

## COMPARACIÓN DE METODOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN PARA LIMONENO Y CARVONA EN *Lippia alba* USANDO CROMATOGRAFÍA DE GASES.

Ligia A. Medina-López<sup>1,\*</sup>, Juan J. Araya-Barrantes<sup>2</sup>, Giselle Tamayo-Castillo<sup>2</sup>, Rosaura M. Romero<sup>2,3</sup>.

<sup>1</sup>Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma de Honduras, Tegucigalpa, Honduras.

<sup>2</sup>Escuela de Química, Universidad de Costa Rica, 11501-2060 San José, Costa Rica.

<sup>3</sup>Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA), Universidad de Costa Rica, 11501-2060 San José, Costa Rica.

Recibido 10 de octubre, 2011; aceptado 10 de diciembre, 2011

### Resumen

Diferentes procedimientos de secado, extracción mediante disolventes e hidrodestilación se evaluaron para la extracción del aceite esencial de *Lippia alba*. Se utilizaron los compuestos limoneno y carvona como marcadores para el análisis cuantitativo mediante cromatografía de gases con ionización de llama (GC-FID). Se definió la precisión, exactitud, especificidad, linealidad y los límites de detección y cuantificación para el análisis. La liofilización como método de secado y la extracción con acetato de etilo utilizando baño ultrasónico mostraron los mejores resultados en función de la obtención de la mayor cantidad de los compuestos marcadores.

### Abstract

Different plants drying procedures, hydrodistillation and solvent extraction by sonication were evaluated for the essential oil extraction of *Lippia alba*. Quantitative analysis of the markers limonene and carvone was performed in the extracts by gas chromatograph with flame ionization detection (GC-FID). Experimental precision, accuracy, specificity, linearity, limits of detection and quantitation were addressed. Lyophilization as a drying procedure and solvent extraction by sonication using ethyl acetate showed the best results regarding the highest concentration for marker compounds.

**Palabras clave:** *Lippia alba*, limoneno, carvona, extracción, cromatografía de gases.

**Key words:** *Lippia alba*, limonene, carvone, extraction, GC-FID.

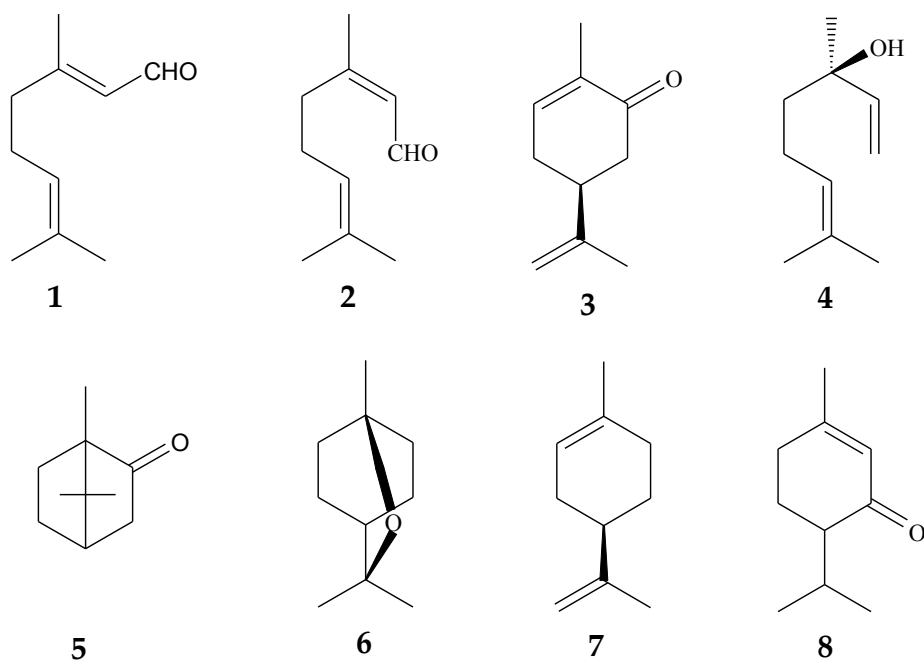
---

\*Autor para correspondencia: liamel94@yahoo.com

## I INTRODUCCION

*Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae) es una hierba conocida popularmente en Costa Rica como juanilama, y es utilizada como tranquilizante y contra desórdenes gastrointestinales. La especie, nativa de América, se encuentra a 1.800 m de altura desde Texas hasta Argentina y en el Caribe (1, 2).

La composición química de la planta incluye flavonoides, alcaloides y su aceite esencial se ha estudiado (3). La esencia de *L. alba* presenta una composición variable y muchos quimiotipos han sido descritos. Estos quimiotipos son diferenciados por la presencia de componentes mayoritarios. En Brasil por ejemplo, tres quimiotipos I, II y III han sido clasificados por la esencia extraída de las hojas, siendo los componentes mayoritarios citral (geranial **1** y neral **2**), carvona (**3**) y linalol (**4**), respectivamente (4, 5). En Uruguay, dos quimiotipos han sido reportados: el primero contiene alcanfor (**5**) y 1,8-cineol (**6**) y el segundo posee linalol como constituyente principal (6). En el caso de América Central, los marcadores reportados son limoneno (**7**) y piperitona (**8**) para Guatemala, la carvona en Cuba, y en Costa Rica se han definido el quimiotipo limoneno y el de la carvona (7, 8).



**Figura 1.** Estructuras de los marcadores de la esencia de *Lippia alba*

En el caso de Brasil, los tres quimiotipos han presentado propiedades biológicas: el primero analgésicas, el segundo efecto miorelajante y el tercero actividad hipotérmica, sedativa y ansiolítica (9) y los compuestos citral, mirceno y limoneno, aislados de los aceites volátiles, mostraron efecto sedante (10). Por otro lado el extracto hidroalcohólico de la planta presenta tanto efecto sedante y actividad antibacteriana contra *Candida albicans*, como anti-inflamatoria, espasmolítica y anticonvulsiva, y tiene potencial como eliminador de radicales libres (11-14).

Debido a que los aceites esenciales de *Lippia alba* tienen importantes actividades biológicas, y particularmente en Costa Rica, se utiliza como sedante, para desórdenes gastrointestinales y como antiespasmódico en los cólicos hepáticos, su composición ha sido analizada previamente mediante cromatografía de gases con un detector de ionización de llama (CG-FID), cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas cuadrupolar con trampa de iones (15, 16), espectroscopia de Raman-TF- (17) y RMN- $H^1$  (18). Por otro lado, la metodología de extracción que se utiliza mayormente para obtener un aceite esencial es el arrastre con vapor, y éste puede que no sea el método más conveniente para la extracción del aceite de juanilama. Por esta razón, se utilizó CG-FID para revisar cuál es el método de extracción más apropiado a la hora de cuantificar la presencia de limoneno y carvona como marcadores en los extractos de juanilama. Además, se compararon las concentraciones de los compuestos marcadores en el material vegetal recolectado a lo largo de un año en una plantación ubicada en Arenal, Alajuela.

## II MATERIALES Y METODOS

### Disolventes y reactivos

Los disolventes fueron comprados a diferentes proveedores de reactivos: etanol de FANAL, acetato de etilo de Gamma y hexano de EM Science. Los estándares internos *l*-carvona ( $98,4 \pm 1,3$  %) de Pfaltz & Bauer, *dl*-limoneno ( $95,0 \pm 1,5$  %) y mentol ( $99,96 \pm 0,09$  %) de Merck & Co.

### Instrumentación

La identificación de compuestos fue realizada usando un cromatógrafo de gases GC-17A acoplado a un detector de espectrometría de masas GC MS-QP 5050 Shimadzu, con un sistema administrador Class-500. La columna utilizada es una capilar de sílica fundida Supelco MDN<sup>TM</sup>-5S 30 m x 0,25 mm i. d. empacada con cross-linked poli(5% difenil/95% dimetilsiloxano) de 0,25  $\mu$ m de grosor de la película. La temperatura del horno se programó de 60-260 °C a una velocidad de 3 °C  $\text{min}^{-1}$ , la del puerto de inyección de muestra 250 °C; detector 250 °C, como gas portador fue

utilizado el helio a  $1,4 \text{ mL min}^{-1}$  y la relación del sistema de inyección “split” 60:1. Para el análisis cuantitativo se usó un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 series II con un detector de ionización de llama (FID) y un sistema administrador Agilent technology. La relación del sistema de inyección “split” 85,1:1,6; una columna capilar de sílica fundida Supelco SPB-5™ 30 m x 0,25 mm i. d. empacada con poli(5% difenyl/95% dimetilsiloxano), con una película de  $0,25 \mu\text{m}$  de grosor. La temperatura del horno: programación 60-135 °C a 3 °C/min para la cuantificación, seguido de 135-200 °C a 6 °C/min 200 °C (2min) para limpieza de columna, temperatura del puerto de inyección de muestra 250 °C; detector 250 °C, el gas portador nitrógeno con una presión en la columna de 90 kPa. El volumen de inyección 1  $\mu\text{L}$ . Para la extracción se empleó un Solid state/Ultrasonic FS-28 Fisher Scientific.

### **Material vegetal**

Las hojas de *Lippia alba* fueron recolectadas en El Abanico, Peñas Blancas, San Ramón, cada dos meses durante un año de agosto 2005 a julio 2006. De toda la plantación se muestrearon plantas en floración al azar. Una muestra fue depositada en el Herbario Nacional de Costa Rica con Boucher (AQ1493-0243910CR).

### **Identificación**

Se extrajeron por hidrodestilación 20 g de hojas frescas fragmentadas con 120 mL de agua, manteniendo una temperatura de 85- 90 °C. La destilación fue llevada a cabo por 4 h y la esencia obtenida fue recolectada en hexano, previamente saturado con NaCl, dentro de un baño de hielo. La fase hexánica fue eliminada usando nitrógeno, y la esencia fue inyectada en el cromatógrafo de gases CG-17A Shimadzu acoplado a un detector de espectrometría de masas CG MS-QP 5050. Los constituyentes principales de la esencia se identificaron por comparación del espectro de masas obtenido a 70 eV con el de referencia de una librería.

### **Evaluación del proceso de extracción**

Dos diferentes metodologías se compararon para el proceso de extracción: hidrodestilación y extracción con disolventes volátiles en baño ultrasónico. Por el primer método se obtuvo el aceite de 5 g de material fresco usando procedimientos previamente descritos en la literatura (19) y por el segundo método, la esencia de 5 g de material fresco se extrajo utilizando un baño ultrasónico, empleando etanol o acetato de etilo a diferentes tiempos de extracción (ver cuadro 1). Cada una de las extracciones se realizó por triplicado. Las concentraciones de carvona y limoneno

fueron usadas para evaluar la eficiencia de la extracción empleando el cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama ya indicado.

**Cuadro 1.** Metodologías de extracción analizadas para obtener el aceite esencial de juanilama.

<i>Parámetros en común</i>	<i>Variación de parámetros</i>	<i>Selección</i>
Tamaño de la muestra: 5 g Volumen 25 mL Número of extracciones: 1	Disolventes: Etanol y acetato de etilo Tiempo de extracción: 15, 25 and 35 min	Disolvente: acetato de etilo Tiempo de extracción: 25 min
Tamaño de la muestra: 5 g Número de extracciones: 1 Disolvente: acetato de etilo Tiempo: 25 min	Volumen del disolvente: 25 mL y 35 mL	Volumen del disolvente: 25 mL
Cantidad de muestra: 5 g Disolvente: acetato de etilo Tiempo de extracción: 25 min	Número de extracciones: 1) Dos extracciones de 25 mL cada una <sup>a</sup> 2) Tres extracciones de 25, 20 y 15 mL <sup>a</sup> 3) Tres extracciones 25 mL cada una <sup>b</sup>	Tres extracciones 25, 20 y 15 mL

<sup>a</sup> Los extractos fueron unidos en un matraz volumétrico; <sup>b</sup> Los extractos fueron analizados individualmente.

### Método general de extracción

Se extrajeron 5 g del material vegetal fresco con acetato de etilo en baño ultrasónico por 25 min, seguido de extracciones de 20 y 15 mL del disolvente bajo las mismas condiciones. Las fracciones fueron unidas y se agregó una cantidad conocida de estándar interno (EI). Las muestras fueron analizadas por CG-FID.

### Evaluación del proceso de secado

El proceso de secado se evaluó por tres diferentes metodologías con el objetivo de determinar la posible pérdida de compuestos durante él. La primera metodología consistió en secar el material vegetal a temperatura ambiente (20 °C), durante la segunda el material fue congelado a -4 °C y liofilizado, y en la tercera se empleó un secador solar. Un total de 3 g de material se secaron y luego se extrajeron según el procedimiento general y se le agregó 0,5 mg/mL de EI. Las muestras fueron analizadas por CG-FID, e inyectadas por triplicado. La concentración de carvona y

limoneno fueron usados como marcadores para evaluar la posible pérdida de compuestos durante el proceso de secado. La concentración de estos compuestos en el material vegetal fresco fue utilizada como referencia.

### Método analítico por cromatografía de gases

La linealidad fue evaluada usando nueve disoluciones de los marcadores limoneno y carvona (0,2-13,0 mg/10 mL), y como estándar interno mentol (5 mg/10mL) en acetato de etilo en una relación de masas de (0,04-2,26 g g<sup>-1</sup>). Las disoluciones fueron inyectadas por triplicado y curvas de calibración se obtuvieron por triplicado.

La exactitud fue desarrollada por adición de una muestra conocida del analito al material vegetal fresco y se realizó la extracción siguiendo el procedimiento general ya descrito. La recuperación se realizó por triplicado en el material seco pulverizado a tres niveles de 5, 10 y 15 mg/3 g.

La repetitividad inter-día e intra-día fue analizada. Esta se probó con siete muestras conteniendo limoneno/mentol y carvona/mentol en una relación de masa de 1,2 g g<sup>-1</sup>. Las muestras fueron refrigeradas a -4 °C por cinco días para el ensayo inter-día. La repetitividad del equipo fue evaluada inyectando 10 veces la misma muestra. La robustez del método fue probada usando tres muestras conteniendo limoneno/mentol y carvona/mentol en una relación de 1,2 g g<sup>-1</sup>. Los parámetros del equipo fueron variados paso a paso. Los parámetros estándar y los rangos de las variaciones realizadas se muestran en el Cuadro 2.

**Cuadro 2.** Parámetros estándar y rango de variaciones para la robustez del método de análisis de aceite esencial de jambil mediante cromatografía de gases.

<i>Parámetros</i>	<i>Estándar</i>	<i>Variación</i>
Temperatura del horno	3 °C min <sup>-1</sup>	1 y 5 °C/min
Temperatura del inyector	250 °C	245 y 255 °C
Temperatura del detector	250 °C	245 y 255 °C
Presión de la columna	90 kPa	70 y 105 KPa
volumen of inyección	1 µL	2 µL

## **Análisis cuantitativo mediante cromatografía de gases**

Las partes aéreas de *L. alba* fueron recolectadas a lo largo de un año, secadas por liofilización y pulverizadas. El aceite esencial se extrajo como se describe en método general de extracción y 0,5 mg/mL de estándar interno se agregó. Las concentraciones de carvona y limoneno fueron determinados por interpolación en una curva de calibración.

## **Análisis estadístico**

Los resultados del método de extracción fueron evaluados aplicando el *t*-test (dos-colas) a un nivel de confianza 95 %. Se usó ANOVA para determinar si existe un error aleatorio en la diferencia entre los promedios obtenidos de las muestras de *L. alba* a lo largo del muestreo durante un año.

## **III Resultados y discusión**

### **Identificación de compuestos**

Los compuestos mayoritarios del aceite esencial de las hojas de *Lippia alba* fueron carvona y limoneno. El quimiotipo carvona ha sido reportado en Costa Rica (8), Cuba (20) Brasil (4, 5) y Colombia (21). Debido a que los componentes mayoritarios son carvona y limoneno y muestran actividad biológica (10, 13, 22, 23), estos son usados como los marcadores de la planta para el control de calidad.

### **Evaluación del método extracción**

El método de extracción con disolventes por baño ultrasónico fue comparado con el método tradicional de hidrodestilación. Las cantidades de limoneno y carvona obtenida para cada proceso son mostradas en el Cuadro 3.

### **Extracción con disolventes con baño ultrasónico**

La extracción con acetato de etilo con tiempos de 25 y 35 min mostró el mejor resultado para la extracción de limoneno y carvona (ver Cuadro 3). Estos resultados fueron evaluados aplicando el *t*-test (dos-colas). El *t*-práctico < *t*-tabla, lo que indica una diferencia no significativa entre el tiempo de extracción al nivel de confianza del 95%. Debido a ello, una extracción con tiempo de 25 min fue seleccionada.

El número de extracciones también fue probado. La aplicación de *t*-test (dos-colas) reveló una diferencia no significativa entre el número de extracciones con un

nivel de confianza del 95%. La cuantificación de limoneno y carvona mostró que una tercera extracción no era necesaria debido a que durante ella se extrae sólo 0,018 % de limoneno y 0,027 % de carvona.

**Cuadro 3.** Concentración de limoneno y carvona obtenida por hidrodestilación y por extracción con disolventes

<i>Método</i>	<i>Limoneno en material vegetal fresco (% m/m)<sup>a</sup></i>	<i>DER<sup>b</sup></i>	<i>Carvona en material vegetal fresco(% m/m)<sup>a</sup></i>	<i>DER<sup>b</sup></i>
Hidrodestilación				
3h	0,152 ± 0,004	50,10	0,206 ± 0,005	30,40
4h 30 min	0,240 ± 0,007	20,94	0,422 ± 0,008	11,93
Extracción con disolventes				
Etanol 15 min, 25 mL	0,063 ± 0,008	20,27	0,176 ± 0,008	4,95
Etanol 25 min, 25 mL	0,081 ± 0,008	6,03	0,197 ± 0,008	2,95
Etanol 35 min, 25 mL	0,115 ± 0,008	10,41	0,246 ± 0,008	7,03
Acetato de Etilo 15 min, 25 mL	0,076 ± 0,008	1,15	0,206 ± 0,008	5,52
Acetato de Etilo 25 min, 25 mL	0,199 ± 0,008	3,15	0,352 ± 0,008	9,31
Acetato de Etilo 35 min, 25 mL	0,147 ± 0,008	6,28	0,274 ± 0,008	10,27
Acetato de Etilo 25 min 1°	0,253 ± 0,008	13,65	0,439 ± 0,010	9,39
Acetato de Etilo 25 min 2°	0,058 ± 0,008	5,40	0,092 ± 0,008	8,42
Acetato de Etilo 25 min 3°	0,018 ± 0,008	0,45	0,027 ± 0,006	2,03
Acetato de Etilo 25 min (2)	0,345 ± 0,012	3,38	0,531 ± 0,016	1,04
Acetato de Etilo 25 min (3)	0,261 ± 0,010	8,05	0,412 ± 0,013	0,43
Acetato de Etilo 25 min, 35 mL	0,193 ± 0,008	13,84	0,317 ± 0,008	8,38

<sup>a</sup> La mediana se utilizó para reportar los porcentajes

<sup>b</sup> La desviación estándar relativa se calculó usando la mediana

La extracción con disolventes volátiles en baño ultrasónico mostró un tiempo menor de extracción que el método de hidrodestilación. El procedimiento de extracción con acetato de etilo dio 0,261% de limoneno y 0,412% de carvona en promedio, mientras que el procedimiento de hidrodestilación 0,240 % of limoneno y 0,422 % de carvona. El *f*-test (una-cola) reveló que la precisión de la extracción por ultrasónico es mejor que el método de hidrodestilación para los dos marcadores. Un *t*-test (dos-colas) fue también usado para comparar los porcentajes obtenidos en cada método. Este demostró que no hay diferencia significativa entre los porcentajes de los marcadores en los extractos de cada método, a un nivel de confianza del 95%.



## Método analítico por cromatografía de gases

La curva de calibración fue obtenida comparando la relación del área de los picos versus la relación de la masa del estándar/estándar interno. Una excelente linealidad sobre el rango ensayado fue obtenida con una ecuación de regresión de  $y = 0,92906782x - 2,15 \times 10^{-02}$  y un  $r^2 = 0,999831$  para carvona, y se obtuvo  $y = 1,09406045x + 4,46 \times 10^{-03}$  con un  $r^2 = 0,999830$  para limoneno.

Para calcular el límite de detección (LDD) y el límite de cuantificación (LDC) la IUPAC emplea la desviación estándar del intercepto ( $S_b$ ) y la pendiente ( $m$ ) de la curva de calibración usando la ecuación  $LDD = 3,29 S_b/m$  y  $LDC = 10 S_b/m$  (24). La aplicación de la regla de la IUPAC produjo un  $LDD = 0,02 \text{ g g}^{-1}$  y un  $LDC = 0,07 \text{ g g}^{-1}$  para carvona y,  $LDD = 0,02 \text{ g g}^{-1}$  y  $LDC = 0,07 \text{ g g}^{-1}$  para limoneno. La concentración del estándar interno fue  $0,5 \text{ mg/mL}$ .

La repetitividad del equipo demuestra una DER  $0,58$  y  $2,6\%$  para carvona y limoneno ( $n=10$ ). La repetitividad intra-día del método muestra una DER  $1,8\%$  y  $2,1\%$  ( $n=3$ ) para el primer día y una DER  $1,3\%$  y  $5,0\%$  ( $n=3$ ) en el quinto día para carvona y limoneno. La repetitividad inter-día fue calculada considerando los datos del primero y quinto día utilizando todas las medidas, la DER  $1,6\%$  y  $4,3\%$  ( $n=6$ ) para los compuestos. La carvona mostró una adecuada repetitividad y precisión intermedia. La precisión fue afectada en el caso de limoneno después de cinco días. El almacenamiento de las muestras puede no ser recomendado por la volatilidad del limoneno.

Recuperaciones obtenidas para limoneno y carvona fueron del  $72-103\%$  y  $74-88\%$ . El presente método mostró una exactitud satisfactoria. Los parámetros que más afectaron en el limoneno fueron el incremento en la temperatura del inyector de la muestra ( $5,9\%$ ) y la disminución de la temperatura del horno ( $4,04\%$ ), y en carvona solo afectó el volumen de inyección ( $-1,71\%$ ). El método analítico es más robusto para la carvona.

## Evaluación de los métodos de secado

En ocasiones el material vegetal rico en esencias es sometido a procesos de secado, lo que puede causar pérdida de compuestos volátiles importantes. Se han realizado diferentes pruebas de secado con respecto a la temperatura y el tiempo (25) o diferentes metodologías de secado (26-28). En este estudio se comparó el método de liofilización, secador solar y secado a la sombra. Durante el primer proceso la pérdida de limoneno fue menor y no hubo una diferencia significativa con la concentración de carvona obtenida en los tres métodos (ver cuadro 4). La pérdida de carvona fue

menor de 40% en los tres métodos, pero la pérdida de limoneno fue mayor del 85 % con el procedimiento de secador solar y secado a la sombra (ver cuadro 5).

**Cuadro 4.** Cuantificación de limoneno y carvona después del proceso de secado

<i>Método de secado</i>	<i>Limoneno en material vegetal seco (% w/w)<sup>a</sup></i>	<i>DER M</i>	<i>Carvona en material vegetal seco (% w/w)<sup>a</sup></i>	<i>DER M</i>
Secador solar	0,10 ± 0,03	8,10	0,80 ± 0,03	0,21
Secado la sombra	0,05 ± 0,03	5,06	0,84 ± 0,03	13,02
Liofilización	0,35 ± 0,03	6,56	0,79 ± 0,03	0,47

<sup>a</sup> Mediana es usada para reportar los porcentajes

<sup>b</sup> Desviación estándar relativa se calculo usando la mediana

**Cuadro 5.** Variación de la concentración de los marcadores con respecto al proceso de secado.

<i>Método de secado</i>	<i>Limoneno en material vegetal fresco (% m/m)<sup>a</sup></i>	<i>Pérdida de limoneno (% m/m)</i>	<i>Carvona en material vegetal fresco (% m/m)<sup>a</sup></i>	<i>Pérdida de carvona (% m/m)</i>
Material fresco	0,146 ± 0,017		0,302 ± 0,016	
Secado solar	0,0227 ± 0,006	84,5%	0,1907 ± 0,006	36,9
Secado a la sombra	0,0131 ± 0,007	91,0%	0,2060 ± 0,007	31,8
Liofilización	0,0792 ± 0,006	54,2%	0,1806 ± 0,006	40,2

<sup>a</sup> La mediana es usada para reportar porcentajes

### **Análisis cuantitativo por cromatografía de gases**

Se realizó un análisis cuantitativo en las muestras de *L. alba*. Las concentraciones de limoneno y carvona en el material vegetal seco son reportadas en el cuadro 6. El limoneno no se encuentra en las muestras de octubre, diciembre y febrero; quizás se perdió en el proceso de secado debido a su volatilidad. Las concentraciones más altas de carvona se obtuvieron en abril y julio, la más baja y en febrero.

**Cuadro 6.** Variaciones en las concentraciones de limoneno y carvona en *Lippia alba* durante un lapso de un año

<i>Mes</i>	<i>Limoneno en material vegetal seco (% m/m)</i>	<i>DER<sup>a</sup></i>	<i>Carvona en material vegetal seco (% m/m)</i>	<i>DER<sup>a</sup></i>
Octubre			0,08±0,02	27,97
Diciembre			0,11 ± 0,02	17,70
Febrero			0,08 ± 0,02	3,31
Abril	0,17 ± 0,02	4,79	0,34 ± 0,02	8,44
Julio	0,12 ± 0,02	6,14	0,43 ± 0,03	11,01

a n=3

Los resultados de carvona fueron evaluados estadísticamente aplicando una ANOVA, con la finalidad de saber si la diferencia entre los promedios es producido por un error aleatorio. El análisis estadístico reveló una diferencia significativa entre los promedios de las muestras.

Para la elaboración del material seco, los agricultores recolectan las plantas siempre en la época de floración, por lo que descartan las variaciones en la concentración de los principios activos debido al ciclo de maduración de la especie. Sin embargo, los resultados obtenidos sugieren que la recolección de las especies debería hacerse en los meses de mayor producción de los principios activos.

#### IV Agradecimiento

Se agradece profundamente al grupo GEMA por proveer el material vegetal de este estudio y al Museo Nacional por la identificación botánica.

#### V Referencias bibliográficas

- (1) Cáceres, A., *Plantas de Uso Medicinal en Guatemala*, Editorial Universitaria: Guatemala, 1996.
- (2) Floripe, F. A.; Altamirano, M. V. *Plantas que Curan, Serie No. 2*; Impramatur: Nicaragua, 2000.
- (3) Germosén, L.; Robineau. *Farmacopea Vegetal Caribeña*; TRAMIL: Nicaragua, 2005.

- (4) Julião, L. S.; Tavares, E. S.; Lage, C. L. S.; Leitão, S.G. *Rev. Bras. Farmacog.*, **2003**, 13, 36-38.
- (5) Tavares, E. S.; Julião, L. S.; Lopes, D.; Bizzo, H. R.; Lage, C. L. S.; Leitão, S. G. *Braz. J. Pharmacog.*, **2005**, 15, 1-5.
- (6) Lorenzo, D.; Paz, D.; Davies, P.; Vila, R.; Cañigüeral, S.; Dellacassa, D. *Flavour Fragr. J.*, **2001**, 16, 356-359.
- (7) Senatore, F.; Rigano, D. *Flavour Fragr. J.*, **2001**, 16, 169-171.
- (8) Ciccío, J. F.; Ocampo, R. A. *Ing. Cienc. Quim.*, **2004**, 21, 13-16.
- (9) Vale, T. G.; Matos, F. J. A.; Lima T. C. M.; Viana G. S. B. *J. Ethnopharmacol.*, **1999**, 67, 127-133.
- (10) Vale, T. G. do; Furtado, E. C.; Santos, J. G.; Viana, G. S. B. *Phytomedicine*, **2002**, 9, 709-714.
- (11) Zétola, M.; De Lima, T. C. M.; Sonaglio, D.; González-Ortega, G.; Limberger, R. P.; Petrovick, R. P.; Bassani, V. L. *J. Ethnopharmacol.*, **2002**, 82, 207-215.
- (12) Teixeira, M. C.; Figueira, G. M.; Sartoratto, A.; Garcia, V. L.; Delarmelina, C. J. *Ethnopharmacol.*, **2005**, 97, 305-311.
- (13) Viana G. S. B.; Vale, T. G.; Rao, V. S. N.; Matos, F. J. A. *Pharm. Biology*, **1998**, 36, 347-351.
- (14) Ramos, A.; Visozo, A.; Piloto, J; Gracia, A.; Rodríguez, C. A.; Rivero, R. J. *Ethnopharmacol.*, **2003**, 87, 241-246.
- (15) Hedhili, L.; Romdhane, M.; Planche, H.; Abderrabba, M. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1064, 129-134.
- (16) Guedes, A. P.; Amorim, L. R.; Vicente, A.; Fernandes-Ferreira, M. *Phytochem. Anal.*, **2004**, 15, 146-151.
- (17) Siatis, N. G.; Kimbaris, A. C.; Pappas, C. S.; Tarantilis, P. A.; Daferera, D. J.; Polissiou, M. G. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, 202-206.
- (18) Rivero-Cruz, B.; Rivero-Cruz, I; Rodríguez, J. M.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Mata, R. *J. Nat. Prod.*, **2006**, 69, 1172-1176.
- (19) Schaneberg, B. T.; Khan, I. A. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 1345-1349.
- (20) Pino, J. A.; Ortega, A. G.; Pérez, A. R.; Rodríguez, M. *Rev. Cubana Farm.*, **1997**, 30, 1
- (21) Stashenko, E. E.; Jaramillo, B. E.; Martínez, J. R. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1025, 93-103.
- (22) Mazzanti, G.; Battinelli, L.; Salvatore, G. *Flavour Fragr. J.*, **1998**, 13, 289-294.
- (23) Viana, G. S. de B.; Vale, T. G. do; Silva, C. M. M.; Matos, F. J. de A. *Biolog. Pharm. Bull.. Pharm. Soc. Japan* **2000**, 23, 1341-1317.
- (24) Currie, L. A. *Pure Appl. Chem.*, **1995**, 67, 1699-1723.
- (25) Rohloff, J.; Dragland, S.; Mordal, R.; Iversen, T. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, 4143-4148.

- (26) Omidbaigi, R.; Sefidkon, F.; Kazemi, F. *Flavour Fragr. J.*, **2004**, 19, 196-198.
- (27) Khangholi, S.; Rezaeinodehi, A.; Sefidkon, F. *Planta Med.*, **2006**, 72.
- (28) Asekun, O. T; Grierson, D. S.; Afolayan, A. J. *Capensis.*, **2007**, 101, 995-998.