

QK495
L25F5



**REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
POSTGRADO EN QUÍMICA DE MEDICAMENTOS
OPCIÓN PRODUCTOS NATURALES**



**ESTUDIO DE LOS COMPONENTES VOLÁTILES
DE TRES ESPECIES DEL GÉNERO *Hyptis*
(LAMIACEAE) Y DETERMINACIÓN DE SU
ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA**

*Trabajo presentado como requisito para optar al Grado de Magister Scientiae en
Química de Medicamentos*

**Farm: Mayalin Zorel Flores Marcano
Tutor: Dr. Alfredo Usubillaga**

MÉRIDA- VENEZUELA

Septiembre, 2013

DEDICATORIA

Mi Tesis de Maestría la dedico con mucho amor:

A Dios Padre Todopoderoso y a la Virgen María guías incondicionales, sin su amor y benevolencia no existiría merito alguno, mis mas sincera dedicatoria por su eterno amor y compañía.

A mis Padres Marina y Ovidio, merecedores de todos los éxitos y logros de mi vida, los amo y hoy quiero regalarles esta anhelada meta que finalmente obtuvimos juntos.

A mis hijos, Gianfranco, Gabriela y Carlos David, que día a día me inspiraron y motivaron para cumplir mis metas. Hoy dejo mis huellas marcadas para que cada día de sus vidas les sirva de guía y aprendan como mayor legado, que lo más importante en la vida luego del amor, es la constancia y perseverancia, sin ustedes nada de mi vida tendría sentido gracias por existir.

www.bdigital.ula.ve

AGRADECIMIENTOS

Mi gratitud:

A Dios y a la Virgen por todas sus bendiciones hoy y siempre.

A mis Padres fuente inagotable de amor y dedicación, hoy todos mis sueños y logros les pertenecen.

A mi Esposo Carlos Rafael por su apoyo y comprensión, pero sobre todo por enseñarme el valor de la perseverancia, gracias por siempre escucharme y apoyarme. Te amo

A mis hermanos Benjamin y Carlos Eduardo, espero de corazón haber sido un buen ejemplo, y les agradezco profundamente lo que día a día me ofrecen, deseo lo mejor del mundo para ustedes, gracias por siempre estar los amo.

A mi Tutor Profesor Alfredo usubillaga, fuente de admiración, gracias por su orientación y paciencia.

A mi Co-Tutora y amiga, Profesora Janne Rojas por su constancia y colaboración, fuente inagotable de conocimiento, realmente sin usted este trabajo no hubiese concluido, gracias “Teacher” por creer en mi, hoy y siempre cuente con mi más sincera e incondicional amistad.

A los Profesores Luis Rojas y María Lucena, excelentes profesionales y de gran dedicación que siempre conte con ustedes Gracias.

A mi amiga Silvana Villarreal, por los buenos y malos momentos que compartimos juntas que bellos recuerdos, te quiero mucho.

Al Ingeniero Juan Carmona y al Profesor Alex Cegarra, por su valiosa colaboración.

Al Post-Grado de Química de Mediamenos de la Facultad de Farmacia y a la Ilustre Universidad de los Andes por siempre abrirme sus puertas.

Y finalmente gracias a todas aquellas personas e instituciones que no haya mencionado, pero que de una u otra forma influyeron en la realización de este trabajo. **GRACIAS...**

RESUMEN

Aceites esenciales de las hojas de tres especies del genero *Hyptis*: *Hyptis colombiana* Epling, *Hyptis pectinata* L. e *Hyptis mutabilis*. L.C. Rich, (Lamiaceae) recolectadas en diferentes épocas comprendidas entre Febrero 2005 y Octubre del 2006, fueron analizados por CG/EM. Los aceites extraídos por hidrodestilación en las tres especies produjeron un 0.34% V/P de rendimiento promedio. Cincuenta y Cuatro, Treinta y uno y Treinta y nueve compuestos respectivamente fueron identificados por comparación de sus espectros de masas con la base de datos de la librería WILEY CG/EM, 6^{ta} edición y por sus índices de retención (IR). Los compuestos observados como mayoritarios presentaron semejanza en los aceites esenciales de las tres especies, los cuales fueron β -cariofileno y germacreno D, los mismos obtenidos en porcentajes mayores al 20%. Los Analisis de actividad antibacteriana mostraron inhibición del crecimiento en la cepas *S. aureus* y *E. faecalis* exhibiendo CIM entre 10 y 30 mg/mL. Este es el primer reporte sobre la composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Hyptis colombiana* Epling.

www.bdigital.ula.ve

ABSTRACT

Essential oils from leaves of three *Hyptis* species: *Hyptis colombiana* Epling, *Hyptis pectinata* L. and *Hyptis mutabilis* L.C. (Lamiaceae) collected in different times between February 2005 and October 2006 were analyzed by CG/EM. The oils extracted by hydrodistillation from the three species produced an average of 0.34 % V/W. Fifty four, thirty one and thirty nine compounds, respectively, were identified by comparison of their mass spectra with the library data base WILEY CG/EM 6th and by their retention indices (IR). Major compounds turned to be similar in the essential oil of the three species, these were β -caryophyllene and germacrene D, obtained in percentages higher than 20 %. The antibacterial activity assays showed grow inhibition on the *S.aureus* and *E. faecalis* cultures, exhibitions values between 10 and 30 mg/mL .This is the first report about the chemical composition and antibacterial activity of *Hyptis colombiana* Epling essential oil.

ÍNDICE DE CONTENIDO GENERAL

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN Y ABSTRACT	iv
ÍNDICE DE CONTENIDO GENERAL	v
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE ESQUEMAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	x
INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES	3
1.1 Distribución geográfica de la familia Lamiaceae en la sistemática botánica	3
1.2 Descripción botánica de la familia Lamiaceae y del género <i>Hyptis</i>	4
1.3 Distribución geográfica del género <i>Hyptis</i> en Venezuela y en los Andes	6
1.4 Estudios fitoquímicos y pruebas biológicas realizadas en algunas especies del género <i>Hyptis</i>	7
1.5 Características de los aceites esenciales	27
1.6 Localización de los aceites esenciales	27
1.7 Composición química de los aceites esenciales	28
1.7.1 Terpenos y sus derivados	28
1.7.2 Compuestos aromáticos derivados del fenilpropano	29
2. OBTENCIÓN DE LOS COMPONENTES PRESENTES EN EL ACEITE ESENCIAL	30
2.1 Destilación por arrastre de vapor	30
2.2 Hidrodestilación	32
2.3 Enfleurage	33
2.4 Extracción con solventes	34
2.5 Extracción con Fluidos Supercríticos	35
3. ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES PRESENTES EN EL ACEITE ESENCIAL	35

3.1 Cromatografía de gases	35
3.2 Espectrometría de masas	36
3.3 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	36
3.4 Cálculo de los Índices de Kováts	37
4. TÉCNICAS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN ACEITES ESENCIALES	38
4.1 Método de difusión con pozos	38
4.2 Método de difusión en agar con discos	39
4.3 Microorganismos usados en el ensayo	39
5. OBJETIVOS	41
5.1 Objetivo General	41
5.2 Objetivos Específicos	41
6 HIPOTESIS	42
7. PARTE EXPERIMENTAL	43
7.1 MATERIALES	43
7.1.1 Recolección del material botánico	43
7.2 METODOS	44
7.2.1 Acondicionamiento del Material Botánico	44
7.2.2 Obtención del aceite esencial	44
7.2.2.1 Metodología para la extracción de aceites esenciales	44
7.2.3 Técnica general aplicada para la identificación de los componentes químicos de los aceites esenciales	45
8. METODOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS BIOLÓGICOS	46
8.1 Ensayos de actividad antibacteriana realizados con los aceites esenciales obtenidos de las tres especies de <i>Hyptis</i> (Labiatae) en estudio	46
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
9.1 Análisis de los aceites esenciales obtenidos de las tres especies de <i>Hyptis</i> (Lamiaceae) estudiadas	50
9.1.1 Análisis de la especie <i>Hyptis mutabilis</i>	51
9.1.2 Análisis de la especie <i>Hyptis pectinata</i>	53

9.1.3 <i>Análisis de la especie Hyptis colombiana</i>	55
9.1.4 <i>Análisis comparativo de las tres especies de Hyptis estudiadas</i>	57
9.2 Ensayos de actividad antibacteriana realizados con los aceites esenciales de las tres especies de <i>Hyptis</i> estudiadas	59
9.2.1 Análisis de la actividad antibacteriana con el aceite esencial de las tres especies de <i>Hyptis</i> estudiadas	63
CONCLUSIONES	65
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXOS	82
ANEXOS I Fotos de las especies <i>Hyptis</i> estudiadas	83
ANEXOS II Cromatogramas de Gases de los Aceites esenciales de las especies investigadas.	85
ANEXO III Espectros de Masas de los compuestos mayoritarios observados en las especies de <i>Hyptis</i> Estudiadas.	96

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Características Botánicas del Género <i>Hyptis</i>	5
Figura 2 Distribución del Género <i>Hyptis</i> en los Andes Venezolanos	6
Figura 3 Estructura del isopreno	29
Figura 4 Bioformación de terpenos	29
Figura 5 Destilación por arrastre de vapor	31
Figura 6 Equipo de hidrodestilación	32
Figura 7 Técnica de Enfleurage	33
Figura 8 Extracción con solventes	34
Figura 9 Equipo de Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	37
Figura 10 <i>Hyptis mutabilis</i>	43
Figura 11 Acondicionamiento de placas	48
Figura 12 Siembra del inóculo del microorganismo	48
Figura 13 Introducción del papel impregnado con la muestra	48
Figura 14 Dilución de los microorganismos	49
Figura 15 Dilución de las muestras	49
Figura 16 Actividad del Aceite Esencial de <i>H. mutabilis</i> frente a <i>E. faecalis</i> a la concentración de 30 mg/mL.	60
Figura 17 Actividad del Aceite Esencial de <i>H. pectinata</i> frente a <i>S. aureus</i> a la concentración de 30 mg/mL.	61
Figura 18a Actividad del Aceite Esencial de <i>H. colombiana</i> frente a <i>S. aureus</i> las concentraciones de 20 y 10 mg/mL.	62
Figura 18b Actividad del Aceite Esencial de <i>H. colombiana</i> frente a <i>E. faecalis</i> a 30 mg/mL.	62

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Ubicación taxonómica de la familia Lamiaceae	4
Esquema 2. Extracción e identificación de los compuestos químicos obtenidos de los aceites esenciales de las especies de <i>Hyptis</i> ensayadas	46
Esquema 3. Diseño experimental de la actividad antibacteriana	47

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Composición química del aceite esencial de varias especies del género <i>Hyptis</i>	15
Tabla 2 Estudios fitoquímicos realizados con extractos en solventes orgánicos para diferentes especies del género <i>Hyptis</i>	23
Tabla 3 Fechas y pesos de las especies de <i>Hyptis</i> recolectadas	43
Tabla 4 Rendimiento de los aceites esenciales obtenidos de las tres especies de <i>Hyptis</i>	50
Tabla 5 Composición Química del aceite esencial de <i>Hyptis mutabilis</i>	51
Tabla 6 Composición Química del aceite esencial de <i>Hyptis pectinata</i>	54
Tabla 7 Composición Química del aceite esencial de <i>Hyptis colombiana</i>	56
Tabla 8 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del Aceite Esencial de <i>Hyptis mutabilis</i>	61
Tabla 9 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del Aceite Esencial de <i>Hyptis pectinata</i>	62
Tabla 10 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del Aceite Esencial de <i>Hyptis colombiana</i>	63

INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales son sustancias volátiles, en su mayoría insolubles en agua pero fácilmente solubles en alcohol, éter, aceites vegetales y minerales, raramente tienen color, su olor es característico, los índices de refracción son muy elevados, su densidad es inferior a la del agua y son líquidos a temperatura ambiente. Generalmente, dependiendo del grupo funcional que posean, pueden agruparse en: alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas, lactonas y óxidos (Bonicatto *et al.*, 2007).

Los aceites esenciales, se pueden encontrar en todos los órganos vegetales, flores (nardo), en las hojas (toronjil, laurel), raíces (vetiver), rizomas (jengibre), leños (sándalo), corteza (canela), frutos (anís) y semillas (nuez moscada) (Marcano y Hasegawa., 2002). Aunque todos los órganos de una misma especie vegetal pueden contener aceites esenciales, la composición de estos suele variar según su localización. Con respecto a su contenido, el rendimiento de los aceites esenciales es muy bajo, normalmente inferior a 1 %.

Por otro lado, los aceites esenciales han sido usados en diversas aplicaciones: baños para relajar, vigorizar y eliminar el estrés, masajes con tratamientos terapéuticos, inhalaciones para tratar los desordenes respiratorios, así como para el cuidado de la piel. Es por esto que se han convertido en el principal componente en la elaboración de perfumes y cosméticos debido a su agradable aroma. (Casamada, San Martin *et al.*, 1977)

A nivel industrial los aceites esenciales son la materia prima en la elaboración de productos de limpieza, para dar fragancia a los jabones, detergentes, desinfectantes y productos de uso hospitalario. En la industria alimentaría son de gran utilidad como saborizantes.

El presente manuscrito contiene una revisión bibliográfica sobre las especies del género *Hyptis* que han sido químicamente estudiadas, centrándose especialmente en su actividad medicinal, los metabolitos que son comunes entre las especies, las técnicas de extracción, el porcentaje de rendimiento y su posible aplicación fundamentada en las pruebas biológicas.

Asi mismo, se describe el estudio comparativo de los componentes volátiles de las especies *Hyptis colombiana* Epling, *Hyptis pectinata* L. Poit., e *Hyptis mutabilis* L.C. Rich, las cuales se encuentran en regiones montañosas de Merida, Venezuela sobre los 2000 m.s.n.m (Dominguez-Vásquez *et al.*, 2002) y su actividad antibacteriana frente a cepas ATCC, tanto Gram positivas como Gram negativas.

www.bdigital.ula.ve

1. ANTECEDENTES

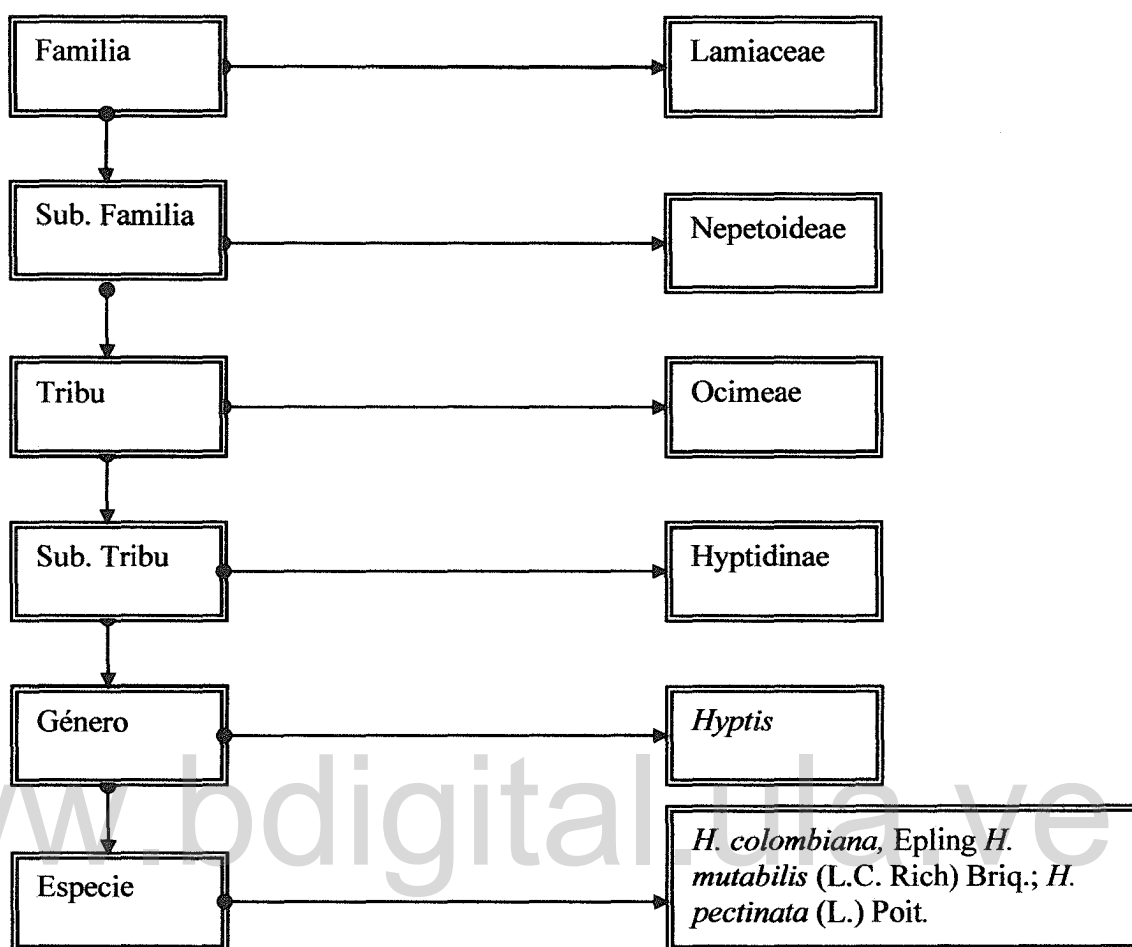
1.1 Distribución geográfica de la familia Lamiaceae en la sistemática botánica

La familia Lamiaceae, está compuesta por aproximadamente 220 géneros y 4000 especies casi cosmopolitas. En su mayoría son originarias de América Tropical (Domínguez-Vásquez *et al.*, 2002). Sin embargo, están ampliamente repartidas en Europa, principalmente en el área del Mediterráneo. Se divide en las siguientes subfamilias:

Ajugoidae, Chloanthoideae, Lamioideae, Nepetoideae, Pogostemonoideae, Scullarioideae, Symphorematoideae, Teucrioideae y Viticoideae, son 9 en total, perteneciendo el género *Hyptis* a la sub-familia Nepetoideae (L. Watson and M.L Dalwitz)

En Venezuela, está representada por 21 géneros y alrededor de 80 especies encontradas en todo el país, entre los 1000 y los 3600 m.s.n.m. Los géneros de más amplia distribución son *Hyptis*, *Leonotis*, *Leonurus* y *Salvia*, los demás se encuentran en la Cordillera de la Costa, la Cordillera de Los Andes, región de los llanos y Guayana (Domínguez-Vásquez *et al.*, 2002). Algunas especies de esta familia son cultivadas en Venezuela para fines culinarios. En la medicina popular ha sido de gran aplicación, y entre las plantas más utilizadas se pueden mencionar: *Lavandula angustifolia* Bubani., *Melissa officinalis* L., *Mentha arvensis* L., *Mentha piperita* L. var. *piperita*, *Mentha spicata* L., *Origanum majorana* L., *Origanum vulgare* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Salvia officinalis* L. Pall, *Teucrium chanaedrys* L. y *Thymus vulgaris* L. Willk. En el Esquema 1 se puede observar la ubicación taxonómica de esta familia.

Esquema 1. Ubicación taxonómica de las tres especies de *Hyptis* estudiadas



Tomado y modificado de Berry (1999)

1.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LA FAMILIA LAMIACEAE Y DEL GÉNERO *Hyptis*

La familia Lamiaceae está formada por hierbas o arbustos, rara vez árboles pequeños o de mediano tamaño como es el caso de *Hyptis arborea* Benth., que mide hasta 18 m. Presenta varios tipos de pelos, generalmente provistos de glándulas epidérmicas cortamente pedunculadas con aceites esenciales característicos y tallos cuadrangulares (Catino *et al.*, 1992).

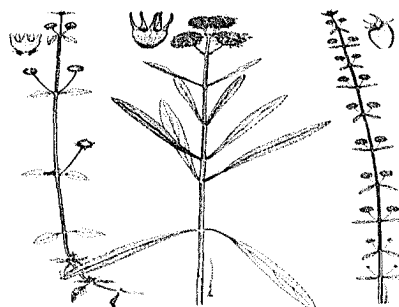
Sus hojas son opuestas, algunas veces verticiladas, simples u ocasionalmente pinnaticompuestas con estípulas ausentes. Las flores se presentan en inflorescencias en pequeñas cimas en la axila de brácteas u hojas. Las cimas axilares a menudo reducidas a una flor y la inflorescencia es esencialmente un racimo. Flores a menudo bracteoladas, hermafroditas o algunas unisexuales (D.Velazquez; N. Ramirez; et al; 1997)

Las plantas pertenecientes al género *Hyptis* se presentan como hierbas de hasta 90 cm, en general muy aromáticas. El género comprende plantas de gran diversidad, variando de anual efímera, hasta pequeños árboles. Predominantemente sub-arbustos o hierbas perennes naciendo a menudo de un tallo leñoso; hojas también variables, generalmente ovadas y bastante amplias, pecioladas o sésiles, las de algunas especies son laciniadas. Las flores sésiles o pediceladas, en verticilastros de flores fascículas o cimas escorpiodeas, englomerados sésiles o pedunculados, (Fig 1.)

La corola blanca o lila, tubular, bilabiada, labio superior sub-erguido, expandido, labio inferior con dos lóbulos laterales y en lóbulo central estilo apenas bifido o sub entero (Acta botánica 1997). El cáliz rara vez bilabiado, generalmente con 5 dientes sub-iguales, triangulares o lineares, agudos o sub-lobulados.

Figura 1: Características Botánicas del Género *Hyptis*

(Hojas, Flores y Cáliz)



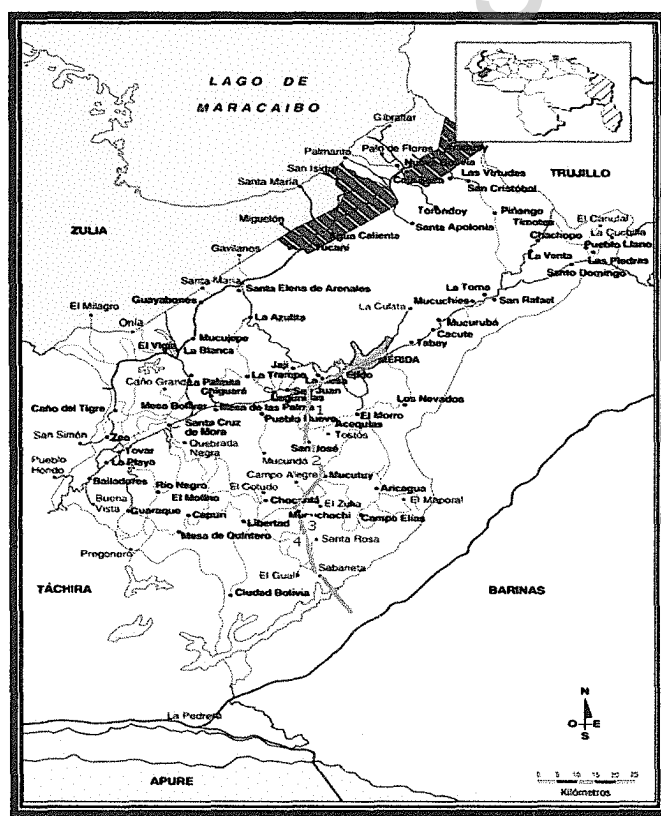
Tomado de Berry (1999)

1.3 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DEL GÉNERO *Hyptis* EN VENEZUELA Y EN LOS ANDES

Este género está representado en Venezuela por 23 especies, entre las cuales las más comunes son *H. brachiata* Briq; *H. dilatata* Benth; *H. lantanifolia* Poit; *H. mutabilis* L.C. Rich. Briq.; *H. pectinata* L. Poit; *H. sinuata* Pohl ex Benth. e *H. suaveolens* L. Poit. Todas ellas están distribuidas en el país, tanto en lugares sombreados, como expuestos y alterados, entre los 10 y 1800 msnm, aproximadamente (Jacq. *et al.*, 1786).

Cabe destacar que se han observado especies de *Hyptis* presentes en el interior de la Sierra Nevada, en los pueblos del sur, y en los alrededores de Mérida a partir de San Juan de Lagunillas, Mucuchachí y hacia Santa Bárbara de Barinas. Entre las especies más importantes, recolectadas están: *H. atrorubens*. Poit, *H. colombiana* Epling., *H. mutabilis* (L.) Rich, y *H. pectinata* (L.) Poit. Ver Fig. 2 (Jacq. *et al.*, 1786).

FIGURA 2. Distribución del Género *Hyptis* en los Andes (Mérida, Venezuela)

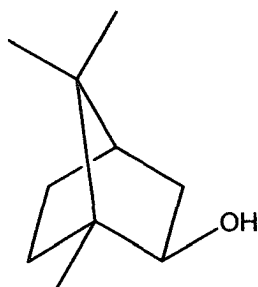


El trazo en verde marca la ruta seguida en la búsqueda de las especies y el color rojo los puntos en los cuales se recolectaron. El N° 1 corresponde a *H. pectinata*; el 2 a *H. colombiana*; el 3 a *H. mutabilis* y el 4 a *H. atrorubens*.

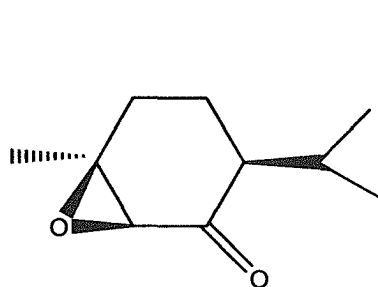
1.4 ESTUDIOS FITOQUÍMICOS Y PRUEBAS BIOLÓGICAS REALIZADAS EN ALGUNAS ESPECIES DEL GÉNERO *Hyptis*

Las plantas del género *Hyptis* son comúnmente utilizadas en medicina tradicional; por esta razón, se han realizados diversos estudios fitoquímicos de algunas de sus especies. El presente trabajo resume los reportes de 54 referencias sobre el estudio de los aceites esenciales de diferentes especies del género, siendo la más estudiada el *H. suaveolens* L. Point.

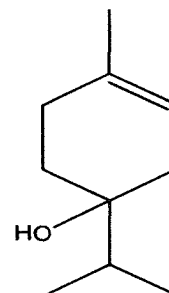
En la Tabla 1 (pag.15), se presentan los resultados de los estudios sobre aceites esenciales de las especies de *Hyptis* que han sido reportados en la literatura. En un estudio del aceite esencial de *H. capitata* Jacq, planta endémica del sur de La India, se demostró que ha sido utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de resfriados, fiebres, asma y enfermedades causadas por hongos, en el mismo estudio se demostró que esta especie contenía en su aceite esencial como componentes mayoritarios borneol (1) 16,7%, oxido de piperitona (2) 14,8% y 4-terpineol (3) 11% (Thoppil y Ernest, 1995).



(1)



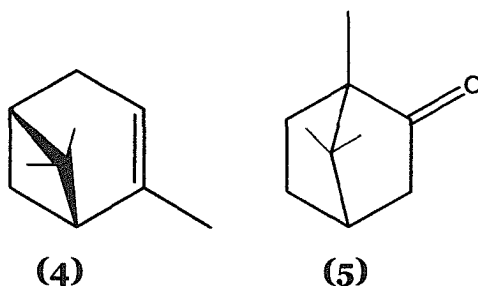
(2)



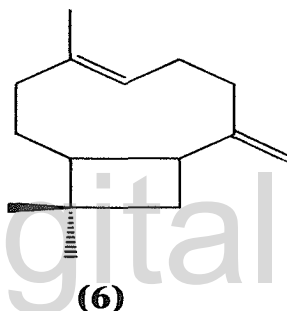
(3)

Con respecto a *H. crenata* Pohl, se encontraron dos estudios realizados en plantas recolectadas en épocas distintas y en diferentes regiones de Brasil. Pudo observarse una variación en el rendimiento de los aceites esenciales, sin embargo, la composición del aceite es muy similar (Scramin *et al.*, 2000). A diferencia de un estudio realizado en

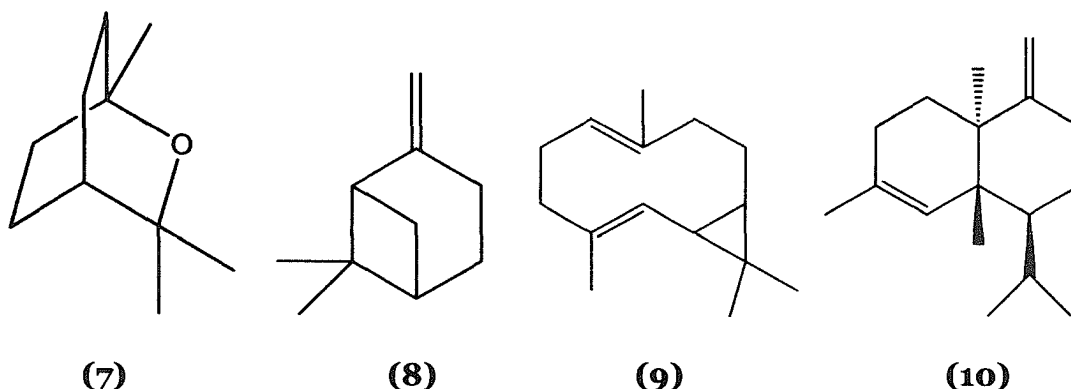
Mato Grosso, Brasil, donde esta especie presentó como principales constituyentes α -pineno (4) y alcanfor (5)

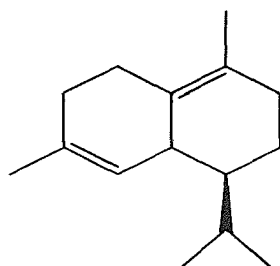


Con relación a los aceites esenciales de *H. floribunda* Briq., *H. glomerata* Mart. y *H. goyazensis* Hil., es importante resaltar que algunos metabolitos como el β -cariofileno (6), son comunes en las tres especies descritas. (Gottlieb *et al.*, 1981).

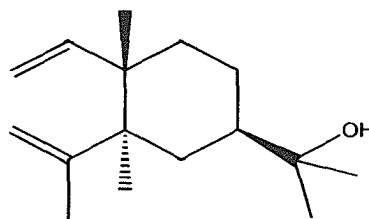


En otro estudio del aceite esencial de *H. goyazensis* Hil., recolectada en Amazonas, reportaron 1-8-cineol (7) 23,9%, borneol (1) 13% y β -pineno (8) 8,4% (Gottlieb *et al.*, 1981) y en *H. floribunda* Briq., se reportaron como principales constituyentes, biciclogermacreno (9) 37,8%, γ -cadineno (10) 17,9%, δ -cadineno (11) 10,7%, α -elemol (12) 11,4% (López *et al.*, 2002; Dellacassa *et al.*, 1997).





(11)



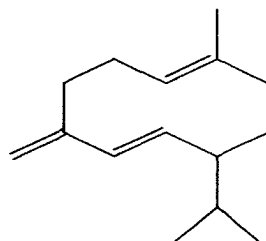
(12)

En un estudio reciente del *H. spicigera* Lam. utilizada para aliviar dolores de cabeza y resfriados, realizado en Nigeria reportaron como compuestos mayoritarios α -pineno (4) 12,16%, β -pineno (8) 9,47% y α -felandreno (13) 10,2%. Además, presentó actividad tripanomisida contra *Tripanosoma brusei-brusei* a una concentración de 0,5% $\mu\text{g/mL}$ antes de los 6 minutos de exposición (Ladan *et al.*, 2011).



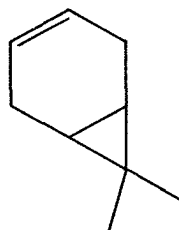
(13)

El aceite esencial de la especie *H. fruticosa* Salzm. presentó como componentes principales 1,8-cineol (7) 16,9%, biciclogermacreno (9) 12,3%, α -pineno (4) 11,3% y β -cariofileno (6) 8,8% (Gottlieb *et al.*, 1981). La especie *H. lanceolata* Poir., presenta actividad antifúngica (Zollo *et al.*, 1998) mientras que en el aceite esencial de esta especie procedente de Camerún se reportó β -cariofileno (6) y gemacreno D (14) como componentes mayoritarios (Tchoumboungang *et al.*, 2005).



(14)

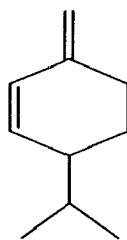
Por otro lado, el estudio de la especie *H. martiusii* Benth., se enfocó en su actividad insecticida contra *Aedes aegypti* y *aergentifollii* demostrando actividad insecticida (Araujo *et al.*, 2003); los componentes volátiles reportados fueron 1,8-cineol (7) 24,3% y δ -3-careno (15) 23% (Araujo *et al.*, 2003).



(15)

Para *H. mutabilis* L.C. Rich., se ha demostrado que previene y reduce la formación de úlceras en la mucosa gástrica, a través de ensayos en ratas con úlceras inducidas por Indometacina (Barbosa y Ramos, 1992). Llama la atención la diversidad del contenido metabólico de esta especie, quizás pueda deberse al hecho que la variación se dé con relación a los factores climáticos, la calidad del suelo y la biodisponibilidad de nutrientes, variables que sin lugar a duda como se verá más adelante en esta discusión, guardan estrecha relación (Bailac *et al.*, 1999). El primer estudio en publicar la composición del aceite esencial de *H. mutabilis* L.C. Rich., fue realizado en Brasil mostrando el β -cariofileno (6) como el componente mayoritario de esta especie con un 65,01% (Wener, 1933). Para 1981 se reportó para un aceite obtenido en Mato Grosso (Brasil) el β -cariofileno (6) en menores concentraciones 13,1% (Gottlieb *et al.*, 1981). Una muestra de aceite de la misma especie recolectada en Cordoba (Argentina) mostró que la

concentración de β -cariofileno (**6**) era de 1,4% (Velasco *et al.*, 1995). Otro estudio para la misma especie recolectada en la región de Amazónica de Venezuela reportó α -felandreno (**13**) 18,4% α -pineno (**6**) 16,8%, β -pineno (**8**) 7,1%, β -felandreno (**16**) 7,1% como los principales componentes (Luz *et al.*, 1984).

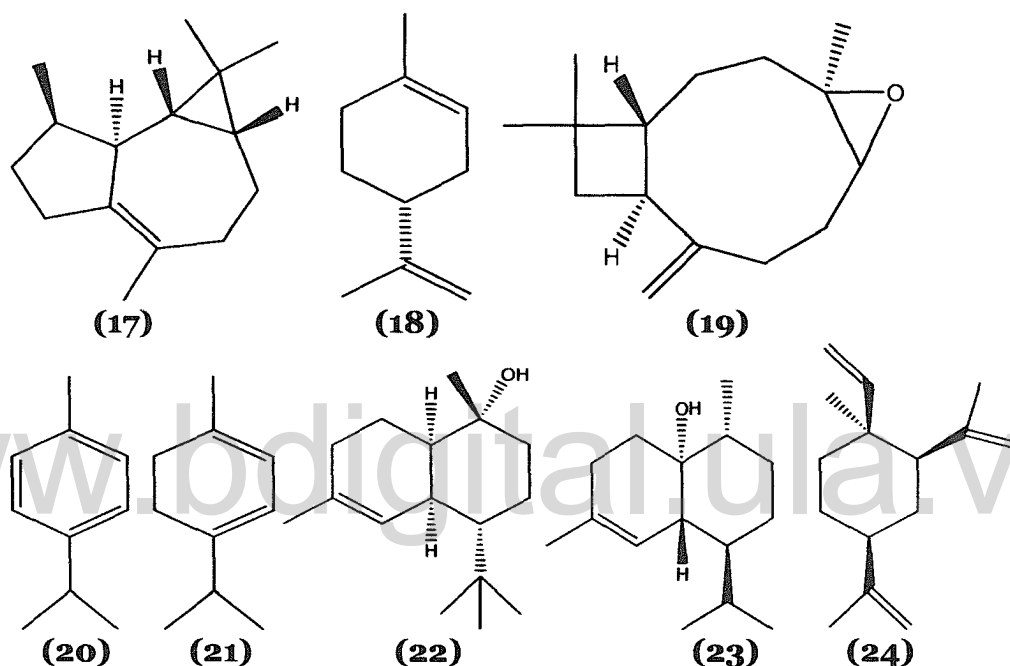


(16)

En el caso de *H. ovalifolia* Benth., el estudio consistió en la evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* contra varias especies de dermatofitos, donde se observó inhibición del crecimiento de los hongos empleados en el bioensayo (Souza *et al.*, 2003).

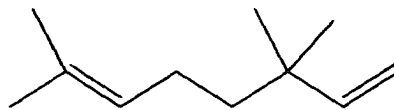
Los estudios realizados al aceite esencial de *H. pectinata* L. Poit., especie que presenta actividad insecticida eficaz contra el escarabajo Cowpea (*Callosobruchus maculatus*), reportaron α -pineno (**4**) 15,3%, ledeno (**17**) 15,1%, limoneno (**18**) 11,1%, como componentes mayoritarios (Tucker *et al.*, 2005). Mientras que en un estudio realizado en Brasil, con la misma especie encontraron β -cariofileno (**6**) 28,3%, oxido de cariofileno (**19**) 28% y β -pineno (**8**) 7% como componentes mayoritarios (Nascimento *et al.*, 2008). En África reportaron, para la misma especie, *p*-cinemo (**20**) 33,8% y α -terpineno (**21**) 8,9% como constituyentes mayoritarios (Malan *et al.*, 1988); Otro estudio en São Critovão, Brasil reportaron α -muurolol (**22**) 25,5%, cubenol (**23**) 11,4%, germacreno D (**14**) 28% y β -cariofileno (**6**) 22,1% (Tchoumboungang *et al.*, 2005).

En las Islas Fiji reportaron β -cariofileno (**6**) 28%, germacreno D (**14**) 31,4%, biciclogermacreno (**9**) 13,6%, β -elemeno (**24**) 13,2%, como constituyentes mayoritarios (Brophy *et al.*, 1987). En India se encontraron β -cariofileno (**6**) 15% y Sabineno 20% como los dos principales constituyentes del aceite esencial del *H. pectinata* L. Poit., (Pietschmann *et al.*, 1998).



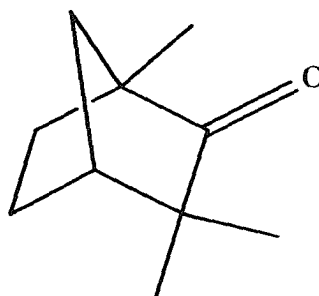
El aceite esencial de *H. suaveolens* L. Poit., presenta una notable variación en su composición, aparentemente, dicha variabilidad está relacionada al sitio de recolección y a la susceptibilidad ante el ataque de insectos (Asekun *et al.*, 1999). Esta es una de las especies cuyo aceite ha sido más estudiado y se le han realizado pruebas de su actividad larvica contra el *Aedes aegypti* (Asekun *et al.*, 2000). Por otra parte *H. suaveolens* L. Poit., también demostró actividad herbicida frente al *Sorghum bicolor* (Singh *et al.*, 1997). Pruebas *in vitro* reportaron que presentó actividad antimalárica contra el *Plasmodium falciparum* cultivado en eritrocitos. Otros estudios realizados a diferentes

aceites esenciales de las especie *H. suaveolens* L. Poit., recolectados en diferentes estados de Nigeria indicaron que existen al menos 5 quimiotipos de esta planta observándose los componentes *p*-cimenol (20), limoneno (18), linalol (25), α -pineno (4), α -felandreno (13) como componentes mayoritarios (Madden *et al.*, 1995).



(25)

Un análisis realizado con diferentes aceites esenciales de la especie de *H. suaveolens* L. Poit., demostró que contenía 1,8-cineol (7) como constituyente mayoritario en las diferentes recolecciones realizadas: en California (38,07%), (Mukhtar *et al.*, 1994); en Australia (32%), (Mabberley, 1987); en Venezuela (29,1%), (Rivas *et al.*, 2002) y en Aruba (27,4%), (Rana *et al.*, 2004). Otros estudios muestran que los constituyentes mayoritarios encontrados en las regiones anteriormente mencionadas difieren de los reportados para las muestras de Asia y África, donde el componente mayoritario es el β -cariofileno (6), (McNeil *et al.*, 2010). Por otro lado, estudios realizados en El Salvador indican la presencia de fenchona (26), en las hojas e inflorescencias de *H. suaveolens* L. Poit., (Grassi *et al.*, 2005) y también fue aislada en un aceite esencial de *H. suaveolens* estudiado en Aruba (Fun y Suenndsen 1990).



(26)

Por otro lado, una evaluación de las propiedades anti-alimentarias del aceite esencial de *H. suaveolens* L. Poit., fué realizado contra el *Tribolium castaneum* (gorgojo de la harina) y *S. oryzae* (gorgojo del arroz) mediante bioensayos de una vía con DDA (Discos Artificiales de Harina) (Ziegler *et al.*, 2002). Otros estudios reportan actividad insecticida contra *Anopheles gambiae* (Seyoum *et al.*, 2002), y actividad antimicrobiana contra el *Mucor* sp. (Malele *et al.*, 2003).

El *H. velutina* Pohl., presenta una composición química similar al *H. lanceolata* Poir. (timol (**27**)) y *H. suaveolens* L. Poit., (β -pineno (**8**)), por lo que se puede inferir que algunas de las propiedades que presentan estas especies, podrían estar presentes en la especie *H. velatina* (Batista *et al.*, 2003).

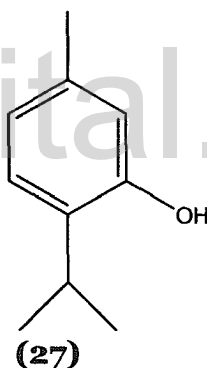


TABLA 1. Composición química del aceite esencial de varias especies del género *Hyptis*

Especie	Compuestos Aislados	Pruebas biológicas	Referencia
<i>H. capitata</i> Jacq	Borneol, oxido de piperitona, 4-terpineol	No se reportaron	Thoppil y Ernest (1995)
<i>H. capitata</i> Jacq	Acetato citronelilo de, β -cariofileno, oxido piperitona	No se reportaron	Thoppil y Joseph (1997)
<i>H. crenata</i> Pohl	α -pineno	No se reportaron	Stadnik <i>et al.</i> (2003)
<i>H. crenata</i> Pohl	Terpinoleno, β -cariofileno, 1,8 cineol, borneol y 3-cariofileno, α pineno, limoneno y β -pineno	No se reportaron	Zoghbi <i>et al.</i> (2002)
<i>H. crenata</i> Pohl	1,8- cineol, alcanfor y β -cariofileno	No se reportaron	Scramin <i>et al.</i> (2000)
<i>H. crenata</i> Pohl	No se reportaron	Prueba de inhibición de la gelatinaza. Evita la degradación de elastina y otras membranas de la piel.	Kobayashi <i>et al.</i> (2001)
<i>H. floribunda</i> Briq	β -cariofileno, germacreno B y D, α copano	No se reportaron	Dellacasa <i>et al.</i> (1997)
<i>H. floribunda</i> Briq (Argentina)	biciclogermacreno, γ -cadineno, δ -cadineno y Elemol	No se reportaron	López <i>et al.</i> (2002)
<i>H. glomerata</i> Hort (Brasil)	cariofileno, δ -cadineno, guaiol, cis-calameno y globulol	No se reportaron	Silva <i>et al.</i> (2000)
<i>H. goyazensis</i> Hil	1-8-cineol, Borneol y β -pineno	No se reportaron	Gottlieb <i>et al.</i> (1981)
<i>H. goyazensis</i> Hil	α -pineno, mirceno, y β -cariofileno	No se reportaron	Luz <i>et al.</i> (1984)

Continuación Tabla 1 Composición química del aceite esencial de varias especies del género *Hyptis*

Espece	Compuestos Aislados	Pruebas biológicas	Referencia
<i>H. lanceolata</i> Poir	timol, carvacrol, linalol, δ -terpineno, <i>p</i> -cimenol, 1,8 cineol, cineol y fenchol	Actividad antifúngica. Método Micro atmosférico	Zollo <i>et al.</i> (1998)
<i>H. lanceolata</i> Poir	β -cariofileno y gemacreno D	No se reportaron	Tchoumboungang <i>et al.</i> (2005)
<i>H. martiussi</i> Benth	δ -3-carenenol, 1,8-cineol β -cariofileno y biciclogermacreno	Pruebas insecticidas contra <i>A. aegypti</i> (larvas) y <i>B. aargentifollii</i>	Araujo <i>et al.</i> (2003)
<i>H. martiussi</i> Benth	1,8 cineol y δ -3-careno	No se reportaron	Araujo <i>et al.</i> (2003)
<i>H. mutabilis</i> L.C. Rich (Brasil)	β -cariofileno	No se reportaron	Werner HW. (1933)
<i>H. mutabilis</i> L.C. Rich (Brasil)	α -cubebeno, α -copano, β -burbureno, β -elemeno, β -cariofileno, α -humuleno, β -cucubeno, calamaneno y 7 compuestos no identificados	Prevención y reducción de la formación de las úlceras en la mucosa gástrica. Pruebas en ratas con úlceras inducidas por Indometacina	Barbosa y Ramos (1992)
<i>H. mutabilis</i> L.C. Rich (Argentina)	β -cariofileno, alcanfor, mircenona, cis- dihidrocarbóna y trans-dihidrocarbóna	No se reportaron	Velasco <i>et al</i> (1995)
<i>H. mutabilis</i> L.C. Rich (Brasil)	α -pineno, mirceno y β -cariofileno α -felandreno, α -pineno, β -pineno y β -felandreno	No se reportaron	Luz <i>et al.</i> (1984)
<i>H. mutabilis</i> L.C. Rich (Argentina)	β -cariofileno, germacreno D, curzereno biciclogermacreno. Notable variación del rendimiento, relativo al tiempo de recolección.	No se reportaron	Bailac <i>et al.</i> (1999)
<i>H. mutabilis</i> L.C. Rich	β -cariofileno	No se reportaron	Gottlie <i>et al.</i> (1981)

Continuación Tabla 1 Composición química del aceite esencial de varias especies del género *Hyptis*

Especie	Compuestos Aislados	Pruebas biológicas	Referencia
<i>H. ovalifolia</i> Benth.	No se reportaron	Evaluación de la actividad antifúngica in vitro contra especies de dermatofitos.	Souza <i>et al</i> (2003)
<i>H. pectinata</i> L. Poit	β -cariofileno, germacreno, Biciclogermacreno y β -elemeno	No se reportaron	Brophy <i>et al.</i> (1987)
<i>H. pectinata</i> L. Poit	<i>p</i> -cimeno, timol, δ -terpineno, α -tujeno y mirceno	No se reportaron	Malan <i>et al.</i> (1988)
<i>H. pectinata</i> L. Poit	β -cariofileno, Sabineno	No se reportaron	Pietschmann <i>et al.</i> (1998)
<i>H. pectinata</i> L. Poit	β -cariofileno, óxido de cariofileno y Monoterpenos	No se reportaron	Jirovet <i>et al.</i> (1999)
<i>H. pectinata</i> L. Poit	α -pineno, ledeno, limoneno	No se reportaron	Jirovetz y Ngassoum (1999)
<i>H. pectinata</i> L. Poit	α -muurolol, β -cariofileno, cubenol, Germacreno D y β -cariofileno	No se reportaron	Tchoumboungang <i>et al.</i> (2005)
<i>H. pectinata</i> L. Poit	β -cariofileno, oxido de carifileno, β -pineono	No se reportaron	Nascimento <i>et al.</i> (2008)
<i>H. recurvata</i> Poit	eugenol	No se reportaron	Zoghbi <i>et al.</i> (2002)
<i>H. fruticosa</i> Salzm	1,8-cineol, biciclogermacreno, α -pineno, β -cariofileno	No se reportaron	Gottlieb <i>et al.</i> (1981)
<i>H. lanceolata</i> Salzm	β -cariofileno y gemacreno D	No se reportaron	Tchoumboungang <i>et al.</i> (2005)
<i>H. recurvata</i> Point.	eugenol, 1,8-cineol	No se reportaron	Delgado <i>et al.</i> (2000)
<i>H. spicigera</i> Lam	β -cariofileno, 1,8-cineol, β -pínenos y sabineno	No se reportaron	Chalchat <i>et al.</i> (1997)

Continuación Tabla 1 Composición química del aceite esencial de varias especies del género *Hyptis*

<i>H. spicigera</i> Lam (Camerún)	Terpinoleno, sabineno, α -tujeno, linoneno y terpinen-4-ol.	No se reportaron	Jirovetz <i>et al.</i> (2000)
<i>H. spicigera</i> Lam (Mali)	β -cariofileno, α -terpineno y β -pineno	No se reportaron	Sibidé <i>et al.</i> (2001)
<i>H. spicigera</i> Lam	No se reportaron	Insecticida, eficaz contra el escarabajo Cowpea (<i>Callosobruchus maculatus</i>)	Boeke <i>et al.</i> (2004)
<i>H. spicigera</i> Lam	α -pineno, β -pineno, α -felandreno	Actividad tripanomicida	Ladan <i>et al</i> (2011)
<i>H. suaveolens</i> L. Poit	β -carrofileno	No se reportaron	McNeil <i>et al.</i> (2010)
<i>H. suaveolens</i> L. Poit (Australia)	1,8-cinerol	No se reportaron	Mabberley <i>et al</i> (1987)
<i>H. suaveolens</i> L. Poit	No se reportaron	Antibiótico de amplio espectro, contra bacterias gran (+) y (-). Pruebas en cultivos de agar sangre	Singh <i>et al.</i> (2001)
<i>H. suaveolens</i> L. Poit	sabineno, limoneno, biciclogermacreno, β -felandreno y 1,8-cineol	No se reportaron	Azevedo <i>et al.</i> (2001)
<i>H. suaveolens</i> L. Poit	fenchona	No se reportaron	Fun <i>et al.</i> (1990)
<i>H. suaveolens</i> L. Poit	p -cimeno, limineni, linalol, α -pineno, α -felandreno	No se reportaron	Madden <i>et al</i> (1995)
<i>H. suaveolens</i> L. Poit	sabineno, β -cariofileno y trans- α bergamoteno	No se reportaron	Sibibé, <i>et al.</i> (2001)
<i>H. suaveolens</i> L. Poit	sabineno, β -pineno, limoneno, p -cimeno β -cariofileno, cis- α -bergamoteno.	No se reportaron	Ngassoum <i>et al.</i> (1999)
<i>H. suaveolens</i> L. Poit	espatulenol, 1,8-cineol y (E)-cariofileno	No se reportaron	Azevedo, <i>et al.</i> (2002)

Continuación Tabla 1 Composición química del aceite esencial de varias especies del género *Hyptis*

Espece	Metabolitos Aislados	Pruebas biológicas	Referencia
<i>H. suaveolens</i> L. Poit	No se reportaron	Actividad Antifúngica. Inhibe la reproducción del <i>S. esclerotial</i> (soil-born). Pruebas en plantaciones de arroz.	Singh y Handique (1997)
<i>H. suaveolens</i> L. Poit	α - pineno, Mirceno y β -cariofileno	No se reportaron	Luz <i>et al.</i> (1984)
<i>H. suaveolens</i> L. Poit	β - cariofileno, β -pineno, terminen-4-ol. Trans- α -bergamoteno	No se reportaron	Asekun <i>et al.</i> (2000)
<i>H. suaveolens</i> L. Poit	sabineno, trans- α -bergamoteno, terminen-4-ol, α -pineno, β -cariofileno	Actividad antibacterial. Pruebas de difusión en disco de agar con bacterias gram(+) y (-)	Asekun <i>et al.</i> (1999)
<i>H. suaveolens</i> L. Poit (Australia)	Monoterpenos, sesquiterpenos. di y triterpenos, glicósidos flavonoides, aglutininas, ácidos grasos y lactonas	Actividad antifúngica. Pruebas biológicas <i>in vitro</i> con cepas de hongos, reproducidas en laboratorio de <i>A. flavos</i> , <i>C. falcatam</i> y <i>E. moniliforme</i>	Singh y Upadhyay (1992)
<i>H. suaveolens</i> L. Poit (California)	1,8-cineol	No se reportaron	Mukhtar <i>et al.</i> (1994)
<i>H. suaveolens</i> L. Poit	1,8-cineol, β -cariofileno	No se reportaron	Peerzada (1997)
<i>H. suaveolens</i> L. Poit	sabineno y β -cariofileno	Pruebas de inhibición <i>in vitro</i> de algunos hongos como: <i>M. canis</i> , <i>F. calmurum</i> , <i>T. mentagrofites</i>	Menghini <i>et al.</i> (1996)
<i>H. suaveolens</i> L. Poit	citronelilo acetato, β -cariofileno, óxido piperitona	No se reportaron	Thoppil y Ernest <i>et al.</i> (1995)
<i>H. suaveolens</i> L. Poit	eugenol y germacreno D	No se reportaron	Hac <i>et al.</i> (1996)
<i>H. suaveolens</i> L. Poit	fenchona, linalol, mentol y eugenol.	No se reportaron	Malonianga <i>et al.</i> (1996)

Continuación Tabla 1 Composición química del aceite esencial de varias especies del género *Hyptis*

Especie	Composición Aislados	Pruebas biológicas	Referencia
<i>H. suaveolens</i> L. Poit	No se reportaron	Variación de la composición de los aceites esenciales, relativo a los diferentes sitios de recolección y a la susceptibilidad por el ataque de insectos.	Queiroz <i>et al.</i> (1995)
<i>H. suaveolens</i> L. Poit	mentol, fenchona β -cariofileno, cineol, sabineno y aromadendreno	No se reportaron	Chalchat <i>et al.</i> (1997)
<i>H. suaveolens</i> L. Poit	biciclo- β ,1,1hexano, β -pineno, α -felandreno γ -terpineno, β -cariofeno y β -ciclohexen-1-ol	Prueba de actividad larvica contra el <i>A. aegypti</i>	Noegroho <i>et al.</i> (1997)
<i>H. suaveolens</i> L. Poit	metilchavicol. estimación espectrofotométrica	Potente agente bioactivo	Srivastava, M. <i>et al.</i> (1996)
<i>H. suaveolens</i> L. Poit	sabineno, β -cariofileno y trans-bergamoteno	No se reportan	Sibibé, L. <i>et al.</i> (2001)
<i>H. suaveolens</i> L. Poit	canforquinona y 2,5-dihidrox-1,4 benzoquinona	Actividad herbicida bioensayo en el desarrollo del <i>Sorghum bicolor</i> .	Ferreira <i>et al.</i> (2000)
<i>H. suaveolens</i> L. Poit	dihidroabietanol	Pruebas in vitro <i>P. falciparum</i> cultivados en eritrocitos. Actividad antimalarica	Ziegler, H. <i>et al.</i> (2001)
<i>H. suaveolens</i> L. Poit	fenchona, 1,8-cineol, y β -pineno	Evaluación de las propiedades anti-alimentarias para el <i>T. castaneum</i> y <i>S. oryzae</i> . bioensayo de 1 vía con DDA. No presento actividad	Rivas, R. <i>et al.</i> (2002)
<i>H. suaveolens</i> L. Poit	No se reportaron	Actividad antimalarica <i>Anopheles gambiae</i> .	Seyoum, A. <i>et al.</i> (2002)

Continuación Tabla 1 Composición química del aceite esencial de varias especies del género *Hyptis*

Especie	Compuestos Aislados	Pruebas biológicas	Referencia
<i>H. suaveolens</i> L. Poit	β -cariofileno, β -elemeno, trans- α -bergamoteno, espatuleno y biciclogermacreno	Significativa actividad antimicrobial contra el <i>Mucor</i> s.p. estudio comparativo con el ketoconazol	Malele <i>et al.</i> (2003)
<i>H. suaveolens</i> L. Poit (Aruba)	1,8-cineol	No se reportaron	Rana <i>et al.</i> (2004)
<i>H. suaveolens</i> L. Poit	fenchona	No se reportaron	Grassi <i>et al.</i> (2005)
<i>H. verticillata</i> Jacq	α -pineno, β -pineno y timol	No se reportaron	Kuhnt <i>et al.</i> (1994)
<i>H. velutina</i> Pohl	β -cariofileno, biciclogermacreno.	No se reportaron	Batista <i>et al.</i> (2003)

A continuación se realizará un análisis sobre los estudios fitoquímicos realizados en extractos con solventes orgánicos de algunas especies de *Hyptis*, la mayoría de los cuales se reseñan en la Tabla 2. En el caso de *H. albida* Kunth., aunque no se reportó ninguna actividad entre los compuestos que se han aislado de esta planta, se han encontrado mayormente triterpenoides y flavonoides; para *H. brevipes* Point., se reporta la prueba *in vitro* por el método de Difusión en Disco, mostrando propiedades antifúngicas y antibacterianas, aunque no se reportaron metabolitos para el estudio de esta especie (Goun *et al.*, 2003). El *H. capitata* Jacq., presenta entre sus funciones biológicas importantes, la actividad citotóxica y antileucémica en cultivos de líneas celulares (Lee *et al.*, 1988). Así mismo un ensayo anti HIV sobre células T presentó resultados importantes (Kashiwada *et al.*, 1998). Para esta especie también se han realizado pruebas de inhibición de la tiroxina con un 99 % de rendimiento (Greff *et al.*, 1998).

Algunos de los compuestos reportados son: ácidos ursólico, pomólico, oceánico y botulínico, dimetoxiflavonas, diterpenos, flavonoides y algunos derivados fenólicos.

El extracto de *H. crenata* Pohl., ha sido utilizado en preparaciones dermatológicas para el tratamiento de enfermedades de la piel (resequedad por uso de detergentes y otros) (Kobayahsi *et al.*, 2001). No se cuenta con el tamizaje fitoquímico para esta especie. En cuanto a *H. dilatata* Benth., no se han reportado pruebas biológicas y solo se sabe que contiene diterpenos tricíclicos.

La especie *H. emoryi* Torr., contiene un agente antitumoral, que ha sido evaluado en un Test (5WA 16), el cual es un sistema de células tumorales utilizado por el Centro Nacional de Servicio de Quimioterapia para el tratamiento del Cáncer, en Washington D.C (Sheth *et al.*, 1972). Así mismo, para *H. fruticosa* Salzm., han reportado actividad antitumoral (Monache *et al.*, 1976). Igual función presenta *H. martiusii* Benth., respecto al efecto proliferativo de las células antitumorales (Costa *et al.*, 2003). Entre los compuestos citados para estas especies, se tienen el ácido betulínico, hiptol y carnosol. Con respecto a *H. mutabilis* L.C. Rich., objeto de este trabajo se han realizado pruebas de inhibición de la tiroxina, los compuestos que se reportan para esta especie son: flavonoides, ácido oceánico, ácido ursólico y algunos derivados fenólicos (Greff, 1998). En *H. oblongifolia* Benth., no se han realizado pruebas biológicas, pero se ha detectado la presencia del ácido ursólico.

H. pectinata L. Poit, por su parte presenta actividad antimicrobiana, especialmente contra bacterias Gram-positivas reportándose como compuestos principales, derivados fenólicos (Greff, 1998). *H. spicigera* Lam., posee actividad citotóxica; con esta especie se realizó un ensayo sistemático *in-vitro* de carcinoma nasofaríngeo, mostrando dicha actividad (Pereda *et al.*, 2001). Por otro lado presenta

también propiedades insecticidas (Serrano *et al*, 1999). De esta planta se han aislado lactonas y diterpenos de la serie del labdano.

Para *H. suaveolens* L. Poit., cuyos compuestos principales son diterpenos y lactonas, se han realizado pruebas de inhibición de la tiroxina resultando positivas (Greff, 1998).

H. verticillata Jacq., presentó actividad antitumoral en pruebas con líneas celulares de pulmón, próstata, seno, colon y fibrosarcoma (Novelo *et al*, 1993). La citotoxicidad y actividad antimicótica, fue también demostrada mediante ensayos realizados en líneas celulares de fibroblasto, basándose en el análisis morfológico (German , 1971). Para esta especie también se reportó actividad insecticida (Porter *et al*, 1995).

Por otro lado, se ha reportado ensayos con huevos de *B. microplus*, no siendo efectivo para los insectos adultos, sino para las larvas (Collins *et al*, 2002). Igualmente se demostró que es un potente inhibidor del escarabajo de la papa dulce *C. formicanius* (Porter *et al*, 1995).

Tabla 2. Estudios fitoquímicos realizados con extractos en solventes orgánicos para diferentes especies del género *hyptis*

Especie	Metabolitos volátiles Aislados	Pruebas Biológicas	Referencias
<i>H. crenata</i> Pohl	compuestos inhibidores de la serina proteasa no identificados	Extracto utilizado en preparaciones dermatológicas para el tratamiento de enfermedades de la piel. (Piel reseca por detergentes y otros)	Kobayashi <i>et al.</i> (2001)
<i>H. dilatata</i> Jacq	diterpenos tricíclicos (Esqueleto del Abietano)	No se reportaron	Urones <i>et al.</i> (1998)

Continuación Tabla 2 Estudio fitoquímico de extractos en solventes orgánicos realizados a especies del género Hyptis

Especie	Metabolitos volátiles Aislados	Pruebas Biológicas	Referencias
<i>H. fruticosa</i> Salzm	un nuevo diterpeno (Hiptol). horminona y 1,4-methoxytaxodiona	Actividad antitumoral.	Monach <i>et al.</i> (1976)
<i>H. martiusii</i> Benth	carnasol y 11, 14-dihidroxi-8,11,13-abietatrien-7-ona	Efecto antiproliferativo de líneas celulares tumorales	Costa <i>et al.</i> (2003)
<i>H. mutabilis</i> L.C. Rich	ácidos oleánicos, ursólico, maslínico y 2 nuevos triterpenos	No se reportaron	Pereda y Gascón (1988)
<i>H. mutabilis</i> L.C. Rich	derivados fenólicos, hidroquinónicos y flavonoides	Pruebas de inhibición de la Tirosina formulación de aplicación tópica (crema)	Greff (1998)
<i>H. oblongifolia</i> Benth	ácido ursólico y oleanólico, 4-deacetoxi-10-epi-olguina	No se reportaron	Delgado <i>et al.</i> (1985)
<i>H. pectinata</i> L. Poit	hiptolido (5,6 dihidro- α -pirona) pectinolidos A y C	Actividad antimicrobial contra bacterias Gram-positivas. Ensayos Biológicos cualitativos	Miranda <i>et al.</i> (1993)
<i>H. pectinata</i> L. Poit	hiptolido (5,6 dihidro α -pirona). Análisis estereoquímico	No se reportaron	Achmad <i>et al.</i> (1987)
<i>H. pectinata</i> L. Poit	lactona insaturada (Olguina) análisis estereoquímico	No se reportan	Aleman <i>et al.</i> (1979)
<i>H. pectinata</i> L. Poit	derivados fenólicos, hidroquinónicos y flavonoides	Pruebas de inhibición de la tirosina. Preparados de uso tópico.	Greff, (1998)
<i>H. pectinata</i> L. Poit	α -pironas y furanonas (peptinoides)	Propiedades citotóxicas antidermatogénica	Boalino <i>et al.</i> (2003)
<i>H. spicigera</i> Lam	6-tetraacetil-oxiheptenil-5,6-dihidro- α -pirona (spicigerolide)	Propiedades citotóxicas. Ensayo sistemático <i>in vitro</i> con carcinoma nasofaringeal. Propiedades Insecticidas. Bioensayos de toxicidad contra la larva de maíz.	(Pereda, R. <i>et al.</i> (2001)

Continuación Tabla 2 Composición fitoquímica de extractos en solventes orgánicos realizados a especies del género *Hyptis*

Especie	Metabolitos Volátiles Aislados	Pruebas Biológicas	Referencias
<i>H. spicigera</i> Lam	labdano diterpenos 7 α ,15,19-triacetoxi- 2 α -hidroxilabda- 8(17),(13z)-dieno	Insecticida: Bioensayos de toxicidad contra la larva del maíz. <i>Ostrinia nubilalis</i> . Anticarcenógeno. Ensayos en líneas celulares de (RMPI).	Serrano <i>et al.</i> (1999)
<i>H. spicigera</i> Lam	spicigera α -lactona	No se reportaron	Aycard <i>et al.</i> (1993)
<i>H. spicigera</i> Lam (México)	6-tetraacetil-oxiheptenil-5,6-dihidro α -pirona (spicigerolido)	Actividad citotóxica. Ensayo en líneas celulares K.B	Pereda <i>et al.</i> (2001)
<i>H. suaveolens</i> L. Poit	ácido suaveólico y suaveolol	No se reportaron	Manchand <i>et al.</i> (1974)
<i>H. suaveolens</i> L. Poit	derivados fenólicos y flavonoides	Pruebas de inhibición de la tirosina	Greff, D. (1998)
<i>H. umbrosa</i> Salzm (Brasil)	nuevo diterpeno quinona	No se reportaron	Monache <i>et al.</i> (1990)
<i>H. urticoide</i> Kunth (México)	hipurticina δ -lactona altamente sustituida en posiciones α , β -insaturadas	No se reportaron	Romo, A. <i>et al.</i> (1991)
<i>H. verticillata</i> Jacq	dehidrofilotoxina, deoxidehidrofilotoxina deoxipicropodofilina apopicrodofilina	Presentó actividad antitumoral en pruebas con líneas celulares de pulmón, próstata, seno, colon y fibrosarcoma.	Novelo <i>et al.</i> (1993)
<i>H. verticillata</i> Jacq	un nuevo lignano hiptinina. Otros lignanos ya conocidos, ácido rosmarínico y sideroflavonas.	No se reportaron	Kuhnt <i>et al.</i> (1994)
<i>H. verticillata</i> Jacq (Jamaica)	4-dimetildeoxi podofilotoxin y β -pelatin	Citotoxicidad, actividad antimicótico, ensayo realizados en líneas celulares defibroblasto. Análisis morfológico	German (1971)

Continuación Tabla 2 Composición fitoquímica de extractos en solventes orgánicos realizados a especies del género *Hyptis*

Especie	Metabolitos Volátiles Aislados	Pruebas Biológicas	Referencias
<i>H. verticillata</i> Jacq	cadena -4,10 (15)-dien-3-ona	Actividad insecticida ensayos con huevos de <i>B. microplus</i> No fue efectivo para los adultos. Y potente antagonista del escarabajo de la papa dulce. <i>C. formicarius</i> .	Porter <i>et al.</i> (1995)
<i>H. verticillata</i> Jacq	Sesquiterpeno, saramulosona	Ensayos de Bio reducción del sesquiterpeno saramulosone por el hongo <i>C. lunata</i> , dando 5 nuevos compuestos con actividades biológicas potenciales	Collins <i>et al.</i> (2002)
<i>H. verticillata</i> Jacq	cadena-4-10(15)-dien-3-ona y saramulosona	Transformación microbial de estos compuestos por el <i>M. Plumbeos</i> obteniéndose 9 nuevos compuestos.	Collins <i>et al.</i> (2002)
<i>H. verticillata</i> Jacq (México)	análisis instrumental de activación de neutron determinación de 22 elementos. As, Br, Ce, Co, Cr, Cs, Eu, Fe, Hf, Hg, K, La, Na, Rb, Sb, Sc, Se, Sm, Sr, Th, U y Zn.	No se reportaron	Vega <i>et al.</i> (1997)
<i>H. verticillata</i> Jacq	ácido carnosólico, carnosol, Me-carnosol, ácido rosmarínico, ácido ursólico, ácido oleanólico y ácido botulínico	No se reportaron pruebas biológicas pero hay referencias de potente actividad antioxidante	Perva <i>et al.</i> (2001)

1.5 CARACTERÍSTICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales son un conjunto de productos volátiles, líquidos a temperatura ambiente, que se caracterizan por su olor pronunciado y penetrante. Se obtienen de materiales naturales por destilación con agua o en corriente de vapor, o si se trata de frutos de cítricos, por un proceso mecánico de extrusión, con posterior separación de la fase acuosa. Esta definición marca las diferencias entre aceites esenciales y las denominadas esencias concretas y esencias absolutas. Estas últimas se preparan a partir del material vegetal y se extraen con la ayuda de un disolvente orgánico, consiguiendo una composición química y unas propiedades farmacodinámicas diferentes (Rouzet, 1984).

Cabe destacar que los aceites esenciales son mezclas de compuestos de bajo peso molecular y que en ocasiones se encuentran más de 200 moléculas diferentes en una sola muestra de aceite, sin embargo en la mayoría de estos aparecen 3 ó 4 compuestos químicos mayoritarios, aunque a menudo los componentes trazas son muy importantes para el olor y el sabor, considerándose que la ausencia de alguno de ellos puede alterar el aroma (Castillo y Martínez, 2007).

1.6 Localización de los aceites esenciales

Los aceites esenciales proceden de las flores, frutas, hojas, raíces, semillas y cortezas de los vegetales. Están situados en estructuras secretoras especializadas conocidas como glándulas monocelulares las cuales están formadas por una sola célula donde la esencia se encuentra almacenada. También se conoce la existencia de las glándulas pluricelulares las cuales están formadas por varias células entre internas,

conocidas como esquizógenas y esquizolisígenas y células aéreas o epidérmicas (Bonicatto *et al.*, 2007).

1.7 Composición química de los aceites esenciales

En un aceite esencial pueden encontrarse hidrocarburos alicíclicos y aromáticos, así como sus derivados oxigenados tales como alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres; también pueden observarse sustancias azufradas y nitrogenadas (Marcano & Hasegawa, 2002) sin embargo, según su origen biosintético se pueden clasificar en dos grandes grupos:

1.7.1 Terpenos y sus derivados: son compuestos químicos formados por la vía del acetato-ácido mevalónico, cuya unidad fundamental es el isopreno (Fig. 3 y Fig. 4), el cual está constituido por cinco átomos de carbono. Estos compuestos se agrupan de acuerdo al número de unidades de isopreno que contienen en:

- ✓ Hemiterpeno: una unidad sencilla de isopreno.
- ✓ Monoterpenos: son biogenéticamente derivados de dos unidades de isopreno y están distribuidos en una gran variedad de sistemas vivos. Existen varios tipos estructurales, los que siguen la regla del isopreno (esqueletos regulares) y los llamados irregulares en los cuales no se mantiene la secuencia de los carbonos que conforman los dos fragmentos de isopreno unidos cabeza-cola; estos esqueletos se generan por pérdida de átomos de carbono, reordenamientos esqueléticos y unión anormal de los monómeros (Fig. 4).
- ✓ Sesquiterpenos: Están formados por tres unidades de isopreno. Aunque contienen sólo quince átomos de carbono, presentan una gran diversidad de esqueletos como resultado de la facilidad de reordenarse que tienen estas estructuras (Fig. 4) (Marcano & Hasegawa, 2002).

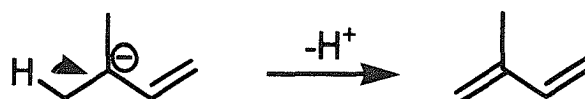
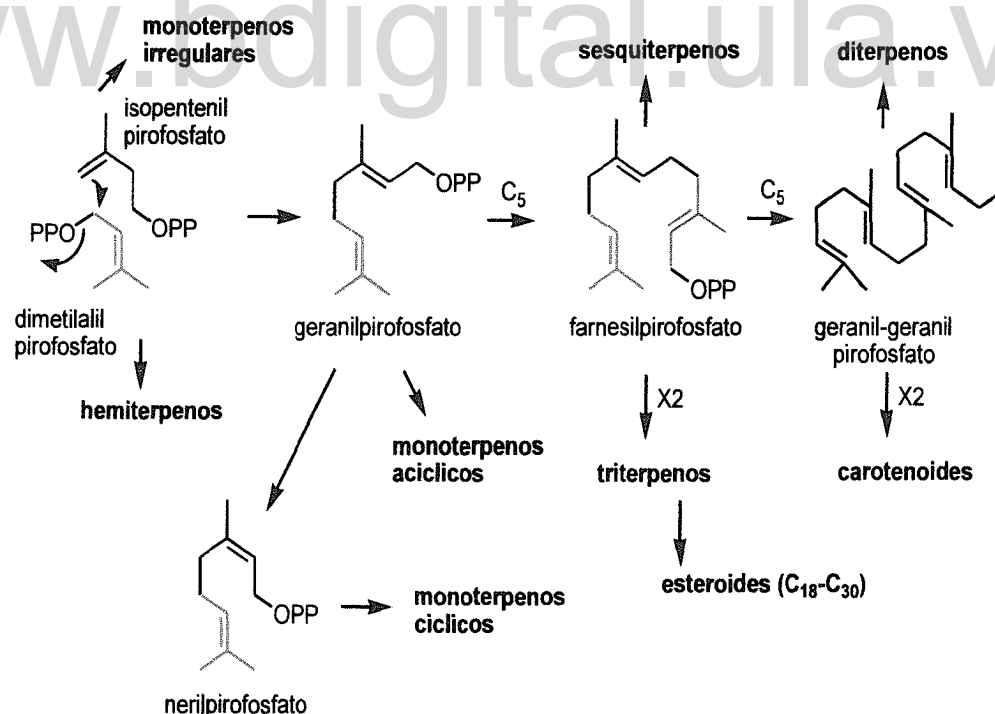


Figura 3. Estructura del isopreno (tomado de Dewick, 2002)

1.7.2 Compuestos aromáticos derivados del fenilpropano: incluyen derivados simples del benceno, anillos bencénicos condensados, monómeros, dímeros o polímeros de alto peso molecular. Desde el punto de vista biogenético, los fenilpropanoides son derivados de la ruta del ácido shikímico. Comprenden un gran número de variaciones estructurales, que van desde moléculas con esqueletos compuestos por un anillo de seis miembros y una cadena de tres carbonos, hasta polímeros (Marcano & Hasegawa, 2002).

Figura 4. Bioformación de terpenos



Tomado: (Marcano & Hasegawa, 2002).

2. Obtención de los componentes presentes en el Aceite Esencial

Generalmente los aceites esenciales se obtienen de las plantas, por diferentes métodos, adaptados a la naturaleza y propiedades de los aceites esenciales o de los cuerpos aromáticos de donde proceden (Gennaro, 1998).

Por esta razón se han descrito diferentes técnicas para la obtención de aceites esenciales entre los que se encuentran: destilación por arrastre con vapor de agua, hidrodestilación, extracción con disolventes volátiles, expresión a mano o a máquina, extracción con fluidos súper críticos y extracción por enfleurage.

2.1 Destilación por arrastre de vapor

La destilación por arrastre de vapor es una técnica usada para separar sustancias orgánicas insolubles en agua y ligeramente volátiles, de otras no volátiles que se encuentran en la mezcla, como resinas, sales inorgánicas u otros compuestos orgánicos no arrastrables (Becerra y Matheus, 1997).

Este método es el más frecuentemente empleado para la extracción de aceites esenciales. Se fundamenta en la Ley de Dalton sobre las Presiones Parciales, la cual dice que “a temperatura constante la presión total de una mezcla de gases es igual a la suma de las presiones parciales de los gases individuales”, entendiéndose por presión parcial la ejercida por cada gas, si él solo ocupara el volumen del recipiente que contiene la mezcla, expresándose matemáticamente de la siguiente manera:

$$P_t = P_1 + P_2 + P_3 \dots P_n$$

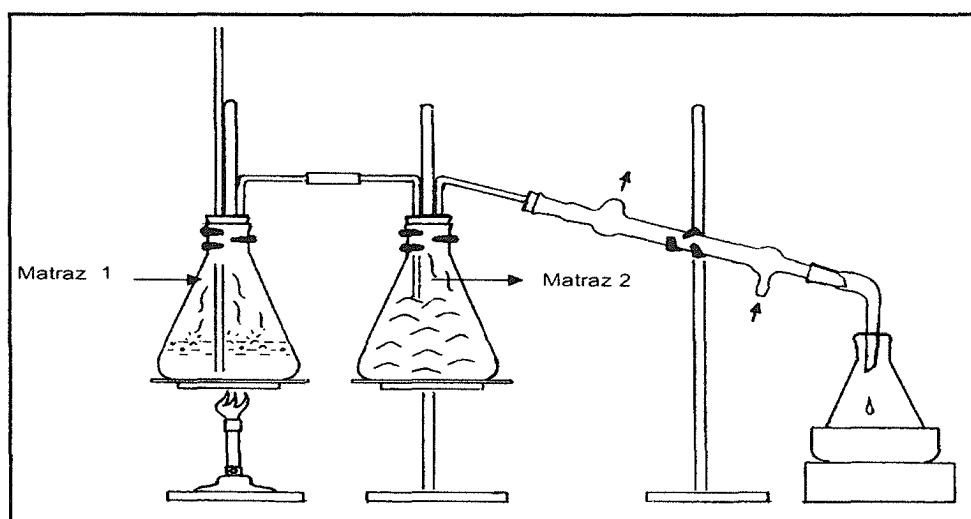
Donde:

P_t = presión total

P_1 = presión del gas₁ y así sucesivamente (Becerra y Matheus, 1997)

Al destilar una mezcla de dos líquidos inmiscibles, su punto de ebullición será la temperatura a la cual la suma de las presiones de vapor es igual a la atmosférica. Esta temperatura será inferior al punto de ebullición del componente más volátil. Si uno de los líquidos es agua (destilación por arrastre de vapor con agua) y se trabaja a presión atmosférica, se podrá separar un componente de mayor punto de ebullición que el agua a una temperatura inferior a 100°C. Generalmente, esta técnica se utiliza cuando los compuestos cumplen con las condiciones de ser volátiles, inmiscibles en agua, tener presión de vapor baja y punto de ebullición alto (Sánchez, 2006; Cerpa, 2007). El fundamento es el mismo que en la técnica de hidrodestilación, la diferencia es que en el arrastre con vapor de agua, la planta no entra en contacto con el agua porque el vapor se genera en un recipiente separado, ver Fig. 5.

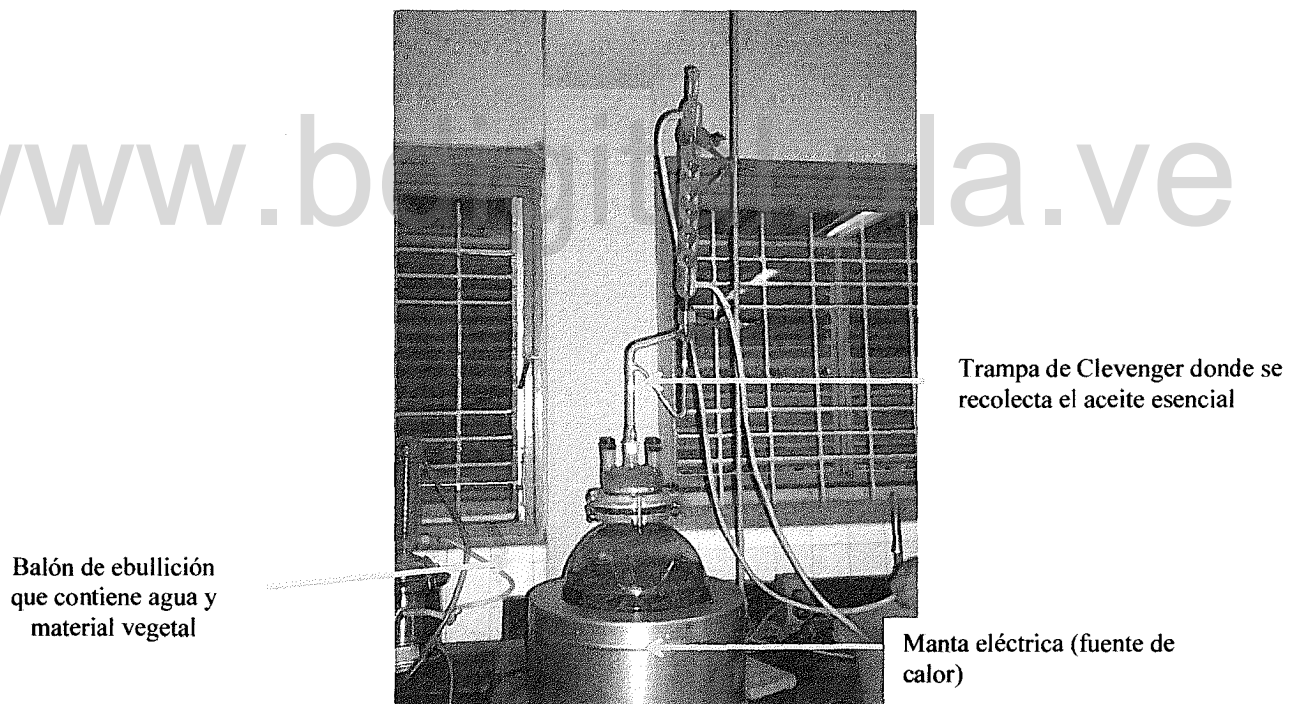
Figura 5 Destilación por arrastre de vapor (A nivel de laboratorio)



Tomada de <http://www.iocd.unam.mx/organica/1311/1311pdf10.pdf>

2.2 Hidrodestilación: es la más utilizada ya que es un proceso muy limpio, de alto rendimiento, que permite obtener un aceite de alta pureza y no requiere tecnología sofisticada, por lo que es muy utilizado a nivel industrial, además permite trabajar con volúmenes grandes de materia prima y la extracción se realiza a temperatura de ebullición. Esta técnica sirve fundamentalmente para separar sustancias insolubles en agua y ligeramente volátiles, de otros productos no volátiles presentes en la mezcla. (Albornoz, 1997). En la figura 6 se ilustra un equipo de hidrodestilación para uso de laboratorio

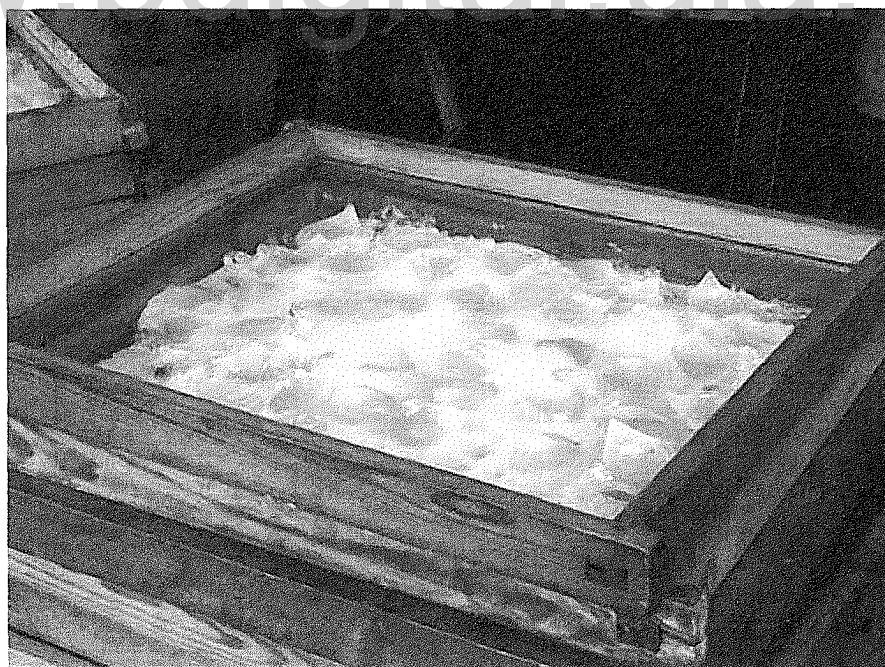
Figura 6. Equipo de hidrodestilación



Tomado: Janne Rojas

2.3 Enfleurage: es el método tradicionalmente utilizado para extraer el aceite esencial de las flores (rosa, jazmín). Se utilizan grasas naturales, normalmente manteca de cerdo RBD (Refinada, Blanqueada y Desodorizada). La grasa se extiende en bandejas en profundidad no mayor a 0,5 cm y sobre ella se colocan los pétalos de flores ó el material vegetal de donde se van a extraer los principios odoríficos. El contacto puede durar de 3 a 5 días, luego el material vegetal es removido y reemplazado por material fresco. La operación se repite buscando la saturación de la grasa. Posteriormente, la grasa impregnada del principio activo, se lava con alcohol libre de congéneres (alcohol de perfumería), en una relación 1:1, dos veces consecutivas. El alcohol se filtra y se destila al vacío hasta recuperar un 80% del volumen, quedando en el fondo del balón el residuo formado por la esencia (Fig. 7) (Sánchez, 2006).

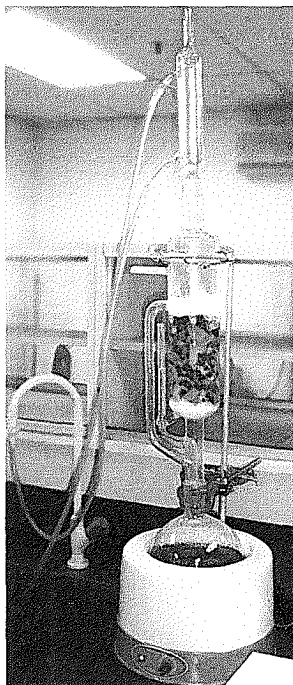
Figura 7. Técnica de Enfleurage



Tomada de http://media.photobucket.com/image/enfleurage/Sacred_Herbals/enfleurage.jpg

2.4 Extracción con solventes: el material a extraer es picado o molido, para permitir mayor área de contacto entre el sólido y el solvente, luego se deja en maceración a temperatura ambiente con el solvente y en agitación constante. El proceso puede ejecutarse por lotes (forma discontinua) o en forma continua (percolación, lixiviación, extracción tipo Soxhlet). Los solventes más empleados son: etanol, metanol, isopropanol, hexano, ciclohexano, tolueno, xileno, ligroína, éter etílico, éter isopropílico, acetato de etilo, acetona, cloroformo; no se usan solventes clorados ni derivados del benceno por su alto grado de toxicidad. Los solventes se recuperan por destilación y pueden ser reutilizados. Adicionalmente, los solventes extraen otros componentes de la planta como colorantes, gomas, mucílagos, ceras, grasas, proteínas y carbohidratos. En la etapa de recuperación del solvente (a presión atmosférica o al vacío), se debe disponer de una unidad de enfriamiento adicional al condensador, con el fin de recuperar la mayor cantidad de solvente posible (Fig. 8) (Sánchez, 2006).

Figura 8. Extracción con solventes (Soxhlet)



Tomada de http://faculty.ksu.edu.sa/18856/Extraction/Soxhlet_Extractor.jpg

2.5 Extracción con Fluidos Supercríticos: esta técnica de extracción permite la obtención de productos de alta calidad y prácticamente inalterados. Requiere el uso de una sustancia (CO_2) en su punto crítico, es decir, en el punto donde esta sustancia se encuentra en una fase entre líquido y gas conservando cualidades de ambos, por lo que es un excelente solvente para extraer aceites esenciales. El CO_2 , en condiciones supercríticas presenta baja viscosidad, baja tensión superficial, alto coeficiente de difusión (10 veces más que un líquido normal), lo cual conlleva a un mayor contacto con la superficie del material, pudiendo penetrar en pequeños poros del mismo, lo que asegura una buena eficiencia en la extracción en un corto tiempo. La desventaja de este método es que requiere de un equipo especial donde se pueda aplicar una presión atmosférica 200 veces superior a la normal. Para remover el solvente solo se requiere de disminuir la presión atmosférica a la que es sometido (Sánchez, 2006) (Cerpa, 2007).

3. Análisis e identificación de los componentes presentes en el Aceite Esencial

3.1 Cromatografía de gases

Es un método de separación en el cual los componentes de una mezcla se reparten entre dos fases: la fase estacionaria (líquida), que posee una superficie de exposición muy grande y la otra, fase móvil, que es un gas que circula en contacto con la fase estacionaria. La muestra se vaporiza en el sistema de inyección y es transportada por la fase móvil gaseosa a través de la columna. El reparto o partición de los componentes de la muestra con la fase estacionaria, se basa en sus diferentes solubilidades en esta fase a una temperatura dada. Por lo tanto, los componentes de la mezcla (solutos o analitos) se separan entre sí en base a sus presiones de vapor relativas y de acuerdo a sus afinidades con la fase estacionaria. Este tipo de proceso cromatográfico se denomina elución. Los

componentes volátiles presentes en cada muestra de aceite esencial son identificados y cuantificados mediante cromatografía gaseosa. La cromatografía de gases es la técnica más adecuada para el estudio de estos aceites, ya que presenta una elevada sensibilidad y una gran eficacia en la separación de los distintos constituyentes de estas sustancias (Pérez *et al.*, 2009).

3.2 Espectrometría de masas

Es una técnica experimental que permite la medición de iones derivados de moléculas. Se realiza en un instrumento que permite analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos e isótopos atómicos, separando los núcleos atómicos en función de su relación masa-carga (m/z). Puede utilizarse para identificar los diferentes elementos químicos que forman un compuesto, o para determinar el contenido isotópico de diferentes elementos en un mismo compuesto. Un espectrómetro de masas tiene tres componentes fundamentales: la fuente de ionización, el analizador de masa y el detector (Valenzuela *et al.*, 2006).

3.3 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Los espectros de masa son obtenidos por conversión de los componentes de una muestra en iones gaseosos que se mueven rápidamente y se separan en función de su relación masa-carga. Los espectros que salen de la columna cromatográfica, son almacenados en un ordenador para el subsiguiente procesamiento (Allemann *et al.*, 1989).

La ventaja de esta técnica es la identificación de los componentes con ayuda de bases de datos, como por ejemplo, la base de datos Wiley. Esta técnica es llevada a cabo en un

cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas, como se puede observar en la Fig. 9 (Allemann *et al.*, 1989).

Figura 9. Equipo de Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

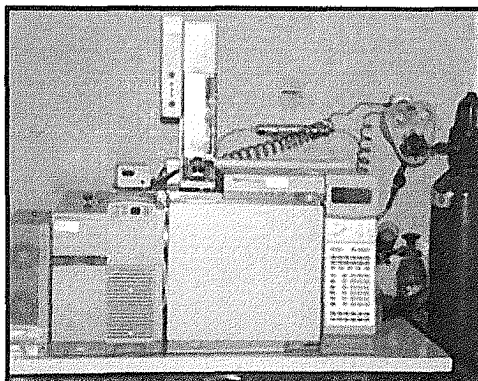


Foto tomada por la profesora Janne Rojas (Laboratorio de Instrumentación 1)

3.4 Cálculo de los Índices de Kovats

Es un método de cuantificación de los tiempos de elución relativa de los diferentes compuestos en cromatografía de gases, utilizado para identificar los compuestos de una mezcla. Emplea una serie de n-parafinas desde la C_7 hasta la C_{22} colocando en el eje de las “y” los tiempos de retención y en el de las “x” el número de carbonos de la n-alcano multiplicado por 100. El cromatograma que se obtiene muestra una relación logarítmica entre el número de carbonos y los tiempos de retención, reflejando la tendencia en los puntos de ebullición entre los miembros de una serie homóloga (Castello *et al.*, 2008).

De esta forma, se obtiene una relación lineal cuando se grafica el logaritmo de los tiempos de retención vs. los índices de Kováts. Para un compuesto que eluye entre las parafinas de (n) y (n+m) átomos de carbono, el índice de retención de Kováts viene dado por la expresión:

$$I = 100 \times \left[n + (N - n) \frac{\log(t'_{r(\text{desconocido})}) - \log(t'_{r(n)})}{\log(t'_{r(N)}) - \log(t'_{r(n)})} \right]$$

Donde:

I = índice de retención

n = número de átomos de carbono en los alcanos de menor masa molecular

N = número de átomos de carbono en los alcanos de mayor masa molecular

t_r' = tiempo de retención ajustado.

(Castello *et al.*, 2008).

4. Técnicas para determinar la actividad antimicrobiana en aceites esenciales

Para la evaluación y valoración de la actividad antimicrobiana de una sustancia de origen vegetal se utilizan diversos métodos, los cuales se rigen de acuerdo a las técnicas de ensayo, el método de cultivo, material biológico y vegetal (Janssen *et al.*, 1987). Las técnicas más utilizadas son:

4.1 Método de difusión con pozos

Emplea placas de petri estériles con agar Müeller Hinton sin solidificar; a cada placa se le perforan cinco pozos de cuatro mm., de diámetro cada uno. Luego se inoculan las placas perforadas por medio de hisopos tomando una pequeña cantidad de la colonia bacteriana, posteriormente se añade el aceite en los pozos, y se sellan con agar Müeller Hinton. Luego de un período de incubación determinado se realiza la lectura, donde un

resultado positivo (+) está dado por la inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del pozo, en caso contrario se considera negativo (-) o resistente (Acosta *et al.*, 2003).

4.2 Método de difusión en agar con discos

Es el método de uso más frecuente en la valoración de la actividad antimicrobiana de un aceite esencial por su comodidad, rápida lectura y economía (Vilariño, 1988). Esta técnica basada en el método de Kirby-Bauer modificado, consiste en la utilización de discos impregnados. En ella se coloca una placa de Petri con agar Müeller Hinton en el caso de las bacterias o agar Sabouraud Dextrosa en el caso de levaduras. Para la preparación de los inóculos de cada microorganismo, estos se deben ajustar al Patrón de Turbidez McFarland nº 0,5. La placa se siembra en césped, con un hisopo estéril; se colocan sobre ellas los discos de papel filtro (6-10 mm. de diámetro), previamente impregnados con la concentración adecuada de los aceites esenciales, dejando al menos 2 cm. de espacio entre cada uno de ellos. Se debe realizar una pre-incubación de las placas a temperatura ambiente durante 30 minutos para permitir que la sustancia a ensayar difunda en el agar, posteriormente se incuban a 37 °C durante 24 horas. Luego de la incubación se realiza la lectura de los halos de inhibición del crecimiento alrededor de los discos (Lynch *et al.*, 1988; Sanabria *et al.*, 1998).

Microorganismos usados en el ensayo

Los microorganismos usados en un ensayo de actividad antimicrobiana son generalmente provenientes de colecciones de cepas puras, conocidas como colección de cultivos de tipo americano (ATCC por su siglas en inglés), sin embargo, también se realizan con cepas obtenidas de pacientes clínicos (Velasco *et al.*, 2007).

Para determinar el potencial antimicrobiano de la sustancia a ensayar se realizan pruebas de susceptibilidad, tales como, la concentración Inhibitoria Mínima (CIM), la cual se define como la concentración más baja capaz de inhibir el crecimiento bacteriano.

Esta prueba puede realizarse tanto en caldo como en agar, generalmente Mueller-Hinton, agregando una suspensión bacteriana previamente estandarizada y utilizando diluciones seriadas del aceite esencial.

La concentración mínima del aceite a la que no se produce crecimiento del microorganismo después de 16 a 20 horas de incubación, se considera como el valor de CIM (Lynch *et al.*, 1988; Koneman, *et al.*, 2003; CLSI, 2010).

Tomando en cuenta los reportes encontrados en la literatura tanto para la familia, como para el género y considerando que no hay estudios previos reportados para una de las especies del género *Hyptis* estudiadas, en la presente investigación se proponen los siguientes objetivos:

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Analizar la composición química del aceite esencial de tres especies del género *Hyptis* nativas de Venezuela, localizadas en la zona de los Andes y evaluar su actividad antibacteriana.

5 Objetivos Específicos

5.2.1 Extraer los aceites esenciales de las especies *Hyptis mutabilis*, *Hyptis peptinata*, e *Hyptis colombiana* usando el método de hidrodestilación.

5.2.2 Determinar la composición química de los aceites esenciales por Cromatografía de Gases Acoplado a Espectrometría de Masas.

5.2.3 Calcular los índices de Kovats de los compuestos identificados.

5.2.4 Realizar el análisis químico comparativo entre las tres especies estudiadas.

5.2.5 Evaluar las actividades antibacterianas de los aceites esenciales en cepas ATCC, tanto gram positivas como gram negativas.

6. HIPÓTESIS

- En vista de que estudios realizados con anterioridad demuestran que las especies del género *Hyptis* biosintetizan determinado tipo de metabolitos volátiles; es de esperar que las especies: *Hyptis colombiana* Epling, *Hyptis pectinata* L., *Hyptis mutabilis* L.C.Rich, resulten ser una fuente de compuestos estructuralmente relacionados con los aislados en otras especies del género, los cuales pudiesen presentar actividades antibacterianas hasta ahora desconocidas para las especies en estudio.

www.bdigital.ula.ve

7. PARTE EXPERIMENTAL

7.1 MATERIALES

7.1.1 Recolección del material botánico

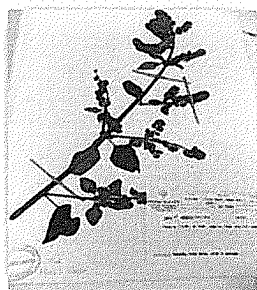


Figura 10: *Hyptis mutabilis* L.C. Rich
Tomada por Farm. Mayalin Flores

Las partes aéreas de las 3 especies en estudio, entre ellas la *Hyptis mutabilis* L.C. Rich (Fig. 10), se recolectaron entre los meses de febrero del 2005 a octubre del 2006, Tabla. 3 a orillas de la carretera del sector el Chama vía a la antenna a 1750 m.s.n.m y la especie *Hyptis Colombiana* Epling, fue recolectada entre febrero de 2005 y octubre del 2006, en la Autopista Rafael Caldera, vía a los pueblos del sur, a 3100 m.s.n.m. Luego de sus identificaciones, un Voucher Especimen de cada especie se depositó en el herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, ULA, bajo los N° de registro M4, M2, M3, respectivamente. La recolección e identificación se realizó con la ayuda del Ingeniero Forestal, Juan Carmona y el Profesor Alex Cegarra.

Tabla. 3 Fechas y pesos de las especies de *Hyptis* recolectadas

Especies	<i>H. mutabilis</i>			<i>H. peptinata</i>				<i>H. colombiana</i>		
Fechas de recolección	Enero 2006	Febreo 2006	Octubre 2006	Febrero 2005	Marzo 2005	Mayo 2005	Octubre 2006	Febrero 2005	Mayo 2006	Octubre 2006
Pesos (g)	1271g	165g	169g	267g	695g	1350g	594g	505g	524g	520g

7.2 MÉTODOS

7. 2.1 Acondicionamiento del material botánico

El material botánico fresco recolectado de las tres especies de *Hyptis*, se colocó sobre una balanza analítica para determinar su peso (TablaN^a 3); una vez pesado el material botánico, se licuó con agua destilada con la finalidad de romper las cutículas de las glándulas de aceite de la planta, que son células que contienen los aceites aromáticos y aumentan el rendimiento de la extracción. La extracción se realizó utilizando el método de hidrodestilación, empleando la trampa de Clevenger (Palá, 2002).

7.2.2 Obtención del Aceite Esencial

7.2.2.1 Metodología para la extracción de aceites esenciales

El principio de la hidrodestilación, para la obtención de los aceites esenciales, se fundamenta en llevar a ebullición una suspensión acuosa del material aromático, para lo que se suministra calor mediante una manta térmica y se mantiene la temperatura para agotar la esencia de la planta, normalmente unas tres horas, aunque depende de la especie y de la cantidad de aceite que contenga; al hervir el agua el vapor, arrastra las moléculas de aceite, que se condensan en un refrigerante. El agua y el aceite son recolectados en la trampa de Clevenger. El aceite, que es inmiscible en agua, y tiene menor densidad que la misma, queda atrapado en la parte superior de la trampa, de donde se colecta con la ayuda de una pipeta. El aceite se deseca con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) para eliminar trazas de agua y se guardan bajo refrigeración a 4 °C, en frascos color ámbar, hasta su análisis. Este sistema es muy utilizado por ser fácil de instalar, de operar y por presentar un consumo de energía bajo (Palá, 2002). El aceite

esencial obtenido servirá para la identificación de los componentes presentes en el aceite esencial, mediante la técnica de cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM), donde la mezcla de compuestos es inyectada en el cromatógrafo de gases, se separa en la columna cromatográfica obteniendo la elución sucesiva de los componentes individuales aislados que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas. Cada uno de estos componentes se registra en forma de pico cromatográfico y se identifica mediante su respectivo espectro de masas (Palá, 2002).

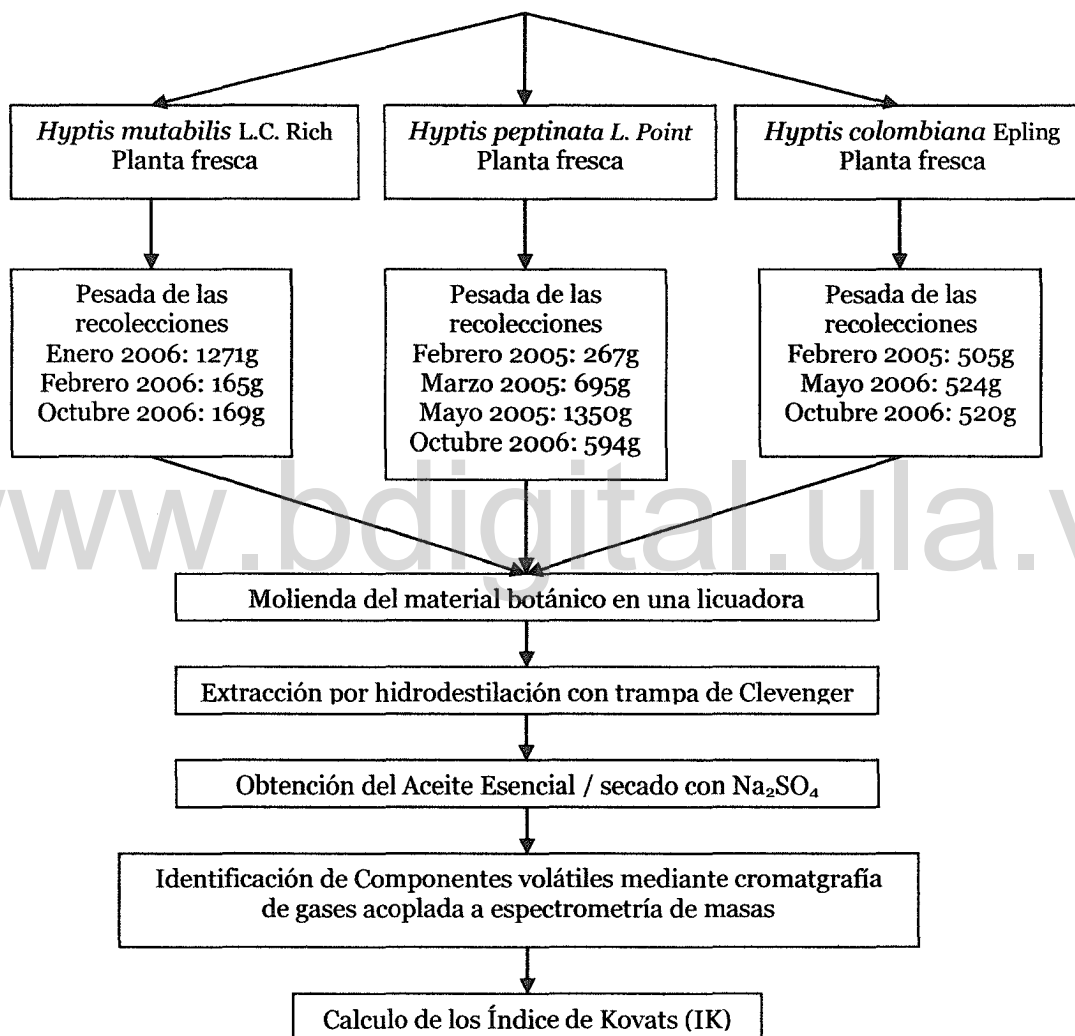
7.2.3 Técnica general aplicada para la identificación de los componentes químicos de los aceites esenciales

Una vez obtenido el aceite esencial, se realizó la identificación de los componentes químicos en un Cromatógrafo de Gases (CG), marca Perkin-Elmer, equipado con detectores de ionización de llama y una columna capilar de sílice fundida AT-5 de fenil (5 %)-metil(95 %)polisiloxano y en un Cromatografo de Gases acoplado a un Espectrometro de Masas (CG-EM), marca Hewlett- Packard 6890 (HP 6890) el detector de masas es HP 5973, y está equipado con un inyector automático HP-ALS y una columna capilar de sílice fundida HP-5MS de fenil(5 %)-siloxano. Este equipo está ubicado en el Laboratorio Instrumental 1 del Instituto de Investigaciones, Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

Los componentes individuales se identificaron mediante la comparación de sus Índices de Kovats con patrones de referencia y por la semejanza de los componentes a identificar con aquellos que se encuentren recogidos en la base de datos WILLEY275.L, NIST05.L, HPCH05 (Davies, 1990; Adams, 2007).A continuación se pueden observar en

el esquema 2, el protocolo experimental que se empleó para la extracción e identificación de los compuestos químicos obtenidos de los aceites esenciales de las especies de *Hyptis* estudiadas.

Esquema 2. Extracción e identificación de los compuestos químicos obtenidos de los aceites esenciales de las especies de *Hyptis* ensayadas



8. Metodología de los Estudios Biológicos

8.1 Ensayos de actividad antibacteriana realizados con los aceites esenciales obtenidos de las tres especies de *Hyptis* (Labiatae) en estudio

Esta actividad se realizó en el laboratorio del departamento de Bioquímica de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, bajo la asesoría de la Dra. María Eugenia Lucena. Las cepas bacterianas fueron donadas por la Cátedra de Microbiología Aplicada, a cargo de la MSc. Judith Araque Rangel. A continuación se puede observar en el esquema 3 el diseño experimental antibacteriano, que se aplicó en el desarrollo de esta actividad.

Esquema 3. Diseño experimental de la actividad antibacteriana

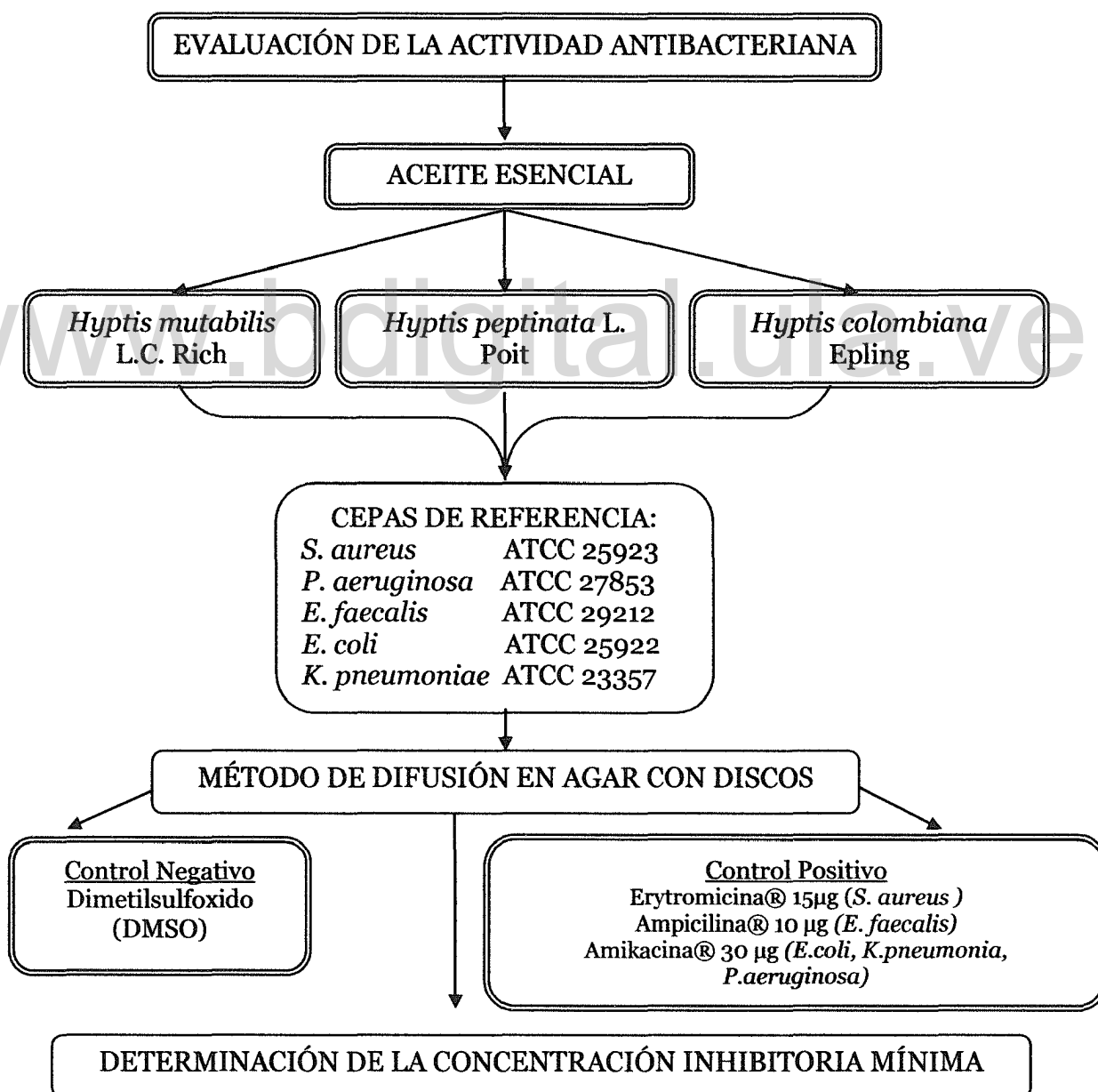


Figura 11: Acondicionamiento de placas
Tomada por Farm. Mayalin Flores



Para la evaluación de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de tres especies de *Hyptis*, se empleó la técnica de difusión en agar con discos descrita por Rangel *et al.*, 2001, modificada en el laboratorio. Para esta técnica se colocó en una placa de Petri con 25ml de medio de cultivo Müller-Hinton (Fig. 11).

Figura 12: Siembra del Inóculo del
microorganismo
Tomada por Farm. Mayalin Flores



Una vez solidificado el medio de cultivo se sembró en su superficie, con un hisopo estéril, el inóculo de las bacterias gram-positivas: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y gram-negativas: *Escherichia coli*, *klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa*. Cada inóculo bacteriano se ajustó con el patrón de turbidez MacFarland N° 0.5 (10^6 - 8 UFC/mL), (Fig. 12).

Figura 13: Introducción del papel
impregnado con la muestra
Tomada por Farm. Mayalin Flores

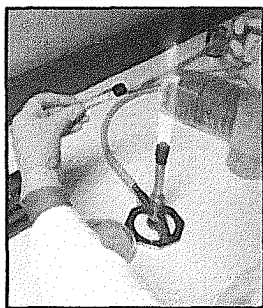


Luego se colocaron en la superficie del agar inoculado, los discos de papel de filtro (6 mm de diámetro), previamente impregnados con 10 μ L de cada aceite extraído de las tres especies de *Hyptis*, ensayadas (Fig. 13). También se colocaron los antibióticos de referencia como controles positivos y discos impregnados con solvente (DMSO- Dimetilsulfoxido) como control negativo. Posteriormente, los medios de cultivo inoculados se incubaron a 4 °C durante 16 horas y luego a 37 °C durante 24 horas, realizándose

entonces la lectura de los halos de inhibición. El diámetro de la zona de inhibición, producto de la actividad antibacteriana, se expresó en mm, la prueba se consideró negativa cuando se observó la ausencia de desarrollo microbiano alrededor de los discos. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Preparación del inóculo bacteriano

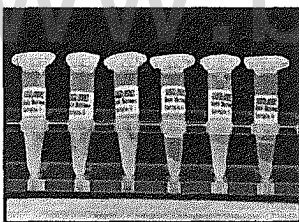
Figura 14: Dilución de los microorganismos
Tomada por Farm. Mayalin Flores



Las cepas se conservaron en tubos con Agar en posición de cuña, a temperatura ambiente en Agar Tripticasa Soya con la finalidad de obtener colonias aisladas y de éstas se tomó un pool de colonias que fueron replicadas en 25 mL de caldo Müller Hinton. Se incubaron a 37 °C durante 18 horas y antes de efectuar el ensayo, a cada uno de los cultivos se le realizó diluciones en solución salina estéril al 85% con el fin de obtener un conteo inicial de 10^{6-8} Unidades Formadoras de Colonias (UFC), utilizando el patrón de turbidez MacFarland N° 0.5, (Fig. 14), (Rangel *et al.*, 2001).

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Figura 15: Dilución de las muestras
Tomada por Farm. Mayalin Flores



La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó solo contra los microorganismos que mostraron zonas de inhibición. La CMI se realizó con la dilución de los aceites esenciales en el siguiente rango de concentración: 30, 25, 20, 15, 10 mg/ml (Fig. 15).

La CMI se definió como la concentración capaz de inhibir el crecimiento bacteriano visible. También, se incluyó en la prueba un control negativo, un disco de papel de filtro impregnado con DMSO (Dimetilsulfóxido) para chequear la posible actividad de estos solventes contra las bacterias ensayadas, y un control positivo, representado por el antibiótico respectivo de cada bacteria

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Análisis de los aceites esenciales obtenidos de las tres especies de *Hyptis* (Lamiaceae) estudiadas

A los aceites esenciales obtenidos de las partes aéreas frescas de *tres especies de Hyptis* (Lamiaceae) recolectadas en los Andes Venezolanos, se les calculó el porcentaje de rendimiento, basándose en la cantidad de gramos de material fresco utilizado para la extracción por el método de hidrodestilación, relacionados con la cantidad en mililitros del aceite obtenido en dichas extracciones; los mismos se indican a continuación en la Tabla 4:

Tabla 4. Rendimiento de los Aceites Esenciales obtenidos de las tres especies de *Hyptis*

Especies	Recolecciones	Peso del Material empleado para la extracción (g)	Cantidad del Aceite Esencial obtenido (mL)	Rendimiento del aceite (% V/P)
<i>Hyptis mutabilis</i>	Enero 2006	1271	1,5	0,1
	Febrero 2006	165	1	0,6
	Octubre 2006	169	1	0,6
<i>Hyptis pectinata</i>	Febrero 2005	267	0,5	0,1
	Marzo 2005	695	1	0,1
	Mayo 2005	1350	1	0,1
	Octubre 2006	594	1	0,2
<i>Hyptis colombiana</i>	Febrero 2005	505	2	0,4
	Mayo 2006	524	2	0,4
	Octubre 2006	520	2	0,4

Una vez realizada la extracción y calculado el rendimiento de los aceites esenciales, los mismos se analizaron por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas, sobre una columna HP-5 (5% fenil-95% metil silicona), obteniendo el número total de los compuestos presentes en cada uno, reportandose 54, 31 y 43 componentes, para *Hyptis mutabilis* L.C. Rich., *Hyptis pectinata* L. Poit., e *Hyptis colombiana* Epling., respectivamente. Los mismos fueron identificados por

comparación de sus espectros de masas con los de la base de datos Wiley GC-MS (7ª Edición).

9.1.1 Análisis de la especie *Hyptis mutabilis*

El aceite esencial de *Hyptis mutabilis* L.C. Rich., tiene un color ligeramente amarillo y se obtuvo un total de 3,5 mL en sus tres recolecciones con un porcentaje de rendimiento promedio del 0,43% (Tabla 4) El análisis por cromatografía de gases sobre una columna de 5% fenil-metilpolixiloxano reveló 54 componentes cuyos porcentajes se pueden observar en la Tabla 5, (Ver Anexo II Cromatograma de Gases, Pag. 89 al 91).

Tabla 5. Composición Química del aceite esencial *Hyptis mutabilis* L.C. Rich.

Nº	COMPUESTO	TR	%ENR 2006	%FEB2006	%OCT2006	lkcal	lktab
1	cis-3-hexenol	3,56	-	0,28	-	838	857
2	α -pineno	4,99	1,19	-	-	927	939
3	sabineno	5,85	-	0,54	-	965	976
4	1-octen-3-ol	6,16	1,88	0,65	1,23	978	978
5	β -mircenol	6,47	-	-	0,18	989	991
6	1,8-cineol	7,32	0,44	-	-	1023	1033
7	p-cimeno	7,39	-	0,92	0,17	1026	1026
8	β -felandreno	7,52	-	-	1,28	1031	1031
9	E- β -ocimeno	8,02	-	0,38	0,82	1049	1050
10	γ -terpineno	8,35	-	1,28	0,93	1061	1062
11	linalool	9,54	-	-	0,64	1100	1098
12	4-terpineol	11,67	-	1,82	0,2	1173	1177
13	δ -elemeno	17,20	1,18	0,84	0,39	1344	1339
14	α -cubebeno	17,59	-	0,7	0,99	1357	1351
15	α -copaeno	18,05	3,04	1,97	3,97	1371	1376
16	β -bourboneno	18,34	2,00	1,49	3,11	1379	1384
17	β -cubebeno	18,47	2,13	0,61	0,63	1383	1390
18	β -elemeno	18,94	1,06	2,66	1,22	1397	1391
19	θ -cariofileno	19,40	25,1	15,71	20,65	1413	1418
20	β -copaeno	20,11	-	-	0,67	1439	1390
21	E-muurola-3,5-dieno	20,33	-	0,66	-	1447	1351
22	α -humuleno	20,46	2,07	2,99	3,00	1452	1454
23	E-cadina-1(6),4-dieno	20,76	-	-	2,58	1462	1476
24	γ -gurjuneno	21,05	1,14	-	-	1472	1477
25	γ -muuroleno	21,13	-	0,63	-	1475	1479
26	germacreno D	21,28	18,32	22,40	30,23	1480	1480
27	β -selineno	21,42	-	0,41	-	1485	1485
28	cadineno	21,48	-	-	0,29	1487	1524
29	epi-biciclosesquifelandreno	21,59	-	0,41	-	1490	1524

Continuación de la Tabla 5

30	α -amorfenol	21,60	-	-	0,32	1491	-
31	α -zingibereno	21,68	2,03	-	-	1493	1493
32	biciclogermacreno	21,73	8,99	4,99	3,62	1495	1494
33	germacreno A	21,99	1,78	-	-	1504	1509
34	α -bulneseno	21,99	-	2,83	-	1504	1439
35	β -cubebeno	22,05	-	-	0,61	1506	1390
36	γ -cadineno	22,28	2,45	1	-	1513	1513
37	velenceno	22,44	-	-	2,45	1518	1491
38	δ-cadineno	22,51	5,75	4,43	-	1521	1524
39	trans-cadina-1,4-dieno	23,22	-	0,61	1,65	1543	1534
40	δ -selineno	23,38	-	-	0,59	1548	1517
41	germacreno B	23,54	1,54	1,59	1,08	1553	1556
42	(+) spatulenol	24,10	2	1,45	-	1570	1576
43	oxido de cariofileno	24,72	4,01	6,68	2,62	1588	1581
44	α -copaeno	26,03	-	0,69	-	1617	1376
45	α -cadinol	26,26	1,01	-	-	1621	1653
46	t-muurolol	26,27	-	3,88	-	1622	1641
47	α -copaeno	26,49	-	-	0,31	1626	1376
48	velerenol	26,73	-	0,99	-	1630	-
49	t-cadinol	26,73	-	-	1,77	1630	1640
50	2-pupukeanona	27,14	-	0,67	-	1637	-
51	curzereno	27,30	-	2,85	-	1640	1496
52	germacreno	27,41	-	0,89	-	1642	1693
53	valerenol	27,59	-	-	0,54	1645	-
54	tunbergol	36,25	5,73	-	-	2031	2094

Tiempo de retención (**TR**), la concentración relativa se muestra en %, índices de Kovats calculados (**IKcal**), índices de Kovats tabulado (**IKtab**), (Adams, 2007; Davies, 1990).

El análisis de los resultados observados en la Tabla 5 revelan que los componentes mayoritarios de la especie *H. mutabilis* L.C. Rich., en las tres épocas de recolección son: β -cariofileno, germacreno D, biciclogermacreno y oxido de cariofileno, destacando el β -cariofileno que presentó el mas alto porcentaje en las tres épocas en que se recolectaron, enero 2006: 25,1%, febrero 2006: 15,71%, octubre 2006: 20,65%; y germacreno D que también presentó en las tres épocas de recolección un excelente rendimiento, en enero 2006: 18,32%, febrero 2006: 22,40% y octubre 2006: 30,23%. Estos compuestos en especial el β -cariofileno se encuentran presentes en otras especies como *H. suaveolens* L. Poit., *H. marrubroides* Lam., *H. spicigera* Lam., *H. peptinata* L. Poit., como componente mayoritario común en ellas (McNeil *et al.*, 2010). Mientras que el germacreno D, se encuentra presente en algunas especies como *H. floribunda* Briq., (Dellacasa, 1997); *H. mutabilis* L.C. Rich., (Bailac *et al.*, 1999) y *H. suaveolens* L. Poit., (Hac *et al.*, 1996).

En los aceites obtenidos de las partes aéreas de *H. mutabilis* L.C. Rich., se observaron tres compuestos con porcentajes resaltantes en sus etapas de recolección como lo son: el biciclogermacreno con un porcentaje en el mes de enero 2006 de 8,99% , en febrero del mismo año 4,99% , sin embargo en el mes de octubre de 2006 no fue observado; la misma situación fue observada con el δ -cadineno que solo presentó en enero de 2006 con 5,75% y en febrero 2006 con 4,43%, para el mes de octubre no hubo presencia del mismo en la muestra. El tunbergol solo se observó en el mes de enero 2006 con un porcentaje de 5,73% y no se observó en las muestras de aceite de los meses, febrero y octubre de 2006, esto se debe probablemente a los cambios climáticos y la composición de los suelos, lo cual influye notablemente en la síntesis de compuestos químicos de la planta. Cabe destacar que el biciclogermacreno se ha hecho presente como componente mayoritario en varias especies tales como *H. martiusii* Benth., (Araujo *et al.*, 2003); *H. suaveolens* L. Poit., (Malele *et al.*, 2003); *H. velutina* Pohl., (Batista *et al.*, 2003); *H. floribunda* Briq., (Lopez y Bahio, 2002); *H. mutabilis* L.C. Rich., (Bailac *et al.*, 1999). El compuesto δ -cadineno, también se encuentra presente como componente mayoritario, en *H. floribunda* Briq., (Lopez y Bahio, 2002) y *H. glomerata* Hot., (Silva *et al.*, 2000).

9.1.2 Análisis de la especie *Hyptis pectinata*

El aceite esencial de *Hyptis pectinata* L. Poit, se mostró incoloro obteniéndose 3,5 mL en sus cuatro recolecciones con un porcentaje de rendimiento promedio del 0,13% (Tabla 4), en la cromatografía de gases sobre una columna de 5% fenil-metilpolixiloxano se observaron 31 componentes identificados cuyos porcentajes se pueden apreciar en la Tabla 6 (ver Anexo II, Cromatograma de Gases, Pag. 92 al 95).

Tabla 6. Composición Química del aceite esencial de *Hyptis pectinata* L. Poit.

Nº	COMPUESTO	TR	%FEB2005	%MARZ 2005	%MAYO2005	% OCTB 2006	Ikcal	Iktab
1	1-octen -3-ol	5,92	-	-	1,20	-	968	978
2	<i>p</i> -cimeno	7,12	1,94	-	0,99	-	1015	1026
3	limoneno	7,24	-	-	0,88	-	1020	1024
4	γ -terpineno	8,08	8,05	-	-	-	1052	1062
5	linalol	9,24	1,07	-	0,45	-	1090	1098
6	δ -elemeno	17,19	-	-	0,91	0,79	1344	1339
7	α -cubebeno	17,58	-	-	0,99	0,30	1356	1351
8	α copaeno	18,05	1,83	1,55	3,84	2,85	-	1376
9	α -ylangeno	18,28	-	-	-	0,28	1377	1372
10	β -bourboneno	18,31	1,62	1,65	1,43	1,87	-	1384
11	β -elemeno	18,93	-	-	1,63	1,34	1396	1391
12	β-cariofileno	19,41	27,62	15,8	21,43	20,0	1413	1404
13	α -humuleno	20,46	1,3	1,96	4,07	3,49	1450	1454
14	trans-cadina-1(6),4-dieno	21,14				0,51	1475	1476
15	germacreno D	21,30	28,83	19,08	20,35	24,77	1480	1480
16	epi-biciclosesquifelandreno	21,59	-	-	0,84	-	1490	1482
17	biciclogermacreno	21,76	2,67	2,1	3,54	4,76	1495	1480
18	germacreno A	22,02	2,16	1,38	1,67	2,26	1503	1503
19	trans-calameneno	22,52	1,66	-	7,58	-	1521	1522
20	gamma-cadineno	22,28	1,38	4,32		1,84	1526	1537
21	trans-cadina-1,4-dieno	22,79	-	-	0,49	-	1530	1534
22	δ -cadineno	22,94	-	2,86	-	3,41	1534	1524
23	α -cadineno	22,94	1,5	-	0,61	0,48	1534	1537
24	hedicariol	23,70	-	-	-	0,46	1558	1546
25	germacreno B	23,95	1,23	0,88	0,94	1,10	1552	1556
26	espatulenol	24,10	-	-	1,79	1,15	1570	1584
27	oxido de cariofileno	24,30	4,06	5,78	4,21	3,87	1576	1581
28	cubenol	25,19	1,72	10,55	1,62	3,17	-	1645
29	t-cadinol	25,91	5,81	29,36	6,65	10,03	1615	1652
30	γ -eudesmol	26,09	-	-	-	0,44	1618	1632
31	α -cadinol	26,36	1,06	1,23	2,47	3,2	1623	1653

Tiempo de retención (**TR**), la concentración relativa se muestra en %, índices de Kovats calculados (**IKcal**), índices de Kovats tabulado (**IKtab**), (Adams, 2007; Davies, 1990).

Los componentes mayoritarios para esta especie, en las cuatro épocas de recolección fueron: β -cariofileno, germacreno D, *t*-cadinol y óxido de cariofileno. El β -cariofileno presentó el mas alto porcentaje en las cuatro épocas de recolección, febrero 2005 (27,62%), marzo 2005 (15,80%), mayo 2005 (21,43%), octubre 2006 (20,00%); seguido por el germacreno D que también presentó en las cuatro épocas de recolección un excelente rendimiento febrero 2005 (28,83%), marzo 2005 (19,08%), mayo 2005 (20,35%), octubre 2006 (24,77%). El oxido de cariofileno mostró su mas alto porcentaje en el mes de marzo 2005 (5,78%) y el porcentaje mas alto del *t*-cadinol en el meses de marzo 2005 con (29,36%), lo cual pudo ser debido que en ese mes la especie se encontraba en época de floración. Estos compuestos en especial el β -cariofileno se encuentran presentes en otras especies como *H. suaveolens* L. Poit., *H. marrubroides* Lam., *H. spicigera* Lam., *H. pectinata* L. Poit., como componente mayoritario (McNeil *et al.*, 2010). Mientras que el germacreno D, se encuentra presente en algunas especies como *H. floribunda* Briq., (Dellacasa, 1997); *H. mutabilis* L.C. Rich., (Bailac *et al.*, 1999) y en *H. suaveolens* L. Poit., (Hac *et al.*, 1996). Es significativo enfatizar que el oxido de cariofileno parece ser un marcador quimiotaxonómico de la especie *H. pectinata* L. Poit., ya que en un estudio realizado con esta especie en Brasil se observó el oxido de cariofileno en un 28% (Nascimento *et al.*, 2008), en otro estudio de la especie *H. pectinata* L. Poit., también se observó como componente mayoritario del aceite esencial al oxido de cariofileno en 10% (Jirovetz *et al.*, 1999).

Dentro de los componentes caracterizados en esta especie se destaca el cubenol observándose en la recolección del mes de marzo 2005 un 10,55% y el *t*-calameneno en el mes de mayo 2005 se hizo presente en un 7,58 %, siendo estos compuestos marcadores de la especie *H. pectinata* L. Poit., recolectada en los Andes venezolanos para esta investigación, no obstante el aceite esencial de *H. pectinata* L. Poit., obtenido en California (Tanowitz *et al.*, 1984), y Brasil (Nascimento *et al.*, 2008), no se presentaron estos compuestos, esto se debe notablemente a que las diferencias climáticas entre cada una de las regiones pueden influir sobre la biosíntesis de compuestos químicos en la planta.

9.1.3 Análisis de la especie *Hyptis colombiana*

El aceite esencial de *Hyptis colommbiana* Epling., presentó un color ligeramente amarillo y se obtuvo un total de 6 mL en sus tres recolecciones con un porcentaje de

rendimiento promedio del 0,4% (Tabla 4) En cromatografía de gases sobre una columna de 5% fenil-metilpolixiloxano se observaron 39 componentes cuyos porcentajes se pueden observar en la Tabla 7, (ver Anexo II, Cromatograma de Gases, Pag.96).

Tabla 7. Composición Química del aceite esencial de *Hyptis colombiana* Epling.

Nº	COMPUESTO	TR	%FEB2005	%MAY2006	%OCT2006	Ikcal	Iktab
1	1-octen-3-ol	6,16	-	0,55	0,22	978	0978
2	δ -elemeno	17,20	-	0,58	1,23	1344	1349
3	α -cubebeno	17,59	-	-	0,99	1357	1351
4	α -copaeno	18,44	-	2,5	4,72	1382	1376
5	β bourboneno	18,73	-	0,75	1,50	1378	1384
6	β -cubebeno	18,88	-	-	0,56	1395	1390
7	β elemeno	18,94	-	1,76	1,15	1397	1391
8	α -gurjuneno	19,50	-	-	0,28	1417	1409
9	β-cariofileno	19,84	46,78	24,87	13,22	1414	1418
10	β -gurjuneno	20,10	-	-	0,44	-	1433
11	6,9-guaiadieno	20,10	-	1,06	0,44	1439	1444
12	isolongifoleno	20,53	-	2,21	-	1454	1618
13	cis-muurolo-3,5-dieno	20,76	-	-	4,49	1462	1450
14	α -humeleno	20,86	-	2,19	2,63	1466	1454
15	cis-cadina-1(6),4-dieno	21,48	-	-	0,53	1487	1463
16	trans-cadina-1(6),4-dieno	21,59	-	-	0,46	1490	1474
17	germacreno-D	21,76	36,1	20,80	31,39	1480	1480
18	β -selineno	21,42	-	2,09	-	1485	1485
19	epi-biciclosesquifelandreno	21,59	-	-	1,57	1490	1482,00
20	biciclogermacreno	21,77	17,12	8,58	4,77	1496	1494
21	germacreno A	22,44	-	2,5	2,31	1504	1503
22	δ -cadineno	22,51	-	3,48	-	1521	1524
23	α -amorfenol	22,69	-	-	1,72	1526	-
24	1s,cis-calameneno	22,95	-	-	3,71	1535	1521
25	β -maaliol	23,38	-	-	0,62	1548	1380
26	cis- α -bisaboleno	23,50	-	-	0,33	1552	1504
27	germacreno B	23,95	-	6,53	0,92	1566	1556
28	espatulenol	24,10	-	1,85	-	1570	1584
29	β -maaliol	24,12	-	-	0,77	1571	1380
30	Oxido de criofileno	24,30	-	5,36	1,13	1576	1581
31	viridiflorol	24,51	-	0,76	-	1582	1590
32	juniperol	25,12	-	0,83	-	1600	1599
33	cadina-1,4-dieno	25,62	-	-	1,85	1610	1532
34	t-cadinol	25,92	-	0,72	-	1615	1652
35	t-muurolol	26,26	-	1,91	-	1621	-
36	α -cadinol	26,34	-	0,72	6,63	1623	1653
37	t-cadinol	26,72	-	-	1,17	1630	-
38	ledeno	39,19	-	1,40	-	2166	1299
39	α -cariofileno	39,40	-	3,17	-	2177	-

Tiempo de retención (TR), la concentración relativa se muestra en %, índices de Kovats calculados (Ikcal), Índices de Kovats tabulado (Iktab), (Adams, 2007; Davies, 1990).

El análisis de los resultados observados en la Tabla 7 revelaron que los componentes mayoritarios de la especie *H. colombiana* Epling., en las tres épocas de recolección fueron: β -cariofileno, germacreno D, y biciclogermacreno; destacando al β -cariofileno que presentó el porcentaje más alto en las tres épocas en que se recolectó febrero 2005 (46,78%), mayo 2006 (24,87%), octubre 2006 (13,22%). El germacreno D también presentó en las tres épocas de recolección un excelente rendimiento febrero 2005 (36,10%), mayo 2006 (20,80%) y octubre 2006 (31,39%). El biciclogermacreno se observó en el mes de febrero 2005 con un 17,12%, esto puede deberse a que la planta necesita producir más cantidad de unos compuestos que otros ya que juegan un papel importante en la polinización y protección de la misma (Marcano *et al.*, 2002). Estos compuestos mayoritarios en especial el β -cariofileno se encuentran presentes en otras especies como *H. suaveolens* L. Poit., *H. marrubroides* Lam., *H. spicigera* Lam., *H. peptinata* L. Poit., como componente mayoritario común en estas especies (McNeil *et al.*, 2010). Mientras que el germacreno D, se encuentra presente en algunas especies *H. floribunda* Briq., (Dellacasa, 1997); *H. mutabilis* L.C. Rich., (Bailac *et al.*, 1999) y en *H. suaveolens* L. Poit., (Hac *et al.*, 1996).

En el aceite obtenido de las partes aéreas de *H. colombiana* se observaron dos compuestos significativamente mayoritarios en determinadas épocas de recolección como son: germacreno B, mayo 2006 (6,53%) y óxido de cariofileno, mayo 2006 (5,36%); estos compuestos se presentan por primera vez dentro de la composición química de esta especie de *Hyptis*, pero los mismos resultan ser comunes dentro de otras especies de este género, tal es el caso de *H. floribunda* Briq., que presentó al germacreno B dentro de su composición química (Dellacasa *et al.*, 1997); y a la especie *H. pectinata* L. Poit., que indicó la presencia del óxido de cariofileno como compuesto mayoritario (Nascimento *et al.*, 2008).

9.1.4 Análisis comparativo de las tres especies de *Hyptis* estudiadas

Al comparar la composición química de las tres especies de *Hyptis* analizadas en la presente investigación se pueden establecer similitudes y diferencias entre sus componentes.

Los compuestos β -cariofileno y germacreno D, se presentaron como componentes mayoritarios en los aceites esenciales de *H. mutabilis* L.C. Rich., *H. pectinata* L. Poit., e

H. colombiana Epling., objeto de esta investigación; los mismos fueron obtenidos en porcentajes mayores al 20% en cada uno de los aceites esenciales de las recolecciones de estas especies. Por su parte el β -cariofileno ha sido reportado como constituyente mayoritario para aceites esenciales de varias especies de *Hyptis* obtenidas de muchos países tanto de Asia como de Africa, que reportan tenerlo como el componente más abundante dentro de su composición química (McNeil *et al.*, 2010). Vale la pena destacar que la especie de *H. colombiana* Epling., analizada en esta investigación no tiene estudios previos por lo que resulta ser el primer aporte para la fitoquímica de esta especie.

De igual manera se hizo presente el compuesto xido de cariofileno tanto en el *H. mutabilis* L.C. Rich., *H. pectinata* L. Poit., como *H. colombiana* Epling., compuesto que según sus antecedentes solo se encontraba en la especie *H. pectinata* L. Poit., pero el mismo parece ser marcador quimiotaxonómico para las especies recolectadas en los Andes venezolanos. Igualmente el biciclogermacreno se identificó en los aceites esenciales de estas tres especies en algunas en menor proporción como en el *H. mutabilis*, *H. pectinata* L. Poit., mientras que en el *H. colombiana* Epling., se observó como constituyente mayoritario con un porcentaje superior al 17%, tal vez esto debido a que esta especie fue recolectada en otra localidad, con características climáticas y morfológicas diferentes a las zonas de recolección de las especies *H. mutabilis* L.C. Rich., e *H. pectinata* L. Poit., lo cual pudo haber influido en la abundancia de los constituyentes de estas especies.

El 1,8-cineol que es un compuesto muy abundante entre las especies del género *Hyptis* solo se halló en la especie *H. mutabilis* L.C. Rich., el mismo solo se detectó en el aceite esencial obtenido de la recolección del mes de enero 2006 en baja concentración, no obstante este compuesto ha sido encontrado como constituyente mayoritario común entre las especies *H. suaveolens* L. Poit., *H. goyazensis* Hil., *H. fruticosa* Salzm., e *H. martiusii* Benth., siendo una disidencia de esta especie con las reportadas anteriormente (McNeil *et al.*, 2010).

El aceite esencial de *H. mutabilis* L.C. Rich., presentó al compuesto α -pineno en su recolección del mes de febrero de 2006 con un porcentaje de 1,19%, inferior al

obtenido en otro estudio de la misma especie recolectada en la región Amazonica, donde este compuesto se observó como mayoritario con un 16,8% (Luz *et al.*, 1984). De igual manera se encuentra una similitud en varios compuestos obtenidos de la especie *H. pectinata* L. Poit., como lo son el limoneno observado solo en la recolección del mes de mayo 2005 con 0,88%, ledeno de la recolección de marzo 2005 con 1,40% y *p*-cimeno obtenido en dos recolecciones de la especie en febrero 2005 (1,94%) y mayo 2005 (0,99%), lo cual corrobora la semejanza con la misma especie pero recolectada en Arizona, USA; donde se obtuvo el limoneno en un 11,1% y el ledeno en un 15,1% (Tucker *et al.*, 2005) y en otra especie de *H. pectinata* L. Poit., en Africa donde se reportó el *p*-cimeno en un 33,8% (Malan *et al.*, 1988), lo que indica que estas especies tienen presente dentro de su constitución a estos compuestos pero en menor proporción, quizás la variación pueda deberse a los factores climáticos, la calidad del suelo y la biodisponibilidad de nutrientes, variables que sin lugar a duda, guardan estrecha relación (Bailac *et al.*, 1999).

9.2 Ensayos de actividad antibacteriana realizados con los aceites esenciales de las tres especies de *Hyptis* estudiadas

La actividad antibacteriana fué evaluada mediante el método de Kirby-Bauer, el mismo se fundamenta a través de la difusión en agar, contra bacterias Gram positivas: *S. aureus* (ATCC 25923) , *E. faecalis* (ATCC 29212) y Gram negativas: *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *E. coli* (ATCC 25922), *K. pneumoniae* (ATCC 23357), empleando para el ensayo los aceites esenciales obtenidos de la especies *H. mutabilis*, *H. pectinata* e *H. colombiana*, estos experimentos se realizaron por duplicado.

La *primera etapa* del estudio, se enfocó en hallar dentro de los aceites esenciales, aquéllos que manifestasen cierta actividad antagónica contra alguna o algunas de las bacterias asepticas (ATCC) contempladas en la investigación, para luego probar en una segunda etapa contra esas mismas bacterias asepticas las diluciones de aquellos aceites esenciales que hubieran dado un resultado positivo. La actividad antibacteriana se manifestó como halos de inhibición, que debían tener un diámetro mayor a 2 mm (1 mm

de radio), por encima de los 6 mm de diámetro del papel de filtro impregnado, para considerarlo como potencial biocontrol a la cepa que lo produjese.

Los halos de inhibición se observaron transcurridas 24 horas desde la incubación de la placa, sin embargo, se dejaron incubando las placas por 72 horas, en caso que apareciese alguna señal de antibiosis tardía.

Se realizaron diluciones a aquellas muestras (aceites esenciales) que resultaron bioactivas contra las cepas ATCC (30 mg/mL, 25 mg/mL, 20 mg/mL, 15 mg/mL, 10 mg/mL), (Tabla 8) con la finalidad de determinar su concentración mínima inhibitoria (CIM). Conjuntamente con los aceites esenciales se realizaron pruebas de susceptibilidad antibiótica, como control positivo.

En el desarrollo de esta actividad antibacteriana se observaron los siguientes resultados:

Aceite esencial de *Hyptis mutabilis* L.C. Rich

El aceite esencial obtenido por hidrodestilación de la especie *H. mutabilis* L.C. Rich., en la recolección de octubre 2006 mostró actividad antibacteriana, siendo antagonista frente a una sola cepa Gram-positiva, presentando su mayor actividad frente a *E. faecalis*, (Tabla 8), a la CIM de 30 mg/mL indicada, fig. 16, bajo la sigla 8C. Las muestras recolectadas en enero y febrero de 2006, no mostraron ningún tipo de actividad antibacteriana.

Figura 16. Actividad del Aceite Esencial de *H. mutabilis* L.C. Rich., frente a *E. faecalis* a la concentración de 30 mg/mL



Tabla 8. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del Aceite Esencial de <i>Hyptis mutabilis</i> L.C. Rich					
Zona de Inhibición (mm)					
Microorganismo	Recolección Octubre 2006	Control Positivo			CMI (mg/mL)
		Amikacina® (30µg)	Ampicilina® (10µg)	Eritromicina® (15µg)	
<i>S. aureus</i> ATCC (25923)	-	NA	NA	26	-
<i>E. faecalis</i> ATCC (29212)	9	NA	27	NA	30
<i>E. coli</i> ATCC (25922)	-	23	NA	NA	-
<i>K. pneumoniae</i> ATCC (23357)	-	24	NA	NA	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC (27853)	-	28	NA	NA	-
NA: No Aplica CMI: Concentración Mínima Inhibitoria					

Aceite esencial de *Hyptis pectinata* L. Poit

El aceite esencial de la especie *H. pectinata* L. Poit., de la recolección de marzo 2005 mostró actividad antibacteriana, contra *S. aureus*, Fig. 17, Tabla 9, mostrando valores de CIM de 30 mg/mL, (indicada en la fig. 17 bajo la sigla 3A). Las muestras recolectadas en febrero 2005, mayo 2005 y octubre de 2006, no presentaron actividad frente a ninguna de las cepas ensayadas.

Figura 17. Actividad del Aceite Esencial de *H. pectinata* L. Poit., frente a *S. aureus* a 30 mg/mL.

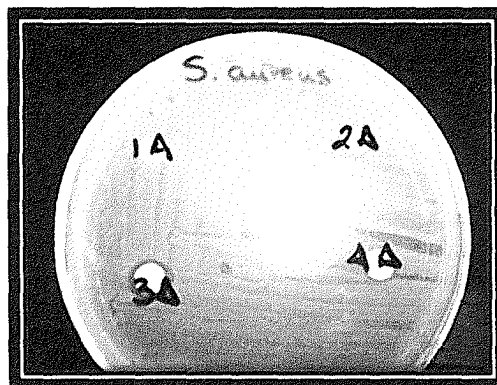


Tabla 9. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del Aceite Esencial de <i>Hyptis pectinata</i> L. Poit					
Zona de Inhibición (mm)					
Microorganismo	Recolección Marzo 2005	Control Positivo			CMI (mg/mL)
		Amikacina® (30µg)	Ampicilina® (10µg)	Eritromicina® (15µg)	
<i>S. aureus</i> ATCC (25923)	8	NA	NA	26	30
<i>E. faecalis</i> ATCC (29212)	-	NA	27	NA	-
<i>E. coli</i> ATCC (25922)	-	23	NA	NA	-
<i>K. pneumoniae</i> ATCC (23357)	-	24	NA	NA	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC (27853)	-	28	NA	NA	-
NA: No Aplica CMI: Concentración Mínima Inhibitoria					

Aceite esencial de *Hyptis colombiana* Epling

El aceite esencial de la especie *H. colombiana* Epling., colectada en febrero 2005 y octubre 2006 mostraron actividad antibacteriana, siendo antagonista frente a todas las cepas Gram-positivas y no contra las cepas Gram-negativas empleadas en el ensayo, su mayor actividad se evidenció frente *S. aureus*, a valores de CMI 20 y 10 mg/mL (indicada en la fig. 18a, bajo las siglas 5B y 6B, Tabla 10) y *E. faecalis*, a la concentración CMI de 30 mg/mL (indicada en la fig. 18b, bajo la sigla 5B, Tabla 10). La muestra recolectada en mayo 2006, no mostró ningún tipo de actividad.

Figura 18a. Actividad del aceite esencial de *H. colombiana* Epling., frente a *S. aureus* las concentraciones de 20 y 10 mg/mL y Figura 18b. actividad del mismo aceite frente a *E. faecalis* a 30 mg/mL.

Figura 18a.

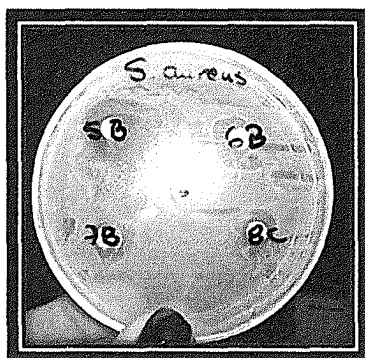


Figura 18b.

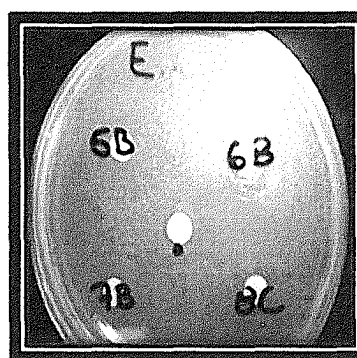


Tabla 10. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del Aceite Esencial de <i>Hyptis colombiana</i> Epling						
Zona de Inhibición (mm)						
Microorganismo	Recolección Febrero 2005	Recolección Octubre 2006	Control Positivo			CMI (mg/mL)
			Amikacina® (30µg)	Ampicilina® (10µg)	Eritromicina ® (15µg)	
<i>S. aureus</i> ATCC (25923)	15	20	NA	NA	26	20 (Febrero 2005) 10 (Octubre 2006)
<i>E. faecalis</i> ATCC (29212)	10	-	NA	27	NA	30
<i>E. coli</i> ATCC (25922)	-	-	23	NA	NA	-
<i>K. pneumoniae</i> ATCC (23357)	-	-	24	NA	NA	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC (27853)	-	-	28	NA	NA	-
NA: No Aplica CMI: Concentración Mínima Inhibitoria						

9.2.1 Análisis comparativo de la actividad antibacteriana observada en los aceites esenciales de las tres especies de *Hyptis* estudiadas

Los resultados obtenidos de estos bioensayos de actividad antibacteriana para los aceites esenciales de *Hyptis mutabilis* L.C. Rich, *Hyptis pectinata* L. Poit e *Hyptis colombiana* Epling., fueron analizados para determinar diferencias significativas entre los aceites ensayados. Es importante destacar que la actividad antibacteriana observada en este estudio podría justificarse debido a la presencia de sesquiterpenos a los cuales se les ha demostrado actividad antimicrobiana, previamente (Harborne, 1988).

Los análisis realizados en este estudio mostraron que la mayor actividad antibacteriana contra bacterias Gram-positivas, (*S. aureus* y *E. faecalis*), fué dada por *Hyptis colombiana* Epling., especie que no presenta estudios previos de actividad antibacteriana, dicha actividad puede deberse a la relación de concentración de algunos constituyentes mayoritarios como el germacreno D y el β -cariofileno; a mayor valor de

esta relación germacreno D/ β -cariofileno mayor es su actividad antimicrobiana. Estos compuestos han sido reportados como potentes antibacterianos en otros estudios de *Hyptis suaveolens* L. Point., perteneciente a la misma familia Lamiaceae (Asekun *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 2001)

Por su parte la especie *Hyptis mutabilis* L.C. Rich, demostró actividad antibacteriana contra *E. faecalis*; mientras *Hyptis pectinata* L. Poit., exhibió actividad contra *S. aureus*, probablemente debido no solo a la presencia de germacreno D y β -cariofileno sino tal vez al *t*-cadinol, el cual esta presente en altas concentraciones 29,36%, y el oxido de cariofileno, pudiendo estos haber generado una acción sinérgica.

www.bdigital.ula.ve

CONCLUSIONES

1. En el presente trabajo se realizó el estudio fitoquímico de los aceites esenciales de tres especies de *Hyptis*, localizadas en los Andes de Mérida, Venezuela de los que se logró obtener por medio de la técnica de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas la identificación de sus componentes principales.
2. Se logró por primera vez determinar la composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *H. colombiana*, lo que constituye un aporte a la florística y la fitoquímica.
3. Al comparar la composición química de los aceites esenciales investigados se pudo observar semejanzas en los compuestos identificados, tal es el caso de germacreno D y β -cariofileno presentes como mayoritarios en los aceites de *H. mutabilis* L.C. Rich., *H. pectinata* L. Poit., e *H. colombiana* Epling; los mismos fueron detectados en porcentajes mayores al 20% en cada uno de los aceites esenciales de las recolecciones de estas especies. El óxido de cariofileno también se evidenció en las tres especies pero solo fue componente mayoritario en *H. mutabilis* L.C. Rich, y en *H. pectinata* L. Poit. Cabe destacar que entre las tres especies hubo un rendimiento promedio de los aceites esenciales de 0,34%.
4. El análisis de *H. mutabilis* L.C. Rich., en las tres épocas de recolección evidenció α -copaeno. En la especie *Hyptis pectinata* L. Poit., se encontró t-cadinol, y al analizar el aceite esencial de *Hyptis colombiana* Epling., se identificó biciclogermacreno como uno de sus componentes mayoritarios.
5. Las tres especies de *Hyptis* estudiadas presentaron actividad frente a bacterias Gram positivas (*S. aureus* y *E. faecalis*) a las concentraciones comprendidas entre

30 y 10 mg/mL. La mayor actividad fue demostrada por la especie *H. colombiana* Epling., frente a *S. aureus*, patógeno que invade o infecta las vías respiratorias constituyéndose en la mayoría de los casos un problema de salud pública.

6. Finalmente al tomar en consideración la relación de concentración germacreno D/ β -cariofileno en las diferentes recolecciones, se puede concluir que la actividad observada es debida a la presencia de estos sesquiterpenos pudiendo ejercer el *t*-cadinol un efecto sinérgico cuando se encuentra en altas concentraciones.

www.bdigital.ula.ve

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Acosta, V; Gutiérrez, A; Otálvaro, B. 2003.** Determinación del potencial bactericida *In vitro* de un aislado nativo de *Lactobacillus cassei* frente *E. col*. Rev. Lasallista Investig. vol. 5:2. 138-140pp.
2. **Achmad, S; Kaer, A; Makmur, A; Norrestam, L. 1987.** Molecular and crystal structure of hyptolide, a naturally occurring α , β -unsaturated δ -lactone. Acta Chemical Scandinavica B, 41:599-609pp.
3. **Adams, R. 2007.** Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4Th Ed. Allured Publishing Corporation, Carol Stream IL, USA. 804p.
4. **Albornoz, A. 1997.** Medicina Tradicional Herbaria. Edi. Instituto Farmacoterápico Latino, S.A. Caracas-Venezuela, 64 – 73pp.
5. **Aleman, A; Marquez, C; Pascual, S; Valverde, M; Perales, A; Fayos, J; Martinez, R. 1979.** New compounds from Hyptis. X-ray crystal and molecular structures of olguine. Tetrahedron Letters. 37:3579-3582pp.
6. **Alleman, D; Andres, R; Borquin, D; Clerc, J. 1989.** Computer – Aided GC/MS analysis of essential oils in complex vegetable drugs for quality control. Planta Medica 55: 70-73pp.
7. **Araujo, E; Silveira, E; Lima, A; Neto, M; De Andrade, I; Lima, M; Santiago, G; Mesquita A. 2003.** Insectidicidal activity and chemical composition of volatile oils from *Hyptis martiussi* Benth. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51:3760-3762pp.

8. Asekun, O; Ekudanyo, O; Adeniyi, B. 1999. Antimicrobial activity of the essential oil of *H. suaveolens* leaves. *Fitoterapia*. 70:440-442pp.
9. Asekun, O; Ekudanyo, O. 2000. Essential oil constituents of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Bush tea) leaves from Nigeria. *Journal of Essential Oil Research*. 12:227-230pp.
10. Aycard, J; Kini, F; Kam, B; Gaydou, E; Faure, R. 1993. Isolation and identification of spicigerol lactone: complete *Hyptis* and C assignments using two. *Fitoterapia* 70:440-442pp.
11. Azevedo, N; Campos, I; Ferreira, H; Portes, T; Seraphin, J; De Paula, J; Santos, S; Ferri, P. 2001. Chemical variability in essential oil of *Hyptis suaveolens*. *Pergamon*. 57: 733-736pp.
12. Azevedo, N; Campos, I; Ferreira, H; Portes, T; Seraphin, J; De Paula, J; Santos, S; Ferri, P. 2002. Essential oil chemotypes in *H. suaveolens* from Brazil Cerrado. *Biochemical Systematics and Ecology*. 30: 205-216pp.
13. Bailac, P; Duschatzky, C; Ponzi, M; Firpo, N. 1999. Essential oil of *Hyptis mutabilis* Briq. Grown in San Luis Argentina. *Journal of Essential Oil Research*. 11: 217-219pp.
14. Barbosa, P; Ramos, C. 1992. Studies on the antiulcerogenic activity of the Essential Oil of *Hyptis mutabilis* Briq. In rats. *Phytotherapy Research*. 6:114-115pp.
15. Batista, F; de Paula, J; Silva, J; Santos, S; Ferri, P; Ferreira, H. 2003. Essential oils of *Hyptidendron canum* (Pohl ex Benth.) R. Harley and *Hyptis velutina* Pohl ex Benth, from Brazil. *Journal of Essential Oil Research*. 15 (2): 88-89pp.

16. **Becerra, G; Matheus, P. 1997.** Fisicoquímica para ciencias de la salud. Universidad de Los Andes, Facultad de Farmacia, Consejo de Estudios de Postgrado, Programa del Vicerrectorado académico, Mérida-Venezuela 20.32pp.
17. **Berry, P; Paul, E; Yatskivych, K; Holstk. 1999.** St. Lous Missuni USA. Missouri Botanica Garden Flora of the Venezuela Guayana 79p.
18. **Boalino, B; Mourao, R; Franzotti, E; Bomfim, K. 2003.** Antinocioceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. Journal of Ethnopharmacology. 76: 81-86pp.
19. **Boeke, S; Barnaud, C; Van Loon, J; Kossou, D; Van Huis, A; Dicke, M. 2004.** Efficacy of plant extracts against the cowpea beetle, *Callosobruchus maculatus*. International Journal of pest management. 50 (4): 251-258pp.
20. **Bonicatto, M; Marasas, M; Sarandón, S. 2007.** El valor medicinal de la biodiversidad vegetal en agroecosistemas tradicionales de Berisso, Argentina. Revista Brasileña de Agroecología. 2, 1319 – 1322pp.
21. **Bropy, J; Lassak, E. 1987.** The volatile leaf oils of *Hyptis pectinata* (L) Poit and *Vitex trifolia* L. var. bicolor Moldenke from Fiji. Flavour and Fragrance Journal. 87:41-43pp.
22. **Castello, G; Moretti, P; Vezzani, S. 2008.** Retention models for programmed gas chromatography. Journal of Chromatography A. 10: 1607 – 1623pp.
23. **Castillo, E.; Martínez, I. 2007.** Manual de Fitoterapia. Elsevier Doyma S.L, Editorial Mansson, Barselona. España, 29: 426-437pp.
24. **Catino, P; Harley, R; Wagstaff, S. 1992.** Genera of Labiatae: Status and classification en: advances in Labiatae science. R:M Harley y Reynolds eds. Royal Botanic Garden review. 511-522pp.

25. **Cerpa, C; Manuel, G. 2007.** Hodrodestilación de aceites esenciales, modelado y caracterización. Tesis Doctoral. Universidad de Valladolid, España 112p.
26. **Chalchat, J; Garry, R; Harama, M; Sidibe, L. 1997.** Chemical composition of essential oils of two species endemic in Mali: *Hyptis spicigera* and *Hyptis suaveolens*. Rivista Italiana EPPOS. 682-696pp.
27. **Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010.** CLSI 31(1): 1-165pp.
28. **Costa, L; Araújo, E; Lima, M; Moraes. M; Pessoa, C; Silveria, E; Moraes, M. 2003.** Antiproliferative effects of abietane diterpenoids isolated from *Hyptis martiusii* Benth (Labiatae). Pharmazie. 58:78-79pp.
29. **Collins, D; Reynolds, W; Reese, P. 2002.** Aromadendrane transformations by *Curvularia lunata* ATCC 12017. Phytochemistry. 60:475-481pp.
30. **Davies, N. 1990.** Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and carbowax 20 M. phases. Journal of Chromatography. A. 503: 1-24pp.
31. **Delgado, G; Pereda, R; Romo, A. 1985.** Structure and stereochemistry of 4-deacetoxy-10-epi-olguine a new δ -lactone from *Hyptis oblonifolia* Benth (Labiatae). Heterocycles. 23:8p.
32. **Delgado, H; Garcia, J; Hidalgo, J; Cerrutti, T; Mestanza, M. 2000.** Aromatic Plant Oils of the Peruvian Amazon. Part 2. *Cymbopogon citrates* (DC) Stapf., *Renealmia* sp., *Hyptis recurvata* Poit. And *Tynanthus panurensis* (Bur.) Sandw. Journal of Essential Oil Research. 12: 14-18pp.
33. **Dellacassa, E; Lorenzo, D; Mondello, L; Stagno, A. 1997.** Uruguayan essential oils. Part VIII. Compositions of leaf oil of *Hyptis floribunda* Briq. Ex Micheli (Labiatae). Journal of Essential oil Research. 9: 523-525 pp.

- 34. Dewick, P. 2002.** Medicinal Natural Products. Edi. John Wiley & Sons, Inglaterra, Pp. 250-257pp.
- 35. Domínguez-Vázquez, G; Berlín, B; Castro Ramírez, A; Estrada-Lugo, E. 2002.** Revisión de la diversidad y patrones de distribución de Labiatae en Chiapas. Anales del Instituto de Biología. *Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Botánica* 73(1):39-80pp.
- 36. Fun, C; Svendsen, A. 1990.** The Essential oil of *Hyptis suaveolens* Poit. Grown in Aruba. Flavour and Flavour Journal. 5: 161-163pp.
- 37. Grassi, P; Nuñez, M; Varmuza, K; Franz, C. 2005.** Chemical polymorphism of essential oils of *Hyptis suaveolens* from El Salvador. Flavour and Fragrance Journal. 20 :131-135pp.
- 38. Greff, D. 1998.** Cosmetic compositions comprising at least one *Hyptis* extract. Patent. 1, 63pp.
- 39. Gennaro, A. 1998.** Determinación de los componentes presentes en los aceites esenciales de especies vegetales. Revista Latinoamericana Química. 18: 89-90pp.
- 40. German, V. 1971.** Insolation and Characterization of Cytotoxic Principles from *Hyptis verticillata* K Jacq. Journal of Pharmaceutical Sciences. 60: 649-650pp.
- 41. Gottlieb, O; Koketsu, M; Magalhaes, M; Guilherme, S; Mendes, P; Da Rocha, A; Da Silva, M; Wilberg, V. 1981.** Essential oils from the Amazon VII. Acta Amazonica. 11: 143-148pp.
- 42. Goun, E; Cunningham, G; Chu, D; Nguyen, C; Miles, D. 2003.** Antibacterial and antifungal activity of Indonesian ethnomedical plants. Fitoterapia. 74 (6): 592-596pp.
- 43. Harborne, J. 1988.** The Flavonoids. Chapman & Hall. London. RMN: 295-296; EM: 294-295; UV: 292-294 pp.

44. **Hac, L; Khoi, T; Dung, N; Mardarowicz, M. 1996.** A new chemotype of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. Journal Essential Oil Reserch. 8 (3): 315-318pp.
45. **Jacq, A; Márquez, C; Pascual, S. 1786.** New compounds from *Hyptis* in Andes. Tetrahedron Letters. 3579-3581pp.
46. **Janssen, A; Scheffer, J; Baerheim, A. 1987.** Antimicrobial activity of essential oils. Planta Medica. 53: 395-398pp.
47. **Jirovet, L; Ngassoum, M. 1999.** Olfactory evaluation and GC/MS analysis of the essential oils of leaves and flowers of *Hyptis pectinata* (L) Poit. From Cameroon. Journal of Essential oil bearing Plants. 3:71-77pp.
48. **Jirovetz, L; Buchbauer, G; Puschmann, C; Ngassoum, M. 2000.** Investigations of aromatic plants from Cameroon: analysis of the essentials oils of flowers of *Hyptis spicigera* (Linn.) Poit. By GC, GC / MS and olfactometry. Journal Essential Oil Bearing Plants. 3 (2): 71-77pp.
49. **Kashiwada, Y; Wang, H; Nagao, T; Kitanaka, S; Yasuda, I; Fujioka, T; Yamagishi, T; Consentino, M; Kozuda, M; Okabe, H; Ikeshiro, Y; Hu, Ch; Yhe, E; Lee, K. 1998.** Anti-HIV activity of oleanic acid, pomolic acid, and structurally related triterpenoids. Journal of Natural Products. 61:1090-1095pp.
50. **Kobayashi, K; Umishio, K; Ota, M; Yoshida, Y; Satake, M; Sekita, S. 2001.** Serine protease inhibitors and skin preparations containing the inhibitors for treatment of rough skin. Human Science Shinko Zaidan. 1, 63pp.
51. **Koneman, E; Allen, S; Jonda, W; Schreckenberger, P; Winn, W. 2003.** Diagnóstico Microbiológico. Edi. Panamericana, Argentina, 764 – 832pp.
52. **Kuhnt, M; Rimpler, H; Heinrich, M. 1994.** Lignans and other compounds from the mixe Indian medicinal plant *H. verticillata*. Phytochemistry 36(2):485-489pp.

53. **Kuhnt, M; Rimpler, H; Allen, S. 1994.** Lignans and other compounds from the mixe Indian medicinal plant *H. verticillata*. *Phytochemistry* 36.2:485-489pp.
54. **Ladan, Z; Amupitan, O; Oyewale, O; Okonkwo, E; Ladan, O; Odjobo, B; Habila, N. 2011.** Chemical compositions and biological activity of the volatile oils of *Hyptis spicigera* against *Trypanosoma brucei brucei*, (tbb) found in Northern Nigeria. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*. 5: 53-58pp.
55. **Lee, K; Lin, Y; Wu, T; Zang, D; Zhang, D; Yamagishi, T; Hayashi, T; Hall, I; Chang, J; Wu, R; Yang, T. 1988.** The cytotoxic principles of the *Prunilla vulgaris*, *Psychotria serpens* and *Hyptis capitata*: Ursolic acid and related derivatives. *Planta Médica* 54(4):308-311pp.
56. **López, A; Banchio, E; Zygodlo, J. 2002.** Aromatic Plants of Yungas ParteI: Chemical composition of The essential oil of *Hyptis floribunda* Briq.Ex Micheli. *Journal of Essential oil Research*. 14.179-180 pp.
57. **Lynch, M; Raphael, S; Mellor, L; Spare, P; Inwood, M. 1988.** Métodos de Laboratorio. Edi. México Interamericana. 1001 – 1013pp.
58. **Luz, A; Zoghbi, M; Ramos, L; Maia, J; Da Silva, M. 1984.** Essential oils of some Amazonian Labiatae.1. Genus *Hyptis*. *Journal of Natural Products*. 745-747pp.
59. **Mabberley, D. 1987.** The plant Book: A Portable dictionary of the Higher Plant. Cambridge University Press. Cambridge.
60. **Madden, Li; Potts B. 1995.** Variation in volatile leaf oils of the Tasmanian *Eucalyptus* Species-1 Subgenus *Monocalyptus*. *Biochemical Systems and Ecology*. 23: 299-318.

- 61. Malan, K; Pelissier, Y; Marion, C; Blaise, A; Bessiere, J. 1988.** The essential oil of *Hyptis pectinata*. *Planta Médica*. 60-68pp *VOLUMEN?*.
- 62. Malele, R; Mutayabarwa, C; Mwangi, J; Tholthl, G; Lopez, A; Lucini, E; Zygadio, J. 2003.** Essential oil *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. From Tanzania: Composition and antifungal activity. *Journal of Essential Oil Research*. 15(6): 438-440pp.
- 63. Malonianga, N; Kolle, C; Camara, B. 1996.** Analysis of the *Hyptis suaveolens* Poit essential oils. *Rivista Italiana. EPPOS*, 7, 708-709.
- 64. Manchand, P; White, J; Fayos, J; Clardy, J. 1974.** Structures of suaveolic acid and suaveolol. *Journal of Organic Chemistry*. 39(15):2306-2308pp.
- 65. Marcano, D; Hasegawa, M. 2002.** Fitoquímica orgánica. Universidad Central de Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Caracas, Venezuela, Pp. 171 – 279pp.
- 66. McNeil, M; Facey, P; Porter, R. 2010.** Essential Oils from the *Hyptis* genus- A Review. *Natural Product Communications*. 5: 1-23pp.
- 67. Menghini, A; Mantilacci, G; Pocceschi, N; Tatani, N. 1996.** Composition and in vitro antifungal activity of the essential oil of *Hyptis suaveolens* Poit. *Rivista Italiana. EPPOS*, 7: 435-440pp.
- 68. Miranda, R; Hernandez, L; Villavicencio, M; Novelo, M; Ibarra, P; Cahi, H; Pezzuto, J. 1993.** Structure and stereochemistry of pectinolides A-C, Novel antimicrobial and cytotoxic 5, 6-dihydro- α -pyrones from *Hyptis pectinata*. *Phytochemistry*. 56. 4:583-593pp.

69. **Monache, F; Marletti, F; Marini, G; De Mello, F; D'Albuquerque, I. 1976.** Diterpenoids of *Hyptis fruticosa* (Labiatae) II. *Hyptol. Phytochemistry.* 78:89pp.
70. **Monache, F; Monache, J; Gacs, E; De Barrios, J; De Albuquerque, I; Chiappeta, A; De Mello, F. 1990.** Umbrose and α -quinone from *H. umbrosa*. *Phytochemistry.* 29. 12:3971-3972pp.
71. **Mukthar, A; Rainer, W; Irwin, P. 1994.** Composition of the leaf oil of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. *Journal of Essential Oil Research.* 6: 571-575pp.
72. **Nascimento, P; Alviano, W; Nascimento, A; Santos, P; Azevedo, V; Trindade, R. 2008.** *Hyptis pectinata* essential oil: chemical compositions and anti- *Streptococcus mutans* activity. *Oral diseases.* 14:485-489pp.
73. **Ngassoum M; Jirovetz, L; Buchbauer, G. 1999.** Essential oil and headspace from *H. suaveolens* (L.) Poit. Leaves and Flowers from Cameroon. *Journal of Essential Oils Resources.* 7:283-288pp.
74. **Noegroho, S; Srimulyani; Mulyaningsih, B. 1997.** Larvacidal activity of *Hyptis suaveolens* essential oil toward 4th instar *Aedes aegyptis* larvae and gas chromatographic-mass spectroscopic analysis of the oil. *Majda Farmasi Indones.* 8 :4. 160-170pp.
75. **Novelo, M; Cruz, J; Hernández, L; Pereda, R. 1993.** Cytotoxic constituents from *H. verticillata*. *Journal of Natural Products.* 56(10):1728-1736pp.
76. **Palá, J. 2002.** Contribución Al Conocimiento De Los Aceites Esenciales. Editorial Pirámide. Madrid. 50-66pp.
77. **Peerzada, N. 1997.** Chemical composition of the essential oil of *H. suaveolens*. *Molecules.* 2:165-168pp.

- 78. Pereda, R; Gascón, M. 1988.** Chemistry of *Hyptis mutabilis*: New pentacyclic triterpenoids. *Journal of Natural Products*. 23:996-998pp.
- 79. Pereda, R; Fragoso, M; Cerda, C. 2001.** Application of molecular mechanics in the total stereochemical elucidation of spicigerolide, a cytotoxic 6-tetraacetyloxyheptenyl-5,6-dihydro- α -pyrone from *Hyptis spicigera*. *Tetrahedron*. 57:47-53pp.
- 80. Pérez, M; Segura, A; García, R; Colinas, T; Pérez, M; Vázquez, A; Navarro, H. 2009.** Residuos de plaguicidas organofosforados en cabezuela de brócoli (*Brassica oleracea*) determinados por cromatografía de gases. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 25-32pp.
- 81. Perva, A; Stangler, S; Hadolin, M; Knez, Z. 2001.** Insolation of active components of Lamiaceae. *Biochemistry*. cross-reference(s) : 20-21pp
- 82. Pietschmann, M; Vostrowsky, O; Bestmann, H; Pant, A; Mathela, C. 1998.** Volatile constituents of *Hyptis pectinata* Poit. (Lamiaceae). *Journal of Essential Oil Research*. 10:550-552pp.
- 83. Porter, R; Reese P; Williams, L; Williams, D. 1995.** Acaricidal and insecticidal activities of cadina-4, 10 (15)-dien-3-one. *Phytochemistry*. 40(3): 735-738pp.
- 84. Queiroz-Voltan, R; Stubblebine, W; Shepherd, G. 1995.** Terpene variations in *Hyptis suaveolens* in the defense against herbivorous insect larvae. *Plant Biochemistry*. 54 (2), 217-235pp.
- 85. Rana, V; Juyal, J; Rashmi, B. 2004.** Volatile constituents of *Hyptis suaveolens* flowering twig oil. *International Journal of Aromatherapy*. 14: 198-201pp.

- 86. Rangel, A.; García, I.; Velasco, J.; Buitrago, D.; Velazco, E. 2001.** Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico, acetónico y acuoso de *Baccharis nitida* (Ruiz et Pavon). Revista de la Facultad de Farmacia. 42: 43-46pp.
- 87. Rivas, R; Valera, D; Luis, A; Aubert, L; Alonso, M; Rojas, L; Usubillaga, A. 2002.** The Essential Oil of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit and its insect deterrent properties. Journal of Oil-Bearing Plants. 5:126-131pp.
- 88. Romo, A; Vidales, P; Pérez, A. 1991.** An aliphatic δ -lactone from *Hyptis urticoides*. Phytochemistry 7:2417-2418pp.
- 89. Rouzet, M. 1984.** The new concept of the chromatographic profile and the quality level of essential oils. Anales de la Real Academia de Farmacia. 50: 465-477pp.
- 90. Sanabria, A; Mendiza, A; Moreno, A. 1998.** Actividad antimicrobiana *in vitro* de angiospermas colombianas. Revista Colombiana de Ciencias Químico – Farmacéutica.27:47 – 51pp.
- 91. Sánchez, C; Francis, J. 2006.** Extracción de aceites esenciales. Experiencia colombiana. II Congreso Internacional de Plantas Medicinales y Aromáticas. Universidad Nacional de Colombia. 26-47pp.
- 92. San Martín Casamada, Ramón. 1977** Tratado de Farmacognosia. Barcelona, España. 1121 p.
- 93. Scramin, S; Saito, M; Pott, A; Ortiz, M. 2000.** Volatile constituents of *Hyptis crenata* Pohl (Labiatae) native in Brazilian Pantanal. Journaln of Essential Oils Resources 12:99-101pp.

94. **Serrano, M; González, E; Pereda, E. 1999.** Novel labdane diterpenes from the insecticidal Plant *Hyptis spicigeria*. Journal of Natural Products. 62: 45-50pp.
95. **Seyoum, A; Paison, K; Kung's, A; Kalibiru, E; Lwande, W; Killeen, G; Hassanail, A; Knols, B. 2002.** Traditional use of mosquito-repellent plants in western Kenya and their evaluation in semi-field experimental huts against anopheles gambias: ethnobotanical studies and application by thermal al expulsion and direct burning. Transactions of the royal society of tropical medicine and Hygiene. 96(3): 225-231pp.
96. **Seyoum, A; Kabiru, E; Lwande, W; Killeen, G; Hassanall, A; Knols, B. 2002.** Repellency of live potted plants against Anopheles gambiae from human baits in semi-field experimental huts. American Journal of tropical medicine and hygiene, 67: 2. 191-195pp.
97. **Sheth, K; Jolad, S; Wiedhope, R; Cole, J. 1972.** Tumor-inhibitory agent from *Hyptis emoryi* (Labiatae). Plant Medical 61(11):18-19pp.
98. **Sibidé, L; Chalchat, J; Garry, R. 2001.** Aromatic plants of Mali (III): chemical composition of two *Hyptis* species: *H. suaveolens* (L.) Poit. And *H. spicigera* Lam. Journal of Essential Oils Resources. 13:55-57pp.
99. **Silva, A; Barbosa, L; Nascimento, E; Casali, V. 2000.** Chemical composition of the Essential oil. Of *Hyptis glomerata* Mart. Ex Scharnk (Lamiaceae). Journal of Essential Oils Resources 12:725-727.
100. **Singh, H; Upadhyay, R. 1992.** Fungitoxic activity of the volatile oil of *Hyptis suaveolens*. Fitoterapia 5:462-465pp.

101. Singh, H; Handique, A. 1997. Antifungal activity of the essential oil of *H. suaveolens* and its efficacy in biocontrol measures in combination with *trichoderma harziaianun*. *Jorunal of Essential Oils Resources* 7:683-687pp.
102. Singh, G; Kapoor, I; Pandey, S; Singh, O. 2001. A note on antibacterial activity of volatile oils of some aromatic plants. *Essential Oil Association of India*. 45(4): 275-278pp.
103. Souza, L; Tackakiti, S; Sombat, C. 2003. Comparison antimicrobial activity of essential oils from *Hyptis ovalifolia*, *Indian Perfumer*. 50: 57-59pp.
104. Srivastava, M; Asai, P; Kumar, A. 1996. Spectrophotometric estimation of methyl chavicol: the potrencial bio-active agent. *Asian Journal of Physics*. 5 :2. 169-171pp.
105. Stadnik, M; Bettloll, W; Salto, M. 2003. Bloprospecting for plant and fungus extracts with systemic effect to control the cucumber powdery mildew. *Journal of plant diseases and protection*. 110(4): 383-393pp.
106. Tanowitz, B; Junak, S; Smith, D. 1984. Terprnoids of *Hyptis pectinata*. *Journal of Natural Products*. 47:739-780pp.
107. Tchoumboungang, F; Zollo, A; Boyom, F; Nyegue, M; Bessiere, J; Menut, C. 2005. Aromatic Plants of tropical central Africa. XLVIII. Comparative study of the essential oils of four *Hyptis* species from Cameroon: *Hyptis lanceolata* Poit. *Hyptis pectinata* L. Poit. *Hyptis spicigera* Lam. And *Hyptis suaveolens* Point. *Flavour and Fragrance Journal*. 20:340-343pp.
108. Thoppil J; Ernest, J., 1995. Chemical composition of essential oil in two ethnomedicinal species of *Hyptis suaveolens* and *Hyptis capitata*. *Acta Pharmaceutica (Zagreb)*. 45 (4):551-553pp.

- 109. Thoppil, J; Joseph, L. 1997.** Chemical composition of essential oil in two ethnomedicinal species of *Hyptis*. *Acta Pharmaceutica*.45.(4):551-559 pp.
- 110. Tucker, A; Maciarello, M; Landrum, L. 2005.** Essential oil of Desert – Lavender. *Hyptis emoryi* Torrey (Lamiaceae) from Arizona. *Journal of Essential oil Research*.17:223-224pp.
- 111. Urones, J; Marcos, I; Diez, D; Cubilla, L. 1998.** Tricyclic diterpenes from *Hyptis dilatata*. *Phytochemistry*. 48.(6):1035-1038pp.
- 112. Valenzuela, A; Armenta, R.; Moreno, E; Gutiérrez, L; Grajeda, P; Orantes, C. 2006.** Optimización y validación de un método de dispersión de matriz en fase sólida para la extracción de plaguicidas organofosforados en hortalizas. *Revista de la Facultad de Agronomía*. 23:471 – 482pp.
- 113. Vega, H; Iskander, F; Manzanares, E. 1997.** Elemental distribution in medicinal plants commonly used in folklore medicine in Mexico. *International Journal of Environmental Analysis Chemistry*. 66:95-105pp.
- 114. Velasco, A; Pérez, M; Esteban, J; Guzmán, C; Zygadlo, J; Espinar, L. 1995.** Volatile constituents of *Hyptis mutabilis* (Rich) Briq. *Journal of Essential Oils Research*. 7:81-82pp.
- 115. Velasco, J; Rojas, J; Salazar, P; Rodríguez, M; Díaz, T; Morales, A; Rondón, M. 2007.** Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Lippia oreganoides* Against Multiresistant Bacterial Strains of Nosocomial Origin. *Natural Products Communication*. 2 (1) 85-88pp.
- 116. Vilariño, R. 1988.** *Prontuario Microbiológico*. Edi. Disinlimed, España. 231 – 261pp.

- 117. Velazquez, D; Ramirez, N; Benites, C., et al. 1997** Acta Botánica de Venezuela Vol. 20. Número 1. Fundación Instituto Botánico de Venezuela.3-10pp.
- 118. Werner, H. 1933.** The volatile oils of *Hyptis mutabilis*. Journal of American Pharmaceutical Association. 24:289-290pp.
- 119. Ziegler, H; Jensen, T; Christensen, J; Staerk, D; Hägerstrand, H; Sittie, A; Olsen, C; Staalso, T; Epke, P; Jaroszewski, J. 2001.** Possible artifacts *in vitro* determination of antimalarial activity of natural products that incorporate into lipid bilayer: apparent antiplasmodial activity o dehydroabietinol, a constituent of *H. suaveolens*. Planta Medica.68:547-549pp.
- 120. Zoghbi, M; Andrade, E; Da Silva, M; Mala, J; Luz, A; Da Silva, J. 2002.** Chemical variation in the essential oils of *Hyptis crenata* Pohl ex Benth. Flavour and Fragrance Journal. 17(1): 5-8pp.
- 121. Zollo, P; Biyiti, L; Tchoumboungang, F; Menut, G; Bouchet, P. 1998.** Aromatic plants of tropical Central Africa, Part. XXXII. Chemical composition and antifungal activity of Thirteen Essential Oils from Aromatic Plants of Cameroon. Flavor and Fragrance Journal. 13:107-114pp.

Referencias Bibliográficas tomadas de la Base de Datos El Common Gateway Interface (CGI):

- 122.** http://media.photobucket.com/image/enfleurage/Sacred_Herbals/enfleurage.jpg
- 123.** http://faculty.ksu.edu.sa/18856/Extraction/Soxhlet_Extractor.jpg

ANEXOS

www.bdigital.ula.ve

ANEXOS I
FOTOS DE LAS ESPECIES
Hyptis ESTUDIADAS

www.bdigital.ula.ve

Hyptis mutabilis L.C. Rich



Hyptis peptinata L. Poit



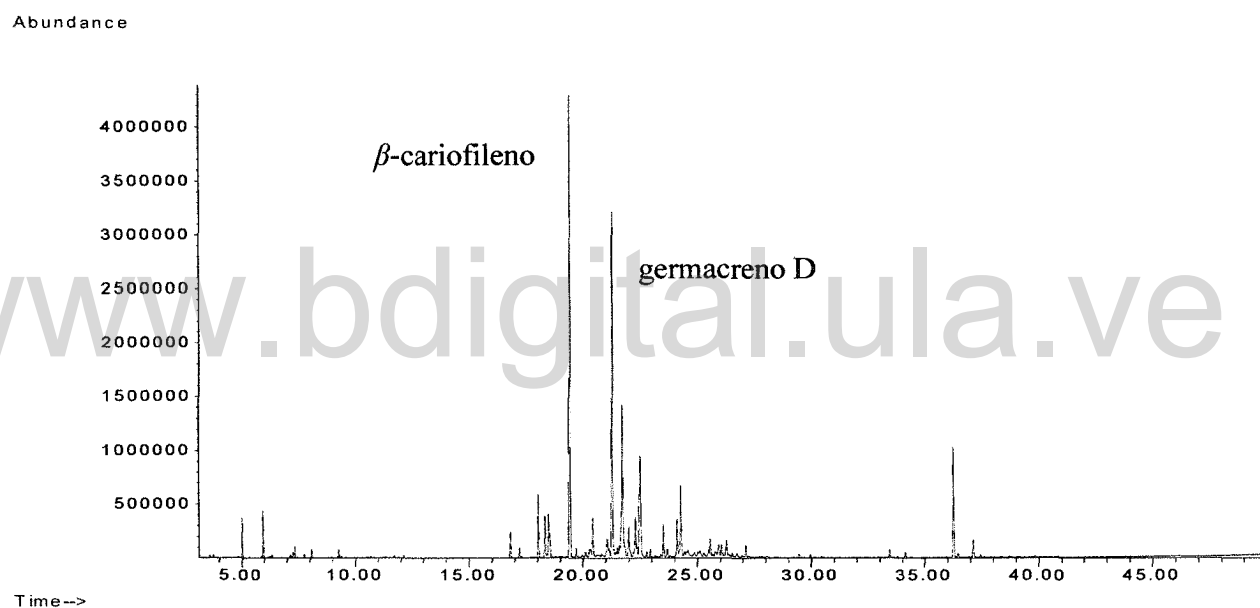
Hyptis Colombiana Epling



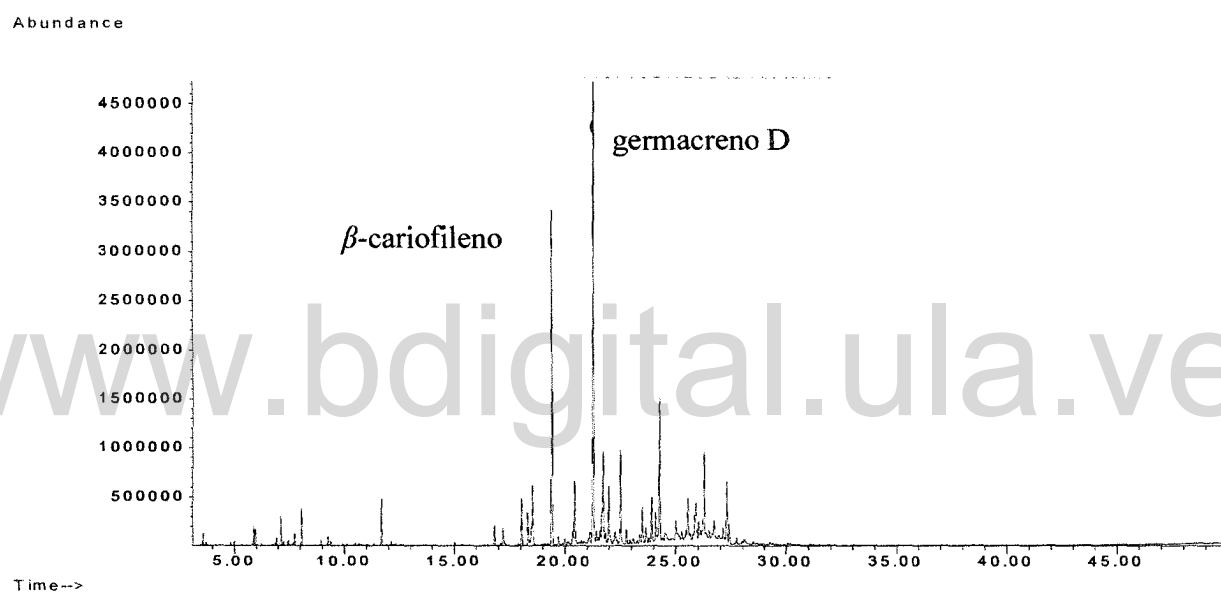
Fuente Fotográfica: Mayalin Flores

ANEXOS II
CROMATOGRAMAS DE GASES DE LOS ACEITES
ESENCIALES DE LAS ESPECIES DE *Hyptis*
INVESTIGADAS

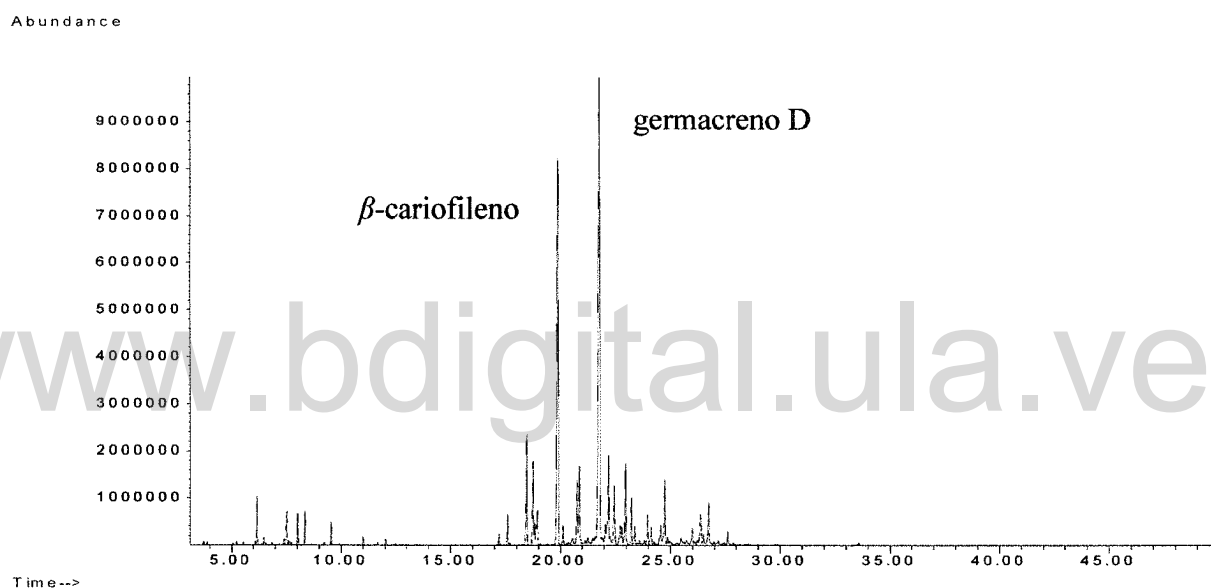
CROMATOGRAMA DE GASES DEL ACEITE ESENCIAL DE
Hyptis mutabilis L.C. Rich. (Recolección, enero 2006)



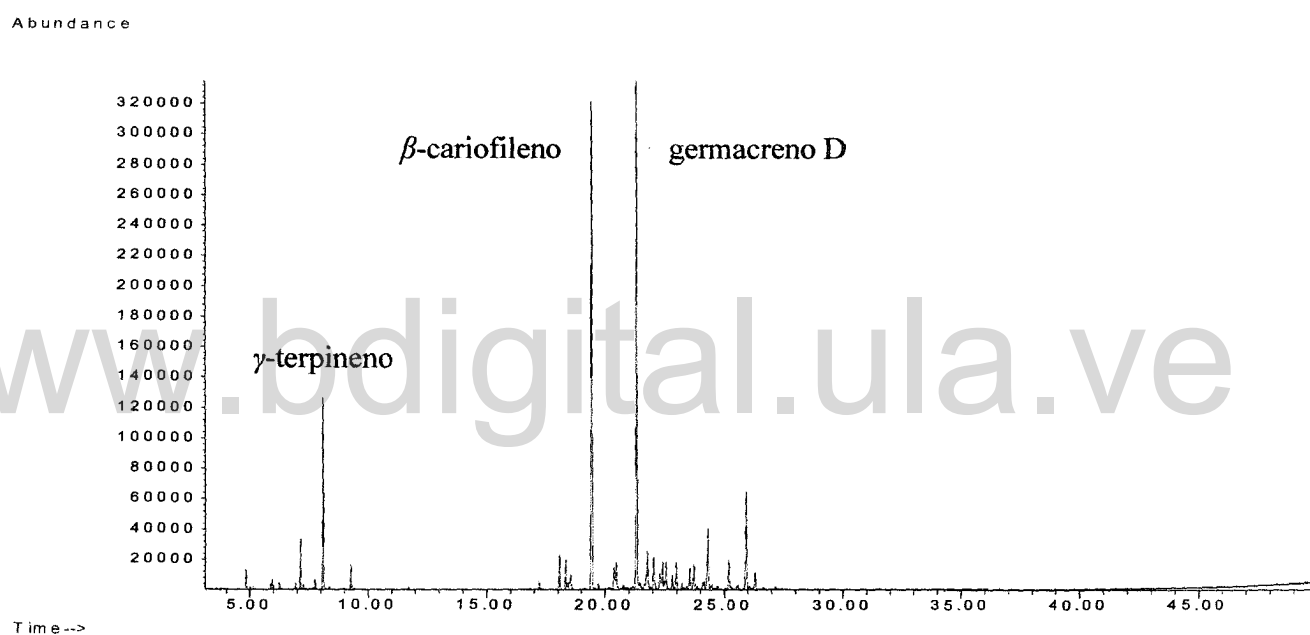
CROMATOGRAMA DE GASES DEL ACEITE ESENCIAL DE
Hyptis mutabilis L.C. Rich. (Recolección, febrero 2006)



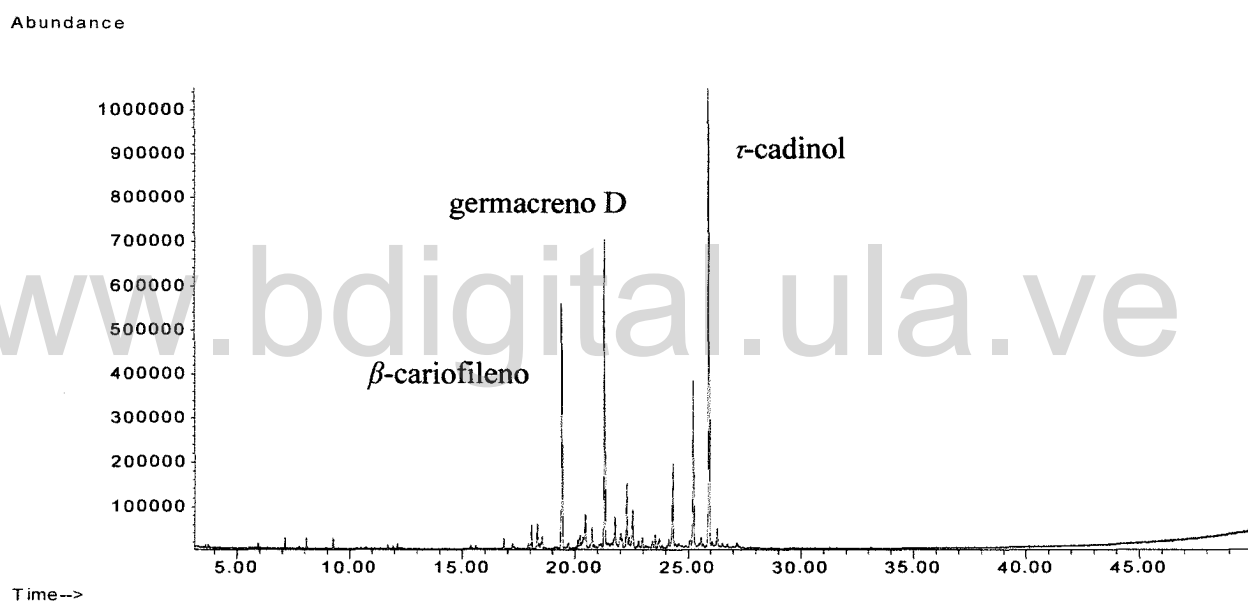
CROMATOGRAMA DE GASES DEL ACEITE ESENCIAL DE
Hyptis mutabilis L.C. Rich. (Recolección, octubre 2006)



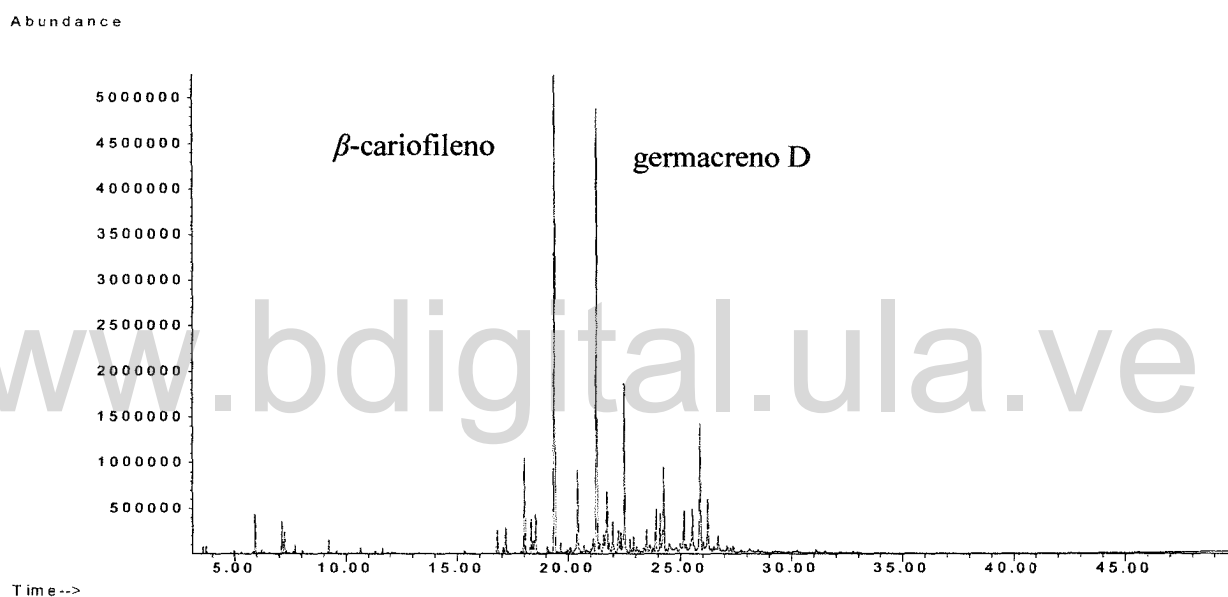
CROMATOGRAMA DE GASES DEL ACEITE ESENCIAL DE
Hyptis pectinata L. Poit. (Recolección, febrero 2005)



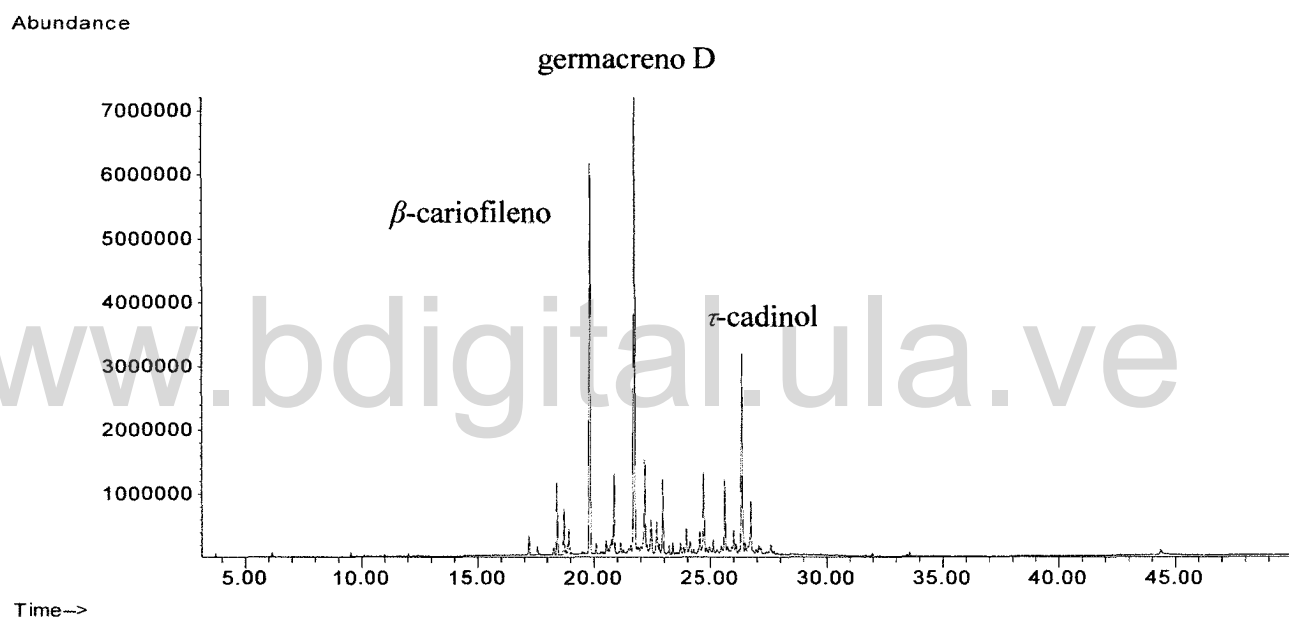
CROMATOGRAMA DE GASES DEL ACEITE ESENCIAL DE
Hyptis pectinata L. Poit. (Recolección, marzo 2005)



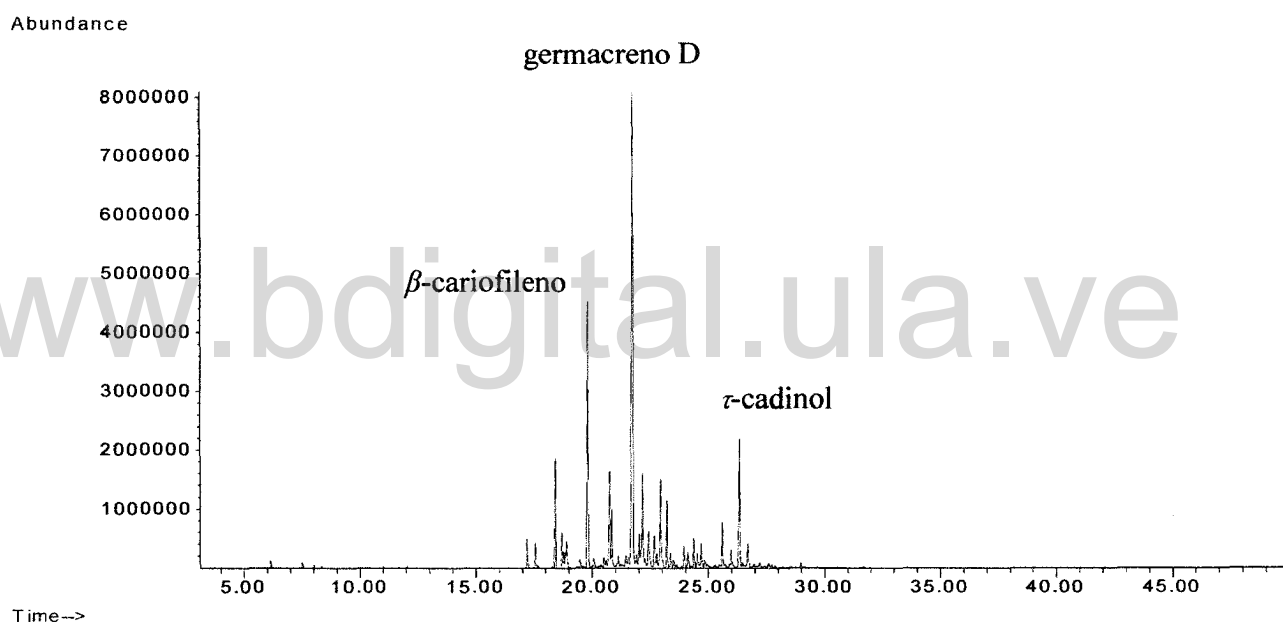
CROMATOGRAMA DE GASES DEL ACEITE ESENCIAL DE
Hyptis pectinata L. Poit. (Recolección, mayo 2005)



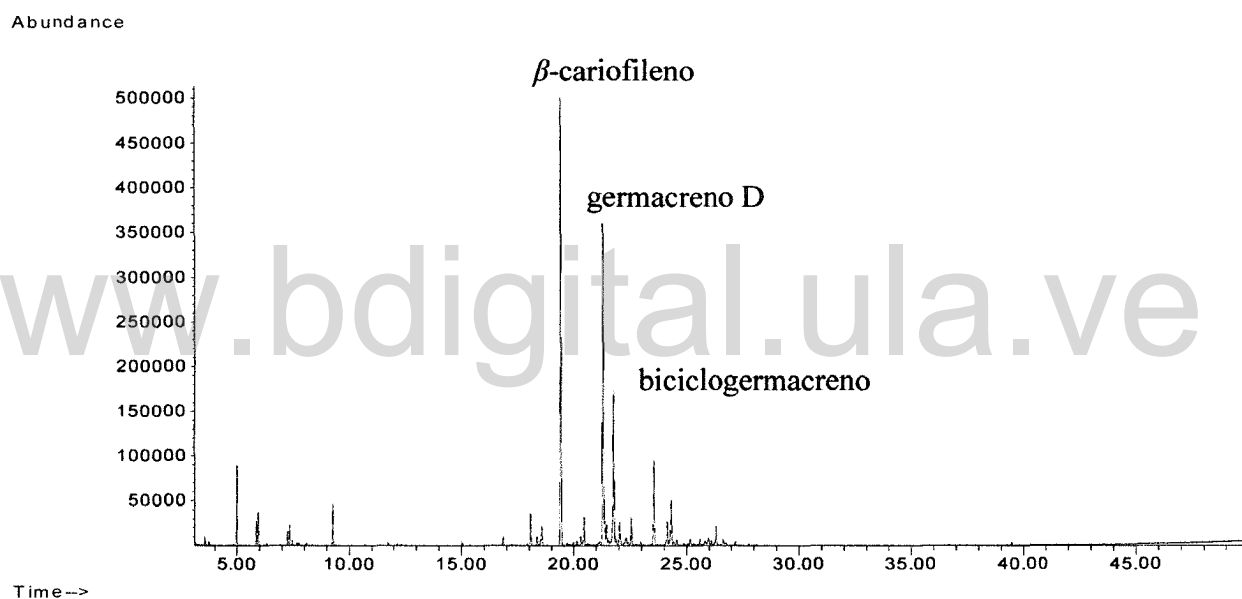
CROMATOGRAMA DE GASES DEL ACEITE ESENCIAL DE
Hyptis pectinata L. Poit. (Recolección, octubre 2006)



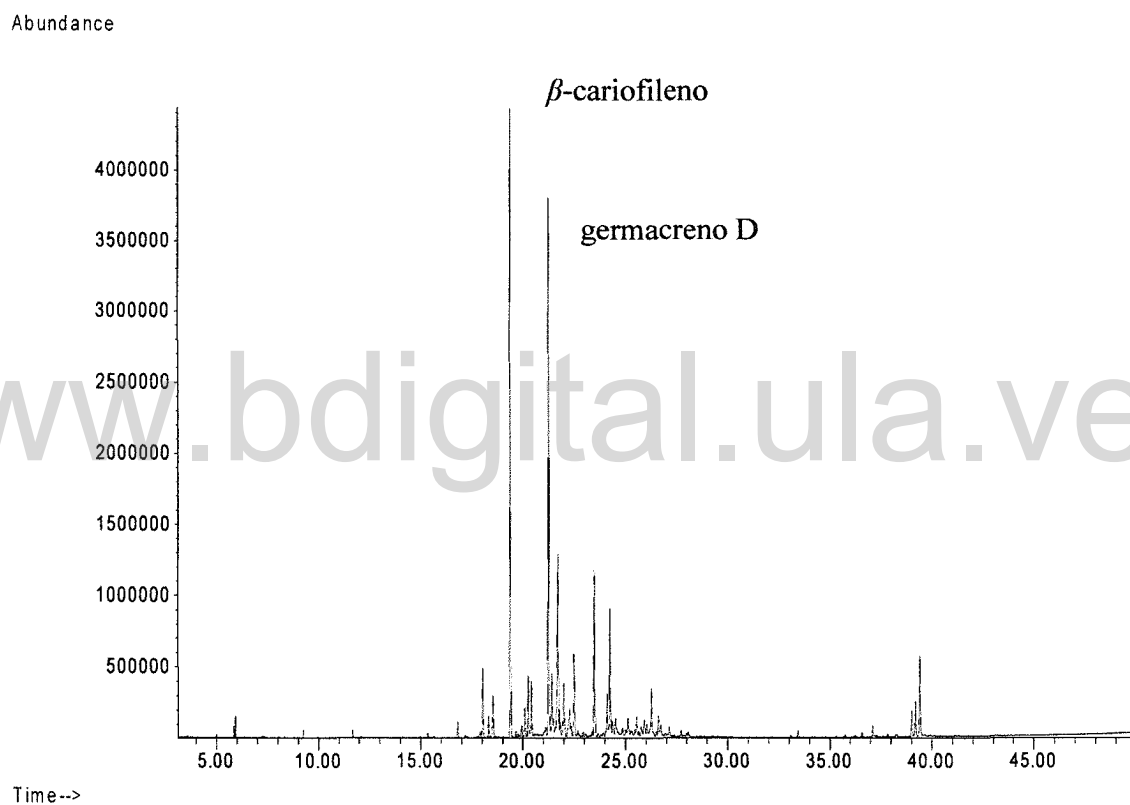
CROMATOGRAMA DE GASES DEL ACEITE ESENCIAL DE
Hyptis colombiana Epling. (Recolección octubre 2006)



CROMATOGRAMA DE GASES DEL ACEITE ESENCIAL DE
Hyptis colombiana Epling. (Recolección febrero 2005)

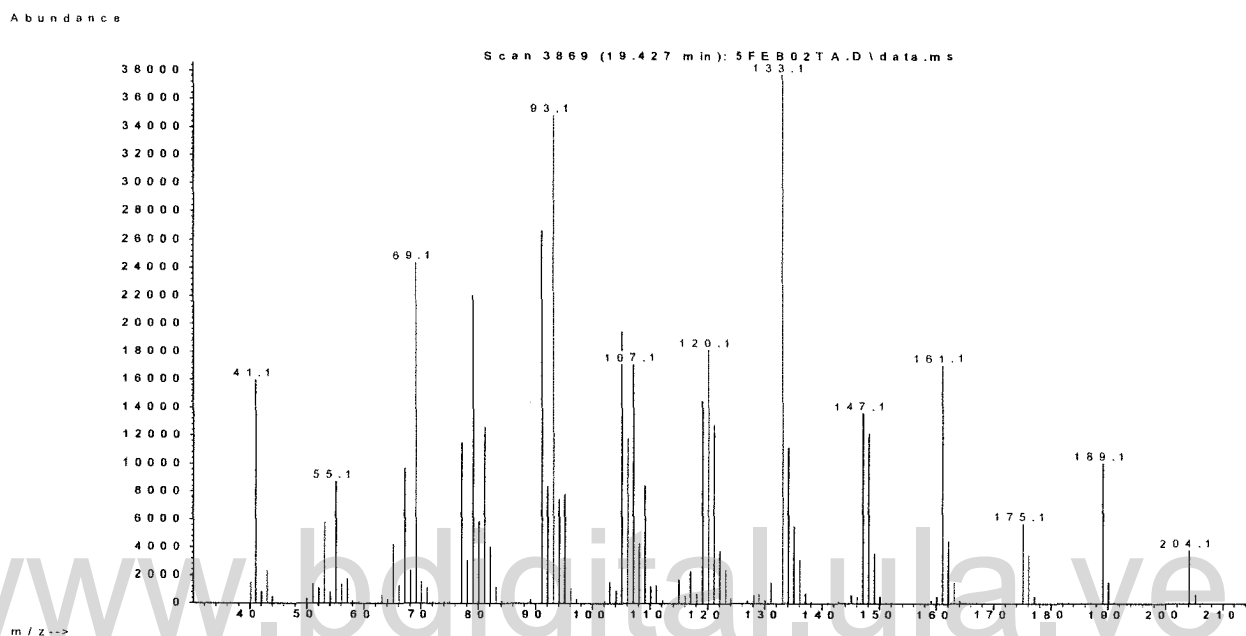


CROMATOGRAMA DE GASES DEL ACEITE ESENCIAL DEL
Hyptis colombiana Epling. (Recolección mayo 2006)



ANEXOS III
ESPECTROS DE MASAS DE LOS COMPUESTOS
OBSERVADOS EN LAS ESPECIES DE *Hyptis*
ESTUDIADAS

ESPECTRO DE MASAS β -CARIOFILENO



ESPECTRO DE MASAS GERMACRENO D

Abundance

