

Estudio fitoquímico preliminar y actividad antibacteriana de los tallos de *Lepechinia bullata* (Kunth) Epling

Preliminary phytochemical study and antibacterial activity of *Lepechinia bullata* (Kunth) Epling stems

ANY ARAUJO^A, GREIMAR VAZQUEZ^A, MAYRA RENGINFO^{B,D}, ALIDA PÉREZ-COLMENARES^{A,*}, LUIS ROJAS-FERMÍN^A, MARÍA LUCENA^C, ANNE-CLAIRE MITAINE-OFFER^D, MARIE-ALETH LACAILLE-DUBOIS^D

Resumen

El tamizaje fitoquímico de los tallos de *Lepechinia bullata* permitió establecer la presencia de triterpenos, esteroides y saponinas en las fracciones de hexano, diclorometano y metanol. Adicionalmente, del extracto de etanol : agua (75:25) se logró el aislamiento de ácido rosmarínico mediante diversas técnicas cromatográficas. Su estructura química fue establecida mediante el análisis de los espectros de IR, RMN y EM y por comparación con los datos reportados en la literatura. La actividad antibacteriana se evaluó *in vitro* empleando el método de difusión en agar con discos frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29219), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). La fracción de hexano fue activa contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli*, presentando una concentración mínima inhibitoria (CIM) de 10, 1.25 y 10 mg/mL, respectivamente. Por otra parte, la fracción de diclorometano mostró actividad contra *P. aeruginosa* a una CIM de 2.5 mg/mL y la fracción de metanol fue activa contra *S. aureus* y *K. pneumoniae* a una CIM de 10 mg/mL y contra *E. faecalis* a una CIM de 5 mg/mL. En el presente trabajo se muestra el estudio fitoquímico preliminar y la actividad antibacteriana de los tallos de *L. bullata*.

Palabras clave: *Lepechinia*, *Lepechinia bullata*, ácido rosmarínico.

Abstract

Phytochemical screening of *Lepechinia bullata* stems allowed to establish the presence of triterpenes, sterols and saponins in hexane, dichloromethane and methanol fractions. Additionally, the isolation of rosmarinic acid was achieved by various chromatographic techniques; its chemical structure was established by IR, NMR and MS data and by comparison of these data against values reported in the literature. The antibacterial activity was evaluated *in vitro* using the diffusion agar method with discs against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29219), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). The hexane fraction was active against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. coli*, exhibiting a minimum inhibitory concentration (MIC) of 10 and 1.25 and 10 mg/mL, respectively. On the other hand, the fraction of dichloromethane showed activity against *P. aeruginosa* at a MIC of 2.5 mg/mL and the methanol fraction was active against *S. aureus* and *K. pneumoniae* at a MIC of 10 mg/mL and against *E. faecalis* at a MIC of 5 mg/mL. We reported for the first time a preliminary phytochemical study and antibacterial activity of *L. bullata* stems.

Key words: *Lepechinia*, *Lepechinia bullata*, rosmarinic acid.

A Instituto de Investigaciones, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.
B Laboratorio de Productos Naturales, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

C Departamento Bioanálisis Clínico, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.
D Laboratoire de Pharmacognosie, PEPITE EA 4267, UFR des Sciences de Santé, Université de Bourgogne Franche-Comté, 7, Bd Jeanne d'Arc, BP 87900, 21079.

* Correspondencia: alidaperezc@gmail.com.

Introducción

El género *Lepechinia* (Lamiaceae) consta aproximadamente de 43 especies distribuidas desde el suroeste de Estados Unidos hasta Argentina (Epling, 1948; Drew y Sytsma, 2013). Algunas de estas plantas han sido utilizadas en la medicina popular para el tratamiento de la diabetes, infecciones uterinas, dolores estomacales y por sus propiedades antitumorales (Dimayuga y col., 1991; Pérez y col., 2008). En Venezuela se reporta la presencia de cuatro especies: *L. schiedeana* (Schlecht) Vatke, *L. salviaefolia* (Kunth) Epling, *L. conferta* (Benth) Epling y *L. bullata* (Kunth) Epling (Cegarra y col., 2006).

Lepechinia bullata (Kunth) Epling es endémica de Colombia y Venezuela, se localiza en biotipos tales como bosque nublado, subpáramo y páramo. En Venezuela se distribuye en los estados Anzoátegui, Distrito Federal, Lara, Mérida, Miranda, Sucre, Táchira y Trujillo (Orsini y Velázquez, 1996; Meier, 2005). Estudios previos sobre la composición química de las hojas de *L. bullata* reportan en el extracto metanólico la presencia de quinonas diterpénicas (6,7-dehidroroyleanona, horminona, 7-metil-horminona, royleanona) (Jonathan y col., 1989) y terpenoides (carnosol, ácido ursólico) en los extractos de hexano y acetona (Pérez y col., 2014). Otras investigaciones demuestran el aislamiento de sesquiterpenos (espirolepechineno, premnaspirodieno, palustrol) a partir del aceite esencial de las hojas de esta planta (Eggers y Sinnwell, 1999; Eggers, 2000). Ensayos realizados sobre los compuestos aislados de *L. bullata* demuestran que poseen actividad citotóxica y antibacteriana (Jonathan y col., 1989; Ulubelen y col., 2001; Gaspar y col., 2006). En el presente estudio se

reporta por primera vez en *L. bullata* el aislamiento de ácido rosmarínico, su estructura fue determinada mediante análisis espectroscópicos de RMN uni y bidimensionales. Adicionalmente se estableció la composición química y la actividad antibacteriana de las fracciones de hexano, diclorometano y metanol de los tallos de *L. bullata*.

Materiales y métodos

GENERAL

El espectro infrarrojo (IR) se obtuvo en un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo FT-1725X, en discos de KBr. Los espectros de masas (EM) se realizaron en un equipo Bruker micrOTOF HR-ESI-MS (modo positivo) y ESI-MS (modo positivo y negativo). Por otra parte, los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) uni y bi dimensionales se obtuvieron en un equipo de RMN marca Agilent, modelo Varian INOVA de 600 MHz para ^1H y 150 MHz para ^{13}C , usando como disolvente $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$. Para la cromatografía en columna (CC) se empleó sílica gel 60, sílica gel RP-18 (Merck) y sephadex LH 20 (Merck). En la cromatografía en capa fina (CCF) se utilizó sílica gel 60 GF₂₅₄, 0,3 mm espesor (Merck) y como revelador físico la lámpara UV (λ 254 y 365 nm) y vainillina-ácido sulfúrico (1% y 5% en etanol) para el revelado químico.

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

Los tallos de la planta se recolectaron en el Páramo de la Culata (Mérida-Venezuela). Una muestra testigo fue depositada en el Herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (Voucher LR002) e identificada como *Lepechinia bullata* (Kunth) Epling por el Ing. Juan Carmona adscrito al Departamento de Farmacognosia y

Medicamentos Orgánicos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

OBTENCIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO Y FRACCIONES DE HEXANO, DICLOMETANO Y METANOL

Los tallos fueron separados de la planta y colocados en bandejas a temperatura ambiente hasta completa sequedad, luego se procedió a moler hasta la obtención de un polvo fino. Posteriormente, se pesaron 100,0 g del material vegetal molido y se realizó una extracción por maceración con metanol (500 mL x 3) por un periodo de tres días cada una. La solución obtenida se filtró y concentró en un rotavapor a presión reducida a una temperatura no mayor a 45 °C. El extracto metanólico seco, se fraccionó por cromatografía al vacío utilizando sílica gel 60 y solventes de polaridad creciente (hexano, diclorometano, metanol x 500 mL c/u), las soluciones provenientes de cada separación, se concentraron bajo las mismas condiciones descritas anteriormente, para obtener las fracciones de hexano, diclorometano y metanol.

ESTUDIO FITOQUÍMICO PRELIMINAR

Para la caracterización química de los metabolitos secundarios presentes en las fracciones de hexano, diclorometano y metanol de los tallos de *L. bullata* se efectuó una serie de pruebas químicas cualitativas y de cromatografía de capa fina (CCF) siguiendo la metodología descrita por Marcano y Hasegawa (2002).

Se analizaron todas las fracciones por CCF, exceptuando la de agua en un 100%. La fracción 30:70 resultó la más interesante ya que se visualizó un compuesto mayoritario y con buenas probabilidades de separación, las otras fracciones presentaron mezclas

complejas de compuestos polares. La fracción metanólica que se estudió en un principio no reaccionó con el FeCl₃, por lo cual no se determinó la presencia de compuestos fenólicos. Probablemente debido a la polaridad del solvente usado (etanol-agua 75:25) se logró que el ácido rosmarínico pudiera extraerse.

El extracto hidroalcohólico se preparó con la finalidad de obtener las saponinas cuya presencia sí fue detectada en el extracto metanólico que se preparó en un principio, tanto por la formación de espuma como por CCF usando como fase móvil clorformo: metanol: agua (70:30:5) y revelador Komarowsky.

AISLAMIENTO DEL ÁCIDO ROSMARÍNICO

Los tallos secos de *L. bullata* (76,0 g) fueron extraídos con una mezcla de etanol-agua 75:25 (660 mL x 3 x 45 min) utilizando un extractor por microondas (Daewoo KOR-630A), el solvente se evaporó hasta sequedad en un rotavapor a una temperatura de 50 °C obteniendo 7,33 g de extracto seco, el cual fue evaluado mediante CCF usando como fase móvil una mezcla de clorformo: metanol: agua (70:30:5), visualizando compuestos polares de interés. Posteriormente el extracto se fraccionó mediante cromatografía al vacío utilizando como fase estacionaria sílica gel RP-18 y como fase móvil una mezcla de MeOH/H₂O (0:100, 30:70, 50:50, 70:30, 100:0), la fracción de interés (30:70) se purificó a través de cromatografía de exclusión molecular (Sephadex LH-20; MeOH) hasta la obtención de un sólido puro (17,8 mg).

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Las cepas bacterianas utilizadas fueron *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922),

Enterococcus faecalis (ATCC 29219), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) proporcionadas por el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

La actividad antibacteriana fue evaluada de acuerdo al método de difusión en agar con discos (CLSI 2015), el ensayo se realizó con un cultivo de 18 horas de cada microorganismo en 2,5 mL de caldo Müeller-Hinton a 37 °C. El inóculo bacteriano fue ajustado con solución salina fisiológica al patrón de turbidez de Mac Farland N° 0,5 (10⁶⁻⁸ UFC/mL). Cada inóculo se diseminó sobre la superficie de una placa que contenía agar Müeller-Hinton y luego se colocaron los discos (6 mm diámetro) previamente impregnados con 10 µL de los extractos, el control negativo (dimetilsulfóxido) y el disco estándar del antibiótico de referencia (Amikacina® y Ampicilina®) como control positivo para cada uno de los microorganismos.

El medio de cultivo inoculado se sometió a preincubación durante 18 horas, posteriormente se incubaron las placas por 24 horas y se realizó la lectura de los halos de inhibición alrededor del disco y se expresó en mm. En los microorganismos que mostraron zona de inhibición se determinó en ensayos por duplicado, la concentración inhibitoria mínima (CIM) disolviendo los extractos en dimetilsulfóxido a concentraciones de 10, 5, 2,5 y 1,25 mg/mL.

Resultados y discusión

El tamizaje fitoquímico de los tallos de *L. bullata* (**Tabla I**) se realizó mediante pruebas químicas cualitativas, los extractos obtenidos se colocaron en contacto con diversos reactivos y se observaron las

reacciones de coloración o precipitación que determinaron la presencia de ciertos metabolitos secundarios.

Los análisis de las fracciones de hexano y diclorometano presentaron una coloración roja y verde en la prueba de Liebermann-Burchard, indicando la presencia de triterpenos y esteroides, respectivamente. Por otra parte, en la fracción de metanol, se determinó la existencia de saponinas por la formación de espuma que se mantuvo por un periodo mayor a 30 minutos con una altura superior a 1 cm, esto se verificó mediante cromatografía de capa fina, usando como revelador el reactivo de Komarowsky, evidenciándose manchas verdes que demuestran que dicho extracto tiene saponinas esteroidales. Estos resultados se corresponden con los reportados en investigaciones previas donde señalan que los extractos de las hojas de *L. bullata* contienen compuestos terpenoidales (Jonathan y col., 1989; Pérez y col., 2014), asimismo, estudios anteriores,

Tabla I
Resultados del tamizaje fitoquímico de las fracciones de hexano, diclorometano y metanol de los tallos de *L. bullata*

Metabolitos	Reacción de coloración y/o precipitación	FH	FD	FM
Alcaloides	Dragendorff	-	-	-
Flavonoides	Shinoda	-	-	-
Cumarinas	Hidróxido de amonio concentrado	-	-	-
Taninos/ fenoles	Gelatina	-	-	-
	Tricloruro férrico	-	-	-
Triterpenos/ esteroides	Liebermann-Burchard	+	+	-
Saponinas	Prueba de Espuma	-	-	+

FH: fracción de Hexano. FD: fracción de Diclorometano. FM: fracción de Metanol. (+) Presencia del metabolito. (-) Ausencia del metabolito.

indican la presencia de saponinas para el género *Lepechinia* (*L. meyeri* y *L. schiedeana*) (Rossi y col., 2002; Gracia y col., 2004), sin embargo para *L. bullata* esta investigación constituye el primer reporte de saponinas.

Por otra parte, de la fracción de MeOH/H₂O (30:70) se logró el aislamiento de 17,8 mg de un sólido color crema, cuyo punto de fusión fue de 171° C. El espectro IR presentó bandas de tensión a 3442, 1688 y 1600 cm⁻¹ correspondientes a grupos OH, C=O y C=C sp². El espectro de masas (HR-ESI) en modo negativo evidenció ion molecular de 359,0823 m/z ((M-H)⁻) y un fragmento a 719,1794 m/z ((2M-H)⁻), consistente con la fórmula molecular C₁₈H₁₆O₈ (calc. 360,08452), por otra parte, en el espectro de masas (HR-ESI) en modo positivo se visualizó un ion molecular de 383,0789 m/z ((M+Na)⁺) y un fragmento a 743,2162 m/z ((2M+Na)⁺) lo cual indica una masa molecular de 360 y confirma el resultado del modo negativo. Con respecto a los datos espectroscópicos de RMN-¹H (C₅D₅) (**Tabla II**) resaltan varias señales entre 6-8 ppm que fueron asignadas de la siguiente manera: 7,45 (d; J= 2,0 H₂); 7,09 (d; J= 7,8 H₅); 6,92 (dd; J= 7,8 H₆); 7,40 (d; J= 1,9 H_{2'}); 7,12 (d; J= 8,4 H_{5'}); 6,87 (dd; J= 7,8 H_{6'}); 7,79 (d; J= 15,0 H_{7'}) y 6,53 (d; J= 15,0 H_{8'}). Asimismo, en el espectro de RMN-¹³C (C₅D₅) se evidenció la presencia de 18 carbonos, destacando señales correspondientes a carbonos aromáticos, olefínicos y carbonílicos (**Tabla II**).

El estudio detallado y la comparación de los datos espectroscópicos obtenidos con los reportados en la literatura (Dapkevicius y col., 2002), permitieron concluir que el compuesto aislado se trata de un fenilpropanoide derivado del ácido caféico conocido como ácido

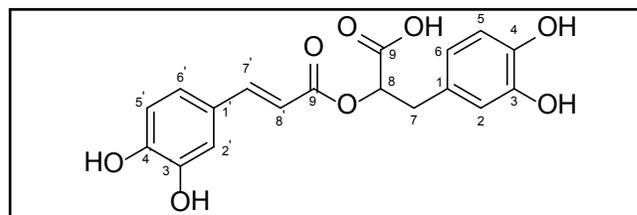


Figura 1. Ácido rosmarínico.

rosmarínico (**Figura 1**), esta sustancia ha sido obtenida previamente de *L. graveolens* (Parejo y col., 2004) y posee diferentes propiedades biológicas (antioxidante, antiinflamatoria, antimicrobiana, antiviral, anticancerígeno) (Venkatachalam y col., 2013; Petersen y Simmonds, 2003). Este compuesto se reporta por primera vez en *L. bullata*.

Tabla II

Desplazamientos químicos (δ: ppm) de los espectros de RMN de ¹H (600 MHz) y ¹³C (150 MHz) del ácido rosmarínico en C₅D₅N.

Posición	RMN ¹³ C	RMN ¹ H (ttt; J)	RMN ¹³ C*	RMN ¹ H (J Hz)*
1	130,6	-----	129,2	-----
2	117,5	7,45 (d; 2,0)	117,5	6,76 (2,0)
3	146,2	-----	146,1	-----
4	144,9	-----	145,2	-----
5	116,0	7,09 (d; 7,8)	116,2	6,68 (8,0)
6	120,6	6,92 (dd; 7,8)	121,8	6,59 (8,0)
7	38,1	3,37 (dd; 14,4-3,7) 3,62 (dd; 14,4-9,6)	37,8	2,97 (14,3-4,3) 3,08 (14,3-8,6)
8	75,6	5,83 (dd; 9,6-3,7)	74,5	5,13 (4,3-8,6)
9	176,5	-----	173,5	-----
1'	126,7	-----	127,6	-----
2'	115,4	7,40 (d; 1,9)	114,3	7,02 (2,0)
3'	146,8	-----	146,7	-----
4'	148,0	-----	149,7	-----
5'	116,2	7,12 (d; 8,4)	116,4	6,76 (8,0)
6'	121,6	6,87 (dd; 7,8)	123,2	6,93 (8,0)
7'	145,2	7,79 (d; 15,0)	147,7	7,53 (16,0)
8'	115,5	6,53 (d; 15,0)	115,1	6,25 (16,0)
9'	167,5	-----	168,4	-----

*RMN de ¹H (400 MHz) y ¹³C (100 MHz) en metanol deuterado (Dapkevicius y col., 2002).

Con respecto a la evaluación de la actividad antibacteriana (**Tabla III**), la fracción de hexano fue activa contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli*, presentando una CIM de 10, 1,25 y 10 mg/mL, respectivamente. Por otra parte, la fracción de diclorometano mostró actividad contra *P. aeruginosa* (CIM= 2,5 mg/mL) y la fracción de metanol fue activa contra *S. aureus* y *K. pneumoniae* a una CIM de 10 mg/mL y contra *E. faecalis* (CIM= 5 mg/mL). Estos resultados son congruentes con estudios realizados previamente en *L. bullata* donde compuestos como la royleanona, horminona, carnosol y 3-acetil ursolato de metilo fueron activos contra *S. aureus* y *E. faecalis* con una CIM de 10 µg/mL (Masterová y col., 1996; Pérez y col., 2014), por otra parte, en la fracción metanólica de *L. meyeri* se reporta la presencia flavonoides, triterpenos, esteroides y saponinas, y actividad antibacteriana contra diversas cepas gram positivas (Rossi y col., 2002). En tal sentido, hay estudios que indican que los compuestos de origen terpénico como triterpenos, esteroides y saponinas presentan diversas

actividades biológicas como antifúngica, antibacteriana y citotóxica, entre otras (Hernández y col., 2012; Francis y col., 2002; Podolak y col., 2010) por lo cual, los resultados obtenidos podrían ser consecuencia de los posibles efectos sinérgicos entre los diferentes metabolitos secundarios presentes en las fracciones evaluadas los tallos de *L. bullata*.

Conclusiones

Los estudios realizados sugieren que los tallos de *L. bullata* podrían ser una fuente importante de compuestos de origen terpénico ya que el análisis fitoquímico preliminar evidenció la presencia de triterpenos y esteroides en las fracciones de hexano y diclorometano, mientras que en la fracción metanólica se determinó la presencia saponinas esteroidales. Adicionalmente, se logró el aislamiento del ácido rosmarínico, el cual se ha obtenido previamente de otras especies de *Lepechinia*. Este estudio representa el primer reporte de la presencia de saponinas y ácido rosmarínico en *L. bullata*.

Tabla III
Actividad antibacteriana de los extractos de los tallos de *L. bullata*.

Microorganismos	Halos de Inhibición (mm)					CIM (mg/mL)		
	Fracciones evaluados			Compuestos de referencia		FH	FD	FM
	FH	FD	FM	AMP	AMK			
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	18	0	14	31	***	10	NA	10
<i>E. faecalis</i> (ATCC 19433)	0	0	10	25	***	NA	NA	5
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	8	0	0	***	22	1,25	NA	NA
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 23357)	0	0	18	***	21	NA	NA	10
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	10	9	0	***	28	10	2,5	NA

FH: Extracto de Hexano; FD: Extracto de Diclorometano; FM: Extracto de Metanol. CIM: Concentración Inhibitoria Mínima. NA: No Activo. AMP: Ampicilina. AMK: Amikacina. *** No se estudió.

En cuanto a la actividad antibacteriana, se puede indicar que los ensayos realizados revelaron que las fracciones obtenidas a partir del extracto metanólico de los tallos de *L. bullata* fueron activas frente a *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. Los resultados de la presente investigación contribuyen en el conocimiento del perfil fitoquímico y actividad antibacteriana del género *Lepechinia*.

Agradecimientos

Al Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. Al programa de apoyo a grupos de investigación del

CDCHTA-ULA (ADG: Grupo de Productos Naturales y Química Medicinal-ULA) y proyecto CDCHTA-ULA FA-589-16-08-B.

Referencias bibliográficas

- Cegarra J, Soriano P, Costa M, Lluch A, Martínez-Solis I. 2006. Especies medicinales y tóxicas del género *Lepechinia* Willd. (Labiatae) en Venezuela. *Revista de Fitoterapia* 6(2): 155–159.
- 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.
- Dapkevicius A, Beek T, Lelyveld G, Veldhuizen A, Groot A, Linssen J, Venskutonis R. 2002. Isolation and structure elucidation of radical scavengers from *Thymus vulgaris* leaves. *J Nat Prod* 65(6): 892–896.
- Drew B, Sytsma K. 2013. The south american radiation of *Lepechinia* (Lamiaceae): phylogenetics, divergence times and evolution of dioecy. *Bot J Linnean Soc* 171(1): 171–190.
- Dimayuga R, Garcia E, Keer S, Per Halfdan N, Carsten C. 1991. Traditional medicine of Baja California Sur (Mexico). III. Carnosol: a diterpene antibiotic from *Lepechinia hastata*. *J Ethnopharmacol* 31(1): 43–48.
- Eggers M, Sinnwell V. 1999. (-)-Spirolepechinene, a spirosesquiterpene from *Lepechinia bullata* (Lamiaceae). *Phytochemistry* 51(8): 987–990.
- Eggers M. Zusammensetzung und variation ätherischer öle von pflanzen der venezolanischen Anden unter besonderer berücksichtigung der gattung *Lepechinia* Willd. (Lamiaceae). PhD Tesis. Universität Hamburg, Deutschland, 2000.
- Epling C. 1948. A synopsis of the tribe Lepechinieae (Labiatae). *Brittonia* 6(3): 352–362.
- Francis G, Kerem Z, Makkar H, Becker K. 2002. The biological action of saponins in animal systems: a review. *Br J Nutr* 88(6): 587–605.
- Gaspar C, Rijo P, Simoes M, Duarte M, Rodríguez B. 2006. Abietanes from *Plectranthus grandidentatus* and *P. hereroensis* against methicillin- and vancomycin-resistant bacteria. *Phytomedicine* 13(4): 267–271.
- Gracia C, Beltrán M, Martínez E. 2004. Estudio fitotóxico preliminar de diez especies vegetales utilizadas en medicina tradicional. *Rev Colomb Cienc Quím Farm* 33(2): 114–121.
- Hernández L, Palazon J, Navarro A. 2012. The pentacyclic triterpenes α,β -amyryns: A review of sources and biological activities. In: *Phytochemicals - A global perspective of their role in nutrition and health*, Cap. 23. Ed: Dr Venketeshwer Rao, ISBN: 978-953-51-0296-0. InTech, 2012. pp. 487–502.
- Jonathan L, Pezzuto J, Fong H, Farnsworth N. 1989. 7-O-methylhorminone and other cytotoxic diterpene quinones from *Lepechinia bullata*. *J Nat Prod* 52(3): 571–575.
- Marcano D, Hasegawa M. Fitoquímica orgánica. 2da Edición. Universidad Central de Venezuela, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico: Caracas, Venezuela, 2002.
- Masterová I, Misíková E, Sirotková L, Vaverková S, Ubik K. 1996. Royleanones in the roots of *Salvia officinalis* L. of domestic provenance and their antimicrobial activity. *Ceska Slov Farm* 45(301): 242–245
- Meier W. 2005. Aspectos de la flora y vegetación del monumento natural Cerro Platillón (Juan Germán Roscio), Estado Guárico, Venezuela. *Acta Bot Venez* 28(1): 39–62.
- Orsini G, Velázquez D. 1996. Estudio palinológico de la subtribu Mentheae (Lamiaceae) en el Parque Nacional “El Ávila”, Venezuela. *Acta Bot Venez* 19(1): 47–66.
- Parejo I, Caprai E, Bastida J, Viladomat F, Jáuregui O, Codina C. 2004. Investigation of *Lepechinia graveolens* for its antioxidant activity and phenolic composition. *J Ethnopharmacol* 94(1): 175–184.

- Pérez A, Vivas K, Rojas L, Usubillaga A, Chataing B. 2014. Estudio fitoquímico y determinación de la actividad antibacteriana de las hojas de *Lepechinia bullata* (Kunth) Epling. Rev Fac Farm 56(1): 40–45.
- Pérez N, Ponce H, Medina J, Joseph P. 2008. Spasmolytic effect of constituents from *Lepechinia caulescens* on rat uterus. J Ethnopharmacol 115(1): 30–35.
- Petersen M, Simmonds M. 2003. Rosmarinic acid. Phytochemistry 62(2): 121–244.
- Podolak I, Galanty A, Sobolewska D. 2010. Saponins as cytotoxic agents: a review. Phytochem Rev 9(3): 425–474.
- Rossi C, Arias G, Lozano N. 2002. Evaluación antimicrobiana y fitoquímica de *Lepechinia meyeri* Walp “Salvia”. Revista Ciencia e Investigación 5(1): 30–36.
- Ulubelen A, Oksuz S, Topcu G, Goren A, Voelter W. 2001. Antibacterial diterpenes from the roots of *Salvia lepharochlaena*. J Nat Prod 64(4): 549–551.
- Venkatachalam K, Gunasekaran S, Jesudoss VA, Namasivayam N. 2013. The effect of rosmarinic acid on 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis. Exp Toxicol Pathol 65(4): 409–418.

Recibido: 09-03-2018
Aceptado: 04-06-2018