



*REVISIÓN DE LITERATURA SOBRE LAS PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS DEL ACEITE
ESENCIAL DE LIPPIA ALBA CONTRA MICROORGANISMOS PATÓGENOS CAUSANTES DE
ENFERMEDADES EN HUMANOS.*

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA
TRABAJO DE GRADO
BOGOTA D.C JUNIO 2019.



*REVISIÓN DE LITERATURA SOBRE LAS PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS DEL ACEITE
ESENCIAL DE LIPPIA ALBA CONTRA MICROORGANISMOS PATÓGENOS CAUSANTES DE
ENFERMEDADES EN HUMANOS.*

Presentado por:

DIANA MARCELA CHARFUELAN LAGUNA

Asesor:

JOVANNA ACERO GODOY MSc.

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA BACTERIOLOGÍA

BOGOTÁ D.C JUNIO DE 2019

DEDICATORIA

A mi hija Luciana Isabella por ser el motor que me impulsa a superarme y ser cada día mejor, a mis padres por ser unos papás incondicionales que pesar de las circunstancias siempre estuvieron ahí apoyándome, a mis hermanas por ser las mejores concejeras y comprensivas, sin el apoyo de ustedes hoy no hubiera sido posible llegar hasta este punto. Mil gracias por todo, los amo con toda mi alma. Y a todas las personas que de alguna u otra forma me han acompañado durante este proceso.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios en primera instancia por darme la fuerza y la sabiduría para poder culminar esta etapa, a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca quien nos brindó excelentes docentes y quienes con sus conocimientos supieron hacer de nosotros hoy en día unos profesionales íntegros. Agradezco a mi Asesora Jovana Acero Godoy por ser la persona quien dedicó su tiempo durante este proceso Y a todos familiares, amigos y compañeras gracias por su apoyo.

TABLA DE CONTENIDO.

	Pág
RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN.....	9
OBJETIVOS.....	12
1. ANTECEDENTES.....	13
2. MARCO TEORICO.....	20
2.1 Generalidades de <i>Lippia alba</i>	20
2.1.1 Descripción Botánica.....	21
2.1.2 Etapas de floración.....	22
2.1.3 Distribución geográfica.....	24
2.1.4 Condiciones de Cultivo.....	25
2.1.5 Condiciones de Cosecha.....	25
2.2 Generalidades del Aceite esencial.....	27
2.2.1 Características químicas de los Aes.....	28
2.2.2 Factores que afectan la composición química.....	29
2.2.3 Quimiotipos del Aes de <i>Lippia alba</i> en Colombia.....	30
2.2.4 Quimiotipos del Aes de <i>Lippia alba</i> en otros países.....	31
2.3 Métodos de Extracción.....	33
2.3.1 Destilación por arrastre de vapor de agua.....	33
2.3.2 Destilación con agua o hidrodestilación.....	34
2.3.3 Destilación de agua – vapor o vapor húmedo.....	34
2.3.4 Hidrodestilación asistida por microondas (MWHD).....	35
2.3.5 Extracción con fluido supercrítico.....	35
2.3.6 Otros métodos de extracción.....	35
2.4 Métodos de Susceptibilidad.....	36
2.4.1 Difusión en agar.....	36
2.4.2 Pruebas para detección de concentración mínima inhibitoria.....	37

2.4.2.1	Microdilución en caldo.....	37
2.4.2.2	Macrodilución en caldo.....	37
2.4.2.3	Dilución en agar.....	38
2.4.3	Otros. Método E test.....	38
2.5	Aplicaciones del Aes de <i>Lippia alba</i>	39
2.5.1	Actividad antibacteriana del Aes de <i>Lippia alba</i>	39
2.5.2	Actividad antifungica del Aes de <i>Lippia alba</i>	40
2.5.3	Actividad antiviral del Aes de <i>Lippia alba</i>	40
2.5.4	Actividad antiprotozoaria del Aes de <i>Lippia alba</i>	41
3.	METODOLOGIA.....	43
3.1	Tipo de investigación.....	43
3.2	Población de estudio.....	43
3.3	Métodos.....	43
4.	RESULTADOS.....	46
5.	DISCUSIÓN.....	58
6.	CONCLUSIONES.....	64
	REFERENCIAS BIBLIGRAFICAS.....	65

LISTA DE FIGURAS

	Pág
FIGURA N°1. Planta de <i>Lippia alba</i>	21
FIGURA N°2. Botón floral etapa I.....	22
FIGURA N°3. Botones en floración etapa II.....	23
FIGURA N°4. Botones en floración etapa III.....	24
FIGURA N°5. Distribución geográfica del quimiotipo de <i>L. alba</i>	25
FIGURA N°6. Esquejes de <i>L. alba</i>	26
FIGURA N°7. Clasificaciones de los aceites esenciales	27
FIGURA N°8. Destilador del Aceite esencial de <i>L. alba</i>	34
FIGURA N°9. Montaje de hidrodestilación	35
FIGURA N°10. Esquema sugerido de Macrodilución en caldo	37
FIGURA N°11. Principales temáticas de la Actividad antimicrobiana del Aes de <i>L. alba</i>	44
FIGURA N°12. Número artículos consultados en la revisión clasificados por País.....	45
FIGURA N°13. Número de Artículos consultados por año de publicación.....	45

LISTA DE TABLAS

	Pág.
TABLA N°1. Taxonomía de <i>Lippia alba</i>	20
TABLA N°2. Grupos funcionales de cada categoría.....	29
TABLA N°3. Composición química de los Aes de regiones de Colombia	30
TABLA N°4. Principales componentes del Aes de <i>L. alba</i>	32
TABLA N°5. Material documental seleccionado.....	46
TABLA N°6 Resumen de Microorganismos evaluados con actividad antimicrobiana y su respectiva concentración mínima inhibitoria.	52
TABLA N°7 Composición química del Aceite esencial de <i>Lippia alba</i>	54
TABLA N° 8 Comparación entre los principales compuestos químicos aislados por cuatro métodos diferentes de extracción.....	59



REVISIÓN DE LITERATURA SOBRE LAS PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS DEL ACEITE ESENCIAL DE *LIPPIA ALBA* CONTRA MICROORGANISMOS PATÓGENOS CAUSANTES DE ENFERMEDADES EN HUMANOS.

RESUMEN

Los aceites esenciales en la actualidad han demostrado tener muchas propiedades beneficiosas entre ellas, actuar como antioxidantes, antibacterianos, antifúngicos, antiparasitarios, antivirales e insecticidas. *Lippia alba* es una especie de planta aromática perteneciente a la familia de las Verbenáceas. El objetivo de esta revisión es recopilar información acerca de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Lippia alba* utilizada como fármaco biológico y la concentración mínima inhibitoria utilizada contra patógenos que causan afecciones en seres humanos.

Para tal fin se buscó información que demostrase la acción antimicrobiana del aceite esencial por medio de métodos de susceptibilidad convencionales y clasificar su acción antimicrobiana de acuerdo al microorganismo enfrentado y la concentración mínima inhibitoria (MIC) reportada hasta el momento contra patógenos estudiados. De igual forma se busca recopilar los estudios realizados acerca de la composición de los tres quimiotipos, el primero (A) caracterizado por su alto contenido de carvona (41 %) y limoneno (36%) el segundo quimiotipo (B) con alto contenido citral (54 %)y trans B-cariofileno (8%) y el tercero quimiotipo (C) denominado “hibrido” rico en carvona (25%), limoneno (22%) y citral (21%), reportados en Colombia.

El resultado de la literatura consultada establece que existen propiedades antimicrobianas contra bacterias, hongos, parásitos, e insectos con concentraciones mínimas inhibitorias que dependen en su mayoría por la composición del aceite esencial y a su vez por factores ambientales durante

la cosecha, pos cosecha y método de extracción inciden en la composición del aceite esencial de *Lippia alba*.

Palabras claves: *Lippia alba*, Aceite esencial, actividad antimicrobiana, concentración mínima inhibitoria.

Estudiante: Diana Marcela Charfuelan Laguna

Docente: Jovanna Acero Godoy

Institución: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Junio 2019

INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos volátiles, principalmente terpenoides, que forman parte del metabolismo secundario de las plantas. Muchos extractos y aceites esenciales de origen natural han mostrado ser bioactivos in Vitro e in Vivo, por lo que se justifica la investigación enfocada a la actividad antimicrobiana de estos vegetales². Por su parte, el aceite esencial de *Lippia alba* además de presentar propiedades, antiespasmódicas, estomáquicas, sudoríficas entre otras, se ha caracterizado por presentar actividad antimicrobiana contra bacterias como: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella choleraesuis* y hongos como *Cándida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida dubliniensis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Cryptococcus grubii*, *Cryptococcus gattii*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum*, importantes en clínica por las patologías que originan y la actual resistencia que han mostrado a los antibióticos comunes². Estos abarcan una gran gama de antibióticos de primera, segunda y hasta tercera generación que ofrecen una amplia variedad de opciones para el tratamiento de padecimientos causados por bacterias⁶. Sin embargo, estudios han demostrado que el uso excesivo de antibióticos en personas ha disminuido su efectividad y por el contrario según la Secretaria Distrital de Salud dichos microorganismos han ido adquiriendo nuevos mecanismos de resistencia bacteriana a los diferentes antibióticos utilizados en la práctica clínica, convirtiéndose en un problema a nivel mundial.⁷ El uso indiscriminado e irracional ha ido incrementando esta resistencia, sin mencionar la presión evolutiva ejercida por el uso terapéutico. Consecuentemente surge la necesidad de descubrir nuevos antibióticos para resolver dicho problema⁸. La resistencia bacteriana genera un aumento en la mortalidad, en la estancia prolongada y un gran impacto económico, produciendo endemias de cepas multirresistentes en el ambiente hospitalario como extra hospitalario aumentando la incidencia de infecciones en pacientes de la comunidad como en pacientes hospitalizados y consecuentemente el uso de antibióticos de amplio espectro⁹.

En este sentido el uso de las plantas medicinales se ha intensificado, pero no simplemente por comprender la sabiduría tradicional, sino por integrarla a la validación científica por medio de estudios *in vitro* que garanticen productos fitoterapéuticos de uso seguro y eficaz de tal manera que puedan ser utilizados por una mayor cantidad de la población ¹².

En Colombia mediante estudios de cromatografía se han reportado tres quimiotipos de aceite esencial de *Lippia alba* los cuales presentan actividad farmacológica entre los que se encuentran el quimiotipo citral-mirceno, citral-limoneno y carvona –limoneno; este último quimiotipo tiene un alto valor agregado ya que se usa en muchos artículos cosméticos, perfumes y productos de uso personal.

Existen diferentes factores que hacen parte de la variabilidad de quimiotipos y la calidad del producto final, estos factores inician desde la identificación correcta de la especie, manejo del cultivo, cosecha y beneficio. Entre los factores que afectan la calidad del producto final se encuentran las variaciones de clima, suelo, época de cosecha, características genéticas de la planta, condiciones de secado y tiempo de almacenamiento por su parte, la calidad de los aceites esenciales está definida por la relación porcentual de cada uno de sus componentes. La calidad de los aceites esenciales es el factor principal para su utilización en industrias cosméticas, terapéutica o agrobiológica, ya que son una fuente natural de compuestos difíciles de sintetizar. Entre los aspectos que pueden dar lugar a pequeños cambios en la composición de los aceites esenciales se encuentran el método de extracción utilizado la etapa fisiológica de la planta al momento de la cosecha, el clima, los días de sol y la humedad relativa¹.

Está claro que se necesita estandarizar el procedimiento para la obtención del aceite esencial de *Lippia alba* que va desde su cultivo hasta su almacenamiento ya que esto es otro de los factores que ha conllevado a la existencia de una gran variabilidad de los componentes y por ende la actividad antimicrobiana que estos tienen sobre los diferentes microorganismos estudiados por los investigadores difiere en las concentraciones mínimas inhibitorias utilizadas en los diferentes estudios contra bacterias, virus, hongos, parásitos e insectos.

De esta manera el conocimiento sobre las diferentes propiedades del aceite esencial de *Lippia alba* favorecería a la economía ya que la obtención de este aceite esencial no supera la

producción de los antimicrobianos convencionales y por otro lado se llevaría a cabo la producción de antimicrobianos amigables con el medio ambiente.

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Realizar un estudio documental a partir de la búsqueda histórica de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Lippia alba* frente a importantes microorganismos patógenos en humanos.

Objetivos específicos:

- Identificar los microorganismos que han sido estudiados frente a la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Lippia alba* y su respectiva concentración mínima inhibitoria.
- Determinar los principales compuestos químicos del aceite esencial de *Lippia alba* y los factores geobotánicos asociados.
- Conocer los métodos de extracción más utilizados en la obtención del aceite esencial de *Lippia alba*.

1. ANTECEDENTES

En el estudio realizado por Oliveira D, (2006) sobre investigación entofarmacológica de *Lippia alba* y *Lippia alba* intermedia, evaluó los microorganismos utilizando el método de difusión en agar, los microorganismos probados fueron: *Candida albicans* Serotipo B ATCC 36802, *Cándida albicans*, *Cándida parapsilosis*, *Cándida guilliermondii*, *Cryptococcus neoformans* T1-444 Serotipo, *Staphylococcus aureus* MRSA, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Con respecto a la composición química, los análisis de los aceites esenciales permitieron la identificación de *Lippia alba* como un quimiotipo mircenocitral (15% y 37.1%, respectivamente) y *Lippia alba* intermedia como quimiotipo citral (22.1%). Los aceites esenciales de ambas especies fueron activos contra todos los microorganismos analizados (bacterias y hongos) y mostraron halos de inhibición que varían de 1.1 a 5.0 cm, probablemente debido al alto contenido de monoterpenos oxigenados (51.0% y 40.1%, respectivamente)¹⁴.

Montiel J, et al (2007) en su investigación sobre la actividad anti-*candida* (*Cándida parapsilosis*, *Cándida krusei*) y anti-*aspergillus* (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*) in vitro mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria CMI de cinco aceites esenciales de *Lippia alba* quimiotipo carvona-limoneno recolectados en diferentes lugares de Colombia, evaluaron los compuestos del aceite esencial por medio de análisis de cromatografía de gases-espectrometría de masas. Evidenciado que la composición química depende del origen geográfico de la planta, las condiciones de su cultivo, la edad y la parte de la planta empleada para la extracción y de algunos otros factores geobotánicos y los resultados para la concentración mínima inhibitoria encontraron que el aceite más activo fue el de *L. alba* de Flandes-Tolima con valores de CMI de $0,004 \pm 0,0\% \text{v/v}$ para *A. fumigatus* y $0,036 \pm 0,021$ para *C. krusei*. Los aceites esenciales más activos de *L. alba* mostraron una asociación con sus componentes mayoritarios limoneno, carvona y biciclosesquifelandreno¹⁵.

En la investigación realizada por Celis C, Et al. (2007) identificaron la relación existente entre la composición química de los aceites esenciales *L. alba*, *L. origanoides* y *Phyla dulcis* encontrando que *Lippia alba* tiene un importante contenido de monoterpenos oxigenados, los

cuales constituyen el 67% de la esencia y de ellos el citral, una mezcla de aldehídos β -insaturados que representan el 42% (quimiotipos citral y carvona), *Lippia origanoides* contiene un 56% de compuestos fenólicos, timol y carvacrol y *Phyla dulcis* se caracterizó por la presencia de sesquiterpenos (63%), entre los cuales se destacan trans- β -cariofileno y d-cadineno, entre otros. De igual manera evaluaron la actividad inhibitoria de los aceites contra promastigotes de *Leishmania chagasi* demostrando la efectividad de los aceites de *Lippia origanoides* y *Lippia alba*, quimiotipo citral, mientras el aceite de *L. alba* quimiotipo carvona fue parcialmente activo y la esencia de *Phyla dulcis* careció completamente de actividad¹⁶.

En la investigación realizada por Nogueira M, et al (2007) evaluaron la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Lippia alba* obtenido de las hojas y la capacidad antibacteriana la evaluaron por medio del método de difusión en disco para esto utilizaron bacterias aisladas de pacientes en ambientes hospitalarios, algunos de ellos resistentes a múltiples fármacos, excepto *Lactobacillus casei* que presentó un halo de inhibición de 18mm; los otros microorganismos encontrados fueron: *Escherichia coli* (17mm), *Pseudomonas aeruginosa* (N/A), *Proteus mirabilis* (18mm), *Staphylococcus intermedius* (18-20 mm)¹⁷.

Mesa A. et al (2009), en su estudio evaluaron dos aceites esenciales de *Lippia alba*; el quimiotipo carvona y citral y 15 de sus compuestos para determinar la citotoxicidad in vitro evaluada contra células HELA ATCC, CCL-2 y línea celular Vero ATCC CCL-81 mediante un ensayo MTT y la actividad antifúngica contra cepas de *Cándida parapsilosis*, *Cándida krusei*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus fumigatus*; el efecto citotóxico lo calcularon por medio de la concentración citotóxica 50 (CC50), definida como la dilución mínima del compuesto que induce el 50% de destrucción de las células y la actividad antifúngica fue evaluada por medio del método AFST-EUCAST, determinando la concentración mínima inhibitoria; de acuerdo a los resultados informados por los investigadores tanto la actividad citotóxica y antifúngica se ve influenciada por la composición química del aceite esencial de *Lippia alba* en este sentido según la GS/MS indican que el quimiotipo citral¹⁸.

En la investigación Agudelo L. Et al. (2010) evaluaron la actividad antiviral in vitro frente al *Herpes virus* humano tipo I (*HSV-1*) debido a que causa infecciones del 30-50 % de riesgo en el momento del parto y constituyendo uno de los problemas de salud pública debido al aumento de

la prevalencia, aunque el tratamiento de elección para las infecciones causadas por los virus *Alfa Herpes Viridae* es el aciclovir y sus derivados se ha visto afectado por la aparición de cepas resistentes a este fármaco complica su manejo a nivel clínico, los investigadores han visto la necesidad de evaluar la actividad antiviral de principios activos del aceite esencial de *Lippia alba* extraídos por destilación tipo Clevenger y encontraron que la mayor actividad anti-herpética, fue evidenciada para los aceites quimiotipo carvona BC1 y CA2 respectivamente a una concentración de 250 µg/mL y 125 µg/mL, los cuales redujeron en 10(1.5) unidades logarítmicas la carga viral¹⁹.

En el estudio realizado por Ocazonez R, Et al (2010) investigaron el efecto inhibitorio in vitro de los aceites esenciales de *Lippia alba* y *Lippia citriodora* contra serotipos replicados del virus del dengue; el cual es considerado entre las enfermedades arbovirales humanas y el responsable de causar la mayoría de las enfermedades y la muerte, por tal razón en el siguiente estudio evaluaron la citotoxicidad del virus con el aceite esencial mediante ensayos MTT y el modo de efecto inhibitorio viral fue investigado por medio de ensayos de reducción de placa con cultivos monocapa de células vero utilizando concentraciones variables del aceite (0.02, 0.1, 2.5, 12.5, 62.5 y 312.5 µg / mL) los ensayos mostraron para *Lippia alba* IC 50 los valores fueron entre 0,4 a 33 µg/ml con los índices de selectividad que van desde 4-349. Según los IC 50 *Lippia alba* fue más activo contra DENV-2 que otros serotipos inhibición del 50% de la formación de placa contra todos los virus examinados²⁰.

En la revisión bibliográfica realizada por Jaramillo D. Giulianna L. (2012) relacionaron la diversidad de la composición del aceite esencial con el origen, clima, suelo, época de cosecha, características genéticas de la planta, condiciones de secado y tiempo de almacenamiento son factores que afectan significativamente la calidad en cuanto a la composición del aceite esencial. De igual forma el objetivo del estudio está relacionado con el contenido de la humedad del material vegetal al momento de la extracción; mostrando que este es un factor importante en el rendimiento de los aceites esenciales; así en plantas de pronto alivio (*Lippia alba*) el rendimiento fue mayor cuando el material al momento de la extracción en fresco presentaba 75% de humedad vs. 12% en seco. En este sentido la composición de los aceites esenciales de las hojas de *L. alba* y *L. origanoides* son sensibles a la post cosecha influenciados por el contenido de humedad de las hojas al momento de la extracción; pero no por la edad de las plantas²¹.

Alvarez I. Et al (2015) evaluaron la técnica de arrastre por vapor para la producción de aceite esencial de *Lippia alba* de igual manera determinaron los tiempos de secado, condiciones de temperatura y presiones más adecuadas para la extracción de aceite esencial de *Lippia alba*. Observaron que el tiempo de secado adecuado del material vegetal a temperatura ambiente bajo sombra no debe ser mayor a 6 días. Observaron que después de dichos tiempos de secado la pérdida de rendimiento de aceite esencial es progresiva, mientras que el rendimiento de hidrolato (subproducto de la destilación), no se ve afectado, mostrando pérdidas significativas de calidad y no de cantidad de material destilado, lo cual perjudicaría visiblemente a los productores de aceites esenciales²².

Ardizolli K, (2015) en su tesis evaluó la actividad antifúngica de cuatro quimiotipos del aceite esencial de *Lippia alba* (Carvona, Citral, Dihidrocarvona y Linalol) provenientes de diversos lugares, frente a *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium verticillioides* que fueron recolectados de dos tipos de pacientes el primer grupo lo conformaban pacientes de consultorio externo, inmunocompetentes que presentaban onicomycosis y lesiones en la córnea y el segundo grupo pacientes inmunocomprometidos internados en la Unidad de Trasplante de Médula Ósea (UTMO) para este caso las muestras las obtuvieron de lesiones en piel, hisopados nasales, reservorios de catéter o hemocultivos; evaluaron la capacidad inhibitoria in vitro mediante el método de microdilución en caldo siguiendo las normativas Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi del Clinical Laboratory Standad Institute (CLSI) este estudio se evaluó la actividad frente a *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* con los siguientes quimiotipos: carvona el cual presentó una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 1500 ppm y una MIC mayor 1750 ppm, citral demostró cantidades de MIC mayores de 750 ppm y 1250 ppm, dihidrocarvona mostró una MIC mayor a 1750 ppm y mayor a 2000 ppm y por último el quimiotipo linalol mostró cantidades de MIC mayores 1750 y 2000 respectivamente²³.

De acuerdo al estudio realizado por Torrenegra M, et al (2015) los aceites esenciales de plantas aromáticas y medicinales contienen principios activos que presentan actividades biológicas como: antioxidante, antifúngica, antimicrobiana, entre otras y en particular los AE de los géneros *Thymus*, *Origanum* y *Lippia* contienen compuestos fenólicos como el timol y el carvacrol que tienen propiedades antisépticas y bactericidas por tal motivo se evaluó la actividad antibacteriana

in vitro de aceites esenciales de *Lippia alba*, *Origanum vulgare* *Origanum vulgare ssp* sobre *Propionibacterium acnes* ATCC 11827, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 microorganismos implicados en el acné, evidenciando que a las 48 horas de incubación presentaron valores de concentración máxima inhibitoria para con valores de 0.029, 0.027 y 0.027 ug/mL respectivamente²⁴.

Dos Santos. Et al (2016) en su artículo sobre la composición química del aceite esencial crudo extraído de hojas de *L. alba* y la evaluación de sus actividades antimicrobianas y citotóxicas, obtenidos por hidrodestilación y sus respectivos componentes analizados por cromatografía de gases–espectrometría de masas; evaluaron la actividad antimicrobiana in vitro usando ensayos de microdilución en caldo y observaron que todas las cepas de levadura probadas, (*Cándida dubliniensis*, *Cándida tropicalis*, *Cándida glabrata*, *Cándida parapsilosis*, *Cándida krusei*, *Cryptococcus grubii*, *Cryptococcus gattii*, *Cryptococcus neoformans*, excepto *C. albicans* son considerablemente más sensibles al aceite esencial de *L. alba* que las cepas bacterianas ensayadas (*Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*. En resumen, estos resultados prometen posibles aplicaciones del aceite esencial de *L. alba* como antifúngica en medicina, así como en la agricultura²⁵.

De Amorin I. et al (2016) en su estudio evaluaron la actividad amebicida de los aceites esenciales de *Lippia alba* contra trofozoitos de *Acanthamoeba polyfhaga* que causa queratitis amebiana y la encefalitis amebiana granulomatosa. Para el caso de la queratitis, uno de los mayores problemas es la recurrencia de la enfermedad debido a la resistencia de los parásitos, especialmente las formas quísticas a las drogas que se usan actualmente. De esta forma los estudios realizados han recurrido a agentes bioactivos potenciales de algunos aceites esenciales de plantas como: el carvacol (*Lippia sidoides*, *Lippia gracilis*), carvona (*Lippia alba*) y rotundifolona (*Lippia pedunculosa*) la actividad amebicida de estos compuestos fueron determinados a varias concentraciones y mostraron que casi todas fueron significativamente inhibitorias del crecimiento amebiano, y se determinó que los valores IC50 para *L.sidoides* fue de 18.19 ug/mL, *L.gracilis* 10.08 ug/mL, *L. alba* 31.79 ug/mL y *L.pedunculosa* 71.47 ug/mL. Los resultados obtenidos de este estudio mostraron que los aceites esenciales de *Lippia spp.* Poseen fuerte

actividad amebicida que podría estar relacionada con la interacción de los componentes activos con la pared celular del parásito o con su penetración mecanismo en los parásitos a través de canales de membrana²⁶.

En la investigación realizada por Ortega M, et al. (2016) evaluaron la capacidad antibacteriana de aceites esenciales de *Lippia alba* para erradicar biopelículas de *Streptococcus mutans* agente principal asociado a la caries. Para llevar a cabo dicho ensayo realizaron pruebas de susceptibilidad mediante la técnica MBEC-high-throughput (prueba de susceptibilidad a metales de alto rendimiento de biopelículas microbianas), con el fin de determinar la concentración de erradicación de las mismas el cual mostró un valor de 0.01 mg/100 mL que removi6 el 95.8% de biopelículas de *Streptococcus mutans*²⁷.

Aldana F, Cruz S. (2017) estudiaron la actividad larvicida de cinco aceites esenciales obtenidos de tres quimiotipos de *Lippia graveolens* (timol, carvacrol y mixto) y dos de *Lippia alba* (timol y carvacol) contra de *Aedes aegypti* vector importante que provoca enfermedades febriles como Dengue, Chikungunya y Zika que afectan en gran parte de la poblaci6n en los pa6ses tropicales, para tal fin realizaron ensayos para cada uno de los cuatro estadios larvarios, empleando inicialmente cuatro concentraciones de los aceites esenciales ((0.4, 0.2, 0.1 y 0.05 mg/mL); determinaron la concentraci6n m6nima letal media CL50 los ensayos mostraron que el aceite esencial obtenido del quimiotipo timol de *L. graveolens*, mostr6 las CL50 m6s bajas con las mayores mortalidades: primer estadio 0.056 mg/mL 95% IC [0.046, 0.064], segundo estadio 0.068 mg/mL 95% IC [0.062, 0.077] tercer estadio 0.088 mg/mL 95% IC [0.080, 0.096] cuarto estadio 0.092 mg/mL 95% IC [0.084, 0.100]. Los resultados indicaron el potencial uso del aceite esencial quimiotipo timol, como un insecticida de origen natural, para el control de *A. aegypti*²⁹.

L6pez J, Alayo A.(2018) en su tesis determinaron el efecto in vitro del aceite esencial de *Lippia alba* extra6do por el m6todo de arrastre de vapor de agua, frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* utilizando el m6todo de macrodiluci6n en caldo Brain Heart infusi6n (BHI) para la determinaci6n de la concentraci6n m6nima inhibitoria, mostrando que el aceite esencial de las hojas de *Lippia alba* tienen efecto antibacteriano frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*³⁰.

Moreno M. Et al. (2018) en su trabajo de investigación afirman que la enfermedad de Chagas causada por *T. Cruzi* es una de las enfermedades tropicales desatendidas más importantes sin una terapia eficaz; en este sentido las plantas medicinales como *Lippia alba* ofrecen una reserva prometedora de moléculas bioactivas importantes para caracterizar propiedades inhibitoras y efectos celulares de *Lippia alba*, los quimiotipos citral y carvona y sus principales terpenos. para este estudio la actividad tripanocida y la citotoxicidad se enfrentaron en epimastigotes (Epi), tripomastigotes (Tryp), amastigotes (Amas) y células Vero. El aceite esencial de *L. alba* mostró diferencias significativas en su composición química y rendimiento tripanocida ($p = 0,0001$), aceites quimiotipo Citral mostró ser más tripanocida que el AE quimiotipo carvona, con la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) de $14 \pm 1,5$ g / ml, $22 \pm 1,4$ g / ml y $74 \pm 4,4$ g / ml, en Epimastigotes, Trypomastigotes y Amastigotes, respectivamente. El estudio indicó que el análisis celular de estos aceites o sus terpenos bioactivos (citral, óxido de cariofileno y limoneno) podrían inducir la muerte celular de *T. cruzi* mediante un mecanismo de tipo apoptótico³¹.

2. MARCO TEÓRICO.

2.1 Generalidades de *Lippia alba*.

Es una planta nativa de América se encuentra ampliamente distribuida y se adapta a diferentes climas, se caracteriza por su olor aromático intenso 0.2 a 0.6% de aceite esencial sobre material fresco además se distingue por su alto contenido de carvona, compuesto ampliamente utilizado en las industrias cosmética, de alimentos y farmacéutica; su clasificación taxonómica se presenta en la tabla N°1.

Tabla N°1. Taxonomía de *Lippia alba*.

Reino	<i>Plantae</i>
Division	<i>Tracheophyta</i>
Orden	<i>Lamiales</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Familia	<i>Verbenaceae</i>
Genero	<i>Lippia</i>
Especie	<i>alba</i>
Nombre científico	<i>Lippia alba (Mill.) N.E. Br. Ex Britton & P. Wilson.</i>

Tabla N° 1. Tomada de: Jardín Botánico José Celestino Mutis (32).

Existen distintos nombres comunes con los que se conoce a esta planta en muchos países. Por ejemplo, en Cuba se la llama “quita dolor”, “menta americana”, “anís de España”, “salvia americana”, “poleo”, “toronjil isleño”. En Guatemala recibe los nombres de “salvia santa”, “salvia

sija”, “orozus”. En Costa Rica y Nicaragua se la conoce como “juanilama” o “mastranto”. En Honduras, se la denomina “juanilama”, “orégano de monte”, “salvia santa”. En Panamá, “oroazul” o “mastrento”. En México, “hierba del negro”, “mirto”, “sonora” o “mastranto”. En Jamaica, “colie mint”. En Colombia se conoce con el nombre de “pronto alivio”, “cidrón llanero”, o “quita dolor”. En Brasil “falsa melissa”, “erva cidreira”; en Venezuela “cidrón”; en Perú “pampa orégano” y en Argentina se la conoce como “salvia morada”³².

2.1.1 Descripción botánica.

Es un arbusto ramificado, puede alcanzar hasta 2.0 metros de altura además posee hojas pequeñas membranosas redondeado-ovaladas, rugosas, de 2.0 a 7.0 cm de largo con peciolo de hasta 14 mm de largo, posee tallos leñosos ramas largas arqueadas, presenta flores zigomorfas hermafroditas en espigas axilares de color lila, púrpura o blanco de 6 mm de longitud usualmente alargadas con un tamaño de 8-12 mm de largo, presentan vello en la parte inferior del tamaño que va desde 1.5 -2 mm de largo. Los frutos miden cerca de 3 mm de largo, en drupa o cápsula seca con un exocarpo membranoso de color violeta oscuro, que se separa al final en dos nuececillas. Presenta raíz axial fasciculada de más o menos 25 cm de largo y se caracteriza por su olor aromático a menta, limón o lima³³.



Figura N°1. Planta de *Lippia alba*. A. Planta de *Lippia alba* B. Hojas de *Lippia alba*, de forma elíptica con borde dentado nerviación reticulada, pecioladas. Fuente: Propia

2.1.2 Etapas de la floración.

Los caracteres del desarrollo floral constituyen una herramienta fundamental para la caracterización taxonómica y la determinación de compuestos químicos que están presentes en las inflorescencias importantes para sus aplicaciones farmacológicas contra patógenos en humanos. La descripción de la dinámica de la floración es difícil por el tamaño de la flor, sin embargo “la floración de *L. alba* inicia con la aparición del botón floral, posteriormente se presenta la anthesis en las primeras flores y de allí hasta la fructificación, la cual inicia con el secado de flores; el desarrollo de los frutos al igual que las inflorescencias presenta un proceso de maduración ascendente, es decir así como las flores más maduras se encuentran en la parte baja, los frutos en desarrollo más avanzado serán los de la parte inferior³⁴.

Las Inflorescencias son pedunculadas y cada una puede llegar a tener hasta 45 flores el aroma de las flores presenta características llamativas para los insectos por su fuerte aroma. se puede dividir en tres etapas principales

- Etapa I: corresponde a los botones verdes pubescentes del ca 1.5mm de disposición acrópeta, esta etapa se caracteriza por su mínimo desarrollo. Hay una maduración

acrópetas de las flores, los procesos morfogenéticos que dan paso a la formación de verticilios florales son cabezulas glomerulares de ubicación axilar opuestas y en pares, las flores pubescentes y sésiles están insertadas sobre una parte del receptáculo común sobre un raquis, acompañadas por brácteas poco diferenciadas^{33,34}.



Figura N°2. Botón floral Etapa I. (35).

- Etapa II: se diferencia de la etapa anterior en el tamaño de ca 2.5 mm y la presencia de múltiples brácteas más diferenciadas pubescentes, cerradas que no permiten ver a simple vista el desarrollo de estructuras florales, a través de cortes longitudinales y vistos por medio de un microscopio estereoscópico se observa la individualización de cada flor y hay una maduración acrópeta. se aprecia la estructura capellar que dará origen al gineceo acompañada de lo primordio de los futuros estambres, se puede evidenciar el inicio de la formación de sépalos, pétalos y estambres, desde la base y en forma centrípeta³⁵.

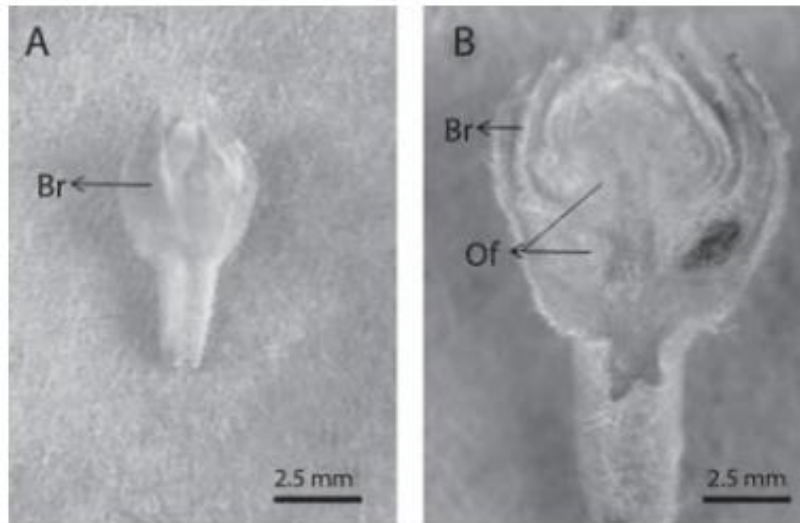


Figura N°3. Botones florales presentes en la etapa II, Bra: bracteas Of: Botones en floración. Tomada de: Morfología, anatomía, ontogenia y composición química de metabolitos secundarios en inflorescencias de *Lippia alba* (Verbenácea) (36).

- Etapa III: en esta etapa se observa por primera vez la inflorescencia de tamaño de 5 mm, con varias flores tubulares de color lila y con todos los órganos florales abiertos y próximos a abrir, tiene un tamaño entre 6-7 mm de largo y de ancho 3-4mm, estas flores son zigomorfas³⁵.



Figura N°4. Botones en floración etapa III. Tomada de: Descripción botánica y manejo del cultivo y post cosecha de *Lippia alba* (35).

2.1.3 Distribución geográfica.

Esta planta es oriunda de América responde a diversos tipos de suelos como arcillosos y limosos con pH de 5-6. Esta distribución tan amplia condiciona a la planta a presentar una gran variabilidad genética, con el propósito de ocupar los diversos hábitats naturales disponibles, situación que lleva a su adaptación a las diversas regiones biogeográficas de América. La presencia de biotipos en diversas regiones de América, contribuye a que la especie se adapte con mayor facilidad a las condiciones reinantes en cada sitio, variando a su vez el contenido de aceites esenciales o de metabolitos secundarios en sus órganos, según el origen de la planta³⁷, motivo por el cual ha conllevado a la existencia de diferentes quimiotipos distribuidos tal como se muestra en la figura 5. Su distribución es bastante amplia, desde México, Centro América y América del Sur, hasta Argentina; en Colombia se encuentra distribuida en casi todo el territorio hasta altitudes de 1800 msnm y con mayor presencia se encuentra en las regiones del Valle del Cauca, Bolívar, Amazonas, Guajira, Magdalena, Atlántico, Cundinamarca, Santander, Antioquia y Quindío³⁸.

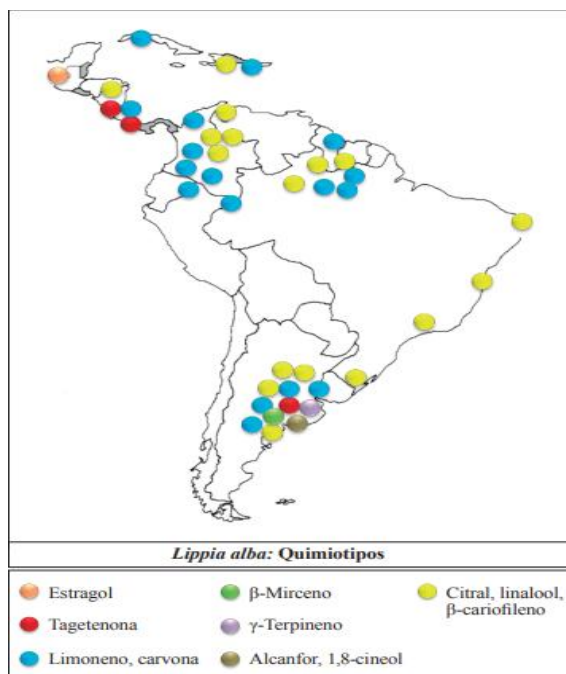


Figura N°5. Distribución geográfica de quimiotipos de *Lippia alba*. La asignación de quimiotipos está dada por el componente o componentes mayoritarios en el aceite esencial. Tomada de: Estudio comparativo de la composición química de aceites esenciales de *Lippia alba* provenientes de diferentes regiones de Colombia, y efecto del tiempo de destilación sobre la composición del aceite (39).

2.1.4 Condiciones de cultivo de *Lippia alba*.

Esta planta aromática se caracteriza por adaptarse a diferentes condiciones climáticas que van desde el nivel del mar hasta los 1900 msnm, la temperatura de crecimiento adecuada está dentro del rango entre 15°C -25°C; sin embargo para un mayor rendimiento se ha visto que las altas temperaturas hacen que desarrolle una mayor vegetación y por el contrario en zonas frías y en épocas de lluvia hacen que el encharcamiento no permita su desarrollo vegetativo ya que esta planta no tolera estas condiciones³⁴. Por otra parte la multiplicación de la planta puede realizarse por semillas y propagación con material vegetal (esqueje) sin embargo se ha evidenciado un mayor rendimiento por medio de propagación por esquejes que aunque se requieran de óptimas condiciones de humedad del terreno, la buena radiación lumínica hace que el cultivo presente mayor cantidad de material vegetal³⁸

- Multiplicación por semilla: Las semillas son de tamaño pequeño, por tanto, se hace semillero. En ensayos realizados en el Instituto de Ciencia se encontró que la semilla tiene un bajo porcentaje de germinación, por lo que únicamente se podría utilizar en trabajos de mejoramiento; por tanto, para producción comercial no es recomendable la propagación por este medio.
- Multiplicación por esqueje: Se reproduce por estacas de tallo de unos 20 cm de largo, con un mínimo de tres nudos por estaca a las cuales se les eliminan las hojas o se les deja únicamente una tercera parte de las mismas para evitar la pérdida excesiva de agua por respiración. el terreno debe tener buen contenido de humedad; si se disponen estacas enraizadas para trasplante deberán mantenerse bajo sombra y húmedos antes de ser llevados a campo y realizar un riego después del trasplante a su sitio definitivo³⁵.



Figura N°6. Esquejes de *Lippia alba*. Tomada de: Descripción botánica y manejo del cultivo y post cosecha de *Lippia alba* (35).

2.1.5 Condiciones de cosecha de *Lippia alba*.

Las condiciones aptas de cosecha de *Lippia alba* deben ser manualmente y cuando ésta alcanza su máxima floración debido a que en este punto presentan un mejor rendimiento. Esta época se alcanza aproximadamente a los 72 días, tiempo en el cual las plantas alcanzan una altura aproximada de 30 cm³⁵. Aunque la primera cosecha depende de la época de floración de la planta esta a su vez es dependiente de las condiciones climáticas y altitud del lugar de siembra ya que se desarrolla en diferentes tiempos⁴⁰. Estas condiciones son muy importantes debido a que la presencia de humedad en el momento de recolección del material vegetal puede favorecer el deterioro ocasionado por mohos y otros microorganismos, por lo tanto, el contenido de humedad de las materias vegetales debe mantenerse lo más bajo posible³⁸.

2.2 Generalidades de los aceites esenciales.

Los aceites esenciales son compuestos formados por varias sustancias volátiles que pueden ser alcoholes, cetonas, éteres, aldehídos, que se producen y almacenan en los canales secretores de las plantas y son responsables del aroma de las plantas. Generalmente se obtienen por métodos como arrastre con vapor de agua. Las plantas aromáticas, como la *Lippia alba* en este caso, poseen pequeñas cantidades de aceite esencial respecto a su masa vegetal, por lo cual la producción de los aceites tiene lugar con un rendimiento muy bajo, ya que para obtener unos

gramos de esencia se necesita gran cantidad de material. Estos aceites son olorosos y muy volátiles, es decir, se evaporan muy rápidamente en contacto con el aire. Su química es compleja, en general cada aceite lo integran compuestos químicos diferentes, como los mencionados anteriormente; pero puede haber muchos compuestos aún por identificar. Estos son solubles en los aceites y en el alcohol, e insolubles en agua⁴¹.

2.2.1 Clasificación de los aceites esenciales.

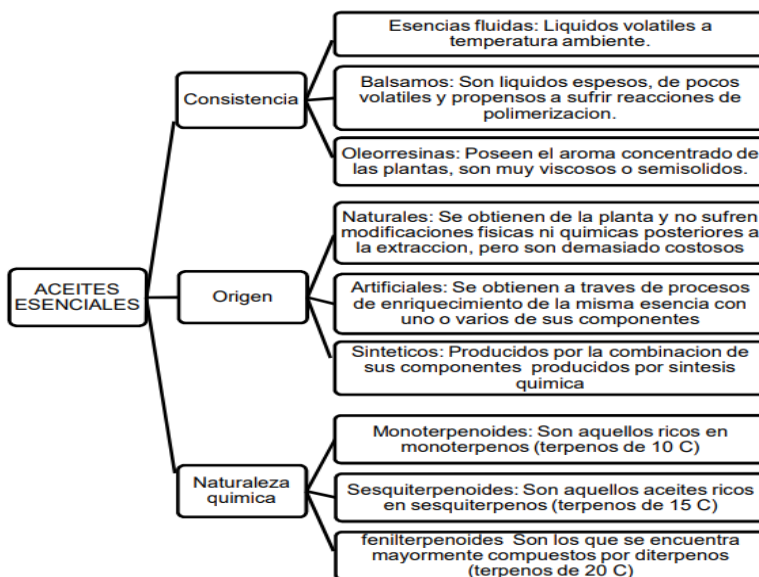


Figura N°7. Clasificación de los aceites esenciales. Tomado de: Estudio comparativo de dos métodos de extracción para el aceite esencial presente en la cáscara de *Pómelo (Citrus máxima)* (42).

2.2.2 Características químicas de los aceites esenciales.

Los aceites esenciales son extractos vegetales aromáticos muy complejos y concentrados. Pueden contener más de una centena de moléculas aromáticas en proporciones muy variables. Son estas distintas combinaciones de moléculas las que aportan a los aceites esenciales sus propiedades tan particulares y las causantes de su olor característico. Generalmente los aceites esenciales se clasifican dentro de dos grupos importantes.

- No terpenoides: En este grupo hacen parte sustancias alifáticas de cadena corta, sustancias aromáticas, sustancias con azufre y sustancias nitrogenadas. No son tan importantes como los terpenoides en cuanto a sus usos y aplicaciones.

- Terpenos o Terpenoides: la actividad antimicrobiana presentada por los aceites esenciales es debida, en gran medida a la presencia de estos compuestos, debido a sus propiedades también son utilizados de manera comercial. los terpenoides son los principales contribuyentes de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, siguiendo en orden de actividad los terpenoides que contienen grupos alcoholes, luego los que poseen aldehídos y por último los que tienen grupos cetónicos. estos compuestos pueden modificar su estructura en presencia de luz pueden causar oxidaciones o polimerizaciones. en cuanto a su estructura química están formados por varios isoprenos el cual posee la misma unidad estructural del caucho, constituido por el hidrocarburo $(C_5H_8)_n$. entre los terpenos que se encuentran más frecuente son el Linanol, nerol, geraniol y citronerol⁴³.



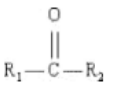
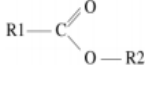
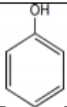
Compuesto	Grupo funcional	Ejemplo	Propiedades
Alcohol		Mentol, geraniol	Antimicrobiano, antiséptico, tonificante, espasmolítico
Aldehído		Citral, citronelal	Espasmolítico, sedante, antiviral
Cetona		Alcanfor, tuyona	Mucolítico, regenerador celular, neurotóxico
Éster		Metil salicilato	Espasmolítico, sedativo, antifúngico
Éteres	-C - O - C -	Cineol, ascaridol	Expectorante, estimulante
Éter fenólico	Anillo - O - C	Safrol, anetol, miristicina	diurético, carminativo, estomacal, expectorante
Fenol		Timol, eugenol, carvacrol	Antimicrobiano Irritante Estimulante inmunológico
Hidrocarburo	Sólo contiene C y H	Pineno, limoneno	Estimulante descongestionante antivirico, antitumoral

Tabla N°2. Grupos funcionales de cada categoría. Tomado de: Aceites esenciales, una alternativa de diversificación para el eje cafetero (43).

2.2.3 Factores que afectan la composición química del aceite esencial de *Lippia alba*.

La composición química del aceite esencial depende de los factores geográficos, factores genéticos de la planta, las condiciones de cultivo, edad de corte, parte de la planta empleada para su extracción. De igual manera otros factores que varían el rendimiento y la calidad de los principios activos son: hora de la cosecha, fase lunar, época de lluvias, luminosidad, y tecnología de cosecha al igual que las condiciones de preparación del material para el proceso de extracción, como temperaturas de secado de hasta 80°C las cuales afectan de manera negativa reduciendo entre el 12% y 17% el contenido de aceite esencial de plantas secas de *Lippia alba* en comparación con los contenidos de los mismos aceites en plantas frescas, el tiempo de extracción, el contenido de humedad del material vegetal y el tratamiento post- cosecha afectan no solo el rendimiento sino generan variabilidad en la composición química de los aceites esenciales⁴⁴.

2.2.4 Quimiotipos del aceite esencial de *Lippia alba* en Colombia.

Las diferentes propiedades medicinales que se le atribuyen a la planta dependen estrictamente a la variabilidad de sus componentes en su aceite esencial. Sin embargo, como se ha citado anteriormente existe una variabilidad dependiente de muchos factores presentando notables variaciones en el contenido de terpenos livianos y sesquiterpenos, de acuerdo al origen de la planta; estas variaciones se originan principalmente en una variación genética, y/o posibles influencias de tipo ecológico de acuerdo a la región en que crece la planta⁴⁵.

En Colombia se han reportado diferentes quimiotipos de acuerdo al origen del material vegetal seleccionado en este sentido el aceite esencial de *Lippia alba* presenta algunas variaciones entre las regiones de Cundinamarca (Anolaima), Tolima (Flandes y Venadillo), Boyacá (Cubará), Santander (Bucaramanga, Suaita y Bolívar), Antioquia (Puerto Berrío), Arauca (Saravena), Bolívar (Turbaco y Colorado), Valle del Cauca (Cali y Palmira), Quindío (Armenia) y Cesar (San Martín). La tabla N° 3 muestra los componentes con sus respectivos porcentajes encontrados en *Lippia alba* y el porcentaje del rendimiento del material vegetal utilizado recolectado de las anteriores regiones mencionadas³⁹.

Tabla N°3. Composición química de los aceites esenciales de *Lippia alba* de regiones de Colombia.

N°	Localidad	Compuestos mayoritarios, Cantidad relativa (%)							Rendimiento , % (p/p)
		Limoneno	Neral	Carvona	Piperitona	Geranial	Piperitenona	Biciclosesquifelandreno	
1	Puerto Berrío	28.1	-	40.6	2.5	-	5.4	10.6	0.48
2	Cubará	31.2	-	41.5	2.5	-	4.5	8.6	0.78
3	Anolaima	30.3	-	35.1	3.0	-	3.1	11.4	0.51
4	Bucaramanga	31.8	-	38.3	2.6	-	4.4	9.0	0.43
5	Flandes	28.5	-	39.4	1.9	-	4.2	10.9	0.73
6	Cali	36.1	-	38.8	2.2	-	1.7	8.4	0.60
7	Palmira	34.1	-	35.4	3.5	-	4.9	8.8	0.55
8	Suaita	30.0	-	41.9	3.3	-	5.6	6.0	3.00
9	Armenia	30.2	-	34.3	2.5	-	3.7	13.6	3.20
10	Bolívar	30.9	-	38.9	3.6	-	4.2	7.7	2.50
11	San Martín	26.1	-	42.2	2.9	-	6.8	8.6	2.40
12	Venadillo	30.2	-	50.3	3.1	-	1.0	3.4	2.50
13	Saravena	22.4	10.4	25.3	1.1	10.4	2.2	8.0	0.36
14	Colorado	3.7	22.6	-	-	28.8	-	3.1	0.30
15	Turbaco	3.7	23.6	-	0.1	30.5	-	1.8	0.83
	H.J	14.6	-	49.9	2.2	-	6.8	17.5	0.53
	H.M	15.5	-	51.2	2.7	-	7.4	12.5	0.45

Tabla N° 3. Tomada de: Estudio comparativo de la composición química de aceites esenciales de *Lippia alba* provenientes de diferentes regiones de Colombia, efecto del tiempo de destilación sobre la composición del aceite. H.J: hojas jóvenes H.M: hojas maduras (39.)

Sin embargo, pese a las múltiples variaciones en la composición química en Colombia se han identificado principalmente tres quimiotipos: el quimiotipo A caracterizado por su alto contenido de carvona (41%) y limoneno (36%) el quimiotipo B el cual se destaca por su alto contenido de neral y geranial (citral, 54%) y *Trans*- β - cariofileno (8%) y un nuevo quimiotipo, denominado “híbrido” (C), rico en carvona (25%), limoneno (22%) y citral (21%). Aunque la composición química como se había mencionado anteriormente depende de diversidad de factores como por ejemplo la parte y la edad de la planta a emplear para extracción, se ha notado que las cantidades de los compuestos mayoritarios presentes en los aceites esenciales, tales como el limoneno, la carvona, la piperona son superiores en las hojas maduras; mientras que el biciclosesquifelandreno y el B-bourboneno, principales sesquiterpenos en los aceites esenciales presentan una mayor concentración en las hojas jóvenes.

2.2.5 Quimiotipos del aceite esencial de *Lippia alba* en otros países

En Brasil el análisis químico de *Lippia alba* recolectado en el estado de Sao Paulo presento 39 compuestos que corresponden al 99.45% del aceite esencial de este porcentaje aproximadamente 67% corresponde a monoterpenos, los principales monoterpenos fueron el isomerol nerol / geraniol (27.09%) y citral (21.87%) el 6-metil-5-heptene-2-ona (11.98%) y *E*-cariofileno (9.25%), y el 19% a sesquiterpenos²⁵. Otro quimiotipo de Brasil, cultivado en Paraná, presentó γ -terpineno (46.7%), *p*-cimeno (8.7%) y β -cariofileno (7.2%) como constituyentes mayoritarios. La planta cultivada en la región noreste de Brasil, presentó dos quimiotipos: uno con neral (27.2-30.4%), geranial (35.6-41.0%) y limoneno (9.1-13.1%) y otro con carvona (42.3-54.7%), limoneno (23.2-30.4%) y *p*-cimeno (3.1-10.6%). En noreste de Brasil, la composición química de *Lippia alba* presentó dos quimiotipos: uno con neral (27.2-30.4%), geranial (35.6-41.0%) y limoneno (9.1-13.1%) y otro con carvona (42.3-54.7%), limoneno (23.2-30.4%) y *p*-cimeno (3.1-10.6%); en Perú el material vegetal recolectado presento mayoritariamente la composición química de 63.4% de carvona, 5.6% de germacreno D y un 5.1% de limoneno. En Argentina encontraron varios tipos quimiotipos que tienen como constituyentes mayoritarios: lippiona (1,2-epoxipulegona), dihidrocarvona, citral y 1,8-cineol, y un cuarto tipo con piperitona (36.7%) y limoneno (34.2%). De plantas que crecen en Uruguay, se informó de un tipo químico en donde los constituyentes principales del aceite son alcanfor (18.2%) y 1,8-cineol (16.5%)³⁸.

El material vegetal recolectado en Cuba demostró 43 compuestos agrupados en 22 hidrocarburos terpénicos y 21 compuestos oxigenados, los mayores constituyentes fueron Limoneno (5.76) carvona (40.00%), piperitona (3.62%) piperitenona (8.26%) y beta guaiene (9.84%) de igual forma mencionaron componentes que no habían sido reportados como .En América del Norte, el aceite esencial obtenido de plantas cultivadas en macetas (en Delaware) y procedentes de Sinaloa, México, dio un nuevo quimiotipo en el que los constituyentes mayoritarios fueron metil (estragol) (56.5%), 1,8-cineol (12.6%) y canfeno (7.0%). En el Norte de India, se encontró otro tipo químico diferente, en el que los compuestos mayoritarios del aceite fueron mirceno (26.4%), peral (6.4%) y geranial (9.8%) En síntesis, se podría concluir que los principales componentes del aceite esencial son: alcanfor, dihidrocarvona, cariofileno, 1.8-cineol, citral, acetato de citronelol,

pcimeno, metildecilcetona, geranial, limoneno, linalool, acetato de linalool, lipiona, mierceno, neral, metiloctil-cetona, a- y b-pineno, piperitona, sabineno y a-terpineol^{38,46}.

Tabla N°4. Principales componentes del aceite esencial de *Lippia alba*

Componentes mayoritarios del aceite esencial, %	
Carvona	53.0
Limoneno	11.1
Biciclosesquifelandreno	16.4
Piperitenona	36
Piperitona	2.5
B-Bourboneno	1.5

Tabla N°4. Tomada de: Aceites esenciales. UIS (46).

2.3 Métodos de extracción de los aceites esenciales.

Existen diferentes métodos para obtener Aes, entre ellos se encuentran; la extracción por solventes, la maceración, el prensado. Estos métodos son demorados y conllevan a la formación de productos no deseados como ceras, pigmentos, extractos y ácidos grasos o que dificulta la separación del aceite, así mismo existen nuevas técnicas que mejoran los rendimientos del aceite como la extracción por microondas sin uso de solventes y la extracción con fluidos supercríticos. Lo anterior ha conllevado a buscar nuevas alternativas que no presenten estas limitaciones entre los métodos más rentables se encuentran⁴².

2.3.1 Destilación por arrastre con vapor de agua.

Esta técnica es utilizada para separar aceites esenciales a partir de material vegetal; su objetivo es la obtención de componentes volátiles y no volátiles, por medio del vapor de agua generado a partir de una fuente de calor externa sobre un recipiente (matraz, alambique etc.), el cual incluye un tamiz que no permite el contacto del material vegetal con el agua. El flujo de vapor creado pasa a través de la materia vegetal y arrastra consigo los aceites esenciales; en seguida estos vapores se enfrían y se condensan creando dos fases líquidas no solubles entre sí, la fase orgánica (aceite esencial) y la fase acuosa que posteriormente por medio del proceso de decantación se pueden separar. Por otra parte, las ventajas que ofrece este procedimiento son su facilidad de uso, un mayor control de la velocidad de destilación, la posibilidad de variar la presión del vapor, este método satisface mejor las operaciones comerciales a escala, al proveer resultados más constantes y reproducibles esta técnica es utilizada especialmente para esencias muy volátiles⁴⁸.



Figura N°8. Equipo de destilación por arrastre con vapor 1. Entrada de agua 2. Caldera de calentamiento 3. Alambique 4. Tubo de salida de aceite y vapor 5. Condensador 6. Entrada de agua al condensador 7. Salida de agua del condensador 8. Salida de la mezcla 9. Recipiente para captura de la muestra. 10. Salida de residuos tipo hidrolato. 11. Manómetro. Tomada de: (49)

2.3.2 Destilación con agua o hidrodestilación.

Este método consiste en sumergir el material vegetal en agua y llevarla por medio de calor hasta su punto de ebullición cabe resaltar que las condiciones para que se lleve un buen proceso de extracción, el material vegetal debe estar durante todo el proceso sumergido en agua y mantener una constante agitación y de esta manera evitar acúmulos y sedimentación del material vegetal. Posteriormente los vapores que se producen son recolectados por medio del proceso de condensación. En cuanto sus ventajas este proceso es de bajo costo y necesariamente no necesita de una fuente eléctrica sin embargo existen desventajas que tiene este método se debe a las altas temperaturas empleadas que con llevan a la disminución o perdida de algunos compuestos del material vegetal⁴⁸⁻⁴⁹.

Figura N°9. Montaje de hidrodestilación.



Figura N°9. Tomado de: Estudio comparativo de dos métodos de extracción para el aceite esencial presente en la cáscara de *Pómelo* (*Citrus maxima*) (42).

2.3.3 Destilación de agua y vapor o vapor húmedo.

Este tipo de destilación se diferencia de la destilación por arrastre de vapor ya que este método no contiene agua en el fondo de la retorta o alambique, el vapor saturado o sobre calentado es provisto por una caldera y a presiones más elevadas que la atmosférica, se inyecta por medio de serpentines cribadas que están debajo de la carga y se dirige hacia arriba, atravesando la masa vegetal colocada sobre una parrilla inferior⁵⁰.

2.3.4 Hidrodestilación asistida por microondas (MWHHD)

Es un método que consiste en sumergir el material vegetal en agua y someterlo a la acción de la radiación de microondas, el agua se calienta hasta su punto de ebullición, libera los compuestos del aceite extraído contenidos en glándulas, por efecto de la presión de vapor; los compuestos volátiles en fase gaseosa son arrastrados hasta el condensador, en donde se forman dos capas, una rica en aceite y otra es hidrolato, los cuales se separan por decantación. El uso de hidrodestilación asistida por microondas ha demostrado ser ambientalmente eficiente, ya que al emplearse agua como vehículo de extracción, se elimina el uso de solventes tóxicos y dañinos al medio ambiente, así como la degradación térmica ocasionada por el uso del vapor de agua para obtener los aceites esenciales y otros extractos; gracias a esto, el rendimiento del extracto es mayor mientras se mantiene la composición de los compuestos volátiles, se eliminan solventes tóxicos, la biomasa residual se puede compostar o bien convertir en una fuente energética como combustible y aminorar costos operativos disminuyendo el consumo energético en el tiempo.

2.3.5 Extracción con fluido supercrítico (SFE).

El proceso de extracción por fluidos supercríticos o “tecnología de los solventes verdes” es muy similar a la extracción convencional, una de las principales diferencias radica en usar como agente extractor un fluido supercrítico en lugar de un líquido. El poder solvente de los fluidos supercríticos se encuentra en función de la densidad, esta densidad puede ser variada por aumentos graduales ya sea en la presión o en la temperatura. La extracción por fluidos supercríticos satisface en gran manera los requisitos exigidos, puesto que el impacto de este para el medio ambiente es considerablemente más bajo comparado con los métodos de extracción convencionales y los productos obtenidos mantienen sus propiedades. La conservación de las propiedades se debe en gran medida a que las materias primas utilizadas no son sometidas a temperaturas elevadas que alteran las propiedades químicas de los compuestos obtenidos; por ejemplo, la calidad de los ácidos grasos poliinsaturados de diferentes materias primas no se ve afectada, ya que, mediante el empleo de esta técnica, la extracción se realiza a temperaturas inferiores a 65 °C.

2.3.6 Otros métodos de extracción.

El método de enflorado o enfleurage: el material vegetal (generalmente flores) es puesto en contacto con un aceite vegetal. La esencia es solubilizada en el aceite vegetal que actúa como vehículo extractor. Se obtiene inicialmente una mezcla de aceite esencial y aceite vegetal la cual es separada posteriormente por otros medios físico-químicos. Esta técnica es empleada para la obtención de esencias florales (rosa, jazmín, azahar, etc.), pero su bajo rendimiento y la difícil separación del aceite extractor la hacen costosa.

Maceración en ésta el material permanece por varios días sumergido en un sistema compuesto por aceite, grasa fundida y alcohol etílico. Se utiliza para cantidades pequeñas. Cuando la maceración es en alcohol, el contacto se realiza en frío por espacio de 24-48 horas en alcohol de 70°C en general, cuando se quiere usar en forma externa (loción). En forma interna se deja macerar de una semana a 10 días, removiendo frecuentemente, para luego exprimir y filtrar el producto. Extracción con solventes El material se pone en contacto con una corriente de solvente hasta que éste se apodera de toda la esencia y seguidamente, se separa por destilación. Se utiliza para conservar mejor los perfumes de flores delicadas⁵⁰.

2.3 Métodos de susceptibilidad antimicrobiana

2.4.1 Método de difusión en disco.

Es un método cualitativo de rutina que se caracteriza por ser fácilmente de estandarizable y que está indicado para microorganismos de rápido crecimiento y microorganismos de crecimiento exigente. Está basado en el trabajo de Kirby Bauer el cual consiste en depositar en la superficie de una placa de agar Müller Hinton previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel de filtro impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado en antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar el filtro absorbe agua y el antibiótico se difunde por el agar, formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18 a 24 horas de incubación, la lectura se realiza por presencia o ausencia de una zona de inhibición de crecimiento, que se mide en milímetros. La interpretación de la prueba está basada en la correlación entre el diámetro de la zona de inhibición (mm) con la MIC ($\mu\text{g/mL}$ o mg/L) para cada antimicrobiano y microorganismo. Los discos pueden o no aparecer rodeados por una zona

de inhibición de crecimiento bacteriano. Este es uno de los métodos que el CLSI recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos⁵¹.

2.3.5 Pruebas para detección de Concentración Mínima Inhibitoria.

La concentración inhibitoria mínima (MIC) de un agente antimicrobiano es la mínima concentración del agente antimicrobiano que inhibe la multiplicación y producción de un crecimiento visible de una cepa bacteriana dada en el sistema de prueba. Determinamos la concentración en el laboratorio incubando una cantidad conocida de bacterias con diluciones definidas del agente antimicrobiano. Las pruebas de la MIC pueden ser realizadas usando como medios de cultivo en caldo o agar, pero la microdilución en caldo es el método más utilizado en los laboratorios clínicos

2.3.5.1 Microdilución en caldo.

La prueba de Microdilución es un método cuantitativo que utiliza diluciones dobles seriadas del antimicrobiano y se expresa el resultado en $\mu\text{g/mL}$. El caldo Mueller-Hinton se recomienda como el medio preferido para pruebas de susceptibilidad de organismos comúnmente aislados, aeróbicos o facultativos de rápido crecimiento. El caldo debe tener el contenido apropiado de cationes (Ca^{++} y Mg^{++}). Los resultados obtenidos por este método pueden ser afectados por diversas variables que deben ser controladas para asegurar la exactitud y reproducibilidad de los resultados para esto el medio ideal debe tener un pH entre 7.2 y 7.4, una baja cantidad de inhibidores pueden afectar las pruebas de susceptibilidad⁵².

2.3.5.2 Macrodilución en caldo.

Las pruebas de dilución han sido utilizadas durante años. Este método consiste en exponer a las cepas a estudiar a diferentes concentraciones de antimicrobianos, en diluciones a la mitad y observar el crecimiento de los microorganismos para luego definir la CIM. El volumen final mínimo, requerido en cada tubo, es de 1 ml de caldo MH suplementado con Ca^{++} y Mg^{++} estéril sin antimicrobiano. La interpretación de la CIM corresponde a la mínima concentración de antibiótico en donde no se observa desarrollo (turbidez). La CIM se expresa en $\mu\text{g/ml}$ ⁵².

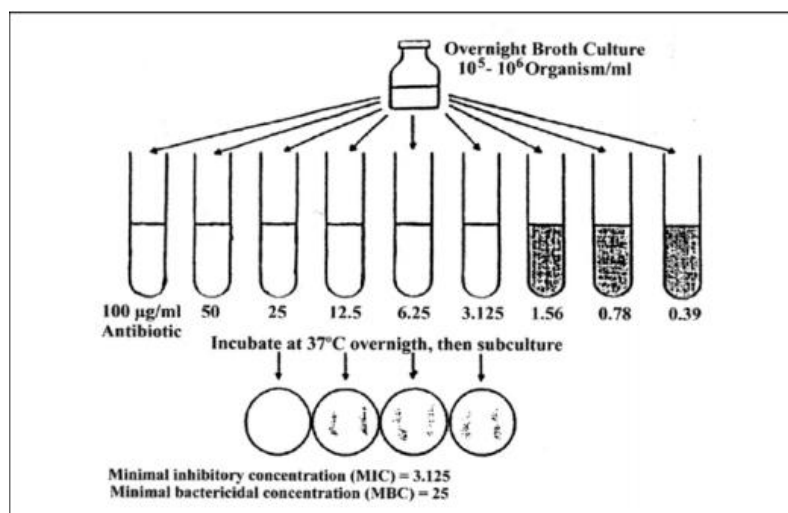


Figura N°10. Esquema sugerido de Macrodilución en caldo. Tomado de: Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Library of Congress Cataloging.2005 (52).

2.3.5.3 Método de dilución en agar.

En el método de dilución en agar, el agente antimicrobiano es incorporado en el medio con cada placa que contenga una concentración diferente del agente antimicrobiano. El agar Müller Hinton es el agar de elección, este debe tener un pH 7,2 - 7,4 no deben añadirse cationes suplementarios. Las ventajas de las pruebas de dilución en agar se encuentra la reproducibilidad de los resultados y el crecimiento satisfactorio de la mayoría de organismos no fastidiosos. Sin embargo, sus desventajas incluyen el trabajo requerido para preparar las placas de dilución en agar y su relativamente corto tiempo de almacenamiento^{51,52}.

2.3.6 Método E test.

La prueba E test determina la susceptibilidad de forma cuantitativa, se basa en el uso de unas tiras o "epsilómetros" (AB Biodisk, Sweden) las cuales contienen un gradiente exponencial continuo de antibiótico y una escala interpretativa. El gradiente de antibiótico cubre un amplio rango de concentraciones correspondientes aproximadamente a 15 diluciones dobles de CIM. Estas concentraciones están diseñadas para corresponder con los puntos de corte correspondientes a cada antimicrobiano. El procedimiento es exactamente igual al usado en el método de difusión en disco, pero en vez de observar una zona circular de inhibición, se observa una zona elíptica. La

CIM del antibiótico se determina en el punto donde la elipse de crecimiento bacteriano intercepta la escala de concentración de la tira⁵³.

2.4 Aplicaciones del aceite esencial de *Lippia alba*.

En la medicina tradicional el aceite esencial de *Lippia alba* se ha caracterizado por presentar propiedades analgésicas, antiinflamatorias, expectorante, sedante, antidiabética, antiespasmódicas, antipirético, antidiarreico, útiles en enfermedades intestinales y hepáticas, anticolesterolemico, de igual manera presentan la propiedad de inhibir el crecimiento de microorganismos actuando como agentes bacteriostáticos, bactericidas, antifúngicas, antivirales, insecticidas¹⁷.

2.5.1 Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Lippia alba*.

La actividad antibacteriana del aceite esencial de *Lippia alba* se ha evaluado contra bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus fecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* y bacterias Gram negativas como *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella choleraesuis*. Los resultados de la MIC se presentan en la **Tabla N°6**. La actividad antibacteriana del aceite de *Lippia alba* sobre gérmenes de interés clínico humano han puesto de manifiesto que de las especies estudiadas sólo la *Pseudomonas aeruginosa* mostró resistencia a las diferentes concentraciones evaluadas de dicho agente. El resto de las bacterias, específicamente las gram positivas y *Serratia marcescens*, presentaron susceptibilidad frente al aceite esencial, con valores de MIC entre 0,31 y 0,63 mg/mL. El *S. aureus* fue de todas las bacterias la que resultó sensible con la menor dosis del agente antibacteriano⁵⁴. Estudios evidencian que la inhibición del crecimiento microbiano fue debida a una acción bacteriostática ocasionada por el aceite sobre las células. Cabe resaltar que varios autores mencionan que para hablar de actividad antibacteriana de los aceites de plantas se habla de fuerte inhibición cuando la MIC tiene un valor hasta 500 µg / mL, una inhibición moderada que se caracteriza por la MIC entre 600 µg / mL y 1500 µg / mL, y la inhibición débil una MIC por encima de 1600 µg / mL.

2.4.5 Actividad antifúngica del aceite esencial de *Lippia alba*.

La actividad antifúngica contra patógenos que causan infecciones en humanos ha ido cobrando importancia debido al elevado incremento en la tasa de morbimortalidad asociada con microorganismos como: *Cándida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida dubliniensis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida grubii*, *Candida gattii*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum*. Estos hongos constituyen un grupo de patógenos emergentes, causando infecciones de difícil diagnóstico y tratamiento, ya que en general son microorganismos que no responden a los antifúngicos disponibles, por lo cual se asocian a una mayor mortalidad y aunque las infecciones fúngicas invasoras provocadas por hongos emergentes son más frecuentes en pacientes inmunosuprimidos o terapias inmunosupresoras, estas condiciones hacen susceptibles a estos individuos de contraer infecciones tanto por hongos patógenos primarios como por otros que son inocuos para las personas inmunocompetentes y su importancia reside en la agresividad de su comportamiento en el hospedero y en la escasa o nula respuesta clínica a la mayoría de los antifúngicos disponibles. Por tal motivo el aumento de las infecciones por hongos y la resistencia que presentan estos microorganismos hacen recurrir a compuestos de origen natural como alternativas terapéuticas. Dicha actividad se ha evaluado con el aceite esencial de *Lippia alba* que en múltiples estudios han demostrado su actividad antimicótica con concentraciones fungicidas mínimas en el intervalo de 0,600–1,250 mg/mL. Los componentes mayoritarios asociados a esta actividad fueron limoneno, carvona y biciclosesquifelandreno a una proporción aproximada de 18%, 27 %, 27 % respectivamente. Lo cual hace competitivo el aceite esencial con medicamentos de referencia como el ketoconazol que presenta una MIC con valores entre 0,250–0,100 mg/mL. Y el bifonazol con MIC de 0,200–0,250 mg/mL¹⁵. Sin embargo, cabe destacar que la actividad antimicótica está relacionada con el porcentaje de sus compuestos especialmente el geranial el cual parece ser el principal componente fungicida del aceite esencial de *L. alba*⁴⁵.

2.4.6 Actividad antiviral del aceite esencial de *Lippia alba*.

En los últimos años se ha enfocado en la evaluación de principios activos aislados de plantas naturales debido a la resistencia de estos microorganismos al tratamiento convencional; tal es el caso evaluado contra el Herpes *virus* Humano Tipo 1 (HSV-1) el cual pertenece a la subfamilia *Alfa Herpes Viridae* y causa infecciones virales comunes en humanos, tales como infecciones herpéticas mucocutáneas, queratitis, encefalitis y herpes neonatal. El tratamiento de elección para las infecciones causadas por los virus *Alfa Herpes Viridae* es el Aciclovir (ACV) y sus derivados. Sin embargo, la aparición de cepas resistentes a este fármaco complica su manejo a nivel clínico. Los ensayos han demostrado que la fracción de n-butanol y acetato de etilo dos de los componentes del aceite esencial obtenido de las hojas de *L. alba* presentan actividad antiviral frente a *Virus del Herpes Simplex* y *Poliovirus* respectivamente. Cabe aclarar que para mencionar de actividad antiviral relevante o moderada de un producto natural purificado, es aquella cuyo factor de reducción (Rf) del título viral es, respectivamente de $\geq 1 \times 10^3$ o de 1×10^2 . En este sentido la mayor actividad anti herpética fue evidenciada para los aceites esenciales del quimiotipo Carvona a una concentración entre 125 ug/mL- 250 ug/mL¹⁹.

2.4.7 Actividad anti protozoaria del aceite esencial de *Lippia alba*.

El aceite esencial de *L. alba* en investigaciones realizadas ha demostrado tener actividad contra *Trypanozoma cruzi* este protozooario hemoflagelado conocido por ser el agente causal de la enfermedad de Chagas; una de las enfermedades desatendidas más importantes del mundo y uno de los problemas de salud pública más relevantes en América Latina en Colombia. Los esfuerzos por controlar esta enfermedad se han visto reducidos por el costo globales que tiene esta enfermedad por tanto el control de la enfermedad se centra principalmente en prevenir o reducir el ciclo de transmisión de *T. cruzi* mediante la erradicación de vectores y la detección masiva de donación de sangre .Sin embargo, existen desafíos mayores como los asociados al cambio del perfil epidemiológico de la infección (diversidad de vectores, reservorios y modos de transmisión), siendo el problema más importante, la falta de terapias efectivas para curar la infección por *T. cruzi* o para prevenir la progresión de la infección. En estudios publicados el Aes de *L. alba* ha mostrado diferencias significativas en su composición química y rendimiento tripanocida ($p = 0,0001$) destacando que los aceites del quimiotipo Citral son más tripanocidas

que los Aes del quimiotipo Carvona, con concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) de $14 \pm 1.5 \mu\text{g} / \text{mL}$, $22 \pm 1.4 \mu\text{g} / \text{mL}$ y $74 \pm 4.4 \mu\text{g} / \text{mL}$, en Epimastigotes, Trypomastigotes y Amastigotes, respectivamente³¹.

3. METODOLOGIA.

3.1 Tipo de estudio.

Esta investigación es un estudio de tipo documental; ya que se realizó una selección de material bibliográfico teniendo como finalidad conocer las nuevas alternativas de tipo biológico para el control de patógenos de importancia clínica, caracterizando los métodos de extracción utilizados, las condiciones ambientales, genéticos y como afectan la composición del aceite esencial de *Lippia alba* de igual forma identificando la Concentración mínima inhibitoria realizada por los diferentes métodos de detección de susceptibilidad microbiana.

3.2 Universo.

En este trabajo de investigación el universo comprende el Aceite esencial extraído de *Lippia alba* con capacidad antimicrobiana reportada contra patógenos de importancia clínica.

3.3 Población.

En este caso nuestra población de estudio son los documentos sobre el aceite esencial extraído de *Lippia alba* con actividad antimicrobiana frente patógenos de interés clínico.

1. Muestra.

En este trabajo la muestra son los 56 documentos seleccionados sobre estudios con actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Lippia alba* y su respectiva concentración mínima inhibitoria frente a bacterias, hongos, parásitos y virus de importancia clínica.

2. Hipótesis.

El aceite esencial de *Lippia alba* posee actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos de importancia clínica y ésta actividad es dependiente de múltiples factores como el método de extracción y condiciones geobotánicas que afectan la composición química del AE.

3. Variables e indicadores.

Objetivo	Variable independiente	Variable dependiente
Identificar los microorganismos que han sido estudiados frente a la actividad antimicrobiana del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> y su respectiva concentración mínima inhibitoria	Microorganismos estudiados	Actividad antimicrobiana
Determinar los principales compuestos químicos del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> y los factores geobotánicos asociados.	Factores geobotánicos	Composición química
Conocer los métodos de extracción más utilizados en la obtención del aceite esencial de <i>Lippia alba</i>	Métodos de extracción.	Aceite esencial de <i>Lippia alba</i>

4. MÉTODOS.

1. Búsqueda de artículos científicos en bases de datos como Pub Med, Scientific electronic library online(SciELO), Sinab y libros online.
2. Revisión de la información: Se procede a revisar la información recolectada en los diferentes artículos, se identifica los microorganismos estudiados con actividad antimicrobiana del AE de *Lippia alba*, métodos de extracción, composición química, factores geobotánicos.
3. Clasificación de la información: Con base en los artículos y la información relevante analizada en cada uno de ellos, se procede a escoger los temas a tratar en el documento como descripción de la planta de *Lippia alba*, condiciones geobotánicas métodos de

extracción del AE, Actividad antimicrobiana y Métodos de susceptibilidad con la finalidad de explicar el tema de forma lógica y completa.

4. Organización del documento: Teniendo claros los temas a tratar, se empieza a realizar el documento, partiendo de una introducción general del tema que permitan entender con más facilidad los ítems que hablan específicamente de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Lippia alba*.

4. RESULTADOS

Paso 1. Búsqueda y selección de información.

Se revisaron 56 documentos en diferentes bases de datos como Pub Med, Biblioteca virtual Sinab- Universidad Nacional de Colombia, ELSEVIER, sciELO y páginas de entidades dedicadas en la documentación de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales.

Posteriormente se llevó a cabo la selección de la información de acuerdo a nuestros temas de interés que se clasificó de la siguiente forma:

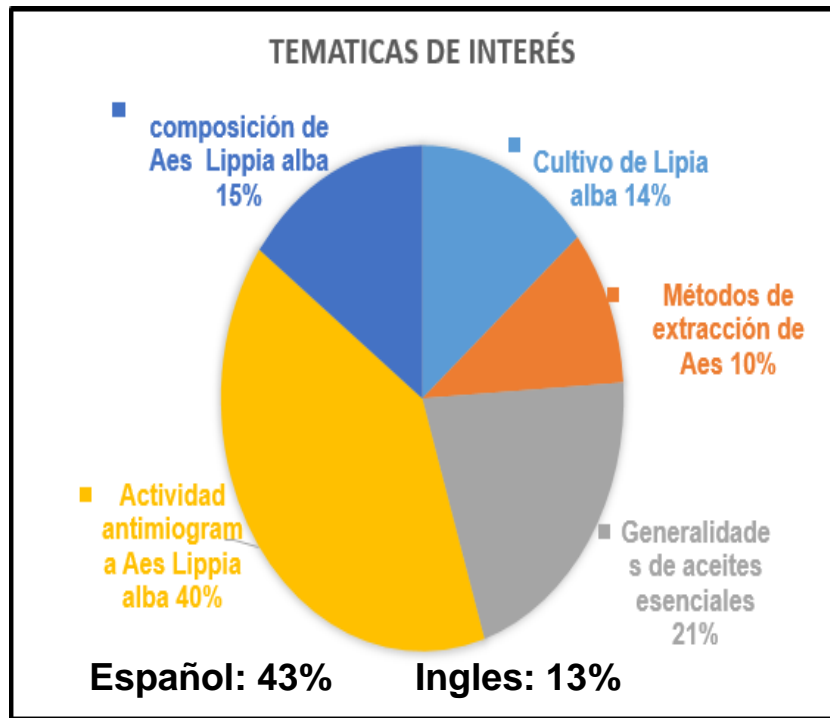


Figura N°11. Principales temáticas de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Lippia alba*. En el gráfico nos muestra las temáticas de mayor relevancia compuesta por un 40% por la actividad antimicrobiana del Aes de *Lippia alba*.

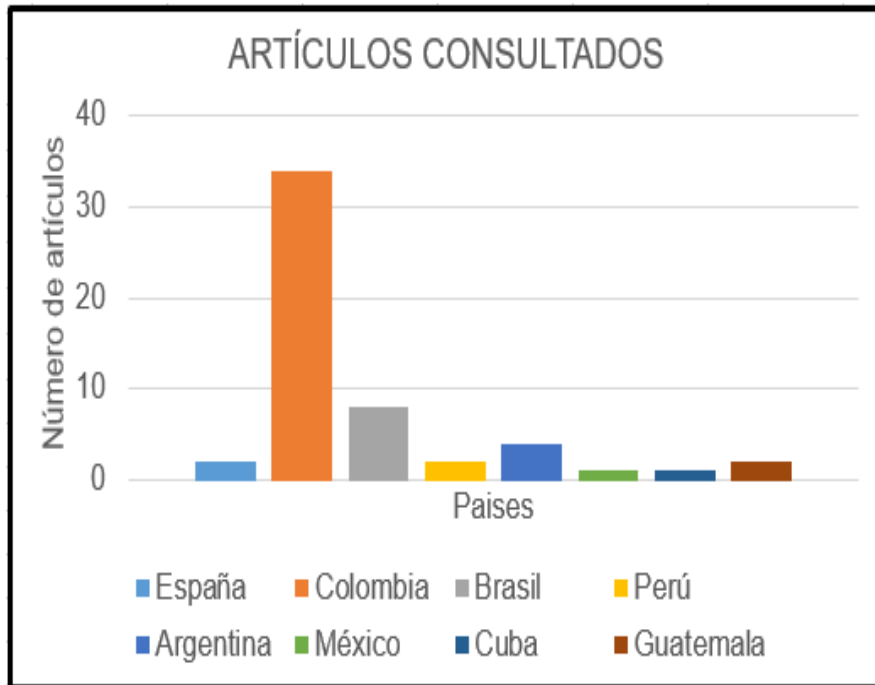


Figura N°12. Número artículos consultados en la revisión clasificados por País.

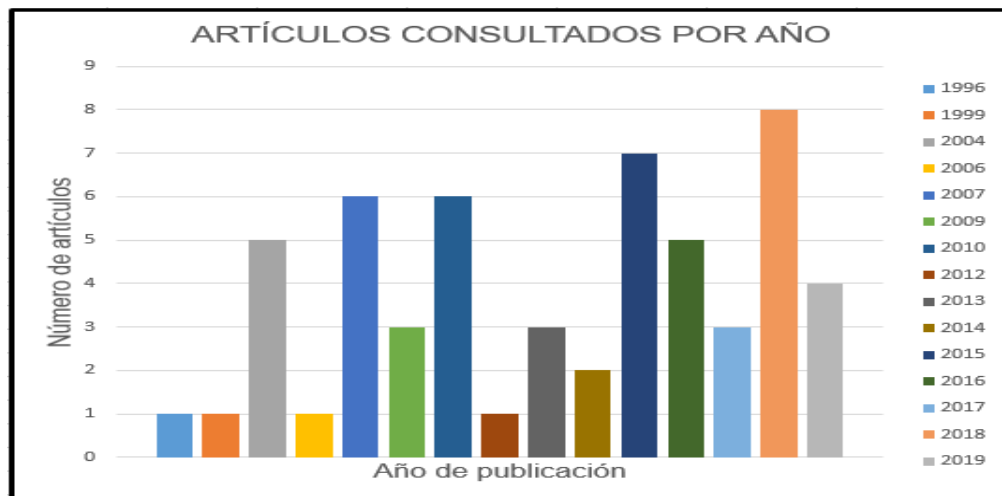


Figura N°13. Número de Artículos consultados por año de publicación.

Paso 2. Organización de la información.

Seguidamente se organizó de forma cronológica por año cada uno de los temas con las características anteriormente mencionadas en el gráfico.

Tabla N°5. Material documental seleccionado ordenado cronológicamente por tema.

Tema : Actividad antimicrobiana del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> .		
ARTICULO	AUTORES	AÑO
Desarrollo agrotecnológico de <i>Lippia alba</i> (Miller) N. E Brown ex Britton & Wilson	Guzman Patricia, Cardozo Ricardo, Garcia Vanesa.	2004
Ethnopharmacological study of two <i>Lippia</i> species from Oriximiná, Brazil.	Danielo R. Oliveira , Gilda G. Leitao , Stela L. Santos , Humberto R. Bizzo , Daise Lopes, Celuta S. Alviano , Daniela S. Alviano ,Susana G. Leitao	2006
Evaluación de la actividad anti- <i>Candida</i> y anti- <i>Aspergillus</i> de aceites esenciales de <i>lippia alba</i> (miller) n.e brown quimiotipo carvona limoneno y su asociación con sus componentes mayoritarios	Jheidys Montiel , Ana Cecilia Mesa Arango , Camilo Duran , Juan Gabriel Bueno , Liliana Betancur Galvis, Elena Stashenko	2007
Actividad antimicrobiana in vitro de compuestos volátiles y no volátiles de <i>Lippia alba</i> y extractos orgánicos y acuoso de <i>Justicia pectoralis</i> cultivadas en diferentes pisos termicos del departamento del Tolima.	Ramon Juan, Pastrana Pedro, Fernandez Katherine, Viña Amparo	2007

Antibacterial activity of <i>Lippia alba</i> (Lemon herb)	Nogueira Marisa, Díaz Gaspar, Sakumo Luciana, Tagami Patricia.	2007
Evaluación in vitro de la actividad de aceites esenciales de plantas colombianas sobre <i>Leishmania braziliensis</i>	Arevalo Yesika , Robledo Sara, Muñoz Diana, Granados Diana , Cuca Luis , Delgado Gabriela	2009
Composición química y evaluación de la actividad antiherpética in vitro de aceites esenciales de <i>Lippia alba</i> (Mill) N.E. Brown y sus componentes mayoritarios	Agudelo Lee, Gomez German , Duran Diego , Stashenko Elena , Betancur Liliana	2010
Virucidal activity of Colombian <i>Lippia</i> essential oils on dengue virus replication in vitro.	Ocazonez Raquel , Meneses Rocio , Torres Flor , Stashenko Elena .	2010
Aceites esenciales: conceptos básicos y actividad antibacteriana.	Usano Jaime, Pala Jesus, Diaz Silvia	2014
Evaluación in vitro de cuatro quimiotipos del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E. Brown como antifúngico frente a <i>Fusarium</i> spp. Recuperados de muestras clínicas	Ardizzoli Karina	2015
Actividad antibacteriana <i>in vitro</i> de aceites esenciales frente a microorganismos implicados en el acné	Torrenegra Miladys, Matiz German, Gil Jesus, Leon Glicerio	2015

Amebicidal activity of the essential oils of <i>Lippia</i> spp. (Verbenaceae) against <i>Acanthamoeba polyphaga</i> trophozoites	Amorim Israel, Scher Ricardo, Brittes Marilise, Rocha Leociley, Vilaca Emmanoel, Cabral Socrates, Fitzgerald Arie , Dos Santos Jaciana , Goncalves Tereshina , Santana Silva.	2016
Actividad antimicrobiana de aceites esenciales de <i>Lippia alba</i> y <i>Cymbopogon citratus</i> sobre streptococcus mutans y citotoxicidad en células CHO	Cuadros M, Rivera A, Alvarez O , Pabon MC , Pareja D, Mereni L.	2016
Larvicidal activity of essential oils of <i>Lippia alba</i> and <i>Lippia graveolens</i> , on <i>Aedes aegypti</i> L.	Aldana Fransisco , Cruz Sully	2017
Efecto in vitro del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> “ <i>pampa oregano</i> “ frente a <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	Rodriguez Joshep , Segura Alex.	2018
Induction of programmed cell death in <i>Trypanosoma cruzi</i> by <i>Lippia alba</i> essential oils and their major and synergistic terpenes (citral, limonene and caryophyllene oxide).	Moreno Marcela , Leal Sandra, Stashenko Elena , Garcia Liliana ,	2018

Fuente: Ilustración propia.

Tema : Composición del aceite esencial de <i>Lippia alba</i>		
TITULO	AUTORES	AÑO DE PUBLICACION
Examen Comparado de la	Ricciardi Gabriela , Veglia	1999

Composición de los Aceites Esenciales de Especies Autóctonas de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Br.	Juan, Ricciardi Armando, Bandano Arnaldo.	
Estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de <i>Lippia alba</i> , <i>Lippia organoides</i> y <i>Phyla dulcis</i> , especies de la familia <i>verbenaceae</i>	Celis Clara ,Rivero Patricia , Isaza Jose, Stashenko Elena, Martinez Jairo ,	2007
Estudio comparativo de la composición química de aceites esenciales de <i>Lippia alba</i> provenientes de diferentes regiones de Colombia, y efecto del tiempo de destilación sobre la composición del aceite	Duran Diego, Monsalve Luz , Martinez Jairo, Stashenko Elena	2007
Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian <i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity	Mesa Ana, Montiel Jehidys, Zapata Bibiana, Duran Camilo, Betancur Liliana, Stashenko Elena.	2009
Quimiotipos, Extracción, Composición y Aplicaciones del Aceite Esencial de <i>Lippia alba</i>	Linde A, Colauto A, Alberto E, Gazmin Z.	2015
Cytotoxic and Antimicrobial Constituents from the Essential Oil of <i>Lippia alba</i> (Verbenaceae)	Dos Santos Nara, Pascon Renata , Vallim Marcelo, Figueiredo Carlos, Soares Marisi, Lago Joao, Sartorelli Patricia	2016

Efecto del secado y la edad de las plantas en la composición de los aceites esenciales de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson y <i>Lippia origanoides</i> Kunth	Delgado Johannes ,Sanchez Manuel, Bonilla Carmen	2016
Composicion química (volátiles) caracterizacion físico química y actividades biológicas del aceites esencial de <i>Lippia alba</i> de Ecuador	Bermudes Carlos	2018

Fuente: Ilustración propia.

Tema : Métodos de Susceptibilidad.		
ARTICULO	AUTORES	AÑO
Manual de actualización en resistencia bacteriana y normas CLSI M100 – S20	Secretaria Distrital de Salud Bogotá- Colombia.	2010
Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana	Perez Hector, Fundación Hospital Nuestra señora de la Luz	2013
Organización mundial de la salud. Resistencia a los antimicrobianos , una amenaza mundial	OMS	2017

Fuente: Ilustración propia.

Tema : Métodos de extracción del aceite esencial		
ARTICULO	AUTORES	AÑO
Aceites esenciales : Métodos de extracción.	Perede H, Garcia Paulo,Lopez A.	2009
Aceites esenciales	Stashenko Elena	2009
Introducción a la industria de los aceites esenciales extraídos de las plantas medicinales y aromáticas	SENA	2012
Análisis de la Producción de Aceite Esencial de <i>Lippia alba</i> por Destilación Mediante Arrastre de Vapor en Planta Móvil	Álvarez Ingrid	2015
Optimización de la extracción de aceites esenciales por destilación en corriente de vapor.	Villaverde Irene	2018

Tema : Cultivo de <i>Lippia alba</i>		
ARTICULO	AUTORES	AÑO
El cultivo de pronto alivio <i>Lippia alba</i>	Bonilla C, Sánchez M, Guzmán S	2004

Desarrollo agro tecnológico de <i>Lippia alba</i> (Miller) N. E Brown ex Britton & Wilson	Guzman Patricia, Cardozo Ricardo, Garcia Vanesa.	2004
Descripción botánica, manejo del cultivo y poscosecha de <i>Lippia alba</i> (MILL.)	Bonilla Carmen, Sánchez Manuel, Delgado Johannes, Zambrano Erika.	2013

Fuente: Ilustración propia.

Paso 3. Recopilación de los principales microorganismos evaluados frente al aceite esencial de *Lippia alba*

Tabla N°6. Microorganismos evaluados con actividad antibacteriana y su respectiva concentración mínima inhibitoria mg/mL

Microorganismo	Pino J.et al.1996.	Feitosa T. 2013	Dos Santos N. et al.2016	Mesquita E. et al.2017
	MIC mg/mL	MIC mg/mL	MIC mg/mL	MIC mg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.31	0.29	—	0.5
<i>Escherichia coli</i>	2.50	1.17	4.0	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	No detectable	9.37	—	—
<i>Serratia marcescens</i>	0.63	—	4.0	—
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.63	—	4.0	—
<i>Klebsiella pneumonie</i>	2.50	—	—	—
Control: (+) amikacin 1.2 mg/mL; (-) Tween 80 1				

Fuente: Ilustración propia.

Tabla N°7. Microorganismos evaluados con actividad antibacteriana y su respectiva concentración mínima inhibitoria en ug/mL

Microorganismo	Vera R. et al (2007)	Torrenegra M. et al (2015)	Oliveira t et al. (2017)	Lopez R. et al (2018)	Amin R et al. (2018)
	MIC ug/mL	MIC ug/mL	MIC ug/mL	MIC ug/mL	MIC ug/mL
<i>Escherichia coli</i>	500	—	250	2.5	31.25
<i>S. aureus</i>	—	0.27	125	3	—
<i>S. epidermidis</i>	—	0.27	—	—	—

Fuente: Ilustración propia.

Tabla N°8. Microorganismos evaluados con actividad antifúngica y su respectiva concentración mínima inhibitoria en mg/mL

Microorganismo	Glamoclija J.et al (2011)	Santos N. et al. (2016)
	MIC mg/mL	MIC mg/mL
<i>Candida albicans</i>	—	2.0
<i>Candida dubliniensis</i>	—	0.5
<i>Cryptococcus neoformans</i>	—	1.0
<i>Aspergillus niger</i>	0.600	—
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0.300	—
Control: cloranfenicol; Fluconazole		

Fuente: Ilustración propia.

Tabla N°8. Microorganismos evaluados con actividad antifúngica y su respectiva concentración mínima inhibitoria en ug/mL

Microorganismo	Mesa A. et al (2009)	Teixeira M. et al (2014)
----------------	----------------------	--------------------------

Compuesto	Hidrodestilación (HD)	Destilación con vapor	Hidrodestilación Asistida por microondas (MWHD)	Extracción con fluidos supercrítico(SFE)
	MIC ug/mL	MIC ug/mL		
<i>Candida albicans</i>	—	2,000		
<i>Candida krusei</i>	39.4	2,000		
<i>Aspergillus fumigatus</i>	62.5	—		
<i>Aspergillus flavus</i>	250	—		

Fuente: Ilustración propia.

TABLA N°9. Composición química del Aceite esencial de *Lippia alba*.

Componentes (%)	Pino J, et.al. (1996)	Duran D, et.al. (2007)	Parra M et, al. (2010)	Feitosa T, et.al. (2011)	Veras H, et.al. (2011)	Lòpez M, et, al. (2011)	Stashe nko E, et.al. (2014)	Fitzgeral d A et, al. (2015)	Toni, C et.al. (2015)	Tofiño A. Et al, (2016)	Soto M, et, al. (2019)
Carvona	40.00 %	51.2 %	29.14 %	0.84%	—	38.1 %	0.8 %	39.58 %	—	—	54.1 %
Limoneno	5.76 %	15.5%	3.20 %	14.07 %	3.0 %	33.2 %	—	45.35 %	0.08 %	2.8 %	7.2 %
Citral	—	—	—	31.57 %	21.87 %	—	0.9 %	—	—	—	—
Piperiteno na	8.26 %	7.4 %	0.41 %	—	—	4.3 %	—	—	—	—	2.5 %
Neral	—	—	—	25.50 %	29.5 %	25.4 %	—	—	—	15.9 %	—
Geranial	—	—	—	—	31.5 %	33.1 %	—	—	—	18.9 %	—

TABLA N°7. Ilustración propia.

Tabla N° 8 Comparación entre los principales compuestos químicos aislados por cuatro métodos diferentes de extracción.

Tabla N°8. Comparación entre los principales compuestos químicos aislados por tres métodos de extracción diferentes. Tomada de: (39). Modificado por la autora.

Limoneno	32.60%	36.90%	29.58%	23.90%
Carvona	51.0%	45.06%	57.21%	40.48%
Piperitona	0.93%	0.8%	1.23%	1.00%
Piperitenona	1.47%	1.1%	1.81%	1.6%

5. DISCUSIÓN.

Las plantas medicinales son utilizadas desde hace muchos años como tratamiento para diferentes afecciones. Dentro de las diversas clases de compuestos aislados de plantas, los aceites esenciales son un grupo reconocido por presentar actividad antimicrobiana contra un gran número de microorganismos, incluyendo especies resistentes a los antibióticos; por tal motivo en los últimos años se ha dirigido las investigaciones hacia la actividad antimicrobiana de los aceites⁵⁵. En este sentido la especie *Lippia alba* resulta de gran interés por la diversidad química de los metabolitos secundarios volátiles presentes en sus aceites esenciales y la variedad de usos botánicos y etnofarmacológicos entre los que se destacan: uso para problemas digestivos, náuseas, problemas cardiovasculares, resfriados, asma y tos; además se le han atribuido propiedades sedantes, ansiolíticas, antiulceras, antifúngicas, antibacterianas, antiprotozoaria, antioxidantes, antiespasmódicas, anticonceptivas y antiinflamatorias por tanto la importancia que han cobrado últimamente la obtención del AE es sin duda un avance útil para encontrar nuevas alternativas biológicas contra microorganismos especialmente resistentes; sin embargo existen ciertos factores que aún no han sido estandarizados como la obtención del aceite esencial útil con actividad antimicrobiana este es el caso del estudio de Agudelo L. Et al quien identificó factores geobotánicos, condiciones de cultivo, condiciones genéticas, condiciones de cosecha, encontrando que existe una relación entre el momento de recolección del material vegetal y la cantidad de los componentes químicos con una menor producción de AE al mediodía; revelando la mañana como el mejor período para obtener mayor cantidad por otra parte los aceites esenciales extraídos de hojas jóvenes y maduras de *Lippia alba*, son muy similares cualitativamente; sin embargo, las cantidades de los compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial de *Lippia alba*, tales como el limoneno, la carvona, la piperitenona y la piperitona, son superiores en las hojas maduras; mientras que el biciclosesquifelandreno y el β -bourboneno, principales sesquiterpenos, presentan una mayor concentración en las hojas jóvenes. Contradictorio a esto aparecen los ensayos realizados por Ciccio et al. quien afirma que en Costa Rica específicamente la Costa Atlántica la cosecha de la planta se podría efectuar durante distintos meses del año sin que haya una variación en la composición del aceite esencial, el cual

alude a que la plasticidad genética probablemente le permite adaptarse a diversos hábitats del continente.

Otro factor limitante ha sido el proceso de extracción del AE frente a eso Stashenko et al. comparó los métodos de extracción por hidrodestilación, destilación simultánea mediante extracción con solvente, hidrodestilación asistida por microondas y encontró 45 componentes entre los mayoritariamente presentes fueron la carvona con un porcentaje entre 40-60% seguido del limoneno 24-27% y bicicloesquilfenaldreno 5-22% de la misma forma en el estudio realizado por Linde C. et al, la extracción por fluido supercrítico aisló una mayor cantidad de sesquiterpenoides e hidrocarburos y la extracción con solvente aisló una mayor cantidad de hidrocarburos monoterpenos. Mientras que Celis Et al. obtuvo el aceite esencial por medio de hidrodestilación y encontró entre los compuestos presentes en mayor proporción el quimiotipo carvona, que contiene 35% de monoterpenos oxigenados, el aceite del quimiotipo citral presentó de igual forma un importante contenido de monoterpenos oxigenados; importantes ya que constituyen el 67% de la esencia. Por su parte Duran D. et al. menciona que la composición cuantitativa del aceite esencial depende del tiempo de destilación, a medida que aumenta se incrementa el contenido especialmente de carvona y bicicloesquifelandreno, mientras que el contenido de limoneno disminuye. Yamamoto et al. refiere que la productividad también depende de factores ambientales tal como demuestra con la alta producción de citral en material recolectado de varias regiones los cuales tienen valores porcentuales altos que oscilan entre 54%. Dos Santos Et al. identificó 39 sustancias correspondientes al 99,45% de la composición total del aceite entre los compuestos identificados, aproximadamente el 67% corresponde a monoterpenos y el 19% a sesquiterpenos los principales componentes caracterizados fueron los monoterpenos isoméricos, nerol / geraniol (27.09%) y citral (21.87%), así como 6-metil-5-heptene-2-ona (11.98%) y *E*- cariofilileno (9.25%), estos compuestos se encontraron previamente como metabolitos menores en el aceite esencial de las hojas de *L. alba* que sugiere un nuevo quimiotipo nerol / geraniol y citral. Estos compuestos de naturaleza monoterpénica que contienen oxígeno, representado principalmente por aldehídos y alcoholes, tales como neral / geranial y son los responsables del aroma de las plantas y esta propiedad se está utilizando en pastas dentales e industria cosmética igualmente poseen también propiedades farmacodinámicas.

Con respecto a la actividad antimicrobiana, se resalta que hay una inhibición mejor contra unos microorganismos que otros, tal como lo menciona Zamora Et al sobre el mecanismo de la actividad, aunque no se sabe a ciencia cierta se ha manejado hipótesis como por ejemplo que no existe un sólo mecanismo de acción o que solo uno de sus constituyentes sea el responsable de esta actividad la mayor resistencia a los AE por parte de las bacterias Gram negativas parece estar asociada a la estructura de su lipopolisacárido de la pared celular que bloquea el paso de los aceites hidrófobos⁵⁵. Tales causas podrían explicar entonces el motivo por el cual la mayoría de resultados de estudios encontrados tengan una mejor actividad contra bacterias especialmente gram positivas como: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* que sobre bacterias Gram negativas como *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella choleraesuis* de las especies estudiadas solo *Pseudomonas aeruginosa* mostró resistencia a las diferentes concentraciones evaluadas de dicho agente. El resto de las bacterias presentaron susceptibilidad frente al aceite esencial, con valores de MIC entre 0,31 y 0,63 mg/mL, *S. aureus* fue de todas las bacterias la que resultó sensible con la menor dosis del agente antibacteriano con una MIC de 0.29 mg/mL⁵⁴. Cabe resaltar que varios autores mencionan que para hablar de actividad antibacteriana de los aceites de plantas se habla de fuerte inhibición cuando la MIC tiene un valor hasta 500 µg / mL, una inhibición moderada que se caracteriza por la MIC entre 600 µg / mL y 1500 µg / mL y la inhibición débil una MIC por encima de 1600 µg/mL. No obstante, en los estudios encontrados se ha reportado la MIC del AE en unidades mg/mL. Igualmente, la actividad antifúngica evaluada contra: *Cándida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida dubliniensis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Cryptococcus grubii*, *Cryptococcus gattii*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum*. Aunque AE de *Lippia alba* posee resultados representativos contra todos los microorganismos analizados, se ha descrito actividad más sensible especialmente contra las levaduras que sobre las cepas bacterianas por ejemplo solo a 4.0 mg/ml, *E. coli* mostró una inhibición del crecimiento de más del 80%; todas las demás cepas mostraron una MIC de más de 4,0 mg/mL con inhibiciones del crecimiento por debajo del 70%. Por el contrario, todas las cepas de levadura probadas fueron sensibles al aceite esencial de *L. alba* y los MIC calculados para ellos fueron de dos a cuatro veces más bajos que los encontrados para cepas bacterianas.

Cabe destacar que la actividad antimicótica está relacionada con el porcentaje de sus compuestos especialmente el geranial el cual parece ser el principal componente fungicida del aceite esencial de *L. alba*⁴⁵.

Las investigaciones recopiladas en el presente estudio han identificado la importancia del aceite esencial de *Lippia alba* y el aprovechamiento de sus metabolitos frente a microorganismos resistentes o no a tratamientos convencionales, sin embargo, estos compuestos podrían aprovecharse en mayor medida si se estandarizaran métodos para de esta forma conservar la originalidad de la composición del aceite esencial de *Lippia alba* y pueda ser más sensible su actividad antimicrobiana.

6. CONCLUSIONES.

1. Los microorganismos estudiados frente a la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Lippia alba* fueron bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* las cuales se caracterizaron por presentar mayor sensibilidad que las bacterias Gram negativas como *Escherichia coli*. De los hongos evaluados, *Candida dubliniensis*, *Cryptococcus grubii*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus niger* tuvieron mayor sensibilidad con valores MIC entre 0.300-0.600 mg/mL.
2. La variabilidad observada en la composición química de los aceites esenciales extraídos de las plantas provenientes de diferentes regiones de Colombia y otros países se debe en su mayoría a factores geobotánicos, condiciones de cultivo, diversidad genética y parte de la planta utilizada para la obtención del aceite esencial de *Lippia alba*.
3. Los métodos más comunes de extracción del aceite esencial son: destilación por arrastre con vapor de agua, hidrodestilación y Hidrodestilación asistida por microondas y vapor húmedo, de estos métodos el más empleado es destilación por arrastre con vapor de agua o tipo Clevenger, aunque tiene ciertas limitaciones como disminución en el rendimiento del aceite conserva mejor las propiedades químicas.
4. Los principales componentes encontrados fueron: Carvona 53%, Limoneno 11%, Biciclosesquifelandreno 16.4%, Piperitenona 36%, Piperitona 2.5% y B-bourboneno 1.5%. Principales compuestos que alteran la permeabilidad de las membranas de microorganismos especialmente bacterias y efectuar su acción antimicrobiana.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Usano J, Palá J, Díaz S. Aceites esenciales: conceptos básicos y actividad antibacteriana, *Reduca*, 2014; 7 (2): 60-70 [consultado 1 de septiembre de 2018] [internet] Disponible en : <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/1553/1747>
2. Vera J Pastrana P, Fernández K, Viña A. Actividad antimicrobiana in vitro de compuestos volátiles y no volátiles de *Lippia alba* y extractos orgánicos y acuoso de *Justicia pectoralis* cultivadas en diferentes pisos termicos del departamento del Tolima. *Scientia et technica* . 2007 Mayo :1(33) 345-348. [consultado el 1 de septiembre de 2018] [internet] Disponible en : <http://revistas.utp.edu.co/index.php/revistaciencia/article/view/6113/3259>
3. Lopez R; Jeremy J; Alayo S; David A. Efecto in vitro del aceite esencial de las hojas de *Lippia alba* “pampa orégano” frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. [Internet] [Citado 1 de Mayo de 2018] .Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/9704>
4. Ricciardi G ,Veglia J ,Ricciardi A , Bandoni A, Examen Comparado de la Composición de los Aceites Esenciales de Especies Autóctonas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. U.N.N.E [Consultado 1 de septiembre de 2018] [internet] Disponible en : <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/exactas/e-029.pdf>
5. Linde G, Colauto N,; Albertó E, Gazim Z. Quimiotipos, Extracción, Composición y Aplicaciones del Aceite Esencial de *Lippia alba*. *REVISÃO* , 2016;18(1): 191-200. [consultado 1 de septiembre de 2018] [internet] Disponible en : <http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v18n1/1516-0572-rbpm-18-1-0191.pdf>
6. Capacidad antibiótica de aceites esenciales empleados en aromaterapia. *La enciclopedia* . 2014: (1) : 753-754 [consultado 4 de septiembre de 2018] [internet] Disponible en : <https://feriadelasciencias.unam.mx/antiores/feria15/aromaterapia.pdf>
7. Secretaria distrital de salud. Manual de actualización en resistencia bacteriana y normas CLSI M100 – S20 2010. 2-74 [consultado 4 de septiembre de 2018] [internet] Disponible en : http://www.saludcapital.gov.co/sitios/VigilanciaSaludPublica/SiteCollectionDocuments/Manual_Resistencia_SDS_2010.pdf

8. Pérez H, Robles A. Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. Revista médica . 1 mayo de 2013 ; 4(3):186-191.[consultado 5 de septiembre de 2018] [internet] Disponible en : <http://www.medigraphic.com/pdfs/revmed/md-2013/md133i.pdf>

10. Durán G, Monsalve D, Martínez L, René J, Stashenko E. Estudio comparativo de la composición química de aceites esenciales de *Lippia alba* provenientes de diferentes regiones de Colombia , y efecto del tiempo de destilación sobre la composición del aceite Scientia Et Technica,2007 Abril : 13(33): 435-438 [Consultado 5 de septiembre de 2018] [internet] Disponible en :

<http://www.redalyc.org/pdf/849/84933123.pdf>

11. Rodríguez C , Zarate A , Sánchez L. Antimicrobial activity of four varieties of plants against pathogens clinical significance in Colombia.NOVA .2017 marzo ;(27):119-130.[consultado 6 de septiembre] [internet] Disponible en : <http://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/nova/article/view/1963/2184>

12. Organización mundial de la salud . Resistencia a los antimicrobianos , una amenaza mundial .Boletín de medicamentos esenciales . 2000.[internet] [consultado 5 de septiembre de 2018] Disponible en : <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s2250s/s2250s.pdf>.

13. Nogueira M, Diaz G, Sakumo L, Tagami P, Antibacterial Activity of *Lippia alba* (LemonHerb). Lat. Am. J. Pharm.2007; 26 (3): 404-6 [Internet] [Consultado 5 de septiembre de 2018] Disponible en <file:///C:/Users/Lab.%20Bloque%205/Downloads/LAJP-Lippiaalba-2007.pdf>

14. Oliveira D, Leitao D, Santos S, Bizzo H, Lopez D, Alviano C, LeitaO S. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximina, Brazil, Journal of Ethnopharmacology, 2006 april27; 108(1):103-108 [consultado 9 de Septiembre de 2018] [internet] Disponible en: <https://sci-hub.tw/10.1016/j.jep.2006.04.018>

15. Montiel J, Mesa A, Duran C, Bueno J, Betancur L, Stashenko E. Evaluación de la actividad anti- *Candida* Y anti-*Aspergillus* De aceites Esenciales de *Lippia alba* (quimiotipo carvona-Limoneno y su asociación con sus Componentes mayoritarios. Redalyc.2007 May : 33 (243)246 [citado el 9 de septiembre de 2018] [internet] Disponible en : <http://www.redalyc.org/html/849/84903364/>
16. Celis N, Escobar P, Isaza J, Stashenko E, Martínez J. estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de *Lippia alba*, *Lippia organoides* y *phyla dulcis*, especies de la familia verbenaceae . Scientia Et Technica, 2007 abril:13(103)105 [consultado 1 de Septiembre de 2018] [internet] Disponible en : <http://www.redalyc.org/pdf/849/84903324.pdf>
17. Nogueira M, Diaz G, Sakumo L, Tagami P. Antibacterial Activity of *Lippia alba* (Lemon Herb) Lat. Am. J. Pharm 2007 Enero: 26 (3): 404-6 [citado 1 de septiembre de 2018] [internet] Disponible en : https://www.researchgate.net/profile/Gaspar_Diaz/publication/289347684_Antibacterial_activity_of_Lippa_alba_Lemon_herb/links/56a7596908ae0fd8b3fdfac4.pdf
18. Mesa A, Montiel J, Zapata B, Duran C, Betancur L, Stashenko E, SciELO. 2009 sep; 104(6):874-884
19. Agudelo L, Gomez A, Duran D, Stashenko E, Betancur L . Composición química y evaluación de la actividad antiherpética in vitro de aceites esenciales de *Lippia alba* y sus componentes mayoritarios Salud UIS, 2010 Dic: 42 (230)239 [citado 1 de septiembre de 2018] [internet] Disponible en : <http://www.redalyc.org/html/3438/343835700006/>
20. Ocazonez R, Stashenko E, Torres F , Menses R. Virucidal activity of Colombian *Lippia* essential oils on dengue virus replication in vitro. NCBI. 2010 May; 105(3):304-9. [consultado 13 de septiembre de 2018] [internet] Disponible en : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20512244>
21. Ospina J , Sanchez M, Bonilla C. Effects of drying and age plants on the composition of the essential oils of *Lippia alba* and *Lippia organoides*. 2016 Jun; 65(2)

[Consultado 8 de septiembre de 2018] [internet] Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-28122016000200010

22. Alvarez I, Uribe C, Acevedo J, Lesmes R, Análisis de la Producción de Aceite Esencial de *Lippia alba* por Destilación Mediante Arrastre de Vapor en Planta Móvil. SENA, 2015 [citado 9 de Septiembre de 2018] [internet] Disponible en : <http://revistas.sena.edu.co/index.php/int/article/view/443>

23. Ardizoli K, Evaluación in vitro de cuatro quimiotipos del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown como antifúngico frente a *Fusarium* spp. Recuperados de muestras clínicas. RIUNNE. 2015 [consultado 14 de septiembre de 2018] [internet] Disponible en: <http://repositorio.unne.edu.ar/handle/123456789/480>

24. Torrenegra M, Matiz G, González J, Méndez G. Actividad antibacteriana in vitro de aceites esenciales frente a microorganismos implicados en el acné. Scielo. 2015 Julio; 49(3) [Consultado 9 de septiembre de 2018] [internet] Disponible en http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152015000300011

25. Dos santos N, Pascon R, Vallim M, Figueiredo M, Soares M, Henrique J, Sartorelli P. Cytotoxic and Antimicrobial Constituents from the Essential Oil of *Lippia alba* (Verbenaceae) 2016, 3(3), 22 [9 de septiembre de 2018] [internet] Disponible en : <http://www.mdpi.com/2305-6320/3/3/22/htm>.

26. Amorin S, Scher R, Brittes M, Rocha L, Vilaca E, Holanda S, Fitzgerald A, Dos santos J, T Gonçalves, Santana S. Amebicidal activity of the essential oils of *Lippia* spp. (Verbenaceae) against *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. 2016 Oct : 115(535):540, [Consultado el 8 de septiembre de 2018] [internet] Disponible en : <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00436-015-4769-4>

27. Ortega M, Tofiño A, Mena O, Martínez M, Galvis D Merini, L. Actividad antimicrobiana de aceites esenciales de *Lippia alba* y *Cymbopogon citratus* sobre *Streptococcus mutans* y citotoxicidad en células CHO. Vitae, 2016 :23(1):503-506. [consultado 10 de septiembre de

- 2018] [internet] Disponible en :
<https://search.proquest.com/openview/f7758be687adb6c93663d66e17644a69/1?pq-origsite=gscholar&cbl=1806352>
29. Aldana F, Cruz S., Larvicidal activity of essential oils of *Lippia alba* and *Lippia graveolens*, on *Aedes aegypti* L. IIQB .2017 enero ; 26(2) : 1-13 [Consultado 14 de septiembre de 2018] [internet] Disponible en : <file:///C:/Users/Lab.%20Bloque%205/Downloads/Dialnet-ActividadLarvicidaDeAceitesEsencialesDeLippiaAlbaY-5920178.pdf>
30. Lopez J, Alayo A. Efecto in vitro del aceite esencial de hojas de *Lippia alba* “pampa oregano” frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* . UNT , 2018 [Consultado 15 de septiembre de 2018][internet] Disponible en :
<http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/9704/Rodriguez%20Lopez%20Joseph%20Jeremy.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
31. Moreno E, Leal S, Stashenko E, García L Inducción de la muerte celular programada en *Trypanosoma cruzi* por los aceites esenciales de *Lippia alba* y sus principales y sinérgicos terpenos (citral, limoneno y óxido de cariofileno). 2018 Jul 27; 18 (1): 225 [consultado 8 de septiembre de 2018][internet]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30053848>
32. Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis. JBB H. Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis [Internet]. Colecciones.jbb.gov.co. 2019 [cited 7 April 2019]. Available from: <http://coleccion.jbb.gov.co/herbario/especimen/12650>
33. Parra Garcés M, Caroprese Araque J, Arrieta Prieto D, Stashenko E. Morfología, anatomía, ontogenia y composición química de metabolitos secundarios en inflorescencias de *Lippia alba* (Verbenaceae) [Internet]. Scielo.sa.cr. 2010 [cited 7 April 2019]. Available from: <http://www.scielo.sa.cr/pdf/rbt/v58n4/a37v58n4.pdf>
34. Muñoz M., Aida M., Vallejo C., Franco A., Sánchez O., Manuel S., Morfología y anatomía de las flores y semillas de pronto alivio. Acta Agronómica [en línea] 2007, 56 (Sin mes) : [Fecha de consulta: 5 de abril de 2019] Disponible en: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169920474002>> ISSN 0120-2812

35. Bonilla C, Orozco J, Delgado J, Zambrano E, Buitrago L, Castro F. Descripción botánica y manejo del cultivo y post cosecha de *Lippia alba*. [internet] 2013 [citado el 7 de abril de 2019]. Available from: [http://file:///C:/Downloads/Descripcinbotnicamanejodelcultivoyposcosecha deLippia](http://file:///C:/Downloads/Descripcinbotnicamanejodelcultivoyposcosecha%20deLippia).
36. Parra Garcés M, Caroprese Araque J, Arrieta Prieto D, Stashenko E. Morfología, anatomía, ontogenia y composición química de metabolitos secundarios en inflorescencias de *Lippia alba* (Verbenaceae) [Internet]. Scielo.sa.cr. 2010 [cited 7 April 2019]. Available from: <http://www.scielo.sa.cr/pdf/rbt/v58n4/a37v58n4.pdf>
37. Ardizzoli K. Evaluación in vitro de cuatro quimiotipos del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown como antifúngico frente a *Fusarium* spp. recuperados de muestras clínicas. [Maestría]. Universidad Nacional del Nordeste; 2015.
38. Bonilla C, Sánchez M, Guzmán S. Programa de investigación en Plantas Medicinales, Aromáticas y Condimentarias [Internet]. Bdigital.unal.edu.co. 2004 [cited 7 April 2019]. Available from: <http://bdigital.unal.edu.co/5409/1/9588095182.pdf>
39. Duran D, Manosalve L, Martínez J, Stashenko E. Estudio comparativo de la composición química de aceites esenciales de *Lippia alba* provenientes de diferentes regiones de Colombia, y efecto del tiempo de destilación sobre la composición del aceite [Internet]. Webcache.googleusercontent.com. 2019 [cited 7 April 2019]. Available from: https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:1nCG_kCiEdEJ:https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4812500.pdf+&cd=1&hl=es-419&ct=clnk&gl=co
40. Delgado J, Sánchez M, Bonilla C. Efecto del secado y la edad de las plantas en la composición de los aceites esenciales de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britton & P. Wilson y *Lippia organoides* Kunth. Acta agron. [internet]; 2016;65(2):170-175. [consultado 15 de septiembre de 2018] Disponible en : https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/47576/52796
41. Alvarez I, Uribe C, Acevedo J, Lesmes R. Análisis de la producción de aceite esencial de *Lippia alba* por Destilación mediante arrastre de vapor en planta móvil. SENNOVA. [Internet]; Junio 2015: 2:4-30. [consultado el 15 de septiembre de 2018] Disponible en : <http://revistas.sena.edu.co/index.php/int/article/view/443/462>

42. Contreras E, Ruiz J. Estudio comparativo de dos métodos de extracción para el aceite esencial presente en la cáscara de Pómelo (*Citrus maxima*) - PDF [Internet]. Docplayer.es. 2019 [cited 7 April 2019]. Available from: <https://docplayer.es/15193716-Estudio-comparativo-de-dos-metodos-de-extraccion-para-el-aceite-esencial-presente-en-la-cascara-de-pomelo-citrus-maxima.html>
43. Montoya G, Aceites esenciales, una alternativa de diversificación para el eje cafetero. [Tesis doctoral,internet]Universidad Nacional de Colombia,2010[citado 15 de septiembre de 2018] Disponible en : <http://bdigital.unal.edu.co/50956/7/9588280264.pdf>
44. Guzman S,Cardozo R, Garcia V.Desarrollo agrotecnológico de *Lippia alba*(Miller) N.E. Brown ex Britton & Wilson.Revista científica Guillermo de Ockham.[Internet] Enero 2004; 7 (1):201-215.[Consultado 16 de septiembre de 2018] Disponible en : <http://www.revistas.usb.edu.co/index.php/GuillermoOckham/article/view/461/267>
45. Linde G, Colauto N, Albertó E,Gazim Z .Quimiotipos, extracción, composición y aplicaciones del aceite esencial de *lippia alba*. bras. pl. med., campinas, 19 sep 2015: 18(1):191-200.[internet][consultado el 16 de septiembre de 2018] disponible en : <http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v18n1/1516-0572-rbpm-18-1-0191.pdf>
46. Stashenko E. Aceites esenciales. UIS [Internet]; octubre de 2009; 1:5-80 [Consultado 10 de septiembre de 2018] Disponible en : <http://cenivam.uis.edu.co/cenivam/documentos/libros/1.pdf>
47. Peredo H,Palou E, Lopez A, Aceites esenciales: métodos de extracción . Temas selectos de ingeniería de alimentos 3 .[internet] . 2009:24-32 [consultado el 10 de septiembre de 2018] Disponible en : [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf)
48. Villaverde I. Optimización de la extracción de aceites esenciales por destilación en corriente de vapor. ETSII-UPM [Tesis pregrado ; internet]febrero 2018; [Consultado 18 de septiembre de 2018] Disponible en : http://oa.upm.es/49669/1/TFG_IRENE_CASADO_VILLAVERDE.pdf
49. Sistema De Bibliotecas Sena. Introducción A La Industria De Los Aceites Esenciales Extraídos De Plantas medicinales y aromáticas, [Internet] [Consultado 10 De septiembre De 2018] Disponible En

https://Repositorio.Sena.Edu.Co/Sitios/Introduccion_Industria_Aceites_Esenciales_Plantas_Medicinales_Aromaticas/Pdf/Aceites%20esenciales%20extraidos%20de%20plantas%20medicinales%20y%20aromaticas.Pdf

50. 4. Tol V. Comparación de la calidad del aceite esencial crudo de citronela (*Cymbopogon winteriana jowitt*) en función de la concentración de geraniol obtenido por medio de extracción por arrastre con vapor y maceración [Internet]. Scribd. 2019 [citado 11 April 2019]. Disponible en: <https://pt.scribd.com/document/94543334/tesis-iq>

51. Taroco R, Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica, *Técnicas de Bacteriología y Virología Médica*, [internet][Cited 11 de marzo de 2019] Disponible en : <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA36.pdf>

52. Cavalierie S, Coyle M, Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Library of Congress Cataloging. 2005. [Internet][consultado el 13 de marzo de 2019] Disponible en: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2005/susceptibilidad-antimicrobiana-manual-pruebas-2005.pdf>

53. Secretaría distrital de Salud, Manual de actualización en resistencia bacteriana y normas CLSI M100 –S20 2010. GREBO. 2010. [Internet][citado el 3 de abril de 2019] Disponible en http://www.saludcapital.gov.co/sitios/VigilanciaSaludPublica/SiteCollectionDocuments/Manual_Resistencia_SDS_2010.pdf

54. Pino J, Ortega A, Rosado A, Rodríguez M, Baluja R. Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) n. e. Brown. SciELO, Ciudad de la Habana 1996. [internet][Citado el 10 de abril de 2019] Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034-75151996000100007&script=sci_arttext&tlng=pt

55. Machado T, Nogueira N, Cassia R, Texeira C, Chaves V. The antimicrobial efficacy of *Lippia alba* essential oil and its interaction with food ingredients. *Braz J Microbiol.* 2014; 45(2): 699–705 [internet] [consultado el 9 de abril de 2019] Disponible en : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4166302/>

56 Cruz O, Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. *sciELO*. Rio de Janeiro. 2009 [Internet] [consultado el 9 de abril de 2019] Disponible en : http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762009000600010&lng=en&nrm=iso&tlng=en