

COMPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES DE PLANTAS DE LA FAMILIA VERBENACEAE

por

Elena E. Stashenko, Beatriz E. Jaramillo & Jairo R. Martínez*

Resumen

Stashenko, E.E., Jaramillo, B.E. & J. R. Martínez: Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. Rev. Acad. Colomb. Cienc. **27** (105): 579-597, 2003. ISSN 0370-3908.

En el trabajo se estudiaron metabolitos secundarios volátiles, obtenidos por diferentes técnicas de extracción, de tres plantas de la familia Verbenaceae, cultivadas en la región Nororiental de Colombia. *Lippia alba* fue un quimiotipo nuevo, no descrito previamente en la literatura; contiene la carvona (40-57%) como el componente mayoritario en los aceites, obtenidos por hidrodestilación (HD) e hidrodestilación asistida por microondas (MWHD) y en los extractos, aislados por destilación – extracción simultánea (SDE) y por extracción con fluido supercrítico (SFE), seguido del limoneno (24-37%), el biciclosquifelandreno (2-22%), la piperitenona (1-2%), la piperitona (0.8-1.2%) y el β -burboneno (0.6-1.5%). El compuesto principal en las fracciones volátiles, obtenidas por métodos *headspace* estático (S-HS), dinámico de purga y trampa (P & T) o por microextracción en fase sólida en modo *headspace* (HS-SPME) fue el limoneno (27-77%), seguido de la carvona (14-30%), el biciclosquifelandreno (1-33%) y el β -burboneno (0.5-6.5%). Los componentes mayoritarios en los aceites esenciales (HD, MWHD) y en los extractos (SDE, SFE) de la *Aloysia triphylla*, fueron el neral (19-22%) y el geranial (33-38%), seguidos del nerol (2-5%) y el geraniol (2-6%), los sesquiterpenoides *ar*-curcumeno (3-4%), biciclosquifelandreno (2-3%), espatulenol (2-4%), nerolidol (*ca.* 2%), β -burboneno (1-2%), β -cariofileno (3-5%) y su óxido (1-1.5%). El aceite esencial de *Lantana camara* fue de tipo *sesquiterpenoide*; más del 60% de la mezcla lo representan hidrocarburos sesquiterpénicos, $C_{15}H_{24}$, y *ca.* 30% sus análogos oxigenados. El *trans*- β -cariofileno (14-15%) y su óxido (4-9%), el biciclosquifelandreno (16-18%), el α -zingibereno (5-6%), el *E,E*- α -farneseno (3-4%) y el γ -bisaboleno (3-4%) fueron los sesquiterpenos mayoritarios aislados de *L. camara*. La fracción de monoterpenos, $C_{10}H_{16}$, en *L. camara* no alcanzó un 10%; entre éstos, el β -pineno (0.2-3%) y el β -mirceno (2-4%) fueron hidrocarburos mayoritarios. En la *L. alba* predominaron monoterpenos (>30%)

* Laboratorio de Cromatografía, Centro de Investigación en Biomoléculas, CIBIMOL, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, A.A. 678, Bucaramanga, Colombia, Tel.: +57-7-6456737, Fax: +57-7-6358210. elena@tucan.uis.edu.co

y monoterpenos oxigenados (ca. 55%); para la *A. triphylla*, la familia de compuestos mayoritarios fue la de monoterpenos oxigenados (>70%), de los cuales, ca. 60% correspondieron al citral; mientras que la *L. camara* fue pobre en monoterpenos y sus análogos oxigenados; la mayoría de sus metabolitos secundarios fueron hidrocarburos sesquiterpénicos (ca. 60%) y sus derivados oxigenados (ca. 30%). Los aceites esenciales de las tres plantas de la familia Verbenaceae mostraron un efecto protector antioxidante *in vitro*, medido en un sistema lipídico modelo (emulsión del ácido linoleico), a la misma concentración, e.g. 10 g/L, igual o mayor que la vitamina E y el BHA, siendo el aceite de *L. camara* el más activo de todos, seguido del aceite de *L. alba*.

Palabras clave: Aceite esencial, extracción, Verbenaceae, *Lippia alba*, *Aloysia triphylla*, *Lantana camara*, actividad antioxidante.

Abstract

This work reports on the study of secondary metabolites obtained by means of different extraction techniques from three Verbenaceae plants, grown in Colombia's northeast. *Lippia alba* was a new chemotype not previously described in the literature. It contains carvone (40-57%) as the main component of the oils, obtained by hydrodistillation (HD) and microwave-assisted hydrodistillation (MWHD), and of the extracts isolated by simultaneous distillation-extraction (SDE), and supercritical fluid extraction (SFE). Other main components were limonene (24-37%), bicyclosesquiphellandrene (2-22%), piperitenone (1-2%), piperitone (0.8-1.2%) and β -bourbonene (0.6-1.5%). Volatile fractions obtained by static (S-HS), dynamic (purge and trap, P & T) headspace methods, or headspace-solid phase microextraction (HS-SPME), contained limonene (27-77%) as the most abundant component, followed by carvone (14-30%), bicyclosesquiphellandrene (1-33%), and β -bourbonene (0.5-6.5%). The main components found in the essential oils (HD, MWHD) and extracts (SDE, SFE) of *Aloysia triphylla*, were neral (19-22%) and geranial (33-38%), followed by nerol (2-5%) and geraniol (2-6%), the sesquiterpenoids *ar*-curcumene (3-4%), bicyclosesquiphellandrene (2-3%), spathulenol (2-4%), nerolidol (ca. 2%), β -bourbonene (1-2%), *trans*- β -caryophyllene (3-5%) and its oxide (1-1.5%). The *Lantana camara* essential oil was of the *sesquiterpenoid* type; over 60% of its composition was represented by sesquiterpene hydrocarbons, C₁₅H₂₄, and ca. 30% by their oxygenated derivatives. *trans*- β -Caryophyllene (14-15%) and its oxide (4-9%), bicyclosesquiphellandrene (16-18%), α -zingiberene (5-6%), *E,E*- α -farnesene (3-4%) and γ -bisabolene (3-4%) were the main sesquiterpenes isolated from *L. camara*. The monoterpene fraction, C₁₀H₁₆, in *L. camara* did not reach 10%; β -pinene (0.2-3%) and β -myrcene (2-4%) were the main monoterpene hydrocarbons. While in *L. alba* monoterpenes (>30%) and oxygenated monoterpenes (ca. 55%) were dominant, in *A. triphylla*, oxygenated monoterpenes (>70%) prevailed, ca. 60% was represented by citral. On the other hand, *L. camara* was poor in monoterpenes and their oxygenated derivatives; most of its secondary metabolites were sesquiterpene hydrocarbons (ca. 60%) and their oxygenated derivatives (ca. 30%). The essential oils of the three Verbenaceae plants studied exhibited an *in vitro* antioxidant effect, which was similar or higher than those of vitamin E or BHA, when measured in a model lipid system (linoleic acid emulsion) at the same concentration, e.g. 10 g/L. *L. camara* oil was the most active, followed by *L. alba* oil.

Key words: Essential oil, extraction, Verbenaceae; *Lippia alba*, *Aloysia triphylla*, *Lantana camara*, antioxidant activity.

Abreviaturas: BHA – *butyatedl hydroxyanisol* [2-(ter-butyl)-4-metoxifenol]; BHT – *butylated hydroxytoluene* [2,6-di(ter-butyl)-p-cresol]; DVB – divinylbenzene (divinilbenceno); ECD – *electron capture detector* (detector de captura de electrones); EI – *electron impact* (impacto de electrones); FID – *flame ionization detector* (detector de ionización en llama); GC – gas chromatograph (cromatógrafo de gases); HD – *hydrodistillation* (hidrodestilación); HP – Hewlett-Packard; HS – *headspace* (espacio de cabeza o fase vapor); MWHD – *microwave-assisted hydrodistillation* (hidrodestilación asistida por radiación de microondas); P & T – *purge and trap* (purga y trampa); PFPH – *pentafluorophenylhydrazine* (pentafluorfenilhidracina); PDMS – poly(dimethylsiloxane) [poli(dimetilsiloxano)]; SDE – *simultaneous distillation-extraction* (destilación – extracción con solvente simultánea); SFE – *supercritical fluid extraction* (extracción con fluido supercrítico); S-HS – *static headspace* (headspace estático); SPME – *solid-phase microextraction* (microextracción en fase sólida);

1. Introducción

Las plantas de la familia Verbenaceae llaman la atención de los investigadores no sólo por su alta diversidad botánica, su abundante y amplia distribución en todo el mundo, sino también por su variable uso. La permanente búsqueda de nuevos productos y combinaciones de sustancias químicas de origen natural, con potencial aplicación en diferentes industrias, tales como la farmacéutica, de alimentos, textil, química orgánica fina y, sobre todo, cosmética y de perfumes, impulsó nuestra investigación hacia un detallado estudio de los metabolitos secundarios volátiles de algunas plantas de la familia Verbenaceae, abundantes en América tropical, y la evaluación de su actividad biológica, particularmente, la capacidad antioxidante *in vitro*.

Tres plantas de la familia Verbenaceae, a saber: *Lippia alba* Mill, *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton y *Lantana armata* Schauer, fueron sometidas a diferentes procedimientos de extracción, con el propósito de obtener la información más completa posible sobre sus metabolitos secundarios volátiles, y sobre el efecto protector de sus aceites esenciales contra la degradación de la emulsión de ácido linoleico (sistema lipídico modelo), sometido a un proceso de oxidación "acelerada" por iones metálicos (Fe^{+2}).

Los conocimientos adquiridos en el presente estudio son de importancia para la nascente industria colombiana de aceites esenciales, que necesita una base científica sólida y la justificación para la selección correcta de especies vegetales promisorias, su cultivo industrial, el procesamiento y la obtención de esencias, con miras a satisfacer los mercados nacional e internacional con productos de calidad garantizada y valor agregado alto. Por ser de origen natural, la composición química de las esencias es inconstante y depende, entre otras, de las siguientes variables: el método de extracción, su duración y la temperatura, el estado y la procedencia de la planta, y las condiciones geobotánicas y agrícolas de su cultivo (Combariza *et al.*, 1994; Stashenko *et al.*, 1995; Blanco *et al.*, 1995, Vogel *et al.*, 1999). El valor económico y la aplicabilidad industrial de las esencias están directamente relacionados con su composición química, que determina todas las otras propiedades macroscópicas (físicoquímicas, olor, etc.) y las de la actividad biológica. Es por ello, que el establecimiento de la composición de aceites esenciales es una tarea importante y requiere de la combinación de diferentes métodos de extracción de los metabolitos secundarios volátiles de la planta (Stashenko *et al.*, 1996a, 1999) y de su análisis exhaustivo, usando técnicas de separación, detección e identificación, sensi-

bles y específicas (Stashenko *et al.*, 1995), tales como la cromatografía de gases capilar acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

La introducción de plantas aromáticas tropicales de la familia Verbenaceae, oriundas de América del Sur, a otros continentes y su exploración allá, la gran variedad de quimiotipos observados, que poseen esencias exóticas y únicas, hacen importante el estudio de Verbenáceas colombianas, a fin de encontrar su aplicación práctica como aromatizantes, agentes de *flavour*, y/o principios activos en preparados farmacológicos, cosméticos, perfumes y aditivos en alimentos, entre otros. En el presente trabajo, se evaluó también la actividad antioxidante *in vitro* de aceites esenciales de *L. alba*, *A. triphylla* y *L. camara*, usando la emulsión del ácido linoleico como el sistema lipídico modelo. Las esencias mostraron, a las mismas concentraciones, una actividad antioxidante *in vitro* similar o mayor que la de la vitamina E o BHA, antioxidantes natural y sintético ampliamente usados en la industria.

2. Plantas bajo estudio

La planta *Lippia alba* Mill N.E. Brown ex Britton & Wills, un subarbusto muy aromático, es ampliamente distribuida y crece espontáneamente en la América Central y del Sur (Gupta, 1995). La planta es conocida también como *Lippia geniculata* HBK o *Lantana alba* Mill y, en Colombia, por sus nombres populares "Pronto alivio" (Antioquia), "Curatodo" y Orégano de cerro" (Magdalena). Esta especie se ha empleado como estomacal y antiespasmódica en infusión teiforme; también se ha usado como sedante, desinfectante, diaforética y emenagoga (García Barriga, 1992). La planta se caracteriza por su intenso y penetrante olor y contiene de 0.1 a 1.2% del aceite volátil. La composición química del aceite esencial de *L. alba* depende sensiblemente del origen geográfico de la planta, las condiciones de su cultivo, la edad y la parte de la planta empleada para la extracción, y de algunos otros factores geobotánicos; lo que evidencian los trabajos sobre la composición química de *L. alba* realizados en Guatemala (Senatore *et al.*, 2001), India (Bahl *et al.*, 2000, 2002), Uruguay (Lorenzo *et al.*, 2001), Cuba (Pino, *et al.*, 1997) y Brasil (Zoghbi *et al.*, 1998).

Zoghbi y colaboradores (1998) identificaron 3 quimiotipos de *L. alba* en 3 municipios de Brasil (Estado de Pará), en términos de los principales terpenos encontrados en los aceites esenciales. El primero (Municipio Santa María) se caracterizó por un alto contenido del 1,8-cineol (35%), el limoneno (18%) y la carvona (8.6%); el segundo quimiotipo (Municipio Belterra) se destacó por una alta proporción del limoneno (32%), la carvona (32%)

y el mirceno (11%); y el tercero (Municipio Chaves) por el geranial (23%), el neral (14%) y el germacreno D (25%). La revisión de la literatura sorprende con una inmensa variabilidad de los metabolitos secundarios volátiles aislados de plantas de *L. alba*, cultivadas en diferentes regiones del mundo. Así, el limoneno (44%) y la piperitona (31%) fueron componentes mayoritarios en *L. alba* originaria de Guatemala (**Senatore et al.**, 2001); el linalol fue el principal compuesto en esencias destiladas en India (65%) (**Bahl et al.**, 2000, 2002), Uruguay (55%) (**Lorenzo et al.**, 2001) y en Valinhos, São Paulo (Brasil) (67-83%) (**Frighetto et al.**, 1998). El aceite esencial de *L. alba*, que crece en Santander (Colombia), fue rico en dos compuestos, el limoneno (24-37%) y la carvona (40-57%); el último es un ingrediente de alto valor y uso en muchos productos cosméticos y perfumes.

Aloysia triphylla (L'Héritier) Britton, conocida también como *Aloysia citriodora* Ortega ex Pers., *Verbena triphylla* L'Héritier y *Lippia citriodora* Kunth, popularmente se llama "Limón verbena", "Cidrón" o "Cedrón", "Verbena", "Yerba Luisa" o "Hierba de la princesa", según el país o la región (**Gupta**, 1995). Es una planta espontánea de América del Sur, originaria del Perú, cultivada, por ser medicinal y ornamental, en solares y jardines de los climas fríos y templados con bastante luz solar; se caracteriza por emanar una intensa y agradable fragancia de limón. La infusión o decocción de las hojas de esta especie se usa en medicina popular como antiespasmódico, tranquilizante, calmante nervioso, expectorante y estomacal (**García Barriga**, 1992; **Gupta**, 1995).

Las partes aéreas contienen 0.2-1% de aceite esencial. Varias investigaciones, realizadas en Chile (**Vogel et al.**, 1999; **Carnat et al.**, 1999), Argentina (**Zygodlo et al.**, 1994, 1995), Brasil (**Brasil e Silva**, 1979), Marruecos (**Bellakhdar et al.**, 1994) y Turquía (**Özek et al.**, 1996), sobre aceites esenciales de *A. triphylla* mostraron, tal como las esencias de *L. alba*, grandes variabilidades en su composición química. En el aceite esencial de flores y hojas de *A. triphylla*, cultivada en Argentina, se aislaron la mircenona (31-37%) y la α -tujona (13-17%), como compuestos mayoritarios (**Zygodlo et al.**, 1994, 1995). **Vogel et al.** (1999) estudiaron el efecto del mes y hora del día de la cosecha sobre el contenido de aceite esencial y del citral en *A. triphylla*, cultivada en Chile (Talca). El rendimiento más alto del aceite fue observado en octubre (primavera en Chile); el contenido de esencia no variaba durante el día, mientras que el del citral sí, se incrementaba. **Carnat et al.** (1999) estudiaron el contenido de compuestos aromáticos y polifenoles en la infusión de "Lemon verbena" comercial, proveniente de Chile. *A. triphylla*

fue importada a Marruecos de la América del Sur, y su aceite esencial, destilado de la planta seca, es producto de exportación. El quimiotipo cultivado en Marruecos fue inusualmente rico en el 1,8-cineol (12%), posee una cantidad baja del citral, *i.e.* el geranial (10%) y el neral (7%); en la esencia se encontraron también 6-metil-5-hepten-2-ona (7%), el limoneno (4%), el *ar*-curcumeno (5%), el óxido de β -cariofileno (6%) y el espatulenol (5%), entre otros componentes (**Bellakhdar et al.**, 1994). En el aceite esencial de las hojas y tallos secos de *A. triphylla* de Turquía (**Özek et al.**, 1996) fueron identificados, como componentes más abundantes, el limoneno (15-19%), el geranial (12-19%) y el neral (6-8%), junto con los sesquiterpenoides *ar*-curcumeno (5-6%), β -cariofileno (3.5-4%) y su óxido (3-5%) y espatulenol (4-4.5%). En varios trabajos se reportan propiedades biológicas del aceite esencial de *A. triphylla* y/o algunos de sus componentes, a saber: antidiarréica (**Pérez**, 1998), antimicótica (**Guerrera**, 1995), psicotrópica (**Wannmacher**, 1990) y analgésica (**Nakamura**, 1997), entre otras.

La esencia de "Lemon verbena" (*A. triphylla*) es una de las más costosas y raras en el mercado internacional de aceites esenciales (www.essential-oils.org), su obtención, análisis y evaluación es de importancia científica y práctica para el país. En el aceite esencial de *A. triphylla*, cultivada en Colombia, el neral (>19%) y el geranial (38%) fueron los componentes mayoritarios, seguidos del espatulenol (*ca.* 4%) y el biciclogermacreno (>3%). El quimiotipo colombiano es rico en citral, lo que convierte a la *A. triphylla* en un producto comercialmente muy atractivo, como la fuente de este aldehído, usado ampliamente en química orgánica fina. Además, *A. triphylla* es una planta autóctona de América del Sur y su cultivo no presenta problemas de adaptación como en otras latitudes (*e.g.* Slovenia, Egipto, Marruecos), donde en la actualidad, debido a un gran interés económico, se lleva a cabo su siembra e industrialización (**Rode et al.**, 2000; **El-Hamidi et al.**, 1983; **Bellakhdar et al.**, 1994).

Lantana armata Schauer se conoce además como *Lantana camara* L., *Camara vulgaris* Benth, o *Lantana aculeata* L. Los nombres populares que se le dan en Colombia a esta planta son "Venturosa", "Gurupacha", "Sanguinaria" y "Carraquillo". Esta Verbenaceae se extiende a lo largo de América Central y del Sur (**García Barriga**, 1992; **Gupta**, 1995). La decocción de las hojas es empleada en las afecciones del estómago y en los resfriados; la de la raíz, para purificar la sangre y en enfermedades hepáticas. Las flores y la raíz se emplean como expectorante en la bronquitis, la tos y el asma. Toda la planta en infusión se usa como emenagogo y antiséptico (**García**

Barriga, 1992), sus propiedades antimicrobianas también han sido reportadas (**Gupta**, 1995; **Barre et al.**, 1997; **Saxena et al.**, 1999).

Afín con otras verbenáceas (e.g. *L. alba* y *A. triphylla*), *L. camara* presenta una gran variedad de quimiotipos y diferencias en la composición química de sus aceites volátiles. **Weyerstahl et al.** (1999) establecieron, que el aceite comercial de *L. camara* proveniente de Brasil, en un 65% está formado por sesquiterpenoides, derivados de bisaboleno. **Silva** y colaboradores (1999) estudiaron las esencias de plantas de *L. camara* provenientes de la Región Amazónica del Norte de Brasil, y hallaron que el limoneno (17%), el α -felandreno (16%) y el sabineno (9%), junto con el germacreno D (13-28%), el β -cariofileno (11%, los curcumenos (27-31%) y el zingibereno (15-19%) fueron componentes mayoritarios en estos aceites.

L. camara, oriunda de América Tropical, fue introducida como planta ornamental y medicinal, a diferentes países de Asia y África. **Ngassoum et al.** (1999) reportaron la composición química de aceites esenciales obtenidos de hojas y flores de *L. camara*, cultivada en Madagascar y Camerún. Los principales componentes encontrados en el aceite de *Lantana* originaria de Camerún fueron el *ar*-curcumeno (25%), el β -cariofileno (13%) y el epóxido de cariofileno (7%), junto con otros sesquiterpenos. El aceite de Madagascar fue rico en la davanona (15%) y el β -cariofileno (12%). **Fathy** (2000) comparó composiciones de aceites esenciales obtenidos de dos especies, *L. delicatissima* y *L. camara*, y de cinco variedades de la última, cultivadas en Egipto. El α -humuleno (>20%) fue el compuesto mayoritario en el aceite de *L. delicatissima*; el β -cariofileno (10-30%), el sabineno (30%), los bisabolenos (ca. 15%), el β -sesquifelandreno (>10%) y otros sesquiterpenos y sesquiterpenoles fueron predominantes, aunque en distintas proporciones, en las 5 diferentes variedades de *L. camara* egipcia. **Khan et al.** (2001) reportaron la presencia en el aceite de India del germacreno D (>20%), el γ -elemeno (10%) y el β -cariofileno (ca. 10%), entre otros sesquiterpenos, observando notorias diferencias en la composición de aceites destilados de flores y de hojas, como también con los aceites de distinto origen geográfico. **Sefidkon** (2002) identificó más de 40 componentes en el aceite esencial de *L. camara* cultivada en Irán. El sabineno (7-17%), el β -cariofileno (14-23%), el 1,8-cineol (6-10%), el biclogermacreno (8-18%) y el α -humuleno (6-11%) fueron metabolitos secundarios volátiles mayoritarios, aislados por hidrodestilación o por arrastre con vapor, de hojas y flores de la *L. camara* iraní. En el aceite esencial de *L. camara* colombiana predominan sesquiterpenos, entre los

cuales se destacan el β -cariofileno (>10%) y su óxido (>5%), el biclosesquifelandreno (>14%), el α -zingibereno (>7%) y el *ar*-curcumeno (>4%), entre otros.

3. Parte experimental

3.1 Material vegetal

Las hojas y tallos de *L. alba*, *A. triphylla* y *L. armata*, se recolectaron en diferentes jardines de la ciudad de Bucaramanga (Santander, Colombia). Solamente tallos y hojas frescos, sin daños, fueron utilizados en las extracciones. La identificación taxonómica de muestras botánicas se llevó a cabo en el Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia (Bogotá). Los pliegos testigo de cada planta quedaron depositados como muestra permanente en el Herbario Nacional Colombiano (COL, Bogotá), así: *Lippia alba* (Mill) N.E. Br. (N° COL 480747), *Lantana armata* Schauer s.l. (N° COL 480749) y *Aloysia triphylla* (L. Her.) Britton. (N° COL 480750). Las plantas fueron clasificadas por el doctor **J. L. Fernández**, a quien los autores expresan su más sincero agradecimiento.

3.2 Materiales y reactivos

n-Tetradecano (se usó como patrón interno, *istd*), 2-(*ter*-butil)-4-metoxifenol (BHA), sulfato de hierro, *Tris*, cloruro de potasio y diclorometano se compraron a *Merck* (Darmstadt, Alemania). La vitamina E, ácido linoleico, linoleato de metilo, 2,6-di(*ter*-butil)-*p*-cresol (BHT), BF_3 /metanol, pentafluorfenilhidracina (PFPH) y patrones de terpenos se compraron a *Aldrich Chemical Co.* Inc. (Milwaukee, WI, EE.UU.). Las fibras de poli(dimetilsiloxano) (PDMS, 100 μm) y poli(dimetilsiloxano)/divinilbenceno (PDMS/DVB, 65 μm) se adquirieron de *Supelco* Inc. (Bellefonte, PA, EE.UU.). Gases especiales para cromatografía se obtuvieron de *AGA-Fano* S.A. (Bucaramanga, Colombia). Todos los solventes empleados en la investigación fueron grado HPLC.

3.3 Extracciones

Hidrodestilación (HD) se llevó a cabo utilizando un equipo de destilación tipo Clevenger, según el procedimiento descrito por **Stashenko et al.** (1993) y **Combariza et al.** (1994). Se usaron 100 g del material vegetal picado de trozos de 2-3 cm, sumergido en agua; la duración de hidrodestilación fue de 2 horas. El aceite esencial se separó del agua, previamente saturada con NaCl, por decantación, y se secó con Na_2SO_4 anhidro. Una alícuota del aceite (30 μL) se diluyó en 1 mL de diclorometano, para el análisis cromatográfico.

Tabla 1. Composición química de los metabolitos secundarios volátiles de *Lippia alba* Mill., aislados por métodos extractivos y de *headspace*.

N° Pico	Compuesto	I _k ^{a)}		Área relativa, % ^{b)}						
				Métodos extractivos				Técnicas <i>headspace</i>		
		HP-5	Inno-wax	HD	MWHD	SDE	SFE	P&T	S-HS	HS-SPME
1	α -Pineno*	935	1039	0.05	0.05	0.1	0.07	0.16	0.62	tr
2	Canfeno*	949	1066	0.14	0.10	0.26	0.15	0.37	0.88	0.20
3	β -Mirreno*	993	1157	0.40	0.35	0.53	0.33	0.85	1.06	0.3
4	Limoneno*	1033	1204	32.60	29.58	36.90	23.90	62.7	77.34	26.70
5	<i>trans</i> - β -Ocimeno	1043	1250	0.1	0.16	0.11	0.12	0.18	0.63	0.28
6	Óxido de α -pineno*	1052	1256	0.37	0.37	0.4	0.3	0.58	tr	tr
7	Tujona	1106	1562	0.18	0.21	0.1	0.23	0.38	tr	tr
8	Óxido de limoneno*	1133	1211	0.16	0.19	0.11	0.19	0.20	tr	tr
9	<i>trans</i> -Dihidrocarvona	1197	1602	0.12	0.08	0.1	0.18	0.18	tr	0.24
10	Pulegona*	1235	1662	0.15	0.11	0.2	0.17	0.21	tr	0.8
11	Carvona*	1245	1715	51.0	57.21	45.06	40.48	29.8	13.9	15.45
12	Piperitona	1255	1740	0.93	1.23	0.8	1.00	0.55	0.39	0.3
13	Geranial*	1270	1730	0.09	0.12	0.1	0.41	0.10	0.35	tr
14	Óxido de carvona	1279	1800	0.1	0.19	0.1	0.11	0.11	0.30	tr
15	Acetato de carveilo	1339	1777	0.09	0.10	0.1	0.07	0.08	0.59	0.21
16	Piperitenona	1347	1782	1.47	1.81	1.1	1.6	0.43	0.31	0.40
17	β -Burboneno	1384	1526	0.7	0.60	1.0	1.52	0.5	0.49	6.5
18	α -Copaeno	1388	1520	0.40	0.22	0.5	0.56	0.05	tr	0.66
19	β -Cubebeno	1390	1544	0.59	0.35	0.6	0.51	0.20	tr	2.0
20	δ -Elemeno	1418	1470	0.26	0.22	0.4	0.30	0.18	tr	0.23
21	α -Cedreno	1420	1600	0.2	0.20	0.3	0.37	0.18	tr	1.99
22	<i>trans</i> - β -Cariofileno*	1424	1618	0.2	0.13	0.2	0.27	0.11	tr	1.8
23	α -Humuleno	1452	1670	0.4	0.19	0.5	1.00	0.14	tr	0.72
24	β -Farneseno*	1460	1695	0.3	0.24	0.4	0.78	0.13	tr	4.9
25	<i>allo</i> -Aromadendreno	1465	1662	0.1	0.12	0.2	0.29	0.07	tr	1.38
26	Germacreno D	1480	1720	0.1	0.12	0.2	0.15	0.11	tr	0.6
27	Biciclosesquifelandreno	1489	1760	7.3	4.79	8.9	21.75	1.14	2.15	32.8
28	Germacreno A	1505	1769	0.4	0.28	0.5	0.95	0.12	tr	0.6
29	β -Bisaboleno	1509	1745	tr	tr	tr	0.11	tr	tr	0.38
30	Cubebol	1514	2010	0.2	0.11	0.1	0.35	0.05	tr	tr
31	δ -Cadineno	1524	1785	tr	tr	tr	0.12	tr	tr	0.3
32	γ -Bisaboleno	1530	1790	tr	tr	tr	0.14	-	-	-
33	Óxido de cariofileno	1580	1965	tr	tr	tr	0.22	-	-	-
34	Germacreno B	1596	1776	0.3	0.17	0.1	0.20	-	-	-
35	Óxido de humuleno	1605	1970	0.3	0.19	0.2	0.22	-	-	-
36	Cedranona	1617	2030	0.1	0.19	0.1	0.19	-	-	-
37	Muurolol	1641	2136	-	-	-	0.11	-	-	-
38	Hidrocarburo C ₂₆	2453	2490	-	-	-	0.10	-	-	-
39	Hidrocarburo C ₂₆	2576	2580	-	-	-	0.12	-	-	-

a) Índices de Kovats determinados experimentalmente;

b) Promedio de tres extracciones independientes;

tr - *trazas*;

* - Se usaron sustancias patrón.

Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD) se realizó usando el mismo montaje descrito para HD, pero, en vez de la manta de calentamiento, se empleó un horno microondas (*Kendo*, 2450 MHz, 800 W), dentro del cual se colocó el balón (1 L) con agua y material vegetal (100 g). El tiempo de extracción, a máxima potencia del horno, fue 30 minutos. Los demás parámetros y el modo de preparación de la muestra para el análisis cromatográfico, fueron los mismos, como está descrito anteriormente para HD, y en el trabajo de *Stashenko et al.* (1999).

Destilación con vapor-extracción con solvente simultánea (SDE) se llevó a cabo en un equipo a micro-escala para solventes de alta densidad, diseñado por *Godefroot et al.* (1981). Se usaron 10 g del material vegetal, finamente picado; la duración de la extracción fue de 2 horas, así como lo describen *Stashenko et al.* (1996a, 1996b, 1999). El solvente de extracción fue diclorometano (grado HPLC). El extracto obtenido (1 μ L) se inyectó directamente al cromatógrafo de gases (GC).

Extracción con fluido supercrítico (SFE) se llevó a cabo en un extractor Soxhlet de alta presión (*J&W Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.). Se empleó la metodología descrita por *Stashenko et al.* (1996b, 2000). Se usaron 10 g del material vegetal, 320 g de hielo seco (CO₂) comercial, como fuente de fluido supercrítico; la extracción durante 2 horas, se llevó a cabo a la temperatura de 40-45° C y a la presión de 1050-1100 psi. El extracto obtenido fue secado con Na₂SO₄ anhidro y disuelto en diclorometano (30 μ L en 1 mL del solvente). 1 μ L de la solución se inyectó al GC.

3.4 Obtención de volátiles

Purga de espacio de cabeza con N₂ y trampa en solvente simultánea (P & T) se realizó en un equipo de extracción *headspace* dinámico, construido en el laboratorio y similar al diseñado por *Umano & Shibamoto* (1987). El procedimiento de extracción fue de acuerdo con la metodología descrita por *Stashenko et al.* (1992). Se usaron 100 g del material vegetal, nitrógeno (*Aga-Fano S.A.*,

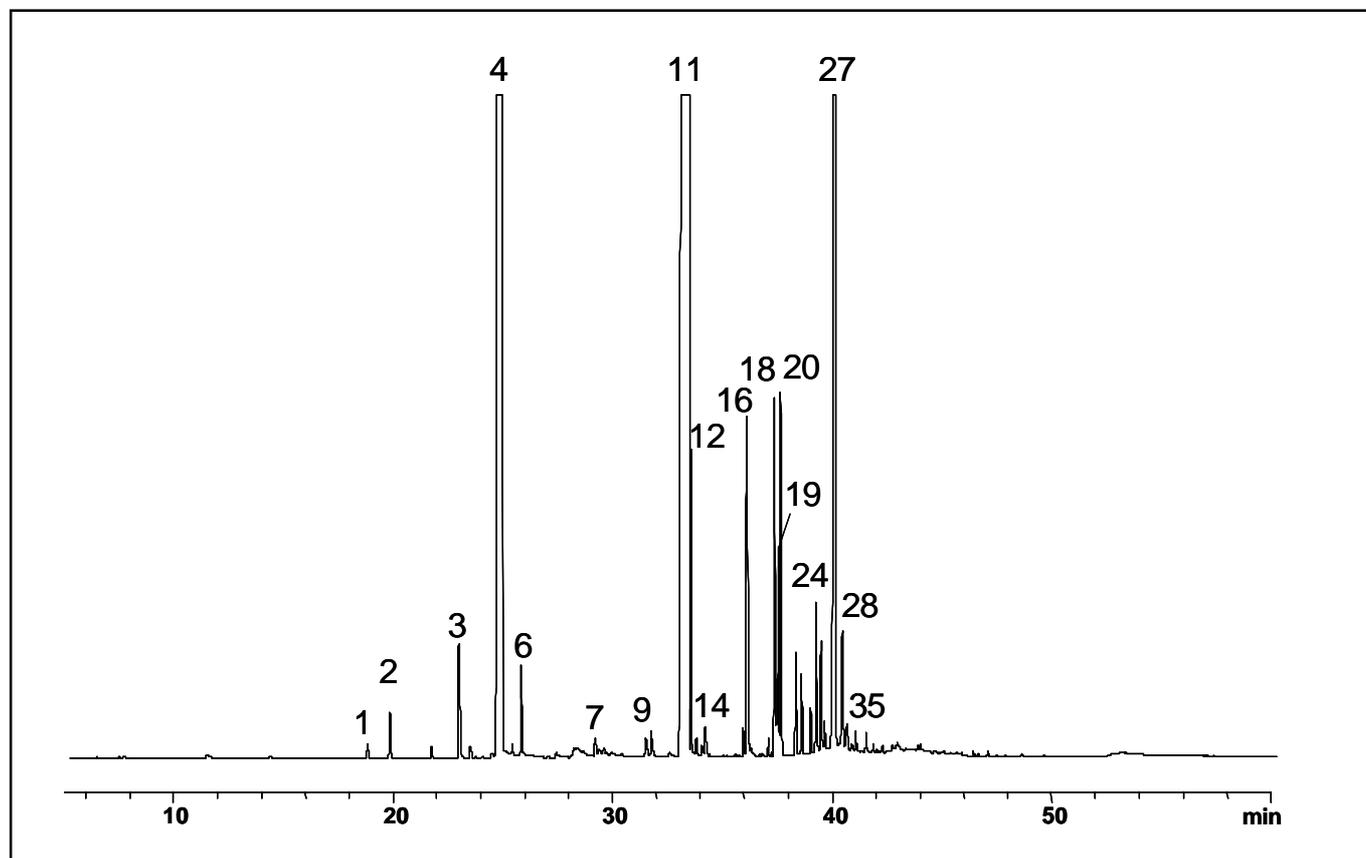


Figura 1. Perfil cromatográfico típico del aceite esencial de *Lippia alba* Mill., obtenido por hidrodestilación. Columna HP-5MS (50 m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los picos se reporta en la **Tabla 1**.

99.995%), como gas de purga y diclorometano, como solvente para atrapar volátiles. La duración de la P & T fue de 2 horas. El extracto obtenido se concentró hasta 10 mL en un equipo Kuderna-Danish, luego se llevó hasta 2 mL con una corriente de nitrógeno seco; 1 µL del extracto final se inyectó al GC.

Headspace estático (S-HS) se llevó a cabo en un equipo *headspace sampler* HP 7694 (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, EE.UU.). Se emplearon los siguientes parámetros operacionales: temperatura del termostato 40° C, tiempo de equilibrio de 15 min, temperaturas del *loop* y de la línea de transferencia a 100 y 110° C, respectivamente. Se usaron 5 g de planta en un frasco de 20 mL, y se inyectó 1 mL de la fase vapor a la columna cromatográfica.

Microextracción en fase sólida de la fase vapor (*headspace*) (HS-SPME) se realizó usando una fibra de poli(dimetilsiloxano) (PDMS, 100 µm de espesor), obtenida de Supelco Inc. (Bellefonte, PA, EE.UU.). Se muestreó la fase vapor a $22 \pm 1^\circ$ C, de 10 g de planta, colocados en un frasco de 50 mL. El tiempo de exposición de la fibra fue de 60 min (la selección de este parámetro se basó en experimentos preliminares). Las sustancias extraídas fueron térmicamente desorbidas a 250° C, durante 5 min, en un puerto de inyección del GC, usando un *liner* especial para SPME, de volumen reducido.

3.5 Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro*

La oxidación de la emulsión del ácido linoleico fue inducida por iones Fe^{+2} , según la metodología descrita por Tamura *et al.* (1991, 1994). La emulsión fue preparada mezclando 2 mL de la solución acuosa del ácido linoleico (2.5 g/L) con 3 mL del buffer *Tris* (pH 7.4), que contenía 0.75 mM de KCl, 2 g/L de dodecil sulfato de sodio y 2.01 mM de sulfato de hierro. Aceites esenciales de *L. alba*, *A. triphylla* o *L. armata*, obtenidos por HD, la vitamina E o BHA se añadieron a la emulsión del ácido linoleico, en concentraciones de 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 y 20.0 g/L (la última concentración no se usó para el BHA). La solución resultante se incubó a 37° C durante 12 horas. Al final de la incubación, la mezcla fue enfriada por 10 min en un baño de agua/hielo, y a la emulsión simultáneamente fueron agregados 100 µL de la solución de BHT (antioxidante) en metanol, para interrumpir la reacción de oxidación en cadena, porque una vez iniciada, ésta continúa.

El hexanal, producto principal de la degradación oxidativa del ácido linoleico (Frankel, 1985), y marcador del avance del proceso de peroxidación, fue medido por dos métodos independientes, así: (1) en solución, des-

pués de su derivación con PFPH y extracción líquido-líquido de la hidrazona, C_6 -PFPH, con hexano, según la metodología descrita por Stashenko *et al.* (1997, 1999); y (2) en fase vapor, usando la fibra SPME (PDMS/DVB, 65 µm), previamente saturada a temperatura ambiente durante 40 min con PFPH; y la extracción-derivación directa del hexanal sobre la fibra, así como se describe en los trabajos de Stashenko *et al.* (2000, 2002). El efecto protector se calculó según la fórmula:

$$\text{Grado de protección, \%} = 100 \times (\text{Ao} - \text{A}) / \text{A}$$

En esta fórmula, **Ao** es el área del pico de hexanal en el sistema lipídico sin sustancia de prueba y **A** es el área del pico de hexanal en el sistema con sustancia de prueba (antioxidante). El progreso de la peroxidación se determinó también cuantificando el ácido linoleico, en forma de su metil éster (agente derivatizante, BF_3/MeOH), según Stashenko *et al.* (1999), antes y después de la oxidación inducida. La cuantificación del hexanal y del ácido linoleico se realizaron en ausencia (blanco) y en la presencia de antioxidante (aceite esencial, vitamina E o BHA), adicionado a la emulsión en diferentes concentraciones.

3.6 Análisis cromatográfico

El análisis cromatográfico de las muestras se realizó en un GC Hewlett-Packard (HP) 5890A Serie II, equipado con un inyector *split/splitless* (250° C, relación *split* 1:30) y un detector de ionización en llama (FID) (250° C). Los datos cromatográficos fueron adquiridos y procesados con un programa HP *Chem Station* HP Rev. A.06.03 [509]. Para la separación de mezclas se usaron una columna capilar apolar, HP-5 (Hewlett-Packard), de 60 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25 µm, d_p , con fase estacionaria de 5%-fenil-poli (metilsiloxano); y una columna capilar de sílice fundida polar, INNOWAX (HP), con fase estacionaria entrecruzada e inmovilizada de poli(etilenglicol), de 50 m x 0.20 mm D.I. x 0.20 µm, d_p . La temperatura del horno fue programada de 40° C (15 min) hasta 250° C @ 5° C min^{-1} para la columna apolar, HP-5; y de 50° C (5 min) hasta 220° C @ 4° C min^{-1} para la columna polar INNOWAX. El gas de arrastre empleado fue helio (99.9995%, *Aga-Fano* S.A), con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 200 kPa y una velocidad lineal de 26 cm s^{-1} . El gas auxiliar fue nitrógeno (99.995%; *Aga-Fano* S.A), con una velocidad de flujo de 30 mL min^{-1} . Las velocidades de flujo para gases de combustión en el FID, el aire y el hidrógeno, fueron de 300 y 30 mL min^{-1} , respectivamente. El volumen inyectado de los extractos fue de 1.0 µL.

Los espectros de masas fueron obtenidos por impacto de electrones con energía de 70 eV, en un CG *Agilent*

Technologies 6890 Plus acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5973*, y equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (1:30), un inyector automático *Agilent 7863*, un sistema de datos *HP MS ChemStation* (Versión 1.05), incluyendo las bases de datos *NBS 75K*, *WILEY 138K* y *NIST 98*. Se usó una columna capilar de sílice fundida, *HP-5MS* de 50 m x 0.25 mm, D.I., con la fase estacionaria de 5%-fenil-poli(metilsiloxano) de 0.25 mm de grosor. Gas de arrastre fue helio (99.9995%, *Aga Fano*, S.A.), con una velocidad lineal de 35 cm s⁻¹. La temperatura del horno fue programada de 40° C (15 min) hasta 250° C (15 min) @ 5° C min⁻¹. Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia se mantuvieron a 230 y 285° C, respectivamente. Espectros de masas y corrientes iónicas reconstruidas (TIC) se obtuvieron en un cuadrupolo, por medio de barrido automático de frecuencia (*full scan*), @ 4.75 scan s⁻¹, en el rango de masas de *m/z* 40-350. La homogeneidad de cada pico cromatográfico fue revisada, obteniendo fragmentogramas de masas, basados en iones característicos de cada compuesto. Para la identificación de los compuestos se usaron algunas sustancias estándar, analizadas bajo las mismas condiciones instrumentales, espectros de masas e índices de retención de Kovats (**Kovats**, 1965) de componentes, que se compararon con los reportados en la literatura (**Jennings & Shibamoto**, 1980; **Davies**, 1990; **Adams**, 1995; **Joulian & König**, 1998).

La determinación del hexanal, en forma de su derivado hidracínico, C₆-PPFH, se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases *HP 5890A Series II*, equipado con un detector de captura de electrones (ECD), operado a 280° C, con una mezcla metano:argón (10%) como gas auxiliar, a la velocidad lineal de 60 mL min⁻¹, una columna capilar *HP-5* de 30 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25 µm, d_p, y un puerto de inyección *split* (250° C, relación *split* 1:10). Se usó helio como gas de arrastre (26 cm s⁻¹). Más detalles sobre la cuantificación del hexanal y del ácido linoleico se reportan en los trabajos de **Stashenko et al.** (1997, 1999, 2000, 2002).

4. Resultados y discusión

4.1 Metabolitos secundarios volátiles de *L. alba*

En la **Figura 1** aparece un perfil cromatográfico típico de metabolitos secundarios volátiles, aislados por HD, de hojas y tallos frescos de *L. alba*. Más de 30 sustancias, en concentraciones relativas >0.05% se encontraron en el aceite esencial, los extractos y en la fase vapor de la planta. En la **Tabla 1** se registran los compuestos identificados y sus cantidades relativas (%) en diferentes fracciones volátiles, obtenidas por métodos extractivos (HD, MWHD,

SDE, SFE) y de *headspace* (S-HS, P & T, HS-SPME). La composición de aceites esenciales de *L. alba* y del extracto, obtenidos por HD, MWHD y SDE, respectivamente, es muy similar, mientras que el extracto, aislado por SFE, fue enriquecido en mayor grado con sesquiterpenos. La fracción altamente volátil, *i.e.* monoterpenos, se recuperó mejor por el método SDE (*ca.* 38% Vs 33 y 30% para HD y MWHD) y, a su vez, la técnica SFE permitió aislar más eficientemente (*ca.* 30% Vs 11 y 19% para HD y MWHD) los compuestos menos volátiles, *i.e.* sesquiterpenoides. MWHD fue el método ventajoso en cuanto al tiempo de extracción mucho más corto (30 min; rendimiento del aceite 0.70%), en comparación con el HD convencional (2 horas; rendimiento del aceite 0.69%), mientras que la composición de ambos aceites obtenidos fue prácticamente la misma (**Tabla 1**).

La carvona (40-57%) fue el componente mayoritario en todos los aceites (HD, MWHD) y extractos (SDE, SFE) de *L. alba*, seguido del limoneno (24-37%), el biciclosesquifelandreno (2-22%), la piperitenona (1-2%), la piperitona (0.8-1.2%) y el β-burboneno (0.6-1.5%). La *L. alba* colombiana es un quimiotipo nuevo, no descrito previamente en la literatura, que se destaca por el alto contenido de carvona; mientras que los otros quimiotipos de esta planta, cultivados en Uruguay, India y Brasil (São Paulo) poseen el linalol como compuesto mayoritario (55-85%), y en el aceite de Guatemala prevalecen el limoneno (44%) y la piperitona (31%).

Para evaluar mejor la composición química de la fragancia natural de la planta, se usaron métodos de aislamiento menos “agresivos”, los llamados *headspace* (HS), donde el calor y el agua, que pueden inducir la formación de artefactos durante la extracción, son eliminados. Sin embargo, la composición de las fracciones volátiles de la planta *L. alba* depende del método *headspace* empleado. HS estático (S-HS), tal vez, refleja mejor el perfume propio de la planta, tal como lo percibe la nariz; los métodos de *headspace* dinámico y de HS-SPME incluyen la etapa de concentración, y, por ende, la composición de las fracciones volátiles obtenidas dependerá notoriamente de los tiempos de purga (P & T) y de la exposición de la fibra (HS-SPME), respectivamente. Como se puede observar, el número de componentes aislados por los métodos HS es menor que el obtenido por las técnicas extractivas (**Tabla 1**). El compuesto principal en las fracciones volátiles fue el limoneno (27-77%), seguido de la carvona (14-30%), el biciclosesquifelandreno (1-33%) y el β-burboneno (0.5-6.5%). El método S-HS extrajo predominantemente los compuestos más volátiles, *i.e.* monoterpenos y sus análogos oxigenados. La composición de la fracción volátil de

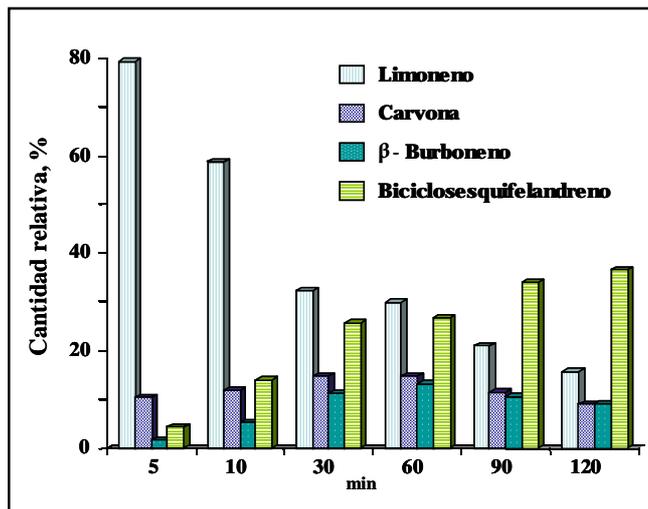


Figura 2. Cantidad relativa (%) de los componentes principales, aislados por SPME de la fase vapor, de la planta fresca de *Lippia alba* Mill., en función del tiempo de exposición de la fibra (PDMS, 100 μ m).

L. alba, aislada por HS-SPME, depende mucho del tiempo de la exposición de la fibra, tal como se puede observar en la **Figura 2**. A mayor tiempo de exposición, se extrae mayor cantidad de componentes, y, además, la fracción aislada se satura progresivamente con sustancias menos volátiles, *i.e.* sesquiterpenos, que poseen coeficientes de distribución, K_D , más altos que monoterpenos, pero sus volatilidades y velocidades de difusión son más bajas.

Para apreciar mejor el impacto del método de extracción sobre la composición final obtenida, las composiciones relativas de fracciones volátiles, obtenidas por diferentes técnicas extractivas (HD, MWHD, SDE y SFE) y de *headspace* (S-HS, P & T y HS-SPME), se compararon por medio del análisis estadístico de Componentes Principales (PCA, STATISTICA, Versión 6.0, StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, EE.UU.). El resultado de PCA, aplicado a la *L. alba*, indica, que más de 90% de la información de la **Tabla 1**, puede ser representada por un subespacio de tres coordenadas (Componentes Principales), construido con base en las combinaciones lineales de las concentraciones relativas de componentes en diferentes extractos (**Figura 3**). El *Factor 1* involucra el 48% de la información, y está representado básicamente por sesquiterpenos (biciclosquifelandreno, β -cubebeno, germacreno D, *allo*-aromadendreno, etc.). El *Factor 2* corresponde al 34% de la información y está caracterizado por cetonas (carvona, piperitona, piperitenona) y otros compuestos oxigenados (acetato de carveilo, óxidos de pineno y limoneno). La principal contribución al *Factor 3*, que constituye el 9% de la información, la hacen el geranial y el cubebol, junto

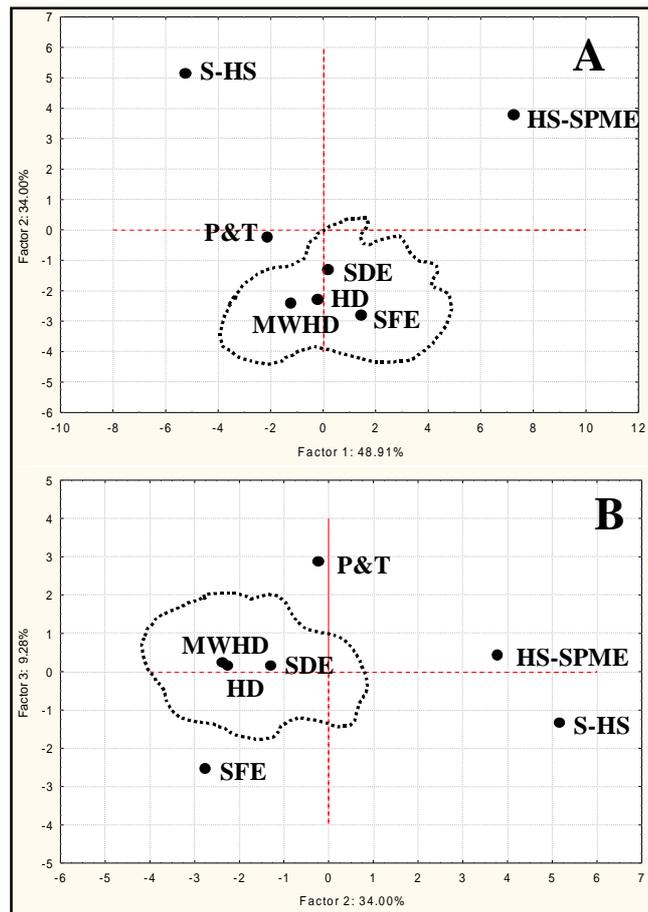


Figura 3. Representación gráfica de las composiciones relativas de fracciones volátiles, aisladas de la planta fresca de *Lippia alba* Mill. por diferentes métodos de extracción, en el espacio formado por los primeros tres componentes principales.

con algunos otros componentes oxigenados. Como se puede observar en la **Figura 3**, la proximidad de los puntos correspondientes a los métodos HD, MWHD y SDE, confirma la similitud de las composiciones obtenidas por estas técnicas (**Tabla 1**), así como las notorias diferencias composicionales con los métodos *headspace* (*e.g.* HS estático Vs HS dinámico).

4.2 Metabolitos secundarios volátiles de *A. triphylla*

En la **Figura 4** se observa un perfil cromatográfico típico del aceite esencial de *A. triphylla*, obtenido por hidrodestilación. En el cromatograma se destacan dos picos principales, correspondientes al neral y al geranial, isómeros geométricos del citral, y un poblado grupo de señales características de sesquiterpenos ($t_R > 34$ min). En la **Tabla 2** se reportan las cantidades relativas (%) y la

Tabla 2. Composición química de los metabolitos secundarios volátiles de *Aloysia triphilla*, aislados por métodos extractivos y de *headspace*.

N° Pico	Compuesto	I _k ^{a)}		Área relativa, % ^{b)}						
		HP-5	Inno- wax	Métodos extractivos				Técnicas <i>headspace</i>		
				HD	MWHD	SDE	SFE	P&T	S-HS	HS- SPME
1	α-Fencheno	951	1070	0.1	tr	0.2	0.1	0.1	2.60	tr
2	1-Octen-3-ol	978	1415	0.50	0.50	1.6	2.4	1.70	0.5	0.9
3	6-Metil-5-hepten-2-ona	985	-	0.40	tr	2.1	tr	3.20	0.6	0.5
4	Octan-3-ol	993	1519	0.10	tr	0.3	tr	1.20	3.1	1.9
5	Limoneno*	1033	1204	0.6	0.60	5.8	7.3	9.70	29.4	9.3
6	1,8-Cineol*	1034	1228	0.40	0.20	1.7	1.3	2.30	12.8	5.6
7	<i>trans</i> -β-Ocimeno	1043	1250	0.20	0.30	0.20	0.20	0.1	1.7	tr
8	Linalol*	1098	1508	0.40	0.40	0.40	0.20	0.70	2.8	0.7
9	Verbenol	1140	1613	0.20	0.50	0.30	0.20	0.60	1.5	0.2
10	Isopulegol	1146	1572	0.9	0.60	1.0	0.60	0.30	0.1	0.1
11	Mentol*	1173	1614	0.5	0.70	0.1	0.20	0.30	0.5	0.8
12	Terpin-4-ol*	1177	1630	0.6	0.50	1.5	0.50	0.80	0.3	1.4
13	α-Terpineol*	1189	1730	0.70	0.60	0.70	0.30	0.30	0.2	1.1
14	Dihidrocitronelol	1196	1750	1.20	1.7	1.4	0.80	2.50	2.1	1.6
15	Nerol*	1228	1755	4.70	4.1	5.0	1.70	1.0	1.1	0.8
16	Neral*	1240	1682	19.3	20	19	21.9	21.5	6.1	13.8
17	Geraniol*	1255	1795	5.4	5.6	5.9	1.90	3.2	3.2	1.3
18	Geranial*	1270	1728	38.1	38.30	33	34.0	26.7	9.21	17.6
19	Acetato de verbenilo	1282	1690	0.70	0.70	0.70	0.90	0.30	1.0	3.3
20	β-Burboneno	1384	1526	1.20	1.4	0.5	1.40	0.70	0.3	4.4
21	α-Copaeno	1388	1520	0.30	0.20	0.30	0.30	0.90	0.82	1.9
22	<i>trans</i> -β-Cariofileno*	1424	1618	2.8	3.1	2.6	4.80	3.8	3.8	4.9
23	β-Copaeno	1430	1628	0.5	0.5	0.2	0.20	1.2	0.2	0.22
24	<i>allo</i> -Aromadendreno	1465	1662	0.70	0.8	0.5	0.60	0.20	0.3	0.29
25	<i>ar</i>-Curcumeno	1483	1775	3.10	4.0	2.7	3.8	4.5	2.30	5.5
26	Biciclosesquifelandreno	1489	1760	1.30	1.5	1.8	1.8	2.30	1.9	4.6
27	Biciclogermacreno	1494	1768	3.40	3.4	1.5	0.70	1.30	0.63	3.5
28	γ-Cadineno	1513	1770	0.70	0.60	0.5	0.50	1.10	0.3	2.4
29	β-Sesquifelandreno	1524	1787	0.60	0.50	0.30	0.70	1.20	0.2	0.5
30	<i>trans</i> -Nerolidol*	1564	2040	2.30	2.4	1.40	2.30	3.0	0.1	0.6
31	Espatulenol	1576	2150	3.6	3.3	2.7	2.60	4.0	0.2	0.7
32	Óxido de cariofileno	1580	1965	1.40	0.9	1.2	0.50	0.30	0.1	0.2
33	Cedranona	1617	2030	0.50	0.30	0.40	0.10	0.30	tr	0.1
34	Eudesmol	1630	2240	1.50	1.20	0.6	0.50	0.50	tr	0.1
35	α-Muurolol	1645	2147	0.30	0.20	0.1	0.20	-	-	tr
36	α-Cadinol	1653	2224	0.50	0.40	0.1	0.30	-	-	tr
37	Cariofilenol	1664	2036	0.20	0.20	0.1	0.50	-	-	tr
38	N.I., C ₁₅ H ₂₄	-	-	0.40	0.30	0.2	0.10	-	-	-
39	N.I., C ₁₅ H ₂₄	-	-	tr	tr	tr	0.60	-	-	-
40	N.I., C ₁₅ H ₂₄	-	-	tr	tr	tr	1.80	-	-	-

a) Índices de Kovats determinados experimentalmente;

b) Promedio de tres extracciones independientes; tr - *trazas*

* - Se usaron sustancias patrón

N.I. - No identificado

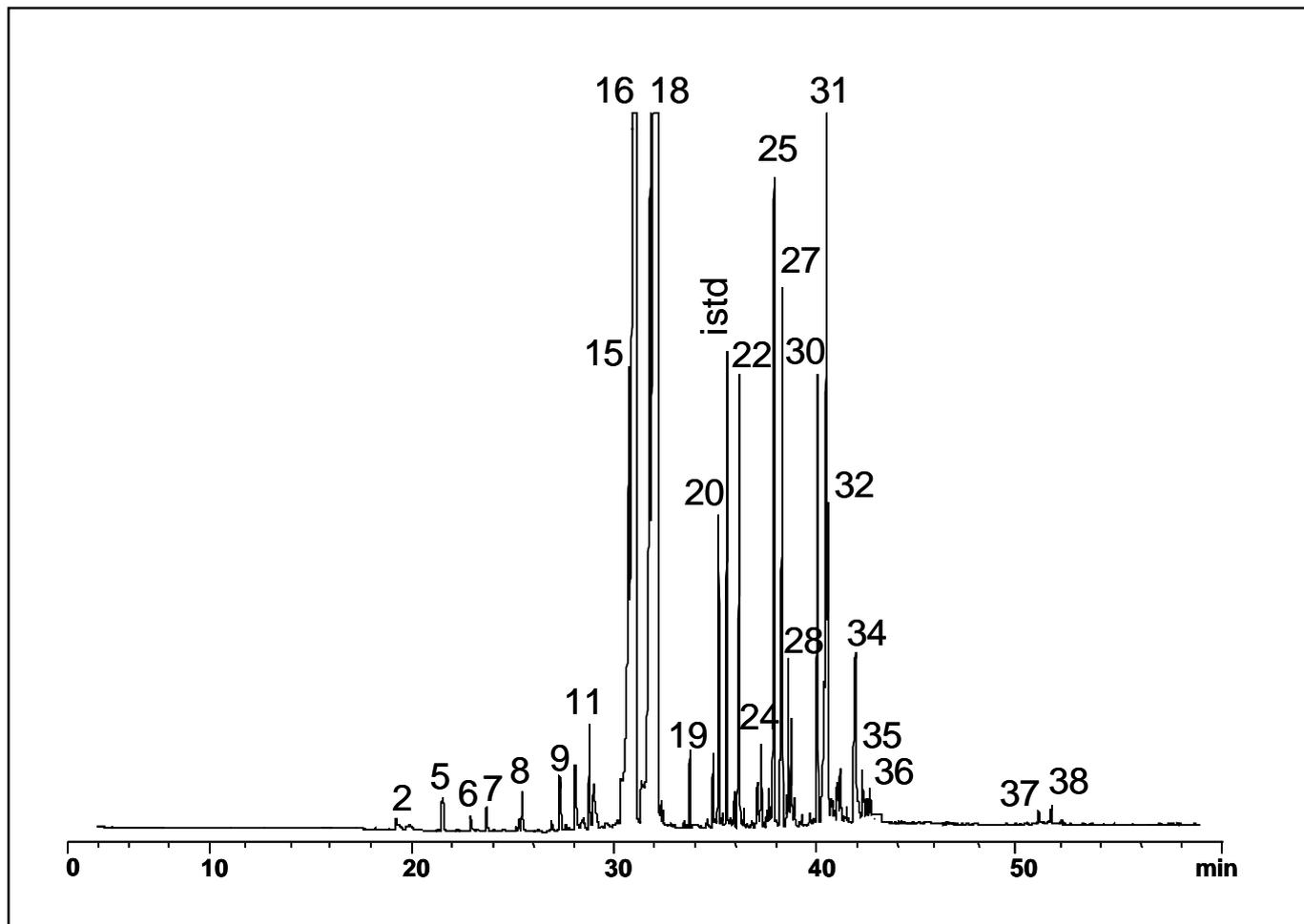


Figura 4. Perfil cromatográfico típico del aceite esencial de *Aloysia triphylla*, obtenido por hidrodestilación. Columna HP-5MS (50 m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los picos se reporta en la **Tabla 2**.

identificación de los componentes aislados por métodos extractivos (HD, MWHD, SDE y SFE) y de *headspace* (S-HS, P & T, HS-SPME). Más de 35 metabolitos secundarios volátiles se aislaron de la planta. Las composiciones relativas de las fracciones volátiles, obtenidas por las técnicas HD, MWHD, SDE y SFE, son similares, pero diferentes a las aisladas por los métodos *headspace*. Nuevamente, la mejor recuperación de monoterpenos y sus análogos oxigenados se logró con la SDE, y la de los sesquiterpenoides, por la SFE. Los componentes mayoritarios en los aceites esenciales (HD, MWHD) y en los extractos (SDE, SFE) de la *A. triphylla*, fueron el neral (19-22%) y el geranial (33-38%), seguidos del nerol (2-5%) y el geraniol (2-6%), los sesquiterpenoides *ar*-curcumeno (3-4%), biciclosesquifelandreno (2-3%), espatulenol (2-4%), nerolidol (*ca.* 2%), β -burboneno (1-2%), β -cariofileno (3-5%) y su óxido (1-1.5%) (**Tabla 2**). Como se mencionó anteriormente, el alto

contenido de citral (*ca.* 60%) en la *A. triphylla* colombiana convierte esta planta a una especie aromática promisoriosa para su cultivo industrial, la obtención del aceite esencial y/o la extracción del citral y su comercialización.

El método HS estático, que se basa en un equilibrio establecido entre la planta y su fase vapor, *i.e.*, perfume que emana, y permite reflejar de una manera más “genuina” la composición del olor propio de la planta, mostró el predominio en la fase vapor de la *A. triphylla* de los monoterpenoides limoneno (*ca.* 30%), 1,8-cineol (13%), geranial (9%) y neral (6%), junto con otros compuestos oxigenados volátiles, 1-octen-3-ol (6%) y 6-metil-5-hepten-2-ona (*ca.* 9%). El estudio de *headspace* de plantas aromáticas tropicales puede servir de base para la creación de aromas exóticos y perfumes descomunales, en un mercado de nuevas fragancias, sofisticado y muy

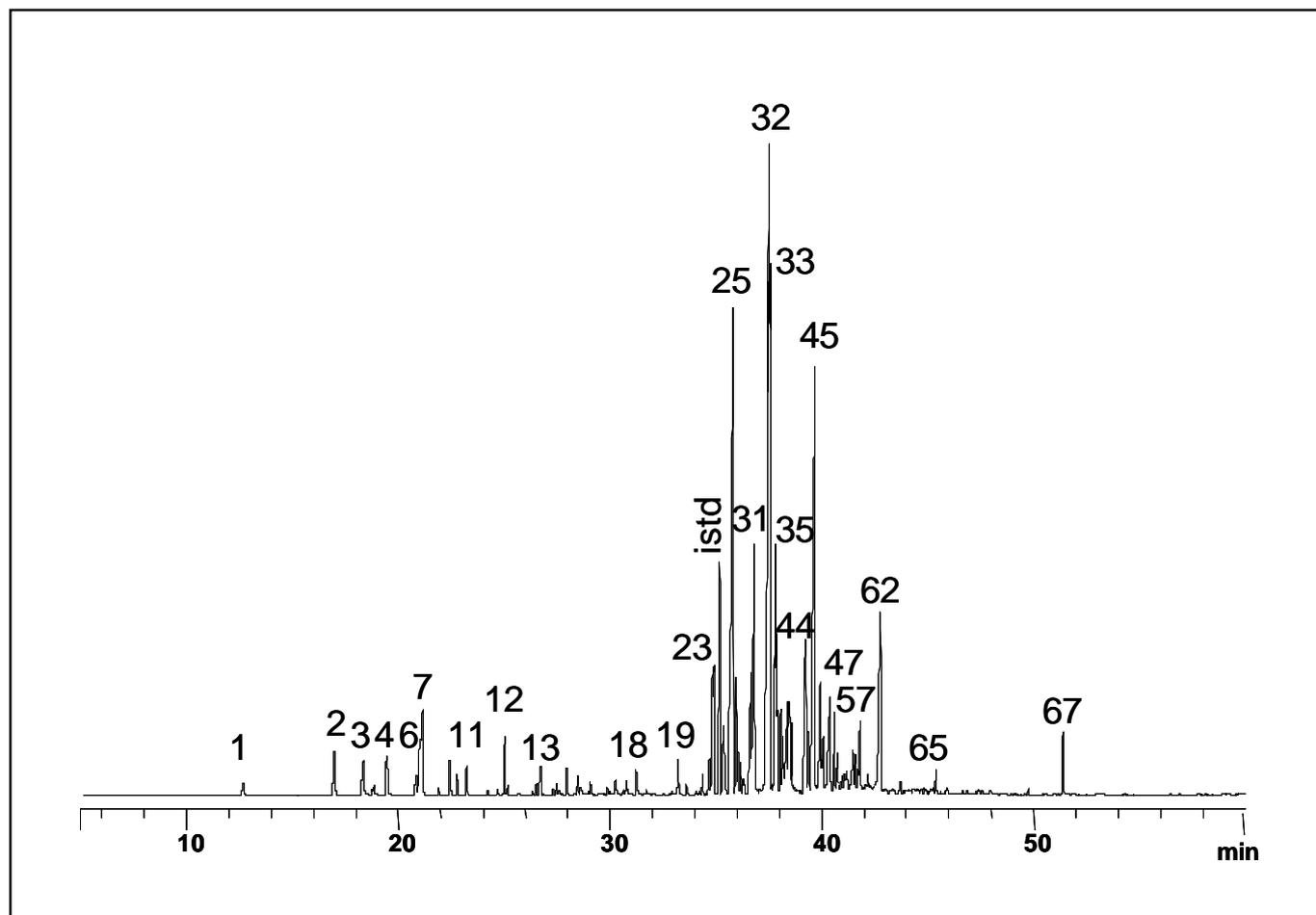


Figura 5. Perfil cromatográfico típico del aceite esencial de *Lantana camara*, obtenido por hidrodestilación. Columna HP-5MS (50 m). Detector selectivo de masas (EI, 70 eV). La identificación de los picos se reporta en la **Tabla 3**.

competitivo. Los métodos P & T y HS-SPME, que involucran una etapa de concentración, permitieron obtener fracciones volátiles, cuya composición se acercaba más a la del aceite esencial de la planta (**Tabla 2**). Así, el neral (14-20%) y el geranial (18-27%) fueron los compuestos mayoritarios en las mezclas de volátiles, obtenidas por P & T y HS-SPME. La técnica HS-SPME (60 min de exposición de la fibra) permitió concentrar los sesquiterpenos en alta proporción, lo que facilitó su identificación, usando índices de retención y espectros de masas, puesto que los últimos fueron “completos” y respondían a todos los criterios espectroscópicos de calidad (Oehme, 1998).

4.3 Metabolitos secundarios volátiles de *L. camara*

En la **Figura 5** aparece un perfil cromatográfico de metabolitos secundarios volátiles, aislados por hidrodesti-

lación de las hojas y los tallos frescos de *L. camara*, planta ampliamente difundida en el Magdalena Medio santandereano. La identificación de los componentes y sus cantidades relativas (%) se reportan en la **Tabla 3**. Como se puede observar, el aceite esencial es de tipo *sesquiterpenoide*; más del 60% de la mezcla lo representan hidrocarburos sesquiterpénicos, $C_{15}H_{24}$, y ca. 30% sus análogos oxigenados. Los siguientes fueron sesquiterpenos mayoritarios, aislados de la *L. camara* por diferentes técnicas extractivas, a saber: el *trans*- β -cariofileno (14-15%) y su óxido (4-9%), el biciclosesquifelandreno (16-18%), el α -zingibereno (5-6%), el *E,E*- α -farneseno (3-4%) y el γ -bisaboleno (3-4%). La fracción de monoterpenos, $C_{10}H_{16}$, no alcanzó un 10%; entre éstos, el β -pineno (0.2-3%) y el β -mirceno (2-4%) fueron hidrocarburos mayoritarios.

Las composiciones relativas de las fracciones volátiles de *L. camara*, obtenidas por las técnicas *headspace*, fueron

Tabla 3. Composición química de los metabolitos secundarios de *Lantana armata* Schauer, aislados por métodos extractivos y de *headspace*.

N° Pico	Compuesto	I _k		Área relativa, %						
		HP-5	Inno-wax	Métodos extractivos			Técnicas <i>headspace</i>			
				HD	MWHD	SDE	SFE	P&T	S-HS	HS-SPME
1	Hexen-3-ol	853	1320	0.3	1.2	1.5	0.2	13.7	19.9	1.7
2	α-Tujeno	928	1035	1.0	1.9	4.1	0.4	14.1	19.4	1.9
3	α-Pineno*	935	1039	1.0	0.8	0.7	0.9	6.8	7.3	0.4
4	Sabineno	976	1129	0.3	0.6	0.7	tr	9.2	15.5	0.8
5	1-Octen-3-ol	978	1415	2.2	2.6	2.2	0.7	7.1	6.1	1.0
6	β-Pineno*	982	1124	2.9	2.5	2.6	0.2	7.6	5.8	0.7
7	β-Mirceno*	993	1157	3.0	3.1	3.9	1.7	0.6	1.9	1.1
8	Octan-3-ol	994	1515	0.3	0.1	0.1	tr	0.6	1.3	0.3
9	α-Felandreno	1009	1180	0.8	0.6	1.0	0.2	0.1	0.1	0.1
10	p-Cimeno*	1027	1278	0.2	0.2	0.5	0.1	0.2	0.1	tr
11	Limoneno*	1033	1205	0.1	0.2	0.5	tr	0.1	0.2	0.2
12	1,8-Cineol*	1034	1230	1.6	1.6	2.0	0.7	0.1	0.3	0.1
13	<i>trans</i> -β-Ocimeno	1043	1249	0.8	0.5	1.4	0.1	0.2	0.1	0.2
14	γ-Terpineno*	1061	1253	0.8	0.5	0.7	0.2	0.2	tr	0.1
15	Terpinoleno*	1088	1290	0.3	0.7	1.2	0.6	0.3	tr	0.1
16	Linalol*	1098	1508	0.7	0.8	1.0	0.9	0.3	tr	0.2
17	Nerol*	1226	1755	0.5	0.3	0.4	0.1	0.1	tr	0.2
18	Neral*	1239	1680	0.6	0.3	0.5	0.6	0.1	tr	0.2
19	Geraniol*	1254	1795	1.0	0.3	0.6	0.5	tr	tr	0.9
20	Geranial*	1270	1728	0.5	0.4	0.9	0.8	0.6	tr	0.4
21	δ-Elemeno	1341	1480	0.6	0.5	0.4	0.3	0.9	tr	0.6
22	β-Burboneno	1384	1526	0.7	0.7	0.7	0.6	0.3	tr	0.6
23	β-Cubebeno	1390	1544	1.6	1.7	1.2	1.9	1.1	1.1	3.7
24	α-Cedreno	1420	1599	0.8	0.4	0.6	0.4	tr	tr	0.4
25	<i>trans</i>-β-Cariofileno*	1425	1618	13.6	13.7	14.2	14.6	11.3	12.4	28.4
26	Aromadendreno	1435	1648	1.3	1.4	1.3	0.9	0.9	tr	5.2
27	α-Humuleno	1452	1670	0.6	0.5	0.6	0.6	tr	tr	2.0
28	<i>allo</i> -Aromadendreno	1465	1663	0.3	0.3	0.4	0.3	tr	tr	0.6
29	γ-Himachaleno	1475	1700	0.5	0.4	0.6	0.7	tr	tr	1.3
30	Germacreno D	1480	1720	0.3	0.3	0.4	0.6	tr	tr	3.9
31	<i>ar</i> -Curcumeno	1482	1775	1.4	1.3	1.5	3.2	2.9	tr	3.2
32	Biciclosesquifelandreno	1490	1760	16.4	16.9	17.0	18.0	11.1	7.1	12.3
33	α-Zingibereno	1494	1726	5.9	5.7	5.7	5.1	0.5	1.6	7.6
34	<i>E,E</i>-α-Farneseno	1509	1740	3.7	3.6	3.4	3.2	0.6	tr	4.8
35	γ-Bisaboleno	1515	1758	3.2	3.3	3.0	3.9	0.4	tr	2.7
36	<i>cis</i> -Calameneno	1518	1842	2.1	1.9	1.6	1.7	0.5	tr	1.4
37	δ-Cadineno	1524	1785	1.9	1.4	1.2	1.3	0.9	tr	1.1
38	<i>trans</i> -Nerolidol	1537	2035	1.2	0.7	0.6	1.6	0.8	tr	2.9
39	α-Calacoreno**	1540	1915	0.9	1.0	1.0	1.4	0.5	tr	0.9
40	Elemol	1547	2075	0.7	0.5	0.3	1.2	0.6	tr	0.4
41	γ-Calacoreno**	1558	1920	1.4	1.2	1.1	1.4	0.4	-	0.2
42	Ledol	1567	2100	1.2	1.3	1.1	1.2	0.5	-	0.2
43	Óxido de himachaleno**	1571	2130	0.7	0.8	0.5	0.8	0.3	-	0.1
44	Germacrenol**	1575	2150	1.0	0.9	0.5	1.2	0.4	-	0.2
45	Óxido de cariofileno	1581	1966	5.9	4.0	4.7	8.8	2.0	tr	2.5
46	<i>trans</i> -β-Elemenona**	1596	2008	2.0	1.9	1.8	1.8	0.4	-	1.1
47	Óxido de humuleno**	1604	1970	0.5	0.6	1.1	1.1	0.5	-	0.3
48	Sesquilandulol**	1607	-	0.6	0.6	0.2	1.4	0.2	-	0.1
49	β-Óxido de himachaleno**	1610	-	0.9	0.6	0.3	1.0	0.1	-	0.2
50	Cedranona**	1617	2030	1.2	1.3	0.4	1.4	0.2	-	0.3
51	<i>epi</i> -γ-Eudesmol**	1622	2183	0.3	0.3	0.2	0.6	0.1	-	0.2
52	Cubenol**	1627	2034	0.1	0.2	0.1	0.3	0.2	-	0.2

Tabla 3. Composición química de los metabolitos secundarios de *Lantana armata* Schauer, aislados por métodos extractivos y de *headspace*.

N° Pico	Compuesto	I _K		Área relativa, %						
		HP-5	Inno-wax	Métodos extractivos			Técnicas <i>headspace</i>			
				HD	MWHD	SDE	SFE	P&T	S-HS	HS-SPME
53	γ-Eudesmol	1630	2240	0.3	0.4	0.4	0.3	0.1	-	0.1
54	β-Acorenol**	1635	-	0.2	0.5	0.5	0.6	tr	-	0.1
55	T-Cadinol	1639	2136	0.7	0.6	0.4	0.6	tr	-	tr
56	Himachalol**	1646	-	0.8	0.6	0.5	0.6	-	-	-
57	α-Cadinol	1654	2224	0.6	0.3	0.2	0.7	-	-	-
58	Dihidroeudesmol**	1659	-	0.3	0.4	0.1	0.6	-	-	-
59	Isocedranol**	1669	-	0.2	0.4	0.1	0.5	-	-	-
60	α-Óxido de bisaboleno	1679	-	0.2	0.3	0.1	0.5	-	-	-
61	Acarenona**	1685	-	tr	tr	tr	0.2	-	-	-
62	Germacrona**	1688	-	2.3	2.2	0.7	2.2	-	-	-
63	β-Sinensal	1695	2040	tr	tr	tr	0.8	-	-	-
64	Farnesol	1740	-	tr	tr	tr	0.7	-	-	-
65	Acetato de cariofilenilo	1700	2038	0.3	0.6	tr	0.9	-	-	-
66	N.I.	-	-	tr	tr	tr	0.5	-	-	-
67	N.I.	-	-	0.5	0.5	0.1	0.7	-	-	-

a) Índices de Kovats determinados experimentalmente;

b) Promedio de tres extracciones independientes; tr – trazas;

* - Se usaron sustancias patrón;

N.I - No identificado;

** - Identificado tentativamente;

notoriamente diferentes de las de los aceites esenciales (HD, MWHD) y de los extractos, obtenidos por SDE y SFE. Así, el perfume de la planta, analizado por *headspace* estático (S-HS), fue constituido predominantemente por el hexen-3-ol (ca. 20%), el α-tujeno (ca. 20%) y el sabineno (ca. 16%). La composición de la fracción volátil, obtenida por la técnica HS-SPME, en las condiciones experimentales empleadas (exposición de la fibra, 60 min), fue más cercana a la del aceite esencial, aunque permitió concentrar en mayor grado los hidrocarburos sesquiterpénicos. La composición de los volátiles, aislados por P & T, fue más cercana a la de la obtenida por S-HS.

Al hacer el análisis global de la composición de metabolitos secundarios volátiles de las tres plantas, según las principales familias de compuestos, *i.e.* hidrocarburos: monoterpenos, C₁₀H₁₆, y sesquiterpenos, C₁₅H₂₄, y sus análogos oxigenados, se destacan visibles diferencias (Figura 6). En la *L. alba* predominaron monoterpenos (>30%) y monoterpenos oxigenados (ca. 55%); para la *A. triphylla*, la familia de compuestos mayoritarios fue la de monoterpenos oxigenados (>70%), de los cuales, ca. 60% correspondieron al citral; mientras que la *L. camara* fue pobre en monoterpenos y sus análogos oxigenados; la mayoría de sus metabolitos secundarios fueron hidrocarburos sesquiterpénicos (ca. 60%) y sus derivados oxigenados (ca.

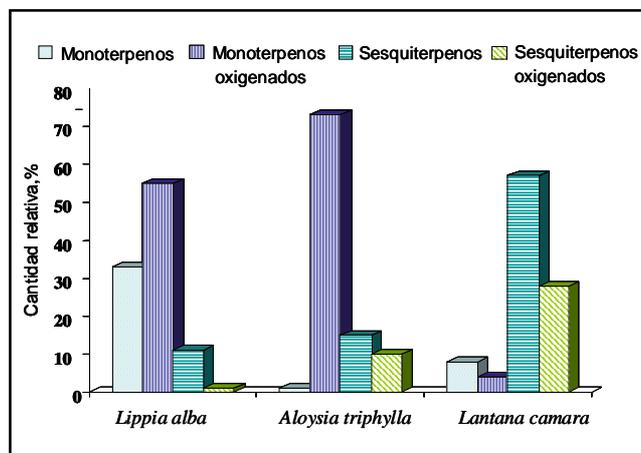


Figura 6. Distribución de las principales familias de compuestos en los aceites esenciales, obtenidos por hidrodestilación, de las tres plantas de la familia Verbenaceae.

30%). De la gran variedad de metabolitos secundarios volátiles (>60) encontrados en las tres plantas de la familia Verbenaceae, sólo el limoneno, el β-burboneno, el *trans*-β-cariofileno y su óxido, el *allo*-aromadendreno y el biciclosesquifelandreno fueron comunes a *L. alba*, *A. triphylla* y *L. camara*, siendo el último, posiblemente uno de los “marcadores” de Verbenaceae.

Tabla 4. Efecto protector de los aceites esenciales de *L. alba*, *A. triphylla*, *L. camara*, la vitamina E y el BHA contra la oxidación de la emulsión del ácido linoleico, inducida por O₂ y Fe⁺².

Antioxidante, g/L	Efecto protector, % *				
	<i>L. alba</i>	<i>A. triphylla</i>	<i>L. camara</i>	Vitamina E	BHA
<i>% de la disminución del hexanal en fase vapor de la emulsión</i>					
1.0	18.7 ± 2.1	27 ± 2.3	16 ± 2.4	34.0 ± 0.51	39 ± 6.3
2.5	65 ± 1.0	39.3 ± 0.2	49.7 ± 0.7	46.0 ± 0.51	56 ± 1.7
5.0	71 ± 1.0	59 ± 4.1	72 ± 1.3	57.0 ± 0.63	51 ± 2.1
10.0	73.6 ± 0.5	71 ± 3.5	78.4 ± 0.5	62.4 ± 0.82	69 ± 2.3
20.0	72.6 ± 0.9	74.7 ± 0.2	76 ± 3.2	61 ± 3.2	-
<i>% de la disminución del hexanal en la emulsión</i>					
1.0	27 ± 1.9	10 ± 2.4	28 ± 2.4	36.1 ± 0.13	72 ± 1.5
2.5	44.9 ± 0.4	48 ± 3.6	69 ± 3.6	56.0 ± 0.51	73 ± 2.6
5.0	72 ± 1.3	65 ± 3.2	71 ± 2.3	64.4 ± 0.44	75.1 ± 0.8
10.0	78.0 ± 0.2	72 ± 2.0	85 ± 2.0	75.9 ± 0.9	76 ± 1.5
20.0	78.5 ± 0.6	68 ± 3.5	87 ± 4.3	75.5 ± 0.9	-
<i>% del ácido linoleico remanente (sin oxidar)</i>					
1.0	32 ± 1.7	50 ± 1.0	45.9 ± 0.1	23 ± 1.7	36.7 ± 0.9
2.5	69 ± 5.0	59 ± 4.2	66.7 ± 0.7	42.2 ± 0.8	38.6 ± 1.9
5.0	72 ± 4.5	63.7 ± 0.3	71 ± 1.3	55 ± 2.1	55.3 ± 0.7
10.0	84 ± 3.4	65 ± 4.7	86 ± 1.8	85 ± 2.5	63 ± 3.0
20.0	85 ± 5.0	73 ± 1.4	89 ± 3.5	72 ± 1.6	-

* - Promedio de tres mediciones (± s)

4.4 Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* de los aceites esenciales de *L. alba*, *A. triphylla* y *L. camara*

Un área muy importante en el campo de productos naturales es la determinación de la actividad biológica de las plantas y sus extractos. Muchas plantas son una fuente valiosa de nuevos *flavours* y efectivos agentes antisépticos y antioxidantes. Los antioxidantes de origen natural se usan cada vez con mayor frecuencia no solamente en los alimentos, sino también en diferentes preparados farmacéuticos y cosméticos (Frei, 1994; Risch, 1997; Larson, 1997).

Varios ensayos han sido implementados para medir la actividad antioxidante de sustancias de origen natural. Éstos pueden ser divididos en dos grupos, así: (1) aquellos que miden la capacidad de sustancia(s) para atrapar radicales (*radical scavenging ability*); y (2) aquellos que miden la capacidad inhibitoria de la oxidación lipídica. La peroxidación puede ser inducida por diferentes métodos (Halliwell & Gutteridge, 1989), a saber: la radiólisis, la fotólisis y/o por la reacción tipo Fenton, la cual se usó en el presente estudio. También es importante tener en cuenta, que el valor medido de la actividad antioxidante depende tanto del tipo de ensayo utilizado, *i.e.* el sistema lipídico, como del modo de inducir la oxidación, y de la propiedad físico-química que se monitorea durante este proceso (Puertas *et al.*, 2002).

En este estudio, la evaluación de la actividad antioxidante (el efecto protector) de los aceites esenciales de las tres verbenaceas, se llevó a cabo en un sistema lipídico consistente en una emulsión de ácido linoleico, que fue sometida a la peroxidación “forzada”, en la presencia de O₂ y de los iones Fe⁺². Las sustancias carbonílicas son productos secundarios finales de la peroxidación lipídica; en particular, el hexanal es el aldehído mayoritario, que se forma durante la peroxidación del ácido linoleico y su cantidad puede emplearse como indicador del avance de la oxidación. Siendo una sustancia volátil, el hexanal se midió tanto en la fase vapor de la emulsión, por HS-SPME con derivación directa sobre la fibra (Stashenko *et al.*, 2000), como en la solución, usando extracción líquido-líquido (Stashenko *et al.*, 1997, 2002). La cantidad del ácido linoleico remanente, que “sobrevive” el ataque del oxígeno, puede indicar también cuánto avanzó su oxidación en el sistema.

En la **Tabla 4** se reportan las mediciones del hexanal en la fase vapor y en la emulsión del ácido linoleico (disminución relativa de éste con respecto al blanco), junto

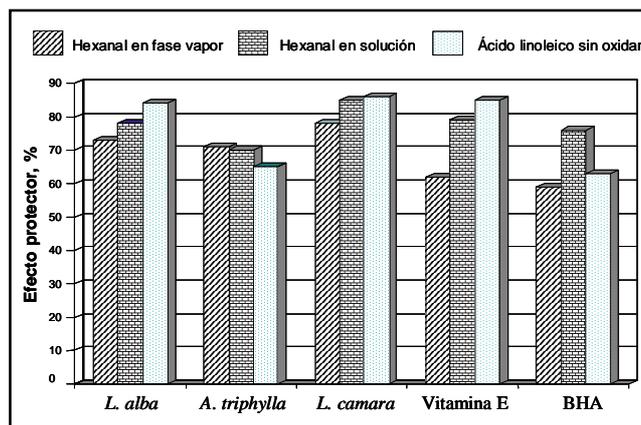


Figura 7. Efecto protector (%) de los aceites esenciales de las tres Verbenáceas, la vitamina E y el BHA, en la emulsión del ácido linoleico, medido por tres métodos diferentes (disminución del hexanal y el % del ácido linoleico sin oxidar)

con el porcentaje del ácido sin oxidar. El efecto protector de las esencias se incrementa con el aumento de su concentración en el sistema, alcanzando valores altos a las concentraciones de 10 ó 20 g/L. Los aceites esenciales de las tres plantas mostraron un efecto protector, a la misma concentración, *e.g.* 10 g/L, igual o mayor que la vitamina E y el BHA, siendo el aceite de *L. camara* el más activo de todos, seguido del aceite de *L. alba*, así como se puede apreciar en la **Figura 7**. Existen diferentes mecanismos de la actividad antioxidante, a saber: el atrapamiento (*scavenging*) de radicales, la interrupción de la reacción en cadena de la peroxidación, la formación de quelatos de iones metálicos, aceleradores de la oxidación, entre otros. En un reciente estudio Puertas *et al.* (2002) mostraron que la capacidad de los componentes del aceite esencial de *L. alba* para secuestrar radicales no fue muy alta, es decir, se activan otros mecanismos de protección contra la peroxidación. Entre éstos, *e.g.* el “sacrificio” de terpenos (hidrocarburos insaturados, compuestos mayoritarios en el aceite de *L. camara*), que se oxidan más rápido y, de esta manera, protegen o retardan la oxidación del sustrato, *i.e.* el ácido linoleico. Sin embargo, para la verificación de esta hipótesis se necesitarán experimentos adicionales.

Agradecimientos

A Colciencias, por su apoyo financiero (Proyectos CO 1102-05-267-97 y 1102-05-220-99). A *Khymós* Ltda., representantes de *Agilent Technologies* en Colombia, por el soporte técnico de equipos analíticos.

Referencias bibliográficas

- Adams, R.P. 1995. Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois.
- Bahl, J.R., Garg, S.N., Singh, S.C., Bansal, R.P., Naqvi, A.A. & Kumar, S. 2000. "Composition of linalool rich essential oil from *Lippia alba* grown in Indian plains" *Flavour Fragr. J.* **15**: 199-200.
- Bahl, J.R., Sinha, S., Naqvi, A.A., Bansal, R.P., Gupta, A.K. & Kumar, S. 2002. "Linalool-rich essential oil quality variants obtained from irradiated stem nodes in *Lippia alba*", *Flavour Fragr. J.* **17**: 127-132.
- Bellakhdar, J., IL Idrissi, A., Cañigueral, S., Iglesias, J. & Vila, R. 1994. "Composition of lemon verbena (*Aloysia triphylla* (L'Herit.) Britton) oil of Moroccan origin", *J. Essent. Oil Res.* **6**: 523-526.
- Blanco, C., Stashenko, E.E., Combariza, M.Y. & Martínez, J.R. 1995. "Comparative study of Colombian citrus oils by high-resolution gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry", *J. Chromatogr. A.* **697**: 501-513.
- BrasiL E Silva, G.A. 1979. "O oleo essencial de *Lippia citriodora* Kunth. do Rio Grande do Sul", *Trib. Farm.* **47**(1): 3-5.
- Carnat, A., Carnat, A.P., Fraisse, D. & Lamaison, J.L. 1999. "The aromatic and polyphenolic composition of lemon verbena tea", *Fitoterapia* **70**(1): 44-49.
- Combariza, M.Y., Blanco, C., Stashenko, E.E. & Shibamoto, T. 1994. "Limonene concentration in lemon (*Citrus volcameriana*) peel oil as a function of ripeness", *J. High Resol. Chromatogr.* **17**: 643-646.
- Davies, N.W. 1990. "Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases", *J. Chromatogr.* **503**: 1-24.
- EL-Hamidi, A., Ahmed, S.S. & Shaarawy, F. 1983. "*Lippia citriodora* grown in Egypt. A new crop development", *Acta Horticulturae.* **132**: 31-33.
- Fathy, M.M. 2000. "Comparative study of essential oils from leaves and flowers of certain *Lantana* species growing in Egypt", *Bull. Fac. Pharm. Cairo Univ.* **38**(2): 105-118.
- Frankel, E.N. 1985. In: *Flavor chemistry of fats and oils*, D.B. Min, T.H. Smouse (Eds.), American Oil Chemists' Society.
- Frei, B. (Ed.) 1994. *Natural antioxidants in human health and disease*, Academic Press, New York.
- García Barriga, H. 1992. *Flora medicinal de Colombia. Botánica médica*, 2a Ed., Tercer Mundo, Bogotá.
- Godefroot, M., Sandra, P. & Verzele, M. 1981. "New method for quantitative essential oil analysis", *J. Chromatogr.* **203**: 325-335.
- Guerrera, P.M., Leporatti, M.L., Foddai, S., Moretto, D., Mercantini, R. 1995. "Antimycotic activity of the essential oil of *Lippia citriodora* Kunth. (*Aloysia triphylla* Britton)", *Rev. Italiana EPPOS.* **15**: 23-25.
- Gupta, M.P. (Ed.) 1995. *270 Plantas medicinales Iberoamericanas*, 1a Ed., CYTED-SECAB, Bogotá.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. 1989. *Free radicals I biology and medicine*, Clarendon Press, Oxford.
- Jennings, W. & Shibamoto, T. 1980. *Qualitative analysis of flavor and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography*, Academic Press, Inc., New York.
- Joulain, D. & König, W. 1998. *The Atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons*, E.B.-Verlag, Hamburg.
- Kovats, E. 1965. "Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system", *Adv. Chromatogr.* **1**: 229-247.
- Larson, R.A. 1997. *Naturally occurring antioxidants*, Lewis Publishers, Boca Raton.
- Lorenzo, D., Paz, D., Davies, P., Vila, R., Cañigueral, S. & Dellacassa, E. 2001. "Composition of a new essential oil type of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown from Uruguay", *Flavour Fragr. J.* **16**: 356-359.
- Nakamura, I., Okuyama, E., Tsukada, A., Yamazaki, M., Satake, M., Nishibe, S., Deyama, T., Moriya, A., Maruno, M. & Nishimura, H. 1997. "Ateoside as the analgesic principle of Cedron (*Lippia triphylla*), a Peruvian medicinal plant", *Chem. Pharm. Bull.* **45**(3): 499-504.
- Ngassoum, M.B., Yonkeu, S., Jirovetz, L., Buchbauer, G., Schmaus, G. & Hammerschmidt, F.-J. 1999. "Chemical composition of essential oils of *Lantana camara* leaves and flowers from Cameroon and Madagascar", *Flavour Fragr. J.* **14**: 245-250.
- Oehme, M. 1998. *Practical introduction to GC-MS analysis with quadrupoles*, Hüthig, Heidelberg.
- Özek, T., Kirimer, N., Baser, K.H.C. & Tumen, G. 1996. "Composition of the essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit.) Britton grown in Turkey", *J. Essent. Oil Res.* **8**: 581-583.
- Pérez, S.G., Zavala, M.A., Vargas, R., Pérez, C. & Pérez, R.M. 1998. "Antidiarrheal activity of C-9 aldehyde isolated from *Aloysia triphylla*", *Phytotherapy Research* **12**(1): S45-S46.
- Pino, J.A., Ortega, A.G., Rosado, A., Rodríguez, M. & Balujar, R. 1997. "Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown", *Rev. Cubana Farm.* **30**: 1-8.
- Puertas, M.P., Hillebrand, S., Stashenko, E.E. & Winterhalter, P. 2002. "In vitro radical scavenging activity of essential oils from Columbian plants and fractions from oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil", *Flavour Fragr. J.* **17**: 380-384.
- Risch, S.J. & Chi-Tang Ho (Eds.) 1997. *Spices. Flavor chemistry and antioxidant properties*, ACS, Washington.
- Rode, J. 2000. "Possibilities of *Lippia citriodora* Kunth. Cultivation in Slovenia", *Acta Horticulturae* **523**: 61-64.
- Sefidkon, F. 2002. "Essential oil of *Lantana camara* L. occurring in Iran", *Flavour Fragr. J.* **17**: 78-80.
- Senatore, F. & Rigano, D. 2001. "Essential oil of two *Lippia* spp. (Verbenaceae) growing wild in Guatemala", *Flavour Fragr. J.* **16**: 169-171.

- Silva, M.H.L., Andrade, E.H.A., Zoghbi, M.G.B., Luz, A.I.R., Silva, J.D. & Maia, J.G.S. 1999. "The essential oils of *Lantana camara* L. occurring in North Brazil", *Flavour Fragr. J.* **14**: 208-210.
- Stashenko, E.E., Acosta, R. & Martínez, J.R. 2000. "High-resolution gas-chromatographic analysis of the secondary metabolites obtained by subcritical-fluid extraction from Colombian rue (*Ruta graveolens* L.)", *J. Biochem. Biophys. Methods.* **43**: 379-390.
- Stashenko, E.E., Cervantes, M., Combariza, M.Y., Fuentes, H., Martínez, J.R. 1999. "HRGC/FID and HRGC/MSD analysis of the secondary metabolites obtained by different extraction methods from *Lepechinia schiedeana*, and *in vitro* evaluation of its antioxidant activity", *J. High Resol. Chromatogr.* **22**: 343-349.
- Stashenko, E.E., Ferreira, C., Sequeda, G., Mateus, A., Cervantes, M. & Martínez, J.R. 1997. "Desarrollo de un método para monitoreo de la degradación oxidativa en lípidos y evaluación de la actividad antioxidante de productos naturales", *Arte y Ciencia Cosmética* **12**: 20-27.
- Stashenko, E.E., Ferreira, M.C., Sequeda, L.G., Martínez, J.R. & Wong, J.W. 1997. "Comparison of extraction methods and detection systems in the gas chromatographic analysis of volatile carbonyl compounds", *J. Chromatogr. A* **779**: 360-369.
- Stashenko, E.E., Macku, C. & Shibamoto, T. 1992. "Monitoring volatile chemicals from must during yeast fermentation", *J. Agric. Food Chem.* **40**: 2257-2259.
- Stashenko, E.E., Martínez, J.R., Macku, C. & Shibamoto, T. 1993. "HRGC and GC-MS analysis of essential oil from Colombian ylang-ylang (*Cananga odorata* Hook Fil. Et Thomson, *forma genuine*)", *J. High Resol. Chromatogr.* **16**: 441-444.
- Stashenko, E.E., Puertas, M.A. & Combariza, M.Y. 1996a. "Volatile secondary metabolites from *Spilanthes americana* obtained by simultaneous steam distillation-solvent extraction and supercritical fluid extraction", *J. Chromatogr. A* **752**: 223-232.
- Stashenko, E.E., Puertas, M.A. & Martínez, J.R. 2002. "SPME determination of volatile aldehydes for evaluation of *in-vitro* antioxidant activity", *Anal. Bioanal. Chem.* **373**: 70-74.
- Stashenko, E.E., Puertas, M.A., Salgar, W., Delgado, W. & Martínez, J.R. 2000. "Solid-phase microextraction with on-fibre derivatisation applied to the analysis of volatile carbonyl compounds", *J. Chromatogr. A* **886**: 175-181.
- Stashenko, E.E., Quiroz, N. & Martínez, J.R. 1996b. "HRGC/FID/NPD and HRGC/MSD study of Colombian ylang-ylang (*Cananga odorata*) oils obtained by different extraction techniques", *J. High Resol. Chromatogr.* **19**: 353-358.
- Stashenko, E.E., Torres, W. & Martínez, J.R. 1995. "A Study of the compositional variation of the essential oil of ylang-ylang (*Cananga odorata* Hook Fil. Et Thomson, *forma genuine*) during flower development", *J. High Resol. Chromatogr.* **18**: 101-104.
- Stashenko, E.E., Villa, H.S. & Combariza, M.Y. 1995. "Comparative study of Colombian rue oils by high resolution gas chromatography using different detection systems", *J. Microcolumn Sep.* **7**: 117-122.
- Stashenko, E.E., Wong, J.W., Martínez, J.R., Mateus, A. & Shibamoto, T. 1996c. "High-resolution gas chromatography with nitrogen-phosphorous detection of saturated volatile aldehydes derivatized with 2-hydrazinobenzothiazole", *J. Chromatogr. A* **752**: 209-216.
- Tamura, H. & Shibamoto, T. 1991. "Antioxidant activity measurement in lipid peroxidation system with malondialdehyde and 4-hydroxy nonenal", *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **78**: 941-943.
- Tamura, H. & Yamagami, A. 1994. "Antioxidant activity of monoacylated anthocyanins isolated from Muscat Bailey A grape", *J. Agric. Food Chem.* **42**: 1612-1615.
- Umamo, K. & Shibamoto, T. 1987. "Analysis of headspace volatiles from overheated beef fat", *J. Agric. Food Chem.* **35**: 14-18.
- Vogel, H., Silva, M.L. & Razmilic, I. 1999. "Seasonal fluctuation of essential oil content in lemon verbena (*Aloysia triphylla* (L'Herit.) Britton)", *Acta Horticulturae* **500**: 75-79.
- Wannmacher, L., Fuchs, F.D., Paoli, C.L., Fillman, H.S., Gianlupi, A., Lubianca Neto, J.F., Hasegawa, C.Y. & Guimarães, F.S. 1990. "Plants employed in the treatment of anxiety and insomnia: II. Effect of infusions of *Aloysia triphylla* on experimental anxiety in normal volunteers", *Fitoterapia* **61**(5): 449-453.
- Weyerstahl, P., Marschall, H., Eckhardt, A. & Christiansen, C. 1999. "Constituents of commercial Brazilian lantana oil", *Flavour Fragr. J.* **14**: 15-28.
- Zoghbi, M.G.B., Andrade, E.H.A., Santos, A.S., Silva, M.H.L. & Maia, J.G.S. 1998. "Essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. grown wild in the Brazilian Amazon", *Flavour Fragr. J.* **13**: 47-48.
- Zygadlo, J.A., Lamarque, A.L., Maestri, D.M., Guzmán, C.A. & Grosso, N.R. 1995. "Composition of the flower oils of some *Lippia* and *Aloysia* species from Argentina", *J. Essent. Oil Res.* **7**: 593-595.
- Zygadlo, J.A., Lamarque, A.L., Maestri, D.M., Guzmán, C.A., Lucini, E.I., Grosso, N.R. & Ariza-Espinar, L. 1994. "Volatile constituents of *Aloysia triphylla* (L'Herit.) Britton", *J. Essent. Oil Res.* **6**: 407-409.

