

Caracterización química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake) Cuatrec.

Chemical characterization and antibacterial activity of the essential oil of *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake) Cuatrec.

ROSA L. APARICIO^{A,*}, LUIS B. ROJAS^A, ALFREDO USUBILLAGA^A,
MARÍA EUGENIA LUCENA^B

Resumen

El aceite esencial de las hojas de *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake) Cuatrec., recolectada en el páramo de El Batallón, en los Andes Venezolanos, fue obtenido por el método de hidrodestilación utilizando la trampa de Clevenger, con un rendimiento de 0,054% v/p. El análisis de sus componentes volátiles fue realizado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), identificando como compuestos principales el germacreno D (24,86%), α -pineno (22,38%), *p*-cimeno (7,35%) y α -felandreno (6,34%). La actividad antibacteriana se evaluó por el método de difusión en agar con discos, frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Los valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) fueron de 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL y 1,0 mg/mL para *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, respectivamente. Para *E. faecalis* el aceite no fue activo. Este es el primer reporte sobre actividad antibacteriana de *R. marcescens*.

Palabras clave: *Ruilopezia marcescens*, aceite esencial, actividad antibacteriana.

Abstract

The essential oil of the leaves of *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake) Cuatrec., collected at paramo El Batallón, in the Venezuelan Andes, was obtained by hydrodistillation using a Clevenger trap, with a yield of 0.054% v/p. The analysis of its volatile components was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The main compounds were germacrene D (24.86 %), α -pinene (22.38 %), *p*-cimene (7.35 %) and α -phellandrene (6.34 %). The antibacterial activity was evaluated by the disk agar diffusion method, compared to *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). The values of minimum inhibitory concentration (MIC) were of 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1.0 mg/mL and 1.0 mg/mL for *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* respectively. The oil was not active against *E. faecalis*. This is the first report on the antibacterial activity of *R. marcescens*.

Key words: *Ruilopezia marcescens*, essential oil, antibacterial activity.

^A Instituto de Investigaciones, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

^B Laboratorio de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

* Correspondencia: rosaaparicio@ula.ve.

Introducción

El género *Ruilopezia* pertenece a la subtribu Espeletiinae de la familia Asteraceae, y posee alrededor de 24 especies distribuidas en los Andes venezolanos (Cuatrecasas, 1976; Ulloa-Ulloa y col., 2017). Está constituido por plantas herbáceas y resinosas, con características de crecimiento en forma de roseta y sus hojas son cubiertas por indumentos plateados lanosos que los protegen del frío. La mayor parte de las Espeletiinae crecen indefinidamente, pero las especies del género *Ruilopezia* son monocárpicas, es decir, que mueren después del florecimiento (Aristeguieta, 1964; Cuatrecasas, 1987; Badillo, 2001). Las hojas de estas plantas son utilizadas como cataplasma para tratar el reumatismo y en infusiones para la bronquitis y como agentes sudoríficos (García-Barriga, 1975; Aparicio y col., 2001).

Estudios previos reportan la composición química de los aceites esenciales de *R. atropurpurea* (A.C.Sm.) Cuatrec. y *R. flocossa* (Standl.) Cuatrec., el limoneno representó el compuesto mayoritario en 40,0% y 24,2% respectivamente. Por otra parte, en *R. lindenii* (Sch.Bip. ex Wedd.) Cuatrec., el α -pineno (28,2%) fue el componente más abundante, en tanto que para *R. marcescens* (S.F. Blake) Cuatrec., recolectada en el Páramo El Batallón, entre los estados Táchira y Mérida, el germaceno D (33,5%) (Aparicio y col., 2001) es el compuesto más abundante. En *R. bracteosa* (Standl.) Cuatrec. β -mirceno (34,2%) es el componente mayoritario (Alarcón y col., 2015). Por otra parte, en el género *Ruilopezia* se reporta la presencia de diterpenos tipo kaureno que son interesantes tanto desde el punto de vista químico como farmacológico (Usubillaga y Nakano, 1979; Bolhman, 1980; Badillo, 2001). Alarcón y col. (2015), determinaron

la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Ruilopezia bracteosa*. En esta investigación se reporta la composición química y por primera vez la actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de *R. marcescens*. A esta especie no se le ha realizado anteriormente ninguna otra actividad biológica.

Materiales y métodos

RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

La planta fue recolectada en el Páramo El Batallón a unos 3000 m s.n.m. y a 4,5 Km del cruce entre las vías de Pregonero y la Grita, en la zona limítrofe de los estados Táchira y Mérida. Una muestra testigo (Voucher) fue depositada bajo el N° R.A. 06 en el Herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes.

EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL

Las hojas frescas (6,980 Kg) cortadas en pequeños pedazos se sometieron a hidrodestilación durante 3 h usando la trampa de Clevenger. El aceite esencial obtenido se secó sobre Na₂SO₄ (ChemAlert®) y se mantuvo a 4-6 °C bajo atmósfera de nitrógeno.

CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG-EM)

La separación e identificación de los componentes del aceite esencial se realizó utilizando un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (Hewlett Packard) (CG/EM), empleando un equipo HP-5973 a 70 eV utilizando una columna capilar HP-5MS (30 m, 0,25 mm de diámetro interno, 0,25 μ m de espesor), temperatura de la fuente 230 °C, temperatura del cuádruplo 150 °C, helio como gas portador a una

velocidad lineal de 34 m/s, rango 40-500 amu, 3,9 scans/s. El volumen inyectado fue de 1,0 μ L de una solución al 2% del aceite esencial en éter dietílico (Riedel-de Haën®), con una relación de reparto de 1:100. Se utilizó el siguiente programa: temperatura inicial de 60 °C seguido por un incremento a razón de 4 °C por minuto hasta 260 °C. La identificación de los componentes del aceite esencial se realizó mediante comparación computarizada de los espectros de masas obtenidos con los datos de la Librería Wiley (6ta edición) (Sandra y Bichi, 1987; Davies, 1990; Adams, 2007). Se determinaron los índices de Kováts en un equipo de Gases marca Perkin Elmer, modelo Autosystem, utilizando una columna de metil-fenil-silicona (Hewlett Packard) de 30 metros y 0,25 mm de diámetro utilizando una serie de patrones de n-parafinas desde la C7 hasta la C22 (Kováts, 1958).

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL

La actividad antibacteriana se evaluó empleando el método de difusión en agar con discos de papel, contra cepas bacterianas de referencia internacional: *S. aureus* (ATCC 25923), *E. faecalis* (ATCC 29212), *E. coli* (ATCC 25922), *K. pneumoniae* (ATCC 23357) y *P. aeruginosa* (ATCC 27853) (Velasco y col., 2007; CLSI, 2015).

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM)

Se procedió a determinar la CIM, y se utilizó como controles positivos: Penicilina® (10 μ g, BBLTM), VA: Vancomicina® (30 μ g, BBLTM), NN: Tobramicina® (10 μ g, BBLTM), CXM: Cefuroxima® (30 μ g, BBLTM), FEP: Cefepima® (30 μ g, BBLTM) y como control negativo DMSO (Burdick & Jackson®). Las diluciones del aceite esencial fueron

en un rango de concentración de 1 a 0,25 mg/mL, se impregnaron discos con 10 μ L de cada dilución. La CIM fue definida como la concentración más baja capaz de inhibir el crecimiento del microorganismo visible (CLSI, 2015). Los ensayos se realizaron por duplicado.

Resultados y discusión

El aceite esencial (AE) obtenido de las hojas frescas de *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake) Cuatrec., fue de 3,8 mL lo cual representa un 0,054%, v/p. Con respecto a las constantes físicas: el AE presentó una densidad de 0,7794 g/mL, una rotación óptica de -38,991° y un índice de refracción de 1,4837. En cuanto a la composición química, se logró identificar un total de 49 componentes que constituyen el 97,04% de las sustancias presentes (**Tabla I**).

El aceite esencial de *R. marcescens* contiene en mayor proporción sesquiterpenos hidrocarbonados (42,40%) y monoterpenos hidrocarbonados (41,46%), siendo el germacreno D (24,86%), α -pineno (22,38%), *p*-cimeno (7,35%) y α -felandreno (6,34%) las sustancias más abundantes. Alarcón y col. (2015) reportan que el aceite esencial de *R. bracteosa* (Standl.) Cuatrec. presenta β -mirceno (34,2%), α -pineno (24,3%), 7-epi- α -selinene (9,1%), y β -pineno (8,5%) como componentes mayoritarios. Por otro lado, Pérez y col. (2017), estudiaron la composición del aceite esencial de *R. lindenii* (Sch.Bip. ex Wedd.) Cuatrec., y encontraron que trans-cariofileno (30,9%), óxido de cariofileno (12,3%), espatulenol (11,7%) α -pineno (5,0%), AR-curcumeno (4,3%), y silfiperfol-6-eno (11,2%) son los componentes mayoritarios.

En este sentido, el aceite esencial de las especies de *Ruilopezia* estudiadas muestran

Tabla I
Composición química del aceite esencial de las hojas de *Ruilopezia marcescens*

| N° Pico | T.R (Min) | Área (%) | Sustancia | I.K _{ref} | I.K _{calc} |
|-----------|--------------|--------------|---------------------------------------|--------------------|---------------------|
| 1 | 3,79 | 0,73 | 2-Hexen-1-ol | 797 | 869 |
| 2 | 5,08 | 22,38 | α-pineno | 939 | 937 |
| 3 | 5,16 | 0,15 | Cafeno | 954 | 940 |
| 4 | 5,93 | 0,84 | Sabineno | 975 | 969 |
| 5 | 6,02 | 1,85 | β pineno | 979 | 972 |
| 6 | 6,30 | 0,28 | Mirceno | 990 | 982 |
| 7 | 6,68 | 6,34 | α-felandreno | 1002 | 994 |
| 8 | 6,99 | 0,26 | α -terpineno | 1017 | 1003 |
| 9 | 7,20 | 7,35 | <i>p</i>-cimeno | 1024 | 1009 |
| 10 | 7,31 | 1,22 | D-limoneno | 1029 | 1012 |
| 11 | 7,39 | 0,76 | 1,8-cineol | 1031 | 1015 |
| 12 | 8,14 | 0,49 | γ terpineno | 1059 | 1046 |
| 13 | 8,39 | 0,72 | Cis-Sabineno hidrato | 1070 | 1056 |
| 14 | 9,01 | 0,30 | α -terpinoleno | 1088 | 1082 |
| 15 | 9,32 | 0,33 | Trans-sabineno hidrato | 1098 | 1095 |
| 16 | 9,45 | 0,17 | Nonanal | 1100 | 1099 |
| 17 | 9,82 | 0,23 | 4,8-dimetil-1,3,7 nonatrieno | - | 1113 |
| 18 | 10,01 | 0,33 | Cis- <i>p</i> -2-menteno-1-ol | 1121 | 1121 |
| 19 | 10,57 | 0,22 | Trans- <i>p</i> -2-menteno-1-ol | 1140 | 1140 |
| 20 | 10,75 | 0,21 | Trans-Verbenol | 1141 | 1146 |
| 21 | 11,76 | 1,83 | Terpineno-4-ol | 1177 | 1179 |
| 22 | 12,19 | 1,50 | α -terpineol | 1188 | 1192 |
| 23 | 12,38 | 0,49 | Mirtenol | 1195 | 1197 |
| 24 | 14,21 | 0,40 | Geraniol | 1252 | 1256 |
| 25 | 18,62 | 0,42 | β -elemeno | 1390 | 1395 |
| 26 | 19,33 | 0,88 | Cis- α -bergamoteno | 1412 | 1415 |
| 27 | 19,48 | 1,77 | Trans-Cariofileno | 1419 | 1419 |
| 28 | 19,96 | 2,38 | Trans- α -bergamoteno | 1434 | 1437 |
| 29 | 20,18 | 2,15 | Z- β -farneseno | 1442 | 1445 |
| 30 | 20,52 | 0,60 | α -humuleno | 1454 | 1457 |
| 31 | 20,59 | 1,01 | E- β -farneseno | 1456 | 1459 |
| 32 | 20,77 | 0,75 | Ageratocromeno 6-demetoxi | 1463 | 1466 |
| 33 | 21,41 | 24,86 | Germacreno D | 1485 | 1488 |
| 34 | 21,53 | 0,25 | β -selineno | 1490 | 1492 |
| 35 | 21,66 | 0,25 | δ -selineno | 1492 | 1496 |
| 36 | 21,73 | 0,54 | Valenceno | 1496 | 1498 |
| 37 | 21,83 | 1,46 | Biciclogremacreno | 1500 | 1502 |
| 38 | 22,15 | 3,88 | δ -amorfenol | 1512 | 1512 |
| 39 | 22,61 | 0,59 | δ -cadineno | 1523 | 1527 |
| 40 | 22,85 | 1,11 | Trans- γ -bisaboleno | 1531 | 1535 |
| 41 | 23,61 | 0,25 | Germacreno B | 1561 | 1558 |
| 42 | 23,75 | 0,83 | E-nerolidol | 1563 | 1563 |

| N° Pico | T.R (Min) | Área (%) | Sustancia | I.K _{ref} | I.K _{calc} |
|---------|-----------|----------|---------------------|--------------------|---------------------|
| 43 | 24,14 | 0,60 | Germacreno D-4-ol | 1575 | 1574 |
| 44 | 24,20 | 0,95 | Espatuleno | 1578 | 1576 |
| 45 | 24,36 | 0,30 | Óxido cariofileno | 1583 | 1581 |
| 46 | 26,36 | 0,65 | τ -muurolool | 1642 | 1647 |
| 47 | 27,15 | 0,57 | α -bisabolol | 1685 | 1679 |
| 48 | 27,80 | 0,20 | Noolkatol | 1715 | 1705 |
| 49 | 40,99 | 0,41 | Kaurenal* | 2247 | 2244 |

| | |
|--------------------------------------|--------------|
| Hydrocarburos alifáticos insaturados | 1,13% |
| Hydrocarburos monoterpénicos | 41,46% |
| Monoterpenos oxigenados | 6,79% |
| Hydrocarburos sesquiterpénicos | 42,40% |
| Sesquiterpenos oxigenados | 4,50% |
| Diterpenos | 0,41% |
| Hydrocarburos aromáticos oxigenados | 0,75% |
| Total identificado | 97,04 |

T.R: Tiempo de retención de los componentes. %Área: área relativa. I.K_{ref}: Índice de Kováts tomado de la bibliografía (Adams, 2007). I.K_{calc}: Índice de Kováts calculado con la temperatura programada en la columna HP-5 MS. (*)Identificado por comparación directa con una muestra auténtica.

un alto contenido de hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpénicos, por lo cual, los resultados obtenidos en esta investigación son congruentes con los análisis previos realizados en otras especies de este género (Khouri y col., 2000; Aparicio y col., 2001; Usubillaga y col., 2001), pero difieren en la proporción de germacreno D, compuesto que es un componente minoritario en otras especies de Espeletiinae de la familia Asteraceae, en tanto que en el aceite esencial de *R. marcescens* constituye un 24,86% y es el componente mayoritario.

El germacreno D, juega un papel importante como precursor de muchos otros sesquiterpenos, puede tener efecto repulsivo contra herbívoros, además de ejercer actividad insecticida contra mosquitos (Kiran y Devi, 2007), así como efecto repelente contra áfidos (Bruce y col., 2005) y garrapatas (Birkett y col., 2008; Bruzual y col., 2015).

Tabla II

Actividad antibacteriana del aceite esencial obtenido de las hojas de *Ruilopezia marcescens*

| Microorganismos | | Zona de Inhibición (mm)* | | | | | | CIM mg/mL |
|-------------------------------|------------|--------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|--------------|
| | | Control Positivo | | | | | | |
| | | AE | P | VA | NN | CXM | FEP | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC 25923 | 13* | 37* | | | | | 0,25 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | ATCC 29212 | NA | | 18* | | | | - |
| <i>Escherichia coli</i> | ATCC 25922 | 13* | | | 26* | | | 0,5 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | ATCC 23357 | 13* | | | | 22* | | 1,0 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC 27853 | 13* | | | | | 30* | 1,0 |

AE: Aceite esencial; P: Penicilina® (10 µg); VA: Vancomicina® (30 µg); NN: Tobramicina® (10 µg); CXM: Cefuroxima® (30 µg); FEP: Cefepima® (30 µg); NA: No activo, *Zona de inhibición en mm, diámetro.

Con respecto a la evaluación de la actividad antibacteriana, el aceite esencial de las hojas de *R. marcescens* inhibió el crecimiento bacteriano en *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* presentando una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL y 1,0 mg/mL, respectivamente (**Tabla II**). Alarcón y col. (2015) reportaron que el aceite esencial *R. bracteosa* es activo contra *S. aureus* y *E. faecalis* con una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 0,1 y 0,6 mg/mL, respectivamente.

La propiedad antibacteriana del aceite esencial de *R. marcescens* podría ser atribuida al germacreno D y α -pineno debido a que son los componentes mayoritarios, reportes previos atribuyen la actividad contra *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* y *P. aeruginosa* por la presencia de dichos compuestos (Wang y col., 2012; Hsouna y col., 2013). En algunos casos estas sustancias exhiben actividad antimicrobiana importante cuando son testados por separado (Gallucci y col., 2009; Bassole y Juliani, 2012; Ouedrhiri y col., 2017). La actividad antibacteriana observada en esta investigación sugiere que el aceite esencial de *R. marcescens* puede ser usado en la industria Farmacéutica en el tratamiento de

enfermedades causadas por este tipo de bacterias (Hidalgo y col., 2008; Velásquez y col., 2010).

Conclusión

En el análisis de la composición química del aceite esencial de *R. marcescens* se identificaron como componentes mayoritarios el germacreno D (24,86%), α -pineno (22,38%), *p*-cimeno (7,35%) y α -felandreno (6,34%). La evaluación de la actividad estableció una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL y 1,0 mg/mL contra *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, respectivamente. Este es el primer reporte sobre la actividad antibacteriana del aceite esencial de *R. marcescens*.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de las Artes de la Universidad de Los Andes CDCHTA-ULA por su apoyo económico a través del Proyecto FA-562-14-08-B.

Referencias bibliográficas

Adams R. Identification of essential oil components by gas chromatography/

- mass spectrometry. Ed. 4. Allured Pub Corp: Carol Stream, Illinois (USA), 2007.
- Alarcón L, Peña A, Velasco J, Baptista J, Rojas L, Aparicio R, Usubillaga A. 2015. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Ruilopezia bracteosa*. *Natural Prod Comm* 10 (4): 655–656.
- Aparicio R, Romero M, Rojas L, Khouri N, Usubillaga A. 2001. Composition of the essential oil of four species of *Ruilopezia* from the Venezuelan Andes. *Flavour Fragrance J* 16 (3): 172–174.
- Aristeguieta L. 1964. Compositae. *Flora de Venezuela* 10 (1): 43–61.
- Badillo V. 2001. Lista actualizada de las especies de la familia Compuestas (Asteraceae) de Venezuela. *Ernstia* 11 (3): 147–215.
- Bassolé I, Juliani H. 2012. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules* 17: 3989–4006.
- Bohlmann F, Suding H, Cuatrecasas J, King R, Robinson H. 1980. Tricyclic sesquiterpenes and futher diterpenes from *Espeletopsis* species. *Phytochem* 19: 2399–2403.
- Birkett M, Al Abassi S, Krober T, Chamberlain K, Hooper A, Guerin P, Pettersson J, Picket J, Slade R, Wadhams L. 2008. Antiectoparasitic activity of the gum resin, gum haggar, from the East Africa plant, *Commiphora holtziana*. *Phytochem* 69(8): 1710–1715.
- Bruce T, Birkett M, Blande J, Hooper A, Martin J, Khambay B, Prosser I, Smart L, Wadhams L. 2005. Response of economically important aphids to components of *Hemizygia petiolata* essential oil. *Pest Manag Sci* 61(11): 1115–1121.
- Bruzual V, Guzmán W, Crescente O, Lanza J. 2015. Aceite esencial de *Wedelia calycina* (Asteraceae): Composición química, actividad antibacteriana y antifúngica. *Saber* (Revista multidisciplinaria del Consejo de Investigaciones de la Universidad de Oriente), Venezuela, 27(1): 87–93.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute, 2015.
- Cuatrecasas J. 1976. A new sub-tribe in the Heliantheae (Compositae): Espeletiinae. *Phytologia* 35 (1): 43–61.
- Cuatrecasas J. 1987. Clave diagnóstica de las especies de *Ruilopezia* (Espeletiinae, Heliantheae, Compositae). *Anales J Bot Madrid* 44 (2): 401–419.
- Davies N. 1990. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silica and carbowax 20 M. *Phases J Chromatog A* 503: 1–120.
- Gallucci M, Oliva M, Casero C, Dambolena J, Luna A, Zygadlo J. 2009. Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. *Flavour Fragr J* 24: 348–354.
- García-Barriga H. *Flora Medicinal de Colombia*. Vol. 3. Imprenta Nacional: Bogotá, 1975. p. 345.
- Hidalgo M, Reyes J, Cárdenas A, Díaz L, Rincón S, Vanegas N, Díaz P, Castañeda E, Arias C. 2008. Perfiles de resistencia a fluoroquinolonas en aislamientos clínicos de cocos Gram positivo provenientes de hospitales colombianos, 1994–2004. *Biomédica* 28: 284–294.
- Hsouna AB, Halima NB, Abdelkafi S, Hamdi N. 2013. Essential oil from *Artemisia phaeolepis*: chemical composition and antimicrobial activities. *J Oleo Sci* 980: 973–980.
- Kiran SR, Devi PS. 2007. Evaluation of mosquitocidal activity of essential oil and sesquiterpenes from leaves of *Chloroxylons wietenia* DC. *Parasitol Res* 01(2): 413–418.
- Khouri N, Usubillaga A, Rojas LB, Galarraga F. 2000. The essential oil of *Espeletia weddellii* Sch.Bip. ex Wedd. *Flavour Frag J* 15(4): 263–265.

- Kováts E. 1958. Retentions indices aliphatischer halogenide, alkohole, aldehyde und ketone. Helvet Chim Acta XLI: 1915.
- Ouedrhiri W, Balouiri M, Bouhdid S, Harki El H, Moja S, Greche H. 2017. Antioxidant and antibacterial activities of *Pelargonium asperum* and *Ormenis mixta* essential oils and their synergistic antibacterial effect. Environ Sci Pollut Res. Disponible en <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9739-1>.
- Pérez A, Rojas L, Aparicio R. 2017. Análisis comparativo de los componentes volátiles de *Ruilopezia lindonii* (Schultz-Bip. ex Wedd.) Cuatrec., recolectada a diferentes altitudes en Mérida-Venezuela. Revista Academia 16(38): 39–44.
- Sandra P, Bichi C. Capillary gas chromatography in essential oil analysis. Hüthig: Hidelberg, 1987. p. 1–437.
- Singh G, Kapoor I, Pandey S, Singh O. 2001. A note on antibacterial activity of volatile oils of some aromatic plants. Ess Oil Asso India 45: 275–278.
- Usubillaga A, Nakano T. 1979. Kauranoid diterpenes in *Ruilopezia margarita*. Planta Médica 35(4): 331–338.
- Usubillaga A, Aparicio R, Romero M, Rojas L B, Khouri N. 2001. Voltatile constituents from the leaves of four *Libanothamus* species from the Venezuelan Andes. Flavour Fragr J 16(3):209–211.
- Velasco J, Rojas J, Salazar P, Rodríguez M, Díaz T, Morales A, Rondón M. 2007. Antibacterial activity of the essential oil of *Lippia origanoides* against multiresistant bacterial strains of nosocomial origin. Nat Prod Comm 2(1): 85–88.
- Velázquez-Guadarrama N, Viguera J, Venegas G, Galindo J, Cerezo J, Nava M. 2010. Resistencia a linezolid en *Staphylococcus aureus* con elevada resistencia a aminoglucósidos en un hospital pediátrico de tercer nivel. Bol Med Hospital Infant México 67: 19–26.
- Wang W, Li N, Luo M, Zu Y, Efferth T. 2012. Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components. Molecules 17: 2704–2713.
- Ulloa-Ulloa C, Acevedo-Rodríguez P, Beck S, Belgrano MJ, Bernal R, Berry PE, Brako L, Celis M, Davidse G, Forzza RC, Gradstein SR, Hokche O, León B, León-Yáñez S, Magill RE, Neill DA, Nee M, Raven PH, Stimmel H, Strong MT, Villaseñor JL, Zarucchi JL, Zuloaga FO, Jørgensen PM. 2017. An integrated assessment of the vascular plant species of the Americas. Science 358(6370): 1614–1617. doi:10.1126/science.aao0398.