

Fitoquímica De *Lippia Citriodora* K cultivada en Ecuador y su actividad biológica

Elington, Vélez¹; Haydelba, D'Armas^{2*}; Carmita, Jaramillo-Jaramillo³; Ana, Echavarría-Vélez⁴; Chinwe Christy, Isitua⁵

Resumen

Se realizó un estudio fitoquímico de metabolitos secundarios, actividad antimicrobiana y letal del extracto metanólico de las partes botánicas de *Lippia citriodora* K (cedrón). Se detectó la presencia taninos, polifenoles, triterpenos y esteroides insaturados para las hojas, flores y tallo; fenilpropanoides y catequinas para tallos y flores; alcaloides para hojas y flores; saponinas para hojas y tallos. Además, las flores exhibieron la presencia de cumarinas y metilencetonas. Todos los extractos metanólicos mostraron una acción bactericida alta contra cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, a excepción del extracto de las flores que exhibió una actividad antibacteriana moderada o mediana contra cepas de *S. aureus*. Además, se observó un efecto antifúngico moderado del extracto de las hojas, y una actividad alta de los extractos del tallo y flores, contra la cepa del hongo *Candida albicans*. Todos los extractos mostraron letalidad significativa (<1000 µg/ml) frente a nauplios de *Artemia salina* a las 24 h de exposición (168,77, 82,19 y 172,76 µg/ml para las hojas, tallo y flores, respectivamente); donde el extracto del tallo presentó mayor letalidad con CL₅₀ de 82,19 µg/ml, considerado altamente tóxico según CYTED. Se puede inferir que la especie *L. citriodora* es una fuente promisoría de metabolitos secundarios bioactivos con actividad farmacológica.

Palabras Clave: actividad tóxica, actividad antimicrobiana, Artemia salina, cedrón, metabolito secundario.

Phytochemistry of *Lippia citriodora* K grown in Ecuador and its biological activity

Abstract

This research was based on a phytochemical study of secondary metabolites, lethal and antimicrobial activity of methanolic extract of botanical organs *Lippia citriodora* K (lemon verbena). It was detected the presence of tannins, polyphenols, triterpenes and unsaturated sterols for leaves, flowers and stem; phenylpropanoids and catechins for stems and flowers; alkaloids for leaves and flowers; saponins for leaves and stems. In addition, the flowers exhibited the presence of coumarins and methylenketones. Methanolic extracts showed high bactericidal action against strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, in the antimicrobial bioassay, except for the flowers which exhibited moderate activity against *S. aureus* strains. Furthermore, moderate antifungal effect was observed for leaves extract and high activity for stem and flowers extracts against the strain of *Candida albicans* fungus. All extracts showed significant lethality (<1000 µg/ml) against *A. salina* nauplii at 24 h of exposure (168.77, 82.19 and 172.76 µg/mL for leaves, stems and flowers, respectively); where the methanolic extract of the stem showed the highest lethality with LC₅₀ value of 82.19 µg/ml, considered highly toxic according to CYTED. It can be inferred that *L. citriodora* is a promising source of bioactive secondary metabolites with pharmacological activity.

Keywords: Arima models; delinquency rate; early warning; risk of default; time series.

Recibido: 21 de Agosto de 2018
Aceptado: 03 de Diciembre de 2018

¹ BQF en Bioquímica y Farmacia; Universidad Técnica de Machala; Provincia del Oro, Ecuador; elingtonvelezparraga@gmail.com

² PhD en Química; Universidad Estatal de Milagro (UNEMI); Docente Ocasional; Milagro, Provincia de Guayas, Ecuador; Investigador, Universidad de Oriente (UDO); Cumaná 6101, Sucre, Venezuela; hdarmasr@unemi.edu.ec; <http://orcid.org/0000-0001-9301-3801>.

³ MSc en Fitofármacos; Universidad Técnica de Machala (UTMACH); Docente Titular; Provincia del Oro, Ecuador; cjaramillo@utmachala.edu.ec

⁴ PhD en Ing. De Alimentos; Universidad Estatal de Milagro (UNEMI); Docente Ocasional; Milagro, Provincia de Guayas, Ecuador; aechavarriav@unemi.edu.ec

⁵ PhD en Microbiología; Afe Babalola University; Docente e Investigador; Ado-Ekiti, Ekiti State, Nigeria; christyking@yahoo.com

*Autor para correspondencia: hdarmasr@unemi.edu.ec

I. INTRODUCCIÓN

Lippia es un género de plantas con flores perteneciente a la familia Verbenaceae. Contiene alrededor de 220 especies con diversas aplicaciones etnofarmacológicas. Una miríada de fitoconstituyentes biológicamente activos abunda en *Lippia* (Okhale *et al.*, 2016).

Las plantas pertenecientes a este género han sido ampliamente utilizadas en etnobotánica en América del Sur y Central y en África tropical como alimentos, medicinas, edulcorantes y saborizantes de bebidas (Funari *et al.*, 2012). Las especies de *Lippia* tienen una larga historia de uso en aplicaciones medicinales tradicionales, algunas de las cuales tienen sido científicamente validado. Se usan principalmente en el tratamiento de trastornos respiratorios y gastrointestinales. Además, exhiben actividades antipalúdicas, espasmolíticas, sedantes, hipotensivas y antiinflamatorias (Abena *et al.*, 2001; Jigam *et al.*, 2009).

Las composiciones químicas de los aceites esenciales de las especies *Lippia* varían notablemente dando lugar a quimiotipos. Estos dependen de factores geográficos, factores genéticos, condiciones ambientales, estado nutricional y los efectos del daño mecánico o herbivoría. En términos generales, el limoneno, el p-cimeno y el β -cariofileno desprendieron los aceites esenciales de las especies conocidas de dicho género y podrían considerarse marcadores quimiotaxonómicos (Okhale *et al.*, 2016).

Lippia citriodora Kunth (cedrón) o su sinónimo científico *Aloysia triphylla* es una planta perenne del tipo arbusto que está ampliamente distribuida en zonas tropicales, subtropicales, centrales de Sudamérica y en África. La planta, que florece en suelo arcilloso, se cría a partir de semillas y esquejes. Las hojas se usan para dar sabor a bebidas, postres, ensaladas y jaleas de frutas y para condimentar los alimentos. Una decocción hecha con hojas y flores se da como febrífugo, sedante y antifatulento (Omollo-Ombito *et al.*, 2014).

Herranz-López *et al.* (2015) mencionan que las hojas, flores y las partes aéreas de *L. citriodora*, se usaron en medicina popular para el tratamiento

de enfermedades respiratorias y enfermedades del sistema digestivo. Además, en su investigación observaron que los polifenoles identificados en los extractos disminuyeron la acumulación de los triglicéridos (TG) y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que fomentan la formación de radicales libres.

Hace casi dos décadas, Ávila *et al.* (1999) reportaron en la literatura aspectos sobre la bioactividad y fitoquímica de la especie *L. citriodora*, indicando que los verbascósidos (derivados fenilpropanoides) aislados de la misma y de otras especies del género *Lippia* parecían ejercer una actividad antimicrobiana más potente contra bacterias Gram-positivas que contra bacterias Gram-negativas.

En otro estudio más reciente, se aislaron tres compuestos fenólicos a partir del extracto en acetato de etilo de hojas de *L. citriodora*. Los tres compuestos se analizaron para actividades analgésicas, antipiréticas, antioxidantes y antiinflamatorias tanto en ratones como en ratas y mostraron una buena actividad (El-Hawary *et al.*, 2012). Adicionalmente, otros investigadores reportaron que cedrón contiene cantidades considerables de polifenoles, es decir de flavonoides y ácidos fenólicos (Zamorano *et al.*, 2006; Álvarez, 2012).

Recientemente, ha sido publicado un estudio sobre la identificación de cinco nuevos compuestos, junto con 26 conocidos, a partir del extracto de etanol al 95% de partes aéreas de *Lippia triphylla* recolectada en Ruanda (África). Sus estructuras fueron elucidadas por métodos químicos y espectroscópicos. Todos los compuestos fueron probados por sus efectos de inhibición de la acumulación de antioxidantes y triglicéridos en células L6 y células HepG2, respectivamente. Este estudio proporcionó respaldo científico parcial para el desarrollo y la utilización de partes aéreas de *L. triphylla* (Zhang *et al.*, 2015).

El aumento de la confianza en el uso de plantas medicinales y productos derivados se ve reflejado por su empleo mayoritario tanto en países en vías de desarrollo, como en los países desarrollados, y esta realidad es muy notable en Ecuador al poseer una enorme biodiversidad (Oliveira *et al.*, 2005).

En Ecuador se comercializan varias plantas medicinales, a las cuales se les da diversos usos además del terapéutico, pero aún no existen estudios científicos para la gran cantidad de especies vegetales que cuantifiquen cuan valiosas son en cuanto a las alternativas terapéuticas que se les puede dar. El cedrón es una de las especies vegetales más utilizadas en Latinoamérica, debido a sus propiedades farmacológicas, habitualmente para tratar dolores abdominales.

En el país existen también muchas plantas con falta de estudio en cuanto a la actividad antimicrobiana o letal que puedan generar, y que estas podría ser muy útiles en el tratamiento de las infecciones microbianas que en la actualidad están apareciendo y que son cada vez más difíciles de combatir, tal es el caso de la especie en estudio, que al poseer metabolitos secundarios de diversas familias dependiendo del hábitat, depredadores etc., éstos podrían actuar como mecanismo de defensa ante factores patógenos como hongos, bacterias, parásitos, etc. (Kummerer, 2004).

Por otra parte, el aumento de microorganismos resistentes a los agentes antimicrobianos es uno de los principales problemas al que se enfrenta la ciencia médica en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. La búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos potentes con mecanismos de acción que actúen contra bacterias u hongos resistentes a los antimicrobianos disponibles en la actualidad, es de vital importancia. Por tanto, es necesario realizar investigaciones que permitan evaluar plantas medicinales, de amplio uso etnobotánico en una o varias zonas del Ecuador, como fuentes de nuevos fármacos (Kummerer, 2004).

En el presente trabajo de investigación, se evaluó el potencial farmacognóstico (composición química de *L. citriodora* mediante ensayos cualitativos) de los órganos botánicos de la planta (flores, tallos y hojas), y se determinó su bioactividad a través de bioensayos de actividad antimicrobiana y letalidad o toxicidad con larvas de *Artemia salina*.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de las muestras

Los ejemplares de la especie vegetal *L. citriodora*

fueron adquiridos en agosto del 2014 en el mercado central de la ciudad de Machala (Provincia del Oro: coordenadas 3°16'00" S 79°58'00" O; 65-85 % de humedad relativa; temperatura y altitud promedio de 26 °C y 12 m respectivamente), Ecuador. Según su calidad organoléptica, se seleccionaron los órganos botánicos sanos (hojas, tallo y flores) para realización de los análisis, siendo procesados en el laboratorio de Farmacia de la Universidad Técnica de Machala, sin almacenamiento previo. La identificación de la especie fue realizada por el Botánico Jesús Inca del Herbario de Quito, Ecuador.

Obtención de los extractos

De cada planta se utilizaron las hojas, tallo y flores, éstas se lavaron con agua destilada y secadas al aire por 24 horas y posteriormente en una estufa (Memmert SNB 400 con flujo de aire) a 37 °C por 24 horas. Luego, se trituraron con un molino (Lab. Mill serial No. 56969, Type AR 400 Erweka®, Alemania) y se pesaron. Los extractos se obtuvieron por maceración de 200 g de las partes trituradas con metanol 100% puro por 72 h. Los extractos fluidos se filtraron y el residuo se re-extrajo con metanol por 48h; los filtrados combinados fueron concentrados a presión reducida (aprox. 11 mbar) y 40 °C en un rotaevaporador marca Heidolph (Modelo Hei-VAP Valor, Alemania) obteniéndose el extracto metanólico crudo por especie. Se determinó la masa de cada uno de los extractos de las plantas estudiadas.

Análisis fitoquímico

Para detectar las familias de compuestos presentes en los extractos estudiados se realizaron pruebas químicas específicas, las cuales permitieron apreciar la posible presencia o ausencia de cumarinas y fenilpropanoides (Murillo y Méndez, 2007); alcaloides, saponinas, glicósidos cardiotónicos, glicósidos cianogénicos, esteroides insaturados y triterpenos pentacíclicos, taninos y polifenoles, antraquinonas y metilencetonas, siguiendo la metodología de Marcano y Hasegawa (2002).

Actividad antimicrobiana

Para determinar la actividad antibacteriana se utilizó la técnica de difusión en agar, según la metodología descrita por Bauer et al. (1966), empleándose cepas de bacterias certificadas: una Gram positiva (*Staphylococcus aureus*) y dos Gram negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*), pertenecientes a la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). La misma consistió en impregnar

discos estériles de papel de filtro Whatman N° 3 de 5 mm de diámetro con 10 µl de una solución preparada (20 y 40 mg. ml⁻¹) del extracto a analizar. Estos discos se colocaron dentro de cápsulas de Petri que contenían agar Mueller-Hinton, inoculadas con una suspensión bacteriana de concentración conocida (10⁸ bacterias. ml⁻¹), preparada por comparación con un patrón comercial estándar N° 0,5 de McFarland. Posteriormente, las cápsulas se preincubaron a 5°C durante 12 h, para permitir la difusión del extracto, y luego, se incubaron a 37°C durante 48 h, para permitir el crecimiento bacteriano. Las zonas claras que se formaron alrededor de los discos, se consideraron halos de inhibición, los cuales fueron medidos, registrando para cada caso el diámetro en milímetros de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano.

Para evaluar la actividad antimicótica se siguió la técnica descrita por Madubunyi (1995), utilizando cepas de un hongo patógeno (*Candida albicans*) de origen clínico. Dicha cepa se incubó por un periodo de 5 a 7 días a temperatura ambiente en un tubo con Agar Papa Dextrosa (PDA). Al cabo de este tiempo, se añadió 10 ml de agua destilada estéril al tubo, se agitó vigorosamente y se filtró a través de un embudo con gasa previamente estéril, para así obtener una suspensión de esporas. La cepa de *C. albicans* se trató siguiendo la metodología de la comparación con un estándar de turbidez 0,5 McFarland. La solución espongiorial obtenida se colocó sobre cápsulas de Petri, previamente preparadas con PDA, empleando hisopos estériles. Posteriormente, se colocaron los discos de papel Whatman N° 3 de 5 mm de diámetro impregnados previamente con el extracto, y luego, se incubaron por dos días a temperatura ambiente. La aparición de halos de inhibición alrededor del disco indicó la actividad fúngica del extracto, los cuales se verificaron tomando en cuenta el diámetro (mm) de los mismos.

Los experimentos de análisis del efecto antimicrobiano de los extractos, se realizaron por triplicado para cada una de las partes botánicas estudiadas. Para establecer los diferentes grados de inhibición del crecimiento bacteriano, se consideraron los rangos de los diámetros de inhibición, como los sugieren Rios *et al* (2009), aplicados a los extractos de las especies empleadas en este estudio, estableciéndose posteriormente rangos de la actividad antimicrobiana.

Actividad tóxica o letalidad contra *Artemia salina*:

Este bioensayo es un indicador de la actividad antitumoral de extractos vegetales y/o compuestos químicos presentes en los mismos. Inicialmente, se determinó que existe una correlación positiva entre la mortalidad de las larvas de *Artemia* y la citotoxicidad frente a las células cancerígenas. De este modo, es posible detectar extractos con actividad citotóxica, utilizando el ensayo de mortalidad de larvas, más que otros ensayos antitumorales *in vivo* o *in vitro* que resultan más tediosos y costosos (Pino y Lazo, 2010).

Se preparó una solución de 10 000 µg. ml⁻¹ del extracto, en una mezcla H₂O/DMSO según la solubilidad de éste y, a partir de ésta, se prepararon soluciones de 1 000 - 0,01 µg. ml⁻¹ mediante diluciones sucesivas con agua de mar bifiltrada, en viales que contenían 10 nauplios de *A. salina*, eclosionados con 24 h de anticipación. Por concentración, se realizaron tres réplicas y un control con igual número de réplicas. La cuantificación de la mortalidad de los nauplios se realizó pasadas las 24 y 48 h de haber montado dicho ensayo. Los datos obtenidos se utilizaron para calcular la concentración letal media de los extractos y fracciones ensayadas, mediante la aplicación del software LC50 V2.5 diseñado para tal fin, que considera los análisis estadísticos computarizados (Probit, Binomial, Logit y Moving Average) con límites de confianza de 95 % (Stephan, 1977; Meyer *et al.*, 1982).

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de los extractos

Obtenidos todos los extractos metanólicos de las hojas, tallo y flores del cedrón, se determinó la masa de los diversos extractos, así como también, su porcentaje de rendimiento. En la Tabla 1 se encuentran reflejados todos estos resultados, tomando como referencia la masa inicial de las partes botánicas de dicha especie vegetal y la masa del extracto crudo de las mismas, los cuales se usaron luego para realizar el tamizaje fitoquímico y analizar el efecto antimicrobiano y letal contra *Artemia salina* de dichos extractos.

En la Tabla 1 se observan los porcentajes de rendimientos de extracción de hojas, tallos y flores secas, pudiéndose notar que el extracto de las flores presentó el rendimiento de extracción más alto con 11,81% y el del tallo mostró el rendimiento más bajo con respecto a todos los extractos obtenidos, porcentaje de extracción

de 3,78%. Tomando en consideración que el disolvente utilizado fue el metanol, se puede considerar que en las flores y hojas se encuentra la mayor cantidad de metabolitos secundarios (taninos, polifenoles, esteroides, triterpenos, fenilpropanoides con polaridades de media

a alta fundamentalmente, siendo las flores las más ricas en metabolitos secundarios polares. Es posible entonces que en el tallo se encuentren metabolitos de baja polaridad o apolares. (Henao *et al.*, 2009)

Tabla 1. Porcentajes de rendimiento de los extractos metanólicos de las partes botánicas de *L. citriodora*.

Parte botánica	Masa (g)		Rendimiento (%)
	INICIAL	EXTRACTO	
Hojas	12,00	0,8611	7,18
Flores	12,00	1,4173	11,81
Tallo	12,00	0,8316	3,78

Análisis Fitoquímico

La Tabla 2 muestra los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico realizado a los extractos metanólicos de las partes botánicas de *L. citriodora*.

En dicha tabla, se puede observar que todos los extractos metanólicos analizados de las distintas partes botánicas, mostraron la presencia de taninos, polifenoles, esteroides insaturados y triterpenos pentacíclicos. Adicionalmente, los extractos del tallo y flores exhibieron la presencia de fenilpropanoides y catequinas; sin embargo, los metabolitos cumarinas y metilencetonas fueron detectados solamente en el extracto de las flores, y glicósidos cardiotónicos y quinonas en el extracto del tallo. Tanto las hojas como el tallo, mostraron la presencia de saponinas, y las hojas y las flores la presencia de alcaloides. En ningún extracto analizado se detectaron flavonoides, a excepción de las hojas.

Estos resultados están en concordancia con los reportados por Argyropoulou *et al* (2010) quienes mediante estudios histoquímicos determinaron la

composición de los metabolitos secundarios de las hojas de cedrón como fenoles, alcaloides, terpenos, taninos y flavonoides.

Al realizarse una comparación de la riqueza de metabolitos secundarios del extracto metanólico de las partes botánicas de *L. citriodora*, se puede argumentar que tanto el tallo como las flores son portadoras de la mayor cantidad de familias de metabolitos secundarios en la planta, en relación a las demás partes botánicas, debido a que se puede apreciar en la Tabla 2 un %MPE (porcentaje de metabolitos presentes para cada extracto de la especie) igual a 64,29% para ambas; sin embargo, las hojas mostraron un 42,86% de metabolitos secundarios. Además, se puede apreciar que todos los extractos metanólicos (de hojas, tallo y flores) exhibieron la presencia de un 100% de metabolitos pertenecientes a las mismas familias químicas (%MPF): taninos, polifenoles, esteroides insaturados y triterpenos pentacíclicos, siendo estas las familias predominantes en esta especie vegetal.

Tabla 2. Tamizaje fitoquímico de los extractos metanólicos de las partes botánicas de *L. citriodora*.

Familias de metabolitos secundarios	Partes botánicas de la planta			%MPF
	Hojas	Tallos	Flores	
Saponinas	+	+	-	66,67
Taninos	+	+	+	100
Polifenoles	+	+	+	100
Glicósidos cardiotónicos	-	+	-	33,33
Glicósidos cianogénicos	-	-	-	0
Alcaloides	+	-	+	66,67

Continuación Tabla 2.

Cumarinas	-	-	+	33,33
Metilcetonas	-	-	+	33,33
Flavonoides	+	-	-	33,33
Esteroles insaturados	+	+	+	100
Triterpenos pentacíclicos	+	+	+	100
Fenilpropanoides	-	+	+	66,67
Quinonas	-	+	-	33,33
Catequinas	-	+	+	66,67
%MPE	42,86	64,29	64,29	

(+): Detectado; (-): No detectado; %MPF: porcentaje de extractos de las partes botánicas con metabolitos pertenecientes a la misma familia química; %MPE: porcentaje de metabolitos presentes para cada extracto de la especie.

En otro estudio realizado previamente por Argyropoulou *et al.* (2007) sobre la composición química de aceites esenciales de las hojas de cedrón por GC-MS, encontrándose que los principales constituyentes (66.3%) fueron los terpenos geranial, neral y limoneno. El género *Lippia*, tiene un gran valor farmacológico, contiene cantidades apreciables de metabolitos algunos de los cuales han mostrado tener actividades biológicas valorables. Omollo *et al.* (2014) realizaron tamizajes fitoquímicos sobre este género, demostrando la presencia de varios compuestos como triterpenoides, fenoles, flavonoides, fenilpropanoides y esteroides.

Como se mencionó, los polifenoles resultaron positivo en los extractos metanólicos de todas las partes botánicas de la planta *L. citriodora*. Seham *et al.* (2012) realizaron una investigación sobre bioactividades y potencial medicinal de los extractos acuosos y alcohólico de la misma especie cultivada en Egipto, también como composición fenólica del extracto más bioactivo. Ellos reportaron que los compuestos fenólicos (principalmente flavonoides, ácidos fenólicos y fenilpropanoides) detectados eran los responsables de su actividad farmacológica, tales como efectos analgésico, antiinflamatoria y antioxidante.

Actividad antimicrobiana (sensibilidad microbiana)

Los extractos metanólicos fueron probados frente a *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*, y mostraron inactividad contra estas cepas bacterianas. Sin embargo, esto no implica que

frente a otros microorganismos no puedan presentar cierta actividad inhibitoria (Mora *et al.*, 2008).

En la Tabla 3 se representan los resultados de la sensibilidad microbiana de los extractos metanólicos de las hojas, tallo y flores de *L. citriodora* frente a cepas de las bacterias *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva), *Escherichia coli* (Gram negativa) y *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negativa) a distintas concentraciones del extracto a ensayar, cuyos halos de inhibición se expresan utilizando la metodología de cruces y criterios expuestos para extractos (Rios *et al.*, 2009).

El extracto metanólico de todas las partes botánicas de *L. citriodora* demostró una alta o muy alta actividad antibacteriana contra *E.coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, a excepción de los extractos de las hojas y flores que exhibieron una actividad antibacteriana moderada y baja respectivamente contra *E. coli* y *S. aureus*, a una concentración del 20 mg. ml⁻¹; sin embargo, la sensibilidad bacteriana de ambas cepas se incrementó al ser expuestas a soluciones de 40 mg. ml⁻¹ de ambos extractos.

A una concentración de 20 mg. ml⁻¹, el extracto del tallo fue el que la mayor actividad antibacteriana contra todas las cepas ensayadas, al presentar halos de inhibición superior a los 15 mm, seguido por los extractos de las hojas y las flores. Se observó una mayor efectividad de los extractos contra todas las bacterias al duplicarse la concentración de los mismos a 40 mg. ml⁻¹. En general, se puede inferir que tanto la cepa Gram positiva como las Gram negativas mostraron una alta sensibilidad bacteriana frente a los extractos metanólicos

de todas las partes botánicas estudiadas de *L. citriodora*, y con valores de halos de inhibición muy cercanos a los de los patrones: antibiótico (ciprofloxacino) y antifúngico de referencia (cloranfenicol) ensayados.

Tabla 3. Actividad antimicrobiana mostrada por extractos metanólicos de *L. citriodora* a distintas concentraciones frente a las cepas utilizadas.

Microorganismos	Concentraciones del extracto (mg.ml ⁻¹)							
	20				40			
	EMH	EMT	EMF	Patrón ^b	EMH	EMT	EMF	Patrón ^b
Bacterias								
<i>S. aureus</i>	3+	4+	1+	4+	4+	4+	4+	4+
<i>E. coli</i>	2+	4+	3+	4+	4+	4+	3+	4+
<i>P. aeruginosa</i>	3+	4+	3+	4+	4+	4+	3+	4+
Hongo								
<i>C. albicans</i>	1+	2+	3+	4+	+2	3+	3+	4+

Diámetros de los halos de inhibición: (-) <6 mm ninguna actividad antimicrobiana; (1+) 6-8 mm poca actividad antimicrobiana; (2+) 8-10 mm mediana actividad antimicrobiana; (3+) 10-15 mm alta actividad antimicrobiana; (4+) >15 mm muy alta actividad antimicrobiana. **a:** media de valores de tres réplicas de halos de inhibición, expresados con metodología de cruces; **b:** antibiótico (ciprofloxacino) o antifúngico de referencia (cloranfenicol); EMH: extracto de metanol de hojas; EMT: extracto de metanol de tallos; EMF: extracto de metanol de flores de cedrón.

Los resultados encontrados en esta investigación coinciden con los de Silva *et al.* (2016), donde los investigadores encontraron que los aceites esenciales de las hojas de *L. thymoides* tenían selectividad antimicrobiana contra las bacterias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* y *Micrococcus luteus*, y además establecieron la base farmacológica para el uso tradicional de la misma especie (Silva *et al.*, 2015). Otro estudio realizado en Bostwana, indica que la planta mostró propiedades antimicrobianas, y que se usa tradicionalmente para tratar el hongo *Candida* en las comunidades africanas (Omollo *et al.*, 2014).

Diversos estudios realizados sobre la composición química y actividad biológica de las hojas de *L. citriodora* han demostrado la presencia de metabolitos bioactivos como los fenilpropanoides y polifenoles a los cuales se le atribuyen las

propiedades antioxidantes, antitumorales, inmunosupresivas y antimicrobianas que posee esta especie (Venkateswara *et al.*, 2013; Herranz-López *et al.*, 2015).

Estudios reportados en la literatura, demuestran que las bioactividades del extracto de la planta *L. citriodora* se deben no a un solo tipo de compuesto, ya que varias investigaciones han mostrado interacciones entre compuestos fenólicos, principalmente efectos sinérgicos y antagonistas. A su vez, los investigadores aislaron flavonoides y otros compuestos fenólicos de cedrón recolectada en diferentes localidades (Skaltsa, 1988; Ono *et al.*, 2008).

Actividad tóxica o letalidad

La concentración letal media (CL₅₀) es de vital importancia para medir la letalidad, porque proporciona una medida de cuan tóxica resulta ser la especie vegetal *L. citriodora*, y si estas propiedades pueden causar un efecto negativo en el organismo, o por el contrario pueden usarse dichas propiedades tóxicas en contra de patógenos, lo cual se realiza por medio de larvas de experimentación como la *Artemia* (Parra *et al.*, 2001).

En la Tabla 4, se puede observar que el porcentaje de mortalidad que ocasiona los extractos de las hojas y el tallo, en las larvas de *A. salina* es del 100% a la máxima concentración (1000 mg.ml⁻¹); sin embargo, tan solo el extracto del

tallos mata 60% de los nauplios ensayados a menor concentración, lo que da indicio de su buena acción tóxica. Se podría presumir que dicho extracto posee una letalidad muy significativa, mostrando una

toxicidad indicativa de la presencia de compuestos antitumorales de gran valor farmacológico en el extracto (Pino y Lazo, 2010).

Tabla 4. Porcentaje de mortalidad (%) correspondiente al ensayo de *Artemia salina* en los diferentes extractos de *L. citriodora*.

Extractos	Concentraciones de disoluciones del extracto ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)				
	1000	100	10	1	control
EMHC	100	23,3	10,0	6,7	3,3
EMTC	100	60,0	3,3	0,0	0,0
EMFC	86,6	42,9	13,3	7,1	3,3

EMH: Extracto metanólico de hojas; EMT: Extracto metanólico de tallo; EMF: Extracto metanólico de flores. Control: solución de dimetilsulfóxido (500 μl) en 3,6ml de agua de mar bifiltrada.

Se puede apreciar en la Tabla 5 una concentración letal media ($CL_{50} < 200 \mu\text{g.ml}^{-1}$) o sea una letalidad o toxicidad significativa, según el método Moving Average para los extractos de las hojas y flores, y método Binomial para el extracto del tallo, con valores más confiables de límites de confianza del 95%, por lo que los extractos podrían poseer compuestos bioactivos (Meyer *et al*, 1982). Además, se observa que el extracto metanólico del tallo mostró una toxicidad de 82,19 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ en contra de las larvas ensayadas, a las 24 h, por lo que se puede inferir que todas las partes botánicas de *L. citriodora*, y especialmente el tallo, constituyen una fuente de compuestos bioactivos. De acuerdo a las categorías de toxicidad del Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo- CYTED (1995), tanto el extracto de hojas como el de las flores son considerados moderadamente tóxicos, y el del tallo altamente

tóxico, y por ende el más promisorio como fuente de metabolitos con posible actividad antitumoral.

Se puede inferir que probablemente, este efecto letal o tóxico observado en los extractos metanólicos de las distintas partes botánicas de la planta, se deba a la presencia de algunas familias de metabolitos detectados en los ensayos químicos preliminares realizados, o a la acción sinérgica de ellos (taninos, alcaloides, triterpenos, esteroides, polifenoles, flavonoides, metilcetonas, fenilpropanoides y/o cumarinas). Adicionalmente, la actividad tóxica muy significativa o altamente tóxica encontrada para el tallo, se podría atribuir a la presencia de glicósidos cardiotónicos y quinonas, metabolitos ausentes en las hojas y flores de *L. citriodora*, o al efecto sinérgico de éstos con los otros compuestos presentes en el tallo (Sepúlveda *et al*. 2003; Avello y Cisternas, 2010).

Tabla 5. Concentración letal media ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) contra *A. salina*, de los extractos de las partes botánicas de *L. citriodora*

Extractos	CL_{50} (24 h)	Método	Intervalo ^a	Categorías CYTED ^b de toxicidad
EMH	168,77	Moving Average	113,42-262,17	moderadamente tóxico
EMT	82,19	Binomial	10,00-100,00	altamente tóxico
EMF	172,76	Moving Average	93,27-355,78	moderadamente tóxico

EMH: Extracto metanólico de hojas; EMT: Extracto metanólico de tallo; EMF: Extracto metanólico de flores. **a:** Límite de confianza del 95%. **b:** Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED).

IV. CONCLUSIONES

Todas la partes botánicas estudiadas de *L. citriodora* exhibieron efecto antibacteriano y antifúngico significativo contra las cepas de bacterias Gram (+) y Gram (-), y hongo ensayado (*C. albicans*).

Cedrón mostró actividad letal o tóxica significativa, siendo el extracto metanólico del tallo el considerado altamente tóxico, debido a que presentó una concentración letal media inferior a 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

El análisis fitoquímico reveló la presencia de compuestos químicos comunes para las hojas, flores y tallo (taninos, polifenoles, triterpenos y esteroides insaturados), por lo que dichas familias de metabolitos detectados, podrían ser responsables de la antibiosis observada para la especie estudiada.

A partir de los resultados obtenidos, se puede inferir que la planta *L. citriodora* es una fuente promisoría de metabolitos secundarios bioactivos con actividad farmacológica (antimicrobianos y citotóxicos), lo que sugiere su importancia como agente de uso terapéutico en Ecuador.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al Proyecto Prometeo de la Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia y Tecnología de la República de Ecuador (SENESCYT) por el financiamiento de esta investigación.

V. REFERENCIAS

Abena, A., Atipo-Ebata, J., Hondi, A., y Diatewa, M. (2001). Psychopharmacological properties of crude extract and essential oil of *Lippia multiflora*. *Encephale*, 27(4), 360-364.

Álvarez, X. (2012). Identificación, historia, características y aplicaciones culinarias de cinco plantas aromáticas endémicas de América (tesis de pregrado). Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador.

Argyropoulou, C., Daferera, D., Petros, A., Fasseas, C., y Polissiou, M. (2007). Chemical composition of the essential oil from leaves of *Lippia citriodora* H.B.K. (Verbenaceae) at two developmental stages. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35 (12), 831-837.

Argyropoulou, C., Akoumianaki-Ioannidou, A., Christodoulakis, N., y Costas, A. (2010). Leaf anatomy and histochemistry of *Lippia citriodora* (Verbenaceae). *Australian Journal of Botany*, 58 (5), 398-09.

Argyropoulou, C., Akoumianaki-Ioannidou, A., Nikolaos, S., Christodoulakis, C., y Costas, A. (2010). Leaf anatomy and histochemistry of *Lippia citriodora* (Verbenaceae). *Australian Journal of Botany*, 58 (5), 398-09.

Avello, M., y Cisternas, I. (2010). Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. *Rev Med Chile*, 138, 1288-1293.

Avila, J., De Liverant, J., Martínez, A., Martínez, G., Muñoz, J. y Arciniegas, A. (1999). Mode of action of *Buddleja cordata* verbascoside against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 66, 75-78.

Bauer, A., Kirby, A., Sherris, J., y Turk, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45 (4), 493-496.

CYTED. (1995). Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. *Manual de Técnicas de Investigación*. España: Editorial Pinzón.

El-Hawary, S., Miriam, F., Yousif, M., Abdel, A., y Abd-Hameed, L. (2012). Bioactivities, phenolic compounds and in-vitro propagation of *Lippia citriodora* Kunth cultivated in Egypt. *Bulletin of Faculty of Pharmacy*, 50, 1-6.

Funari, C., Eugster, P., Martel, S., Carrupt, P., Wolfender, J., y Silva, D. (2012). High resolution ultra-high pressure liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry dereplication strategy for the metabolite profiling of Brazilian *Lippia* species. *J Chromatogr A*, 1259, 167-178.

Henaó, J., Muñoz, L., Ríos, E., Padilla, L., y Giraldo, G. (2009). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de la planta *Lippia origanoides* h.b.k. cultivada en el Departamento del Quindío. *Rev. Invest. Univ. Quindío*, 19, 159- 164.

Herranz-López, M., Barrajón-Catalán, E., Segura-Carretero, A., Menéndez, J., Joven, J., y Micol, V. (2015). Lemon verbena (*Lippia citriodora*) polyphenols alleviate obesity-related disturbances in

- hypertrophic adipocytes through AMPK-dependent mechanisms. *Phytomedicine*, 22, 605-614.
- Jigam, A., Akanya, H., Ogbadoyi, E., Dauda, B., y Egwim, C. (2009). In vivo antiplasmodial, analgesic and antiinflammatory activities of the leaf extract of *Lippia multiflora* Mold. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3 (3), 148-154.
- Kummerer, K. (2004). Resistance in the environment. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54, 311-314.
- Madubunyi, I. (1995). Antimicrobial activities of the constituents of *Garcinia kola* seeds. *Intern. J. Pharm.*, 33 (3), 232-237.
- Marcano, D., y Hasegawa, M. (2002). Fitoquímica Orgánica. Venezuela: Universidad Central de Venezuela-Torino.
- Meyer, B., Ferrigni, N., Putnam, J., Jacobsen, L., Nichols, D., y McLaughlin, J. (1982). Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Médica*, 45 (1), 31-34.
- Mora, J., Newmark, F., Santos, M., y Sánchez, J. (2008). Evaluación de extractos de esponjas marinas como nuevas fuentes de sustancias antimicrobianas. *Rev. Esp. Quimioter.*, 21 (3), 174-179.
- Murillo, E., y Méndez, J. (2011). Guía metodológica para la detección rápida de algunos metabolitos secundarios y caracterización de una droga cruda. Colombia: Universidad de Tolima.
- Okhale, E., Michael-Nwanosike, E., Temitope Fatokun, O., y Folashade-Kunle, O. (2016). Phytochemistry and ethnopharmacology of *Lippia* genus with a statement on chemotaxonomy and essential oil chemotypes. *International Journal of Pharmacognosy IJP*, 3 (5), 201-211.
- Oliveira, M., Velázquez, D., y Bermúdez, A. (2005). La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales. *Revista de Ciencia y Tecnología de América*, 30 (8), 453-459.
- Omollo-Ombito, J., Nyangweso-Salano, E., Kipkirui-Yegon, P., Kipkirui-Ngetich, W., y Muthoni-Mwangi, E. (2014). A review on the chemistry of some species of genus *Lippia* (Verbenaceae family). *Journal of Scientific and Innovative Research*, 3 (4), 460-466.
- Ono, M., Oda, E., Tanaka, T., Iida, Y., Yamasaki, T., Masuoka, C., et al. (2008). DPPH radical-scavenging effect on some constituents from the aerial parts of *Lippia triphylla*. *J Nat Med.*, 62 (1), 101-106.
- Parra, L., Silva, Y., Iglesias, B., y Guerra, S. (2001). Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD₅₀ value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, 8 (5), 395-400.
- Pino, O., y Lazo, J. (2010). Ensayo de Artemia: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Revista de Protección Vegetal*, 22 (1), 35-36.
- Ríos, N., Medina, G., Jiménez, J., Yañez, C., García, M., Di Bernardo, M., y Guaitia, M. (2009). Actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de algas venezolanas. *Rev. Perú Biol.*, 16 (1), 097-100.
- El-Hawary, S., Yousif, M., Abdel, A., y Abd-Hameed, L. (2012). Bioactivities, phenolic compounds and in-vitro propagation of *Lippia citriodora* Kunth cultivated in Egypt. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 50, 1-6.
- Sepúlveda, G., Porta, H., y Rocha, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21 (3), 355-363.
- Silva, F., Menezes, P., de Sá, P., Oliveira, A., Souza, E., Bamberg, V., de Oliveira, H., de Oliveira, S., Araújo, R., Uetanabaro, A., et al. (2015). Pharmacological basis for traditional use of the *Lippia thymoides*. *Evid. Based Complement. Altern. Med.*, 20 (12), 21946-21959.
- Silva, F., Menezes, P., de Sá, P., Oliveira, A., Souza, E., Almeida, J., Lima, J., Uetanabaro, A., Silva, T., Peralta, E., et al. (2016). Chemical composition

- and pharmacological properties of the essential oils obtained seasonally from *Lippia thymoides*. *Pharm. Biol.*, 54 (1), 25-34.
- Skaltsa, H., y Shamma, G. (1988). Flavonoids from *Lippia citriodora*. *Planta Med.*, 58 (5), 465.
- Stephan, C.E. (1977). Methods for calculating an LC50. In: Mayer FL, Hamelink J. (Editors). *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation: ASTM STP 634*. Philadelphia: American Society for Testing and Material.
- Venkateswara, R., Gopalakrishnan, M., y Mukhopadhyay, T. (2013). Secondary metabolites from the leaves of *Lippia citriodora* H. B. & K. *Der Pharmacia Lettre*, 5 (3), 492-495.
- Zamorano, E., Morales, C., Ramos, D., Sepúlveda, C., Cares, S., Rivera, P., Fernández, J., y Carballo, M. (2006). Anti-genotoxic effect of *Aloysia triphylla* infusion against acrylamide-induced DNA damage as shown by the comet assay technique. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 603 (2), 145-150.
- Zhang, Y., Chen, Y., Wang, S., Dong, Y., Wang, T., Qu, L., Li, N., y Wang, T. (2015). Bioactive constituents from the aerial parts of *Lippia triphylla*. *Molecules*, 20, 21946-21959.