

**MORFOANATOMÍA DE LAS INFLORESCENCIAS DE *Lippia alba*
(VERBENACEAE) EN TRES ESTADÍOS DEL DESARROLLO Y COMPOSICIÓN
QUÍMICA DE SUS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES.**

MARÍA ISABEL PARRA GARCÉS

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA
2009**

**MORFOANATOMÍA DE LAS INFLORESCENCIAS DE *Lippia alba*
(VERBENACEAE) EN TRES ESTADÍOS DEL DESARROLLO Y COMPOSICIÓN
QUÍMICA DE SUS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES**

MARÍA ISABEL PARRA GARCÉS

**Proyecto de grado para optar al título de
Bióloga**

Director:

Esp. DAGOBERTO ARRIETA PRIETO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA
2009**

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus más sinceros agradecimientos a María Nilda Cerf Arbulú y a José Miguel Esborronda Andrade, por la contribución con sus conocimientos y sugerencias para la realización de este proyecto y para todas las áreas del Saber. A la Federación Internacional de Sociedades Científicas (FISS) por el material bibliográfico. Agradecemos igualmente a Fernando Caroprese por sus aportes en el desarrollo de la parte experimental de esta investigación, a Jhon Jairo Díaz Olarte por su apoyo en el diseño y revisión estadística, a Humberto García Pinzón por sus aportes en la descripción de las inflorescencias y a Edgar Rincón Barón, por contribuir con su experiencia al desarrollo de esta investigación.

DEDICATORIA

*A mis padres, Isabel Garcés y Alfonso Parra
por su apoyo incondicional e inquebrantable durante mi carrera.*

A mi hijo, Juan Sebastián, mi inspiración, mi felicidad, mi vida.

*Al Doctor Serge Raynaud de la Ferrière
y al Doctor David Juan Ferríz Olivares,
por su Pensamiento de profundas transformaciones dialécticas para esta Nueva
Era de Investigaciones Verdaderas.*

*A nuestros Maestros Cont. María Nilda Cerf Arbulú
y Lic. José Miguel Esborronda Andrade,
por su constancia irreductible en la formación Científica y Espiritual para la
reeducación de la humanidad.*

*A Fernando Caroprese,
por ser mi apoyo constante.*

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
1. MATERIALES Y MÉTODOS	4
1.1 MATERIAL VEGETAL	4
1.2 ANÁLISIS QUÍMICO	5
2. RESULTADOS	8
2.1 MORFOANATOMÍA FLORAL	8
2.2 METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES	9
3. DISCUSIÓN	11
BIBLIOGRAFÍA	18

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. Tabla 1. Promedios \pm SD de cantidad relativa de metabolitos volátiles en <i>L. alba</i> durante tres estadios desarrollo ontogénico, número de pico e índices de Kovats. Significancia según test de Anova, letras diferentes (a, b, c) indican diferencias significativas, según el test de Tukey ($p < 0,05$).	25
ANEXO B. Figura 1. Botón de flores, característicos del estadio I. Abreviaturas: Bf: Botón floral; R: rama.	26
ANEXO C. Figura 2. Cortes longitudinales (A,B,C) y transversal (D) de las inflorescencias de <i>L. alba</i> en el estadio I. Abreviaturas: Pd: primordio en diferenciación; Br: Bráctea; Tp: tejido parenquimático	27
ANEXO D. Figura 3. Botones florales presentes en el estadio II. Abreviaturas: Br: brácteas; Of: órganos en formación.	28
ANEXO E. Figura 4. Cortes longitudinales (A, C) y transversal (B, D) de las inflorescencias de <i>L. alba</i> en el estadio II. Abreviaturas: Br: Bráctea; Se: sépalos; Pe: pétalos; An: anteras; Ec: estructura carpelar; Pa: parénquima.	29
ANEXO F. Figura 5. Inflorescencias en su máximo desarrollo, con flores abiertas correspondientes al estadio III.	30
ANEXO G. Figura 6. Cortes longitudinales (A, B, D, E, F) y transversal (C) de las inflorescencias de <i>L. alba</i> en el estadio III. Abreviaturas: Br: Bráctea; Ed: estigma decurrente; Se: sepalos; Oo: ovulo; Ov: ovario; Co: corola; St: estilo; Ca: cáliz; ADt: anteras ditecas Pi: pistil.	31
ANEXO H. Figura 7. Cromatograma (CG-MS) de los metabolitos secundarios volátiles de las inflorescencias de <i>L. alba</i> , estadio I, obtenido por HS-SPME. La identificación de los picos aparece en la tabla 1.	32
ANEXO I. Figura 8. Cromatograma (CG-MS) de los metabolitos secundarios volátiles de las inflorescencias de <i>L. alba</i> , estadio II, obtenido por HS-SPME. La identificación de los picos aparece en la tabla 1.	33

ANEXO J. Figura 9. Cromatograma (CG-MS) de los metabolitos secundarios volátiles de las inflorescencias de *L. alba*, estadio III, obtenido por HS-SPME. La identificación de los picos aparece en la tabla 1.

RESUMEN

Título: Morfoanatomía de las inflorescencias de *Lippia alba* (Verbenaceae) en tres estadios del desarrollo y composición química de sus metabolitos secundarios volátiles*.

Autora: María Isabel Parra Garcés**

Palabras claves: *Lippia alba*, inflorescencias, morfoanatomía floral, metabolitos secundarios volátiles.

Se describe el desarrollo morfoanatómico de las inflorescencias de *Lippia alba* (Verbenaceae), recolectadas en la zona de cultivos experimentales del CENIVAM, (Bucaramanga, Colombia). Se establecieron tres estadios de desarrollo y se observaron al microscopio estereoscópico y al microscopio óptico convencional. Se realizó la determinación de la composición química de los metabolitos secundarios volátiles en cada uno de los tres estadios elegidos. El aislamiento de los analitos fue realizado mediante la técnica de microextracción en fase sólida en el modo *headspace* (HS-SPME) y su posterior análisis de componentes, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). El Estadio I se caracterizó microscópicamente por presentar un desarrollo inmaduro, en el cual se aprecia una masa de células en donde se inicia la diferenciación meristemática. En el Estadio II, se observó que la acción de movimientos morfogenéticos da paso a la formación de las respectivas estructuras sexuales florales, el cáliz y la corola. Al llegar al Estadio III, se observaron claramente los diferentes órganos: estambres adnados a la corola, epipétalos y didínamos, el gineceo sincárpico y bicarpelar, ovario súpero y estigma de forma capitada. Las flores son sésiles y hermafroditas. Los principales metabolitos secundarios detectados y que constituyen un 78% de las cantidades relativas totales fueron el biciclosesquifelandreno (38%), seguido de la carvona (37%) y el limoneno (4.7%). Los metabolitos encontrados en este estudio y que no fueron encontrados en la bibliografía revisada fueron el β -copaeno, el γ -amorfenol y el cis- β -guaíeno. Aunque la función primaria de las esencias florales de las plantas es atraer polinizadores, otras funciones podrían incluir la defensa y protección contra el estrés abiótico, herbívoros y actividades bactericida y antifúngica después de la abscisión de los órganos florales.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Director: Esp. Dagoberto Arrieta Prieto.

ABSTRACT

Title: Morpho-anatomy of inflorescences of *Lippia alba* (verbenaceae) in three stages of development and chemical composition of his secondary volatile metabolites*.

Author: María Isabel Parra Garcés**

Key words: *Lippia alba*, inflorescences, floral morpho-anatomy, volatile secondary metabolites.

In this study, the morpho-anatomical development of the inflorescences of *Lippia alba* (Verbenaceae) collected in the zone of experimental crop in CENIVAM, Bucaramanga, Colombia was described. In order to carry out this process, three stages of the plant development were established and analyzed by the microscope. On the other hand, the determination of the chemical composition of the volatile secondary metabolites was made for each of the three chosen stages. The isolation of analytes was achieved by means of solid phase micro-extraction in the headspace mode (HS-SPME) the analysis of components was carried out by means of gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Stage I was microscopically characterized by an immature development in which the meristematic differentiation begins with a mass of cells. In Stage II, it was observed how the morphogenetic movement gives way to the formation of the respective floral sexual structures, the flowerhead and the corolla. When reaching Stage III, the different organs could be overtly noticed: stamens adnate to the corolla, epipetals and didynamous, the bicarpelar and syncarpic gynoecium, superior ovary and stigma of capitate form. The flowers are sessile and hermaphroditic. The main detected by GC-MS secondary metabolites, constitute 78% of the total relative amounts. They were biciclosesquifelandreno (38%), followed by carvone (37%) and limonene (4.7%). The metabolites found in this study which did not appear described in the bibliography revised were, β -copaene, γ -amorphene, *cis*- β -guaiene. Although the primary function of the floral essences of plants is to attract pollinators, other functions might include the defense and protection against abiotic stress, herbivores and bactericidal and antifungal activity after the abscission of the floral organs.

* Degree Work

** Science Faculty. School of Biology. Director: Esp. Dagoberto Arrieta Prieto. Co-Director: Elena Stashenko.

INTRODUCCIÓN

L. alba, es un arbusto de características fuertemente aromáticas, que normalmente alcanza de 1 a 2 m de altura. Es erecto, perenne, con hojas de 2 – 7 cm, opuestas, de color verde, lámina oblonga, lanceoladas, generalmente pecioladas y sin estípulas (Yamamoto 2006). El sistema de ramas es homomórfico, i.e., no se observa especialización en ramas fértiles y vegetativas. En las nuevas ramas, que se originan a partir de las yemas prolépticas, las florescencias se desarrollan silépticamente y en su conjunto forman las inflorescencias (Múlgura *et al.* 1998), que producen néctar y polen durante todo el año (Vit *et al.* 2002). La planta es conocida comúnmente como prontoalivio (Colombia), erva cidreira (Brasil), cidrón (Venezuela), juanilama (Costa Rica), y en Centroamérica como quitador. Es originaria del bosque seco tropical y subtropical americano (Gupta 1995, Bandoni 2000, Kumar y Bahl 2002) y pertenece a la familia Verbenaceae, en la que se incluyen cerca de 98 géneros con aproximadamente 2.500 taxa específicos (García 1975, Ocampo y Valverde 2000). En Colombia se encuentra distribuída en casi todo el país, hasta los 1.800 m.s.n.m. (Guzmán *et al.* 2004).

En la comunidad científica, las diversas sinonimias que le son conferidas a *L. alba* Mill. N.E. Brown, causan confusión (Pascual *et al.* 2001, Yamamoto 2006). Por esta razón, los estudios de la ontogénesis de la inflorescencia son pieza fundamental, como lo mencionó Mora (1987): “Uno de los capítulos de la morfología de las plantas superiores que permaneció estancado durante siglos, fue sin duda, el de la morfología comparativa o tipología de las inflorescencias, no obstante el interés que reviste la comprensión global de estos sistemas para la fisiología, la ecología, la sistemática y la filogénesis”. Este autor también afirma que, “resulta particularmente revelador e instructivo el análisis de diferentes estadios de desarrollo de la estructura en cuestión (ontogénesis)”. No obstante, la

publicación de trabajos acerca de morfoanatomía floral para taxa del género *Lippia*, es escasa (Rueda 1994).

Se trata de una especie vegetal reconocida por la medicina tradicional de Colombia por sus usos etnobotánicos (García 1975), lo que ha despertado en los últimos años gran interés en los investigadores por el estudio de sus propiedades. Pino *et al.* (1996), Zétola *et al.* (2002) y Oliveira *et al.* (2006), entre otros, han descrito actividad antibacteriana y antifúngica del aceite sobre gérmenes procedentes de infecciones clínicas. Por otra parte, Vale *et al.* (1999) y Gurgel *et al.* (2002) realizaron pruebas con ratones de la cepa Swiss machos, verificando que la acción de componentes del aceite esencial (citrinal, mirceno y limoneno) de *L. alba*, es de tipo dopaminérgica, causando un efecto depresivo sobre el sistema nervioso central, lo cual por un lado justifica su utilización etnomédica como tranquilizante, pero por otro pone de manifiesto que se trata de una especie que debe ser utilizada con precaución.

Actualmente, sólo el 25% de las angiospermas han sido estudiadas y algunas familias son totalmente desconocidas en lo concerniente a las esencias florales (Dudareva y Pichersky 2006). Por otra parte, Carvalho y Fonseca (2005), mencionan que en el aceite esencial de *L. alba* se encuentra carvona en alta concentración (30-35%). Este es un compuesto con diversas aplicaciones, como fragancia y sazonador, inhibidor de la germinación de la papa y semillas, agente antimicrobiano y antifúngico, indicador bioquímico ambiental y con relevancia en el campo médico.

Para la realización de este trabajo, se utilizaron inflorescencias de *L. alba*, que consisten en un eje central que soporta los agrupamientos florales y al igual que una flor, inicia en las yemas florales (Mora 1987). Evans y Dickinson (1999), constataron que para examinar hipótesis concernientes a las relaciones entre los

miembros de una familia, son necesarios estudios de morfología y ontogenia floral y análisis fitoquímicos, entre otros.

Por los antecedentes existentes en bibliografía, dentro de la familia Verbenaceae (Stashenko *et al.* 2004), el género *Lippia* aparece como promisorio para aislar principios activos novedosos (Pascual *et al.* 2001). En este trabajo se describe por primera vez en forma simultánea, la organogénesis floral en esta especie y los compuestos químicos volátiles que se forman durante este proceso.

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 MATERIAL VEGETAL

El muestreo de las inflorescencias se realizó a partir de plantas clones (reproducidas por estaquia), en las instalaciones de los cultivos experimentales del Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales, CENIVAM, a las 12 horas del medio día. La identificación taxonómica del material vegetal se efectuó en el Herbario Nacional Colombiano, Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias, de la Universidad Nacional de Colombia (Bogotá) donde quedó depositado como muestra permanente y se identificó como *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown. (Nº COL 512078).

El material recolectado fue observado al microscopio estereoscopio para el establecimiento de los tres estadios, teniendo en cuenta características de tamaño, color y cambios morfológicos como la presencia y ausencia (en estadios incipientes del desarrollo) de las pequeñas corolas que conforman la inflorescencia y posteriormente, para la descripción de la morfoanatomía floral (tipo de ovario, pétalos, tipo de corola). Los estadios seleccionados fueron fijados en FAA, embebidos en parafina y seccionados en cortes transversales y longitudinales a 10 µm con micrótopo rotatorio, para obtener así micropreparados que posteriormente fueron coloreados con safranina- *fastgreen* (Johansen 1940). Finalmente, los cortes se observaron en microscopio óptico (OLYMPUS, Japón) y se fotografiaron.

1.2 ANÁLISIS QUÍMICO

El análisis químico se realizó según la metodología propuesta por Stashenko *et al.* (2004). Para el proceso de microextracción en fase sólida de la fase vapor (*headspace*) (HS-SPME) del material vegetal, se usó una fibra de poli(dimetilsiloxano)/divinilbenceno (PDMS/DVB, 65 μm) obtenida de *Supelco* Inc. (Bellefonte, PA, EE.UU.). Los gases especiales para cromatografía fueron obtenidos de *Aga-Fano* S.A. (Bucaramanga, Colombia). Se muestreó la fase vapor a 22 ± 1 °C, de 0.7 g de planta, colocada en un frasco de 20 ml. El tiempo de pre-equilibrio del frasco, fue de 15 min y el tiempo de exposición de la fibra fue de 40 min (la selección de este parámetro se basó en experimentos preliminares). Las sustancias extraídas fueron térmicamente desorbidas a 250 °C, durante 2 min, en un puerto de inyección del cromatógrafo de gases, usando un *liner* especial para SPME, de volumen reducido.

El análisis cromatográfico de las muestras se realizó en un GC *Hewlett-Packard* (HP) 5890A *Series* II, equipado con un inyector *split/splitless* (250 °C, relación *split* 1:10) y un detector de ionización en llama (FID) (250 °C), por triplicado para cada muestra (tres estadíos, en total nueve muestras). Los datos cromatográficos fueron adquiridos y procesados con un programa HP *Chem Station* HP Rev. A.06.03. Para la separación de mezclas se usó una columna capilar apolar, HP-5 (*Hewlett-Packard*) de 30 m x 0.25 mm, d.i. x 0.25 μm , d_f , con fase estacionaria de 5%-fenil-poli(metilsiloxano). La temperatura del horno fue programada de 45 °C (2 min) hasta 150 °C a razón de 5 min^{-1} para la columna apolar, HP-5. El gas de arrastre empleado fue helio (99.9995%, *Aga-Fano*, Bucaramanga S.A.), con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 15 psi y una velocidad lineal de 26 cm s^{-1} . El gas auxiliar fue nitrógeno (99.995%; *Aga-Fano*, Bucaramanga S.A.), con una velocidad de flujo de 30 ml min^{-1} . Las velocidades de flujos de los gases de combustión en el FID, aire e hidrógeno, fueron de 300 y 30 mL min^{-1} , respectivamente. Los espectros de masas se obtuvieron por impacto de electrones

con energía de 70 eV, en un CG *Agilent Technologies 6890 Plus* acoplado a un detector selectivo de masas *Hewlett Packard MSD 5972* (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)), y equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (1:10), un inyector automático *Agilent 7863*, un sistema de datos HP *MS ChemStation* (Versión 1.05), incluyendo las bases de datos NBS 75K, WILEY 138K y ADAMS. Se usó una columna capilar de sílice fundida, HP-5MS de 30 m x 0.25 mm, d.i., con la fase estacionaria de 5%-fenil-poli(metilsiloxano) de 0.25 mm de grosor. El gas de arrastre fue helio (99.9995%, *Aga-Fano*, Bucaramanga S.A.), con una velocidad lineal de 35 cm s⁻¹. Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia se mantuvieron a 230 °C y 285 °C, respectivamente. Los espectros de masas y corrientes iónicas reconstruidas (TIC) se obtuvieron en un cuadrupolo, por medio de barrido automático de frecuencia (*full scan*), a 4.75 scan s⁻¹, en el rango de masas de *m/z* 40-350. La homogeneidad de cada pico cromatográfico fue revisada, obteniendo fragmentogramas de masas, basados en iones característicos de cada compuesto. Para la identificación de los compuestos se usaron espectros de masas e índices de retención de Kovàts (Kovàts 1965) de componentes, que se compararon con los reportados en la literatura (Adams 1995, Jouliau y König 1998).

1.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos por triplicado, obtenidos del FID, fueron descritos como media ± error estándar de la media (SEM). Posteriormente, para establecer las diferencias significativas en la variación de los porcentajes relativos de los metabolitos secundarios volátiles de *L. alba* en los tres estadios de desarrollo, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía tipo modelo lineal general (MLG), verificando previamente los supuestos de normalidad (prueba de Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de varianzas (prueba de Levene). Por la naturaleza de los datos, éstos fueron transformados usando la raíz del arco-seno.

Adicionalmente, se utilizó la prueba de Tukey para comparar las medias entre los diferentes estadios de desarrollo de los diferentes metabolitos encontrados. El criterio de significancia fue $p < 0,05$. Los análisis estadísticos fueron realizados usando el programa SPSS para Windows, versión 13.0.

2. RESULTADOS

2.1 MORFOANATOMÍA FLORAL

L. alba presenta inflorescencias en cabezuelas glomerulares, sus flores pediceladas, insertas sobre una porción del receptáculo común sobre un raquis, con ubicación axilar, en pares (Fig.1, A, B). Posee unas brácteas poco diferenciadas (Fig. 1, A). El Estadío I fue caracterizado macroscópicamente (Fig. 1, B), como botones de flores verdes (ca. 1.5 mm), pubescentes, dispuestos en forma acrópeta al tallo, tal como lo reportaron Múlgura de Romero *et al.* (1998). Microscópicamente, el Estadío I se caracterizó por presentar un desarrollo inmaduro. Se aprecian, al inicio de la diferenciación meristemática (Fig. 2, A, B, C, D), grupos de células (primordios en diferenciación) dispuestos en verticilos (Fig. 2, D), al igual que la presencia, previa a la aparición de los órganos, de brácteas que posteriormente soportarán a la flor madura (Fig. 2, A, B). Se insinúa una maduración acrópeta (Fig. 2, B, C).

El Estadío II varía macroscópicamente del Estadío I, en el tamaño (ca. 2.5 mm) y la presencia de múltiples brácteas aún más diferenciadas, pubescentes, imbricadas, que no permiten ver a simple vista el desarrollo de estructuras florales (Fig. 3 A). En los cortes longitudinales observados al estereoscopio, ya se puede apreciar la división de lo que será cada flor y se percibe claramente la maduración acrópeta (Fig. 3 B). Una diferencia más notoria con respecto al Estadío I de desarrollo puede apreciarse a nivel microscópico, donde ya se observa cómo la acción de movimientos morfogenéticos da paso a la formación de los respectivos verticilos florales, iniciando por el perianto (cáliz y la corola) (Fig. 4, B y D).

En un Estadío II avanzado, se puede apreciar la estructura carpelar que dará origen al gineceo (Fig. 4, A y C). De igual manera, se observa que el futuro

androceo y gineceo maduros, se encuentran protegidos del exterior por la corola, el cáliz, y la bráctea (Fig. 4 A). La flor presenta un pedicelo bastante reducido (subpedicelada), soportada siempre por su respectiva bráctea (Fig. 4, B y C). Se evidencia el inicio de la formación desde la base y en forma centripeta de sépalos, pétalos y estambres, los cuales se encuentran insertos en los pétalos (petalostémono) (Fig. 4, A y B).

El Estadio III presenta macroscópicamente una diferencia marcada con respecto a los dos anteriores. Se observa la cabezuela (ca. 5 mm) con varias pequeñas corolas tubulares cilíndricas y zigomorfas (Fig. 5, A) y dentro de ellas, en los cortes longitudinales observados al estereoscopio, la presencia de todos los órganos florales completamente desarrollados: androceo epipétalo con dos pares de estambres didínamos de color amarillo, el gineceo sincárpico, bilocular y bicarpelar, ovario súpero y estigma amarillo verdoso de forma decurrente y plumoso (Fig. 5, B). Flores presentan una estivación imbricada quincuncial. Son pubescentes, gamopétalas, zigomorfas, bilabiadas, y se disponen subsésiles, sobre brácteas ovadas que las abrazan (Fig. 5, B).

Microscópicamente, se observan con detalle las estructuras reproductoras de la planta. El estigma es decurrente y plumoso (Fig. 6, A y B), óvulos de tipo anátropo, ovario subsésil, súpero (Fig. 6, A y F), el gineceo es bilocular (bicarpogónico) con placentación axial (Fig. 6, F). Por otra parte, se presenta el androceo de tipo epipétalo, estambres didínamos con sus filamentos adnados a la corola y anteras ditecas libres (petalostémono) (Fig. 6, C, D y E).

2.2 METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES

En la Fig. 7 se presenta el perfil cromatográfico de los metabolitos secundarios volátiles, aislados mediante HS-SPME, de flores de *L. alba* en el Estadio I. Para este estadio se identificaron 22 compuestos, en cantidades relativas >0.05%.

Para el Estadio II se detectaron e identificaron 21 compuestos (Fig. 8), al igual que en el Estadio III (Fig. 9). En la composición química de todos los estadios de desarrollo, predominaron los sesquiterpenos.

En la Tabla 1 se muestra la cantidad relativa (% \pm SD, n=3) de los metabolitos secundarios volátiles aislados por HS-SPME de *L. alba*, durante los tres estadios del desarrollo elegidos. Los 22 metabolitos detectados presentaron diferencias significativas cuantitativas (Tabla 1).

Todos los metabolitos identificados estuvieron presentes durante el desarrollo de la inflorescencia de *L. alba*, salvo el γ -muuroleno, que sólo se detectó en el Estadio I (resaltado con negrilla en la Tabla 1).

Dentro de los principales metabolitos detectados (Ver Tabla 1 y Fig. 8, 9, 10), se encontró el biciclosesquifelandreno, con un porcentaje del 25% en el estadio I del desarrollo, mientras en el Estadio II aumentó a 36.13% y en el Estadio III se incrementó su presencia hasta un 38%. La carvona, con un porcentaje relativo del 37.1% en el Estadio I, mientras en el Estadio II disminuyó hasta llegar a 27% y en el Estadio III se presentó un incremento al 29.14%. Por otra parte, el metabolito secundario limoneno, se presenta con 4.7% en el Estadio I y disminuye hasta 3.2% durante el Estadio III. Por último, el *trans*- β -farneseno, presenta un porcentaje de 4.6% en el Estadio I, disminuye en el Estadio II a 3.7% y finalmente, llega a 1.2% en el Estadio III.

3. DISCUSIÓN

En las observaciones morfoanatómicas realizadas para *L. alba*, en el presente estudio, se reporta un estigma decurrente y plumoso y no capitado, como lo afirma Muñoz *et al.* (2007). Estos mismos autores reportan que las flores son opuestas, no obstante, en este trabajo se presentan axilares. Muñoz *et al.* (2007) también reporta cuatro pétalos para la flor, pero en realidad, esta especie cuenta con cinco pétalos en su corola. Las diferencias en las observaciones podrían explicarse por la existencia de un par de pétalos que se fusionan dando la apariencia de ser uno solo. Sumado a ello se observó que cada bráctea, da soporte a una flor, semejante a lo descrito para *Cladium jamaicense* por Richards (2002).

Mediante esta investigación se confirma el desarrollo floral acrópeto como un fenómeno que ocurre tanto en las ramas, como en el desarrollo del botón de flores. Es decir, en los botones elegidos como tercer estadio, se podrán encontrar desde grupos de células en proceso de diferenciación, hasta diferentes órganos florales completamente desarrollados. Esta asincronía en el crecimiento podría propiciar el éxito reproductivo y de variabilidad genética, pues de este modo se facilita la fertilización cruzada.

Igualmente se pudo observar el orden en que surgen cada una de las estructuras florales; la bráctea está presente desde los inicios de la ontogenia, surge sobre ella el cáliz y casi simultáneamente la corola, sin la cual no podrían aparecer luego los estambres, ya que estos son petalostémonos (unidos a la corola). De este modo se garantiza la protección a los órganos sexuales en desarrollo (androceo y gineceo). No obstante pueden encontrarse diferencias con respecto a los tiempos en que surgen las diferentes estructuras, la disposición de éstas y sus diferentes tamaños en otras especies. Tal como sugiere Cerana (2004), la disposición del

estigma, por ejemplo, puede variar para ser más receptivo a la polinización cuando la flor (en ese caso de la familia Asteraceae) es visitada por un insecto en cierta época. Perreta y Vegetti (2004), mencionan la variación observada en la longitud de las inflorescencias que podría deberse a factores ambientales y a la menor o mayor plasticidad morfológica. Dong *et al.* (2005), adelantaron simultáneamente estudios con Krizek y Fletcher (2005), en los cuales se ratifica que los mecanismos moleculares contribuyen a la identidad y posición de los órganos florales y la extrema variación en las morfologías florales, combinadas con la relativa simplicidad de las estructuras. Todas estas diferencias nos permiten ver que no hay un patrón específico para el desarrollo floral en dicotiledóneas y que estas características podrían apoyar estudios filogenéticos vegetales.

Junto con los cambios morfo-anatómicos presentados durante el desarrollo de las inflorescencias de *L. alba*, se observa un cambio en la detección o no, aumento y disminución de los diferentes metabolitos secundarios volátiles típicos para esta especie [variación descrita en los resultados (Ver también Tabla 1)]. Estos cambios podrían deberse a que un compuesto presente se requiera para biosintetizar otro u otros. Precisamente Bouwmeester *et al* (1998), reporta la síntesis de carvona a expensas del limoneno en frutos de *Carum carvi* L. Para *L. alba* se observa (Ver Tabla 1) la tendencia de éste (limoneno) a disminuir (de 4.7% a 3.2%), mientras carvona mantiene altos porcentajes. De este modo, el precursor disminuiría o se transformaría. Según Dudareva y Pichersky (2006), esta ausencia también podría ser causada por regulaciones existentes en los genes que codifican las enzimas biosintéticas, cambios en la información codificante (por ejemplo, mutaciones), modificaciones postraslacionales y disponibilidad del sustrato, que afectan la estabilidad del producto y el proceso de esta emisión. Así mismo, la creación de nuevos compuestos esenciales podría ocurrir por mutación, cuando nuevas enzimas son creadas con nuevos sustratos específicos o nuevos productos.

De igual modo, podría darse la volatilización de los monoterpenos que depende, entre otros factores, de la temperatura, la luminosidad y la humedad. Ello es corroborado por Matile y Altenburger (1988), Loughrin *et al.* (1991) y especialmente por Duarte *et al.* (2007), en una investigación realizada sólo con las hojas de *L. alba* y teniendo en cuenta el ciclo circadiano de la planta. Allí se observó que cuando se presentan condiciones de alta radiación solar y temperaturas elevadas, se obtienen contenidos altos de metabolitos secundarios y, en especial, de carvona (compuesto que presentó el quimiotipo en la investigación de Duarte *et al.*, 2007, y que también está presente en este trabajo). Esto motivó que se eligiera el soleado medio día para los muestreos de las inflorescencias de *L. alba*.

También durante el proceso de extracción, varios compuestos probablemente se pierden, ya sea durante la absorción o porque la muestra concentrada es altamente volátil (Dudareva y Pichersky 2006). Lo anterior es claramente observado al comparar los compuestos detectados en la presente investigación, con los registrados en estudios de Stashenko *et al.* (2004), Duarte *et al.* (2007), Durán (2005), Monsalve (2007) y Agudelo y Blanco (2005), realizados con hojas de la misma especie, donde aparecen más de 40 compuestos diferentes, mientras en ésta, sólo 22 fueron detectados en cantidades >0.05%; Sin embargo, algunos de los mayoritarios como la carvona, el biciclosesquifelandreno y el limoneno siempre estuvieron presentes; De todas formas, se debe tener en cuenta que las diferentes técnicas empleadas para la extracción (Stashenko *et al.* 2004), sumadas a la parte de la planta utilizada (y la diferenciación en sus estados de desarrollo), podrían influir marcadamente en los resultados, pues los metabolitos secundarios presentan variaciones dependientes de estas condiciones. A ello se deben agregar otros factores condicionantes, tales como los diferentes orígenes geográficos, las épocas de recolección del material vegetal y la variación genética. Todo ello es descrito también por Nickavar y Mojab (2000), en cuya investigación,

de la especie *Calamintha officinalis*, la carvona se detectó como componente mayoritario en hojas (46.7%), seguida por el limoneno (24.6%).

Según Dudareva y Pichersky (2006), entre los terpenos que constituyen las esencias florales, el porcentaje de compuestos oxigenados es generalmente mucho más alto para monoterpenos (81%) que para sesquiterpenos (38%). Contrario a ello, de los 22 compuestos identificados en este estudio, 15 fueron sesquiterpenos (ninguno oxigenado), mientras los restantes eran monoterpenos y de ellos, seis son oxigenados. Estas características podrían ser una resultante del tiempo de exposición de la fibra (PDMS/DVB) durante la extracción, y en general, de la importante influencia del proceso de extracción utilizado. De este modo, las cantidades relativas de estos últimos representan un 43% del total de los volátiles obtenidos que son precisamente los responsables de la suave y agradable fragancia que caracteriza esta planta. Otra causa determinante de la frecuencia baja de estos compuestos, además de su volatilidad, podría ser la ineficiente recolección por los métodos utilizados (Dudareva y Pichersky 2006).

Otro aspecto importante son las emisiones de las esencias florales que varían en el espacio, a causa de que la esencia puede ser emitida desde regiones especializadas del tejido floral (Vogel 1990). A pesar de que en las flores, los pétalos son los principales emisores de volátiles, algunas veces compuestos específicos pueden ser emitidos desde un solo grupo de órganos florales (Verdonk *et al.* 2003). Ya se ha demostrado que, estambres, pistilos, polen y néctar contribuyen o son los principales responsables de la emisión de ciertos compuestos. Los volátiles emitidos por el polen son notablemente diferentes a los emitidos desde otras partes de la flor (Dudareva y Pichersky 2006). En relación con ello, se puede mencionar el γ -muuroleno que aparece sólo durante el primer estadio de desarrollo, en el cual se inicia el proceso de diferenciación morfoanatómica de los órganos florales (siempre se detectaron los demás compuestos). De igual modo, sugerimos la poca área de contacto con el ambiente que presentan los dos primeros estadios pues podría dar como resultado una

menor volatilización de compuestos. El desarrollo floral también implica una mayor preservación o volatilización de los metabolitos ya que normalmente, la biosíntesis ocurre en las células epidermales de los tejidos de la planta, desde los cuales pueden escapar hacia la atmósfera o la rizósfera luego de haber sido sintetizados (Dudareva y Pichersky 2000). Allí jugaría un papel importante la radiación solar y otros factores ambientales en la emisión de la fragancia al ambiente. Por supuesto, los genes juegan un importante papel en esta producción y emisión de compuestos, por ejemplo, el gen LIS es un gen que ha mostrado una alta expresión en los estigmas, con ligeros niveles en los pétalos (Dudareva *et al.* 1996). Así mismo, la expresión de las terpeno-sintasas en el estigma podría estar involucrada en la protección de mayor superficie de área contra el crecimiento de hongos, aunque los monoterpenos producen también actividad antimicrobial. Otra función potencial podría ser la función contra el estrés oxidativo (Deans y Waterman, 1993). Igualmente, la expresión del gen AtTPS es conocida para la síntesis de monoterpenos y sesquiterpenos y se ha comprobado su actividad en los tejidos florales, no obstante, los pétalos se reportan como el principal órgano de expresión de esencias no terpenoides de las esencias florales (Fiehn *et al.* 2000).

Continuando con la relación compuesto-estadio en la presente investigación, se pueden mencionar compuestos como el β -ylangeno, el γ -amorfenol, el *cis*- β -guaieno y el biciclosesquifelandreno, que incrementan en su porcentaje relativo durante el Estadio III e igualmente podrían estar relacionados en su producción con los órganos florales maduros. Así mismo, se detectaron tres metabolitos diferentes a los reportados en otros estudios (Stashenko *et al.* 2004, Duarte *et al.* 2007, Durán 2005, Monsalve 2007 y Agudelo y Blanco 2005), con esta misma especie; ellos son: el β -copaeno, el γ -amorfenol y el *cis*- β -guaieno. Estos metabolitos, probablemente sean producidos sólo en la flor de esta planta (en hojas ni en tallos). Corroborando una vez más todo lo anterior, Shalit *et al.* (2003) y Lavid *et al.* (2002) investigaron la emisión en flores de diferentes especies de

plantas, lo cual sigue patrones de desarrollo similar, aumentando durante los primeros estadios de desarrollo floral, llegando al máximo cuando las flores son percibidas por los polinizadores y descendiendo después de esto. No obstante, según Euler y Baldwin (1996), aparte de atraer polinizadores (lo cual es la función primaria de la flor), los compuestos químicos de las fragancias florales también podrían aumentar el riesgo de ataques de herbívoros a las estructuras de la flor y los tejidos florales pueden requerir relativamente mayor protección de enemigos. Es así como en *Nicotiana attenuata* se inducen en la corola metabolitos biocidas de defensa (Euler y Baldwin 1996) y probablemente sucede igual con otra gran variedad de organismos vegetales, incluida nuestra especie en estudio.

Las esencias de muchas flores son marcadamente reducidas poco después de la polinización. Investigaciones con *Petunia hybrida*, revelan que la disminución en la emisión, empieza sólo después que el polen alcanza el ovario, sugiriendo que la polinización es un requisito para la reducción de las esencias florales luego de la polinización (Negre *et al.* 2003). Con ello se muestra la importante relación que existe entre los procesos del desarrollo de la planta con su ambiente y se observa la reducción de compuestos tales como piperitenona, *cis*-dihidro-carvona y *trans*-dihidro-carvona en el Estadio III.

Otras funciones de los metabolitos secundarios incluyen la defensa y protección contra o durante el estrés abiótico (Euler y Baldwin 1996) y la protección de zonas con heridas después de la abscisión de los órganos florales (Dudareva y Pichersky 2006). Estas funciones adicionales pueden ayudar a explicar la abundancia y variedad de los diferentes constituyentes detectados (Euler y Baldwin 1996).

El conocimiento de las esencias florales es crítico para el entendimiento de las funciones evolutivas y biológicas. El progreso de la investigación en esta área resulta un aporte significativo al conocimiento farmacognóstico de una especie vegetal medicinal de nuestro país. Pero además se constituye en una fuente de

apoyo para biólogos, bioquímicos, farmacéuticos y químicos analíticos y de síntesis (Dudareva *et al.* 2000). Más aún resulta importante si se considera que las reconstrucciones filogenéticas de las plantas basadas en los compuestos esenciales, son aún escasas (Azuma *et al.* 1999).

BIBLIOGRAFÍA

Adams, R.P. 1995. Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois.

Agudelo, A & K. Blanco. 2005. Estudio comparativo de los aceites esenciales de *Lippia alba* Mill N.E. Brown ex Britton & Wills cultivada con tres tipos de compostaje. Química.Tesis. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

Azuma H., L.B., Thien & S. Kawano. 1999. Molecular Phylogeny of magnolia (Magnoliaceae) inferred from cpDNA sequences and evolutionary divergence of the Floral Scents. J. Plant. Res. 112: 291-302.

Bandoni A. 2000. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Argentina: Red de Editoriales Universitarias. p. 29-43.

Bouwmeester H.J., J. Gershenzon., M. Konings & R. Croteau. 1998. Biosynthesis of the monoterpenes limonene and carvone in the fruit of caraway. Demonstration of enzyme activities and their changes with development. Plant Physiol. 117: 901-912.

Carvalho C. & M. Fonseca. 2005. Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene. Food Chem. 95: 413-422.

Cerana M. 2004. Flower morphology and pollination in *Mikania* (Asteraceae). Flora. 199: 168-177.

- Deans S.G & P.G. Waterman. 1993. Biological activity of volatile oils, in volatile oil Crops: Their biology, biochemistry and production. Long. Scient. Nueva York. p. 97-111.
- Dong Z., Z. Zhao, C. Liu, J. Luo, J. Yang & W. Huang. 2005. Floral Patterning in *Lotus japonicus*. Plant Physiol. 137: 1272-1282.
- Duarte S., C. Cárdenas, J. Martínez & E. Stashenko. 2007. Estudio de la variación circadiana de los metabolitos secundarios volátiles obtenidos por la destilación extracción con solvente simultánea de hojas de *Lippia alba* (fam. Verbenaceae). Scientia et Technica. 13: 83-85.
- Dudareva, N. & E. Pichersky. 2006. Biology of floral Scent. Taylor & Francis Group. Nueva York.
- Dudareva N., B. Piechulla & E. Pichersky. 2000. Biogenesis of floral Scent. Hort. Rev. 24: 31-54.
- Dudareva N., L.Cseke, V.M. Blanc & E. Pichersky. 1996. Evolution of floral scent in Clarkia: novel patterns of s-linalool synthase gene expression in the *C. breweri* flower. Plant Cell. 8: 1137-1148.
- Durán, C. 2005. Estudio del aceite esencial de *Lippia alba* (Fam. Verbenaceae) y de los aspectos fisiológicos en diferentes etapas de su crecimiento bajo tres niveles de luz. Químico. Tesis. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.
- Euler M & I.T. Baldwin. 1996. The Chemistry of defense and apparency in the corollas of *Nicotiana attenuata*. Oecologia. 107: 102-108.

Evans R & T. Dickinson. 1999. Floral ontogeny and morphology in subfamily *Spiraeoideae* Endl. (Rosaceae). *Int. J. of Plant.* 160: 981-1012.

Fiehn O., J. Kopka, P. Dormann, T. Altmann, R.N. Trethewey & L. Willmitzer. 2000. Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat. Biotech.* 18: 157-168.

García, H. 1975. Plantas medicinales de Colombia. Tomo II. Bogotá, Colombia.

Gupta, M. 1995. 270 Plantas medicinales iberoamericanas. CYTED-SECAB. Bogotá. Colombia.

Gurgel Do Vale, T., J. Couto, Jr. Santos & G. Viana. 2002. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. *Phytomed.* 9: 709-714.

Guzmán S., Cardozo R & García V. 2004. Desarrollo agrotecnológico de *Lippia alba* (Miller) N.E.Br ex Britton y Wilson. *Rev. Cient. Ockhman* 7: 201-215.

Johansen, D. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Co., Nueva York, USA.

Joulain D, König W. 1998. The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons. E.B.Verlag, Hamburgo.

Kováts, E. 1965. Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. *Adv. Chromatogr.* 1: 229-247.

Krizek, B & J. Fletcher. 2005. Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide. *Nat. Pub. Group* 6: 688-698.

Lavid, N., J. Wang., M. Shalit & I. Guterman. 2002. O-methyl transferases involved in the biosynthesis of Volatile Phenolic derivates in rose petals. *Plant Physiol.* 129: 1899-1907.

Loughrin J.H., D.A. Potter & T.R. Hamilton-Kemp. 1991. Circadian rhythm of volatile emission from flowers of *Nicotiana sylvestris* and *N. suaveolens*. *Plant Physiol.* 83: 492-496.

Matile, P & R. Altenburger. 1988. Rhythms of fragrance emission in flowers. *Planta.* 174: 242-247.

Monsalve, L.A. 2007. Comparación de la composición química de los aceites esenciales de las plantas de *Lippia alba* (Mill) N.E Brown, provenientes de diferentes regiones de Colombia. Química. Tesis. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

Mora L. 1987. Estudios morfológicos, autoecológicos y sistemáticos en Angiospermas. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 1: 19-54.

Múlgura de Romero, M., S. Martínez., A. Suyama. 1998. Morfología de las Inflorescencias en *Lippia* (Verbenaceae). *Darw.* 36:1-12.

Muñoz A., F. Vallejo & M. Sánchez. 2007. Morfología y anatomía de las flores y semillas de pronto alivio. *Ac. Agron. Col.* 56: 7- 11.

Negre F., C.M. Kish, J. Boatright, B. Underwood, K. Shibuya, C. Wagner, D.G. Clark & N. Dudareva. 2003. Regulation of methylbenzoate emission after pollination in snapdragon and petunia flowers. *Plant Cell.* 15: 2992-3006.

Nickavar B & F. Mojab. 2000. Hydrodistilled volatile constituents of *Calamintha officinalis* Moench from Iran. *J. of Essent. Oil-Bearing Plants.* 8: 23-27.

Ocampo R & R. Valverde. 2000. Manual de cultivo y conservación de plantas medicinales. Tomo I. Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical. Tramil. San José. Costa Rica.

Oliveira D., S. Santos, H. Bizzo & D. Alviano. 2006. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. J. Ethnopharmacol. 108: 103-108.

Pascual M., K. Slowing, E. Carretero, D. Sánchez & A. Villar. 2001. *Lippia*: Traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. J. Ethnopharmacol. 76: 201-214.

Perreta, M & A. Vegetti. 2004. Estructura de las inflorescencias en especies de *Melica* (Meliaceae, Pooideae, Poaceae). Darw. 42: 37-49.

Pino J., L. Ariel, A. Pérez & M. Rodríguez. 1996. Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. Rev. Cub. Farm. 30:1-3.

Richards J.H. 2002. Flower and spikelet morphology in sawgrass, *Cladium jamaicense* Crantz (Cyperaceae). Ann. of Bot. 90: 361-367.

Rueda R. 1994. Systematics and evolution of the genus *Petrea* (Verbenaceae). Ann. of Bot. 81: 610-652.

Shalit M., I. Guterman, H. Volpin, E. Bar, T. Tamari, N. Menda, Z. Adam, D. Zamir, A. Vainstein & D. Weiss. 2003. Volatile ester formation in roses. Identification of an acetyl-coenzyme a geraniol /citronellol acetyltransferase in developing rose petals. Plant Physiol. 131: 1868-1876.

Stashenko, E., B. Jaramillo & J. Martínez. 2004. 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. 1025: 93-103.

Vale T., F. Matos & G. Viana. 1999. Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown chemotypes. J. Ethnopharm. 167: 127-133.

Verdonk J.C., C.H. Ric de Vos, C.H. Verhoeven, H.A. Haring, M.A. Van Tunen & R.C. Schuurink. 2003. Regulation of floral scent production in Petunia revealed by targeted metabolomics. Phytochem. 62: 997-1008.

Vogel S. 1990. The role of scent glands in pollination, Amerind Publishing. Nueva Delhi.

Vit P., B. Silva & P. Meléndez. 2002. *Lippia alba* N.E.Br. Ficha botánica de interés apícola en Venezuela, No. 2 Cidrón. Rev. Fac. Farm. 43:13-14.

Zétola M., T. De Lima, G. Sonaglio, R. González, P. Limberger, P. Petrovick & V. Bassania. 2002. CNS activities of liquid and spraydried extracts from *Lippia alba* Verbenaceae (Brazilian false melissa) J. Ethnopharm. 82: 207- 215.

Consultas de internet:

Kumar, S., J. Bahl. 2002. *Lippia alba*, planta llamada "Bhurakshak". United States Plant Patent. Patent No: US PP13, 110 P2. (Consultado 22 de diciembre de 2008, www.books.google.com/patents?id=Bhurakshak).

Yamamoto P. 2006. Interação genótipo X ambiente na produção e composição de óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. Tesis de posgrado (Mejoramiento Genético Vegetal), Instituto Agronómico Campinas, SP. (Consultado 20 de mayo de 2009 www.cipedya.com/web/FileDetails.aspx?IDFile=153395.pdf).

SPSS para Windows. 2004. Versión 13.0. Chicago: SPSS Inc. [programa informático en CD-ROM]. Disponible en SPSS Inc. Página web de SPSS disponible en: <http://www.spss.com/>

ANEXO A. Tabla 1. Promedios \pm SD de cantidad relativa de metabolitos volátiles en *L. alba* durante tres estadios desarrollo ontogénico, número de pico e índices de Kovats. Significancia según test de Anova, letras diferentes (a, b, c) indican diferencias significativas, según el test de Tukey ($p < 0,05$).

No pico	Ik	Tipo ^{x)}	Compuesto	Cantidad relativa, %			
				E1	E2	E3	p
1	1030	M	Limoneno	4.7 \pm 0.14 a	3.8 \pm 0.03 b	3.2 \pm 0.05 c	p < 0.001***
2	1169	MO	Borneol*	0.4 \pm 0.05 a	1.40 \pm 0.06 b	1.80 \pm 0.09 c	p < 0.001***
3	1199	MO	<i>cis</i> -Dihidro Carvona	0.53 \pm 0.04 a	0.24 \pm 0.09 b	0.23 \pm 0.07 b	p < 0.01**
4	1207	MO	<i>trans</i> -Dihidro Carvona	1.80 \pm 0.09 a	2.70 \pm 0.08 b	0.85 \pm 0.05 c	p < 0.001***
5	1256	MO	Carvona	37.1 \pm 0.43 a	27.0 \pm 0.2 b	29.14 \pm 0.11c	p < 0.001***
6	1261	MO	Piperitona	3.41 \pm 0.31 a	2.01 \pm 0.04 b	2.5 \pm 0.07 ab	p < 0.001***
7	1343	MO	Piperitenona	2.70 \pm 0.06 a	0.34 \pm 0.11 b	0.41 \pm 0.06 c	p < 0.001***
8	1348	SE	α -Cubebeno*	2.3 \pm 0.24 a	1.2 \pm 0.07 b	0.94 \pm 0.05 c	p < 0.001***
9	1380	SE	α -Copaeno	0.4 \pm 0.10 a	0.61 \pm 0.14 b	0.51 \pm 0.05 ab	p < 0.01**
10	1389	SE	β -Bourboneno	2.50 \pm 0.16 a	3.13 \pm 0.04 b	3.7 \pm 0.07 c	p < 0.001***
11	1395	SE	β -Elemeno	2.54 \pm 0.13 a	1.40 \pm 0.06 b	2.3 \pm 0.10 ab	p < 0.01**
12	1423	SE	β -Ylangeno*	1.00 \pm 0.04 a	1.74 \pm 0.10 b	1.8 \pm 0.05 c	p < 0.01**
13	1433	SE	β -Copaeno	0.52 \pm 0.03 a	1.5 \pm 0.10 b	1.5 \pm 0.07 b	p < 0.01**
14	1448	SE	β -Gurjuneno	0.50 \pm 0.02 a	0.63 \pm 0.05 b	0.6 \pm 0.08 c	p < 0.01**
15	1459	SE	<i>trans</i> - β -Farneseno	4.60 \pm 0.26 a	3.70 \pm 0.08 b	1.2 \pm 0.07 c	p < 0.001***
16	1465	SE	<i>allo</i> -Aromadendreno	1.30 \pm 0.11 a	2.22 \pm 0.07 b	2.05 \pm 0.05 c	p < 0.001***
17	1482	SE	γ-Muuroleno	0.75 \pm 0.03 a	ND	ND	-
18	1490	SE	Biclosesquifelandreno	25.0 \pm 0.32 a	36.13 \pm 0.11 b	38.0 \pm 0.08 c	p < 0.001***
19	1499	SE	<i>cis</i> - β -Guaieno	1.2 \pm 0.11 a	1.50 \pm 0.08 b	1.61 \pm 0.06 c	p < 0.01**
20	1502	SE	γ -Amorfenoleno	1.40 \pm 0.07 a	1.75 \pm 0.10 b	1.82 \pm 0.08 b	p < 0.01**
21	1517	SE	γ -Cadideno	0.90 \pm 0.09 a	1.70 \pm 0.14 b	1.32 \pm 0.07 c	p < 0.01**
22	1525	SE	δ -Cadineno	1.50 \pm 0.10 a	2.60 \pm 0.05 b	2.34 \pm 0.08 c	p < 0.01**

x) M: Monoterpeno; MO: Monoterpeno oxigenado; SE: Sesquiterpeno

E1: Estadio I, E2: Estadio II, E3: Estadio III

* Identificados tentativamente

**Probabilidades significativas

***Probabilidades altamente significativas

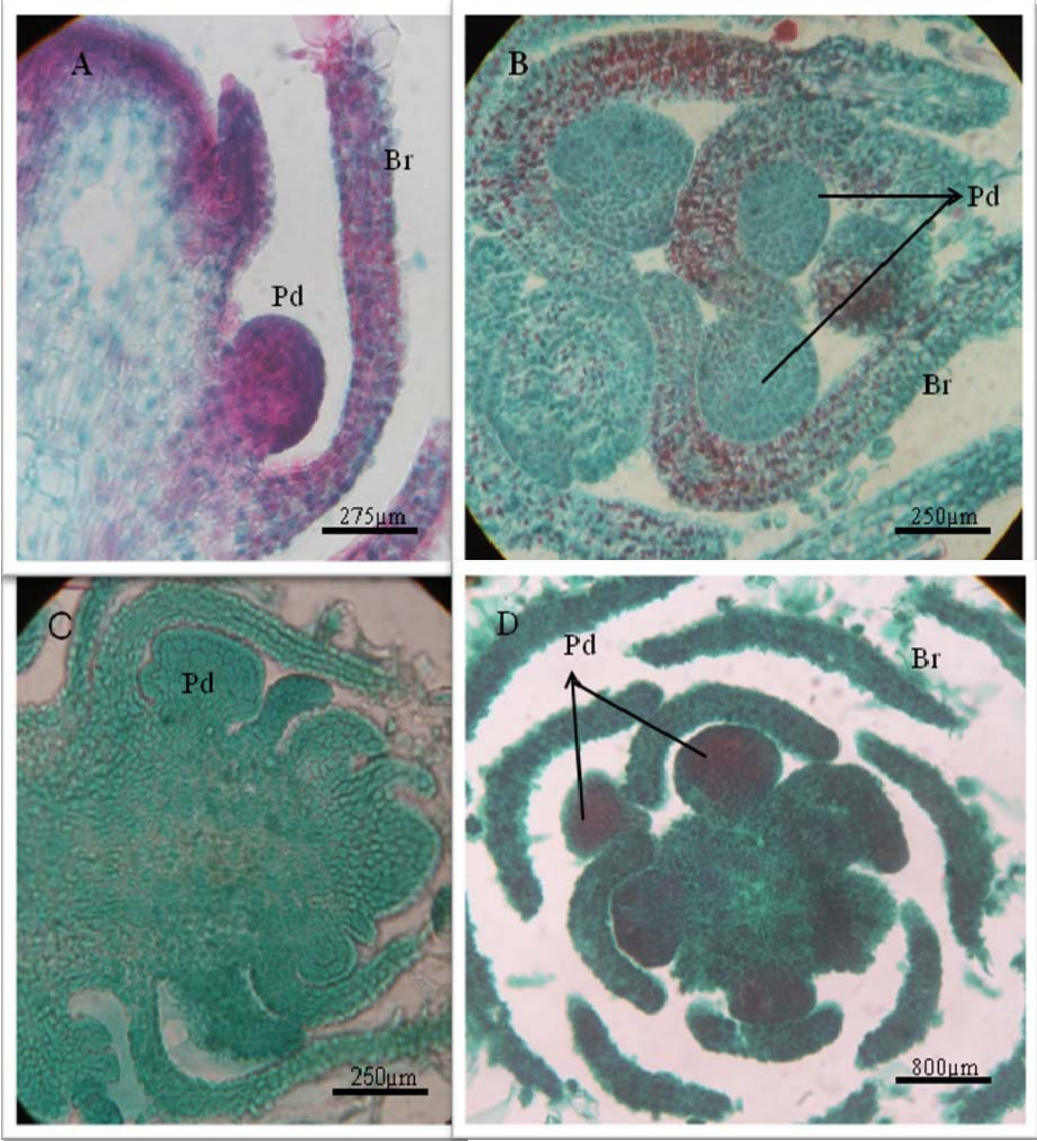
P: probabilidad

ND: no detectado

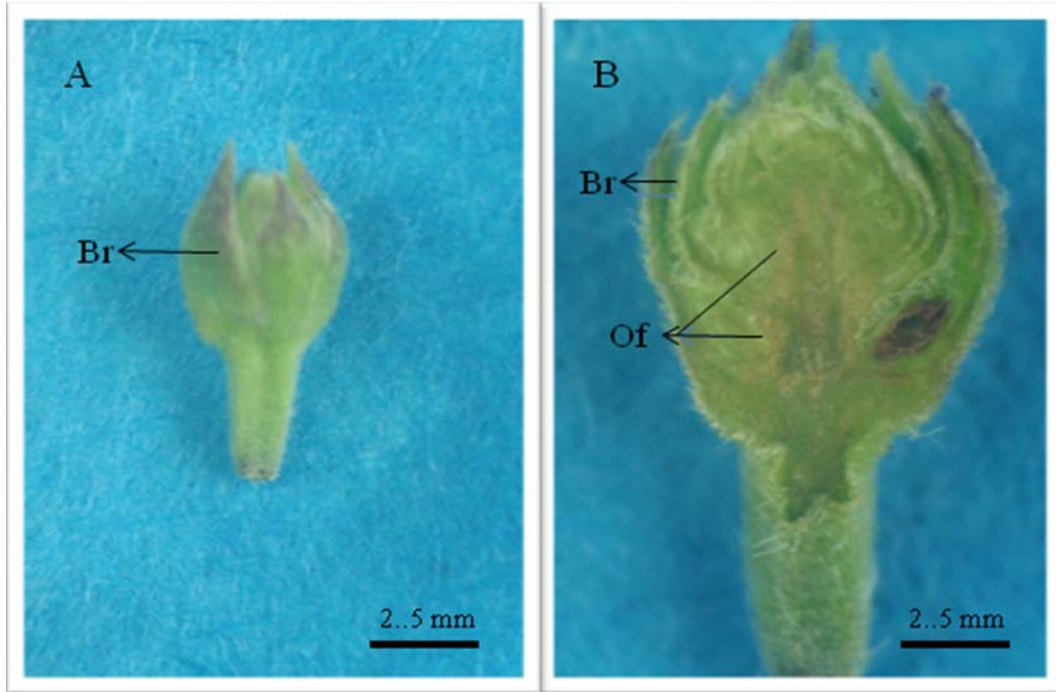
ANEXO B. Figura 1. Botón de flores característicos del estadio I (A), destacando la disposición en la rama (B). Abreviaturas: Bf: Botón floral; T: Tallo.



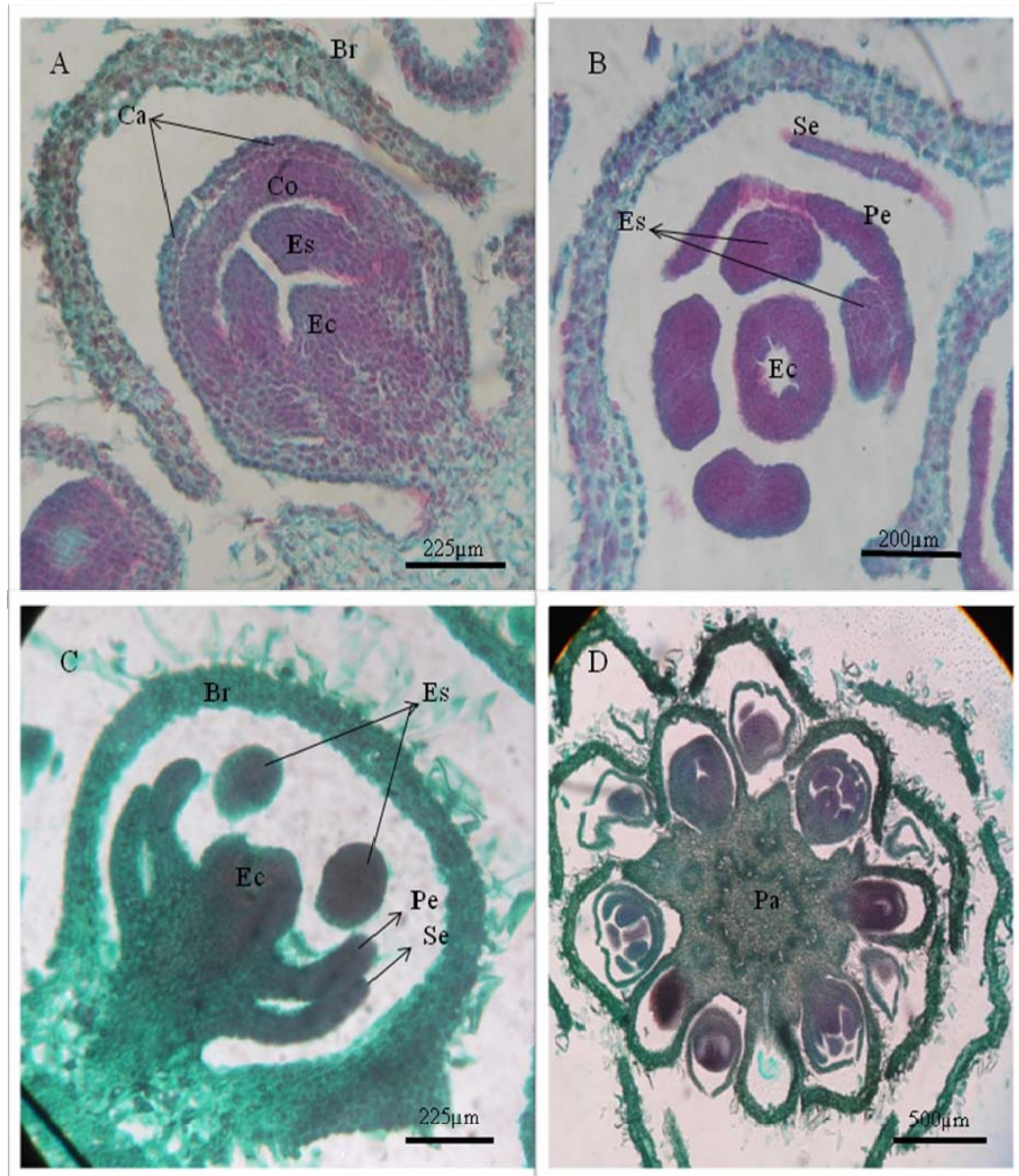
ANEXO C. Figura 2. Cortes longitudinales (A,B,C) y transversal (D) de las inflorescencias de *L. alba* en el estadio I. Abreviaturas: Pd: primordio en diferenciación; Br: Bráctea.



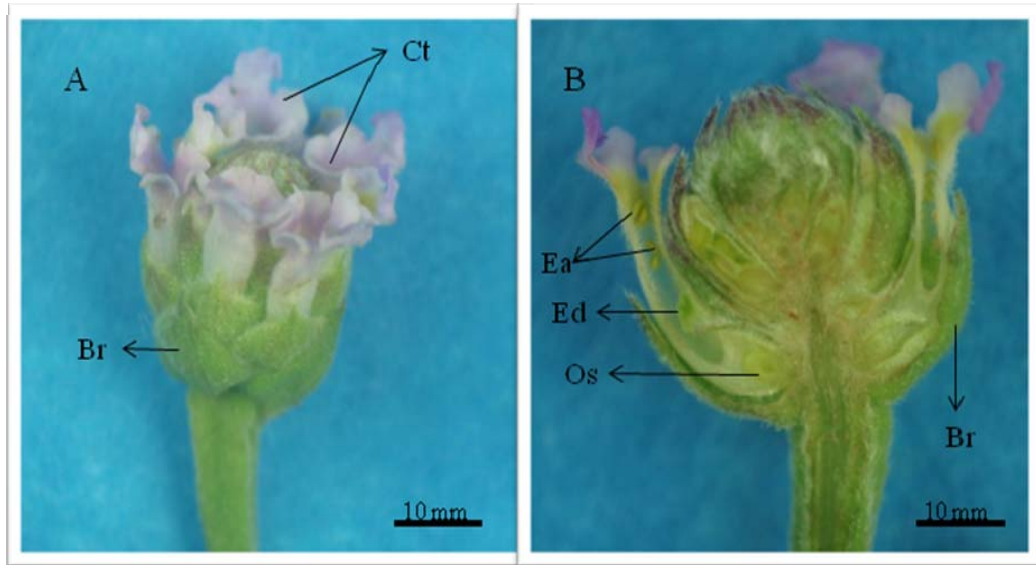
ANEXO D. Figura 3. Botones florales presentes en el estadio II (A), destacando corte longitudinal (B). Abreviaturas: Br: brácteas; Of: órganos en formación.



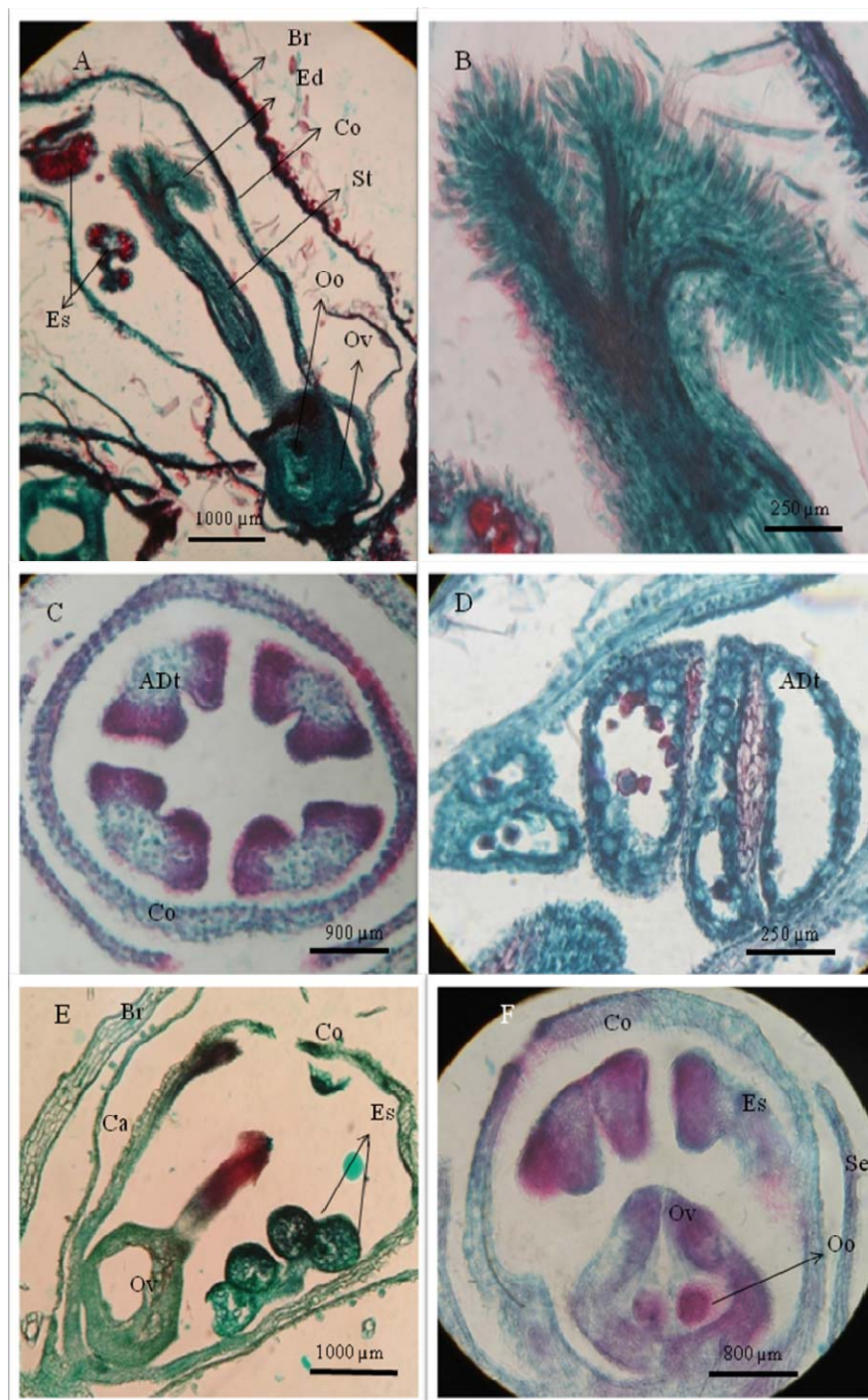
ANEXO E. Figura 4. Cortes longitudinales (A, C) y transversal (B, D) de las inflorescencias de *L. alba* en el estadio II. Abreviaturas: Br: Bráctea; Se: sépalos; Pe: pétalos; Es: estambres; Ec: estructura carpelar; Pa: parénquima.



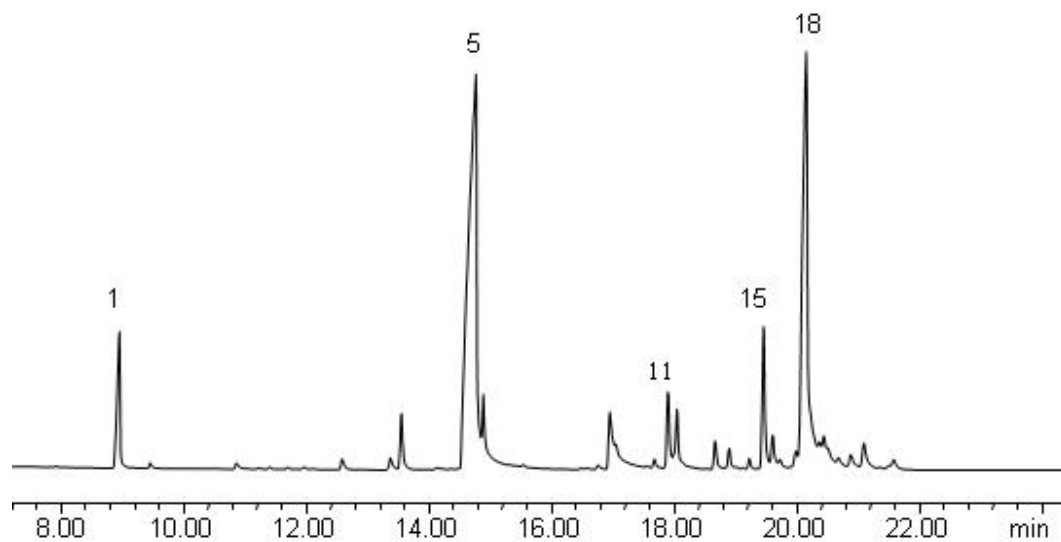
ANEXO F. Figura 5. Inflorescencias en su máximo desarrollo con flores abiertas (A), en las cuales se destacan los órganos completamente desarrollados correspondientes al estadio III (B).



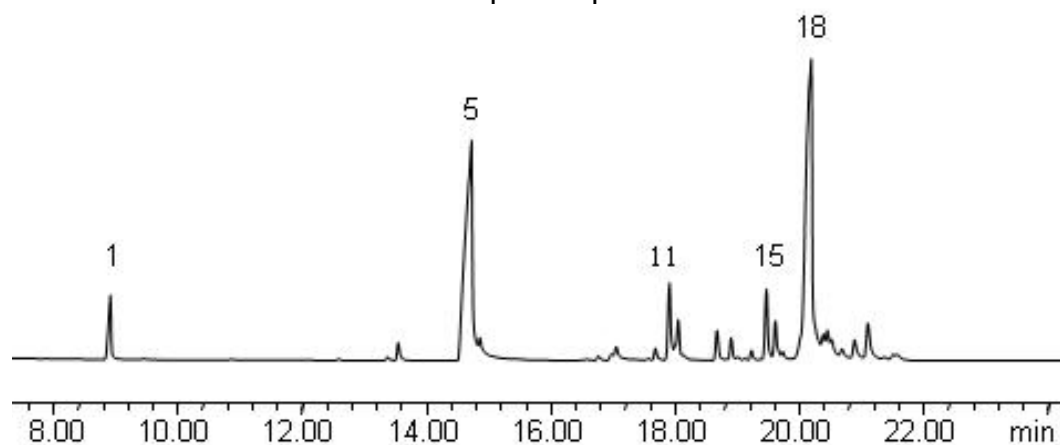
ANEXO G. Figura 6. Cortes longitudinales (A, B, D, E, F) y transversal (C) de las inflorescencias de *L. alba* en el estadio III. Abreviaturas: Br: Bráctea; Ed: estigma decurrente; Se: sepalos; Oo: ovulo; Ov: ovario; Co: corola; St: estilo; Ca: cáliz; ADt: anteras ditecas; Pi: pistilo; Es: estambres.



ANEXO H. Figura 7. Cromatograma (CG-MS) de los metabolitos secundarios volátiles de las inflorescencias de *L. alba*, estadio I, obtenido por HS-SPME. La identificación de los picos aparece en la tabla 1.



ANEXO I. Figura 8. Cromatograma (CG-MS) de los metabolitos secundarios volátiles de las inflorescencias de *L. alba*, estadio II, obtenido por HS-SPME. La identificación de los picos aparece en la tabla 1.



ANEXO J. Figura 9. Cromatograma (CG-MS) de los metabolitos secundarios volátiles de las inflorescencias de *L. alba*, estadio III, obtenido por HS-SPME. La identificación de los picos aparece en la tabla 1.

