

*Universidad Nacional del Nordeste*

*Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura*

*Tesis Doctoral*

*Variaciones fitoquímicas en aceites esenciales de especies medicinales del NE argentino: Aloysia gratissima (Gillies & Hook.) Tronc. var. gratissima; Aloysia virgata var. platyphylla (Briquet) Moldenke y Lippia alba (Miller) N. E. Brown*

*Lic. Gabriela Ana Leticia Ricciardi*

*Corrientes, 3 de Julio del 2006*

Tesis Doctoral para optar al grado de **Doctor**, en la especialidad **Química**, de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura de la *Universidad Nacional del Nordeste*.

**Director:** Prof. Dr. *Arnaldo Luis Bandoni*, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, Argentina.

**Co Director:** Prof. Dr. *Eduardo Dellacassa*, de la Facultad de Química de la Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Este trabajo se realizó principalmente en el Laboratorio Dr. Gustavo A. Fester, de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura de la UNNE; como así también en la cátedra de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, Argentina, y en la cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales de la Facultad de Química de la Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Dedicado

A la Memoria de mi Madre: **Anita Letizia Rossetti** que, aunque sus tiempos no fueron los míos, me alentó a terminar este trabajo hasta sus últimos días.

A mi Padre: **Armando Ítalo Amadeo Ricciardi**, que me dio el legado más importante que un padre puede dejar a su hijo: su ejemplo.

### Agradecimientos:

- A la **Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura** de la Universidad Nacional del Nordeste.
- A la **Secretaría General de Ciencia y Técnica** de la UNNE, por el financiamiento de las becas de postgrado.
- Al **Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) Subprograma IV, Proyecto IV.20**, por el financiamiento de las pasantías en la Universidad de la República, Uruguay.
- Al **Ing. Juan Federico Veglia**, director de las becas de postgrado y con quien aprendí las bases de la cromatografía gaseosa.
- A la **Bioq. Ana María Torres**, colega y amiga, sin cuyo apoyo incondicional este trabajo me hubiese resultado más difícil.
- A la **Prof. Ada E. Agrelo de Nassiff**, colega y amiga, por su compañía y estímulo constantes.
- A la **Lic. Sara Tressens**, del IBONE, por la colaboración en la identificación de los ejemplares de estudio y en los viajes de prospección y recolección del material vegetal.
- Al **Ing. Carlos Chifa**, de la Facultad de Agroindustrias de la UNNE, por la provisión e identificación del material de estudio (*Lippia alba*).
- Al **Dr. Jorge R. Avanza**, de la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la UNNE, por su estímulo constante y apoyo en la investigación.
- A la **Farm. Catalina Van Baren** y a la **Farm. Paola Di Leo Lira**, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, por su colaboración en la realización de las corridas cromatográficas.
- Al **Mst. Daniel Lorenzo** de la Facultad de Química de la Universidad de la República, por haberme guiado en la interpretación de las cromatografías y especialmente de las cromatografías con columnas quirales.

Y en especial:

- A las personas que durante este trabajo dieron desinteresadamente su tiempo y sus conocimientos para formarme con criterio científico del más alto nivel: **Prof. Dr. Arnaldo Bandoni**, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, y **Prof. Dr. Eduardo Dellacassa**, de la Facultad de Química de la Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

## Índice

Publicaciones	1
Presentaciones en Congresos y Reuniones Científicas	1
<b>1-Resumen</b>	<b>4</b>
<b>2-Abstract</b>	<b>7</b>
<b>3-Antecedentes</b>	<b>10</b>
<b>3.1-La Región Fitogeográfica</b>	<b>11</b>
<b>3.2-La Flora Medicinal y Aromática de la Región</b>	<b>12</b>
<b>3.3-Las Verbenáceas Medicinales y Aromáticas de la Región</b>	<b>15</b>
<b>3.3.1-Aloysia gratissima</b> var. <i>gratissima</i> (Gillies & Hook.) Tronc.	<b>17</b>
<b>3.3.2-Aloysia virgata</b> var. <i>platyphylla</i> (Briquet) Moldenke	<b>21</b>
<b>3.3.3-Lippia alba</b> (Miller) N. E. Brown	<b>24</b>
Tabla Composición de Quimiotipos de <i>Lippia alba</i>	<b>35</b>
<b>4-Hipótesis de Trabajo</b>	<b>37</b>
<b>5-Objetivos</b>	<b>39</b>
<b>6-Parte Experimental</b>	<b>41</b>
<b>6.1-Ejemplares Estudiados</b>	<b>42</b>
<b>6.1.1-Aloysia gratissima</b> var. <i>gratissima</i> de San Lorenzo (Ctes)	<b>44</b>
<i>Aloysia gratissima</i> var. <i>gratissima</i> de Río Empedrado (Ctes)	<b>44</b>
<i>Aloysia gratissima</i> var. <i>gratissima</i> de El Perichón (Ctes)	<b>45</b>
<b>6.1.2-Aloysia virgata</b> var. <i>platyphylla</i> de Río Empedrado (Ctes)	<b>46</b>
<i>Aloysia virgata</i> var. <i>platyphylla</i> de San Lorenzo (Ctes)	<b>46</b>
<b>6.1.3-Lippia alba</b> de Sáenz Peña (Chaco)	<b>47</b>
<i>Lippia alba</i> de El Perichón (Ctes)	<b>47</b>
<i>Lippia alba</i> de Santa Ana (Ctes)	<b>48</b>
<b>6.2.1-Pretratamiento de las muestras</b>	<b>49</b>
Recolección del material vegetal	<b>49</b>
Secado por Exposición y Aireación	<b>49</b>
<b>6.2.2-Extracción y Caracterización del Aceite Esencial</b>	<b>49</b>
Destilación por Arrastre con Vapor de Agua	<b>49</b>
Determinación de la Densidad de Aceites Esenciales	<b>52</b>
Determinación del Índice de Refracción de un Aceite Esencial	<b>52</b>
Determinación del Poder Rotatorio de una Sustancia	<b>53</b>
<b>6.2.3-Análisis de los Aceites</b>	<b>53</b>
Destilación Fraccionada a Presión Reducida	<b>53</b>
Preparación de Semicarbazonas	<b>53</b>
Restitución de Semicarbazonas	<b>54</b>
Método de Stillman Reed para dosaje de carbonilos	<b>54</b>
Espectroscopia Infrarroja	<b>55</b>
Cromatografía de Gas con Detector de Masa	<b>55</b>
Análisis Estadístico	<b>57</b>
Espectroscopia de RMN H	<b>57</b>
Cromatografía de Gas con Columna de Quirales	<b>57</b>

<b>7-Resultados</b>	60
<b>7.1-Cantidades Destiladas de <i>A. gratissima</i> de una región de Corrientes</b>	61
Constantes Fisicoquímicas de <i>A. gratissima</i> de una región de Corrientes	62
Composición de las Esencias de <i>A. gratissima</i> de una región de Corrientes	62
Contenido en Carbonílicos de <i>A. gratissima</i> de San Lorenzo (Ctes)	67
Relaciones Enantioméricas en <i>A. gratissima</i> de Río Empedrado, primavera	74
<b>7.2-Cantidades Destiladas de <i>A. virgata</i> de Corrientes</b>	79
Constantes Fisicoquímicas de <i>A. virgata</i> de una región de Corrientes	79
Composición de las Esenciales de <i>A. virgata</i> de una región de Corrientes	80
Relaciones Enantioméricas de Aceites Esenciales de <i>A. virgata</i> de Corrientes	82
<b>7.3-Cantidades Destiladas de <i>Lippia alba</i></b>	87
Constantes Fisicoquímicas de <i>Lippia alba</i>	88
Composición de los Aceites Esenciales de <i>Lippia alba</i>	88
Cálculo de Coeficientes de Extinción Molar	104
Cálculo de Desplazamientos Químicos de Mircenona	106
Relaciones Enantioméricas de Linalol y Germacreno D	106
<b>7.4-Resultados de Ensayos de Actividad Antitumoral</b>	109
<b>8- Discusión de Resultados</b>	110
<b>8.1-<i>A. gratissima</i> var. <i>gratissima</i></b>	111
Quimiotipos de <i>A. gratissima</i> var. <i>gratissima</i> Postulados para Corrientes	118
<b>8.2-<i>A. virgata</i> var. <i>platyphylla</i></b>	119
<b>8.3-<i>Lippia alba</i></b>	124
Quimiotipos Postulados para <i>L. alba</i> del Nordeste	135
<b>8.4-Ensayos de Actividad Antitumoral</b>	137
<b>9-Conclusiones</b>	138
<b>10-Bibliografía</b>	142

## Índice de Figuras

Mapa de Zonas Fitogeográficas y de Recolección del Material	43
Esquema de Columnas y Válvula en un Cromatógrafo con Columna Quiral	59
Esquema de la Válvula Rotativa de un Cromatógrafo con Columna Quiral	59
Grafico de Componentes de Aceites Esenciales de <i>A. gratissima</i>	65
Cromatograma de <i>A. gratissima</i> de San Lorenzo, otoño	68
Cromatograma de <i>A. gratissima</i> de San Lorenzo, primavera	69
Cromatograma de <i>A. gratissima</i> de San Lorenzo, verano	70
Espectro de Masa de $\alpha$ -Tuyona	71
Cromatograma Esencia de Aguas de <i>A. gratissima</i> de San Lorenzo, verano	71
Espectro IR de Fracción de Esencia de <i>A. gratissima</i> de San Lorenzo, verano	72
Espectro IR de $\alpha$ -Tuyona patrón	72
Cromatograma Quirales <i>A. gratissima</i> de Río Empedrado, primavera	73
Separación Enantiomérica de Linalol Patrón por Cromatografía	74
Cromatograma de <i>A. gratissima</i> de Río Empedrado, verano	75
Espectro de Masa de Viridiflorol	76
Cromatograma de <i>A. gratissima</i> de El Perichón, otoño	76
Cromatograma Esencia de Aguas de <i>A. gratissima</i> de El Perichón, otoño	77

Espectro de Masa de 10- <i>epi</i> -Cubebol	77
Espectro IR de Esencia de <i>A. gratissima</i> de El Perichón, primavera	78
Gráfico de los Componentes del Aceite Esencial de <i>A. virgata</i> de Corrientes	81
Gráfico de Terpenos y Sesquiterpenos de <i>A. virgata</i> de Corrientes	82
Cromatograma Quirales de <i>A. virgata</i> de San Lorenzo, otoño	83
Cromatograma de <i>A. virgata</i> de Río Empedrado, otoño	84
Cromatograma de <i>A. virgata</i> de San Lorenzo, otoño	85
Espectro de Masa de Germacreno D	85
Espectro IR de <i>A. virgata</i> de Río Empedrado, primavera	86
Cromatograma Esencia de Aguas de <i>A. virgata</i> de Río Empedrado, verano	86
Cromatograma de Esencia de <i>L. alba</i> de Sáenz Peña, (Chaco), otoño	93
Cromatograma de Esencia de <i>L. alba</i> de Sáenz Peña, (Chaco), verano	94
Espectro de Masa de Linalol	95
Espectro IR de Esencia de <i>L. alba</i> de Sáenz Peña, (Chaco), verano	95
Espectro IR Linalol Patrón	96
Espectro IR de Esencia de <i>L. alba</i> Sáenz Peña, (Chaco), otoño	96
Cromatograma Esencia de <i>L. alba</i> de Sáenz Peña, hija, (Chaco), verano	97
Cromatograma Esencia de Aguas de <i>L. alba</i> , Sáenz Peña, hija, verano	98
Cromatograma de Esencia de <i>L. alba</i> de Perichón, otoño	99
Espectro de Masa de Mircenona	100
Cromatograma de Esencia de Aguas de <i>L. alba</i> de Perichón, otoño	100
Cromatograma de Esencia de <i>L. alba</i> de Santa Ana, (Ctes), verano	101
Espectro IR de <i>L. alba</i> de Santa Ana, (Ctes), verano	102
Espectro IR de Esencia de Aguas de <i>L. alba</i> de Santa Ana, (Ctes), verano	102
Cromatograma de Esencia de Aguas de <i>L. alba</i> de Santa Ana, (Ctes), verano	103
Espectro UV Fracción Enriquecida en Mircenona	104
Espectro RMN H Fracción Enriquecida en Mircenona	105
Cromatograma Quirales de <i>L. alba</i> Sáenz Peña, (Chaco), verano	107
Agrupamiento Poblacional de <i>A. gratissima</i>	116
Andrograma de Componentes de Esencia de <i>A. gratissima</i>	116
Agrupamiento Poblacional de <i>Lippia alba</i>	131

La realización de este trabajo posibilitó la publicación o presentación en Reuniones Científicas, de los siguientes artículos:

**Publicaciones con referato:**

- ▶ Ricciardi, GAL; Torres, AM; van Baren, C; Di Leo Lira, P; Ricciardi, AIA; Dellacassa, E; Lorenzo, D y Bandoni, AL; (2004); “*Essential Oil of Aloysia virgata var. platyphylla (Briquet) Moldenke from Corrientes (Argentina)*”; *Flavour Fragr. J.*; **20**; (6): 645-649.
- ▶ Ricciardi, GAL; van Baren, CM; Di Leo Lira, P; Ricciardi, AIA; Lorenzo, D; Dellacassa E y Bandoni, AL; (2005); “*Volatile constituents from aerial parts of Aloysia gratissima (Gillies & Hook.) Tronc. var. gratissima growing in Corrientes (Argentina)*”; *Flavour Fragr. J.*; **21**: 690.
- ▶ Ricciardi, G; Ciccio, JF; Ocampo, R; Lorenzo, D; Dellacassa, E; Ricciardi, AIA y Bandoni, AL; (2006); “*Chemical variability of essential oils in Lippia alba (Miller) N. E. Brown growing in Costa Rica and Argentina*”; *Biochemical Systematics and Ecology*; enviado a publicar: 12/02/2006.

**Presentaciones en Congresos y Reuniones Científicas:**

- X Sesión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la UNNE**, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, Corrientes, octubre 2005; presentación del trabajo:
  - “*Examen del aceite esencial de Aloysia virgata var. platyphylla (Briq.) Moldenke de Corrientes*” ; Ricciardi, GAL; Torres, AM; van Baren, C; Di Leo Lira, P Ricciardi, AIA; Dellacassa, E; Lorenzo, D y Bandoni, AL.
- VIII Simposio Argentino y XI Latinoamericano de Farmacobotánica**, Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA, Buenos Aires, agosto del 2004; presentación del trabajo:
  - “*Variaciones estacionales en la composición del aceite esencial de Lippia alba (Miller) N. E. Brown en la Provincia de Corrientes: importancia en el estudio de un nuevo quimiotipo*”; Ricciardi, GAL; Lorenzo, D; Dellacassa, E; Ricciardi, AIA y Bandoni, AL.
- Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas (2002)**, Campus Universitario de la UNNE, Resistencia, Chaco, octubre 2002; presentación del trabajo:
  - “*Examen del aceite esencial de “niño rupá” (Aloysia gratissima var. gratissima (Gillies & Hook.) Tronc.)*”; Ricciardi, GAL; Torres, A; Agrelo de Nassiff, A; Ricciardi, AIA; van Baren, C y Bandoni, AL.
- XI Congresso Italo Latinoamericano di Etnomedicina “Alberto Di Capua”**, Pavia, Italia, septiembre del 2002; presentación del trabajo:
  - “*Variazioni nel contenuto di tujone nell’olio essenziale di Aloysia gratissima var. gratissima (Gillies & Hook.) Tronc. raccolta in Corrientes (Argentina)*”; Ricciardi, AIA; Ricciardi, GAL; Torres, AM; Agrelo de Nassiff, AE y Bandoni, AL.

- I Congreso Latinoamericano de Fitoquímica**, Buenos Aires, mayo del 2002; presentación del trabajo:
  - “El aceite esencial de Aloysia gratissima (Gillies & Hook.) Tronc. de la Provincia de Corrientes”*; Ricciardi, GAL; van Baren, C; Di Leo, P; Ricciardi, AIA y Bandoni, AL.
  
- Sesiones de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas (2001)**, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, Corrientes; octubre del 2001; presentación del trabajo:
  - “Efecto de las Variaciones Estacionales sobre la Composición Química del Aceite Esencial de Plantas de “salvia morada” de Sáenz Peña (Chaco)”*; Ricciardi, GAL y Ricciardi, AIA.
  
- X Congreso Italo Latinoamericano de Etnomedicina (2001)**, Isla Margarita, Venezuela, septiembre del 2001; presentación en Libro de Resúmenes, del trabajo:
  - “Fitoquímica de Especies de Lippia del Norte y Centro de la Argentina”*; Ricciardi, AIA; Ricciardi, GAL; Agrelo de Nassiff, AE y Torres, AM.
  
- Reuniones de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas (2000)** de la UNNE; Resistencia, Chaco; octubre del 2000; presentación del trabajo:
  - “Fitoquímica de Verbenáceas (Lippias y Aloysias) del Nordeste Argentino”*; Ricciardi, GAL; Ricciardi, AIA y Bandoni, AL.
  
- Sesiones de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas (1999)** de la UNNE, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, Corrientes; octubre de 1999; presentación de los trabajos:
  - “Examen de los aceites esenciales de especies de Aloysia (Verbenáceas) del nordeste”*; Ricciardi, GAL; Veglia, JF; Ricciardi, AIA y Bandoni, AL.
  - “Examen comparado de la composición de los aceites esenciales de especies autóctonas de Lippia alba (Mill.), N. E. Br.”*; Ricciardi, GAL; Veglia, JF; Ricciardi, AIA y Bandoni, AL.
  
- Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas (1998)** de la UNNE, Resistencia, Chaco; octubre de 1998; presentación del trabajo:
  - “Fitoquímica de Verbenáceas del Nordeste: Aceites Esenciales de Aloysia gratissima (Gill. et Hook.) “niño rupá” y Lippia alba (Mill.) “salvia morada”*”; Ricciardi, GAL; Veglia, JF y Ricciardi, AIA.
  
- VI Simposio Argentino de Farmacobotánica**, Posadas, Misiones; agosto de 1998; presentación del trabajo:
  - “Fitoquímica de Lippia alba (Mill.) N. E. Br. (“salvia morada”)*”; Ricciardi, GAL; Veglia, JF y Ricciardi, AIA.
  
- Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas (1997)** UNNE, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, Corrientes; septiembre - octubre de 1997; presentación del trabajo:
  - “Examen del Aceite Esencial de Lippia alba (Mill.), “salvia morada” de la Zona de Santa Ana, Corrientes”*; Ricciardi, GAL; Veglia, JF y Ricciardi, AIA.

**-X Sesión de Comunicaciones Científicas y Técnicas**, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, Corrientes; noviembre de 1996; presentación del trabajo:

-“*Examen del Aceite Esencial de Lippia alba (Mill.) N. E. Br. del Centro Chaqueño*”; Ricciardi, GAL; Veglia, JF; Ricciardi, AIA y Agrelo de Nassiff, AE.

**-IX Sesión de Comunicaciones Científicas**, UNNE, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, Corrientes; noviembre de 1995; presentación del trabajo:

-“*Examen del Aceite Esencial de Lippia alba (Mill.) N. E. Br. "la salvia morada" de Corrientes*”; D’Andrea, A; Adami, M; Salvatore, G; Ricciardi, AIA; Veglia, JF; Agrelo de Nassiff, AE; Torres, AM y Ricciardi, GAL.

# ***1. - Resumen***

Se estudiaron aceites esenciales de la familia Verbenáceas, recolectados en otoño, primavera y verano, de tres especies medicinales del nordeste argentino: *Aloysia gratissima* var. *gratissima*; *Aloysia virgata* var. *virgata* y *Lippia alba*.

Los aceites esenciales fueron extraídos de las matrices vegetales por arrastre con vapor de agua, caracterizando las esencias separadas por determinación de sus constantes físicas (densidad, índice de refracción, poder rotatorio), e identificando sus componentes por cromatografía de gases.

Se evaluó el efecto de la influencia estacional sobre la composición química de los aceites para determinar el momento más adecuado de su cosecha, además de identificar la existencia de posibles variedades químicas que pudieran aportar componentes bioactivos o útiles para la industria o que, por el contrario, pudieran presentar un cierto grado de toxicidad.

La evaluación de la composición química de los aceites esenciales se realizó por análisis de las cromatografías de gases y espectrometría de masas. La proporción de los constituyentes fue determinada por cromatografía de gases con detector de ionización por llama y detector de masa, y se confirmó la identidad por medio de la determinación de los índices de retención lineales, usando la serie de *n*-alcanos como referencia para el uso de bases de datos especializadas.

Simultáneamente, se desarrollaron técnicas químicas de determinación de grupos funcionales orgánicos para identificar especies características como grupos cetónicos o alcoholes terciarios. Para confirmar la presencia de grupos característicos o compuestos específicos se utilizó el análisis espectroscópico de IR, UV y RMN H. Además, se introdujo la evaluación de la quiralidad de los constituyentes volátiles quirales principales de los aceites esenciales, mediante la realización e interpretación de cromatogramas de gases con columnas quirales.

Los rendimientos en esencia demostraron ser dependientes del estado de crecimiento de la planta, vinculado estrechamente con los períodos de lluvias, viéndose afectados positivamente en aquellos períodos posteriores a lluvias abundantes. Por lo cual se concluyó que es el verano la época más favorable para la cosecha de estas tres especies.

Se determinó la composición química de nueve esencias de *A. gratissima* var. *gratissima*, de tres localidades de Corrientes (San Lorenzo, Río Empedrado y El Perichón) y en tres estados de crecimiento diferentes, concluyéndose que las esencias de las especies de las tres procedencias no respondían al mismo patrón de composición química. Por lo cual se postuló la existencia de tres quimiotipos nuevos dentro de la especie: **quimiotipo A** (con 10-20% de  $\alpha$ -Tuyona), **quimiotipo B** (sin Tuyona pero con 1-40% de Viridiflorol y trazas-15% de Linalol) y **quimiotipo C** (sin Tuyona ni Viridiflorol y con 0,5 – 13,4% de 10-*epi*-Cubebol).

Se analizaron cinco esencias de *A. virgata* var. *platyphylla* de Corrientes, de dos localidades diferentes (San Lorenzo y Río Empedrado), observándose que mantienen la misma composición sin mayores diferencias en los constituyentes principales, que son en su mayoría sesquiterpenos:  $\delta$ -Elemeno (4,6 a 8,4 %);  $\beta$ -Cariofileno (16,3 a 18,1 %); Germacreno D (16,0 a 27,1 %) y Biciclogermacreno (17,6 a 29,3 %).

Se verificó la variabilidad química del aceite esencial de *Lippia alba* en la región del Nordeste, observándose el **quimiotipo Citral** en ejemplares de Sáenz Peña, Chaco, pero que experimentó una modificación en el contenido de Citral en verano, estado de crecimiento en el cual se observó un incremento en el contenido de Linalol mientras que disminuyó considerablemente el contenido en Citral.

Se detectó la presencia de un nuevo quimiotipo de *Lippia alba* para la región del Nordeste, en ejemplares procedentes de El Perichón y Santa Ana (Corrientes), **quimiotipo Mircenona**: caracterizado por la presencia de  $\beta$ -Mirceno (15-25%), Mircenona (34,2-47,1%), (*Z*)-Ocimenona (9,2-11,3%) y (*E*)-Ocimenona (3,2-6,0%).

Finalmente, por lo expuesto anteriormente, se advierte sobre el riesgo de uso indiscriminado de *Aloysia gratissima* var. *gratissima*, por la posibilidad de presentar componentes reportados como convulsivos. Bajo el mismo concepto, la realización de ensayos de *aldosa reductasa* sobre dos tipos de cáncer humano y uno de leucemia en ratones, demostraron la inactividad de los aceites esenciales de: **quimiotipo A** de *A. gratissima* var. *gratissima*; *A. virgata* var. *platyphylla* y **quimiotipo Mircenona** de *Lippia alba*.

## ***2. - Abstract***

Essential oils from Verbenacea's family of three medicinal species from the north-east of Argentina: *Aloysia gratissima* var *gratissima*; *Aloysia virgata* var *virgata* and *Lippia alba* were collected in autumn, spring and summer and subsequently studied.

The essential oils were extracted from the vegetable matrix with water steam distillation, thus characterising the essences, separated by their physical determination signs (density, refraction index and rotatory power) and by identification of its components by gas chromatography.

The seasonal influence on the chemical composition of the essential oils was evaluated in order to determine the best time of harvest. This evaluation was also aimed at identifying the possible existence of chemical varieties that could provide bioactive or useful industrial components and to establish if, on the contrary, they could present a certain degree of toxicity.

The evaluation of the chemical composition of the essential oils was carried out by analysing the chromatograms and mass spectrometry. The proportions of the components was determined by gas chromatography with a flame ionization and a mass detector, and their identity was established by determining their linear retention index, using the *n*-alkanes series as reference in the use of the specialised database.

Chemical techniques for the determination of functional groups were simultaneously developed so as to identify characteristic species like ketonic groups or tertiary alcohols. IR, UV and RMN H spectroscopic analyses were used in order to confirm the presence of these groups or of specific compounds. Chirality evaluation of the main chiral volatile constituents of the oils was also introduced by means of the design and interpretation of gas chromatograms obtained from chiral columns.

The essence yield demonstrated to be independent from the degree of growth of the plant, to be strongly linked with rainy periods, being affected positively during periods following abundant rain. It was therefore concluded that the summer is the most favourable season for the harvest these species.

The chemical composition of nine essences of *A. gratissima* var *gratissima* was determined, these being collected from plants in three areas of the Corrientes province (San Lorenzo, Río Empedrado and El Perichón) and in three different states of growth, leading the research to the conclusion that the essences of the three species do not display the same stock of chemical composition. So it was postulated that there existed three new chemotypes on the species: **chemotype A** (with 10-20%  $\alpha$ -Thujone), **chemotype B** (without  $\alpha$ -Thujone but with 1-40% Viridiflorol and traces-15% Linalool) and **chemotype C** (without  $\alpha$ -Thujone or Viridiflorol but with 0.5 – 13.4% 10-*epi*-Cubebol).

Five essences of *A. virgata* var *platyphylla*, from two different areas of the province of Corrientes (San Lorenzo and Río Empedrado) were also analysed. This led to the conclusion that they maintain the same composition without great differences in their principal components, mainly sesquiterpenes:  $\delta$ -Elemene (4.6 to 8.4%);  $\beta$ -Caryophyllene (16.3 to 18.1%); Germacrene D (16.0 to 27.1%) as well as Bicyclogermacrene (17.6 to 29.3%).

The chemical variability of the essential oil of *Lippia alba* from the North-eastern region was detected in the process. This determines the **Citral chemotype** in samples from Sáenz Peña, in the Chaco province. These present, however, a kind of modification on the Citral content in summer, during which their state of growth was characterised by a considerable increase in the Linalool content, while the Citral content presented a considerable decrease.

The presence of a new chemotype of *Lippia alba* from the north-eastern region was detected on samples from El Perichón and Santa Ana (Corrientes). This is the **Mircenone chemotype**, characterised by the presence of  $\beta$ -Myrcene (15-25%), Mircenone (34.2-47.1%), (*Z*)-Ocimenone (9.2-11.3%) and (*E*)-Ocimenone (3.2-6.0%).

Finally, in view of what was explained above, a warning is issued presently on the risk of indiscriminate use of *Aloysia gratissima* var *gratissima* in view of the possibility that it may contain components reported as convulsive. By the same concept, the carrying out of *aldose reductase* tests on two types of human cancer and one on leukaemia in mice, demonstrated the inactivity of the essential oils from: **chemotype A** of *A. gratissima* var *gratissima*; *A. virgata* var *platyphylla* and the **Mircenone chemotype** from *Lippia alba*.

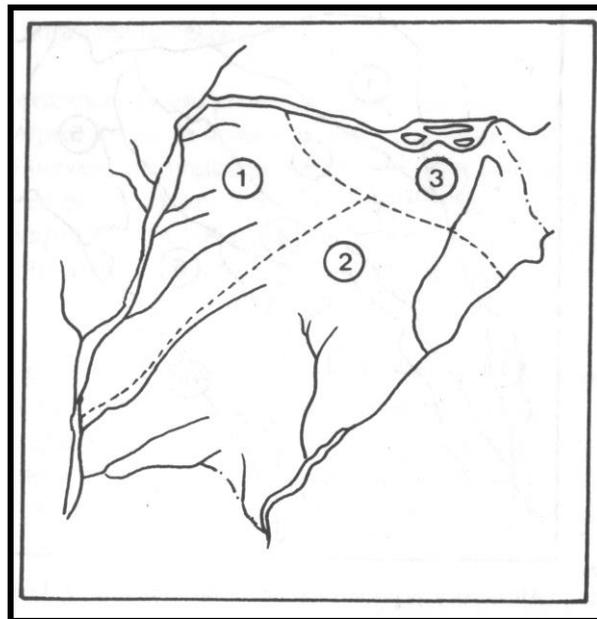
### ***3. - Antecedentes***

### **3.1-La región fitogeográfica**

La provincia de Corrientes se encuentra en el NE de Argentina. Presenta una temperatura media anual que varía entre los 21°5 C al N y los 19°5 C al S, siendo las temperaturas más bajas en el mes de Julio, de 13 °C a 16 °C, y las más altas en el mes de enero, 26 °C a 27 °C; lo cual define al clima de Corrientes como subtropical o mesotermal. Las lluvias son abundantes y frecuentes, superando los 1500 mm anuales en el NE y bajando hasta los 1000 mm hacia el SO. Por esta razón, tanto el clima como el régimen de lluvias y el balance hídrico, afectan la distribución de la vegetación. (Carnevali, 1994)

En relación a la distribución de la vegetación, se puede observar que la provincia está representada por dos grandes territorios fitogeográficos: la mayor parte de la superficie cubierta por el **Dominio Chaqueño**, subdividido a su vez en dos distritos: el oriental de la *Provincia Chaqueña* (1) y el del *Ñandubay de la Provincia de Esquel* (2); y por otro lado, en el ángulo NE limitando con Misiones, el **Dominio Amazónico** en el cual se reconoce el distrito de los Campos de la *Provincia Paranaense* (3). En la confluencia de las tres provincias fitogeográficas se observan zonas de transición, de caracteres diferenciados. (Carnevali, 1994)

**Figura 1:** Mapa de las zonas fitogeográficas de Corrientes



(Carnevali, 1994; Pág. 26)

Por las características ambientales y climáticas antes mencionadas la provincia de Corrientes posee una flora autóctona sumamente diversificada por lo cual en el presente trabajo de tesis, se ha encarado el estudio de especies de Verbenáceas distribuidas en la zona del distrito Occidental del Dominio Chaqueño cuyas características principales son: (Carnevali, 1994)

- espartillares (en planicies arenosas y terrazas bajas y medias del Río Paraná): estrato alto constituido por el espartillar (*Elyonurus muticus*), acompañado por *Baccharis coridifolia*, *Vernonia chamaedrys*, *Eryngium horridum*, *Heimia salicifolia*, *Senecio grisebachii*, *Sporobolus indicus*, *Schizachyrium microstachyum*,

*Chloris cantherae*, *Aristida circinalis*; en el estrato medio, dominante: *Cnidocolus loasoides*, y en el estrato bajo: *Paspalum notatum*;

- pastizal o pajonal de paja colorada de las lomas: pastizal de *Andropogon lateralis*, *Paspalum notatum*, *Vernonia chamaedrys* y *Baccharis coridifolia*, (más difundida y de menor ocupación de los suelos altos, extendida en el dique del Paraná alto y medio y de sus afluentes principales: Riachuelo, Empedrado, San Lorenzo y Santa Lucía);
- praderas de pasto horqueta, espartillares de espartillo amargo; pradera de *Paspalum notatum*, *Desmodium incanum* y *Vernonia chamaedrys*; espartillar de espartillo amargo: *Elyonurus muticus*: (en planos de terraza y orillares del área de quebrachales colorados, dique del Paraná medio y cuencas cerradas de antiguos cauces y del Santa Lucía hacia el NE de la Provincia),
- pastizales de paja amarilla: pastizales de *Sorghastrum agrostoides*: (en zonas de cañadas, bañados, aluviales y caños de drenaje; suelos poco profundos, anegables e inundables y de escurrimiento lento o de drenaje pobre),
- gramillares de bajos y cañadas: prados de *Paspalum acuminatum*: (suelos húmedos a ligeramente anegados, en la periferia de los esteros, bañados y cañadas),
- canutillares de bajos y cañadas: pradera hidrófila de *Eleocharis nodulosa*, *E. fistulosa* y *E. luziola peruviana*: (en cuerpos de agua semi permanente en terrenos bajos y planos de muy escasa pendiente),
- malezales de paja colorada (*Andropogon lateralis*), de paja amarilla (*Sorghastrum agrostoides*), de paja azul (*Paspalum durifolium*): (ubicados en superficies de planos anegables de relieve subcóncavo, escurrimiento y permeabilidad lenta a muy lenta y drenaje pobre).

### **3.2.-La flora medicinal y aromática de la región**

En los últimos años, se ha observado que a nivel internacional existe un renovado y marcado interés en el conocimiento de plantas usadas en la medicina popular por la seguridad que confiere el uso comprobado durante varias centurias, contando nuestro país con una tradición de empleo que se remonta hasta la época precolombina. Este conocimiento nos ha sido transmitido por los cronistas españoles y jesuitas de la época colonial quienes han dejado su legado en documentos escritos, como es el caso del Hno. **Pedro de Montenegro S. J.**, quien se desempeñó como enfermero en las misiones del Paraguay y que junto a otros religiosos acompañó como cirujano para curar heridas a cuatro mil indios guaraníes en el sitio de la Colonia del Sacramento. Se lo reconoció como eminente cirujano y herbolario del Paraguay y su herbario de las misiones fue editado como “*Materia Médica Misionera*” de acuerdo a la edición de la Biblioteca Nacional. (Ricciardi, 2005)

La parte central y más extensa de esta obra constituye una descripción de las plantas, sus características, sus nombres vernáculos (guaraní o tupí) y en español, el hábitat, y sus propiedades curativas o virtudes, incluyendo algunos casos específicos de curaciones, modo de empleo y recetas de preparación. (Ricciardi, 2005). Aunque en esta obra es difícil identificar algunas especies, por carecer de una nomenclatura binaria en latín, es fácil detectar ya unas pocas Verbenáceas medicinales entre las 115 plantas descriptas, como son el caso del poleo y la salvia silvestre.

En 1555, el fraile franciscano **Andreas Thevet** quien estuvo recorriendo Brasil, publicó sus observaciones, muchas de ellas referidas a la medicina guaraní, con el título

“*Les singularités de la France antarctique autrement nommée Amérique et des plusieurs terres et des decouvertes de notre temps*”, reeditado en París en 1878. En esta obra expone sobre la copaiba que suministra el bálsamo homónimo (*Copaifera* sp.), el maní, *Amyris balsamifera* y *Anacardium occidentale*. Este autor fue el que llevó a Europa las semillas del tabaco. (Ricciardi, 2005)

**José Acosta, ó José de Acosta**, S. J., nacido en Medina del Campo, (España), en 1571 fue destinado al Perú por lo que en numerosos viajes, llegando hasta el Tucumán, estudió la flora americana, dejando como fruto de sus observaciones la obra titulada “*De natura nobi orbis*” publicada en Salamanca en 1588, traducida al castellano y editada en Sevilla con numerosas reimpresiones como: “*Historia Natural y Moral de las Indias*”, en la que describe diversas plantas como la yuca, el maíz, el maní, la papa, la batata o camote, el plátano, la coca (*Erythroxylon*), el axi o ají (*Capsicum*), el maguey (*Agave*), el guayabo (*Psidium*), la palta, la granadilla (*Passiflora*), la zarzaparrilla (*Smilax; Herreria*), etc., algunas de ellas curativas, (Ricciardi, 2005). En esta obra no hay alusión a alguna especie de las Verbenáceas.

**Pedro Lozano**, S. J., oriundo de Madrid, se trasladó a la Argentina, donde completó sus estudios en Córdoba, y siendo Padre de la Compañía de Jesús recorrió Buenos Aires, Santiago del Estero, Salta y prácticamente todo el Chaco argentino bajando por el río Pilcomayo hasta su confluencia con el Paraguay, zona muy poco explorada en aquella época, y dejando, en 1733, una descripción con el título: “*Descripcion chorographica del Terreno, Rios, Arboles, y Animales de las dilatadissimas Provincias del Gran Chaco, Gualamba, y de los Ritos y Costumbres de las innumerables naciones barbaros é infideles que le habitan. Con una cabal Relacion Historica de lo que en ellos han obrado para conquistarlas algunos Gobernadores y Ministros Reales, y los Misioneros Jesuitas para reducirlos à la fe del Verdadero Dios.*”. En esta obra describió varios tipos de plantas y animales, incluyendo la flora medicinal. En ella se encuentran amplios comentarios sobre las plantas medicinales de la región.

Siendo Jesuita, el austriaco **Martín Dobrizhoffer**, S. J. vino a Buenos Aires en 1749 y, pasando luego a Córdoba y misionando a continuación durante ocho años entre abipones y guaraníes, al retornar a su tierra en 1767 fue escuchado frecuentemente por la emperatriz María Teresa, ávida de sus relatos y experiencias. En 1783-1784 escribió en Viena su obra en tres volúmenes “*Historia de Abiponibus, equestris bellicos aque Paraquariae natione*”, que fue traducida al alemán por el Prof. Keil de la Universidad de Pesth y publicada en el mismo año en Viena; y en 1822 al inglés por Sara Coleridge con el título: “*An Account of the Abipones, an Equestrian People of Paraguay*”, Londres 1822, y traducida al castellano por Clara Vedoya de Guillén, en 1967 con el título “*Historia de Abiponibus*”, editada por Fac. de Humanidades de la U.N.N.E, Resistencia (Chaco, Argentina). (Ricciardi, 2005)

Posteriormente, en 1882, **Hieronimus** escribió su obra “*Plantae Diaphoricae ae Florae Argentinae*”, en la cual menciona a la especie *Lippia lycioides* Stend., sinónimo de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook. )Tronc., e indica los nombres vulgares con los que se conoce a esta especie. Menciona que las flores tienen agradable olor a vainilla; también especifica que los gajos se usan en infusión teiforme para el tratamiento de resfríos y dolores de estómago.

A inicios del siglo XX se destacó en la Argentina el **Dr. Juan A. Domínguez** (1876 – 1946). Doctor en Farmacia de la Universidad de Buenos Aires, fue un valiosísimo colaborador de la *Materia Médica Argentina*, habiendo comenzado en 1898 a formar su herbario particular. En 1899 inició un viaje de diez meses durante el cual se interesó en recoger tradiciones y recolectar material de estudio. Durante ese período y en la ciudad de Córdoba conoció al botánico alemán Federico Kurtz quien lo ayudó a clasificar las colecciones botánicas recogidas durante el viaje, luego de lo cual fundó el Museo de Farmacología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Buenos Aires, que actualmente se conoce como Museo de Farmacobotánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. Tuvo siempre un denodado desempeño en la investigación de plantas de uso indígena y transplantadas por lo que se conocen numerosos trabajos de los cuales el más representativo es “*Contribuciones a la Materia Médica Argentina*” en 1928, obra en la cual incluyó aparte de los datos empíricos y científicos, variada y abundante información relacionada a los investigadores de la época de la conquista y colonización de América, con crónicas de sus viajes y datos sobre la medicina aborígen. En sus primeros estudios fitoquímicos se destacan obras como: “*Notas sobre Tagetes glandulifera Cehr.*” (1901); “*Estudio micrográfico de medicamentos simples de origen vegetal*” (1902) y la Serie de Trabajos del Museo de Botánica y Farmacología, sobre investigaciones fitoquímicas en plantas indígenas y naturalizadas (1904 a 1939). (Amorín, 1996). Además, en su *Materia Médica Argentina*, incluye a *Lippia lycioides* (sinónimo de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc.), de la cual indica no haberse encontrado cianoglucósidos, saponinas, alcaloides ni oxidasas, en muestras de los tallos foliáceos obtenidos de la localidad de Belgrano en el mes de octubre; sí indica que contiene peroxidasas y aceite esencial.

Numerosos trabajos siguen documentando aún hasta nuestros días la riqueza que existe en la flora aromática y medicinal de la región del Nordeste argentino. Entre ellos merecen citarse los trabajos desarrollados hace ya varios años por Martínez Crovetto, (Martínez Crovetto, 1961), quien realizó una prospección de la información del conocimiento de las indígenas o “yuyeras” que se encuentran en las calles de la ciudad de Corrientes. Este trabajo ha sido publicado en 1961, en un libro titulado: “*Plantas utilizadas en medicina en el NO de Corrientes*”, las especies medicinales y aromáticas más abundantes y reconocidas en el ambiente, sus aplicaciones atribuidas popularmente, los distintos modos de empleo y los nombres vulgares con los que se las conoce.

Asimismo, desde hace cerca de treinta años el grupo de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura de la U.N.N.E., desarrolla una línea de investigación sobre especies aromáticas de la zona, tanto autóctonas como implantadas. Estos trabajos son continuación de los que iniciara el Dr. Gustavo A. Fester, en la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad del Litoral, quien fuera el pionero del estudio de los aceites esenciales de las plantas aromáticas en la Argentina. Muchos de esos trabajos fueron publicados, como es el caso de las presentaciones en las revistas de la Sociedad Argentina para la Investigación de Productos Aromáticos (SAIPA); o en la revista de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad del Litoral, que en 1961 publicara el libro: “*Aceites esenciales de la República Argentina*” cuyos autores fueron: Fester, G.A.; Martinuzzi, E.A., Retamar, J.A. y Ricciardi, A.I.A (Fester *et al.*, 1961). En esta obra se encuentran varios antecedentes sobre el estudio de las Verbenáceas de la región en estudio.

Ratera *et al.*, (Ratera *et al.*, 1980), publicaron un libro con la descripción de los usos y aplicaciones de plantas utilizadas en la medicina popular. En la misma fecha, Toursarkissian (Toursarkissian, 1980) publicó una obra de naturaleza similar. En ambos textos se citan numerosas Verbenáceas de la región en estudio.

Se hace evidente la riqueza en información sobre usos y particularidades de las plantas aromáticas y medicinales autóctonas, sin embargo queda mucho por conocer sobre la composición química de estas especies. El estudio de las plantas aromáticas y medicinales en la región del Nordeste es uno de los objetivos primordiales cuando se quiere aportar a la sociedad conocimientos que puedan contribuir al mejor aprovechamiento de estos recursos para el tratamiento de diversos malestares o enfermedades, sobre todo por la aplicabilidad en sectores marginales de la población. Por otro lado, es necesario profundizar en la variabilidad natural de estas plantas, para favorecer la generación de posibles emprendimientos productivos con aplicación industrial. Estas premisas, y los antecedentes descritos fueron valiosas herramientas a la hora de seleccionar las especies aromáticas autóctonas que más trascendencia tuvieran en esta región.

Como criterio adicional, en este trabajo se ha encarado el estudio de especies caracterizadas por su abundancia y por encontrarse con mayor facilidad en los suelos correntinos, a fin de asegurar una población estable para realizar el estudio estacional sobre los mismos ejemplares.

### **3.3.-Las Verbenáceas medicinales y aromáticas de la región**

Son numerosos los trabajos botánicos en los cuales se puede encontrar el listado de las especies de Verbenáceas más abundantes en la región del Nordeste, y dentro de la variedad de información que se dispone, están desde los trabajos que hacen un simple listado descriptivo morfológico de las especies, hasta los que describen los usos y aplicaciones de cada especie.

De acuerdo a la obra de Zuloaga *et al.*, (Zuloaga *et al.*, 1999), en las provincias de Corrientes y Chaco, son característicos 11 géneros de Verbenáceas. Se encuentran 2 especies de *Aegiphila* Jacq., 9 especies de *Aloysia* Ortega ex. Juss., entre las que figuran *Aloysia gratissima* var. *chacoensis* (Moldenke) Botta, *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. var. *gratissima*, *Aloysia gratissima* ver. *sellowii* (Briq.) Botta, *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke y *Aloysia virgata* var. *platyphylla* (Briq.) Moldenke; una especie de *Bouchea* Cham.; 2 de *Citharexylum* L.; 2 de *Duranta* L.; 19 especies de *Glandularia* J.F. Gmel.; 10 especies de *Lantana* L.; 19 especies de *Lippia* L. incluyendo a *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br., *Lippia fissicalyx* Tronc. y *Lippia turbinata* Griseb.; 1 especie de *Stachytarpheta* Vahl; 11 especies de *Verbena* L. y 2 especies de *Vitex* L..

En el listado anterior se han expuesto los géneros y especies propios de las provincias de Corrientes y Chaco, de acuerdo a los autores citados. Sin embargo algunas de estas especies han sido ampliamente estudiadas, otras, por la existencia de escasas poblaciones hacen difícil encarar un estudio de caracterización. Por lo cual, se podría clasificar a estas especies en cuatro grupos:

a) aquellas especies que han sido ampliamente estudiadas: *Aloysia polystachya*, *Lantana balansae*, *Lantana camara*, *Lippia fissicalyx*, *Lippia turbinata*;

b) aquellas que no presentan antecedentes de uso, no pueden ser relacionadas con especies útiles o bien carecen casi por completo de aroma: las especies del género *Duranta*, por ejemplo; o *Lantana megapotamica* entre otras;

c) aquellas que presentan difícil ubicación en la clasificación taxonómica, por no estar bien definida esta última: como es el caso del género *Verbena*: *Verbena bonariensis* y *Verbena montevidensis*; y *Lippia villafloridana*, por citar algunos ejemplos;

d) aquellas con amplia difusión en la región, con tradición de uso en la medicina popular, con potencial aprovechamiento industrial pero con insuficiente información fitoquímica como para abordar su aprovechamiento industrial: *Aloysia virgata*, *Aloysia gratissima*, *Lippia alba*.

En la selección de especies a estudiar se tomaron las tres plantas incluidas en este último grupo. Como se verá en la exposición de antecedentes para cada especie, *Lippia alba* es una excepción en este grupo, debido a que es la única de las tres citadas que posee una gran cantidad de información fitoquímica disponible. Sin embargo, de todas estas Verbenáceas es la única que ha sido reiteradamente llevada a cultivo, no solamente en nuestro país sino también en Uruguay (Lorenzo *et al.*, 2001; Dellacassa *et al.*, 1990), Brasil (Braga *et al.*, 2005; Castro *et al.*, 2005; Teixeira Duarte *et al.*, 2005; Siani *et al.*, 2002; Frighetto *et al.*, 1998; Mattos *et al.*, 1996; De Abreu Mattos *et al.*, 1996); Colombia (Fischer *et al.*, 2004; Stashenko *et al.*, 2003; Puertas Mejía *et al.*, 2002), Guatemala (Senatore *et al.*, 2001) y Costa Rica (Ciccio *et al.*, 2002). Más aún, se ha redactado una monografía por parte de UNCTAD (UNCTAD, 2005) como para proponer su introducción en el mercado europeo. Estos antecedentes plantearon la imperiosa necesidad de profundizar el conocimiento de su variabilidad fitoquímica en la región en estudio, con miras a orientar futuros emprendimientos agroindustriales basados en esta especie.

A continuación se dan los antecedentes de cada una de ellas, organizando la información de acuerdo al siguiente orden:

- Nombre actual de la especie
- Sinónimos botánicos
- Nombres vulgares
- Breve descripción botánica
- Distribución geográfica
- Usos medicinales atribuidos y forma de empleo
- Estudios farmacológicos
- Constituyentes identificados

### 3. 3. 1- *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. var. *gratissima*

#### NOMBRE ACTUAL DE LA ESPECIE:

-*Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. var. *gratissima*

#### SINÓNIMOS BOTÁNICOS: (Zuloaga *et al.*, 1999; Jozamí *et al.*, 1982)

-*Aloysia lycioides* Cham.

-*Aloysia uruguayensis* Moldenke

-*Lippia lycioides* (Cham.) Steud.

-*Verbena gratissima* Gillies & Hook.

#### NOMBRES VULGARES:

En guaraní: “niño rupá” que significa *cuna del niño*; “ángel”; “palo amarillo”; “azahar del campo”, “oreganito”, “cedrón del monte” (Toursarkissian, 1980); “resedá del campo”; “poleo”; “usillo”; “muña del monte”; “romerillo” (Jozamí *et al.*, 1982; Amorín, 1988); en lengua toba: “kaguetá lchè”, que significa *canillas de guazuncho* (Sorarú *et al.*, 1978); “poleo del campo” (Martínez Crovetto, 1981); “arrayán”, “arrayán del campo”, “favorita”, “usillo” (Cabrera, 1993); “mitá rupá” (González Torres, 1997; Bassols *et al.*, 1996).

**Foto 1:** *Aloysia gratissima* var. *gratissima*, ramillete floral.



#### BREVE DESCRIPCIÓN BOTÁNICA:

Arbusto alto, que puede alcanzar los 3 m de altura, muy ramoso con ramas y ramitas secundarias rígidas espinescentes; hojas enteras en ramas floríferas verde oscuras en el haz y grisáceas en el envés. Flores blancas y fragantes de 4 a 8 cm de longitud. (Botta, 1979; Cabrera, 1965; Jozamí *et al.*, 1982). Difiere de *Aloysia gratissima* var. *sellowii* (Briq.) nov. stat. en que en esta última especie predominan hojas de margen aserrado e inflorescencias de mayor longitud. *A. gratissima* var. *sellowii* habita en el borde de la selva misionera y de la vegetación marginal de los ríos Paraná y Uruguay. (Corrientes y Misiones). (Botta, 1979)

En el presente trabajo se ha encarado solamente el estudio de la especie *A. gratissima* var. *gratissima* por ser la variedad más abundante y que se encuentra con mayor facilidad en los suelos correntinos, a fin de asegurar una población estable para realizar el estudio estacional sobre los mismos ejemplares.

#### DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA:

Estados Unidos del N. y México, Bolivia; sur de Brasil, Cuba, Paraguay, Uruguay; noroeste y centro de la Argentina: Buenos Aires, Catamarca, Córdoba, Corrientes (Hertlitzka, Empedrado), Entre Ríos, La Pampa, Mendoza, Misiones, Santa Fe, San Juan, San Luis y Tucumán. (Zuloaga *et al.*, 1999; Cabrera, 1993; Bassols *et al.*, 1996)

En Corrientes se la encuentra en las periferias de monte de espinillo o ñandubay (*Prosopis affinis*) o de ibopé morotí o algarrobo (*Prosopis alba*). (Carnevali, 1994)

#### USOS MEDICINALES ATRIBUIDOS Y FORMA DE EMPLEO:

En Argentina se emplea la infusión de sus gajos para resfríos y como anticatarral; la infusión de hojas como diaforético, estomacal, sedante, afrodisíaco y tónico; la infusión de hojas y brotes tiernos como digestivo. En Bolivia como carminativo y sudorífico; en Paraguay, para digestiones difíciles, se colocan diez hojas en una taza de agua caliente; también se usa como estomáquico y sedante, para los resfríos se hacen infusiones de las flores, al 2%; en Uruguay, se usan las infusiones de hojas y flores al 1% o directamente las hojas en el mate, como estomacal y también como antiespasmódica; las hojas molidas como cataplasma. Se la emplea contra los resfríos, asma, dolores de estómago, digestiones difíciles, cólicos, indigestiones, en casos de gastritis, neuralgias, males de corazón de origen nervioso y susto. (Bassols *et al.*, 1996)

En Brasil, se utiliza la decocción de las hojas secas contra las hemorroides. (Alice *et al.*, 1991)

#### ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS:

Se ha encontrado actividad antibacterial del aceite esencial de las partes aéreas de ejemplares provenientes de San Luis, Argentina, en concentraciones no especificadas, sobre cultivos de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. (Bailac *et al.*, 1999) En cambio, no se encontró actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de partes secas no especificadas, en concentraciones de 5,0 mg/ml sobre: *Bacillus subtilis*; *Escherichia coli*; *Micrococcus luteus*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus aureus*; tampoco se encontró actividad antifúngica sobre *Aspergillum niger* en similares concentraciones que las anteriores, y también resultó inactivo frente a *Candida albicans*. (Penna *et al.*, 1994)

El aceite esencial de ejemplares de Bolivia, demostró actividad insecticida en una concentración de 1,0 mg/insecto sobre *Triatoma infestans*. (Chantraine *et al.*, 1998)

Las hojas secas y extraídas con EtOH al 95%, de ejemplares de Bolivia, dieron actividad antimalárica en concentraciones de 100,0 mcg/ml, sobre *Plasmodium falciparum*, y en concentraciones de 1000 mg/kg en vía intragástrica en ratones, contra *Plasmodium vinckei*. (Muñoz *et al.*, 2000)

#### CONSTITUYENTES IDENTIFICADOS:

Fester *et al.* (Fester *et al.*, 1955), encontraron en el aceite esencial de hojas de *Lippia lycioides*, de San Luis y Córdoba (Argentina), 1,8-Cineol; Citral; (+)-Limoneno; (-)-Limoneno; y Verbenona.

En trabajos posteriores, Fester *et al.* (Fester *et al.*, 1961a), obtuvieron por destilación por arrastre con vapor de agua, una esencia en la que prevalecía el aroma a **Eucaliptol**; por fraccionamiento por destilación al vacío separaron tres fracciones, de las cuales, en la primera se aisló Eucaliptol, y se comprobó la presencia de *l*- $\alpha$ -Pino y de *d*-Limoneno con algo de Dipenteno; la segunda y tercera fracción consistieron en sesquiterpenos con una pequeña proporción de ésteres, alcoholes sesquiterpénicos y una cetona, cuya semicarbazona funde por encima de 200° C; de la destilación de las flores, obtuvieron un rendimiento del 0,53% de esencia con olor a **Eucaliptol**; luego de una extracción con carbonato sódico se obtuvieron algunos ácidos con aroma a ácido *iso*-Valeriánico y un producto oleaginoso con vestigios de Vainillina.

Según Jozamí y Muñoz (Jozamí *et al.*, 1982) en el IPNAYS (San Luis, Argentina) se extrajo un aceite esencial del que se identificó **Pulegona** en un 28,4%.

Terblanché y Cornelius (Terblanché *et al.*, 1996), registran la identificación de los siguientes componentes:  $\alpha$ -Pino, *p*-Cimeno, Alcanfor, Carvona, Citral, Geraniol, acetato de Geraniol, Isomentona, Limoneno, Mentona, Pulegona y Verbenona.

Zygodlo *et al.* (Zygodlo *et al.*, 1995), analizaron el aceite esencial extraído por arrastre con vapor de agua de las inflorescencias de la planta cultivada en Córdoba (Argentina) e identificaron los siguientes constituyentes: Limoneno (4%), Sabineno (1%), Ocimeno (1%),  $\alpha$ -Tuyona (1%),  $\beta$ -Tuyona (0,7%), Mentona (2%), Dihidrocarvona (2%), **Pulegona** (66%), Espatulenol (2%), Lippifoli-1(6)-en-5-ona (1%).

Del aceite esencial de las partes aéreas de ejemplares de San Luis, Bailac *et al.*, (Bailac *et al.*, 1999), reportan una composición constituida principalmente por alcoholes sesquiterpénicos y sesquiterpenos: 33,0% de **Cadinol**; 3,5% de epóxido de 1,2-Humuleno; 3,3% de  $\beta$ -Cariofileno; 2,9% de Bicyclogermacreno; 2,8% de *trans*-Verbenol; 2,3% de Carotol; 2,2% de  $\alpha$ -Humuleno; 2% de acetato de *cis*-Crisantenol; 1,9% de  $\alpha$ -Santalol; 1,6% de  $\beta$ -Bisabolol; 1,6% de  $\gamma$ -Gurjuneno; 1,5% de  $\alpha$ -Gurjuneno; 1,5% de  $\beta$ -Selineno; 1,1% de *trans*-Sabinol; y 0,7% de Germacreno D, entre los componentes mayoritarios.

Soler *et al.* (Soler *et al.*, 1986b), reportan haber identificado en aceite esencial de hojas de esta especie, proveniente de Uruguay: **Sabineno** (30%),  $\alpha$ -Pino (10%),  $\beta$ -Pino (3%),  $\alpha$ -Terpino (1%), Limoneno (1%), 1,8-Cineol (1%),  $\alpha$ -Elemeno (2%), Pinocanfona (2%), *iso* Pinocanfona (2%),  $\beta$ -Cariofileno (7%),  $\beta$ -Bisaboleno (5%), Copaenol (4%), Globulol o Ledol (3%),  $\alpha$ -Ledreno (3%), Copaenona (4%), Isocariofileno (2%),  $\beta$ -Cadineno (2%),  $\alpha$ -Curcumeno (2%), Calameneno (1%), Espatulenol (1%).

Del aceite esencial de las flores de ejemplares de Uruguay, se identificaron como constituyentes mayoritarios alcoholes sesquiterpénicos y sesquiterpenos: Globulol (8,7%);  $\beta$ -Bisaboleno (7,7%);  $\alpha$ -Curcumeno (3,6%);  $\beta$ -Cadineno (2,8%);  $\alpha$ -Cedreno (2,3%); Copaenona (1,9%); Copaenol (1,6%); Calameneno (1,4%); Espatulenol (1,3%) y óxido de Cariofileno (1%); entre los monoterpenos: *iso* Pinocanfona (2,4%) y Pino-

canfona (2,1%). (Soler *et al.*, 1986a) En tanto que de las hojas se separó un aceite esencial constituido principalmente por: **Sabineno** (35,3%);  $\alpha$ -Elemeno (1,6%); 1,8-Cineol (1,5%); Ledol (1,5%);  $\alpha$ -Terpineno (1,2%); hidrato de *cis*-Sabineno (0,8%); *iso* Cariofileno (0,7%); *p*-Cimeno (0,6%) y Terpinoleno (0,5%). (Soler *et al.*, 1986b)

Según Bravo *et al.* (Bravo *et al.*, 1973), el aceite esencial de hojas de ejemplares colectados en Tucumán, está principalmente constituido por Canfeno, Alcanfor, Limoneno, Linalol, acetato de Linalilo, Mirceno,  $\alpha$ -Pineno y  $\beta$ -Pineno.

Del screening fitoquímico de las partes aéreas de especies de Argentina, Medina *et al.* (Medina *et al.*, 1977), informan sobre la ausencia de alcaloides, cardenólidos, flavonoides, compuestos cianogénicos, leucoantocianinas, saponinas, quinonas y taninos, en tanto que se encuentran presentes fenoles y esteroides y/o triterpenos. En el Sur de Brasil, Alice *et al.* (Alice *et al.*, 1991) detectaron la presencia de alcaloides en hojas.

Sartoratto y Augusto (Sartoratto *et al.*, 2002), en especies cultivadas en Brasil, identificaron por el método de cromatografía de gases utilizando la técnica SPME (extracción del espacio de cabeza): *trans* Pinocanfona (11%), acetato de *trans*- Pinocarvilo (9%) y *trans* Cariofileno (6%) así como también indican la presencia de un compuesto desconocido, con PM: 222 uma e IR: 1607  $\mu$ m (9% de transmitancia).

Da Silva *et al.* (Da Silva *et al.*, 2006), en un trabajo sobre la composición química de los extractos de hojas de *Aloysia gratissima* colectada en Goiania, Goiás, Brasil, reportan la presencia de sesquiterpenoides como Guayol, Bisabolol y Epatulenol en el extracto hexánico de las hojas, mientras que el extracto diclorometánico, por elusión con cloroformo – metanol en Sílicagel, dio una fracción enriquecida en el triterpenoide  $\alpha$ -Amirina. La cromatografía sobre Sílicagel del extracto en acetato de etilo, con un gradiente de solventes de hexano/acetato de etilo, (0 - 100%) permitió separar: ácido Betulínico, ácido Ursólico, ácido Oleanólico; 5-hidroxi-4,7'-dimetiléter del flavonoide Apigenina, el flavonoide Genkwanina, el 7,3',4'-trimetiléter de Luteolina; el *ent*-Kaurano Hoffmanniacetona y un glicósido de Rutina. Por otro lado, el extracto metanólico separado por cromatografía sobre Sephadex LH-20, con un gradiente de solvente de agua y agua/metanol (25, 50 y 75%) permitió aislar Verbascósido y Arenariósido. Dado que no identificaron iridoides, estos autores postulan la posibilidad de cambiar de familia a esta especie, trasladándola a la familia Lamiáceas basados principalmente en la presencia de los diterpenoides, kauranos y feniletanoides que son marcadores filéticos de la familia antes mencionada.

### 3. 3. 2-*Aloysia virgata* var. *platyphylla* (Briquet) Moldenke

NOMBRE ACTUAL DE LA ESPECIE:

-*Aloysia virgata* var. *platyphylla* (Briq.) Moldenke

SINÓNIMOS BOTÁNICOS: (Zuloaga *et al.*; 1999)

-*Aloysia virgata* var. *elliptica* (Briq.) Moldenke

-*Lippia arborea* Rojas Acosta

-*Lippia virgata* var. *elliptica* Briq.

-*Lippia virgata* var. *platyphylla* Briq.

NOMBRES VULGARES:

En guaraní: “niño rupá guazú” (Matoso, 1893) , que significa *cuna del niño grande*; también “pa’ira yvoty” que significa *flor del futuro sacerdote*; “aloyasia grande”; “niño rupá”; “cuna del niño”; “cedrón del monte”; en lengua toba: “kagueta Ichè Itàà” que significa: *padre de las canillas de guazuncho* (Sorarú *et al.*, 1978); “niño rupá mayor”. (Cabrera, 1993)

**Foto 2:** *Aloysia virgata* var. *platyphylla*, ramillete floral.



BREVE DESCRIPCIÓN BOTÁNICA:

Con hojas anchamente ovadas, de ápice agudo subobtusado y base obtusa a truncada, de margen crenado-aserrado. Dientes del cáliz triangulares, de ápice más o menos agudo, de casi igual longitud que el tubo calicino. Ovario piloso. (Botta, 1979)

De acuerdo a la información suministrada por Botta (Botta, 1979), en Brasil, Paraguay, Bolivia, Perú y norte de Argentina se encuentra la especie *A. virgata* var. *virgata* que crece en claros y márgenes de selva. De hojas lanceoladas a ovadas, con ápice agudo y base subobtusado, margen crenulado-aserrado. Dientes del cáliz subulados, más largos que el tubo calicino; ovario glabro. No se menciona material de Corrientes, aunque sugiere la posibilidad de híbridos entre las dos variedades, lo cual no ha sido verificado en este trabajo. (Botta, 1979)

En el presente trabajo se ha seleccionado para su estudio la especie *A. virgata* var. *platyphylla* dado que es la más frecuente además de encontrarse en poblaciones abundantes que aseguran la estabilidad del material de estudio para la prospección geográfico-estacional.

#### DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA:

Bolivia, Brasil, Paraguay; noroeste y nordeste de la Argentina: Chaco, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, Misiones, Salta, Santiago del Estero y Tucumán.  
(Zuloaga *et al.*, 1999; Cabrera, 1993)

#### USOS MEDICINALES ATRIBUIDOS Y FORMA DE EMPLEO:

*A. virgata* var. *platyphylla* es morfológicamente muy similar a *Aloysia virgata* var. *virgata* por lo cual se las confunde habitualmente y por consiguiente se le atribuyen los mismos usos: las hojas y flores en infusión (Bassols *et al.*, 1996); o en el mate; en Bolivia se utiliza como carminativo, estomacal y tónico; en Paraguay, como anticatarral, anti-reumático, diaforético, estimulante, estomáquico y pectoral, y en uso externo, como emoliente; también contra la sarna. En Argentina, se indica el uso de hojas y flores en casos de menstruaciones excesivas. (Bassols *et al.*, 1996)

La madera del tallo es utilizada frecuentemente por los lugareños, para la manufactura de implementos agrícolas (Botta; 1979); se le atribuyen propiedades de estomáquico y antimalárico, además las hojas frescas son usadas para el tratamiento de enfermedades de la piel (Martínez Crovetto, 1981) y para el tratamiento de excoriaciones (Bassols *et al.*, 1996; González Torres, 1997; Bourdy *et al.*, 2000). La infusión de las flores y de las hojas, tradicionalmente ha sido utilizada en casos de desórdenes menstruales. (Martínez Crovetto, 1981)

#### ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS:

De las partes aéreas, secas, de ejemplares de Brasil, se han ensayado diversas actividades moluscidas de los extractos etanólicos al 95%, resultando activos en concentraciones de 100 ppm contra *Biomphalaria glabrata*, no así los extractos con Hexano-Acetato de etilo, que no resultaron activos en la misma concentración. (De Souza *et al.*, 1984)

El extracto con Acetato de etilo de partes secas no especificadas de ejemplares de Brasil, resultó inactivo en dosis intragástrica en ratones, de 100,0 mg/kg diarios por cuatro días, contra *Plasmodium berghei*. El mismo resultado se observó con el extracto etanólico al 95% y con el extracto hexánico. (Brandao *et al.*, 1985)

#### CONSTITUYENTES IDENTIFICADOS:

Solamente se reportan los constituyentes químicos de los extractos metanólicos de *Aloysia virgata* (Ruiz y Pavón) A. L. Jussieu. El extracto metanólico diluido con agua de 6 g de hojas secas y pulverizadas, fue filtrado sobre Florisil y extraído tres veces más con HCCl<sub>3</sub>. Este extracto rindió un compuesto conocido como **Hoffmaniacetona** y su **monoacetato**, en tanto que el mismo extracto pero de los tallos, secos y pulverizados rindió **Verbascósido**, **Luteolina** y **Arenariósido** en mayor proporción. Es decir que De Oliveira *et al.* (De Oliveira *et al.*, 2005), caracterizan a las Verbenáceas por la presencia de

feniletanoides y de glucósidos de iridoides pudiendo relacionar la presencia de Kauranos y ausencia de Iridoides de *A. virgata*, con las Lamiáceas. (De Oliveira *et al.*, 2005)

### 3. 3.3 -Lippia alba (Miller) N. E. Brown

#### NOMBRE ACTUAL DE LA ESPECIE:

-*Lippia alba* (Miller) N.E.Brown

#### SINÓNIMOS BOTÁNICOS: (Zuloaga *et al.*; 1999; Botta, 1979)

- Lantana alba* Mill.
- Lantana geminata* (H.B.K.) Spreng.
- Lantana lavandulacea* Willd.
- Lantana lippioides* Hook. & Am.
- Lantana mollissima* Desf.
- Lippia asperifolia* A. Rich.
- Lippia citrata* Cham.
- Lippia crenata* Sesse & Moc.
- Lippia geminata* H.B.K.
- Lippia geminata* Kunth
- Lippia geminata* var. *microphylla* Griseb.
- Lippia globiflora* var. *geminata* (Kunth) Kuntze
- Lippia havannensis* Turcz.
- Lippia panamensis* Turcz.
- Verbena globiflora* L'Her.
- Verbena odorata* (Pers.) Steud.
- Zapania globiflora* (L'Her.) Willd.
- Zapania lantanoides* Lam.
- Zapania odorata* Pers.
- Zapania odoratissima* Scop.

#### NOMBRES VULGARES:

Argentina: “yerba buena”, “salvia”, “salvia morada”, “salvia del monte”, “salvia trepadora”, “romerillo”, “poleo” (Jozamí *et al.*, 1982); “salvia maestra”; “salvia de jardín” (Martínez Crovetto, 1981); “cidrona”, “toronjil morado”; en Perú: “pampa orégano” (Mejía *et al.*; 1995); “salvia morada”, “salvia de campo o de monte”, “salvia trepadora”, “salvia maestra”, “salvia de jardín” (Cabrera, 1993) ; en Brasil: “erva cidreira” (Toursarkissian, 1980); “falsa melissa”; en Colombia: “pronto alivio”; en Costa Rica: “juanilama”; en Cuba: “quita dolor”, “menta americana”, “anís de España”, “hinojo de anís”, “poleo”, “salvia americana”, “toronjil americano”, “toronjil de España”, “isleño”, “toronjil mentol”, “yerbabuena americana”; en Guatemala: “salvia sija”, “juanilama”, “mastranto”, “salvia santa”, “santa mari”; Honduras: “guanilama”; en México: “Hierba buena”, “hierba del negro”, “mirto”, “salvia betónica”, “sonora”, “té del país”; en Nicaragua: “juanislama”, “rondana”; en Panamá: “Mastranto”, “orozul” (Gupta, 1995); en Venezuela: “toronjil de árbol”, “cariaquito blanco”, toronjil morado” y “cedrón” (Meza *et al.*, 2001)

**Foto 3:** *Lippia alba*, rama con hojas y flores.



**BREVE DESCRIPCIÓN BOTÁNICA:**

Es un arbusto rizomatoso, que puede alcanzar 1 a 1,5 m de altura, muy ramoso, de ramas delgadas mimbreadas a veces decumbentes o arraigadas; las hojas son opuestas o ternadas, ovadas u ovado-oblongas, de 2 – 6 (9) cm long. por 1,2 – 4,5 cm lat., cuneadas en la base, serradas o crenadas en el margen; hirsutas en el haz y con el envés reticulado-venoso; flores violáceas con fauce amarilla y blanca; corola violácea a lilacina con fauce blanca amarilla. Cabezuelas breve o largamente pedunculadas. Hojas con pedúnculos breves de 0,3 – 1,5 cm long. Cáliz 2-filo. Fruto subgloboso u obovoide, de 2,8 – 3 mm diám., cubierto por el cáliz acrescente. Es una especie muy variable y polimorfa; florece en primavera. (Cabrera, 1993)

**DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA:**

Sudamérica tropical y subtropical desde el S de México e Islas del Caribe hasta la Argentina y Uruguay (Cabrera, 1993), Bolivia, Brasil, Paraguay; en Argentina: Buenos Aires, Chaco, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, Misiones, Santa Fe. (Zuloaga *et al.*; 1999) En Corrientes, se la ubica en los bosques de Ceibo (*Erythrina crista-galli*) donde el bosque ralea y el suelo se mantiene húmedo. Se la encuentra además en los suelos húmedos e inundables de campos bajos, con pajonales de *Panicum prionitis*. Presente escasamente en montes de aromito o de espinillo de bañado. (Carnevali, 1994)

#### USOS MEDICINALES ATRIBUIDOS Y FORMA DE EMPLEO:

En la Argentina, especialmente en el Nordeste esta planta es considerada como “remedio cálido” (esta propiedad viene definida en la etnobotánica en función del principio de oposición a la naturaleza del trastorno; así para enfermedades consideradas “frías” producidas por exceso de frío al órgano afectado, se recomiendan y utilizan remedios cálidos; las enfermedades “cálidas” necesitan de remedios “fríos” y son producidas por exceso de calor) por lo cual es utilizada contra el empacho en forma de decocción de las hojas con quemadillo (azúcar quemada a punto de caramelo); también se la usa como digestivo estomacal y contra los dolores estomacales (Scarpa, 2002); al cocimiento de hojas, infusión de hojas y sumidades floridas, se le atribuyen propiedades de: antiespasmódico, diaforético, digestivo, emenagogo, estimulante, estomacal, estomáquico, expectorante, nervino; infusión alcohólica en fricciones y en uso externo, como antihemorroidal (Bassols *et al.*, 1996) El zumo de la raíz o la infusión fría en tomas de tres veces al día, o también se usa la tintura, para lo cual se macera 100g de hojas frescas picadas en medio litro de alcohol 80% durante 14 días. (Mejía *et al.*, 1995). En Brasil, además se la conoce por su propiedad tranquilizante; en Guatemala se le atribuye a las hojas acción analgésica; en México, además de las propiedades citadas previamente, se la conoce por su acción sudorífica. (Bassols *et al.*, 1996)

La raíz se utiliza en casos de hemorragias menstruales y posparto; las hojas, en uso interno, se utilizan para calmar dolores menstruales, menstruaciones excesivas, tos catarra, en uso externo para las cefalalgias. (Bassols *et al.*, 1996)

En Perú, a la infusión se le atribuye la propiedad de aliviar dolores cardíacos, y aliviar los casos de infecciones urinarias, propiedad también atribuida a la tintura, y para el tratamiento de cólicos, en tanto que si se ingiere la decocción de las hojas actúa como calmante y soporífero. (Mejía *et al.*, 1995)

Según los estudios realizados por Rodríguez (Rodríguez, 1991), en la etnomedicina venezolana se le atribuyen las siguientes propiedades: sudorífica, diaforética, emenagoga, antiespasmódica, estomacal, contra la diabetes y sedante. Pascual *et al.* (Pascual *et al.*, 2001b) han efectuado una revisión general de los usos, química y farmacología de las especies de *Lippia*. En la misma, reconocen los siguientes usos para *Lippia alba*: como estomáquico y para las indigestiones; carminativo; en casos de diarrea y disentería; el té es usado como antiespasmódico; analgésico, antiinflamatorio y/o antipirético; en Brasil, utilizan la infusión o decocción para el tratamiento de malestares hepáticos, de desórdenes menstruales y también como sedante; en Guatemala y Brasil, como febrífugo; en Costa Rica, la decocción es usada como vermífugo. También se reporta como indicada para el tratamiento de la sífilis.

Según Castro *et al.* (Castro *et al.*, 2002) en la Amazonia Brasileira se conocen dos etnovarietades de esta especie que son usadas para diversas afecciones de acuerdo a la variedad. Una de ellas es conocida como “cidreira” y es utilizada como analgésico y sedativo, en tanto que la otra es conocida como “carmelitana” y es usada contra los desórdenes estomacales y como digestivo.

En la medicina vernácula de Colombia se utiliza a esta planta como antihipertensivo conjuntamente con otras especies como *Calea glomerata*, *Croton schiedeanus*, *Curatella americana* y *Lupinus amandus*. (Guerrero *et al.*, 2002)

Gazola *et al.* (Gazola *et al.*, 2004), citan el empleo de esta especie en forma de infusión en la medicina popular brasilera, para el tratamiento de estados de ansiedad y espasmos intestinales y gástricos, conjuntamente con las especies *Cymbopogon citratus* y *Melissa officinalis*, conocidas comúnmente bajo el mismo nombre vernáculo: “cidreiras”. Esta denominación indica en general especies que presentan aroma a limón y además se les asocian efectos digestivos, carminativos y espasmolíticos.

#### ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS:

Los extractos acuosos de *Lippia alba* de Brasil fueron estudiados por Gazola *et al.* (Gazola *et al.*, 2004). En concentraciones de 0,077- 0,77-7,7 y 77 mg/ml fueron administrados en volúmenes de 0,5 ml correspondientes a dosis de 0,038- 0,38- 3,8 y 38 mg y dieron como resultado una disminución en la eficacia cardiaca con todas las dosis, a los 5 segundos, en tanto que el mismo efecto se logró con las dosis mayores a los 15 segundos. La fuerza contráctil del corazón no experimentó alteraciones con la aplicación del extracto acuoso.

Estudios farmacológicos revelan una significativa acción analgésica (Costa *et al.*, 1989) central y periférica, y posible acción citostática. El citral,  $\beta$ -mirceno y limoneno, presentes en algunos quimiotipos o variedades de *L. alba* han mostrado acción anticonvulsivante por administración intraperitoneal u oral en ratas inyectadas con pentilentetrazol, requiriendo una dosis oral mayor para producir un efecto similar al de la inyección i.p.; además se ha observado un efecto potenciador con el diazepam, lo que sugiere que sus efectos responden a un mecanismo similar (Viana *et al.*, 2000); y acción sedante y relajante motora sin generar ningún efecto ansiolítico sino más bien un ligero efecto anxiogénico a las dosis mayores (Do Vale *et al.*, 2002). De acuerdo a trabajos anteriores de Viana *et al.* (Viana *et al.*, 1998) los aceites esenciales de dos quimiotipos de *L. alba* de Brasil, presentaron efectos antinociceptivo y antiedematogénico, en tanto que los tres quimiotipos estudiados, de la misma zona, demostraron tener un efecto ansiolítico notable. También se detectó en los tres quimiotipos, efectos sedante y ansiolíticos, en tanto que trabajos previos (Kluger *et al.*, 1996) no revelaron efectos ansiolíticos del extracto acuoso, si bien mostraron un efecto no específico, depresor del sistema nervioso central (Vale *et al.*, 1999). Vale, ya en 1993, comprobó que el extracto hidroalcohólico de hojas de *L. alba* causaba ataxia y somnolencia en ratones, así como también un efecto central con el incremento, de manera significativa, de la respuesta latente al estímulo térmico, aunque posteriormente no se comprobó que produzca alteraciones en la actividad locomotriz. El efecto de los extractos de *L. alba*, puede compararse al efecto que presentan las benzodiazepinas que actúan como ansiolíticos (a bajas dosis), anticonvulsivo y también como sedante y miorelajante a altas dosis (principalmente el quimiotipo citral-limoneno, a altas dosis) (Vale *et al.*, 1999). También el extracto no volátil, extraído de hojas por etanol 80% y luego de evaporación, presenta efecto sedante y miorelajante en ratones, relacionado a un elevado contenido en flavonoides. (Zétola *et al.*, 2002)

El extracto acuoso o infusión (1:5) liofilizado de las hojas y tallo secos en polvo, demostró efecto *in vitro* contra virus de influenza tipo A, diarrea viral bovina tipo 1 y herpes virus tipo 1. (Ruffa *et al.*, 2004)

Extractos con etanol-agua (90-10%) de *L. alba* colectada en marzo del 2001 en Maringá, Brasil, fueron ensayados *in vitro* por su posible acción bactericida, frente a los microorganismos: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphy-*

*lococcus aureus*, junto con las levaduras *Candida albicans*, *Candida krusei*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*. Los extractos de *Lippia alba*, mostraron una respuesta moderada frente a la actividad antifúngica contra *C. krusei* y débil actividad contra *C. tropicalis*, mientras que no mostraron actividad contra *C. albicans* ni *C. parapsilosis*. Sin embargo no mostraron actividad bactericida (Holetz *et al.*, 2002). En otros ensayos, se determinó cierta actividad bactericida contra bacterias Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus neumoniae* y *S. pyogenes* sin especificar la procedencia de las plantas ni el quimiotipo estudiado. (Cáceres, 1996)

El estudio etnofarmacológico de especies de Brasil (Oriximiná, Estado de Pará), realizado por Oliveira *et al.*, (Oliveira *et al.*, 2006), permitió corroborar el efecto sedante que se le atribuye a las infusiones o decocciones de esta especie, principalmente considerando que el estudio se realizó sobre ejemplares correspondientes al quimiotipo Mirceno – Citral. Estos autores atribuyen la efectividad sedante de las infusiones a la presencia no solamente de Citral en el aceite esencial sino también de flavonoides en los extractos de esta planta, que mostraron efecto mio-relajante y sedante, según Zétola *et al.*, (Zétola *et al.*, 2002). Por otra parte, el estudio antimicrobiano realizado por los primeros autores, reveló actividad contra *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans* T1-444, *Fonsecaea pedrosoi* 5 VPL, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Lactobacillus casei* ATCC 4646, *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Esta actividad la atribuyen a la presencia de monoterpenos, principalmente Mirceno y Citral. Dichos autores confirman que de la encuesta realizada a pobladores que hacen uso de las plantas como medicinales, no obtuvieron mayormente respuesta respecto de la actividad antiinflamatoria y analgésica que citan otros autores. (Costa *et al.*, 1989; Forestieri, *et al.*, 1996)

El examen de la acción de la infusión preparada con material vegetal de Guatemala, sobre ratas Wistar, mostró que no causa irritación gástrica por administración durante cinco días consecutivos, además de resultar altamente efectiva en la prevención de la ulceración gástrica inducida por indometacina. Otra propiedad importante observada en el tratamiento de ratones con las infusiones de *L. alba* es la de mantener prácticamente invariable el pH gástrico y la acidez total, a diferencia de lo que ocurre en el tratamiento con ranitidina. (Pascual *et al.*, 2001)

También en Guatemala se demostró la acción analgésica central y periférica a dosis de 750 a 1.000 mg / kg de peso. (Bassols *et al.*, 1996)

Pascual *et al.*, (Pascual *et al.* 2001b), reportan cierta actividad citostática del aceite esencial de *Lippia alba*, como así también indican que fue demostrada la acción sedante de algunos extractos, sin especificar los solventes de los mismos.

Guerrero *et al.*, (Guerrero *et al.*, 2002), estudiaron el efecto antihipertensivo y vasodilatador de diferentes especies vegetales utilizadas en la medicina vernácula de Colombia, entre las cuales incluían a *Lippia alba*; sin embargo los resultados de los estudios realizados sobre ratas Wistar y SHR con diferentes concentraciones de los extractos etanólicos no demostraron actividad para esta especie.

También de especies de Colombia, Puertas-Mejía *et al.*, (Puertas-Mejía *et al.*, 2002), estudiaron el efecto antioxidante del aceite esencial, encontrando que esta especie muestra una actividad muy baja respecto del radical ABTS (monocatión radical ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico) determinada por el reciente ensayo TEAC de

decoloración del radical catión y también por el ensayo DPPH, dando una actividad antioxidante total de 14,4 mmol Trolox/kg de aceite y una concentración efectiva relativa EC<sub>50</sub> de 0,28 kg de aceite/mmol de DPPH.

Los estudios sobre la actividad antiviral de extractos con diclorometano y con etanol de plantas medicinales realizados por Abad *et al.*, (Abad *et al.*, 1997), ensayada sobre *Herpes simplex* tipo I (HSV-1, virus del DNA) incluían a *Lippia alba* entre las mismas y dieron como resultado que los extractos con diclorometano fueron especialmente tóxicos por lo que estarían compuestos por sustancias antiproliferativas muy activas. Los extractos etanólicos también resultaron efectivos sobre HSV-1 a concentraciones crecientes desde 12,5 a 50 µg/ml aunque en este caso, el límite de toxicidad está muy próximo al rango de concentración útil.

Son muy pocos los trabajos que citan ensayos sobre la evaluación de la actividad fisiológica de un quimiotipo específico, a tal respecto se pueden citar los estudios realizados por Stashenko *et al.*, (Stashenko *et al.*, 2003), sobre el quimiotipo Carvona de Colombia, en el cual se evaluó la actividad antioxidante mediante mediciones realizadas sobre un sistema lipídico modelo (emulsión del ácido Linoléico) a una concentración igual o mayor que la de la vitamina E y el BHA. Como resultado de estos estudios surgió que *Lippia alba* de Colombia constituida principalmente por **Carvona** y **Limoneno** tiene una actividad antioxidante *in vitro*, en una concentración de 10 g/l, similar a la de la vitamina E y el BHA. (Stashenko *et al.*, 2003)

En el caso de ejemplares de *Lippia alba* cultivados y estudiados en La Habana, Cuba, Ramos *et al.*, (Ramos *et al.*, 2003), ensayaron el efecto antimutagénico de extractos hidroalcohólicos obtenidos por percolación. Los ensayos dieron como resultado que esta especie, de la cual no especificaron el quimiotipo estudiado, posee una IC<sub>50</sub> < 30 µg/ml en el ensayo de reducción del radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) lo cual es indicativo de un buen potencial como inhibidor de radicales libres. Por otro lado, el ensayo de inhibición de peroxidación lipídica dio una IC<sub>50</sub> < 32 µg/ml, con lo cual se presume una buena actividad antioxidante. El ensayo antimutagénico se realizó estudiando la regeneración del daño inducido por TBH (hidroperóxido de *ter*-butilo) sobre *Escherichia coli*; en este caso, se observó una disminución del 25 - 50% cuando se trató *E. coli* con extractos de *Lippia alba*, aún en ausencia de TBH (2,5 - 10mg/plato), lo cual estaría poniendo en evidencia algún tipo de toxicidad de la especie ensayada. (Ramos *et al.*, 2003)

Por otro lado, Teixeira Duarte *et al.*, (Teixeira Duarte *et al.*, 2005), ensayaron la actividad anti *Candida albicans* en algunas especies comunes en Brasil, entre las que se encontraba *Lippia alba*. Esta especie resultó constituida principalmente por **Linalol** (76,3%) seguido por **1,8-Cineol** (2,3%) y **Germacreno B** (1,9%), por lo que los resultados obtenidos son aplicables al quimiotipo Linalol. Se ensayaron tanto el extracto alcohólico como el aceite esencial, obteniéndose resultados negativos en el caso del primero, mientras que el aceite esencial resultó ser un inhibidor moderado de *Candida albicans* con un MIC (Mínima Concentración de Inhibición) de 0,6mg/ml. (Teixeira Duarte *et al.*, 2005)

En un trabajo reciente, Andrighetti – Fröhner *et al.*, (Andrighetti – Fröhner *et al.*, 2005), evaluaron la actividad antiviral de hojas de *Lippia alba* colectada en Florianópolis, estado de Santa Catarina, Brasil, sin identificar el quimiotipo o la composición química de la especie. En ese trabajo, investigaron la actividad por el método de la inhibición de

citopatogenicidad sobre virus tipo 1 *Herpes simplex* (HSV-1), y poliovirus tipo 2 (PV-2). Se ensayaron los extractos: hidroetanólico al 10%, en diclorometano 0,3%, acetato de etilo 0,3% y *n*-butanol 1,3%, resultando que el extracto en Acetato de etilo demostró actividad antipoliavirus, con una concentración  $CE_{50} = 125$  ( $\mu\text{g/ml}$ ), mientras que solamente el extracto *n*-butanólico mostró inhibición del HSV-1. (CE: concentración necesaria para inhibir el efecto citopatogénico viral al 50% ( $\mu\text{g/ml}$ )). (Andrighetti - Fröhner *et al.*, 2005)

#### CONSTITUYENTES IDENTIFICADOS:

Posee un aceite esencial que le confiere un aroma pronunciado pero cuya composición varía de acuerdo a la procedencia y aún con la edad de las hojas. Fester *et al.*, (Fester *et al.*, 1961a), distinguieron tres variedades según su origen geográfico:

-variedad santafesina: principalmente con ***l*-Dihidrocarvona**, ***l*-Alcanfor**, **Citral**, **Linalol**, ***d*- $\alpha$ -Pino**;

-variedad entrerriana: con ***d*-Limoneno**, **Lippiona** (~50%), ***d*-Piperitona** y **Piperitona** y como constituyentes menores ***d*- $\alpha$ -Pino**, ***dl*-Dihidrocarvona**, **Citral** y **Alcanfor**;

-variedad del norte de Santa Fe: con **Citral**.

Estudiando ejemplares provenientes de la Isla Puente situada muy cerca de la costa entrerriana, en Santa Fe, Fester *et al.*, (Fester *et al.*, 1961b), identificaron Dihidrocarvona tanto por la formación de una semicarbazona del aceite esencial, con un máximo en el UV de 226 nm como por el espectro IR de la misma. En esencias de la misma procedencia pero de plantas colectadas un año después, identificaron Citral, por medio de la formación del complejo bisulfítico, y 1,8-Cineol y Alcanfor por espectroscopia IR de la fracción liviana de la esencia. También por espectroscopia IR identificaron Linalol y Dihidrocarvona. Asimismo, no encontraron Lippiona, cetona característica de las especies de la costa entrerriana. En resumen, la esencia de Isla Puente está caracterizada por Dihidrocarvona, seguida por el 1,8-Cineol y en menores proporciones por Alcanfor y Carvona, estando en proporciones muy pequeñas Linalol y Citral.

De material vegetal proveniente de la zona de Puente Pezoa (Corrientes), Fester *et al.*, (Fester *et al.*, 1961c), extrajeron Citral por el método de Tiemann y luego de restituido el complejo bisulfítico, lo identificaron por espectroscopia UV. Además por restitución de la semicarbazona de la esencia, identificaron la presencia de 1,8-Cineol sin hallarse Lippiona ni Lippiafenol, componentes característicos del quimiotipo entrerriano.

De las costas de los Ríos Paraná y Uruguay, en la Provincia de Entre Ríos, se estudiaron ejemplares de *L. alba* con alto contenido en Lippiona (1,2-epoxipulegona) (Retamar, 1994). Posteriormente, Shimizu *et al.*, (Shimizu *et al.*, 1996), determinaron la configuración relativa de la Lippiona, por mediciones de dispersión óptica rotatoria, resultando 1*S*,2*S*.

También de Argentina, pero en esencias estudiadas de plantas provenientes de Tucumán, se encontró Piperitona en proporciones variables entre 37 y 24% correspondientes a esencias de primavera y otoño, respectivamente, Limoneno en 34% para esencias

de primavera y 47% en las de otoño y 1,8-Cineol variando entre el 10 y 13% respectivamente para los estados de crecimiento mencionados. (Catalán *et al.*, 1977)

Del aceite esencial de ejemplares provenientes de Brasil, Zoghbi *et al.*, (Zoghbi *et al.*, 1998), identificaron tres quimiotipos caracterizados por:

-tipo A: Sabineno (8,2%), Mirceno (3,7%), **Limoneno** (18,4%), **1,8-Cineol** (34,9%),  $\alpha$ -Terpineol (1,3%), **Carvona** (8,6%),  $\beta$ -Cubebeno (1,0%) y Nerolidol (1,5%).

-tipo B:  $\alpha$ -Tuyeno (2,1%), Sabineno (0,7%), Mirceno (11,0%), **Limoneno** (32,1%), **Carvona** (31,8%) y **Germacreno D** (21,0%).

-tipo C:  $\alpha$ -Pinenos (1,6%), Sabineno (1,0%), Ocimeno (1,0%), Limoneno (1,2%), 1,8-Cineol (3,1%), Linalol (3,9%), **Neral** (13,7%), **Geranial** (22,5%),  $\beta$ -Elemeno (3,7%),  **$\beta$ -Cariofileno** (10,2%), **Germacreno D** (25,4%), Viridifloreno (3,1%),  $\alpha$ -Farneseno (2,4%),  $\gamma$ -Elemeno (1,4%) y óxido de Cariofileno (2,9%).

En material que crece en el sudeste de Brasil y también transplantado a localidades diferentes se ha observado un nuevo quimiotipo con un aceite esencial de elevado contenido de (**S**)-**Linalol** (46,5 a 90,7%). (Siani *et al.*, 2002). En plantas colectadas en San Pablo (Brasil), Frighetto *et al.*, (Frighetto *et al.*, 1998), también reportan un aceite esencial constituido principalmente por Linalol (78%), 1,8-Cineol (6,5%) y  $\beta$ -Cariofileno (2,7%).

Teixeira Duarte *et al.*, (Teixeira Duarte *et al.*, 2005), reportan también un aceite esencial de *Lippia alba* proveniente de cultivos del Centro de Investigaciones de Química, Biología y Agricultura de la Universidad Estatal de Campinas, San Pablo (Brasil), formado principalmente por **Linalol** (76,3%), 1,8-Cineol (2,3%) y Germacreno B (1,9%).

De acuerdo al estudio del contenido en biomasa en tres partes de la planta (apical, media y basal) realizado por Castro *et al.*, (Castro *et al.*, 2002), en *Lippia alba* de Brasil, sobre especies colectadas en otoño/98, primavera/98, verano/98, invierno/98 y verano/99, el contenido resultó un 22% mayor en las plantas de verano/98 que las de otoño/98 y un 42% mayor que las de invierno/98. En tanto que el rendimiento en aceite esencial resultó mayor en verano/99, correspondiendo, además, los mayores rendimientos en esencia a las hojas más jóvenes, esto es las apicales y medias (0,5% para las apicales, 0,6% para las medias y 0,3% para las basales en otoño, 0,5% para las apicales, 0,7% para las medias y 0,1% para las basales en invierno). De acuerdo a este estudio, la composición química de los aceites esenciales resultó con el mismo perfil para todas las estaciones, alcanzando el 50% de la composición con el Neral, Geranial y el llamado por los autores: "t-Cariofileno".

Mattos *et al.*, (Mattos *et al.*, 1996), estudió la composición del aceite esencial de hojas de 6 clones de esta especie, por CG/EM, obteniendo como resultado para tres de los clones: Neral (27,2% - 30,4%) y Geranial (35,6% - 40,9%), en cambio los tres clones restantes resultaron quimiotipos Carvona, con una proporción de este componente entre el 42,3% y el 54,7%. Según Catalán *et al.*, (Catalán *et al.*, 2002), en seis colecciones de aceites esenciales del Nordeste de Brasil estudiados por De Abreu Matos *et al.*, (De

Abreu Matos *et al.*, 1996), se identificaron dos quimiotipos: uno conteniendo Carvona (42 - 55%) y Limoneno (23 - 30%) y el otro con Geranial (27 - 30%) y Neral (36 - 41%).

Resulta interesante destacar que en un examen sobre efectos comportacionales, autores brasileños hacen referencia a cuatro quimiotipos: I) con Citral,  $\beta$ -Mirceno y Limoneno; II) con Citral y Limoneno, III) con Carvona y Limoneno (Vale *et al.*, 1999), IV) con Linalol (Siani *et al.*, 2002), es decir que no citan la presencia de Lippiona, Piperitona o Dihidrocarvona a diferencia de las variedades de Argentina.

Ejemplares de la especie, colectados en Oriximiná, Estado de Pará (Brasil), dieron un aceite esencial constituido principalmente por monoterpenos oxigenados de los cuales se destacan: Mirceno (15%), Neral (16,4%), Geranial (20,7%), Nerol (3,8%) y Geraniol (5,2%). Entre los sesquiterpenos presentes en el aceite esencial, aparecen *trans*- $\beta$ -Cariofileno (4%) y Germacreno D (4,9%). Por lo cual los autores asocian esta especie al quimiotipo Mircenona-Citral. (Oliveira *et al.*, 2006)

Plantas provenientes de Cuba, se caracterizaron por aceites esenciales conteniendo Carvona (33%), Limoneno (31%) y  $\beta$ -Guayeno (13%). (Pino *et al.*, 1997; Pino *et al.*, 1996)

El aceite esencial de *Lippia alba* procedente de Lucknow, India, contiene como principales constituyentes **Linalol** (65,2%), 1,8-Cineol (6,6%), Geraniol (2,8%), Terpinen-4-ol (2,7%) y  $\alpha$ -Terpineol (1,6%). (Bahl *et al.*, 2000)

Ejemplares estudiados de Guatemala (Senatore *et al.*, 2001) caracterizados por la presencia de **1,8-Cineol** (14,2%), **Limoneno** (43,6%) y **Piperitona** (30,6%) con pequeñas cantidades de sesquiterpenos y/o alcoholes sesquiterpénicos, muestran coincidencia en la composición del aceite esencial de las hojas con muestras registradas de Tucumán, (Argentina), de acuerdo a lo examinado por Catalán *et al.*, (Catalán *et al.*, 1977), en plantas que fueron colectadas en primavera y en otoño, las que contenían un 37% y 24% respectivamente, de **Piperitona**, 34% y 47% respectivamente de **Limoneno** y 10% y 13% respectivamente de **1,8-Cineol**. (Catalán, 2002). Este trabajo resulta interesante dado que es uno de los pocos que menciona el análisis de los aceites esenciales en dos épocas de crecimiento diferentes de la matriz vegetal.

Por otra parte, Stashenko *et al.*, (Stashenko *et al.*, 2003), analizaron plantas de *Lippia alba* provenientes de la región Nororiental de Colombia, con diversos métodos de extracción (hidrodestilación, hidrodestilación asistida por microondas, extracción por fluidos supercríticos, aislamiento de componentes volátiles por el método de análisis de cabeza estático, dinámico de purga y trampa o por micro extracción en fase sólida del espacio de cabeza) por lo cual la composición del aceite esencial quedó bien dilucidada puesto que de acuerdo al método utilizado han podido identificar los constituyentes de la fracción liviana o de la sesquiterpénica. De la extracción de tallos y hojas por hidrodestilación, han identificado el quimiotipo **Carvona**, quimiotipo nuevo para esa región, constituido por: Carvona (40 - 57%), Limoneno (24 - 37%), Biciclosesquifelandreno (2 - 22%), Piperitona (1 - 2 %), Piperitenona (0,8 - 1,2%) y  $\beta$ -Bourboneno (0,6 - 1,5%).

Posteriormente, Stashenko *et al.*, (Stashenko *et al.*, 2004), confirman que el aceite esencial de *Lippia alba* obtenido por hidrodestilación, también de ejemplares de Colombia, resultó estar principalmente constituido por **Carvona** (40 - 57%) en la fracción volátil, seguido de **Limoneno** (24 - 37%), **Biciclosesquifelandreno** (5 - 22%), Piperitenona (1 -

2%), Piperitona (0,8 - 1,2%) y  $\beta$ -Bourboneno (0,6 - 1,5%). Puertas Mejía *et al.*, (Puertas Mejía *et al.*, 2002), confirman la presencia de ( $\pm$ ) Carvona en el aceite esencial de *Lippia alba* de Colombia, en un total de 51,0%.

Ciccio *et al.*, (Ciccio *et al.*, 2004), en un trabajo sobre el aceite esencial de ejemplares cultivados en campos de la empresa Bougainvillea S.A., en la región de Talamanca, Provincia de Limón en Costa Rica, identificaron dos tipos de *Lippia alba* basados a su aroma: una de ellas conocida como “dulce”, de olor fragante, y la otra “fuerte”, de aroma sumamente fuerte y poco agradable. En el citado trabajo, estudiaron la composición del aceite esencial de ejemplares que respondían a la variedad “dulce”, encontrando como constituyentes principales: Limoneno (23,3%) y Carvona (69,2%) con lo cual asocian la especie estudiada al quimiotipo Carvona, más frecuente en Brasil, Perú y Cuba.

Mejía y Rengifo, (Mejía *et al.*, 1995), citan como constituyentes del aceite esencial de material de Perú al Lippiol, Citral, L-Limoneno, Geraniol y alcaloides no especificados.

Catalán *et al.*, (Catalán *et al.*, 2002), informan que en el aceite esencial de plantas de *L. alba* oriundas del Amazona Peruana, se encontró un 63% de Carvona, 5,6% de Germacreno D y 5% de Limoneno como constituyentes principales. (Leclerq *et al.*, 1999)

Dellacassa *et al.*, (Dellacassa *et al.*, 1990), encontraron como principales componentes del aceite esencial de hojas de plantas silvestres de Uruguay, Alcanfor (18,2%), 1,8-Cineol (16,5%) y  $\beta$ -Cubebeno (6,9%). Lorenzo *et al.*, (Lorenzo *et al.*, 2001), estudió la composición química del aceite esencial de hojas de especies cultivadas en Uruguay y comunicó la presencia de un nuevo quimiotipo con Linalol como principal constituyente. El aceite que separaron era de color amarillo pálido con un rendimiento de 0,25 a 0,40% p/p y reportó como principales constituyentes a: Linalol (55,3%);  $\beta$ -Cariofileno (9,0%); Germacreno D (6,0%);  $\beta$ -Cubebeno (4,0%); Germacreno B (3,1%); Limoneno (2,9%);  $\gamma$ -Elemeno (1,4%) y Germacreno A (1,3%). Por otra parte, del análisis enantiomérico de  $\alpha$ -Pino, Sabineno, Limoneno y Linalol para los mencionados aceites esenciales, se observó que el enantiómero del Linalol más abundante es el (+), siendo la relación (+) : (-) de 99,6 : 0,4. Para el  $\alpha$ -Pino, esta relación es de 8,3 : 91,7, en el Sabineno de 16,4 : 83,6 y en el Limoneno de 95,4 : 4,6. En el caso de  $\alpha$ -Pino y Sabineno es predominante la presencia del isómero *levo*, a diferencia del Limoneno y Linalol que se encuentran principalmente como los isómeros *dextro*.

Fischer *et al.*, (Fischer *et al.*, 2004), realizaron un extensivo estudio del aceite esencial de *Lippia alba*, silvestre y cultivada, en 16 localidades de Guatemala ubicadas a diferentes alturas comprendidas entre los 200 m y los 1915 m, de las cuales obtuvieron un rendimiento en esencia variable entre el 0,18 y el 0,37% p/p. Como resultado del estudio de la composición del aceite esencial, catorce muestras dieron una composición similar que les permitió definir un nuevo quimiotipo conteniendo Mircenona, en tanto que las dos muestras restantes correspondían al quimiotipo Citral. Los componentes mayoritarios del quimiotipo Mircenona son: **Mircenona** (37,8 - 58,2%); (*Z*)-Ocimenona (11,1 - 16,3%); (*E*)-Ocimenona (3,5 - 6,8%) y Mirceno (3,5 - 8,4%). El quimiotipo Citral en cambio, está caracterizado por la presencia de: **Geraniol** (24,7 - 27,0%), **Neral** (17,6 - 18,9%), **1,8-Cineol** (20,3 - 25,4%), Sabineno (2,0 - 2,3%) y 6-metil-5-heptén-2-ona (1,4 - 1,5%).

Meza *et al.*, (Meza *et al.*, 2001), estudiaron plantas de tres localidades diferentes del Estado de Táchira, Venezuela y reconocieron que dos de ellas estaban constituidas principalmente por Z-Citral (21,5 - 59,8%) y E-Citral (30,9 - 30,8%) con proporciones menores de Geraniol, (4,3 - 24,9%), Limoneno (3,3 - 1,8) y 6-metil-5-heptén-2-ona (7,7 - 1,6%). La otra población de plantas está caracterizada por l-Carvona (40,8%) y Limoneno (44,2%).

Del análisis foliar de *Lippia alba* proveniente del Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNNE (sobre ruta 12, km 5, en Corrientes Capital), en dos períodos de cosecha diferentes (septiembre y noviembre), Schroeder M. *et al.*, (Schroeder M. *et al.*, 2004), detectaron que las concentraciones foliares de N, P, K, Ca, Mg, Cu, Mn, Fe y Zn se encuentran dentro de los parámetros considerados normales observándose solamente ligeras disminuciones en los respectivos contenidos de septiembre a noviembre. (Schroeder, M. *et al.*, 2004)

Más recientemente, Braga *et al.*, (Braga *et al.*, 2005), realizaron un estudio sobre la influencia de la técnica de extracción en el rendimiento en aceite esencial, para lo cual compararon los resultados obtenidos mediante la técnica de extracción con fluidos supercríticos, determinando las temperaturas y presiones más adecuadas para lograr el mayor rendimiento de los componentes principales de *Lippia alba*. El trabajo se realizó sobre ejemplares correspondientes al quimiotipo Carvona (Carvona y Limoneno) cultivados en el Departamento de Producción de Plantas del Colegio de Agronomía y Ciencia / UNESP, de Botucatu, Brasil. Como resultado lograron las condiciones de extracción con Fluidos Supercríticos en las que se obtiene la mayor proporción de Carvona (80%) y Limoneno (17%) correspondientes a 80bar/323K y 12bar/323K respectivamente. Además citan como componentes secundarios Guayol y Bulnesol. (Braga *et al.*, 2005) Respecto de la composición correspondiente a los extractos con equipo de Soxhlet, observaron la impurificación por presencia de compuestos pesados que se extraen simultáneamente con el etanol utilizado en el proceso; por lo cual fue más complicado realizar la determinación de las condiciones para extraer con los fluidos supercríticos la mayor proporción de Carvona y Limoneno.

Se desprende de todo lo visto anteriormente que los aceites esenciales de esta especie no presentan una composición química estable sino que por el contrario, aparecen quimiotipos. Para facilitar la lectura de todos estos antecedentes para *L. alba*, se han resumido los diferentes quimiotipos en una misma tabla, según su lugar de origen. (**Tabla A**)

**Tabla A** (los valores se aproximaron a la unidad)

Compuesto Origen y quimiotipo	1,8-Cineol	Limoneno	Mircenona	Mirceno	Germacreno D	Carvona	Lippiona	Alcanfor	Linalol	Citral	Piperitona	Geraniol	Referencia
<b>Argentina</b>													
Corrientes	sí									sí			Fester <i>et al.</i> , 1961c
Entre Ríos							50						Fester <i>et al.</i> , 1961; Retamar, 1994
Santa Fe								sí	sí	sí			Fester <i>et al.</i> , 1961
Tucumán	10-13	34-47									24-37		Catalán <i>et al.</i> , 1977
<b>Brasil</b>													
Tipo A	35	18				9							Zoghbi <i>et al.</i> , 1998
Tipo B	11	32			21	32							
Tipo C		1			25					36			
Carvona		23-30 17				42-55 80							De Abreu Matos <i>et al.</i> , 1996; Braga <i>et al.</i> , 2005
Geranial										63-71			De Abreu Matos <i>et al.</i> , 1996
Linalol	6 2,3								47- 91 73,6				Siani <i>et al.</i> , 2002; Frighetto <i>et al.</i> , 1998 Teixeira Duarte <i>et al.</i> , 2005
Tipo I		si								si			Vale <i>et al.</i> , 1999
Tipo II		si								si			
Tipo III		si				si							
Tipo IV									si				Siani <i>et al.</i> , 2002
Citral										50			Castro <i>et al.</i> , 2002
Citral										63-71			Mattos, 1996
Carvona						42-54							
Mirceno-Citral				15						37		5	Oliveira <i>et al.</i> , 2006

<b>Compuesto</b>	<b>1,8-Cineol</b>	<b>Limoneno</b>	<b>Mircenona</b>	<b>Mirceno</b>	<b>Germacreno D</b>	<b>Carvona</b>	<b>Lippiona</b>	<b>Alcanfor</b>	<b>Linalol</b>	<b>Citral</b>	<b>Piperitona</b>	<b>Geraniol</b>	<b>Referencia</b>
<b>Origen y quimiotipo</b>													
<b>Colombia</b>													
Carvona		24-37				40-57 51					1-2		Stashenko <i>et al.</i> , 2004; Puertas <i>et al.</i> , 2002
<b>Costa Rica</b>													
Dulce		23,3				69,2							Ciccio <i>et al.</i> , 2004
<b>Cuba</b>													
Carvona		31				33							Pino <i>et al.</i> , 1997; Pino <i>et al.</i> , 1996
<b>Guatemala</b>													
Citral	20-25									42-46			Fischer <i>et al.</i> , 2004
Mircenona			38-58										Fischer <i>et al.</i> , 2004
Piperitona	14	44									31		Senatore <i>et al.</i> , 2001
<b>India</b>													
Linalol	7								65			3	Bahl <i>et al.</i> , 2000
<b>Perú</b>													
Carvona		5			6	63							Leclerq <i>et al.</i> , 1999
Lippiol		sí								sí		sí	Mejía <i>et al.</i> , 1995
<b>Uruguay</b>													
silvestres	17							18					Dellacassa <i>et al.</i> , 1990
cultivadas		3			6				55				Lorenzo <i>et al.</i> , 2001
<b>Venezuela</b>													
Citral		3-2								52-91		9-25	Meza <i>et al.</i> , 1996
Carvona		44				41							Meza <i>et al.</i> , 1996

## ***4. - Hipótesis***

## *Hipótesis de trabajo*

Como se ha expuesto anteriormente, la tradición de uso de las plantas consideradas como medicinales en la región en estudio se remonta a tiempos bien antiguos, por lo cual también data de fechas similares el interés por conocer sus composiciones químicas. Aunque la región del nordeste argentino se caracteriza por ser del tipo llanura con vegetación acorde a tal tipo de suelo, la biodiversidad del ambiente ecológico es tan amplia que es probable que se produzcan notorias diferencias tanto en la composición química como en el aspecto morfológico de muchas especies vegetales. Por lo tanto, para la misma especie, puede ser frecuente encontrar usos y aplicaciones medicinales populares de lo más variadas. Trasladado esto a nivel industrial, hace que las plantas medicinales de la región sean materia prima potencialmente interesante e importante para la industria.

Paralelamente el conocimiento de los factores involucrados en el condicionamiento y expresión de la biodiversidad para las plantas y ambiente ecológico definidos, representa un valor adicional en el manejo de los materiales, brindando la información mínima requerida para su posible aprovechamiento en forma eficiente y sostenida.

En consecuencia, surge el interés de determinar la composición química de las especies seleccionadas para confirmar las siguientes hipótesis:

-la caracterización química de las poblaciones vegetales encontradas en la región en estudio, puede contribuir a identificar nuevas variedades, las que a su vez pueden ser potencialmente útiles para la industria alimenticia, farmacéutica, de sabores y fragancias, de semisíntesis, etc.;

-la variación estacional de la composición química de los aceites esenciales permitiría definir el momento más adecuado para la colecta o cosecha del material vegetal;

-la hipótesis anterior, no sólo supone la presencia de compuestos útiles o bioactivos sino también la posible existencia de sustancias indeseables por su toxicidad. El conocimiento de esto puede contribuir al uso seguro de las especies estudiadas.

En este sentido, un mayor y mejor conocimiento de estos aspectos también establece criterios para el adecuado manejo de las poblaciones preservando sus características en cuanto a comportamiento de su composición y relación con su entorno. En un escenario de manejo de plantaciones silvestres, pero fundamentalmente en una perspectiva de aprovechamiento con intervención de selección, domesticación y cultivo de los materiales.

## ***5. - Objetivos***

## **Objetivos**

Estudiar la composición química de los aceites esenciales de *Aloysia gratissima* var. *gratissima*, *Aloysia virgata* var. *platyphylla* y *Lippia alba*, para:

-recopilar la información existente sobre las especies estudiadas a fin de aportar conocimiento científico sobre la utilización de las mismas en la medicina vernácula en la región del nordeste;

-seleccionar poblaciones representativas de las especies, condiciones de desarrollo y su entorno ecológico

-obtener y analizar la composición química de sus aceites esenciales;

-analizar la variabilidad estacional de la composición química de los mismos;

-a través del conocimiento de la composición de sus aceites esenciales confirmar el uso seguro de las especies o alertar sobre la posible toxicidad de las especies estudiadas;

-identificar la existencia de nuevos quimiotipos que colaboren en la identificación botánica de las especies o que puedan ser utilizados en procesos industriales de semisíntesis;

-evaluar, con validez estadística, el impacto de cada uno de los factores considerados de modo de considerar las implicancias que estos resultados pueden tener sobre el uso popular y la aplicación industrial de estas especies.

## ***6. - Parte Experimental***

## **6.1- Materiales**

Inicialmente se delimitó el universo de estudio a poblaciones vegetales abundantes en una región de la Provincia de Corrientes.

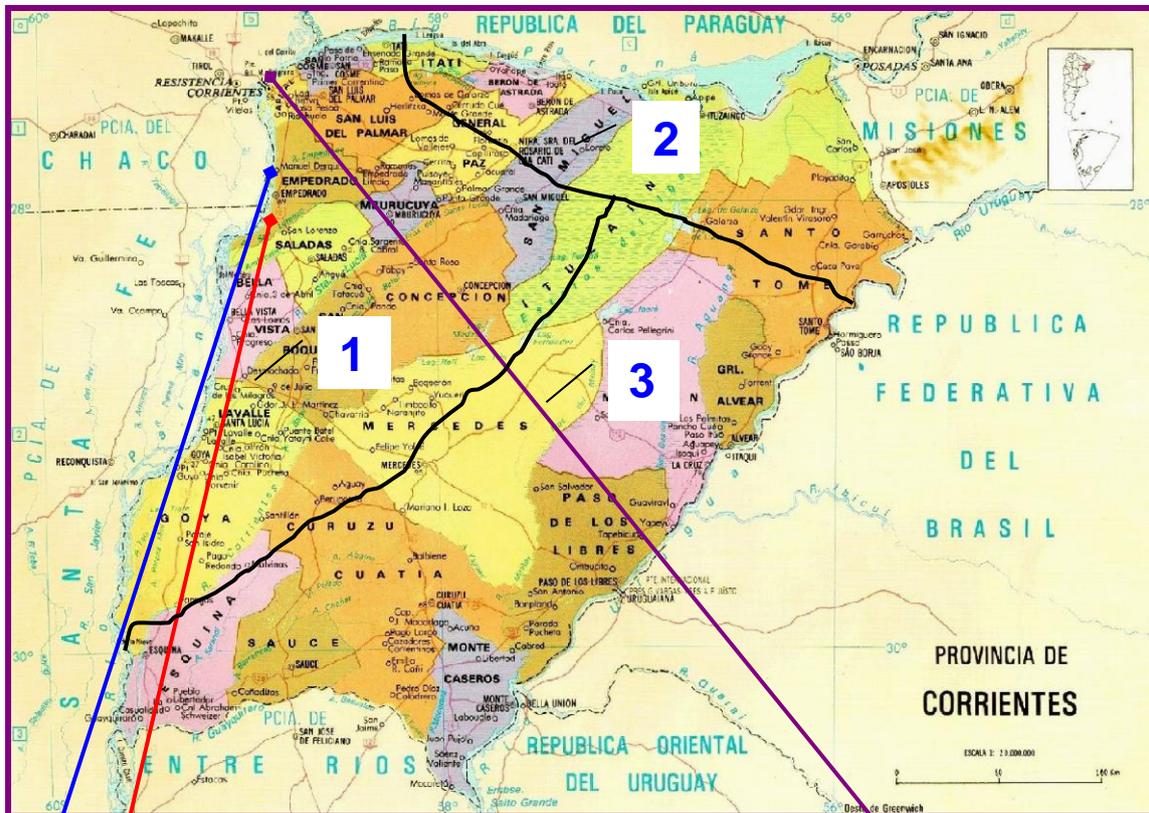
### **6.1-Ejemplares estudiados:**

Se han seguido las indicaciones de Romeo Carnevali (Carnevali, 1994) y se ha consultado a la especialista botánica Lic. Sara Tressens (Herbario IBONE) sobre la existencia de poblaciones abundantes de estas especies, tras lo cual se realizaron numerosos viajes de prospección a fin de individualizar e identificar dichas poblaciones y realizar la colecta.

En todos los casos el material vegetal ha sido recolectado realizando cortes a modo de poda, con tijera para evitar la pérdida de aceite esencial, para preservar las plantas madres y conservar la población para la realización del estudio estacional. Las recolecciones se realizaron en general en las épocas de Verano, Otoño y Primavera, excluyéndose el Invierno por ser la época en que las plantas no presentan un buen desarrollo foliar. Resultados preliminares indicaron la validez de esta estrategia de trabajo.

Para facilitar la identificación de las zonas de recolección del material vegetal, se indica en el mapa de la provincia de Corrientes, las localidades elegidas para muestreo y las zonas fitogeográficas de acuerdo a lo indicado por Carnevali (Carnevali, 1996).

**Figura 2:** Mapa de Corrientes con localización de las zonas de recolección del material vegetal:



San Isidro (Río Empedrado)

San Lorenzo

El Perichón

1, 2, 3: Zonas Fitogeográficas

De las zonas seleccionadas para la recolección del material vegetal de acuerdo al entorno ecológico-geográfico y considerando los diversos estados vegetativos de las especies a fin de realizar un seguimiento estacional de la composición del aceite esencial, se recolectaron ejemplares de:

**6.1.1-*Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. var. *gratissima*:**

Se han seleccionado tres localidades para muestrear: San Lorenzo, Río Empedrado y Perichón (Corrientes), por las características del suelo y por haberse observado poblaciones abundantes. Debido a que la región del Nordeste se caracteriza por un clima predominantemente cálido, y en los últimos años se ha observado una modificación global

de los estados climáticos como consecuencia de las corrientes de El Niño y La Niña, no necesariamente las estaciones otoño, primavera y verano concuerdan con las fechas cronológicas establecidas para las mismas, por lo tanto, algunas colecciones han sido realizadas a fines de marzo o inicios de abril, con un clima predominantemente veraniego. En tales casos, se designó la estación que caracterizaría a la esencia en función del estado de desarrollo de la planta, considerando que en la época de verano generalmente las plantas se encuentran totalmente desarrolladas, con flores y /o frutos, en primavera se hallan en floración, con pimpollos y en otoño, generalmente, no presentan ni flores ni frutos.

### **Características de los Ejemplares Estudiados:**

-**San Lorenzo** (Corrientes): 85 km al S de la capital correntina (Departamento Saladas, 28,70° S, 58,47° W y 65 m de altitud); poblaciones abundantes en el centro del pueblo, en terreno baldío aledaño a la finca de la familia Taconi; en proximidades de poblaciones de *Ambrosia tenuifolia* (altamisa) constituyendo los ejemplares colectados, el estrato de mayor altura de la población vegetal.

Material identificado por: Lic. Sara Tressens (IBONE)

Ejemplar/es de herbario: (FAI) 0124; 0126 y 0133

Ejemplares estudiados:

Código de Identificación: AgSL

-**AgSL I** (otoño): material consistente en plantas muy ramosas, de hojas muy pequeñas, con escasos pimpollos florales.

Fecha de recolección: fines de abril

-**AgSL II** (primavera): material consistente en plantas con hojas muy pequeñas, sin flores y con pimpollos florales.

Fecha de recolección: septiembre

-**AgSL III** (verano): material de ramas con hojas jóvenes y tiernas, sin flores ni frutos.

Fecha de recolección: mediados de marzo

-**Río Empedrado** (Corrientes): Localidad San Isidro, a 40 km hacia el S del centro de la capital correntina (Departamento Empedrado, 27,51° S, 58,44° W y 65 m de altitud), en el camino de acceso al puente sobre el Río Empedrado. Suelo arenoso, en cercanía de *Eugenia uniflora* (ñangapirí), *Fagara pterota* (uña de gato), *Lantana balansae* (salvia í).

Material identificado por: Lic. Sara Tressens (IBONE)

Ejemplar/es de herbario: (CTES) GRicciardi 1

Ejemplares estudiados:

Código de Identificación: AgRE

-**AgRE IV** (otoño): material consistente en plantas grandes, de 2 m de altura, con hojas pequeñas, espigas florales secas y sin frutos.

Fecha de recolección: marzo

-**AgRE V** (primavera): plantas bien verdes, de hojas grandes y recién brotadas, sin flores y sin espigas florales.

Fecha de recolección: noviembre

-**AgRE VI** (verano): ramas con hojas muy pequeñas y bien verdes, con espigas florales vacías, provenientes de arbustos bajos (1-1,30 m de altura)

Fecha de recolección: inicios de abril

-**Perichón** (Corrientes): en el camino de entrada a El Perichón (Departamento Capital, 27,25° S, 58,44° W), desde la ruta 12 y hacia el río Paraná; al borde del camino a la altura del Club de los Odontólogos, en suelo arenoso, en cercanía de especies varias de Mirtáceas y *Lippia alba* (salvia morada).

Material identificado por: Lic. Sara Tressens (IBONE)

Ejemplar/es de herbario: (CTES) **D. Matteis et al. 1910**

Ejemplares estudiados:

Código de Identificación: AgP

-**AgP VII** (otoño): ramas largas con hojas chiquitas y espiguitas florales abiertas, sin flores.

Fecha de recolección: mayo

-**AgP VIII** (primavera): ejemplares de hojas muy pequeñas y con flores blancas en espiguitas.

Fecha de recolección: noviembre

-**AgP IX** (verano): arbustos muy ramosos, de 1,6 a 1,7 m de altura, con hojas muy chiquitas y sin flores ni espigas florales.

Fecha de recolección: inicios de abril

**6.1.2-Aloysia virgata var. platyphylla (Briquet) Moldenke:**

El estudio de esta especie comenzó inicialmente con ejemplares procedentes de la localidad de San Isidro, Corrientes, identificada como Río Empedrado por ser éste el río que pasa por allí. Posteriormente a la colecta de los materiales vegetales de Río Empedrado, se colectaron muestras de San Lorenzo (Corrientes), en dos estados vegetativos. Los ejemplares destilados se identificaron de la siguiente manera:

### Características de los Ejemplares Estudiados:

-**Río Empedrado** (Corrientes): Localidad de San Isidro, a 40 km hacia el S del centro de la capital correntina (Departamento Empedrado, 27,51° S, 58,44° O y 65 m de altitud), en el camino de acceso al puente sobre el Río Empedrado. Suelo arenoso, al borde del puente, en proximidades de *Fagara pterota* (uña de gato), *Cordia curassavica* (maría negra) y *Lippia alba* (salvia morada)

Material identificado por: Ing. Carlos Chifa (Facultad de Agroindustrias, UNNE)

Ejemplar/es de herbario: **(FAI) 0122 y 0123**

Ejemplares estudiados:

Código de Identificación: **AvRE**

-**AvRE I** (otoño): ejemplares grandes y altos, de 1,70 a 2m de altura, con hojas tiernas, grandes y ásperas; ramas con espigas florales secas y pocos frutos.

Fecha de recolección: fines de marzo

-**AvRE II** (primavera): arbustos muy ramosos, sin flores, con hojas grandes y sin frutos.

Fecha de recolección: noviembre

-**AvRE III** (verano): material consistente en hojas con tallos tiernos y espigas florales.

Fecha de recolección: inicios de abril

-**San Lorenzo** (Corrientes): 85 km al S de la capital correntina (Departamento Saladas, 28,70° S, 58,47° O y 65 m de altitud); poblaciones abundantes, de ejemplares altos y sanos, cercanas a curso de agua.

Material identificado por: Lic. Sara Tressens (IBONE)

Ejemplar/es de herbario: **(CTES) AMTorres y GRicciardi 10**

Ejemplares estudiados:

Código de Identificación: **AvSL**

-**AvSL IV** (otoño): material vegetal consistente en ramas largas, con abundante población de hojas bien verdes, nuevas y tiernas y con pimpollos florales.

Fecha de recolección: inicios de mayo

-**AvSL V** (verano): ramas con hojas grandes y bien ásperas (maduras) con numerosas espigas florales secas (período posterior a floración)

Fecha de recolección: inicios de marzo

### **6.1.3-Lippia alba (Miller) N. E. Br.**

Considerando la variabilidad intrínseca asociada a la composición química, de esta especie, como se ha encontrado en la bibliografía consultada, se han estudiado ejemplares representativos de poblaciones diferenciadas principalmente y *a priori*, por el aroma. Con este criterio, se han seleccionado tres zonas de recolección diferentes, dos de ellas de la provincia de Corrientes, coincidiendo con una de las zonas de donde se colectaron las otras especies estudiadas, y la tercer zona correspondiente a la provincia del Chaco.

**-Sáenz Peña** (Chaco): ejemplares transplantados de la Villa Río Bermejito a la finca ubicada en calle Arribalzaga (4) N° 145 – E Sud; 3700- Pcia Roque Sáenz Peña, (Chaco, 26° 48' S; 60° 27' O).

Material identificado por: Ing. Carlos Chifa (Facultad de Agroindustrias, UNNE)

Ejemplar/es de herbario: **(LIL) 603257**

Ejemplares estudiados:

Código de Identificación: **LaSP**

**-LaSP I** (otoño): material vegetal de los ejemplares transplantados consistente en hojas y algunas flores, con tallos tiernos.

Fecha de recolección: fines de abril

**-LaSP II** (primavera): ramas largas, con hojas tiernas, grandes y muchas flores color lila, provenientes de los ejemplares transplantados.

Fecha de recolección: octubre

**-LaSP III** (verano): ramas medianas con hojas tiernas de tamaños variables, tallos tiernos y algunas flores, sin frutos. Material proveniente de ejemplares transplantados.

Fecha de recolección: febrero

**-LaSP IV** (primavera): ramas medianas, con muchas flores violáceas y hojas chicas, medianas y grandes, provenientes de los ejemplares silvestres de Villa Río Bermejito.

Fecha de recolección: noviembre (planta madre)

**-Perichón** (Corrientes): ejemplares silvestres recolectados al costado del camino de entrada a El Perichón (27°26 S; 58°45 O), a 500m de la ruta 12, hacia el río Paraná, frente al club de los Odontólogos. Suelo arenoso, sobre canaleta de agua, en cercanía de *A. gratissima* (niño rupá), *Eugenia uniflora* (ñangapirí) y *Lantana balansae* (salvia í).

Material identificado por: Ing. Carlos Chifa (Facultad de Agroindustrias, UNNE)

Ejemplar/es de herbario: **(FAI) 3009**

Ejemplares estudiados:

Código de Identificación: LaP

-**LaP V** (otoño): ramas de hojas pequeñas y con algunas flores.

Fecha de recolección: mayo

-**LaP VI** (primavera): ramas con hojas, muchas flores y algunos frutos.

Fecha de recolección: noviembre

-**LaP VII** (verano): ramas largas, con hojas chicas y medianas, bien verdes y tiernas, con pocas flores y muchos frutos.

Fecha de recolección: inicios de marzo

-**Santa Ana** (Corrientes): ejemplares silvestres recolectados a 10 km del Ingenio Primer Correntino, en la localidad de Santa Ana (27°28' S, 58°39' O); ubicados en suelo arenoso y vecinas a cursos de agua.

Material identificado por: Ing. Carlos Chifa (Facultad de Agroindustrias, UNNE)

Ejemplar/es de herbario: **(FAI) 3008**

Ejemplares estudiados:

Código de Identificación: LaSA

-**LaSA VIII** (verano): la población constituida por plantas medianas, con flores y pocos frutos, hojas preferentemente chicas y muy aromáticas.

Fecha de recolección: fines de febrero

## **6.2- Métodos**

### **6.2.1).- Pretratamiento de las muestras:**

#### **6.2.1.1-Recolección del material vegetal:**

Se recolectaron ejemplares sanos, libres de insectos, hongos o mohos, consistentes en ramas con hojas, flores o frutos de acuerdo al estado de crecimiento, y tallos tiernos, realizando podas en las ramas, dejando las raíces bien plantadas y el tallo de la planta intacto. El material vegetal fue transportado al laboratorio mediante bolsas de adecuado tamaño, del tipo de arpillera y/o con orificios para evitar apelmazamientos o fermentaciones.

Los ejemplares destinados al Herbario fueron colectados en el momento de la recolección y colocados entre papeles, a fin de prensarlos en la manera correspondiente, identificados con una adecuada etiqueta ilustrativa del lugar y fecha de recolección y de la posible identidad botánica.

#### **6.2.1.2-Secado por exposición y aireación:**

El material vegetal fue extendido sobre papeles de diario en un lugar seco a la sombra y al aire con periódicas remociones. Luego se separaron las hojas, tallos tiernos, flores y frutos (en caso de haberlos) que serían destinados a destilar, de los tallos lignificados que se descartaron. Se continuó el secado de las hojas durante un período variable de tres a siete días, de acuerdo a la textura y tamaño de las hojas; en general la especie *A. gratissima* var. *gratissima* ha requerido períodos de secado menores que las otras especies estudiadas, por tener sus hojas menor superficie, además de no presentar pelos ni rugosidades que pudieran favorecer la inclusión de agua, como en el caso de *A. virgata* var. *platyphylla* y *Lippia alba*.

### **6.2.2).- Extracción y Caracterización del Aceite Esencial:**

#### **6.2.2.1-Destilación por arrastre con Vapor de Agua:**

Las hojas, flores y tallos tiernos, fueron extraídos por destilación por arrastre con vapor de agua, para lo cual se utilizó un equipo formado por (ver **Foto 4**) un generador de vapor, un balón de vidrio Pyrex, de 12 litros de capacidad, un condensador tipo West de aluminio y un *frasco florentino* para contener las aguas de arrastre; este recipiente consiste en un balón de vidrio de 2 l de capacidad, con un cuello graduado en ml y con un sistema de sifonado en uno de sus costados (ver **Foto 5**) consistente en un tubo de vidrio doblado en forma de U invertida, cuya concavidad superior lleva un orificio al cual va adosado un trozo de goma que va cerrado con una llave de Hoffmann para asegurar el sifonado; este orificio se encuentra a la altura del inicio del cuello graduado; el extremo libre del tubo en forma de U contiene un robinete para regular la salida de las aguas de arrastre. Al inicio de la destilación se coloca un pie de agua saturada con cloruro de sodio para evitar que el destilado con el aceite esencial pase a la tubuladura lateral, con la consiguiente pérdida del aceite esencial; sobre el pie de agua se recogen las aguas de arrastre con el aceite esencial (\*). Luego de destilados 2 l de aguas de arrastre, se cierra el robinete del sifón y se enrasa el nivel de líquido en el cuello graduado. De esta manera, debido a la diferencia de densidades con la solución saturada con cloruro de

sodio, se separa la capa de aceite esencial que queda en la parte superior del cuello del florentino y así se mide el volumen de esencia. El tiempo aproximado de destilación usado fue de cuatro horas.

**Foto 4:** Equipo de destilación por arrastre con vapor de agua.



(\*) Una modificación al frasco florentino es el *tubo* que se muestra en **Foto 5**, que consiste en un tubo de vidrio, graduado y doblado en forma de U, con un embudo en el extremo del brazo graduado y una salida lateral en el otro, con un orificio a la altura del cero de la escala. La salida lateral tiene por finalidad descargar las aguas de arrastre en un erlenmyer de 2 l. Con este sistema se obtienen resultados similares a los del frasco original.

**Foto 5:** Tubo de recolección de aceite esencial.



Debido a que, con el arrastre con vapor de agua lo que se obtiene es una mezcla de las aguas condensadas y el aceite esencial insoluble, éste se separó cuidadosamente de las aguas de arrastre contenidas en el frasco florentino, mediante una pipeta Pasteur y se colocó en un frasco limpio, color caramelo, previamente tarado y rotulado. En caso de que hubiesen quedado pequeñas gotas de agua en el aceite, se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y luego se filtró el aceite y se colocó en el frasco limpio y seco y en las condiciones establecidas previamente. Este frasco, conteniendo el aceite esencial, fue nuevamente pesado para determinar los gramos de aceite esencial destilado. Se conservó el aceite esencial en atmósfera inerte y a  $-15\text{ }^\circ\text{C}$  en freezer, hasta el momento de su análisis.

El rendimiento en aceite esencial se expresó en función del material vegetal seco, por una relación de pesos, por lo cual los rendimientos quedaron expresados como % (p/p).

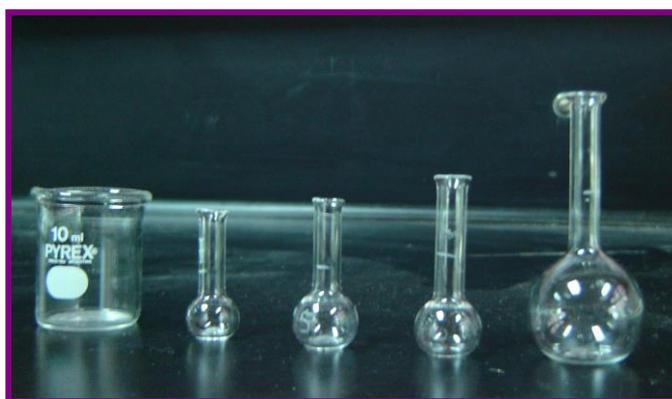
Extracción de la fracción hidrosoluble (miscible) del aceite esencial: En las aguas de arrastre quedan retenidos los componentes más solubles en agua, generalmente compuestos oxigenados como alcoholes, aldehídos o cetonas, por lo cual, una vez separado el aceite esencial insoluble, se saturaron las aguas de arrastre con sal común y se extrajeron con éter etílico en ampolla de decantación; se efectuaron tres extracciones consecutivas con mínimas cantidades de disolvente. Las fases etéreas se concentraron usando la menor temperatura posible. Por diferencia de pesada se determinaron las cantidades de aceite extraído a los que se denominaron “**esencias de aguas**”. Estas esencias de aguas tienen por finalidad completar el rendimiento total de esencia sumándose el rendimiento de las mismas al rendimiento de la esencia completa y si el caso lo requiriera, se puede también realizar el seguimiento de los constituyentes de las esencias de aguas, a fin de identificar posibles componentes que pudieran aparecer solamente en ellas y no en la esencia.

#### 6.2.2.2-Determinación de las constantes físicas:

Tanto la densidad como el poder rotatorio, para su determinación requieren cantidades mínimas de esencias de alrededor de 0,5 ml, por lo tanto, en aquellos casos en los que el aceite esencial separado no alcanzó este valor, solamente se determinó el índice de refracción que solamente necesita de algunas gotas para su medición.

**-Densidad: (d)** Se determinó con un Picnómetro, utilizando agua destilada para determinar el valor del volumen equivalente del mismo.

**Foto 6:** Picnómetros de diferentes capacidades.



Con el fin de estandarizar los resultados obtenidos en las mediciones, se realizaron correcciones por el efecto de la temperatura, para lo cual se utilizó la fórmula:

$$d_4^{20} (g/ml) = d^{t^{\circ}C} + (t^{\circ}C - 20^{\circ}C) \times 0,0008$$

Dado que en tablas no se disponía del factor de corrección correspondiente al aceite analizado, se utilizó un promedio calculado con todos los factores correspondientes a los demás aceites indicados por Guenther (Guenther, 1960) llegándose al valor promedio de 0,0008.

**-Índice de refracción: (n<sub>D</sub>)** el valor de esta constante se determinó en todas las esencias dado que requiere solamente algunas gotas del aceite esencial. Se utilizó para ello un refractómetro de Abbe, con precisión de la cuarta decimal y se realizaron tres lecturas, que luego se promediaron. La escala se calibró con agua y con una placa de vidrio de índice de refracción específico, provista con el instrumento. También en este caso se hizo necesaria la aplicación de una fórmula para llevar los valores medidos directamente a valores estandarizados a 20 °C. De la misma manera que para la corrección de la densidad, en este caso se calculó el promedio de los factores de corrección tabulados por Guenther (Guenther, 1960), llegándose al valor de 0,00045, por lo cual la fórmula empleada fue:

$$n_D^{20} = n_D^{t^{\circ}C} + (t^{\circ}C - 20^{\circ}C) \times 0,00045$$

**-Poder Rotatorio: ( $[\alpha]_D^{t^{\circ}C}$ )** Se trabajó con un polarímetro de limbo Carl ZEISS con la precisión de 0,01° y ángulo de penumbra ajustable. Todas las medidas se efectuaron con tubo polarimétrico de 5 cm de paso óptico y capacidad de aproximadamente 0,5 ml. Se realizaron números impares de lecturas, en número total de nueve a once, de las cuales se descartaron las dos extremas, y se promediaron las restantes.

### **6.2.3).- Análisis de los Aceites Esenciales:**

En algunos casos, la composición del aceite esencial permitió una separación inicial de los constituyentes por medio de la técnica de destilación a presión reducida, sobre todo cuando se encontró una notable diferenciación entre constituyentes volátiles (ejemplo abundante composición sesquiterpénica), y cuando la cantidad de aceite esencial de la que se disponía superaba los 10 ml necesarios para colocar en el balón de mínima capacidad del equipo.

#### **6.2.3.1-Destilación fraccionada a presión reducida:**

Se utilizó un equipo de destilación con banda rotante Perkin Elmer, de 24 platos teóricos, con una bomba de vacío Arthur Pfeiffer. Se procedió en cada caso a estabilizar la temperatura y la presión con un tiempo de reflujo de entre 1 y 2 hs. Una vez estable, se reguló la relación de reflujo entre 24:1 y 30:1, según cada caso, para obtener una mejor separación de los componentes de cada mezcla destilada.

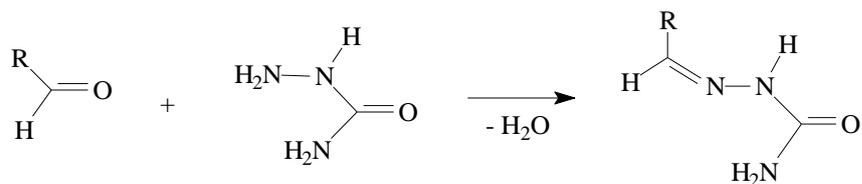
Cuando se destilaron esencias con fracciones muy volátiles, se comenzó la destilación con una presión de 30 mm Hg y una temperatura en cabeza de la columna de 60°-70 °C, hasta destilar todos los componentes livianos, luego se procedió a enfriar la columna y a bajar la presión a 2-3 mm Hg para destilar entre 60° y 70 °C las fracciones más pesadas.

#### **6.2.3.2-Métodos Químicos:**

Siguiendo la aplicación de los tradicionales métodos químicos como medio para confirmar la presencia de componentes determinados o bien para aislar constituyentes que pudiesen ser utilizados como patrones de cromatografía o espectroscopía, en algunos aceites se pudo realizar el dosaje y/o separación de ciertos componentes de naturaleza carbonílica o alcohólica, por lo cual se recurrió a la aplicación de las técnicas de:

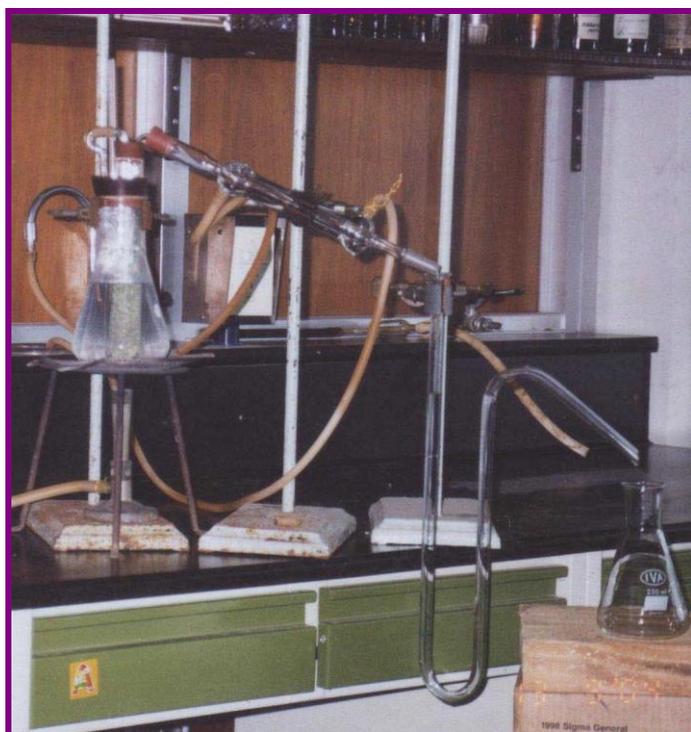
**-Preparación de semicarbazonas:** En los aceites esenciales de *Aloysia gratissima* var. *gratissima* de San Lorenzo, Corrientes, se procedió a la identificación de los isómeros de **Tuyona** presentes en ellos, previamente a la cuantificación por cromatografía graseosa, como un medio de apoyo a la identidad espectroscópica, por lo cual se obtuvieron las semicarbazonas disolviendo 1 g de compuestos carbonílicos (en este caso, de las esencias completas o fracciones conteniendo compuestos carbonílicos) en una mezcla de 0,65 g de clorhidrato de semicarbazona y 0,65 g de acetato de sodio disueltos en agua gota a gota y luego lavando con alcohol gota a gota hasta homogeneizar. La mezcla se dejó precipitar y se separó el sólido por filtración y lavado con etanol 56°. Se pasó el sólido a un plato poroso para purificar y luego se recrystalizó y determinó el punto de fusión mediante un aparato de Thiele.

Reacción general:



**-Restitución de semicarbazonas:** se realizó por hidrólisis de la semicarbazona obtenida, con ácido oxálico en una relación estequiométrica de 1:2, realizando un arrastre con vapor de agua, con un equipo de escala micro.

**Foto 7:** Equipo de micro arrastre por vapor de agua.



**-Determinación de compuestos carbonílicos por el Método de Stillman Reed:** (Guenther, 1960) este método es una modificación del método estandar de determinación de aldehídos y cetonas. Como también es un método de dosaje, fue utilizado en las esencias de *A. gratissima* var. *gratissima* de San Lorenzo para el dosaje de tuyonas. Se colocó en un balón de capacidad adecuada, 1 g del aceite esencial y se le adicionaron 35 ml de una solución de 17,375 g de clorhidrato de hidroxilamina en 20 ml de agua destilada y enrasados a 500 ml con etanol 95%, solución esta última a la que se le agregaron 7,5 ml de azul de bromofenol al 0,1% en alcohol al 50%. Al mismo tiempo se desarrolló un blanco para comparar. Luego de haber dejado la mezcla en reposo durante 24 hs, se tituló con NaOH 0,5 N estandarizado, hasta lograr un mismo punto final verde amarillento tanto para la esencia como para el blanco. Se calculó el % de compuestos carbonílicos (porcentaje de isómeros de tuyona) presentes en la esencia mediante la fórmula:

$$\% \text{ aldehídos o cetonas} = \frac{a \times m}{20 \times s}$$

donde:

a: número de ml de NaOH 0,5 N usados para la neutralización

m: peso molecular del aldehído o cetona (PM de tuyaona)

s: peso de la muestra en gramos.

### 6.2.3.3- Métodos Espectroscópicos:

#### **-Espectroscopía Infrarroja:**

Los espectros IR se obtuvieron con un espectrofotómetro de doble haz, INFRACORD 137, Perkin Elmer, con prisma de cloruro de sodio, rango de medida de 2,5 a 15  $\mu\text{m}$ . Se trabajó con celdas de cloruro de sodio, utilizando espaciador de aluminio de 0,025 mm. de espesor.

Condiciones de trabajo:	fase:	Líquido
	paso óptico:	0,025 mm
	testigo:	NaCl

Para la interpretación de los espectros IR de las esencias completas se trabajó de dos maneras: primeramente se procedió a identificar los modos vibracionales de grupos en particular, como el caso de los picos de carbonilos que aparecen a una longitud de onda de 5,4 a 5,8  $\mu\text{m}$ , o de alcoholes, que varían entre 3,4-3,8  $\mu\text{m}$  dependiendo de que el grupo OH se encuentre libre o asociado por uniones puente de hidrógeno; en segundo lugar, se procedió a la comparación directa de los espectros IR de las esencias o fracciones, con espectros IR de componentes patrones de la biblioteca propia del grupo de trabajo.

#### **-Cromatografía de gas con Detector de Masa:**

Se utilizaron dos equipos de cromatografía con detector de masa. Uno de ellos fue un equipo Shimadzu QP 5050, equipado con dos columnas capilares: una SE 52 (Mega, Legnano, Italy) unida químicamente (25 m x 0,25 mm de diámetro interno; 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor de fase fija), recubierta con 5 % de fenil-polimetilsiloxano (0,25  $\mu\text{m}$  de espesor de fase fija). Programa de temperatura en la columna: 60 °C durante 8min, aumentando hasta 180 °C a 3 °C/min; luego hasta 230 °C a 20 °C/min. Temperatura del inyector 250 °C, modo de inyección split; relación de split 1:40; volumen de inyección: 0,2  $\mu\text{l}$  de aceite. Fase móvil: helio, 122,2 kPa (51,6 cm/seg), temperatura de la interfase: 250 °C; rango de adquisición de masa 40-400 m/z. La otra columna capilar era de sílice fundida BP-20 (SGE, Australia) (25 m x 0,25 mm de diámetro interno), recubierta con polietilenglicol 20.000 (0,25  $\mu\text{m}$  de espesor de fase fija). Programa de temperatura en la columna: 40 °C durante 8min, aumentando luego hasta 180 °C a 3 °C/min y hasta 230 °C a 20 °C/min. Temperatura del inyector 250 °C, modo de inyección split, relación de split 1:40; volumen inyectado: 0,2  $\mu\text{l}$  de aceite. Fase móvil: helio, 92,6 kPa (55,9 cm/seg), temperatura en la interfase: 250 °C; rango de adquisición de masas: 40-400 m/z.

El segundo equipo usado fue un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Autosystem acoplado a un equipo Perkin Elmer Q-Mass 910 equipado con una biblioteca de espectros de masas de referencia y usando dos columnas capilares. La primera fue una columna capilar de sílice fundida SE-52 (Mega, Legnano, Italy) unida químicamente (25 m x 0,25 mm de diámetro interno y 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor de fase fija). Programa de temperatura en la columna: 60 °C por 8 min, con un incremento hasta 180 °C a 3 °C/min; luego hasta 230 °C a 20 °C/min. Temperatura en el inyector de 250 °C, con modo de inyección split y relación de split 1:40; volumen de inyección de 0,2  $\mu\text{l}$  de muestra. Fase móvil: helio, con 122,2 kPa (51,6 cm/seg), con temperatura de interfase de 250 °C y rango de adquisición de masa de 40-400 m/z.

La segunda columna fue una columna capilar de sílice fundida DB-Wax (Alltech, Deerfield, Illinois, U.S.A.) (30 m x 0,25 mm de diámetro interno) recubierta con polietilén glicol (0,25  $\mu\text{m}$  de espesor de fase fija). Programa de temperatura en la columna 75 °C durante 4 min, aumentando hasta 220 °C a 3 °C/min. Temperatura en el inyector de 255 °C; modo de inyección tipo split y relación de split 1:150; volumen inyectado de 0,2  $\mu\text{l}$  de muestra. Fase móvil: helio con 91,5 kPa (26,4 cm/seg) y temperatura en la interfase de 250 °C; rango de adquisición de masas de 40-400 m/z.

#### Identificación y Cuantificación:

Se utilizó nuevamente la Cromatografía de gases mediante un equipo Shimadzu 14B, detector de ionización por llama, procesador de datos EZ-Chrom, con dos columnas capilares: la primera SE 52 (Mega, Legnano, Italy) unida químicamente (25 m x 0,32 mm de diámetro interno y 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor de fase fija), recubierta con 5 % de fenil-polimetilsiloxano (0,40-0,45  $\mu\text{m}$  de espesor de fase fija). Programa de temperatura en la columna: 60 °C durante 8 min, aumentando luego hasta 180 °C a 3 °C/min; seguidamente hasta 250 °C a 20 °C/min y finalmente a 250 °C durante 10 min. Temperatura en el inyector: 250 °C, en el detector 280 °C, modo de inyección split, relación de split 1:30; volumen de inyección de 0,2  $\mu\text{l}$  de esencia. Fase móvil: hidrógeno a 55 kPa. La segunda una columna Carbowax 20M (Ohio, Valley, USA) de sílice fundida (25 m x 0,32 mm de diámetro interno) recubierta con polietilenglicol (0,25  $\mu\text{m}$  de espesor de fase fija). Programa de temperatura en la columna: 40 °C durante 8 min, aumentando hasta 180 °C a 3 °C/min y luego hasta 230 °C a 20 °C/min. Temperatura del inyector 250 °C; temperatura del detector 250 °C; modo de inyección split, relación de split 1:30; volumen de inyección: 0,2  $\mu\text{l}$  de esencia. Fase móvil: hidrógeno, con 30 kPa.

La identificación y cuantificación se realizó por comparación de los Índices de Retención Lineales (IRL) determinados en relación a la serie homóloga de *n*-alcanos (C<sub>9</sub>-C<sub>26</sub>) con los de bibliografía (Adams, 2001; Davies, 1990). Los patrones de fragmentación de cada componente se compararon con los almacenados en la biblioteca de espectros del software (Adams, 2001; Mc Lafferty *et al.*, 1991; NIST/EPA/NIH, 1992). La cuantificación se realizó considerando el área de picos, expresándose las proporciones relativas como porcentajes obtenidos por normalización de las mismas sin corrección por factor de respuesta.

A modo de verificar algunos resultados, se inyectaron esencias en un cuarto equipo con las siguientes características:

Un equipo Perkin Elmer modelo Clarus 500 provisto de un único inyector tipo split (Relación de split: 1:100) conectado con un divisor de flujos a dos columnas capilares

de sílice fundido: a) polietilenglicol de PM aprox. 20.000 y b) 5% fenil-95% metil sili-  
cona, ambas de 60 m x 0,25 mm de diámetro y 25 $\mu$  de espesor de fase estacionaria. La  
columna polar está conectada a un detector FID mientras que la columna no polar está  
conectada a un detector FID y a un detector de masas cuadrupolar (70 eV), a través de  
un sistema de venteo (MSVent™). Fase móvil: Helio a 1,87 ml/min. Programa de tem-  
peratura: 90 °C , luego a 3°/min hasta los 225 °C (15 min). Temperaturas de inyector y  
detectores FID: 255 °C y 275 °C, respectivamente. Cantidad inyectada: 0,2  $\mu$ l de una  
dilución al 10% en etanol. Temperatura de la línea de transferencia: 180 °C. Temperatu-  
ra de la fuente de iones: 150 °C. Rango de masas escaneado: 40-300 Da.

La identificación de los compuestos se realizó por sus índices de retención en las  
dos columnas empleadas, respecto de una serie homóloga de hidrocarburos C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>, e  
identificados por comparación de sus espectros de masa con los que figuran en la base  
de datos (Adams, 2001; Wiley 7<sup>th</sup> Ed., 2000; Nist/EPA/HH Mass Spectral Library, vers. 2.0, 2002). La  
cuantificación se realizó por el método de porcentaje de áreas de las respuestas de los  
dos FID, sin corrección por diferencias de respuesta. Se tomó para cada componente la  
menor respuesta obtenida entre las correspondientes a cada columna usada.

**-Análisis Estadístico:** El estudio quimiométrico de las correlaciones entre  
el contenido relativo de la fracción volátil a través de los componentes  
de los aceites esenciales (porcentaje de área de pico) obtenidos por CG, se  
realizó mediante un análisis de cluster (Principal Compounds  
Analysis) utilizando el Software Estadístico MINITAB Release 14 (Minitab  
Inc 2005).

**-Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de H<sup>1</sup> y de C<sup>13</sup>:** Los espectros  
se realizaron utilizando un espectrómetro de RMN Bruker AC 200, de 200 MHz /52  
mm con DCCl<sub>3</sub> como solvente de muestra.

**-Cromatografía de gases con columna de quirales:**

Para el análisis de la distribución enantiomérica de compuestos quirales. Se utilizó  
un sistema cromatográfico bidimensional. El equipo consta de dos hornos, uno de ellos  
con columna capilar unida químicamente con sílice fundida SE 52 (Mega, Legnano,  
Italy), (30 m x 0,32 mm de diámetro interno) recubierta con 5 % de fenil-  
polimetilsiloxano (0,40-0,45  $\mu$ m de espesor de fase). Programa de temperatura de co-  
lumna: 45 °C durante 6min, aumentando hasta 280 °C a 2 °C/min; luego a 280 °C duran-  
te 15min. En el horno del segundo cromatógrafo se instaló una de las siguientes colum-  
nas capilares equipadas con fases quirales: sílice fundida (25 m x 0,25 mm diámetro  
interno, 0,25  $\mu$ m de espesor de fase), recubiertas con (a) 2,3-di-*O*-etil-6-*O*-*t*-  
butildimetilsilil- $\beta$ -ciclodextrina en PS 086 (13 % fenilmetil-polisiloxano) (Mega, Leg-  
nano, Italy) y otra (b) 2,3-di-*O*-metil-6-*O*-*t*-butildimetilsilil- $\beta$ -ciclodextrina en OV 1701  
(50%). Programa de temperatura de inyección: 250 °C; temperaturas en las columnas:  
(a) 50 °C durante 6min, aumentando hasta 90 °C a 2 °C/min, 90 °C por 20min; luego  
incrementándose desde 90° hasta 180 °C a 2 °C/min, 180 °C por 10min; columna (b)  
como describe Schmidt *et al.*, (1999); temperatura en la interfase: 200 °C; detector de  
ionización por llama, 280 °C (en los dos cromatógrafos). Volumen inyectado: 1  $\mu$ l de  
aceite diluido en n-hexano 1:10; modo de inyección, split; relación de split 1:15. Fase

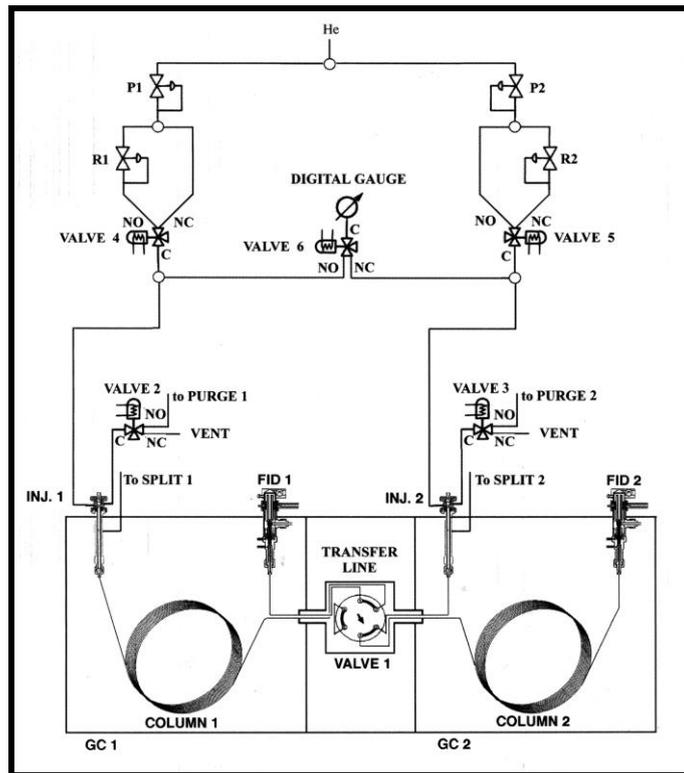
móvil: helio a 90 kPa en la precolumna y 110 kPa en la columna analítica. Los enantiómeros de sabineno fueron asignados por inyección de los estándares enantioméricos puros provistos por Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA).

El equipo (ver **Figura 3**) consta de una válvula rotativa que permite enviar la corriente de gas portador con los componentes de esencia de interés, hacia la columna de fases quirales, por eso es muy importante determinar correctamente los tiempos de elución de cada constituyente del aceite para poder seleccionar correctamente el tiempo de corte al cual la válvula desviará la corriente de gas.

La metodología de trabajo consiste en realizar una inyección de la esencia completa en el primer horno, a fin de identificar el orden de elusión de cada uno de los constituyentes del aceite. Seguidamente que se identifican los tiempos de retención de los mismos, se seleccionan los picos correspondientes a los componentes cuyas quiralidades se pretenden conocer, y se programa con el software del equipo los tiempos a los cuales la válvula desviará el componente indicado, a la columna de fase quiral del segundo cromatógrafo. Por lo tanto, una vez identificados y programados los tiempos de corte, se realiza una segunda inyección de la esencia completa en el primer cromatógrafo. Previamente a este paso, es conveniente dar un tiempo de espera en la segunda columna, consistente generalmente entre 10 y 15 min, para que los componentes cortados puedan eluir con sus respectivos tiempos de retención en la columna quiral. Una vez que se completa la corrida con los cortes, y si los tiempos de corte estuvieron bien seleccionados, se observan los picos cortados en el cromatograma completo en la forma de picos truncados a los cuales les falta el área central. En el cromatograma de los componentes quirales se observan los picos de los componentes ópticamente activos, que eluyen separadamente. De esta manera se pueden comparar los tiempos de elusión correspondientes, con los tiempos de elusión de los patrones puros eluidos en las mismas condiciones para determinar la quiralidad del componente mayoritario.

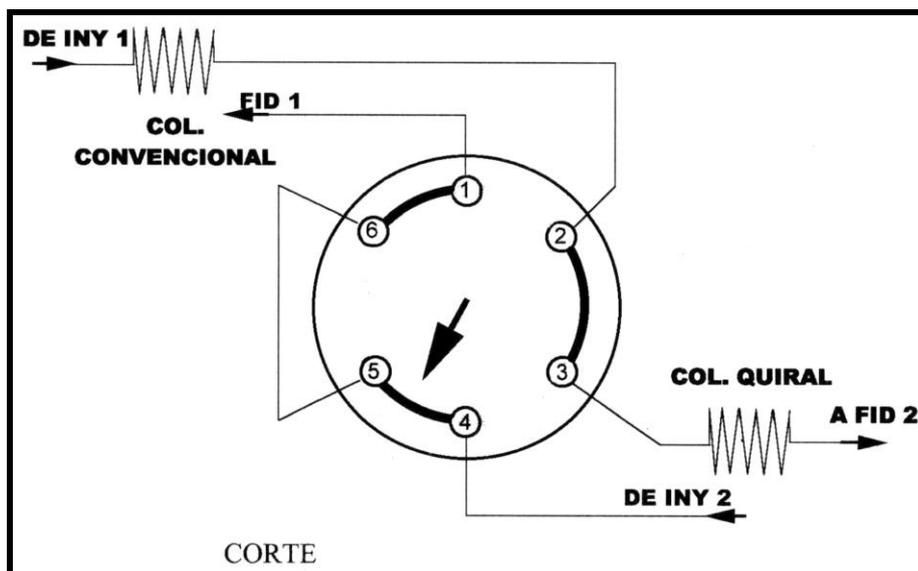
Para ejemplificar el funcionamiento de la válvula, se incluye el siguiente esquema de la trayectoria del gas de arrastre. La columna 1 corresponde al primer cromatógrafo, y es la que recibe primeramente el gas portador con el aceite esencial; la segunda columna es la columna de fases quirales a la cual llega el gas con parte del aceite esencial, de acuerdo a la apertura de la válvula 1. (**Figura 3**)

**Figura 3:** Esquema de las columnas y válvula del CG quiral.



Cuando se programa el corte, al llegar el tiempo de corrida correspondiente la válvula 1 gira de tal modo de enviar la corriente de gas a la columna quiral y al FID 2; mientras no se alcance el tiempo programado, la válvula se mantiene estática y la corriente de gas pasa de la columna convencional al FID 1. (Figura 4)

**Figura 4:** Esquema de la válvula rotativa del CG quiral.



## ***7. - Resultados***

### **7.1-Aloysia gratissima var. gratissima:**

Las cantidades de material vegetal destiladas con sus respectivas cantidades de aceite esencial obtenido se detallan a continuación:

#### **-AgSL I:**

Peso de material vegetal destilado: 1743 g

Volumen de arrastre: 2 litros

Peso de esencia directa: 19,8 g; esencia color amarillo que emulsiona con el agua de arrastre. El aroma es similar al de las plantas frescas pero más acentuado y pungente; al final de la destilación se suaviza un poco el aroma llegándose a percibir un fondo frutado.

#### **-AgSL II:**

Peso de material vegetal destilado: 871 g

Volumen de arrastre: 2 litros

Peso de esencia directa: 6,6 g; esencia de color amarillo muy pálido, con aroma especiado similar al de las plantas frescas pero más concentrado.

#### **-AgSL III:**

Peso de material vegetal destilado: 914 g

Volumen de arrastre: 2 litros

Peso de esencia directa: 10,6 g; esencia de caracteres organolépticos similares a las anteriores.

#### **-AgRE IV:**

Peso de material vegetal destilado: 255 g

Volumen de arrastre: 4 litros

Peso de esencia directa: 2,3 g; esencia color amarillo pálido que se emulsiona con el agua de arrastre, aroma muy especiado pero con un agradable fondo de limoneno.

#### **-AgRE V:**

Peso de material vegetal destilado: 733 g

Volumen de arrastre: 6,5 litros

Peso de esencia directa: 11,5 g; esencia color amarillo – pálido, con aroma especiado y un fuerte indicio de 1,8 – Cineol.

#### **-AgRE VI:**

Peso de material vegetal destilado: 296 g

Volumen de arrastre: 2 litros

Peso de esencia directa: 2,7 g; de esencia de color amarillo – limón, intenso. El aroma de la esencia es muy similar al de la esencia IV.

#### **-AgP VII:**

Peso de material vegetal destilado: 119 g

Volumen de arrastre: 2 litros

Peso de esencia directa: 1,2 g; esencia color amarillo - limón, con un fuerte aroma especiado y un fondo notable a frutas.

#### **-AgP VIII:**

Peso de material vegetal destilado: 205 g

Volumen de arrastre: 2 litros

Peso de esencia directa: 1,2 g; esencia de color amarillo pálido, con un aroma especiado pero bastante desagradable y con un fondo frutado (algo limonado).

**-AgP IX:**

Peso de material vegetal destilado: 362 g

Volumen de arrastre: 2 litros

Peso de esencia directa: 3,3 g; esencia color amarillo – limón, con un fuerte y destacado aroma especiado similar a las esencias anteriores del mismo origen.

En la **Tabla 1**, se detallan las constantes físicas correspondientes a los aceites esenciales y en la **Tabla 2**, la composición química de los mismos:

**Tabla 1**

**-Constantes Fisicoquímicas:**

	San Lorenzo			Río Empedrado			Perichón		
	AgSL I	AgSL II	AgSL III	AgRE IV	AgRE V	AgRE VI	AgP VII	AgP VIII	AgP IX
<b>Rto % P/P</b>	1,2	0,8	0,7	1,3	1,6	1,0	1,0	1,0	1,1
<b>d<sup>20</sup><sub>4</sub> (g/ml)</b>	0,93	0,93	0,93	0,96	0,91	0,93	0,93	0,94	0,93
<b>nd<sup>20</sup></b>	1,4939	1,4872	1,4945	1,5088	1,4922	1,5032	1,5045	1,5034	1,5070
<b>α<sub>D</sub><sup>20</sup> °C</b>	+00,36 <sup>o26</sup>	-15,26 <sup>o22</sup>	-17,28 <sup>o27</sup>	+03,20 <sup>o27</sup>	-27,02 <sup>o28</sup>	+07,26 <sup>o25</sup>	-31,44 <sup>o21</sup>	-42,51 <sup>o26</sup>	-29,82 <sup>o25</sup>

**Tabla 2**

**-Composición de los aceites esenciales:**

Los componentes están registrados según el orden de elusión en la columna no polar, con sus respectivos índices de retención lineal experimentales, calculados en columna SE52:

tr: indica proporción menor que 0,1%

IRL (SE52)	Componente	%										*
		San Lorenzo			Río Empedrado			Perichón				
		AgSL I	AgSL II	AgSL III	AgRE IV	AgRE V	AgRE VI	AgP VII	AgP VIII	AgP IX		
915	α-Tuyeno	-	tr	-	0,1	tr	0,2	0,1	tr	tr	<b>no</b>	
930	α-Pineno	0,2	0,3	tr	0,2	0,5	0,4	0,8	1,4	1,2	si	
972	Sabineno	3,9	6,3	2,6	0,1	5,4	tr	tr	tr	tr	si	
979	β-Pineno	-	-	-	0,1	tr	0,3	0,4	0,7	0,5	si	
987	β-Mirceno	0,2	0,3	0,2	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1	0,3	si	
1000	α-Terpineno	-	-	-	tr	-	0,1	0,1	0,1	0,1	si	
1011	p-Cimeno	-	-	tr	1,6	0,3	3,0	2,0	1,4	5,8	si	
1024	β-Felandreno	0,4	0,5	-	-	-	-	-	-	-	<b>no</b>	
1027	Limoneno	-	-	0,7	tr	0,6	tr	tr	0,1	tr	si	
1041	1,8-Cineol	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	si	
1044	(E)-β-Ocimeno	-	-	-	tr	tr	0,1	0,1	0,2	0,2	si	

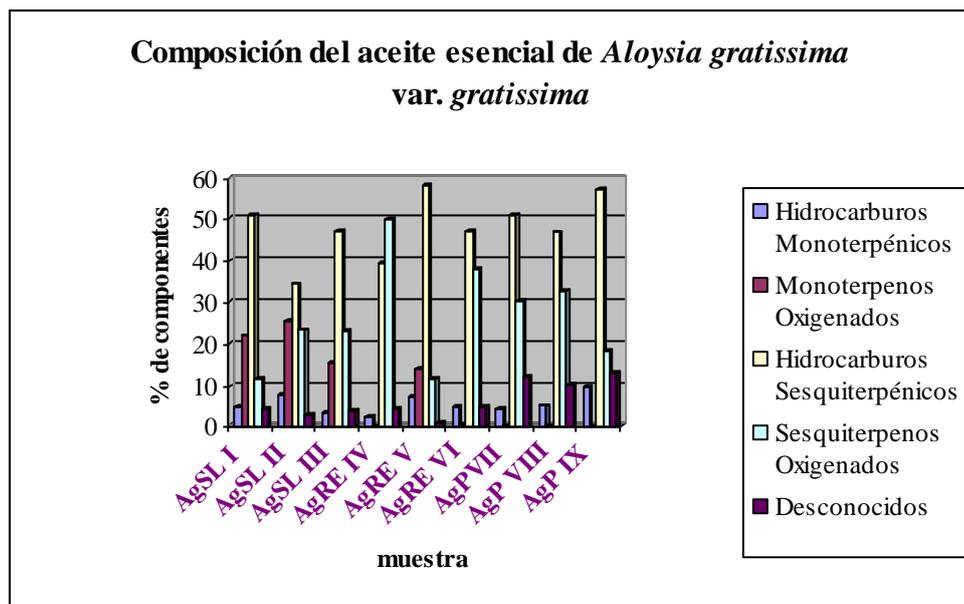
1055	$\gamma$ -Terpineno	0,2	0,2	-	0,1	-	0,5	0,8	1,0	1,5	no
1083	Linalol	-	-	-	0,1	13,9	0,6	tr	tr	tr	si
1108	$\alpha$ -Tuyona	10,7	17,5	6,8	-	-	-	-	-	-	si
1115	$\beta$ -Tuyona	1,3	1,4	1,3	-	-	-	-	-	-	si
1131	Óxido de (Z)-Limoneno	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	no
1139	Mircenona	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	no
1161	$\beta$ -Tuyanól	0,6	0,2	0,1	-	-	-	-	-	-	no
1167	Óxido de (E)-Limoneno	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	no
1185	Terpinen-4-ol	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	no
1185	$\alpha$ -Terpineol	0,1	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-	no
1190	Mirtenol	-	-	-	-	-	-	0,1	0,1	tr	no
1267	Acetato de $\beta$ -Tuyilo	0,2	0,1	0,2	-	-	-	-	-	-	no
1308	Acetato de Terpinen-4-ol	6,2	4,5	2,1	-	-	-	-	-	-	no
1321	Acetato de Mirtenilo	-	-	-	-	-	-	tr	0,1	tr	no
1335	Acetato de (E)-Piperitol	2,7	1,7	2,1	-	-	-	-	-	-	no
1338	$\delta$ -Elemeno	-	-	-	2,5	0,8	1,2	-	-	-	no
1347	$\alpha$ -Cubebeno	-	tr	-	tr	tr	tr	0,1	0,2	tr	no
1353	$\alpha$ -Longipineno	0,6	0,1	-	-	-	-	-	-	-	no
1360	Acetato de $\alpha$ -Terpinilo	-	-	2,0	-	-	-	-	-	-	no
1375	$\alpha$ -Copaeno	-	-	0,2	-	-	-	0,6	0,9	tr	no
1378	$\beta$ -Bourboneno	0,4	1,0	0,8	tr	tr	0,3	-	tr	tr	no
1384	isómero de $\beta$ -Elemeno	-	-	-	1,2	0,7	2,0	2,1	1,8	2,7	no
1400	$\beta$ -Elemeno	0,5	0,2	tr	14,4	1,6	23,6	29,0	24,4	35,7	no
1400	$\beta$ -Cubebeno	-	-	0,6	-	-	-	-	-	-	no
1400	$\beta$ -Funebreno	tr	0,3	-	-	-	-	-	-	-	no
1422	$\alpha$ -Gurjuneno	-	-	0,6	0,4	-	0,1	-	-	-	si
1427	$\beta$ -Cariofileno	25,1	15,2	15,3	1,8	28,0	3,5	3,0	2,8	3,8	si
1433	$\gamma$ -Elemeno	-	-	0,7	0,5	4,9	1,1	0,3	1,3	2,5	no
1449	$\beta$ -Copaeno	-	-	0,4	0,1	-	tr	-	0,3	tr	no
1450	(Z)-3,5-Muuroladieno	0,7	0,3	tr	-	-	-	-	-	-	no
1457	dehidro Aromadendrano	0,6	0,7	0,8	-	-	-	-	-	-	no
1458	Aromadendreno	-	-	0,1	-	-	-	-	-	tr	no
1460	allo Aromadendreno	0,5	0,1	-	0,6	-	0,8	1,2	1,6	tr	no
1462	Desconocido 1	-	-	-	-	-	-	1,7	tr	1,6	no
1466	$\alpha$ -Humuleno	3,0	1,5	2,3	0,6	4,3	1,2	1,8	1,1	1,2	si
1479	Germacreno D	3,5	6,9	8,8	1,9	10,1	3,8	6,8	8,3	5,0	si
1488	$\beta$ -Selineno	-	-	-	0,8	-	1,3	1,2	tr	1,8	si
1500	Germacreno A	2,4	1,8	tr	0,4	-	0,7	3,6	2,8	2,4	no
1500	Biclogermacreno	12,6	5,6	9,1	12,8	3,8	5,9	-	-	-	si
1521	$\beta$ -Bisaboleno	0,5	0,4	3,0	-	-	-	-	-	-	si
1530	$\delta$ -Cadineno	0,2	tr	0,8	0,3	-	0,2	tr	tr	0,2	no
1535	(Z)-Nerolidol	-	-	-	-	-	-	0,3	0,3	-	no
1537	10- <i>epi</i> -Cubebol	-	-	0,1	0,6	0,6	0,4	7,9	13,4	0,5	no
1545	$\alpha$ -Cadineno	-	-	-	0,3	0,1	0,4	tr	tr	0,2	no
1557	Germacreno B	0,5	0,2	3,7	0,7	3,8	1,0	1,4	1,3	1,5	no
1557	Ledol	-	-	-	0,2	tr	4,5	-	-	-	si
1572	(Z)-Muurool-5-en-4- $\alpha$ -ol	-	-	-	-	-	-	1,7	2,6	tr	no
1575	Epóxido de $\alpha$ -cedreno	0,4	tr	-	-	-	-	-	-	-	no
1581	hidrato de (E)-Sesquisabineno	-	3,0	-	-	-	-	-	-	-	no
1583	(E)-Nerolidol	tr	0,2	11,6	-	-	-	-	-	-	no
1585	Espatulénol	3,7	7,7	tr	-	-	-	-	-	-	si
1585	Germacren-D-4-ol	-	-	tr	-	-	-	0,5	1,3	tr	no

1592	Óxido de Cariofileno	3,8	10,1	tr	-	-	-	1,1	1,0	1,6	si
1600	Desconocido 2	-	-	-	-	-	-	6,6	6,0	6,5	no
1600	Epoxiaromadendreno	-	-	-	0,3	0,9	2,7	6,2	5,7	6,9	no
1601	Globulol	-	-	-	5,4	6,2	2,9	0,2	tr	-	si
1607	Cedrol	0,8	0,6	-	-	-	-	-	-	-	no
1608	Epóxido de Humuleno II	-	-	0,2	0,5	-	9,7	-	-	-	si
1616	Viridiflorol	-	-	6,2	33,6	0,9	10,0	-	-	-	no
1627	Epoxi-alloaromadendreno	tr	-	1,1	1,2	tr	-	-	-	-	no
1635	Cedr-8(15)-en-10- $\alpha$ -ol	0,2	0,4	1,2	2,3	1,0	1,8	-	tr	-	no
1637	Sesquilavandulol	-	-	-	-	-	-	4,5	3,6	3,5	no
1640	Eremoligenol	0,4	0,5	-	-	-	-	-	-	-	no
1643	Selin-11-en-4- $\alpha$ -ol	-	-	0,8	-	-	-	0,9	1,6	-	no
1643	$\alpha$ -Muurolol	-	-	-	tr	-	-	1,2	tr	-	no
1655	Cariofila-4(14),8(15)-dien-5- $\beta$ -ol	1,2	0,3	tr	-	-	-	-	-	-	no
1664	14-hidroxi-9- <i>epi</i> -( <i>E</i> )-cariofileno	-	-	-	1,9	0,8	0,6	1,2	1,1	2,0	no
1666	Acetato de Elemol	-	-	0,9	-	-	-	3,0	0,4	2,4	no
1674	Selina-3,11-dien-6- $\alpha$ -ol	-	-	-	2,3	0,5	2,2	-	-	-	no
1676	3-Tuyopsanona	-	-	-	1,2	-	2,0	-	-	-	no
1686	Eudesma-4(15),7-dien-1- $\beta$ -ol	-	-	-	0,4	0,7	1,0	1,6	1,6	1,4	no
1696	( <i>E</i> )-Bisabolol-11-ol	0,9	0,5	1,0	-	-	-	-	-	-	si
1725	Desconocido 3	1,5	1,8	2,7	2,4	0,6	2,6	2,1	3,0	2,8	no
1741	Desconocido 4	2,7	1,2	1,2	1,9	0,2	2,2	1,7	1,2	2,2	no
<b>Componentes Identificados</b>		<b>89,2</b>	<b>90,7</b>	<b>89,2</b>	<b>91,6</b>	<b>90,7</b>	<b>90,2</b>	<b>86,0</b>	<b>84,6</b>	<b>84,9</b>	
<b>Componentes Agrupados</b>											
Hidrocarburos Monoterpénicos		4,9	7,6	3,5	2,3	7,1	4,7	4,4	5,0	9,6	
Monoterpenos Oxigenados		21,8	25,5	15,4	0,1	13,9	0,6	0,2	0,2	0,0	
Hidrocarburos Sesquiterpénicos		51,1	34,3	47,2	39,3	58,1	47,1	51,1	46,8	57,0	
Sesquiterpenos Oxigenados		11,4	23,3	23,1	49,9	11,6	37,8	30,3	32,6	18,3	
Desconocidos		4,2	3,0	3,9	4,3	0,8	4,8	12,1	10,2	13,1	

\* Referencia a la identificación de estos constituyentes en *Aloysia gratissima* de otros orígenes geográficos de acuerdo a la bibliografía.

Comparando en un mismo gráfico el porcentaje de los componentes agrupados para los aceites esenciales de los ejemplares de *A. gratissima* var. *gratissima* analizados:

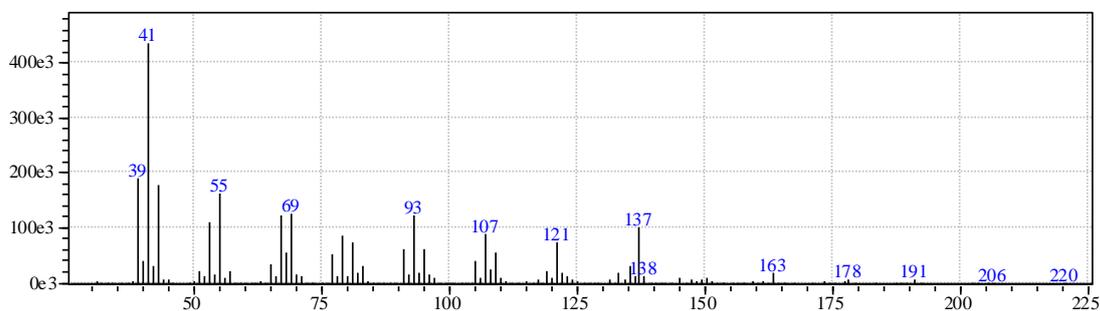
**Figura 5:** Gráfico de los componentes agrupados de los aceites esenciales de *A. gratissima* var. *gratissima*



A continuación se representan los espectros de masa de los compuestos desconocidos:

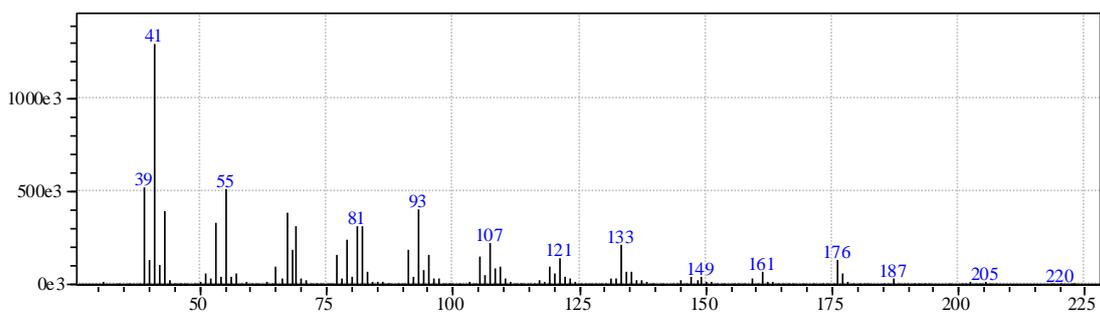
**-EM 1:**

Espectro de Masa del componente **Desconocido 1**:  $M^+$ : 220, de *A. gratissima* de El Perichón.



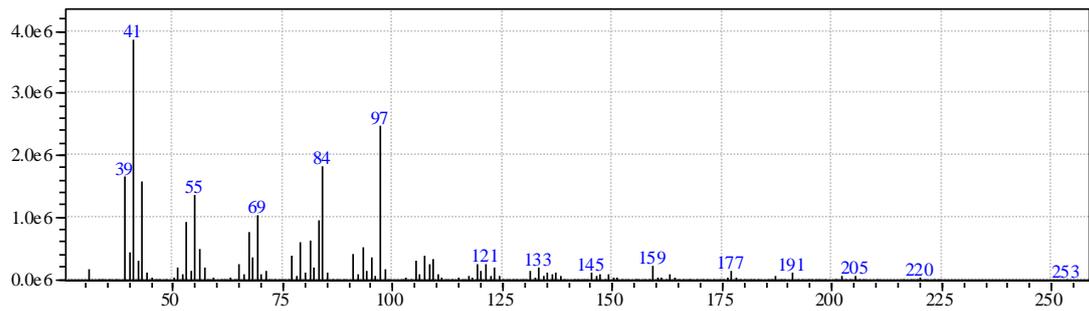
**-EM 2:**

Espectro de Masa del componente **Desconocido 2**:  $M^+$ : 220, de *A. gratissima* de El Perichón.



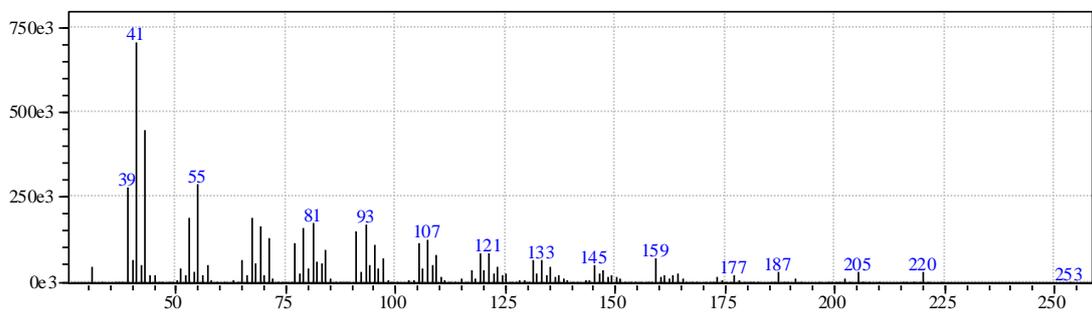
**-EM 3:**

Espectro de Masa del componente **Desconocido 3**:  $M^+$ : 220, de *A. gratissima* de El Perichón.



#### **-EM 4:**

Espectro de Masa del componente **Desconocido 4**:  $M^+$ : 220, de *A. gratissima* de El Perichón.



A pesar del gran número de componentes identificados, hay una cierta cantidad de constituyentes que sí fueron identificados en esencias de otras procedencias citados en bibliografía y que sin embargo, no fueron encontrados en los ejemplares estudiados en el presente trabajo. Esos constituyentes son:

Citral, *trans*-Sabinol, hidrato de *cis*-Sabineno, Terpinoleno, Canfeno, acetato de Linalilo, Verbenona, *trans*-Verbenol, Carotol, acetato de *cis*-Crisantenol, Pulegona, Alcanfor, Pinocanfona, *iso* Pinocanfona, Carvona, Dihidrocarvona, Lippifoli-1(6)-en-5-ona,  $\alpha$ -Elemeno,  $\gamma$ -Gurjuneno,  $\alpha$ -Cedreno, *iso* Cariofileno,  $\beta$ -Cadineno,  $\alpha$ -Curcumeno, Calameneno, Copaenol, Copaenona, Cadinol y  $\alpha$ -Santalol.

La presencia de  $\alpha$ - y  $\beta$ - Tuyona en el aceite esencial de los ejemplares de San Lorenzo, se verificó por la formación de la semicarbazona a partir de la fracción de **AgSL I** destilada a 1,7 mm Hg entre 45° y 75 °C y una vez purificada por recristalización y determinado el punto de fusión, se comparó con el de las semicarbazonas patrones y las semicarbazonas de la mezcla de ambas Tuyonas, además de la observación de los cristales con el microscopio de la platina de Kofler.

Por otra parte, también fue determinado el contenido de compuestos carbonílicos de los aceites esenciales **AgSL I**, **AgSL II** y **AgSL III**, respectivamente, por el método clásico de dosaje de Stillman Reed (Ver: **6.2.3.2**). Con este método, se determinó que el menor contenido en carbonílicos de las esencias corresponde al estado de crecimiento coincidente con la época de verano, en tanto que el máximo valor se observó en la esencia de primavera como se observa en la siguiente tabla:

**Tabla 3:**

**-Contenido en componentes carbonílicos por dosaje:**

	<b>AgSL I</b>	<b>AgSL II</b>	<b>AgSL III</b>
<b>% carbonílicos</b>	13,7	19,3	8,2

La corrida cromatográfica con cromatografo de gases con detector de masas, permitió la identificación de los isómeros de Tuyona por lo cual la identificación de  $\alpha$ - y  $\beta$ -Tuyona en las esencias de San Lorenzo, fue completamente asegurada.

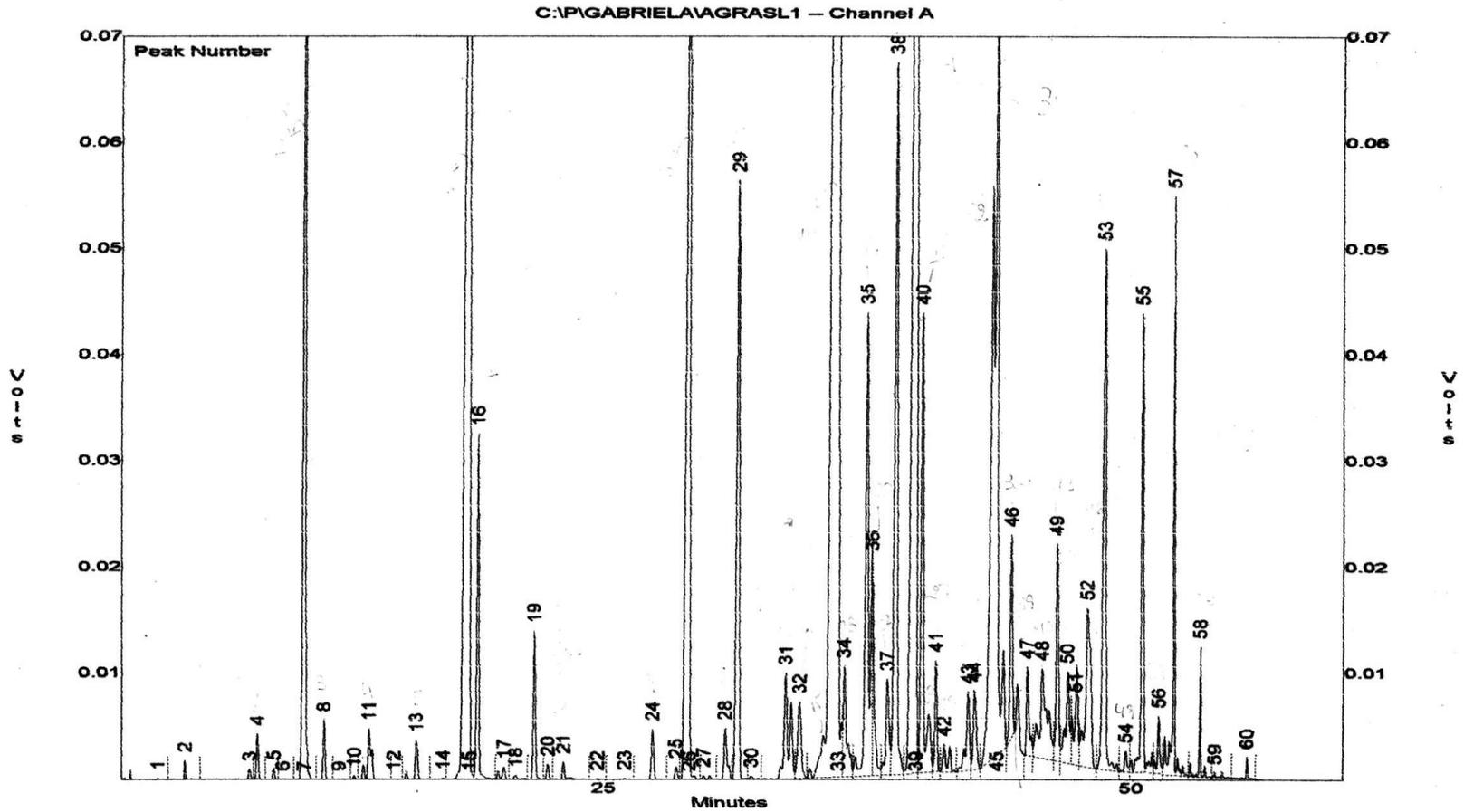
(Ver **CG 1**, **CG 2** y **CG 3** en páginas 68, 69 y 70)

**-CG 1:**

Cromatograma de esencia AgSL I, donde:

pico 15:  $\alpha$ -Tuyona

pico 16:  $\beta$ -Tuyona

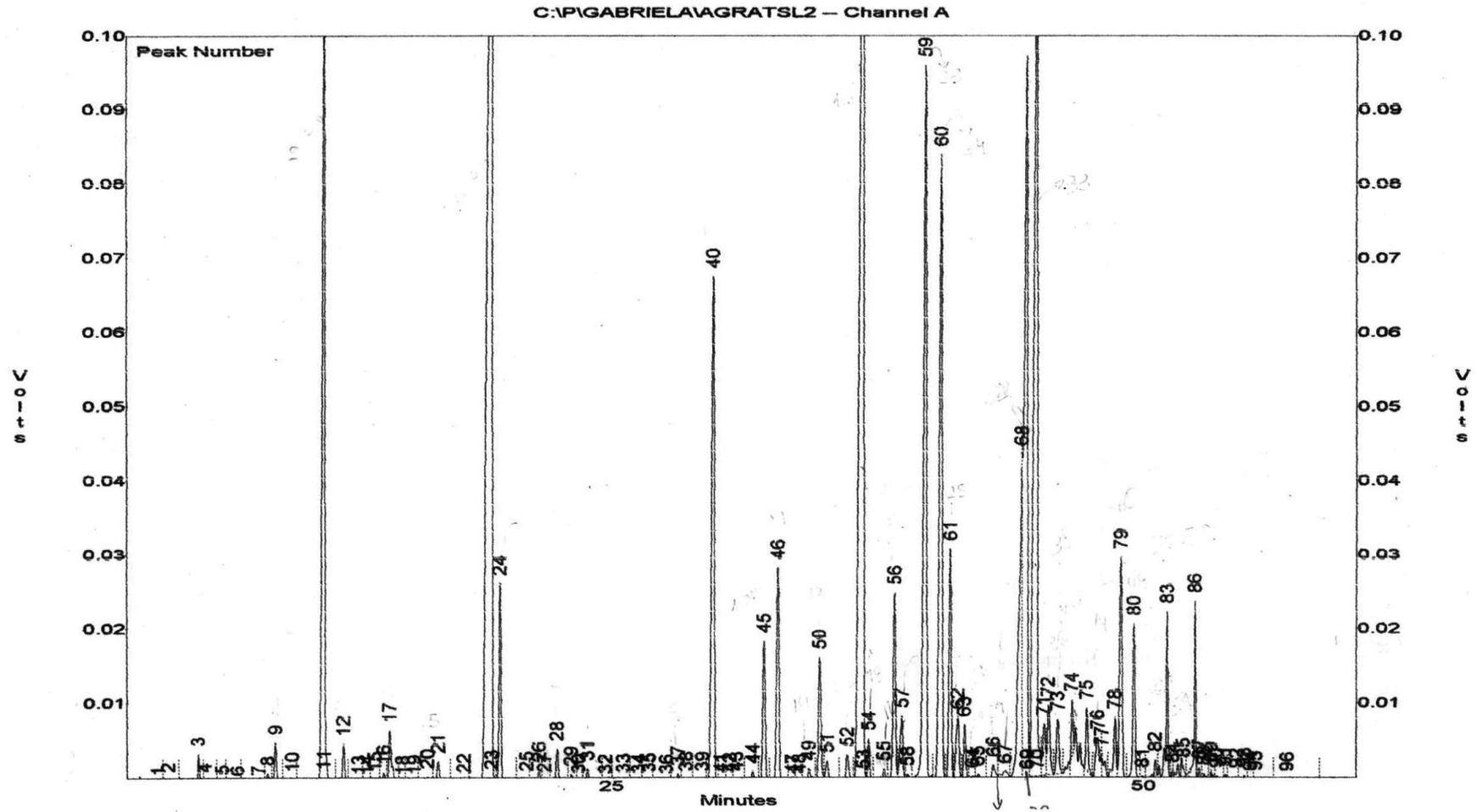


**-CG 2:**

Cromatograma de esencia AgSL II, donde:

pico 23:  $\alpha$ -Tuyona

pico 24:  $\beta$ -Tuyona

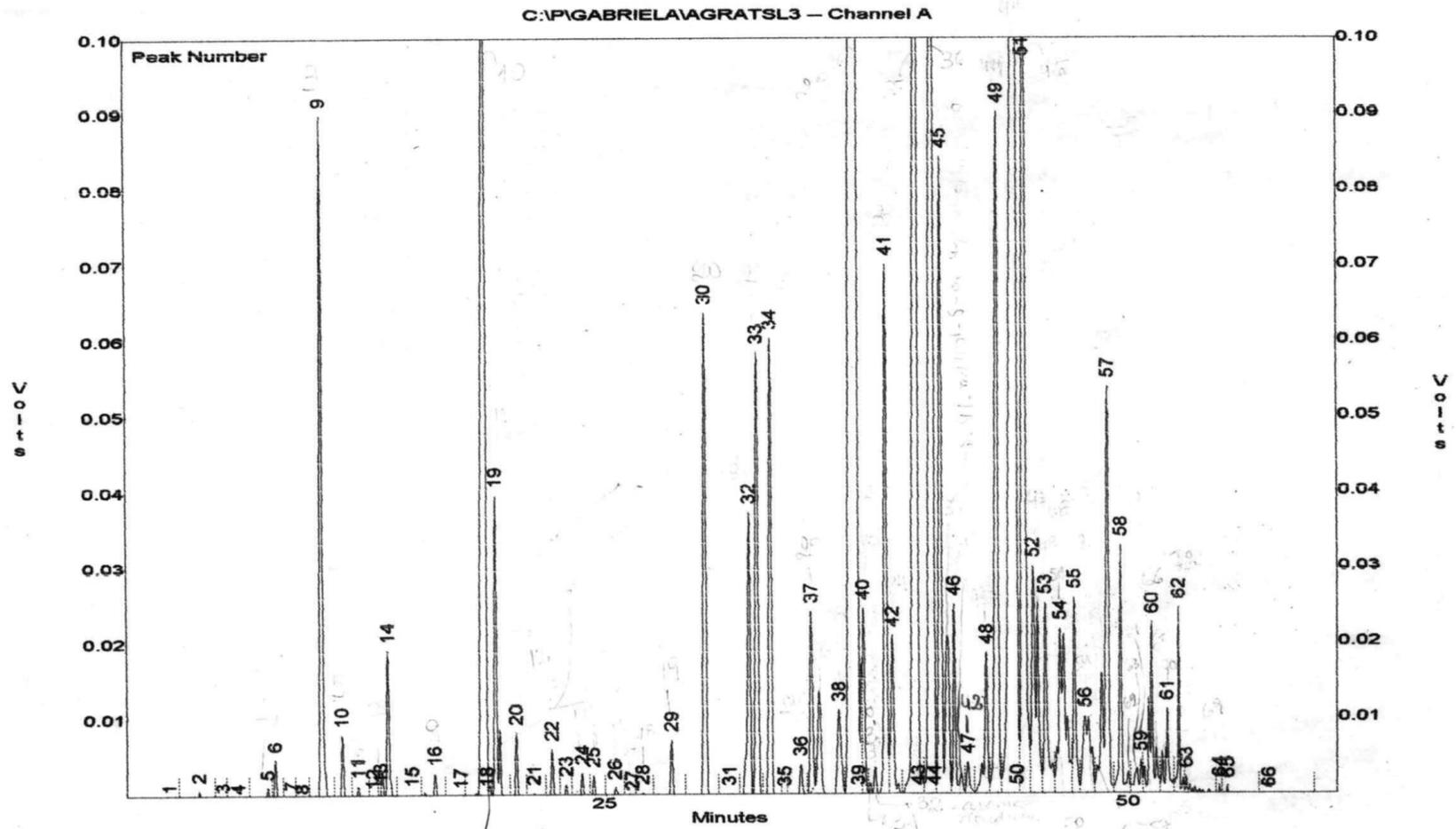


**-CG 3:**

Cromatograma de esencia AgSL III, donde:

pico 18:  $\alpha$ -Tuyona

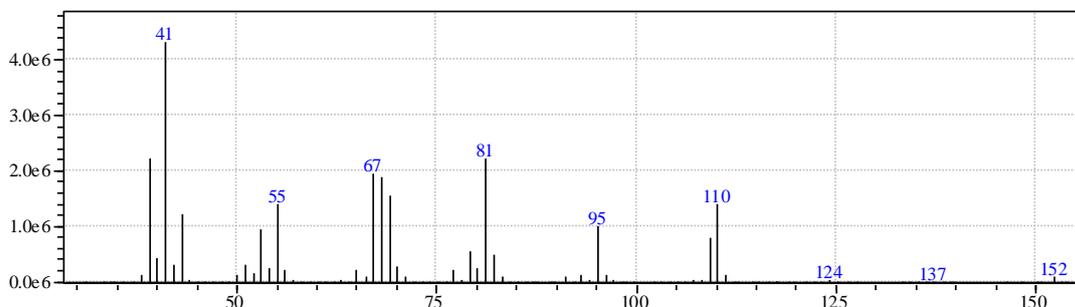
pico 19:  $\beta$ -Tuyona



El espectro de masa del pico correspondiente a  $\alpha$ -Tuyona, en la corrida cromatográfica de la esencia **AgSL III** fue el siguiente:

**-EM 5:**

Espectro de Masa pico de  $\alpha$ -Tuyona en esencias de *A. gratissima* de San Lorenzo:



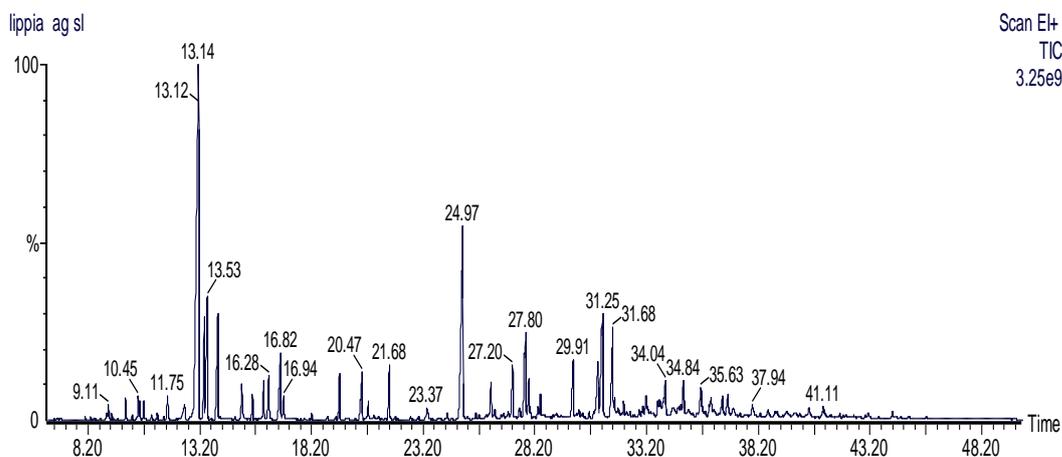
Las esencias extraídas de las aguas de arrastre, también fueron evaluadas en su composición química, llegándose a observar variaciones cuantitativas principalmente, como se ilustra con la corrida de la esencia de aguas de **AgSL III** a continuación:

**-CG 4:**

Cromatograma de esencia de aguas de **AgSL III**

pico **13,12**:  $\alpha$ -Tuyona

pico **13,14**:  $\beta$ -Tuyona

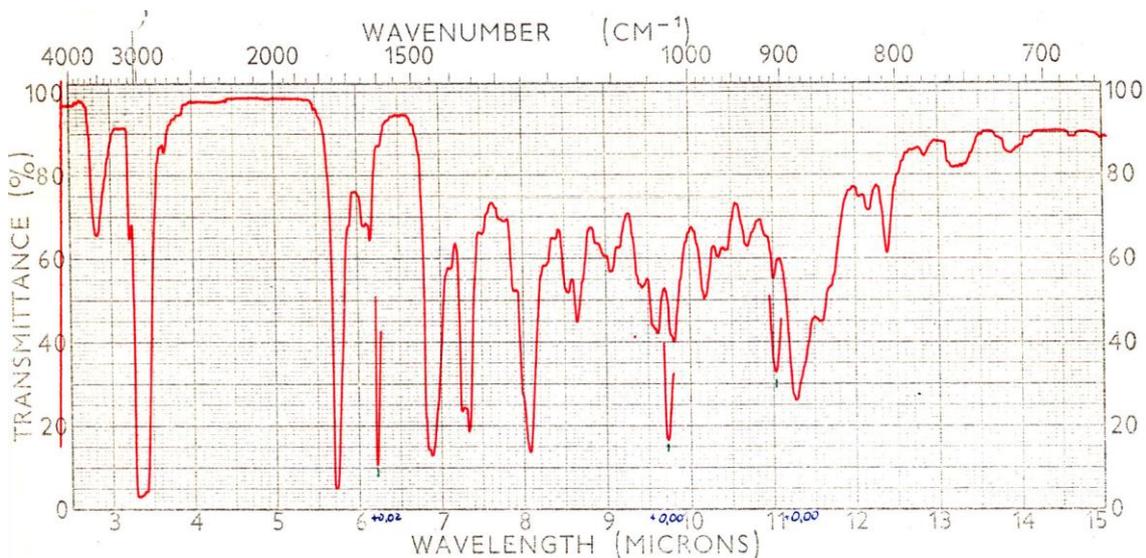


Se puede apreciar enriquecida la fracción monoterpénica oxigenada representada por los picos de tr 13,12 y 13,14 min, principalmente.

Por otra parte, por espectroscopia IR de la fracción destilada del aceite esencial **AgSL III**, a 18 mmHg y 51 °C se observaron las bandas de absorción características de los grupos carbonílicos aldehídicos en 5,72  $\mu$ m además de las bandas típicas de los grupos *gem* dimetilo (en 7,27  $\mu$ m) y cadenas alquílicas:

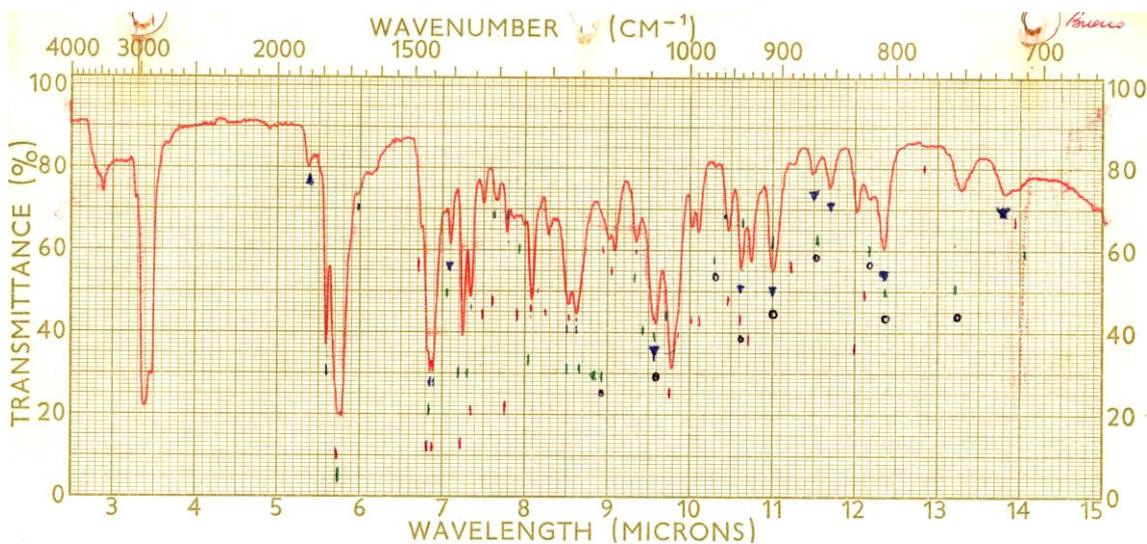
**-IR 1:**

Espectro IR de fracción I (enriquecida en Tuyona) de esencia AgSL III:



**-IR 2:**

Espectro IR de Tuyona patrón, restituida de semicarbazona.



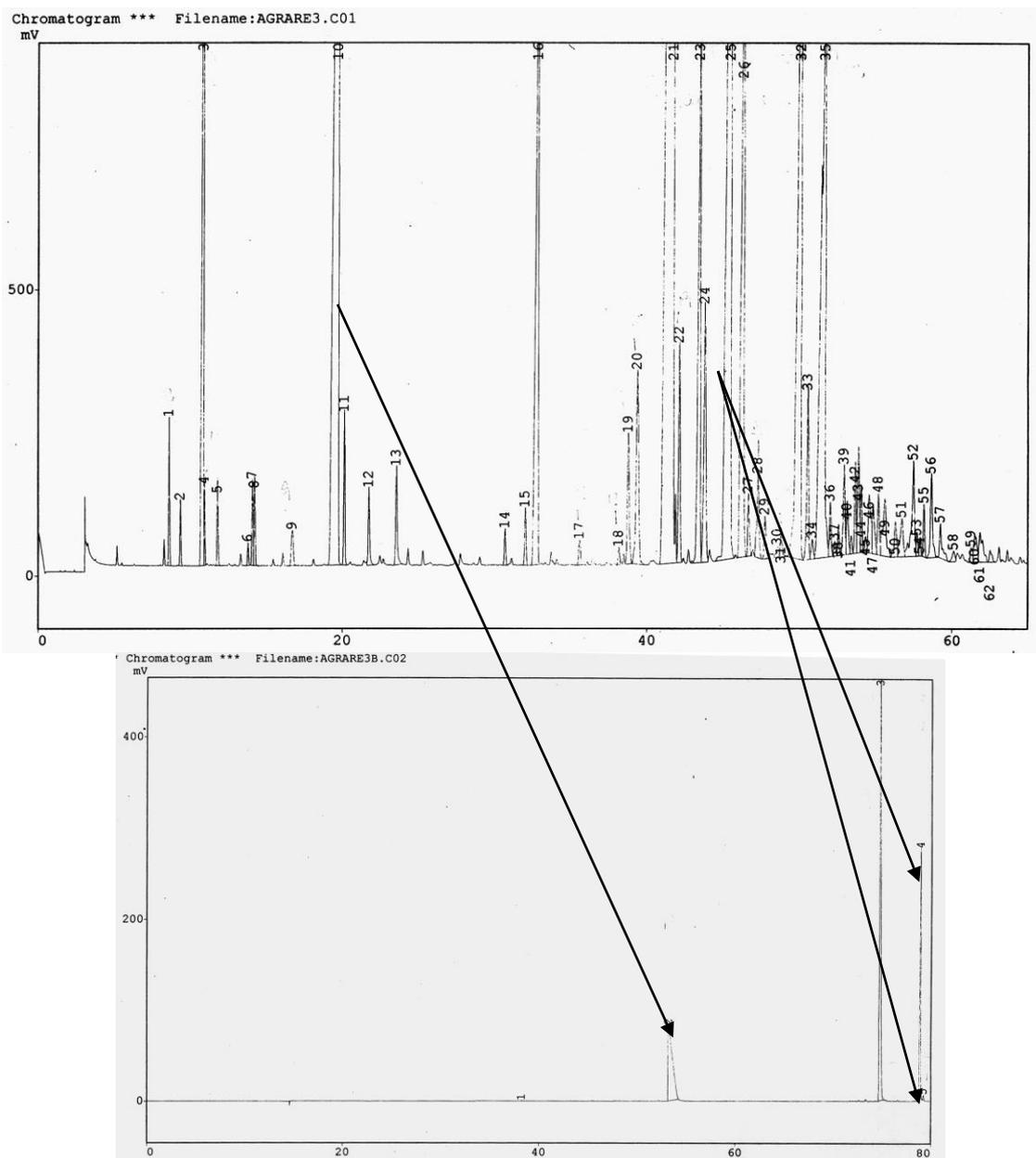
Las relaciones enantioméricas para **Linalol** y **Germacreno D** de la esencia **AgRE V** se muestran en las corridas cromatográficas siguientes, estando los datos resumidos en la **Tabla 4**:

**-CG 5:**

Cromatograma de **AgRE V**, cortes quirales de Linalol y Germacreno D:

pico **10**: Linalol

pico **25**: Germacreno D



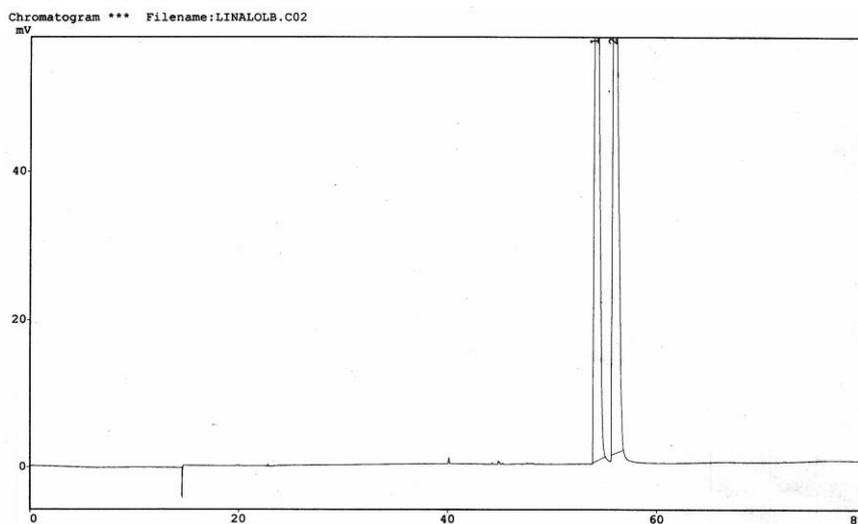
Se realizó la corrida cromatográfica de una mezcla racémica de Linalol patrón para luego realizar el corte correspondiente y determinar la relación enantiomérica de los dos isómeros de Linalol:

**-CG 6:**

Cromatograma con columna quiral de Linalol racémico patrón, donde:

pico 1: *R*-(-)-Linalol

pico 2: *S*-(+)-Linalol



**Tabla 4**

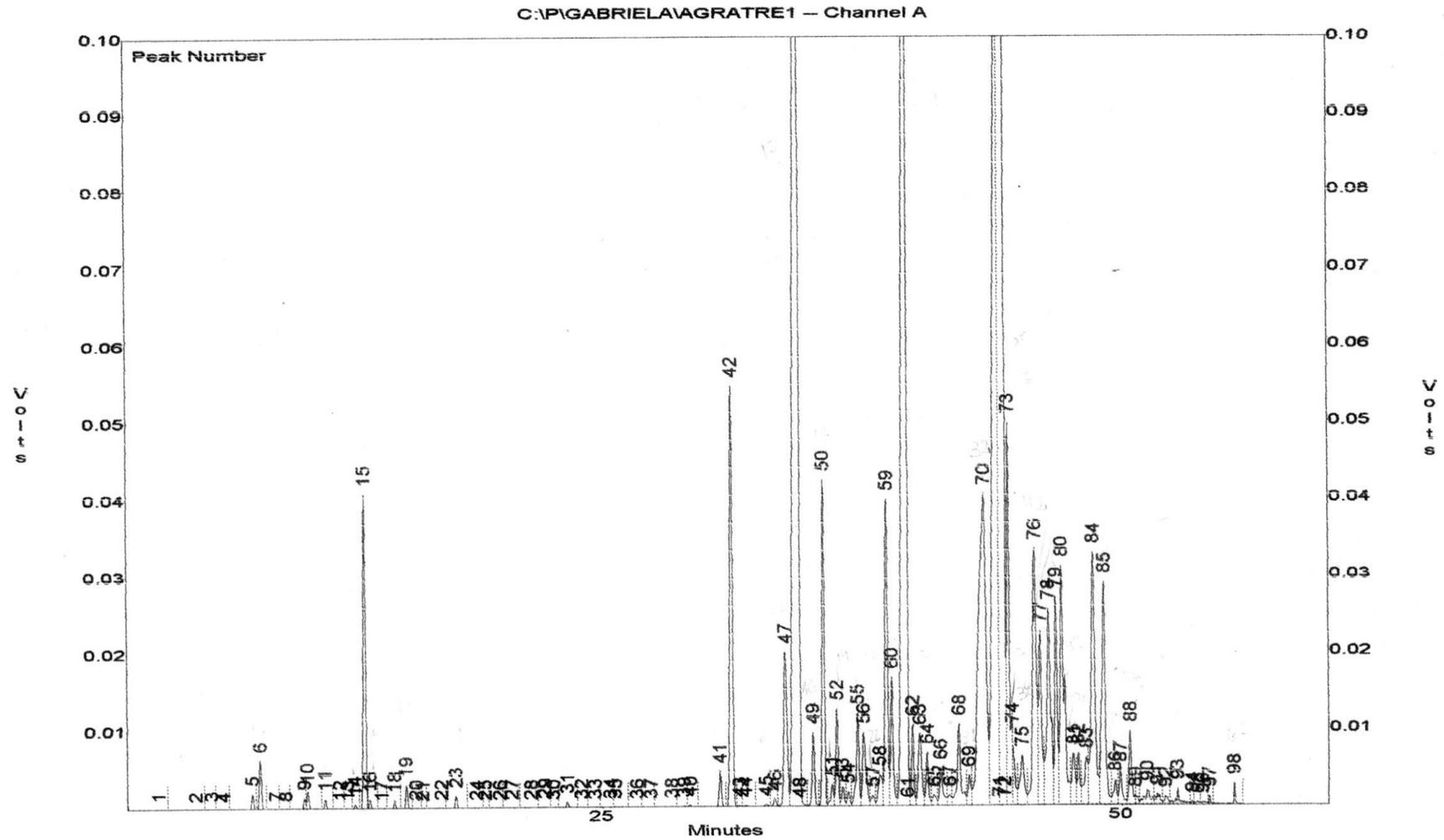
**-Relaciones enantioméricas de Linalol y Germacreno D en AgRE V:**

<b>Linalol</b>		
Enantiómero	3 <i>S</i> -(+)	3 <i>R</i> -(-)
Relación Enantiomérica	0,1	99,9
<b>Germacreno D</b>		
Enantiómero	7 <i>R</i> -(+)	1 <i>S</i> -(-)
Relación Enantiomérica	1,4	98,6

Para la esencia **AgRE VI:**

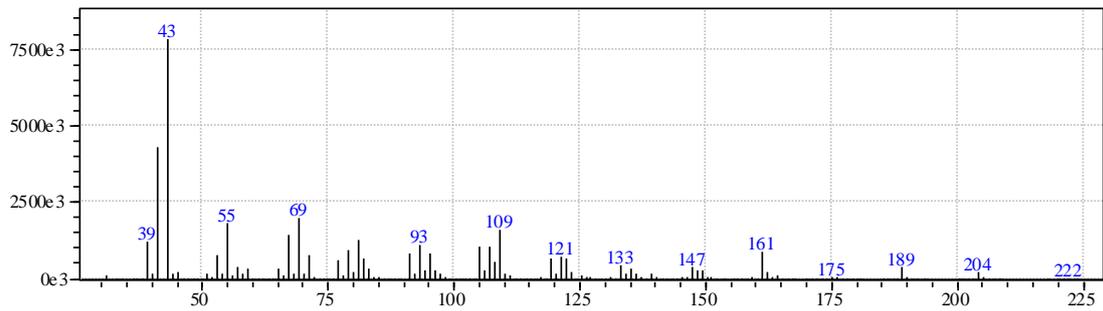
**-CG 7:**

Cromatograma de esencia **AgRE VI**, donde:  
pico **72**: Viridiflorol



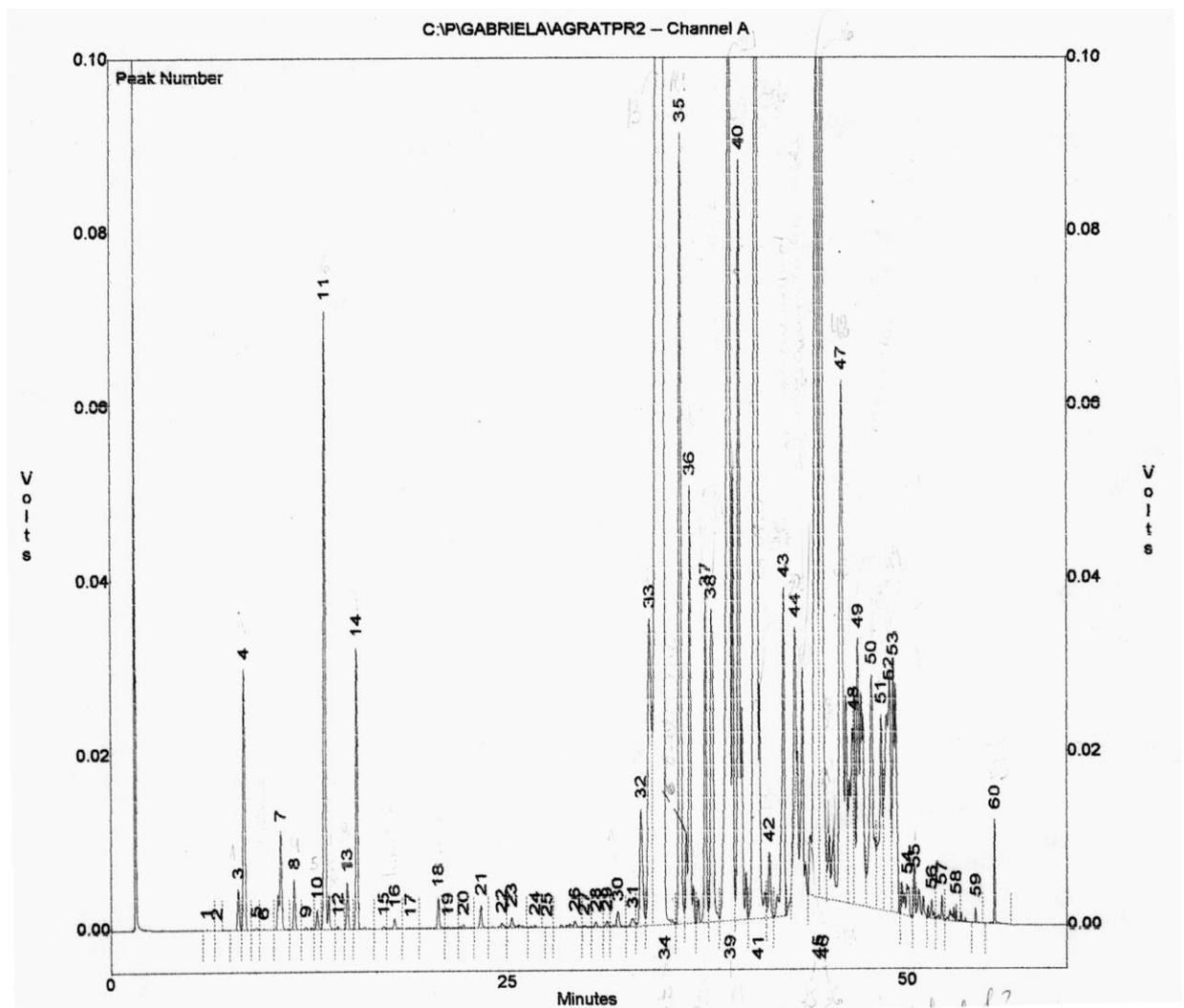
**-EM 6:**

Espectro de Masa pico **Viridiflorol** en esencias de *A. gratissima* de Río Empedrado:



**-CG 8:**

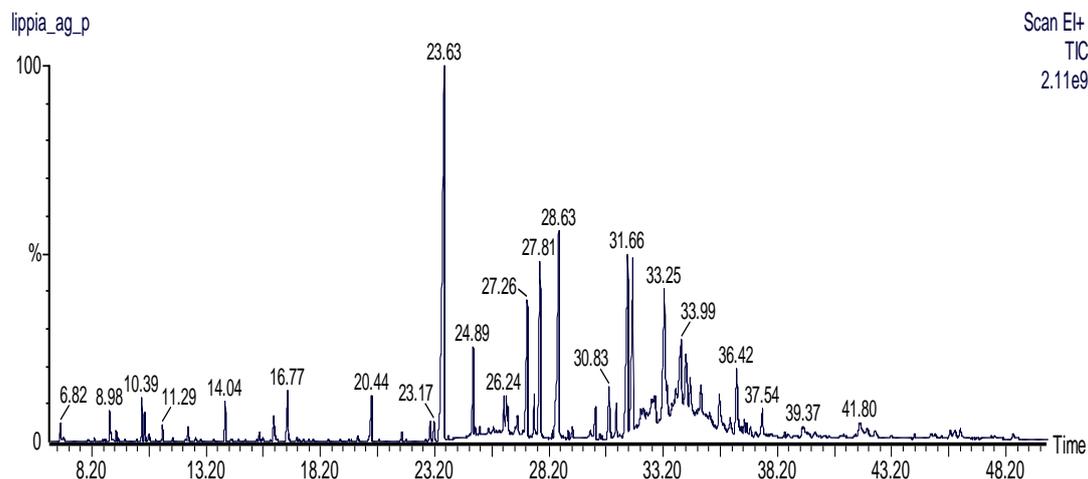
Cromatograma de esencia **AgP VII**, donde:  
pico **41**:10-*epi*-Cubebol



Nuevamente en el caso de las esencias procedentes de Río Empedrado, también se evaluó la composición química de la esencia de aguas observándose:

**-CG 9:**

Cromatograma de la esencia de aguas de **AgP VII:**

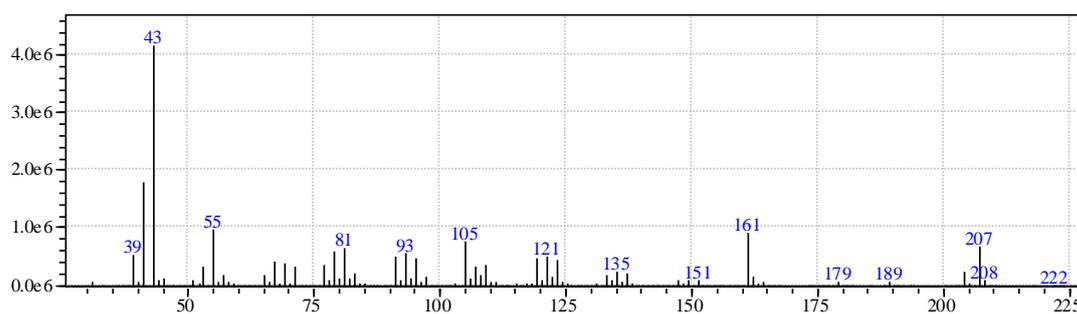


En este cromatograma, se observa que el pico de 23,63 min de tiempo de retención corresponde al  $\beta$ -Elemeno mientras que de la fracción oxigenada de los sesquiterpenos se destaca el pico de 28,63 min., correspondiente a 10-*epi*-Cubebol.

El espectro de masa del componente representado por el pico mencionado es el siguiente:

**-EM 7:**

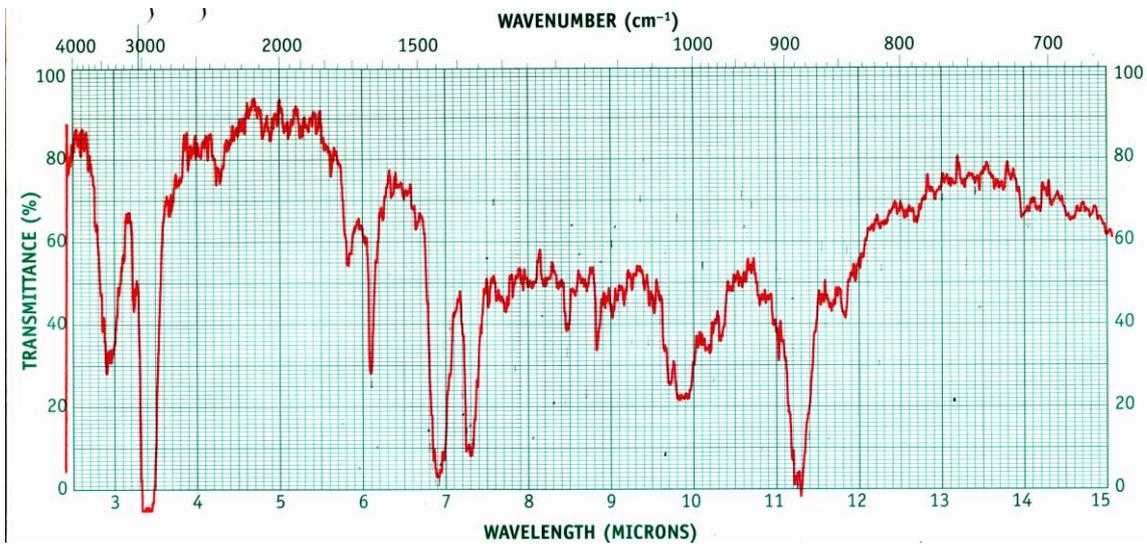
Espectro de Masa pico 10-*epi*-Cubebol en AgP VII:



Este espectro de masa coincide con el espectro de masa del 10-*epi*-Cubebol, además de observarse la correspondencia entre el IRL calculado y el teórico (1535).

En el espectro IR de estas esencias se distingue el pico correspondiente a los OH alcohólicos, como se puede observar en el espectro IR de la esencia AgP VIII que es la que mayor contenido en alcoholes sesquiterpénicos presenta:

**-IR 3:**  
Espectro IR esencia AgP VIII:



## **7.2-Aloysia virgata var. platyphylla:**

### **-AvRE I:**

Peso de material vegetal destilado: 708 g

Volumen de arrastre: 2 litros

Peso de esencia directa: 2,2071 g; esencia color amarillo pálido que se emulsiona con el agua de arrastre, aroma muy especiado pero con un agradable fondo reminiscente a Limoneno.

### **-AvRE II:**

Peso de material vegetal destilado: 1588 g

Volumen de arrastre: 2 litros

Peso de esencia directa: 6,8142 g; esencia color amarillo – pálido, con aroma especiado y un fuerte indicio de 1,8 – Cineol.

### **-AvRE III:**

Peso de material vegetal destilado: 690 g

Volumen de arrastre: 2 litros

Peso de esencia directa: 3,7460 g; esencia de color amarillo – limón, intenso. El aroma de la esencia es muy similar al de la esencia **AvRE II**.

### **-AvSL IV:**

Peso de material vegetal destilado: 1007 g

Volumen de arrastre: 4 litros (en dos destilaciones de 2 litros cada una)

Peso de esencia directa: 2,4155 g; esencia de color amarillo - limón pálido, con un fuerte aroma especiado pero con fondo frutal.

### **-AvSL V:**

Peso de material vegetal destilado: 901 g

Volumen de arrastre: 4 litros (en dos destilaciones de 2 litros cada una)

Peso de esencia directa: 2,3319 g; esencia de color amarillo - limón oscuro y aroma especiado muy similar al de la esencia **AvSL IV**.

En la tabla siguiente se resumen las constantes fisicoquímicas de las esencias de esta especie:

**Tabla 5**

### **-Constantes Fisicoquímicas:**

	Río Empedrado			San Lorenzo	
	AvRE I	AvRE II	AvRE III	AvSL IV	AvSLV
<b>Rto % P/P</b>	0,3	0,4	0,5	0,3	0,3
<b>d<sup>20</sup><sub>4</sub> (g/ml)</b>	0,91	0,91	0,92	0,91	0,92
<b>n<sub>D</sub><sup>20</sup></b>	1,5083	1,5096	1,5094	1,5091	1,5081
<b>α<sub>D</sub><sup>t°C</sup></b>	-45,46 <sup>o27°</sup>	-48,58 <sup>o25°</sup>	-40,62 <sup>o25°</sup>	-46,46 <sup>o26°</sup>	-57,94 <sup>o27°</sup>

La composición química de los aceites esenciales es la que se muestra en la tabla siguiente:

**Tabla 6****-Composición de los aceites esenciales:**

Los componentes están registrados según el orden de elusión en la columna no polar, con sus respectivos índices de retención lineal experimentales, calculados en columna SE52:

tr: indica proporción menor que 0,1%

IRL SE-52	Componente	%				
		Río Empedrado			San Lorenzo	
		AvRE I	AvRE II	AvRE III	AvSL IV	AvSL V
936	$\alpha$ -Tuyeno	0,1	tr	0,1	0,1	-
941	$\alpha$ -Pino	0,1	tr	tr	0,1	-
976	Sabineno	2,2	1,8	2,4	1,4	0,4
1021	<i>p</i> -Cimeno	0,1	tr	0,1	-	-
1025	Limoneno	tr	0,1	tr	-	-
1052	$\gamma$ -Terpineno	0,1	tr	tr	-	-
1324	acetato de <i>iso</i> Verbanol	tr	tr	tr	0,4	0,3
1338	$\delta$ -Elemeno	4,6	8,4	4,9	7,6	4,5
1348	$\alpha$ -Cubebeno	0,1	tr	0,1	tr	tr
1375	$\alpha$ -Copaeno	1,7	1,1	4,1	1,4	3,0
1384	$\beta$ -Bourboneno	3,3	0,7	2,5	1,5	3,6
1391	$\beta$ -Cubebeno	0,2	-	tr	tr	tr
1391	$\beta$ -Elemeno	0,4	2,7	3,0	3,7	3,5
1406	$\alpha$ -Gurjuneno	0,2	0,1	0,4	0,2	0,3
1424	$\beta$ -Cariofileno	16,3	16,8	18,1	11,0	13,5
1430	$\beta$ -Copaeno	1,7	0,7	1,0	0,8	1,4
1435	$\gamma$ -Elemeno	0,3	1,6	2,4	3,2	1,4
1441	Aromadendreno	1,2	-	-	0,3	0,4
1457	$\alpha$ -Humuleno	2,7	1,0	1,5	3,7	5,9
1463	9- <i>epi</i> -( <i>E</i> )-Cariofileno	3,7	1,9	2,7	2,3	3,1
1468	$\gamma$ -Muuroleno	-	-	-	tr	0,2
1487	Germacreno D	27,1	25,1	16,0	26,8	28,1
1487	$\alpha$ -Muuroleno	0,3	-	-	tr	tr
1500	Biciclogermacreno	17,6	29,3	20,3	24,4	16,2
1508	( <i>E</i> ) Cicloisolongifol-5-ol	-	-	-	0,3	0,3
1515	$\gamma$ -Cadineno	0,4	0,5	0,8	0,6	0,8
1520	Germacreno A	1,6	0,1	0,3	-	-
1525	$\delta$ -Cadineno	0,3	0,7	1,6	1,2	1,6
1530	( <i>E</i> ) Cadina-1(2),4-dieno	-	-	-	tr	0,1
1530	$\alpha$ -Cadineno	-	-	-	-	0,2
1537	10- <i>epi</i> -Cubebol	0,2	0,1	0,4	-	-
1540	$\alpha$ -Calacoreno	-	-	-	0,2	0,1
1560	Germacreno B	1,3	1,3	1,9	2,1	0,6
1563	Hidrato de Sesquisabineno	tr	0,2	0,3	-	-
1570	Ledol	-	-	-	0,1	0,1
1580	Espatulenol	0,6	0,9	1,3	1,5	1,9
1585	Germacreno D-4-ol	-	1,2	3,0	-	-
1586	Globulol	0,5	0,1	0,7	1,5	1,4

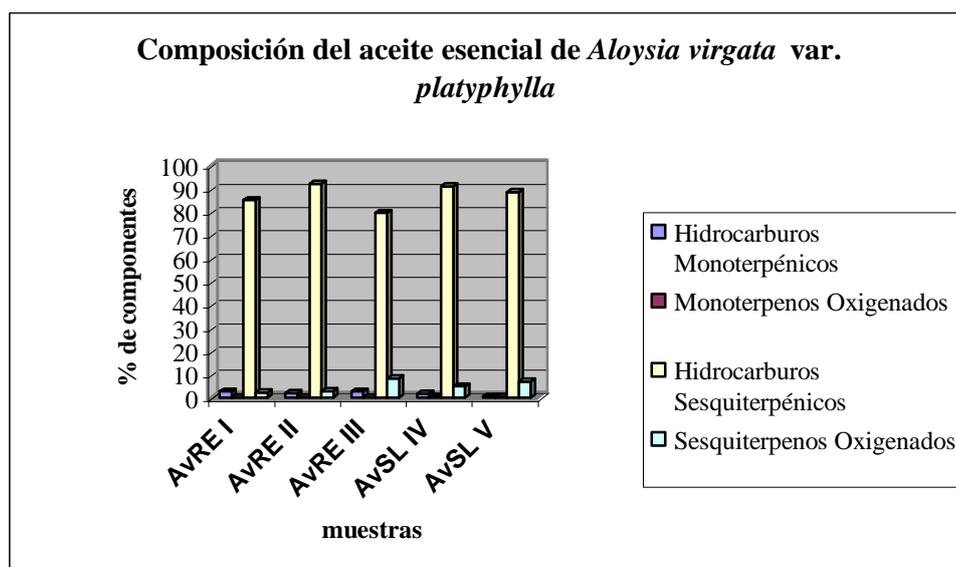
IRL SE-52	Componente	%				
		Río Empedrado			San Lorenzo	
		AvRE I	AvRE II	AvRE III	AvSL IV	AvSL V
1596	Guayol	0,4	0,2	0,4	-	-
1600	Salvial-4,(14)-en-1-ona	-	-	-	0,1	0,2
1607	Bulnesol	tr	0,1	0,2	-	-
1612	Viridiflorol	0,4	-	-	0,1	0,1
1645	epóxido de Humuleno II	-	-	-	0,1	0,3
1665	9- <i>epi</i> -( <i>E</i> ) Cariofileno 14-hidroxi	-	-	-	0,3	0,7
1680	$\alpha$ -Muurolol	-	-	-	0,4	0,9
1700	Selin-11-en-4- $\alpha$ -ol	-	-	-	0,4	0,9

<b>Componentes Identificados</b>	<b>89,7</b>	<b>96,7</b>	<b>90,5</b>	<b>97,8</b>	<b>96,0</b>
<b>Componentes Agrupados</b>					
Hidrocarburos Monoterpénicos	2,6	1,9	2,6	1,6	0,4
Monoterpenos Oxigenados	-	-	-	0,4	0,3
Hidrocarburos Sesquiterpénicos	85,0	92,0	79,5	91,0	88,5
Sesquiterpenos Oxigenados	2,1	2,8	8,2	4,8	6,8

No existen otros datos sobre la composición de esta esencia, en bibliografía.

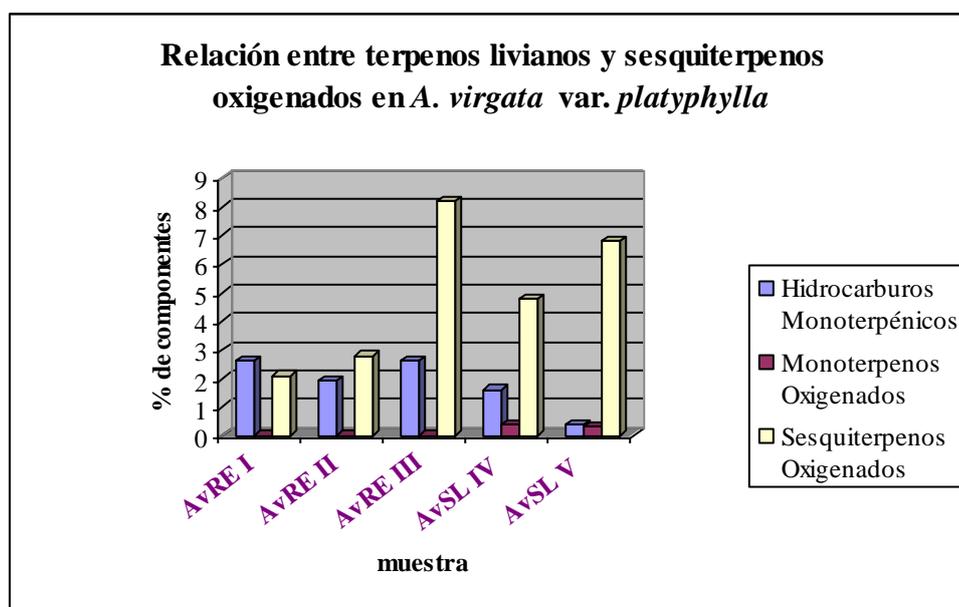
Graficando los porcentajes de abundancia de los distintos constituyentes, la composición química de la esencia de *A. virgata* var. *platyphylla* guarda la siguiente relación, respecto de los orígenes y estado de crecimiento de las plantas:

**Figura 6:** Gráfico de los componentes agrupados del aceite esencial de *A. virgata* var. *platyphylla*



Dado que la mayor proporción de compuestos sesquiterpénicos dificulta la visualización de la relación que guardan entre sí los componentes terpénicos, se reproducen seguidamente los porcentajes correspondientes a los hidrocarburos monoterpénicos, monoterpénos oxigenados y sesquiterpenos oxigenados:

**Figura 7:** Gráfico de la relación entre terpenos livianos y sesquiterpenos oxigenados del aceite esencial de *A. virgata* var. *platyphylla*



Para encontrar una relación más directa entre las propiedades físicas de los aceites y sus constituyentes, se ha analizado la relación enantiomérica de aquellos que aparecen en proporciones considerablemente mayores respecto de los demás, y de los que además se disponía de patrones. Estos resultados aparecen indicados en la tabla siguiente:

**Tabla 7**  
**-Relaciones enantioméricas para Sabineno y Germacreno D**

	Río Empedrado						San Lorenzo			
	AvRE I		AvRE II		AvRE III		AvSL IV		AvSL V	
<b>Sabineno</b>										
Enantiómero	(1R,5R)-(+)	(1S,5S)-(-)	(1R,5R)-(+)	(1S,5S)-(-)	(1R,5R)-(+)	(1S,5S)-(-)	(1R,5R)-(+)	(1S,5S)-(-)	(1R,5R)-(+)	(1S,5S)-(-)
Relación (%)	87,2	12,8	87,7	12,3	87,5	12,5	87,8	12,2	-	-
<b>Germacreno D</b>										
Enantiómero	7R-(+)	1S-(-)	7R-(+)	1S-(-)	7R-(+)	1S-(-)	7R-(+)	1S-(-)	7R-(+)	1S-(-)
Relación (%)	0,7	99,3	0,5	99,5	0,7	99,3	1,4	98,6	0,5	99,5

Se ejemplifican las corridas cromatográficas y la separación de los enantiómeros de Sabineno y Germacreno D para la esencia de AvSL IV, con columna quiral:

**-CG 10:**

Cromatograma con columna quiral de esencia **AvSL IV**, cortes quirales de Sabineno y Germacreno D:

pico **4**: Sabineno

pico **48**: Germacreno D

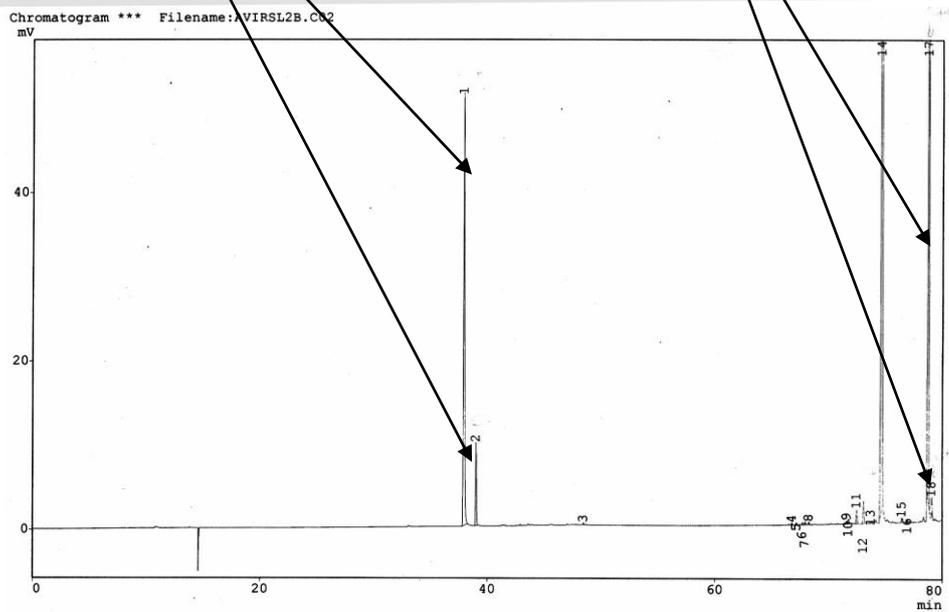
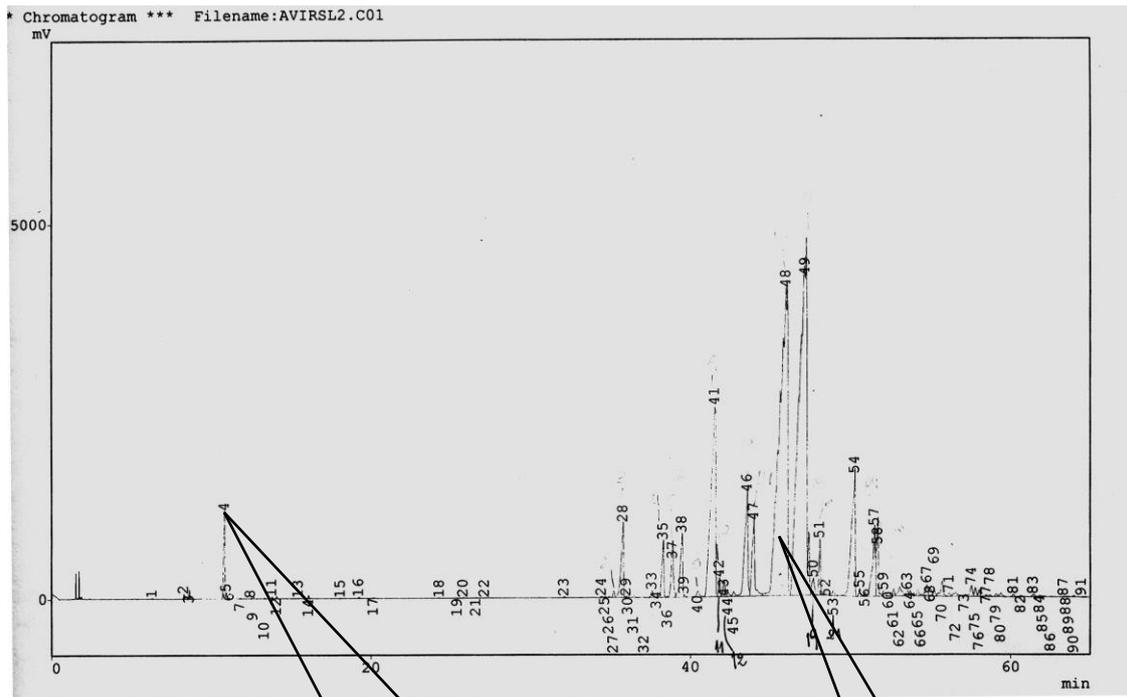
Separaciones enantioméricas:

pico **1**: *R*-(+)-Sabineno

pico **2**: *S*-(-)-Sabineno

pico **17**: *S*-(-)-Germacreno D

pico **18**: *R*-(+)-Germacreno D



En el cromatograma con columna SE 52, de la esencia **AvRE I** se pueden observar los picos correspondientes a  $\delta$ -Elemeno,  $\beta$ -Cariofileno, Germacreno D y Biciclogermacreno:

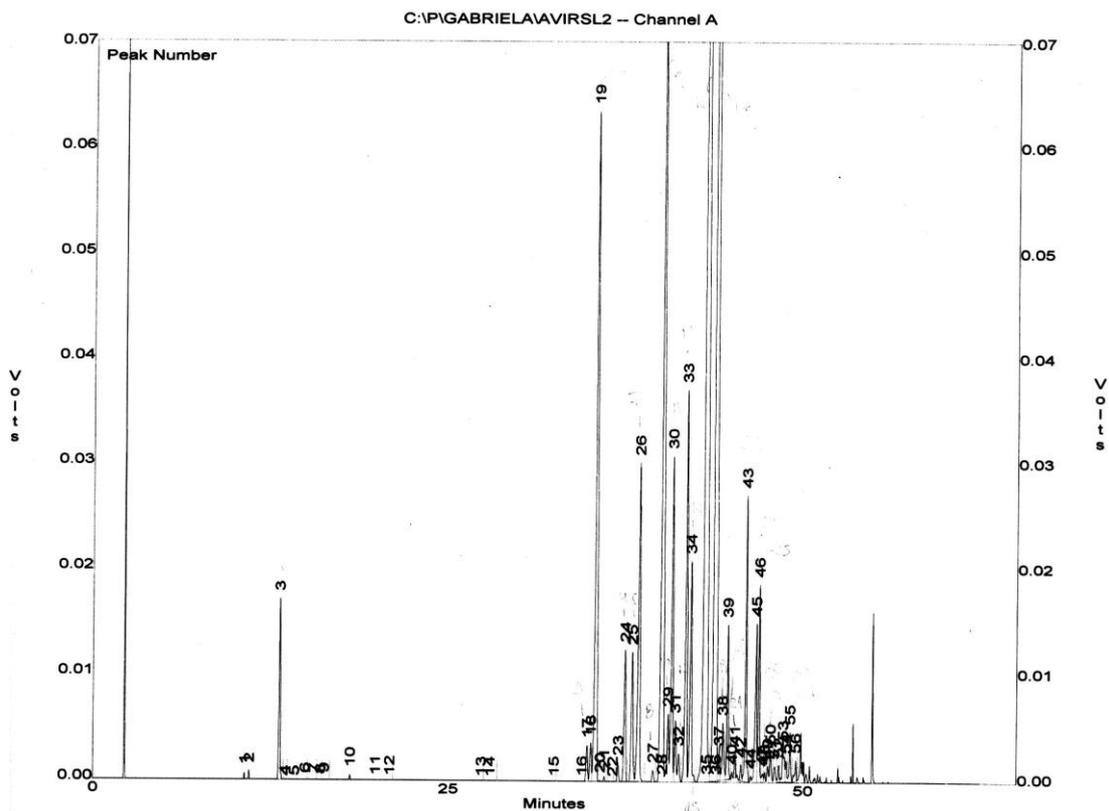


A modo de comparación se incluye seguidamente el cromatograma en columna SE 52, para la esencia **AvSL IV** en el cual se pueden observar los picos ya indicados en el caso anterior:

**-CG 12:**

Cromatograma de esencia **AvSL IV**, donde:

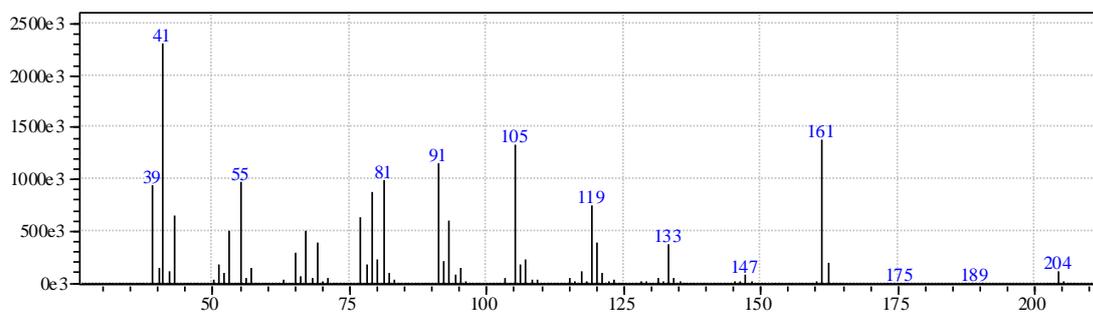
- pico (19):  $\delta$ -Elemeno;
- pico (28):  $\beta$ -Cariofileno;
- pico (35): Germacreno D;
- pico (36): Biciclogermacreno.



El espectro de masa del pico de Germacreno D de estas esencias es el siguiente:

**-EM 8:**

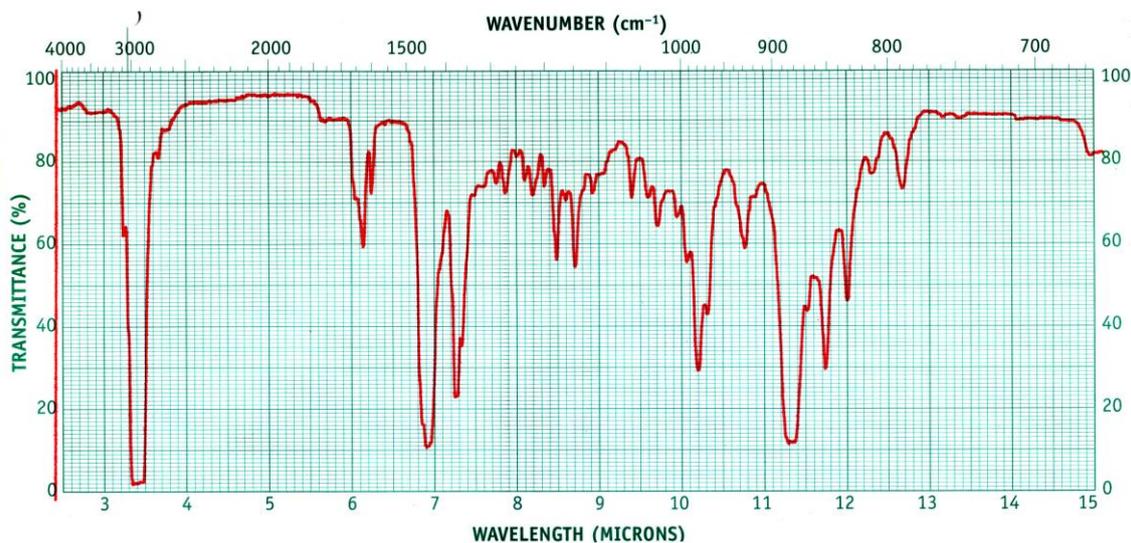
Espectro de Masa pico de **Germacreno D** de esencias de *A. virgata*:



En el espectro IR de la esencia **AvRE II** se observan las bandas características de los hidrocarburos sesquiterpénicos:

**-IR 4:**

Espectro IR de esencia **AvRE II**:

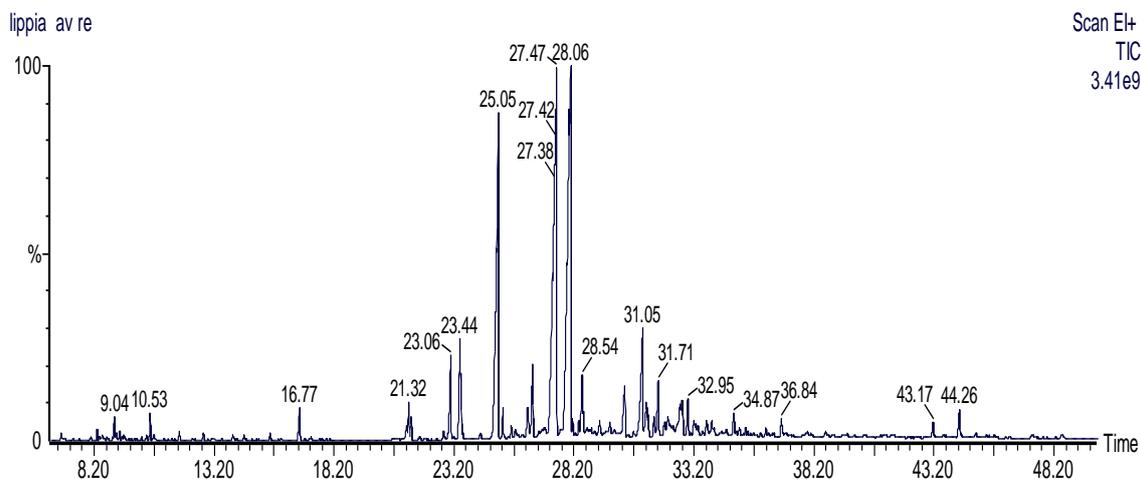


La esencia de aguas de **AvRE III** dio un perfil cromatográfico muy similar al de la esencia directa, sólo que se observan incrementados los sesquiterpenos principales, como se puede observar en el siguiente cromatograma:

**-CG 13:**

Cromatograma de la esencia de aguas de **AvRE III**:

- pico (21,32):  $\delta$ -Elemeno;
- pico (25,05):  $\beta$ -Cariofileno;
- pico (27,47): Germacreno D;
- pico (28,06): Biciclogermacreno.



### **7.3- Lippia alba:**

#### **-LaSP I:**

Peso de material vegetal destilado: 68g  
Volumen de arrastre: 2 litros  
Peso de esencia directa: 0,2 g; de esencia color amarillo intenso, con fuerte aroma a Citral.

#### **-LaSP II:**

Peso de material vegetal destilado: 554 g  
Volumen de arrastre: 2 litros  
Peso de esencia directa: 2,5 g; esencia color amarillo con aroma a Citral.

#### **-LaSP III:**

Peso de material vegetal destilado: 580 g  
Volumen de arrastre: 2 litros  
Peso de esencia directa: 4,4 g; esencia color amarillo – verdoso con aroma a Citral pero con un fondo de 1,8-Cineol.

#### **-LaSP IV:**

Peso de material vegetal destilado: 388 g  
Volumen de arrastre: 2 litros  
Peso de esencia directa: 1,9 g; esencia amarillo claro y con aroma fuertemente cítrico.

#### **-LaP V:**

Peso de material vegetal destilado: 429 g  
Volumen de arrastre: 2,4 litros  
Peso de esencia directa: 7,8 g; esencia color amarillo - naranja, con aroma fresco, frutado y muy agradable.

#### **-LaP VI:**

Peso de material vegetal destilado: 772 g  
Volumen de arrastre: 2 litros  
Peso de esencia directa: 10,7 g; esencia color amarillo-limón oscuro, aroma característico del 1,8-Cineol al inicio de la destilación, luego algo más frutado .

#### **-LaP VII:**

Peso de material vegetal destilado: 1170 g  
Volumen de arrastre: 2 litros  
Peso de esencia directa: 24,0 g; esencia de color amarillo – verdoso al inicio de la destilación y luego más amarilla y de aroma especiado con fondo frutado.

#### **-LaSA VIII:**

Peso de material vegetal destilado: 1583 g  
Volumen de arrastre: 6 litros  
Peso de esencia directa: 29,9 g; esencia de color amarillo – anaranjado, de aroma con indicios de 1,8-Cineol, sin percibirse aroma a Citral.

Para una mejor comprensión de los resultados del análisis de las esencias de esta especie, dada la variabilidad de sus composiciones químicas, se ha resumido en un mismo cuadro comparativo los resultados para las esencias de las tres procedencias: Perichón (Corrientes), Santa Ana (Corrientes) y Sáenz Peña (Chaco). Por lo tanto, en **Tabla 8** y **Tabla 9** se indican las Constantes Físicas y Constituyentes de los aceites esenciales, respectivamente.

**Tabla 8**  
**-Constantes Físicoquímicas:**

	Sáenz Peña (Chaco)				Perichón (Ctes)			Santa Ana (Ctes)
	LaSP I	LaSP II	LaSP III	LaSP IV	LaP V	LaP VI	LaP VII	LaSA VIII
<b>Rto % P/P</b>	0,3	0,6	0,8	0,6	2,1	1,6	2,1	2,2
<b>d<sup>20</sup><sub>4</sub> (g/ml)</b>	-	0,91	0,89	0,92	0,89	0,89	0,89	0,89
<b>nd<sup>20</sup></b>	1,4927	1,4930	1,4853	1,4953	1,5029	1,5056	1,5019	1,5039
<b>αD r°C</b>	-	-21,26° 25°	-06,12° 29°	-27,28° 26°	-13,52° 23°	-12,18° 26°	-13,00° 26°	-08,62° 27°

**Tabla 9**  
**-Composición de los aceites esenciales:**

Los componentes están registrados según el orden de elusión en la columna no polar, con sus respectivos índices de retención lineal experimentales, calculados en columna SE52:

tr: indica proporción menor que 0,1%

IRL SE 52	Componentes	%									
		Sáenz Peña (Chaco)				Perichón			Santa Ana	*	
		LaSP I	LaSP II	LaSP III	LaSP IV	LaP V	LaP VI	LaP VII	LaSA VIII		
914	α-Tuyeno	-	-	-	-	0,1	0,1	tr	2,3	si	
928	α-Pineno	-	-	-	-	0,7	0,6	0,4	tr	si	
942	Canfeno	-	-	-	-	2,7	2,2	1,6	0,1	si	
958	Sabineno	0,2	0,1	-	tr	0,5	0,5	0,3	2,1	si	
968	β-Pineno	-	-	-	-	0,5	0,7	0,3	tr	si	
986	6-metil-5-hepten-2-ona	tr	0,3	tr	1,3	-	-	-	-	si	
991	β-Mirceno	3,3	1,2	1,1	tr	19,2	25,2	15,2	13,8	si	
1017	Desconocidos	-	-	-	-	1,3	1,3	1,2	0,9	no	
1024	Limoneno	-	tr	0,1	0,4	1,2	1,0	0,9	-	si	
1026	1,8-Cineol	-	0,2	-	0,1	0,7	0,9	0,4	6,8	si	
1032	(Z)-β-Ocimeno	1,2	tr	tr	-	-	-	-	0,1	si	
1042	(E)-β-Ocimeno	0,3	1,3	0,6	tr	-	-	-	0,2	si	
1050	Bergamal	-	-	-	0,3	-	-	-	-	no	
1084	α-Terpinoleno	-	-	-	-	0,3	0,3	0,3	-	no	
1092	6,7-epoxi Mirceno	-	-	-	-	0,3	0,4	0,2	0,3	no	
1096	Perilleno	0,7	0,4	tr	0,1	-	-	-	-	no	

IRL SE 52	Componentes	%								*
		Sáenz Peña (Chaco)				Perichón			Santa Ana	
		LaSP I	LaSP II	LaSP III	LaSP IV	LaP V	LaP VI	LaP VII	LaSA VIII	
1100	óxido de $\alpha$ -Pino	0,1	0,1	-	0,1	0,9	1,1	0,7	-	no
1100	Linalol	-	0,1	40,8	0,5	-	0,1	0,2	-	si
1116	óxido de $\beta$ -Pino	0,1	0,6	-	0,1	-	-	-	-	no
1119	<i>p</i> -1,3,8-Mentatrieno	-	-	0,2	-	-	-	-	-	no
1127	Alcanfor	-	-	0,6	0,2	-	-	-	-	si
1144	óxido de ( <i>E</i> )-Limoneno	0,6	0,4	-	tr	tr	tr	0,1	-	no
1145	$\beta$ -Citronelal	tr	0,2	0,2	0,4	-	-	-	-	no
1150	Borneol	-	-	-	-	3,5	2,7	-	-	no
1162	Mircenona	-	-	-	-	39,6	34,2	47,1	35,8	si
1171	epoxido de Rosefurano	tr	0,2	tr	0,1	-	-	-	-	no
1172	<i>p</i> -Menta-1,5-dien-8-ol	-	-	tr	-	-	-	-	-	no
1175	$\alpha$ -Terpineol	-	-	-	-	0,1	0,3	2,7	0,7	si
1190	Salicilato de metilo	0,1	0,1	-	0,1	-	-	-	-	no
1191	Verbenona	-	-	-	-	tr	0,2	0,5	0,7	no
1206	( <i>Z</i> )-dihidro Carvona	0,5	1,0	0,5	-	tr	tr	0,1	0,1	si
1211	( <i>E</i> )-dihidro Carvona	-	-	2,0	-	-	-	-	0,3	si
1239	( <i>Z</i> )-Ocimenona	-	-	-	-	9,2	11,3	9,8	8,0	si
1245	Neral	19,4	19,9	9,3	11,4	-	-	-	-	si
1246	( <i>E</i> )-Ocimenona	-	-	-	-	4,6	6,0	3,2	2,3	si
1255	Piperitona	-	0,2	-	0,2	-	-	-	-	si
1276	Geranial	29,7	26,6	12,4	18,5	-	-	-	0,4	si
1286	óxido de ( <i>E</i> )-Carvona	-	-	-	0,2	-	-	-	-	no
1332	$\delta$ -Elemeno	-	0,1	-	-	-	-	-	-	no
1344	$\alpha$ -Cubebeno	0,6	0,1	0,3	-	-	-	-	0,1	no
1357	$\alpha$ -Longipineno	0,8	0,7	-	-	-	-	-	-	no
1360	Eugenol	tr	tr	tr	-	tr	tr	0,4	0,3	no
1363	Ciclosativeno	-	-	0,2	1,1	-	-	-	-	no
1373	$\alpha$ -Copaeno	2,5	3,7	1,6	6,7	0,8	0,8	0,8	1,0	no
1381	$\beta$ -Bourboneno	tr	0,1	0,3	tr	0,2	0,1	0,2	0,3	no
1386	acetato de Geranilo	-	tr	-	-	-	-	-	-	no
1387	$\beta$ -Cubebeno	tr	0,4	1,9	tr	0,4	0,4	0,5	tr	si
1387	$\beta$ -Elemeno	3,2	3,0	tr	-	tr	tr	tr	1,3	si
1406	$\alpha$ -Gurjuneno	0,6	0,7	0,4	-	tr	tr	0,2	-	no
1419	$\beta$ -Cariofileno	5,2	8,0	5,1	5,2	3,1	2,7	3,7	4,8	si
1427	$\beta$ -Copaeno	tr	0,4	0,3	-	0,2	0,2	0,1	0,2	no
1429	$\gamma$ -Elemeno	1,5	2,4	0,8	1,2	-	-	-	tr	si
1442	$\alpha$ -Humuleno	tr	0,8	0,5	1,0	tr	tr	tr	0,4	no
1451	Allo Aromadendreno	2,0	1,2	0,6	-	0,2	0,1	0,2	-	no
1458	( <i>E</i> )- $\beta$ -Farneseno	-	tr	tr	0,7	0,5	0,6	0,6	0,7	si
1483	Germacreno-D	3,4	7,1	4,6	1,1	4,2	3,4	4,9	5,1	si
1486	( <i>E</i> )-Muurolo-4(14),5-dieno	tr	0,1	tr	-	-	-	-	-	no
1497	Viridifloreño	-	0,2	0,2	tr	-	-	-	-	si
1506	$\beta$ -Selineno	-	tr	-	tr	tr	tr	0,2	-	no
1510	$\gamma$ -Cadineno	tr	0,6	0,9	1,4	-	-	-	-	no

IRL SE 52	Componentes	%									*
		Sáenz Peña (Chaco)				Perichón			Santa Ana		
		LaSP I	LaSP II	LaSP III	LaSP IV	LaP V	LaP VI	LaP VII	LaSA VIII		
1517	Biciclogermacreno	tr	0,5	0,4	-	0,3	0,2	0,2	0,7	no	
1523	$\alpha$ -Muuroleno	2,7	3,1	1,9	5,3	tr	0,1	0,1	0,4	no	
1526	(E)-Cadina-1(2),4-dieno	-	0,2	tr	-	-	-	-	-	no	
1528	$\delta$ -Cadineno	3,3	2,3	1,3	2,1	0,1	0,1	0,3	0,6	no	
1534	$\alpha$ -Cadineno	tr	0,3	0,1	-	-	-	-	-	no	
1535	(Z)-Muurool-5-en-4- $\beta$ -ol	-	-	-	0,3	-	-	-	-	no	
1553	Germacreno B	1,3	1,8	0,8	0,9	-	-	-	0,5	si	
1561	$\alpha$ -Calacoreno	-	-	tr	0,8	-	-	-	-	no	
1561	(Z)-Muurool-5-en-4- $\alpha$ -ol	0,5	tr	0,3	0,9	tr	-	-	-	no	
1580	Viridiflorol	tr	0,8	-	-	-	-	-	-	no	
1581	Óxido de Cariofileno	3,3	0,3	2,2	8,2	tr	tr	tr	0,1	no	
1583	Globulol	0,8	-	-	1,8	0,3	0,4	0,4	-	no	
1597	Espatulol	-	-	tr	-	tr	0,2	tr	-	no	
1599	Germacren D-4-ol	-	2,9	1,3	-	0,3	tr	0,1	0,6	no	
1623	1,10-di <i>epi</i> - $\alpha$ -Cubenol	0,2	0,2	0,1	0,3	-	-	-	-	no	
1640	<i>epi</i> - $\alpha$ -Cadinol	tr	0,2	tr	3,1	-	-	-	-	no	
1641	<i>epi</i> - $\alpha$ -Muurolol	1,9	1,8	1,3	tr	-	-	-	-	no	
1653	$\alpha$ -Cadinol	1,4	1,0	0,9	2,3	-	-	-	-	no	
1668	(Z)-Calmenen-10-ol	0,4	-	-	1,2	-	-	-	-	no	
1683	9- <i>epi</i> -E-14-hidroxi-Cariofileno	0,5	-	-	0,5	-	-	-	-	no	
1689	Tetradecanol-n	0,8	0,2	tr	1,0	0,3	0,1	0,3	-	no	
1739	Oplopanona	0,7	tr	-	2,4	-	-	-	-	no	
<b>Componentes Identificados</b>		<b>93,8</b>	<b>98,1</b>	<b>96,1</b>	<b>83,5</b>	<b>95,0</b>	<b>97,2</b>	<b>97,2</b>	<b>92,0</b>		
<b>Componentes agrupados</b>											
Hidrocarburos Monoterpénicos		5,7	3,0	2,0	0,5	25,2	30,6	19,0	18,6		
Monoterpenos Oxigenados		50,5	49,9	65,8	33,5	58,9	57,2	65,4	55,7		
Hidrocarburos Sesquiterpénicos		27,1	37,8	22,0	27,5	10,0	8,7	12,0	16,1		
Sesquiterpenos Oxigenados		10,5	7,4	6,3	22,0	0,9	0,7	0,8	0,7		
Desconocidos		-	-	-	-	1,3	1,3	1,2	0,9		

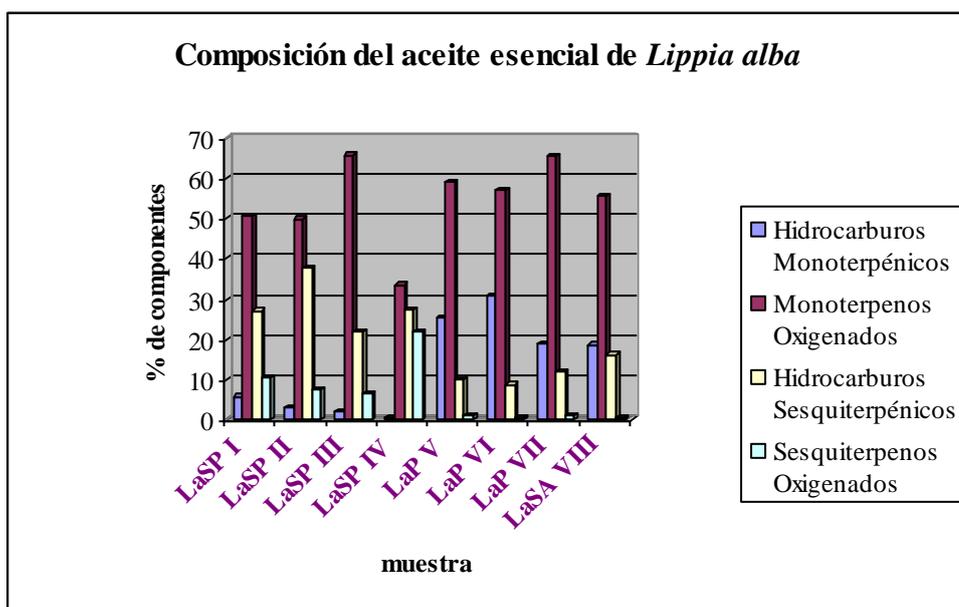
\* Referencia a la identificación de estos constituyentes en *Lippia alba* de otros orígenes geográficos de acuerdo a la bibliografía.

Asimismo, los componentes hallados en ejemplares de otra procedencia y que no han sido hallados en los ejemplares estudiados en este trabajo son:

Lippiona; Piperitenona; Lippiafenol; Carvona; Nerolidol; Terpinen-4-ol; Biciclosesquifelandreno.

Representando en un gráfico los porcentajes de los componentes agrupados, resulta más fácil la comparación, de acuerdo al estado de crecimiento y procedencia de los ejemplares de *Lippia alba* del Nordeste:

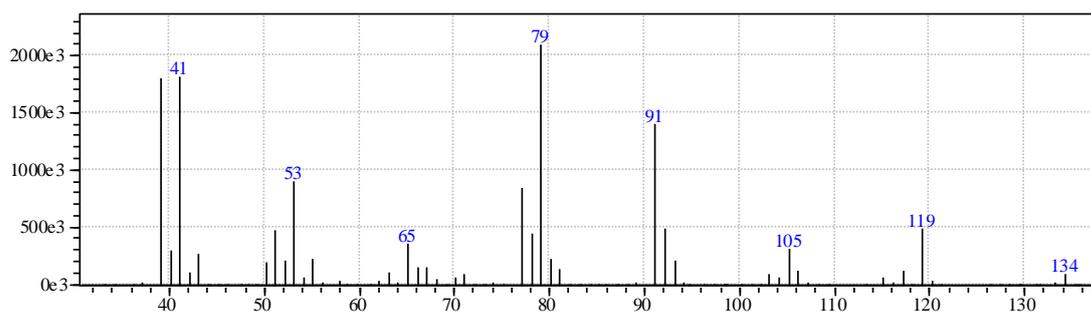
**Figura 8:** Gráfico de los componentes agrupados del aceite esencial de *Lippia alba*



Por otro lado, el espectro de masa del componente **Desconocido**, es el siguiente:

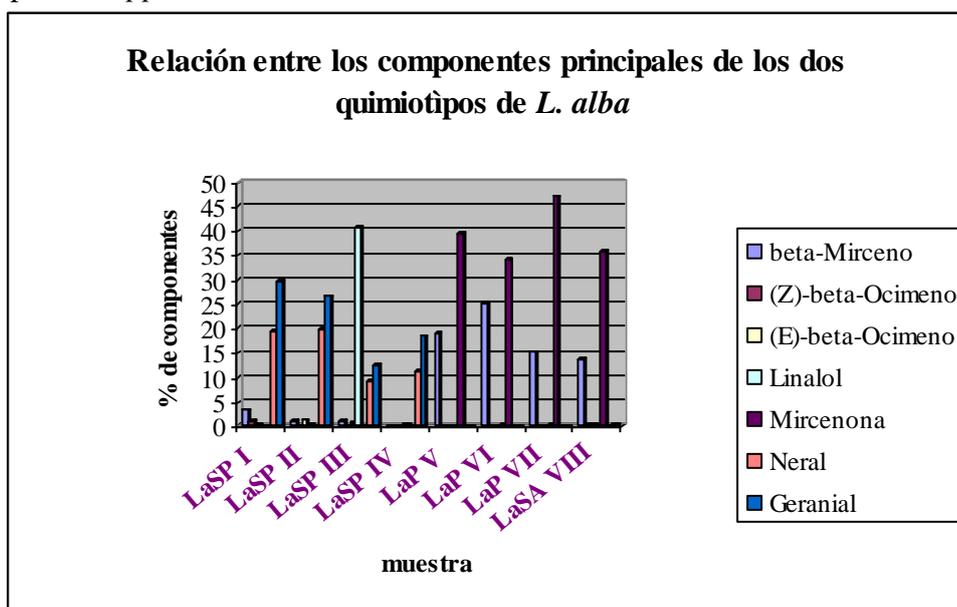
**-EM 9:**

Espectro de masa del componente **Desconocido**:  $M^+$ : 134, de *Lippia alba* de El Perichón y Santa Ana.



Para identificar de mejor manera las relaciones entre los componentes particulares de cada una de las procedencias, se observa en la siguiente figura, la relación entre los componentes principales:

**Figura 9:** Gráfico de la relación entre los componentes principales de los dos quimiotipos de *Lippia alba*



El cromatograma, con columna SE 52, de la esencia **LaSP I** fue el siguiente:

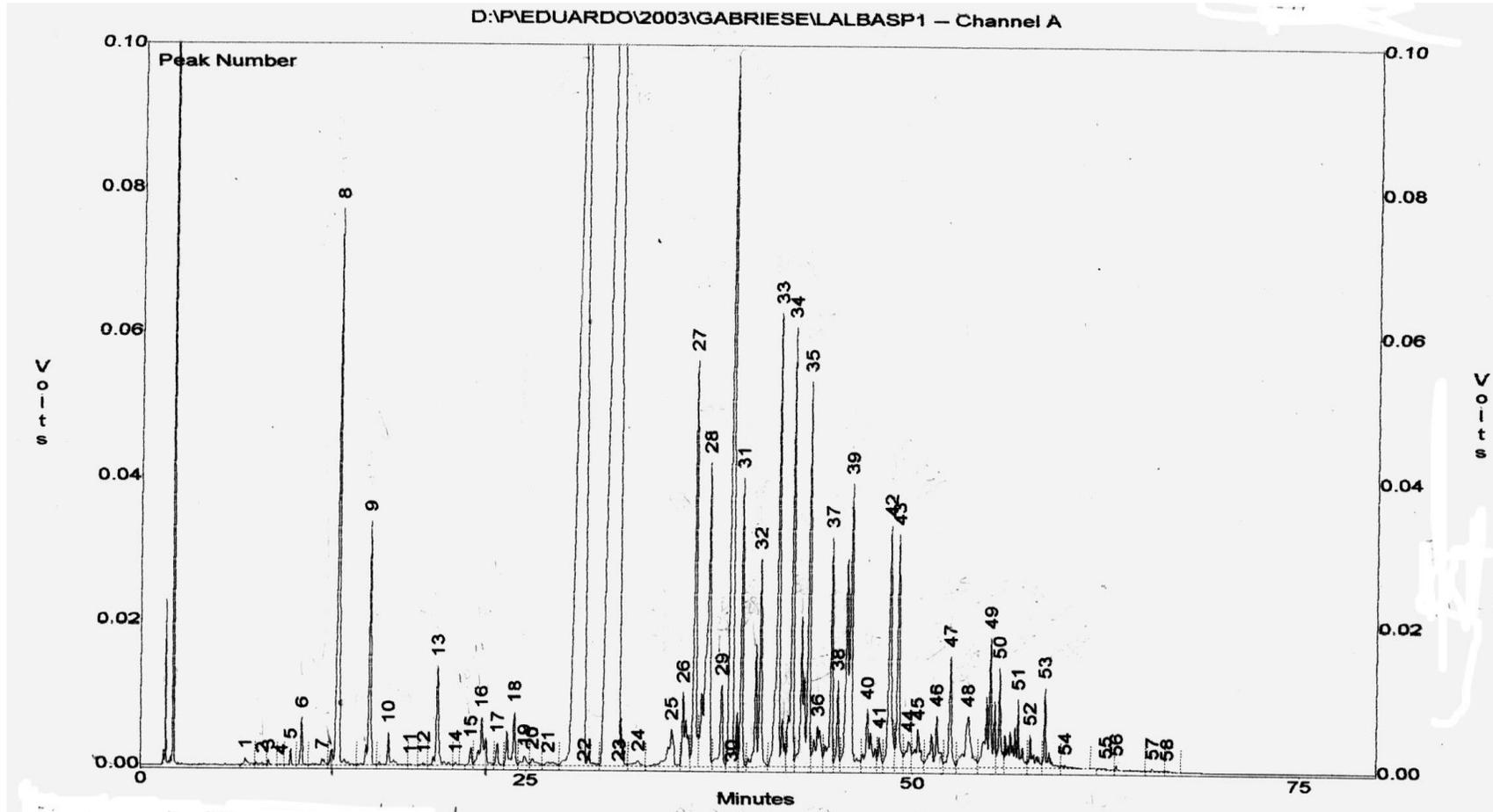
(Ver **CG 14**, de página 93)

**-CG 14:**

Cromatograma de esencia **LaSPI**, donde:

pico **22**: Neral

pico **23**: Geranial



De la esencia **LaSP III** se obtuvo el siguiente cromatograma con columna SE 52, en el que se observa que el pico correspondiente a Linalol aparece considerablemente aumentado respecto de la esencia de **LaSP I**:

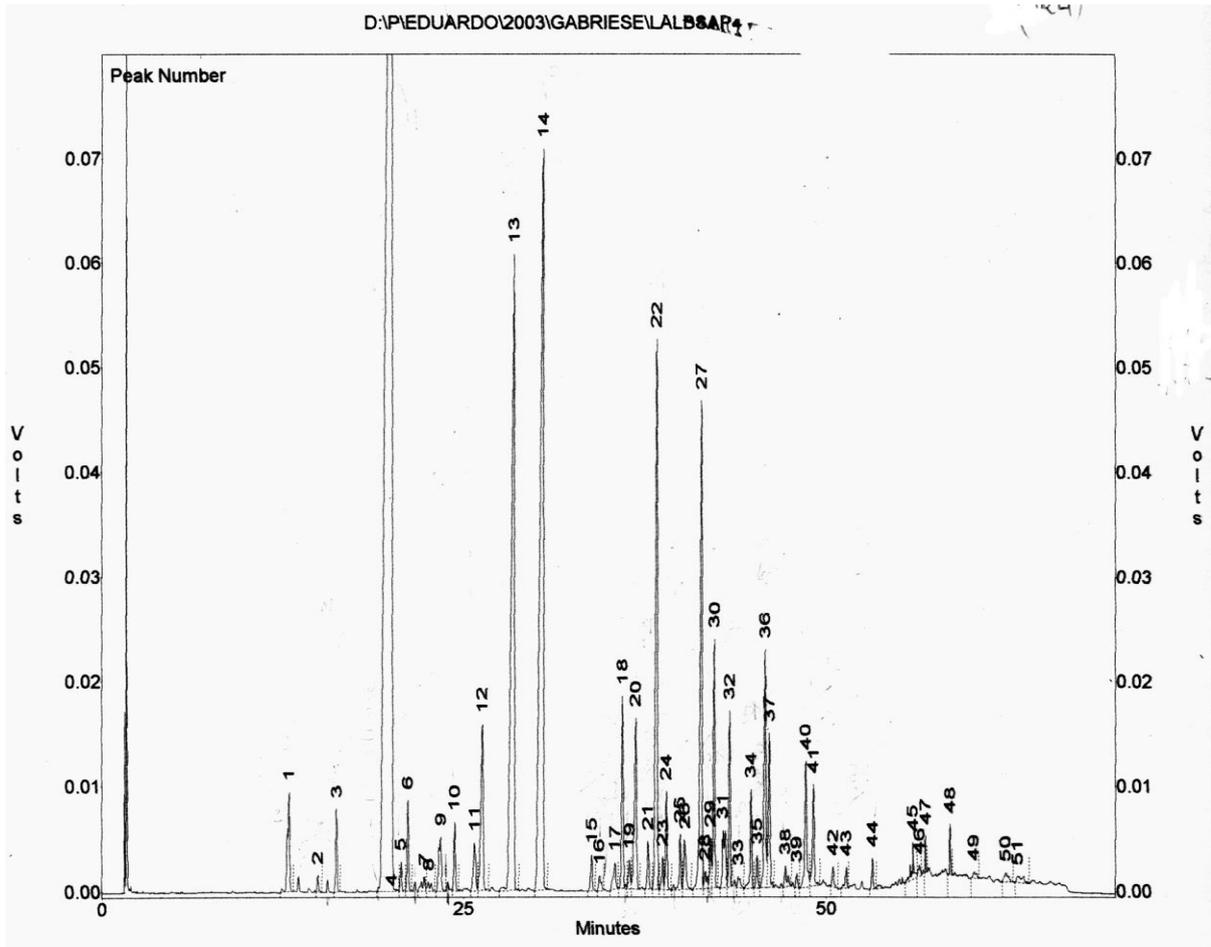
**-CG 15:**

Cromatograma de esencia **LaSP III**, donde:

pico **4**: Linalol

pico **13**: Neral

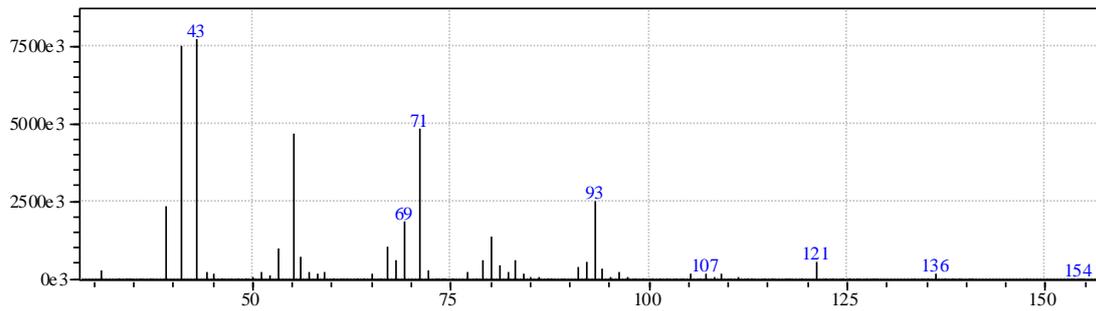
pico **14**: Geranial



Del pico **4**, correspondiente al **Linalol**, con IRL calculado 1110 (IRL teórico del Linalol 1097), el espectro de masa fue:

**-EM 10:**

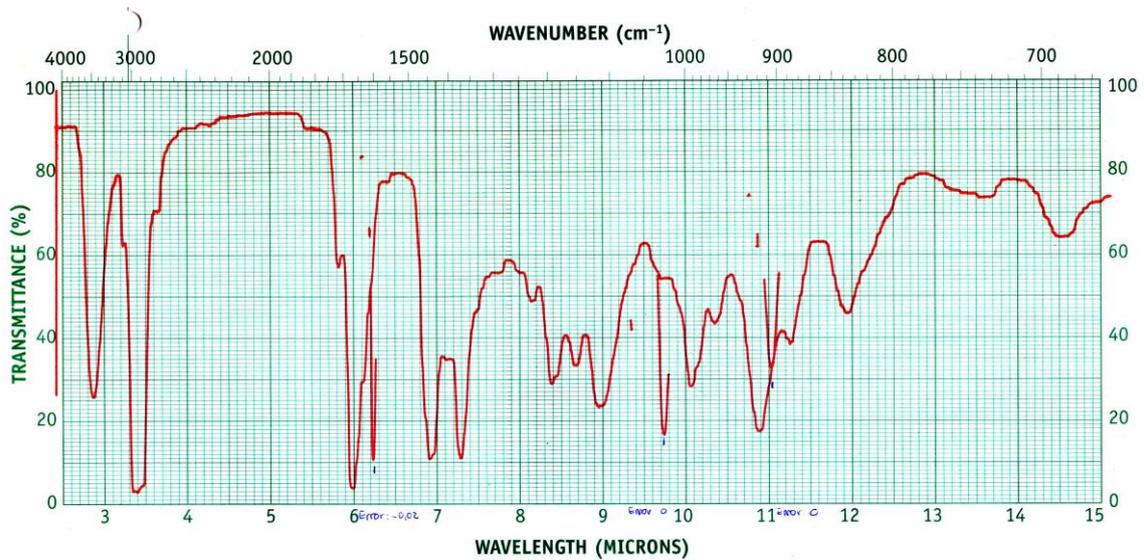
Espectro de Masa pico **Linalol** de esencia **LaSP III**:



El espectro IR de la esencia **LaSP III** muestra la banda correspondiente al OH terciario a una longitud de onda de 2,86  $\mu\text{m}$ , evidenciando la presencia de Linalol:

**-IR 5:**

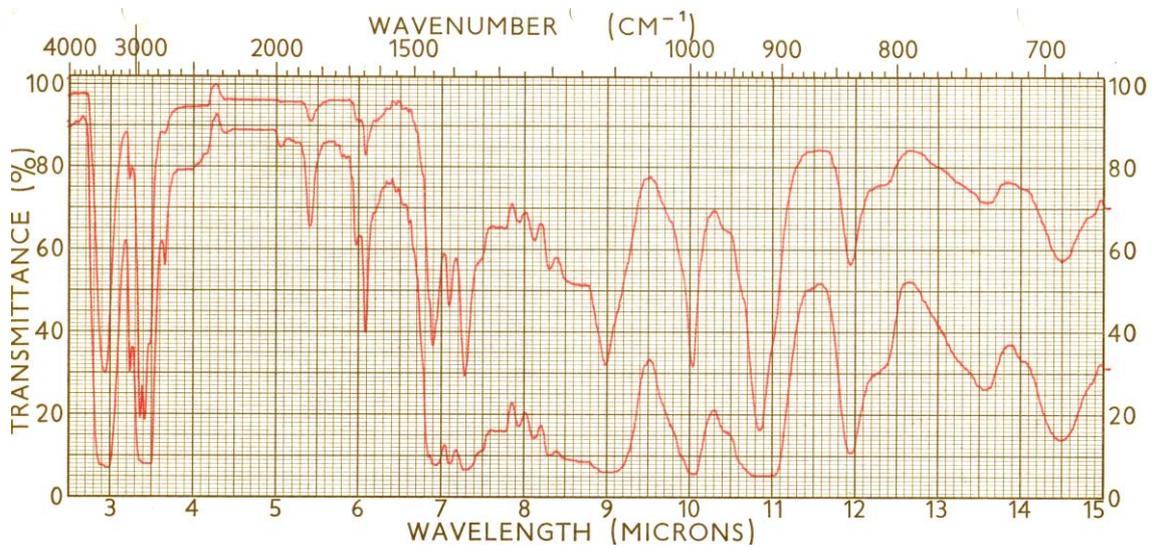
Espectro IR de esencia **LaSP III**:



Para verificar la presencia de Linalol, se compara con el espectro IR del Linalol patrón:

**-IR 6:**

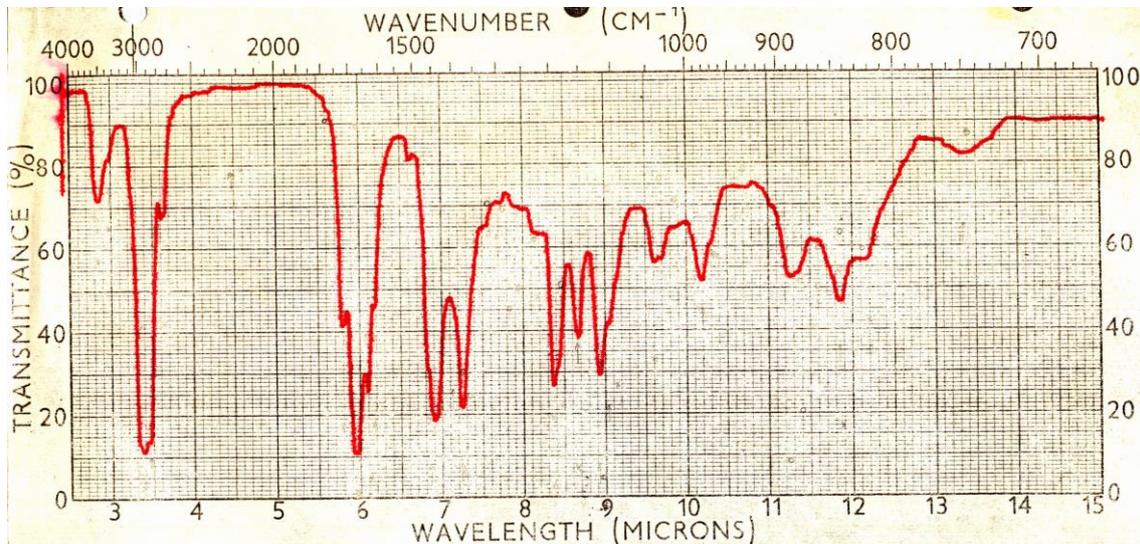
Espectro IR de Linalol patrón (curva superior más definida)



Por otra parte, se puede comparar con el espectro IR de la esencia **LaSP I**:

**-IR 7:**

Espectro IR de esencia **LaSP I**:



Se puede apreciar la mayor coincidencia de bandas entre el espectro IR de la esencia **LaSP III (IR 5)** y el espectro IR del Linalol patrón (**IR 6**), mientras que en el caso del espectro IR de **LaSP I (IR 7)**, las bandas correspondientes al patrón no se pueden identificar con facilidad, evidenciado, por consiguiente, una concentración mucho menor de este componente en la esencia.

Por otro lado, para comprobar si se repetía la presencia mayoritaria de Linalol en la esencia de verano, se analizó el aceite esencial de ejemplares que son hijos de tercera generación de los que dieron ese resultado, por lo que se adjunta a continuación el cromatograma de gases correspondiente:

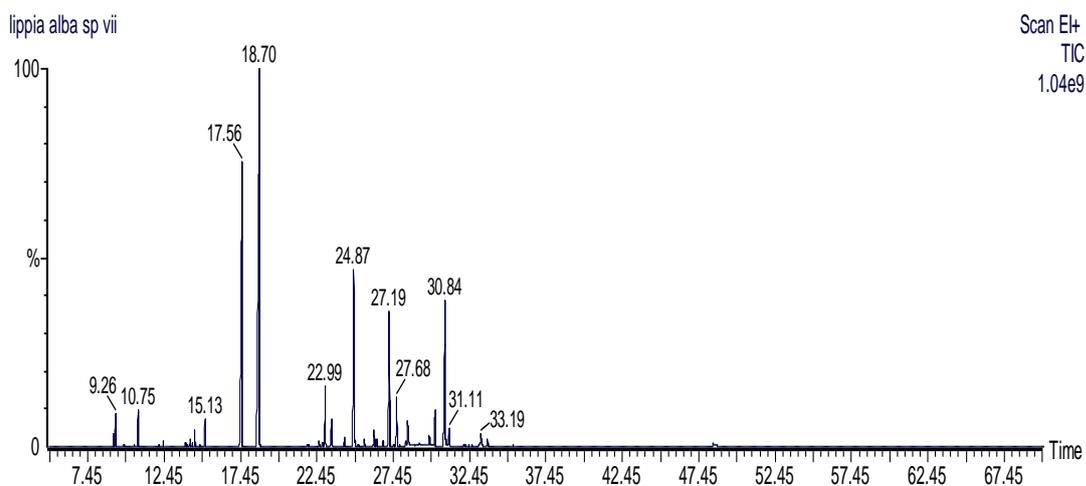
**-CG16:**

Cromatograma de esencia de *Lippia alba* hija de tercera generación de la planta madre **LaSP III**, donde:

pico **12,45**: Linalol (0,2%)

pico **17,56**: Neral (17,2%)

pico **18,70**: Geranial (27,7%)



De la misma especie, se obtuvo el cromatograma de la esencia de aguas, a fin de descartar que el Linalol se encuentre en la fracción soluble en agua, por lo cual se adjunta el cromatograma correspondiente a esta esencia:

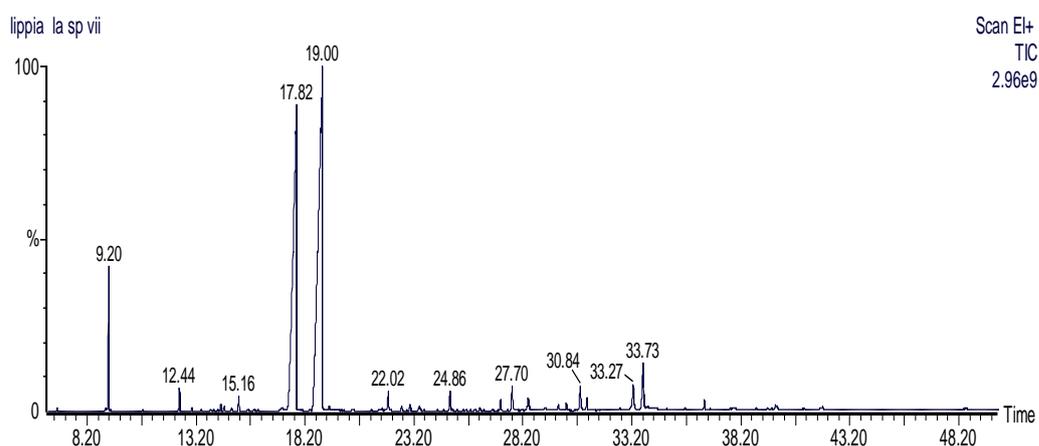
**-CG 17:**

Cromatograma de esencia de aguas de *Lippia alba* hija de tercera generación de la planta madre **LaSP III**

pico **12,44**: Linalol (0,5%)

pico **17,82**: Neral (28,7%)

pico **19,00**: Geranial (36,6%)



La esencia de aguas presenta enriquecida la fracción monoterpénica oxigenada (representada por el 66% de los constituyentes totales) mientras que en el caso de la esencia directa, se encuentran en mayor proporción tanto los monoterpenos oxigenados como los hidrocarburos monoterpénicos (47,3% de los primeros, con 32,1% de los segundos)

En el caso de las esencias de El Perichón, se muestra el cromatograma con columna SE 52 correspondiente a la esencia **LaP V** en el cual el pico **6** es el correspondiente a  $\beta$ -Mirceno y el pico **17** a Mircenona:

**-CG 18:**

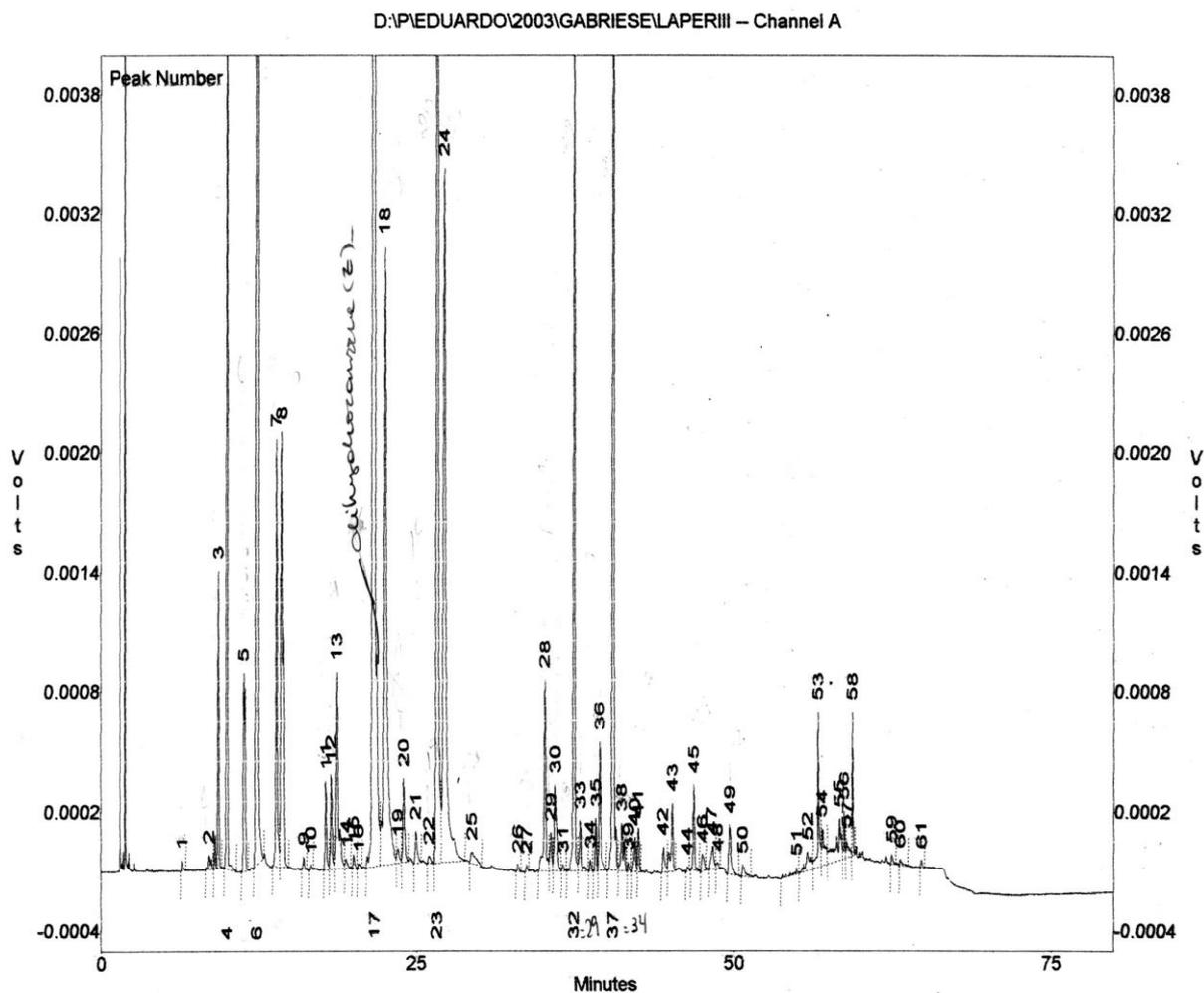
Cromatograma de gases de esencia **LaP V**, donde:

pico **6**:  $\beta$ -Mirceno

pico **17**: Mircenona

pico **23**: (Z)-Ocimenona

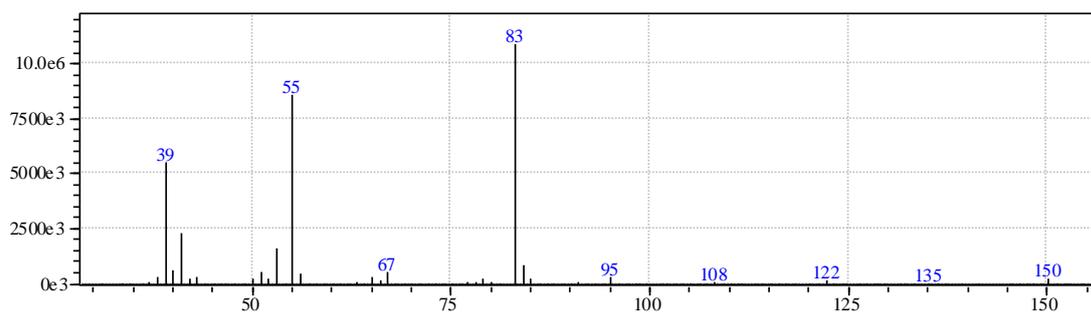
pico **24**: (E)-Ocimenona



El espectro de masa correspondiente al pico asignado a **Mircenona** fue:

**-EM 11:**

Espectro de Masa pico 17 de esencia **LaP V: Mircenona**



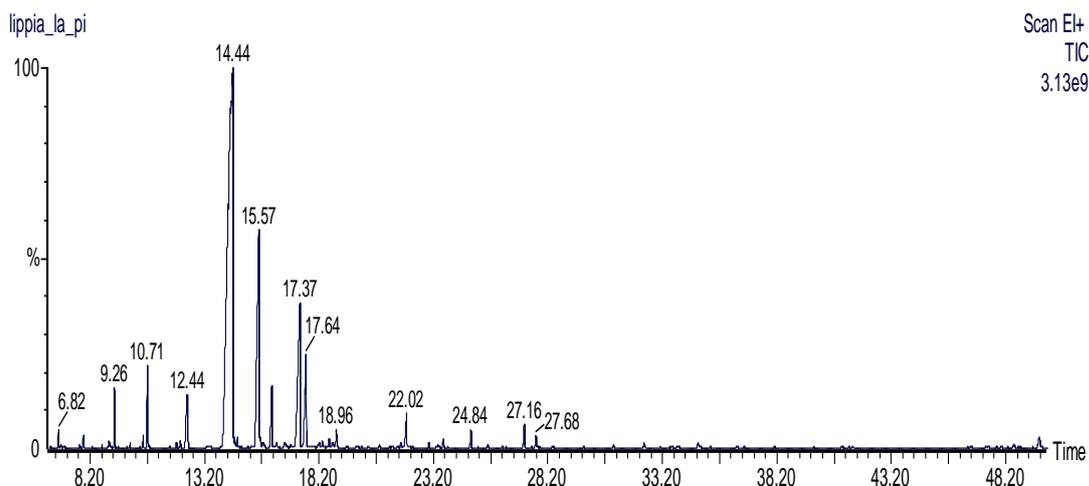
El cromatograma de la esencia de aguas de esta especie es:

**-CG 19:**

Cromatograma de esencia de aguas de **LaP V:**

pico **14,44:** Mircenona

pico **15,57:** (*Z*)-Ocimenona y (*E*)-Ocimenona



En el caso de la esencia de *Lippia alba* Santa Ana (**LaSA VIII**), el cromatograma de gases con columna SE-52 en el que también se identifica el pico correspondiente a Mircenona es:

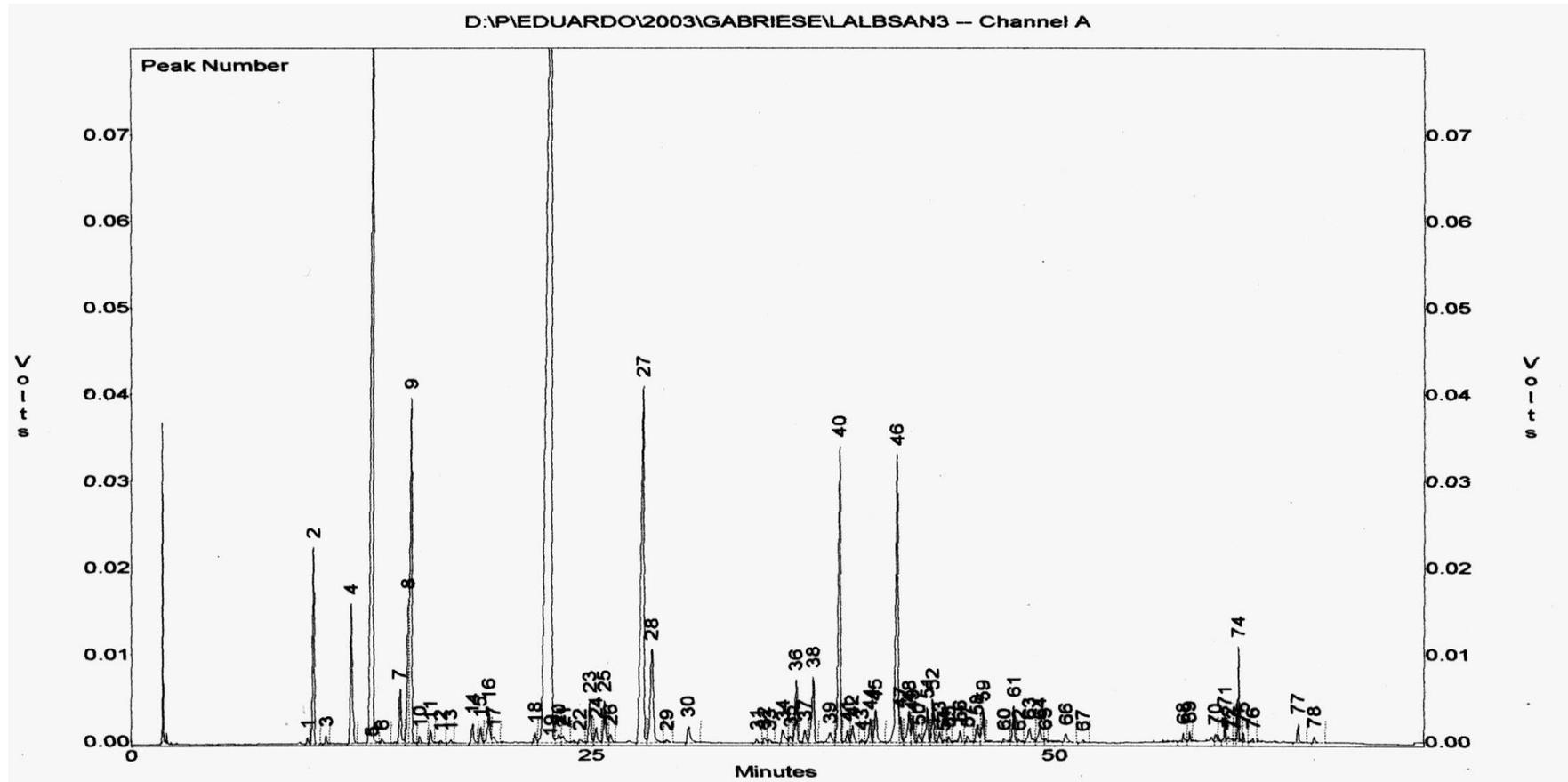
**-CG 20:**

Cromatograma de esencia **LaSA VIII**, donde:

pico **19**: Mircenona

pico **27**: (*Z*)-Ocimenona

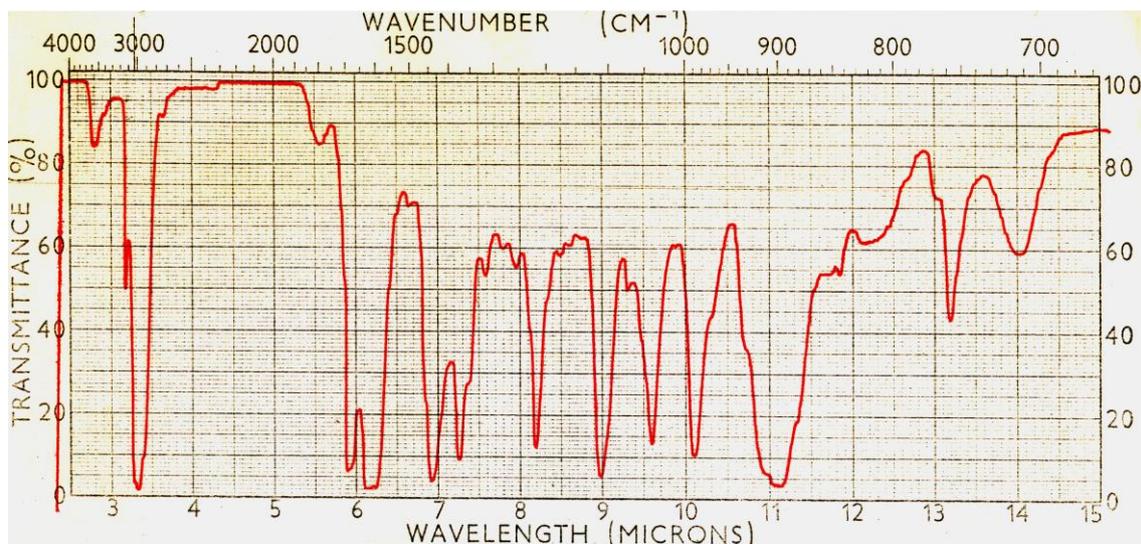
pico **28**: (*E*)-Ocimenona



Esta esencia de Santa Ana fue caracterizada además, por medio del espectro IR de la esencia completa. Por otra parte, se fraccionó la esencia por destilación en banda rotante y de la fracción **I** (destilada a 10 mmHg y 75 °C) se realizó el espectro UV en el cual se observan dos máximos de absorción ( $\lambda_{\text{máx. 1}} = 225 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{máx. 2}} = 248 \text{ nm}$ ) y luego se obtuvo el espectro de RMN de la misma fracción. A continuación se representan los espectros mencionados:

**-IR 8:**

Espectro IR de esencia **LaSA VIII**:

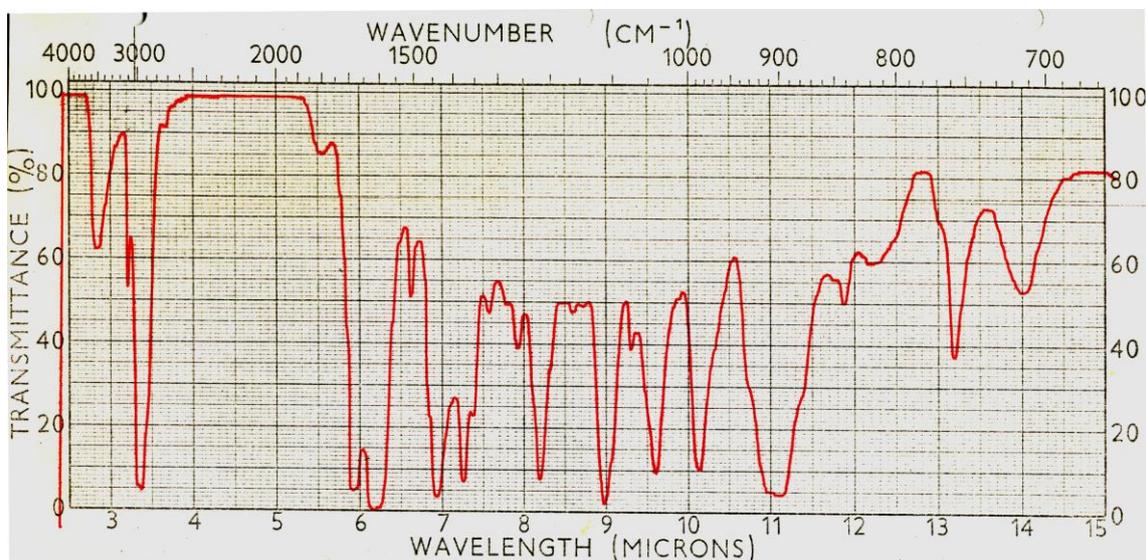


Se puede apreciar que la banda que aparece a 5,90  $\mu\text{m}$  es la que caracteriza a los compuestos carbonílicos, por lo cual si se correlaciona este resultado con el CG correspondiente (**CG 20**) es de esperar que esta banda corresponda al grupo carbonilo de **Mircenona**, estando intensificada además por la presencia de **Ocimenona** en la misma esencia. También son destacables las bandas correspondientes a los modos vibracionales - rotacionales de  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$  y enlaces dobles característicos de los sesquiterpenos (grupo *gem*-dimetilo a 7,25  $\mu\text{m}$ ).

A modo de comparación, también se obtuvo el espectro IR y el CG de la esencia de aguas:

**-IR 9:**

Espectro IR de esencia de aguas de **LaSA VIII**:

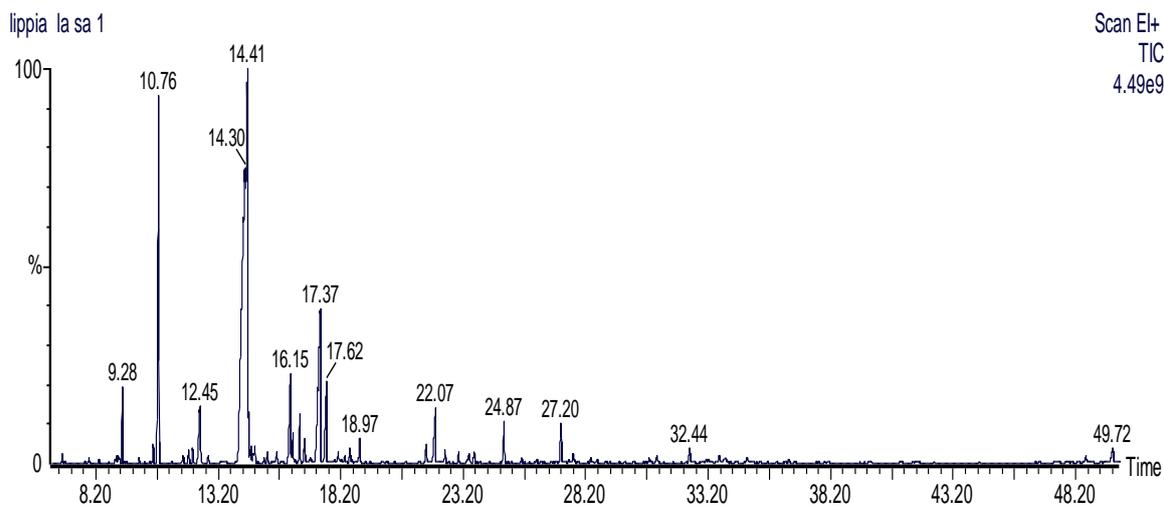


El cromatograma de esta esencia de aguas permite corroborar el espectro de IR, evidenciando la presencia de los componentes oxigenados mayoritarios, en mayores proporciones que los demás constituyentes del aceite:

**-CG 21:**

Cromatograma de la esencia de aguas de **LaSA VIII**:

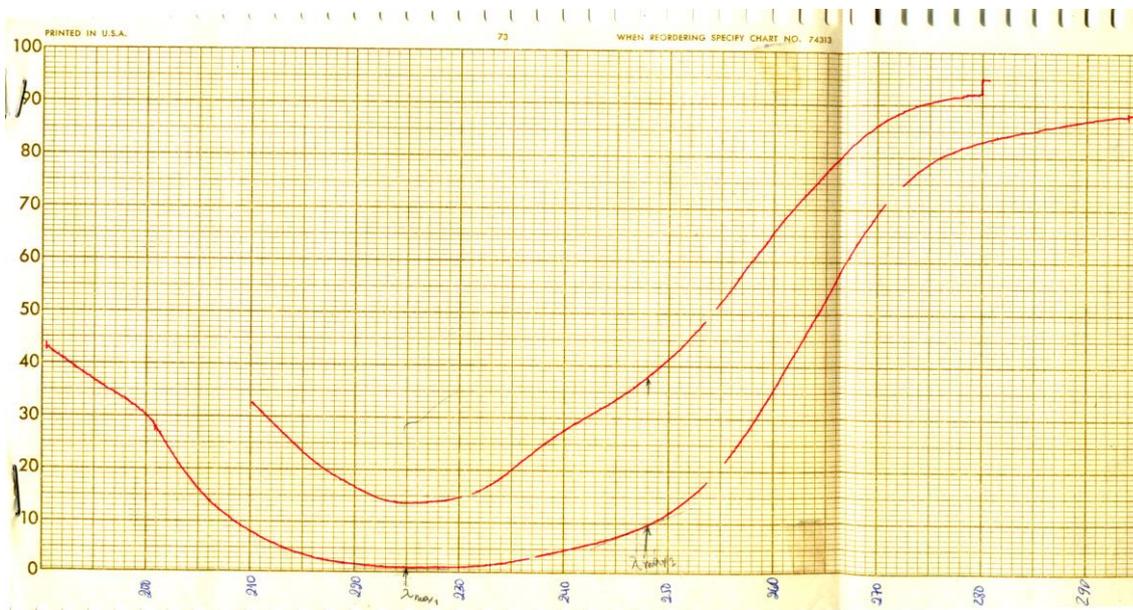
- pico **14,41**: Mircenona
- pico **17,37**: (*Z*)-Ocimenona
- pico **17,62**: (*E*)-Ocimenona



De la fracción enriquecida en Mircenona se obtuvo, a fin de lograr una mejor identificación, el espectro de UV correspondiente, en el cual se pueden calcular los máximos de absorción y compararlos con los de la Mircenona patrón:

**-UV 1:**

Espectro UV de la fracción **I** enriquecida en Mircenona de **LaSA VIII**:



**-Valores experimentales:**

$$\lambda_{\text{máx. 1}} = \mathbf{225 \text{ nm}}$$

$$\lambda_{\text{máx. 2}} = \mathbf{248 \text{ nm}}$$

**-Cálculo del coeficiente de extinción del  $\lambda_{\text{máx. 1}}$ :**

$$\epsilon^{225} = \frac{PM \times (2 - \log T)}{C} = \frac{138,21 \times (2 - \log 1,2)}{(0,02 \text{ g / L})} = 13274$$

**-Cálculo del coeficiente de extinción del  $\lambda_{\text{máx. 2}}$ :**

$$\epsilon^{248} = \frac{PM \times (2 - \log T)}{C} = \frac{138,2 \times (2 - \log 9,5)}{(0,02 \text{ g / L})} = 7064$$

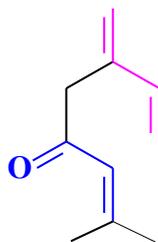
Donde:

PM: peso molecular de Mircenona

T: transmitancia

C: concentración de la dilución de la esencia **LaSA VIII**

Por su estructura, la Mircenona presenta dos máximos de absorción correspondientes a los dos grupos cromóforos, por lo cual calculando los  $\lambda_{\text{máx.}}$  correspondientes:



Cromóforo Básico 217 nm  
 1 sustituyente alquílico 5 nm  
 $\lambda$  máx. calc 1 = **222 nm**

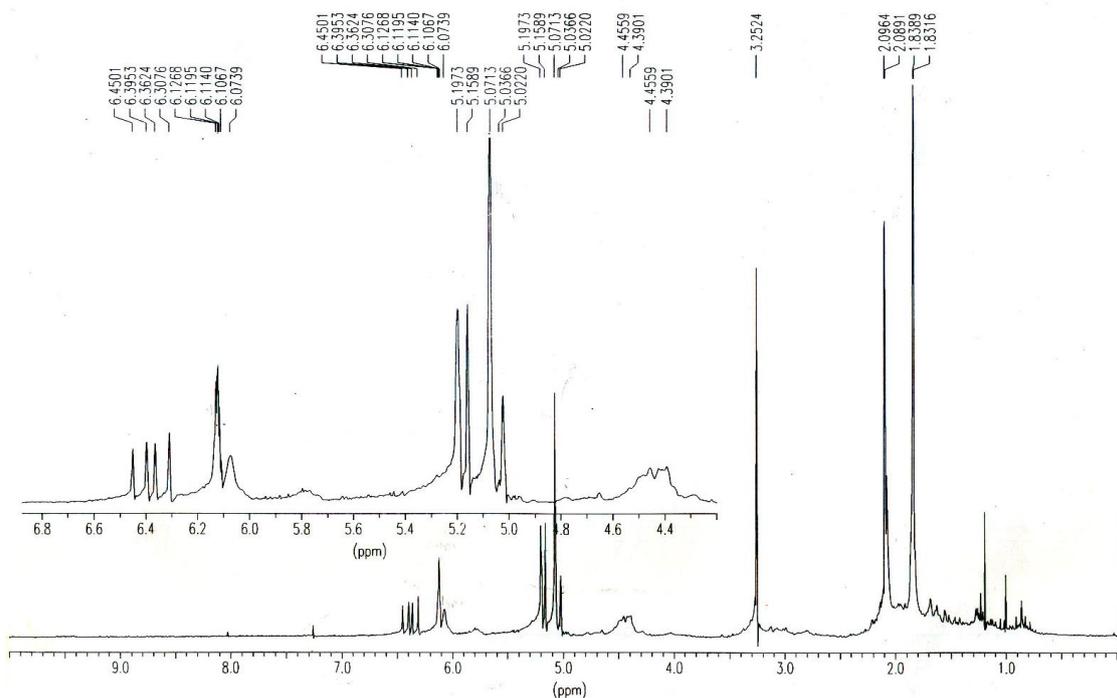
Cromóforo Básico 215 nm  
 2 sustituyentes en  $\beta$  24 nm  
 $\lambda$  máx. calc 2 = **239 nm**

(Ricciardi, A., 2004)

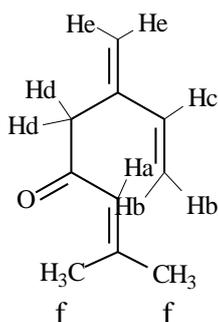
Estos valores difieren poco de los valores experimentales correspondientes en el espectro UV.

**-RMN 1:**

Espectro RMN H de fracción I, enriquecida en **Mircenona** de **LaSA VIII**:



Calculando los desplazamientos químicos de los Hidrógenos de **Mircenona**, mediante tablas adecuadas (Hesse, *et al.*, 1995) para Hidrógenos sobre enlaces dobles o utilizando la regla de Shoolery modificada, para Hidrógenos alifáticos:



Ha:	$5,25 \text{ ppm} + (-0,22) + (-0,28) + 1,10 = 5,85 \text{ ppm}$	.....	singulete
Hb:	$5,25 \text{ ppm} + (0,02) = 5,27 \text{ ppm}$	.....	cuadruplete
Hc:	$5,25 \text{ ppm} + (1,24) = 6,49 \text{ ppm}$	.....	cuadruplete
Hd:	$1,25 \text{ ppm} + 0,8 + 1,20 = 3,25 \text{ ppm}$	.....	singulete
He:	$5,25 \text{ ppm} + (-0,22) + (0,02) = 4,99 \text{ ppm}$	.....	duplete
CH <sub>3</sub> f:	$1,71 \text{ ppm}$	.....	singulete

Por la vecindad de Ha con los Hb, la señal que debería ser un singulete aparecerá como triplete.

Asignando estos valores calculados a los datos obtenidos del espectro de RMN:

1,84 ppm	.....	singulete = CH <sub>3</sub> f
2,10 ppm	.....	singulete = CH <sub>3</sub> f
3,25 ppm	.....	singulete = Hd
5,04 ppm	.....	duplete = He
5,15 ppm	.....	cuadruplete = Hb
6,11 ppm	.....	triplete = Ha
6,37 ppm	.....	cuadruplete = Hc

### **-Relaciones enantioméricas de linalol y germacreno D:**

Del aceite esencial **LaSP III** se determinó la relación enantiomérica de **Linalol** y de **Germacreno D** (45,4% del total identificado), debido a que esta esencia es la que presentaba mayor diferencia de valores con la rotación óptica de las otras esencias de la misma procedencia. Al analizar los distintos constituyentes del aceite esencial, se observó que la diferencia primordial entre las tres esencias está en el mayor contenido de **Linalol** en la esencia de verano. El cromatograma gaseoso con columnas quirales correspondiente al corte de **Linalol** y **Germacreno D** de **LaSP III** y la separación enantiomérica correspondiente son:

**-CG 22:**

Cromatograma con columna quiral de **LaSP III**, cortes de Linalol y Germacreno D, donde:

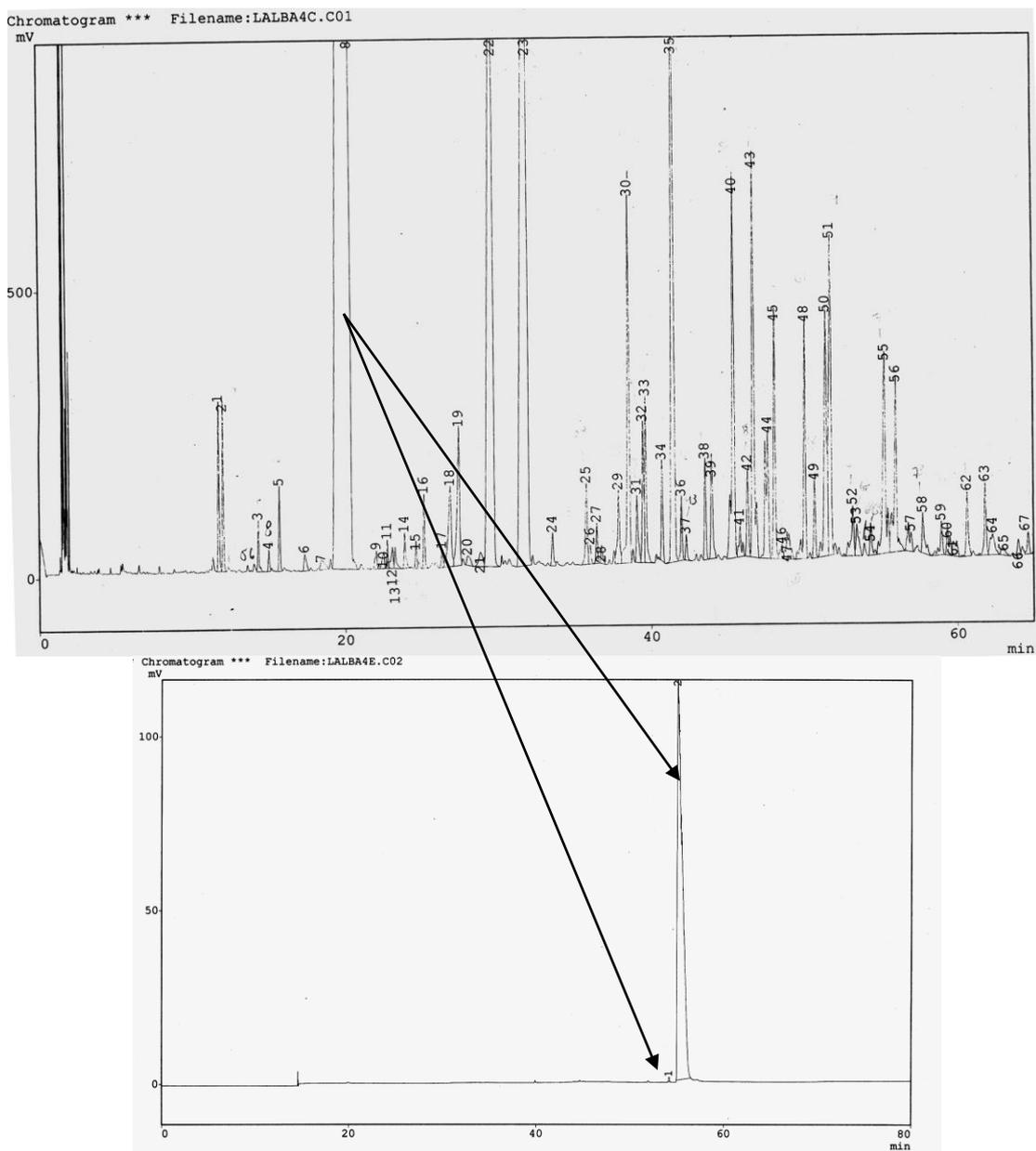
pico **8**: Linalol

pico **40**: Germacreno D

Separaciones enantioméricas:

pico **1**: *R*-(-)-Linalol

pico **2**: *S*-(+)-Linalol



La identificación de los enantiómeros de **Linalol** se realizó por comparación con la corrida de Linalol patrón cuyos datos y cromatograma (**CG 6**) se incluyen en la sección correspondiente a *A. gratissima* var. *gratissima*.

Por lo tanto la relación enantiomérica de los enantiómeros respectivos se resumen en la **Tabla 10**:

***Tabla 10***

***-Relaciones enantioméricas de Linalol y Germacreno D en LaSP III:***

<b>Linalol</b>		
Enantiómero	3 <i>S</i> -(+)	3 <i>R</i> -(-)
Relación %	99,7	0,3
<b>Germacreno D</b>		
Enantiómero	7 <i>R</i> -(+)	1 <i>S</i> -(-)
Relación %	9,8	90,2

#### **7.4-Ensayos de Actividad Antitumoral:**

Incidentalmente, las esencias de *Aloysia gratissima* var. *gratissima* de San Lorenzo I (AgSL I), *Aloysia virgata* var. *platyphylla* de Río Empedrado I (AvRE I) y *Lippia alba* Santa Ana (LaSA VIII), han sido enviadas a la empresa Biomar S.A., ubicada en la ciudad de León, España, por lo cual se pudo evaluar, mediante el test de inhibición de *Aldosa Reductasa*, la posible actividad antitumoral *in vitro*, de las mismas. Los ensayos de actividad se llevaron a cabo en cultivos de células neoplásicas determinando la citotoxicidad en paralelo frente a líneas de células normales CV-1 (fibroblastos de riñón de mono), datos no informados en este trabajo.

Las esencias se ensayaron sobre las siguientes muestras:

**P-388:** leucemia en ratón

**A-549:** carcinoma de pulmón humano

**HT-29:** carcinoma de colon humano.

Con los dos ensayos de carcinoma humano (A-549 y HT-29), se pretende inhibir directamente *in vitro* un cultivo de las células de tumores en fase de crecimiento puesto que son de lento desarrollo, exponiendo continuamente dichas células a las muestras en ensayo. En tanto que con el ensayo P-388 sobre ratones, se determina la velocidad de proliferación celular ya que se persigue detectar la posible inhibición de ADN, ARN y proteínas, sistemas claves en el control de tumores que son de progreso más rápido, como en el caso estudiado.

Los resultados, expresados como valores de IC<sub>50</sub>, o concentración del compuesto en µM que inhibe el 50 % de la división celular, fueron los siguientes:

**Tabla 11**

**-Ensayos de actividad antitumoral de aceites esenciales de:**

	<b>AgSL I</b>	<b>AvRE I</b>	<b>LaSA VIII</b>
<b>P-388</b>	> 10mg/ml	>10mg/ml	>10mg/ml
<b>A-549</b>	>10mg/ml	>10mg/ml	>10mg/ml
<b>HT-29</b>	>10mg/ml	>10mg/ml	>10mg/ml

\*Observación: se considera que presenta actividad antitumoral positiva cuando IC<sub>50</sub> < 10 mg/ml.

## ***8. - Discusión***

### ***Aloysia gratissima* var. *gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc.**

De acuerdo con los componentes identificados para los aceites esenciales de esta especie (CG 1 al CG 5, CG 7 y CG 8), se observa un comportamiento distintivo respecto de las diferentes procedencias del material vegetal (**Figura 5**). En la **Tabla 1** se puede apreciar que hay variaciones en los rendimientos en aceite esencial, manteniéndose los valores en el orden entre 0,7 y 1,3% (p/p), de acuerdo al estado de crecimiento de la planta. Resulta notable el hecho de que el período de crecimiento de la planta en el que el rendimiento en esencia alcanza el mayor valor no es el mismo para cada esencia, de acuerdo a la procedencia del material vegetal: en las especies colectadas en San Lorenzo, el rendimiento fue mayor en otoño, mientras que en las de Río Empedrado alcanzó el máximo rendimiento en primavera, y en verano, como sería de esperar, en las especies de El Perichón. En general, se puede observar que los mayores valores de esta propiedad coincidieron con épocas posteriores a lluvias copiosas por lo que dado que, desde los últimos diez años se viene observando un clima cambiante, aparecieron rendimientos mayores en otoño cuando sería de esperar lo contrario.

Se puede observar además que, independientemente de la procedencia de los aceites esenciales, algunas constantes físicas como densidad e índice de refracción, también se mantienen dentro de un rango de valores casi constantes, no así la rotación óptica de las esencias que presenta variaciones muy notables, inclusive en los aceites esenciales de un mismo origen. Esta magnitud puede variar entre valores positivos y valores altamente negativos. Este hecho se puede relacionar con la propiedad aditiva de la rotación óptica, con lo cual componentes con valores positivos de esta constante física, se contraponen a componentes con rotaciones ópticas negativas llevando así a la rotación óptica total de la esencia, a valores muy cercanos a 0°. Por otra parte, al ser una propiedad algebraicamente aditiva, la predominancia de alguno de los componentes con valores negativos o positivos llevarán la rotación total a asumir un valor en ese sentido, lo cual permitiría explicar que algunas de las esencias presenten fluctuaciones de esta magnitud respecto de las variaciones en los contenidos de sus componentes principales, de acuerdo al estado vegetativo y la preponderancia de alguno de los enantiómeros ópticos en particular.

Todas las esencias de *A. gratissima* var. *gratissima* presentan altos contenidos en hidrocarburos sesquiterpénicos (**Tabla 2**) que sufren algunas variaciones en la proporción de acuerdo al estado de crecimiento de la planta. En segundo orden de importancia se encuentra la fracción monoterpénica oxigenada, que a su vez aparece más abundante en las esencias de San Lorenzo y de El Perichón que en las de Río Empedrado. Estas últimas esencias presentan, en cambio, un incremento muy notable en la fracción de sesquiterpenos oxigenados en relación con las esencias de San Lorenzo, encontrándose, inclusive, en proporciones muy cercanas a la proporción en la que estos componentes se encuentran en las esencias de El Perichón. En cuanto a la fracción de hidrocarburos monoterpénicos, se mantiene casi constante para todas las esencias en sus distintos orígenes y estados de crecimiento, observándose variaciones mínimas entre los distintos aceites. (**Figura 5**)

Otra tendencia evidente que surge del gráfico de los componentes de los aceites esenciales para esta especie, es la que presentan los monoterpénos oxigenados que tienden a aumentar hacia la primavera en el caso de las esencias de San Lorenzo y Río Empedrado, manteniéndose casi invariables en las de El Perichón (**Figura 5**). En cambio,

comparando los hidrocarburos sesquiterpénicos en las esencias de San Lorenzo y El Perichón se ve que tienden a experimentar una disminución hacia la primavera mientras que, con la misma tendencia, experimentan una modificación en sentido inverso en las esencias de Río Empedrado.

Estas fluctuaciones en las proporciones de las diferentes fracciones de componentes de los aceites pueden ser explicadas por la diferente composición de las mismas, ya que en el caso de los aceites esenciales de San Lorenzo (**AgSL I: CG 1**, **AgSL II: CG 2** y **AgSL III: CG 3**) la fracción de hidrocarburos sesquiterpénicos está principalmente constituida por  **$\beta$ -Cariofileno**, **Germacreno D**, **Biciclogermacreno**, mientras que la fracción de los monoterpenos oxigenados por los isómeros  **$\alpha$ -** y  **$\beta$ -Tuyona** (**Tabla 2**, **EM 5**, **IR 1**). De los sesquiterpenos más abundantes, el contenido en  **$\beta$ -Cariofileno** se mantiene prácticamente constante, independientemente del estado vegetativo de las plantas (**Tabla 2**). Por esta razón, se podrían relacionar los elevados valores negativos de las rotaciones ópticas de los aceites **AgSL II** y **AgSL III** con el contenido en **óxido de Cariofileno** ( $[\alpha]_D -74^\circ$ ) y de  **$\beta$ -Cariofileno** ( $[\alpha]_D -11^\circ$ ), (Ourisson *et al.*, 1966), a los cuales se suma la contribución de  **$\alpha$ -Tuyona** ( $[\alpha]_D -10^\circ 14'$ ) en mayor proporción respecto de  **$\beta$ -Tuyona** ( $[\alpha]_D +76^\circ 10'$ ), (Guenther, 1963), aunque esta suposición no se ha podido verificar por la carencia de patrones ópticos.

En cualquier caso, es importante considerar que el sistema enzimático de cada organismo en particular, condiciona la estereoquímica de los productos finales de la biosíntesis, por lo que la rotación óptica total de la esencia dependerá de los enantiómeros formados para cada constituyente.

Por otra parte, el contenido en monoterpenos en los aceites de San Lorenzo, alcanza su mayor proporción (7,6%) en primavera (**AgSL II**) mientras que en otoño y verano, los más altos porcentajes corresponden al contenido en hidrocarburos sesquiterpénicos (47,2 - 51,1%) (**Tabla 2**, **Figura 5**). Particularmente, la fracción monoterpénica oxigenada de estos aceites está mayoritariamente representada por la contribución de la fracción de  **$\alpha$ -** y  **$\beta$ -Tuyona**, por lo cual, estos componentes condicionarán la variación total de la fracción. Comparando esta composición con la de la fracción monoterpénica de las esencias de Río Empedrado (**CG 5** y **CG 7**) en las que no se observa la presencia de Tuyona, la variación total estará directamente afectada por el contenido en Linalol y no de Tuyona.

Respecto de la composición de la fracción sesquiterpénica oxigenada se observan notorias diferencias en los distintos aceites, a pesar de que la variación de las mismas con el estado de crecimiento de la planta para cada aceite, experimenta una tendencia similar. En el caso de los aceites de San Lorenzo, es predominante la presencia de óxido de Cariofileno, en tanto que en las esencias de Río Empedrado el principal constituyente de esta fracción, y del cual dependen las variaciones totales, es el Viridiflorol (**EM 6**) y en el caso de las esencias de El Perichón, la mencionada fracción está determinada por el contenido en 10-*epi*-Cubebol. (**Tabla 2**)

Estas diferencias observadas entre los distintos componentes principales de la misma especie, dependiendo de la naturaleza u origen de la planta, llevaría a pensar en un caso similar al que ocurre con *Lippia alba*, respecto de la plasticidad de la especie. Hasta el momento no se había encontrado en la bibliografía citas referentes a la existencia de diferentes composiciones de aceite esencial de *Aloysia gratissima*, por lo cual, frente

a los resultados obtenidos, sería considerable suponer que esta especie pudiese presentar una cierta adaptabilidad o plasticidad similar a la que presenta *L. alba*, de la misma familia.

En la **Tabla 2**, en la última columna, se observa que en las especies estudiadas en este trabajo aparece una gran cantidad de constituyentes que no han sido identificados en trabajos sobre esta esencia pero de otras procedencias, haciéndose notable la identificación positiva de los isómeros de Tuyona, sólo que en proporciones mucho menores a las encontradas en las esencias de Corrientes. De la misma manera, luego de la tabla mencionada, aparece un listado de los constituyentes que fueran citados en trabajos de bibliografía pero que no fueron encontrados en las esencias estudiadas en el presente trabajo. No resultan sorprendentes las diferencias halladas suponiendo que las especies constituyentes de la familia de las Verbenáceas están caracterizadas por una notoria variabilidad química, como ya se ha mencionado previamente para el caso de *Lippia alba*.

Por otra parte, los isómeros  $\alpha$ - y  $\beta$ -Tuyona aparecen exclusivamente en los aceites de especies provenientes de San Lorenzo, siendo sus contenidos variables (6,8 – 17,5%) de acuerdo al estado vegetativo. Este último hecho es notable ya que previamente no se han encontrado estos constituyentes en cantidades que superaran el 2% del total de la esencia. Sin embargo, por conversaciones personales con personas de campo vecinas al sitio de donde se recolectaron los ejemplares, se supo que no utilizan esta planta bajo ninguna forma, excepto en animales y como medio para facilitar la expulsión de la placenta en las vacas (efecto abortivo). En consecuencia, considerando que los isómeros de Tuyona presentan acción convulsiva comprobada, (ECFA, Monographs & Evaluations, 519), este dato llevaría a pensar que la presencia de altas proporciones de estos componentes en el aceite, sea el motivo del escaso uso de esta especie en la zona de San Lorenzo, Corrientes, teniendo en cuenta que las cetonas son suficientemente solubles en agua y pueden ser extraídas del aceite esencial al prepararse la infusión. Esta particularidad se ve reflejada en el cromatograma de gases de la esencia extraída de las aguas de arrastre (**CG 4**), en el cual se observa incrementada la fracción monoterpénica oxigenada de  $\alpha$ - y  $\beta$ - Tuyona, por lo que es de esperar que la infusión de esta especie contenga una mayor proporción de estos componentes por su solubilidad en agua.

Por otro lado, resultó notable el hecho de que el contenido en cetonas monoterpénicas disminuye a medida que la planta alcanza su mayor estado de desarrollo, siendo máximo cuando está más joven.

En relación a los componentes no identificados o desconocidos, por los valores de los iones moleculares se supuso que se trata de compuestos sesquiterpénicos, aunque la identificación se hizo difícil por presentar espectros de masa (**EM 1**; **EM 2**; **EM 3**; **EM 4**) que no guardan relación definida con los espectros de masa de los componentes de las bibliotecas disponibles. Los índices de retención lineales de los compuestos desconocidos **2** al **4** hacen suponer que estos componentes sean sesquiterpenos oxigenados de naturaleza alcohólica o cetónica a diferencia del componente desconocido **1**, que se halla dentro del rango de índices de retención lineales de los hidrocarburos sesquiterpénicos. Tanto el componente desconocido **1** como el **2** aparecen solamente en las esencias procedentes de El Perichón, en tanto que los componentes desconocidos **3** y **4** aparecen en proporciones similares en todas las esencias de las tres procedencias.

Como se puede observar en la **Tabla 2**, la esencia **AgRE V (CG 5)** es la que se caracteriza por contener una mayor proporción de Linalol respecto de todas las muestras de esta procedencia (Río Empedrado).

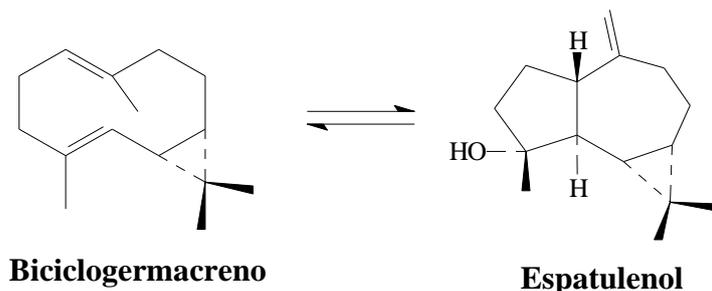
Por otro lado, y contrariamente a lo que sucede con las esencias de San Lorenzo, los aceites esenciales de especies de Río Empedrado y Perichón presentan mayor contenido en sesquiterpenos oxigenados sin observarse cantidades notables de monoterpenos oxigenados, excepto en el caso del aceite **AgRE V** que, como se explicó anteriormente, tiene un alto contenido en **Linalol** (13,9%) no observado en los demás. Correlacionando este dato con la correspondiente rotación óptica de la esencia, se ve que es la que presenta el más elevado valor negativo a diferencia de las otras esencias con valores casi nulos o positivos, por lo que se podría suponer que este terpeno sea el responsable de este efecto ya que al determinar la relación enantiomérica se observó que predomina el isómero 3*R*-(-)-Linalol (**CG 5**) (**Tabla 4**) cuya rotación específica tiene un valor teórico de  $[\alpha]_D -17^{\circ}4$ . (Guenther, 1963)

Luego de la comprobación de la relación enantiomérica del linalol, el hecho de que los aceites **AgRE IV** y **AgRE VI**, contrariamente a la esencia **AgRE V**, presenten rotaciones positivas, podría permitirnos concluir que efectivamente el enantiómero de Linalol presente en esta última esencia es el *levo*.

Los aceites esenciales del Perichón presentan todos altos valores negativos de rotación específica, a la vez que están caracterizados por la presencia de alcoholes sesquiterpénicos como el **10-*epi*-Cubebol (EM 7)**, lo cual concuerda con la identificación de la banda de OH a 3,90  $\mu\text{m}$  observada en el espectro IR de los aceites esenciales (**IR 3**). Asimismo, el contenido en este alcohol sesquiterpénico es más importante en el aceite **AgP VIII** y en menor proporción en el **AgP VII (CG 8)** (primavera y otoño respectivamente) siendo prácticamente trazas en el aceite **AgP IX** de verano.

Respecto de las esencias de aguas de las especies procedentes de El Perichón, se observa que dado que los componentes principales son sesquiterpenos poco solubles en agua, las esencias de aguas de arrastre están principalmente constituidas por  $\beta$ -Elemeno y 10-*epi*-Cubebol, como se observa en el **CG 9**. Surge como consecuencia de ese cromatograma que las esencias de aguas se diferencian de las esencias directas solamente en la proporción relativa de los componentes, sin apreciarse modificaciones cualitativas que pudiesen modificar la calidad de la infusión en el momento de prepararla.

Analizando los sesquiterpenos presentes en las esencias de San Lorenzo y Río Empedrado (**AgSL I** a **AgSL III** y **AgRE IV** a **AgRE VI**), se observa que entre los sesquiterpenos de mayor predominancia, aparece un contenido variable entre el 5% y el 25% de **Biciclogermacreno**, acompañado por el **Espatulenol** en proporciones mucho menores, de entre el 3,7 y el 7,7% solamente en las esencias **AgSL I** y **AgSL II**, hecho éste que resultó curioso por no mantenerse la constancia en todos los aceites. Sin embargo, como señalan Toyota M. *et al.*, (Toyota M. *et al.*, 1996), el Espatulenol resulta ser un producto de la conversión del Biciclogermacreno por oxidación en el tiempo. Este proceso de conversión se produce por envejecimiento del aceite o extracto y es cuantitativo en cuanto a la cantidad de Biciclogermacreno presente y Espatulenol formado; también postularon que se mantiene la relación enantiomérica del isómero del Biciclogermacreno que se está transformando, por lo que esta interconversión se puede representar de la siguiente manera:

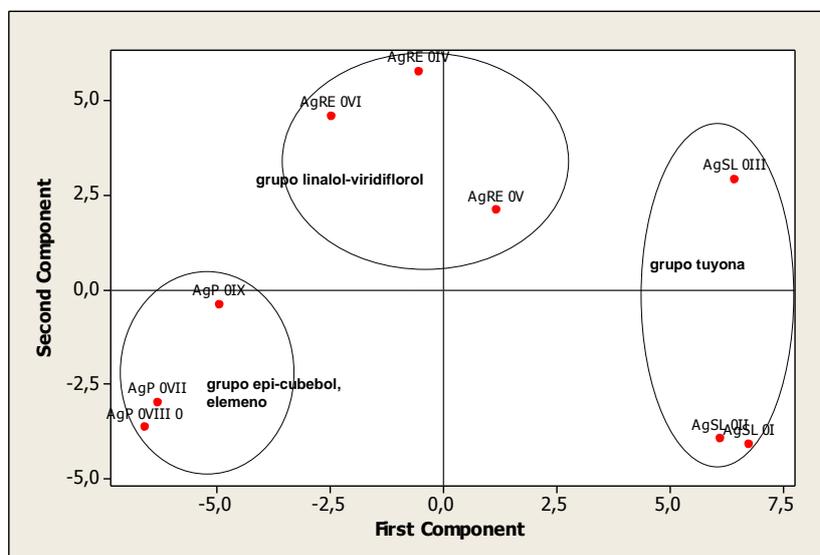


En consecuencia, sería posible considerar la presencia del Espatulenol no solamente como constituyente del aceite esencial, producto del metabolismo de la planta, sino también en parte como un producto secundario formado durante el proceso de extracción del aceite.

La amplitud del área de distribución para *A. gratissima*, en la Provincia de Corrientes, está caracterizada por una notable complejidad fisiográfica que, a su vez, depende de un complicado conjunto de factores. Por lo tanto, es razonable encontrar divergencias considerables en la composición de los aceites esenciales de regiones diferentes. Los ejemplares estudiados difieren notablemente de los publicados en la bibliografía internacional, sobre todo en el contenido en **Sabineno** y  **$\alpha$ -Pineno**, los cuales no representan valores considerables en los aceites analizados, contrariamente a lo citado en especies de Brasil y otras procedencias (Bauer *et al.*, 1969; Soler *et al.*, 1986b; Zygadlo *et al.*, 1995). Además, tampoco se encontraron cantidades apreciables de **Copaenol**, **1,8-Cineol** y **Pulegona**. Este último compuesto fue encontrado previamente en especies provenientes de Córdoba (Argentina), como principal constituyente de las flores (Jozamí *et al.*, 1982; Soler *et al.*, 1986a; Zygadlo *et al.*, 1995). (Ver sección **3.3.1: CONSTITUYENTES IDENTIFICADOS**)

Del análisis de los diferentes compuestos encontrados para cada origen de las plantas, se hace evidente la dificultad de evaluar objetivamente las matrices de composición dada la complejidad que presentan los aceites esenciales. Por otra parte, son variados los factores que condicionan la composición química de éstos. En este sentido, se podría realizar la comparación entre aceites provenientes de orígenes similares, tomando como variable el estado de crecimiento de la planta, pero por otra parte se podría considerar a este factor como una constante para analizar el efecto del origen geográfico. Sin embargo, al momento de analizar ambos factores simultáneamente el análisis se ha complicado en su interpretación por lo que se hace necesario recurrir al uso de herramientas del tipo del análisis estadístico multivariable. Que permitan realizar, con mayor objetividad, un análisis de los resultados y su efecto sobre los diferentes factores (estado de crecimiento, origen geográfico, condiciones climáticas, etc.) Por otra parte, la aplicación de este tipo de herramientas permitiría tanto visualizar como explicar fenómenos de discriminación o relacionamiento entre las poblaciones para poder así agrupar aquellas con características comunes que inicialmente podrían no ser percibidas. En tal sentido, el análisis estadístico en la modalidad de agrupamientos y representación gráfica en la modalidad de dendrograma sobre los aceites esenciales analizados (**Tabla 2**), ha hecho posible agrupar las poblaciones estudiadas de *Aloysia gratissima* de la región del Nordeste Argentino, en tres grupos bien definidos:

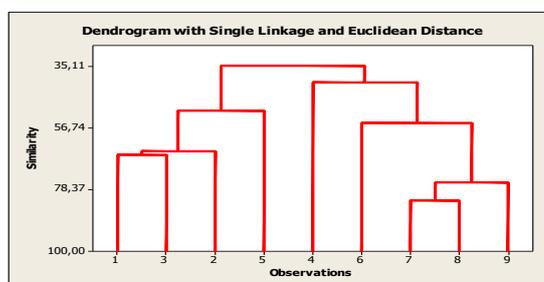
**Figura 10:** Gráfico del agrupamiento de las poblaciones de *Aloysia gratissima* en función de los componentes químicos principales del aceite esencial.



Coincidentemente los tres grupos están separados por el origen geográfico de los aceites esenciales sin que el estado de crecimiento tenga influencia mayormente significativa en la distribución de las tres familias, ya que la vinculación estaría determinada por los constituyentes principales, identificándose un primer grupo por Tuyona, un segundo grupo por Linalol – Viridiflorol y el tercer grupo por 10-*epi*-Cubebol –  $\beta$ -Elemeno. A modo de confirmación se puede analizar el dendrograma de las esencias obtenido por análisis jerárquico de clusters, del cual también es posible establecer el acercamiento de los aceites esenciales 1-AgSL I, 2-AgSL II, 3-AgSL III por un lado, 7-AgP VII, 8-AgP VIII y 9-AgP IX por otro lado, mientras que en el medio de ambas vinculaciones, se encuentra el tercer grupo: 4-AgRE IV, 5-AgRE V y 6-AgRE VI que presenta similitudes con sus vecinos observándose, además, que la esencia AgRE IV parecería ser el centro del grupo:

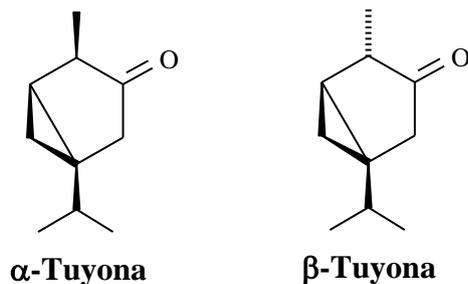
**Figura 11:** Dendrograma para aceites esenciales de *Aloysia gratissima*

- 1-AgSL I
- 2-AgSL II
- 3-AgSL III
- 4-AgRE IV
- 5-AgRE V
- 6-AgRE VI
- 7-AgP VII
- 8-AgP VIII
- 9-AgP IX

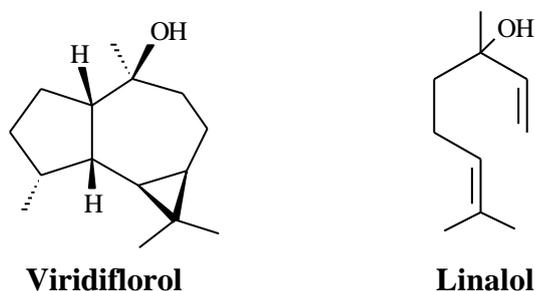


Como consecuencia de lo expuesto, se ha supuesto que en *A. gratissima* var. *gratissima* también existe variabilidad química, por lo cual se postulan los siguientes quimiotipos diferenciados según sus constituyentes principales:

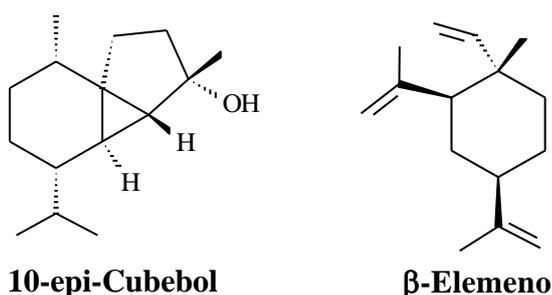
**-quimiotipo A** (con presencia de  $\alpha$ -Tuyona): caracterizado por aceites esenciales conteniendo  $\alpha$ -Tuyona en proporción variable entre el 10 y el 20%,  $\beta$ -Cariofileno, Germacreno D, Bicyclogermacreno y óxido de Cariofileno como constituyentes secundarios.



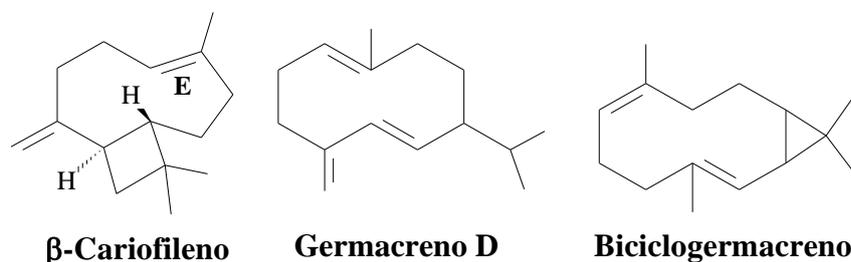
**-quimiotipo B** (con presencia de Linalol y Viridiflorol): caracterizado por aceites esenciales conteniendo proporción variable entre 1 y 40% de **Viridiflorol**, 0,6 a 15% de **Linalol**, 2 a 24% de  $\beta$ -Elemeno, y  $\beta$ -Cariofileno, Germacreno D y Bicyclogermacreno como constituyentes secundarios.



**-quimiotipo C** (sin  $\alpha$ -Tuyona ni Viridiflorol, con presencia mayoritaria de 10-*epi*-Cubebol y  $\beta$ -Elemeno): caracterizado por aceites esenciales conteniendo proporciones considerables y variables con el estado de crecimiento de la planta, de **10-*epi*-Cubebol** (0,5 a 13,4%), y como constituyentes secundarios  $\beta$ -Elemeno (24,4 a 35,7%),  $\beta$ -Cariofileno (2,8 a 3,8%), Germacreno D (5,0 a 8,3%) y Epoxiaromadendreno (5,7 a 6,9%).



Los constituyentes comunes a todos los aceites y considerados como componentes secundarios, como ser:  **$\beta$ -Cariofileno**, **Germacreno D**, **Biclogermacreno** y **óxido de Cariofileno**, no son los que permiten diferenciar los quimiotipos ya que aparecen en todas las esencias estudiadas aunque las proporciones sean variables desde el nivel de trazas hasta valores más apreciables:



Por lo que esta nueva clasificación de la especie en función de la composición química podría convertirse en un complemento a la clasificación botánica establecida previamente por Cabrera (Cabrera, 1965), Botta (Botta, 1979) y Jozamí (Jozamí *et al.*, 1982) dado que es la primera vez que se considera la división de esta especie en tres subespecies de acuerdo a la composición química de los aceites, por lo que los trabajos previos a esta presentación deberían ser revisados en este aspecto.

Resumiendo los tres quimiotipos postulados, en la **Tabla 12**:

**Tabla 12**

**-Quimiotipos postulados para *A. gratissima* var. *gratissima* de Corrientes:**

Componente Quimiotipo	$\alpha$ -Tuyona	Linalol	$\beta$ -Elemeno	Biclogermacreno	Viridiflorol	10-epi-Cubebol
<b>Tipo A</b>	7-17	-	tr	6-13	-	-
<b>Tipo B</b>	-	1-14	2-23	4-13	1-34	tr
<b>Tipo C</b>	-	tr	24-36	-	-	1-13

Si se tiene en cuenta la vinculación geográfica de las tres poblaciones que definen los tres quimiotipos (la localidad de Río Empedrado se encuentra aproximadamente a mitad de camino entre El Perichón y San Lorenzo: ver mapa de zonas de recolección, pág. 43) y sumado a lo observado por medio del dendrograma respecto de la vinculación de los mismos, se podría suponer que, a medida que se avanza desde el Sur de la Provincia hacia el Norte (desde San Lorenzo hacia El Perichón), existe una interconversión entre el quimiotipo A y el quimiotipo C a través del quimiotipo B, que es el que presenta elementos comunes con los dos anteriores.

### *Aloysia virgata* var. *platyphylla*:

Como se puede observar en la **Tabla 5**, los aceites esenciales de esta especie están caracterizados por elevados valores negativos de rotación específica, en tanto que no se observan mayores diferencias entre los valores de las otras constantes físicas en los diferentes estados de crecimiento de las plantas. La rotación óptica, en todos los aceites mantiene un valor altamente negativo y casi constante respecto del estado de crecimiento de las plantas, entre  $-40^\circ$  y  $-60^\circ$ , lo cual indica a primera vista la presencia dominante de componentes ópticamente activos en su forma *levo*. Simultáneamente, de estos resultados se puede esperar que la composición química de los aceites esenciales esté mayormente representada por sesquiterpenos (con altos valores de rotación óptica negativa) que además abundan en las Verbenáceas. El hidrocarburo monoterpénico más característico de estos aceites, **Sabineno**, predomina en la forma del enantiómero *dextro* en forma casi constante en todas las esencias (**Tabla 7**), de acuerdo a lo observado a partir de la determinación de la distribución enantiomérica de los enantiómeros presentes. Por lo cual, la contribución de este enantiómero particular a la rotación óptica total de la esencia, debería moderar el valor altamente negativo de la rotación óptica de los sesquiterpenos. Sin embargo, la proporción total en la que Sabineno se encuentra en la esencia no supera el 3% por lo que ésta continúa teniendo una rotación óptica altamente negativa, además afectada directamente por la presencia de contenidos elevados de sesquiterpenos, como es el caso del Germacreno D (entre otros) con un exceso enantiomérico de alrededor del 99 % para la forma *levo*. (**Tabla 7**)

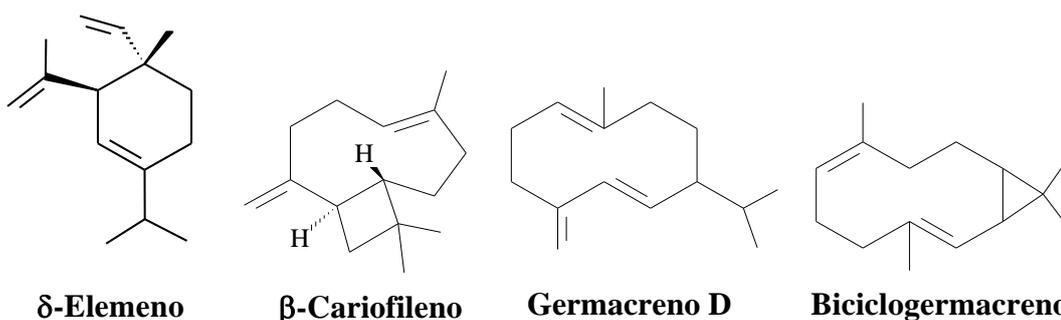
A su vez, la presencia de sesquiterpenos (**Tabla 6**) se puede correlacionar con los altos valores de densidad e índice de refracción de los aceites, que también mantienen una relación casi constante en todas las esencias y que, por otra parte, son valores característicos de estos constituyentes. Relacionando estas tendencias con la composición química de los aceites esenciales en función de los diferentes estados vegetativos de las plantas, en la **Figura 6** se puede apreciar la predominancia de las fracciones sesquiterpénicas en todas las etapas de crecimiento de las matrices vegetales, para los dos orígenes considerados, mientras que las fracciones de hidrocarburos monoterpénicos, así como los mono y sesquiterpenos oxigenados se observan notablemente disminuidas. En la **Figura 7**, sin embargo, se puede distinguir que los monoterpénicos oxigenados se mantienen prácticamente constantes en las esencias de Río Empedrado, viéndose disminuidos en las de San Lorenzo; mientras que, los sesquiterpenos oxigenados, que son los constituyentes secundarios de los aceites, alcanzan sus contenidos más importantes en las esencias de verano para ambas procedencias. Pareciera ser una característica de la especie la escasez de monoterpénicos oxigenados, puesto que para ambas procedencias no se observan proporciones considerables de estos componentes, coincidiendo este dato, además, con lo encontrado en bibliografía. (De Oliveira *et al.*, 2005)

Por otra parte, entre los hidrocarburos sesquiterpénicos más abundantes de los aceites esenciales de esta especie, se destacan  **$\delta$ -Elemeno** (4,6 a 8,4 %),  **$\beta$ -Cariofileno** (16,3 a 18,1 %), **Germacreno D** (16,0 a 27,1 %) y **Biciclogermacreno** (17,6 a 29,3 %) (**CG 10 – CG 12**) entre otros. Analizando la composición química de la esencia de aguas (**CG 13**), se puede apreciar que está principalmente caracterizada por la presencia de los hidrocarburos sesquiterpénicos mayoritarios, viéndose notablemente disminuidas las proporciones de los demás constituyentes por lo que se podría concluir que la esencia de aguas no presenta componentes diferentes a los de la esencia directa sino simplemente diferencias cuantitativas. Por otra parte, y de acuerdo a lo informado por Ourisson *et al.*

(Ourisson *et al.*, 1966) y Guenther (Guenther, 1960), es probable que habitualmente los sesquiterpenos que aparecen en la naturaleza sean aquellos enantiómeros con altos valores negativos de rotación óptica específica, por lo cual se ha supuesto que estos sesquiterpenos son los que contribuyen a la rotación óptica total del aceite esencial.

Esta afirmación se ve reforzada por los resultados obtenidos por otros autores que, investigando por cromatografía de gases enantioselectiva un número importante de aceites esenciales provenientes de plantas medicinales y aromáticas de diferente origen, demostraron que si bien la presencia de ambos enantiómeros de un determinado compuesto es una situación frecuente para los monoterpenos, no ocurre lo mismo para los compuestos sesquiterpénicos, (König, 1998). Los que presentan una composición enantiomérica característica para cada planta considerada. Esta afirmación se confirmó en este trabajo por la distribución enantiomérica obtenida para los diferentes mono y sesquiterpenos seleccionados, en particular para el Germacreno D, que se encuentra prácticamente como su enantiómero *levo* puro.

Este comportamiento ha demostrado que puede ser utilizado con un objetivo quimotaxonomico así como para la detección de adulteraciones. (Lorenzo *et al.*, 2002)



En la **Tabla 6**, en la que se listan los constituyentes principales de los aceites esenciales de *A. virgata* var. *platyphylla*, no aparecen diferencias cualitativas significativas entre ellos sino simplemente pequeñas diferencias cuantitativas en los constituyentes principales, tanto en diferentes estados de crecimiento como de distinta procedencia del material vegetal. Las referencias bibliográficas solamente citan los constituyentes de los extractos de las hojas de esta especie (De Oliveira *et al.*, 2005) de los que se separaron componentes del tipo de los feniletanoides y de los glucósidos de iridoides, sin haberse encontrado ningún tipo de información referente a la composición del aceite esencial.

Analizando la composición en sesquiterpenos de los aceites esenciales estudiados, se ha observado que el contenido de β-Cariofileno se mantiene prácticamente constante durante todos los estados de crecimiento de la planta, pues siempre se mantiene en valores aproximados al 10 y 20% de la esencia (**Tabla 6**); en cambio, **Germacreno D (EM 8)**, experimenta pequeñas variaciones cuantitativas que implican una disminución de su contenido a medida que la especie entra en su estado de mayor desarrollo (esto es, el verano); a este componente se asocian los contenidos de sus isómeros: **Germacreno A** y **Germacreno B** que, si bien en proporciones mucho menores que las de Germacreno D, se mantienen alrededor del 1% de la esencia. El **Bicyclgermacreno** es otro de los sesquiterpenos de importancia de la especie, experimentando variaciones menores que

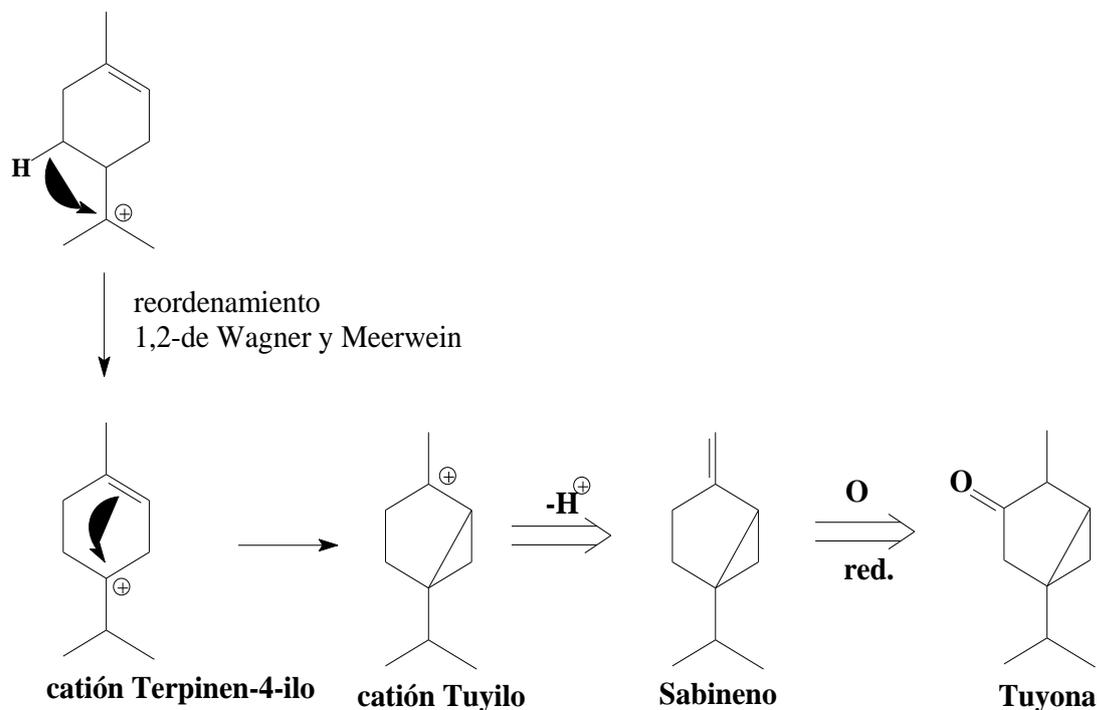
provocan que en la primavera alcance su máximo valor, en el caso de las especies de Río Empedrado, y en otoño en las de San Lorenzo. Dado que las especies de primavera presentan la mayor proporción de hidrocarburos sesquiterpénicos (**IR 4**), en cambio en verano este contenido se ve disminuido, aumentando la proporción de sesquiterpenos oxigenados, se ha supuesto la transformación de los primeros en los segundos como resultado de los diferentes estados metabólicos de la especie. Es de hacer notar que, a diferencia de las otras especies de la familia (*Aloysia gratissima*, *Lippia alba*; *Aloysia citriodora* y *Aloysia polystachia*, no incluidas en este trabajo), con notables contenidos en monoterpenos y monoterpenos oxigenados, *A. virgata* var. *platyphylla* carece prácticamente de estos compuestos, estando representados los monoterpenos, principalmente por **Sabineno**, en una proporción variable entre el 1,8 y el 2,4 % del aceite esencial. La ausencia de monoterpenos y monoterpenos oxigenados se ha asociado con las propiedades organolépticas de los aceites analizados, que presentan un aroma especiado, bastante áspero y distintivo de los sesquiterpenos, a diferencia de los aromas cítricos o frescos y mentolados de *Lippia alba*, que está caracterizada por Citral o 1,8-Cineol respectivamente. Es interesante, y a la vez importante, destacar que la bibliografía no hace referencias a la composición química del aceite esencial de *A. virgata* var. *platyphylla*, habiéndose encontrado solamente una referencia de la composición del aceite esencial de *A. virgata* proveniente de Cuba y publicado contemporáneamente a este trabajo, en la cual expresa la composición del aceite esencial de *A. virgata* sin especificar la variedad de la especie, y que está constituida por **Germacreno D** (15,6%),  **$\beta$ -Cariofileno** (15,4%), **Biciclogermacreno** (13,8%) y  **$\alpha$ -humuleno** (11,7%), (Pino *et al.*, 1996). Como se puede apreciar, comparando estos datos con los de las esencias de Corrientes, si bien la composición química pareciera ser similar hay notables diferencias cuantitativas.

Los datos presentados en la **Tabla 6**, están basados en muestras simples de cada sitio de colección y solamente se han comparado con aceites esenciales de una sola procedencia diferente (San Lorenzo, Corrientes), y en dos estados vegetativos esta última (otoño y verano) debido a que se comprobó que no hay diferencias cualitativas significativas entre los mismos. Manifestándose solamente algunas variaciones menores en la proporción de los constituyentes principales, debidas a la influencia de las condiciones ambientales locales y de los períodos estacionales al momento de la colección. Esto resulta interesante desde el punto de vista comparativo con la especie *A. gratissima*, de la cual para las mismas procedencias se verificó una notable diferencia en la composición química de los aceites esenciales. Lo que permitiría suponer que en el caso de la variabilidad fitoquímica comprobada para esta última especie, el origen de la misma se deba a un aspecto más bien genético que fenológico, considerando el parentesco botánico de ambas especies y el mismo tipo de suelo en el cual fueron recolectadas.

Como un indicador sustancial de genuinidad se ha introducido la evaluación de la quiralidad de los constituyentes de los aceites esenciales (**CG 10**), presuponiendo alta estereoespecificidad durante la biosíntesis de los precursores y la liberación enzimáticamente inducida de los volátiles quirales. Por lo tanto, a fin de caracterizar el aceite esencial de *A. virgata* que crece en la región del Nordeste Argentino, se ha verificado la distribución enantiomérica de **Sabineno** y de **Germacreno D** (**Tabla 7**) que son el monoterpeno y sesquiterpeno más característicos de su aceite esencial.

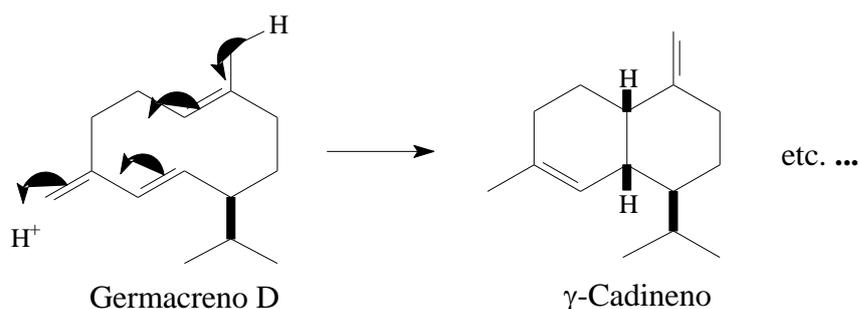
Como es sabido, el catión Terpinen-4-ilo origina el catión Tuyilo y por deshidrogenación de éste se forma Sabineno. Si posteriormente se produce la oxigenación de este compuesto se llega a Tuyona; sin embargo, si el sistema enzimático de la planta no al-

canza a desarrollar este último paso, se observará una proporción notable de Sabineno en lugar de Tuyona, que pareciera ser lo que ocurre en el caso de *A. virgata* en el que los aceites esenciales están constituidos por proporciones variables entre el 0,4 y 2,4% de este componente, sin notarse cantidades detectables de la cetona correspondiente.



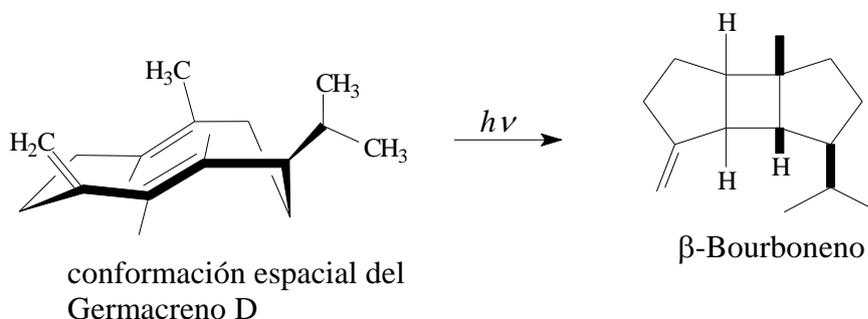
(Dewick, 2002)

En el estudio realizado a estas esencias, las condiciones experimentales usadas evitaron la parcial o total racemización de los compuestos sensibles, que pudieran haberse producido durante el proceso de extracción y análisis. El elevado contenido en Germacreno D y Bicyclogermacreno encontrados en los aceites es prueba de este procedimiento, dado que es conocida la alta labilidad de ambos sesquiterpenos (Toyota *et al.*, 1996; Schmaus *et al.*, 1985). Ya en 1969, Kazuo Yoshihara *et al.*, comprobaron a través de Germacreno D aislado de la especie *Pseudotsuga japonica* que, al hacerlo pasar por sílica-gel, se isomeriza completamente dando una mezcla de hidrocarburos sesquiterpénicos como (+)- $\gamma$ -Muuroleno, (-)- $\alpha$ -Amorfeno,  $\alpha$ -Muuroleno, (+)- $\delta$ -Cadineno y (+)- $\gamma$ -Cadineno. Estos sesquiterpenos son compañeros habituales del Germacreno D en los aceites esenciales de la mayoría de las especies, como es el caso de los constituyentes de las esencias estudiadas. De acuerdo a lo postulado por Kazuo Yoshihara *et al.* (Kazuo Yoshihara *et al.*, 1969), el camino de biosíntesis que siguen los derivados de Cadineno se corresponde con un proceso de ciclación e isomerización, como se indica con las siguientes estructuras:



Por lo tanto, la presencia en cantidades apreciables de isómeros de Cadineno, Muuroleno y Amorfeno en los aceites esenciales puede ser un indicador de que la esencia no ha sido bien almacenada o procesada. Sin embargo, como se ve en la **Tabla 6**, los aceites esenciales de *A. virgata* var. *platyphylla* contienen entre el 15 y el 30% de **Germacrene D**, con proporciones que van desde 0,1 a 2% solamente de  $\alpha$ - y  $\delta$ -Cadineno y  $\alpha$ - y  $\gamma$ -Muuroleno; por consiguiente se puede decir que las esencias examinadas han sido bien procesadas y conservadas.

Por otra parte, como la estructura conformacional preferida por el Germacrene D pareciera ser aquella en la que los dos dobles enlaces se encuentran enfrentados cara a cara, es posible que en la matriz vegetal ocurra una fotoisomerización catalizada por la radiación UV, (Kazuo Yoshihara *et al.*, 1969), en la cual se convierte el Germacrene D en Bourboneno, razón por la cual es frecuente encontrar en la mayoría de los aceites esenciales con altos contenidos en Germacrene D, la presencia de derivados de la familia del Bourboneno en proporciones menores:



En resumen, es muy probable que si se encuentra **Germacrene D** en un aceite esencial se encuentren también  $\gamma$ -Cadineno,  $\gamma$ -Muuroleno y  $\gamma$ -Amorfenol, además de  $\alpha$ - y  $\beta$ -Bourboneno, pero como productos secundarios de transformaciones y no ya como productos del camino biosintético en la matriz vegetal. Por lo tanto, se podría decir que la especie *A. virgata* var. *platyphylla* está caracterizada químicamente por los sesquiterpenos  $\delta$ -Elemeno, **Germacrene D** y **Biciclogermacrene**.

### -*Lippia alba*

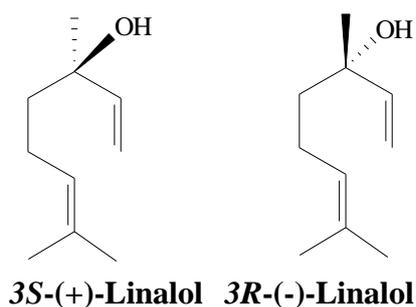
De acuerdo a los rendimientos en esencia indicados en la **Tabla 8**, para los aceites esenciales de esta especie se observan variaciones entre el 0,3 y el 2,1% coincidiendo los mayores valores con las especies colectadas en Corrientes, a la orilla de caminos arenosos en áreas completamente abiertas, libres de malezas, con buena luz solar y cercanas a cursos de agua.

En la **Figura 8**, donde se puede comparar la composición química de los aceites esenciales de las tres procedencias en sus respectivos estados de crecimiento (correspondientes a la **Tabla 9**), se observa que los mismos están perfectamente diferenciados por la predominancia de alguna de las fracciones de componentes químicos habituales en aceites de Verbenáceas. Si bien todas las esencias estudiadas se caracterizan por presentar una fracción monoterpénica oxigenada en proporciones considerables, en las esencias de Sáenz Peña (Chaco) se observa como rasgo distintivo la presencia de hidrocarburos sesquiterpénicos en mayor proporción que en las esencias de Corrientes, mientras que estas últimas están caracterizadas por la fracción de hidrocarburos monoterpénicos, en segundo término. Complementariamente, las esencias de Sáenz Peña, son más ricas en sesquiterpenos oxigenados que las esencias de Corrientes que prácticamente carecen de ellos. Por otra parte, y de acuerdo a la **Figura 9**, a primera vista se podría establecer que *Lippia alba* está caracterizada por dos variedades químicas diferentes, dado que la especie cosechada en Sáenz Peña muestra una predominancia considerable de **Neral** y **Geranial** en la fracción monoterpénica oxigenada. Sin embargo, es notable que en la esencia colectada en verano, se hace importante el contenido en Linalol, el cual experimentó un aumento considerable, a expensas de una marcada disminución del contenido en Citral (Neral y Geranial), posiblemente relacionado a la genética de la especie, aunque este aspecto no se ha podido elucidar dado que no se repitió esta variación en cosechas posteriores. Por otro lado, las esencias colectadas de plantas de El Perichón (Corrientes) coinciden en su composición con la esencia de Santa Ana (Corrientes), manifestándose la predominancia de **Mircenona** en lugar del Citral de las esencias de Sáenz Peña.

En cuanto a la tendencia que siguen los componentes principales en las esencias completas, se puede observar que tanto el Neral como el Geranial en las esencias de Sáenz Peña, experimentan una disminución hacia la llegada del verano. Por el contrario, en las esencias de El Perichón no se observa la presencia de estos componentes, estando la esencia de verano enriquecida en el contenido de Mircenona. A su vez los porcentajes de  $\beta$ -Ocimeno de estas últimas esencias experimentan una tendencia inversa a la del contenido en Mircenona, alcanzando el mayor valor en la esencia de primavera. Coincidentemente con la presencia de Mircenona, las esencias de El Perichón y de Santa Ana contienen altas proporciones de  $\beta$ -Mirceno, el cual varía de acuerdo a la etapa de desarrollo de la planta (mayores valores cuando el contenido en Mircenona es menor).

En estas esencias también los valores de las constantes físicas son indicadores de componentes más pesados como los sesquiterpenos, o bien de compuestos oxigenados que generalmente elevan el valor de densidad a valores próximos a 0,90 g/ml en tanto que mantienen los valores de índice de refracción alrededor de 1,50 (**Tabla 8**). Nuevamente, se ha observado que la rotación óptica de las esencias completas está caracterizada por cifras altamente negativas que hacen suponer la presencia de componentes en la forma de su enantiómero *levo*. La esencia **LaSP III** es la que menor valor negativo

presentó para esta propiedad por lo cual se supuso que, a diferencia de las otras esencias, alguno de los componentes que aparecen en mayor proporción debería encontrarse en la forma *dextro*, de tal modo que su contribución a la rotación óptica total de la esencia completa fuera tal que disminuyera su valor de  $-21^\circ$ ,  $-27^\circ$  a  $-06^\circ$ . Esta presunción se corroboró, como se observa en la **Tabla 10**, determinando las distribuciones enantioméricas de los componentes principales ópticamente activos (**CG 22**), de las cuales resultó evidente que el enantiómero mayoritario del **Linalol** es el isómero *dextro* (**3S-(+)-Linalol**), que al encontrarse en proporciones superiores al 10% del total de la esencia (**Tabla 9**), permitiría explicar la diferente magnitud de esta propiedad en relación a las otras esencias (**LaSP II** y **LaSP IV**). Este hecho concuerda con lo encontrado por Siani *et al.*, (Siani *et al.*, 2002), en *Lippia alba* de diversas localidades del sudeste de Brasil, en las que aparecen ejemplares con 46,5 a 90,7 % de **3S-(+)-Linalol**, y también puede compararse con los resultados obtenidos por Lorenzo *et al.*, (Lorenzo *et al.*, 2001), en especies silvestres de Uruguay que también contienen en su aceite esencial un 55,3 % de Linalol, representando el 99,6% de **3S-(+)-Linalol**. Por esto, resulta completamente factible suponer que el metabolismo de esta especie se encuentra genéticamente condicionado para biosintetizar el enantiómero *dextro*, en forma similar a lo que ocurre en el aceite esencial de coriandro o de petit grain. Lo que la diferencia de otras especies (como las lavandas, por ejemplo) ricas en Linalol, pero que biosintetizan preferentemente el enantiómero *levo* del compuesto.



Por otro lado, se sabe que cada enantiómero individualmente puede producir diferentes respuestas biológicas, en particular en lo que se refiere a los receptores olfativos en la nariz. (Dewick, 2002)

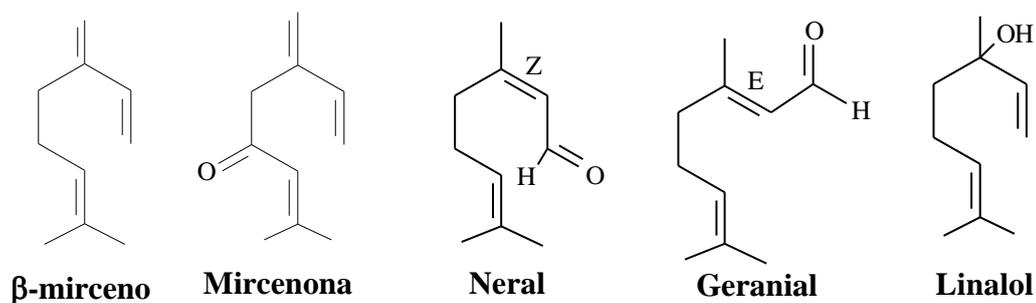
Observando los resultados presentados en la **Tabla 9**, se ve que simultáneamente aparecen (*Z*)- y (*E*)-Dihidrocarvona en el aceite esencial **LaSP III (CG 15)**, además de contener también pequeñas proporciones de Limoneno. Esta composición podría explicarse considerando que biosintéticamente la (-)-Carvona se origina a partir del (-)-Limoneno, formado a su vez a partir del catión  $\alpha$ -Terpinilo, precursor originado a partir del pirofosfato de Linalilo, por lo que la presencia de Linalol en la esencia puede ser explicada además, considerando los componentes que se forman simultáneamente durante esta ruta biosintética. Sin embargo, comparando con la esencia de otoño (**CG 14**), no se observa la presencia de este componente, encontrándose en cambio aumentada la proporción de Citral. Un fenómeno que, si bien excede el alcance de este trabajo, deberá ser estudiado en mayor detalle en el futuro en base a la experiencia y resultados adquiridos en el desarrollo de esta tesis, dado que la evaluación del aceite esencial proveniente de plantas hijas de tercera generación de la planta madre **LaSP III**, dio un contenido en Linalol visiblemente disminuido respecto del de la esencia original (**CG 16**), incremen-

tándose en cambio, el contenido en Citral (44,9% contra 21,7%); del resto, el perfil cromatográfico resultó muy similar al de las esencias de primavera y otoño. Por otra parte, la cromatografía de la esencia de aguas de la especie hija (**CG 17**), dio un contenido en Linalol ligeramente mayor que el de la esencia directa (0,5% contra 0,2%) pero igualmente disminuido respecto del contenido en Linalol de la especie original. A la vez, se observa un enriquecimiento de la esencia de aguas respecto del contenido en Citral (65,3% contra 44,9%) en relación a la esencia directa, estando notablemente disminuidos los demás constituyentes de la esencia. Esto pone de manifiesto que la esencia de aguas de la especie no tiene una composición química diferente sino simplemente se manifiestan pequeñas modificaciones cuantitativas, como sería de esperar considerando la mayor solubilidad en agua de los componentes oxigenados. Por lo tanto, sería de suponer que las infusiones preparadas con este quimiotipo se vean principalmente constituidas por Citral.

Asimismo, comparando las rotaciones ópticas de las esencias analizadas, expresadas en la **Tabla 8**, el hecho de que la mayoría de las rotaciones presenten valores altamente negativos, llevaría a pensar en que las esencias deberían estar constituidas por componentes principales de altos valores ópticos negativos. Sin embargo, como resultado de la identificación de la distribución enantiomérica de Linalol y Germacreno D en la esencia de **LaSP III**, se concluye que la misma debería presentar un valor de rotación óptica total menos negativo dado que, a diferencia de lo observado en otras esencias, como la de *Aloysia gratissima* de Río Empedrado de primavera (**AgRE V**) con alta proporción de Linalol *levo*, esta esencia presenta mayor proporción de Linalol *dextro*, como se observa en la **Tabla 10**. Sin perder de vista la aditividad de la rotación óptica de la esencia, la presencia de un enantiómero en mucha mayor proporción produciría un aumento de la rotación óptica total, por lo cual sería explicable que de las tres esencias de *L. alba* de Sáenz Peña, la de verano presente una rotación óptica diferente.

En las demás esencias registradas en la **Tabla 8**, el elevado valor negativo de la actividad óptica indica la presencia de algún isómero *levo* en alta concentración, lo cual, en el caso de las muestras de Perichón y Santa Ana, podría corresponderse con el alto contenido en sesquiterpenos.

De la composición química mostrada en la **Tabla 9**, se observa que no hay tanta similitud entre los componentes principales de los aceites esenciales de diferente procedencia (**Figura 9**), dado que a primera vista se aprecia la presencia de **Mircenona** y **sesquiterpenos** en las esencias de Perichón y Santa Ana y en cambio, de **Citral (Neral y Geranial)** y **sesquiterpenos** en las esencias de Sáenz Peña:



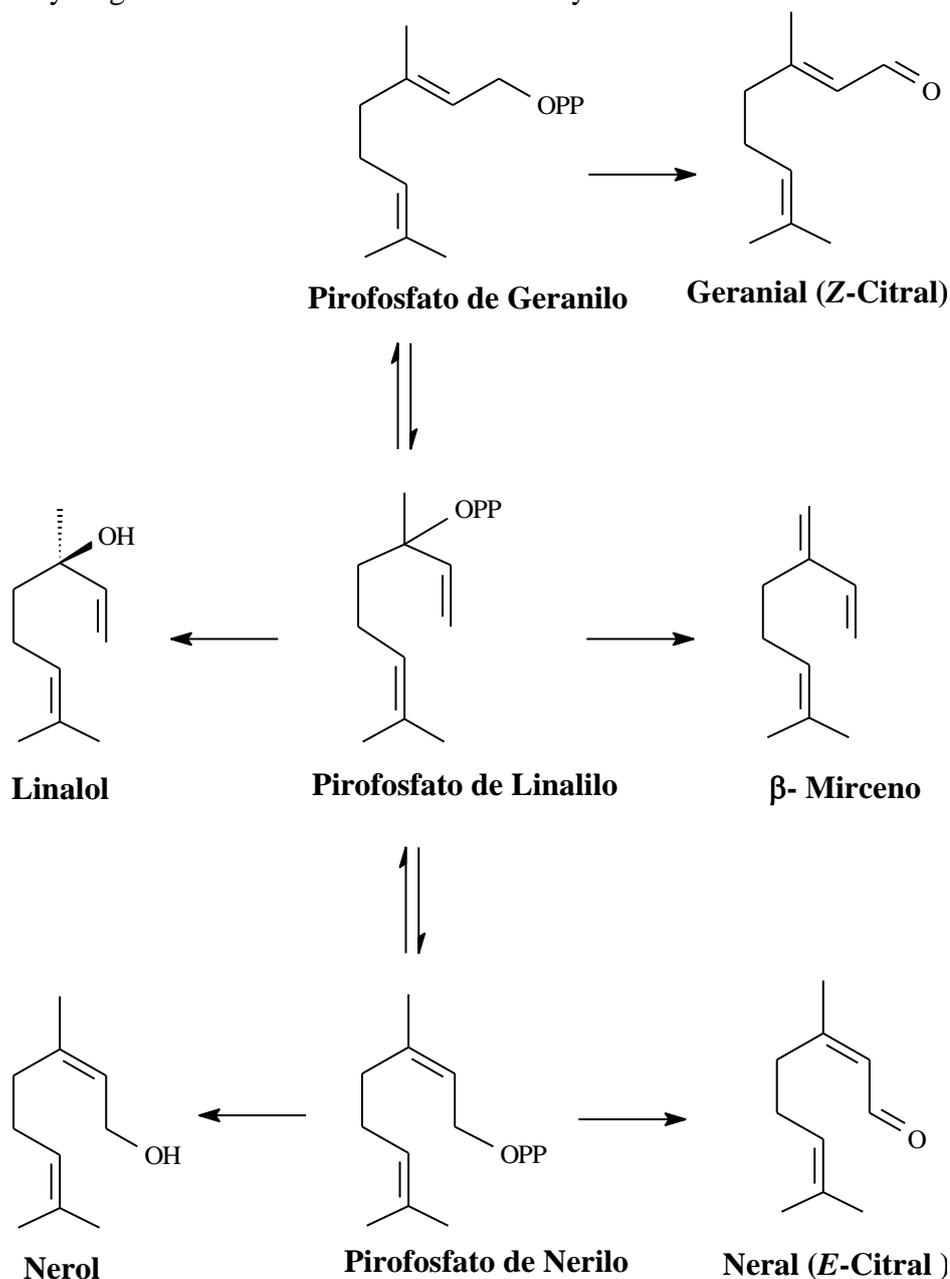
En la esencia **LaSP I** se observó que el pico correspondiente al **Linalol (CG 14)** aparece notoriamente disminuido en relación a los picos de **Neral** y **Geranial**, estando estos últimos aumentados considerablemente en relación a los picos equivalentes en el cromatograma correspondiente a la esencia **LaSP III** (ver **CG 15**). La identidad del Linalol en esta esencia fue comprobada por comparación del EM del pico en cuestión (**EM 10**), con el EM del Linalol en la biblioteca de espectros. También mediante el espectro IR se pudo detectar la presencia de un alcohol, por la identificación de la banda correspondiente al OH, en 2,86  $\mu\text{m}$  (**IR 5**) que además, por comparación directa de espectros con el espectro IR de Linalol patrón (**IR 6**) se identificaron la mayoría de las bandas de este componente en la esencia en cuestión, en tanto que si se compara con el espectro IR de la esencia de otoño (**IR 7**), la banda de OH aparece disminuida en intensidad por lo cual se podría suponer que la presencia de este grupo (OH terciario) es escasa, además de no observarse mayor similitud entre los espectros (**IR 6** e **IR 7**).

Por otra parte, cuando se realizó la verificación de la presencia mayoritaria de Linalol en *Lippia alba* de Sáenz Peña, se analizó el aceite esencial directo proveniente de una muestra de verano de ejemplares hijos de la planta original. Sin embargo, se pudo comprobar que la composición de esta esencia no se diferenciaba mayormente de la composición de las esencias de otoño y primavera, por comparación de los cromatogramas (**CG 14** y **CG 16**). En el cromatograma de la esencia directa de la planta hija (**CG 16**), se observa un enriquecimiento en la proporción de Citral (17,2% de Neral y 27,7% de Geranial) con 0,2% de Linalol. Mientras que si se comparan los cromatogramas de la esencia directa (**CG 16**) con el de la esencia de aguas (**CG 17**), la única diferencia visible es simplemente el hecho de aparecer enriquecida la fracción monoterpénica oxigenada (constituida principalmente por Citral) viéndose el contenido en Linalol aumentado en una proporción muy pequeña, por lo que no se ha podido verificar que el quimiotipo Linalol y el quimiotipo Citral pudiesen ser el mismo quimiotipo que experimenta una interconversión bajo la influencia del estado de crecimiento de la planta.

Complementariamente, al realizar el trasplante de la especie silvestre a un suelo diferente en condiciones más resguardadas que las ambientales de su origen, se pudo observar que la composición química de los aceites esenciales extraídos de las especies transplantadas no experimentó modificaciones cualitativas con respecto a la composición química del aceite esencial de la planta madre, identificado como aceite **LaSP IV**. (**Tabla 9, Figura 8**)

Por otro lado, analizando la posible influencia del estado de crecimiento de las plantas sobre la composición química del aceite esencial, se puede afirmar que éste simplemente se manifiesta a través de una modificación cuantitativa de las proporciones de cada componente, sin observarse cambios en el perfil de composición de cada aceite para una misma procedencia. Este comportamiento estaría de acuerdo con lo observado por Castro *et al.*, (Castro *et al.*, 2002), quienes informaron, a través de un estudio de biomasa, la relación que guardan los rendimientos de los aceites esenciales en plantas de Brasil en diferentes estados de crecimiento. Como conclusión de ese estudio surgió que los rendimientos porcentuales resultaron mayores en verano que en otoño, sin que se vea afectada la calidad de la composición química de los aceites. Complementariamente, estos autores reportan que los componentes principales de estos aceites esenciales, al igual que las esencias de *L. alba* de Sáenz Peña, son **Neral** y **Geranial**, sin observarse cambios notables en el contenido de los mismos en las diferentes épocas de cosecha y sin indicar tampoco la presencia de **Linalol** en ninguna de las estaciones del año. Es

decir que, aplicando el mismo razonamiento, se podría confirmar esta relación entre rendimientos en esencia y estado de crecimiento, en las especies de Sáenz Peña, además de corroborarse que ambas especies en cuestión guardan un perfil similar de composición química con presencia de **Citral**. Un rasgo notable respecto de la composición química de las esencias de Sáenz Peña, lo constituye la presencia de **Linalol** en cantidades mayores en los aceites colectados en verano. De acuerdo a la información disponible, y la generada, sobre esta especie, podría correlacionarse esta situación con la plasticidad confirmada de la especie. Lo que determinaría que las condiciones ambientales presentes al momento de la cosecha de los ejemplares, hayan inducido el metabolismo de este componente conjuntamente con cantidades menores de Citral, dado que, de acuerdo con el camino de biosíntesis de ambos compuestos, se generan a partir del pirofosfato de Linalilo que puede isomerizar al pirofosfato de Geranilo y pirofosfato de Nerilo y originar Linalol en un caso o Geranial y Neral en otro:



(Dewick; 2002)

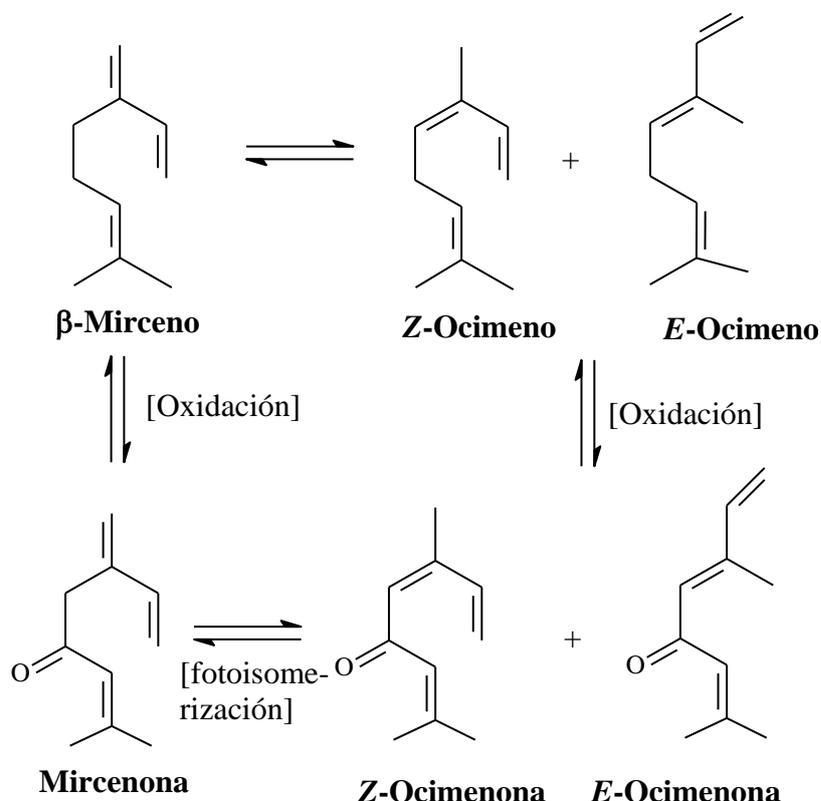
Por otra parte, este comportamiento puede correlacionarse con los quimiotipos Citral encontrados en Brasil, ya que en estos casos siempre que aparece este componente también se ha detectado Linalol en proporciones muy pequeñas. Dada la plasticidad asociada a esta especie no debería descartarse una transformación metabólica entre los quimiotipos en poblaciones geográficamente cercanas. Una situación sobre la que debería avanzarse en el futuro sobre la base de los resultados de este trabajo.

Por otro lado, comparando las composiciones químicas de las esencias separadas de ejemplares colectados en El Perichón y Santa Ana (Corrientes) (**CG 18**, **CG 20**), se observan perfiles cromatográficos diferentes a los de las esencias de Sáenz Peña (Chaco). Contrariamente, respecto de las cantidades relativas de los componentes agrupados en las esencias de Corrientes se observó un perfil similar entre sí (**Figura 8**), destacándose, en todos los aceites estudiados, una tendencia semejante en cuanto a la presencia de monoterpenos oxigenados (estando a su vez constituidos principalmente por **Mircenona (EM 11)**), hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpénicos y sesquiterpenos oxigenados. Por otra parte, en las esencias de las dos poblaciones correntinas analizadas, el contenido en Mircenona no resultó estable (**Figura 9**), manifestando variaciones de acuerdo al estado vegetativo de la matriz vegetal. El mayor valor se consiguió en el verano (47,1%), durante la finalización del proceso de floración y cuando el material tiene una considerable cantidad de frutos, mientras que el menor valor se encontró en la primavera (34,2%) coincidiendo con la ausencia de flores o frutos (**Tabla 9**). A su vez, este componente tiene un comportamiento en su contenido que resulta ser inversamente proporcional al del  **$\beta$ -Mirceno**, el cual alcanzó un máximo valor de 25,2% cuando el contenido en Mircenona era el menor (**Tabla 9**). Sin embargo, lo que sí resultó sumamente notable e importante de destacar es que, de acuerdo al cromatograma de la esencia de aguas (**CG 19**), ésta estaría formada principalmente por Mircenona y Ocimenona, lo cual es posible dada la mayor solubilidad en agua de los componentes oxigenados. Pero además, esta esencia no presenta componentes diferentes respecto de la esencia directa sino que principalmente se observan modificaciones cuantitativas más que cualitativas con lo cual la calidad de la infusión dependerá sencillamente del quimiotipo utilizado para realizarla.

La esencia proveniente de Santa Ana, localidad correntina vecina a escasos km de El Perichón, dio un perfil cromatográfico (**CG 20**) muy similar al de la esencia de El Perichón, con un contenido en Mircenona muy elevado. Además, la esencia de aguas correspondiente, al igual que aquella de El Perichón, se vio enriquecida en el contenido de este componente sin observarse diferencias cualitativas del aceite, como se observa en el **CG 21** de la esencia de aguas de **LaSA VIII**. En el espectro IR de la esencia directa correspondiente (**IR 8**) se aprecia la presencia de componentes carbonílicos, por la presencia de la banda característica en 5,90  $\mu\text{m}$  por lo que este espectro también permitiría corroborar la presencia de Mircenona y Ocimenona en la esencia directa. En relación a la esencia de aguas, se podría decir que ésta presenta un enriquecimiento de la fracción oxigenada, manifestada por el moderado incremento en la intensidad de la banda en el espectro IR (**IR 9**) correspondiente a los OH (2,85  $\mu\text{m}$ ).

La variación en los contenidos de  **$\beta$ -Mirceno** y **Mircenona** en las esencias directas, podría explicarse suponiendo una posible modificación en el camino biosintético, prueba de lo cual es el hecho de que, además de  **$\beta$ -Mirceno** y **Mircenona**, también se encontraron como constituyentes secundarios (**Z**)-**Ocimenona** (9,2 - 11,3%) y (**E**)-**Ocimenona** (3,2 - 6,0%), isómeros estructurales de los dos compuestos mencionados

primeramente. De acuerdo a lo expuesto por Andersson, (Andersson, 2002), el  **$\beta$ -Mirceno** puede oxidarse al epóxido correspondiente (6,7-epoximirceno) por acción de la temperatura y de la luz durante el almacenamiento de la esencia, por lo que no sería sorprendente que por la similitud estructural de los componentes antes mencionados y suponiendo una reacción enzimática o bien por el efecto de la radiación UV, ocurra la isomerización de  **$\beta$ -Mirceno** a **Ocimeno**, con lo cual estando presente  **$\beta$ -Mirceno** deberían estar presentes simultáneamente (*E*)- y (*Z*)-**Ocimeno**. Por otra parte, si estos compuestos experimentan una oxidación enzimática (más enérgica que la acción del tiempo, la temperatura y la luz), de la misma manera que el  **$\beta$ -Mirceno**, podría esperarse que se forme **Mircenona** a partir de  **$\beta$ -Mirceno** y simultáneamente los dos isómeros de **Ocimenona** a partir de los dos isómeros de Ocimeno, como se resume en el siguiente esquema:



A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, podría afirmarse que el quimiotipo **Mircenona** en *Lippia alba*, encontrado inicialmente en la localidad de El Perichón (Corrientes), no es un caso aislado de la especie, puesto que se comprobó la existencia simultánea de este quimiotipo en la localidad de Santa Ana, al determinar Mircenona en la esencia del material proveniente de ese origen. Si bien las localidades de Santa Ana y El Perichón son localidades vecinas, están separadas por varios kilómetros una de otra y en suelos con algunas características diferentes, sobre todo en lo referente a la humedad.

Sin embargo, todo esto permitiría confirmar que se trata efectivamente de un quimiotipo nuevo para la Argentina.

Por otra parte, como dato complementario, es de hacer notar que el quimiotipo Mircenona ha sido detectado simultáneamente en Guatemala, (Fischer *et al.*, 2004), y en un

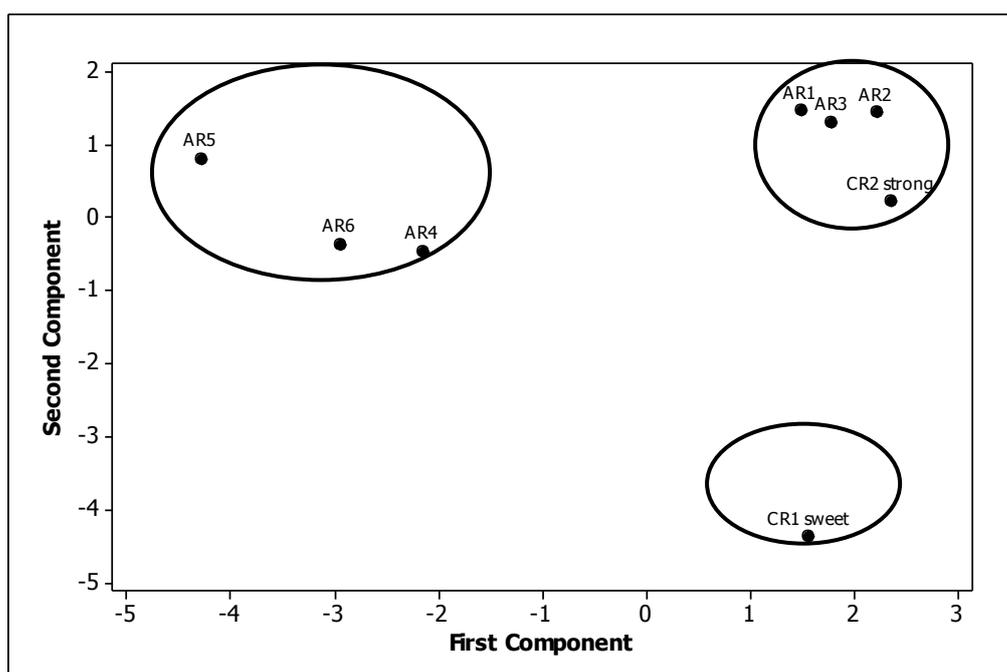
cultivo de ejemplares en Costa Rica, (Ricciardi, G. *et al.*, 2006; Ciccío *et al.*, 2004), identificados en esas regiones como *L. alba* tipo “fuerte”. Lo que refuerza la hipótesis de la existencia de un quimiotipo nuevo, dejando de lado la posibilidad de que se trate simplemente de una variedad local.

Conjuntamente a los constituyentes principales aparecen los componentes secundarios, de los cuales del Componente Desconocido que aparece en estas esencias de Corrientes y que figura en la **Tabla 9**, por su patrón de fragmentación en EM se piensa que se podría tratar de un compuesto tipo monoterpénico, sin haberse podido comprobar su identidad.

Es evidente el comportamiento diferente entre individuos que son de origen geográfico distinto, puesto que la tendencia observada en los componentes principales del quimiotipo Mircenona no se aprecia en las esencias de *L. alba* de Sáenz Peña (Chaco), en las que no aparecen ni siquiera trazas de **Mircenona** ni de los isómeros de **Ocimenona**, observándose solamente  **$\beta$ -Mirceno** en proporciones mucho menores que las de las esencias de El Perichón y Santa Ana (Corrientes). Este comportamiento ha permitido suponer que el razonamiento planteado acerca de la interrelación entre  $\beta$ -Mirceno, Ocimeno, Mircenona y Ocimenona podría ser posible.

Recurriendo nuevamente al análisis estadístico multivariable en la modalidad de dendrograma, aplicado a los componentes principales de los aceites esenciales estudiados de la especie, en el gráfico resultante (**Figura 12**) se pueden apreciar las distintas relaciones entre los grupos de aceites, de las que se distinguen dos quimiotipos diferentes para las esencias de Argentina. Simultáneamente, comparando estas esencias con aquellas citadas para Costa Rica, (Ricciardi, G. *et al.*, 2006, Ciccío *et al.*, 2004), se observa una relación bastante cercana entre una de éstas (CR strong: quimiotipo “fuerte”) con el mismo quimiotipo Mircenona hallado en Corrientes:

**Figura 12:** Gráfico del agrupamiento de las poblaciones de *Lippia alba* en función de los componentes químicos principales del aceite esencial.



La agrupación de los constituyentes principales lleva a relacionar los aceites esenciales de Sáenz Peña (constituidos principalmente por Citral) por un lado (ejemplares identificados en el gráfico como AR4, AR5 y AR6) y los aceites esenciales de El Perichón por el otro (identificados como AR1, AR2 y AR3). Por otra parte, se pone de manifiesto una diferencia sustancial en la composición de la esencia CR1 sweet (quimiotipo “dulce”) correspondiente al quimiotipo de *L. alba* de Costa Rica, que está caracterizado en su aceite esencial por la presencia de **Carvona**. Esto se debe a que en ninguno de los aceites esenciales de Argentina, estudiados en este trabajo, se han detectado cantidades apreciables de este componente, además de que este quimiotipo no se encuentra citado para la Argentina en ninguna de las referencias bibliográficas analizadas hasta el momento.

Si se observa la muy cercana vinculación entre la composición del aceite esencial de las especies de El Perichón (con Mircenona) con la composición del aceite esencial de la especie “fuerte” de Costa Rica (CR2 strong), se interpreta que se trata del mismo quimiotipo.

De las relaciones establecidas en el gráfico anterior también surge que la esencia identificada como AR5 y correspondiente a *L. alba* de Sáenz Peña de verano (**LaSP III**), es la que más se distingue de los otros aceites de Argentina (y en particular de los de su mismo origen), por el alto contenido en Linalol; pero por otra parte, de la determinación de las relaciones enantioméricas de este componente, se observa la predominancia del enantiómero 3S-(+)-Linalol (**Tabla 10**). Desafortunadamente, este componente apareció como única vez en la esencia mencionada ya que de cosechas realizadas posteriormente sobre ejemplares que resultaron ser hijos de las plantas madres, no se encontró Linalol sino que por el contrario, la esencia estaba formada principalmente por Citral (Neral y Geranial), como las esencias correspondientes a primavera y otoño (**LaSP II** y **LaSP I**) del mismo origen. Sin embargo este caso aislado podría aportar un testimonio más sobre la *plasticidad* de la especie, como ya fuera observado por otros autores en trabajos anteriores. Como es el caso de los cambios fundamentales en el contenido de **Dihidrocarvona** y **Citral-Linalol** de un año a otro, verificados por Fester *et al.*, (Fester *et al.*, 1961b). Más recientemente Ocampo *et al.*, (Ocampo *et al.*, 2005), citaron ejemplos de la variabilidad genética y quimiotipos encontrados en ejemplares de *L. alba*. En este sentido existen también otros trabajos, como los de Januzzi (Januzzi, 2005), que caracterizó más de 40 cultivos de *Lippia alba*, Yuri Yamamoto (Yuri Yamamoto, 2005) que informó sobre la interacción entre el genotipo y el ambiente y Siquiera, (Siquiera, 2005), que ha evaluado las posibilidades de mejorar genéticamente la especie para su explotación basándose en criterios de composición química del aceite esencial.

Por todo lo expuesto anteriormente en referencia a la variabilidad química detectada para la composición de los aceites esenciales y considerando la gran variedad de usos que se le atribuyen a esta especie, es evidente que la composición química de las esencias es una característica determinante al momento de evaluar la utilización de la especie. Ya que basado en los constituyentes presentes en la esencia se puede determinar su calidad, así como también diferenciar sus características organolépticas y sus efectos fisiológicos. (Bandoni, (ed.), 2000)

Por otra parte, la identificación de estos compuestos carbonílicos para las esencias de las poblaciones de Corrientes permite cotejarlas al quimiotipo de *Lippia junelliana*

(Mold.) Tronc. encontrado en la provincia de Córdoba (Argentina), que también contiene una proporción variable entre el 54% y el 76% de **Ocimenona** y un 10% de **Mirceno** (Juliani *et al.*, 2002) e incluso se podría establecer una cierta similitud también con la especie Verbenácea *Lippia javanica*, muy difundida en África del Sur y que se caracteriza por presentar cinco quimiotipos diferentes: tipo Mircenona (con Mircenona entre 36 - 62%); tipo Carvona (con Carvona entre 61 - 73%); tipo Piperitenona (con Piperitenona entre 32 - 48%); un quimiotipo rico en Ipsidienona (42 - 61%) y finalmente un quimiotipo rico en Linalol (con más del 65% de este componente), (Viljoen *et al.*, 2005). Como se observa de estos resultados, pareciera ser una especie muy afín a *Lippia alba*, con razas químicas muy similares entre sí.

A su vez, como se vio en el apartado correspondiente a los Antecedentes de este trabajo, en el ítem **3.3.3** han sido analizadas otras muestras de *Lippia alba*:

a) de un cultivo experimental en La Plata (Buenos Aires) y obtenidas de gajos traídos de Puerto Limón (Costa Rica) conocidos en dicho país como “*variedad dulce*” y que mantenía aproximadamente una calidad comparable con la del aceite original analizado en Costa Rica (**Carvona**: 61,3%, **Limoneno**: 32,9%);

b) otra de un cultivo en Iquitos, Perú (**Carvona**: 47,6%, **Limoneno**: 26,4%, (*E*)-Dihidrocarvona: 4,9%, (*Z*)-Dihidrocarvona: 4,6%);

c) una muestra colectada en Santa Fe (Argentina) ((*E*)-**Dihidrocarvona**: 42,2%, (*Z*)-**Dihidrocarvona**: 34,9 %, **Limoneno**: 10,0%);

d) cultivos en Entre Ríos (Argentina) ((*E*)-**Dihidrocarvona**: 52,1%, (*Z*)-**Dihidrocarvona**: 19,1 %, Limoneno: 6,5%, Piperitona: 4,2%);

e) cultivos en Las Brujas (Uruguay) (**Linalol**: 76,3%, (*Z*)-Dihidrocarvona: 2,5%).

En consecuencia, por las composiciones químicas respectivas de estos materiales de *Lippia alba* se podría establecer una relación más estrecha con los quimiotipos **Carvona**, **Dihidrocarvona**, por lo que pareciera ser ésta la variedad más reconocida y abundante de estas regiones Latinoamericanas. Mientras que este quimiotipo no ha sido identificado en las muestras de Corrientes estudiadas, ni ha sido encontrado en la bibliografía como quimiotipo frecuente en la Argentina.

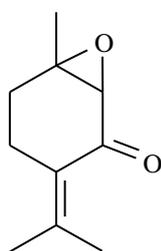
Finalmente, no deja de resultar sorprendente que, simultáneamente al descubrimiento del quimiotipo **Mircenona** en *Lippia alba* en Corrientes (Argentina), se encontrara el mismo quimiotipo en Guatemala, (Fischer *et al.*, 2004), país muy distante de la Argentina y con clima diferente por encontrarse más cercano al Ecuador. Sin embargo, esta coincidencia ha permitido confirmar la existencia de este quimiotipo como tal y no pensar en la presencia de Mircenona como una posible biotransformación en la matriz vegetal o un subproducto de oxidación por mala conservación del aceite esencial. Este hecho avalaría la idea de que la formación de Mircenona ocurre por un proceso enzimático de origen genético, descartándose el efecto fenológico como posible origen de la oxidación-isomerización.

La aparición de este quimiotipo, reportado hasta el momento solamente para Argentina, Guatemala y Costa Rica, debería ser explicada considerando algunas posibles circunstancias:

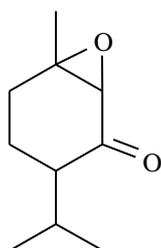
- primeramente que, por un hecho fortuito no se haya encontrado aún este quimiotipo en otros países sudamericanos, pero que seguramente aparecerá con el tiempo;

- en segundo lugar, que exista una justificación ecológica: la región del sur de América es la más rica en biodiversidad de esta especie (7 de 8 quimiotipos se encuentran en Argentina), (Ricciardi, G. *et al.*, 2006), por lo que probablemente constituya el centro de distribución. Por tal motivo es posible suponer que el quimiotipo Mircenona se desarrolle en regiones de condiciones subtropicales (sur de América y América Central) mientras que otros quimiotipos podrían adaptarse más fácilmente en zonas fitogeográficas tropicales.

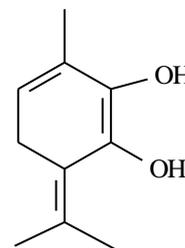
Comparando los resultados obtenidos en este trabajo, con los que obtuviera inicialmente Fester *et al.*, (Fester *et al.*, 1961a), quien estudiara por primera vez en el Nordeste a esta especie, surgió el inconfundible hecho de que en plantas de *Lippia alba* analizadas en este trabajo no apareció ni Lippiona ni Dihidrolippiona ni Lippiafenol, que fueran los componentes que Fester *et al.*, encontraran y aislaran como marcadores filéticos de esta especie en la provincia de Entre Ríos, limítrofe con la provincia de Corrientes y con clima mesopotámico similar al de ésta última:



**Lippiona**



**Dihidrolippiona**



**Lippiafenol**

Este podría ser un argumento más que avale la existencia de los distintos quimiotipos.

Otra observación que puede resultar interesante, es la ausencia del **quimiotipo Carvona** en el Nordeste Argentino ya que en ninguna de las especies estudiadas se observó la presencia mayoritaria de Carvona, componente principal del quimiotipo frecuente en países más cercanos a América Central (Cuba, Perú, Colombia y Brasil) por lo cual se podría asociar este quimiotipo a un ambiente ecológico más de acuerdo con un clima tropical.

De todas maneras, en la **Tabla 9** se observan muchos componentes que no han sido identificados en especies de *Lippia alba* de otras procedencias por lo que una de las causas de tanta diferencia en composición puede deberse a que, aparte de la diferencia de suelos o climas, en muchas publicaciones se hace hincapié en los componentes mayoritarios o que aparecen en proporciones considerables. Sobre todo si las publicaciones son de una cierta antigüedad cuando no se disponía de métodos más precisos para la cuantificación e identificación de constituyentes. Por otra parte, también hay una serie de componentes que no han sido identificados en las especies del Nordeste pero que sí son característicos de otras procedencias, como ocurre en el caso de Carvona o de Biciclosquifelandreno que son componentes principales de quimiotipos específicos de *Lippia alba*, de otros países. En este caso, se podría suponer que la ausencia de estos componentes se debe principalmente a un factor genético y no fenológico.

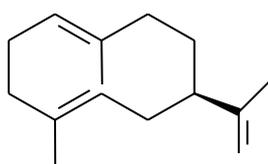
Es decir que estos resultados obtenidos permitirían postular dos quimiotipos nuevos para la región del Nordeste, con lo cual se los podría clasificar en 5 quimiotipos diferentes:

**Tabla 12**

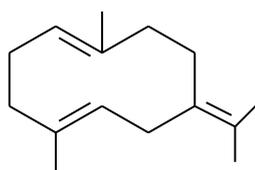
**-Quimiotipos postulados para *Lippia alba* del Nordeste Argentino:**

Componente \ Quimiotipo	1,8-Cineol	$\beta$ -Mirceol	Dihidrocarvona	Carvona	(Z)-Ocimenona	(E)-Ocimenona	Mirceol	Citral	Linalol	Lippiona	Piperitona	Piperitenona
1,8-cineol	35	18		9								
Citral-linalol	-	1-3		-	-	-	-	21-49	40	-		
Dihidrocarvona			42-52					Si	Si			
Lippiona										50	Si	Si
Mirceol	tr	15-25		-	9-11	3-6	34-47	-	tr	-		
Piperitona	14										31	

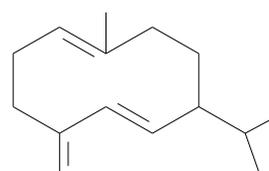
En resumen, de las especies de las tres procedencias diferentes estudiadas en este trabajo, se observaron constituyentes comunes en la composición de los aceites esenciales de las Verbenáceas, como es el caso de **Germacreno A, B y D**. Siendo éste último el más abundante de los Germacrenos en las Verbenáceas estudiadas, además del hecho de que se trata de isómeros de posición, por lo cual es completamente factible que si se encuentra uno de ellos, simultáneamente se deba encontrar a los otros dos, como se puede observar con las estructuras siguientes:



**Germacreno A**

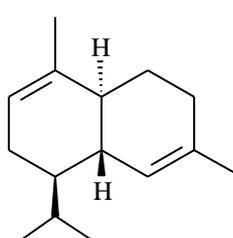


**Germacreno B**

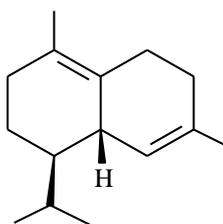


**Germacreno D**

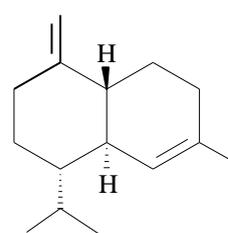
En consecuencia, y como se viera anteriormente para *A. virgata* var. *platyphylla*, también aparecen los componentes de la familia de **Cadineno** que se forman a partir del catión común germacranilo, con lo cual se encuentran  $\alpha$ -,  $\delta$ - y  $\gamma$ - Cadineno:



**$\alpha$ -Cadineno**



**$\delta$ -Cadineno**



**$\gamma$ -Cadineno**

Pero básicamente, la diferencia principal entre estas especies la constituyen los componentes diferenciales y que en muchos casos son los responsables de los caracteres organolépticos de las plantas, hecho ya observado cuando se realizó la prospección y colección de las plantas, circunstancias en las cuales se ha podido percibir el aroma distintivo de los diversos quimiotipos para *Lippia alba* y también en el caso de los quimiotipos de *Aloysia gratissima*.

Finalmente, como componentes comunes de los aceites esenciales de las Verbenáceas aparecen los sesquiterpenos:  **$\beta$ -Cariofileno**, **Germacreno D**, **Biciclogermacreno** y **óxido de Cariofileno**, éste último probablemente un producto de auto oxidación del primero ocurrido como consecuencia del manipuleo de la esencia, (Sköld *et al.*, 2005), así como también aparece en algunas esencias el **6,7-Epoximirceno**, también producto de la oxidación del Mirceno, o los óxidos de Limoneno y de  $\alpha$ -Pineno, (Andersson, 2002; Sköld *et al.*, 2005). Complementariamente es interesante recalcar que la aparición de los óxidos por auto oxidación de los componentes mencionados, produce un aumento de las dermatitis de piel, mientras que  $\beta$ -Mirceno, Limoneno o  $\beta$ -Cariofileno están indicados como componentes con mínimo efecto de dermatitis. (Sköld *et al.*, 2005)

### Ensayos de Actividad Antitumoral:

De las especies de Verbenáceas estudiadas en este trabajo, los ensayos realizados tendientes a demostrar una posible actividad antitumoral, dieron resultados negativos, ya que esta actividad ensayada viene expresada como IC<sub>50</sub> en mg/ml, por lo cual según los resultados obtenidos (**Tabla 11**) y dadas las condiciones que deben cumplirse para que una sustancia sea activa, en el caso de los aceites ensayados lamentablemente ninguno de ellos presenta concentraciones activas menores a 10mg/ml, por lo cual los aceites de *A. gratissima* var. *gratissima* provenientes de San Lorenzo (Corrientes), *A. virgata* var. *platyphylla* de Río Empedrado (Corrientes) y *Lippia alba* de Santa Ana (Corrientes) no demostraron ser activos en casos de leucemia en ratón, carcinoma de pulmón humano y carcinoma de colon humano.

Sin embargo, cabría considerar que estos resultados negativos corresponden específicamente a quimiotipos bien definidos, como es el caso de *A. gratissima* var. *gratissima* de San Lorenzo (**quimiotipo A**), caracterizada por  **$\alpha$ -Tuyona** y *Lippia alba* de Santa Ana (Corrientes) caracterizada por **Mircenona**. Por lo que no se puede, sin embargo, emitir juicio respecto de la actividad de los otros quimiotipos encontrados (**quimiotipo B** y **quimiotipo C** de *A. gratissima* var. *gratissima* y **quimiotipo Citral** de *Lippia alba*), por no haberse ensayado sobre ellos la actividad *aldosa reductasa*. Ya en la búsqueda bibliográfica se ha observado que en general los trabajos de los que se ha dispuesto, no hacen referencia a la correlación entre quimiotipo y actividad fisiológica comprobada sino que hacen mención a aplicaciones generalizadas a toda la especie sin tener en cuenta la existencia de las variedades químicas.

## ***9. - Conclusiones***

Se ha realizado la prospección geográfico-estacional en la provincia de Corrientes, de los aceites esenciales de las especies Verbenáceas encaradas en este trabajo: *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. var. *gratissima*, *Aloysia virgata* var. *platyphylla* (Briquet) Moldenke y *Lippia alba* (Miller) N.E.Br.. De esta tarea, surgieron las siguientes conclusiones:

-De la determinación de la composición química de los aceites esenciales de las tres especies estudiadas, se observó que en general estas Verbenáceas presentan un conjunto común de constituyentes químicos, en su mayoría sesquiterpenos: particularmente  **$\beta$ -Cariofileno**, **Germacreno D** y **Biciclogermacreno**. Además, y desde el punto de vista intraespecífico se constató la presencia de quimiotipos, algunos de ellos por primera vez en el país.

-Se verificó variabilidad química para los aceites esenciales de *Aloysia gratissima* var. *gratissima*. Este aspecto se evaluó mediante la comparación de la composición química de especies provenientes de tres orígenes geográficos diferentes (San Lorenzo, Río Empedrado y El Perichón, Corrientes). En paralelo, este comportamiento se correlacionó con los datos sobre la especie relevados de bibliografía, no encontrándose antecedentes previos a este respecto.

-Se comprobó una sustancial similitud en la composición química del aceite esencial de *A. virgata* var. *platyphylla* al compararla con aceites esenciales de dos procedencias diferentes (Río Empedrado y San Lorenzo, Corrientes). Los componentes principales identificados fueron  **$\delta$ -Elemeno**,  **$\beta$ -Cariofileno**, **Germacreno D** y **Biciclogermacreno**, estando la fracción liviana caracterizada por **Sabineno**. Además se verificó que la composición del aceite esencial se ve afectada por el efecto ontológico solamente a nivel cuantitativo de sus constituyentes, sin modificarse el perfil cualitativo del aceite esencial a medida que la planta va pasando por sus diferentes estados vegetativos. Por otra parte, el estudio de la distribución enantiomérica para el **Sabineno** y **Germacreno D** resultó en una relación característica de la especie en las condiciones ambientales seleccionadas, observándose sólo pequeñas variaciones en la composición enantiomérica durante los diferentes períodos de crecimiento de los terpenos quirales analizados.

-Se determinó la composición química de los aceites esenciales de *Lippia alba* de tres procedencias diferentes (El Perichón y Santa Ana de Corrientes y una tercera procedencia correspondiente a Sáenz Peña, Chaco), observándose que la composición química en dos de ellas (una de Corrientes y la otra de Chaco) no se mantuvo constante. Para el caso de las poblaciones de Corrientes, la composición química de los aceites esenciales estuvo principalmente constituida por **Mircenona**,  **$\beta$ -Mirceno**, **(E)-Ocimenona**, **(Z)-Ocimenona**,  **$\beta$ -Cariofileno** y **Germacreno D**. En tanto que las esencias de Sáenz Peña (Chaco) presentaron como principal constituyente a **Neral** y **Gernial**, con una importante presencia de **Linalol** en la esencia de verano, además de los sesquiterpenos comunes en la familia Verbenáceas.

-Se verificó para las tres especies estudiadas que sus aceites esenciales mostraron tener rendimientos dependientes de la época del año, alcanzando los mayores valores en los períodos posteriores a lluvias copiosas, esto es la época veraniega. Por lo cual, teniendo en cuenta la potencial aplicación de los aceites esenciales, se advierte sobre la importancia de este factor al momento de utilizar estas especies, tanto desde el punto de vista del rendimiento como sobre sus posibles efectos farmacológicos.

-Se observó que la calidad del aceite esencial del material de *Lippia alba* proveniente de Sáenz Peña no sufrió cambios significativos al ser evaluado luego de trasplantado a un suelo distinto al original.

-Se verificó que la composición química de los aceites esenciales de *Aloysia gratissima* var. *gratissima* está estrechamente relacionada con el origen de las muestras. A pesar de que para esta especie no se había planteado previamente la existencia de quimiotipos, a partir de este trabajo se identificaron tres posibles quimiotipos, definidos específicamente para la Provincia de Corrientes.

-Se postuló que *A. gratissima* var. *gratissima* de Corrientes estaría representada por:

-**quimiotipo A:** caracterizado por la presencia de  $\alpha$ - y  $\beta$ -**Tuyona** en proporciones hasta del 20%, y  **$\beta$ -Cariofileno, Germacreno D, Biclogermacreno** y **óxido de Cariofileno** como constituyentes secundarios de importancia;

-**quimiotipo B:** caracterizado por la presencia de **Viridiflorol** en proporciones hasta del 34%, y **Linalol** en proporciones hasta del 15%;

-**quimiotipo C:** caracterizado por la presencia de **10-*epi*-Cubebol** hasta el 13% de la esencia.

Este hallazgo debería ser motivo para una revisión de los estudios fitoquímicos previos sobre la especie, ya que es la primera vez que se reconoce la clasificación taxonómica de Botta (Botta, 1979) donde se identificaron 2 variedades predominantes en la zona del Nordeste argentino: *A. gratissima* var. *gratissima* y *A. gratissima* var. *sellowii*.

-El hallazgo de  $\alpha$ - y  $\beta$ -**Tuyona** en los aceites esenciales de *A. gratissima* var. *gratissima* de San Lorenzo debería ser motivo suficiente para advertir sobre el uso indiscriminado de esta planta, dado el grado de toxicidad de estos componentes. Por otra parte, correspondería advertir que el período en el cual estos componentes se encuentran en menor proporción (verano) sería el que menor riesgo revistaría en el uso de esta especie.

-Se verificó la existencia del quimiotipo **Citral** para la especie *L. alba*, de Sáenz Peña (Chaco), lo que se relacionó con lo que ya planteara inicialmente Fester *et al.*, (Fester *et al.*, 1961a), sobre la existencia de este quimiotipo en el norte de la provincia de Santa Fe y en la provincia de Entre Ríos. En consecuencia, se correlacionó al quimiotipo **Citral** de Sáenz Peña, con el que Fester llamara **quimiotipo del Norte de Santa Fe y Entre Ríos**. Se observó una variación en el contenido de Citral en una de las recolecciones, sin que se haya repetido posteriormente esta modificación, en la cual se hizo importante el contenido de Linalol en los ejemplares correspondientes a la época de verano, con una disminución concomitante en el contenido en Citral. Sin embargo, al no repetirse esta variación no se ha podido encontrar la causa, dejando abierto un interrogante más sobre la plasticidad de la especie.

-Simultáneamente, la determinación de la distribución enantiomérica del Linalol en *Lippia alba* de Sáenz Peña en verano, permitió corroborar que se trata principalmente de 3 *S*-(+)-Linalol, coincidiendo con lo observado por Siani *et al.*, (Siani *et al.*, 2002), en la misma especie proveniente de Brasil, y Lorenzo *et al.* (Lorenzo *et al.*, 2001), en especies silvestres de Uruguay.

-Se encontró también para la especie *Lippia alba* un nuevo quimiotipo en la provincia de Corrientes, correspondiente al quimiotipo **Mircenona**, que fuera encontrado simultáneamente en Guatemala, (Fischer *et al.*, 2004), y Costa Rica, (Ciccio *et al.*, 2004). Este nuevo quimiotipo está caracterizado por **Mircenona**,  **$\beta$ -Mirceno**, **(E)-Ocimenona** y **(Z)-Ocimenona**. Este resultado soporta con mayor validez la propuesta de un nuevo quimiotipo para Argentina por los factores genéticos y no fenológicos o ecológicos condicionantes de la región estudiada, debido a la gran distancia que separa los países mencionados de nuestro país.

-Es válido suponer que la amplitud y diversidad de usos atribuidos a las especies estudiadas, en especial *Lippia alba*, tenga su origen en esta diversificada composición química de acuerdo a la zona donde crecen las plantas, y a la época de recolección. Además, en el caso del quimiotipo Citral de *Lippia alba*, la presencia de este componente podría ser la causante de las aplicaciones de esta especie como estimulante cardíaco y sedante. Sin embargo, también es importante destacar los riesgos que pueden ocasionar el confundir calidades de una misma especie, suponiendo actividades que pueden no ser las esperables, en función de la variabilidad química y estacional de estas plantas.

-Se verificó circunstancialmente la inactividad como antitumorales frente a carcinoma de pulmón humano, carcinoma de colon humano y leucemia en ratones, de los aceites esenciales de *A. gratissima* var. *gratissima* **quimiotipo A**, *A. virgata* var. *platyphylla* y *Lippia alba* **quimiotipo Mircenona**, lo cual no descarta que esta actividad se manifieste en los otros quimiotipos de estas especies.

-Se observó que las aguas de destilación obtenidas en el proceso de extracción de estos aceites esenciales poseen una composición en componentes volátiles muy similar a la de las esencias respectivas, en las especies donde se pudo realizar este estudio. Por este motivo estas fracciones no aportarían ventajas adicionales en una posible utilización industrial de estos aceites esenciales, independientemente de buscar una optimización en la separación del aceite con el objetivo de minimizar los componentes volátiles residuales en estas aguas.

-De acuerdo a todos estos resultados, se han podido constatar las hipótesis oportunamente planteadas, a saber:

-se han encontrado nuevas variedades químicas en las poblaciones de las especies estudiadas en la región.

-se han detectado notables variaciones estacionales, lo que influye no solamente en la elección del momento de cosecha de cada especie, sino también en la ponderación de sus posibles aplicaciones industriales, así como en la seguridad e inocuidad en su manejo para el consumo humano o animal.

Todas estas especies, debidamente caracterizadas, pueden ser más ampliamente aprovechadas por la industria de lo que son en la actualidad, tanto desde el punto de vista de sus cualidades organolépticas, como por la composición química y la especificidad estructural de algunos de sus principales constituyentes (caso de la Mircenona o del 3 S-(+) Linalol, (Viljoen *et al.*, 2004)).

## ***10. - Bibliografía***

- Abad, J; Bermejo, P; Villar, A; Sánchez Palomino, S y Carrasco, L; 1997; “*Antiviral Activity of Medicinal Plant Extracts*”; *Phytotherapy Research*; **2**: 198-202.
- Adams RP; 2001; “*Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Quadrupole Mass Spectroscopy*”; Allured: Carol Stream, IL.
- Alice, CB; Vargas, VMF; Silva, GAAB; De Siquiera, NCS; Schapoval, EES; Gleve, J; Henriques, JAP y Henriques, AT; 1991; “*Screening of plants used in South Brazilian folk medicine*”; *J. Ethnopharmacol.*; **35**; (2): 165-71.
- Amorín, JL; 1988; “*Guía Taxonómica de Plantas de Interés Farmacéutico*”; Colegio Oficial de Farmacéuticos y Bioquímicos de la Capital Federal; Bs. As..
- Amorín, JL; 1996; “*Los precursores de la Farmacobotánica argentina*”; Ediciones Hector Macchi; Buenos Aires.
- Andersson, A; 2002; “*Studies in the autoxidation of  $\beta$ -myrcene at different storage conditions and isolation of the oxidation product 6,7-epoxmyrcene*”; *Dermatochemistry and Skin Allergy*; en: [http://www.farmaceut.org.gu.se/Graduation Abstracts/HT-2002/Abstrakt\\_2002.pdf](http://www.farmaceut.org.gu.se/Graduation_Abstracts/HT-2002/Abstrakt_2002.pdf)
- Andrighetti – Fröhner, CR; Sincero, TCM; da Silva, AC; Savi LA; Gaido, CM; Bertega, JMR; Mancini, M; de Almeida, MTR; Barbosa, RA; Farias, MR; Barardi, CRM y Simoes, CMO; 2005; “*Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest*”; *Fitoterapia*; **76**: 374 – 78.
- Bahl, JR; Garg, SN; Singh, SC; Bansal, RP; Naqvi, AA y Sushil Kumar; 2000; “*Composition of linalool rich essential oil from Lippia alba grown in Indian plains*”; *Flavour Fragr. J.*; **15**: 199-200.
- Bailac, PN; Dellacassa, AD; Duschatzky, CB; Firpo, N y Ponzi, MI; 1999; “*Essential oil composition and antimicrobial activity of Aloysia gratissima from San Luis – Argentina*”; *An. Asoc. Quím. Argentina*; **87**; (3/4): 149-59.
- Bandoni, A (ed.); 2000; “*Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica*”; CYTED, Editorial de la Universidad Nacional de La Plata, Bs. As., Argentina: 29- 31; 367- 68.
- Bassols, G; Gurni, A; 1996; “*Especies del género Lippia utilizadas en medicina popular latinoamericana*”; *Dominguezia*; **13**; (1): 7-24.
- Bauer, L; Brasil y Silva, GA de A; 1969; “*Sobre o óleo esencial de Lippia lycioides Steud. (Verbenaceae)*”; *Tribuna Farmacéutica*; **37**: 151-59.
- Botta, M; 1979; “*Las Especies Argentinas del género Aloysia (Verbenaceae)*”; *Darwiniana*; **22**; (1-3): 69-107.
- Bourdy, G; DeWalt, SJ; Chávez de Michel, LR; Roca, A; Deharo, E; Muñoz, V; Balderama, L; Quenevo, C y Gimenez, A; 2000; “*Medicinal plants uses of the Tacana an Amazonian Bolivian ethnic group*”; *J. Ethnopharmacol.*; **70**: 87–109.
- Braga, MEM; Ehlert, PAD; Ming, LC; Meireles, MAA; 2005; “*Supercritical fluid extraction from Lippia alba: global yields, kinetic data, and extract chemical composition*”; *J. of Supercritical Fluids*; **34**: 149-56.
- Brandao, M; Botelho, M y Krettli, E; 1985; “*Antimalarial experimental chemotherapy using natural products*”; *Cienc. Cult.*; **37**; (7): 1152-63.
- Bravo, AH; Aiquel, GR y Retamar, JA; 1973; “*Essential Oils of Tucuman Province. Essence of Aloysia gratissima*”; *Arch. Bioquim. Quím. Farm.*; **18**: 21.
- Cabrera, AL; 1965; “*Flora de la Provincia de Buenos Aires*”; **4**; (5): 150, f. 51.
- Cabrera, AL (director); 1993; “*Flora de la Provincia de Jujuy*”; Colección Científica; **13**, parte 9: Verbenáceas a Caliceráceas; INTA; Bs. As.: 38; 42.
- Cáceres, A; 1996; “*Plantas de Uso Medicinal en Guatemala*”; Editorial Universitaria, Universidad de San Carlos de Guatemala: 7; 208-10; 369-70.

- Camargo, FJ; Torres, AM; Tressens, SG; Dellacassa, E y Ricciardi, AIA; 2005; “*Inhibición de la actividad hemolítica del veneno de Bothrops neuwiedii diporus Cope (yará chica) por extractos de plantas del nordeste argentino*”; Resúmenes de XI Sesión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad Nacional del Nordeste, Chaco, Argentina.
- Carnevali, R; 1994; “*Fitogeografía de la Provincia de Corrientes*”; Gobierno de la Provincia de Corrientes; Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria; Corrientes.
- Castro, DM; Ming, LC y Marques, MOM; 2002; “*Biomass Production and Chemical Composition of Lippia alba (Mill.) N.E.Br. ex Britt & Wilson in Leaves on Different Plant Parts in Different Seasons*”; *Acta Hort.*; (569): 111-15.
- Catalán, CAN; Merep DJ y Retamar JA; 1977; “*El aceite esencial de Lippia alba (Miller) N.E. Brown de la provincia de Tucumán*”; *Riv. Italiana EPPOS*; **59**: 513-18.
- Catalán, CAN y Lampasona, MEP; 2003; “*The chemistry of the genus Lippia (Verbenaceae)*”; in: “*The genus Oregano and Lippia (ed. Kintzios, S.E.)*”; Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Profiles; **25**; Taylor & Francis, Incorporated: 127-50.
- Chantraine, JM; Laurent, D; Ballivian, C; Saavedra, G; Ibañez, R y Vilaseca, LA; 1998; “*Insecticidal activity of essential oils on Aedes aegypti larvae*”; *Phytother. Res.*; **12**; (5): 350-54.
- Ciccio, JF y Ocampo, R; 2004; “*Aceite esencial de Lippia alba (Verbenaceae) cultivada en el trópico húmedo en el Caribe de Costa Rica*”; *Ing. Cienc. Quím.*; **21**: 13-16.
- Costa, M; Di Stasi, LC; Kirizawa, M; Mendacolli, SL; Gomes, C y Trolin, G; 1989; “*Screening in mice of some medicinal plants used for analgesic purposes in the state of Sao Paulo, part II*”; *J. Ethnopharmacol.*; **27**; (1-2): 25-33.
- Da Silva, CC; Vandresen, F; de Oliveira, CMA; Kato, L; Tanaka, CMA y Ferreira, HD; 2006; “*Chemical composition of Aloysia gratissima (Gill. et Hook.) Tronc. Verbenaceae*”; *Biochemical Systematics and Ecology*; **34**: 593-95.
- Davies, NW; 1990; “*Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases*”; *J. Chromatogr.*; **503**: 1-24.
- de Abreu Matos, FJ; Lacerda Machado, MI; Craveiro, AA y Alencar, JW; 1996; “*Essential oil composition of two chemotypes of Lippia alba grown in Northeast Brazil*”; *J. Essent. Oil Res.*; **8**: 695-98.
- Dellacassa, E; Soler, E; Menéndez, P y Moyna P; 1990; “*Essential oils from Lippia alba and Aloysia chamaedrifolia from Uruguay*”; *Flavour and Fragr. J.*; **5**: 107 - 09.
- de Oliveira, CM; da Silva, CC; Dias Ferreira, H; Lemes, G de F; Schimtt, E; 2005; “*Kauranes, phenylethanoids and flavone from Aloysia virgata*”; *Biochemical Systematics and Ecology*; **33**: 1191.
- De Souza, CP; Lima de Azevedo, ML; Lopes, JLC; Sarti, J; Santos Filho, DD; Lopes, JNC; Vichnewski, W; Nasi, AMTT y Filho, HFL; 1984; “*Chemoprophylaxis of Schistosomiasis: molluscicidal activity of natural products*”; *An. Acad. Brasil. Cienc.*; **56**; (3): 333-38.
- Dewick, PM; 2002; “*Medicinal Natural Products. A biosynthetic approach*”; 2<sup>nd</sup> Ed. John Wiley & Sons. Ltd.: 157.
- Do Vale, TG; Furtado, EC; Santos, JG Jr y Viana, GS; 2002; “*Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from Lippia alba (Mill.) N.E. Brown.*”; *Phytomedicine*; **9**; (8): 709-14.
- ECFA - Monographs & Evaluations. 519. Thujone (WHO Food Additives Series 16). <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono>
- Fester, GA y Martinuzzi, EA; 1955; “*Esencias volátiles argentinas*”; Universidad Nacional del Litoral; Santa Fe.

- Fester, GA; Martinuzzi, EA; Retamar, JA y Ricciardi, AIA; 1961a; “*Aceites Esenciales de la República Argentina*”; Academia Nacional de Ciencias, Córdoba: 38-41; 42.
- Fester, GA; Retamar, J; Ricciardi, A y Cassano, A; 1961b; “*Algunas esencias volátiles - 14<sup>o</sup> Comunicación- La esencia de Lippia alba de Isla Puente (y de Villa Ana)*”; *Revista de la Facultad de Ingeniería Química*, Santa Fe; **30**: 5-10.
- Fester, GA; Romero Fonseca, L; Ricciardi, A; Cassano, A y Burgos, J; 1961c; “*Algunas esencias volátiles -15<sup>o</sup>Comunicación- La esencia de Lippia alba de Puente Pessoa y Loreto*”; *Revista de la Facultad de Ingeniería Química*, Santa Fe; **30**: 10-14.
- Fischer, U; Lopez, R; Pöll, E; Vetter, S; Novak, J y Franz, ChM; 2004; “*Two chemotypes within Lippia alba populations in Guatemala*”; *Flavour and Fragr. J.*; **19**: 333 – 35.
- Forestieri, AM; Monforte, MT; Ragusa, S; Trovato, A y Iauk, L; 1996; “*Antiinflammatory, analgesic and antipyretic activity in rodents of plants extracts used in Africa Medicine*”; *Phytotherapy Research*; **10**: 100-06.
- Frighetto, N; de Oliveira, JG; Siani, AC y Calagodas Chagas, K; 1998; “*Lippia alba (Mill.) N.E.Br. (Verbenaceae) as a source of Linalool*”; *J. Essent. Oil Res.*; **10**: 578-80.
- Gazola, R; Machado, D; Ruggiero, C; Singi, G y Macedo Alexandre, M; 2004; “*Lippia alba, Melissa officinalis and Cymbopogon citratus: effects of the aqueous extracts on the isolated hearts of rats*”; *Pharmacological Research*; **50**; (5):477-80.
- González Torres, D; 1997; “*Catálogo de Plantas Medicinales (y alimenticias y útiles) usadas en Paraguay*”; Asunción: 120 – 21; 305; 400.
- Guenther, E; 1960; “*The essential Oils*”, **I**, 5<sup>th</sup> Ed.: 265; 1963, **II**: 167-70; 423-28; Van Nostrand Co.; USA.
- Guerrero, MF; Puebla, P; Carrón, R; Martín, ML; Arteaga, L y San Román, L; 2002; “*Assessment of the antihypertensive and vasodilator effects of ethanolic extracts of some Colombian medicinal plants*”; *Journal of Ethnopharmacology*; **80**: 37 – 42.
- Gupta, M (ed.); 1995; “*270 Plantas Medicinales Iberoamericanas*”; CYTED-SECAB; Santafé de Bogotá: 553-54; 557-58.
- Hesse, M; Meier, H y Zeeh, B; 1995; “*Métodos Espectroscópicos en Química Orgánica*”; Editorial Síntesis; España: 121-23.
- Holetz, FB; Pessini, GL; Sanches, NR; García Cortez, DA; Nakamura, CV y Prado Dias Filho, B; 2002; “*Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases*”; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*; **97**; (7): 1027-31.
- Januzzi, H; 2005; “*Caracterização química de óleos essenciais em 40 acessos de Lippia alba*”; Resúmenes del III Simposio Brasileiro de Óleos Essenciais; Campinas, Brasil.
- Jozamí, JM y Muñoz, J de D; 1982; “*Árboles y arbustos indígenas de la Prov. de Entre Ríos*”; Instituto Investigaciones de Productos Naturales de Análisis y de Síntesis Orgánica (IPNAYS) (CONICET – UNL) Santa Fe: 301; 304.
- Juliani, H R (Jr.); Koroch, AR; Juliani, HR; Trippi, VS y Zygadlo, JA.; 2002; “*Intraespecific variations in leaf oils of Lippia junelliana (Mold.) Tronc.*”; *Biochemical Systematics and Ecology*; **30**: 163-70.
- Kazuo Yoshihara, Yoshimoto Ohta, Tsutomu Sakai y Yoshio Hirose; 1969; “*Germacone D, a key intermediate of cadinene group compounds and bourbonenes*”; *Tetrahedron Letters*; **27**: 2263-64.
- Kluger, PA; Teuber, CA; Daros, MR; de Lima, TCM; 1996; “*Avaliação da atividade farmacológica central de diferentes preparações de Lippia alba Miller (Verbena-*

- ceae)”; XIV Simposio de Plantas Mediciniais do Brasil, Florianópolis; S.C.; Brasil. En: Vale *et al.*, 1999.
- König, WA; 1998; “*Enantioselective capillary gas chromatography in the investigation of stereochemical correlations of terpenoids*”; *Chirality*; **10**: 499–504.
  - Leclercq, PA; 1999; “*Aromatic plant oils of the Peruvian Amazon. Part 1. Lippia alba (Mill.) N.E. Br. and Corutia odorata (Poeppig) Poeppig ex Schauer, Verbenaceae*”; *J. Essent. Oil Res.*; **11**: 753-56.
  - Lorenzo, D; Paz, D; Davies, Ph; Vila, R; Cañigüeral, S y Dellacassa E; 2001; “*Composition of a new essential oil type of Lippia alba (Mill.) N.E. Brown from Uruguay*”; *Flavour and Fragr. J.*; **16**: 356-59.
  - Lorenzo, D; Paz, D; Loayza, I; Vila, R; Cañigüeral, S y Dellacassa, E; 2002; “*El análisis enantiomérico en la caracterización y evaluación de plantas aromáticas*”; *Ing Cienc Quím.*; **21**: 14-19.
  - Martínez Crovetto, R; 1961; “*Plantas utilizadas en medicina en el NO de Corrientes*”; *Miscelánea* 69; Fundación Miguel Lillo; Tucumán: 89-91.
  - Matoso, E; 1893; “*Cien Industrias. Notas sobre Plantas Útiles Escogidas de la Flora Correntina*”; 3° parte; Corrientes: 232.
  - Mattos, AFJ; Machado, MIL; Craveiro, AA; Alencar, JW y de Abreu Mattos, FJ; 1996; “*Essential oil composition of two chemotypes of Lippia alba grown in northeast Brazil*”; *J. of Essent. Oil Res.*; **5**: 695-98.
  - McLafferty, FW y Stauffer, DB; 1991; “*The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data*”; 5th Ed.; Wiley; New York.
  - Medina, JE; Rondina, VD y Coussio, JD; 1977; “*Phytochemical screening of Argentine plants with potential pharmacological activity (part VII)*”; *Planta Med.*; **31**: 136-40.
  - Mejía, CK y Rengifo, SE; 1995; “*Plantas Medicinales de Uso Popular*”; Proyecto de Desarrollo Integral de Carreteras Iquitos- Nauta; Instituto de Investigaciones de la Amazonia; AECI y II AP, Lima, Perú: 121; 175.
  - Meza, MM; Colmenares, N y Usubillaga, A; 2001; “*Comparación del Aceite Esencial de tres especies de Lippia alba del Estado de Táchira, Venezuela*”; *Memorias del X Congreso Italo Latinoamericano de Etnomedicina*: 165-66.
  - Muñoz, V; Sauvain, M; Bourdy, G; Arrazola, S; Callapa, J; Ruiz, G y Choque, J; 2000; “*A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part III. Evaluation of antimalarial activity of plants used by altenos Indians*”; *J. Ethnopharmacol.*; **71**; (1/2): 123-31.
  - NIST/EPA/NIH; 1992; “*Mass Spectral Data Base, Version 4.1*”; National Bureau of Standard by Secretary of Commerce of Behalf of U.S. Government, Washington.
  - Ocampo, R; Ocampo, ER; Ringuelet, J; Burillo, J; Pauletti, G; Cicció, F; Dellacassa, E y Villamil, J; 2005; “*Variabilidad genética y quimiotipos de Lippia alba (Mill.) N.E. Br. en América*”; *Resúmenes del V Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe*. Montevideo, Uruguay.
  - Oliveira, DR; Leitão, GG; Santos, SS; Bizzo, HR; Lopes, D; Alviano, CS; Alviano, DS y Leitão, SG; 2006; “*Ethnopharmacological study of two Lippia species from Oriziminá-Brasil*”; *Journal of Ethnopharmacol.*; en prensa.
  - Ourisson, G; Munavalli, S y Ehret, C; 1966; “*Sesquiterpenoids – Selected Constants*”, Pergamon Press.
  - Pascual, ME; Slowing, K; Carretero, ME y Villar, A; 2001; “*Antiulcerogenic activity of Lippia alba (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae)*”; *Il Farmaco*; **56**: 501-04.
  - Pascual, ME; Slowing, K; Carretero, E; Sanchez Mata, D y Villar, A; 2001b; “*Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review*”; *J. Ethnopharmacol.*; **76**: 201-14.

- Penna, CA; Radice, M; Gutkind, GO; Van Baren, C; Broussalis, A; Muschietti, L; Martino, V y Ferraro, G; 1994; “Antibacterial and antifungal activities of some Argentinean plants”; *Fitoterapia*; **65**; (2): 172-74.
- Pino, JA; Ortega, A y Rosado, A; 1996; “Chemical Composition of the Essential oil of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown from Cuba”; *J. Essent. Oil Res.*; **8**: 445-46.
- Pino, LA; García, J y Martínez, M; 1997; “Solvent extraction and supercritical Carbon Dioxide extraction of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown leaf”; *J. Essent. Oil Res.*; **9**: 341-43.
- Puertas-Mejía, M; Hillebrand, S; Stashenko, E y Winterhalter, P; 2002; “In vitro radical scavenging activity of essential oils from Columbian plants and fractions from oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil”; *Flavour and Fragr. J.*; **17**: 380-84.
- Ramos, A; Visozo, A; Piloto, J; García, A; Rodríguez, CA y Rivero, R; 2003; “Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants”; *Journal of Ethnopharmacol.*; **87**: 241-46.
- Ratera, EL y Ratera, MO; 1980; “Plantas de la flora Argentina empleadas en Medicina Popular”; Ed. Hemisferio Sur S. A., Buenos Aires:152.
- Retamar, J; 1994; “Variaciones fitoquímicas de la especie *Lippia alba* (salvia morada) y sus aplicaciones en la Química Fina”; *Essenze Deriv. Agrum.*; **64**: 55-60. En Catalán et al., 2002.
- Ricciardi, AIA; 2004; “Tabla para la evaluación de máximos en el espectro UV”; tablas de apoyo a las clases teóricas y prácticas de Química Orgánica III; Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura; (UNNE).
- Ricciardi, A; 2005; “Antecedentes históricos en el uso de plantas medicinales en la región”; en: Chifa, C; 2005; “Plantas Medicinales usadas por las Comunidades Aborígenes del Chaco Argentino. (Castellano, Mocoví, Wichi, Toba)”; EUDENE, Corrientes: 7-16.
- Ricciardi, G; Ciccio, JF; Ocampo, R; Lorenzo, D; Dellacassa, E; Ricciardi, AIA y Bandoni, AL; 2006; “Chemical variability of essential oils in *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown growing in Costa Rica and Argentina”; *Biochemical Systematics and Ecology*; enviado a publicar: 12/02/2006.
- Rodríguez, PM; 1991; “Plantas de la Medicina Popular Venezolana de Venta en Herbolarios”; *Soc. Ven. de Ciencias Nat.*: 221-22.
- Ruffa, MJ; Wagner, ML; Suriano, M; Vicente, C; Nadinic, J; Pampuro, S; Salomon, H; Campos, RH y Cavallaro, L; 2004; “Inhibitory effect of medicinal herbs against RNA and DNA viruses”; *Antivir Chem Chemother*; **15**; (3): 153-59. (En Base de Datos TRAMIL: [http://www.funredes.org/tramil/espanol/plantdata.html.ref\\_id/753](http://www.funredes.org/tramil/espanol/plantdata.html.ref_id/753) )
- Sartoratto, A y Augusto, F; 2002; “Assessment of volatile constituents of some aromatic Brazilian plants by headspace solid phase microextraction-gas chromatography”; *Journal of Chromatography*; Special Symposium Volume, HTC-7:1-10.
- Scarpa, GF; 2002; “Plantas empleadas contra trastornos digestivos en la medicina tradicional criolla del Chaco Noroccidental”; *Dominguezia*; **18**; (4): 1-15.
- Schmaus, G y Kubezka, KH.; 1985; In “Essential Oils and Aromatic Plants”, Baerheim Svendsen A, Scheffer JJC (eds), Martinus Nijhoff/Dr. Junk Publishers: Dordrecht: 127.
- Schmidt, CO; Bouwmeester, HJ; Franke, S y König, WA; 1999; “Mechanisms of the biosynthesis of sesquiterpenes enantiomers (+)- and (-)-Germacrene D in *Solidago Canadensis*”; *Chirality*; **11**: 353-62.
- Schroeder, MA; López, AE y Martínez, GC; 2004; “Resultados preliminares del análisis foliar de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, *Pluchea sagittalis* (Lamb.) Cab., *Petiveria aliacea* L. y *Ocimum selloi* Benth.”; Universidad Nacional del Nordeste, Comuni-

- caciones Científicas y Tecnológicas 2004; resumen **A-035**; en: <http://www.unne.edu.ar>
- Senatore, F y Rigano, D; 2001; “*Essential oil of two Lippia spp. (Verbenaceae) growing wild in Guatemala*”; *Flavour Fragr. J.*; **16**: 169-71.
  - Shimizu, S; Katsuhara, J y Inouye, Y; 1996; “*Optical rotatory dispersion of Rotundifolone*”; *Agr. Biol. Chem.*; **30**: 89-93.
  - Siani, AC; Tappin, MR; Ramos, MF; Mazzei, JL; Ramos, MC; De Aquino Neto, FR; y Frighetto, N; 2002; “*Linalool from Lippia alba: study of the reproducibility of the essential oil profile and the enantiomeric purity*”; *J. Agric. Food Chem.*; **50**; (12): 3518-21.
  - Siqueira, WJ; 2005; “*Melhoramento genético de Lippia alba*”; resúmenes del III Simposio Brasileiro de Óleos Essenciais; Campinas, Brasil.
  - Sköld, M; Karlberg, AT; Matura, M y Börje, A; 2005; “*The fragrance chemical beta-caryophyllene-air oxidation and skin sensitization*”; *Food and Chemical Toxicology*; **44**: 538-45.
  - Soler, E; Dellacassa, E y Moyna, P; 1986a; “*Composition of Aloysia gratissima flower essential oil*”; *Planta Med.*; **52**: 488-90.
  - Soler, E; Dellacassa, E y Moyna, P; 1986b; “*Composition of Aloysia gratissima Leafs Essential Oil*”; *Phytochemistry*; **25**; (6): 1343-45.
  - Sorará, SB y Bandoni, AL; 1978; “*Plantas de la Medicina Popular*”; Albatros, Buenos Aires: 107.
  - Stashenko, EE; Jaramillo, BE y Martínez, JR; 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**: 579 – 98.
  - Stashenko, EE; Jaramillo, BE y Jairo, RM; 2004; “*Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of Lippia alba (Mill.) N. E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity*”; *Journal of Chromatography A.*; **1025**, 93-103.
  - Teixeira Duarte, MC; Figueira, GM; Sartoratto, A; García Rehder, VL y Delarmelina, C; 2005; “*Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants*”; *Journal of Ethnopharmacol.*; **97**: 305-31.
  - Terblanché, FC y Kornelius, G; 1996; “*Essential Oil Constituents of the Genus Lippia (Verbenaceae)- A Literature Review*”; *J. Essent. Oil Res.*; **8**: 471-85.
  - Torres de Sosa, AM; Camargo, FJ; Avanza de Temporetti, MV; Tressens, SG y Ricciardi, AIA; 2004; “*Interacción entre extractos de órganos de plantas y veneno de Bothrops neuwiedii diporus Cope (yarára chica)*”; Resúmenes del VIII Simposio Argentino y XI Simposio Latinoamericano de Farmacobotánica; Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
  - Toursarkissian, M; 1980; “*Plantas Medicinales de la Argentina*”; Ed. Hemisferio Sur; Bs. As.: 132- 34.
  - Toyota, M; Koyama, H; Mizutani, M y Asakawa, Y; 1996; “*(-)-ent-Spathulenol isolated from liverworts is an artefact*”; *Phytochemistry*; **41**: 1347-50.
  - Tressens, S G; 2003 – 2004; Comunicaciones Personales.
  - Troncoso, N; 1961; “*Las Lippia (Verbenáceas) descritas del Paraguay por Robert Chodat y John Briquet*”; *Darwiniana*; **12**; (2): 256 – 91.
  - Trovati, G; Sanchez, EA; Gakhiane, MS y Chierice, GO; 2003; “*Análise da composição do óleo essencial das folhas da Aloysia gratissima e isolamento do pinocanfona por cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida em coluna*”; *Documentos IAC, Campinas*; **74**:122.

- UNCTAD: United Nations Conference on Trade and Development; 2005; “Lippia alba. *Prontoalivio; Erva cidreira; juanilama; Melissa*”; United Nations.
- Vale, TG; Matos, FJA; de Lima, TCM y Viana, GSB; 1999; “Behavioral effects of essential oils from Lippia alba (Mill.) N.E. Brown chemotypes”; *Journal of Ethnopharmacol.*; **167**: 127-33.
- Viana, GS; do Vale, TG; Silva, CM y 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): 1314-17
- Viana, GSB; Vale, TG; Rao, VSN y Matos, FJA; 1998; “Analgesic and antiinflammatory effects of two chemotypes of Lippia alba: a comparative study”; *Pharmaceutical Biology*; **36**: 1-5.
- Viljoen, AM; Subramoney, S; van Vuuren, SF; Baser, KHC y Demirci, B; 2005; “The composition, geographical variation and antimicrobial activity of Lippia javanica (Verbenaceae) leaf essential oils”; *Journal of Ethnopharmacol.*; **96**: 271-77.
- Wiley Registry; 2000; 7<sup>th</sup> Ed.; (338.000 spectra).
- Yuri Yamamoto, P; 2005; “Interação genótipo vs ambiente na produção de folhas e de óleos essenciais de Lippia alba (Verbenaceae)”; Resúmenes del III Simposio Brasileiro de Óleos Essenciais, Campinas, Brasil.
- Zetola, M; De Lima, TC; Sonaglio, D; Gonzalez-Ortega, G; Limberger, RP; Petrovick, PR y Bassani, VL; 2002; “CNS activities of liquid and spray-dried extracts from Lippia alba-Verbenaceae (Brazilian false melissa)”; *J. Ethnopharmacol.*; **82**: 207-15.
- Zoghbi, M das G; Andrade, EHA; Santos, AS; Silva, MHL y Maia, JGS; 1998; “Essential oil of Lippia alba (Mill.) N. E. Br. growing wild in the Brazilian Amazon”; *Flavour Fragr. J.*; **13**: 47-48.
- Zuloaga, FG y Morrone, O; 1999; “Verbenaceae”. En Zuloaga, F. y Morrone, O. (eds.); “Catálogo de las Plantas Vasculares de la República Argentina II”; *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.*; **74**: 1136-70.
- Zygadlo, JA; Lamarque, AL; Guzmán, CA y Grosso, NR; 1995; “Composition of the Flower Oils of Some Lippia and Aloysia Species from Argentina”; *J. Essent. Oil Res.*; **7**: 593-95.

## Argentina

**Corrientes:** Citral; 1,8-Cineol

**Entre Ríos:** Lippiona

**Santa Fe:** Citral, Linalol, Alcanfor

**Tucumán:** Piperitona, Limoneno, 1,8-Cineol

## Brasil

**Tipo A:** Limoneno, 1,8-Cineol, Carvona

**Tipo B:** Limoneno, 1,8-Cineol, **Carvona**, Germacreno D

**Tipo C:** Citral, Germacreno D

**Carvona:** Carvona, Limoneno

**Geranial:** Citral

**Linalol:** Linalol, 1,8-Cineol

**Tipo I:** Citral, Limoneno

**Tipo II:** Citral, Limoneno

**Tipo III:** Carvona, Limoneno

**Tipo IV:** Linalol

**Citral:** Citral

**Carvona:** Carvona

**Mirceno-Citral:** Mirceno, Citral

## Colombia

**Carvona:** Limoneno, **Carvona**, Piperitona

## Costa Rica

**Dulce:** Limoneno, **Carvona**

## Cuba

**Carvona:** Limoneno, **Carvona**

## Guatemala

**Citral:** 1,8-Cineol, **Citral**

**Mircenona:** **Mircenona**

**Piperitona:** Limoneno, **Piperitona**, 1,8-Cineol

## India

**Linalol:** Linalol, Geraniol, 1,8-Cineol

## Perú

**Carvona:** **Carvona**, Germacreno D, Limoneno

**Lippiol:** Geraniol, Citral, Limoneno

## Uruguay

Silvestres: **Alcanfor**, 1,8-Cineol

Cultivadas: **Linalol**, Germacreno D, Limoneno

## Venezuela

**Citral**: **Citral**, Geraniol, Limoneno

**Carvona**: **Carvona**, Limoneno

Según Hennebelle *et al.*, (2006), los quimiotipos de *L. alba* se podrían agrupar en siete quimiotipos diferentes de acuerdo a la proporción de los componentes mayoritarios; por lo que de acuerdo a esta consideración se reconocen:

**Quimiotipo I:** Citral / Linalol

*Subtipo Ia:* > proporción de Citral pero con Linalol también presente en porcentajes menores: Argentina, Brasil, Francia, Guatemala e India.

*Subtipo Ib:* > proporción de Linalol con Citral en cantidades menores: Brasil, India, Uruguay.

*Subtipo Ic:* Citral y Linalol en cantidades variables uno respecto del otro y de acuerdo al estado de crecimiento: Argentina (Corrientes)

*Subtipo Id:* Citral y Linalol pero con una proporción considerable de  $\beta$ -Cariofileno: Brasil.

**Quimiotipo II:** Mircenona, Mirceno, Germacreno D: Argentina (Corrientes), Guatemala.

**Quimiotipo III:** Carvona, Piperitenona

*Subtipo IIIa:* > proporción de Carvona o Limoneno: Brasil, Cuba, Columbia, Francia y Perú.

*Subtipo IIIb:* > proporción de Piperitona con Limoneno y 1,8-Cineol: Argentina; Guatemala

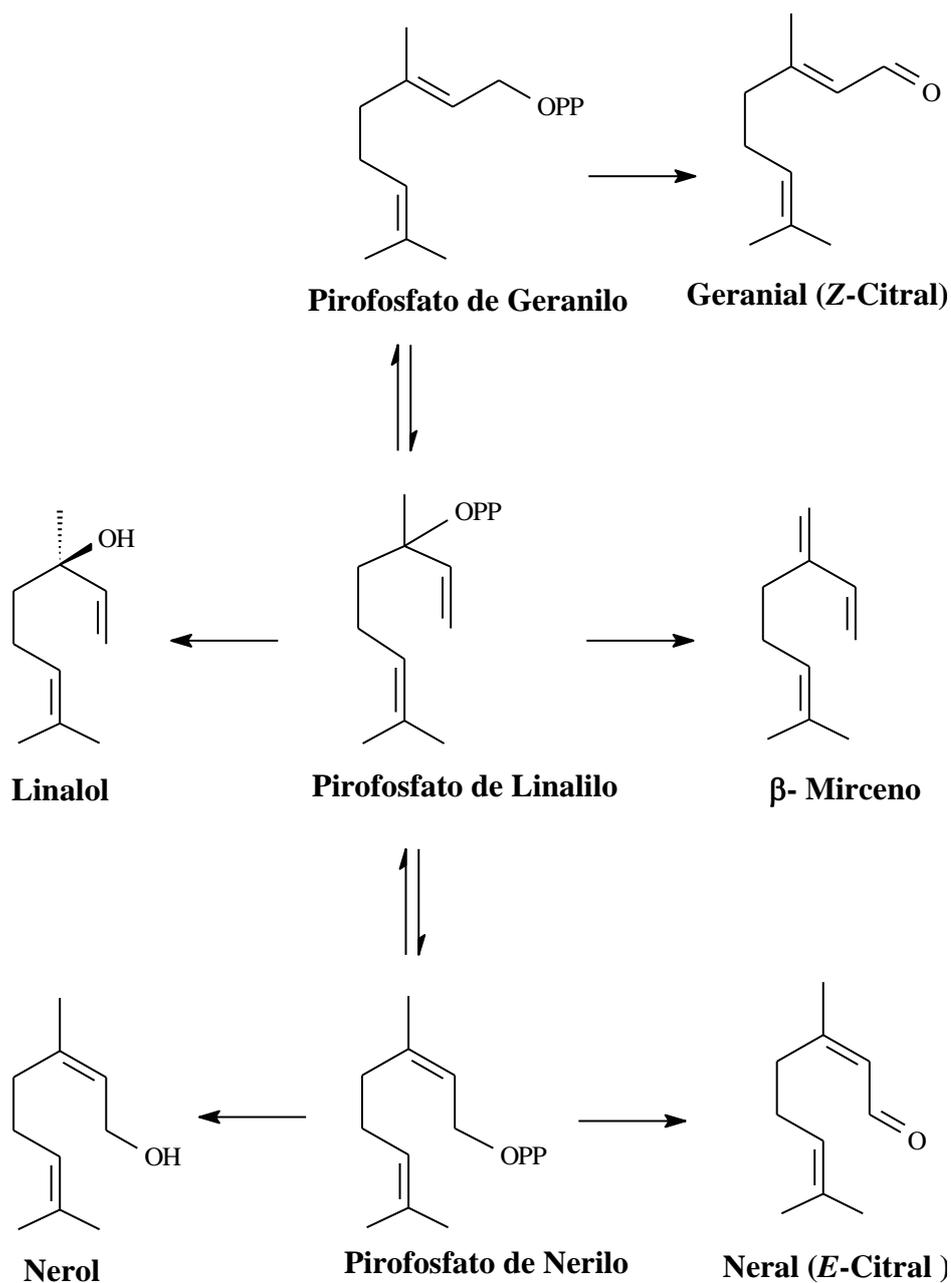
**Quimiotipo IV:** > proporción de Mirceno con Citral (Argentina) o Canfeno (India)

**Quimiotipo V:**  $\gamma$ -Terpineno: Brasil

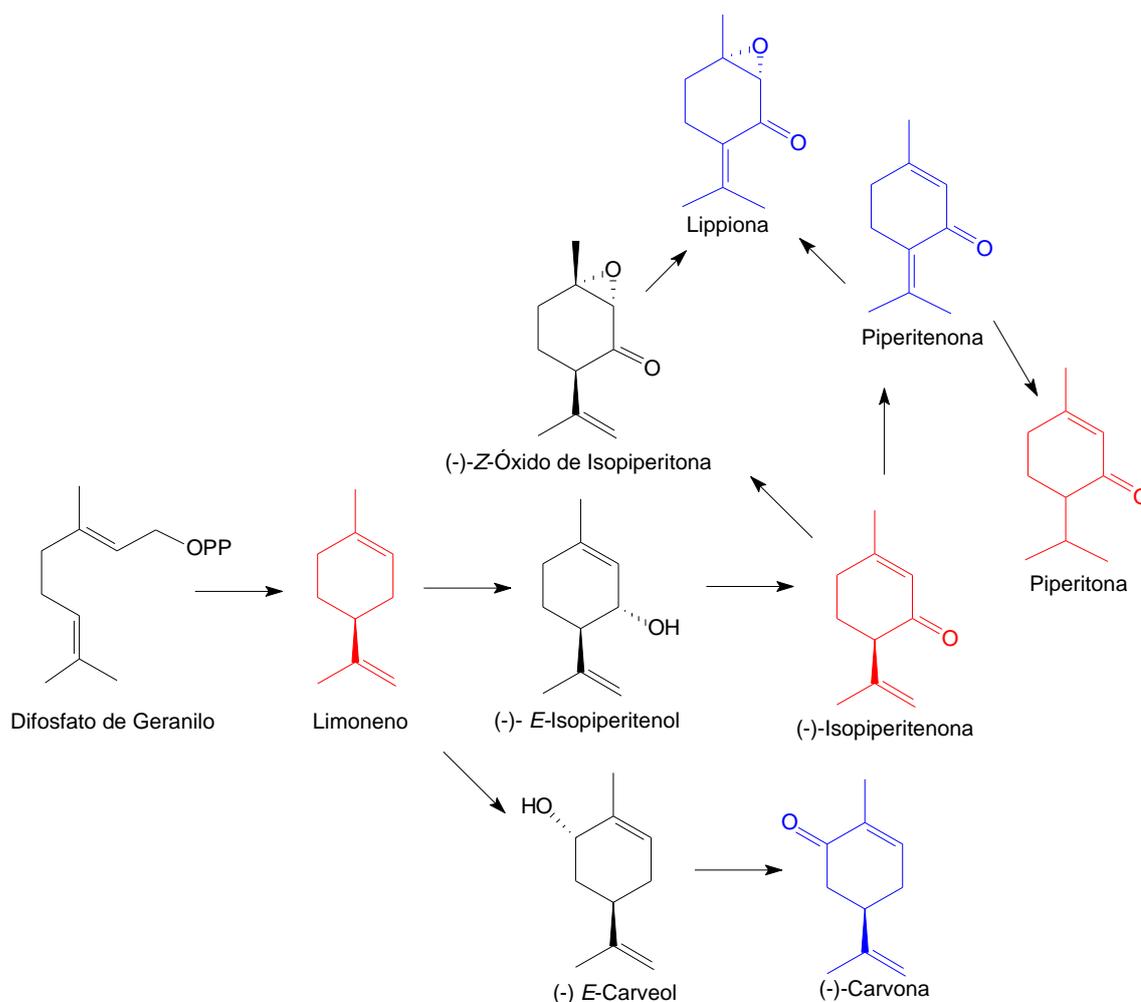
**Quimiotipo VI:** Alcanfor y 1,8-Cineol: Uruguay

**Quimiotipo VII:** Estragol en var. *carterae* no citada para la Argentina: USA.

Sin embargo, en el caso del quimiotipo I subtipo Ic, resulta apresurado afirmar que se trata de un mismo quimiotipo dado que no se cuenta con otros datos que confirmen esta conversión de un componente en otro, si bien el camino de biosíntesis indica la formación de Citral y Linalol a partir del mismo precursor:



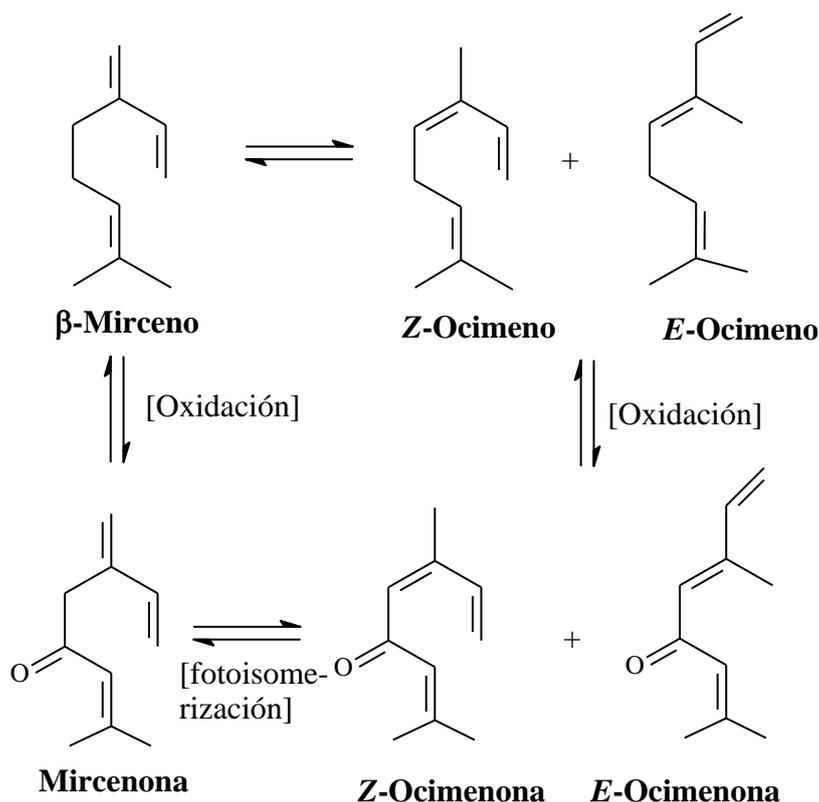
No sería desacertado incluir dentro de un mismo quimiotipo (Citral / Linalol) subtipos de acuerdo a la presencia mayoritaria de los componentes que lo definen. Sin embargo, en el caso del quimiotipo propuesto como **III**, con Limoneno / Carvona / Piperitona, la inclusión en un mismo subtipo (**IIIc**) de Carvona / Piperitona y Lippiona, también se podría justificar a partir del camino de biosíntesis de estos componentes, ya que también en este caso el precursor resulta el mismo para los tres constituyentes:



El quimiotipo Lippiona ha sido identificado originalmente en los trabajos de Fester *et al.*, en Argentina, mientras que en el caso del quimiotipo Carvona, no ha sido detectado en ninguna muestra proveniente de Argentina.

La posibilidad de existencia de un híbrido entre el quimiotipo **I** y el **III**, no está verificada tampoco, dado que es un solo caso en el que se verifica la existencia de Limoneno conjuntamente con Citral, de acuerdo a lo investigado por Tavares *et al.*, (2005) y según Fester *et al.*, (1961), se presentaron plantas en las cuales aparece Citral en el quimiotipo **III**. Sin embargo, dado que se trata de un monoterpeno acíclico y otro cíclico, es de esperar que el camino de biosíntesis, si bien incluye el mismo precursor (pifosfato de geranilo), implique enzimas diferentes, por lo que la suposición de híbridos entre ambos quimiotipos no resulta muy clara.

En el caso del quimiotipo **II**, la presencia de Mircenona, identificada en Argentina y simultáneamente en Guatemala demuestra efectivamente la aparición de un nuevo quimiotipo, caracterizado además por la presencia de los dos isómeros de las cetonas isómeras del componente principal: (*Z*) – Ocimenona y (*E*) – Ocimenona, de acuerdo a la posible interconversión de estos isómeros geométricos:



La presencia de Estragol, identificada en la variedad *carterae* de *Lippia alba*, ha sido establecida solamente en ejemplares provenientes de USA. Sin embargo, en Argentina y en Uruguay, no están reportadas variedades de *Lippia alba*, exceptuando un taxón dudoso: *Lippia alba* var. *globiflora* (L'Hér.) Moldenke (Zuloaga *et al.*, 1999).

Hennebelle *et al.* (2006), por otra parte, proponen la existencia de *morfotipos*, basados en trabajos de Matos (1996), en los cuales asocia la forma de las hojas con el quimiotipo Citral / Mirceno, sin haberse encontrado otras referencias (especialmente en los trabajos de Fester *et al.*, pionero en el estudio de esta especie) al respecto. Consideramos que la identificación de morfotipos, basados sólo en trabajos de este tipo, no son suficiente justificación dado que para poder correlacionar quimiotipos con formas de hojas, es necesario realizar un estudio estadístico de las hojas de *Lippia alba*, de cada uno de los quimiotipos, sobre todo conociendo la enorme variabilidad de la especie en lo referente a forma y composición.

### **Bibliografía:**

- Dewick, PM; 2002; “*Medicinal Natural Products. A biosynthetic approach*”; 2<sup>nd</sup> Ed. John Wiley & Sons. Ltd.: 157.
- Fester, G.A.; Martinuzzi, E.; Retamar, J. y Ricciardi, A.I.A.; 1955; *Revista de la Facultad de Ingeniería Química*; **24**: 37.
- Fester, G.A.; Retamar, J., Ricciardi, A.I.A. y Cassano, A.; 1961; *Revista de la Facultad de Ingeniería Química*; **30**: 5.
- Hennebelle, T.; Sahpaz, S.; Dermont, C.; Joseph, H. and Bailleul, F.; 2006; “*The essential oil of Lippia alba: Analysis of Samples from French Overseas Departments and Review of previous works*”; *Chemistry & Biodiversity*; **3**: 1116 – 1125.
- Matos, F.J.A.; 1996; *Rev. Bras. Farm.*; **77**: 137.
- Tavares, E.S.; Julião, L.S.; Lopes, D.; Bizzo, H.R.; Lage, C.L.S. y Leitão, S.G.; 2005; *Rev. Bras. Farmacogn.*; **15**: 1.
- Zuloaga, FG y Morrone, O; 1999; “*Verbenaceae*”. En Zuloaga, F. y Morrone, O. (eds.); “*Catálogo de las Plantas Vasculares de la República Argentina II*”; *Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.*; **74**: 1136-70.
  
- Mattos, AFJ; Machado, MIL; Craveiro, AA; Alencar, JW y de Abreu Mattos, FJ; 1996; “*Essential oil composition of two chemotypes of Lippia alba grown in northeast Brazil*”; *J. of Essent. Oil Res.*; **5**: 695-98. (Es el trabajo que identifican como Matos, FJA, de la Rev. Bras. Farm.,1996?????)