



**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**  
**FACULTAD DE FARMACIA**

**Usos etnofarmacológicos, evidencias y valoración científica de *Lippia origanoides* Kunt.**

**Especie utilizada en la medicina tradicional indígena americana.**



**ANTONIO JOSÉ PONCE VALLE**





UNIVERSIDAD DE SEVILLA



FACULTAD DE FARMACIA

**TRABAJO DE FIN DE GRADO**  
**GRADO DE FARMACIA**

**Usos etnofarmacológicos, evidencias y valoración científica de  
*Lippia origanoides* Kunt.**

**Especie utilizada en la medicina tradicional indígena americana.**

**Autor:** Antonio José Ponce Valle  
**Lugar y Fecha de presentación:** Sevilla, enero 2019  
**Departamento:** Farmacología  
**Tutora:** Ana María Quílez Guerrero  
**Tipología del proyecto:** Revisión bibliográfica

## Resumen

**Introducción:** Las comunidades indígenas de Centroamérica y Sudamérica han utilizado plantas medicinales con fines terapéuticos y sagrados basados en sus cosmovisiones. Colombia tiene una gran diversidad de flora, la cual constituye una fuente para la elaboración y empleo de fitomedicamentos para la Atención Primaria de Salud en comunidades indígenas. La OMS, en su programa de Estrategia sobre la Medicina Tradicional 2014-2023, está promoviendo el uso de esta terapia y su integración en los sistemas de salud nacionales. Pineda Research Center es un centro de investigación que se dedica a la investigación de plantas endémicas colombianas con el fin de introducirlas en comunidades indígenas. **Objetivos:** Mediante revisión bibliográfica conocer la información científica sobre *Lo* y sus evidencias de uso en la medicina tradicional indígena americana, para su posterior elaboración de fitomedicamentos y su integración en los sistemas sanitarios de salud con la colaboración de PRC. **Metodología:** A través de bases de datos como PubMed, Scielo, Scopus y Lilacs; así como libros y guías específicas se ha realizado la búsqueda de información. **Resultados:** El AE de *Lo* obtenido de sus hojas secas es la forma más estudiada, entre sus componentes mayoritarios destacan monoterpenos como timol y carvacrol. Las actividades farmacológicas que han sido valoradas para un uso en la medicina tradicional son: antioxidante, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiparasitaria y anticancerosa. **Conclusión:** *Lo* es una potencial fuente de recursos medicinales que puede ser útil como antioxidante y en el tratamiento de procesos infecciosos en Atención Primaria. Es necesario profundizar las investigaciones para las posibles aplicaciones en el tratamiento de la tuberculosis y el cáncer de mama.

**Palabras clave:** *Lippia origanoides*, medicina tradicional, aceite esencial, Colombia

## Abreviaturas

**ABTS:** 2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico

**AE:** Aceite Esencial

**BHA:** Butilhidroxianisol

**BHT:** Butilhidroxitolueno

***C. albicans:*** *Candida albicans*

**CMB:** Concentración mínima bactericida

**CMI:** Concentración mínima inhibitoria

**CL<sub>50</sub>:** Concentración letal al 50%

**DL<sub>50</sub>:** Dosis letal media

**DPPH:** 2,2-difenil-1-picrilhidracilo

***E. coli:*** *Escherichia coli*

**ELo:** Extracto de *Lo*

**IC<sub>50</sub>:** Concentración inhibitoria al 50%

***L. chagasi:*** *Leishmania chagasi*

***Lo:*** *Lippia origanoides Kunth*

**MRSA:** *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina

***M. tuberculosis:*** *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*

**ORAC:** Capacidad de absorción de los radicales de oxígeno

**PFU/mL:** Unidad de formación de placas por mililitro

**PRC:** Pineda Research Center

***S. aureus:*** *Staphylococcus aureus*

***S. cholerasuis:*** *Salmonella cholerasuis*

**SISPI:** Sistema Indígena de Salud Propia e Intercultural

**TEAC:** Actividad antioxidante equivalente a Trolox

***T. cruzi:*** *Trypanosoma cruzi*

**Vero:** Células de riñón de monos verdes africanos

**VFA:** Virus de la fiebre amarilla

## ÍNDICE

<b>1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Sistema Tradicional de medicina indígena americana .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Colombia. Comunidad Indígena Awá .....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023 .....</b>	<b>3</b>
<b>1.4 Pineda Research Center .....</b>	<b>3</b>
<b>2. Justificación y objetivos .....</b>	<b>4</b>
<b>3. Metodología .....</b>	<b>4</b>
<b>4. Resultados y discusión .....</b>	<b>5</b>
<b>4.1 Descripción y distribución geográfica de <i>Lippia origanoides</i> Kunth .....</b>	<b>5</b>
4.1.1 Uso tradicional.....	6
4.1.2 Composición .....	7
4.1.3 Actividades farmacológicas validadas .....	11
4.1.4 Toxicidad.....	22
4.1.5 Tabla resumen.....	24
<b>5. Conclusión.....</b>	<b>26</b>
<b>6. Anexo.....</b>	<b>27</b>
<b>7. Bibliografía.....</b>	<b>29</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Sistema Tradicional de medicina indígena americana

#### 1.1.1 Norte América

En la mayoría de los pueblos nativos norteamericanos se percibía a la enfermedad como la invasión de un espíritu o la introducción de un cuerpo extraño, entre otras causas, (Alonso, 2015) por lo que el curandero indígena o chamán trataba las enfermedades desde la dimensión física y la espiritual. Se realizaban ceremonias con cantos, bailes y otros rituales con la intención de expulsar las fuerzas negativas para que el paciente o su comunidad pudieran ser curados. Los primeros colonos aprendieron de estas prácticas nativas y con el tiempo adoptaron muchos de los remedios a base de plantas medicinales, que más tarde se incluyeron en la Farmacopea de los Estados Unidos. Dentro de la gran variedad de plantas medicinales podemos destacar la *Echinacea purpurea (L.) Moench* (Equinacea purpurea) y la *Hydrastis Canadensis L.* (Sello de oro).

Durante el siglo XX, con el desarrollo de la industria farmacéutica de síntesis el uso de plantas medicinales y sus preparados fueron objeto de mucho escepticismo por lo que su uso disminuyó. Se convirtieron principalmente en la materia prima de compuestos químicos para el desarrollo de la medicina.

Recientemente, el uso como complemento nutricional de las plantas medicinales y fitopreparados ha experimentado un auge importante en los Estados Unidos y Canadá (Gurib-Fakim A, 2006).

#### 1.1.2. Centro América y Sudamérica

Los diversos pueblos indígenas de Centro América y América del Sur, con culturas y cosmovisiones diferentes, conservan y transmiten el conocimiento y el uso de sus plantas nativas en sus sistemas de medicina tradicional. Además, han incorporado el conocimiento de las prácticas tradicionales de las comunidades negras provenientes de África, así como de los conquistadores e inmigrantes que traían su propia flora medicinal europea (Bernal y Mesa, 2014).

Algunas de las plantas endémicas más conocidas y usadas en la medicina tradicional de esta región son: *Cinchona pubescens Vahl* (quina), *Myroxylon balsamum (L.) Harms* (Bálsamo de Perú), *Erythroxylum coca Lam* (Coca)... Cuyos principios activos han sido modificados posteriormente sintéticamente o aislados para su introducción en la medicina convencional (Gurib-Fakim A, 2006).

El conocimiento y uso de las especies medicinales en algunas regiones es desconocida y no tiene, en muchos casos, bibliografía escrita. Es por ello necesario el rescate del saber etnomedicinal que posibilite la investigación, en las próximas décadas, de estas fuentes de nuevos fitomedicamentos

### 1.2 Colombia. Comunidad Indígena Awá.

Colombia tiene una extensión territorial de unos dos millones de km<sup>2</sup> y está ubicada en la esquina noroccidental de Sudamérica. Comprende cinco grandes regiones naturales: Caribe, Pacífico, Amazonia, Orinoquia y Andes, cada una de estas regiones se subdividen en zonas con estructuras ecosistémicas propias. Por lo que cuenta con una gran biodiversidad de flora y de las cuales muchas son endémicas (Romero et al., 2008).

Dentro de las numerosas especies vegetales que hay en Colombia, muchas de ellas tienen reconocida su empleo medicinal, sin embargo, no se conocen estudios que avalen estos usos.

En Colombia la población indígena, en la primera década del siglo XXI, es de un millón trescientas mil personas, lo que corresponde al 3.4 % de la población del país (Elí, 2010). Hay unos 87 grupos indígenas, nos centraremos en la comunidad indígena Awá por la utilidad, en su sistema tradicional de salud, de la especie objeto de este trabajo.

Los Awá viven entre la frontera de Colombia y Ecuador, en el lado colombiano están

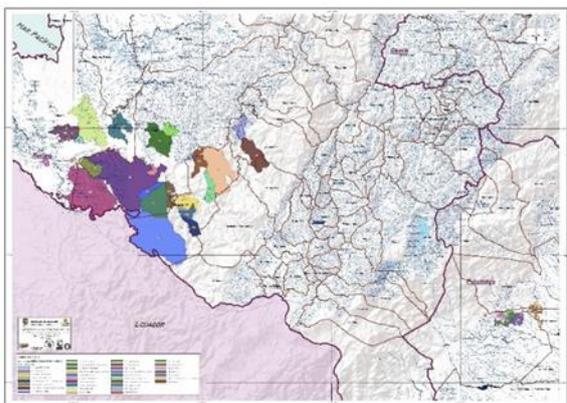


Figura 1 Mapa distribución de la comunidad Awá

asentado en el departamento de Nariño y del Putumayo. Su población es de unas 26000 personas según el censo nacional de 2005. Su lengua es Awapit, que pertenece a la familia lingüística Chibcha.

La cosmovisión y cultura Awá está estrechamente relacionada con la salud y su relación con la naturaleza y los sitios sagrados y siempre debe estar en armonía,

en caso de que este equilibrio se rompa, se produce la enfermedad en la persona o comunidad, considerando la medicina tradicional como la única validada para restaurar el equilibrio.

Los médicos tradicionales son los intermediarios entre las personas y el mundo espiritual, tienen una gran sabiduría ancestral que ha sido transmitida de generación en generación (Organizaciones de pueblo Awá Unipa et al, 2012).

### 1.3 Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023

La OMS define la medicina tradicional como “la suma total de los conocimientos, capacidades y prácticas basados en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas, bien sean explicables o no, utilizadas para mantener la salud y prevenir, diagnosticar, mejorar o tratar enfermedades físicas y mentales” (OMS, 2013).

La estrategia tiene como fin ayudar a los Estados a poder desarrollar políticas dinámicas e introducir planes de acción que refuercen la medicina tradicional en los servicios de salud. Se establecieron cuatro objetivos básicos que son:

- Política: Poder integrar la medicina tradicional en los sistemas nacionales de salud mediante la aplicación de programas y políticas nacionales sobre medicina tradicional.
- Seguridad, eficacia y calidad: Promover estos parámetros y ampliar la base de conocimientos.
- Acceso: Que sea accesible para todas las personas, y mejorar su disponibilidad.
- Uso racional: Promover el uso terapéutico racional de la medicina tradicional entre los profesionales y los pacientes.

Con estos objetivos se quiere dar sostenibilidad al uso de las plantas medicinales e integrarlos en la atención primaria de salud, sobre todo en comunidades indígenas.

### 1.4 Pineda Research Center

Es un centro de investigación, formación profesional y desarrollo en la domesticación de especies nativas, fomentando el cultivo y transformación de plantas aromáticas y medicinales para así poder introducirlas en el sistema tradicional de salud de comunidades indígenas.

Por otra parte, esta empresa colombiana lleva a cabo los servicios de consultoría, asesoría y formación para organizar, integrar, fomentar y fortalecer a los cultivadores y productores en la transformación, comercialización y exportación de plantas aromáticas y medicinales en Colombia. La especie *Lippia Origanoides Kunth (Lo)* figura entre sus especies seleccionadas por su amplio uso y sus buenas perspectivas terapéuticas.

## 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Brasil, Perú, Argentina, México figuran entre los principales países iberoamericanos que han incluido medicina tradicional indígena dentro de sus sistemas nacionales de salud (OMS,2013). Colombia en su Decreto 1848 de 2017 (Único Reglamentario del Sector Salud y Protección Social), incluye una sección sobre el sistema de habilitación de las entidades promotoras de salud indígena; con la cual se empieza la construcción de las políticas públicas en salud de los pueblos indígenas que dieron como resultado el Sistema Indígena de Salud Propia e Intercultural (SISPI).

Pineda Research Center (PRC) bajo el apoyo y supervisión del SISPI trabaja con la comunidad Awá para domesticar y elaborar preparados fitoterapéuticos de *Lo* que pueden ser de utilidad en el Sistema Atención Primaria.

Colaboraciones y contactos previos del autor y tutor del presente trabajo con el director de este centro motivaron los objetivos de esta investigación bibliográfica:

- Recopilar la información existente sobre la actividad farmacológica de la especie medicinal *Lo* que pueda validar las evidencias de uso recogidas en la medicina tradicional indígena americana
- Contribuir a través de la investigación realizada y en colaboración con PRC a la integración del uso racional de preparados fitoterápicos de *Lo* en el sistema sanitario de Colombia, especialmente en la Atención Primaria de las comunidades indígenas.



Figura 2 Logo de PRC.

## 3. METODOLOGÍA

Este trabajo de investigación y revisión bibliográfica se ha llevado a cabo bajo la consulta de las bases de datos PubMed, Scielo, Scopus, además de otra fuente bibliográfica más específica como Lilacs (base de datos de América Latina y Caribe). También se han revisado páginas de internet, artículos, textos científicos y libros. Esta búsqueda se inició el 20 de marzo de 2018 y terminó en el mes de enero del 2019.

La búsqueda general comenzó con los descriptores `` *Lippia origanoides Kunt*`` y ``medicina tradicional``. Posteriormente se añadieron `` aceite esencial``, ``infusion`` y `` chemical composition`` para la obtención de estudios más específico de la planta.

Los artículos revisados en total fueron 54, de los cuales 31 fueron relativos al aceite esencial y sus extractos para evaluar su posible uso en la medicina tradicional. Dentro de esta selección, los criterios de no inclusión fueron artículos anteriores al año 2001, porque es una especie que apenas ha sido estudiada. Otro de los criterios fue no seleccionar artículos relativos a ciencias veterinarias, biológicas y de ingeniería agrónoma; ya que no proporcionaban información práctica sobre *Lo* y su actividad farmacológica.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### 4.1 Descripción y distribución geográfica de *Lippia origanoides* Kunth (*Lo*)

Nombre científico: *Lippia Origanoides* Kunth

Nombre común: Orégano del monte (Colombia), Salva da marajó (Brasil)

*Lo* pertenece a la familia Verbenaceae, esta familia tiene una distribución geográfica tropical y subtropical, está compuesta de 91 géneros y 1900 especies. Todas tienen porte de hierbas, arbustos, lianas y árboles de pequeño tamaño. Esta especie se distribuye por el Caribe y norte de Sudamérica, es una



Figura 3 *Lippia Origanoides*. Fuente: Dr. José V. Pineda

planta neotropical.



Figura 4 *Lippia origanoides* en Colombia. Fuente: [www.gbif.org](http://www.gbif.org)

Tiene un porte de arbusto aromático que puede medir hasta 3,5 metros de altura, muy ramificada con ramas subredondeadas y con hojas opuestas decusadas. El tamaño de la hoja varía según el ambiente, aumentando en zonas más húmedas (6x3.5 cm) y disminuyendo en las más secas (5x3 mm). Las inflorescencias son axilares verticiladas, normalmente más cortas que la longitud de las hojas; las flores se presentan en cuatro series, imbricadas, de 4 mm de longitud, fragantes, de pétalos unidos, de color blanca, cáliz comprimido, ovado, bífido, fruto oblicuamente ovado y cubierto por el cáliz persistente. El

orégano del monte se extiende desde México a Brasil. En Colombia se encuentra en los departamentos de Nariño, Cauca, Magdalena, Cundinamarca, Santander, Norte de Santander y Guajira. Habita en terrenos con inclinación de 5 a 45 grados, desde terrazas aluviales hasta suelos entisoles poco desarrollados (Celis, A y col 2012).

#### 4.1.1 Uso tradicional

*Lo* es utilizada en países sudamericanos que componen la región amazónica como Brasil, Venezuela y Colombia, su uso en la medicina tradicional tiene distintas aplicaciones para el tratamiento de enfermedades respiratorias, en alteraciones menstruales y genitourinarias, y enfermedades gastrointestinales, además de ser usado como antiséptico para la boca, garganta y heridas. También es usado como condimento alimenticio en algunas zonas de México. La parte de la planta más utilizada son las hojas y su forma de uso en la medicina tradicional son infusión, decocción y lavados.

##### *Infusión*

Se emplea en el tratamiento contra dolores de estómago, indigestión, diarrea, náuseas, flatulencias, dolores menstruales, así como antiséptico oral. En México se usa en forma de infusiones para tos, cólicos, problemas renales, fiebre y enfermedades de las vías respiratorias. En Colombia *Lo* es utilizada en infusión para el tratamiento de la diarrea, como analgésico, antiinflamatorio y antipirético (Vazquez, 2012).

##### *Decocción*

La decocción de *Lo* es muy utilizada para dolores de estómago e indigestiones. En Venezuela, se usa la decocción para el estímulo del apetito (Pascual, 2001).

##### *Lavados*

Se emplea en forma de lavados vaginales para el tratamiento de inflamaciones de útero y para lavados posteriores a la menstruación en caso de que haya desordenes en el flujo vaginal. En embarazadas se ha usado para facilitar la evacuación de coágulos de sangre; esta forma de empleo es usada por mujeres pertenecientes a comunidades quilombolas de Oriximiná (Brasil) (Oliveira et al, 2014).

#### 4.1.2 Composición

El aceite esencial obtenido de sus hojas ha sido objeto de la mayoría de los estudios fitoquímicos cuantitativos.

En el aceite esencial extraído de hojas secas se han obtenido varios componentes mayoritarios como son timol, *p*-cimeno, mirceno y  $\gamma$ -terpineno. De los cuales el timol es el que presenta mayor concentración (73.7%). Este estudio se realizó con plantas endémicas de Alto Patía, entre los departamentos de Cauca y Nariño (Arango, 2012).

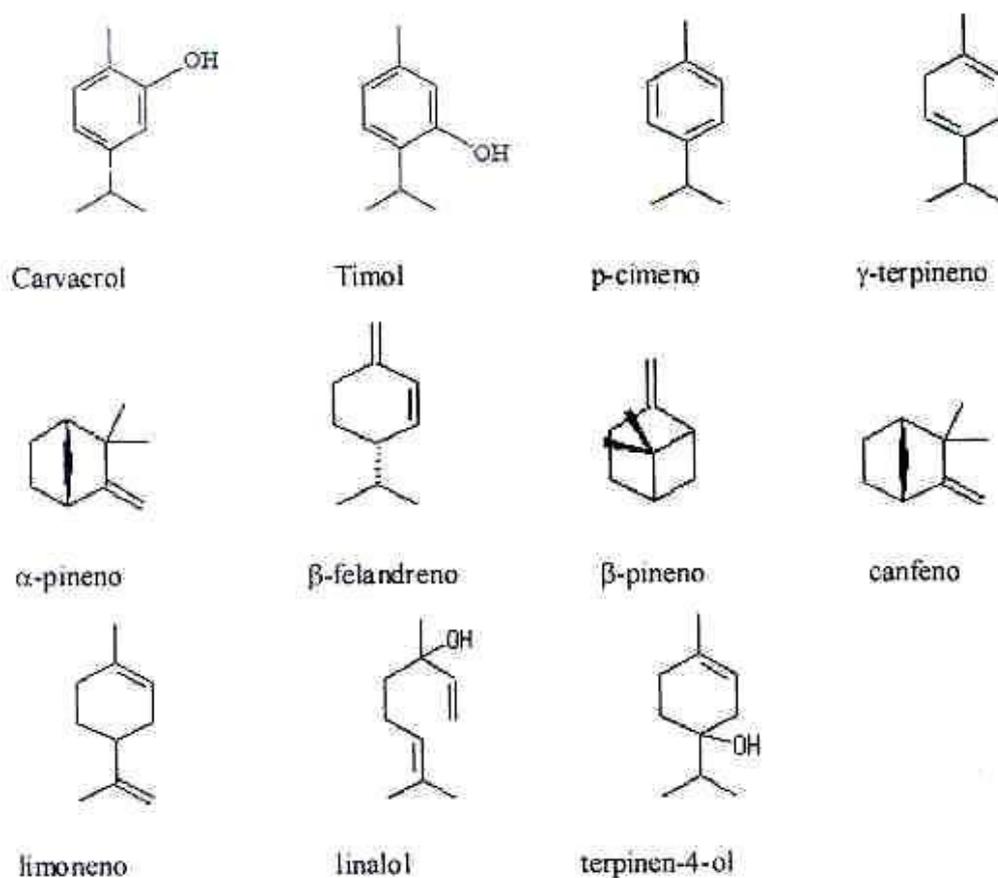
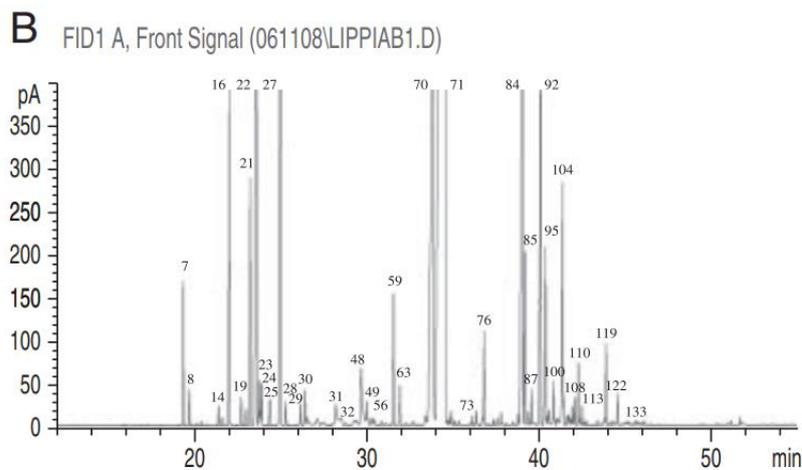
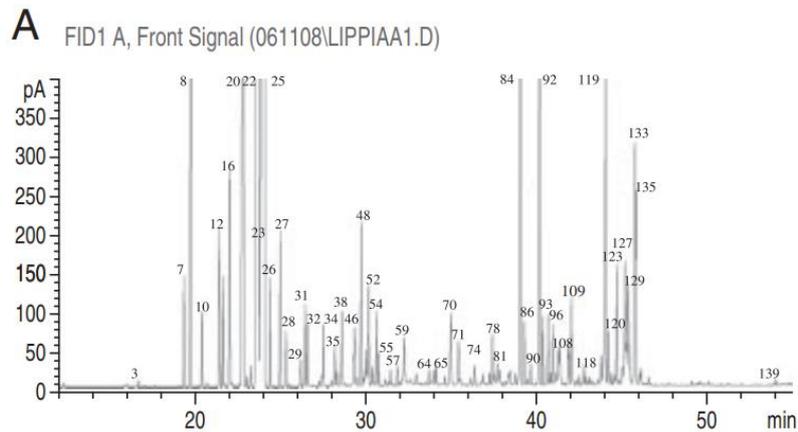


Figura 5 Componentes mayoritarios de *Lippia sp.* Imagen tomada de Arcila et al., 2004

En otro estudio realizado con *Lo* proveniente del estado de Pará (Brasil) el aceite esencial tenía un alto contenido de monoterpenos oxigenados y bajo contenido de monoterpenos hidrocarbonados, sesquiterpenos carbonados y oxigenados. Dentro de los monoterpenos fueron carvacrol y timol los de mayor concentración, con un 38.6 % y 18.5% respectivamente. Además, se obtuvieron monoterpenos como *p*-cimeno y  $\gamma$ -terpineno en concentraciones más bajas (Oliveira, 2007).

Además, mediante el estudio de aceite esencial de *Lo* procedentes de varias regiones de Colombia, se han determinado tres quimiotipos diferentes:

- Quimiotipo A: Está compuesto de terpenos hidrocarbonados, como monoterpenoides:  $\alpha$ -felandreno (8%) y  $\beta$ -felandreno (6%),  $p$ -cimeno (12%), limoneno (5%), y 1,8-cineol (4%), y sesquiterpenoides: trans- $\beta$ -cariofileno (9%),  $\alpha$ -humuleno (5%), oxido de cariofileno (3%), and  $\alpha$  y  $\beta$ -eudesmol. Tiene un olor cítrico fuerte. E
- Quimiotipo B: Sus componentes mayoritarios son carvacrol (40%),  $p$ -cimeno (13%),  $\gamma$ -terpineno (11%), y timol (11%). Tiene una fuerte fragancia a orégano. Este quimiotipo tiene una composición similar a *Lo* procedente de Brasil.
- Quimiotipo C: Posee un olor a orégano, tiene una concentración alta de timol (56%), después su contenido en  $p$ -cimeno y  $\gamma$ -terpineno son 9% y 5% respectivamente.



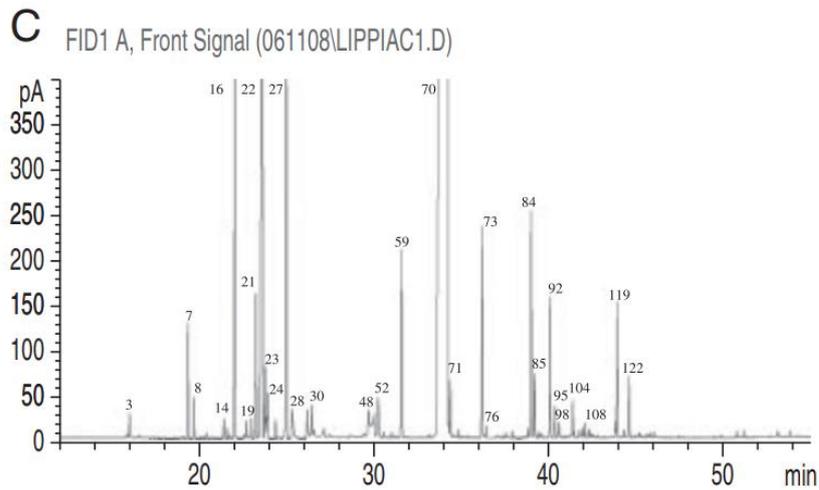
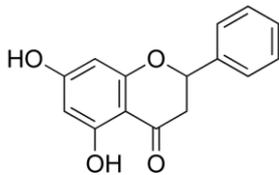


Figura 6 Cromatogramas de los diferentes quimiotipos de AE de *Lo* (Tomado de Stashenko et col, 2010)

El quimiotipo A contiene una flavanona, la pinocembrina, que no fue encontrada en los otros quimiotipos. Tiene propiedades antioxidantes y se usa como quimiopreventivo en el cáncer (Stashenko et al,2010).



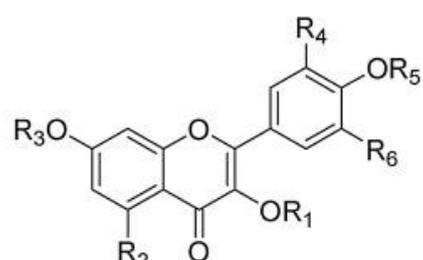
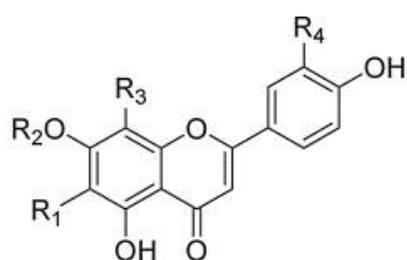
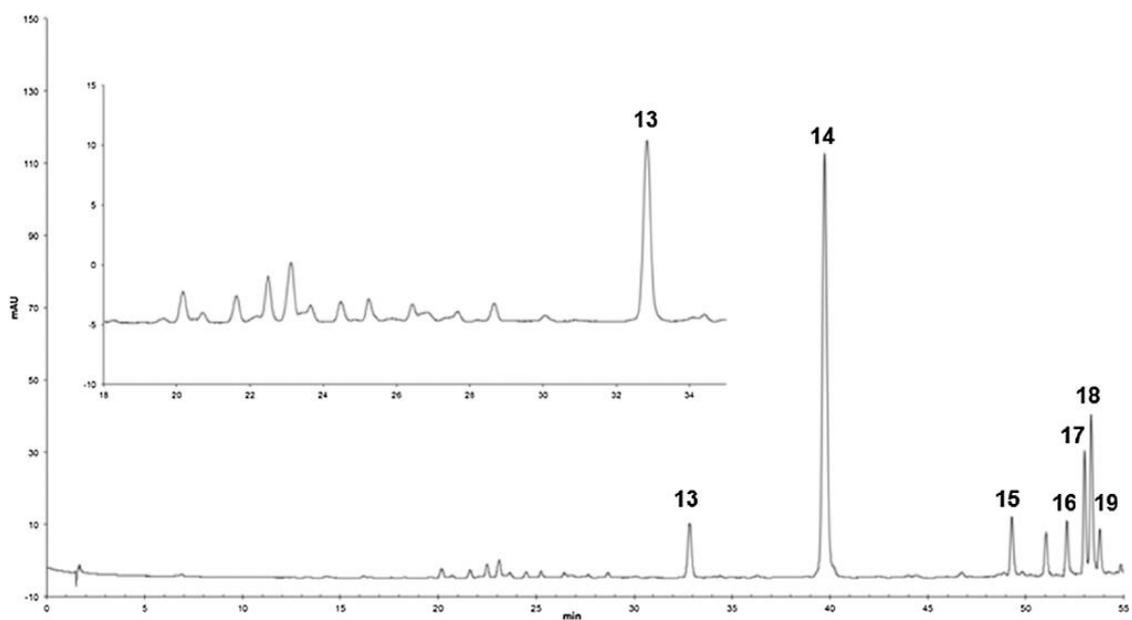
Pinocembrina

Figura 7 Imagen tomada de UNIIQUIM

Guimaraes et al (2017) realizaron un estudio sobre la composición del extracto etanólico de *Lo* procedente de Oriximiná (Brasil), en el cual recolectaron las partes aéreas en flor, posteriormente fue secado, extraído por percolación con etanol comercial y filtrado y concentrado bajo presión a 40°C.

El extracto etanólico fue analizado mediante HPLC-UV-HRMS<sup>n</sup> para la identificación de los compuestos mayoritarios, que fueron agliconas de flavonoides y terpenoides aromáticos. La mayor concentración de flavonoides correspondía a Eriodictiol, Naringenina, Pinocembrina, Ramnocitrina y Fisetina.

En la siguiente figura podemos observar el perfil cromatográfico que obtuvieron.



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
1	Hex	H	Hex	OH
2	Glc	H	Glc	H
4	H	H	Glc	OH
5	Glc	H	H	OH
7	H	H	Glc	H
9	Glc	H	H	H
10	H	Glc	H	OH

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>
6	H	H	Hex/H	OH	H/Hex	OH
11	Hex	H	H	OH	H	OH
12	H	OH	H	OH	Glu	H
15	H	OH	CH <sub>3</sub>	H	H	H
16	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H

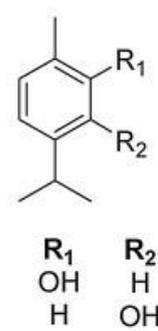
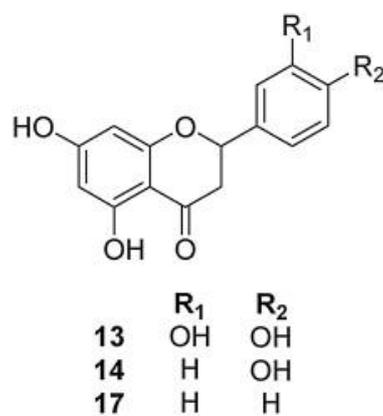
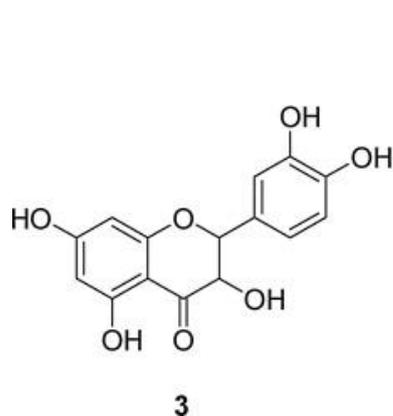


Figura 8 HPLC-UV (290 nm) Perfil cromatográfico del extracto etanólico de *Lo* (Tomada de Guimaraes et al, 2017)

Para más información sobre los compuestos véase Anexo.

#### 4.1.3 Actividades farmacológicas validadas

Se han realizado distintos ensayos farmacológicos sobre el aceite esencial de *Lo* que evidencian su actividad farmacológica. Seleccionaremos los que puedan validar los usos en Sistema de Medicina Tradicional Indígena y los relativos a su toxicidad.

- Antioxidante

Arango et al (2012) evaluaron la actividad antioxidante del aceite esencial de *Lo* mediante la capacidad de captura de radicales libres en ensayos con 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) y 2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico (ABTS) mediante métodos espectrofométricos comparado con antioxidantes sintéticos butilhidroxianisol (BHA) y butilhidroxitolueno (BHT). El intervalo de concentraciones del aceite esencial fue de 0.1- 8,97 mg mL<sup>-1</sup>.

En el ensayo de DPPH se obtuvo que la concentración necesaria para disminuir la concentración de DPPH inicial al 50% fue  $5,58 \pm 0,035$  mg AEO/mL DDPH. En el ensayo de ABTS se realizó una curva de calibrado con diluciones de concentración conocidas del patrón Trolox, en la cual con los datos obtenidos se determinó la concentración de antioxidante que da el mismo porcentaje de estabilización que 1 mM de Trolox. Los resultados se expresan en unidades TEAC (actividad antioxidante equivalente a Trolox). Con los datos del porcentaje de estabilización de radicales ABTS a diferentes concentraciones de aceite esencial a 1 min de reacción, se calculó el TEAC, obteniéndose 1,16 mg/mL; que equivale al mismo porcentaje de estabilización del radical ABTS\*+ que con 1 mM de Trolox.

El orden de actividad antioxidante según el método DPPH fue BHA, BHT, y AE de mayor a menor efecto; en cambio en el método ABTS resultó que AE tuvo mayor actividad respecto a BHA y BHT; como se muestra en la figura 9. Hay que resaltar que en ambos métodos la capacidad de estabilización de radicales libres del AE fue semejante en orden de magnitud a la de los antioxidantes sintéticos BHT y BHA.

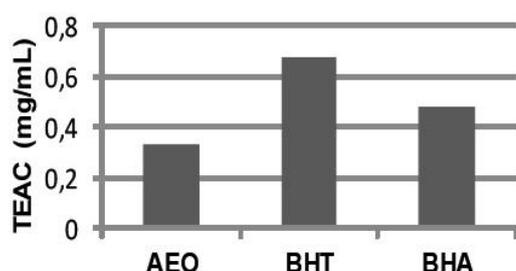


Figura 9 Actividad antioxidante de AE y antioxidantes sintéticos (Tomada de Arango et al, 2012)

En el estudio de Stashenko et al (2014) donde se realizó un estudio comparativo de la actividad antioxidante de los aceites esenciales de algunas plantas del género *Lippia* cultivadas en Colombia, la metodología usada fue TEAC y la capacidad de

absorción de los radicales de oxígeno (ORAC); el método TEAC ya fue descrito anteriormente.

El método ORAC mide la inhibición antioxidante de las oxidaciones inducidas por radicales peroxilo y, por lo tanto, refleja la actividad antioxidante de ruptura de la cadena radical clásica mediante la transferencia de átomos de hidrógeno. En el ensayo básico, el radical peroxilo reacciona con una sonda fluorescente para formar un producto no fluorescente, que se puede cuantificar fácilmente mediante fluorescencia (Prior et al, 2005). La capacidad antirradicalaria de las muestras fue determinada con base en mediciones frecuentes de la disminución de la fluorescencia.

Los métodos ORAC y ABTS se basan en mecanismos de atrapamiento o aniquilamiento de radicales en los cuales la fase fundamental es la transferencia protónica o electrónica, respectivamente.

Los resultados del estudio comparativo se muestran en la tabla 1, en la cual se aprecia que los AE ricos en fenilpropanoides (carvacrol y timol) tienen una actividad mayor que los demás AE, según los métodos usados. También se puede observar que tienen mayor actividad frente a los antioxidantes sintéticos como BHT y  $\alpha$ -tocoferol.

En cambio, el quimiotipo de *Lo felandreno* tiene valores más bajos al tener componentes mayoritarios como hidrocarburos mono y sesquiterpénicos (Stashenko et al, 2014).

Ambos estudios demuestran que *Lo* presenta una importante actividad antioxidante superior a la de los antioxidantes sintéticos, usados en productos comerciales, por lo que podría ser de utilidad como antioxidante natural en la industria.

Tabla 1 Valores de capacidad antioxidantes obtenidos por los métodos ORAC y TEAC para los AE de especies de *Lippia* y antioxidantes sintéticos. Tomada de Stashenko et al (2014)

Muestra	Métodos (promedio $\pm$ s, n = 3)	
	ORAC ( $\mu$ mol Trolox <sup>g</sup> / g sustancia)	ABTS <sup>+</sup> ( $\mu$ mol Trolox <sup>g</sup> / g sustancia)
AE de <i>L. graveolens</i>	3990 $\pm$ 58	5410 $\pm$ 48
AE de <i>L. citriodora</i>	3630 $\pm$ 40	41 $\pm$ 2
AE de <i>L. origanoides</i> (carvacrol)	3400 $\pm$ 120	5200 $\pm$ 109
AE de <i>L. origanoides</i> (timol)	2840 $\pm$ 72	5090 $\pm$ 42
AE de <i>L. micromera</i>	2050 $\pm$ 78	2750 $\pm$ 80
AE de <i>L. alba</i> (citrál)	2000 $\pm$ 77	24.8 $\pm$ 0.4
AE de <i>L. origanoides</i> (felandreno)	1820 $\pm$ 82	310 $\pm$ 2
AE de <i>L. alba</i> (carvona)	1340 $\pm$ 54	126.4 $\pm$ 0.7
AE de <i>L. americana</i>	1200 $\pm$ 27	239 $\pm$ 4
Carvacrol	3410 $\pm$ 50	4609 $\pm$ 6
Timol	3000 $\pm$ 103	5700 $\pm$ 125
<i>trans</i> - $\beta$ -cariofileno	2800 $\pm$ 109	N.D.
$\gamma$ -Terpineno	1766 $\pm$ 8	N.D.
$\alpha$ -Felandreno	1040 $\pm$ 18	136 $\pm$ 3
$\alpha$ -Tocoferol	550 $\pm$ 13	2429 $\pm$ 7
BHT	457 $\pm$ 9	4760 $\pm$ 23
1,8-Cineol	299 $\pm$ 5	N.D.
<i>p</i> -Cimeno	219 $\pm$ 2	N.D.

N.D. : No se observó disminución en la coloración

- Antibacteriana

Hay varios estudios sobre la actividad antibacteriana de *Lo* frente a bacterias como *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (MRSA), *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Salmonella sp.*

Andrade et al (2014) realizó un estudio sobre la actividad antibacteriana de *Lo* frente a *E. coli*, *S. aureus* y *Salmonella cholerasuis* (*S. cholerasuis*). En el ensayo de sensibilidad antimicrobiana se usaron concentraciones de AE de 30 µL/mL, 60 µL/mL y 120 µL/mL. Los resultados que se muestran en la figura 10, demuestran que con la concentración de 120 µL/mL es eficaz para inhibir el crecimiento de estos microorganismos.

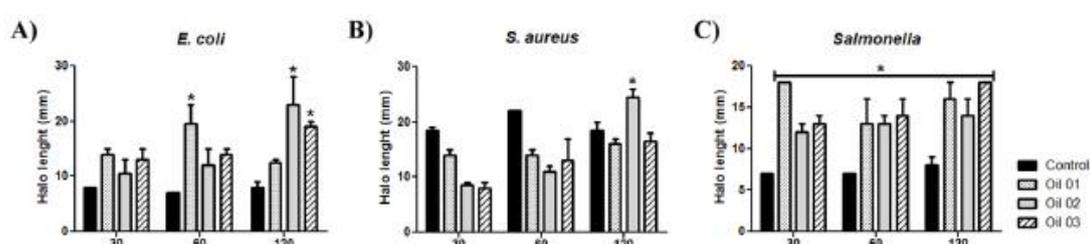


Figura 10 Test de sensibilidad de *Lo* a *E. coli*, *S. aureus* y *S. cholerasuis*. Tomada de Andrade et al (2014)

En el estudio realizado por Betancour et al (2012) se compara la composición y la actividad bactericida de varias especies incluyendo a *Lo*. Se determinó la concentración mínima bactericida (CMB) frente a bacterias patógenas y beneficiosas para el organismo cuyos valores figuran en la siguiente tabla.

Tabla 2 CMB (mg/mL) de AE frente a bacterias patógenas y beneficiosas. Tomada de Betancour et al (2012)

Essential oils	Pathogenic Bacteria			Beneficial Bacteria	
	<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13078	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	<i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700
Carvacrol	0.098	0.098	0.006	3.125	1.560
<i>O. vulgare</i> L. ssp. <i>hirtum</i>	0.098	0.390	3.125	6.250	6.250
<i>O. majorana</i>	1.560	3.125	6.250	12.500	3.125
<i>O. vulgare</i> L.	0.780	0.780	3.125	1.560	3.125
<i>L. origanoides</i>	0.098	1.560	0.780	3.125	50.000

Como se observa en la tabla 2, *Lo* presenta una buena actividad bactericida frente a las bacterias patógenas y una baja actividad frente a las bacterias beneficiosas.

En otro estudio con *Lo* se pone de manifiesto que no hay influencias climáticas durante doce meses en el AE de *Lo* quimiotipo carvacrol; y tampoco en la actividad antibacteriana frente a *E. coli* y *S. aureus* (Sarrazin et al, 2015).

Oliveira et al (2007) realizaron un trabajo en el que determinan la actividad antimicrobiana de *Lo* frente a diversos microorganismos, utilizando como antibióticos de referencia vancomicina y meticilina. En la tabla 3, observamos como el AE de *Lo* inhibe el crecimiento de todos los microorganismos usados en el ensayo. Además, frente a algunos microorganismos posee mayor actividad antibacteriana que el antibiótico de referencia.

Tabla 3 Zona de inhibición de crecimiento de microorganismos en mm (Adaptada de Oliveira et al, 2007)

Microorganismos	Diámetro de halo de inhibición (mm)		
	AE de <i>Lo</i>	Vancomicina	Meticilina
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b> <b>ATCC 25923</b>	25	21	20
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b> <b>MRSA (BMB9393)</b>	25	18	08
<b><i>Lactobacillus casei</i></b> <b>ATC 4646</b>	20	10	15
<b><i>Streptococcus mutans</i></b> <b>ATCC 25175</b>	26	10	10

Medeiros Barreto et al (2014), realizaron un estudio donde utilizaron extractos de *Lo* para ver la actividad antibacteriana sola y en combinación con otros antibióticos frente a MRSA. En los ensayos se comprobó que los extractos de *Lo* frente a MRSA no tuvieron actividad antibacteriana, ya que se obtuvo una CMI de 1024  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (una CMI por debajo de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se considera con buena actividad inhibitoria, entre 100-500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  presenta una actividad moderada y valores superiores a 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  tiene una actividad débil).

En cambio, cuando los extractos de *Lo* se añadieron a los antibióticos neomicina y amikacina se obtuvieron valores de CMI más bajos, como se pueden observar en las siguientes figuras.

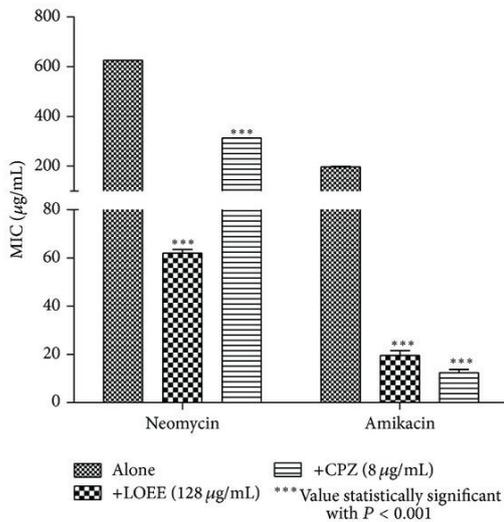


Figura 11 Valores de CMI en ausencia y presencia de extracto etanólico de *Lo* y clorpromazina frente a MSRA (SA10) Tomada de Medeiros Barreto et al (2014)

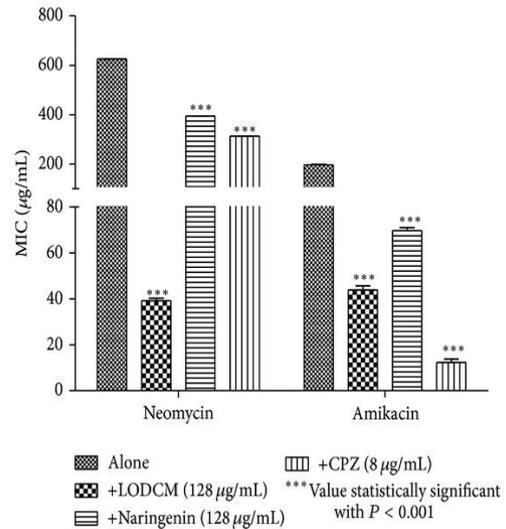
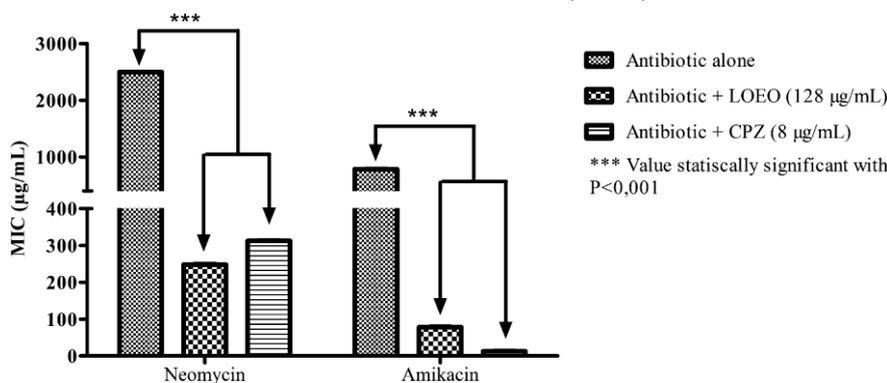


Figura 12 Valores de CMI en ausencia y presencia de extracto de *Lo* con diclorometano y clorpromazina frente a MSRA (SA10) Tomada de Medeiros Barreto et al (2014)

En este caso, los extractos de *Lo* potencian la actividad de neomicina y kanamicina frente a MRSA in vitro, lo cual puede estar relacionada por la baja polaridad de sus componentes. Estos aminoglucósidos han sido usados en el tratamiento inicial de endocarditis causada por bacterias Gram positivas, incluida MRSA; pero la alta resistencia de las bacterias y sus reacciones adversas ha hecho que su uso en clínica ha disminuido.

Estos resultados obtenidos permiten que *Lo* pueda ser una fuente de metabolitos secundarios para ser utilizados en asociación con neomicina y kanamicina para el tratamiento de infecciones causadas por MRSA (Medeiros Barreto et al, 2014).

En un estudio posterior Medeiros Barreto et al (2014) estudiaron los efectos de AE de *Lo* en la resistencia de aminoglucósidos frente a MRSA (SA10), en el cual se observó que el AE de *Lo* no tiene actividad inhibitoria frente a MRSA pero que cuando se combina con un antibiótico



como neomicina y kanamicina se obtienen valores más bajos de CMI, como se observa en la figura 13.

Figura 13 Valores de CMI en ausencia y presencia de AE de *Lo* y clorpromazina frente a MSRA (SA10) Tomada de Medeiros Barreto et al (2014)

Este estudio demostró una gran evidencia en el efecto sinérgico de AE de *Lo* en combinación con antibióticos aminoglucósidos frente a MRSA, por lo que puede ser una fuente de metabolitos secundarios para el uso de politerapia en el tratamiento de infecciones causadas por MRSA y de esta forma disminuir las resistencias causadas con otros antibióticos (Medeiros Barreto et al, 2014).

Bueno-Sánchez et al (2009) estudiaron la actividad antituberculosa de once plantas medicinales de Colombia, de las cuales en el estudio había tres muestras de AE de *Lo*, de diferentes zonas del país; en los resultados que obtuvieron dos de las muestras tenían una actividad moderada frente a *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* (*M. tuberculosis*) (Bueno-Sánchez et al, 2009a).

En otro estudio realizado por Bueno-Sánchez et al (2009) comprobaron la actividad antimicobacteriana de diferentes terpenos, la cual fue evaluada mediante la determinación de CMI frente a *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* y *Mycobacterium chelonae MNT 1407*. De los 17 monoterpenos usados, carvacrol y timol fueron los que tuvieron una CMI más baja (125 µg/mL frente *M. tuberculosis* y 250 µg/mL frente *M. chelonae*). Posteriormente ensayaron la actividad bactericida mediante el ensayo de curvas de letalidad usando isoniazida como control. Se obtuvo que timol tenía actividad bactericida frente a *M. tuberculosis* (Bueno-Sánchez et al, 2009b).

Una vez revisada la actividad antibacteriana de *Lo*, observamos que el AE de *Lo* puede ser utilizado para algunas infecciones ya que presenta una buena efectividad frente a diversos microorganismos. Además, puede ser usado en combinación con antibióticos mejorando la resistencia frente a estos y protegiendo la flora bacteriana.

- Antifúngica

Dos Santos et col (2004) realizaron un estudio para determinar la actividad antimicótica de AE de *Lo* frente a *Candida albicans* (*C. albicans*) y *Candida tropicalis*, en el cual la actividad fue medida con el diámetro de la zona inhibitoria de crecimiento, en el que un diámetro menor de 10 mm corresponde a una débil actividad. Usaron muestras de tres zonas diferentes de Brasil, y todas ellas mostraron los siguientes resultados que se aprecian en la tabla 4. Por lo que se observa su actividad antifúngica frente a estos organismos.

Tabla 4 Evaluación microbiológica de AE de Lo. OECAB, OECAM y OEFRE son aceites esenciales procedentes de Cabeceiras, Campo Maior and José de Freitas. Adaptada de Dos Santos et al (2004).

Diámetro de halo de inhibición en mm			
Microorganismos	OECAB	OECAM	OEFRE
<i>Candida albicans</i>	23	23	25
<i>Candida tropicalis</i>	27	30	28

En otro estudio realizado por Tangarife-Castaño et col (2011) estudiaron la actividad de varias plantas colombianas frente a tres cepas de *C. albicans*, usaron como metodología la determinación de CMI y la concentración inhibitoria al 50% (IC<sub>50</sub>).

En la siguiente tabla observamos cómo *Lo* quimiotipo B destaca con unos resultados de CMI e IC<sub>50</sub> donde muestra su alta actividad fúngica frente a *C. albicans*. En este caso *Lo* quimiotipo B tiene como componentes mayoritarios timol (43.8%) y carvacrol (17.3%) que explica la actividad antimicrobiana.

Tabla 5 CMI e IC<sub>50</sub> de AE y extractos activos frente a *C albicans*. Tomada de Tangarife-Castaño et col (2011)

Plant	Voucher specimen	Sample	GM - MIC (µg/ml)			IC50 (M ± SD)	R2
			<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	<i>C. albicans</i> (Clinical isolate)	Vero ATCC CCL-81	
<i>Lippia alba</i> 007	484650	Oil	*	353.6	420.4	32.8 ± 3.6	0.89
<i>Lippia organoides</i>	512271	Oil	396.9	500	500	52.3 ± 11.5	0.8
<i>Lippia organoides</i>	512075	Oil	250	250	315	74.6 ± 16.9	0.75
<i>Lippia organoides</i>	512075	Oil	500	500	500	60.4 ± 11.2	0.83
<i>Piper bredemeyeri</i> Jacq.	516939	Oil	157.5	176.8	222.7	15.2 ± 3	0.81
<i>Turnera aff. diffusa</i> Willd. ex Schult.	516293	Oil	*	353.6	500	52.2 ± 5.2	0.93
<i>Lippia organoides</i> Kunth (A)	517741	Oil	500	500	500	31.4 ± 5.6	0.75
<i>Lippia organoides</i> Kunth (B)	517741	Oil	157.5	157.5	198.4	31.4 ± 5.6	0.75
<i>Lippia organoides</i> Kunth (C)	517741	Oil	500	396.9	396.9	34.4 ± 5.9	0.76
<i>Morinda royoc</i> L.	512222	Extract	250	250	250	≥200	NA
<i>Piper hispidum</i> Sw.	519969	Oil	250	280.6	250	51.7 ± 9.3	0.8
<i>Lippia organoides</i>	512087	Oil	500	500	500	104.4 ± 5.9	0.98
<i>Cymbopogon citratus</i>	531013	Oil	*	500	500	≥200	NA

\* MIC > 500 µg/ml; R<sup>2</sup>: linear regression coefficient; NA: not applicable.

Betancur-Galvis et al (2011) realizaron un estudio de la actividad antifúngica de AE de *Lo* frente a varias especies de *Candida* y *Aspergillus*. Se usaron nueve AE, de los cuales el quimiotipo más activo fue timol frente a *Aspergillus fumigatus* y *Candida parapsilosis*.

Con estos resultados, llegaron a la conclusión que el AE de *Lo* puede ser usado para aspergilosis y otras infecciones causadas por hongos (Betancur-Galvis et al, 2011).

En otro estudio Oliveira et al (2007) realizaron análisis de la actividad fungicida de AE de *Lo* de varias especies de *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophytum rubrum* y *Fonsecaea pedrosoi*. La metodología empleada fue antibiograma usando anfotericina B como control. En la siguiente tabla se observan los valores obtenidos.

Tabla 6 Zona de inhibición de crecimiento de microorganismos en mm (Adaptada de Oliveira et al, 2007)

Microorganismos	Diámetro de halo de inhibición (mm)	
	AE de <i>Lo</i>	Anfotericina B
<b><i>Candida albicans</i> Serotype B ATCC 36802</b>	25	20
<b><i>Candida albicans</i></b>	27	16
<b><i>Candida guilliermondii</i></b>	40	24
<b><i>Candida parapsilosis</i></b>	35	18
<b><i>Cryptococcus neoformans</i> T<sub>1</sub>-444 Serotype A</b>	24	20
<b><i>Trichophytum rubrum</i> T544</b>	30	20
<b><i>Fonsecaea pedrosoi</i> 5VPL</b>	40	18

Los resultados obtenidos muestran la alta actividad que tiene el AE frente a anfotericina B en todos los microorganismos.

Tras revisar la actividad antifúngica del AE de *Lo*, comprobamos su alta efectividad frente a diferentes hongos, por lo que podría ser usado como fitomedicamento en patologías causadas por estos microorganismos. De esta forma, se podría evitar el uso de antibióticos sintéticos y disminuir las resistencias provocadas por estos en tratamientos a largos plazos.

- Antiviral

Meneses et al (2009) realizaron un estudio del efecto inhibitorio del virus de la fiebre amarilla de AE de plantas colombianas mediante replicación in vitro. La metodología empleada fue mediante el cultivo de células de riñón de monos verdes africanos (Vero) en placas durante 24 horas, posteriormente se suspendió el virus en el medio y fue incubado durante 1 hora. El recuento de título fue expresado en unidad de formación de placas por mililitro (PFU/mL).

El efecto inhibitorio del virus de la fiebre amarilla (VFA) fue comprobado mediante la disminución de crecimiento del virus ensayado. La concentración del virus fue de  $9.5 \times 10^4$  PFU/mL y se incubó con concentraciones de AE (100, 33.3, 11.1 y 3.7  $\mu\text{g/mL}$ ) durante 24 horas. El CMI obtenido de AE de *Lo* fue 3.7  $\mu\text{g/mL}$ .

Posteriormente ampliaron el tiempo de incubación de VFA en presencia de AE durante 48 horas, y obtuvieron que AE de *Lo* a la concentración de 11.1  $\mu\text{g/mL}$  redujo completamente el crecimiento del virus.

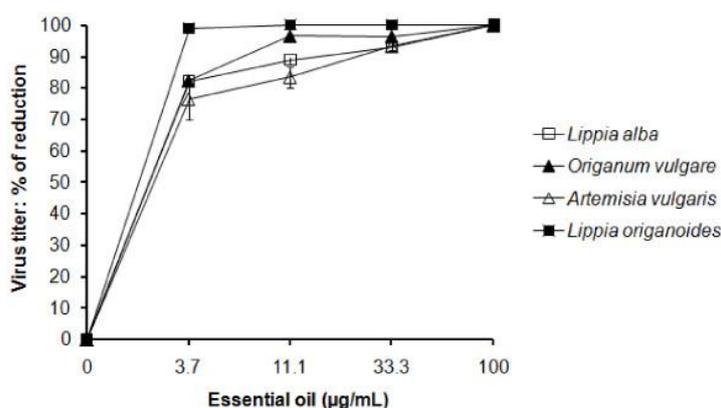


Figura 14 Porcentaje de reducción de título de VFA en varias concentraciones de AE (Tomada de Meneses et al (2009))

Con estos datos obtenidos Meneses et al llegaron a la conclusión de que el AE de *Lo* tiene un efecto inhibitorio frente a VFA, y que el uso tópico del AE podría ser útil en la prevención de infección del virus por la picadura del mosquito (Meneses et al, 2009).

- Antiparasitaria

Hay varios estudios que se han realizado para evaluar la actividad del AE frente a formas intracelulares de *Leishmania chagasi* (*L. chagasi*) y *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). También existen estudios sobre los efectos del AE frente al mosquito *Aedes aegypti*, mosquito vector de enfermedades como el dengue y de la fiebre amarilla.

Escobar et al (2010) realizaron un estudio de la actividad antiprotozoaria de varias especies de *Lippia sp* frente a formas libres e intracelulares de *L. chagasi* y *T. cruzi*. La metodología empleada fue mediante el cultivo de estas especies en sus distintas formas (epimastigotes y amastigotes de *T. cruzi* y promastigotes de *L. chagasi*) y posteriormente se

añadió diluciones de AE y fármacos de referencia como nifurtimox y anfotericina B durante 72 horas a 28°C. Para el cultivo de amastigotes, se usaron células Vero infectadas por tripomastigotes de *T. cruzi*.

La actividad antiparasitaria fue expresada como la concentración para inhibir el crecimiento parasitario al 50% (IC<sub>50</sub>). Los datos relativos al AE de *Lo* se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 7 Concentración inhibitoria al 50% de AE de *Lo*. Adaptada de Escobar et al (2010)

List of selected plants and anti-protozoal and mammalian cell activities							
Species	Voucher	Collection place	Yield %	µg/mL			
				<i>Trypanosoma cruzi</i>		<i>Leishmania chagasi</i>	
				Epimastigotes IC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	Amastigotes IC <sub>50</sub>	Promastigotes IC <sub>50</sub>	
13	<i>Lippia origanoides</i>	516290	Santander, Piedecuesta	4.4	9.9	50.5	13.7
14		512271	Santander, Jordán Sube	3.6	19.7	77.5	63.2
15		512270	Santander, Jordán Sube	1.0	40.1	> 100	> 100
16		512087	Cauca, Mercaderes	2.0	10.7	> 100	4.4
17		512075	Santander, Bucaramanga	1.5	32.8	53.0	16.0
18		516294	Santander, Los Santos	1.5	7.8	94.4	> 100

Con los datos obtenidos se observa que algunas muestras de AE de *Lo* son activos frente a epimastigotes de *T. cruzi* (13 y 18), amastigotes de *T. cruzi* (13 y 17) y promastigotes de *L. chagasi* (16) (Escobar et al, 2010).

Raposo et al (2012) en su estudio, estudiaron la actividad tripanocida de AE pertenecientes a plantas del noroeste de Brasil, entre las que se encuentra *Lo*, frente a *T. cruzi*. La metodología empleada fue mediante el estudio de IC<sub>50</sub> de epimastigotes y de la concentración letal al 50% (CL<sub>50</sub>) de tripomastigotes. Se usaron diluciones de AE de 15.6 a 250 µg/mL. Posteriormente fueron determinados estos parámetros mediante recuento celular en cámara de Neubauer, previamente cultivados durante 48 y 24 horas respectivamente.

En la figura número 15 se observa que *Lo* presenta mejor actividad inhibitoria del crecimiento de epimastigotes, en cambio tiene una baja actividad letal frente a

tripomastigotes. Los autores del trabajo llegaron a la conclusión que el AE de *Lo* puede ser un candidato para posibles nuevos tratamientos frente a la enfermedad de Chagas.

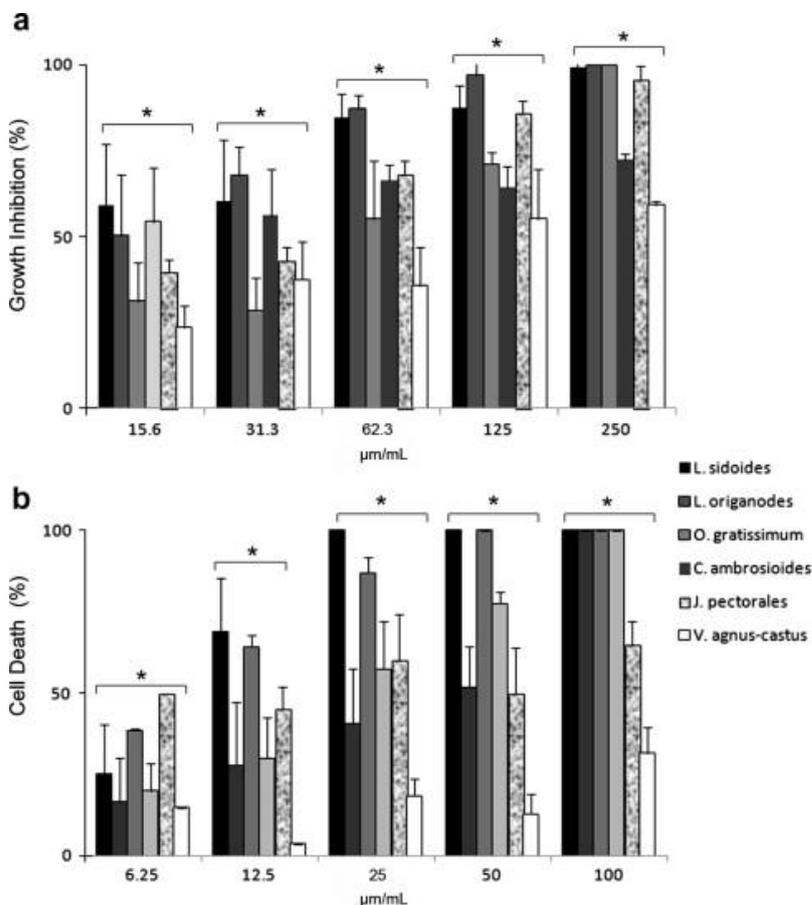


Figura 15 IC50 y LC50 de los AE de las plantas estudiadas. Tomada de Raposo et al (2012)

Castillo et al (2017) examinaron la actividad repelente e insecticida de varias plantas frente al mosquito *Aedes aegypti*, entre las cuales estaba *Lo*. Evaluaron la actividad pupicida, adulticida y repelente de AE de distintas plantas. Entre todas las especies estudiadas, el AE de *Lo* mostró una gran actividad pupicida. Además, fue capaz de matar a todos los mosquitos adultos expuestos durante 120 min a una dosis de 300 ppm. En otro ensayo demostró una gran efectividad repelente a una concentración de 1000 ppm durante 2 minutos de exposición sobre la piel. Por lo que los autores llegaron a la conclusión de que podía ser efectivo como posible repelente.

En otro estudio Vera et al (2014) estudiaron la actividad insecticida de AE de diversas plantas frente a la larva de *Aedes aegypti*. En el estudio el AE de *Lo* obtuvo una actividad moderada.

- Anticancerosa

Raman et al (2017) realizaron un estudio con un extracto hidroalcohólico de *Lo* que induce la detención del ciclo celular y apoptosis, además suprime células NF-kB señalizadas en células de cáncer de mama triple negativo. El extracto de *Lo* (E*Lo*) procedente de la sumidad aérea de la planta fue disuelto en metanol en una concentración de 50 mg/mL.

En el estudio usaron líneas celulares de cáncer de mama triple negativo (MDA-MB-231 y CRL-2321) y células epiteliales mamarias (MCF10A) para su cultivo y posterior uso en diferentes ensayos, como la evaluación de la detención del ciclo celular y apoptosis mediante citometría de flujo y la activación de la caspasa-3/7 midiendo la intensidad fluorescente.

Los resultados obtenidos son:

- El E*Lo* disminuye la viabilidad de las células MDA-MB-231 en un 50% a una dosis de 0.15 mg/mL y con una dosis de 0.2 mg/mL en un 95%. En las células MCF10A con las mismas dosis usadas se obtiene un 20 y 40 % respectivamente.
- El E*Lo* induce detención en las fases S y G0/G1 del ciclo celular a una dosis de 0.15mg/mL.
- El E*Lo* induce activación de la apoptosis via caspasa-8/-3.

Estos mismos autores, han realizado recientemente un estudio donde determinan la actividad del mismo extracto frente al proteoma de células MDA-MB-231, con el objeto de obtener el efecto que produce en el metabolismo mitocondrial de las células MDA-MB-231. Se observa que E*Lo* interrumpe la función mitocondrial inhibiendo el metabolismo en estas líneas celulares tumorales (Raman et al, 2018).

Estos estudios recientes pueden promover el inicio de una nueva línea de investigación para la búsqueda de nuevos componentes procedentes de *Lo* que sean útil en la terapia contra el cáncer.

#### 4.1.3 Toxicidad

- Toxicidad aguda

Hernandes et al (2017) realizaron un estudio sobre el AE de *Lo* con el fin de evaluar la eficacia y seguridad para su uso como conservante en productos industriales. La toxicidad aguda fue determinada midiendo la dosis letal media (DL<sub>50</sub>), la cual usaron 54 ratones albinos machos que fueron divididos en seis grupos. A cada grupo le administraron por vía oral una dosis de 1000, 2000, 3000, 3300,3600 y 4000 mg.kg<sup>-1</sup> de AE preparado en solución salina. Al

grupo control se le administró la solución salina. Los animales fueron observados durante 24 horas.

La  $DL_{50}$  obtenida fue  $3.548 \text{ mg.Kg}^{-1}$  animal de AE, de los cuales el 26.28% de AE corresponde a carvacrol, la  $DL_{50}$  es de  $922.48 \text{ mg.Kg}^{-1}$ . Estos datos están dentro de los parámetros de no toxicidad de acuerdo con los criterios de la Unión Europea, los cuales consideran valores iguales o menores de  $25 \text{ mg.Kg}^{-1}$  (Hernandes et al, 2017).

Andrade et al (2014) evaluaron la toxicidad aguda del AE de *Lo*, usando 20 ratas Wistar, que estaban divididas en cuatro grupos. A cada grupo se le administró una dosis de 0 (grupo 1 ó control), 30 (grupo 2), 60 (grupo 3) y 120 mg/Kg (grupo 4) de AE de *Lo*. Estas dosis corresponden a concentraciones similares que usaron en el análisis microbiológico. El ensayo tuvo una duración de catorce días, los cuales fueron monitorizados cada 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h y 8 h después de la administración de la dosis.

Después de este periodo, se obtuvieron muestras macroscópicas e histopatológicas de hígado, corazón y pulmones. Estas muestras no mostraron daños en los órganos, ni alteraciones en los test hematológicos realizados. Por lo que Andrade et al llegaron a la conclusión de que el AE de *Lo* no tiene efectos tóxicos.

- Toxicidad Crónica

En el estudio anterior también evaluaron la toxicidad crónica del AE de *Lo* basado en el protocolo 452/2001 de la OECD, en el cual usaron una única dosis de 120 mg/Kg. Para el estudio utilizaron el mismo número de animales y fue dividido en cuatro grupos, uno de ellos era control (se le administró solución salina). Se recogieron muestras de sangre el día previo al comienzo del ensayo, el día 15 y 30. Además el día 30 se obtuvieron muestras histopatológicas de corazón, hígado y riñones.

En las muestras obtenidas no se observaron daños ni anormalidades en los órganos. En el análisis hematológico sólo se apreció un cambio significativo en el volumen corpuscular medio y en la hemoglobina corpuscular media. Con estos resultados Andrade et al llegaron a la conclusión de que el AE de *Lo* a la dosis de 120 mg/Kg administrado durante 30 días no tiene efectos tóxicos (Andrade et al, 2014).

#### 4.1.4 Tabla resumen

Tabla 8 Resumen de las actividades farmacológicas validadas.

Actividad Farmacológica	Tipo de muestra empleada	Metodología del ensayo	Resultados	Referencias
Antioxidante	AE	DPPH y ABTS	Activo	Arango et al (2012)
	AE	ABTS y ORAC	Activo	Stashenko et al (2014)
Antibacteriana	AE	Sensibilidad antimicrobiana Concentraciones: 30, 60 y 120 µL/mL	Activo a 120 µL/mL frente a <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> y <i>S. cholerasuis</i>	Andrade et al (2014)
	AE	CMB	Activo frente a bacterias patógenas y no activo a beneficiosas	Betancour et al (2012)
	AE	Sensibilidad antimicrobiana, vancomicina y meticilina como control	Activo a <i>S. aureus</i> , MRSA, <i>S. mutans</i> y <i>L. casei</i>	Oliveira et al (2007)
	Extracto etanólico y extracto con diclorometano	CMI	No activo frente a MRSA; activo en combinación con antibióticos	Medeiros Barreto et al (2014)
	AE	CMI	No activo frente a MRSA; activo en combinación con antibióticos	Medeiros Barreto et al (2014)
	AE	CMI	Actividad moderada frente a <i>M. tuberculosis</i>	Bueno-Sánchez et al (2009)

Tabla 8. Cont.

<b>Antifúngica</b>	AE	CMI	Activo frente a <i>C. albicans</i> y <i>Candida tropicalis</i>	Dos Santos et col (2004)
	AE	CMI e IC <sub>50</sub>	Activo frente a <i>Candida albicans</i>	Tangarife-Castaño et col (2011)
	AE	CMI e IC <sub>50</sub>	Activo frente a <i>Aspergillus fumigatus</i> y <i>Candida parapsilosis</i>	Betancur-Galvis et al (2011)
	AE	Sensibilidad antimicrobiana, anfotericina B como control	Activo frente a <i>Candida sp</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Trichophytum rubrum</i> y <i>Fonsecaea pedrosoi</i>	Oliveira et al (2007)
<b>Antiviral</b>	AE	CMI e IC <sub>50</sub>	Activo a 3.7 µg/mL frente a VFA.	Meneses et al (2009)
	AE	IC <sub>50</sub>	Activos frente a epimastigotes y amastigotes de <i>T. cruzi</i> y promastigotes de <i>L. chagasi</i>	Escobar et al (2010)
	AE	IC <sub>50</sub> y CL <sub>50</sub>	Activo frente a epimastigotes y no activo frente a tripomastigotes	Raposo et al (2012)
	AE	Bioensayos de mortalidad de diferentes estadios	Actividad repelente frente a mosquitos a 1000 ppm durante 2 min de exposición	Castillo et al (2017)
<b>Anticancerosa</b>	Extracto hidroalcohólico	Evaluación de la detención del ciclo celular y apoptosis; activación de las caspasas	Activo	Raman et al (2017)

## 5. CONCLUSIONES

- Las actividades farmacológicas validadas en el AE de las hojas de *Lippia organoides Kunth* (antibacteriana, antifúngica, antiparasitaria y antiviral) constatan que esta especie es un importante recurso medicinal para el Sistema de Atención Primaria en comunidades indígenas y por ello, susceptible de inclusión en el Sistema Nacional de Salud en países sudamericanos.
- Es necesario fomentar el estudio del uso de extractos acuosos e hidroalcohólicos de la hoja de *Lo* debido: a los ensayos promisorios encontrados frente a líneas celulares de cáncer de mama triple negativo (MDA-MB-231 y CRL-2321) y al amplio empleo tradicional detectado en diversas enfermedades en diferentes comunidades sin validaciones farmacológicas realizadas.
- La realización de ensayos clínicos con el AE de *Lo* es útil para la optimización de la posología, formulación y forma farmacéutica para la fabricación de fitomedicamentos con actividad antioxidante, antimicrobiana y antiparasitaria.
- La actividad mostrada frente a *M. tuberculosis* tanto del AE de *Lo*, quimiotipo timol, como de los dos terpenos mayoritarios que lo integran (timol y carvacrol), insta a la investigación de *Lippia organoides Kunth* en el posible tratamiento coadyuvante de la tuberculosis.

## 6. ANEXO

Datos de componentes detectados en extracto crudo en UHPLC-HRMS y flavonoides ricos en fracciones 15-16 HSCCC de *Lippia origanoides*. Adaptada de Guimaraes et al (2017).

N	RT (min)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	Formula Molecular	Error (ppm)	MS <sup>n</sup> product ions (m/z, rel abundance)	Compuesto
1	17.7	609.1427	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	-4.0	(-)-MS <sup>2</sup> : 591 (6), 519 (23), 489 (100), 471 (7), 429 (7), 399 (19), 369 (16)	Luteolin-6,8-diC-hexoside
2	19.7	593.1474	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	-4.2	(-)-MS <sup>2</sup> : 575 (18), 503 (35), 473 (100), 383 (28), 353 (50)	Apigenin-6,8-diC-glucoside <sup>a</sup>
3	21.7	303.0490	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	-2.8	(-)-MS <sup>2</sup> : 285 (100), 177 (10)	Taxifolin <sup>a</sup>
4	22.5	447.0904	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	-4.0	(-)-MS <sup>2</sup> : 357 (42), 327 (100); (+)-MS <sup>2</sup> : 431 (100), 413 (34), 395 (8), 383 (26), 353(8), 329 (17); (+)-MS <sup>3</sup> (449 → 329): 300 (100), 259 (12), 137 (8)	Orientin
5	23.2	447.0902	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	-4.0	(-)-MS <sup>2</sup> : 429 (11), 357 (46), 327 (100); (+)-MS <sup>2</sup> : 431 (100), 413 (24), 395 (18), 383 (67), 353(31), 329 (29); (+)-MS <sup>3</sup> (449 → 329): 311 (100), 300 (25), 283 (95)	Isoorientin <sup>a</sup>
6	23.6	463.0853	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	-4.0	(-)-MS <sup>2</sup> : 301 (100) (-)-MS <sup>3</sup> (463 → 301):165 (22), 137 (9), 135 (9)	Robinetin-7(or 4')- O-hexose
7	24.5	431.0953	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	-4.2	(-)-MS <sup>2</sup> : 341 (8), 311 (100); (+)-MS <sup>2</sup> : 415 (100), 397 (37), 367 (28), 337 (8), 313 (18); (+)-MS <sup>3</sup> (433 → 313): 284 (100), 243 (10)	Vitexin <sup>a</sup>
8	25.3	623.1946	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>15</sub>	-4.0	(-)-MS <sup>2</sup> : 461 (100)	Verbascoside <sup>a</sup>
9	26.5	431.0954	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	-4.2	(-)-MS <sup>2</sup> : 413 (9), 341 (24), 311 (100); (+)-MS <sup>2</sup> : 415 (100), 397 (27), 379 (20), 367 (68), 337 (31), 313 (26); (+)-MS <sup>3</sup> (433 → 313): 295 (100), 284 (15), 267 (89)	Isovitexin <sup>a</sup>
10	26.7	447.0904	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	-4.0	(-)-MS <sup>2</sup> : 285 (100)	Luteolin-7-O-glucoside <sup>a</sup>
11	27.3	463.0853	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	-4.0	(-)-MS <sup>2</sup> : 301 (70), 300 (100) (-)-MS <sup>3</sup> (463 → 301):165 (35), 137 (12), 135 (9)	Robinetin-3-O-hexose

Anexo. Cont.

12	30.2	463.0853	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	-4.0	(-)-MS2: 301 (100); 300 (25) (-)-MS3 (463 → 301): 179 (100), 151 (72)	Quercetin-4'-O-glucoside <sup>a</sup>
13	32.9	287.0542	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	-3.0	(-)-MS2: 151 (100), 135 (4)	Eriodictyol
14	39.7	271.0591	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	-3.7	(-)-MS2: 177 (25), 151 (100), 119 (6)	Naringenin <sup>a</sup>
15	49.3	299.0541	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	-3.1	(-)-MS2: 284 (100) (-)-MS3 (299 → 284): 137 (54), 150 (14)	Rhamnocitrin
16	52.2	313.0698	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	-2.4	(-)-MS2: 298 (100), 283 (3); (-)-MS3 (313 → 283): 163 (7), 135 (1)	3',4'- dimethoxyfisetin
17	53.1	255.0645	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	-2.8	(-)-MS2: 213 (100), 211 (28), 187 (16), 151 (24), (103 (3)	Pinocembrin <sup>a</sup>
18	53.4	151.1121 <sup>b</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	-2.6	-	Carvacrol
19	53.8	151.1123 <sup>a</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	-3.9	-	Thymol <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Comparado con estándares de referencia.

<sup>b</sup> Corresponde con [M+H]<sup>+</sup> iones.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- ACTUALIZACIÓN PLAN DE SALVAGUARDA ÉTNICA DEL PUEBLO AWÁ. Nariño y Putumayo; 2012.
- Andrade V, Almeida A, Souza D, Colen K, Macêdo A, Martins E et al. Antimicrobial activity and acute and chronic toxicity of the essential oil of *Lippia origanoides*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2014;34(12):1153-1161.
- Arango BO, Pantoja DD, Santacruz CL, Hurtado B. AM. Actividad antioxidante del aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides h.b.k*) del Alto Patía. *rev.bio.agro* [internet]. 2012 dec [cited 2018 oct];10(2):79-86. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=s169235612012000200010&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s169235612012000200010&lng=en).
- Arcila-Lozano CC, Loarca-Piña G, Lecona-Urbe S, González de Mejía E. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *ALAN* [Internet]. 2004 Mar [citado 2018 Sep 25];54(1):100-111. Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S000406222004000100015&lng=es](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000406222004000100015&lng=es).
- Bernal, HY y Mesa, C. (2014), Plantas medicinales endémicas de Colombia, 476 registros, En línea, [http://ipt.sibcolombia.net/sib/resource.do?r=puj\\_002](http://ipt.sibcolombia.net/sib/resource.do?r=puj_002), publicado el 11/06/2014.
- Betancur-Galvis L, Zapata B, Baena A, Bueno J, Ruíz-Nova C. A, Stashenko EE et al. Antifungal, cytotoxic and chemical analyses of essential oils of *Lippia origanoides* H.B.K grown in Colombia. *Rev. Univ. Ind. Santander. Salud* [Internet]. 2011 Aug [cited 2018 Nov 16]; 43(2): 141-148. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S012108072011000200005&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012108072011000200005&lng=en).
- Betancourt L, Phandanavong V, Patiño R, Ariza-Nieto C y Afanador-Téllez G. (2012). Composition and bactericidal activity against beneficial and pathogenic bacteria of oregano essential oils from four chemotypes of *Origanum* and *Lippia* genus. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 59(1), 21-31. Retrieved November 01, 2018, from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S012029522012000100003&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012029522012000100003&lng=en&tlng=en).
- Bueno-Sánchez JG, Martínez-Morales JR, Stashenko EE. Actividad antimicobacteriana de terpenos. *Rev. Univ. Ind. Santander. Salud* [Internet]. 2009b Dec [cited 2018 Dec 28]; 41(3): 231-235.

- Bueno-Sánchez JG, Martínez-Morales JR, Stashenko EE, Ribón W. Anti-tubercular activity of eleven aromatic and medicinal plants occurring in Colombia. *Biomédica* [Internet]. 2009a Mar [citado 2018 Nov 12];29(1):51-60. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S012041572009000100008&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012041572009000100008&lng=en).
- Castillo RM, Stashenko EE y Duque JE. (2017). Insecticidal and Repellent Activity of Several Plant-Derived Essential Oils Against *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 33(1), 25–35. doi:10.2987/16-6585.1
- dos Santos F, Lopes J, Cito A, de Oliveira E, de Lima S, Reis F. Composition and Biological Activity of Essential Oils from *Lippia organoides* H.B.K. *Journal of Essential Oil Research*. 2004;16(5):504-506.
- Elí Izquierdo J. *Pueblos Indígenas de Colombia*. Edición Libre; 2010
- Escobar P, Milena Leal S, Herrera Laura V, Martinez Jairo R, Stashenko EE. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* sp essential oils and their major components. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* [Internet]. 2010 Mar [cited 2018 Nov 20]; 105(2):184-190.
- Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2013.
- Hernandez C, Pina E, Taleb-Contini S, Bertoni B, Cestari I, Espanha L, Varanda E, Camilo K, Martinez E, França S y Pereira A. (2017), *Lippia organoides* essential oil: an efficient and safe alternative to preserve food, cosmetic and pharmaceutical products. *J Appl Microbiol*, 122: 900-910. doi:10.1111/jam.13398
- Guimaraes Leitão S, Guimarães Leitão G, K.T. Vicco D, Barreto Pereira JP, de Moraes Simão G, Oliveira DR, Celano R, Campone L, Piccinelli AL, Rastrelli L. Counter-current chromatography with off-line detection by ultra high performance liquid chromatography/high resolution mass spectrometry in the study of the phenolic profile of *Lippia organoides* (2017). *Journal of Chromatography A*, Volume 1520, 83-90,0021-9673. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.09.004>.
- Gurib-Fakim A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*. 2006;27(1):1-93.

- Oliveira D, Leitão G, Bizzo H, Lopes D, Alviano D, Alviano C et al. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* H.B.K. *Food Chemistry*. 2007;101(1):236-240.
- Oliveira D, Leitão G, Fernandes P, Leitão S. Ethnopharmacological studies of *Lippia organoides*. *Rev. bras. farmacogn.* [Internet]. 2014 Apr [cited 2018 Nov 16]; 24(2): 206-214. Disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102695X2014000200206&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102695X2014000200206&lng=en). <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2014.03.001>.
- ONIC - Awá [Internet]. ONIC. [Consultado en enero de 2019]. Disponible en: <http://www.onic.org.co/pueblos/112-awa>
- Medeiros Barreto H, de Lima I, Coelho K, Osório L, de Almeida Mourão R, Santos B et al. Effect of *Lippia organoides* H.B.K. essential oil in the resistance to aminoglycosides in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Integrative Medicine*. 2014;6(5):560-564.
- Medeiros Barreto H, Cerqueira Fontinele F, Pereira de Oliveira A, et al. Phytochemical prospection and modulation of antibiotic activity in vitro by *Lippia organoides* H.B.K. in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:305610.
- Meneses R, Ocazonez RE, Martínez JR, Stashenko EE. Inhibitory effect of essential oils obtained from plants grown in Colombia on yellow fever virus replication in vitro. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2009; 8:8. Publicado 2009 Mar 6. doi:10.1186/1476-0711-8-8
- Pascual M, Slowing K, Carretero E, Sánchez Mata D, Villar A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology*. 2001;76(3):201-214.
- Pinto C, Rodrigues V, Pinto F, Pinto R, Uetanabaro A, Pinheiro C et al. Antimicrobial Activity of *Lippia* Species from the Brazilian Semiarid Region Traditionally Used as Antiseptic and Anti-Infective Agents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013; 2013:1-5.
- Prior R, Wu X, Schaich K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005;53(10):4290-4302.
- Raman V, Fuentes Lorenzo JL, Stashenko EE, Levy M, Levy MM, Camarillo IG. *Lippia organoides* extract induces cell cycle arrest and apoptosis and suppresses NF- $\kappa$ B signaling in triple-negative breast cancer cells. *Int J Oncol*. 2017;51(6):1801-1808.

- Raman V, Aryal UK, Hedrick V, Ferreira RM, Lorenzo JLF, Stashenko EE, Camarillo IG. (2018). Proteomic analysis reveals an extract of the plant *Lippia organoides* suppresses mitochondrial metabolism in triple-negative breast cancer cells. *Journal of Proteome Research*. doi:10.1021/acs.jproteome.8b00255.
- Raposo Borges A, Ramos de Albuquerque Aires J, Maciel Higino TM, Freire de Medeiros M. G., Lopes Citó A. M. G., Dantas Lopes J. A., Bressan Queiroz de Figueiredo, R.C. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil, 2012. *Experimental Parasitology*, Vol 132, Issue 2, 2012, 123-128, 0014-4894, <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.06.003>.
- Sarrazin SL, da Silva LA, de Assunção AP, Oliveira RB, Calao VY, da Silva R, Stashenko EE, Maia JG, Mourão RH. Antimicrobial and seasonal evaluation of the carvacrol-chemotype oil from *Lippia organoides* kunth. *Molecules*. 2015 Jan 23;20(2):1860-71. doi: 10.3390/molecules20021860.
- Stashenko E, Martínez J, Durán D, Córdoba Y, y Caballero D. Estudio comparativo de la composición química y la actividad antioxidante de los aceites esenciales de algunas plantas del género *Lippia* (Verbenaceae) cultivadas en Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 2014 Nov 28.
- Stashenko EE, Martínez JR, Ruíz CA, Arias G, Durán C, Salgar W y Cala M. (2010), *Lippia organoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. *J. Sep. Science*, 33: 93-103. doi:10.1002/jssc.200900452
- Tangarife-Castaño V, Correa-Royero J, Zapata-Londoño B, Durán C, Stanshenko E, Mesa-Arango A. Anti-*Candida albicans* activity, cytotoxicity and interaction with antifungal drugs of essential oils and extracts from aromatic and medicinal plants. *Infectio*. 2011;15(3):160-167.
- Vásquez Carreño, DR (2012) El orégano de monte (*Lippia organoides*) del Alto Patía: efecto del método de obtención de sus extractos sobre la composición y la actividad antioxidante de los mismos. Maestría thesis, Universidad Nacional de Colombia.
- Vera SS, Zambrano DF, Méndez-Sánchez SC, Rodríguez-Sanabria F, Stashenko EE y Duque Luna JE (2014). Essential oils with insecticidal activity against larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 113(7), 2647–2654. doi:10.1007/s00436-014-3917-6