=3.

^c Ref. bibl. [123-127].

N.I. No identificado.

distintas: la *Menta spicata*, que contiene (-)-R-carvona (**17a**), y *Carum carvi*, es rico en (+)-S-carvona (**17b**) [128].

Figura 17. Representación estructural de los isómeros ópticos de la carvona: **17a** - (-)R-Carvona; **17b** - (+)S-carvona.

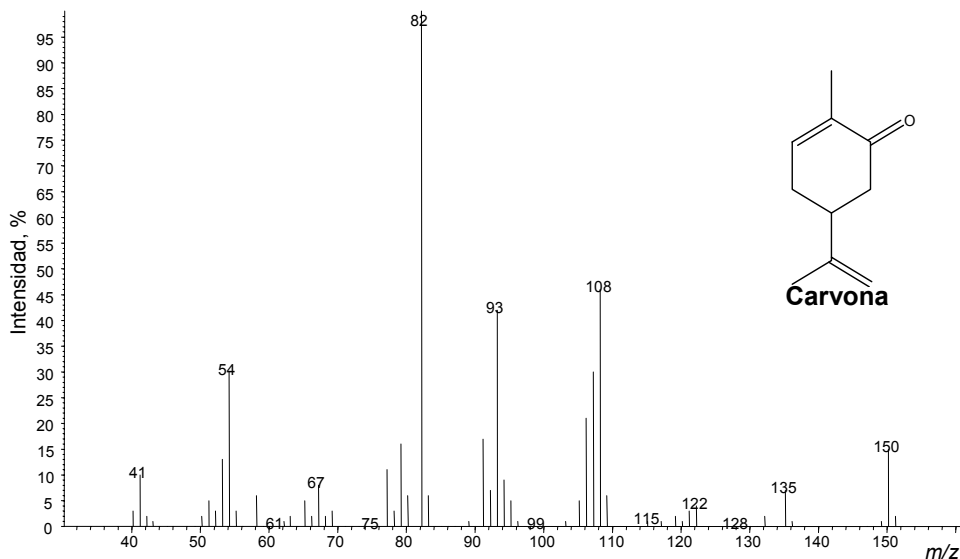


El espectro de masas y las posibles rutas de fragmentación de la carvona, se ilustran en la **Figura 18** y en el **Esquema 3**, respectivamente. El ion molecular (M^+ , m/z 150) de este monoterpeno oxigenado, posee una intensidad relativa de 15%.

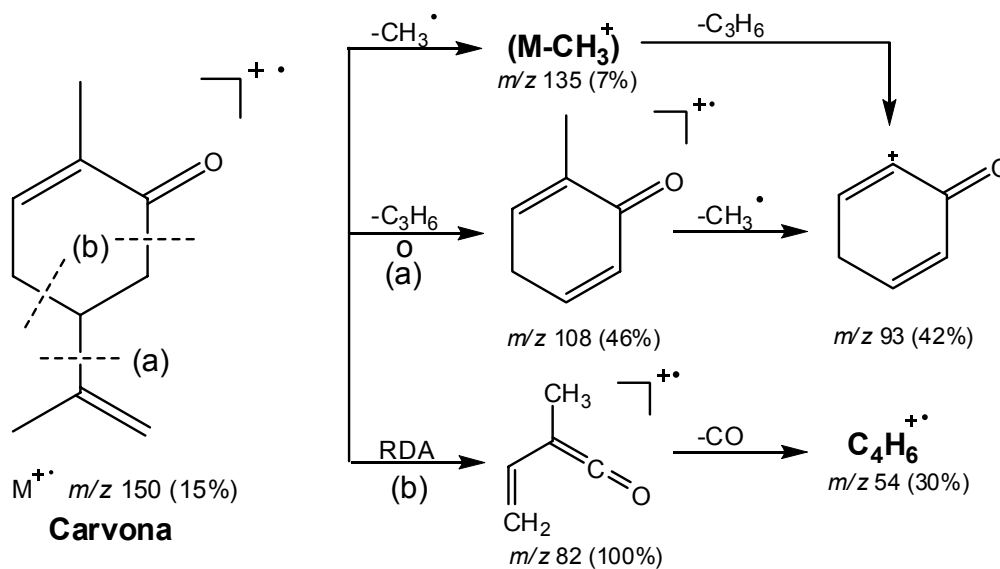
La presencia de una insaturación en el ciclo, hace que el ion molecular sufra una ruptura retro-Diels-Alder (RDA), que conduce a la formación del ion pico de base (100%), en m/z 82, el cual elimina sucesivamente monóxido de carbono, produciendo el ion $C_4H_6^+$, en m/z 54. Rupturas simples a partir del ion molecular conducen a la eliminación de los radicales metilo y propenilo, produciendo los

iones en m/z 135 ($M-\text{CH}_3$)⁺ y 107 ($M-\text{C}_3\text{H}_6$)⁺, con abundancias relativas de 7 y 30%, respectivamente.

Figura 18. Espectro de masas de la carvona.



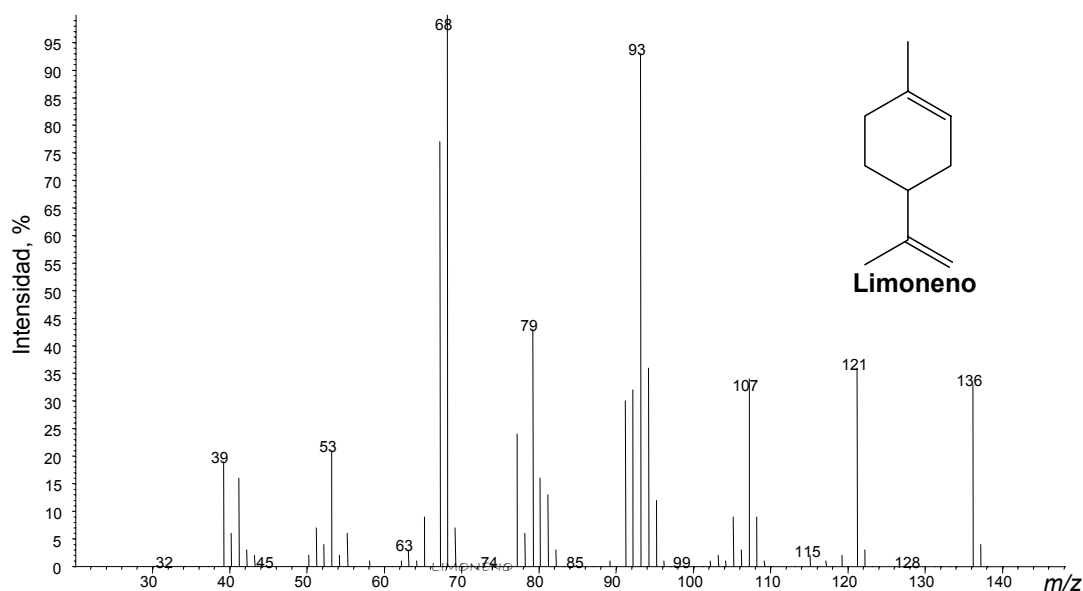
Esquema 3. Posibles rutas de fragmentación de la carvona.



La transposición de hidrógeno, sufrida por el ion molecular, genera los fragmentos en m/z 108 (46%) y 93 (42%), correspondientes a la pérdida sucesiva de propileno (C_3H_6) y del radical $CH_3\cdot$, respectivamente.

El segundo compuesto más abundante en el AE, después de la carvona, es el limoneno (28,9%), cuyo tiempo de retención es $t_R = 21.8$ min. El espectro de masas obtenido para este monoterpreno se registra en la **Figura 19**.

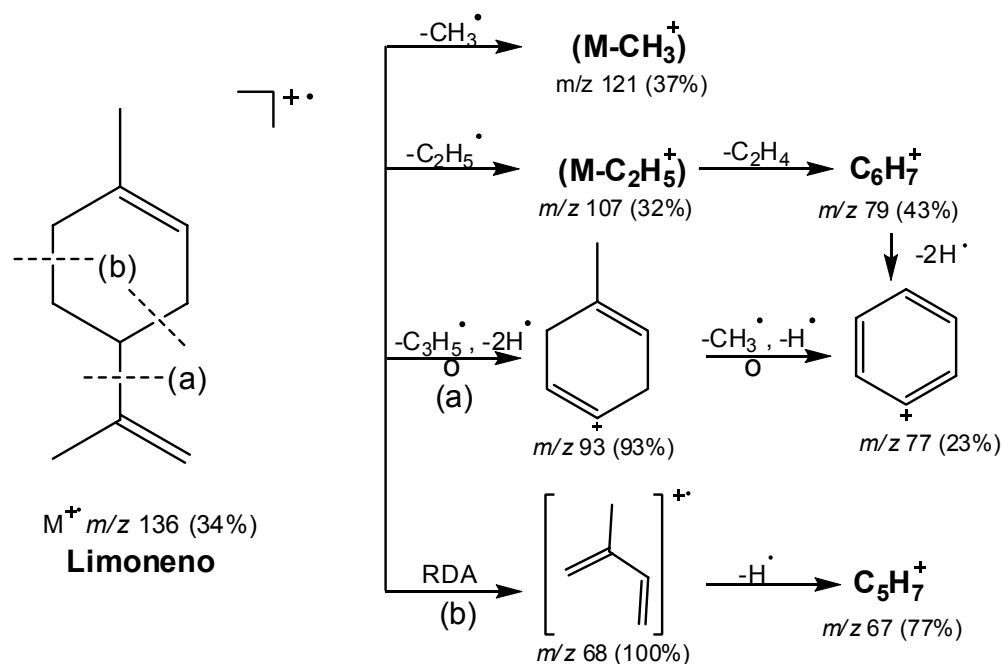
Figura 19. Espectro de masas del limoneno.



El ion molecular de esta sustancia en m/z 136 (34%), sufre durante su ionización disociativa, al igual que la carvona, la ruptura RDA, con la cual el dieno formado constituye el ion, pico de base, en m/z de 68 (100%). Adicionalmente, la eliminación del radical isopropilo, a través de doble reordenamiento de hidrógeno sobre el sustituyente ramificado, conduce a la formación del ion en m/z de 93 (93%). La expulsión paralela de radicales metilo y etilo produce iones con intensidades altas, en m/z 121 y 107, respectivamente. El último, a su vez, origina

el ion $(M-C_2H_5-C_2H_4)^+$ en m/z 79 (43%), por pérdida de una molécula de etileno (**Esquema 4**).

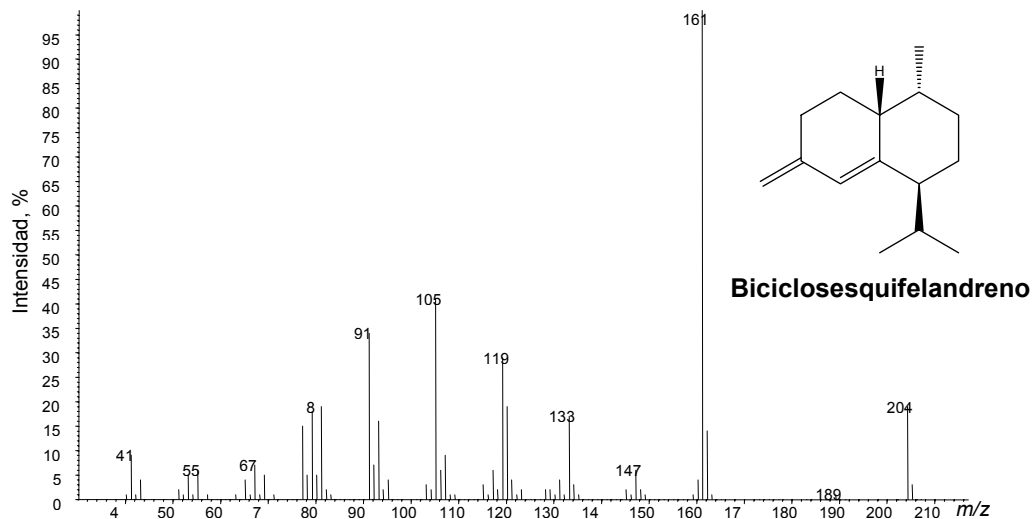
Esquema 4. Ionización disociativa (EI, 70 eV) del limoneno.



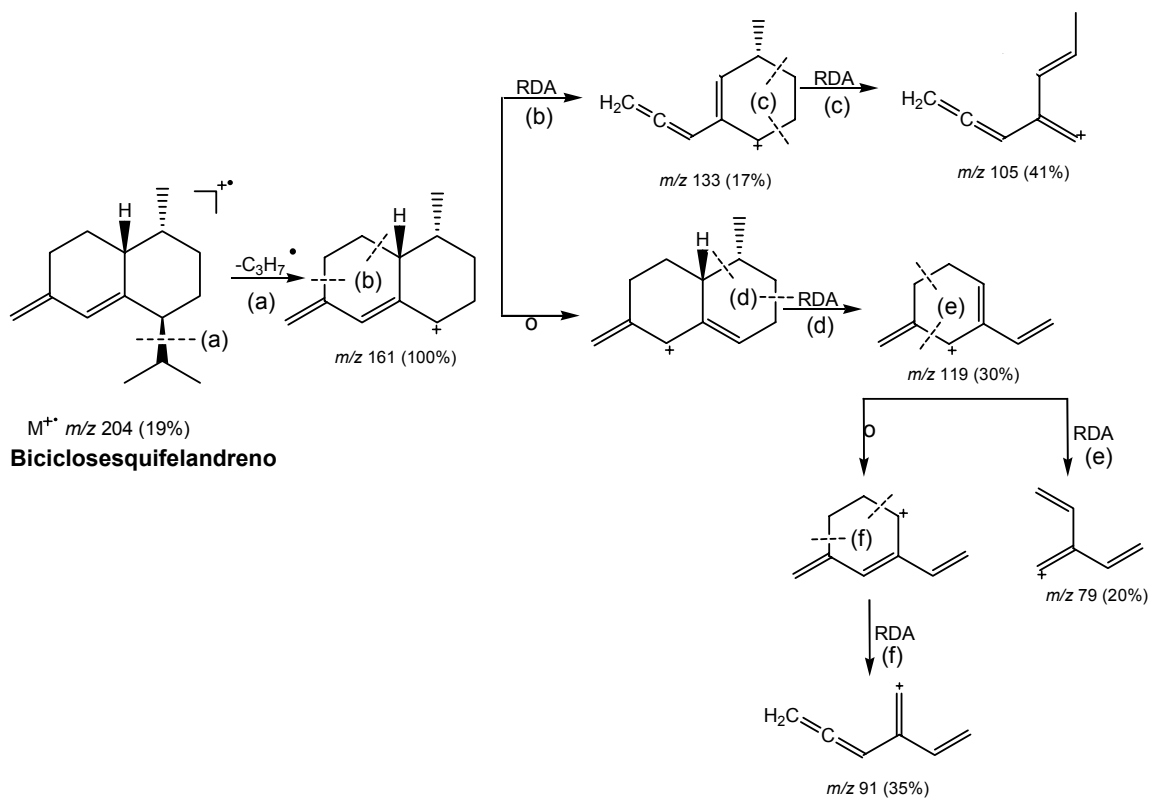
El principal representante de los compuestos sesquiterpénicos en el AE de *Lippia alba*, es el biclosesquifelandreno, cuyo espectro de masas se ilustra en la **Figura 20**. El 1- β (H),7 α (H),10 β (H)-cadina-4(14),5-diene, cuyo nombre común es biclosesquifelandreno, es un compuesto termolábil aislado en 1973 del aceite de *Piper cubeba*. El esqueleto del cadaleno, es considerado como la estructura hidrocarbonada base, de la cual se deriva este sesquiterpeno [130].

Este metabolito presenta un ion molecular de intensidad media (19%) en m/z 204. La formación de los distintos iones, ocurre principalmente, a partir del ion pico de base $(M-C_3H_7)^+$ en m/z 161. A partir de éste, y siguiendo esencialmente rupturas de tipo retro-Diels-Alder y reordenamiento de hidrógeno, se forman iones en m/z 133 (17%), 105 (41%), 119(30%), 91(35%) y 79(20%), como se ilustra en el **Esquema 5**.

Figura 20. Espectro de masas del biclosesquifelandreno.



Esquema 5. Rutas de fragmentación del biclosesquifelandreno.



Las propiedades físico-químicas características del AE de *L. alba*, quimiotipo carvona, se registran en la **Tabla 14**. La densidad y el índice de refracción determinados experimentalmente para el AE de este quimiotipo obtenido por hidrodestilación, coincidieron con los reportados para esta misma especie [27], en la **Tabla 3**. Adicionalmente, la rotación óptica (α) fue, en promedio, de (+) $106.19^\circ \pm 0.69$, con lo cual se infiere la similitud en la composición del aceite extraído por Pino y sus colaboradores en Cuba, y el obtenido en el presente estudio. Análogamente, se establecieron los rangos para las constantes físico-químicas características de los AEs, con los cuales se lleva a cabo la evaluación de la calidad de los mismos.

Tabla 14. Propiedades físico-químicas del aceite esencial de *Lippia alba*, quimiotipo carvona.

PROPIEDAD	VALOR	
Densidad (23°C)	0.900 \pm 0.002* g/mL	
n_D (20°C)	1.4987 \pm 0.0005**	
$[\alpha]_D^{25}$ (°·mL/g·dm)	(+) 58.39 \pm 0.38*	
Solubilidad en etanol/H ₂ O	20 %v/v	Insoluble
	40 %v/v	Insoluble
	60 %v/v	Insoluble
	80 %v/v	0.15 (\pm 0.02)***mL de AE/mL de solución

* Promedio de cinco determinaciones \pm s, n=5.

** Promedio de tres determinaciones \pm s, n=3.

*** Promedio de dos determinaciones \pm s, n=2.

Según lo reportado en la literatura, AEs con densidades superiores a 0.9 g/mL e índices de refracción mayores a 1.47, contienen en su composición cantidades importantes de compuestos oxigenados aromáticos o alicíclicos [101]. Estos datos corresponden a los valores determinados experimentalmente para el AE de *Lippia alba*, quimiotipo carvona, siendo debidos principalmente a la presencia de carvona, piperitenona y piperitona, tres cetonas cíclicas que constituyen cerca del 37% de la mezcla.

Generalmente, la densidad de aceites esenciales varía entre 0.84 y 1.17 g/mL [131, 132]. Los valores determinados para los AEs de *Lippia alba*, *Lippia origanoides* y *Phyla (Lippia) dulcis*, se encuentran dentro de este rango.

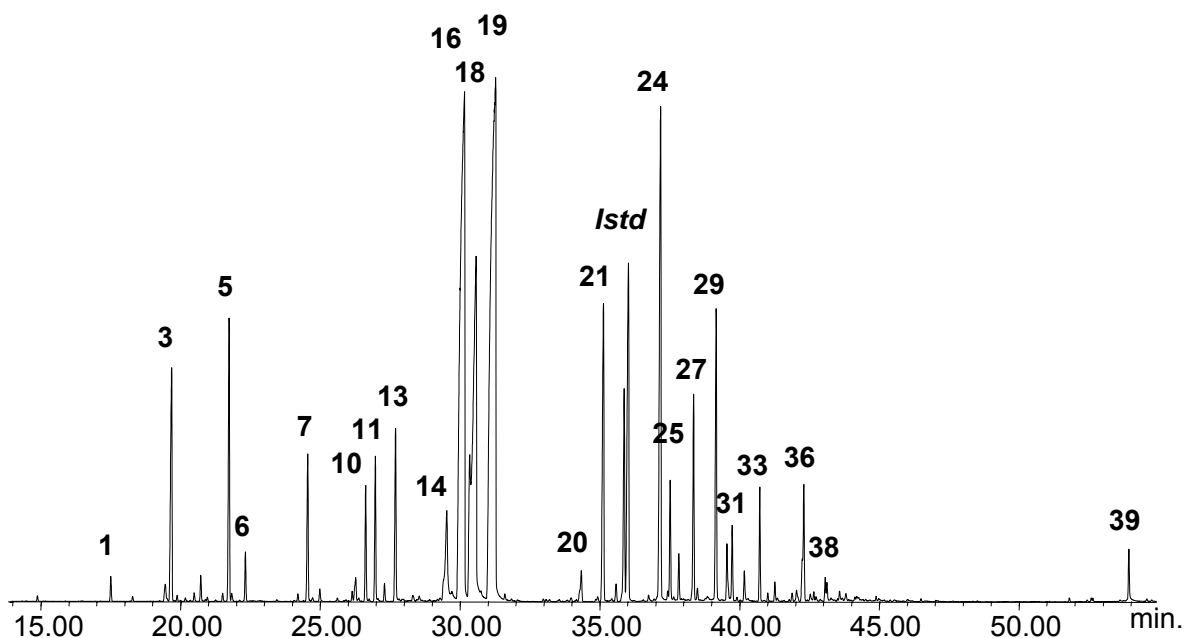
- ***Lippia alba*, quimiotipo citral:** El aceite esencial, obtenido por MWHD, de las partes aéreas de esta planta, es de color amarillo y con intenso olor cítrico; el contenido de AE en el material vegetal fresco empleado fue de 0.40 ± 0.03 % (p/p). Estudios previos de este quimiotipo, reportaron rendimientos de extracción ligeramente menores, 0.2-0.3% [34, 133]; las diferencias entre estos resultados son principalmente debidas a la etapa de desarrollo de la planta y las condiciones del cultivo.

El perfil cromatográfico típico de los metabolitos secundarios volátiles aislados de *Lippia alba*, quimiotipo citral, se ilustra en la **Figura 21**. En la **Tabla 15** se reporta la identificación de los analitos, realizada con base en criterios cromatográfico (índices de retención) y espectroscópico (espectros de masas, EI, 70 eV) junto con sus cantidades relativas (%) y concentraciones (mg/kg), determinadas por el método de estandarización interna, y las notas odoríferas de algunos componentes. 39 compuestos identificados constituyen el 98% de la muestra, bajo los parámetros de integración aplicados (umbral de integración, Thshd = 17 y área de rechazo del pico en la base = 0.1).

El AE aislado del material vegetal, contiene 67% de monoterpenos oxigenados, principales responsables de las distintas notas fragantes en los productos naturales [134], 18% de sesquiterpenos, entre los cuales se destacan *trans*- β -cariofileno, biciclosesquifelandreno y α -humuleno; contiene en menor proporción hidrocarburos monoterpénicos (4%) y sesquiterpenos oxigenados (2%).

Los principales monoterpenos oxigenados presentes en el AE son: citral (neral + geranial, 42.8%) y citrol (nerol + geraniol, 13.9%). Entre los sesquiterpenos mayoritarios se encuentran, *trans*- β -cariofileno, el cual contribuye con un 6.6%, biciclosesquifelandreno con 3% y β -elemeno con 2%. Mientras los respectivos ésteres del citrol, *i.e.* acetatos de nerilo y geranilo, constituyen el 4% del AE.

Figura 21. Perfil cromatográfico típico del AE de *L. alba*, quimiotipo citral, aislado por MWHD. Columna DB-5, 60 m. Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los picos se reporta en la **Tabla 15**.



El componente más abundante presente en el AE, es el citral (42.8%), una mezcla de dos compuestos isoméricos, geranial (23.3%), **22a**, y neral (19.4%), **22b**. Los compuestos carbonílicos α,β -insaturados, son de especial importancia en la síntesis orgánica, debido a su aplicación como intermediarios en la producción de alcoholes a escala industrial, explotados, principalmente, por las industrias de aromas, fragancias y fármacos [135]; y el citral en particular es empleado en la síntesis de vitamina C.

Tabla 15. Cantidad relativa (%), concentración (mg/kg de AE) e identificación por GC-MS de los principales componentes del aceite esencial de *Lippia alba*, quimiotipo citral, aislado por MWHD.

N° Pico Fig 21	Compuesto	I _k ^a		Cantidad relativa, % ^b	Concentración [mg/kg] ^b	Nota odorífera ^c
		DB-5	DB-WAX			
1	α-Pineno	939	1018	0.24	1700	A pino
2	1-Octen-3-ol	979	1451	0.25	1800	Frutal, herbácea
3	6-Metil-5-hepten-2-ona	986	1338	2.56	19000	Picante
4	α-Felandreno	1010	1163	0.24	1800	Herbácea
5	Limoneno	1034	1197	2.93	21000	Cítrica, frutal
6	<i>trans</i> -β-Ocimeno	1048	1251	0.44	3200	Herbácea
7	Linalool	1101	1548	1.43	10400	Floral, dulce
8	C ₁₀ H ₁₆ O (N.I.)	1112	1520	0.12	890	
9	<i>epi</i> -Fotocitral A + C ₁₀ H ₁₆ O	1145	1488	0.30	2200	
10	Citronelal	1154	1481	0.87	6300	
11	<i>trans</i> -Verbenol	1163	1548	1.47	10700	
12	Epóxido de rosafurano	1171	1611	0.14	1000	
13	Borneol + <i>cis</i> -Crisantenol	1181	1575	1.83	13400	Dulce
14	Nerol	1230	1805	2.07	15000	
15	<i>cis</i> -3,7-Dimetil-3,6-octadien-1-ol	1235	1769	0.22	1600	
16	Neral	1247	1692	19.46	142000	
17	Nerol + Geraniol	1252	1852	2.36	17000	Suave floral
18	Geraniol	1258	1852	9.47	69000	Suave floral
19	Geranial	1277	1744	23.34	170000	
20	Acetato de nerilo + Eugenol	1358	1732 – 2177	0.42	3050	
21	Acetato de geranilo	1379	1761	3.63	26500	
22	Sesquiterpeno (N.I.)	1391	1598	0.17	1300	
23	β-Elemeno	1398	1598	2.23	16000	
24	<i>trans</i> -β-Cariofileno	1436	1611	6.59	48000	A madera
25	α-Guaieno	1446	1601	1.13	8000	
26	<i>trans</i> -β-Farneseno	1455	1670	0.38	2800	A pasto
27	α-Humuleno	1471	1686	1.94	14000	A madera
28	<i>allo</i> -Aromadendreno	1475	1662	0.11	830	
29	Biciclosesquifelandreno	1494	1725	2.99	22000	
30	Isobutanoato de geranilo	1507	1815	0.62	4500	
31	α-Bulneseno	1513	1730	0.70	5100	
32	10- <i>epi</i> -Cubebol	1527	1955	0.26	1900	
33	<i>cis</i> -α-Bisaboleno	1546	1782	0.91	6600	
34	<i>trans</i> -Nerolidol	1564	2043	0.14	1050	Dulce
35	Germacreno D-4-ol	1590	2068	0.15	67	
36	Óxido de cariofileno	1599	2001	1.34	725	Cítrica
37	N.I.	1607	2202	0.08	170	
38	Epóxido de humuleno II	1627	2068	0.23	460	
39	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	2114	-	0.44	690	

Continuación **Tabla 14.**

Familia de compuestos	Porcentaje promedio, % (n=3)		
Hidrocarburos monoterpénicos	4.1	±	0.1
Monoterpenos oxigenados	67	±	1.6
Hidrocarburos sesquiterpénicos	18	±	1.2
Sesquiterpenos oxigenados	2.3	±	0.1
Otros	8.5	±	0.6

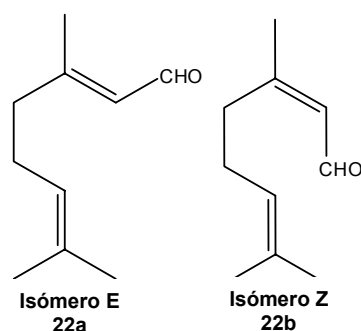
^a Índices de Kovàts experimentales.

^b Promedio de tres extracciones independientes, (n=3).

^c Ref. bibl. [123-127].

N.I. No identificado.

Figura 22. Estructura molecular del citral (mezcla de dos isómeros geométricos del 3,7-dimetil-2,7-octadienal): **22a**-Geranial; **22b**-Neral.



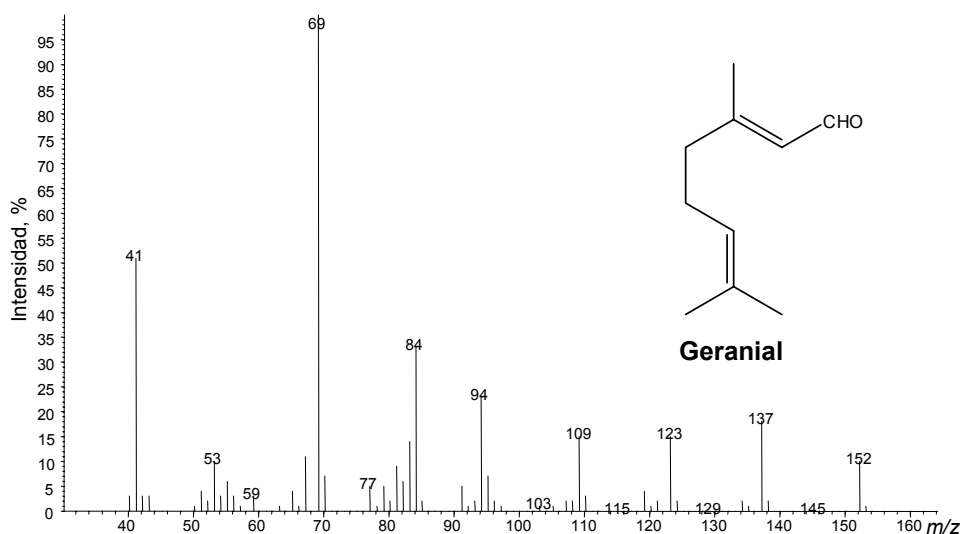
El espectro de masas del geranial, un monoterpeneo oxigenado con el ion molecular en m/z 152 de intensidad baja (10%), se presenta en la **Figura 23**. Las señales en la región de bajo peso molecular, están conformadas, principalmente, por los iones en m/z 69 y 41, los cuales son productos de la ruptura alílica del ion molecular, según se ilustra en la **Esquema 6**.

Otros iones de intensidad media, se forman por la eliminación de propenal y butenal, y aparecen en m/z 94 (23%) y m/z 84 (33%), respectivamente.

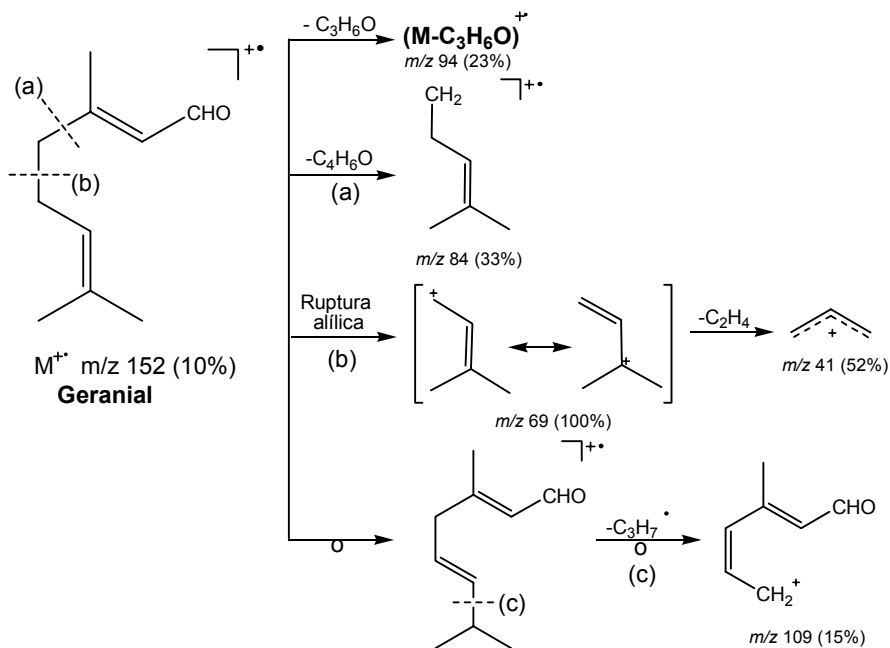
El neral, **22b**, isómero geométrico del geranial, presenta un patrón de fragmentación similar al de geranial (**Figura 22a**, **esquema 6**), con algunas diferencias cuantitativas en las intensidades de los iones. El ion en m/z 109,

formado por la eliminación del radical propilo a partir del ion molecular, alcanza una intensidad de 51%, mientras en el espectro del geranial es de 15%. Por su parte, el fragmento de m/z 94, exhibe una intensidad de 48% Vs 23% en el espectro del geranial.

Figura 23. Espectro de masas del geranial.

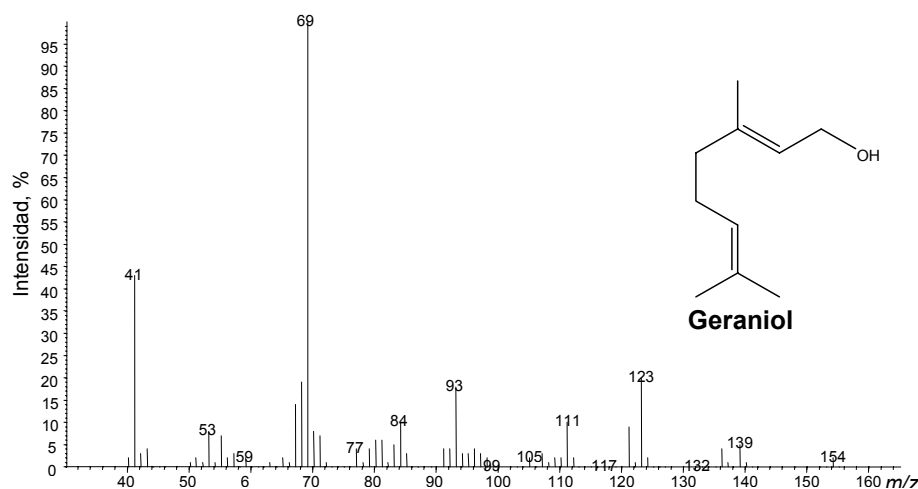


Esquema 6. Posibles rutas de fragmentación del geranial.



Los alcoholes análogos del neral y geraniol, constituyen el 13.9% del total del AE y presentan rutas disociativas similares. El espectro de masas del geraniol se muestra en la **Figura 24**, y las rutas de su ionización disociativa aparecen en el **Esquema 7**.

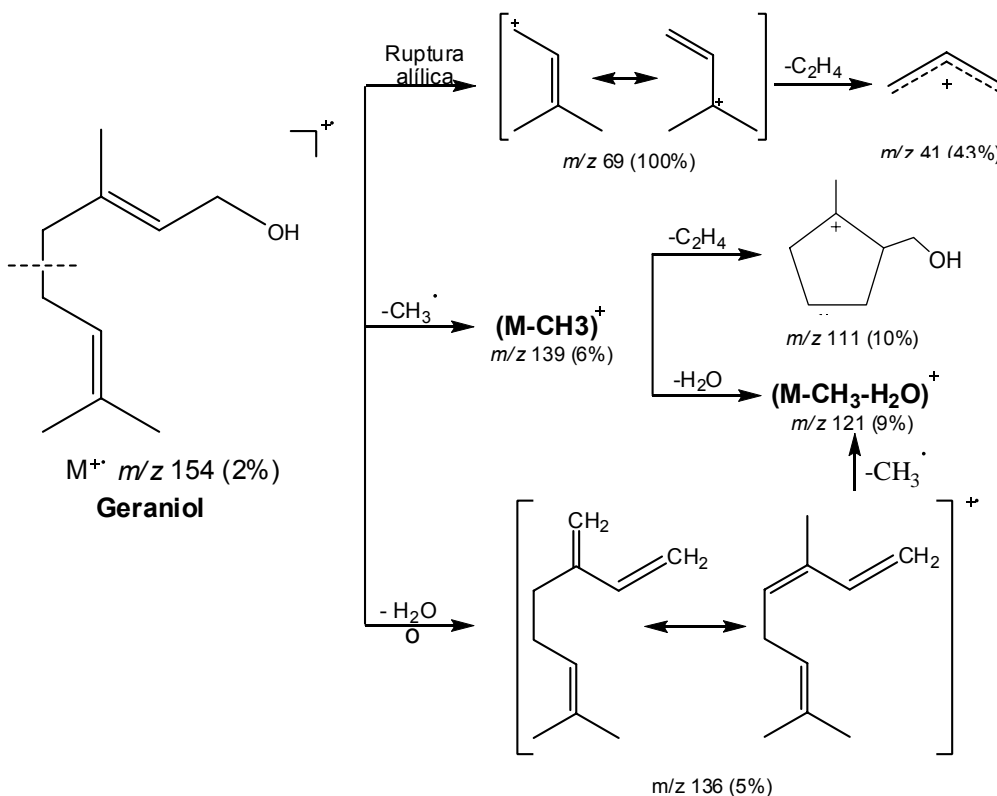
Figura 24. Espectro de masas del geraniol.



Los espectros de masas de nerol y geraniol, muestran picos de iones moleculares con intensidades bajas (2%), debido a su poca estabilidad, y rápidas rupturas, entre ellas, alílica. El fragmento formado por esta escisión (100%), sufre pérdida de eteno, con formación del catión alilo en m/z 41 (44%). Para los dos isómeros, el patrón de fragmentación es similar: la pérdida de radical metilo con formación de un ion $(M-CH_3)^+$ de m/z 139 (6%), y la subsiguiente eliminación de eteno, que conduce a la formación del ion, $(M-CH_3-C_2H_4)^+$ en m/z 111 (nerol, 8% y geraniol, 10%). Ambos isómeros presentan fragmentos correspondientes a la pérdida de H_2O , en m/z 136, a partir del ion molecular.

Los valores determinados para cada una de las propiedades físico-químicas del aceite de *Lippia alba*, quimiotipo citral, medidas, se presentan en la **Tabla 16**.

Esquema 7. Posibles rutas de fragmentación del geraniol.



De los aceites esenciales bajo estudio, el aceite extraído de *L. alba*, quimiotipo citral, fue el único levógiro, en concordancia con lo reportado por Ricciardi [35].

La solubilidad de los AEs de *Lippia alba* en etanol es considerablemente diferente para los dos quimiotipos ensayados, así: el AE del quimiotipo carvona sólo fue soluble en la solución acuosa del 80% v/v de etanol, mientras que el AE del quimiotipo citral fue miscible con esta misma solución. Esto es debido principalmente al contenido de compuestos oxigenados en los AEs, donde, el quimiotipo citral contiene 69% de compuestos oxigenados, mientras el quimiotipo carvona sólo ca. 45%. La presencia de compuestos oxigenados aumenta la afinidad por el solvente, y, adicionalmente, los aldehídos y alcoholes poseen la capacidad de formar puentes de hidrógeno, y por ende mayor solubilidad en los

solventes ensayados que la cetonas cíclicas. Por tal razón, el contenido de compuestos oxigenados, además de proveer las notas aromáticas agradables a los AEs, aumentan su solubilidad en etanol, haciéndolos más aptos para su aplicación en la industria perfumística.

Tabla 16. Propiedades físico-químicas del aceite esencial de *Lippia alba*, quimiotipo citral.

PROPIEDAD	VALOR
Densidad (23°C)	0.894 ± 0.005* g/mL
n _D (20°C)	1.4957 ± 0.0005**
[α] _D ²⁵ (°·mL/g·dm)	(-) 45,89 ± 0.42*
	20 %v/v
	Insoluble
	40 %v/v
	Ligeramente soluble
Solubilidad en etanol/H ₂ O	60 %v/v
	0.004 mL de AE/ mL de solución***
	80 %v/v
	Miscible

* Promedio de cinco determinaciones ± s, n=5.

** Promedio de tres determinaciones ± s, n=3.

*** Promedio de dos determinaciones ± s, n=2.

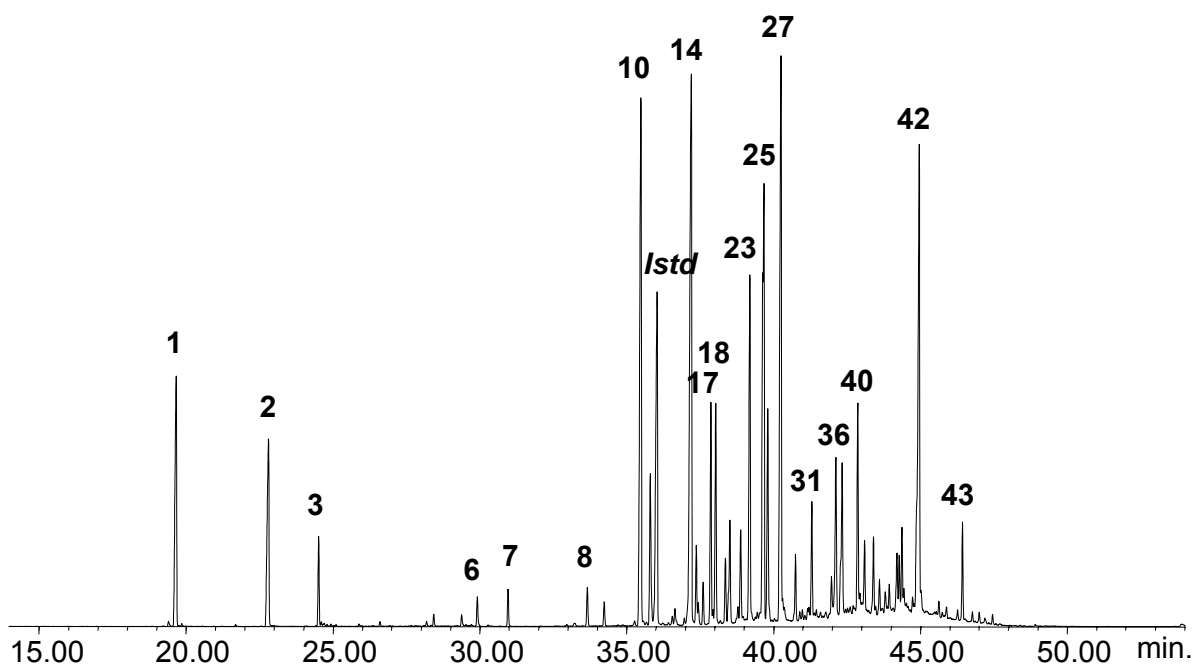
3.2.2 *Phyla (lippia) dulcis* (Trevir) Moldenke.

El AE de esta especie obtenido por MWHD, es ligeramente amarillo y tiene un olor dulce, agradable. El rendimiento promedio (n=3) de la extracción fue de 0.129± 0.008%.

El cromatograma típico para el AE obtenido de hojas, tallos e inflorescencias de *Phyla (Lippia) dulcis*, se ilustra en la **Figura 25**. El respectivo reporte de identificación de sus componentes, junto con la cantidad relativa y concentración, índices de retención y algunas notas odoríferas características, se registran en la **Tabla 17**. La identificación de los analitos se basó en índices de Kovats y espectros de masas (EI, 70 eV). Los siguientes fueron los parámetros de integración de los picos cromatográficos aplicados durante el análisis: área de

rechazo del pico en la base igual a 0.1 y un umbral de integración, $thshd = 17$; con base en los cuales, fueron identificados los 36 compuestos, que corresponden al 85% de la mezcla.

Figura 25. Perfil cromatográfico típico del AE de *Phyla (Lippia) dulcis* por MWHD. Columna DB-5, 60 m. Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los picos se reporta en la **Tabla 17**.



La composición del AE se caracteriza principalmente por la presencia de sesquiterpenos, los cuales constituyen el 63% del total de la muestra, entre los que se encuentran *trans*- β -cariofileno (10.4%), δ -cadineno (8.8%), α -copaeno (8.3%) y biciclogermacreno (7.9%), entre otros. En menor proporción se hallan también sesquiterpenos oxigenados, *i.e.* α -bisabolol y *epi*- α -bisabolol (8.2%), óxido de cariofileno (2.5%), espatulenol, germacreno D-4-ol (2.4%) y nerolidol (1.4%). Cabe destacar, que aplicando al perfil cromatográfico los parámetros de integración previamente especificados, no se detectó ningún hidrocarburo monoterpénico, y los monoterpénos oxigenados alcanzaron solo 2% de la muestra.

Tabla 17. Cantidad relativa (%), concentración (mg/kg) e identificación por GC-MS de los principales componentes del aceite esencial de *Phyla (Lippia) dulcis*, aislado por MWHD.

Nº Pico Fig. 25	Compuesto	Ik ^a		Cantidad relativa, % ^b	Concentración [mg/kg] ^b	Nota odorífera ^c
		DB-5	DB-WAX			
1	6-Metil-5-hepten-2-ona	986	1338	3.99	11800	Picante
2	3-Metil-2-ciclohexen-2-ona	1059	1613	3.37	9600	
3	Linalool	1100	1548	1.03	2900	Floral, dulce
4	N.I.	1200	1548	0.14	400	
5	Citronelol	1226	1575	0.13	380	Rosa
6	Neral	1241	1688	0.32	900	Floral
7	Geranial	1269	1737	0.38	1100	Rosa
8	δ-Elemeno	1341	1487	0.43	1230	A madera
9	α-Cubebeno	1356	1464	0.28	794	Cítrica
10	α-Copaeno	1388	1502	8.35	23900	A madera
11	β-Bourboneno + β-Cubebeno	1396	1529 – 1586	1.96	5600	Herbácea
12	Isoariofileno	1418	1778	0.11	300	
13	α-Gurjuneno	1420	1541	0.24	680	
14	<i>trans</i> -β-Cariofileno	1437	1613	10.35	29600	A madera
15	<i>trans</i> -α-Bergamoteno	1442	1594	1.11	3180	A madera
16	<i>cis</i> -β-Farneseno	1449	1654	0.45	1280	
17	<i>trans</i> -β-Farneseno	1456	1669	2.50	7200	A pasto
18	Sesquisabineno	1461	1652	2.54	7300	
19	α-Humuleno	1471	1685	0.75	2130	
20	Aromadendreno	1475	1710	1.48	4200	
21	γ-Muuroleno	1483	1702	0.21	610	
22	γ-Amorfenol	1486	1505	1.19	3397	
23	<i>trans</i> -Muurolo-4(15),5-dieno	1495	1605	4.33	12364	
24	Viridifloreol	1503	1733	0.19	540	
25	Biciclogermacreno	1511	1752	7.90	22600	Herbácea
26	β-Bisaboleno	1515	1737	2.58	7400	Dulce
27	δ-Cadineno	1530	1773	8.84	25000	A tomillo
28	<i>trans</i> -α-Bisaboleno	1547	1782	0.67	1900	Balsámica
29	α-Calacoreno	1554	1935	0.14	390	
30	N.I.	1562	2008	0.24	700	
31	<i>trans</i> -Nerolidol	1565	2042	1.36	3900	Dulce
32	C ₁₅ H ₂₄	1570	2092	0.14	400	
33	β-Calacorene	1575	1978	0.14	390	
34	<i>trans</i> -Hidrato de sesquisabineno	1588	2096	0.61	1700	
35	Germacreno D-4-ol + Espatuleno	1593	2067 – 2143	2.40	6900	Herbácea
36	Óxido de cariofileno	1600	2012	2.51	7200	Cítrica
37	<i>cis</i> -Calamen-10-ol	1670	2354	0.89	2540	
38	<i>cis</i> -Atlantona	1676	2111	1.59	4500	
39	C ₁₅ H ₂₆ O	1620	2272	2.65	6000	
40	N.I.	1628	2025	1.58	3300	

Continuación **Tabla 17.**

41	Eudesma-4(15),7-dien-1-β-ol*	1640	2169	1.03	9000
42	α-Bisabolol + <i>epi</i> -α-Bisabolol	1698	2231	8.15	18000
43	N.I.	1759	2405	0.99	2840
Familia de compuestos		Porcentaje promedio, % (n=3) ^d			
Hidrocarburos monoterpénicos		-	-	-	-
Monoterpenos oxigenados		2.1	±	0.3	
Hidrocarburos sesquiterpénicos		63.1	±	0.9	
Sesquiterpenos oxigenados		19.4	±	0.7	
Otros		15	±	1.6	

^a Índices de Kováts experimentales.

^b Promedio de tres extracciones independientes, n=3.

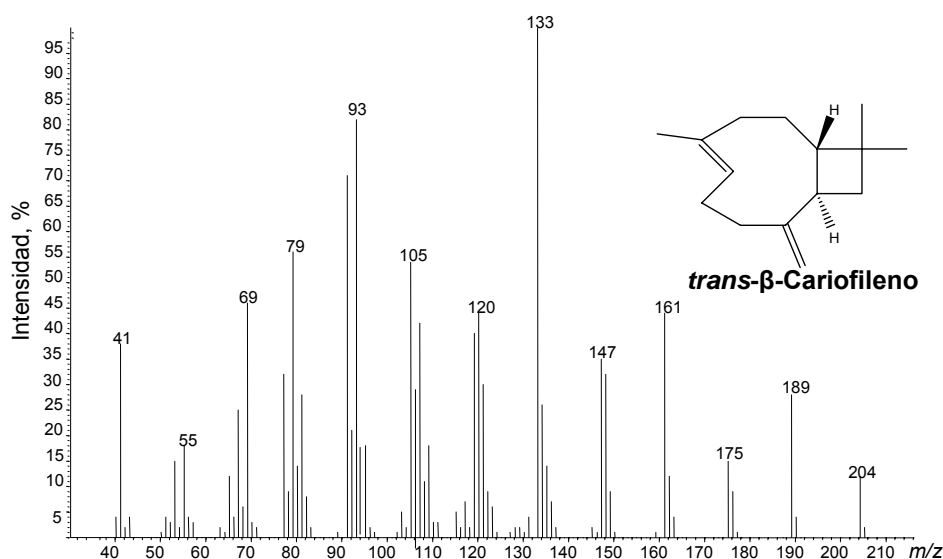
^c Ref. bibl. [123-127].

* Compuestos identificados tentativamente.

N.I. No identificado

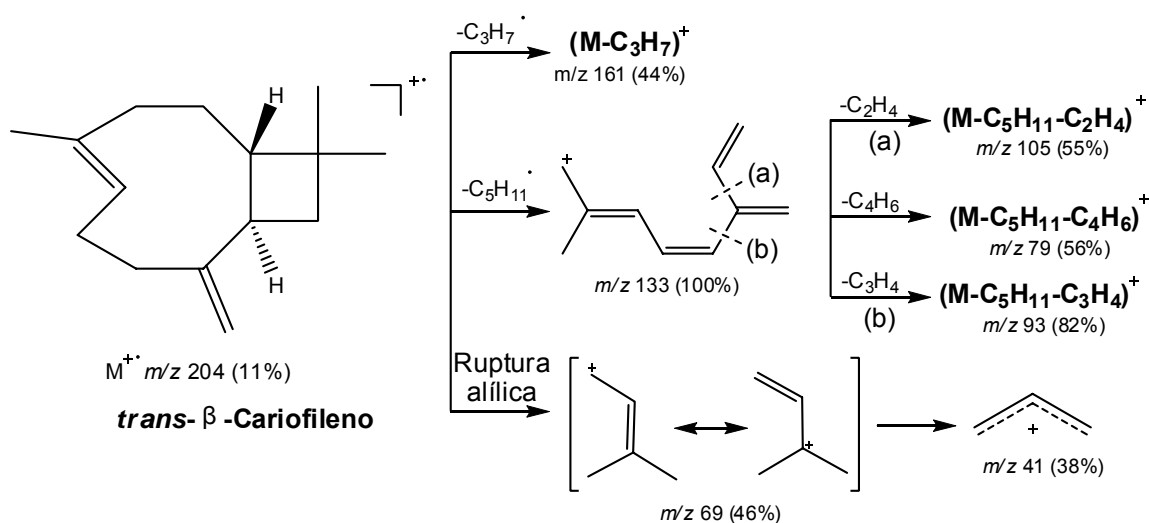
Uno de los sesquiterpenos más abundantes en el AE fue el *trans*-β-cariofileno (10.4%), un compuesto común en los AEs del género *Lippia*, de olor a madera, y de fórmula condensada C₁₅H₂₄. El espectro de masas de este compuesto se presenta en la **Figura 26**. Su ion molecular en *m/z* 204 tiene intensidad media baja (11%) y se caracteriza por una fragmentación abundante, como se ilustra en el **Esquema 8**.

Figura 26. Espectro de masas del *trans*-β-cariofileno.



El ion molecular sufre reordenamientos de esqueleto y de hidrógeno, que conducen a la formación del ion pico de base en m/z 133 (100%), la sucesiva eliminación de moléculas neutras a partir de este fragmento, produce los iones en m/z 79 (56%), 93 (82%) y 105 (55%), según se ilustra en el **Esquema 8**. La ruptura alílica del ion molecular, produce el ion en m/z 69 (46%), y el fragmento alílico $C_3H_5^+$ en m/z 41(38%).

Esquema 8. Posibles rutas de fragmentación del *trans*- β -cariofileno.

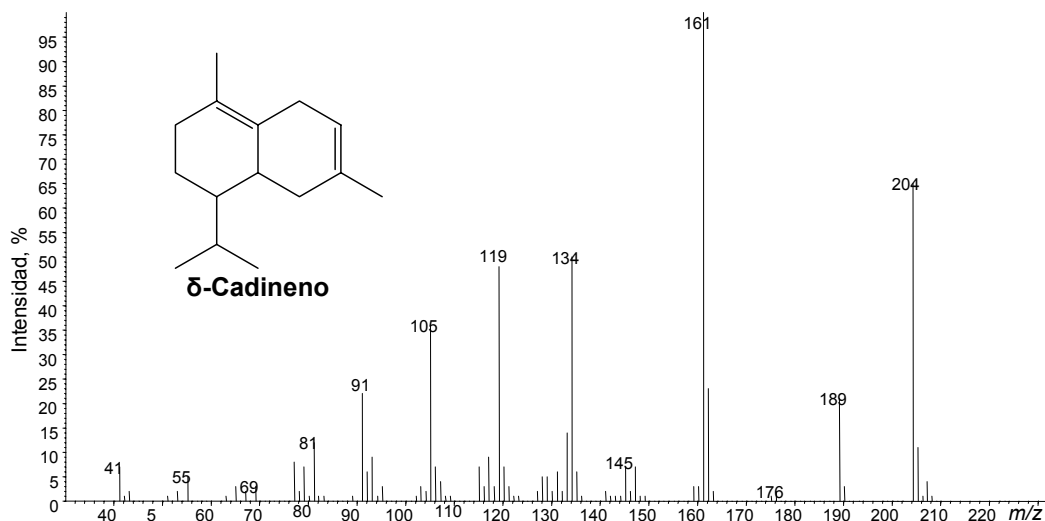


El espectro de masas del δ -cadineno, otro de los sesquiterpenos abundantes en el AE de *Phyla (Lippia) dulcis*, se observa en la **Figura 27**, y sus posibles rutas de fragmentación se presentan en el **Esquema 9**.

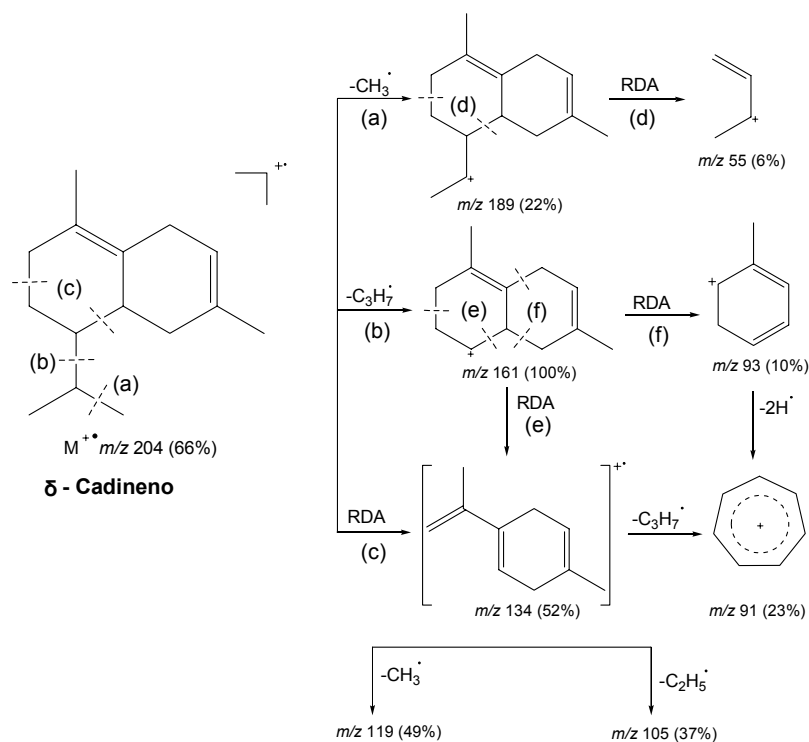
En el espectro de masas del δ -cadineno, el ion molecular presenta intensidad alta, $M^+ m/z$ 204 (66%). El ion, pico de base, en m/z 161, surge de la eliminación del radical propilo, $(M-C_3H_7)^+$. Debido a la presencia de dos ciclos con insaturaciones aisladas, tanto el ion, pico de base, en m/z 161, como el ion molecular, sufren rupturas retro-Diels-Alder (RDA), formando los iones en m/z 93(10%) y en m/z 134 (52%), respectivamente. El ion en m/z 134 se disocia con la formación de los

fragmentos en m/z de 91(23%), 105 (37%) y 119 (49%), por pérdida de los radicales, propilo, etilo y metilo, respectivamente.

Figura 27. Espectro de masas del δ -cadineno.



Esquema 9. Posibles rutas de fragmentación del δ -cadineno.



En la **Tabla 17** no se registra el hernandulcin, ni sus análogos, 4 β -hidroxihernandulcin y *epi*-hernandulcin, probablemente, debido a que estos compuestos son termolábiles y pueden descomponerse fácilmente en el inyector. El hernandulcin es un compuesto de gran interés, debido a sus características edulcorantes, el cual fue encontrado en un 58% en el extracto vegetal obtenido en Puerto Rico [60]. Sin embargo, en la composición química del AE de *Phyla (Lippia) dulcis*, tampoco se identificó el alcanfor, compuesto característico del quimiotipo caracterizado en México [58].

Por otra parte, se identificaron los productos de descomposición del hernandulcin (**Esquema 1**), *i.e.* 6-metil-5-hepten-2-ona (4%) y 3-metil-2-ciclohexen-1-ona (3.4%). Estos metabolitos se encuentran también presentes en otros AEs, *e.g.* *Lippia alba*, quimiotipo citral, por lo cual, es necesaria la prueba directa del hernandulcin en los aceites.

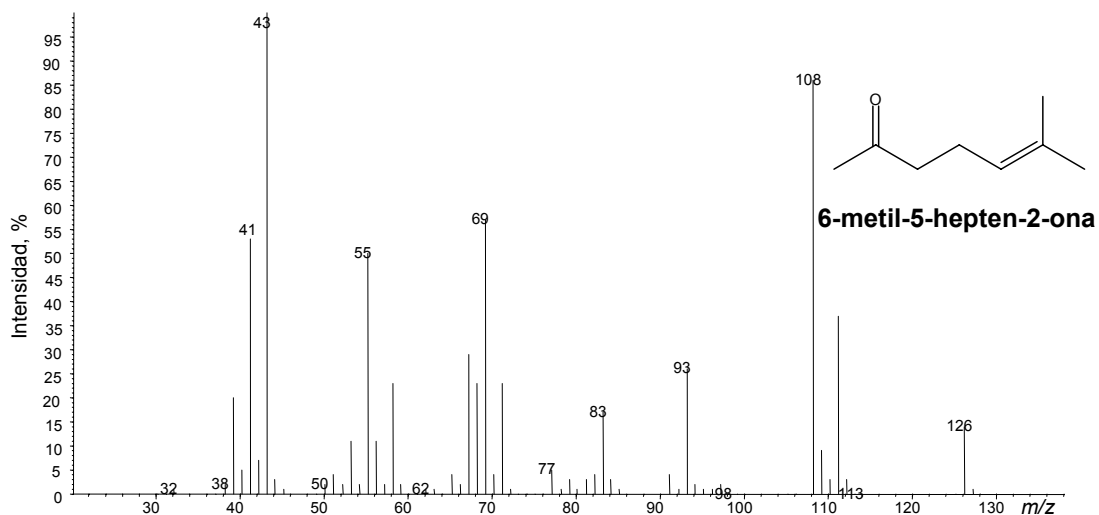
En la **Figura 28** se muestra el espectro de masas del 6-metil-5-hepten-2-ona, compuesto que constituye el 4% del aceite, el cual presenta un M⁺ en *m/z* 126 con 14% de intensidad. El posible patrón de fragmentación de esta estructura se ilustra en el **Esquema 10**.

Al eliminar una molécula de agua, se forma un catión-radical (M-H₂O)⁺ en *m/z* 108, con intensidad del 87%. Por ruptura α , con respecto al grupo carbonílico de esta cetona, surge el fragmento en *m/z* 43 (100%). La ruptura alílica a partir del ion molecular, genera el ion de *m/z* 69 (58%), que decae con formación del fragmento alílico en *m/z* 41. Por eliminación de un radical C₄H₇O, se forma el ion, (M-C₄H₇O)⁺ en *m/z* 55 de 52%.

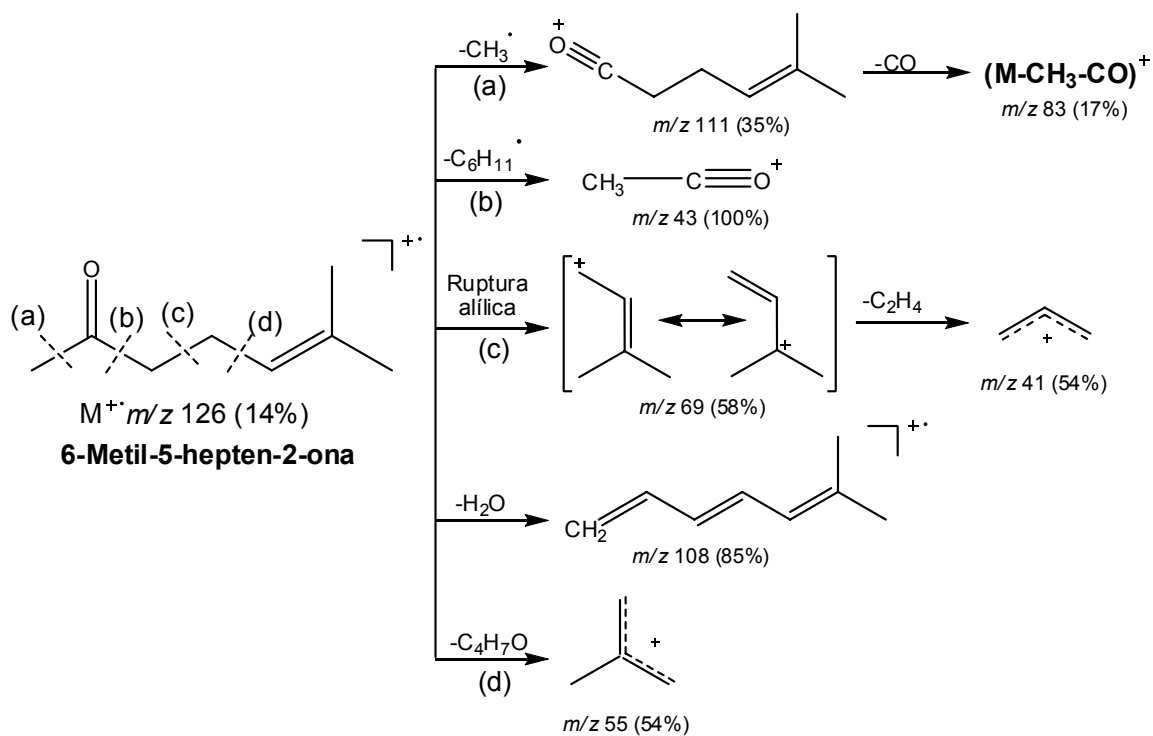
La 3-metil-2-ciclohexen-1-ona, posible producto de la descomposición del hernandulcin, presenta un su espectro de masas ion molecular en *m/z* 110 con intensidad media (50%), como se observa en la **Figura 29**. En general, el

compuesto presenta una fragmentación pobre, el ion, pico de base del espectro, corresponde al fragmento $(M-CO)^+$ en m/z 82, y se forma por la pérdida del monóxido de carbono a partir del ion molecular.

Figura 28. Espectro de masas del 6-metil-5-hepten-2-ona.

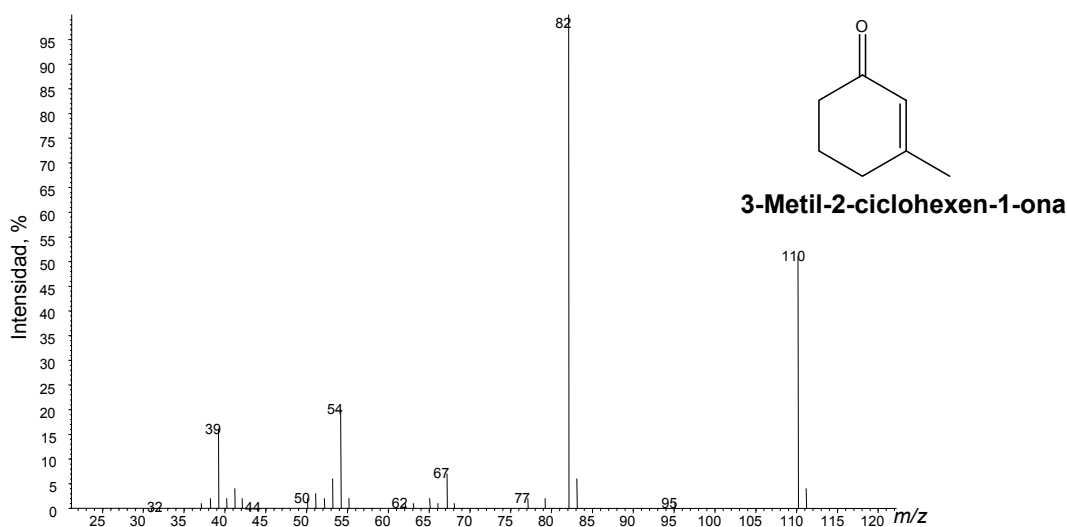


Esquema 10. Ionización disociativa (EI, 70 eV) del 6-metil-5-hepten-2-ona.



Debido a la ausencia de un espectro de masas que concuerde con las características estructurales del hernandulcin, y con el fin de lograr identificar su presencia y el quimiotipo al cual corresponde la planta empleada en el estudio, se procedió a realizar una derivatización química directa del AE.

Figura 29. Espectro de masas del 3-metil-2-ciclohexen-1-ona.



La corriente iónica total, TIC, de la masa de reacción resultante de la derivatización, se ilustra en la **Figura 30**. Un pico cromatográfico, cuyo patrón de fragmentación corresponde al reportado para el hernandulcin, se identificó en $t_R=46.4$ min, y su espectro de masas se ilustra en la **Figura 31**. En el **Esquema 12** aparece la posible ruta de fragmentación del derivado del hernandulcin. Este compuesto se encuentra presente en el aceite en una concentración de 62913 mg/Kg de AE.

En el espectro de masas del derivado hernandulcin-TMS, el pico del ion molecular se registra en m/z 308. La intensidad de este ion disminuye debido a la abundante fragmentación que padece. El fragmento en m/z 218 (33%), formado por la eliminación de los radicales trimetilsililo e hidroxilo a partir del ion molecular, produce el ion, pico de base en m/z 82 tras sufrir ruptura de retro-Diels-Alder [69].

La ruptura alílica a partir del fragmento en m/z 218, conduce a la formación de los iones en m/z 69 (39%) y 41 (45%). Análogamente, el ion, pico de base, sufre un reordenamiento de hidrógeno para generar los iones en m/z 175 (63%) y 203 (12%), por eliminación sucesiva de los radicales isopropilo y metilo, respectivamente.

Figura 30. Perfil cromatográfico de la masa de reacción del AE de *Phyla (Lippia) dulcis* y el agente sililante, BSTFA. Columna DB-5 (60 m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV).

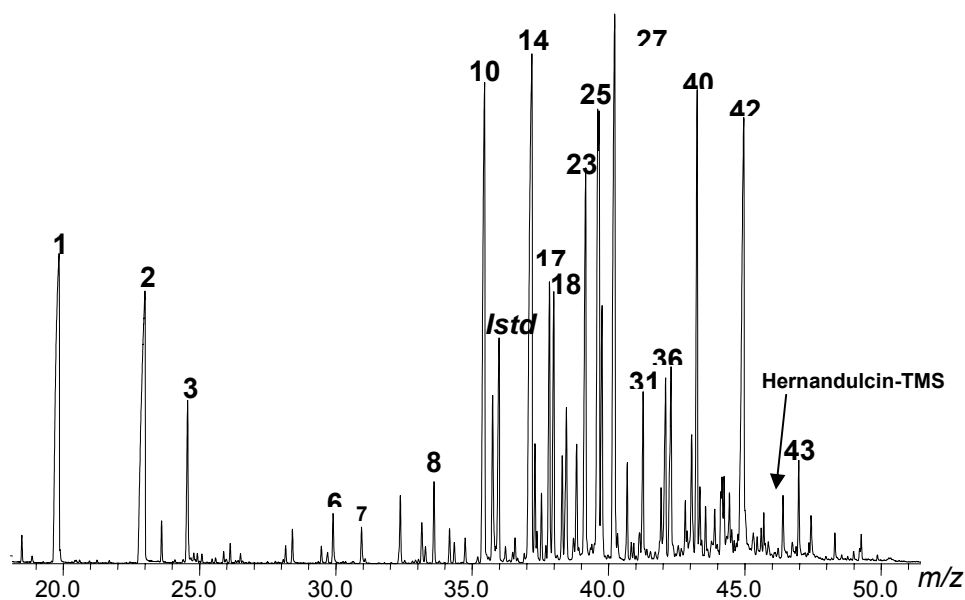
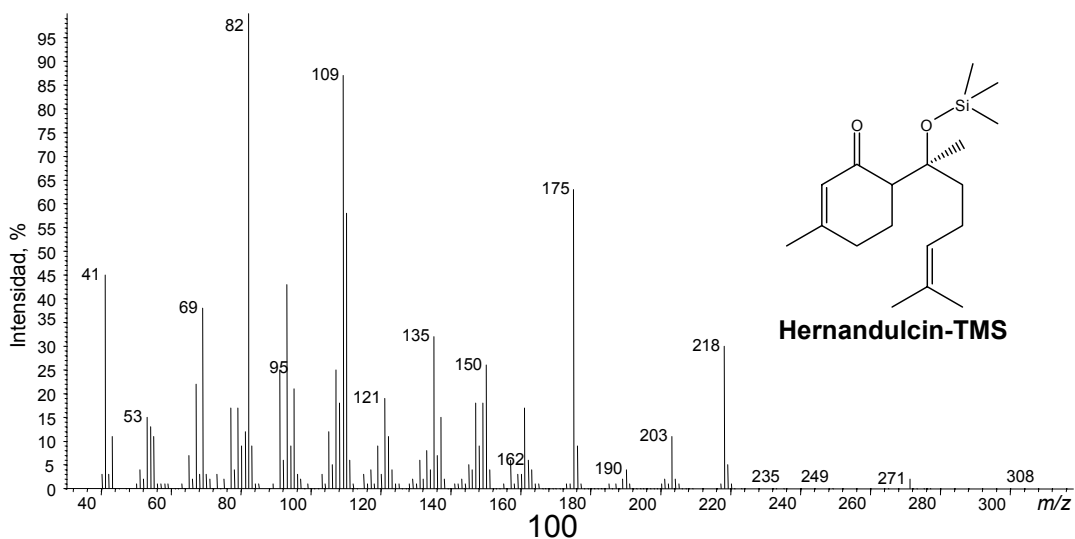
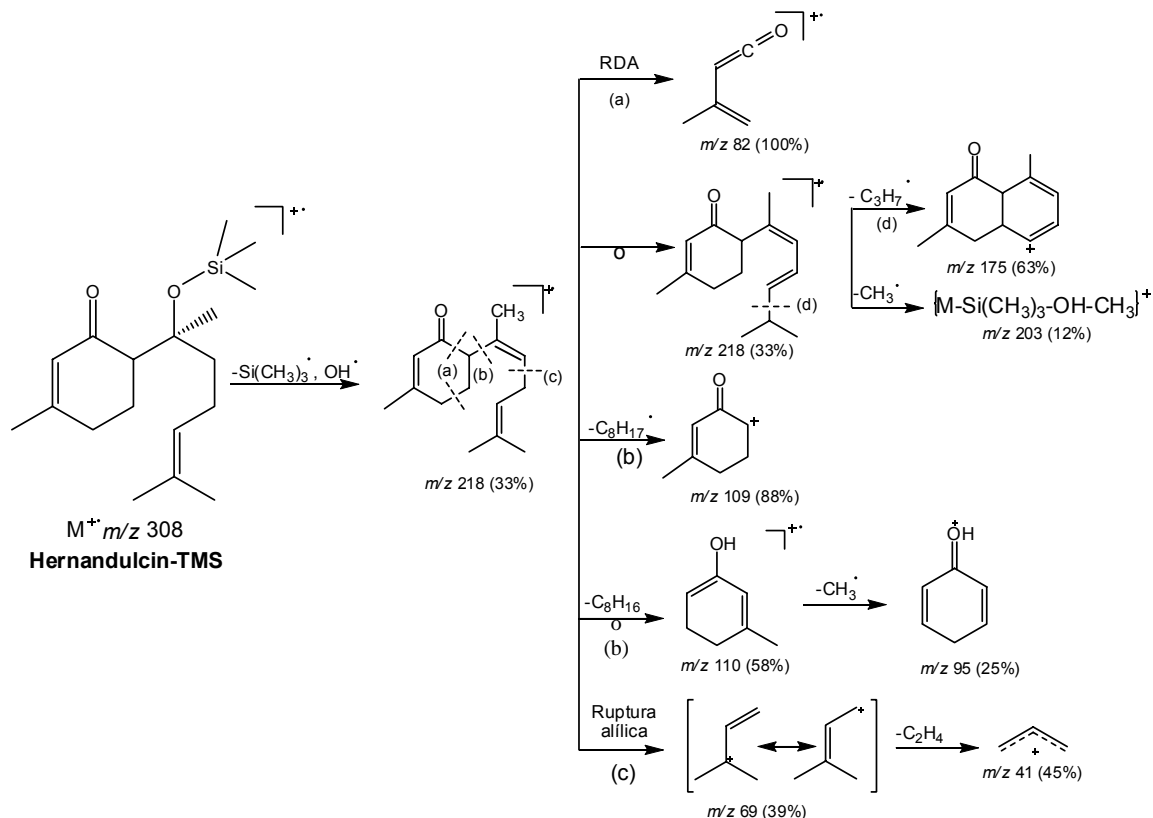


Figura 31. Espectro de masas del hernandulcin-TMS.



Esquema 11. Posibles rutas de fragmentación del derivado TMS del hernandulcin.



Adicionalmente, se identificaron en el cromatograma de la masa de reacción, picos con los espectros de masas correspondientes a los derivados trimetilsililo del α -bisabolol, *trans*-nerolidol, espatulenol, linalool, germacreno D-4-ol, citronelol y *cis*-calamen-10-ol. También se identificaron los compuestos productos de la descomposición térmica del hernandulcin, formados probablemente durante la hidrodestilación asistida por la radiación de microondas.

El contenido alto de sesquiterpenos presentes en el AE de *Phyla (Lippia) dulcis*, reduce su solubilidad en etanol. Esta característica, puede restringir notablemente el uso de este aceite en aplicaciones cosméticas y, sobre todo para la fabricación de perfumes. Por otra parte, los valores de constantes físicas determinados para este aceite, difieren considerablemente de los obtenidos para el quimiotipo rico en alcanfor aislado aplicando destilación por arrastre con vapor, para el cual el

rendimiento de la extracción fue de 0.8% p/p y el aceite obtenido desvió la luz polarizada en un ángulo de -11.8° [65].

Tabla 18. Propiedades físico-químicas del aceite esencial de *Phyla (Lippia) dulcis*.

PROPIEDAD	MAGNITUD	
Densidad (23°C)	$0.92 \pm 0.01^*$ g/mL	
n_D (20°C)	$1.5095 \pm 0.0005^{**}$	
$[\alpha]_D^{25}$ (°·mL/g·dm)	(+) $4.00 \pm 0.18^*$	
Solubilidad (mL AE/mL sln C ₂ H ₅ OH/H ₂ O)	20 %v/v	Insoluble
	40 %v/v	Insoluble
	60 %v/v	Insoluble
	80 %v/v	Ligeramente soluble

* Promedio de cinco determinaciones \pm s, n=5.

** Promedio de tres determinaciones \pm s, n=3.

*** Promedio de dos determinaciones \pm s, n=2.

3.2.3 *Lippia origanoides* Kunth

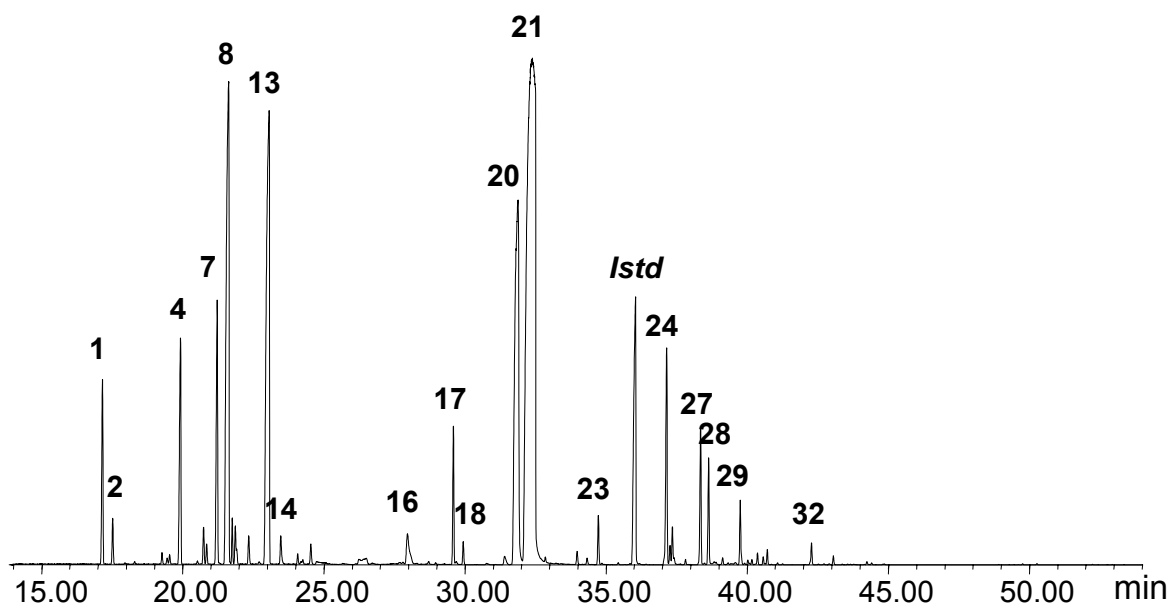
El aceite esencial obtenido por MWHD, de las partes aéreas de la planta, presentó un olor picante y color amarillo, y constituyó el 1.46 ± 0.05 % (n=3) del peso del material vegetal fresco. Previamente han reportado rendimientos de extracción de 1% [78] y 4.6% [73].

El cromatograma típico de los metabolitos secundarios volátiles extraídos, se presenta en la **Figura 32**, y su identificación, con base en criterios cromatográfico y espectroscópico, se registra en la **Tabla 19**, junto con la cantidad relativa (%) y concentración (mg/kg) de los mismos, los respectivos índices de Kovats y las notas odoríferas de algunos compuestos.

Según los parámetros de integración empleados (área de rechazo de pico de base: 0.1, y umbral de integración, thshd = 17), los 32 compuestos identificados corresponden al 97.5% del AE. El aceite es constituido principalmente por hidrocarburos monoterpénicos (37%) y monoterpénoides (56%), siendo timol y

carvacrol los metabolitos más abundantes (ca. 47%), junto con sus precursores biosintéticos *p*-cimeno y γ -terpineno. La composición es bastante similar a la reportada por Oliveira y sus colaboradores en Brasil, quienes identificaron 66% de monoterpenos oxigenados y cerca del 1% de sesquiterpenos oxigenados [78]

Figura 32. Perfil cromatográfico típico del aceite esencial de *Lippia origanoides*, obtenido por MWHD. Columna DB-5 (60 m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV).



Timol y carvacrol son compuestos fenólicos isoméricos, de masa molecular 150, sus iones moleculares aparecen en los espectros con intensidades de 34 y 38 %, respectivamente. La fragmentación escasa, es debida a la estabilidad característica de los compuestos aromáticos (**Figura 33**). El patrón de fragmentación para los dos isómeros es muy similar, con algunas diferencias cuantitativas en las intensidades de los picos fragmento. La posible ruta disociativa para el carvacrol se ilustra en el **Esquema 12**.

Tabla 19. Cantidad relativa (%), concentración (mg/kg) e identificación por GC-MS de los principales componentes del aceite esencial de *Lippia organoides*, aislado por MWHD.

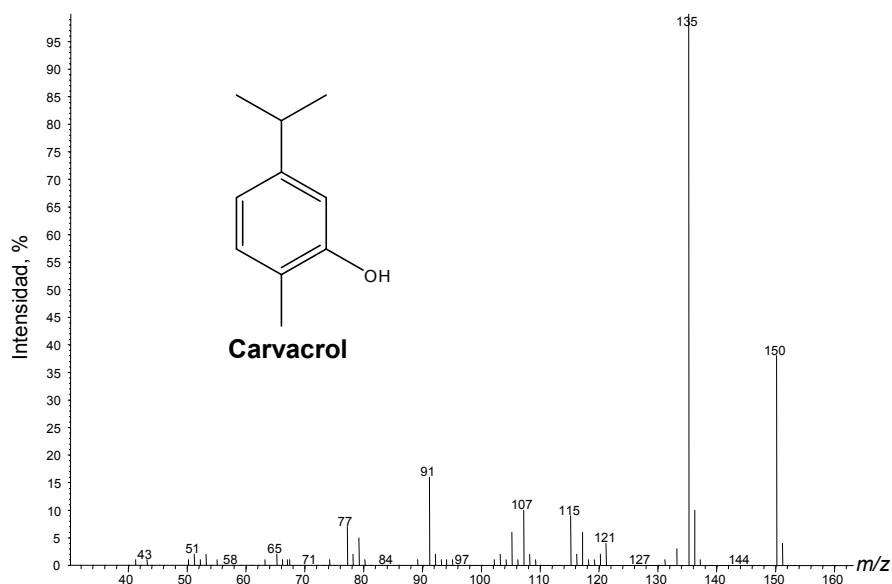
Nº Pico Fig. 32	Compuesto	I _k ^a		Cantidad relativa, % ^b	Concentración [mg/kg] ^b	Nota odorífera ^c
		DB-5	DB-WAX			
1	α-Thujeno	930	1024	1.90	23000	A madera
2	α-Pineno	939	1019	0.42	5200	A pino
3	Sabineno	975	1119	0.10	1200	Verde fresco
4	β-Mirceno	991	1164	2.83	35000	Balsámica
5	α-Felandreno	1011	1178	0.36	30000	Herbácea
6	Δ ³ -Careno	1013	1147	0.19	2400	A limón
7	α-Terpineno	1022	1178	3.11	38000	A limón
8	p-Cimeno	1032	1272	10.92	134000	A gasolina
9	Limoneno	1035	1197	0.38	4600	Cítrica, frutal
10	β-Felandreno	1037	1206	0.38	4600	Amentolada
11	1,8-Cineol	1039	1209	0.10	1200	A eucalipto
12	trans-β-Ocimeno	1049	1252	0.31	3700	
13	γ-Terpineno	1066	1248	11.78	140000	A gasolina
14	cis-Hidrato de sabineno	1076	1470	0.34	4200	Balsámica
15	Linalool	1101	1548	0.21	2600	
16	Terpinen-4-ol	1189	1556	0.78	9600	Nuez moscada
17	Timil metil éter	1232	1597	1.28	15700	
18	Carvacril metil éter	1242	1610	0.21	2600	
19	4-Metil-2-isopropilfenol	1281	2167	0.16	1900	
20	Timol	1294	2187	14.41	180000	
21	Carvacrol	1308	2219	32.88	450000	
22	Acetato de timilo	1349	1856	0.14	1700	
23	Acetato de carvacrilo	1368	1880	0.41	5000	
24	trans-β-Cariofileno	1435	1610	2.54	31000	A madera
25	Sesquiterpeno	1439	1618	0.16	2000	
26	trans-α-Bergamoteno	1441	1593	0.31	3800	
27	α-Humuleno	1471	1684	1.41	17000	A madera
28	N.I.	1479	2162	1.04	12800	
29	β-Bisaboleno	1514	1735	0.56	7000	Dulce
30	trans-γ-Bisaboleno	1534	1766	0.10	1200	
31	N.I.	1546	1782	0.12	1400	
32	Óxido de cariofileno	1598	2013	0.21	2600	Cítrica, frutal
Familia de compuestos		Porcentaje promedio, % (n=3)				
	Hidrocarburos monoterpénicos	37	±	4.38		
	Monoterpenos oxigenados	56	±	1.32		
	Hidrocarburos Sesquiterpénicos	5.4	±	0.36		
	Sesquiterpenos oxigenados	0.22	±	0.02		
	Otros	3.0	±	0.78		

^a Índices de Kováts experimentales.

^c Ref. bibl. [123-127].

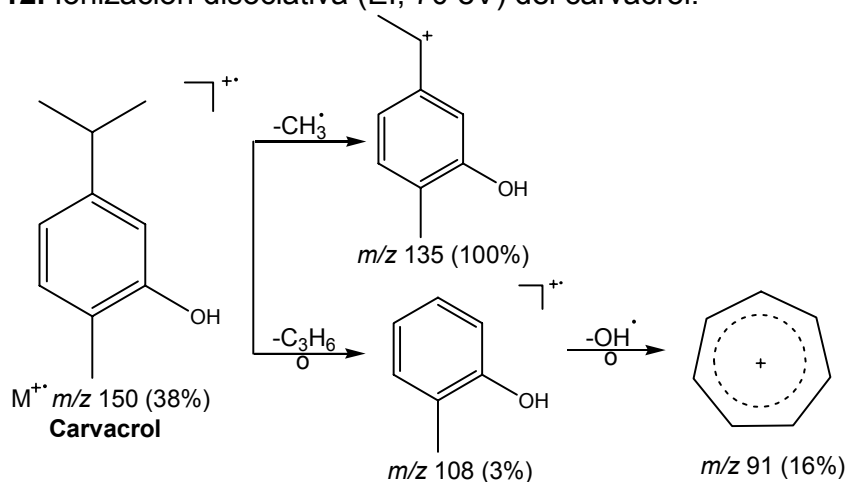
^b Promedio de tres extracciones, n=3.

Figura 33. Espectro de masas del carvacrol.



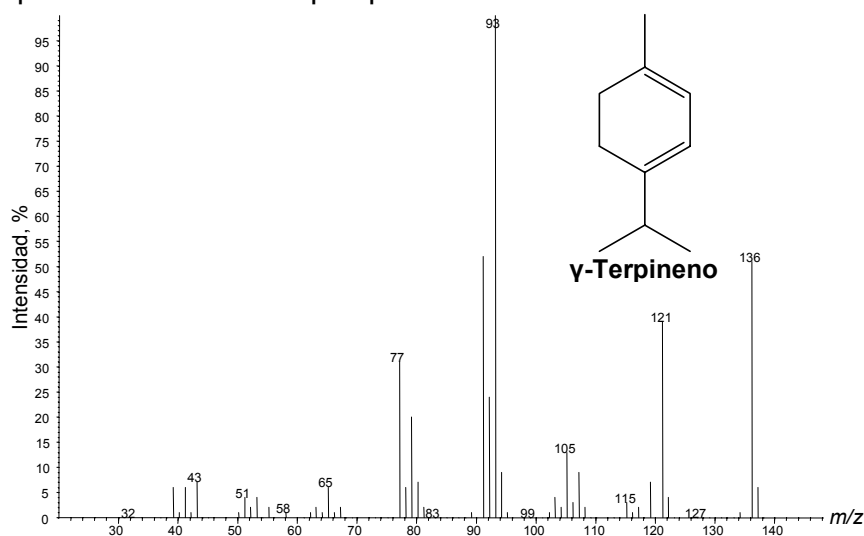
El ion $(M-CH_3)^+$, pico de base, para los dos isómeros se forma por eliminación de un radical metilo, a partir del ion molecular. Adicionalmente, las rutas de fragmentación de estos fenoles conducen a la formación de iones característicos para compuestos aromáticos, *i.e.* los fragmentos típicos en m/z 91, 77 y 65.

Esquema 12. Ionización disociativa (EI, 70 eV) del carvacrol.



El γ -terpineno es un monoterpeno cíclico, precursor biosintético del timol y carvacrol, su ion molecular en m/z 136 con intensidad media (52%) se disocia para eliminar un radical isopropilo y formar el ion, pico de base, en m/z 93 (100%). La presencia de dos enlaces dobles en el anillo, impulsa la ionización disociativa hacia la formación de un ciclo aromático por eliminación sucesiva de 2H y CH₃, formando los iones en m/z 77 y 91 (**Esquema 13**). La estabilidad de los fragmentos se deduce de la intensidad de las respectivas señales y la presencia de picos débiles en la región de masas bajas (**Figura 34**).

Figura 34. Espectro de masas del γ -terpineno



El p -cimeno, un monoterpeno aromático, es, al igual que el γ -terpineno, precursor biosintético de fenoles en el metabolismo secundario vegetal. El espectro de masas de este precursor aromático se presenta en la **Figura 35** y la respectiva ruta de fragmentación se ilustra en el **Esquema 14**. En su espectro de masas aparece el ion molecular en m/z 134, con intensidad intermedia (33%), que presenta la fragmentación y la estabilidad características de compuestos aromáticos. La eliminación del radical metilo conduce a la formación del ion, pico de base, en m/z 119.

Esquema 13. Posibles rutas de fragmentación del γ -terpineno

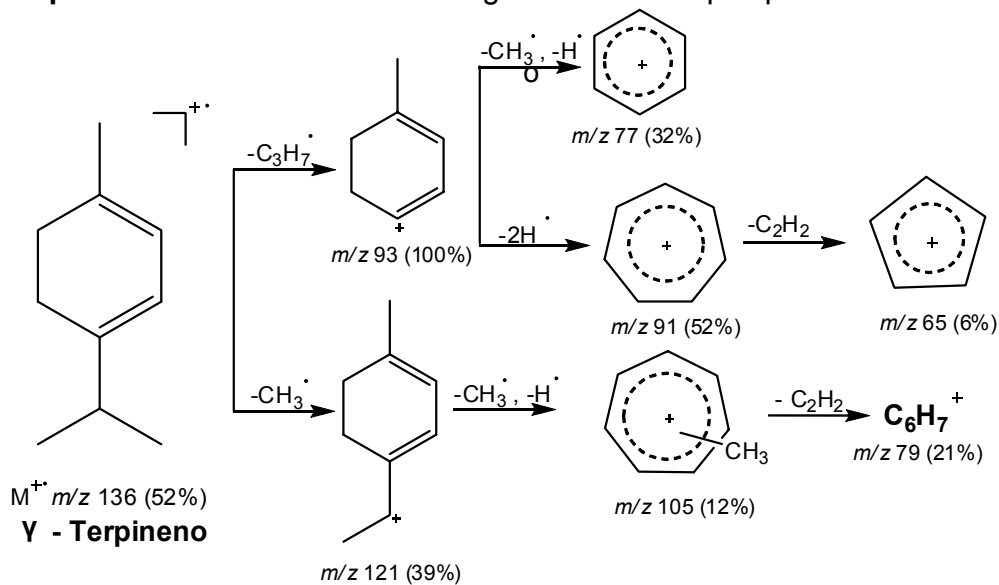
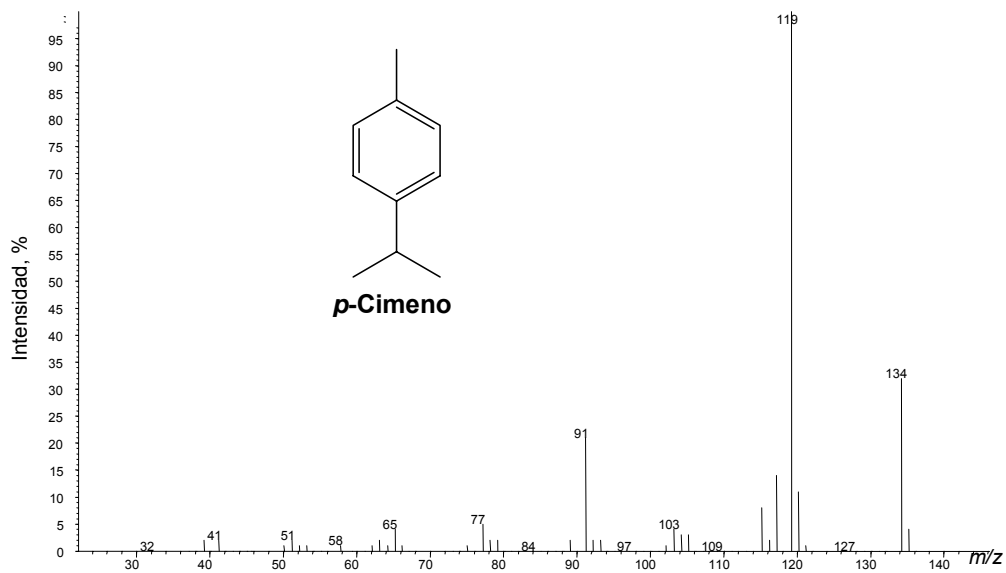
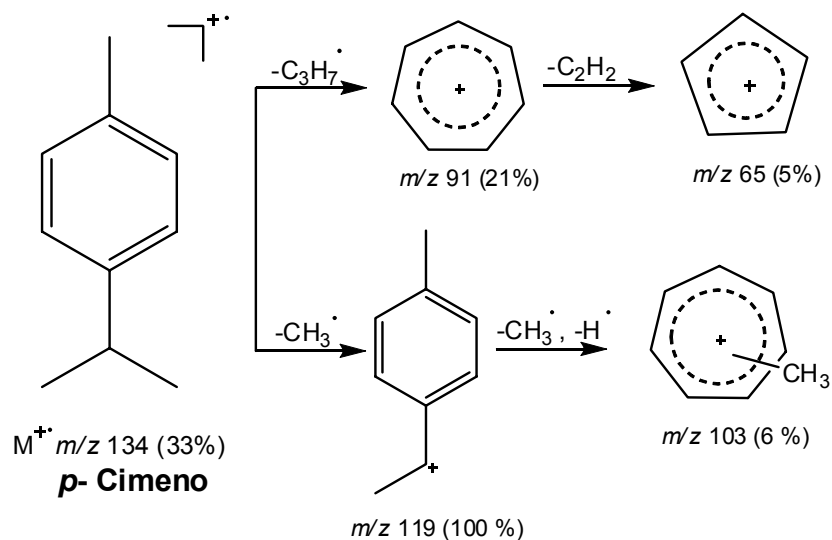


Figura 35. Espectro de masas del *p*-cimeno.



Esquema 14. Fragmentación del ion molecular del *p*-cimeno.



Las propiedades físico-químicas determinadas para el AE de *L. origanoides* se reportan en la **Tabla 20**. Los compuestos mayoritarios del aceite esencial de *L. origanoides* no presentan carbonos quirales, hecho que podría explicar la rotación específica casi nula de este aceite. Sin embargo, es posible que algunos compuestos minoritarios con actividad óptica (e.g. linalool), produzcan una pequeña rotación. Los compuestos aromáticos oxigenados presentan densidades superiores a 0.9 g/mL e índices de refracción mayores a 1.47, así la presencia de compuestos fenólicos en el AE (37%), explica los valores de estas propiedades.

Tabla 20. Propiedades físico-químicas del aceite esencial de *Lippia origanoides*.

PROPIEDAD	VALOR	
Densidad (23°C)	0.922 g/mL ± 0.002*	
$n_D (20^\circ C)$	1.5143 ± 0.0005**	
$[\alpha]_D^{25} (c. mL/g \cdot dm)$	(+) 0.439 ± 0.099*	
Solubilidad	20 %v/v	Insoluble
mL de AE/ mL de solución	40 %v/v	0,004 ***
	60 %v/v	0,006***
C ₂ H ₅ OH/H ₂ O	80 %v/v	0.64 ± 0.11***

* Promedio de cinco determinaciones ± s, n=5.

** Promedio de tres determinaciones ± s, n=3.

*** Promedio de dos determinaciones ± s, n=2.

Por otra parte, el aceite de esta especie botánica presentó solubilidad en etanol relativamente buena, propiedad que se debe, principalmente, al contenido alto de compuestos oxigenados, *i.e.* timol, carvacrol y sus acetatos.

Con el fin de determinar las similitudes y diferencias en la composición de los aceites esenciales de tres especies del género *Lippia* se desarrolló una comparación entre las familias de compuestos y los metabolitos presentes en los aceites estudiados. El único metabolito común, presente en los cuatro AEs, incluyendo dos quimiotipos de *Lippia alba*, en un porcentaje superior a 0.1%, fue *trans*- β -cariofileno, un sesquiterpeno cuya estructura química se presenta en el **Esquema 8**. La distribución de las diferentes familias de los metabolitos presentes en los AEs estudiados, se ilustra en la **Figura 36**. De esta distribución, se observó que los monoterpenos oxigenados, son la principal familia de metabolitos en los aceites de *L. alba* y *L. organoides*, y los sesquiterpenos en el aceite de *Phyla (Lippia) dulcis*.

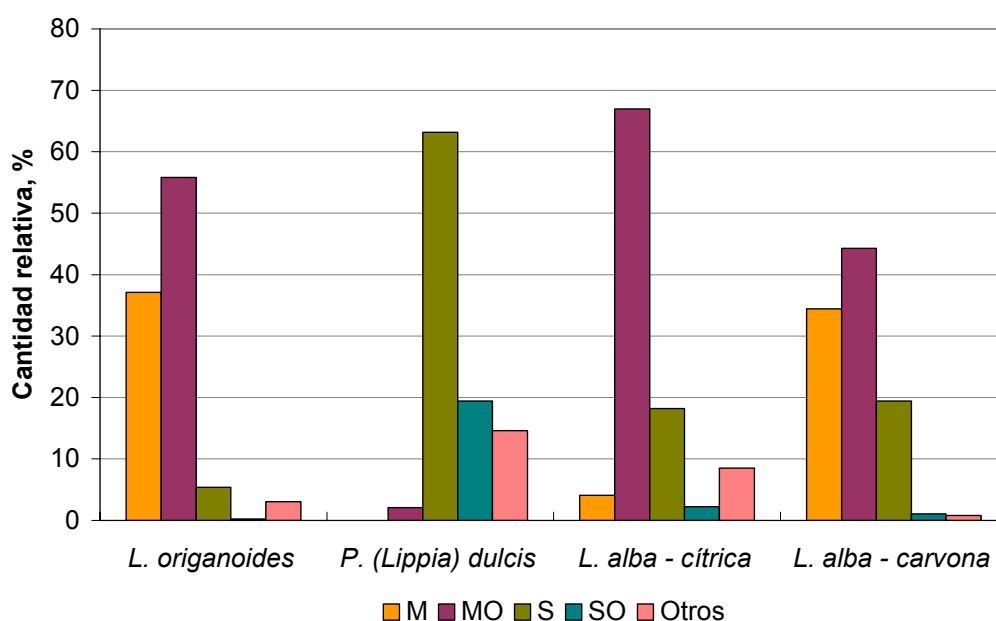
Compadre [65], describió en su trabajo, la similitud en la composición de algunos aceites del género *Lippia*, *e.g.* los aceites de *L. dulcis*, *L. adoensis*, *L. fissicalyx*, *L. grata*, *L. grandis*, *L. grisebachiana*, *L. integrifolia*, *L. sidoides* y *L. ukambensis*, que se caracterizan por un alto contenido de monoterpenos, mientras los aceites de *L. aristata* y *L. thymoides*, presentan en su composición sesquiterpenos como compuestos mayoritarios.

Aunque es posible caracterizar las plantas en función de la composición y estructura de sus metabolitos mayoritarios, es necesario tener en cuenta la amplia variedad de quimiotipos que presentan las especies del género *Lippia*.

Por el contrario, especies de otros géneros conservan casi constante la composición de sus AE, un ejemplo es el caso de las especies del género

Thymus, para las cuales los componentes mayoritarios casi siempre son timol, carvacrol, *p*-cimeno y γ -terpineno [136].

Figura 36. Distribución de las principales familias de los compuestos en los aceites de *Lippias* estudiados, M: Hidrocarburos monoterpénicos, MO: Monoterpenos oxigenados, S: Hidrocarburos sesquiterpénicos, SO: Sesquiterpenos oxigenados; Otros.



La ruta metabólica para la biosíntesis de monoterpenos y sesquiterpenos, presenta pasos comunes, de tal manera, que el grado en que una especie o quimiotipo catabolice en mayor proporción uno de los compuestos está principalmente determinado por factores genéticos. De igual manera, estos factores, rigen la formación de compuestos fenólicos, amínicos y azufrados.

3.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS ACEITES ESENCIALES

Los métodos colorimétricos se usan ampliamente para la determinación de la actividad antioxidante, tanto de sustancias puras como de mezclas [9, 137]. En

relación másica entre AO y radical, necesaria para reducir la mitad de los radicales presentes inicialmente.

Con el fin de relacionar los valores obtenidos para la capacidad antirradicalaria de los AEs, se determinaron los valores de EC_{50} para dos antioxidantes conocidos o empleados industrialmente en la preservación de diversos productos.

Establecer el estado estacionario, en el desarrollo de esta metodología, es fundamental para obtener valores exactos. Así, experimentalmente, se determinó este estado cuando la variación en la absorbancia es de 0.002.

En el caso de la vitamina E, un α -tocoferol cuya estructura se ilustra en la **Figura 37**, la curva que representa la relación existente entre la cantidad de DPPH \cdot sin reaccionar en el estado estacionario y los valores de EC (mg de vitamina E/mg de DPPH \cdot), se ilustra en la **Figura 38**. Según la línea, construída con los datos experimentales, la relación entre la cantidad de antioxidante y de radical, que logra reducir a la mitad de la concentración inicial de radical, es 0.25. Este valor concuerda con el reportado en la literatura [121]. La velocidad de la reacción es relativamente alta, pues el estado estacionario se alcanza casi en 15 min, después de iniciada la reacción.

Figura 37. Representación estructural de la molécula de vitamina E (α -tocoferol).

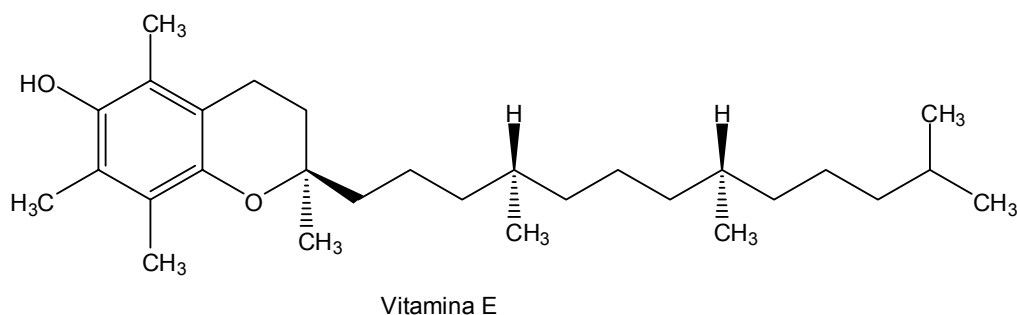
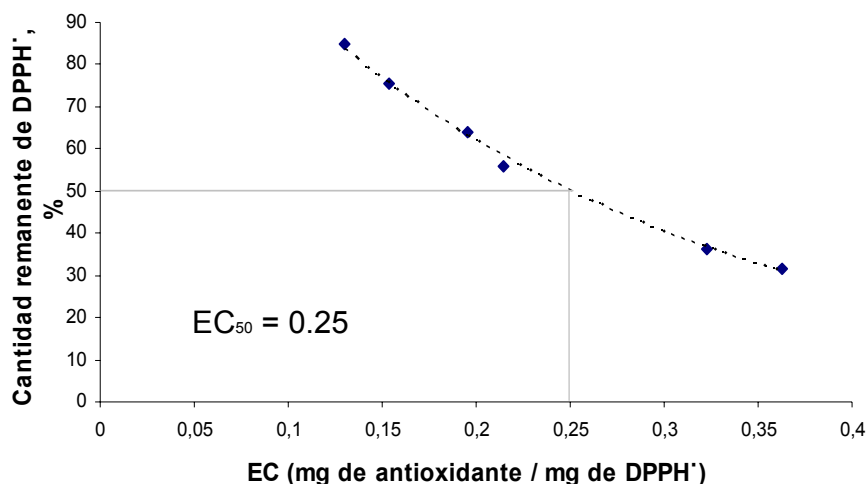


Figura 38. Desaparición de DPPH[·] en función de la cantidad de vitamina E (mg) por mg de radical.



El EC₅₀ corresponde al número de mg de antioxidante necesarios para reducir a la mitad la cantidad inicial de DPPH[·]; de esta manera, la respectiva cantidad de AO que reducirá el total del radical presente, se puede expresar como dos veces el valor de EC₅₀. Según esto, 0.5 mg de vitamina E serán necesarios para reducir 1 mg del radical, *i.e.* 1 mol de DPPH[·] reaccionará completamente con dos moles del antioxidante.

Generalmente, los compuestos fenólicos reducen tantas moléculas de radical como grupos hidroxilo posean en su estructura. En el caso de la vitamina E, la estequiometría de la reacción es diferente. Kikugawa [138] describió la posibilidad de formación de dímeros. De esta manera, el compuesto resultante tendría la habilidad de reducir dos moléculas de radical.

Otro de los antioxidantes de referencia, comercialmente empleado, es conocido como Trolox[®] (*6-Hidroxi-2,5,7,8-tertramethylchroman-2-carboxilic acid*), sustancia empleada para la determinación del TEAC, *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*. En el procedimiento que se aplicó en este estudio, se determinó el EC₅₀ para el Trolox[®], y el valor obtenido correspondió a 0.278 mg de Trolox[®] por mg de DPPH[·],

como se presenta en la **Figura 39**. El tiempo transcurrido hasta alcanzar el estado estacionario, de la reacción entre el Trolox[®] y el radical, fue de aproximadamente 15 min. De los resultados obtenidos es posible comparar la efectividad de los AO de referencia, siendo el α -tocoferol ligeramente más efectivo que el Trolox[®].

El Trolox[®] es el análogo hidrosoluble de la vitamina E, su estructura base es similar a la del grupo de los tocoferoles, como se ilustra en la **Figura 40**.

Figura 39. Concentración efectiva media, EC_{50} , del Trolox[®], medida en función de la disminución de la cantidad del DPPH[·].

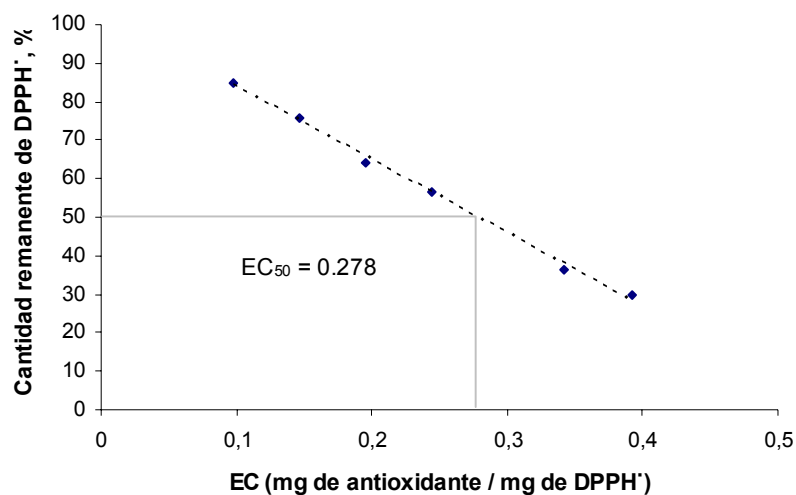
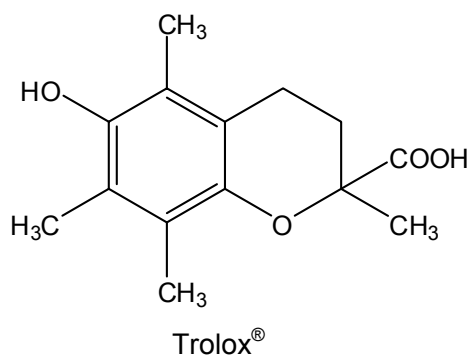


Figura 40. Representación estructural del Trolox[®].



La concentración de antioxidante necesaria para reducir el 50% del DPPH[·] inicial, EC₅₀, es inversamente proporcional a la capacidad de atrapar radicales. De tal manera, para obtener datos más claros es posible expresar los resultados como poder antirradicalario, ARP, según el cual los respectivos valores para vitamina E y Trolox[®], son 4.17 y 3.60.

La selección de los parámetros para establecer el estado estacionario es de gran importancia en la evaluación del EC₅₀, debido a que su determinación en cinéticas lentas (como las presentadas por los AE bajo estudio) conduce a resultados con mayor incertidumbre, que los determinados para cinéticas rápidas.

Los datos experimentales obtenidos en el análisis de la actividad antioxidante de los AE permitieron determinar los valores de EC₅₀ registrados en la **Tabla 21**.

Tabla 21. Concentración efectiva media, EC₅₀, de los aceites esenciales estudiados.

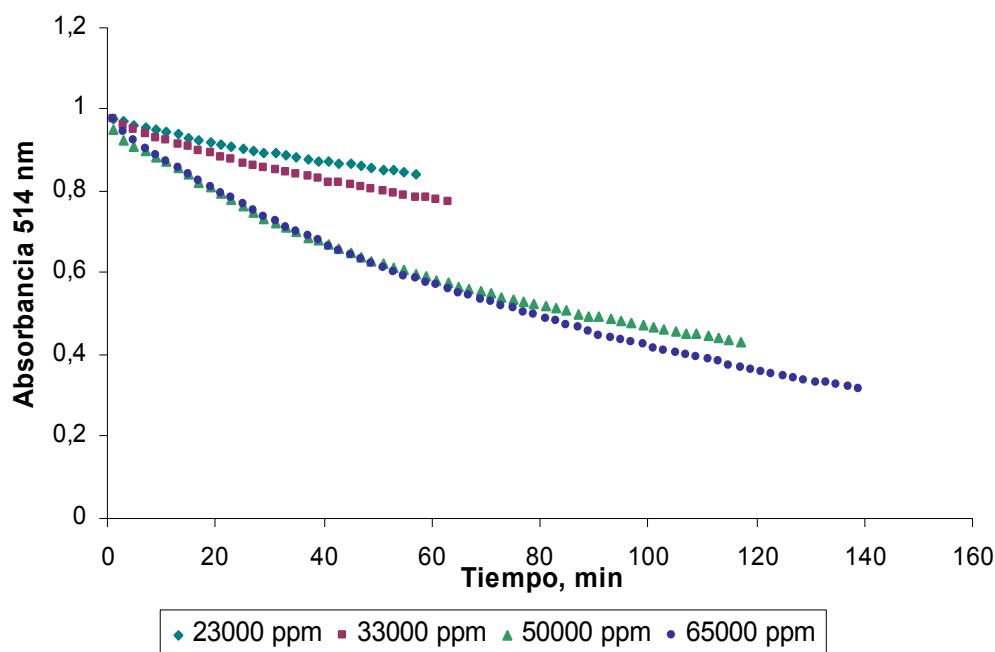
ACEITES ESENCIALES	EC ₅₀ (mg de antioxidante/mg de DPPH [·])*
<i>Lippia alba</i> , quimiotipo carvona	289 ± 9
<i>Lippia alba</i> , quimiotipo citral	305 ± 6
<i>Phyla (Lippia) dulcis</i>	8.47 ± 0.05
<i>Lippia organoides</i>	6.0 ± 0.3

* Promedio de dos mediciones ± s.

La cinética obtenida para las reacciones entre los dos aceites de *Lippia alba* y el radical fueron similares; los tiempos empleados para alcanzar el estado estacionario fueron parecidos, como se ilustra en las **Figuras 41** y **42**. Sin embargo, existen ligeras diferencias en su capacidad antirradicalaria, probablemente, debido a la presencia de fenoles, timol y eugenol, en un porcentaje ca. 0.3% en el quimiotipo carvona, razón, por la cual este quimiotipo presentó una actividad antioxidante ligeramente más alta.

En un estudio desarrollado por Choi [139], se determinó la capacidad de compuestos característicos de los aceites esenciales cítricos para secuestrar radicales DPPH[·]. De los compuestos ensayados, los que presentaron mayor actividad, fueron el γ -terpineno, terpinoleno y geraniol, los cuales redujeron el contenido total inicial de radical en un 84.7, 87.4 y 87.7% respectivamente, mostrando un efecto 3.5 veces más fuerte que el Trolox[®]. La mezcla que constituye el citral, logró reducir el 48% del radical inicial. Mientras los respectivos valores para α -terpineol, octanol, decanol, α -pineno, terpinen-4-ol, *p*-cimeno, mirceno y limoneno, se encuentran entre 8.8-16.5%

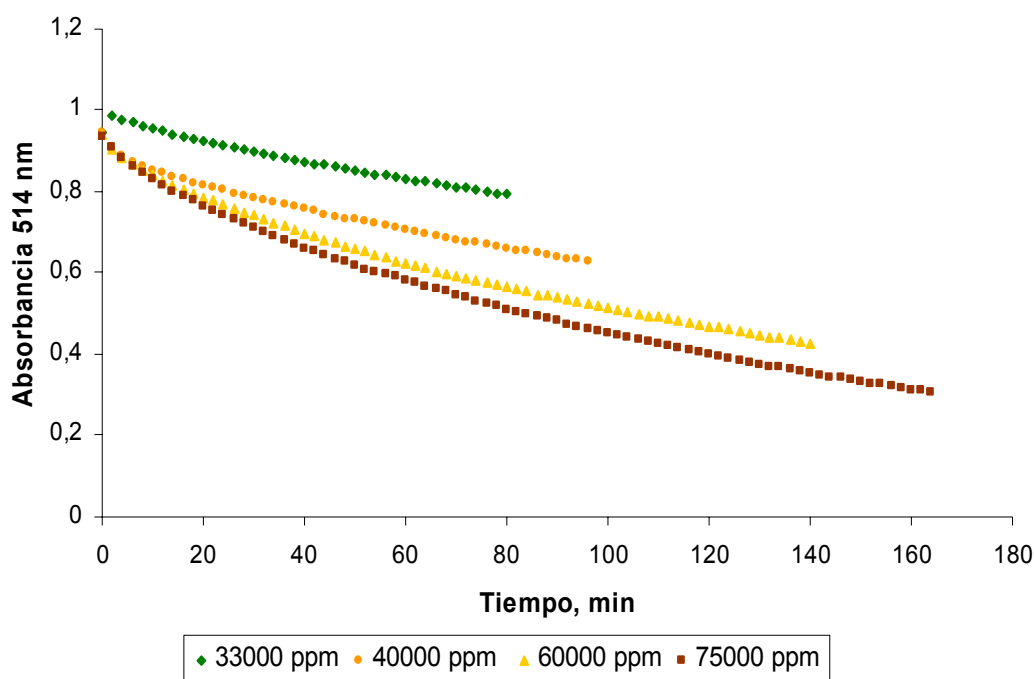
Figura 41. Determinación del estado estacionario de la reacción entre el AE de *Lippia alba*, quimiotipo carvona, con DPPH[·].



Así, es posible concluir, que la actividad antirradicalaria del AE de *L. alba*, quimiotipo citral, es principalmente causada por el contenido de citrol (nerol más geraniol), y citral, en menor proporción. Sin embargo, aunque estos compuestos

oxigenados se encuentran en un porcentaje de 56.7% en el aceite del quimiotipo cítrico, su capacidad antirradicalaria es considerablemente más baja, que la de los compuestos fenólicos presentes en la esencia del quimiotipo carvona.

Figura 42. Cinética de la reacción del aceite esencial de *Lippia alba*, quimiotipo citral, con DPPH[·].

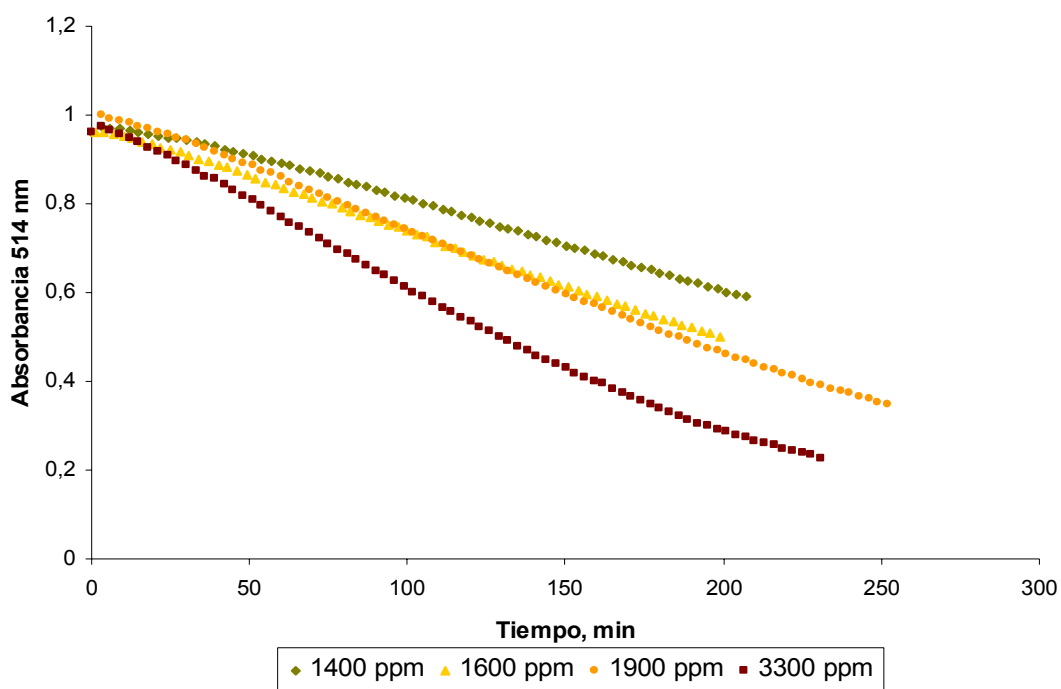


El solvente empleado en el análisis de la actividad antioxidante fue etanol; sin embargo, en el caso del AE de *Phyla (Lippia) dulcis*, debido a su muy baja solubilidad, se empleó hexano. Solventes con características apolares, reducen la velocidad de la reacción, mientras que solventes próticos pueden acelerar este proceso cediendo un hidrógeno [140].

A pesar de no contener compuestos fenólicos, aminas, ni mercaptanos, el AE de *Phyla (Lippia) dulcis* presentó una buena actividad antioxidante, (ca. 8 mg AE/mg DPPH[·]), incluso alcanzando una efectividad similar a la presentada por el AE de *L.*

origanoides (compuestos fenólicos). El hernandulcin, presente en el aceite de esta especie, puede actuar por atrapamiento radicalario, donando el hidrógeno hidroxílico al radical DPPH[·]. Sin embargo, la cinética de la reacción fue bastante lenta, aproximadamente 4 horas (**Figura 43**). Razón por la cual, no es un antioxidante conveniente en la formulación de productos susceptibles a deterioro oxidativo.

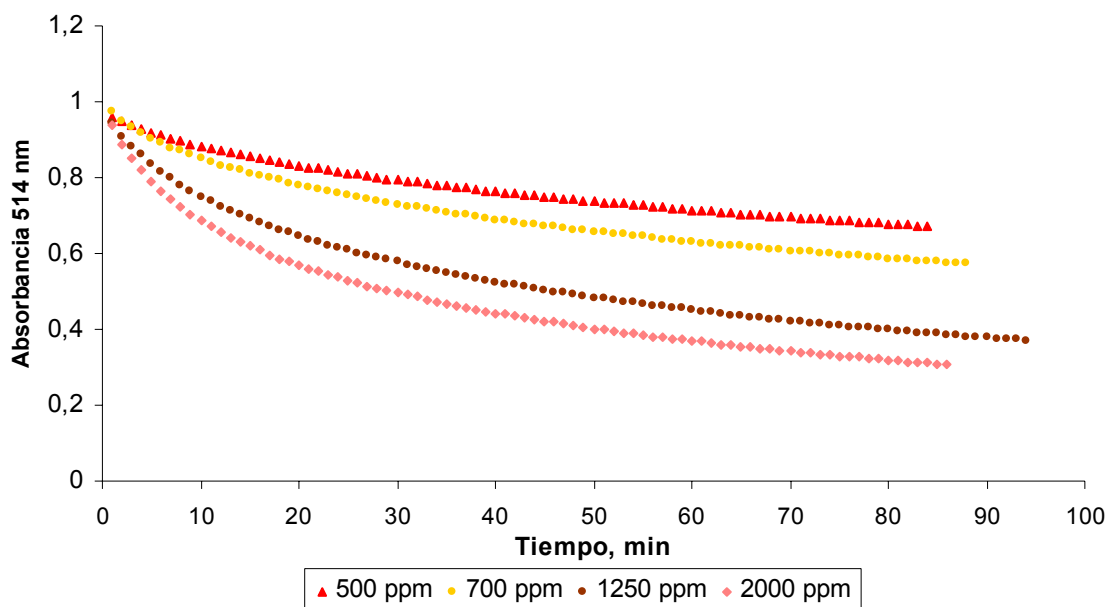
Figura 43. Determinación del estado estacionario de la reacción entre el AE de *Phyla (Lippia) dulcis* con DPPH[·].



El AE de *Lippia origanoides* fue el más activo en cuanto a la capacidad antirradicalaria, *i.e.* su EC₅₀ fue el menor; 6 mg de aceite esencial son necesarios para reducir la mitad del radical presente inicialmente (**Figura 44**). Esta actividad se debe a la presencia de fenoles, *ca.* 50% del aceite esencial. La cinética de esta reacción fue la más rápida de los aceites estudiados; pero, sin embargo, es 6 veces más lenta que la cinética de la vitamina E.

En el caso de los compuestos fenólicos, la capacidad antirradicalaria está directamente relacionada con la actividad antioxidante y su reacción con radicales es generalmente de primer orden [121]. Pero en el caso de hidrocarburos, éstos actúan de manera diferente, pueden ejercer un efecto protector, evitando la oxidación, a través de cinéticas más complejas.

Figura 44. Determinación del estado estacionario de la reacción del aceite esencial de *Lippia organoides* con DPPH[·].



En conclusión, el aceite más efectivo, con mayor capacidad antirradicalaria, fue el de *Lippia organoides*, pues además de ser activo, presentó la cinética menos lenta. Por otra parte, aunque el AE de *Phyla (Lippia) dulcis* también presentó buena actividad, su cinética lenta lo hace menos apto para su aplicación comercial. En el caso de los aceites de *Lippia alba*, la actividad antirradicalaria es gobernada por los compuestos oxigenados presentes, aunque es bastante similar para los dos quimiotipos, el AE del quimiotipo carvona posee una efectividad ligeramente mayor debido a la presencia de timol y eugenol, en pequeñas cantidades.

Las cinéticas evaluadas para las reacciones entre los AEs y el radical DPPH[·], presentaron un comportamiento particular, una relación inversa entre la concentración de los aceites y la velocidad de reacción. Este fenómeno es explicado, por el efecto del producto de la reacción, la α,α -difeníl- β -picrilhidrazina, sobre el desarrollo de la reacción, según lo cual se ha observado, que ejerce efectos inhibitorios sobre el transcurso de la reacción, posiblemente debido a que al aumentar la cantidad de hidrazina en solución, aumenta la reacción inversa [141]. Sin embargo, el mecanismo de reacción aún no está claro, y debe ser bastante complejo, debido a la presencia de numerosos compuestos en el aceite que pueden ejercer efectos sinérgicos o antagónicos sobre compuestos activos.

3.4 EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales de diversas especies vegetales y algunos de sus componentes, han sido empleados por largo tiempo como saborizantes de alimentos y bebidas, así como en aplicaciones etnomédicas. Los AEs contienen numerosas sustancias con actividad bactericida, lo que los hace aptos como agentes de preservación de alimentos y componentes de fitofármacos. Las actividades antibacterial y antifúngica de los AEs, se deben principalmente a ciertos terpenoides y compuestos fenólicos presentes [142].

Diversos estudios han demostrado la efectividad biológica *in vitro* e *in vivo* de los AEs; estos resultados respaldan científicamente sus aplicaciones en medicina popular, para diferentes dolencias [5, 46, 54].

3.4.1 actividad citotóxica de los aceites esenciales en pruebas con células vero.

Los resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad realizados en el Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, CINTROP, UIS, que forma parte de

CENIVAM, se reportan en la **Tabla 22**, junto con los respectivos límites de confianza (LC) para cada una de las determinaciones.

Tabla 22. Concentración letal media, CL₅₀ en células Vero (µg/mL).

SOLUCIÓN	CÉLULAS VERO	
	CL ₅₀	LC
<i>Lippia alba</i> , quimiotipo carvona	48.27	39.75-56.78
<i>Lippia alba</i> , quimiotipo cítrico	30.6	30.57-30.63
<i>Phyla (Lippia) dulcis</i>	20.96	18.70-23.22
<i>Lippia organoides</i>	>100	ND
Nifurtimox (sustancia de referencia)	27.54	24.41-30.67

Las células Vero son células epiteliales de un mono verde africano, comúnmente conocido como mono Vero, empleadas en análisis de citotoxicidad de diferentes virus y parásitos. En este tipo de células se incuba y desarrolla el *Trypanosoma cruzi*, parásito causante del mal de chagas.

Un medicamento comúnmente recetado para tratar este padecimiento, es el nifurtimox, un derivado del 2-nitrofurano, que a pesar de su efectividad en este tratamiento, es altamente tóxico, como se ilustra en **Tabla 22**.

Los resultados de citotoxicidad en células Vero, demuestran la relación entre la composición química de los AEs bajo estudio, y las respectivas concentraciones letales medias; según lo cual, a mayor contenido de fenoles en el aceite, menor toxicidad presenta la mezcla en las células ensayadas, como se observa para el aceite de *Lippia organoides*. Por el contrario, al AE de *Phyla (Lippia) dulcis*, presentó mayor toxicidad que la sustancia de referencia (Nifurtimox), razón por la cual, se recomienda no incluir un aceite con estas características toxicológicas en productos de consumo humano.

La toxicidad de los aceites esenciales está determinada por el grado de lipofilicidad de la mezcla, pues esta propiedad define la solubilidad del aceite en la membrana celular. Así, mezclas con alto contenido de hidrocarburos disuelven fácilmente la membrana celular provocando, una ruptura de ésta, y por ende la muerte celular [143]. Este es el caso del AE de *Phyla (Lippia) dulcis*, el cual poseen un 63% de hidrocarburos y el más alto grado de toxicidad.

3.4.2 Actividad antiparasitaria de los aceites esenciales

El ciclo de vida de la *Leishmania*, empieza cuando un mosquito flebótomo (vector invertebrado) parasitado por *Leishmania*, se alimenta de un hospedador vertebrado: es en este momento cuando inocula con su saliva los promastigotes presentes en su probóscide. En el estado promastigote, el protozoo es un flagelado móvil extracelular. Una vez está el parásito en los capilares cutáneos del hospedador se produce su fagocitosis por un macrófago que lo engloba en una vacuola parasitófora en un intento de eliminarlo, pero la *Leishmania* es resistente a todas las reacciones inmunológicas y vive y se desarrolla en su interior, transformándose a la forma amastigote. Los macrófagos parasitados son ingurgitados por otro flebótomo en cuyo intestino se liberan los amastigotes que recuperan la forma de promastigote y van emigrando al esófago y laringe del mosquito atraídos por sustancias quimiotácticas de su saliva y alcanzando su capacidad infectiva. Ya en la probóscide quedan preparados para ser inoculados. La duración del ciclo es de 4 a 20 días [144].

Los resultados obtenidos de las pruebas de efectividad inhibitoria en *Leishmania chagasi* de los AEs, se reportan en la **Tabla 23**, junto con los límites de confianza, LC, establecidos para las determinaciones respectivas.

Los parámetros para establecer la efectividad de un producto anti-*Leishmania*, se basan en los valores de concentración inhibitoria ($\mu\text{L/mL}$), así: una sustancia es activa cuando su concentración inhibitoria media, CI_{50} , es menor de 50 y la concentración necesaria para inhibir el 90% de los microorganismos, CI_{90} , es

menor de 100, parcialmente activa si su CI_{50} es menor que 50 pero el $CI_{90} > 100$, y se consideran inactivas cuando los valores de CI_{50} y CI_{90} superan los 50 y 100, respectivamente.

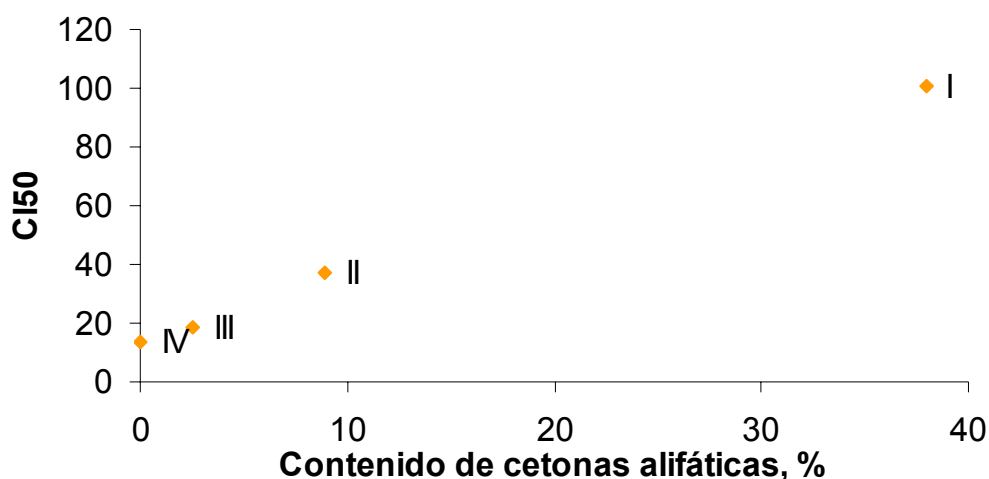
Tabla 23. Concentración inhibitoria, en promastigotes de *Leishmania chagasi* ($\mu\text{L}/\text{mL}$).

ACEITE ESENCIAL	PROMASTIGOTES DE <i>Leishmania chagasi</i>			
	CI_{50}	LC	CI_{90}	LC
<i>Lippia alba</i> , quimiotipo carvona	>100	ND	>100	ND
<i>Lippia alba</i> , quimiotipo citral	18.88	17.84-19.91	54.14	53.56-54.92
<i>Phyla (Lippia) dulcis</i>	37.30	36.97-37.64	>100	ND
<i>Lippia origanoides</i>	13.39	12.84-13.93	26.74	23.49-29.99

Según esto, el AE de *L. alba*, quimiotipo carvona, es inactivo en promastigotes de *Leishmania chagasi*; el aceite de *Phyla (Lippia) dulcis* es parcialmente activo, y los aceites de *Lippia origanoides* y *Lippia alba*, quimiotipo citral, son efectivos para inhibir el desarrollo de promastigotes de este protozoo, *i.e.* pueden evitar la transformación de la forma extracelular a la intracelular (amastigote).

La efectividad de todos los productos en aplicaciones biológicas, está directamente determinada por la composición química de las sustancias, así, de los resultados obtenidos es posible establecer una relación entre el contenido de compuestos oxigenados y la actividad anti-*Leishmania* de las mezclas, donde el contenido de cetonas alifáticas es inversamente proporcional a la efectividad inhibitoria, y la cantidad de aldehídos alifáticos y fenoles es proporcional a esta actividad (**Figura 46**).

Figura 46. Relación del contenido de cetonas alifáticas y la concentración inhibitora media en *Leishmania chagasi*. I: *L. alba*, quimiotipo carvona, II: *Phyla (Lippia) dulcis*, III: *L. alba*, quimiotipo citral, IV: *L. organoides*.



3.4.3 Actividad anti-*Candida*

Las infecciones causadas por *Candida* spp. son en general conocidas como candidiasis. El espectro clínico de esta enfermedad es muy diverso, casi cualquier órgano o sistema del cuerpo puede ser afectado.

Los resultados obtenidos por el laboratorio de Infección y Cáncer de la U de A, en la evaluación de la efectividad de los AEs para inhibir el desarrollo de levaduras del género *Candida*, se registran en la **Tabla 24**.

La sustancia de referencia empleada en el ensayo fue Itraconazol, un antifúngico de la familia de los triazoles, efectivo para inhibir el desarrollo de hongos infecciosos.

El AE de *L. organoides*, fue el más efectivo contra *Candida parapsilosis*, probablemente, debido a su contenido de compuestos fenólicos. De forma similar,

el AE de *L. alba*, quimiotipo citral, fue también efectivo, principalmente, en *C. krusei*; la mezcla isomérica de neral y geranial (citral) ha mostrado previamente actividad anti-*Candida* alta [54]. Sin embargo, la efectividad de ninguno de los aceites es comparable con las sustancia de referencia.

Tabla 24. Concentración mínima inhibitoria, CMI, de los AEs de *L. alba*, *Lippia organoides* y *Phyla (Lippia) dulcis* en *Candida parapsilosis* y *Candida krusei* (%v de AE/v de DMSO).

ESPECIE	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>Lippia alba</i> , quimiotipo carvona	>500	>500
<i>Lippia alba</i> , quimiotipo citral	500	130±85.39
<i>Phyla (Lippia) dulcis</i>	>500	>500
<i>Lippia organoides</i>	250	250
Itraconazol (Compuesto de referencia)	0.11±0.07	0.17±0.06

3.4.4 Actividad anti-*aspergillus*

Otro de los ensayos biológicos realizados con los aceites obtenidos, fue la actividad antifúngica contra dos diferentes especies de *Aspergillus*; estos microorganismos pueden ocasionar múltiples procesos patológicos. Entre los factores de patogenicidad de este hongo se encuentran:

- Tienen pequeño tamaño de sus conidias, lo que permite que sean aspiradas, causando infección en el pulmón y en los senos paranasales;
- Poseen alta capacidad de crecer a 37°C, lo que los hace idóneos para afectar al humano;
- Poseen capacidad alta de adherencia a superficies epiteliales y, posiblemente, endoteliales, y una gran tendencia para invadir los vasos sanguíneos;
- Generan un gran número de productos extracelulares tóxicos para las células (elastinas, aflatoxinas, fumigatoxinas, etc.) [145].

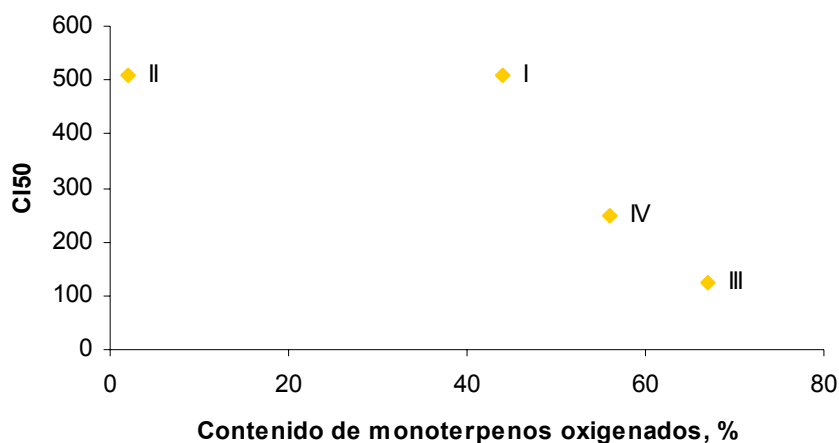
La actividad antifúngica medida contra dos diferentes especies de *Aspergillus*, se ilustra en la **Tabla 25**.

Tabla 25. Concentraciones mínimas inhibitoria, CMI, de AEs estudiados en *Aspergillus flavus* y *Aspergillus fumigatus*. (%v de AE/v de DMSO).

ACEITE ESENCIAL	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Lippia alba</i> , quimiotipo carvona	>500	>500
<i>Lippia alba</i> , quimiotipo citral	500	200±64.55
<i>Phyla (Lippia) dulcis</i>	>500	125
<i>Lippia organoides</i>	200±64.55	<52.13
Itraconazol (Sustancia de referencia)	0.25	0.14±0.08

De los resultados obtenidos, es posible observar la relación existente entre el contenido de monoterpenos oxigenados y la capacidad inhibitoria en especies del género *Aspergillus* (**Figura 48**). La mayor efectividad es obtenida para las esencias que en su composición presentan compuestos fenólicos y aldehídos, debido principalmente, a las interacciones formadas por los hidrógenos de grupos hidroxi y carbonílicos, las cuales permiten inhibir procesos vitales. Sin embargo, la efectividad de ninguno de los aceites esenciales estudiados llega a ser comparable con la actividad de la sustancia de referencia (itraconazol).

Figura 47. Relación del contenido de monoterpenos oxigenados y la concentración mínima inhibitoria en *Aspergillus fumigatus*. I: *L. alba*, quimiotipo Carvona, II: *Phyla (Lippia) dulcis*, III: *L. alba*, quimiotipo Citral, IV: *L. organoides*.



3.4.6 Actividad antibacterial

El Grupo de Polifenoles de la UTP, que forma parte de CENIVAM, desarrolló ensayos microbiológicos contra bacterias gram-negativas, a saber: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Salmonella tiphymurium* ATCC 13311.

Las bacterias gram-negativas se caracterizan por presentar una membrana celular interna la cual se rodea por una pared celular delgada de peptidoglucano y, hacia el lado externo del cuerpo celular una membrana celular externa, que recubre la pared celular en estas bacterias [146], por esta razón, estos microorganismos son ligeramente más resistentes a efectos bactericidas y bacteriostáticos.

Los microorganismos empleados en los ensayos mostraron resistencia a la acción de los AEs de *L. alba*, quimiotipos citral y carvona, y *Phyla (Lippia) dulcis* en las concentraciones ensayadas. De manera particular, *P. aeruginosa* exhibe alta resistencia a numerosos agentes antimicrobiales [147, 148], y fue la única bacteria que presentó resistencia a la acción del aceite de *L. organoides*. Los resultados de inhibición del AE de *Lippia organoides* en el desarrollo de las bacterias ensayadas, se ilustran en la **Tabla 26**.

Tabla 26. Diámetro de inhibición (mm) del aceite esencial de *Lippia organoides* en cepas de bacterianas.

BACTERIA	Amoxicilina 5 µg/µL	Concentración de los AEs, µg/µL		
		100	50	25
<i>Escherichia coli</i> (+)	25.3	15	11	8.7
<i>Staphylococcus aureus</i> (-)	25.3	10.3	7.7	0
<i>Salmonella tiphymurium</i>	25	11.7	10.0	8.3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (-)	15.3	0	0	0

La Amoxicilina, se usó como sustancia de referencia, es un antibiótico de la familia de las penicilinas, efectivo en el tratamiento de enfermedades infecciosas en diferentes partes del organismo.

La actividad mostrada por el aceite de *L. origanoides* en la inhibición *E. coli*, *S. aureus* y *S. tiphymurium*, alcanzan casi el 40 % de la efectividad de la Amoxicilina, para la máxima concentración ensayada.

Estudios previamente descritos, reportaron actividad inhibitoria de estos AEs en el desarrollo de bacterias; el AE de *L. origanoides* inhibió el crecimiento de *S. aureus* y *E.coli* [78], el de *L. alba*, quimiotipo citral, inhibió *S. aureus* y *P. aeruginosa* [50, 149] y el quimiotipo carvona, de esta misma especie, fue efectivo en la inhibición de *S. aureus* [28]. Las diferencias entre los resultados obtenidos pueden deberse entre otros factores, al medio de cultivo, a la técnica de ensayo, la fuente botánica de la planta, su edad, la cantidad de aceite empleado, ya que estos factores pueden implicar grandes variaciones en la determinación de la bioactividad [150].

Los efectos antimicrobiales de los componentes de los AEs, se basan en la habilidad de estos para deteriorar las biomembranas, en concordancia con su lipofilicidad; ésta propiedad les permite atravesar la bicapa lipídica e interactuar con las enzimas, inhibiendo los procesos necesarios para la vida y la reproducción [151]. El orden de actividad de los metabolitos secundarios vegetales disminuye de fenoles a alcoholes, aldehídos, cetonas hasta hidrocarburos [152].

Los aceites esenciales, ricos en compuestos fenólicos, timol y carvacrol han reportado altos niveles de actividad antimicrobial. El carvacrol presente en los AEs les confiere efectos biostáticos y biocidas en bacterias, hongos y levaduras [148, 150].

En adición, los posibles efectos sinérgicos o antagonísticos entre metabolitos presentes en los AEs, pueden afectar la efectividad de algunos compuestos. Así, *e.g.* *cis*- y *trans*- dihidrocarvonas, linalool y *trans*- carveol [148], han mostrado pronunciada actividad antimicrobial, pero el aceite de *L. alba*, quimiotipo carvona, en el cual se encuentran presentes estos metabolitos, fue el menos efectivo de los aceites probados. Adicionalmente, limoneno y α -pineno, han mostrado bajos niveles de actividad antimicrobial [152, 153].

Para muchos AEs, no ha sido posible correlacionar su actividad antibacteriana con el porcentaje de los metabolitos mayoritarios presentes en el aceite, puesto que muchos compuestos que se encuentran a nivel de trazas, pueden jugar un rol decisivo en el momento de determinar la bioactividad, tanto por su acción directa como por el sinergismo.

4. CONCLUSIONES

- El contenido de aceite esencial en las plantas estudiadas varía considerablemente de una especie a otra: *Lippia origanoides* contiene $1.46 \pm 0.05\%$ de esencia, siendo la especie de mayor rendimiento del aceite, seguida de *Lippia alba*, quimiotipo carvona, con $0.97 \pm 0.03\%$, y *Lippia alba*, quimiotipo citral, con $0.4 \pm 0.03\%$; el rendimiento más bajo de aceite esencial lo presenta *Phyla (Lippia) dulcis*, con tan solo $0.129 \pm 0.008\%$.
- Las composiciones químicas de los aceites esenciales de las tres especies estudiadas muestran grandes variaciones: así, para los aceites esenciales de *Lippia alba*, quimiotipo citral y carvona, y *Lippia origanoides*, los monoterpenos oxigenados son los componentes más abundantes (67, 44 y 56%, respectivamente). A su vez, cada AE contiene compuestos oxigenados de diferente naturaleza, a saber: *L. alba*, quimiotipo citral, se caracteriza por un alto porcentaje de aldehídos α, β -insaturados (neral, 19% y geranial, 23%), el aceite de *L. alba*, quimiotipo carvona, contiene cetonas cíclicas en un 38%, principalmente, carvona, piperitenona y piperitona, y el AE de *L. origanoides* está representado por compuestos fenólicos, timol y carvacrol, en 14 y 33 %, respectivamente. El AE de *Phyla (Lippia) dulcis*, se caracterizó por su contenido alto de sesquiterpenos (63%): *trans*- β -cariofileno, δ -cadineno y biciclogermacreno, entre otros. El único compuesto común que se encuentra en todos los AEs, en un porcentaje superior al 0.1%, es el *trans*- β -cariofileno.
- La familia *Verbenaceae* presenta especies con diversidad de quimiotipos, para los cuales la composición química de los aceites esenciales determina sus diferentes aplicaciones. Los dos quimiotipos de *Lippia alba* estudiados en el presente trabajo de investigación, muestran diferencias en cuanto a la

forma de sus hojas y su crecimiento, principalmente; en tanto, que las plantas de *Phyla dulcis* empleadas difieren considerablemente de la descripción morfológica realizada por Compadre [65], para el quimiotipo alcanfor de *Lippia dulcis*.

- Dos quimiotipos de *Lippia dulcis* han sido descritos previamente [60]; en uno de ellos, proveniente de México, el alcanfor fue el metabolito más abundante, el otro quimiotipo fue encontrado en Puerto Rico. En el aceite esencial de este último, se identificó el hernandulcin, un compuesto 1000 veces más dulce que la sacarosa [69]. Las plantas estudiadas en este trabajo, provenientes de Piedecuesta, Santander, se caracterizan por un mínimo contenido de hernandulcin, el cual se identificó en el aceite esencial después de su sililación.
- La efectividad antirradicalaria de los AEs estudiados fue menor que la observada para antioxidantes de referencia, *i.e.* Vitamina E y Trolox[®]. La esencia más activa es la de *Lippia origanoides*, para la cual el EC₅₀ determinado es de 6 mg de AE/mg de DPPH[·] y su cinética fue *ca.* 90 min. Esta capacidad se debe al contenido alto de fenoles en el AE, timol y carvacrol, que constituyen *ca.* 50% del aceite.
- Los compuestos volátiles oxigenados determinan en un alto grado las propiedades funcionales de los aceites esenciales. Los monoterpenos oxigenados son los principales responsables de las notas aromáticas de las esencias, y de su solubilidad en etanol. Los compuestos fenólicos, poseen las mayores efectividades como agentes antirradicalarios y antioxidantes. Dependiendo de su estructura molecular, los compuestos oxigenados ejercen mayor o menor actividad biológica contra hongos, parásitos o bacterias, *e.g.* los aldehídos alifáticos presentan mayores capacidades de inhibición de parásitos que incluso los compuestos

fenólicos. Los datos de actividad biológica de los aceites de la plantas estudiadas se reúnen en la **Tabla 27**.

Tabla 27. Resultados generales de los ensayos y determinaciones realizadas a los aceites esenciales de *Lippia alba*, quimiotipo citral y carvona, *Phyla (Lippia) dulcis* y *Lippia origanoides*.

Planta, Aceite esencial	<i>L. alba</i> , quimiotipo carvona	<i>L. alba</i> , quimiotipo citral	<i>P. (Lippia)</i> <i>dulcis</i>	<i>L.</i> <i>origanoides</i>	
No.voucher, COL (UN, Bogotá)	512079	512075	512078	512077	
Rendimiento AE, %	0.97±0.03	0.4±0.03	0.129±0.008	1.46±0.05	
Propiedades físico-químicas	d, g/mL	0.900	0.894	0.92	0.922
	n _D	1.4987	1.4957	1.5095	1.5143
	α _D ²⁵ , °	(+) 3.48	(-) 4.59	(+) 0.40	(+) 0.05
	Solubilidad, mL de AE/mL solución (80%v/v C ₂ H ₅ OH/H ₂ O)	15	Miscible	Ligeramente soluble	64
Metabolitos mayoritarios	Carvona, limoneno, biciclosesquifelandreno, piperitenona, piperitona, β-bourboneno	Geranial, neral, geraniol, nerol, acetato de geranilo, <i>trans</i> -β-cariofileno	<i>trans</i> -β-cariofileno, δ-cadineno, biciclogeracreno, α-bisabolol, α-copaeno	Timol, carvacrol, γ-terpineno, <i>p</i> -cimeno, <i>trans</i> -β-cariofileno, α-humuleno	
Citotoxicidad en células Vero	Media	Media	Alta	Nula	
Bioactividad	<i>L. chagasi</i>	Baja	Alta	Media	Alta
	<i>Candida</i>	Baja	Baja	Baja	Baja
	<i>Aspergillus</i>	Baja	Baja	Baja	Baja
	<i>E. coli</i>	Nula	Nula	Nula	Media
	<i>S. aureus</i>	Nula	Nula	Nula	Media
	<i>S. tiphymurium</i>	Nula	Nula	Nula	Media
	<i>P. aeruginosa</i>	Nula	Nula	Nula	Nula

- De los resultados obtenidos en el presente estudio, el aceite esencial de *Lippia origanoides* es el más promisorio, a saber: es de mayor rendimiento

de extracción ($1.46 \pm 0.05\%$), miscible con soluciones acuosas de etanol al 80% (v/v), lo que lo hace apto en la formulación de perfumes, fragancias y productos cosméticos; es el antioxidante natural más efectivo, presentando un EC_{50} de 6 mg de AE/ mg de DPPH; no mostró toxicidad en células Vero, fue activo inhibiendo el desarrollo de hongos de los géneros *Aspergillus* y *Candida*, promastigotes de *Leishmania chagasi*, y algunas bacterias incluyendo, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Salmonella typhimurium* ATCC 13311. Por lo que, su aplicación como conservante de alimentos y en la formulación de fitofármacos podría recomendarse.

5. RECOMENDACIONES

- Desarrollar ensayos de actividad antioxidante por metodologías de peroxidación lipídica u otras diferentes de atrapamiento radicalario, para aceites esenciales que en su composición contengan cantidades muy pequeñas de compuestos fenólicos, e.g. *Phyla (Lippia) dulcis* y *Lippia alba*, quimiotipo citral.
- Los aceites esenciales ricos en compuestos fenólicos presentan potenciales aplicaciones como antioxidantes y como agentes preservantes. El aceite esencial de *Lippia organoides* contiene ca. 50% de compuestos fenólicos y buen rendimiento de extracción (ca. 1.5%). Su composición es similar a la de los aceites ya posicionados en el mercado internacional, tales como aceites de orégano y tomillo. Por tal razón, se requieren estudios enfocados hacia la evaluación de la factibilidad comercial de la obtención industrial de estos aceites.
- Las plantas de *Phyla (Lippia) dulcis*, contienen en su composición metabolitos con alto potencial antirradicalario, los cuales probablemente sufren descomposición térmica durante su extracción y análisis. Por tal razón, es necesario aislar los metabolitos, entre ellos el hernandulcin, aplicando metodologías que no involucren temperaturas altas, como es el caso de la extracción con fluido supercrítico (SFE). De igual forma, para evitar la descomposición de estos analitos en el puerto de inyección de GC, se recomienda realizar inyección *on-column*, tanto de muestras del AE, como del extracto, así como pruebas de bioactividad del extracto, para comparar el efecto del método de extracción sobre la composición y la actividad biológica.

- Los resultados de actividad biológica variaron de una especie a otra, siendo promisorios los AEs de *L. alba*, quimiotipo citral, y *L. origanoides*, mezclas con abundante contenido de aldehídos α,β -insaturados y derivados fenólicos, respectivamente. Mientras, la actividad de los aceites con alto contenido de cetonas cíclicas (*L. alba*, quimiotipo carvona) y sesquiterpenos [*Phyla (Lippia) dulcis*], fue baja, incluso presentando toxicidad. Por tal razón, se sugiere desarrollar ensayos de actividad biológica para patrones de los metabolitos mayoritarios de cada uno de los aceites, a saber: citral, timol, carvona y *trans*- β -cariofileno, con el fin identificar el impacto de éstos sobre la actividad de los AEs ensayados.

BIBLIOGRAFÍA

1. BANDONI, A. (Ed), Los recursos vegetales aromáticos en latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores, 1ª edición, Argentina, La Plata, **2000**, p.p. 29-43, 94-96, 149-171, 197-232.
2. SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANDREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R., Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in food, *Food Chem.*, **2005**, 91, p.p. 621-632.
3. SMITH, R.L.; COHEN, S.M.; DOULL, J; FERON, V.J.; GOODMAN, J.I.; MARNETT, L.J.; PORTOGHESE, P.S.; WADDELL, W.J.; HALL, R.L.; HIGLEY, N.A.; LUCAS-GAVIN, C.; ADAMS, T.B., A procedure for the safety evaluation of natural flavor complexes used as ingredients in food: essential oils, *Food Chem. Toxicol.*, **2005**, 43, p.p. 345-363.
4. JARAMILLO, B.E.; Estudio de la actividad antioxidante *in vitro* de aceites esenciales de plantas tropicales y compuestos nitrogenados sintéticos, Tesis de grado (Doctorado en química), **2004**, p.p. 55-58, 86-88.
5. RAMOS, A.; VISOZO, A.; PILOTO, J.; GARCÍA, A.; RODRÍGUEZ, C.A.; RIVERO, R., Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants, *J. Ethnopharm.*, **2003**, 87, p.p. 241-246.
6. STASHENKO, E.E.; JARAMILLO, B.E.; MARTÍNEZ, J.R., Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its *in vitro* antioxidant activity, *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1025, p.p. 93-103.
7. BURT, S., Essential oils. Their antibacterial properties and potencial applications in food- a review, *Int. J. Food Microbiol.*, **2004**, 94, p.p. 223-253.

8. PAULI, A.; Antimicrobial properties of essential oil constituents, *Int. J. Aromather.*, **2001**, 11:(3) p.p.126-133.
9. KULISIC. T.; RADONIC. A.; KATALINIC, V., MILOS, M.; Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil, *Food Chem.*, **2004**, 85, p.p. 633-640.
- 10.VALE, T.G.; FURTADO, E.C.; SANTOS, K.G.; VIANA, G.S.B., Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, *Phytomed.*, **2002**, 9, p.p. 709-714.
- 11.GUERRERO, M.F.; PUEBLA, P.; CARRON, R.; MARTIN, M.L.; ARTEAGA, L; SAN ROMAN, L., Assessment of the antihypertensive and vasodilator effects of ethanolic extracts of some Colombian medicinal plants, *J. Ethnopharm.*, **2002**, 80, p.p. 37-42.
- 12.PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SANCHEZ, D., and VILLAR, A., *Lippia*: Traditional uses, chemistry and pharmacology: a review, *J. Ethnopharm.*, **2001**, 76, p.p. 204-214.
- 13.http://lunazul.ucaldas.edu.co/download/cd41ee01Revista2_4.pdf. [Citada el 3 de enero de 2007].
- 14.GARCIA BARRIGA, H., Flora medicinal de Colombia. Tomo II, Tercer Mundo Editores, Bogotá, **1992**, p.p. 506-507.
- 15.Estudio del mercado nacional de los aceites esenciales, **2003**, Biocomercio sostenible, Instituto de Investigación de Recursos Biológicos "Alexander von Humbolt"
- 16.LEMOS, T. L. G.; MATOS, F. J. A.; AJENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; McCHESNEY, J. D., Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants, *Phytother. Res.*, **1990**, 4, p.p. 32-84.
- 17.MWANGI, J. W.; ADDAE-MENSAH, I.; MURIUKI, G.; MUNAVU, R.; LWANDE, W.; HASSANALI, A., Essential oils of *Lippia* species in Kenya.

- IV. Maize weevil (*Sitophilus zeamais*) repellency and larvicidal activity. *Int. J. Pharmacogn.*, **1992**, 30, p.p. 9-16.
- 18.** GUPTA, P. M., 270 Plantas medicinales iberoamericanas, Santa Fé de Bogotá, Colombia, **1995**, 617p.
- 19.** GUERRERA, P.M.; LEPORATTI, M.L.; FODDAI, S.; MORETTO, D., and MERCANTINI, R., "Antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia citriodora* Kunth. (*Aloysia triphylla* Britton)". *Rev. Italiana EPPOS.*, **1995**, 15, p.p. 23-25.
- 20.** DEENA, M.J. and THOPPIL, J.E., Antimicrobial activity of the essential oil of *Lantana camara*, *Fitoterapia*, **2000**, 71, p.p. 453-455.
- 21.** WÄCHTER, R.G.A.; VALCIC, S.; FRANZBLAU, S.G.; SUAREZ, E.; TIMMERMANN, B.N., Antitubercular activity of triterpenoids from *Lippia turbinata*, *J. Nat. Prod.*, **2001**, 64, p.p. 37-41.
- 22.** CRAVEIRO, A.A.; ALENCAR, J.W.; MATOS, F.J.A.; ANDRADE, C.H.S.; MACHADO, M.I.L., Essential oils from Brazilian Verbenaceae genus *Lippia*, *J. Nat. Prod.*, **1981**, 44, p.p. 598-601.
- 23.** TERBLANCHÉ, F.C.; KORNELIUS, G., Essential oil constituents of Genus *Lippia* (Verbenaceae) – A literature review, *J. Essent. Oil Res.*, **1996**, 8, p.p. 471-485.
- 24.** COMBARIZA, M. Y.; BLANCO, C.; STASHENKO, E. E.; SHIBAMOTO, T., Limonene concentration in lemon (*Citrus volcameriana*) peel oil as a function of ripeness, *J. High Resol. Chromatogr.*, **1994**, 17, p.p. 643-646.
- 25.** HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; DERMONT, C.; JOSEPH, H.; BAILLEUL, F., The essential oil of *Lippia alba*: analysis of samples from french overseas departementes and review of previous works, *Chem. Biodiv.*, **2006**, 3, p.p.1116-1125.
- 26.** LECLERCQ, P.A.; HIDALGO, J.E.; CERRUTTI, T.; MESTANZA, M.; RIOS, F.; NINA, E., *et al.*, Aromatic plant oils of the Peruvian Amazon. Part 1.

- Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. and *Cornutia odorata* (Poeppig) Poeppig ex Schauer, *J. Essent. Oil Res.*, **1999**, 11:(6), p.p. 753-756.
27. PINO, J. A.; ORTEGA, A. G.; PÉREZ, A.; RODRÍGUEZ, M.; BALUJA, R., Composición y propiedades del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown, *Rev. Cub. Farm.*, **1997**, 30:(1) 30p.
28. PINO, J.A.; ORTEGA, A.; ROSADO, A., Chemical composition of the essential oil of *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown from Cuba, *J. Essent. Oil Res.*, **1996**, 8:(4), p.p. 445-446.
29. MATOS, F.J.D.A.; MACHADO, M.I.L.; CRAVEIRO, A.A.; ALENCAR, J.W.; Essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in Northeast Brazil, *J. Essent. Oil Res.*, **1996**, 8:(6), p.p. 695-698.
30. SENATORE, F. y RIGAND, D., Essential oil of two *Lippia* spp. (Verbenaceae) growing wild in Guatemala, *Flav. Fragr. J.*, **2001**, 16, p.p. 169-171.
31. FRIGHETTO, N.; OLIVEIRA, J. G.; SIANI, A. C.; CHAGAS, K. C., *Lippia alba* Mill N. E. Br (Verbenaceae) as a source of linalool, *J. Essent. Oil Res.*, **1998**, 10, p.p. 578-580.
32. BAHL, J.R.; GARG, S.N.; SINGH, S.C., BANSAL, R.P.; NAQVI, A.A.; KUMAR, S., Composition of linalool rich essential oil from *Lippia alba* grown in Indian plants, *Flav. Fragr. J.*, **2000**, 15, p.p.199-200.
33. LORENZO, D.; PAZ, D.; DAVIES, P.; VILA, R.; CAÑIFUERAL, S.; DELLACASSA, E., Composition of a new essential oil type of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown from Uruguay, *Flav. Fragr. J.*, **2001**, 16, p.p. 356-359.
34. ZOGHBI; M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; SANTOS, A. S.; SILVA, M. H. L.; MAIA, J. G. S., Essential oils of *Lippia alba* (Mill) N. E. Br. Grown Wild in the Brazilian Amazon, *Flav. Fragr. J.*, **1995**, 13, p.p. 47-48.
35. RICCIARDI, G.A.L.; VEGLIA, J.F.; RICCIARDI, A.I.A.; BANDONI, A.L.; Examen comparado de la composición de los Aceites Esenciales de especies autóctonas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br., *Comunicaciones*

científicas y tecnológicas, Universidad Nacional de Nordeste, Corrientes, 1999, 8, p.p.103-106.

36. SINGH, G.; PANDEY, S.K.; LECLERCQ, P.A.; SPERKOVA, J., Studies on essential oils. Part 15. GC-MS analysis of chemical constituents of leaf oil of *Lippia alba* (Mill) from North India, *J. Essent. Oil Res.*, **1999**, 11:(2), p.p. 206-208.
37. GOMES, E.C.; MING, L.C.; MOREIRA, E.A.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D.; KERBER, V.A.; CONTIN, A.; FILHO, A.W., *Rev. Bras. Farm.*, **1993**, 74, 29 p.
38. DELLACASA, E.; SOLER, E.; MENENDEZ, P.; MOYNA, P, *Flav. Frag. J.*, **1990**, 5, 106 p.,
39. TUCKER, A.O.; MACIARELLO, M.J., Volatile leaf oil of the “licorice verbena” [*Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown ex Britton and P. Wils. Var. *carterae* Moldenke] from the North American herb trade, *J. Essent. Oil Res.*, **1999**, 11:(3), p.p. 314-316.
40. STASHENKO, E.E., MARTÍNEZ, J.R.; DURÁN, D.C., MONSALVE, A.; CELIS, C.N.; GÓMEZ, G., Estudio comparativo del aceite esencial de *Lippia alba* proveniente de diferentes regiones de Colombia, XIV Congreso Colombiano de Química, Armenia (Colombia), Poster, **2006**, 17-19 de mayo.
41. GUILLIARD, W.; DELGADO, W.; MARTINEZ, J.R.; STASHENKO, E.E.; Determination of the enantiomeric purity of Carvona, Main component of Colombian *Lippia alba* (Mill) oil by means of bidimensional gas chromatography. VIII Latinamerican Chromatography Congreso, COLACRO VIII, Buenos Aires, Argentina, **2000**.
42. STASHENKO, E.E.; MARTÍNEZ, J.R.; DURÁN, D.C.; MONSALVE, A.; CELIS, C.N.; GÓMEZ, G., Comparative study of composition and biological activity of essential oils of *Lippia alba*, growing in different

regions of Colombia, International Congress on Analytical Sciences, Moscú, Poster, **2006**, 25-30 de junio.

- 43.** COSTA, M.; DI STASI, L. C.; KIRIZAWA, M.; MENDACOLLI, S. L.; GOMES, C.; TROLI, G., Screening in mice of some medicinal plants used for analgesic purposes in the State of São Paulo. Part II, *J. Ethnopharm.*, **1989**, 27, p.p. 25-33.
- 44.** CACERES, A.; ÁLVAREZ, A. V.; OVANDO, A. E.; SAMAYOA, B. E., Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. Screening of 68 plants against Gram-positive bacteria, *J. Ethnopharm.*, **1991**, 31, p.p. 193-208.
- 45.** ABAD, M. J.; SÁNCHEZ, S.; BERMEJO, P.; VILLAR, A.; CARRASCO, L., Antiviral activity of some medicinal plants, *Methods and Findings*, **1995**, 17 (Suppl. A), 108p.
- 46.** ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C.R.; SINCERO, T.C.M.; DA SILVA, A.C.; SAVI, L.A.; GAIDO, C.M.; BETTEGA, J.M.R.; MANCINI, M.; BARARDI, C.R.M.; SIMÕES, C.M.O., Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest, *Fitoterapia*, **2005**, 26, p.p. 374-378.
- 47.** LÓPEZ, A.A.M.; ROJAS, H.N.M.; JIMIÉZ, M.C.A., Plants extracts with cytostatic properties growing in Cuba, *Rev. Cubana Med. Trop.*, **1979**, 31, p.p. 105-111.
- 48.** GAZOLA, R.; MACHADO, D.; RUGGIERO, C.; SINGI, G.; MACEDO, M.A.; *Lippia alba*, *Melissa officinalis* and *Cymbopogon citratus*: effects of the aqueous extracts on the isolated hearts of rats, *Pharmacol. Res.*, **2004**, 50, p.p. 477-480.
- 49.** ABENA, A. A.; NGONDZO-KOMBEM, G. R.; BIOKA, D.; Psychopharmacologic properties of *Lippia multiflora*, *Encephale*, **1998**, 24, p.p. 449-454.
- 50.** OLIVEIRA, D.R.; LEITÃO, G.G.; SANTOS, S.S.; BIZZO, H.R.; LOPES, D.; ALVIANO, C.S.; ALVIANO, D.S.; LEITÃO, S.G., Ethnopharmacological

study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil, *J. Ethnopharm.*; **2006**; 108:(1), p.p. 103-108.

51. ZETOLA, M.; DE LIMA, T.C.M.; SONAGLIO, D.; GONZALEZ, G., LIMBERGER, R.P.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L., CNS activities liquid and spray-dried extracts from *Lippia alba*- Verbenaceae (Brazilian *False Melissa*), *J. Ethnopharm.*, **2002**, 82, p.p. 207-215.
52. VIANA, G.S.B.; VALE, T.G.; RAO, V.S.N.; MATOS, F.J.A., Analgesic and antiinflammatory effects of two chemotypes of *Lippia alba*: A comparative study, *Pharm. Biol.*, **1998**, 16:(5), p.p. 347-351.
53. VALE, T.G.; MATOS, F.J.A.; DE LIMA, T.C.M.; VIANA, G.S.B., Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown chemotypes. *J. Ethnopharm.*, **1997**, 67, p.p. 127-133.
54. TEIXEIRA, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V.L.G.; DETARMELENA, C., Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants, *J. Ethnopharm.*, **2005**, 92, p.p. 305-311.
55. STASHENKO, E.E.; JARAMILLO, B.E.; MARTÍNEZ, J.R., Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in Vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae, *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, **2003**, 27:(105), p.p. 579-597.
56. JORGENSEN, P.M.; LEON-YAÑEZ, S., Catalogue of the vascular plants of Ecuador, Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden; 75: i--viii, 1--1182.
57. STEVENS, W.D.; ULLOA, U.; POOL, A.; MONTIEL, O.M., Flora de Nicaragua, Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, 85: i--xlii, 1--2666.
58. COMPADRE, C. M.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D.; KAMATH, S. K., Hernandulcin: an intensely sweet compound discovered by review of ancient literature, *Science*, **1985**, 227, p.p. 417-419.

59. MORI, K.; KATO, M., Synthesis and absolute configuration of (+)-hernandulcin, a new sesquiterpene with intensely sweet taste, *Tetr. Lett.*, **1986**, 27, p.p. 981-982.
60. SOUTO, F. A.; DE JESUS, M.; CARDENAS, O. E.; ACUÑA, M. F.; MELENDEZ, P. A., and ROMERO, L., Terpenoid composition of *Lippia dulcis*, *Phytochem.*, **1997**, 44, p.p. 1077-1086.
61. ABE, F.; NAGAO, T.; OKABE, H., Antiproliferative Constituents in Plants 9. Aerial Parts of *Lippia dulcis* and *Lippia canescens*, *Biol. Pharm. Bull.*, **2002**, 25:(7), p.p. 920-922.
62. KANEDA, N.; LEE, I. S.; GUPTA, M. P.; SOEJARTO, D. D.; KINGHORN, D., (+)-4 β -Hernandulcin, a new sweet sesquiterpene from the leaves and flowers of *Lippia dulcis*, *J. Nat. Prod.*, **1992**, 55, p.p. 1136-1141.
63. KINGHORN, A.D.; COMPADRE, C.M.; PEZZUTO, J.M.; U.S. Patent No. 4,808,409, Feb. 28, 1989.
64. ONO, M.; MORINAGA, H.; MASUOKA, C.; IKEDA, T.; OKAWA, M.; KINJO, J.; NOHARA, T., New bisabolane type sesquiterpenes from the Aerial Partes of *Lippia dulcis*, *Chem. Pharm. Bull.*, **2005**, 53:(9), p.p.1175-1177.
65. COMPADRE, C. M.; ROBBINS, E. F.; KINGHORN, D., The intensely sweet herb, *Lippia dulcis* Trev.: Historical uses, field inquiries, and constituents, *J. Ethnopharm.*, **1986**, 15, p.p. 89-106.
66. KINGHORN, A.D.; SOEJARTO, D.D., New highly sweet plant-derived terpenoids and phenols, *Pure Appl. Chem.*, **2002**, 74, p.p. 1169-1179.
67. ROJAS, L.B.; USUBILLAGA, A.; CEGARRA, J.A.; BORREGALES, E.; CARRERO, S., Composición Química y Actividad Antimicótica de el Aceite Esencial de la *Lepechinia schiedeana* (Schlecht)Vatke, *REVISTA DE LA FACULTAD DE FARMACIA*, **2004**, 46:(1), p.p. 27-30.
68. [http://www.portalfarma.com/pfarma/taxonomia/general/gp000011.nsf/voDocuments/BF0ED8889267BF7FC1256B670057FB4F/\\$File/MELISA.htm](http://www.portalfarma.com/pfarma/taxonomia/general/gp000011.nsf/voDocuments/BF0ED8889267BF7FC1256B670057FB4F/$File/MELISA.htm)
[Citado el 29 de enero de 2007].

69. COMPADRE, C.M.; HUSSAIN, R.A.; LOPEZ, R.L.C.; PEZZUTO, J.M.; KINGHORN, A.D., The intensely sweet sesquiterpene hernandulcin: isolation, synthesis, characterization, and preliminary safety evaluation, *J. Agric. Food Chem.*, **1987**, 35, p.p.273-279.
70. CACERES, A.; FLETES, L.; AGUILAR, L.; RAMIREZ, O.; FIGUEROA, L.; TARACENA, A. M.; SAMAYOA, B., Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 3. Confirmation of activity against enterobacteria of 16 plants, *J. Ethnopharm.*, **1993**, 38, p.p. 31-38.
71. GUEVARA, J.M.; CHUMPITAZ, J.; VALENCIA, E., The *in vitro* activity of plants on *Vibro cholera*, *Rev. de Gastroenter.*, **1992**, 14, p.p. 27-31.
72. PÉREZ, S.; MECKES, M.; PÉREZ C.; SUSUNAGA, A.; ZAVALA, M.A., Anti-inflammatory activity of *Lippia dulcis*, *J. Ethnopharm.*, **2005**, 102, p.p. 1-4.
73. DOS SANTOS, F.; LOPES, A.; CITO, A.M., Composition and biological activity of essential oils from *Lippia organoides* H.B.K., *J. Essent. Oil Res.*, **2004**, 16, p.p. 504-506.
74. POULOSE, A. J.; CROTEAR. R., Biosynthesis of aromatic monoterpenes. Conversion of γ -terpinene to *p*-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L., *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1978**, 187, p.p. 307-314.
75. MORTON, Atlas of medicinal plants of Middle América, Vol I, Springfield, Illinois, **1981**, p.p. 745-750.
76. GALLINO, M., Una Verbenaceae essenziera ricca en timolo: *Lippia organoides* H.B.K., *Essen. Deriv. Agrum.*, **1987**, 57, p.p. 628-629.
77. VELASCO-NEGUERUELA, A., PEREZ-ALONSO, M.J., Volatile constituents of four *Lippia* species from Córdoba (Argentina). *J. Essent. Oil Res.*, **1993**, 5, p.p. 513-524.
78. OLIVEIRA, D.R.; LEITÃO, G.G.; BIZZO, H.R.; LOPES, D.; ALVIANO, D.S.; ALVIANO, C.S.; LEITÃO, S.G., Chemical and antimicrobial analices of essential oil of *Lippia oiganoides* H.B.K., *Food Chem.*, **2007**, 101, p.p. 236-240.

79. AESCHEBACH, T., LOLIGER, J., SCOTT, B.C., MURCIA, A., BUTLER, J., HALLIWELL, B., ARUOMA, O.I., Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol, *Food Chem. Tox.*, **1994**, 32:(1), p.p. 31-36.
80. DE VINCENZI, M.; STAMMATI, A.; DE VINCENZZI, A.; SILANO, M., Constituents of aromatic plants: carvacrol, *Fitoterapia*, **2004**, 75, p.p. 801-804.
81. YANISHLIEVA, N.V.; MARINOVA, E.M.; GORDON, M.H.; RANEVA, V.G., Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems, *Food Chem.*, **1999**, 64, p.p. 59-66.
82. BRAGA, P.C.; DAL SASSO, M.; CULICI, M.; GALASTRI, L.; MARCECA, M.T.; GUFFANTI, E.E., Antioxidant potential of thymol determined by chemiluminescence inhibition in human neutrophils and cell-free systems, *Pharmacol.*, **2006**, 76:(2), p.p. 61-68.
83. PUERTAS, M.A., HILLEBRAND, E.; STASHENKO, E.E.; WINTERHALTER, P., *In vitro* radical Scavenging Activity of Essential Oils from Columbian plants and Fractions from Oregano (*Origanum vulgare* L.) Essential Oil, *Flav. Fragr. J.*, **2002**, 17, p.p. 380-384.
84. TAIZ, L.; ZEIGER, E., *Plant Physiology*, 3^a ed., Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts, EE.UU., **2002**, p.p.283-307.
85. AZCÓN, J., y TALÓN, M. *Fundamentos de fisiología vegetal*. 1^a Ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid: **2000**, 261 p.
86. GODEFROOT, M.; SANDRA, P.; VERZELE, M, New method for quantitative essential oil analysis, *J. Chromatogr.*, **1981**, 203, p.p. 325-335.
87. STASHENKO, E.E.; CERVANTES, M.; COMBARIZA, Y; FUENTES, H.; MARTINEZ, J.R., HRGC/FID and HRGC/MSD análisis of the secondary metabolites obtained by different extraction methods from *Lepechinia*

- schiedeana*, and *in vitro* evaluation of its antioxidant activity, *J. High. Resolut. Chromatogr.*, **1999**, 22:(6), p.p. 343-349
- 88.** BRAGA, M.E.M.; EHLERT, P.A.D.; MING, K.C.; MEIRELES, M.A.A.; Supercritical fluid extraction from *Lippia alba*: global yields, kinetic data, and extract chemical composition, *J. Supercrit. Fluids*, **2005**, 34, p.p. 149-156.
- 89.** STASHENKO, E. E.; MARTINEZ, J. R.; MACKU, C.; SHIBAMOTO, T.; HRGC and GC-MS analisis of essential oil from Colombian ylang-ylang, *J. High Resotl. Chromatogr.*, **1993**, 16, p.p. 441-444
- 90.** DURÁN, D.C., Estudio del aceite esencial de *Lippia alba* (Verbenaceae) y de los aspectos fisiológicos en diferentes etapas de su crecimiento bajo tres niveles de luz, Tesis de grado (Química), Universidad Industrial de Santander, **2005**, p.p.22-25.
- 91.** BLANCO, C.T.; STASHENKO, E.E.; COMBARIZA, M.Y.; MARTINEZ, J.R., Comparative study of Colombian citrus oils by high-resolution gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **1995**, 697, p.p. 501-513.
- 92.** STASHENKO, E.E.; COMBARIZA, Y. PUERTAS, M.A., Aceites esenciales: técnicas de extracción y análisis. Laboratorio de Fitoquímica, Bucaramanga, Colombia, **1998**, 30p.
- 93.** GÓMEZ, N.E.; WITTE, L.; A simple method to extract essential oils from tissue samples by using microwave radiation, *J. Chem. Ecol.*, **2001**, 27:(11), p.p. 2351-2359.
- 94.** FERHAT, M.A.; MEKLATI, B.Y.; SMADJA, J.; CHEMAT, F., An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel, *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1112, p.p. 121-126.
- 95.** PARÉ, J. R. J.; BEANGER, J. M. R. , Microwave-asisted process (MAPTM): A new tool for the analytical laboratory, *TrAC*, **1993**, 13, p.p. 176-184.

- 96.** PARÉ, J. R. J., Microwave extraction of volatile oil and apparatus therefore, U.S. Patent Ep 0485668 A1, **1992**.
- 97.** CBI MARKET SURVEY, THE MARKET FOR NATURAL INGREDIENTS FOR COSMETICS IN THE EU, [Citada en Octubre de 2006] http://www.cbi.nl/show.php?file=marketinforesults.htm&action_ p.p. 22. 31-32.
- 98.** Análisis de la tendencia del mercado internacional de aceites esenciales. Informe mensual de la Fundación Exportar. Secretaría de Comercio y Relaciones Económicas Internacionales, **2002**, 24 p.
- 99.** CBI EU MARKET BRIEF 2005, ESSENTIAL OILS, November 2005. [Citada en octubre de 2006] http://www.cbi.nl/show.php?file=marketinforesults.htm&action_ p.p. 3-7, 13-14.
- 100.** Market Brief in the European Union for selected natural ingredients derived from native species: *Lippia alba*, Prontoalivio, Erva cidreira, juanilama, Melissa, United Nation Conference on Trade and Development, 2005.
- 101.** DOMÍNGUEZ, X.A., Métodos de investigación fitoquímica, Ed. Limusa, México, **1988**, 232 p.
- 102.** SCHREIER, P., Chromatographic studies of biogenesis of plant volatiles, Chromatographic Methods, Sr. Alfred Hüthig Verlag, New York, **1984**.
- 103.** JENNINGS, W., Analytical Gas Chromatography. Academic Press: San Diego, **1987**, 259 p.
- 104.** POOLE, C. F., and POOLE S. K., Chromatography Today. Elsevier: Amsterdam **1991**. 1026 p.
- 105.** SCHULZ, H.; ÖZKAN, G.; BARANSKA, M.; KRÜGER, H.; OZCAN, M, Characterisation of essential oil plants from Turkey by IR and Raman spectroscopy, *Vibr. Spectr.*, **2005**, 39:(2), p.p. 249-256.

- 106.** ADAMS, R.P., Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy, Ed. Allured Publishing Corporation, Illinois, **2004**, 469p.
- 107.** BLAU, K.; HALKET, J.M., Handbook of derivatives for chromatography, Ed. John Wiley & sons, Chichester, **1997**, p.p. 51-100
- 108.** YU, J.; FLAGAN, R.C.; SEINFELD, J.H., Identification of products containing –COOH, –OH, and –C=O in atmospheric oxidation of hydrocarbons, *Environ. Sci. Technol.*, **1998**, 32:(16), p.p. 2357-2370.
- 109.** PROESTOS, C.; SERELI, D.; KOMAITIS, M., Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS, *Food Chem.*, **2006**, 95, p.p. 44-52.
- 110.** MADHAVI, D.L.; DESHPANDE, S.S.; SALUNKHE, D.K., Food Antioxidants, Technological, Toxicological and Health Perspectives, Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, **1996**, p.p. 1-75.
- 111.** CRYSTAL, T. AND RAMON, J., GSH System glutation: eje de la defensa antioxidante, Excepta Médica, Amsterdam, **1992**, 202 p.
- 112.** POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M., Antioxidants in food, CRC Press. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, **2001**, pp. 1-17.
- 113.** FRANKEL, E. N., Volatile lipid oxidation products, *Prog. Lip. Res.*, **1982**, 22, p.p.1-33.
- 114.** RODRIGUEZ, J. M.; MENENDEZ, J. R.; TRUJILLO, Y., Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo, *Rev. Cub. Med. Milit.*, **2001**, 30, p.p. 36-44.
- 115.** FRANKEL, E. N.; Review. Recent advances in lipid oxidation, *J. Sci. Food Agric.*, **1991**, p.p. 495-511.
- 116.** MIYAKE, T.; SHIBAMOTO, T., Antioxidative Activities of Natural Compounds Found in Plants, *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, 45, p.p. 1819-1822.

117. YAMAGUCHI, T.; TAKAMURA, H.; MATOBA, T.; TERAOKA, J., HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **1998**, 62:(6), p.p. 1201-1204.
118. SOARES, D.G., ANDREAZZA, A.C.; SALVADOR, M., Sequestering Ability of Butylated Hydroxytoluene, Propyl Gallate, Resveratrol, and Vitamins C and E against ABTS, DPPH, and Hydroxyl Free Radicals in Chemical and Biological Systems. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, p.p. 1077-1080.
119. DA PORTO, C.; CALLIGARIS, S.; CELOTTI, E.; NICOLI, M.C., Antiradical Properties of Commercial Cognacs Assessed by the DPPH-Test, *J. agric. Food Chem.*, **2000**, 48, p.p. 4241-4245.
120. RE, R.; PELLIGRINI, N.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C., Antioxidant activity applying and improved ABTS⁺ radical-cation decolorization assay, *Free Rad. Biol. Med.*, **1999**, 16, p.p. 1231-1237.
121. BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C., Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Food Sci. Technol. Int.*, **1995**, 28, p.p. 25-30.
122. SCHLESIER, K.; HARWAT, M.; BÖHM, V.; BITSCH, R., Assessment of antioxidant activity by using different *in Vitro* methods, *Free Rad. Res.*, **2002**, 36 : (2), p.p. 177-187.
123. JIROVETZ, L., Chemical composition, antimicrobial activities and odor descriptions of some essential oils with characteristic floral-rosy scent. *Recent Res. Devel. Agron. Horticult.*, **2006**, 2, p.p 1-12.
124. KJELDSEN, F., CHRISTENSEN, L, and EDELENBOS, M. Changes in volatiles compounds of carrots (*Daucus carota L.*) during refrigerated and frozen storage. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, p.p. 5400-5407.

125. <http://www.leffingwell.com/chirality/chirality.htm> [Consultado el 6 de diciembre de 2006].
126. <http://www.nysaes.cornell.edu/flavornet/chem.html> [Consultado el 13 de enero de 2007].
127. <http://www.flavornet.org> [Consultado el 13 de enero de 2007].
128. VERSTEGEN, A., SWARTS, H., CANSEN, B. and GROOT, A., Total synthesis of (-)-Ambrox from S(+)-Carvone (Part 6). *Tetr.*, **1994**, 50, p.p. 10095-10097.
129. HARBORNE, J.B.; BAXTER, H., *Phytochemical dictionary, A handbook of bioactive compounds from plants*, Taylor & Francis, London, **1993**, 2042 p.
130. TERHUNE, J., HOGG, W., LAWRENC, M., Bicyclosesquiphellandrene and L-epibicyclosesquiphellandrene: two new dienes based on the cadalene skeleton, *Phytochem.*, **1974**, 13, p.p. 1183-1185.
131. OLADIMEJI, F.A.; ORAFIDIYA, L.O.; OKEKE, I.N., Physical properties and antimicrobial activities of leaf essential oil of *Lippia multiflora* Moldenke, *Int. J. Aromather.*, **2004**, 14, p.p. 162-168.
132. GÜENTHER, E. *The Essential Oils. Volume I: History – Origin in plants production – Analysis*, Litton Educational, New York, **1948**, p.p. 241–244.
133. TAVARES, E.S.; JULIÃO, L.S.; LOPES, D.; BIZZO, H.R.; LAGE, C.L.S.; LEITÃO, S.G.; Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes; *Revista Brasileira de Farmacognosia*; 2005; 15(1); pp. 1-5.
134. ROSSITE, K.J., Structure-odor relationships, *Chem. Rev.*, **1996**, 96, p.p. 3201-3240.
135. LIU, R.; ZHAO, F.; FUJITA, S.; ARAI, M., Selective hydrogenation of citral with transition metal complexes in supercritical carbon dioxide, *Appl. Cat. A, General*, **2007**, 316, p.p. 127–133.

- 136.** NICKAVAR, B.; MOJAB, F.; DOLAT-ABADI, R., Analysis of the essential oils of two *Thymus* species from Iran, *Food Chem.*, **2005**, 90, p.p. 609–611.
- 137.** NENADIS, N.; WANG, L.F.; TSIMIDOU, M.; ZHANG, H.Y., Estimation of Scavenging Activity of Phenolic Compounds Using the ABTS+· Assay, *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, p.p. 4669-4674.
- 138.** KIKUGAWA, K.; KUNUGI, A.; KURECHI, T., Natural antioxidants exploited commercially, En: HUDSON, B.J.F. (Ed.) *Food Antioxidants*, Essex: Elsevier Applied Science, **1990**, p.p. 65-98. citado por: BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C., Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Food Sci. Technol.*, **1995**, 28, p.p. 25-30.
- 139.** CHOI, H.S.; SONG, H.S.; UKEDA, H.; SAWAMURA, M., Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, p.p. 4156-4161.
- 140.** LITWINIENKO, G. AND INGOLD, K.U., Abnormal Solvent Effects on Hydrogen Atom Abstractions. The Reactions of Phenols with 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (dpph·) in Alcohols, *J. Org. Chem.*, **2003**, 68, p.p.3433-3438.
- 141.** HOGG, J.S.; LOHMANN, D.H. and RUSSELL, K.E., The Kinetics Of Reaction Of 2,2-diphenyl-1-Picrylhydrazyl With Phenols, *Can. J. Chem.*, **1961**, 39, p.p. 1588-1594.
- 142.** HELANDER, I.M.; ALAKOMI, H.L.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POL, I.; SMID, E.J.; GORRIS, L.G.M.; WRIGHT, A., Characterization of the Action of Selected essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria, *J. Agric. Food Chem.*, **1998**, 46, p.p. 3590-3595.

143. BROWN, J.T.; HEGALY, P.K. and CHARLWOOD, B.V., Mono- and Sesquiterpene biosynthesis in plant cells in culture. Part 4. The toxicity of monoterpenes to plant cell cultures, *Plant Sci.*, **1987**, 48, p.p. 195-201.
144. http://www.vetjg.com/shared/php/page.php?page=artic_leishmaniosis_etiologia [Citado 29 de enero de 2007]
145. <http://sameens.dia.uned.es/Trabajos3/T1A/MorcilloRubioMP/Agente.htm#fumigatus> [Consultado el 2 de enero 2007].
146. CAMPBELL, M.K., FARREL, S.O., *Bioquímica*, 4º ed., Thomson, México, **2004**, 454 p.
147. SIVROPOULOU, A.; PAPANIKOLAOU, E.; NIKOLAOU, C.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M., Antimicrobial and Cytotoxic Activities of *Origanum* Essential Oils, *J. Agric. Food Chem.*, **1996**, 44, p.p. 1202-1205.
148. SIVROPOULOU, A.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. Antimicrobial activity of mint essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, **1995**, 43:(9), p.p. 2384-2388.
149. OLIVEIRA, D.R., Levantamento etnobotánico das plantas medicinais utilizadas pela comunidade de Oriximiná (Pará) com enfoque etnofarmacológico para o Genero *Lippia*, Master Thesis. Rio de Janeiro: UFRJ/NPPN, 111p., citado por OLIVEIRA, D.R., LEITÃO, G.G., BIZZO, H.R., LOPES, D., ALVIANO, D.S., ALVIANO, C.S., LEITÃO, S.G., Chemical and antimicrobial analices of essential oil of *Lippia oiganoides* H.B.K., *Food Chem.*, **2007**, 101, p.p. 236-240.
150. CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; DE BRUYNE, T.; HERMANS, N.; TOTTE´, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J., Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo, *J. Ethnopharm.*, **2002**, 79, p.p. 213–220.

151. RAI, M. and MARES, D., Plant-Derived Antimycotics. Current Trends and Future POrospects, Ed., USA, New York, p.p. 279-364.
152. KNOBLOCH, K., PAULI, P., IBERL, B., WEIGAND, H., WEISS, N., Antibacterial and antifungal properties of essential oil components, *J. Essent. Oil Res.*, **1989**, 1, p.p. 119–128.
153. CHALCHAT, J.C., CHIRO, F., GARRY, R.PH., LACOSTE, J., SANTOS, V., Photochemical hydroperoxidation of terpenes. Antimicrobial activity of α -pinene and limonene hydroperoxides. *J. Essent. Oil Res.*, **2000**, 12, p.p. 125–125.