

## Artículo original

# Estudio fitoquímico y determinación de la actividad antibacteriana de las hojas de *Lepechinia bullata* (Kunth) Epling.

Phytochemical study and antibacterial activity evaluation of *Lepechinia bullata* (Kunth) Epling leaves.

Pérez-Colmenares Alida<sup>1\*</sup>, Vivas-Guerrero Karla<sup>2</sup>, Rojas-Fermín Luis<sup>1</sup>, Usubillaga Alfredo<sup>1</sup>, Chataing Bernardo<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. <sup>2</sup>Laboratorio de Análisis Biológico de Productos Naturales, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes, Mérida C.P. 5101, República Bolivariana de Venezuela.

Recibido enero 2014 - Aceptado julio 2014

## RESUMEN

Los terpenoides carnosol y ácido ursólico (aislado como 3-acetil-ursolato de metilo) fueron obtenidos de las hojas de *Lepechinia bullata* (Kunth) Epling, a partir de los extractos de hexano y acetona respectivamente. Adicionalmente, por reacciones de hemisíntesis, a partir de estos productos se obtuvo 11,12-diacetil-carnosol y ursolato de metilo. Las estructuras fueron determinadas mediante análisis espectroscópicos, incluyendo técnicas de RMN uni y bidimensionales. El carnosol y 3-acetil-ursolato de metilo presentaron actividad contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) a una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 10 µg/mL, mientras que el 11,12-diacetil-carnosol no fue activo frente a ninguna de las bacterias evaluadas. El ursolato de metilo mostró actividad contra *Bacillus subtilis* (ATCC 19433), *S. aureus* (ATCC 25923) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), con una CIM de 10 µg/mL, 10 µg/mL y 100 µg/mL, respectivamente. Es este el primer reporte sobre estos compuestos en *L. bullata*.

## PALABRAS CLAVE

Lamiaceae, *Lepechinia*, *Lepechinia bullata*, carnosol, ácido ursólico.

## ABSTRACT

The terpenoids carnosol and ursolic acid (isolated as 3-acetyl-methyl ursolate) were obtained from the leaves of *Lepechinia bullata* (Kunth) Epling

by hexane and acetone extractions respectively. Additionally, by semisynthetic reactions from these products 11,12-diacetyl-carnosol and methyl ursolate were obtained. Structures were determined by spectroscopic analysis, including 1D- and 2D-NMR techniques. Carnosol and 3-acetyl-methyl ursolate showed activity against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) a minimum inhibitory concentration (MIC) of 10 µg/mL, however 11,12-diacetyl-carnosol was not active against the bacteria tested. Methyl ursolate showed activity against *Bacillus subtilis* (ATCC 19433), *S. aureus* (ATCC 25923) and *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), with an MIC of 10 µg/mL, 10 µg/mL and 100 µg/mL respectively. This is the first report for these compounds in *L. bullata*.

## KEY WORDS

Lamiaceae, *Lepechinia*, *Lepechinia bullata*, carnosol, ursolic acid.

## INTRODUCCIÓN

El género *Lepechinia* (familia Lamiaceae) se encuentra distribuido desde el suroeste de Estados Unidos hasta Argentina [1]; en Sudamérica se han reportado alrededor de 40 especies [2,3]. En Venezuela se encuentran solo cuatro especies: *L. schiedeana* (Schlecht) Vatke, *L. salviaefolia* (Kunth) Epling, *L. conferta* (Benth) Epling y *L. bullata* (Kunth) Epling [4]. Varias especies de este género han sido utilizadas en la medicina popular para el tratamiento de la

diabetes, infecciones uterinas, dolores estomacales y por sus propiedades antitumorales [4, 5].

En relación a la composición química del género *Lepechinia* se ha logrado el aislamiento de diterpenos [6-12], triterpenos [7] y flavonoides [9]. *L. bullata* es una planta medicinal endémica de Colombia y Venezuela, localizada en biotopos tales como bosque nublado, subpáramo y páramo. En Venezuela la planta se encuentra distribuida en el Distrito Federal y en los estados Anzoátegui, Lara, Mérida, Miranda, Sucre, Táchira y Trujillo [13,14]. Investigaciones realizadas sobre la composición química de las partes aéreas de *L. bullata* reportan la presencia de quinonas diterpénicas como royleanona, 6,7-dehidroroyleanona, horminona y 7-metil-horminona; estudios microbiológicos de estos compuestos los señalan con actividad antibacteriana [15-17]. Por otra parte, a partir del aceite esencial de las hojas se han aislado sesquiterpenos como el espirolepechineno, premnaspirodieno y palustrol [18, 19]. En este trabajo se describe el aislamiento e identificación de dos compuestos de naturaleza terpénica obtenidos de los extractos de hexano y acetona de las hojas de *L. bullata*, así como la evaluación de su actividad antibacteriana y la de dos derivados hemisintéticos contra microorganismos de referencia internacional.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**General.** Los espectros infrarrojos de los compuestos aislados se realizaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer, modelo Spectrum Bx, en discos de KBr. Los espectros de masas se obtuvieron en un equipo de cromatografía de gases acoplado a masas marca Hewlett Packard, modelo 5973, utilizando una columna HP-5 (30 m x 0.25 mm x 0,25 µm de i.d) y un detector de impacto electrónico (EI, energía e<sup>-</sup> 70 eV). Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) uni y bi dimensionales se realizaron en un equipo de RMN Bruker-Avance DRX 400. Como solventes se usaron piridina deuterada (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) y metanol deuterado (CD<sub>3</sub>OD).

**Material Vegetal.** Las hojas frescas de la planta fueron recolectadas en enero de 2008 en el Páramo de la Culata por encima de los 2500 m.s.n.m., a pocos kilómetros de la ciudad de 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 specimen* N° 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.

**Separación y Purificación.** Las hojas (6,18 Kg) fueron separadas del resto del material vegetal, secadas en estufa a 40 °C durante una semana y posteriormente molidas, obteniéndose 1,7 Kg de material vegetal seco, el cual, fue extraído en columna a temperatura ambiente con hexano (4L x 3) y acetona (4L x 3) a temperatura ambiente. Las soluciones provenientes de ambas extracciones se filtraron y luego se concentraron en un rotavapor a presión reducida a una temperatura no mayor a 45 °C. De la fracción de hexano se obtuvo 92,7 g de extracto seco, mientras que de la fracción de acetona 83,4 g. Ambos extractos fueron sometidos a procesos de separación y purificación mediante cromatografía flash, utilizando como soporte sílica gel 60 y como eluentes hexano, mezclas de hexano-acetato de etilo (AcOEt), AcOEt y metanol en orden de polaridad creciente. Las fracciones fueron analizadas por cromatografía de capa fina y reunidas adecuadamente, obteniendo 11 subfracciones del extracto de hexano y 10 del extracto de acetona; de las subfracciones 5 (hexano) y 9 (acetona) se aislaron los compuestos I y II respectivamente (Figura 1).

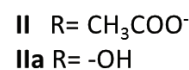
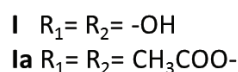
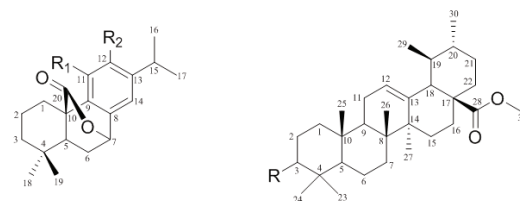


Fig. 1. Estructuras de los Compuestos I, Ia, II y IIa.

### Actividad antibacteriana

**Microorganismos.** Las cepas bacterianas utilizadas fueron *Bacillus subtilis* (ATCC 19433), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *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.

**Prueba de actividad antibacteriana.** La actividad antibacteriana fue evaluada de acuerdo al método de difusión en agar con discos [20]; 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 se ajustó con

solución salina fisiológica al patrón de turbidez de Mac Farland N° 0,5 ( $10^{6-8}$  UFC/mL). Cada inóculo se diseminó con un hisopo sobre la superficie de una placa que contenía agar Müeller-Hinton y luego se colocó sobre la superficie un disco de papel de filtro (6 mm diámetro) previamente impregnado con 10  $\mu$ L del extracto y el control negativo respectivo (dimetilsulfóxido). Además, se colocó el disco estándar del antibiótico de referencia (eritromicina® y ácido nalidíxico®) 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 organismos que mostraron zona de inhibición se determinó en ensayos por duplicado, la concentración inhibitoria mínima (CIM) disolviendo los compuestos en dimetilsulfóxido a concentraciones de 10, 50 y 100  $\mu$ g/mL.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El compuesto I (225,0 mg) fue obtenido de la subfracción 5 (9,73 g) de la cromatografía general del extracto de hexano por recristalización. El espectro de masas mostró un ion molecular a  $m/z$ : 330 [ $M^+$ ], congruente con la fórmula molecular  $C_{24}H_{30}O_6$ . En el espectro IR se visualizaron bandas de absorción a 3493, 3288 y 1720  $cm^{-1}$ , estas señales corresponden a la presencia de grupos hidroxilos y carbonilos, por otra parte, el espectro UV mostró un máximo de absorción en 288 nm. En el espectro de RMN- $^{13}C$  ( $C_5D_5N$ ) se observaron 20 señales entre las cuales destacan la señal a 175,7 ppm correspondiente a un grupo carbonilo ( $C_{20}$ ); también se visualizan varias señales entre 120 y 150 ppm que indican la presencia de un sistema aromático, así como un pico centrado a 77,5 ppm que corresponde a un carbono metínico  $sp^3$  unido a un oxígeno ( $-H-C-O-$ ;  $C_7$ ). El análisis del DEPT reveló que el compuesto se encuentra constituido por 4 metilos, 4 metilenos, 3 metinos y 8 carbonos cuaternarios y un carbonilo. En el espectro RMN- $^1H$  se observó la presencia de dos singuletes ( $J= 6,88$  Hz c/u) que integran para tres protones cada uno con un desplazamiento de  $\delta_{H18}$ : 0,55 y  $\delta_{H19}$ : 0,78; estas señales se correlacionan en el espectro HSQC con los carbonos  $C_{18}$  ( $\delta$ : 31,0) y  $C_{19}$  ( $\delta$ : 18,9), respectivamente. En el espectro HMBC se observan las correlaciones (Fig. 2) de la señal de  $H_{18}$  ( $\delta$ : 0,55) con la de los carbonos  $C_3$  ( $\delta$ : 40,6),  $C_4$  ( $\delta$ : 33,9) y  $C_{19}$  ( $\delta$ : 18,9), mientras que  $\delta_{H19}$ : 0,78 se correlaciona con los carbonos  $C_4$  ( $\delta$ : 33,9),  $C_5$  ( $\delta$ : 45,1) y  $C_{18}$

( $\delta$ : 31,0), logrando de esta manera confirmar la ubicación de los carbonos y protones  $C_{18}$ ,  $C_{19}$ ,  $C_4$ ,  $C_5$  y  $C_3$ . Adicionalmente en el espectro RMN- $^1H$  ( $C_5D_5N$ ) se visualizan dos dobletes que integran para tres protones cada uno ( $\delta_{H16}$ : 1,10 y  $\delta_{H17}$ : 1,05) los cuales se correlacionan en el espectro HSQC con los carbonos  $C_{16}$  ( $\delta$ : 22,5) y  $C_{17}$  ( $\delta$ : 22,4). A su vez, en el espectro HMBC las señales de estos protones,  $H_{16}$  y  $H_{17}$ , se correlacionan con la de los carbonos  $C_{15}$  ( $\delta$ : 29,9) y  $C_{13}$  ( $\delta$ : 135,1). El septuplete generado por el protón  $H_{15}$  ( $\delta$ : 3,49) a su vez se correlaciona con los picos asignados a los carbonos  $C_{12}$  ( $\delta$ : 144,5),  $C_{13}$  ( $\delta$ : 135,1),  $C_{14}$  ( $\delta$ : 111,3),  $C_{16}$  ( $\delta$ : 22,5) y  $C_{17}$  ( $\delta$ : 22,4) quedando establecido un grupo isopropilo en  $C_{13}$  (figura 2). Al tomar en cuenta los datos derivados del espectro de masas (EM), infrarrojo (IR), ultravioleta (UV) y los resultados del análisis de RMN- $^1H$ , RMN- $^{13}C$ , DEPT, HSQC y HMBC se identificó el compuesto I con el carnosol, un diterpeno del tipo abietano. Este diterpeno ha sido previamente aislado de *L. hastata* (A. Gray) Epling, *L. meyenii* Epling y *L. urbaniana* (Brig) Epling [10,11,21], sin embargo es la primera vez que se reporta para *L. bullata*.

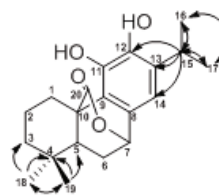


Fig. 2. Correlaciones observadas el espectro HMBC del Carnosol (I).

El compuesto Ia (Fig. 1) se obtuvo al tratar el carnosol (I) con piridina y anhídrido acético a temperatura ambiente y fue caracterizado como 11,12-diacetil-carnosol [22]. El espectro de masas mostró un ion molecular a  $m/z$  414 [ $M^+$ ] correspondiente con la fórmula molecular  $C_{24}H_{30}O_6$ . Al comparar su espectro de RMN- $^1H$  con el de I, se observó la presencia adicional de un singulete ( $\delta_H$ : 2,3), que integra para seis protones, el cual se asignó a los metilos de los dos grupos acetatos que se adicionaron a la molécula mediante la reacción de acetilación; de igual manera en el espectro de RMN- $^{13}C$  aparecen dos señales adicionales en 170,4 y 170,2 ppm que indican la presencia de los dos grupos carbonilos correspondientes a estos acetatos. Las señales restantes coinciden con los carbonos y protones del compuesto de partida (I).

El compuesto II se obtuvo de la subfracción 9 (3,0 g) de la cromatografía general del extracto de acetona

que había sido previamente tratada con piridina y anhídrido acético a temperatura ambiente [22] y luego con diazometano [22]. El espectro de masas mostró un ion molecular  $m/z$ : 512,4 [ $M^+$ ], adicionalmente se observan otros picos  $m/z$ : 452 y  $m/z$ : 409 que representan la pérdida de los grupos  $CH_3COOH$  y  $CH_3CO$ , respectivamente. También se observa un pico  $m/z$ : 262 que corresponde a la fragmentación característica de los triterpenos tipo  $\Delta^{12}$ -ursano con un grupo  $COOCH_3$  en  $C_{28}$ . El espectro IR presentó una banda de absorción a  $1693\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a la presencia de los grupos carbonilos. En el espectro UV se visualizó un máximo de absorción en 230 nm. En el espectro de RMN- $^{13}C$  ( $CD_3OD$ ) se observaron 33 señales entre las cuales destacan las correspondientes a dos grupos carbonilos en 171,0 y 178,2 ppm, así como la presencia de un doble enlace cuyos carbonos emiten una señal en 125,6 y 138,3 ppm, también se observó la señal de un carbono unido a oxígeno a 81,0 ppm. En el espectro RMN- $^1H$  ( $CD_3OD$ ) se visualizaron cinco singuletes que integran para tres protones cada uno ( $\delta_{H23}$ :0,87;  $\delta_{H24}$ :0,85;  $\delta_{H25}$ : 0,95;  $\delta_{H26}$ : 0,74;  $\delta_{H27}$ : 1,07) estas señales se correlacionan en el espectro HSQC con los carbonos  $C_{23}$  ( $\delta$ :28,2),  $C_{24}$  ( $\delta$ :16,9)  $C_{25}$  ( $\delta$ :15,6),  $C_{26}$  ( $\delta$ :17,2) y  $C_{27}$  ( $\delta$ :23,7), respectivamente. adicionalmente, se observan las señales correspondientes a 2 metilos terciarios ( $\delta_{H29}$ : 0,83 y  $\delta_{H30}$ : 0,94) y dos singuletes con un desplazamiento químico de  $\delta_{H33}$ : 2,07 y  $\delta_{H31}$ : 3,6; estas señales se correlacionan en el espectro HSQC con los carbonos  $C_{29}$  ( $\delta$ :17,1),  $C_{30}$  ( $\delta$ :21,3),  $C_{33}$  ( $\delta$ :21,4) y  $C_{31}$  ( $\delta$ :51,5) respectivamente. También se visualizo una señal correspondiente a un protón olefinico  $H_{12}$  ( $\delta$ :5,22) que se correlacionó en el HSQC con el carbono  $C_{12}$  ( $\delta$ :125,6). Al tomar en cuenta los datos derivados del EM, (IR), (UV) y los resultados del análisis de RMN- $^1H$ , RMN- $^{13}C$  y HSQC se identificó el compuesto II como 3-acetil-ursolato de metilo.

Posteriormente, el compuesto II se hidrolizó en medio básico [22] obteniendo el ursolato de metilo (IIa, Fig. 1). Estos compuestos fueron identificados por comparación de los datos físicos y los valores de desplazamientos en los espectros de RMN- $^1H$ , RMN- $^{13}C$  y DEPT con los publicados en la literatura [23]. Esta información indica que el compuesto presente en la subfracción 9 es el ácido ursólico, el cual ha sido aislado previamente de *L. chamaedryoides* (Balb.) Epling [24] y *L. caulescens* (Ortega) Epling [25], reportándose por primera vez para *L. bullata*.

En la Tabla 1 se presentan los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad antibacteriana observándose que el carnosol (I) y el 3-acetil-ursolato de metilo (II) inhibieron el desarrollo de

*S. aureus* a una CIM de  $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ , sin embargo, el 11,12-diacetil-carnosol (Ia) fue inactivo frente a las cepas evaluadas; estos datos sugieren que la presencia de los grupos acetilos inhiben la acción antibacteriana, debido al bloqueo de los grupos hidroxilos de naturaleza fenólica, los cuales probablemente actúan produciendo lisis de la membrana plasmática de las bacterias [26]. Por otra parte, el ursolato de metilo (IIa) mostró actividad contra las bacterias Gram positivas (*B. subtilis*, *S. aureus* y *E. faecalis*) con una CIM que osciló entre  $10\text{ }\mu\text{g/mL}$  y  $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ . Estudios previos reportan la evaluación de derivados semisintéticos del ácido ursólico y señalan que el grupo hidroxilo en  $C_3$  y carboxílico en  $C_{17}$  son esenciales para la actividad antibacteriana y citotóxica [27]. En el presente estudio el compuesto IIa mostró mayor actividad que II corroborando la importancia del grupo hidroxilo en  $C_3$ . Los compuestos I, II y IIa fueron activos solo contra los microorganismos Gram positivos, posiblemente su acción esté dirigida a la síntesis del peptidoglicano, componente mayoritario de la pared celular de estas bacterias.

TABLA 1

Actividad antibacteriana de los compuestos aislados de los extractos de *L. bullata*.

Microorganismos	Halos de Inhibición (mm)*						CIM $\mu\text{g/mL}$		
	Muestras evaluadas			Compuestos de Referencia			I	II	IIa
	I	Ia	II	IIa	Eri	Nal			
<i>B. subtilis</i> (ATCC 19433)	NA	NA	NA	12*	32*	-	-	-	10
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	17*	NA	12*	12*	33*	-	10	10	10
<i>E. faecalis</i> (ATCC 19433)	NA	NA	NA	10*	33*	-	-	-	100
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	NA	NA	NA	NA	-	23*	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 23357)	NA	NA	NA	NA	-	23*	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	NA	NA	NA	NA	-	25*	-	-	-

\*mm de los halos de inhibición (discos 6 mm de diámetro) promedio de dos ensayos consecutivos. I: carnosol; Ia: 11,12-diacetil-carnosol; II: 3-acetil-ursolato de metilo; IIa: ursolato de metilo; Eri: eritromicina; Nal: ácido nalidixico; CIM: concentración inhibitoria mínima; NA: no activo.

## CONCLUSIONES

Del extracto de hexano de las hojas de *L. bullata* se obtuvo carnosol (I) y del extracto de acetona se logró identificar el ácido ursólico bajo la forma de 3-acetil-ursolato de metilo (II). Adicionalmente se prepararon dos derivados semisintéticos el 11,12-diacetil-carnosol (Ia) y ursolato de metilo (IIa). Los compuestos I y II presentaron actividad contra *S. aureus* a una CIM de  $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ , el compuesto IIa fue activo contra *B. subtilis*, *S. aureus* y *E. faecalis* con una CIM de  $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ ,  $10\text{ }\mu\text{g/mL}$  y  $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Este es el primer reporte que identifica los compuestos I y II en *L. bullata*.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico y de las Artes de la Universidad de Los Andes (CDCHTA proyecto FA-525-12-08-C). Al Laboratorio de RMN de la Facultad de Ciencias, al Programa de Formación e Intercambio Científico-ULA, al Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACIT).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Epling, C. A synopsis of the tribe *Lepechinieae* (Labiatae). *Brittonia*. 1948; 6(3): 352-362.
- [2] Hart, J. Peripheral isolation and the origin of diversity in *Lepechinia* sect. *Parviflorae* (Lamiaceae). *Syst Bot*. 1985; 10(2): 134-146.
- [3] Drew B, Sytsma K. The South American radiation of *Lepechinia* (Lamiaceae): phylogenetics, divergence times and evolution of dioecy. *Bot J Linn Soc*. 2013; 171 (1): 171-190.
- [4] Pérez N, Ponce H, Medina J, Joseph P. Spasmolytic Effect of Constituents from *Lepechinia caulescens* on Rat Uterus. *J Ethnopharmacol*. 2008; 115(1): 30-35.
- [5] Dimayuga R, Garcia E, Keer S, Per Halfdan N, Carsten C. Traditional medicine of Baja California Sur (Mexico). III. Carnosol: a diterpene antibiotic from *Lepechinia hastata*. *J Ethnopharmacol*. 1991; 31(1): 43-48.
- [6] Cegarra J, Soriano P, Costa M, Lluch A, Martínez I. Especies medicinales y tóxicas del género *Lepechinia* Willd. (Labiatae) en Venezuela. *Revista de Fitoterapia*. 2006; 6(2): 155-159.
- [7] Delgado G, Cárdenas X, Álvarez L, Devivar A, Pereda R. New oleanane and isopimarane terpenoids from *Lepechinia glomerata*. *J Chem Res*. 1986; 1(8): 2565-2579.
- [8] Bruno M, Savona G, Piozzi F, De La Torre M, Rodríguez B, Marlier M. Abietane Diterpenoids from *Lepechinia meyeri* and *Lepechinia hastata*. *Phytochemistry*. 1991; 30(7): 2339-2343.
- [9] Delgado G, Sánchez E, Hernández J, Chávez M, Alvarez L, Martínez E. Abietanoid acid from *Lepechinia caulescens*. *Phytochemistry*. 1992; 31(9): 3159-3161.
- [10] Ahmed A, Hussein N, De Adams A, Mabry T. Abietane diterpenes from *Lepechinia urbaniana*. *Pharmazie*. 1995; 50(31): 279-280.
- [11] Dimayuga R, Garcia S, Nielsen H, Christophersen C. Traditional Medicine of Baja California Sur (Mexico) III. Carnosol: A diterpene antibiotic from *Lepechinia hastata*. *J Ethnopharmacol*. 1991; 31(1): 43-48.
- [12] Delgado G, Hernández J, Chávez M, Álvarez L, Gonzaga V, Martínez E. Di- and triterpenoid acids from *Lepechinia caulescens*. *Phytochemistry*. 1994; 37(4): 1119-1121.
- [13] Orsini G, Velázquez D. Estudio palinológico de la subtribu Mentheae (Lamiaceae) en el Parque Nacional "El Ávila", Venezuela. *Acta Bot Venez*. 1996; 19(1): 47-66.
- [14] Meier W. Aspectos de la flora y vegetación del monumento natural Cerro Platillón (Juan Germán Roscio), Estado Guárico, Venezuela *Acta Bot Venez*. 2005; 28(1): 39-62.
- [15] Jonathan L, Pezzuto J, Fong H, Farnsworth N. 7-O-methylhorminone and other cytotoxic diterpene quinones from *Lepechinia bullata*. *J Nat Prod*. 1989; 52(3): 57-575.
- [16] Ulubelen A, Oksuz S, Topcu G, Goren A, Voelter W. Antibacterial diterpenes from the roots of *Salvia lepharochlaena*. *J Nat Prod*. 2001; 64(4): 549-551.
- [17] Gaspar C, Rijo P, Simoes M, Duarte M, Rodriguez B. Abietanes from *Plectranthus grandidentatus* and *P. hereroensis* against methicillin- and vancomycin-resistant bacteria. *Phytomedicine*. 2006; 13(4): 267-271.
- [18] Eggers M, Sinnwell V. E. (-)-Spirolepechinene, a spirosesquiterpene from *Lepechinia bullata* (Lamiaceae). *Phytochemistry*. 1999; 51(8): 987-990.
- [19] EGGERS M. "Zusammensetzung und Variation ätherischer Öle von Pflanzen der venezolanischen Anden unter besonderer Berücksichtigung der Gattung *Lepechinia* Willd (Lamiaceae). PhD Tesis. Universität Hamburg (2000).
- [20] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty First Informational supplement. CLSI document M100-S21 (2011). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania, USA, 19087-1898.
- [21] Castillo P, Locks O. Compounds with antioxidant activity in the Species *Lepechinia meyeri* (Walp). *Rev Soc Quim Perú*. 2005; 71(4): 227-236.
- [22] Furniss B, Hannaford A, Smith P, Tatchell A. Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry. 5<sup>th</sup> Ed. Logman Scientific Technical. (New York). 1989. 1540 p.
- [23] Ciangherotti C, Buitrago D, Morales A. Estudio de los componentes químicos de las hojas y tallos de *Cestrum buxifolium* Kunth. *Rev Fac Farm*. 2004; 46(1): 31-34.
- [24] Silva, M. Triterpenic constituents of *Lepechinia chamaedryoides*. *J Pharm Sci*. 1968. 57(5): 864-865.

[25] Aguirre F, Vergara J, Villalobos R, Lopez J, Navarrete, G., Estrada, S. Ursolic acid mediates the vasorelaxant activity of *Lepechinia caulescens* via NO release in isolated rat thoracic aorta. Life Sciences. 2006; 79(11): 1062-1068.

[26] Domingo D, López M. Plantas con acción

antimicrobiana. Rev Esp Quimioter. 2003; 16(4): 385-393.

[27] Shai L, McGaw L, Aderogba M, Mdee L, Eloff J. Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from *Curtisia dentata* (Burm.f) C.A. Sm. Leaves. J Ethnopharmacol. 2008; 119(2): 238-244.