



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis de Maestría en Plantas Medicinales

“Rendimiento de biomasa y aceite esencial de quimiotipos
de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown en respuesta a las
prácticas agronómicas, y sus propiedades farmacológicas”

Tesista: Ing. Agr. Marcos Blanco

Director: Ing. Agr. Jorge Ringuelet

Codirectoras: Dra. Alicia E. Consolini
Dra. Sonia Viña

Año 2014

Dedico esta tesis:

_ A mis padres Alberto y Graciela por el apoyo y esfuerzo constantes desde los comienzos de mi formación, por pelear desde abajo con humildad, por confiar en mí.

_ A mi hermana Paula, por su afecto, dedicación y aliento en el transcurso de este proyecto.

_ A mi novia Griselda por su afecto, colaboración y aliento constantes para comenzar y poder terminar este proyecto.

_ A mis seres queridos que ya han partido pero están presentes en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

A las Facultades de Ciencias Agrarias y Forestales y de Ciencias Exactas de la UNLP, por la posibilidad de realizar esta Tesis de Maestría en Plantas Medicinales.

A mi Director de Tesis, Ing. Agr. Jorge Ringuélet, por los saberes que generosamente me ha brindado durante los años de trabajo juntos, por su apoyo y paciencia desde el comienzo de este proyecto.

A mi codirectora de Tesis, Dra. Sonia Viña, por la ayuda brindada en el transcurso de este trabajo.

A la Dra. Alicia Consolini, Directora de la Maestría en Plantas Medicinales y también codirectora de mi Tesis, por ocuparse siempre para que haya podido culminar con éxito el camino emprendido, por todas las facilidades brindadas para la realización de una parte importante de este trabajo; por su aliento constante y por confiar en mí.

A Germán Colareda y María Inés Ragone quienes me ayudaron a llevar adelante los experimentos en el laboratorio de Farmacología (Facultad de Cs. Exactas, UNLP).

Al Dr. Arnaldo Bandoni y su equipo de trabajo (Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA), por haber realizado generosamente el análisis de los aceites esenciales.

Al M. Sc. Qco. Guillermo Schinella por su apoyo y estímulo en el transcurso del proyecto.

A Gabriel Crédico (Facultad de Cs. Agrarias y Forestales), por su colaboración con el material utilizado en el laboratorio.

A todos los profesores de la Maestría en Plantas Medicinales de la Facultad de Ciencias Exactas y a los profesores invitados provenientes de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la UNLP y de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA, por su predisposición para dictar sus materias y transmitir sus saberes.

A mis compañeros de cátedra por su apoyo.

Y muy especialmente:

A mi familia: Alberto, Graciela, Paula y Griselda, por el apoyo constante y colaboración desde el comienzo en este proyecto, por confiar y valorar mi esfuerzo y la importancia que este proyecto significó para mí.

Índice

RESUMEN

	Pág.
1. <u>Introducción</u>	1
1.1. La importancia de las plantas medicinales y su potencial	2
1.2. Extractivismo y sustentabilidad	3
1.3. Las plantas medicinales en terapéutica	3
1.4. Fitomedicamentos	4
1.5. Antecedentes	5
1.5.1. Familia <i>Verbenaceae</i>	5
1.5.2. <i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E. Brown ex Britton & Wilson	6
1.5.3. Cultivo	9
1.5.4. Calidad de la droga vegetal	10
1.5.4.1 Humedad	11
1.5.4.2 Cenizas	11
1.5.4.3 Color	12
1.5.5. Usos y actividades farmacológicas descritas para <i>Lippia alba</i>	12
1.6. Objetivos de la tesis	14
2. <u>Materiales y métodos</u>	15
2.1. Cultivo	15
2.2. Extracción y análisis de aceites esenciales	19
2.3. Control de calidad de la droga vegetal	21
2.4. Estudios farmacológicos	23

3. <u>Resultados</u>	27
3.1. Aspectos agronómicos del cultivo	28
3.1.1. Efecto de la distancia de plantación en el rendimiento de hoja	29
3.1.2. Efecto de la época de cosecha en el rendimiento de hoja	31
3.1.3. Efecto del número de cortes en el rendimiento de hoja	32
3.1.4. Rendimiento de aceite esencial	35
3.2. Análisis cromatográfico del aceite esencial	36
3.3. Estudios farmacológicos	42
3.3.1- Efectos de las esencias sobre las curvas concentración-efecto de acetilcolina	42
3.3.2- Evaluación del mecanismo de acción de las esencias	47
3.4. Parámetros de calidad de la droga vegetal	54
4. <u>Discusión</u>	60
4.1. Efecto de la época de cosecha en el rendimiento de hoja	61
4.2. Efecto del número de cortes en el rendimiento de hoja	62
4.3. Rendimiento de aceite esencial con relación a la época de cosecha	63
4.4. Efectos farmacológicos y su relación con el perfil cromatográfico de las esencias de <i>L. alba</i>	64
4.5. Mecanismos de acción	65
4.6. Parámetros de calidad de la droga vegetal	66
5. <u>Conclusiones</u>	68
6. <u>Referencias bibliográficas</u>	70

RESUMEN

Esta tesis estudia experimentalmente la respuesta de plantas cultivadas pertenecientes a cuatro quimiotipos de *Lippia alba* (carvona, dihidrocarvona, citral y linalol) ante la implementación de distintas técnicas de manejo agronómico. Se analizó la incidencia de la distancia de plantación y época de corte de la planta sobre el rendimiento de biomasa, de droga cruda (hoja seca) y aceite esencial en los diferentes quimiotipos evaluados. El rendimiento de droga cruda no fue afectado por las diferentes distancias de plantación ensayadas; en cambio la época de recolección produjo diferencias, tanto en el rendimiento de droga cruda como en el de aceite esencial. Se observó en los quimiotipos “citral” y “linalol” mayor rendimiento de droga cruda, en cambio el quimiotipo “dihidrocarvona” presentó el mayor rendimiento de aceite esencial.

Los métodos de cosecha y secado empleados no afectaron la calidad de la droga vegetal.

El análisis cromatográfico de los aceites esenciales confirmó la identidad de los cuatro quimiotipos evaluados.

Los estudios farmacológicos realizados sobre los cuatro quimiotipos confirmaron la hipótesis de que el uso tradicional de *Lippia alba* para problemas gastrointestinales está avalado por un efecto antiespasmódico del aceite esencial. El mecanismo de este efecto es que las esencias actúan como antagonistas no competitivos de la acetilcolina por interferir con el influjo de calcio al músculo liso. La comparación de la concentración inhibitoria al cincuenta por ciento (CI_{50}) de las esencias de los cuatro quimiotipos mostró que el aceite esencial del quimiotipo “citral” es alrededor de 10 veces más potente que las otras tres esencias.

1. Introducción

1.1 La importancia de las plantas medicinales y su potencial

Las plantas medicinales y aromáticas nativas constituyen recursos naturales de gran importancia para el bienestar de la humanidad, y tienen un gran potencial en relación a su posible industrialización. Cumplen una función importante tanto como fuente de medicinas naturales como de ingresos para los productores, procesadores y comercializadores, contribuyendo al proceso de desarrollo. No obstante, la materia prima requerida no siempre se encuentra a disposición.

En algunos casos, ciertas especies con valor medicinal se encuentran en poca cantidad o se vuelven escasas debido a los procesos de recolección y la falta de producción sostenible, planteando una amenaza para las poblaciones silvestres. El interés por el conocimiento de las plantas medicinales se ha intensificado, no sólo por comprender la sabiduría tradicional, sino también para validarla científicamente por medio de estudios en diferentes niveles que garanticen productos fitoterapéuticos de uso seguro y eficaz de tal manera que puedan ser aprovechados por una mayor cantidad de personas (Guzmán y col., 2004).

Debido a la presencia en distintos órganos vegetales de numerosos metabolitos secundarios, las plantas se han utilizado con propósitos diversos desde tiempos muy antiguos: uso medicinal y cosmético, uso en alimentos como especias para impartir sabor y aroma, además de servir como preservantes; uso veterinario, o para el control de plagas y enfermedades en la agricultura.

Las plantas medicinales y aromáticas se hallan presentes en distintos ambientes, que van desde regiones secas hasta húmedas y desde el nivel del mar hasta una altura mayor a los 4000 m.s.n.m. y con diversidad de estaciones de acuerdo con la ubicación de la región: tropical, subtropical o templada. Esta variabilidad de clima puede provocar cambios de índole morfológico, genético y químico cuya evaluación es importante, sobre todo con miras a un desarrollo comercial (Dellacasa, 2010).

El desconocimiento y/o la desaparición de las técnicas y saberes tradicionales sobre el aprovechamiento de la flora silvestre provocan la alteración del equilibrio ancestral que suele existir en el hábitat natural, entre los distintos recursos. La pérdida de la diversidad genética puede poner en peligro muchos recursos vegetales nativos. Por esta razón es imperioso conducir mayores esfuerzos técnicos en acciones de domesticación de especies, con el propósito de rescatar recursos no investigados en la región latinoamericana. Los nuevos avances en acciones de domesticación deberían implementar metodologías bajo un concepto amplio, donde se logre el manejo adecuado del hábitat original, sin destruir el mismo. No deben plantearse modelos agroecológicos que brinden estabilidad al sistema de producción buscando la sustentabilidad económica como objetivo único. Aunque este último puede ser un factor importante para el desarrollo de una región, debe considerarse realmente la sustentabilidad biológica del sistema de producción. Para esto, en el paquete de acciones a realizar hay que incluir un profundo estudio de la biodiversidad, tanto desde el punto de vista morfológico tradicional, como del quimiotaxonómico. Como herramientas de protección deberían aplicarse tanto los bancos de germoplasma, como la implementación de reservas naturales en la región de producción, tales como: herbarios, jardines botánicos y bases de datos etnobotánicas (Bandoni, 2002).

1.2 Extractivismo y sustentabilidad

Se denomina extractivismo al procedimiento mediante el cual se acopia material silvestre para uso comercial. Es una acción irracional en el aprovechamiento de los recursos naturales, y constituye un modelo histórico que provoca el deterioro de los mismos, sin otorgar el valor agregado necesario para promover un modelo sustentable a nivel productivo; además tiene como desventaja que el material recolectado no posee calidad uniforme. La situación se agrava cuando el mismo es objeto de comercio internacional; por ello es muy importante conocer cuál es la abundancia de la especie que se va a recolectar. Por otro lado, si la práctica del extractivismo se expande a un mercado globalizado, la demanda puede ejercer una presión demasiado alta, lo que se puede traducir en un serio desequilibrio entre la capacidad de regeneración del recurso natural y su explotación comercial. Sin embargo, los problemas en la calidad y la permanente degradación de las poblaciones vegetales naturales hacen que poco a poco vaya surgiendo una demanda por un producto de alta calidad, solamente asequible mediante el cultivo (Bandoni, 2002).

El aprovechamiento de poblaciones silvestres, aunque poco relevante en términos cuantitativos comparado con las cultivadas, es una actividad que debe ser atendida y estudiada desde el punto de vista agronómico, ecológico, económico y social. Debido a un mal manejo de esas poblaciones, existen especies en peligro de extinción, se produce degradación de suelos y se observan problemas sociales en comunidades rurales por pérdida de fuentes de trabajo, al afectarse seriamente el recurso económico. Las buenas prácticas agrícolas aplicadas a poblaciones silvestres ayudarán a mantener la biodiversidad y un buen cuidado del medio ambiente. Algunas poblaciones silvestres pueden llevarse a cultivo a través de procesos de domesticación, lo que muy probablemente lleve a un aumento de producción por unidad de superficie y mayor rentabilidad (Martínez y col., 2000).

Los productos aromáticos de origen natural sufren una fuerte competencia con los sustitutos sintéticos y los metabolitos secundarios producidos *in vitro* usando técnicas avanzadas de cultivo de células y tejidos. Pero la demanda de productos naturales es creciente en todo el mundo, principalmente por los interrogantes y los problemas que se le atribuyen a muchos productos sintéticos en relación con la salud humana y el medio ambiente. Asimismo, existen en algunos casos razones de índole económica por los elevados costos de síntesis; y una razón adicional es la imposibilidad tecnológica, hasta el momento, de imitar exactamente un aroma o fragancia natural por uno sintético debido a la complejidad de la composición química del primero. Este último factor es muy marcado en el caso de algunas esencias usadas en perfumería (Bandoni, 2002).

1.3 Las plantas medicinales en terapéutica

Se consideran plantas medicinales todas aquellas que contienen en alguno o algunos de sus órganos principios activos que, administrados en dosis adecuadas, producen efectos curativos en las enfermedades de los hombres y de los animales en general (Pérez, 2008). Su actividad primordial, a veces específica, es servir como droga o medicamento que alivie la enfermedad o restablezca la salud; es decir, que tienden a disminuir o neutralizar el desequilibrio orgánico que es la enfermedad. Constituyen aproximadamente la séptima parte de las especies existentes (Muñoz, 1987).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) definió a las plantas medicinales como aquéllas que en uno o más de sus órganos contienen sustancias que pueden ser utilizadas con finalidad terapéutica o que son precursores para la semisíntesis químico-farmacéutica (OMS, 1978).

En los sistemas de salud de los países subdesarrollados o en desarrollo, las plantas representan una alternativa terapéutica para diversas afecciones del ser humano y animales. La OMS estimó que más del 80 % de la población mundial usa la medicina tradicional para cubrir sus necesidades en la atención primaria, con el empleo de extractos de plantas o sus principios activos.

Algunas plantas medicinales empleadas en países del primer mundo cuentan con estudios farmacológicos que avalan su uso y determinan sus mecanismos de acción, estando sus monografías incorporadas en diversas farmacopeas, en la Organización de Estados Americanos (OEA) y en la Comisión Europea (Capasso y col., 2003; OMS, 1999). Sin embargo, en nuestro país se utilizan más frecuentemente plantas autóctonas, que cuentan con menor cantidad de estudios farmacológicos experimentales y clínicos, de manera que hay poca bibliografía disponible (Soraru y Bandoni, 1978; Marzocca, 1997; Lahitte y col., 1998; Alonso y Desmarchelier, 2005).

La mitad o más de los fitofármacos que se utilizan en el mundo se solicitan sin prescripción médica. Un estudio reciente realizado en la provincia de Buenos Aires mostró que durante el período de un año se dispensaron 43608 plantas medicinales en 260 farmacias, representadas por un 80,1 % de drogas crudas de herboristería y un 19,9 % de fitoterápicos. Se observó que sólo un 3,5 % de las hierbas medicinales fueron prescritas por el médico, correspondiendo en su mayoría a malva, manzanilla y tilo (Consolini y col., 2007).

Dolencias como las de índole gastrointestinal, circulatorias periféricas, obesidad, eczemas, ansiedad e insomnio, tos y gripe, entre otras, suelen ser tratadas con fitoterápicos generalmente por automedicación. Otras dolencias crónicas pueden requerir el uso de tisanas como coadyuvantes, por ejemplo para regular la presión arterial, la glucemia, la colesterolemia. Así, la popularidad que logró la medicina natural para tratar ciertas enfermedades ha estimulado el uso de muchas especies sobre todo herbáceas, para su recolección o cultivo bajo condiciones estandarizadas. Otro aspecto es la utilización de las plantas medicinales como fuente de nuevos y novedosos principios activos para tratar enfermedades en las que se dispone de escasas alternativas terapéuticas. Muchos programas actualmente trabajan en busca de compuestos de origen vegetal con acción anti-sida y anti-cáncer. Especialmente India, África y Sudamérica, son las principales fuentes de productos vegetales patentables y poseen amplio conocimiento ancestral de la etnomedicina (Arvelija, 2010).

1.4 Fitomedicamentos

La ciencia que estudia la utilización de los productos de origen vegetal con una finalidad terapéutica, tanto para prevenir, atenuar o curar un estado patológico se conoce como *Fitoterapia*. Si bien la humanidad ha utilizado las plantas con fines curativos a lo largo de toda su historia, la incidencia de los productos derivados de plantas en la terapéutica ha variado a lo largo de los tiempos, de acuerdo con los avances en el conocimiento científico tanto sobre estos productos como sobre otras herramientas terapéuticas (Cañigual y col., 2003).

En los últimos años se ha incrementado de forma considerable el uso de las plantas medicinales para la elaboración de fitomedicamentos, lo que ha despertado gran interés por la calidad, incluyendo en este concepto a la inocuidad, la eficacia y la seguridad en las producciones. La calidad de los fitomedicamentos puede ser afectada por numerosos factores, esencialmente por la recolección de las especies silvestres que por lo general no brinda seguridad, pues en múltiples ocasiones se ha incurrido en el error de una incorrecta identificación de las especies vegetales. También suele ser problemática la contaminación con materias extrañas. En muchos casos no es posible asegurar la inocuidad del producto, por crecer muchas veces las poblaciones en áreas contaminadas con residuos químicos y de otros tipos, además de recolectarse de cualquier sitio, en disímiles estados de desarrollo, etc., lo que impide garantizar un producto con componentes activos que puedan ser normalizados farmacológicamente. Es solamente mediante el cultivo que, además de ser la mejor forma de suplir la necesidad de drogas vegetales con fines comerciales, se pueden evitar las posibilidades de identificación errónea, de adulteración y de variación en la composición química del material vegetal. Mediante esta práctica se reduce o elimina la incertidumbre sobre los beneficios terapéuticos y resulta ser el mejor camino para emprender el estudio y desarrollo de la producción y comercialización de hierbas curativas (Bandoni, 2002).

Por otra parte, se ha demostrado que muchas especies de uso medicinal tienen propiedades insecticidas y fungicidas para el control de plagas agrícolas. Esto refuerza la importancia de cultivar y manejar aquellas especies que tienen además de valor medicinal otras utilidades. El desarrollo de cultivos permite enfrentar diversas problemáticas, no sólo la mencionada anteriormente, sino también otros destinos con alta demanda como la industria de los condimentos, cosmética, perfumística, química orgánica fina, etc. (Stashenko y col., 2003).

Desde el momento mismo en que se desea implantar un cultivo, es necesario considerar que una planta o un conjunto de plantas no están aislados en su ambiente y que interactúan con una serie de factores que benefician o no su desarrollo. Uno de los primeros pasos en la aplicación de la agricultura ecológica es la utilización de ciertos criterios que permiten decidir si una planta es la más adecuada para determinado tipo de ambiente (Acosta de la Luz y col., 2006).

1.5 Antecedentes

1.5.1 Familia *Verbenaceae*

La familia *Verbenaceae* está constituida por alrededor de 100 géneros y 3000 especies, distribuidas en regiones tropicales y subtropicales; solamente un limitado número de especies están presentes en regiones templadas. Generalmente se encuentran en forma de arbustos, lianas y hierbas, algunas con espinas. Presentan hojas opuestas, sin estípulas. Poseen flores normalmente irregulares, bisexuales, racemosas o cimosas, axilares o terminales; el cáliz tiene unos 4-5 lóbulos, con el limbo algo bilabiado. El fruto es una drupa, o con menor frecuencia una cápsula o esquizocarpo. Sus semillas carecen de endosperma. Son especies vegetales de interés económico por sus usos diversos, siendo fuentes de aceites o frutos comestibles, ornamentales (ej. el género *Lantana*) que se emplean en jardinería, o son utilizadas para aplicaciones etnomédicas (Celis Melo, 2007).

Dentro de la familia *Verbenaceae*, el género *Lippia* posee 176 especies en América, más 40 en el Viejo Mundo, donde muchas de ellas son aromáticas y solamente cerca de 50 especies han sido analizadas químicamente (Ciccío y Ocampo, 2010).

1.5.2 *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown ex Britton & Wilson

En particular, *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown ex Britton & Wilson es una especie aromática y medicinal, nativa de América, utilizada en medicina popular. Es una planta arbustiva perenne, con hojas dispuestas en verticilos, ovadas o elípticas de borde dentado, nervaduras muy marcadas y con pecíolo corto, densamente pubescentes, de color verde en la cara adaxial y gris en la abaxial. Sus ramas decumbentes tienen la capacidad de enraizar cuando se ponen en contacto con el suelo (Figura 1).



Figura 1: Plantas de L. alba con tallos decumbentes. Fuente: propia

Esta planta posee inflorescencias axilares, pedunculadas, de flores hermafroditas, zigomorfas, con corola tubular de color rosado-violáceo, dispuestas en cabezuelas (Soraru y Bandoni, 1978; Villamil, 2010). La Figura 2 muestra una imagen de plantas cultivada en la Estación Experimental Julio Hirschhorn (FCAyF-UNLP), donde se aprecian dichas inflorescencias.



Figura 2: Planta de *L. alba* con inflorescencias axilares. Fuente: propia

La planta sintetiza aceites esenciales que se acumulan en los tricomas glandulares de sus hojas (Albes dos Santos y col., 2004) (Figura 3).

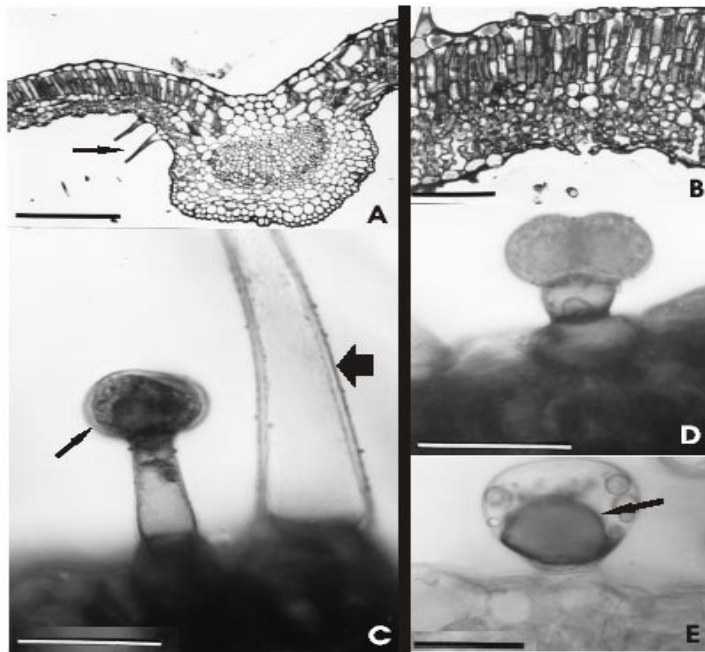


Figura 3: Micrografía de la hoja de *L. alba* donde se observa:
 A- nervadura central en corte transversal; B- limbo foliar en corte transversal; C- tricoma glandular (izq) y tricoma tector (der); D- tricoma glandular con cabeza bicelular; E- tricoma glandular con gotas de aceite.
 Fuente: Revista Ciência Agronômica, Vol. 35, N° 2, págs 377-383, 2004.

A nivel taxonómico, esta especie presenta más de 20 sinonimias y diversos nombres comunes, como consecuencia de sus características morfológicas diferentes (Villamil, 2010). Como ejemplo se citan los siguientes sinónimos:

_ <i>Lantana alba</i>	_ <i>Lippia crenata</i>
_ <i>Lantana geminata</i>	_ <i>Lippia geminata</i>
_ <i>Lantana lavandulacea</i>	_ <i>Lippia panamensis</i>
_ <i>Lantana habannensis</i>	_ <i>Verbena globiflora</i>
_ <i>Lantana mollisima</i>	_ <i>Verbena odorata</i>
_ <i>Lippia asperifolia</i>	_ <i>Zaponia globiflora</i>
_ <i>Lippia citrato</i>	_ <i>Zaponia odorata</i>

Existen distintos nombres comunes (vulgares o vernáculos) con los que se conoce a esta planta en muchos países. Por ejemplo, en Cuba se la llama “quita dolor”, “menta americana”, “anís de España”, “salvia americana”, “poleo”, “toronjil isleño”. En Guatemala recibe los nombres de “salvia santa”, “salvia sija”, “orozus”. En Costa Rica y Nicaragua se la conoce como “juanilama” o “mastranto”. En Honduras, se la denomina “juanilama”, “orégano de monte”, “salvia santa”. En Panamá, “oroazul” o “mastrento”. En México, “hierba del negro”, “mirto”, “sonora” o “mastranto”. En Jamaica, “*colie mint*”. En Colombia se conoce con el nombre de “pronto alivio”, “cidrón llanero”, o “quita dolor”. En Brasil “falsa melissa”, “erva cidreira”; en Venezuela “cidrón”; en Perú “pampa orégano” y en Argentina se la conoce como “salvia morada” (Villamil, 2010; Parra Garcés y col., 2010; Hennebelle y col., 2008; Ocampo Sanchez y col., 2007).

Su distribución biogeográfica abarca principalmente regiones tropicales y subtropicales, como los bosques secos de Centroamérica, las zonas húmedas del Caribe y de América del Sur, la región del Amazonas y ciertas zonas subtropicales secas de América del Norte y también del Cono Sur. Esto se relaciona con una gran variabilidad genética, que permite a la planta ocupar diversos hábitats naturales (Antolinez Delgado y Rodríguez López, 2008).

La presencia de biotipos contribuye a que la especie se adapte con mayor facilidad a las condiciones reinantes en cada sitio, variando a su vez el contenido de metabolitos secundarios (entre ellos los componentes de los aceites esenciales). Este fenómeno permite distinguir un número variable de quimiotipos (individuos de una misma especie que se diferencian entre sí en cuanto a que presentan distinta composición química de sus aceites esenciales).

En diferentes provincias de la Argentina se han identificado los siguientes quimiotipos: “cital y linalol” (Corrientes); “tagetenona” (Corrientes); “dihidrocarvona” (Santa Fe); “piperitona” (Entre Ríos y Tucumán); “lippiona” (Entre Ríos); “mirceno” (Corrientes) (Ciccio y Ocampo, 2010).

Esta especie, de la que existe poca información en relación con los biotipos, puede tener respuestas farmacológicas diferentes en fitoterapia, o en su uso como biocida o como repelente contra diversos organismos, debido a que en diversas regiones podrían estar utilizándose distintos quimiotipos.

Retamar (1982), menciona que en las investigaciones sobre los aceites esenciales y sus particularidades, referentes a las variaciones fitoquímicas en plantas silvestres y cultivadas, se ha observado que dentro de una misma especie botánica podían producirse cambios en la composición

química, aún en plantas localizadas a distancias cortas. Aparentemente las Verbenáceas tienen mucha tendencia a tales variaciones fitoquímicas, en particular la especie *Lippia alba*, no habiendo ninguna diferencia morfológica entre plantas de distinta procedencia que permita la admisión de una variedad botánica distinta (Guzmán y col., 2004).

En el caso de *L. alba*, la denominada “droga cruda” se recolecta a partir de poblaciones silvestres y es popularmente utilizada como medicinal en Argentina, Brasil, Cuba, Costa Rica, Colombia, Perú, Venezuela, entre otros países (Hennebelle y col., 2008).

Refiriéndose a plantas medicinales, el término “droga cruda” corresponde a los órganos vegetales o sus exudaciones naturales, molidos o no, en estado fresco o seco (Youngken, 1951). En el caso de esta especie, la droga cruda empleada son sus hojas e inflorescencias.

Como ha sido mencionado previamente, la gran mayoría de las hierbas nativas que se comercializan, entre ellas *L. alba*, son recolectadas de poblaciones silvestres, sin control de la calidad y sin tener en cuenta la sustentabilidad del recurso. Existe una marcada tendencia mundial hacia una mayor proporción de material cultivado, por lo tanto, las poblaciones silvestres pueden llevarse a cultivo a través de procesos de domesticación, resultando probablemente en un aumento de producción por unidad de superficie, mayor rentabilidad y calidad uniforme de la droga cruda. El cultivo permite el aprovechamiento en diferentes ambientes, con técnicas específicas y recomendadas para cada especie, permitiendo preservar los recursos vegetales, especialmente en el caso de especies en riesgo de extinción. Asimismo, el mercado a gran escala, las compañías farmacéuticas y herbarias prefieren material cultivado, dado que éste puede ser tipificado y certificado (Villamil, 2010).

1.5.3 Cultivo

Con respecto a la adaptación de *L. alba* al cultivo, se han informado resultados de ensayos en cultivos experimentales en Brasil (Pauletti, 2010), Costa Rica (Ocampo Sánchez y Valverde, 2000), Uruguay (Davis, 2004) y Colombia (Guzmán y col., 2004).

En ensayos realizados en Centroamérica se encontró que la semilla tiene un muy bajo porcentaje de germinación, debido al pequeño tamaño del embrión, por lo que únicamente se podría emplear en trabajos de mejoramiento. Por tal motivo se recomienda la propagación asexual (Ocampo Sánchez y col., 2007).

Estudios llevados a cabo en Cuba, demuestran que el cultivo de *L. alba* puede iniciarse a partir de estacas que enraízan con facilidad en suelo húmedo; la cosecha se realizó en este caso a los 5-6 meses obteniéndose rendimientos de 900-1200 kg de materia seca por hectárea (Ocampo Sánchez y Valverde, 2000). En trabajos realizados en la Universidad Nacional de Colombia (Hernández y col., 2004), se evaluó el efecto de la fertilización nitrogenada en la producción de biomasa y de aceite esencial en dos momentos de corte.

Si bien existen algunas experiencias en fertilización nitrogenada en otros países, no se mencionan técnicas de plantación ni se relaciona el momento de corte con las etapas fenológicas de esta especie; tampoco hay registros del rendimiento de aceite esencial. En nuestro país, los antecedentes al respecto son escasos y la información disponible no se encuentra sistematizada.

El aceite esencial de *L. alba* posee gran potencial como insumo para las industrias de aromas y fragancias, recomendándose su normalización para facilitar su utilización y favorecer su mercado (Dellacassa, 2010).

Tal como se mencionó anteriormente, la amplia distribución biogeográfica de *L. alba* en Latinoamérica ha permitido la aparición de varios quimiotipos, factor que influye marcadamente en la diversificación de las posibilidades de uso.

Cabe aclarar que hay una sola inscripción de *Lippia* en el mundo bajo el modo de patente: United States Patent PP13-110 (Kumar y col., 2002). La misma describe un mutante de *L. alba* llamado “Bhurakshak”, caracterizado por un nuevo aroma del aceite esencial cuyos componentes mayoritarios son: 7,2% de 1,8-cineol; 42,3% de linalol; 12,9% de neral y 14,2% de geranial, dentro de los principales terpenoides. En forma concomitante, no hay ninguna inscripción de cultivares en los registros de Propiedad de Cultivares en el mundo, documentados en la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV) (Villamil, 2010).

La cantidad de informes sobre la potencialidad de esta especie como medicinal, biocida y como materia prima para la industria perfumística genera la necesidad de contar con información sobre la factibilidad y posibilidad de su cultivo en zonas templadas de nuestro país. Ya ha sido señalado que la información disponible al respecto es reducida y no hay recomendaciones de manejo agronómico que posibiliten implantar cultivos comerciales a nivel local.

1.5.4 Calidad de la droga vegetal

El concepto de calidad abarca varias definiciones, pero se puede decir que es la aptitud para satisfacer una necesidad o deseo definido. Cada individuo cuenta con criterios propios de calidad o aceptabilidad para cada producto destinado a un determinado fin, e incluso los atributos deseados pueden variar según el contexto. En este caso, la calidad se puede determinar a través de parámetros como: sabor, olor y color, los cuales definen la calidad organoléptica del material vegetal. También se deben tener en cuenta otros como la genuinidad, que asegura la identificación botánica del material vegetal y comprende los ensayos macroscópicos y microscópicos de las drogas vegetales. Según si la especie se destine a infusiones o alimento, existen determinados límites máximos de carga microbiana y micotoxinas, fijados por la legislación vigente en cada país; lo mismo ocurre con la presencia de metales en trazas, provenientes del uso de agroquímicos (Cerimele y Ringuet, 2010).

La necesidad de garantizar la calidad de las hierbas medicinales surge de manera imperiosa, debido al gran incremento en los últimos tiempos de su expendio en herboristerías y en farmacias, no sólo de la Argentina sino también en el mercado herboristero internacional. Se ha verificado, lamentablemente, un aumento en la frecuencia de adulteraciones, falsificaciones y sustituciones. Ello exige un mayor número de controles de calidad de muestras comerciales en sus aspectos sanitarios (ausencia de material extraño orgánico e inorgánico) y fundamentalmente, en sus aspectos botánicos (Luján y Barboza, 2008).

En el caso de la especie motivo del presente trabajo, *Lippia alba*, al no estar incluida en la Farmacopea Argentina, sería importante evaluar los parámetros de calidad, para poder conocer los límites correspondientes, con la intención de que pueda ser incorporada en el futuro.

1.5.4.1 Humedad

Las hierbas aromáticas y medicinales se comercializan secas, entre otros motivos para favorecer su conservación.

El contenido de humedad de las materias vegetales medicinales preparadas para su uso en forma seca debe mantenerse lo más bajo posible, para reducir el deterioro ocasionado por mohos y otros microorganismos. Puede existir información sobre el contenido de humedad adecuado para determinadas materias vegetales medicinales en farmacopeas u otras monografías fidedignas (OMS, 2003).

En la etapa de envasado y comercialización la mayoría de las hierbas deben mantener un contenido de humedad de alrededor del 10 al 12%, ya que si éste es mayor, junto con la disponibilidad de nutrientes, temperatura y luz puede favorecer la reproducción y crecimiento de las colonias de hongos y bacterias indeseables (Cerimele y Ringuet, 2010). Por este motivo, es fundamental la determinación de humedad de la droga cruda, que se define como la cantidad de agua contenida en el material.

1.5.4.2. Cenizas

La determinación de cenizas representa el contenido en sales minerales o en materia inorgánica de la droga vegetal. El proceso consiste en determinar la cantidad de residuo no volátil después de la calcinación de la droga (Sharapin, 2000).

La ceniza resultante de la incineración del material vegetal puede ser fisiológica, si proviene de los componentes minerales de la propia planta o derivada de materia extraña, principalmente restos de tierra, adherida a la superficie de la droga. El contenido de cenizas es importante, ya que indica si la droga vegetal ha sido debidamente acondicionada (Vidaurre Martínez y col., 2007).

1.5.4.3. Color

El color es una de las características externas más importantes para evaluar la calidad de productos vegetales frescos y procesados. Por esto, determinar los cambios que se generan como resultado del procesamiento, almacenamiento y vida poscosecha del producto resulta de suma utilidad, ya que el color es uno de los principales factores que inciden en la decisión de compra por parte del consumidor (Duque y col., 2007).

La evaluación del color puede ser subjetiva u objetiva. En el primer caso depende del ojo humano y es una manera rápida y sencilla de determinarlo, donde se utilizan cartas de color como referencia; sin embargo la desventaja reside en que los resultados pueden variar debido a diferencias de percepción y errores humanos. En el segundo caso, se utiliza un colorímetro que provee un valor específico, basado en la luz reflejada por la superficie del producto; siendo menor la variabilidad

que en la apreciación subjetiva. La desventaja radica en la lentitud del proceso y el costo elevado de los equipos (Mitcham y col., 1996)

1.5.5. Usos y actividades farmacológicas descritas para *Lippia alba*

En Latinoamérica se mencionan distintas propiedades medicinales de esta especie. La parte empleada de la planta, como se mencionó previamente, son las hojas e inflorescencias, usadas en infusión como antiespasmódico (De Abreu Matos y col., 1996), digestivo y sedante (Amat y Yajía, 1998), como hipoglucemiante, analgésico y emenagogo (Duque Villegas, 2003), para tratar enfermedades renales (Alonso y Desmarchelier, 2005) y respiratorias (Pascual y col., 2001a). También se mencionan usos como hipotensor (Guerrero y col., 2002), antiinflamatorio (Haldar y col., 2012), para el tratamiento de dolores estomacales (Bandoni y col., 1972), de enfermedades hepáticas (Di Stasi y col., 1994) y la sífilis (Zamora-Martínez y Nieto de Pascual, 1992).

En ciertos mercados de Centroamérica, se vende en saquitos para infusión y como parte de algunos productos para el tratamiento de resfríos y el reumatismo (Ciccio y Ocampo, 2004). Además, como en la mayor parte de las esencias, se ha descrito que la de *Lippia alba* posee efecto antibacteriano (Nogueira y col., 2007; Veras y col., 2011), antifúngico (Montiel y col., 2007; Oliveira y col., 2014), y antioxidante (Stashenko, 2004). Por otra parte, se han reportado trabajos en los que el aceite esencial muestra actividad biológica como repelente de insectos (Ringuelet y col., 2005; Vera y col., 2014).

En algunas regiones de la Argentina la *Lippia alba*, conocida como “salvia morada”, se prepara en infusión de 6-12 gramos de hojas por día o en forma de tintura con 200 gramos de hojas secas en etanol al 70%. También se emplea la decocción de 12-20 gramos de hojas frescas por litro por día como antiespasmódico en humanos (Alonso y Desmarchelier, 2005). Además se conocen otros usos medicinales como antitusivo, descongestivo, para el dolor de garganta y dolor de cabeza (Scarpa, 2004).

En Uruguay es citado el uso de la infusión a razón de 20 gramos de hojas por litro de agua como estomacal y contra catarros; el cocimiento o decocción de 40 gramos en un litro de agua es aplicado en compresas contra las hemorroides (Davies, 2004).

Existen antecedentes de que el aceite esencial de dos quimiotipos de *Lippia alba* ricos en citral y carvona, producen efecto analgésico en el test de las contorsiones por ácido acético en ratones y efecto antiinflamatorio en el edema de carragenina en la pata de rata, con diferencias en la potencia a favor del primero (Viana y col., 1998). También se encontró actividad ansiolítica en tres quimiotipos de *Lippia* (Vale y col., 1999) y el efecto anticonvulsivante de los principales componentes del aceite esencial (Viana y col., 2000). Además, se comprobó que una infusión de *Lippia alba* previno la ulceración gástrica inducida por indometacina en ratas (Pascual y col., 2001b). Más recientemente, al extracto hidroalcohólico del quimiotipo geranial + carvenona se le atribuyó efecto en reducir la frecuencia e intensidad del dolor en pacientes con migraña (Conde y col., 2011).

1.6. Objetivos de la tesis

Los objetivos del presente trabajo de tesis de Maestría fueron:

- a) Evaluar el comportamiento de plantas cultivadas pertenecientes a cuatro quimiotipos de *Lippia alba* (carvona, dihidrocarvona, citral y linalol) ante la implementación de distintas técnicas de manejo agronómico (distancia de plantación, épocas de corte y cantidad de cortes al año) y analizar su incidencia sobre el rendimiento de hoja (materia seca) y la calidad de la droga cruda obtenida.
- b) Cuantificar el rendimiento de aceites esenciales obtenidos y su relación con las técnicas de manejo empleadas y determinar la composición de los aceites esenciales efectuada mediante el análisis cromatográfico.
- c) Evaluar la calidad de la droga cruda a partir de la cuantificación del contenido de humedad, cenizas totales y cenizas insolubles en ácido, y del color superficial de las muestras.
- d) Evaluar farmacológicamente el uso tradicional de *Lippia alba* por su efecto en el tracto gastrointestinal, y comparar los efectos de los aceites esenciales de los cuatro quimiotipos: citral, linalol, carvona y dihidrocarvona.

2. Materiales y métodos

2.1. Cultivo

El cultivo se realizó en la Estación Experimental Julio A. Hirschhorn de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina; ubicada en 34° 58' latitud Sur y 57° 54' longitud Oeste. La precipitación media anual en la zona es de 1092 mm, con un período libre de heladas comprendido entre los meses octubre-abril. El lote donde se realizó la implantación corresponde a un suelo Argiudol Típico, con textura franco-arcillo-limosa a franca. La Tabla 1 muestra información sobre las condiciones climáticas durante el período que duraron los ensayos.

Tabla 1: Información climática durante la etapa del cultivo. Estación Experimental Ing. Agr. Julio Hirschhorn. UNLP. 2012-2013.

Mes-Año	Temperatura media (°C)	Humedad relativa (%)	Precipitación (mm)	Radiación solar (Watt/m ²)	Evapotranspiración potencial (mm)
Sep-12	13,6	88	52,4	3333,7	69,8
Oct-12	16,6	90	192	3594,5	79,1
Nov-12	20,1	82	41,2	5191,5	120,2
Dic-12	22,6	84	143,6	5641,0	137,0
Ene-13	22,8	75	43	5913,3	153,0
Feb-13	22	74	121,9	5321,5	123,0
Mar-13	17,5	81	107,4	4059,4	93,2
Abr-13	16,6	85	307	3187,6	66,5
May-13	12,9	88	101,2	2086,3	42,9
Jun-13	10	84	10,4	1936,7	37,7
Jul-13	9,8	87	46	1860,4	37,7
Ago-13	10	73	7,2	2990,5	68,5
Sep-13	11,9	84	150,8	2967,0	64,2
Oct-13	16,1	83	28,8	4262,7	96,4
Nov-13	18,9	83	140,6	4775,0	112,5
Dic-13	24,2	71	30,3	6052,4	161,5
Ene-14	23,6	77	197	5383,7	153,0
Feb-14	21	89	145,4	3614,5	123,0

Fuente: Estación Experimental Ing. Agr. Julio Hirschhorn, área Agrometeorología.

Se eligió un lote elevado proveniente de campo natural, en el cual se realizó una labranza con rastra de discos tres meses previos a la plantación, para tener un buen barbecho del terreno que permita la acumulación de humedad y el control de malezas. A continuación, se realizó la preparación de surcos alomados separados a 0,70 metros.

La plantación se inició en la segunda quincena de septiembre de 2012, en una parcela de 18 m por 11 m.

Se utilizó el sistema de multiplicación asexual por estacas, según la metodología aplicada en ensayos realizados en Costa Rica (Ocampo y Valverde, 2000; Ocampo y col., 2007).

Se seleccionaron plantas madres disponibles, correspondientes a cuatro quimiotipos (citrál y dihidrocarvona de origen nacional, linalol de origen uruguayo y carvona de origen peruano). Ejemplares de los mismos se depositaron en el herbario del Jardín Botánico Carlos Spegazzini (UNLP) con los siguientes números:

- _ *Lippia alba linalol*. Voucher N° 3121 LPAG
- _ *Lippia alba dihidrocarvona*. Voucher N° 3120 LPAG
- _ *Lippia alba citral*. Voucher N° 3448 LPAG
- _ *Lippia alba carvona*. Voucher N° 3123 LPAG

Se extrajeron estacas de 25-30 cm de largo y se quitaron las hojas de la parte basal, dejando algunas hojas y yemas en la parte superior.

Se procedió a la plantación en surcos separados a 0,70 m. La distancia de plantación dentro del surco se definió en base a los resultados obtenidos en regiones de clima tropical, donde se ha implantado la especie, utilizando distancias variables (Ocampo, 2007; Guzmán Rivera y col., 2004). Para evaluar el efecto de la distancia de plantación sobre el rendimiento de biomasa, se implantaron parcelas de cada quimiotipo; sobre ellas se ubicaron estacas distanciadas a 0,30 m, a 0,60 m y a 0,90 m entre plantas dentro de la línea. Entre los distintos quimiotipos se implantó una especie distinta (*Cymbopogon citratus*) a modo de barrera física para mantener separadas las plantas de los distintos quimiotipos de *Lippia* y facilitar su manejo.

Finalizada la plantación, se realizó un riego de toda la parcela, asegurando el contenido de humedad del suelo necesario para facilitar el enraizamiento de las estacas.

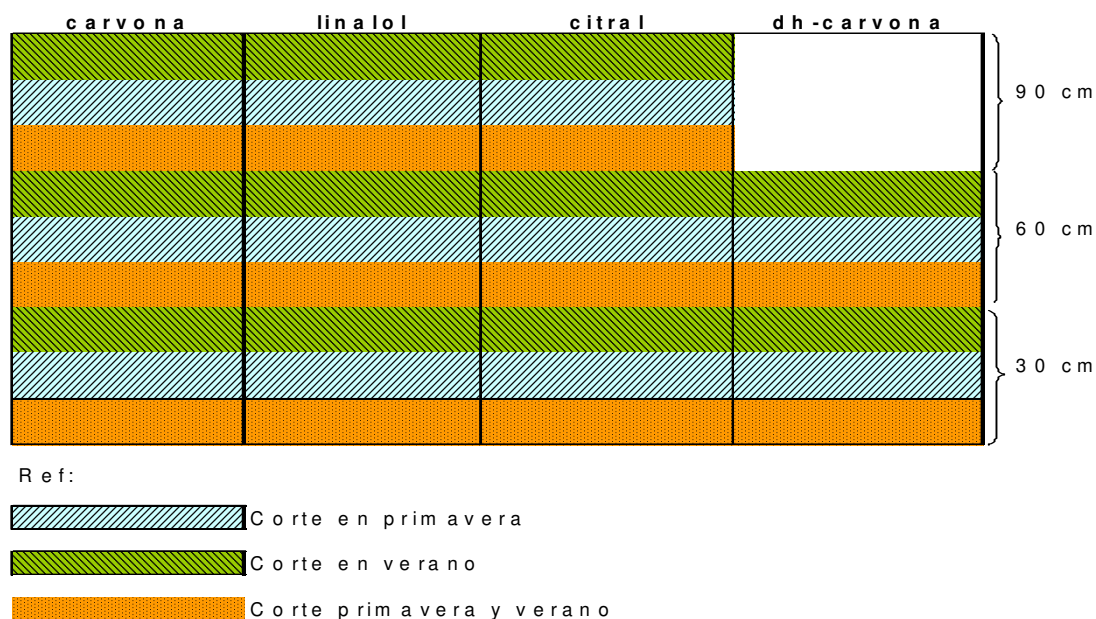
Posteriormente, se registraron varias precipitaciones, por lo que no fueron necesarios riegos adicionales. Se realizó una aplicación de herbicida prometrina (marca comercial PROMETREX) en dosis de 3 L/ha. El herbicida se aplicó en el entresurco con el objeto de controlar semillas y emergencia de malezas. Luego de 60 días de la aplicación, se realizaron carpidas manuales en forma periódica.

A los dos meses y medio de la plantación (fines de diciembre 2012) se inició la cosecha, cuando las plantas se encontraban en plena floración, tal como indican otras experiencias (Ocampo y col., 2007; Pimenta y col., 2007). La misma se hizo en forma manual, en horas de la mañana cuando había desaparecido el rocío, teniendo la precaución de dejar 15 a 20 cm o dos a tres nudos por encima de la superficie del suelo, para permitir el rebrote de la planta, según se indicó en experiencias previas (Ocampo y col., 2007).

Con el objetivo de evaluar la influencia de la época y la cantidad de cortes sobre el rendimiento de biomasa, se procedió según la metodología empleada en ensayos previos con otras especies (Ringuelet y col., 1996).

Se dispusieron 3 parcelas para cada quimiotipo y cada una de ellas se separó en 3 subparcelas de 1,40 m x 3 m; salvo para el quimiotipo dihidrocarvona que se plantaron 2 parcelas por falta de material. Una subparcela se cosechó al final de la primavera (diciembre de 2012) del primer año y al final de la primavera del segundo año (diciembre de 2013). Otra subparcela se cosechó al final de la primavera del 1° año (diciembre) y se hizo un segundo corte a los tres meses, al final del verano (marzo) correspondiente al rebrote; esta práctica se repitió durante los dos años

que llevó el ensayo. De la misma forma, la tercer subparcela se cosechó solamente al final del verano del 1° año (marzo de 2013) y al final del verano del 2° año (marzo de 2014) (Figura 4).



Nota: Se indican a la derecha del croquis las distancias de plantación ensayadas en cada parcela, y en la parte superior los quimiotipos de *L. alba* implantados en las mismas.

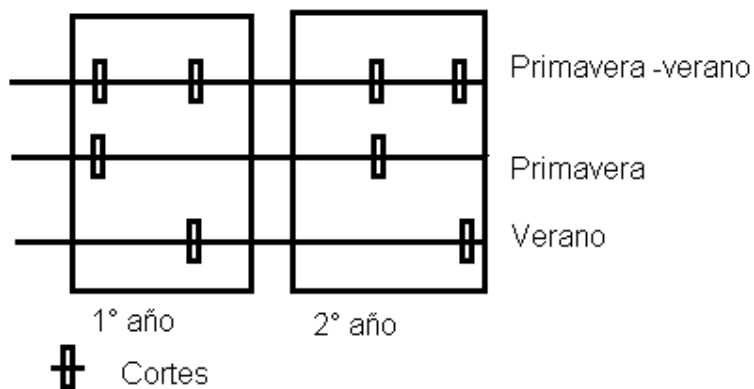


Figura 4: Croquis del ensayo de campo. Fuente: propia

Cada corte corresponde a una superficie cosechada de 4,20 m². Se cosechó la parte aérea de la planta y se midió el peso fresco. Para ello se utilizó una balanza monoplato de 15 kg de capacidad.

El material se dejó orear a temperatura ambiente, con corriente de aire natural, colocándolo en forma extendida sobre estantes, con el objetivo de facilitar la circulación de aire sobre el mismo. Transcurrida una semana, y habiéndose secado la totalidad del material (hasta peso constante), se

pesaron por separado los tallos y las hojas, obteniéndose de esta forma, el valor de materia seca de hojas y tallos.

Análisis estadístico:

El parámetro de rendimiento “materia seca de hoja” fue comparado considerando dos variables: la “distancia de plantación” y la “época de recolección (o secuencia)”. Se aplicó un ANOVA de 2 vías para evaluar la influencia de dichas variables en cada quimiotipo.

Para evaluar el efecto de uno o dos cortes por temporada sobre el rendimiento, se aplicó otro ANOVA de 2 vías. En los resultados se muestran los parámetros estadísticos correspondientes. En todos los tests fue considerado un nivel de significancia de $p < 0,05$.

2.2 Extracción y análisis de los aceites esenciales

Con las hojas y flores de los quimiotipos ensayados, se realizó una hidrodestilación, utilizando un equipo de vidrio tipo Clevenger, compuesto por una trampa tipo Dean-Stark para aceites esenciales de menor densidad que el agua (Figura 5).

Se destilaron por separado muestras de la cosecha de fin de primavera y fin de verano de los cuatro quimiotipos, durante 2 horas, hasta agotar completamente el material. Una vez obtenido el aceite esencial, se agregó Na_2SO_4 anhidro para eliminar trazas de agua, y se almacenó en frascos de vidrio color caramelo a 5°C para evitar su alteración.

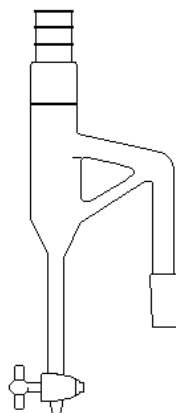


Figura 5: Trampa Dean Stark. Fuente: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/119ssa14.html>

Cálculo de Rendimiento de esencia:

$$\text{Rendimiento (\%)} = (\text{mL de esencia} / \text{g material vegetal seco destilado}) \times 100$$

Medición de la densidad de las esencias:

Para determinar la densidad del aceite esencial se utilizó un picnómetro, según lo establecido en Métodos Generales de Análisis de la Farmacopea (Farmacopea Argentina 7^a Ed., 2003).

Análisis cromatográfico de los aceites esenciales:

Los análisis de los aceites esenciales se llevaron a cabo en la cátedra de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA), por GC-FID-MS, utilizando un equipo Hewlett Packard 7890A equipado con un inyector (relación de separación 1:100) conectado por un divisor de flujo a dos columnas capilares (HPWAX y HP1 respectivamente, ambas de 60 m x 0,25 mm con 0,25 μ m de fase fija). La columna polar estaba conectada a un FID (Flame Ionization Detector), mientras que la columna no polar estaba conectada a un detector de masas cuadrupolar (HP 5975 C) (70 eV). Las condiciones de operación fueron: gas portador: He (1,8 mL/min); temperatura del inyector: 250 °C; volumen de inyección: 0,3 μ L. La temperatura de columna fue programada según el siguiente gradiente: 100°C, aumentando gradualmente 2°C hasta 240°C y se mantuvo constante por 15 minutos. La temperatura del FID fue 260°C, y las temperaturas para la línea de transferencia y la fuente iónica fueron fijadas a 280 y 230 °C, respectivamente. El rango de masas (m/z) fue 40-500 Da.

Los componentes se identificaron mediante el análisis de los índices de retención lineal (en relación con C8-C24 n-alcenos) obtenidos en ambas columnas y comparados con los compuestos de referencia. Además, cada espectro de masa obtenido fue comparado con los de la bibliografía (Adams, 2007; Wiley/NIST, 2008; Babushok y col., 2011) y con los espectros de masa obtenidos a partir de compuestos de referencia. Los porcentajes relativos de contribución de los compuestos fueron calculados desde la respuesta del FID mediante integración computarizada, suponiendo que todos los factores de respuesta eran 1.

2.3 Control de calidad de la droga vegetal

Contenido de humedad:

Para la determinación de humedad de la droga cruda se utilizó el método de destilación azeotrópica de Sterling Bidwell, estandarizado según norma IRAM 18982.

El método se basa en la destilación por arrastre con vapor de tolueno, del agua contenida en la muestra de un producto dado, y recolectada en una trampa graduada.

El aparato consta de un balón de 500 mL, una trampa graduada y un refrigerante de bolas, todos ellos con uniones esmeriladas (Figura 6).

Se pesó exactamente una cantidad de muestra (20 g) y se colocó en el balón, luego se agregó tolueno hasta cubrir la muestra y se llenó la trampa con el solvente hasta que desbordó hacia el balón. Una vez armado el equipo, se calentó el balón de manera de obtener una velocidad de destilación de 100 gotas por minuto; cuando la mayor parte del agua fue destilada, se aumentó la

velocidad de destilación a alrededor de 200 gotas por minuto y se continuó hasta que no se recolectó más agua. Por último, se dejó separar la fase acuosa del solvente y se leyó el volumen de agua. Los resultados se expresaron en gramos de agua por 100 g de muestra.



Figura 6: Equipo Sterling Bidwell. Fuente: propia

Color superficial:

Las mediciones de color se realizaron sobre muestras de droga seca de cada uno de los cuatro quimiotipos, empleando un colorímetro de superficie Konica Minolta CR 400 (Osaka, Japón) (área de medición: 8 mm de diámetro), calibrado con un plato estándar blanco (Figura 7). El equipo permite describir el color de la muestra a través de un sistema de coordenadas; siendo L^* la luminosidad, que varía desde el blanco (100) al negro (0); a^* corresponde al eje rojo-verde y b^* al eje amarillo-azul; el centro es el gris (Figura 8). El ángulo de color hue ($h^\circ = \tan^{-1}(b^*/a^*)$) determina la localización alrededor de la circunferencia y corresponde al tinte básico del color; el croma ($C = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$) o saturación, es la distancia a partir del centro. Se realizaron 39 mediciones de color para cada uno de los quimiotipos evaluados y se informan las medias \pm ESM correspondientes.

Los resultados se sometieron al análisis de la varianza (ANOVA), utilizando el programa Statgraphics Plus versión 4.0.



Figura 7: colorímetro de superficie Konica Minolta CR 400. Fuente: CIDCA (UNLP)

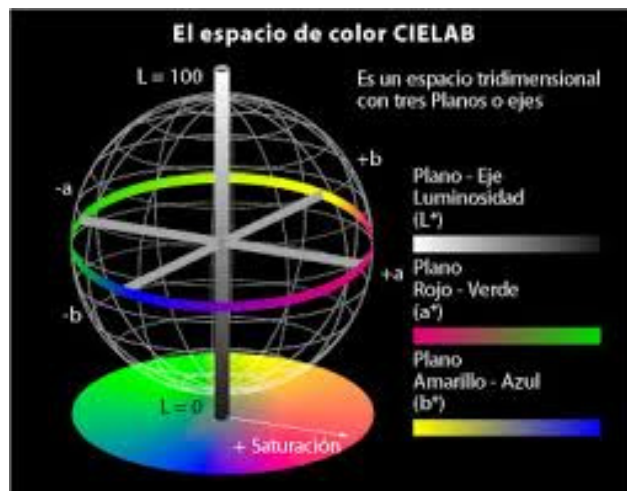


Figura 8: Representación del espacio de color según la escala CIE L^* , a^* , b^* . Fuente: [http://www.gusgsm.com/espacio color cie lab](http://www.gusgsm.com/espacio%20color%20cie%20lab)

Cuantificación de cenizas totales y cenizas insolubles en ácido:

Para la determinación de cenizas totales se pesó exactamente una cantidad de droga vegetal seca y molida, que pase por un tamiz N° 20; luego se colocó en cápsula de porcelana previamente tarada y se calcinó en mufla a 550 °C hasta eliminación del residuo carbonoso. Por último, por diferencia de peso, se obtuvo el peso de las cenizas y se calculó el porcentaje de cenizas totales. El análisis se realizó para cada quimiotipo por triplicado.

Luego se llevó a cabo la determinación de cenizas insolubles en ácido. Para ello, a las cenizas obtenidas mediante el procedimiento anterior se les agregó 25 mL de ácido clorhídrico 3M y se llevó a ebullición durante 5 minutos; el residuo obtenido se filtró a través de papel de filtro Whatman y se lavó con agua destilada hasta eliminar cloruros. Luego se colocó el papel con el residuo en crisol previamente tarado y se calcinó nuevamente en la mufla. Por último, se determinó el porcentaje de cenizas insolubles en ácido (Farmacopea Argentina 7^a Ed., 2003).

2.4 Estudios farmacológicos: determinación de la actividad antiespasmódica intestinal del aceite esencial

Estos estudios tuvieron como objetivo validar el uso tradicional del aceite esencial de *Lippia alba* desde un enfoque científico farmacológico, a los efectos de reconocer si posee efecto antiespasmódico intestinal. Como se explicó en la Sección “Introducción”, gran parte de las plantas medicinales de nuestra región se usan en fitoterapia por tradición, pero sus efectos no están validados científicamente. En segundo lugar, se pretendió estudiar si el aceite esencial proveniente de los cuatro diferentes quimiotipos presentaba similares propiedades farmacológicas a nivel cuantitativo (concentración inhibitoria al 50% de la contracción provocada por estímulo colinérgico). Este punto podría influenciar en la dosificación de los diferentes quimiotipos.

El fundamento del método farmacológico empleado reside en que permite evaluar los efectos del aceite esencial en diferentes concentraciones sobre las curvas concentración-efecto de acetilcolina (Ach), por ser éste el neurotransmisor del sistema parasimpático que controla la actividad peristáltica intestinal y puede causar espasmos dolorosos. La utilización de un método “ex vivo” con porciones de intestino aislados en una cuba con solución Tyrode (de composición similar al fluido que rodea al intestino) permite obtener una curva concentración-efecto repetible (Ragone y col., 2007; Consolini y col., 2011). Esto es debido a que permite medir exactamente la concentración agregada y el efecto logrado, condiciones ideales para comparar actividades farmacológicas de los diversos tratamientos sin influencias de otras variables que participan “in vivo” (Kenakin, 1984). Así, es posible evaluar adecuadamente el mecanismo de acción de los componentes del aceite esencial frente a la contracción intestinal (modelo de espasmo) y comparar las potencias de los cuatro quimiotipos a través de las concentraciones inhibitorias al 50% (CI50). Estos métodos son ampliamente utilizados en el campo farmacológico.

Animales:

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley de 200-250 g, mantenidas en el bioterio de la cátedra de Farmacología de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP), sometidas a 12 horas de ayuno y agua *ad*

libitum, antes del experimento. Los animales fueron anestesiados con sobredosis de pentobarbital, y luego fueron sacrificados por apertura de tórax y abdomen.

Se aislaron trozos de íleon y duodeno de aproximadamente 2 cm de largo, colocándolos en cubas de doble camisa termostalizadas a 37° C, que contenían 20 mL de solución Tyrode y burbujeo constante de aire, determinándose un pH 8,2. Los preparados fueron estabilizados durante al menos 45 minutos a 1g de precarga.

Los tejidos fueron conectados a un transductor isométrico WPI (USA). Se registró la tensión desarrollada por los trozos de íleon mediante transductores de fuerza isométricos acoplados a un preamplificador TBM-4M (WPI, USA), con detección mediante el programa de adquisición Eagle (USA).

Soluciones y drogas:

Las soluciones empleadas en tejidos intestinales tenían la siguiente composición (en mmol/L):

- Tyrode (Tyr): 150 NaCl, 2,7 KCl, 2 MgCl₂, 12 NaHCO₃, 0,4 PO₄H₂Na, 1,8 CaCl₂.
- Tyrode-0Ca: por eliminación de CaCl₂.
- Tyrode-0Ca-40 mmol/L K⁺ por adición de 0,6 mL KCl 10% a 20 mL de Tyrode 0Ca.

Las soluciones fueron burbujeadas con aire en las cubas, alcanzando un pH de 8,2 que es cercano al del medio intestinal.

Las drogas empleadas en los protocolos biológicos fueron: Acetilcolina bromhidrato (Ach, Sigma, USA), clorhidrato del éster metílico de N^o nitro-L-arginina (L-NAME, Sigma, USA), verapamil (Sigma, USA). Ach y verapamil fueron disueltos en agua, el aceite esencial y L-NAME fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) y luego diluidos en agua a diferentes soluciones madre, antes de agregar a la solución Tyrode.

Curvas concentración-respuesta (CCR) de acetilcolina (Ach):

Se realizaron CCR en los trozos de duodeno e íleon de rata luego de 45 minutos en Tyrode, al menos dos repeticiones hasta la estabilización.

Ensayos previos en el laboratorio demostraron que las CCR de ambas porciones de intestino, duodeno e íleon, no fueron significativamente diferentes. Las concentraciones de Ach fueron agregadas a la cuba en forma acumulativa (para alcanzar concentraciones desde 0,01 a 10 µg/mL) en ausencia (control inicial) y presencia de una única concentración (creciente en las sucesivas CCR) del aceite esencial. En algunos protocolos también se incluyó 30 µmol/L de L-NAME 5 minutos antes del aceite esencial. Las drogas y/o el aceite esencial permanecieron en la solución durante toda la CCR. Luego de alcanzado el efecto de contracción máxima en cada CCR, se lavaron los preparados reemplazando 3 veces el medio por Tyrode.

Se agregaron varias concentraciones de aceite esencial, en orden creciente de concentración para realizar la CCR en cada cuba de órgano. Como control positivo se hizo CCR de Ach en

ausencia y presencia de verapamil, un conocido bloqueante de los canales de Ca^{+2} . También se hicieron las respectivas CCR de Ach en presencia de DMSO, como control negativo del vehículo.

Curvas concentración-respuesta (CCR) de cloruro de calcio (CaCl_2):

Luego de la estabilización durante 45 minutos en Tyrode, el Ca^{+2} externo fue eliminado, cambiando a solución Tyrode-0Ca, y luego el músculo fue despolarizado con Tyrode-0Ca-40 mmol/L K^+ . La CCR de Ca^{+2} fue obtenida de forma acumulativa, agregando CaCl_2 para alcanzar concentraciones desde 0,0195 a 17,5 mmol/L, en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de aceite esencial.

Cada concentración de aceite esencial fue agregada 5 minutos antes de la despolarización con alto K^+ en Tyrode-0Ca y permaneció en la cuba durante ella.

Como control positivo, se hizo una CCR-Ca en ausencia y presencia de verapamil, conocido bloqueante de los canales de Ca^{+2} .

Cuantificación farmacológica:

A partir de la CCR de Ach y Ca se calculó el pD_2 del agonista (como $-\log \text{EC}_{50}$, en mol/L, donde EC_{50} corresponde a la concentración efectiva al 50%).

Para el antagonista puro no competitivo (verapamil) se calculó la afinidad (pD'_2 o $\text{pK}_{B'}$) como sigue:

$$\text{pD}'_2 \text{ o } \text{pK}_{B'} = -\log [B'] + \log [(E_A - E_{AB'_{\max}})/(E_A - E_{AB'}) - 1]$$

Donde B' es la concentración del antagonista no competitivo (en moles/Litro), y E_A , $E_{AB'}$ y $E_{AB'_{\max}}$ son los máximos efectos del agonista no competitivo en ausencia (A) y en presencia del antagonista (B') respectivamente y en la máxima concentración de él (B'_{\max}) (Van der Brink, 1977; Kenakin, 1984).

Para el aceite esencial, que es una mezcla de compuestos, no puede calcularse el $\text{pK}_{B'}$. Por lo tanto, se calculó la concentración inhibitoria al 50% (IC_{50}) por extrapolación de la curva de inhibición. Ésta se calcula a partir de cada CCR graficando los efectos obtenidos a una única concentración de agonista (correspondiente al máximo efecto) en función de la concentración del antagonista (aceite esencial o verapamil). La concentración del aceite esencial se expresó inicialmente como μL de aceite esencial por mL de solución Tyrode y este valor fue convertido a μg de aceite esencial por mL, teniendo en cuenta la densidad del aceite esencial.

Análisis estadístico:

Todos los resultados están expresados como las medias \pm ESM. El análisis estadístico de los parámetros de las CCR fue hecho utilizando el programa Graph Pad Prisma 4.0. Se aplicaron análisis ANOVA de dos vías para comparaciones múltiples entre las CCR (variables: concentración de esencia y \log [agonista]) seguido de “tests *a posteriori*” de Bonferroni entre los efectos

obtenidos a cada concentración de agonista, en presencia y ausencia (control) de la respectiva concentración de esencia. Para comparaciones múltiples de parámetros (pD₂, CI₅₀) de las diversas esencias se aplicó un ANOVA de una vía seguido de los “tests *a posteriori*” de Tukey. Para la comparación de dos muestras con resultados pareados se utilizó el test t. En todos los test fue considerado un nivel de significancia de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Aspectos agronómicos del cultivo

La Figura 9 muestra un sector de las parcelas implantadas en la Estación Experimental Julio Hirschhorn (FCAyF-UNLP).



Figura 9: Diferentes quimiotipos de *L. alba* separados por lemongrass, como barrera física. Fuente: Propia

Transcurrido un mes desde la plantación se registró la brotación del 90% de las estacas implantadas. A los dos meses siguientes a la plantación (noviembre) se registró la floración de 3 quimiotipos (linalol, citral y dihidrocarvona), no así la del quimiotipo carvona, el cual aún no había alcanzado esta etapa. En el mes de diciembre, los cuatro quimiotipos se encontraban en plena floración.

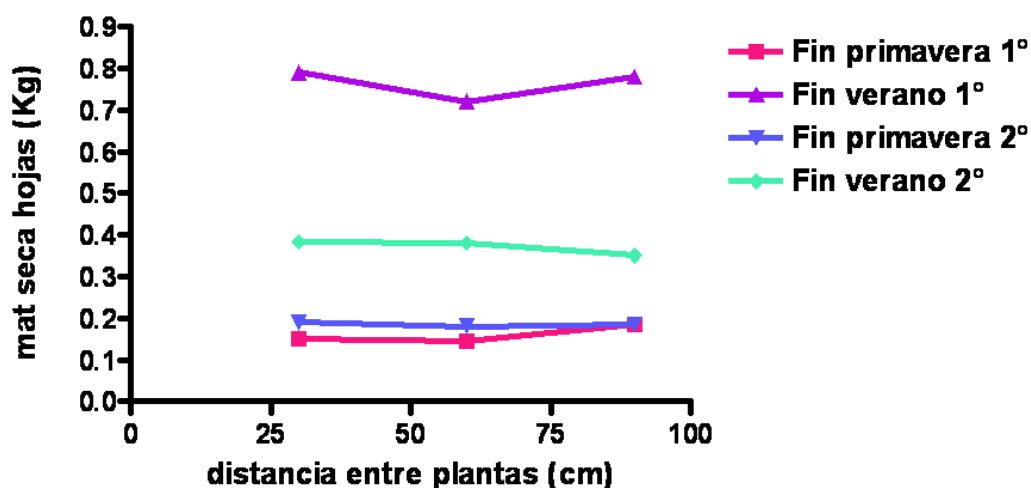
Durante el desarrollo del cultivo no se registraron ataques de plagas ni tampoco de enfermedades, en concordancia con las observaciones realizadas sobre esta especie, señalando que posee alta rusticidad frente al ataque de patógenos, atribuible precisamente a la presencia de aceites esenciales en sus hojas, según ha sido reportado en ensayos realizados en Costa Rica (Ocampo y col., 2007). En experiencias realizadas en Uruguay, tampoco se registraron ataques de plagas ni enfermedades (Davies, 2004).

Los valores de rendimiento de biomasa de cada quimiotipo, obtenidos en las distintas épocas de cosecha se muestran en la Tabla 2; los resultados están expresados en kg de materia seca y corresponden a una parcela cosechada de 4,20 m² para cada distancia de plantación.

3.1.1. Efecto de la distancia de plantación en el rendimiento de hoja:

Las Figuras 10 a 13 muestran el peso seco de hoja de cada quimiotipo y comparan los grupos cosechados en diferente época del año y las distancias de plantación. La aplicación del ANOVA de 2 vías permitió concluir que la distancia de plantación no ocasionó diferencias significativas en el rendimiento. En cambio, la época de corte influyó significativamente ($p < 0,05$) en el rendimiento.

Dado que la variable “distancia de plantación” no generó diferencias significativas (NS), se promediaron los 3 datos obtenidos a las diferentes distancias considerándolos como réplicas de un mismo grupo. Con este promedio de materia seca de hojas (expresado en kg por subparcela de 4,2 m²) se calculó el rendimiento por hectárea.



ANOVA 2 vías: por distancia $p = 0,4278$ NS
por época de corte $p < 0,0001$

Figura 10. Rendimiento de hoja seca del quimiotipo carvona en función de las distancias de plantación ensayadas. Se muestran los resultados estadísticos del ANOVA de dos vías (NS: no significativo).

Para el quimiotipo carvona (Figura 10) el rendimiento por hectárea más bajo equivale a 440 kg de hoja seca/ha y correspondió al material cosechado a fines de primavera del primer año. Asimismo, el rendimiento más elevado fue de 1880 kg de hoja seca/ha y correspondió al material cosechado a fines de verano del primer año.

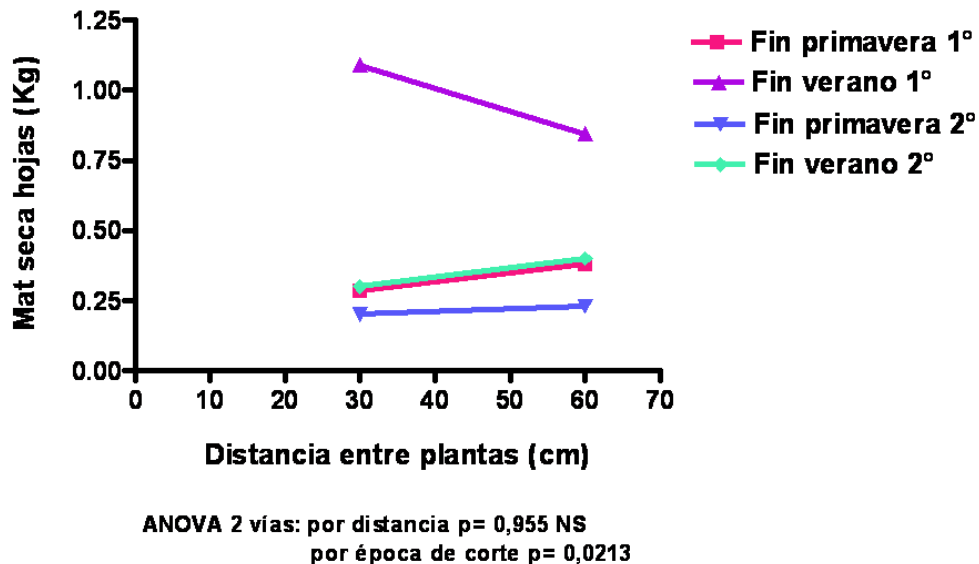


Figura 11. Rendimiento de hoja seca del quimiotipo dihidrocarvona en función de las distancias de plantación ensayadas. Se muestran los resultados estadísticos del ANOVA de dos vías (NS: no significativo).

Para el quimiotipo dihidrocarvona (Figura 11) se observó el rendimiento más bajo a fines de primavera del segundo año, equivalente a 547 kg de hoja seca/ha. El rendimiento más elevado fue de 2600 kg de hoja seca/ha y correspondió al material cosechado a fines de verano del primer año.

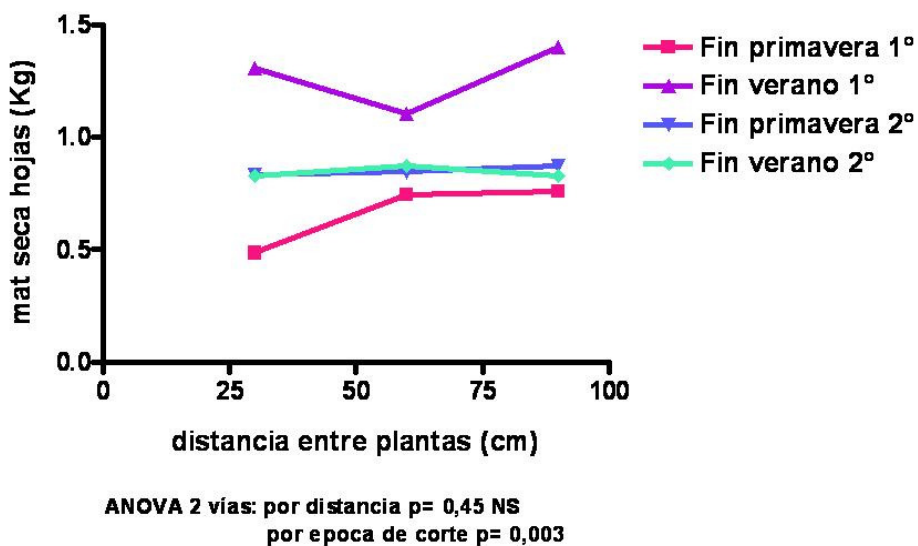


Figura 12. Rendimiento de hoja seca del quimiotipo linalol en función de las distancias de plantación ensayadas. Se muestran los resultados estadísticos del ANOVA de dos vías (NS: no significativo).

El quimiotipo linalol (Figura 12) produjo su menor rendimiento en la cosecha de fin de primavera del primer año, equivalente a 952 kg de hoja seca/ha, mientras que el mayor rendimiento fue de 3300 kg de hoja seca/ha y correspondió a la cosecha de fin de verano del primer año.

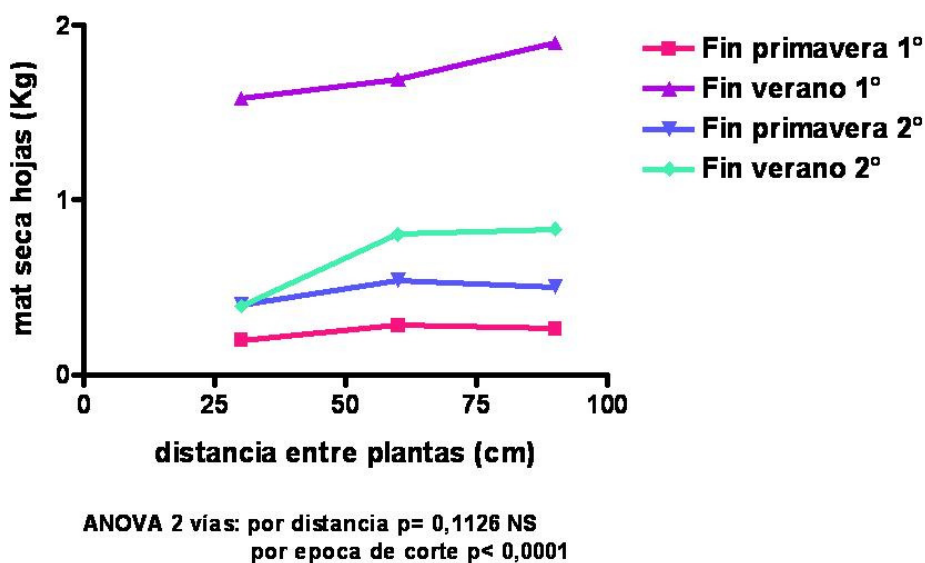


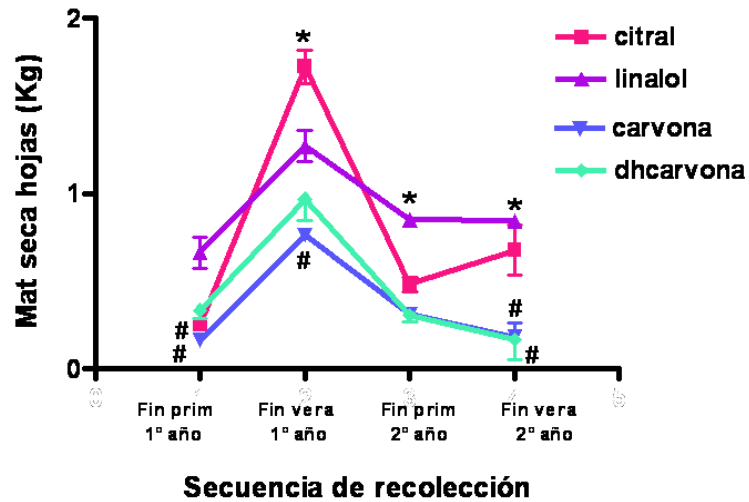
Figura 13. Rendimiento de hoja seca del quimiotipo citral en función de las distancias de plantación ensayadas. Se muestran los resultados estadísticos del ANOVA de dos vías (NS: no significativo).

El quimiotipo citral (Figura 13) también produjo su menor rendimiento en la cosecha de fin de primavera del primer año, equivalente a 715 kg/ha, mientras que el rendimiento más alto fue de 4000 kg de hoja seca/ha y correspondió a la cosecha de fin de verano del primer año.

3.1.2. Efecto de la época de cosecha en el rendimiento de hoja:

Dado que la variable “distancia de plantación” no generó diferencias significativas (NS), se aplicó otro ANOVA de 2 vías para evaluar la influencia de las variables “quimiotipo” y “época o secuencia de recolección” en el rendimiento.

En la Figura 14 se muestran los resultados del análisis realizado para evaluar la influencia de las variables quimiotipo y época o secuencia de recolección. Puede observarse que todos los quimiotipos produjeron mayor rendimiento de hoja seca en las subparcelas que se cosecharon al final del verano del primer año.



ANOVA 2 vías: $p < 0.0001$ por quimiotipo
 $p < 0.0001$ por orden recolección
 Post_tests: * $p < 0.05$ vs otros quimiotipos
 # $p < 0.05$ vs linalool

Figura 14. Rendimiento de hoja seca de los cuatro quimiotipos en función de la época de recolección. Se muestran los resultados estadísticos del ANOVA de dos vías.

3.1.3. Efecto del número de cortes en el rendimiento de hoja:

Puesto que uno de los objetivos fue evaluar técnicas de manejo para aumentar el rendimiento de hoja seca, se comparó el rendimiento de plantas que fueron cosechadas dos veces al año (primavera y verano) con los grupos de plantas cosechadas en un solo corte anual (primavera o verano) a lo largo de los 2 años que duró el ensayo. En las Figuras 15 a 18 se muestran los resultados del análisis (ANOVA de 2 vías) realizado para evaluar la influencia de uno o dos cortes anuales sobre el rendimiento de cada quimiotipo.

Como era de esperar, se observó que en todos los quimiotipos dos cortes anuales superan en rendimiento a un solo corte anual.

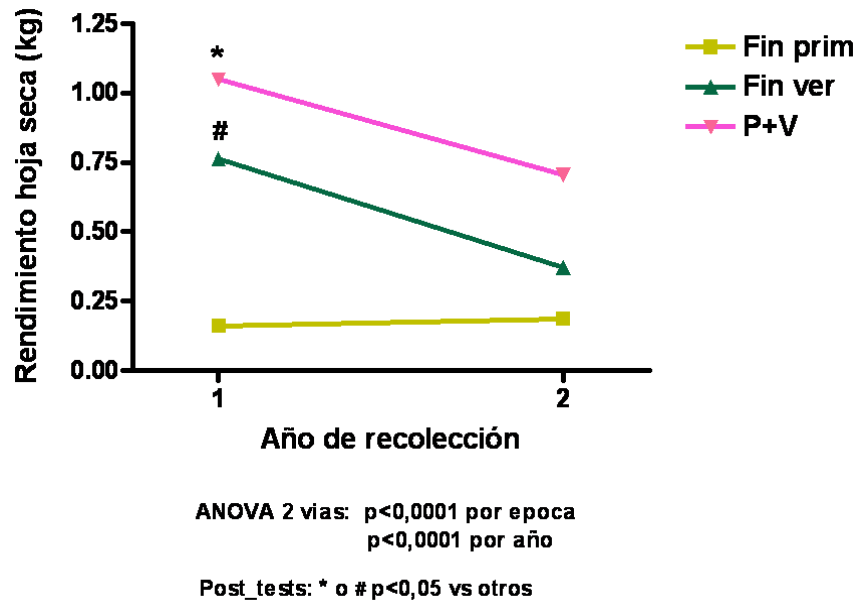


Figura 15. Comparación del rendimiento de un corte (fin primavera o fin verano) con el de dos cortes (corte y rebrote, P+V) durante dos años de cultivo del quimiotipo carvona.

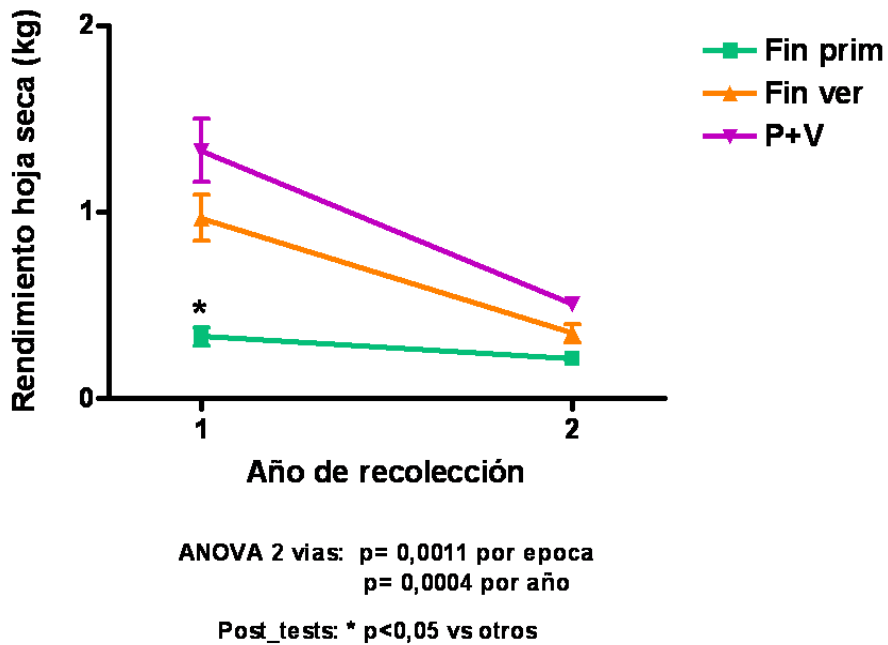


Figura 16. Comparación del rendimiento de un corte (fin primavera o fin verano) con el de dos cortes (corte y rebrote, P+V) durante dos años de cultivo del quimiotipo dihidrocarvona.

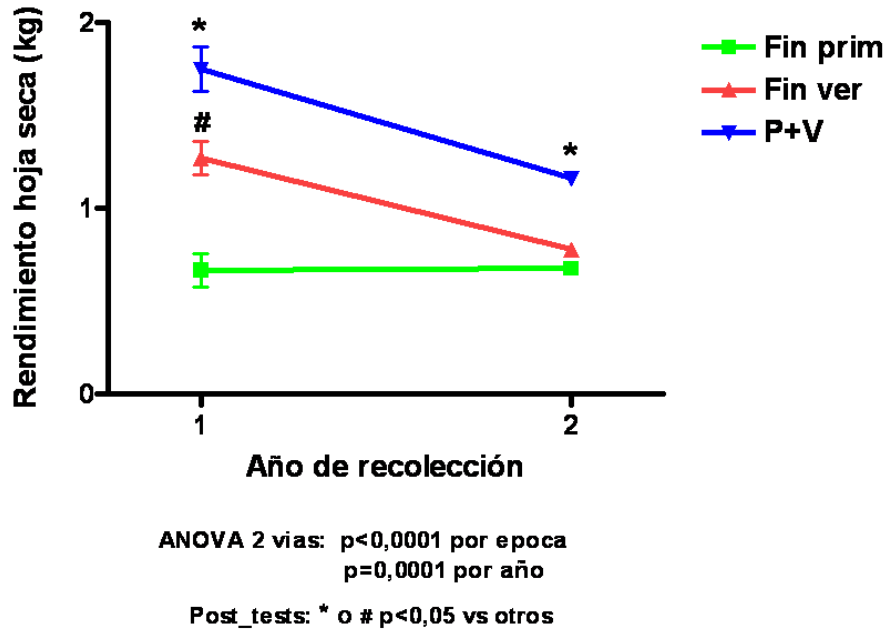


Figura 17. Comparación del rendimiento de un corte (fin primavera o fin verano) con el de dos cortes (corte y rebrote, P+V) durante dos años de cultivo del quimiotipo linalol.

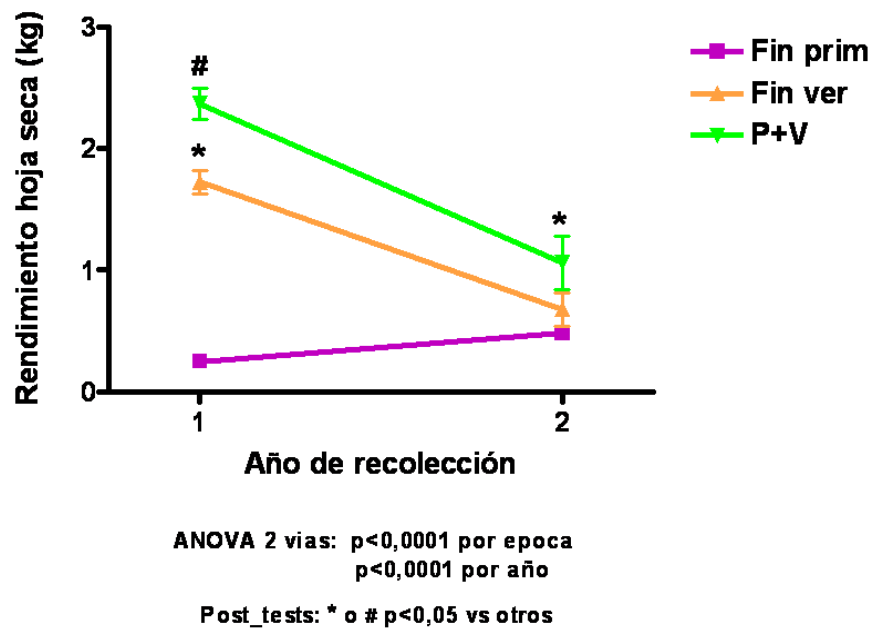


Figura 18. Comparación del rendimiento de un corte (fin primavera o fin verano) con el de dos cortes (corte y rebrote, P+V) durante dos años de cultivo del quimiotipo citral.

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos del cultivo en cada época de corte, que fueron comparados en los gráficos previos.

Tabla 2. Máximos rendimientos de hoja (kg/ha) de los cuatro quimiotipos evaluados en cada época de corte:

	Fin p 1°	Fin v 1°	P+V 1°	Fin p 2°	Fin v 2°	P+V 2°
carvona	440	1880	2500	1200	1000	1350
dhcarvona	547	2600	3160	1400	1200	1600
linalol	952	3300	4157	2300	2000	2700
citral	715	4000	5600	1700	1500	2000

Fin p1° (fin primavera 1° año); Fin v1° (fin verano 1° año); P+V 1° (primavera y verano 1° año); Fin p2° (fin primavera 2° año); Fin v 2° (fin verano 2° año); P+V 2° (primavera y verano 2° año).

A modo de complemento, en la Tabla 3 se indican los datos correspondientes a la relación tallo/hoja de los cuatro quimiotipos evaluados.

Tabla 3. Relación tallo/hoja de los quimiotipos evaluados

	carvona	dhcarvona	linalol	citral
% de tallo	48 - 56	51 - 57	55 - 63	52 - 60
% de hoja	44 - 52	43 - 49	37 - 45	40 - 48

3.1.4. Rendimiento de aceite esencial

Las Tablas 4 y 5 muestran el rendimiento de aceite esencial obtenido en distintas épocas de cosecha durante los dos años del ensayo.

Tabla 4. Rendimientos (mL/100 g) de aceite esencial extraído de material seco en el primer año

Fin primavera		Fin verano	
Quimiotipo	% s/ps	Quimiotipo	% s/ps
Citral	0,6 ± 0,05	Citral	1 ± 0,07
Linalol	1,2 ± 0,05	Linalol	1,4 ± 0,05
Dh-Carvona	1,4 ± 0,06	Dh-Carvona	1,9 ± 0,05
Carvona	1,2 ± 0,05	Carvona	1,5 ± 0,05

Los resultados están expresados en % de esencia sobre peso seco (% s/ps)

Tabla 5. Rendimientos (mL/100 g) de aceite esencial extraído de material seco en el segundo año

Fin primavera		Fin verano	
Quimiotipo	% s/ps	Quimiotipo	% s/ps
Citral	1,1 ±0,07	Citral	1,2 ±0,07
Linalol	1,5 ±0,09	Linalol	1,58 ±0,05
Dh-Carvona	2 ±0,05	Dh-Carvona	2,1 ±0,07
Carvona	1,56 ±0,02	Carvona	1,65 ±0,04

Los resultados están expresados en % de esencia sobre peso seco (% s/ps)

La Tabla 6 muestra los valores de densidad de los aceites esenciales obtenidos a partir de los distintos quimiotipos de *Lippia alba*.

Tabla 6. Densidad del aceite esencial de los cuatro quimiotipos expresados en g/mL

Carvona	Citral	Dhcarvona	Linalol
0,9291	0,8701	0,9295	0,8471

3.2. Análisis cromatográfico de los aceites esenciales de los quimiotipos evaluados

Las Figuras 19-22 muestran los cromatogramas obtenidos para los aceites esenciales extraídos a partir de los quimiotipos linalol, citral, carvona y dihidrocarvona de la especie *Lippia alba*.

Operator :
 Acquired : 5 Jun 2012 10:00 using AcqMethod PERFUME.M
 Instrument : MSD
 Sample Name: LIPPIA ALBA LINALOL LA PLATA
 Misc Info :
 Vial Number: 1

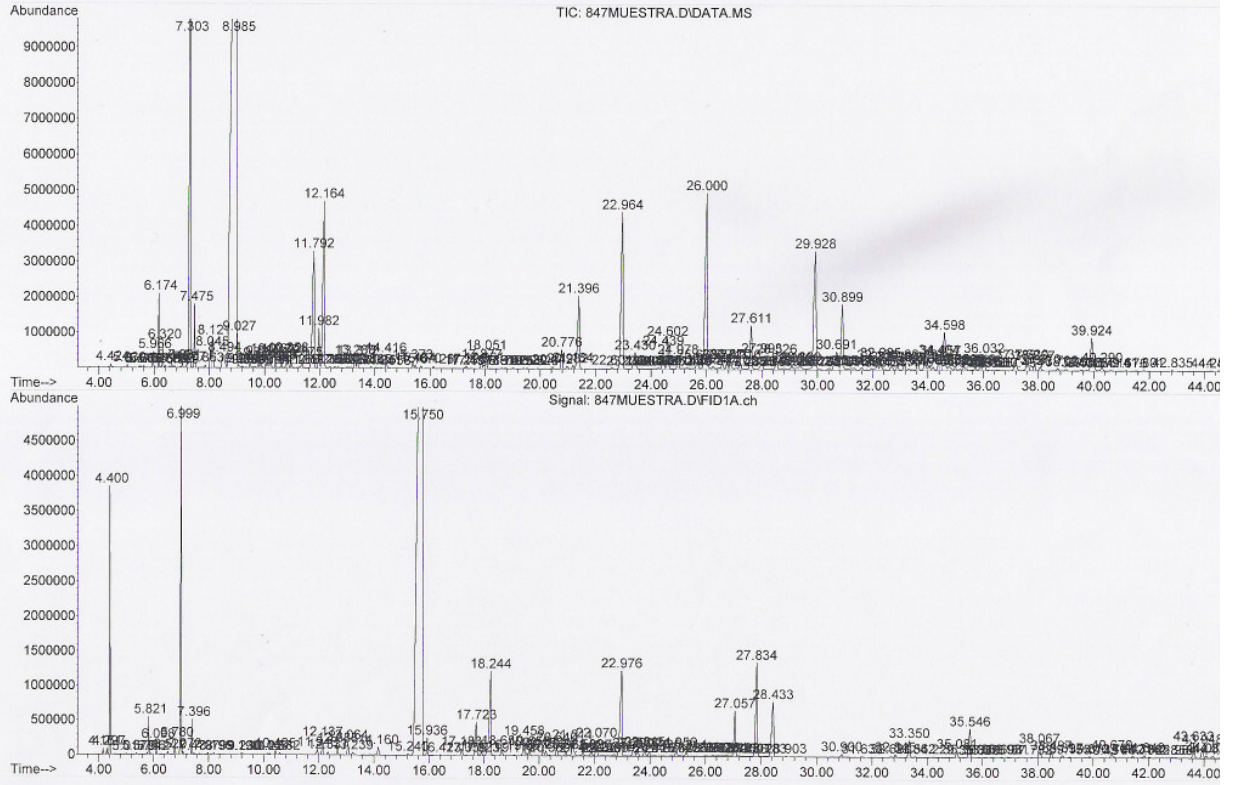


Figura 19. Cromatograma del aceite esencial del quimiotipo linalol

Operator :
 Acquired : 25 Oct 2012 11:04 using AcqMethod PERFUME.M
 Instrument : MSD
 Sample Name: LIPPIA ALBA DIHIDROCARVONA LA PLATA 2012
 Misc Info :
 Vial Number: 1

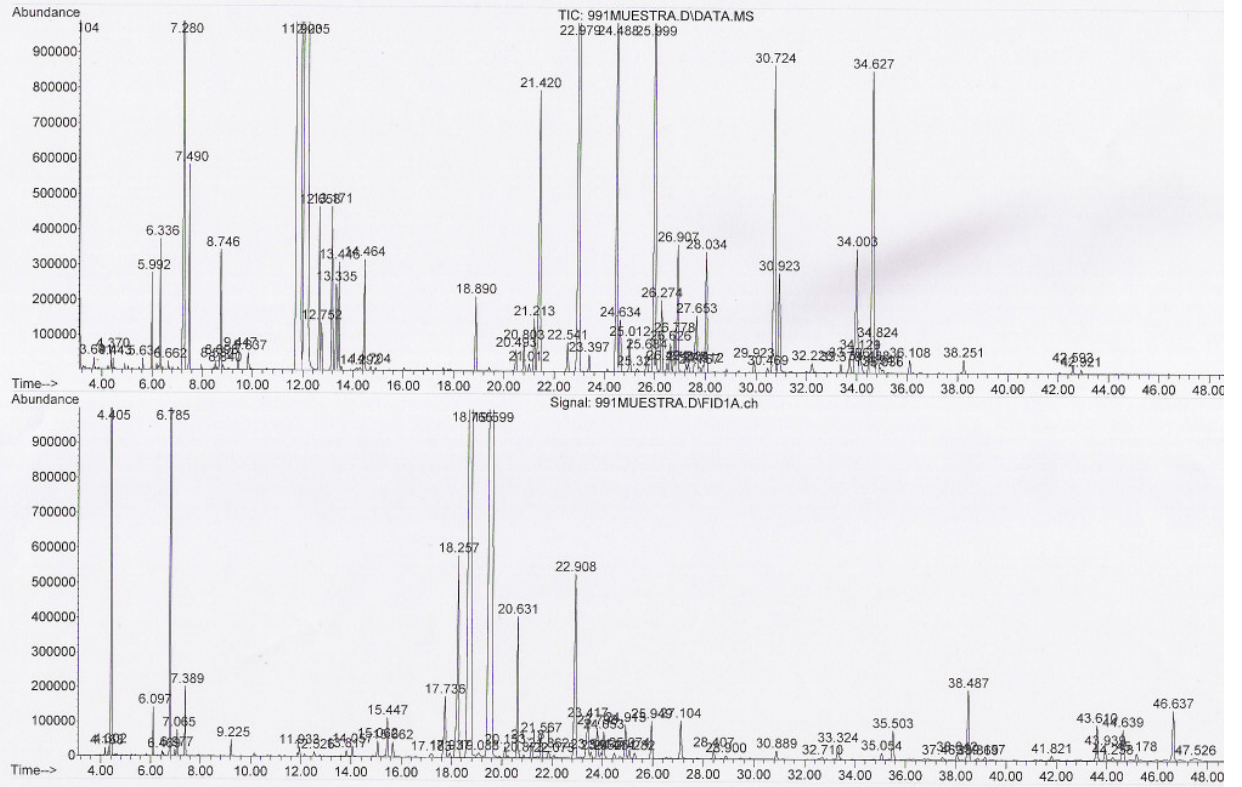


Figura 21. Cromatograma del aceite esencial del quimiotipo dihidrocarvona

FILE : D:\MATERIA PRIMA\NATURALES\990MUESTRA.D
 Operator :
 Acquired : 25 Oct 2012 9:45 using AcqMethod PERFUME.M
 Instrument : MSD
 Sample Name : LIPPIA ALBA CARVONA LA PLATA 2012
 Misc Info :
 Vial Number : 1

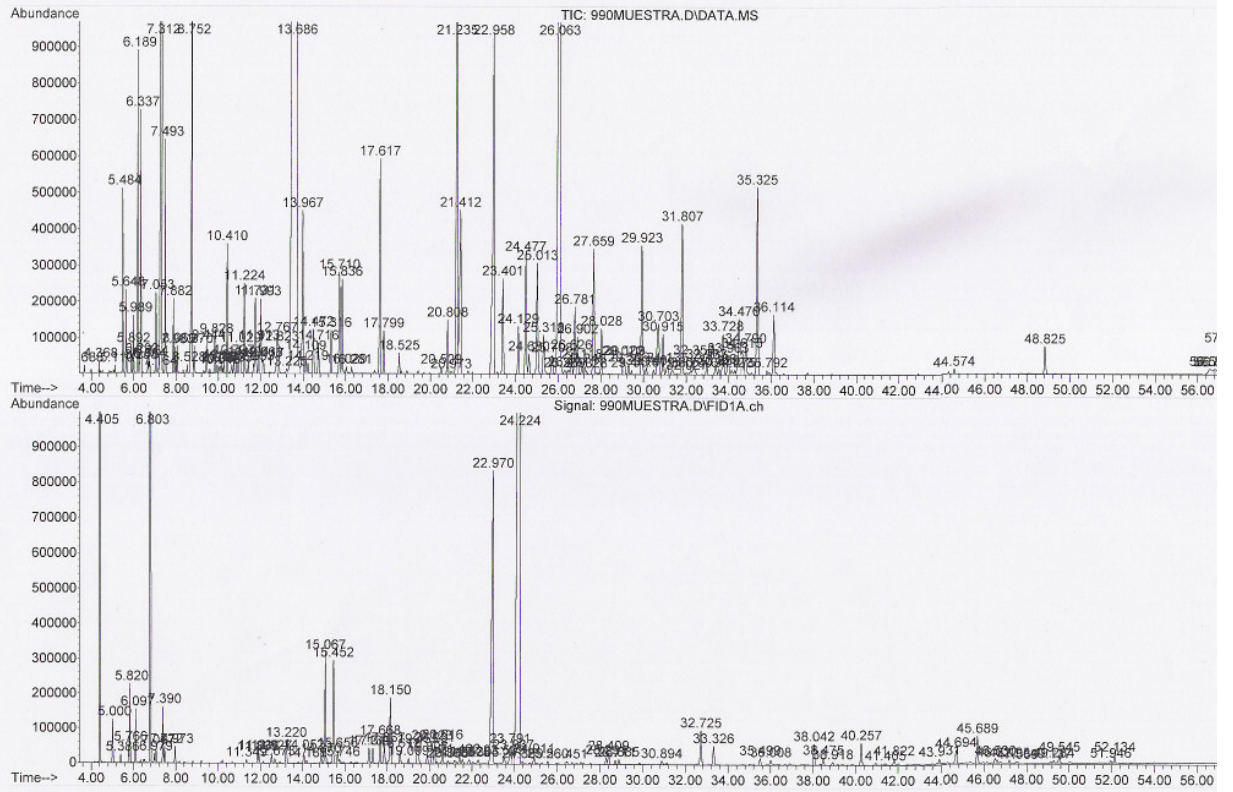


Figura 22. Cromatograma del aceite esencial del quimiotipo carvona

La Tabla 7 muestra los datos correspondientes al contenido de los componentes identificados para los aceites esenciales de los cuatro quimiotipos en estudio.

Tabla 7: Porcentaje de los principales componentes del aceite esencial de los cuatro quimiotipos con sus índices de retención (IR), analizado por Cromatografía Gaseosa.

<i>Lippia alba</i> Compuestos mayoritarios	Porcentaje por quimiotipo				IR no polar	IR polar
	LINALOL	CARVONA	DIHIDROCARVONA	CITRAL		
alfa tuyeno	-	0,3	-	-	926	1036
alfa pineno	tr	0,2	-	tr	935	1043
Canfeno	tr	0,1	-	-	951	1100
octen-3-ol-1	-	tr	-	-	957	1448
beta pineno	tr	0,2	-	tr	979	1133
Sabineno	0,5	0,7	-	0,1	968	1138
Mirceno	0,2	0,5	0,3	6,6	974	1170
Limoneno	0,2	26,0	6,7	8,2	1024	1221
alfa felandreno	-	tr	-	-	1005	1191
1,8-cineol	6,0	-	-	-	1022	1234
cis beta ocimeno	0,1	-	0,2	0,1	1020	1235
trans beta ocimeno	0,5	0,5	0,5	0,6	1032	1260
p-cimeno	tr	0,2	tr	-	1018	1286
3-octanol	tr	tr	-	-	975	1390
metil heptenona	-	-	0,1	4,3	957	1349
gamma terpineno	-	0,2	-	-	1047	1264
hidrato de sabineno cis	-	0,1	-	-	1055	1468
hidrato de sabineno trans	-	0,2	-	-	1089	1552
cis-3-hexenol	-	-	tr	tr	< 900	1392
isobutirato cis-3-hexenilo	0,1	-	-	-	1121	1396
p-cimeno	-	tr	tr	-	1073	1452
trans oxilinalol	0,3	-	-	-	1072	1452
3-octen-1-ol	0,1	0,1	-	-	957	1448
cis oxilinalol	0,3	-	-	-	1056	1481
exo isocitral	-	-	-	0,1	1121	1525
focitral B	-	-	-	0,1	1091	1443
focitral A	-	-	-	0,2	1129	1524
cis isocitral	-	-	-	0,4	1139	1549
trans isocitral	-	-	-	0,3	1156	1576
alfa choapeño	0,2	0,2	0,1	0,2	1376	1511
beta bourboneno	-	1,6	0,2	0,6	1384	1537
beta cubebeno	tr	0,1	tr	0,2	1426	1539
Benzaldehido	tr	-	tr	-	933	1546
rosefuran óxido	-	-	-	0,1	1147	1507
Ciclosativeno	-	-	0,1	0,1	1370	1504
Linalol	64,2	1,3	0,5	0,8	1081	1549
oxilimoneno cis	-	0,1	0,1	-	1117	1465
oxilimoneno trans	-	tr	-	-	1121	1478
alfa gurjuneno	-	-	0,2	0,4	1410	1548
p-menta-2,8-dienol trans	-	0,1	0,2	-	1106	1632
p-menta-2,8-dienol cis	-	0,2	-	-	1119	1674

Mentona	-	0,3	-	-	1134	1485
Mentol	-	0,2	-	-	1156	1647
trans verbenol	-	tr	-	-	1128	1687
Borneol	-	tr	-	-	1150	1711
cis carveol	-	tr	tr	-	1208	1869
trans alfa bergamoteno	-	-	-	0,4	1431	1596
Carvona	-	45,9	0,4	16,7	1215	1745
beta elemeno	0,9	0,4	1,1	0,5	1387	1603
terpinen-4-ol	0,1	tr	-	-	1164	1614
beta cariofileno	2,7	1,1	3,6	3,8	1417	1614
Z dihidrocarvona	0,2	0,2	32,8	0,2	1172	1623
E dihidrocarvona	0,5	0,3	37,5	0,2	1179	1642
dihidrocarveol iso	-	-	0,6	-	1200	1783
dihidrocarveol neo iso	-	-	0,6	-	1213	1808
gamma elemeno	0,2	-	-	-	1428	1648
Pulegona	0,1	-	-	-	1216	1663
Alloaromadendreno	tr	0,3	0,1	0,3	1456	1658
Z beta farneseno	0,1	0,1	1,8	0,3	1448	1668
alfa humuleno	0,5	0,1	0,2	0,3	1449	1683
Neral	0,1	tr	0,3	11,5	1213	1692
alfa terpineol	0,4	-	-	-	1172	1705
germacreno D	3,0	7,3	2,9	4,6	1474	1721
gamma cadineno	tr	tr	0,1	0,1	1504	1732
Geranial	0,1	0,2	0,2	19,5	1239	1740
Piperitona	tr	0,4	-	0,1	1312	1927
Geraniol	-	0,1	-	0,3	1261	1852
Anetol	-	0,2	-	-	1259	1836
acetato bornilo	-	0,2	-	0,1	1270	1595
Timol	-	tr	-	-	1262	2195
Piperitenona	-	0,7	-	-	1227	1739
acetato cis carvilo	-	tr	-	-	1314	1781
Eugenol	-	0,1	-	0,3	1326	2178
meti eugenol	-	tr	-	-	1368	2019
Aromadendreno	-	tr	-	-	1437	1622
alfa amorpheno	-	0,1	tr	0,1	1473	1700
alfa trans, trans farneseno	-	tr	-	-	1496	1754
alfa muuroleno	tr	tr	0,2	0,6	1492	1731
Biciclogermacreno	0,2	0,1	-	0,1	1489	1742
acetato geranilo	-	-	-	0,4	1359	1760
alfa trans bisaboleno	-	-	-	-	1530	1776
trans nerolidol	0,4	0,4	0,1	0,3	1546	2042
Espatuleno	-	0,2	-	-	1558	2125
Guayol	-	0,4	-	-	1581	2090
Bulnesol	-	0,5	-	-	1647	2212
delta cadineno	0,2	0,1	0,5	0,5	1512	1763
cis, cis 2,6-dimetil-3,5,7-octatrien-2-ol	1,3	-	-	-	1177	1807
trans,trans 2,6-dimetil-3,5,7-octatrien-2-ol	2,8	-	-	-	1187	1823
germacreno B	2,0	-	-	-	1550	1836
Cubebol	0,5	0,4	0,3	0,7	1507	1940

iso oxicariofileno	0,2	-	0,1	0,4	1563	1977
Oxicariofileno	0,9	0,1	0,5	2,7	1565	1989
germacren-4-ol	0,1	0,1	1,1	1,0	1562	2050
Carvacrol	tr	0,1	-	-	1280	2216
tau Muurolol	-	0,1	0,5	0,7	1627	2186
						2233
alfa cadinol	-	0,1	0,8	0,6	1633	
Phytol	0,1	0,2	0,1	0,2	2098	2613
TOTAL	90,3	93,6	95,6	90,9		

En los cromatogramas de las Figuras 19, 20, 21 y 22 se visualizan los picos cromatográficos resultantes de la Cromatografía Gaseosa (CG), por el uso de la fase polar con el detector FID en la parte inferior de la figura y de la fase no polar con el detector de masa en la superior.

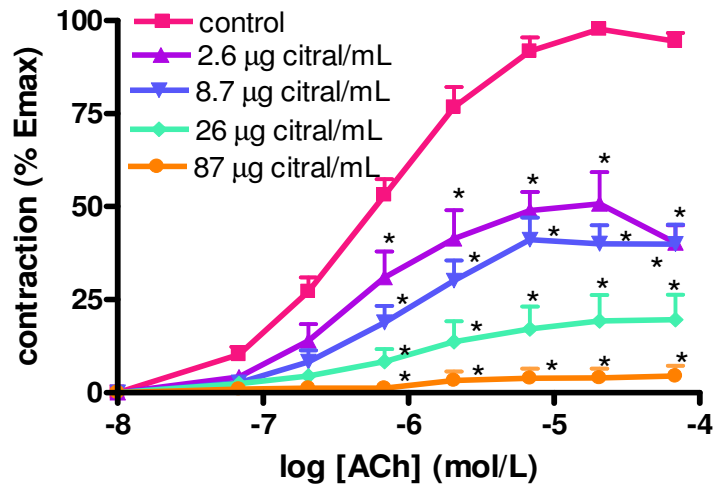
Los resultados son ordenados en la Tabla 7 con sus correspondientes índices de retención (IR) en cada fase y el análisis de la composición química del aceite esencial (identidad y porcentaje).

De dicho análisis se deduce que el porcentaje de los compuestos mayoritarios confirma la identidad de los cuatro quimiotipos evaluados en el presente trabajo, mostrando similitud con los reportes bibliográficos sobre el análisis de la composición del aceite esencial de esta especie (Bandoni, 2002; Parra Garcés y col., 2010; Ciccio y Ocampo, 2010).

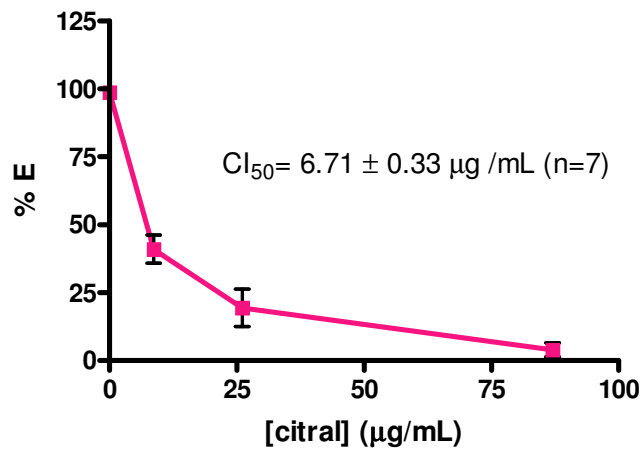
3.3. Estudios farmacológicos

3.3.1 Efectos de las esencias sobre las curvas concentración-efecto de acetilcolina:

El aceite esencial de *Lippia alba* de los cuatro quimiotipos redujo el efecto máximo de la CCR de acetilcolina (Ach) en una manera dependiente de la concentración (Figuras 23 a 26), lo que sugiere un antagonismo no competitivo sobre la contracción colinérgica (Kenakin, 1984). La concentración inhibitoria al 50% (IC₅₀) extrapolada de las curvas de inhibición de la esencia del quimiotipo citral fue de $6,71 \pm 0,33 \mu\text{g/mL}$ (n = 8) (Fig. 23b), la de linalol $46,5 \pm 14,2 \mu\text{g/mL}$ (n = 7) (Fig. 24b), la de carvona $73,1 \pm 16,7 \mu\text{g/mL}$ (Fig. 25b) y la de dihidrocarvona $44,8 \pm 17,9 \mu\text{g/mL}$ (Fig. 26b).

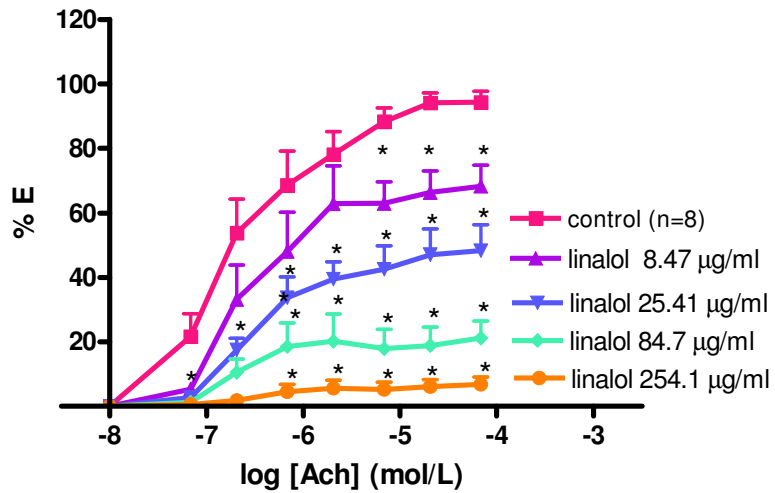


a

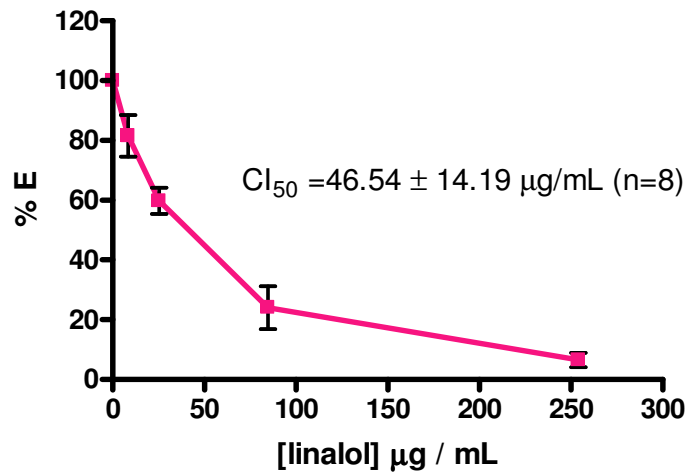


b

Figura 23: a) Curvas concentración-respuesta de acetilcolina (ACh) en ausencia (control) y presencia de concentraciones únicas y crecientes del aceite esencial del quimiotipo citral de *Lippia alba* (indicadas en la leyenda); b) Curva de inhibición obtenida del gráfico anterior para el cálculo de la CI_{50} de la esencia, indicado en el gráfico (n : número de experimentos, valores expresados como media \pm ESM, * $p < 0,05$ vs. Control, por "tests a posteriori" del ANOVA de 2 vías).

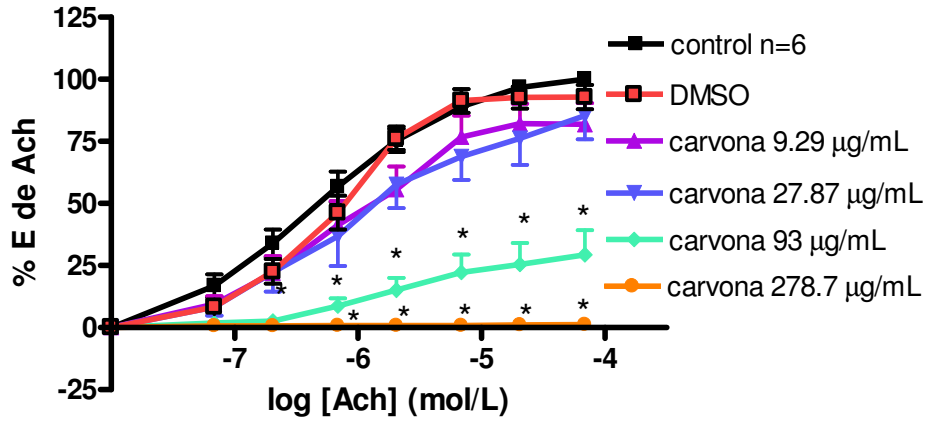


a

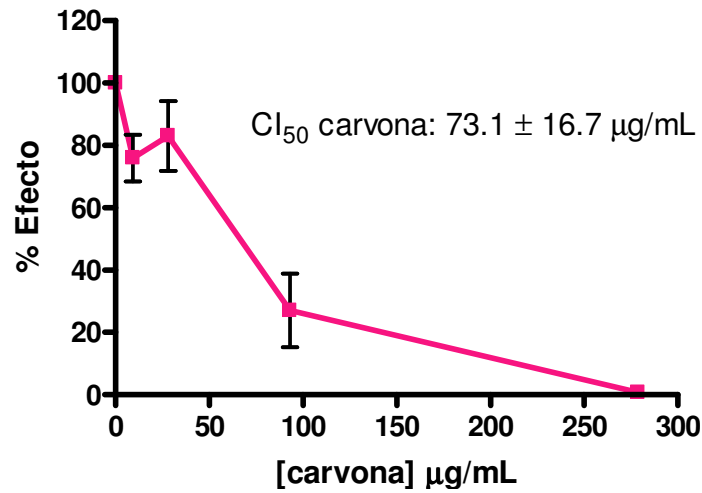


b

Figura 24: a) Curvas concentración-respuesta de acetilcolina (ACh) en ausencia (control) y presencia de concentraciones únicas y crecientes del aceite esencial del quimiotipo linalol de *Lippia alba* (indicadas en la leyenda); b) Curva de inhibición obtenida del gráfico anterior para el cálculo de la CI₅₀ de la esencia, indicado en el gráfico (n: número de experimentos, valores expresados como media±ESM, *p<0,05vs. Control, por “tests a posteriori” del ANOVA de 2 vías).

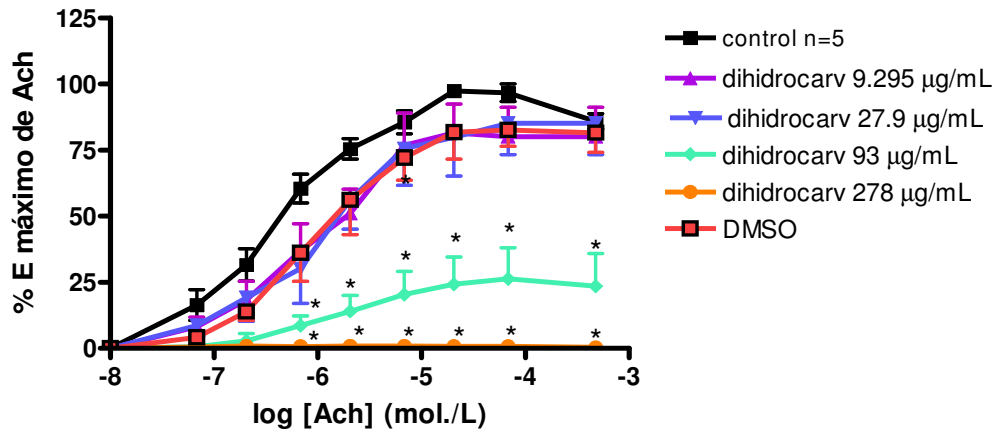


a

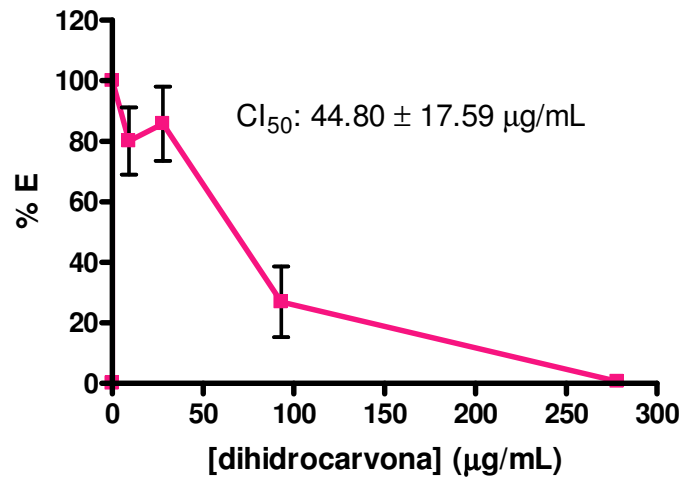


b

Figura 25: a) Curvas concentración-respuesta de acetilcolina (ACh) en ausencia (control) y presencia de concentraciones únicas y crecientes del aceite esencial del quimiotipo carvona de *Lippia alba* (indicadas en la leyenda, DMSO es el control del vehículo); b) Curva de inhibición obtenida del gráfico anterior para el cálculo de la CI₅₀ de la esencia, indicado en el gráfico (n: número de experimentos, valores expresados como media±ESM, *p<0,05vs. Control, por “tests a posteriori” del ANOVA de 2 vías).



a



b

Figura 26: a) Curvas concentración-respuesta de acetilcolina (ACh) en ausencia (control) y presencia de concentraciones únicas y crecientes del aceite esencial del quimiotipo dihidrocarvona de *Lippia alba* (indicadas en la leyenda, DMSO es el control del vehículo); b) Curva de inhibición obtenida del gráfico anterior para el cálculo de la CI_{50} de la esencia, indicado en el gráfico (n : número de experimentos, valores expresados como media±ESM, $*p < 0,05$ vs. Control, por “tests a posteriori” del ANOVA de 2 vías).

La Figura 27 compara las potencias de los aceites esenciales de los cuatro quimiotipos de *Lippia alba* para inhibir las contracciones de acetilcolina, y puede verse que la esencia de “cital” es significativamente más potente que las de los otros tres quimiotipos, dado que su CI_{50} es menor.

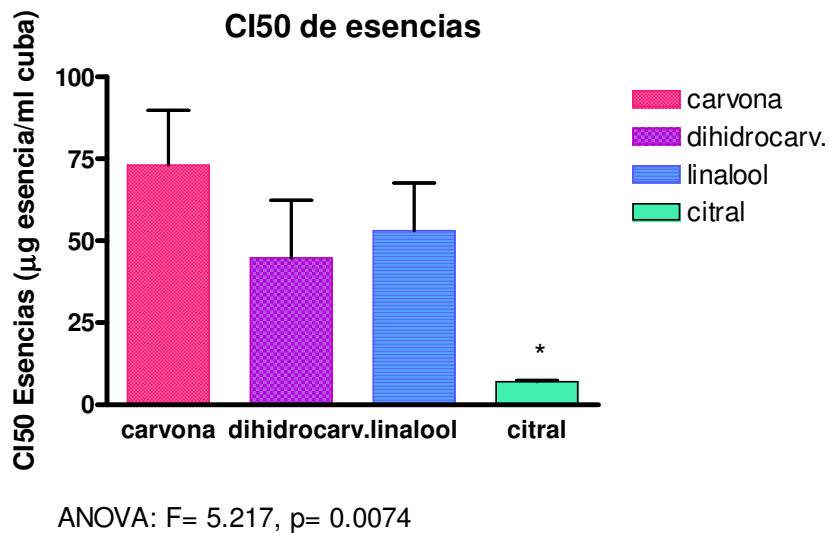
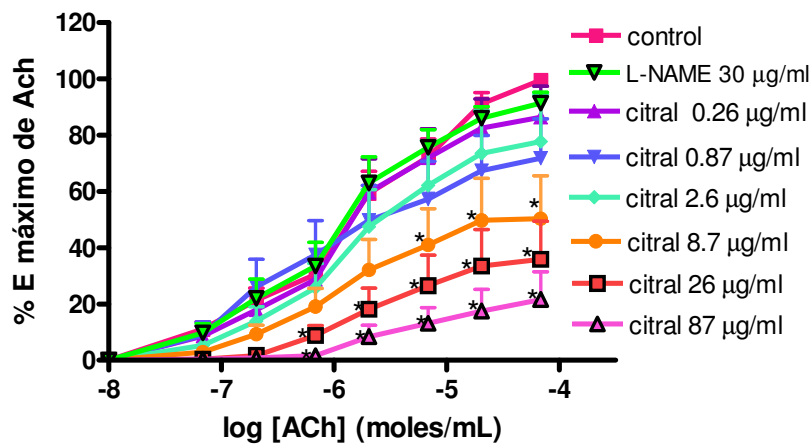


Figura 27: Comparación de las concentraciones inhibitorias al 50% (CI_{50}) de las esencias de los 4 quimiotipos de *Lippia alba*. Se indican los parámetros de la comparación estadística por ANOVA, y el resultado del test a posteriori: * $p < 0.05$ vs los otros quimiotipos.

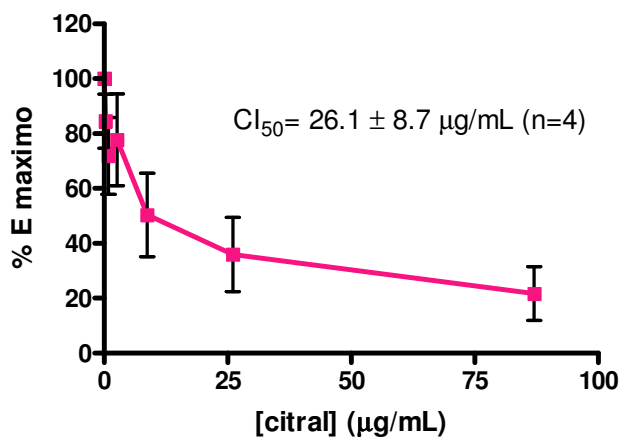
3.3.2 Evaluación del mecanismo de acción de las esencias:

Efectos sobre la producción de óxido nítrico:

Se evaluó si el aceite esencial de “citral” (AEC) podría producir espasmolisis del intestino por estimular la síntesis de óxido nítrico (NO) en el tejido, lo cual podría explicar la relajación. Se realizaron CCR de Ach y las mismas concentraciones de esencia de “citral” evaluadas antes, en presencia y ausencia de 30 $\mu\text{mol/L}$ de L-NAME, un inhibidor selectivo de la NO-sintasa (NOs). La Figura 28 muestra que L-NAME no impidió el efecto del AEC pero lo redujo parcialmente, ya que aumentó significativamente la IC50 de AEC a $25,2 \pm 8,4 \mu\text{g/mL}$ ($n = 4$, $p = 0,0337$ con t: 2,503; df: 9; por la prueba t vs CI50 de AEC en ausencia de L- NAME, visto en Fig. 23b). Los resultados indican que el AEC actúa parcialmente a través de la producción de NO, lo que contribuye a relajar el músculo liso.



a



b

Figura 28: a) Curvas concentración-respuesta de acetilcolina (ACh) en ausencia (control) y presencia del inhibidor de NO-sintasa L-NAME 30 µg/mL y de concentraciones únicas y crecientes del aceite esencial del quimiotipo citral de Lippia alba (indicadas en la leyenda); b) Curva de inhibición obtenida del gráfico anterior para el cálculo de la CI50 de la esencia, indicado en el gráfico (n: número de experimentos, valores expresados como media±ESM, *p < 0,05 vs. Control, por "tests a posteriori" del ANOVA de 2 vías).

Efectos sobre el influjo de calcio:

Para evaluar si las esencias podrían comportarse como inhibidoras del influjo de calcio al músculo liso intestinal, inicialmente se compararon sus efectos en las CCR de Ach con las de un conocido bloqueante de los canales de Ca^{2+} como es verapamil.

La Figura 29 muestra que el verapamil también indujo una inhibición no competitiva de la CCR de Ach, cuya afinidad por el canal de Ca^{2+} se puede calcular mediante el $\text{pD}'2$ o pK'_B que dio $6,22 \pm 0,16$.

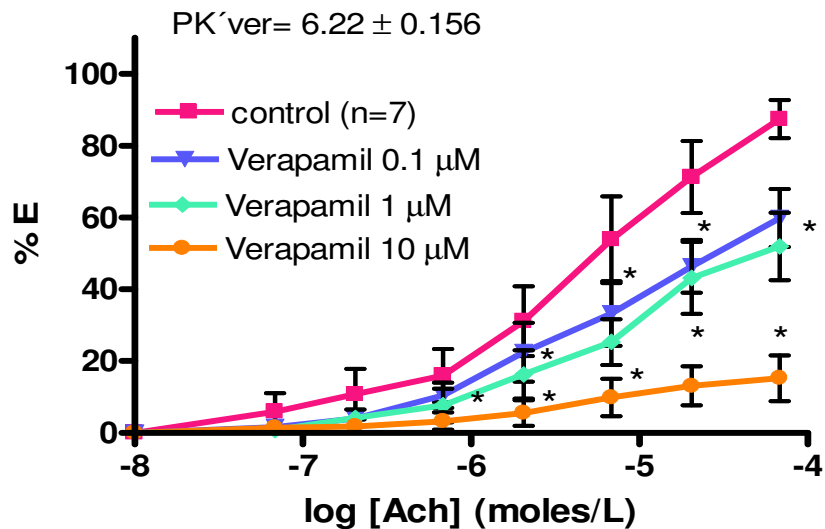
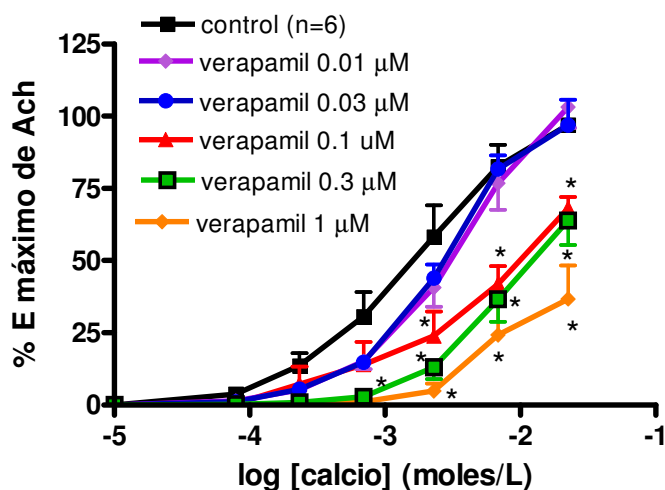


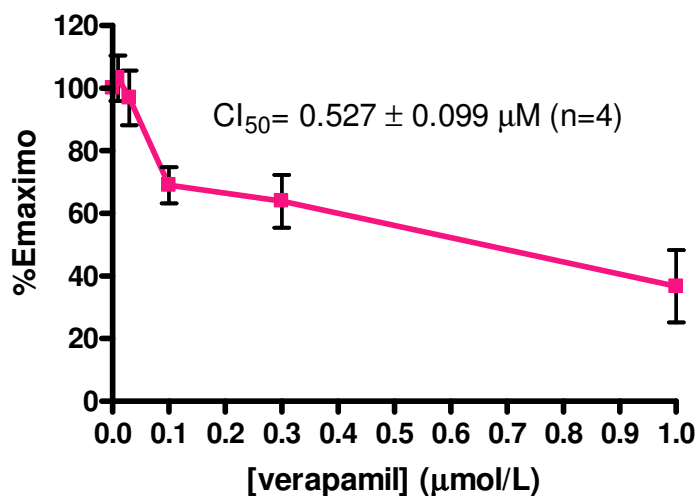
Figura 29: Curvas concentración-respuesta de acetilcolina (Ach) en ausencia (control) y presencia del inhibidor de los canales de calcio verapamil en concentraciones únicas y crecientes (indicadas en la leyenda); se indica el valor promedio calculado del parámetro de afinidad $\text{p}'K$ o $\text{pD}'2$. (n: número de experimentos, valores expresados como media \pm ESM, $*p < 0,05$ vs. Control, por "tests a posteriori" del ANOVA de 2 vías).

Para dilucidar si el antagonismo no competitivo del aceite esencial en la CCR-Ach es debido a la inhibición del influjo de Ca^{+2} hacia el músculo liso, se realizaron CCR de Ca^{+2} en medio de alta $[\text{K}^+]$ (medio despolarizante para activar los canales). Con dicho protocolo se evaluó el mecanismo de acción de las esencias de "citral" y "linalol", y se ensayó como testigo al verapamil, para comparar las potencias. Se eligió comparar con verapamil a la esencia del quimiotipo "citral" por ser la más potente, y a la de "linalol" por ser una de las esencias que exhibió menor potencia frente a Ach y similar a las otras (CI_{50} de "linalol" fue similar a la de "carvona" y "dihidrocarvona" y mayor que la de "citral"; Figura 27).

La Figura 30 muestra que el verapamil indujo un leve desplazamiento hacia la derecha con disminución en el efecto máximo de la CCR-Ca, propia del antagonismo no-competitivo. La afinidad calculada como $pD'2$ o pK_B resultó pK_B verapamil = 6.50 ± 0.11 , con una CI_{50} de $0,527 \pm 0,099 \mu\text{mol/L}$ que resulta $239,8 \pm 45 \mu\text{g/mL}$.



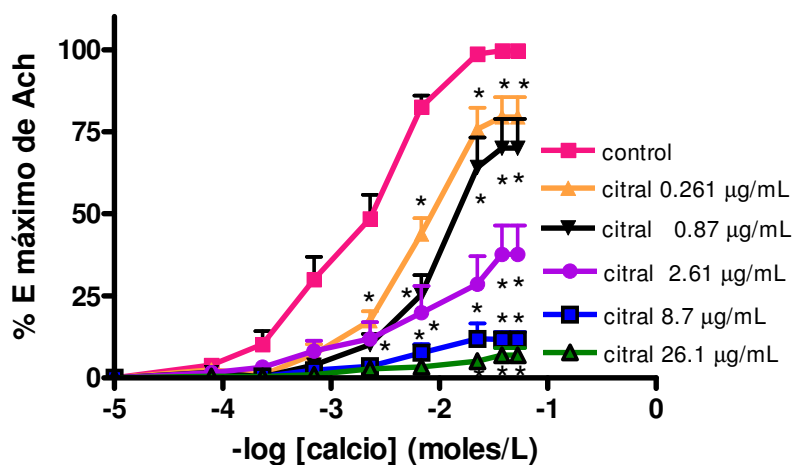
a



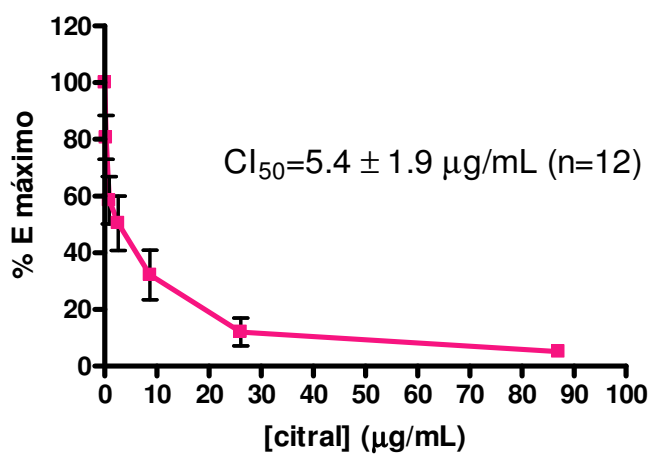
b

Figura 30: a) Curvas concentración-respuesta de calcio (Ca^{2+}) en ausencia (control) y presencia del inhibidor de los canales de calcio verapamil en concentraciones únicas y crecientes (indicadas en la leyenda); valor promedio calculado del parámetro de afinidad pK_B verapamil: 6.50 ± 0.11 ($pEC_{50}\text{Ca}^{2+}$: 2.74 ± 0.16 , $n=6$); b) Curva de inhibición obtenida del gráfico anterior para el cálculo de la CI_{50} del verapamil, indicado en el gráfico (n : número de experimentos, valores expresados como media \pm ESM, * $p < 0,05$ vs. Control, por "tests a posteriori" del ANOVA de 2 vías).

Las Figuras 31 y 32 muestran que las esencias "citral" y "linalol" produjeron una inhibición no competitiva de la CCR- Ca^{2+} . Las CI_{50} extrapoladas, fueron respectivamente: $5,4 \pm 1,9 \mu\text{g/ml}$ ($n = 12$) para el aceite esencial de citral y $7,0 \pm 2,5 \mu\text{g/mL}$ ($n = 12$) para el aceite esencial de linalol.



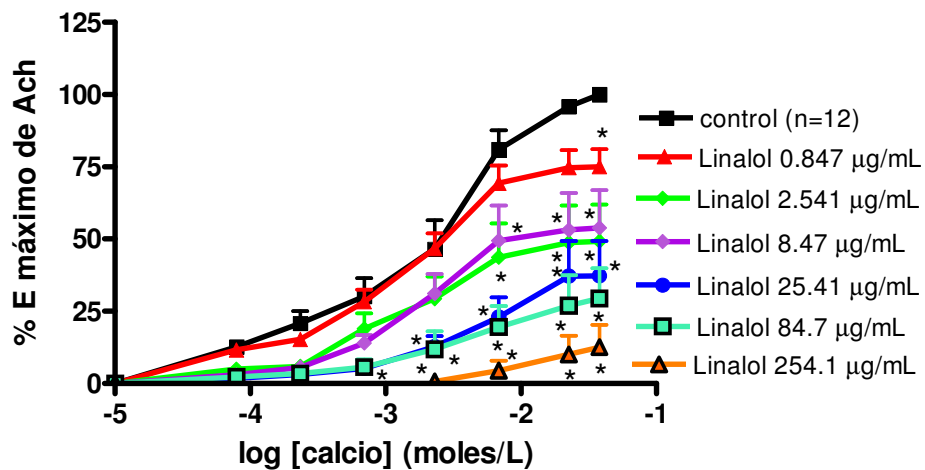
a



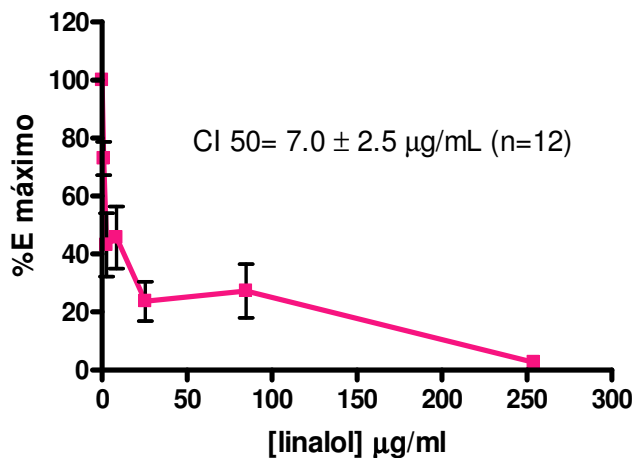
b

Figura 31: a) Curvas concentración-respuesta de calcio (Ca^{2+}) en ausencia (control) y presencia de concentraciones únicas y crecientes del aceite esencial del quimiotipo citral de *Lippia alba* (indicadas en la leyenda); b) Curva de inhibición obtenida del gráfico anterior para el cálculo de la CI_{50} de la esencia, indicado en el gráfico (n : número de experimentos, valores expresados como media \pm ESM, * $p < 0,05$ vs. Control, por “tests a posteriori” del ANOVA de 2 vías).

Las CI_{50} de ambas esencias no resultaron diferentes, por lo cual las curvas de inhibición del aceite esencial de “citral” y “linalol” se compararon con la del verapamil, conocido bloqueante de canales de calcio, expresada en las mismas unidades ($\mu\text{g/mL}$). La Figura 33 muestra que ambas esencias son aproximadamente 40 veces más potentes que el verapamil para inhibir el influjo de calcio.



a



b

Figura 32: a) Curvas concentración-respuesta de calcio (Ca^{2+}) en ausencia (control) y presencia de concentraciones únicas y crecientes del aceite esencial del quimiotipo linalol de *Lippia alba* (indicadas en la leyenda); b) Curva de inhibición obtenida del gráfico anterior para el cálculo de la CI50 de la esencia, indicado en el gráfico (n: número de experimentos, valores expresados como media±ESM, * $p < 0,05$ vs. Control, por “tests a posteriori” del ANOVA de 2 vías).

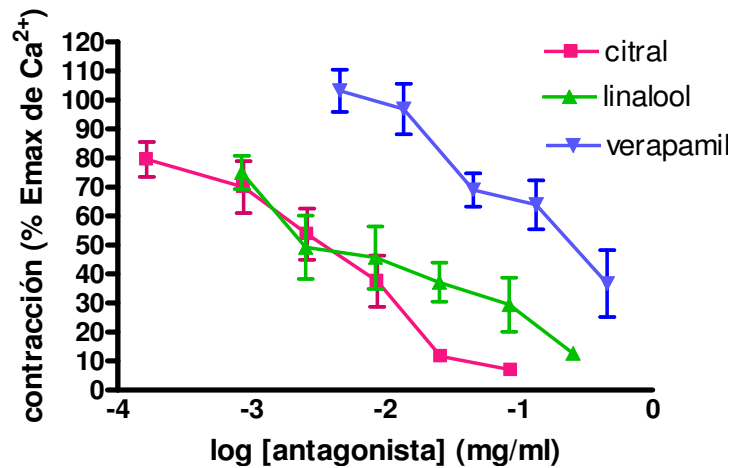


Figura 33: Comparación de las curvas de inhibición de las esencias de los quimiotipos citral y linalol y del verapamil, obtenidas a partir de las CCR de inhibición no-competitiva en las contracciones mediadas por calcio en medio despolarizante, y expresadas en las mismas unidades (mg/mL). Puede verse que las esencias se comportaron en forma similar, pero son unas 40 veces más potentes que verapamil en inhibir el influjo de calcio al músculo liso.

3.4 Calidad de la droga vegetal

Humedad

El contenido de humedad de las muestras analizadas estuvo comprendido entre 11,33 y 12,15%. Los valores hallados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Valores promedio del contenido de agua, expresado en g por 100g

Quimiotipos	Citral	Carvona	Dh-carvona	Linalol
% H (p/p)	12 ±0	12,15 ±0,28	11,33 ±0,28	11,33 ±0,57

Cenizas totales

Los contenidos de cenizas totales de las muestras (droga cruda) pertenecientes a los distintos quimiotipos estuvieron comprendidos entre 14,65 y 17,52%. Los valores más bajos correspondieron a los quimiotipos carvona y citral, mientras que el mayor contenido de cenizas totales fue registrado para el quimiotipo linalol (Tabla 9).

Tabla 9. Valores promedio del contenido de cenizas totales, expresado en g por 100g.

QUIMIOTIPO	% (p/p)
Carvona	14,65 ±0,85
Citral	15,58 ±0,51
Linalol	17,52 ±0,52
Dh-carvona	15,65 ±0,89

Cenizas insolubles en ácido

La cuantificación de cenizas insolubles en ácido (Figura 34, Tabla 10) mostró valores comprendidos entre 3,85 y 6,71%. Tal como se observó en la determinación de cenizas totales, los promedios más bajos correspondieron a los quimiotipos carvona y citral, mientras que el mayor contenido de cenizas insolubles en ácido se registró para el quimiotipo linalol.



Figura 34. Determinación de cenizas insolubles en ácido. Fuente propia

Tabla 10. Valores promedio del contenido de cenizas insolubles en ácido, expresado en g por 100g.

QUIMIOTIPO	% (p/p)
Carvona	4,53 ±0,35
Citral	3,85 ±0,79
Linalol	6,71 ±0,45
Dh-carvona	5,20 ±0,48

Parámetros que definen el color para cada quimiotipo



Figura 35. Muestra de hojas secas de los cuatro quimiotipos analizados. Fuente: Propia

La Figura 35 muestra que los materiales obtenidos luego de la cosecha y secado natural a temperatura ambiente conservaron su coloración.

Con respecto a los parámetros que caracterizan el color, los resultados hallados se muestran en las Figuras 36 a 40.

El quimiotipo linalol presentó menor luminosidad (coordenada L^*) que los quimiotipos carvona y dihidrocarvona ($p < 0,05$), pero no difirió significativamente del quimiotipo citral ($p > 0,05$) (Figura 36).

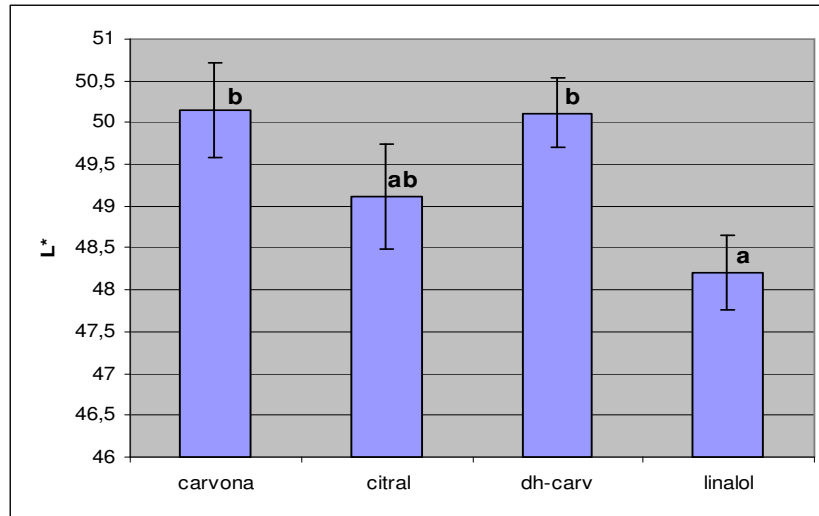


Figura 36. Valores de L^* para distintos quimiotipos, expresados en media \pm ESM ($n=39$). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los quimiotipos ($p < 0,05$).

El quimiotipo dihidrocarvona presentó los valores absolutos más altos para la coordenada a^* respecto a los demás quimiotipos ($p < 0,01$) (Figura 37). A su vez, el quimiotipo carvona mostró valores absolutos para dicha coordenada mayores a los de los quimiotipos citral y linalol ($p < 0,01$). Éstos últimos no presentaron diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$).

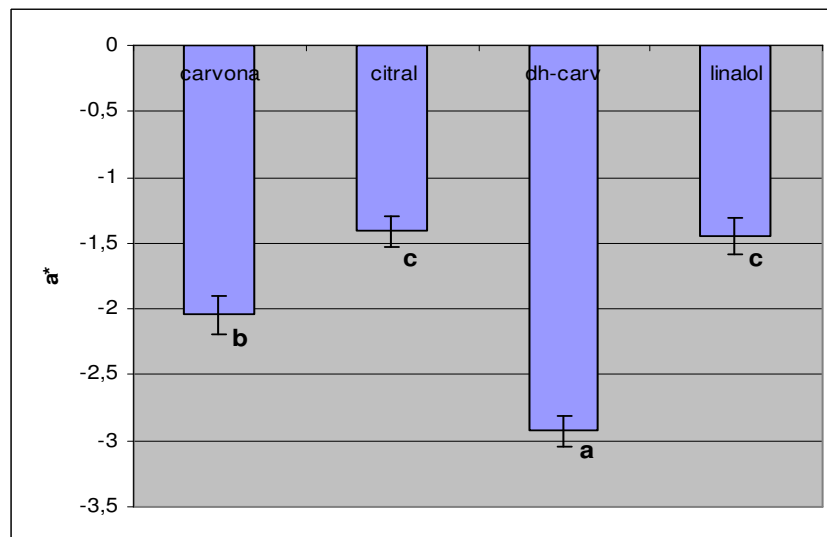


Figura 37. Valores de a^* para distintos quimiotipos expresados en media \pm ESM ($n=39$). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los quimiotipos ($p < 0,01$).

Con respecto a la coordenada b^* (Figura 38), el quimiotipo dihidrocarvona difirió del resto de los quimiotipos, presentando una mayor proporción del componente amarillo ($p < 0,01$). No se observaron diferencias significativas entre los quimiotipos restantes.

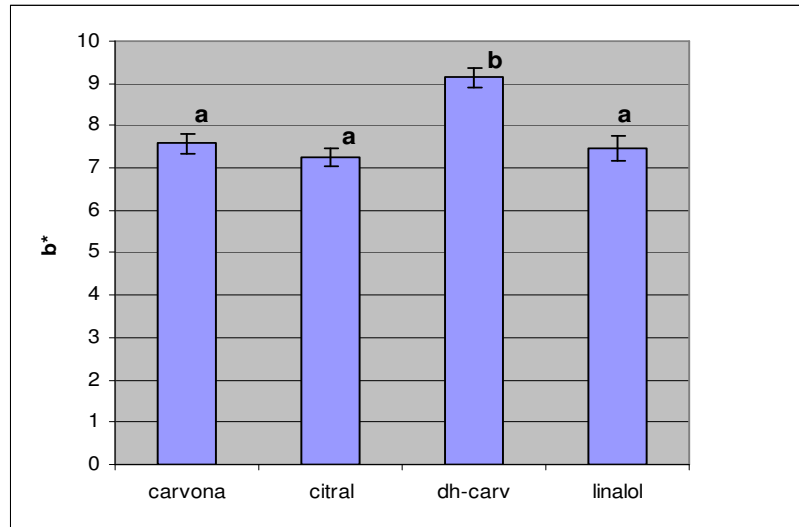


Figura 38. Valores de b^* para distintos quimiotipos expresados en media \pm ESM ($n=39$). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los quimiotipos ($p < 0,01$).

En lo que respecta a los valores de Chroma, el quimiotipo dihidrocarvona presentó el mayor valor de saturación de color ($p < 0,01$), mientras que los restantes quimiotipos no difirieron entre sí (Figura 39).

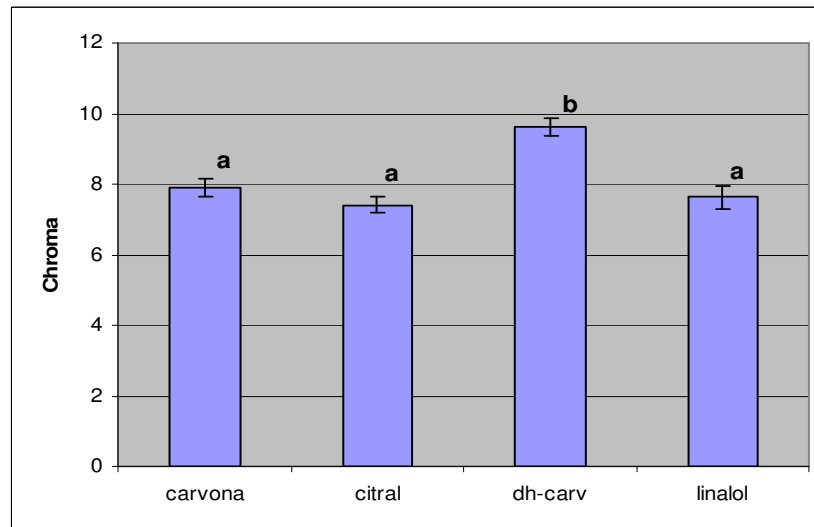


Figura 39. Valores de saturación (Chroma) para distintos quimiotipos expresados en media \pm ESM ($n=39$). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los quimiotipos ($p < 0,01$).

Con respecto a los valores del ángulo hue, que describen el tinte básico del color del producto, los resultados se muestran en la Figura 40. El quimiotipo dihidrocarvona presentó el valor más alto entre todos los quimiotipos ($p < 0,01$). Adicionalmente, el quimiotipo carvona mostró un valor intermedio entre el del quimiotipo dihidrocarvona y el de los quimiotipos citral y linalol. Estos dos últimos no mostraron diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$) con respecto al tinte básico del color.

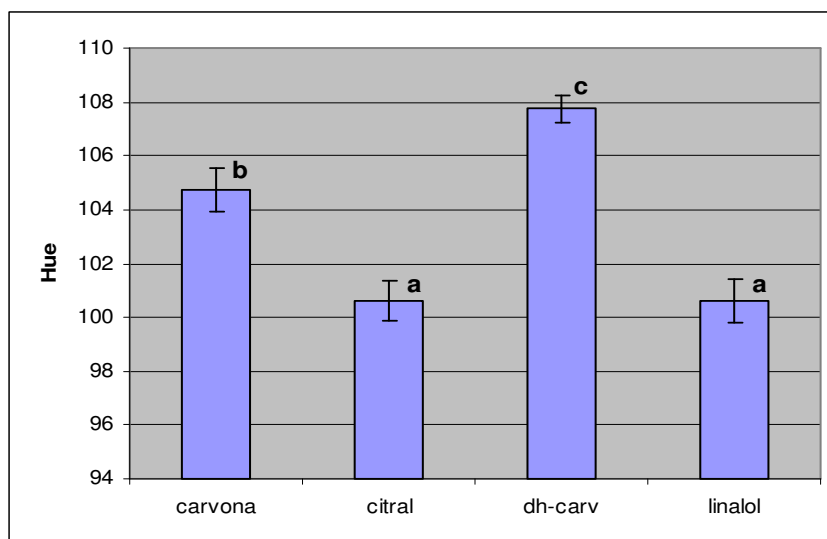


Figura 40. Valores de hue para distintos quimiotipos expresados en media \pm ESM ($n=39$). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los quimiotipos ($p < 0,01$)

4. Discusión

4.1. Efecto de la época de cosecha en el rendimiento de hoja

Si analizamos el rendimiento de hoja de la especie a través de una secuencia de recolección en distintas épocas, tal como se muestra en la Figura 14, se puede observar que en el primer corte, realizado a fines de primavera del primer año, el quimiotipo “linalol” presentó un rendimiento superior al del resto de los quimiotipos. Esto puede deberse, entre otras causas, al rápido desarrollo del mismo en la zona, por poseer similares condiciones edafoclimáticas que en Uruguay, de donde provienen las estacas.

Puede observarse que en el segundo corte, realizado a fines de verano del primer año, el quimiotipo citral tuvo el mayor rendimiento, seguido por el quimiotipo linalol, el cual superó a los otros dos quimiotipos.

La mayor productividad del quimiotipo citral se debe a que éste posee alto potencial productivo en distintos ambientes. Esto coincide con los resultados obtenidos en ensayos anteriores donde se comparó la producción de hojas de distintos quimiotipos de esta especie, evaluados en diferentes condiciones y se observó que el quimiotipo “citral” produjo alto rendimiento y además podría recomendarse su posible uso como padre en cruzamientos con otros quimiotipos de interés industrial, para aumentar la producción de hojas (Yamamoto y col., 2008). También es interesante observar que en el segundo corte, realizado a los siete meses luego de la plantación, todos los quimiotipos mostraron un mayor rendimiento, lo que confirma el aumento de productividad de la especie cuando la cosecha se realiza luego de que se ha establecido completamente el cultivo (Alves dos Santos y col., 2006) y a su vez se vio favorecido por las condiciones ambientales del verano que produjeron un mayor desarrollo de las hojas, resultando en un aumento de biomasa (Dias Elhert, 2003). En experiencias previas (Davies, 2004) se obtuvo el máximo rendimiento de biomasa de esta planta, realizando la cosecha luego de transcurrido un año y tres meses desde el inicio del cultivo. Similares resultados se obtuvieron en otra experiencia de cultivo realizada en Colombia, donde se observó que el contenido de materia seca aumentaba a medida que aumentaba la edad del cultivo (Guzmán y col., 2004).

En cambio, en el tercer corte, realizado a fines de primavera del segundo año, el quimiotipo linalol fue el que presentó el mayor rendimiento, mientras que el quimiotipo “citral” tuvo un rendimiento similar a los quimiotipos “carvona” y “dihidrocarvona”. La disminución en el rendimiento de los cuatro quimiotipos podría estar dada, por un lado debido a que el exceso de precipitaciones en algunos meses, especialmente en el mes de abril de 2013, ocasionó encharcamientos en el lote, lo cual produjo asfixia radicular y la consecuente merma en el rendimiento de hojas, debido a que la especie no tolera el anegamiento (Ocampo, 2000; Bandoni, 2002). Por otro lado, algunos autores reportan que la especie se desarrolla mejor en climas cálidos y secos con temperaturas de 32°C (Ocampo, 2000), los cuales difieren de los de nuestra región. Otra posible explicación a la disminución del rendimiento de hoja, podría ser que con el transcurso de los años la planta produce mayor cantidad de materia seca de tallo con respecto a la hoja (Tabla 3); tal como se ha reportado en ensayos previos donde en el segundo corte la especie rindió un 40% de hojas y un 60% de tallos (Guzmán y col., 2004; Porto Verdecia y col., 2000).

Sin embargo el quimiotipo “linalol”, parece haber sido el menos afectado por las causas adversas mencionadas, lo cual confirmaría su rusticidad y estabilidad, tal como se ha informado en experiencias anteriores (Yamamoto y col., 2008).

En el cuarto corte, realizado a fines de verano del segundo año, se observa que el quimiotipo “linalol” nuevamente tuvo el mayor rendimiento respecto a los restantes, manteniendo constante su producción respecto al corte anterior. El quimiotipo “citral” superó a los quimiotipos “carvona” y “dihidrocarvona” y mostró un claro aumento del rendimiento, acercándose al rendimiento del quimiotipo “linalol”.

Por otro lado, la disminución del rendimiento de “carvona” y “dihidrocarvona”, podría deberse a la debilidad del rebrote causada por los factores mencionados anteriormente, lo que también explica en parte, la pérdida de plantas de estos quimiotipos, que ha sido la causante de la merma en el rendimiento de ambos. Esto podría explicarse, en el caso de “carvona”, porque su adaptación al tipo de suelo y clima locales no ha sido tan exitosa como en los ensayos realizados en Centroamérica (Ocampo y col., 2000), probablemente debido a que este quimiotipo es originario de la zona tropical peruana. En lo que respecta al quimiotipo dihidrocarvona, cuyas estacas provienen de la zona ribereña de Santa Fe que posee un suelo arenoso, al haber sido cultivadas en un suelo pesado de menor drenaje como es el de nuestra región pueden haber sufrido limitaciones en su adaptación, desencadenando la consecuente pérdida de plantas.

Por último, otro factor que podría haber afectado negativamente la supervivencia de estos dos quimiotipos es la presencia de malezas en el lote, ya que la baja capacidad de competencia de esta especie y la dificultad de controlar las malezas dentro de la línea del cultivo podrían haber sido la causa de las pérdidas, tal como ha sido reportado en trabajos anteriores (Davies, 2004).

4.2. Efecto del número de cortes en el rendimiento de hoja

Por otro lado, si analizamos el rendimiento de hoja seca obtenido realizando un solo corte al final del verano del primer año y dos cortes (primavera más verano), puede observarse que el rendimiento en todos los quimiotipos fue mayor cuando se realizaron dos cortes. De esta forma se obtuvo un aumento aproximado del 30% en el rendimiento de hoja seca respecto al corte de fin de verano, siendo citral y linalol los quimiotipos más productivos. El mismo comportamiento se volvió a observar en el segundo año de producción, siendo nuevamente los quimiotipos citral y linalol, los que han resultado ser de mayor productividad, tal como se ha explicado anteriormente.

También es interesante destacar que realizando un solo corte al final del verano del primer año, se obtuvo mayor rendimiento que en el corte de primavera en todos los quimiotipos. Esto concuerda con resultados obtenidos en un ensayo realizado en Brasil con la misma especie, donde se evaluó la influencia de la época de plantación y el tiempo transcurrido hasta el momento de cosecha sobre la producción de hoja y se observó que la misma fue mayor en la cosecha realizada a los siete meses de la plantación de primavera, debido a un mayor desarrollo de la planta causado por los factores climáticos favorables del verano (Dias Elhert, 2003).

Otros autores, durante tres años de ensayo con tomillo (*Thymus vulgaris*), obtuvieron el mayor rendimiento de hoja seca cosechando al final del verano y concluyeron que el mayor

rendimiento de la cosecha era a causa de la mayor radiación y temperatura (Özgüven y Tansi, 1998).

4.3. Rendimiento de aceite esencial con relación a la época de cosecha

Analizando el rendimiento de aceite esencial y su relación con la época de cosecha, puede observarse un aumento del rendimiento en todos los quimiotipos cuando fueron cosechados al final del verano. Esto podría ser el resultado de la mayor intensidad lumínica durante el verano, la cual causó un mayor desarrollo de las hojas que se traduce tanto en un aumento de biomasa como en una mayor producción de aceite esencial (Dias Elhert, 2003).

La alta productividad del quimiotipo linalol y su estabilidad en el tiempo, coincide con los resultados de ensayos previos en otras regiones, donde se comparó el rendimiento de aceite esencial entre los quimiotipos citral, carvona y linalol, observándose el mayor rendimiento del quimiotipo linalol, que tiene importancia porque este compuesto es comercializado y resulta de gran interés en la industria (Yamamoto y col., 2008).

En lo que respecta al quimiotipo carvona, presentó un rendimiento aceptable, el cual se acercó a los resultados obtenidos en ensayos realizados en Costa Rica, donde se obtuvo un rendimiento de 1,9 % (Ocampo Sánchez y col., 2007).

El quimiotipo citral fue el que presentó menor rendimiento de aceite esencial, sin embargo en la cosecha del segundo año, mostró un leve aumento, el cual supera el rendimiento del mismo quimiotipo evaluado en otro ensayo (Celis Melo, 2007).

También es interesante destacar que el quimiotipo dihidrocarvona superó a todos los quimiotipos, mostrando estabilidad de su rendimiento durante las dos campañas.

En otra experiencia, donde se evaluó la influencia de dos épocas de cosecha sobre el rendimiento de aceite esencial, se observó que en la segunda cosecha el rendimiento fue muy superior, probablemente debido a que las plantas ya estaban completamente establecidas (Alves dos Santos, 2006).

Otros autores que evaluaron la misma especie, también confirmaron que el contenido de aceite esencial depende del estado de madurez de la planta (Celis Melo, 2007).

Los resultados del rendimiento de aceite esencial de los cuatro quimiotipos evaluados en esta tesis concuerdan con informes que indican que el mayor rendimiento de aceite esencial de esta especie se obtiene al segundo y tercer año de cultivo (Fuentes Fiallo y col., 2000).

Similares resultados se obtuvieron en el rendimiento de aceite esencial de tomillo evaluado en distintas épocas de cosecha, donde se concluyó que el mayor rendimiento obtenido en la cosecha postfloración fue a causa de los factores climáticos externos (Özgüven y Tansi, 1998). Otros autores, también reportaron que el mayor rendimiento de aceite esencial de *L. alba* obtenido a mayor tiempo transcurrido desde el trasplante era a causa de un mayor desarrollo de la planta (Guzmán y col., 2004).

Analizando en forma conjunta los cuatro quimiotipos de *L. alba* mencionados previamente, se observó un aumento del rendimiento de aceite esencial en la cosecha del segundo año, lo cual concuerda con resultados obtenidos en ensayos previos en los cuales se produjo el mayor

rendimiento de aceite esencial en la cosecha al segundo año de iniciado el cultivo de esta especie (Davies, 2004).

4.4. Efectos farmacológicos y su relación con el perfil cromatográfico de las esencias de *Lippia alba*:

Los aceites esenciales de los cuatro quimiotipos de *Lippia alba* demostraron tener actividad antiespasmódica intestinal en los estudios *ex vivo* de trozos de duodeno e íleon aislados de rata frente a la contracción evocada por acetilcolina (Ach). Este fármaco es el agonista muscarínico endógeno mediador de la estimulación vagal, rama del sistema nervioso autónomo parasimpático. El modelo simula un espasmo intestinal mediado por hiperestimulación vagal. Sin embargo, ninguna de las esencias provocó antagonismo competitivo, que se hubiera evidenciado por un corrimiento a la derecha de la CCR de Ach, por lo cual no tienen propiedades antimuscarínicas. Las esencias inhibieron a las CCR de Ach de modo no competitivo, según se aprecia por la reducción del efecto máximo (Emax) en modo dependiente de la concentración de la esencia (Kenakin, 1984). La comparación de las CI_{50} de las esencias de los cuatro quimiotipos muestra que “cital” es alrededor de 10 veces más potente que las otras tres en inhibir las CCR de acetilcolina (Figura 27). La mayor potencia de la esencia del quimiotipo “cital” podría deberse al mayor contenido de limoneno, mirceno, neral, y geranial. En bibliografía ha sido reportado el efecto relajante del músculo liso vascular para el compuesto cital (constituido por neral y geranial) (Devi y col., 2012) y del íleon de rata contraído por diversos agonistas (Sadraei y col., 2003; Devi y col., 2012). En íleon de conejo también ha sido reportado un efecto espasmolítico del cital, que se asoció a producción de óxido nítrico (NO) y bloqueo no-competitivo de la CCR de calcio, al igual que verapamil (Devi y col., 2011). Esos resultados acuerdan con los presentados en esta tesis para las cuatro esencias, siendo la de “cital” la más potente (Figura 27).

Comparando las composiciones de los aceites esenciales, también se encontró mayor contenido de mirceno en la esencia del quimiotipo “cital” (6,6%) que en la de “carvona” (0,5%), “linalol” (0,2%) y “dihidrocarvona” (0,3%), lo que permite suponer que este compuesto también contribuyó a la mayor actividad antiespasmódica. El mirceno también mostró un leve efecto antiespasmódico en trabajos realizados en íleon de cobayo (Câmara y col., 2003).

El quimiotipo “carvona” tiene una esencia rica en (-) carvona, la cual ha sido encontrada en otras especies como *Aloysia polystachya* (Werdin González y col., 2010) y el género *Mentha*, en el que se le atribuyó efecto antiespasmódico (de Sousa y col., 2008). Otros autores describieron la presencia de este monoterpeno cetónico en el aceite esencial de *Lippia alba* (Da Silva, 2011) y su efecto relajante en el íleon de cobayo (Souza y col., 2013). En el laboratorio donde se hizo esta tesis se encontró que el compuesto puro (-)-carvona inhibió en modo no-competitivo las contracciones muscarínicas del íleon de rata pero casi no modificó la contracción máxima de una CCR de Ca^{2+} en medio de alta $[K^+]$ (Consolini y col., 2011). Esos resultados sugerían que (-)-carvona no sería un bloqueante de los canales de Ca^{2+} sino que podría activar directamente los canales de K^+ . Esto se concluye porque la hiperpolarización resultante del eflujo de K^+ reduciría el influjo de Ca^{2+} frente a agonistas como la acetilcolina pero no podría hacerlo en el medio ya despolarizado por alta $[K^+]$ (Quast, 1993). Por lo tanto, (-)- carvona podría contribuir al efecto espasmolítico de la esencia del

quimiotipo “carvona” frente a acetilcolina pero no contribuiría a la inhibición de las CCR de Ca^{2+} en medio de alta $[\text{K}^+]$. De acuerdo con esto, los resultados de esta tesis muestran que la esencia rica en carvona (45,9%) produjo efecto antiespasmódico frente a Ach, pero tuvo menor potencia que las esencias de los quimiotipos “citral” y “linalol”, en coincidencia con esos resultados previos obtenidos con el compuesto puro (Consolini y col., 2011). La presencia de bajas cantidades de mirceno (0,5%) podría contribuir al moderado efecto espasmolítico, según se describió anteriormente. Sin embargo, la esencia del quimiotipo “carvona” es la que tiene mayor contenido de limoneno (26%), y se ha informado que este compuesto exhibe relajación muscular en ratones (Gurgel do Vale y col., 2002).

La esencia del quimiotipo “dihidrocarvona” también produjo un comportamiento similar a los otros quimiotipos, debido a una inhibición no competitiva de la CCR de Ach, mostrando un efecto antiespasmódico, aunque con menor potencia que el del quimiotipo “citral”. Su efecto podría deberse a su contenido de cariofileno (3,6%) además de la presencia de dihidrocarvona (70,3%) siendo los mismos, los componentes mayoritarios del aceite esencial. También hay cariofileno en los quimiotipos “citral” (3,8%) y linalol (2,7%). En trabajos anteriores, se ha demostrado que si bien el cariofileno tuvo un leve efecto antiespasmódico en duodenos de cobayo, la mezcla del mismo con alfa-pineno produjo un efecto aditivo, lo cual aumentó considerablemente el efecto antiespasmódico (Câmara y col., 2003). No se encontraron reportes bibliográficos acerca del efecto de la dihidrocarvona.

La esencia de “linalol” también tuvo un efecto antiespasmódico; esto probablemente se debió a la presencia del linalol (64,2%) y al contenido de cariofileno (2,7%) cuyo comportamiento se explicó anteriormente. También es el único quimiotipo que tiene alto contenido de 1,8-cineol (6%). Se ha reportado en bibliografía que el 1,8 cineol inhibe las contracciones del íleon de cobayo evocadas por estímulo eléctrico de campo con una CI_{50} de alrededor de 0,10 mM (Lee y col., 2009).

Otro componente encontrado en alta proporción en las esencias (Tabla 7) es el germacreno, del cual no hay reportes sobre actividad antiespasmódica pero ha demostrado tener actividad antinociceptiva (Shah y col., 2012).

4.5. Mecanismos de acción

Para dilucidar el mecanismo causante del bloqueo no-competitivo de los aceites esenciales, se evaluó la posibilidad de que estimularan la formación de óxido nítrico (NO), un activador natural de la guanilato-ciclase, que activa vías relajantes dependientes de GMPc. La Figura 28 muestra que el pretratamiento con el inhibidor de la NO-sintasa L-NAME aumentó más de 3 veces la CI_{50} de la esencia más potente “citral”, frente a Ach. Esta reducción en la potencia sugiere que parte del efecto de la esencia se debe a la formación de NO, lo cual podría asociarse a la presencia de citral, como se describió anteriormente. Sin embargo, el bloqueo no-competitivo persistió en presencia de L-NAME, sugiriendo la activación de otro mecanismo principal. Se evaluó entonces la capacidad de las esencias de afectar el influjo de Ca^{2+} al músculo liso intestinal. Como control positivo se evaluó el efecto del bloqueante de los canales de Ca^{2+} verapamil. Esta droga se comportó también como antagonista no-competitivo de la Ach (Figura 28). El $\text{pD}'2$ de verapamil frente a acetilcolina resultó de $6,22 \pm 0,16$ lo cual sugiere que la concentración de verapamil que ocupa la mitad de los

receptores es aproximadamente de 1 $\mu\text{mol/L}$, lo cual está de acuerdo con otras estimaciones de bibliografía (Ishii y col., 1985). Esto sugiere que todos estos efectos del verapamil dependen de la interacción droga-receptor con los canales de calcio. Es notorio que, a pesar de conocerse al verapamil como un bloqueante de los canales de Ca^{2+} , se haya comportado también como un antagonista no-competitivo de las CCR de Ca^{2+} en medio despolarizante de alta $[\text{K}^+]$ (Figura 30). Esto podría asociarse a su modo de interacción con los canales, que ocurre desde el interior de la célula en un sitio diferente al de unión del Ca^{2+} , tal como fue informado en músculo intestinal (Spedding, 1985) y ventricular (Ishii y col., 1985). Las esencias de los quimiotipos “citra” y “linalol” exhibieron el mismo comportamiento que verapamil.

Si bien la esencia del quimiotipo “citra” fue más potente que las esencias de los otros quimiotipos para inhibir en modo no-competitivo la contracción por acetilcolina, se comportó similarmente a una de ellas (linalol) en la inhibición de las CCR de calcio. Esto sugiere que ambas esencias presentan componentes inhibidores del influjo de calcio, y algunas de ellas podrían tener otros componentes que atenúan ese efecto en la contracción muscarínica, por lo cual aparecen menos potentes que el quimiotipo “citra”. En la composición de la esencia de “linalol” se encuentran los componentes germacreno y beta cariofileno, comunes con la del quimiotipo citra. Este es el primer informe bibliográfico acerca del efecto de este quimiotipo rico en linalol.

4.6. Parámetros de calidad de la droga vegetal

Humedad

Para hierbas culinarias y especias, está establecido en el caso del orégano (*Origanum* sp.) un requisito en el contenido de humedad del 12% tanto para hojas enteras o cortadas como para el material molido (norma IRAM 18971); también existen valores estandarizados para otras especies como *Peumus boldus* “boldo” (10%), *Aloysia citriodora* “cedrón”(11%), *Eucalyptus* sp. “eucalipto” (10%), *Ginkgo biloba* “ginkgo” (11%), *Mentha* sp. “menta” (11%) e *Ilex paraguariensis* “yerba mate” (9,5%) (Farmacopea Argentina 7^a Ed., 2003).

Si bien en la bibliografía no existen referencias específicas para *L. alba*, los resultados obtenidos en este trabajo se encontraron dentro de los valores que se consideran admisibles para una droga vegetal; por lo tanto se podría afirmar que el método de secado utilizado para las plantas de *Lippia* ha sido satisfactorio, ya que se obtuvo droga vegetal de calidad aceptable.

En otra experiencia, Albes dos Santos e Innecco (2005) evaluaron la influencia del período de secado de la hoja en la volatilidad y estabilidad del aceite esencial de *L. alba*, utilizando el método de secado por corriente de aire natural y reportaron que el porcentaje de humedad de la hoja tendía a estabilizarse luego del octavo día, debido al balance higroscópico que se establece entre el material vegetal y el ambiente. Estos resultados permiten reafirmar que el secado natural de la droga vegetal realizado en esta tesis ha resultado ser un método adecuado para esta especie.

Cenizas

Teniendo en cuenta que en la Farmacopea Argentina sólo existen valores estandarizados para las especies mencionadas previamente (boldo: 13%; cedrón: 10%; eucalipto: 6%; ginkgo: 11%; menta: 15%; yerba mate: 9%) y los resultados obtenidos en el análisis de cenizas totales realizado para *L. alba* en la presente tesis, se aproximaron a los valores obtenidos en ensayos previos realizados con la misma especie (Ringuelet y col., 2007), podría indicarse que los mismos se encuentran dentro de los parámetros aceptables.

Para el caso de cenizas insolubles en ácido, tampoco existen registros sobre el análisis de la especie evaluada en esta tesis; por lo tanto se podrían tomar los resultados obtenidos como referencia para una posible elaboración de normas.

Color

El cambio de coloración en tejidos verdes es causado principalmente por la degradación de los pigmentos (especialmente clorofilas), lo que ocasiona una variación desde el verde brillante hacia el verde oliva (Curutchet y col., 2014). Los quimiotipos que mostraron mayores variaciones en los parámetros analizados fueron: linalol en la coordenada L^* y carvona y dihidrocarvona en las coordenadas a^* , b^* y en los valores de hue y croma.

Se puede deducir que el procedimiento de secado utilizado para el tratamiento de la droga cruda no afectó detrimentalmente el color de la misma, ya que los valores de luminosidad (L^*) no evidenciaron la incidencia del pardeamiento (oscurecimiento) de las hojas.

De todo esto se desprende que el secado con corriente de aire natural a temperatura ambiente es una buena herramienta, ya que no afecta la calidad sensorial de la droga cruda, lo cual podría ocurrir en caso de someterla a un tratamiento térmico que además podría inducir, según las condiciones, una mayor pérdida de los componentes volátiles (Levaj y col., 2012).

En experiencias anteriores, donde se evaluaron diferentes métodos de secado de hierbas, se comprobó que mediante el secado natural a temperatura ambiente en habitaciones ventiladas durante tres semanas, las muestras presentaron el mayor contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante (Hossain y col, 2010).

En otro ensayo realizado con hojas de romero, donde se evaluó la incidencia de distintos métodos de secado, se observó que la muestra secada al sol presentó el valor más alto de L^* , el cual fue el más cercano al valor L^* de la muestra fresca; mientras que el secado en estufa redujo significativamente el valor de luminosidad (Arslan y Özcan, 2008).

En el caso de *L. alba*, al no existir en bibliografía datos sobre mediciones del color, se podría afirmar que el método de secado utilizado respondió satisfactoriamente, porque además de permitir la conservación de la calidad comercial de la hierba, es un método simple y de bajo costo.

5. Conclusiones

- * Este trabajo demuestra que la especie *Lippia alba* se adaptó bien en el aspecto agronómico a las condiciones edafoclimáticas locales, excepto los quimiotipos carvona y dihidrocarvona, que mostraron menor rendimiento de hoja con respecto a los quimiotipos linalol y citral, debido a situaciones climáticas desfavorables tales como períodos con exceso de lluvias y alta humedad relativa, que se presentaron en el transcurso de los ensayos y al tipo de suelo de nuestra región.
- * Los quimiotipos estudiados mostraron diferente respuesta con relación a la época y cantidad de cortes al año. Linalol y citral fueron los que tuvieron el mejor desarrollo, lo que se tradujo en el mayor rendimiento de hoja; por lo tanto se puede recomendar su cultivo en esta zona debido a su normal comportamiento, comparando los resultados obtenidos en otras experiencias.
- * Las condiciones edafoclimáticas locales no favorecieron un buen desempeño de los quimiotipos carvona y dihidrocarvona en cuanto a la producción de hoja, sin embargo produjeron un buen rendimiento de aceite esencial.
- * De acuerdo a los rendimientos de hoja obtenidos en nuestra región, se observó que la especie permite hacer dos cosechas por año (primavera y verano), o en su defecto una cosecha al final del verano.
- * Considerando que al tratarse de un cultivo intensivo que demanda gran cantidad de mano de obra temporal, con el consiguiente aumento de costos (fundamentalmente en el período de recolección y durante el acondicionamiento de la droga vegetal) la cantidad de cortes también estará determinada por los costos de producción.
- * También es importante tener en cuenta que con el transcurso del tiempo algunos quimiotipos desarrollan mayor proporción de tallos que de hojas, lo cual se traducirá en el menor rendimiento de droga vegetal y será un factor decisivo en el número de cortes.
- * En cuanto al rendimiento de aceite esencial, según los resultados obtenidos en esta tesis y los datos bibliográficos hallados, el mayor rendimiento se obtuvo en la cosecha al final del verano.
- * El método de secado empleado y todo el proceso postcosecha han sido adecuados, ya que permitieron obtener las características organolépticas óptimas.
- * Al tratarse de una especie muy poco conocida en nuestra región y en el mercado herborístico local, aún se requiere tiempo y esfuerzo para continuar con ensayos que permitan su estandarización e introducción tanto como producto fitoterapéutico como en la formulación de productos farmacéuticos e industriales.

* El efecto antiespasmódico de las esencias está correctamente comprobado y valida el uso etnoterapéutico de esta planta en el alivio de espamos y malestares intestinales. El mismo podría ser causado por la presencia de varios compuestos terpénicos del aceite esencial, pero también puede ser el resultado del efecto sinérgico entre dos o más compuestos. Si bien los cuatro quimiotipos manifiestan la misma actividad farmacológica, el más potente es el aceite esencial del quimiotipo “citra”.

* Los resultados de esta tesis muestran que las esencias tienen el mismo efecto cualitativo que el antes reportado para las infusiones y tinturas. Esto da la posibilidad de aplicar la esencia en pequeñas cantidades en preparaciones magistrales y oficinales para el tratamiento de espasmos gastrointestinales, con ventajas en la más precisa dosificación y el menor riesgo de efectos adversos asociados a la presencia de sustancias fijas extraíbles en una tintura, infusión o decocción.

6. Referencias bibliográficas

- Acosta de la Luz, L; Rodríguez Ferrada, C (2006). Cultivo, Cosecha y Manejo poscosecha, factores determinantes en la producción de drogas vegetales con calidad. Estación Experimental de Plantas Medicinales Dr. Juan Tomás Roig, La Habana; Cuba.
- Adams RP (2007). Identification of essential oil Components by gas chromatography/mass spectrometry, 4th Ed. Allured Publishing Corporation. Carol Stream, Illinois.
- Alonso J, Desmarchelier C (2005) Plantas Medicinales Autóctonas de la Argentina. Ed. LOLA (Literature of Latin American). p. 508-514.
- Alves dos Santos M R, Inneco R, Soares A A (2004). Caracterização anatômica das estruturas secretoras e produção de óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E. BR. em função do horário de colheita nas estações seca e chuvosa. Rev Ciênc Agron 35: 377-383.
- Alves dos Santos M R, Inneco R (2005). Processamento de folhas de *Lippia alba* visando a maximização da produção de limoneno e carvona. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 29: 5-14. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Centro de Pesquisa Agroflorestal de Rondônia. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (EMBRAPA).
- Alves dos Santos M R, Fernandes C F, Inneco R (2006). Efeitos da adubação orgânica na produção de biomassa e óleo essencial de *Lippia alba*. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 32: 5-9. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Centro de Pesquisa Agroflorestal de Rondônia. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (EMBRAPA).
- Arslan D, Özcan M (2008). Evaluation of drying methods with respect to drying kinetics, mineral content and colour characteristics of rosemary leaves. Energy Conversion and Management 49: 1258–1264.
- Amat A, Yajía M (1998). Plantas Vasculares Utilizadas en la Fitoterapia Popular en la Provincia de Misiones, Argentina. Farmacobotánica y Farmacognosia en Argentina (1980-1998), Univ. Nac. Misiones.
- Antolinez Delgado C A, Rodríguez López, N (2008). Plasticidad fenotípica en *Lippia alba* y *Lippia organoides* (Verbenaceae): Respuesta a la disponibilidad de nitrógeno. Acta biol Colomb 13 (1): 53-64.
- Arvelija C, Walter C (2010). Antimicrobial agents deriving from indigenous plants. Recent Pat Food Nutr Agric 2 (1): 83-92.
- Babushok V I, Linstrom P J, Zenkevich I G (2011). Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. Journal of Physical and Chemical Reference Data. 40: 1-47.
- Bandoni A L, Mendiondo ME, Rondina RV, Coussio JD (1972). Survey of Argentine medicinal plants.I. Folklore and phytochemical screening. Journal of Natural Products 35: 69-81.
- Bandoni, A L. Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica. Ed UNLP; 2002. 410 pp.
- Câmara C, Nascimento N R F, Macêdo F L C, Almeida F B, Manassés C F (2003). Antispasmodic effect of the essential oil of *Plectranthus barbatus* and some major constituents on the Guinea-pig ileum. Planta Med 69: 1080-1085.
- Cañigueral S, Dellacassa E, Bandoni A L (2003). Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿Indicadores de dependencia o factores de desarrollo? Acta Farm. Bonaerense 22 (3): 265-279.
- Capasso F, Gaginella T, Grandolini G, Izzo A (2003). Phytotherapy. Springer-Verlag Berlín Heidelberg.
- Cerimele E, Ringuet J A. Buenas prácticas agrícolas para cultivos aromáticos. Su incidencia en la calidad. En: Dellacassa, E. Normalización de productos Naturales Obtenidos de Especies de la Flora Aromática Latinoamericana. Ed Universitária da PUCRS, Porto Alegre, Brasil; 2010. p. 15-36.
- Celis Melo C N (2007). Estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de *Lippia alba*, *Lippia organoides* y *Phyla (Lippia) dulcis*, especies de la

- familia Verbenaceae. Universidad industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Bucaramanga; Colombia.
- Ciccio J F, Ocampo R. Distribución biogeográfica de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. Ex Britton & Wilson y quimiotipos en América y el Caribe. En: Dellacassa, E. Normalización de productos Naturales Obtenidos de Especies de la Flora Aromática Latinoamericana. Ed Universitária da PUCRS, Porto Alegre, Brasil; 2010. p. 107-130.
- Ciccio J F, Ocampo R A (2004). Aceite esencial de *Lippia alba* (Verbenaceae) cultivada en el trópico húmedo en el Caribe de Costa Rica. Ing. Cienc. Quím. 21 (1-2): 13-16.
- Conde R, Corrêa V S C, Carmona F, Contini S H T, Pereira A M S (2011). Chemical composition and therapeutic effects of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown leaves hydro-alcoholic extract in patients with migraine. Phymedicine 18: 1197– 1201.
- Consolini A.E, Ragone M.I., Tambussi A, Paura A (2007). “Estudio observacional del Consumo de Plantas Medicinales en La Provincia de Buenos Aires, Argentina, en el periodo Diciembre de 2004- Noviembre de 2005”. Lat. Am. J. Pharm. 26 (6): 924-936.
- Consolini AE, Berardi A, Rosella MA. and Volonté MG (2011). Antispasmodic effects of *Aloysia polystachya* and *A. gratissima* tinctures and extracts are due to non-competitive inhibition of intestinal contractility induced by acetylcholine and calcium. Revista Brasileira de Farmacognosia 21(5): 889-900.
- Curutchet A, Dellacassa E, Ringuet J A, Chaves A R, Viña S Z (2014). Nutritional and sensory quality during refrigerated storage of fresh-cut mints (*Mentha* × *piperita* and *M. spicata*). Food Chem 143: 231–238.
- Da Silva, GB (2011). Isolamento, caracterização, quantificação e avaliação da pureza enantiomérica da linalol, carvona e limoneno em óleos essenciais de espécies aromáticas. Dissertation, Universidad Federal de Sergipe, Brazil.
- Davis P. Salvia trepadora. En: Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Estudios en Domesticación y Cultivo de Especies Medicinales y Aromáticas Nativas. Las Brujas, Uruguay; 2004. p. 95-99.
- de Abreu Matos FJ, Machado MIL, Craveiro A A, Alencar JW (1996). Essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in northeast Brazil. *Journal of Essential Oil Research* 8 (6): 695-698.
- Dellacassa E. Normalización de productos Naturales Obtenidos de Especies de la Flora Aromática Latinoamericana. Ed Universitária da PUCRS, Porto Alegre, Brasil; 2010. 337 pp.
- De Sousa D P, Genival A, Andrade L, Calasans F, Nunes X, Barbosa J, Batista J (2008) “Structure and spasmolytic activity relationships of monoterpene analogues found in many aromatic plants” *Z. Naturforsch* 63: 808-812.
- Devi R Ch, Sim S M, Ismail R (2011). Spasmolytic effect of citral and extracts of *Cymbopogon citratus* on isolated rabbit ileum. *Journal of Smooth Muscle Research* 47: 143-156.
- Devi RCh, Sim SM, Ismail R (2012). Effect of *Cymbopogon citratus* and citral on vascular smooth muscle of the isolated thoracic rat aorta. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012:1-8
- Dias Ehlert P A (2003). Epocas de plantio, idades e horários de colheita na produção e qualidade do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br., quimiotipo Limoneno-Carvona. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Campus de Botucatu.
- Di Stasi LC, Hiruma CA, Guimarães EM, Santos C D (1994). Medicinal plants popularly used in Brazilian Amazon. *Fitoterapia* 65: 529-540.
- Duque A L, Giraldo G G A, Mejía D C M (2007). Variación del color en mango, mora y uchuva en diferentes tratamientos de deshidratación osmótica. *Revista de Investigaciones. Universidad del Quindío, Armenia; Colombia.* 17: 19-26.
- Duque Villegas A (2003). Prontoalivio. En: Díaz, JA (Ed). Informe Técnico. Caracterización del mercado colombiano de plantas medicinales y aromáticas. Instituto Alexander von Humboldt. Bogotá DC, Colombia. 79 pp.
- Farmacopea Nacional Argentina Séptima Edición, 2003. Comisión Permanente de Farmacopea Argentina. Ministerio de Salud. ANMAT. INAME.

- Fuentes Fiallo V R, Lemes Hernandez C M, Rodriguez Ferradá C A, Germosén Rabineau L. Manual de cultivo y conservación de plantas medicinales. Ed Centenario, Santo Domingo, Rep. Dom.; 2000. p 77-79.
- Fernandes Pauletti G, Atti Serafini L, Rotta L, Atti dos Santos A C, Rosatto M. Banco ativo de germoplasma de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. En: Dellacassa, E. Normalización de productos Naturales Obtenidos de Especies de la Flora Aromática Latinoamericana. Ed Universitária da PUCRS, Porto Alegre, Brasil; 2010. p. 193-203.
- Guerrero MF, Puebla P, Carrón R, Martín ML, Arteaga L, Román LS (2002). Assessment of the antihypertensive and vasodilator effects of ethanolic extracts of some Colombian medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology* 80 (1): 37-42.
- Gurgel do Vale T, Couto Furtado E, Santos J G and Viana G S B (2002). Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. *Phytomedicine* 9: 709–714.
- Guzmán Rivera S P, Cardozo Z R, García N V (2004). Desarrollo agrotecnológico de *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown ex Britton & Wilson. *Revista científica Guillermo de Ockham* 7 (1): 201-215, Universidad de San Buenaventura, Cali; Colombia.
- Haldar S, Kar B, Dolai N, Kumar RB, Behera B (2012). In vivo anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of *Lippia alba*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 2012: 667-670.
- Hennebelle T, Sahpaz S, Joseph H, Bailleul F (2008). Ethnopharmacology of *Lippia alba*. *J Ethnopharmacol* 16: 211-222.
- Hernández V H, Bonilla C C, Sánchez O M (2004). Efecto de la fertilización nitrogenada en la producción de biomasa y calidad de aceite esencial en *Lippia alba* (Miller), pronto alivio. *Acta agron.* 53 (1): 40-47.
- Hossain M B, Barry-Ryan C, Martin-Diana A, Brunton N P (2010). Effect of drying method on the antioxidant capacity of six Lamiaceae herbs. *Food Chem* 123: 85–91.
- INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria). Estudios en Domesticación y Cultivo de Especies Medicinales y Aromáticas Nativas. Las Brujas, Uruguay; 2004. p. 95-99
- IRAM (Instituto Argentino de Normalización y Certificación) (2007). Norma 18985: Especies y condimentos. Determinación de cenizas insolubles en ácido.
- IRAM (Instituto Argentino de Normalización y Certificación) (2007). Norma 18982: Especies y condimentos. Determinación de humedad. Método por arrastre.
- Ishii K, Taira N, Yanagisawa T (1985). Differential antagonism by Bay K 8644, a dihydropyridine calcium agonist, of the negative inotropic effects of nifedipine, verapamil, diltiazem and manganese ions in canine ventricular muscle. *British Journal of Pharmacology* 84: 577–584.
- Kenakin TP (1984). The classification of drugs and drug receptors in isolated tissues. *Pharmacological Reviews* 36 (3): 165-222.
- Kumar S, Bahl J R, Bansal R P, Garg S N, Naqvi A A, Khanuja S P S, Sinha S. (2002). U.S. Patent No. PP13,110. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Lahitte, H.B., J.A. Hurrell, M.J. Belgrano, L.S. Jankowski, P. Haloua, & K. Mehlreter. Plantas medicinales rioplatenses. Ed Literatura of Latin America (L.O.L.A.), Buenos Aires. 1998.
- Lee J Y, Kang H S, Park B E, Moon H J, Sim S S, Kim C J (2009). Inhibitory effects of Geijigajakyak-Tang on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Journal of Ethnopharmacology* 126: 244–251.
- Levaj, B., Repajić, M., Mušić, A., & Bursać Kovačević, D (2012). Effect of maceration and pasteurization on colour of cloudy sour cherry Marasca (*Prunus Cerasus* var. Marasca) juice. In: *6th Central European Congress on Food*. Novi Sad, Croatia.
- Luján M C, Barboza G E (2008). Control de calidad botánico e higiénico-sanitario de muestras comerciales usadas como droga cruda en Argentina. *Arnaldoa* 15 (1): 109–125.
- Martínez J V, Bernal H Y, Cáceres A (Eds) (2000). Fundamentos de Agrotecnología de Cultivo de Plantas Medicinales Iberoamericanas. Ed. Convenio Andrés Bello (CAB) y Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CyTED). Bogotá, D.C, Colombia. 493 pp.
- Marzocca A. Vademecum de malezas medicinales. Ed. Orientación gráfica, Buenos Aires.1997.

- Mitcham B, Cantwell M, Kader A (1996) Methods for determining quality of fresh commodities. Perishables handling newsletter 85: 1-5.
- Montiel J, Mesa A A, Durán C, Bueno J G, Galvis B L, Stashenko E (2007). Evaluación de la actividad anti-Candida y anti-Aspergillus de aceites esenciales de *Lippia alba* (Mill) N.E.Br. quimiotipo carvona-limoneno y su asociación con sus componentes mayoritarios. *Scientia et Technica* 13 (33): 242-246.
- Muñoz F. Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y procesado. Ed. Mundi-Prensa Libros. 1987. 365 pp.
- Nogueira M A, Diaz G, Sakumo L (2007). Antibacterial activity of *Lippia alba* (Lemon Herb). *Lat Am J Pharm* 26: 404-406.
- Ocampo Sánchez R A, Valverde R. Manual de cultivo y conservación de plantas medicinales. 1ª ed; San José, Costa Rica. 2000. p. 97-100.
- Ocampo S R, Ringuelet J, Burillo J, Pauletti G, Ciccio F, Dellacassa E, Villamil J. Variabilidad genética y quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. en América. V Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y El Caribe. Montevideo, Uruguay. 23 al 25 de noviembre de 2005.
- Ocampo S R, Martínez J V, Cáceres A. Manual de agrotecnología de plantas medicinales nativas. 1ª ed. Ed Sanabria; San José, Costa Rica. 2007. p 78-87.
- Oliveira G T, Ferreira J M S, Rosa L H, Pessoa de Siqueira E, Johann S, Santos Lima L A R. In vitro antifungal activities of leaf extracts of *Lippia alba* (Verbenaceae) against clinically important yeast species. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 47 (2): 247-50, 2014.
- OMS. WHO Monographs on selected medicinal plants. Geneva. Ed. WHO, 1999.
- OMS. The Promotion and Development of Traditional Medicine, Ed. WHO, Technical Report Series 622: 44, Geneva. 1978.
- OMS. Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales. Ginebra. 2003.
- Özgülven M, Tansi S (1998). Drug Yield and Essential Oil of *Thymus vulgaris* L. as in Influenced by Ecological and Ontogenetical Variation. *Tr. J. of Agriculture and Forestry* 22: 537-542.
- Parra Garcés MI, Caroprese JF, Arrieta Prieto D, Stashenko E (2010). Morfología, anatomía, ontogenia y composición química de metabolitos secundarios en inflorescencias de *Lippia alba* (Verbenaceae). *Rev. Biol. Trop.* 58 (4): 1533-1548.
- (a) Pascual ME, Slowing K, Carretero E, Sánchez Mata D, Villar A (2001). *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *J Ethnopharmacol* 76: 201-214.
- (b) Pascual ME, Slowing K, Carretero M E, Villar Á (2001). Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae). *Farmaco* 56 (5): 501-504.
- Pauletti FG, Serafini L A, Rota L, dos Santos A C A, Rosatto M. Banco ativo de germoplasma de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. En: Dellacassa, E. Normalización de productos Naturales Obtenidos de Especies de la Flora Aromática Latinoamericana. Ed Universitária da PUCRS, Porto Alegre, Brasil; 2010. p.194-203.
- Pérez IC (2008). El uso de las plantas medicinales. *Revista Intercultural. Universidad Veracruzana Intercultural.* http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/8921/1/tra6_p23-26_2010-0.pdf
- Pimenta MR, Fernandes LS, Pereira UJ, García LS, Leal SR, Leitão SG, Salimena FRG, Viccini LF e Peixoto P H P (2007). Floração, germinação e estaquia em espécies de *Lippia* (Verbenaceae). *Revista Brasil Bot* 30 (2): 211-220.
- Porto Verdecia M, Ceballos VR, Ganzó DN, Arévalo MJ, Cáceres A (2000). Agrotecnología para el cultivo de salvia sija o pronto alivio. En: Martínez J V, Bernal H Y, Cáceres A. Fundamentos de Agrotecnología de Cultivo de Plantas Medicinales Iberoamericanas. Ed. Convenio Andrés Bello (CAB) y Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CyTED). 2000. Bogotá, D.C, Colombia. 493 pp.
- Quast U (1993). Do the K⁺ channel openers relax smooth muscle by opening K⁺ channels? *Trends in Pharmacological Sciences* 14: 332-337.
- Retamar JA (1982). Variaciones fitoquímicas de la especie *Lippia alba* (salvia morada) y sus aplicaciones en la química fina. *Essenze e derivati agrumari* 64 (1): 55-60.

- Ringuelet J, Bandoni A, Dellacassa E (2007). Importancia de la normalización en la puesta en valor de plantas nativas: el caso *Lippia alba*. En: XVI Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina de la Sociedad Italo-latinoamericana de Etnomedicina (SILAE). La Plata, Argentina.
- Ringuelet J, Cerimele E, Henning C, Re M S (1996). Contribución al estudio de la relación entre rendimiento de esencia y época de corte en *Rosmarinus officinalis* L. En: Anales de SAIPA VII Congreso Nacional de Recursos Naturales Aromáticos y Medicinales 14: 155-159.
- Ringuelet J, Ciccio J, Alberti JF, Ocampo Sánchez RA, Henning C, Padin S, Cerimele E, Urrutia M. Repelencia y mortalidad de la esencia de *Lippia alba* sobre *Tribolium castaneum*. Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica "Prof. Emérito Patrick Moyna".V., Montevideo, UY, 28 Nov.-2 Dic. 2005.
- Ragone M.I. , Sella M, Conforti P, Volonté MG, Consolini AE (2007). The spasmolytic effect of *Aloysia citriodora*, Palau (South American cedrón) is partially due to its vitexin but not isovitexin on rat duodenum. *Journal of Ethnopharmacology*, 113: 258-266.
- Sadraei H., Ghannadib A., Malekshahi K.. Relaxant effect of essential oil of *Melissa officinalis* and citral on rat ileum contractions. *Fitoterapia* (74): 445-452, 2003.
- Scarpa G F (2004) Medicinal plants used by the Criollos of Northwestern Argentine, Chaco. *Journal of Ethnopharmacology* 91(1): 115-135.
- Shah S M M, Ullah F, Hassan S M S, Zahoor M and Sadiq A (2012) Analysis of chemical constituents and antinociceptive potential of essential oil of *Teucrium stocksianum* bioss collected from the North West of Pakistan. *Complementary and Alternative Medicine (BMC)* 12 (244): 1-6.
- Sharapin N. "Materias primas vegetales para la industria de productos fitoterapéuticos". *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Ed: Convenio Andrés Bello (CAB)-CYTED (Ciencia y tecnología para el desarrollo). Bogotá, Colombia; 2000. 210 pp.
- Soraru SB, Bandoni A. *Plantas de la medicina popular argentina*. Ed Albatros, Bs. As.; 1978. p. 109-110.
- Souza F V M, Barbosa da Rocha M, de Souza D P, Moretti M R (2013). (-)Carvone: Antispasmodic effect and mode of action. *Fitoterapia* 85: 20-24.
- Spedding M (1985). Competitive interactions between Bay K 8644 and nifedipine in K⁺ depolarized smooth muscle: a passive role for Ca²⁺? *Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology* 328: 464-466.
- Stashenko E E, Jaramillo B E, Martínez J R (2004). Comparison of different extraction methods for the análisis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, Brown in Colombia, and evaluation of its in Vitro antioxidante activity. *J Chromatogr A* 1025: 93-103.
- Stashenko E, Jaramillo B E, Martínez R J (2003). 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.
- Vale TG, Matos FJA, de Lima TCM, Viana GSB (1999). Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown chemotypes. *J Ethnopharmacol.* 167 (2):127-33.
- Van der Brink FG (1977). General theory of drug-receptor interactions. Drug-receptor interaction models. Calculation of drug parameters, in: Van Rossum, J.M. ed. *Kinetics of Drug Action*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, p.169-254.
- Veras HNH, Campos AR, Rodrigues FFG, Botelho MA, Coutinho HDM, Menezes IRA, da Costa JGM (2011). Enhancement of the antibiotic activity of erythromycin by volatile compounds of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown against *Staphylococcus aureus*. *Pharmacogn Mag* 7 (28): 334-337.
- Vera S S, Zambrano DF, Méndez Sanchez SC, Rodríguez Sanabria F, Stashenko EE, Duque Luna JE (2014) Essential oils with insecticidal activity against larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res.* 113 (7): 2647-54.
- Viana GSB, Vale TG, Rao VSN, Matos FJA (1998). Analgesic and anti-inflammatory effects of two chemotypes of *Lippia alba*: A comparative study. *Pharm Biol* 36: 347-351.
- Viana GS, Vale TG, Silva CM, Matos FJ (2000). Anticonvulsant activity of essential oils and active principles from chemotypes of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. *Biol. Pharm. Bull.* 23 (11): 1314-7.
- Vidaurre Martínez MF, Querevalú García LM, De los Rios Martínez E, Ruiz Reyes SG (2007) Características farmacognósticas de las hojas de *Capparis avicennifolia*. *Rev. Med. Vallejana* 4 (2): 121-131.

- Villamil J (2010). El modelo *Lippia alba*. En: Dellacassa, E (Ed). Normalización de productos Naturales Obtenidos de Especies de la Flora Aromática Latinoamericana. Ed Universitária da PUCRS, Porto Alegre, Brasil; p. 97-105.
- Werdin González J.O, Gutierrez M.M, Murray A.P, Ferrero A.A. “ Biological activity of Essentials oils from *Aloysia polystachya*, and *Aloysia citriodora* against the Soybean Pest *Nezara viridula*” (2010). Natural Product Communications 5 (2): 301-306.
- WHO Monographs on selected medicinal plants (1999) Geneva, Switzerland.
- Wiley/NIST. The Wiley/NBS registry of mass spectral data. Eighth ed. J. Wiley & Sons, Inc., New York/NIST/EPA/NIH, 2005, Mass Spectral Library, vers. 2.0. 2008.
- Yamamoto P Y, Colombo C A, Azevedo J A, Lourenção A L, Marques M O M, da Silva Morais D G, Chiorato A F, Mello Martins A L, Siqueira W J (2008). Performance of ginger grass (*Lippia alba*) for traits related to the production of essential oil. Sci Agric 65 (5): 481-489.
- Youngken H W. Tratado de Farmacognosia. Ed: Atlante S A. México, D F; 1951. 1375 pp.
- Zamora-Martinez MC, Nieto de Pascual CN (1992). Medicinal plants used in some rural populations of Oaxaca, Puebla and Veracruz, Mexico. Journal of ethnopharmacology, 35(3): 229-257.