



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DEL ESTADO DE HIDALGO

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
Área Académica de Química.



Tesis

Identificación por GC-MS de compuestos químicos presentes en extractos orgánicos de *Melissa officinalis* y evaluación de su actividad antimicrobiana

Para obtener el grado de licenciada de Química en Alimentos

PRESENTA:

Ana Karen Ruíz Hernández

Directores de tesis:

Dra. Elizabeth Contreras López
Dr. Juan Ramírez Godínez

Mineral de la Reforma, Hidalgo.

Noviembre, 2018



Mineral de la Reforma, Hgo., a 29 de octubre de 2018

Número de control: ICBI-D/843/2018
 Asunto: Autorización de impresión.

M. EN C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIDO
 DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH

Por este medio le comunico que el Jurado asignado a la Pasante de la Licenciatura en Química en Alimentos **Ana Karen Ruiz Hernández**, quien presenta el trabajo de titulación "Identificación por GC-MS de compuestos químicos presentes en extractos orgánicos de *Melissa officinalis* y evaluación de su actividad antimicrobiana" después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación firman de conformidad los integrantes del Jurado:

PRESIDENTE:	Dra. Verónica Salazar Pereda
PRIMER VOCAL:	Dra. Elizabeth Contreras López
SEGUNDO VOCAL:	Dra. Araceli Castañeda Ovando
TERCER VOCAL:	Dr. Juan Ramirez Godínez
SECRETARIO:	Dr. Javier Añorve Murga
PRIMER SUPLENTE:	Dra. Fabiola Araceli Guzmán Ortiz
SEGUNDO SUPLENTE:	M. en Q. Emmanuel Pérez Escalante

Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

Atentamente
 "Amor, Orden y Progreso"

Dr. Oscar Rodolfo Suárez Gastón
 Director del ICBI



018CWMR



Carretera Pachuca-Tulancingo Km 4.5 Colinas
 Córdoba, Mineral de la Reforma, Hidalgo
 México C.P. 42154
 Teléfono: +52 (271) 71 701 00 ext. 2501
 Fax: 2158
 dirección: icbi@uah.edu.mx

www.uah.edu.mx

Agradecimientos.

A mi madre Hildeberta Hernández Uscanga, que gracias a su apoyo y amor incondicional he llegado a donde estoy. Por creer en mí siempre, le doy gracias por nunca dejarme sola.

A mi tía Verónica Ruíz, por ser mi segunda madre. Gracias por tus consejos y apoyo, por levantarme cuando me caía. En general a mi familia, por su amor y apoyo.

A mis amigos inseparables Ricardo, Angie, Néstor, Lisa y Javier, por hacer tan amenos los 5 años en la carrera, por todos los momentos que vivimos juntos y que ahora serán imborrables. También por motivarme en momentos difíciles.

A Ricardo Rosas mi mejor amigo, mi confidente y todo, le agradezco su ayuda en este trabajo, ya que fue parte clave y esencial.

A mis amigos Fernando, Roberto, Melintzen y Fanny que nunca me han dejado sola y siempre han estado conmigo, por todos sus consejos e impulsarme a ser mejor.

A mis asesores de tesis la Dra. Elizabeth Contreras López y al Dr. Juan Ramírez Godínez por su ayuda y motivación en la realización de este trabajo, ya que sin ellos esto no hubiera sido posible.

Al Dr. José Antonio Rodríguez Ávila, el cual siempre creyó en mí y me impulso a continuar en esta maravillosa carrera.

Dedicatorias

Dedico este trabajo principalmente a mi madre Hildeberta Hernández Uscanga, por el esfuerzo que ha hecho a través de los años en mi crianza y educación. Este logro no solo es mío, también es tuyo. Te amo mamá.

Karen Ruíz

Índice

1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
2.1 Las plantas medicinales	2
2.2 <i>Melissa officinalis</i>	5
2.2.1 Historia, descripción botánica y condiciones de cultivo.....	5
2.2.3 Composición química del aceite esencial.....	6
2.2.4 Otros compuestos presentes en <i>Melissa officinalis</i>	9
2.2.5 Factores que afectan la composición química.....	13
2.2.6 Aplicaciones de <i>Melissa officinalis</i>	13
2.3 Métodos de extracción de aceites esenciales	15
2.3.1 Extracción por disolventes	15
2.3.2 Hidrodestilación	15
2.3.3 Percolación.....	16
2.4 Métodos de prueba de sensibilidad antimicrobiana	16
2.4.1 Método de difusión	16
2.4.1.1 Ensayo de difusión del disco en Agar.....	17
2.4.2 Métodos de dilución	18
3. Objetivos	19
3.1 Objetivo General	19
3.2 Objetivos específicos	19
4. Metodología	20
4.1 Muestra.....	20
4.2 Identificación de los compuestos químicos en <i>Melissa officinalis</i>	20
4.2.1 Obtención de los extractos orgánicos	20
4.2.2 Identificación de los compuestos extraídos por GC-MS	21
4.3 Análisis de solvente residual mediante RMN de ¹ H a 400 MHz.....	22
4.3.1 Actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos	22
4.3.2 Preparación de extractos orgánicos	23
4.3.3 Activación de cepas microbianas.....	23
4.3.4 Prueba de sensibilidad antimicrobiana	24
5. Resultados	25

5.1 Identificación de los compuestos presentes en los extractos orgánicos de <i>Melissa officinalis</i>	25
Extracto éter de petróleo	25
Éter etílico	29
Extracto de acetato de etilo	33
Extracto metanólico	36
5.2 Identificación de compuestos antioxidantes	40
5.3 Actividad antimicrobiana	41
5.3.1 Análisis de la presencia de solventes por RMN ¹ H	41
5.3.2 Resultados de inhibición	47
6. Discusión	48
6.1 Identificación de compuestos por GC-MS	48
Compuestos antioxidantes	50
6.2 Actividad antimicrobiana	52
7. Conclusiones	55
8. Referencias	56

1. Introducción

Desde tiempos remotos, la existencia del hombre ha estado ligada al uso de las plantas, ya que han sido parte fundamental de su alimentación y salud. En México, antes de la llegada de los españoles, ya existía un amplio acervo de los recursos botánicos utilizados por las poblaciones indígenas. En esa época el conocimiento ecológico, biológico, taxonómico y de uso de plantas era extenso, lo que despertó un gran interés entre los españoles; en Europa la medicina estaba basada en el uso de plantas medicinales (Gómez-Pompa, 1993).

Actualmente las plantas medicinales siguen teniendo un papel importante en la salud de la población, no solo en México sino también en países tercer mundistas donde la práctica de la medicina tradicional resulta una alternativa económica viable y cuya importancia ha sido reconocida por organismos internacionales como la Organización Mundial de la Salud (Bruneton, 1999).

Melissa officinalis o bálsamo de limón, es una planta ampliamente utilizada en la medicina tradicional ya que posee propiedades que han sido aprovechadas en el tratamiento de trastornos digestivos, carminativos, antiespasmódicos, sedantes, analgésicos, tónicos y diuréticos. Diversos estudios han señalado que esta planta presenta actividad antioxidante, antiviral, anticancerígena, antitumoral, antimicrobiano, entre otras (Miraj et. al., 2016).

Es por ello que en este trabajo se pretende identificar mediante técnicas cromatográficas los compuestos químicos presentes en *Melissa officinalis*, así como, la actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos obtenidos de dicha planta. Las propiedades antimicrobianas de *Melissa Officinalis* podrían ser utilizados en el control de diversas enfermedades de origen microbiano, así como, en la preservación de alimentos, lo que resulta de interés tanto para la industria farmacéutica como para la alimentaria.

2. Antecedentes

2.1 Las plantas medicinales

El uso de plantas medicinales entre las culturas indígenas ha sido una larga tradición, cuyos inicios aún no han sido completamente establecidos. Sin embargo, los primeros registros arqueológicos de 60,000 años de antigüedad encontrados en las cuevas de Shanidar (Irak), indican que los hombres de Neanderthal ya utilizaban esta clase de plantas. Uno de los primeros registros del uso de las plantas medicinales fue hallado en unas tablillas de arcilla en escritura cuneiforme alrededor del año 2800 a. C. en la cultura sumeria (Barquero, 2007).

En el Código de Hammurabi del rey de Babilonia de 1728 a 1686 a.C. se describieron los usos de diversas plantas curativas; en este se describe como culturas antiguas pertenecientes a Egipto, India, China y Roma también contaban con una gran diversidad de documentos en los cuales describían las propiedades de diversas plantas medicinales. En el continente americano, fueron hallados restos de hojas de coca, una especie estimulante, narcótica y medicinal, en Huaca Prieta, Perú (Feldman, 2011) En México, en un sitio arqueológico de Coahuila con 8,000 años de antigüedad, se encontraron *Lophophora williamsii* (peyote) y otras especies ceremoniales y curativas. En otras cuevas de Chihuahua y Tehuacán, Puebla, se recuperaron raíces de sangre de grado, *Jatropha sp.* y fragmentos de doradilla, *Selaginella sp.*, que muy probablemente tuvieron algún uso medicinal (Callejas, 2006).

En México, existen cerca de 22,000 especies de plantas con flores, y 7,000 de estas han resultado útiles; siendo el medicinal el que presenta un mayor porcentaje de uso (Gheno-Heredia *et al.*, 2011). En la Tabla 1 se muestran algunas plantas medicinales y su uso en el tratamiento de diversas enfermedades.

Tabla 1. Algunas plantas medicinales mexicanas y su aplicación.

Familia	Nombre científico	Nombre local	Aplicación
<i>Annonaceae</i>	<i>Annona cherimola</i> Mill. <i>Annona muricata</i> L.	Chirimoya Guanabana	Diarrea, fiebre, antihelmíntico, tos, emético. Diarrea, disentería, lepra.
<i>Aristolochiaceae</i>	<i>Aristolochia taliscana</i> Hook. et Arn.	Guaco	Enfermedad cutánea.
<i>Asteraceae</i>	<i>Piqueria trinervia</i> Cav	Hierba de San Nicolás	Disentería y fiebre.
<i>Bixaceae</i>	<i>Bixa orellana</i> L	Achiote	Disentería, sarampión y granos en la boca.
<i>Burseraceae</i>	<i>Bursera simaruba</i> (L.) Sarg	Palo mulato	Diarrea, fiebre, gingivitis, tos, sarampión.
<i>Chenopodiaceae</i>	<i>Chenopodium</i> <i>graveolens</i> Willd. <i>Chenopodium</i> <i>ambrosioides</i> L.	Epazote de zorrillo Epazote morado	Diarrea, amebiasis, dolor de estómago, tos. Diarrea, dolor de estómago, cramps
<i>Clusiaceae</i>	<i>Calophyllum brasiliense</i> Cambess. <i>Clusia salvinii</i> Donn. Sm. <i>Mammea americana</i> L.	Bari Oreja de coyote Zapote Domingo	Diarrea, lombrices intestinales. Gonorrea, dolor de riñón. Fiebre, enfermedad cutánea.
<i>Elaeocarpaceae</i>	<i>Muntingia calabura</i> L.	Puan, Capulín rojo	Sarampión, granos en la boca, dolor de estómago.
<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Croton draco</i> Schltld	Sangre de grado	Disentería, granos y/o espinillas, llagas.
<i>Fabaceae</i>	<i>Gliricidia sepium</i> (Jacq.) Kunth ex Walp.	Cocote Palo de Brasil Hierba de la Vibora	Antipirético, sarampión. Fiebre. Fiebre.
<i>Malvaceae</i>	<i>Malvaviscus arboreus</i> Cav.	Azocopacle, manzanit	Disentería, dolor de estómago, llagas, tos.
<i>Piperaceae</i>	<i>Piper amalago</i> L. <i>Piper auritum</i> Kunth	Cordoncillo Acuyo	Fiebre Fiebre, infecciones en la piel.
<i>Polypodiaceae</i>	<i>Phlebodium aureum</i> (L.) J. Sm.	Lengua de ciervo	Fiebre, enfermedades renales úlceras.
<i>Rubiaceae</i>	<i>Hamelia patens</i> Jacq.	Balletilla	Granos y/o espinillas, malaria, llagas.
<i>Verbenaceae</i>	<i>Aloysia triphylla</i> Royle	Té de cedrón	Diarrea, dolor de estómago.

Fuente: Tomada de Yasunaka et al., (2005)

La investigación científica sobre las plantas medicinales ha sido relativamente escasa (Rivera, 1999), se estima que en México solo en el 5% de las especies ha sido realizada la validación química, farmacológica y biomédica (Huerta, 1997; Alonso, 2003). Sin embargo, esta perspectiva cambió, ya que en la década de los años 70's se renovó el interés por investigar la herbolaria medicinal, esto como resultado del reconocimiento internacional que realizó la Organización Mundial de la Salud hacia la medicina tradicional.

En la medicina tradicional, muchas de las plantas son empleadas en el tratamiento de enfermedades tales como infecciones de vías urinarias, bronquitis, diarrea, abscesos cutáneos y enfermedades relacionadas a parásitos (Yasunaka et al., 2005). En México, cerca de 1024 plantas se emplean para tratar problemas relacionados al tracto digestivo (Argueta-Villamar et al., 1994). De acuerdo al IMSS, 473 especies son empleadas para tratar problemas del tracto digestivo, 247 para problemas respiratorios y 277 para enfermedades de la piel (Aguilar et al., 1994).

Diversos estudios han sido realizados con el fin de analizar el efecto antimicrobiano de las plantas (Khan et al., 1980; Samy et al., 1998; Essawi and Srour, 2000), algunos de ellos se presentan a continuación; sin embargo, aún permanecen sin estudiar un gran número de plantas. En este sentido, en el estudio realizado por Yasunaka et al., (2005) se analizaron 22 plantas (Tabla 1) de uso común en la medicina tradicional mexicana; estas son empleadas principalmente en el tratamiento de fiebre, diarrea, malaria, disentería, llagas y enfermedades venéreas causadas principalmente por microorganismos. Los resultados obtenidos por dichos investigadores revelan que de las 22 plantas estudiadas 7 presentaron alta actividad contra *Staphylococcus aureus* y nueve de ellas actividad moderada. 6 plantas presentaron actividad moderada contra *Escherichia coli*. *Bursera simaruba*, *Haematoxylon brasiletto*, *Calophyllum brasiliense*, y la planta *Mammea americana* mostró alta actividad contra *Staphylococcus aureus*. Debido a las propiedades antimicrobianas mostradas por estas dos últimas plantas, Yasunaka et al., (2005) analizaron los principios bioactivos encontrando a cumarinas y xantonas como responsables de dicha actividad.

Mimica-Dukic et al., (2004) analizaron el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Melissa officinalis* sobre 13 cepas de bacterias y 6 de mohos. Los resultados de este estudio mostraron inhibición sobre la bacteria *Shigella sonnei* y una actividad significativa sobre especies de *Trichophyton*, siendo el citral y citronelal los principales responsables de dicha actividad. Por otro lado, Navarro et al., (2003) analizaron la actividad antifúngica de 18 extractos orgánicos obtenidos de 9 plantas medicinales mexicanas colectadas en Morelos. El efecto inhibitor más fuerte fue observado en el extracto hexánico de *Melissa officinalis* sobre *Eupatorium aschenbornianum* y *Sedum oxypetalum*; el extracto metanólico también mostró actividad inhibitoria sobre *Lysiloma acapulcensis* y *Annona cherimolia*. Carocho et al., (2015) observaron un efecto inhibitor de *Melissa officinalis* sobre *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* y *Penicillium funiculosum*; el efecto fue superior al observado con estreptomycin.

2.2 *Melissa officinalis*

2.2.1 Historia, descripción botánica y condiciones de cultivo

Melissa officinalis fue utilizada desde tiempos ancestrales en la medicina tradicional. Algunos datos históricos señalan que los monjes franceses y Paracelso (1493-1541) ya hacían uso de ésta planta. Los médicos y químicos suizos preparaban tónicos llamados “Elixir de la vida” a base de *Melissa officinalis*. El escritor inglés John Evelyn (1620-1706) describió esta planta como fortalecedora del cerebro y removedora de la melancolía. En hebreo, su aceite esencial fue llamado “bal-smin” o líder de los aceites (Moradkhani et al., 2010)

Melissa officinalis, conocida como bálsamo de limón, es una planta medicinal perteneciente a la familia *Lamiaceae* (Tabla 2). Otros nombres de ésta planta son: Melisa, Toronjil, Hierba de limón, Citronela, Abejera, Apiastro, Bedaranjil, Cedrón, Hierba luna, Cidronela, Citraria, Hoja de limón, Torongil, Toronjina. Es una planta nativa de la región este del Mediterráneo y oeste asiático (Mefthizade et al., 2010).

Es un arbusto de alrededor de 60-90 cm de altura. Los tallos se ramifican desde la base. Las hojas son grandes, pecioladas y con márgenes dentados, de color verde claro brillante. Las flores son de color blanco o rosado.

Se adapta muy bien a diferentes tipos de suelo y clima, lo que le ha permitido vivir en diferentes lugares del mundo como Europa y Estados Unidos, en donde es ampliamente cultivada. En México, y particularmente en el estado de Hidalgo crece en los municipios de Acaxochitlán, Pacula y Valle del Mezquital (Pérez, Villavicencio & Ramírez, 2003)

Tabla 2. Clasificación botánica de *Melissa officinalis*.

Reino	<i>Plantae</i>
Sub-genero	<i>Tracheobionta</i>
Orden	<i>Lamiales</i>
Familia	<i>Lamiaceae</i>
Genero	<i>Melissa</i>
Especie	<i>Melissa Officinalis L.</i>

(Goetz, 2012)

Respecto a las condiciones de cultivo, este tipo de planta prefiere suelos fértiles arenosos y arcillosos, bien drenados con pH de 5 a 7. Crece bien en climas soleados, pero también con sombra parcial; en ésta última condición produce hojas más grandes que cuando se encuentra expuesta al sol. *Melissa officinalis* puede crecer a temperaturas de 15-35°C y requiere de 500-600 mm de precipitación; es especialmente sensible a la sequía (Moradkhani et al., 2010).

2.2.3 Composición química del aceite esencial

Las esencias o aceites esenciales son una mezcla compleja de sustancias aromáticas responsable de las fragancias de las flores. Son líquidos con escasa solubilidad en agua, solubles en alcoholes y en disolventes orgánicos (López-Luego, 2004). Los aceites esenciales en las plantas pueden encontrarse en las

plantas en diferentes células oleíferas, en los canales secretorios, estar presentes en las glándulas o en los tricomas. El aceite esencial está compuesto por una gran variedad de sustancias volátiles; esta mezcla puede contener desde 50 hasta 300 sustancias químicas y está compuesta por hidrocarburos terpénicos, sus derivados oxigenados, alcoholes, aldehídos y cetonas, así como éteres, ésteres, compuestos fenólicos, fenilpropanoides y otros derivados (Stashenko, 2009).

El contenido de aceite esencial en plantas medicinales varía de 0.02 a 0.3%, de ahí el elevado costo de producción y alto precio de los aceites esenciales en el mercado. Diversos trabajos de investigación han sido reportados en relación a la composición del aceite esencial de *Melissa officinalis*, el resumen de estos se presenta en la tabla 3. De estos se infiere que los principales compuestos presentes en *Melissa officinalis* es el citral con sus isómeros geranial y neral.

Por otro lado, es importante mencionar que algunas subespecies de *Melissa* pueden presentar perfiles químicos diferentes, tal es el caso de la subespecie *altissima* cuyo aceite esencial está compuesto principalmente por β -cubebeno, terpioleno, γ -3-careno, terpineno, β -cariofileno y muurolol (Dawson et al., 1988). Otra subespecie de *Melissa officinalis* es *inodore*, la cual ha sido utilizada en la medicina turca tradicional y cuya composición ha revelado la presencia de compuestos como β -cubebeno, β -cariofileno, α -cadinol, geranial y neral. En la planta fresca han sido detectados también otro tipo de compuestos como fenoles totales (2253/100mg), ácido ascórbico (53.2/100mg) y carotenoides (46.3/100mg) cuya presencia puede ser responsable de propiedades antioxidantes (Sarar & Kokdil, 1991).

Tabla 3. Composición química del aceite esencial de *Melissa officinalis*.

Referencia	Principales constituyentes del aceite esencial
Argyropoulos y Müller (2014)	Compuestos volátiles (geranial, neral, citronelal, geraniol)
Awad et al., (2009)	Ácido rosmarínico Triterpenos (ácido ursólico y oleanólico) Derivados del ácido cinámico tales como ácido cafeico
Meftahizade et al., (2010)	Citral (geranial y neral) Citronelal Geraniol β -pineno α -pineno β -cariofileno
Carnat et al., (1998)	Citral (48%) Citronelal (39.47%) Cariofileno (2.37%)
Sarer y Kokdil (1991)	α -pineno (2.86%) β -pineno (11.37%) Linalool (2.74%) Citronelal (5.86%) Borneol (0.62%) Neral (12.22%) Geraniol (38.13%)
Masakova et al. (1979)	Citral (geranial y neral)

2.2.4 Otros compuestos presentes en *Melissa officinalis*

Triterpenos

Los terpenoides son compuestos orgánicos y volátiles que se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, cuya unidad estructural básica es el isopreno, constituido por cinco átomos de carbono. Su unión sucesiva da lugar a distintos tipos de terpenos en los que se encuentran monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos y politerpenos (Palá, 2002).

Los triterpenos tienen 30 carbonos, los cuales son sintetizados por la mayoría de las plantas, hasta ahora más de 20,000 triterpenos diferentes se han identificado en diversas plantas. Los principales triterpenos que han sido aislados e identificados en *Melissa officinalis* son el ácido ursólico y oleanólico (Fig.1), que de acuerdo a algunas investigaciones son los responsables de la actividad antifúngica, citotóxica y hemolítica de la planta (Shakeri, Sahebkar y Javadi, 2016).

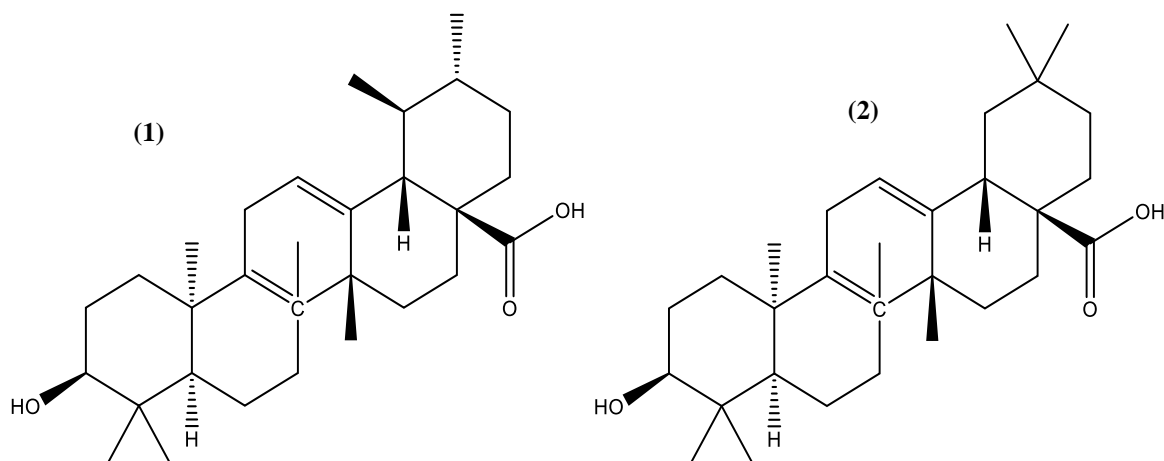


Figura 1. Ácido ursólico (1), ácido oleanólico (2)

Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos son metabolitos secundarios de las plantas, derivados del ácido benzoico y ácido cinámico, de acuerdo a su estructura química poseen al menos un anillo aromático, un grupo hidroxilo y un grupo carboxílico. Estos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal.

La actividad antioxidante que presenta *Melissa officinalis* se ha atribuido a la presencia del ácido rosmarínico, tal como lo demuestran los estudios de Ziaková & Brandosterova (2002) quienes reportaron que entre los principales componentes antioxidantes de *Melissa Officinalis* procedente de Eslovaquia, la presencia de este compuesto, así como el ácido cafeico y ácido clorogénico (Fig. 2)

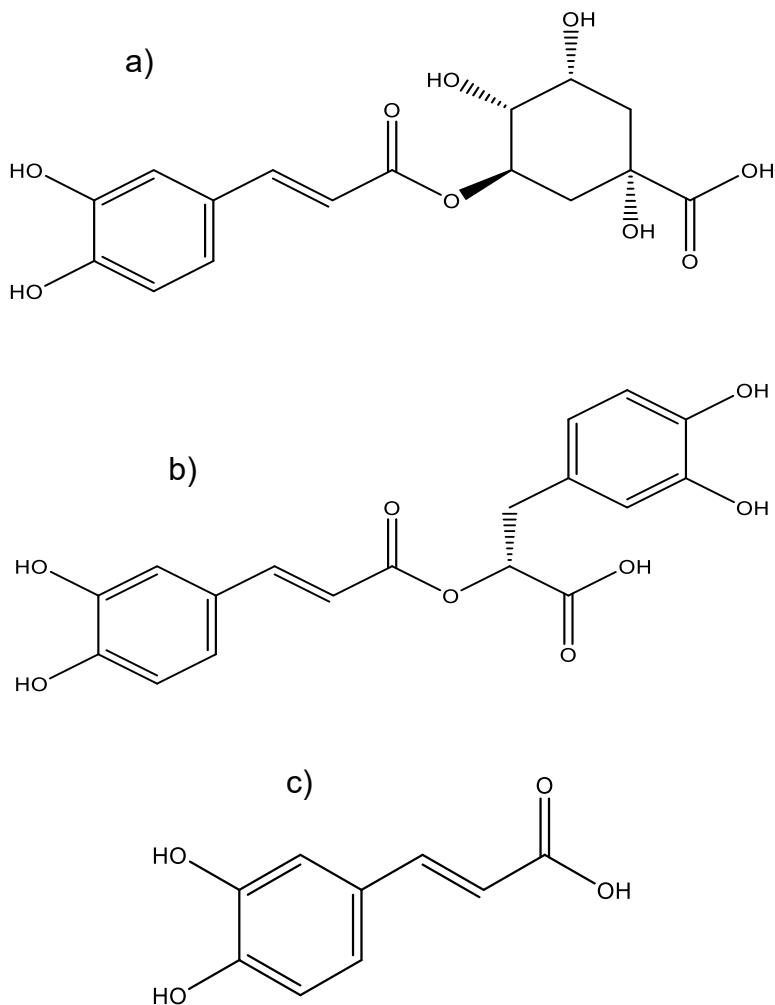


Figura 2. Estructura de algunos ácidos fenólicos: a) ácido clorogénico, b) ácido rosmarínico. c) ácido cafeico

Flavonoides

Los flavonoides son un amplio grupo de metabolitos secundarios. Son compuestos orgánicos que se sintetizan a partir de aminoácidos, carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Tenorio-López et al., 2006) Se caracterizan por un núcleo flavan; la figura 3 presenta la estructura general de los flavonoides que muestra los tres anillos fenólicos (A, B y C). Las diferentes clases de flavonoides difieren en el nivel de oxidación y los sustituyentes del anillo C (Faggio et al., 2017).

En las plantas, los flavonoides se sintetizan a través de la ruta del fenilpropanoide, que transforma la fenilalanina en coenzima A de coumaroil A y a continuación entra en la ruta de los flavonoides. La ruta de los fenilpropanoides produce calconas y de estos se forman varios flavonoides. Dependiendo de la planta, diferentes grupos de enzimas (por ejemplo, reductasas, hidroxilasas e isomerasas) pueden actuar y originar diferentes flavonoides (Ferreyra et al., 2012).

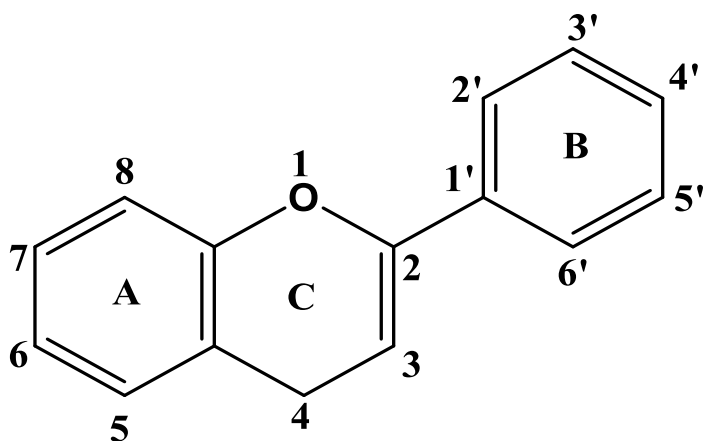


Figura 3. Estructura básica de los flavonoides

Se sabe que los flavonoides son potentes antioxidantes y eliminadores de radicales libres derivados de un doble enlace situado entre los carbonos dos y tres, un grupo hidroxilo en la posición tres del carbono, polihidroxilación de los anillos aromáticos A y B anillos aromáticos y un grupo carbonilo ubicado en el carbono cuatro (Faggio et al., 2017).

Investigaciones científicas sugieren que estos compuestos poseen actividad biológica y farmacológica; incluyendo actividad antioxidante, antiinflamatoria, antimicrobiana, y anticoagulante. En la tabla 4 presenta los compuestos reportados por diversos autores en hojas de *Melissa officinalis*, destacando diferentes monoterpenos oxigenados, triterpenos, ácidos fenólicos y distintos flavonoides (Shakeri et al., 2016) Los flavonoides que se han identificado en *Melissa Officinalis* se clasifican en cuatro grupos: flavonas (9 compuestos) flavanonas (5 compuestos), flavonoles (3 compuestos), y flavonoides (2 compuestos) (Heitz et al., 2000).

Tabla 4. Compuestos químicos reportados en hojas de *Melissa officinalis*.

Clasificación	Compuesto químico reportado
Monoterpeno oxigenado	Decadienal Carvacrol Metil-citronelato
Triterpeno	23-Monosulfato-estero $2\alpha,23$ -dihidroxiuros-12-eno-28-ácido oico,3-O- β -D-glucopiranosido 3,23-Disulfato-estero $2\alpha,3\beta$ -23,29-tetrahidrozolina-12-eno-28-ácido oico,28- O- β -D-glucopiranosido
Ácido fenólico	Ácido clorogénico Ácido gálico Ácido m-cumárico
Glucósido de flavona	Luteolin3'-O- β -D-glucuronido Luteolin7-O-glucósido Apigenin7-O-glucósido Isoquercitrina Luteolin7-O- β -D-glucopiranosido-3'-O- β -D-glucuronopiranosido Luteolin7-O- β -D-glucuronopiranosido Apigenin7-O- β -D-glucopiranosido Luteolin3'-O- β -D-glucuronopiranosido Hesperidina Eriodictiol-7-O-glucosido Naringina
Flavonol	Rhamnocitrina
Flavona	Apigenina Luteolina
Flavonona	Hesperidina Naringenina

Fuente: Citado por Shakeri et al., (2016)

2.2.5 Factores que afectan la composición química

La composición química del aceite esencial es afectada por diversos factores tales como la intensidad de la luz, la presencia de nutrimentos, la temperatura ambiente, edad de la planta y la época de cosecha, entre otros. Se ha observado que el contenido de aceite esencial y de taninos en *Melissa officinalis* aumenta conforme se incrementa la intensidad de la luz (Turhan et al., 2006).

Ozturk et al., (2004) reportaron que la producción de aceite esencial en *Melissa officinalis* es afectada positivamente por el déficit de agua; sin embargo, este es afectado negativamente con el incremento en la concentración de sales. Otro factor que afecta la producción de aceite esencial es el fertilizante (fuente de nitrógeno) empleado. Hossein et al., (2009) citado por Moradkhani et al.(2010) reportó que el nitrógeno del fertilizante tiene una influencia significativa sobre el porcentaje de aceite, la altura de la planta y el número de tallos.

2.2.6 Aplicaciones de *Melissa officinalis*

Aplicación farmacéutica

Extractos acuosos y el aceite esencial de bálsamo de limón han sido empleado con diferentes propósitos médicos como tónico, antiespasmódico, carminativo, apósito quirúrgico para heridas, fortalecedor de la memoria, liberador de estrés, reductor del dolor de cabeza, entre otras. Otra propiedad que ha sido aprovechada es como antiviral ya que se ha utilizado en la curación de herpes labial (Blumenthal et al., 2000).

El aceite esencial de esta planta se ha utilizado en aromaterapia para curar la depresión ligera. A pesar de las propiedades mostradas en diversos estudios, aún no ha sido reportado ningún estudio farmacológico que muestre su efecto como antidepressivo. En la tabla 5 se presentan algunos estudios realizados con *Melissa officinalis* en donde se reportan propiedades que podrían ser de interés para el humano.

Tabla 5. Algunas propiedades medicinales de *Melissa officinalis*.

Referencia	Extracto	Estudio realizado
Turhan (2006)	Aceites volátiles	Antiviral
Bolkent et al., (2005)	Acuoso	Reducción de colesterol y lípidos en hígado Antiviral
De Sousa et al., (2004)	Aceite esencial	Actividad antitumoral y antioxidante
Janina (2003)	Aceite esencial	Antitumoral
Wreker et al., (1993)	Aceite esencial (cariofileno como agente activo)	Sedativo
Moradkhani et al., (2010)	Extracto agua-etanol	Sedativo Analgésico
Valnet (1990)	Extracto acuoso	Antiestrés Migraña Indigestión Problemas neurálgicos Insomnio

Aplicación en alimentos

De acuerdo a diversos autores, el aceite esencial y extractos de las plantas *M. officinalis* subsp. *officinalis* y de *M. officinalis* subsp. *inodora* pueden ser empleados como antioxidantes y antimicrobianos en alimentos; esto debido a su capacidad para atrapar radicales libres y para inhibir el crecimiento microbiano, respectivamente (Marongiu et al., 2004; Mimica et al., 2003; Meftahizade et al., 2010).

Respecto a la actividad antioxidante, los principales compuestos atrapadores de radicales libres son aldehídos monoterpénicos y cetonas (neral/geranial, citronelal, isomentona, y mentona) y mono- y sesquiterpenos hidrocarbonados (E-cariofileno). En relación a sus propiedades antimicrobianas, en el estudio realizado por Marongiu et al., (2004) se analizó la capacidad que tiene el aceite esencial de *Melissa officinalis* para inhibir el crecimiento de trece bacterias y seis mohos. La actividad antibacteriana y antifúngica fue encontrada sobre la cepa *Shigella sonnei* y sobre algunas especies de Trichophyton.

Finalmente, extractos de *Melissa officinalis* pueden tener un efecto sobre la vida útil así como, en el olor de productos de confitería (Meftahizade et al., 2010).

2.3 Métodos de extracción de aceites esenciales

2.3.1 Extracción por disolventes

En la extracción por disolventes, la muestra seca y molida se pone en contacto con disolventes orgánicos. Estos disolventes solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas y ceras, obteniendo al final un extracto heterogéneo. Se utiliza a nivel laboratorio, a nivel industrial resulta costoso por el valor de los disolventes. En este tipo de procedimientos se obtienen masas viscosas, según la materia prima, que contiene el aceite esencial. El aceite esencial es recuperado haciendo uso de un rotaevaporador, concentrando así la materia de interés (Peredo et al., 2009).

2.3.2 Hidrodestilación

La hidrodestilación se ha utilizado desde la antigüedad para la extracción de aceites esenciales. Generalmente, el material vegetal crudo se coloca en un aparato de destilación sobre agua caliente y el aceite esencial se lleva a cabo con el flujo a medida que pasa el vapor a través del material vegetal, rompiendo las estructuras foliares. La mezcla condensada de agua y aceite esencial se recoge en el recipiente receptor y la parte superior del aceite. Después de la extracción, el aceite esencial a menudo se redestila, para obtener un producto más puro (Orio et al., 2012).

Es un proceso que consume mucho tiempo y generalmente proporciona bajos rendimientos. A pesar de las limitaciones intrínsecas de esta técnica, sigue siendo el método más común tanto en el laboratorio como a escala industrial. Los principales inconvenientes son el largo tiempo de extracción involucrado y el riesgo de degradación térmica (Orio et al., 2012).

2.3.3 Percolación

La percolación es una extracción sólido-líquido. La palabra percolación se refiere a la forma de operación, es decir, el vertido de un líquido sobre un sólido. (Costa et. al.,2004). La percolación consiste en hacer pasar el solvente a través de la planta seca, hasta su extracción exhaustiva completa, esto con solvente siempre renovado. A pequeña escala la percolación se realiza en aparatos denominados percoladores de cuerpo cilíndrico o cónico, provistos de un grifo en la parte inferior, para regular el flujo del solvente. El número de extracciones, así como el tiempo de extracción, deben determinarse experimentalmente (Sharapin, 2000).

2.4 Métodos de prueba de sensibilidad antimicrobiana.

Las pruebas de sensibilidad antimicrobiana (AST) son técnicas esenciales en la investigación y los resultados pueden variar dependiendo de una gran cantidad de factores involucrados en el desarrollo de las mismas. Los métodos de prueba de sensibilidad antimicrobiana pueden clasificarse ampliamente en métodos de difusión y dilución. Los primeros incluyen difusión del disco en agar, difusión del pozo en agar, mientras que las técnicas de dilución en agar, microdilución en caldo y macrodilución en caldo se clasifican según los métodos de dilución (Bakht, Humaira, Ahmad & Haq, 2015).

2.4.1 Método de difusión

Los métodos más antiguos para detectar los efectos antibacterianos de los extractos implicaron el uso de zanjas cortadas en placas de agar que estaban impregnadas con bacterias. La solución de prueba se vertía en la zanja y se dejaba difundir e inhibir el crecimiento bacteriano. Como fuente alternativa de difusión, algunos investigadores utilizaron tiras de papel impregnadas con antibióticos. Los principios de difusión en agar se ampliaron para desarrollar la prueba de difusión en disco. Los pozos de agar que portaban la solución antibiótica pronto fueron reemplazados por discos de papel impregnados con antibióticos. Debido a su simplicidad y facilidad de rendimiento, los ensayos de difusión fueron ampliamente adoptados por muchos investigadores, pero la falta de estandarización resultó en resultados no

confiables y no reproducibles. El primer artículo que describe una técnica estandarizada llamada "Paper Disc Method" (PDM) para pruebas de sensibilidad de bacterias fue publicado por Ericsson en 1954. Actualmente se utilizan diferentes tipos de pruebas de difusión y son una parte vital de las metodologías AST actuales (Bakht, Humaira, Ahmad & Haq, 2015).

El método de difusión es cualitativo, se caracteriza por ser de fácil estandarización y está indicado para microorganismos no exigentes y crecimiento rápido. Este método está apoyado por datos clínicos y de laboratorio y además presenta la ventaja de ser reproducible; el método se desarrolla en base a los fundamentos descritos por (Bauer, Kirby, Sherris & Turck, 1966) en el método de Kirby-Bauer. Esta técnica se puede realizar ya sea en pozo o disco ya que actualmente ambos se encuentran estandarizados y son recomendados por el subcomité de ensayos de susceptibilidad del NCCLS por sus siglas en inglés, de los Estados Unidos de América (Ramirez & Marin, 2009 citado por Sánchez García, Castillo Hernández, & García Palencia, 2016)

2.4.1.1 Ensayo de difusión del disco en Agar.

Esta técnica se refiere a la difusión de un agente antimicrobiano de una concentración especificada desde discos, tabletas o tiras, al medio de cultivo sólido que se ha sembrado con el inóculo seleccionado aislado en un cultivo puro. El principio de la prueba de difusión de disco se desarrolló en 1940 y se ha utilizado en laboratorios de microbiología durante más de 70 años. Bauer, Kirby, Sherris y Turck probaron diligentemente diferentes variables utilizadas en la prueba, como los medios, la temperatura y la profundidad del agar. El artículo fue publicado en 1966, describiendo la prueba que se usa actualmente. El método de susceptibilidad a la difusión del disco de agar (comúnmente conocido como prueba de Kirby-Bauer) es simple, práctico y ha sido bien estandarizado (Bakht, Humaira, Madiha & Haq, 2015).

2.4.2 Métodos de dilución

Los métodos de dilución se usan con mayor frecuencia para determinar la CIM de los agentes antimicrobianos, incluidos los antibióticos y otras sustancias que matan (actividad bactericida) o inhiben el crecimiento (actividad bacteriostática) de los microorganismos. Los diferentes tipos de pruebas de dilución son microdilución en caldo, macrodilución en caldo y métodos de dilución en agar. Este método ofrece ciertas ventajas sobre las técnicas de difusión que incluyen; sensibilidad mejorada para volúmenes de extracto más pequeños, análisis cuantitativo y capacidad para diferenciar los efectos bacteriostáticos y bactericidas de la muestra de prueba. Es una prueba económica que puede usarse para varios microorganismos y proporciona resultados bastante reproducibles. Los métodos de dilución se consideran métodos de referencia para las pruebas de susceptibilidad in vitro y también se utilizan para evaluar el rendimiento de otras técnicas de AST (Bakht, Humaira, Madiha & Haq, 2015).

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Identificar los compuestos químicos presentes en extractos orgánicos de *Melissa officinalis* a través de cromatografía de gases masas (GC-MS) a fin de evaluar sus propiedades antimicrobianas.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar la extracción y separación de compuestos químicos presentes en *Melissa officinalis* mediante percolación y cromatografía en columna.
- Identificar los compuestos químicos presentes en los diferentes extractos orgánicos de *Melissa officinalis* mediante el uso de cromatografía de gases masas (GC-MS).
- Analizar la presencia de solventes orgánicos residuales en los extractos de *Melissa officinalis* mediante el uso de RMN de ^1H .
- Evaluar la actividad antimicrobiana de los diferentes extractos orgánicos de *Melissa officinalis* contra *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria spp.*, a través de la determinación de la prueba de difusión en disco.

4. Metodología

4.1 Muestra

Melissa Officinalis se obtuvo en el mercado 1° de mayo ubicado en el municipio de Pachuca de Soto, Hidalgo. De la planta fueron separados las flores, tallo y hojas; utilizándose estas últimas, ya que en un estudio preliminar fueron las que presentaron mayor actividad antioxidante (Hernández, 2017). Las hojas de *Melissa Officinalis* fueron secadas durante 3 días a temperatura ambiente y posteriormente se sometieron a molienda mecánica en un molino (Marca KRUP) a fin de incrementar la superficie de contacto para la extracción de compuestos químicos, en la figura 9 se muestran las hojas secas y trituradas.



Figura 9. Hojas de *Melissa Officinalis* seca y triturada.

4.2 Identificación de los compuestos químicos en *Melissa officinalis*

Para la identificación de los compuestos químicos presentes en las hojas de *Melissa officinalis* se trabajó con cuatro extractos orgánicos, los cuales fueron obtenidos mediante el uso de solventes de distinta polaridad (éter de petróleo, éter etílico, acetato de etilo y metanol), la metodología se describe a continuación.

4.2.1 Obtención de los extractos orgánicos

Para la obtención de los diferentes extractos orgánicos, una columna de vidrio fue empaquetada con las hojas de *Melissa Officinalis* secas y trituradas. A continuación se hizo pasar éter de petróleo, éter etílico, acetato de etilo y metanol, a fin de agilizar el paso de cada solvente se empleó una bomba ELITE 802. En la figura 10 se

muestra el sistema optimizado, el cual permitió agilizar el paso de cada solvente en la columna. Primero se pasó por la columna éter de petróleo, el cual se hizo recircular 3 veces por la columna y se agregaba más solvente puro, hasta la degradación del color de la muestra, es decir, al principio se obtenía una coloración verde intenso y el solvente se dejaba de pasar hasta obtener un color verde amarillento, tal y como se muestra en la figura 11. Esto se realizó con cada solvente orgánico.

Estos extractos se concentraron en el rotaevaporador, con la finalidad de recuperar el solvente utilizado y tener solo los compuestos de interés.



Figura 10. Obtención de los extractos, usando la bomba ELITE 802.



Figura 11. Degradación de la coloración en los extractos

4.2.2 Identificación de los compuestos extraídos por GC-MS

Los extractos orgánicos obtenidos a partir del uso de los solventes: hexano, éter etílico, acetato de etilo y metanol, fueron analizados mediante cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS). Para ello se empleó El análisis de GC-MS se realizó utilizando un equipo Agilent 6890 N equipado con un autoinyector de la serie Agilent 7683B, acoplado a un detector selectivo de masa Inerte Agilent 5975. La ionización fue por interface de electrospray en modo positivo (EI+). La columna capilar fue de sílice fundida (30 m X 0.25 mm id, espesor de película 0,25 μm) (J.W. Scientific).

Las condiciones de funcionamiento fueron los siguientes: temperatura inicial del horno, 50°C durante 5 min, luego se incrementó 4°C/min hasta llegar a 150°C y se

mantuvo durante 5 min, luego se incrementó 4°C/min hasta llegar a 250°C y se mantuvo durante 10 min. Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 275°C. Se utilizó N₂ como gas acarreador con un flujo de 1mL/min. El volumen de inyección fue de 0.2 µL.

Los constituyentes se identificaron por comparación del espectro de masas con los de los compuestos de referencia en la biblioteca NIST 05.

4.3 Análisis de solvente residual mediante RMN de ¹H a 400 MHz.

Todos los experimentos se realizaron utilizando las técnicas convencionales (método que implica el uso de matraces y aparatos de filtración, unidos a conexiones esmeriladas, y llaves para eliminar el aire). Los procedimientos de evaporación del disolvente, filtrado y secado se realizaron bajo vacío. Los disolventes se secaron por métodos estándar (el éter etílico (**CH₃COCH₂CH₃**) y éter de petróleo (mezcla de hidrocarburos de C-5 y C-6) con sodio (Na), el metanol (**CH₃OH**) y el acetato de etilo (**CH₃CH₂OCH₂CH₃**) con sulfato de sodio), se destilaron antes de su uso. Los espectros de RMN de ¹H se obtuvieron en los equipos Varian de 400 MHz y Bruker de 400 a temperatura ambiente utilizando como disolvente cloroformo deuterado marca Aldrich. Los desplazamientos químicos en los espectros de ¹H están referenciados con respecto a la señal residual del disolvente.

4.3.1 Actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos

A fin de determinar la actividad antimicrobiana en los diferentes extractos orgánicos, estos se prepararon según se indica en el apartado 4.2.1. Los extractos obtenidos se concentraron en un rotaevaporador, con la finalidad de eliminar todo el solvente y evitar falsos positivos en las pruebas de actividad antimicrobiana. Con la finalidad de confirmar la ausencia de solvente en los extractos orgánicos, estos fueron sometidos a un análisis en resonancia magnética nuclear (RMN), apartado 4.3, una vez confirmado esto, se llevaron a cabo las pruebas de actividad antimicrobiana cuya metodología se describe a continuación.

4.3.2 Preparación de extractos orgánicos

Los extractos orgánicos obtenidos en éter petróleo, éter etílico, acetato de etilo y metanol (previa eliminación del solvente) fueron resuspendidos en dimetilsulfoxido (DMSO). Para esto, se agregó 2 mL de DMSO a cada extracto para su disolución. Obteniendo una concentración final de éter petróleo 88.25 mg/mL, acetato de etilo 118 mg/mL, éter etílico 67.9 mg/mL y metanol 437.95 mg/mL

4.3.3 Activación de cepas microbianas.

Para la activación de las cepas microbianas se utilizó el medio de cultivo Caldo Soya Trypticaseína (CST) de la marca Bioxon. Para ello, en tubos de ensaye de 12x75 mm se colocaron 3 mL de CST previamente esterilizados (121°C, 2 psi, 15 minutos). A continuación, se transfirió una asada a cada tubo de la cepa a analizar, esto se realizó por triplicado y se dejó incubar 24 horas a 37°C para su activación. Las cepas utilizadas fueron *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*. Una vez activadas las cepas, se realizaron diluciones hasta 10⁻³. Para ello a tubos de 9 mL con agua peptonada previamente esterilizada se le adiciono 1 mL de la cepa activa, la cual se encontraba en el CST.

4.3.4 Prueba de sensibilidad antimicrobiana

Se utilizó el medio de cultivo agar métodos estándar (AME) de la marca BD Bioxon el cual se preparó de acuerdo a las instrucciones de uso, posteriormente se esterilizó en autoclave a 121°C, 2 psi y 15 minutos. Enseguida, se agregaron 25 mL del medio a cajas Petri, el cual se dejó gelificar para su utilización.

Mediante la técnica de extensión en superficie en las cajas Petri, con el medio de cultivo AME, se transfirió 100 µL de la dilución 10^{-3} de cada microorganismo activado (*Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*). Esto se realizó por duplicado.

Después de inocular cada microorganismo, se colocaron cuatro discos de papel filtro de 6 mm de diámetro previamente esterilizados (control negativo, control positivo y muestras). Los discos fueron impregnados con 25 µL de cada extracto orgánico. Las cajas se incubaron 24 horas a 37°C boca arriba, concluido este tiempo las cajas se sacaron de la incubadora y se midieron los halos de inhibición.

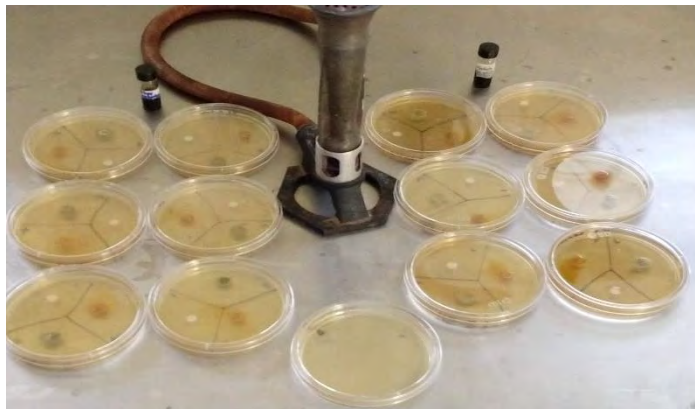


Imagen 12. Cajas Petri con los discos de papel filtro de 6 mm.

5. Resultados

5.1 Identificación de los compuestos presentes en los extractos orgánicos de *Melissa officinalis*.

Extracto éter de petróleo

En la Figura 13 se muestra el cromatograma obtenido por cromatografía de gases acoplada a masas (CG-MS) del extracto de éter de petróleo de *Melissa officinalis*, el cual permitió la identificación de 12 compuestos químicos (Tabla 6). Entre los más abundantes se encuentran el 3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol (Fitol), el tetratetracontano y el 2,6,10,15-tetrametilheptadecano, con abundancias de 34.05, 14.87 y 9.76%, respectivamente. El porcentaje de abundancia de cada compuesto se obtuvo de la relación del área individual de cada pico entre el área total de todos los picos esto multiplicado por 100. Esto se realizó en cada uno de los extractos.

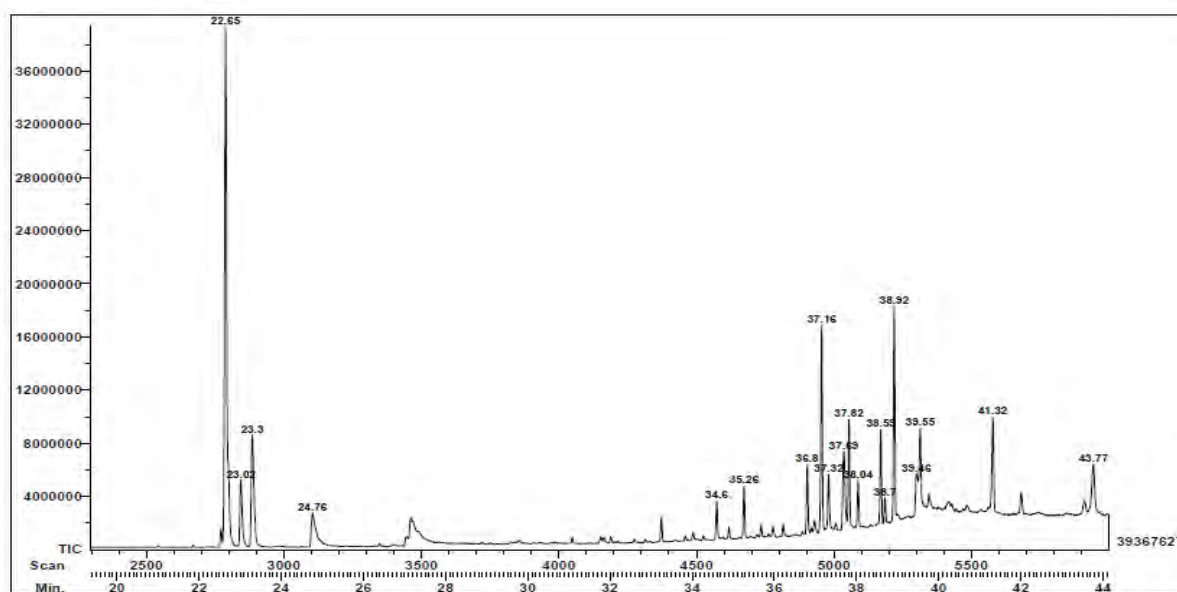
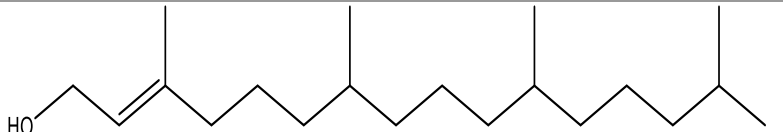
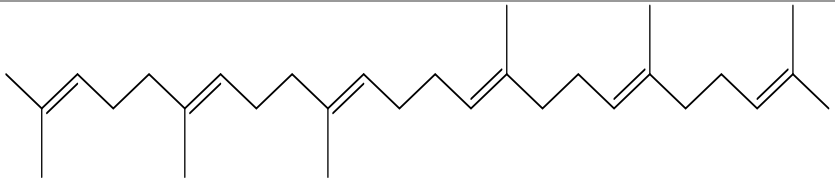
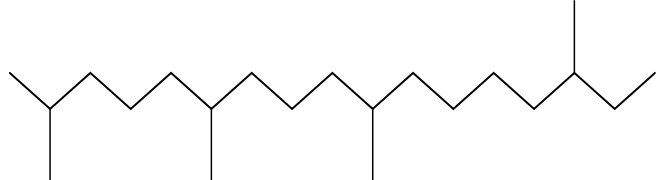
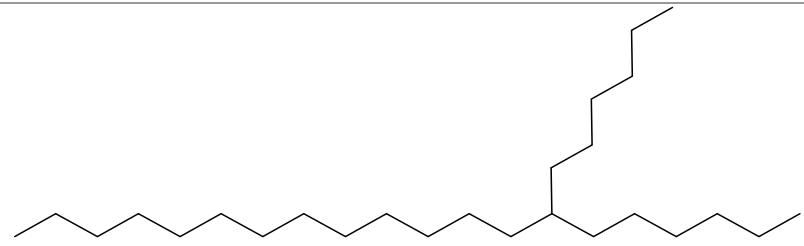
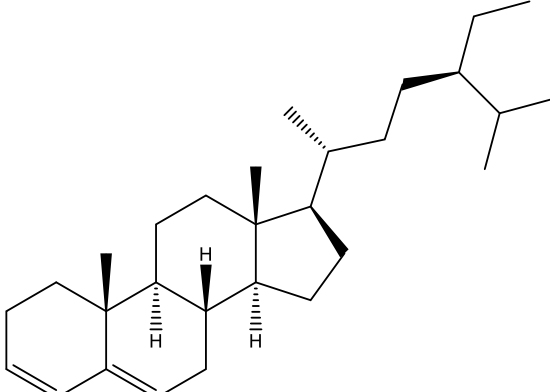
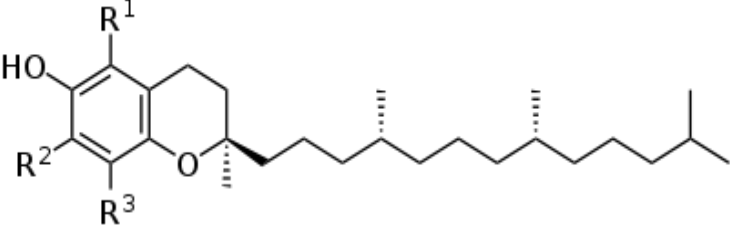
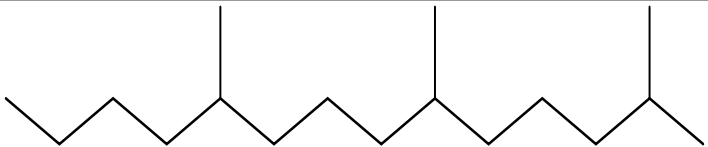
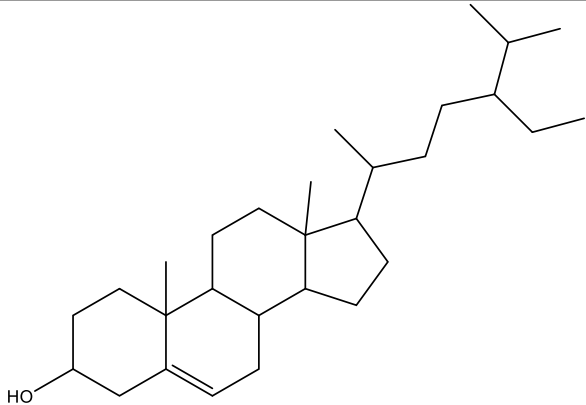
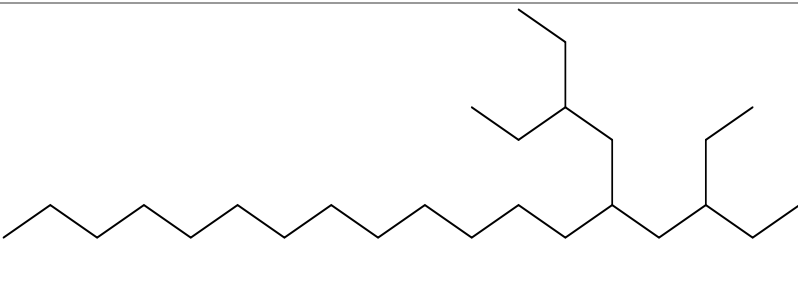
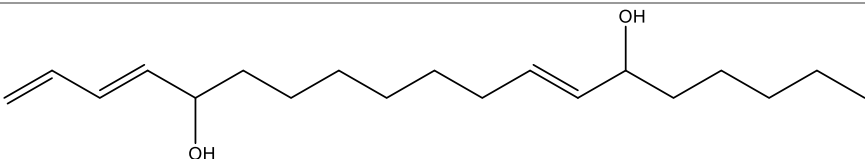


Figura 13. Cromatograma del extracto de éter de petróleo de *Melissa officinalis*.

Tabla 6. Compuestos químicos identificados en el extracto de éter de petróleo en *Melissa officinalis*.

Extracto de éter de petróleo			
Número	Identificación	% Abundancia	Estructura química
1	3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol (Fitol)	34.05	
2	Ácido n-hexadecanoico	3.00	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
3	2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno,2,6,10,15,19,23-(E) hexametil	1.93	
4	2,6,10,15-tetrametilheptadecano	9.76	
5	7-hexil- eicosano	6.89	

6	Tetratetracontano	14.87	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{42}\text{CH}_3$
7	Estigmastan-3,5-dieno	3.67	
8	Vitamina E	4.95	
9	2,6,10-trimetil-tetradecano	3.67	

10	ç-Sitosterol	4.23	
11	3-etil-5-(2-etilbutil)- octadecano	6.30	
12	E,E,Z-1,3,12-Nonadecatrieno-5,14-diol	6.69	

Éter etílico

El cromatograma obtenido, mediante CG-MS, del extracto éter etílico se presenta en la figura 14. En dicho extracto se logró la identificación de 9 compuestos químicos (Tabla 7), entre los más abundantes se encontraron el fitol, butilhidroxitolueno (también conocido como BHT) y estragol, con un porcentaje de abundancia de 29.44, 16.80 y 14.12%, respectivamente. Respecto al BHT, este es un antioxidante sintético que pudo haberse adicionado durante el tratamiento de la muestra previo a su análisis en CG-MS.

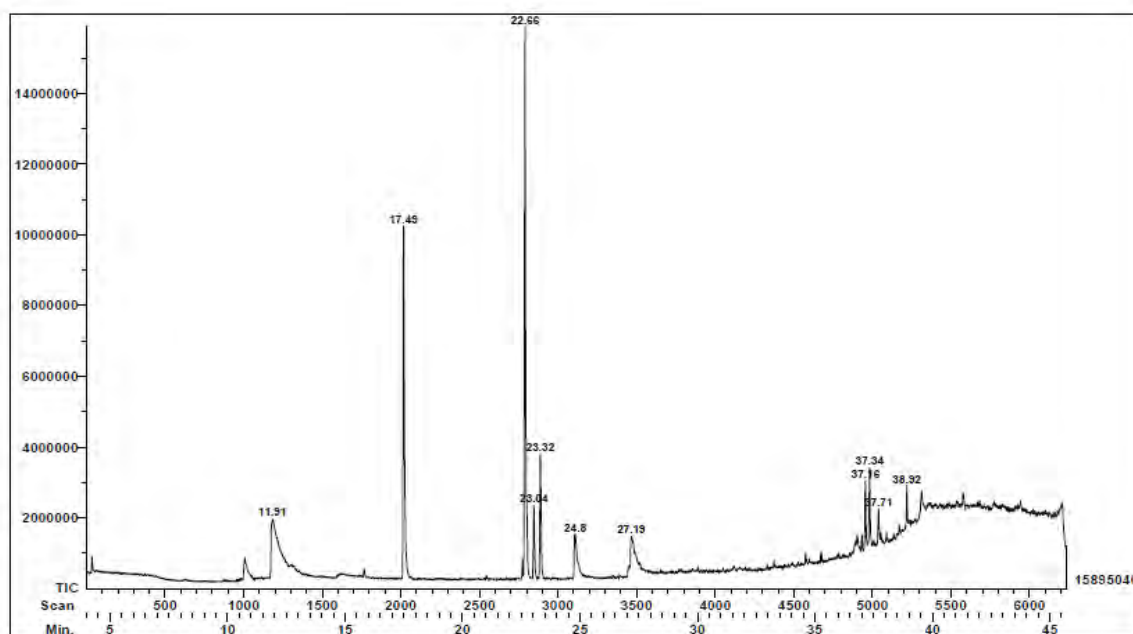
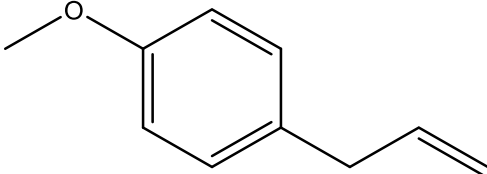
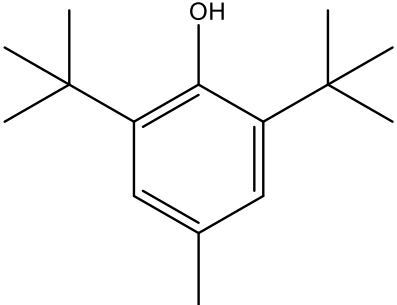
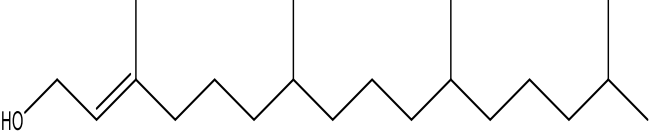

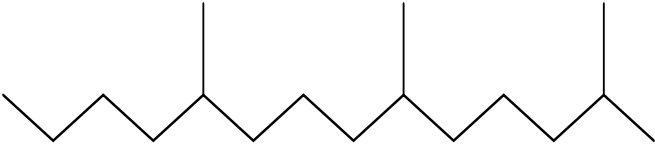
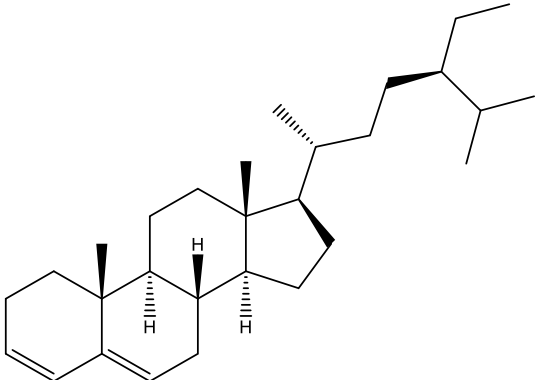
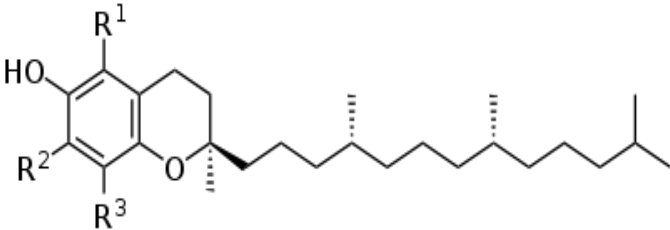


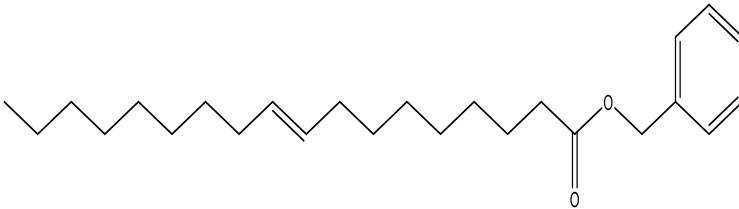
Figura 14. Cromatograma del extracto éter etílico de *Melissa officinalis*

Tabla 7. Compuestos químicos identificados en el extracto de éter etílico en *Melissa officinalis*.

Extracto de éter etílico			
Número	Identificación	% Abundancia	Estructura química
1	Estragol	14.12	
2	Butilhidroxitolueno (BHT)	16.80	
3	3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol (Fitol)	29.44	
4	Ácido n-hexadecanoico	4.69	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$

Continuación

5	cis,cis,cis-7,10,13-Hexadecatrienal	8.80	
6	2,6,10-trimetiltetradecano	5.91	
7	Estigmastan-3-5-dieno	7.81	
8	Vitamina E	5.64	

9	Oleato de bencilo	6.79	 <p>The image shows the chemical structure of benzyl oleate, an ester. It consists of a long hydrocarbon chain with a double bond (oleic acid derivative) esterified to a benzyl group (a methylene group attached to a benzene ring). The structure is drawn in a skeletal format.</p>
----------	-------------------	------	--

Extracto de acetato de etilo.

En la figura 15 se muestra el cromatograma del extracto acetato de etilo de *Melissa officinalis*, el cual fue obtenido mediante cromatografía de gases acoplada a masas (CG-MS). Este análisis permitió la identificación de 7 compuestos químicos (tabla 8), entre los más abundantes se encontraron: ácido 1,2-Benzenodicarboxílico-mono (2-etilhexilo) éster, (Z)-Ácido 9-Octadecenoico-fenilmetilo éster y el fitol, con un 39.48, 27.54 y 11.45% de abundancia, respectivamente.

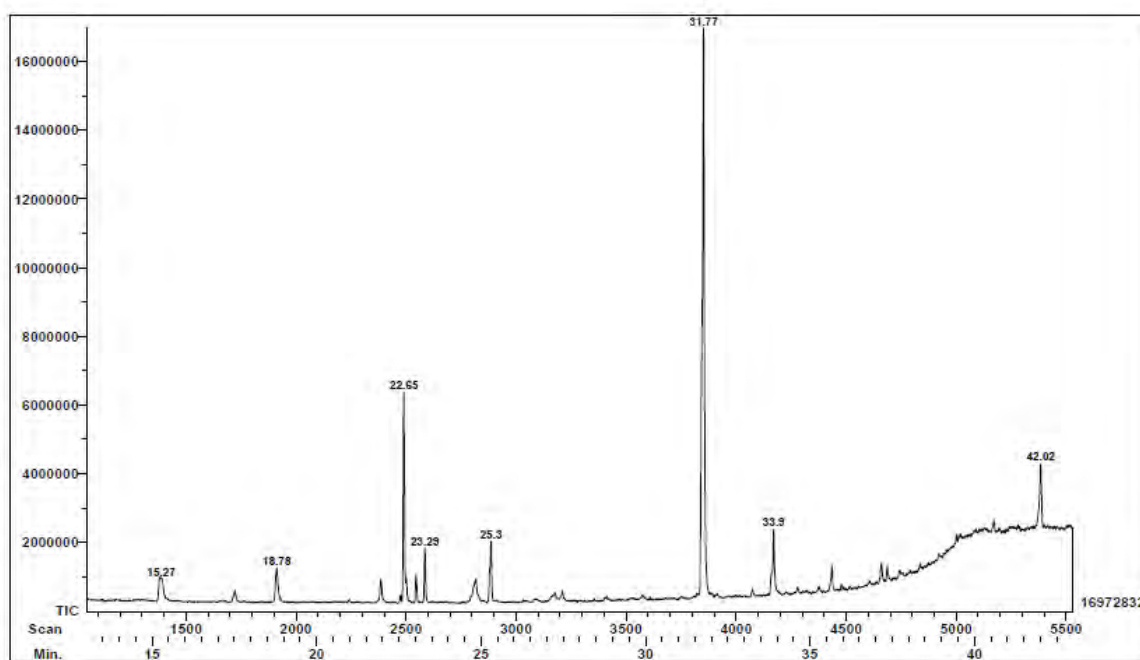
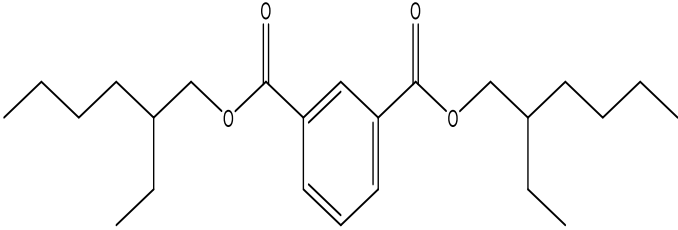
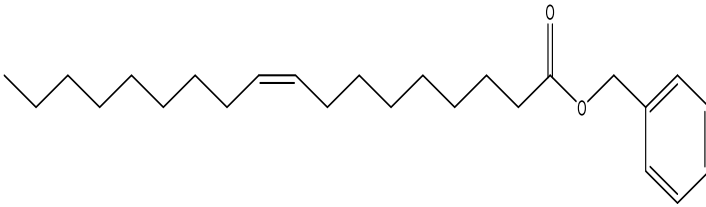


Figura 15. Cromatograma del extracto acetato de etilo de *Melissa officinalis*.

Tabla 8. Compuestos identificados en el extracto de acetato de etilo en *Melissa officinalis*.

Extracto de acetato de etilo			
Número	Identificación	% Abundancia	Estructura
1	Ácido acético trifluoro-3,7-dimetiloctil éster.	5.28	
2	(Z)- 3-Tetradeceno	4.21	
3	3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol (Fitol)	11.45	
4	Palmitato de Isopropil	4.81	$\text{CH}_3 (\text{CH}_2)_{14} \text{COOCH} (\text{CH}_3)_2$
5	Mono(2-etilhexilo) éster-ácido 1,2-bencenodicarboxílico	39.48	

6	Bis(2-etilhexilo) éster- ácido 1,3-Bencenodicarboxílico	7.23	
7	Fenilmetilo éster(Z)-ácido 9-Octadecenoico,	27.54	

Extracto metanólico

El cromatograma del extracto metanólico de *Melissa officinalis*, obtenido mediante CG-MS se presenta en la figura 16. Se logró la identificación de 15 compuestos químicos (Tabla 9), los de mayor porcentaje de abundancia fueron: 2,2-difenil-2H-1-Benzopirano, Ácido linoleico y el (Z,Z,Z)-9,12,15-Octadecatrien-1-ol, con 20.49%, 12.13% y 11.00%, respectivamente. Las estructuras químicas de los compuestos identificados se indican posteriormente.

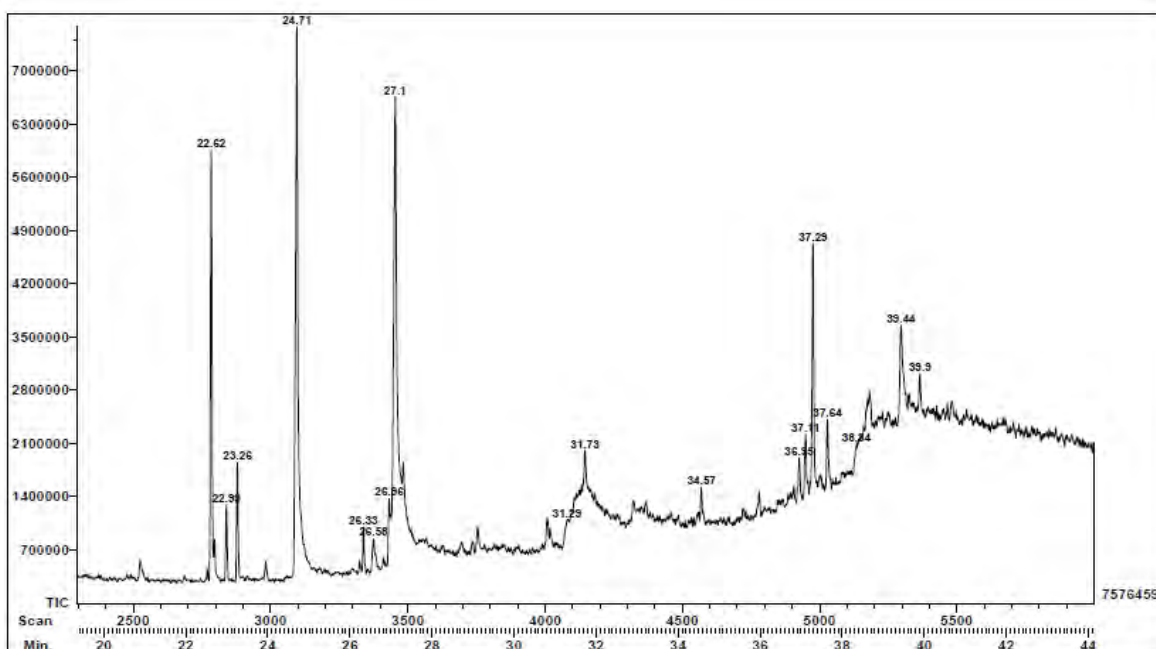
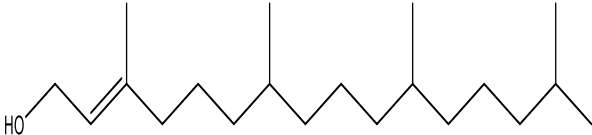
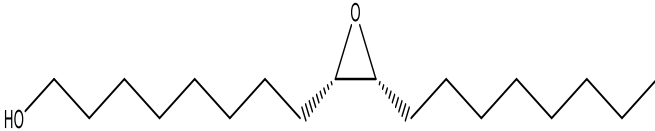
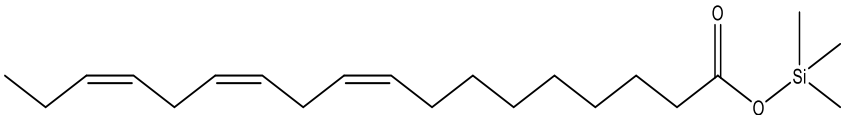
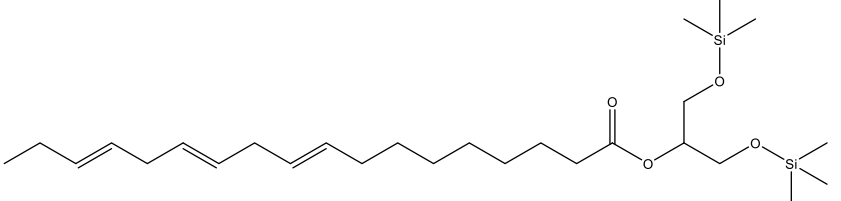
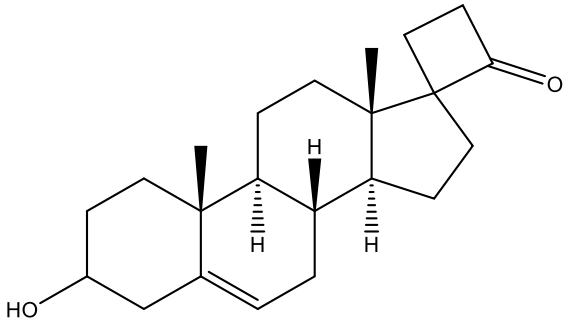
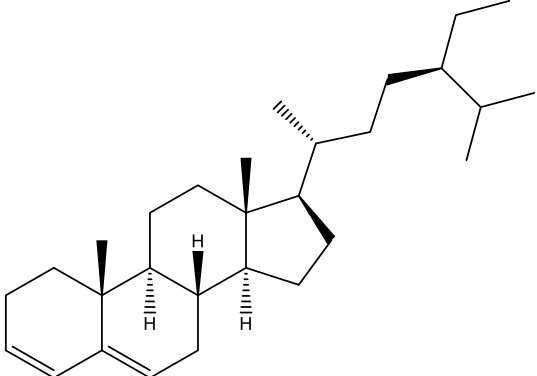
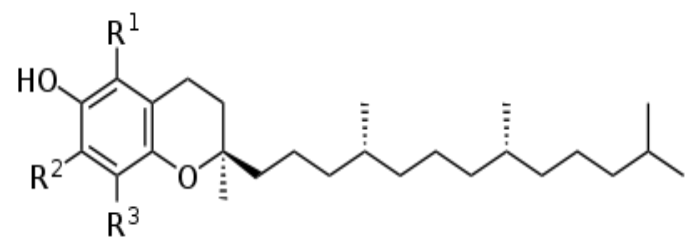
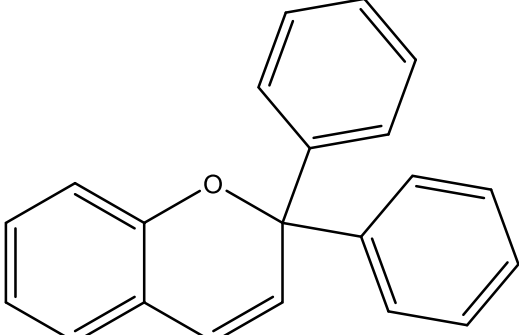
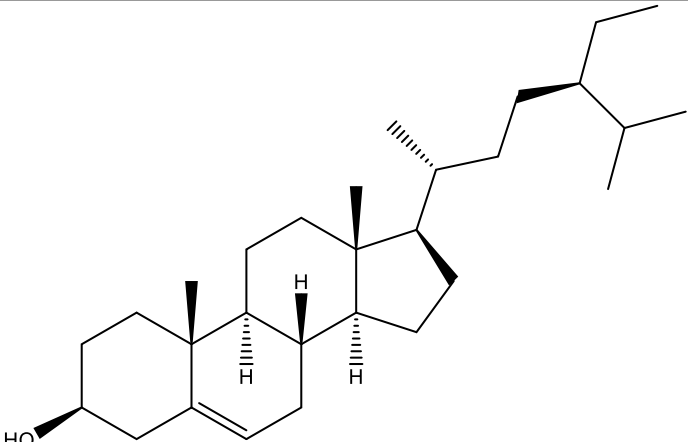
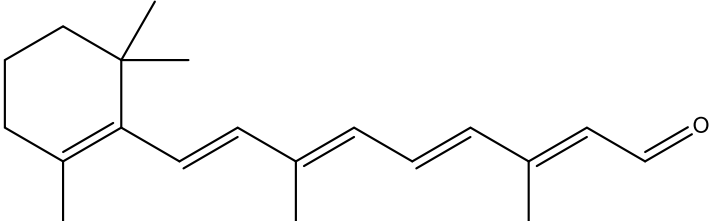


Figura 16. Cromatograma del extracto metanólico de *Melissa Officinalis*.

Tabla 9. Compuestos identificados en el extracto metanólico en *Melissa officinalis*.

Extracto metanólico			
Número	Identificación	% abundancia	Estructura química
1	3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol	7.03	
2	Ácido n-hexadecanoico	8.99	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
3	Éster metílico del ácido 11,14,17-eicosatrienoico	0.95	$\text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{O}_2$
4	cis-9,10-Epoxioctadecan-1-ol	1.17	
5	13-Tetradec-11-in-1-ol	1.51	$\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{O}$
6	(Z,Z,Z)-9,12,15-Octadecatrien-1-ol	11.00	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}$
7	Ácido linoleico, trimetilsililo éster	12.13	
8	2 - [(trimetilsilil) oxil] - 1 - [[trimetilsilil) oxil] metil] etil éster del ácido 9,12,15 -(Z, Z, Z) octadecatrienoico	6.02	
9	Farnesol isómero a	1.94	$\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$

10	Espiro[androst-5-eno-17,1'-ciclobutan]-2'-ona, 3-hidroxi-, (3a,17a)	6.13	
11	Estigmastan-3,5-dieno	5.52	
12	Vitamina E	4.16	

13	2,2-difenil, 2H-1-Benzopirano	20.49	 <p>The structure shows a benzopyran ring system with two phenyl groups attached to the 2-position of the pyran ring.</p>
14	Estigmasterol-22,23-dihidro,	8.02	 <p>The structure shows a steroid nucleus with a hydroxyl group at C-3, a double bond at C-5, and a side chain at C-17. The side chain is a 22,23-dihydro derivative of stigmasterol, featuring a methyl group at C-22 and an ethyl group at C-23.</p>
15	Retinal	4.91	 <p>The structure shows a cyclohexene ring with a methyl group at C-1 and a long polyene side chain at C-2. The side chain consists of four conjugated double bonds and a terminal aldehyde group.</p>

Es importante mencionar que algunos de los compuestos químicos que fueron identificados no corresponden a derivados de plantas, tal fue el caso del ácido acético trifluoro-3,7-dimetiloctil éster en el extracto de acetato de etilo. Así mismo, el ácido linoleico-trimetilsililo éster y el 2 - [(trimetilsilil) oxi] - 1 - [[trimetilsilil) oxi] metil] etil éster del ácido 9,12,15 -(Z, Z, Z) octadecatrienoico presentes en el extracto metanólico. La presencia de estos compuestos podrían atribuirse a una contaminación ya sea durante el proceso de extracción o bien el análisis en cromatografía de gases acoplada a masas GC-MS.

5.2 Identificación de compuestos antioxidantes

El análisis en CG-MS permitió la identificación de todos los compuestos presentes en los diferentes extractos de *Melissa officinalis* (Tablas 6-9). A través de dicho análisis fue posible identificar compuestos con actividad antioxidante, los cuales se presentan en la tabla 10. El fitol fue el compuesto común hallado en todos los extractos, desde el hexánico hasta el metanólico. La vitamina E estuvo presente en todos los extractos excepto el de acetato de etilo, aunque en menor proporción que el fitol (<5.64%). En el extracto más polar (metanólico) se encontró mayor presencia de antioxidantes que en los extractos menos polares.

Tabla 10. Compuestos antioxidantes presentes en *Melissa Officinalis* (% abundancia)

Compuesto	Extracto éter de petróleo	Extracto éter etílico	Extracto acetato etilo	Extracto metanólico
Fitol	34.05%	29.44%	11.45%	7.03%
Vitamina E	4.95%	5.64%	-	4.16%
ç-Sitosterol	4.23%	-	-	-
Butilhidroxitolueno (BHT)	-	16.80%	-	-
Ácido 1,2-Bencenodicarboxílico, mono(2-etilhexilo) éster	-	-	39.48%	-
cis-9,10-Epoxioctadecan-1-ol	-	-	-	1.17%
13-Tetradec-11-in-1-ol	-	-	-	1.51%
(Z,Z,Z)-9,12,15-Octadecatrien-1-ol,	-	-	-	11%
Farnesol isómero a	-	-	-	1.94%
Espiro[androst-5-eno-17,1'-ciclobutan]-2'-ona, 3-hydroxy-, (3a,17a)-	-	-	-	6.13%
22,23-dihidro Estigmasterol	-	-	-	8.02%
Farnesol isómero a	-	-	-	1.94%

5.3 Actividad antimicrobiana

5.3.1 Análisis de la presencia de solventes por RMN ¹H

De acuerdo con lo mencionado en el apartado de metodología, se obtuvieron los extractos orgánicos de *Melissa officinalis* mediante el uso de los solventes éter de petróleo, éter etílico, acetato de etilo y metanol. A fin de corroborar la ausencia de estos solventes en los extractos de la planta, se llevó a cabo un análisis en RMN. Los espectros obtenidos para cada extracto y los espectros simulados de los solventes utilizados se presentan en las figuras 18 al 20, ya que el espectro de éter de petróleo no fue simulado y se obtuvo a partir del compuesto puro (Fig.17) obtenidos por el programa ChemBioDraw.Ultra 13.0 PerkinElmer.

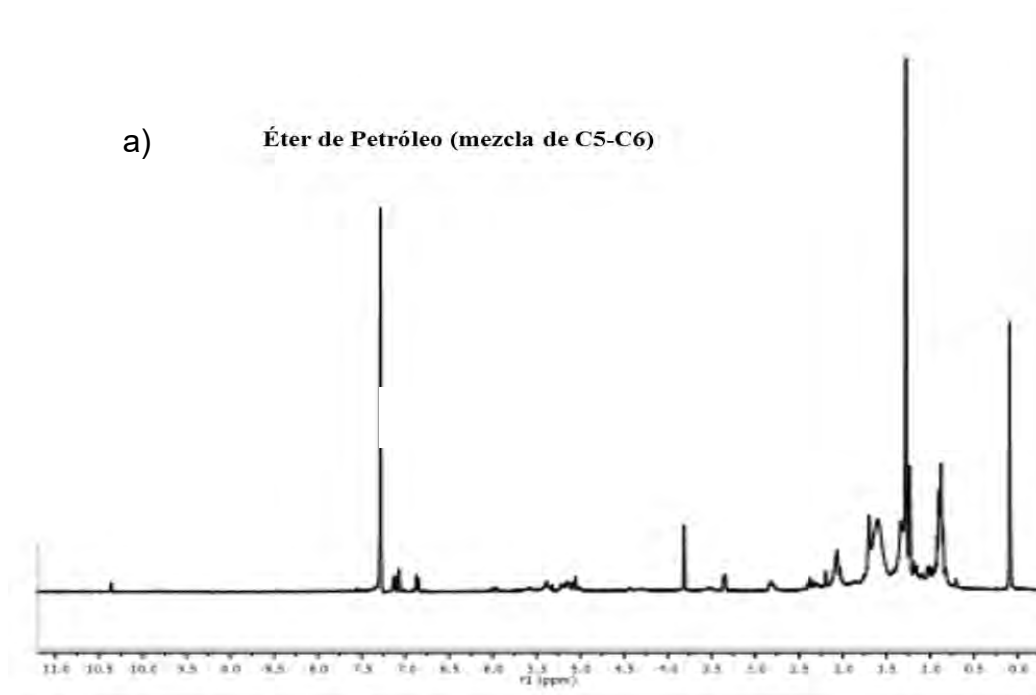
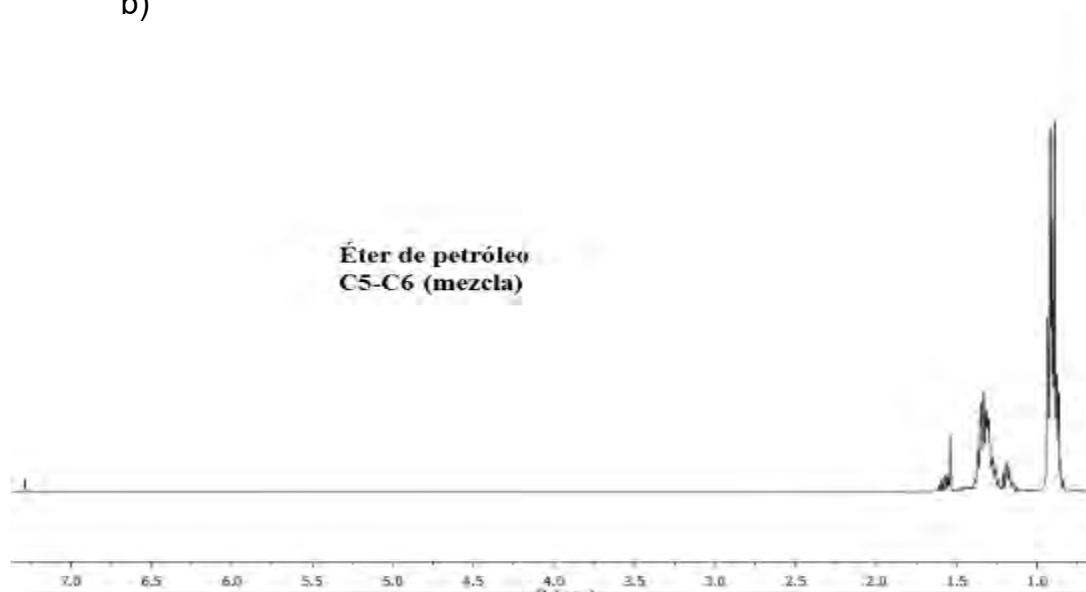


Figura 17. a) Espectro de RMN ^1H a 400 MHz del extracto éter de petróleo de Melissa officinalis en CDCl_3 . b)



b) Espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 de Éter de petróleo puro en CDCl_3 (Mezcla de hidrocarburos de átomos de **C5-C6**).

Para el caso del éter de petróleo, no se encontró una composición real ya que solo se menciona una mezcla de hidrocarburos de C5-C6, de cinco a seis átomos de carbono, por lo tanto, podríamos pensar en sistemas hexánicos y pentánicos así

como la presencia de diferentes isómeros que cumplan con esta cantidad de carbonos. Considerando un disolvente lo muy volátil.

Como se puede observar en el espectro del disolvente puro se muestran señales múltiples en la proximidad de entre 0-1 ppm, otros grupos de señales múltiples entre 1.0 – 1.5 ppm debido a los grupos metílicos $\text{CH}_3\text{-}[\text{CH}_2]\text{-}_n$

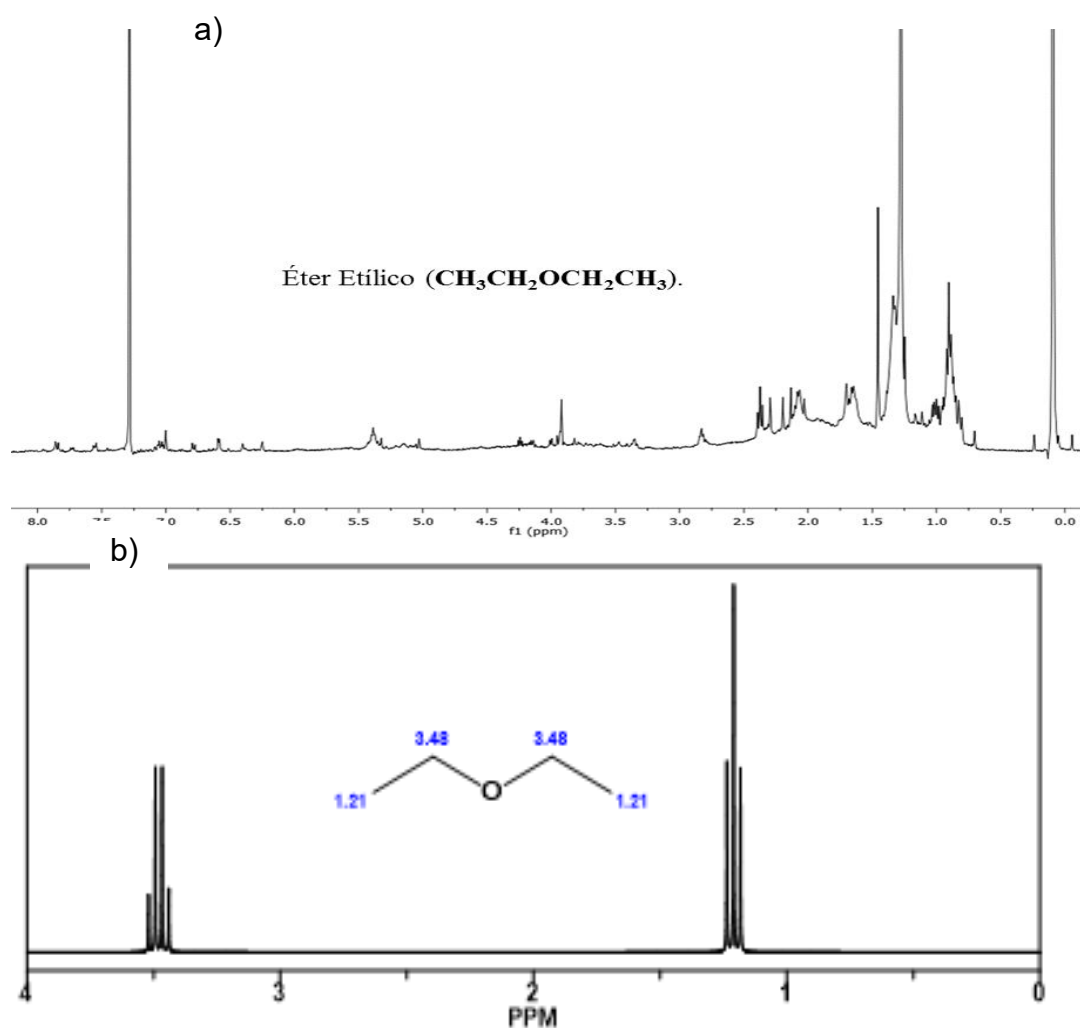


Figura 18. a) Espectro de RMN de ^1H a 400 Mhz en CDCl_3 del extracto éter etílico de *Melissa officinalis*. b) Espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 calculado del Éter Etílico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$).

En la figura 18 b se muestra el espectro simulado de éter etílico, como se puede observar en 1.21 ppm se observa una señal triple correspondiente al grupo CH₃- de la cadena alquílica, esta multiplicidad se debe al acoplamiento que presenta con el grupo metilénico (-CH₂-) de dicha cadena, así mismo en 3.38 ppm se muestra una señal cuádruple debido al acoplamiento que este tiene con el -CH₂-. Cabe mencionar que es un espectro de primer orden el cual se debe al plano de simetría que presenta la molécula.

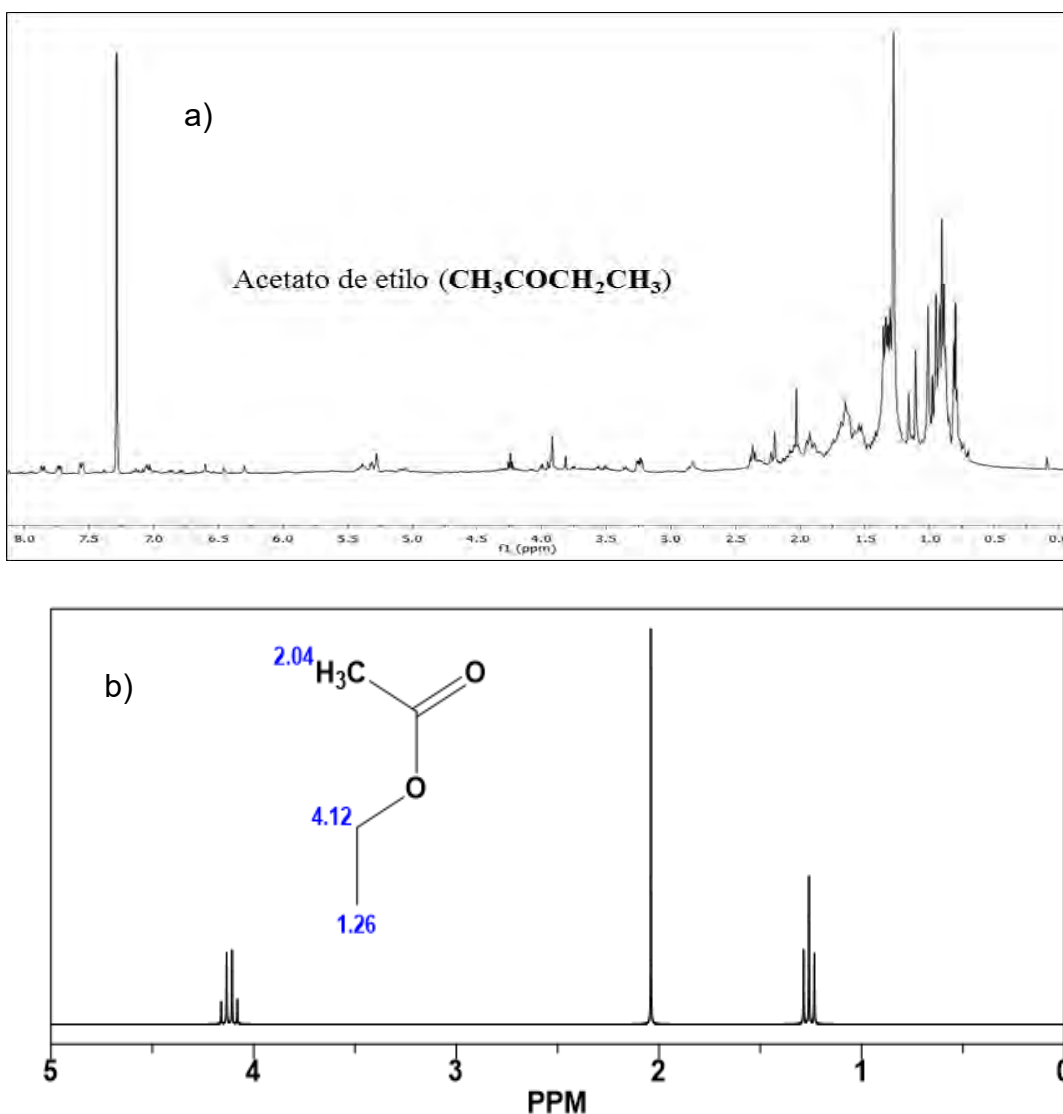


Figura 19. a) Espectro de RMN ¹H a 400MHz en CDCl₃ del extracto en acetato de etilo de *Melissa officinalis*. b) Espectro de RMN ¹H en CDCl₃ calculado para el acetato de etilo (CH₃COCH₂CH₃).

Así mismo en la figura 19 b. se muestra el espectro simulado de acetato de etilo, en él se observan tres señales: a campo bajo se observa una señal cuádruple en 4.12 ppm que se corresponde al grupo ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-CO}$) cercano al grupo carbonilo esta multiplicidad se debe al acoplamiento que presenta con el grupo metilo ($\text{CH}_3\text{-}$) vecino, así mismo en 2.04 ppm se muestra una señal simple que se corresponde al grupo $\text{CH}_3\text{CO-}$ vecino al grupo carbonilo, el que sea una señal simple es indicativo que no se acopla a ningún sistema alquílico. Por último en 1.26 ppm se presenta una señal triple que se corresponde al grupo ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-CO}$). Cabe mencionar que la molécula carece de simetría, considerado como un espectro de primer orden.

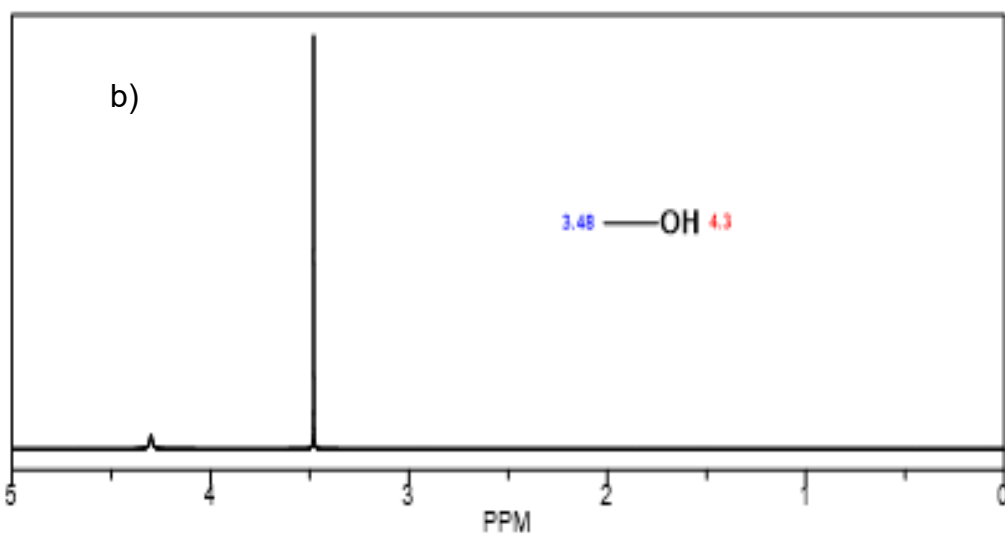
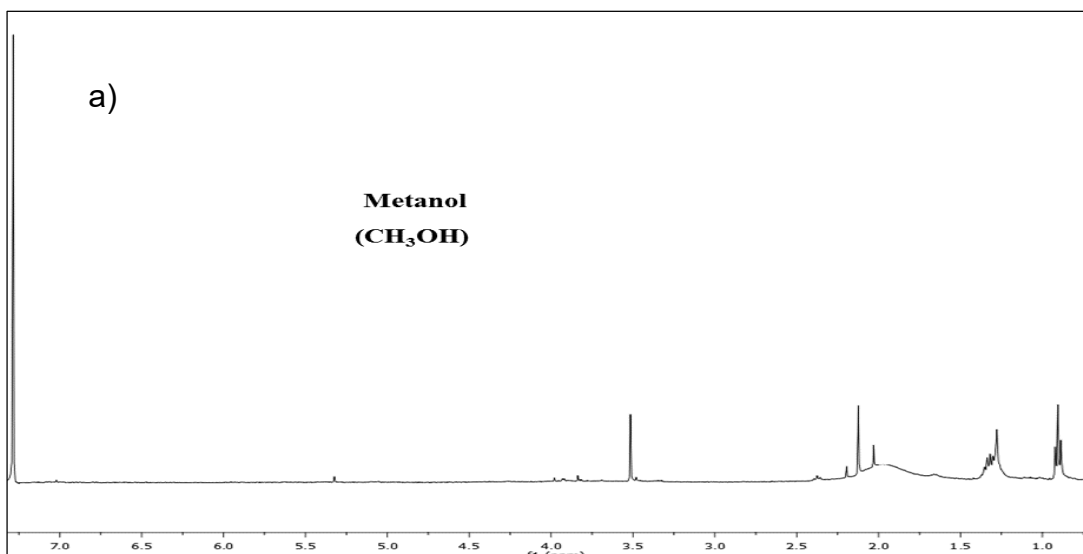


Figura 20. a) Espectro de RMN ^1H a 400MHz en CDCl_3 del extracto en Metanol (CH_3OH) de *Melissa officinalis*. b) Espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 calculado de Metanol (CH_3OH).

Cabe mencionar que este espectro se puede observar un poco resolución de los compuestos orgánicos presentes. Sin embargo, es necesario retomar este sistema ya que la señal en 3.5 ppm podría deberse a un residuo en pequeña ppm de metanol ya que este disolvente es muy problemático para evaporar.

5.3.2 Resultados de inhibición

En la tabla 11 se observa la actividad antimicrobiana mostrada en cada extracto orgánico de *Melissa Officinalis* contra *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*. El extracto orgánico que presentó la mayor inhibición fue el metanólico; este inhibió el crecimiento de las tres cepas utilizadas. Los extractos de éter etílico y éter de petróleo solo mostraron efecto inhibitorio sobre *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*, respectivamente; el extracto de acetato de etilo no presentó efecto alguno sobre las cepas estudiadas, aunque no se descarta que pudiese tener actividad antimicrobiana frente alguna otra cepa bacteriana.

En relación con el control positivo, el microdyn fue el que presentó inhibición sobre las tres cepas ensayadas con halos de inhibición de 14 y 15 mm, sin embargo el mejor extracto fue el metanólico con halos de 17, 15 y 8 mm. Como era de esperarse, la plata ionizada que es el principio de este microbicida, inhibió el crecimiento de los tres microorganismos. Es importante mencionar que se realizaron pruebas de actividad antimicrobiana con el dimetilsulfoxido, agente empleado para resuspender los extractos; los resultados no mostraron ningún efecto inhibitorio de dicho compuesto.

Tabla 11. Actividad antimicrobiana en los extractos orgánicos de *Melissa officinalis*.

Bacterias	Halos de inhibición (mm) ^a				
	Metanol	Acetato de etilo	Éter etílico	Éter de petróleo	Microdyn ^b
<i>Salmonella spp.</i>	17	-	-	-	14
<i>Staphylococcus aureus</i>	15	-	10	-	14
<i>Listeria monocytogenes</i>	8	-	-	13	15

a: media de los valores de dos réplicas; b: control positivo; -: Sin halo de inhibición.

6. Discusión

6.1 Identificación de compuestos por GC-MS

Otros compuestos encontrados en esta planta fueron reportados por Miraj et al., (2016) y entre estos se encuentran derivados del ácido hidroxicinámico (tales como los ácidos rosmarinico, cafeico, clorogénico y metrílico), taninos, y aceites volátiles que incluyen al citronelal, citral a (geranial), citral b (neral), metil citronelato, ocimeno, citronelol, geraniol, nerol, β -cariofileno, óxido β -cariofioleno, linalool, y aceite etérico.

Los resultados de este estudio (Tabla 6-9) difieren de lo reportado por Shakeri et al., (2016) y Miraj et al., (2016); sin embargo, revelan la presencia de otro tipo de compuestos químicos tales como alcoholes, ésteres, aldehídos, ácidos orgánicos y vitaminas como la E y la A. Estos resultados coinciden con los de Carnat et al., (1998), quienes trabajaron con el aceite de hojas de *Melissa officinalis subesp. officinalis*, cultivadas en Francia, reportando la presencia de este tipo de compuestos (Tabla 12). Por lo que la especie analizada, así como el origen de la planta y las condiciones de cultivo podrían ser factores que determinan la presencia de los diferentes compuestos químicos.

En este sentido, en el trabajo realizado por Carnat et al., (1998), las hojas de la planta fueron recolectadas antes de la floración, posteriormente fueron sometidas a secado por 48h a 30-35°C y almacenadas en bolsas de papel por tres meses a temperatura ambiente hasta su análisis.

Sin embargo, en este estudio se desconoce la etapa de recolección de la planta y el método de secado fue a temperatura ambiente durante tres días, con lo cual la preparación de la muestra y período de cosecha podría ser factores que afecten los diferentes compuestos.

Al respecto, Moradkhani et al., (2010) y Acevedo et al., (2013), reportaron que los constituyentes en el aceite esencial de la planta varían dependiendo del clima, la intensidad de la luz, nutrientes, temperatura, edad de la planta, cultivo, cosecha, así

como el país de origen. Tal como se observó en las investigaciones realizadas por Carnat et al., (1998) y Acevedo et al.,(2013), en las cuales se analizó el aceite esencial de *Melissa officinalis* proveniente de Francia y Colombia extraído en ambos casos por hidrodestilación, observándose compuestos diferentes en ambos estudios (Tabla 12).

Otros factores de interés están relacionados al método y las condiciones físicas de extracción como polaridad del solvente a utilizar, temperatura, tiempo, cantidad de muestra, entre otros; todos ellos determinan la extracción de los diferentes compuestos.

Tabla 12. Otros compuestos identificados en *Melissa officinalis*.

Referencia bibliográfica	Condición de extracción	Compuestos identificados
Acevedo et al., (2013)	Hidrodestilación Aceite esencial de hojas Colombia	Eugenol 45.47% Cariofileno 40.77% α -cariofileno 2.94% 3- metil-4-isopropil fenol 1.52% Germacreno D 1,17%
Carnat et al., (1998)	Hidrodestilación Aceite esencial de hojas Francia	α -pineno cis- <i>p</i> -ocimeno <i>trans</i> - <i>p</i> -ocimeno 6-metil-5-hepteno-2-ona Óxido de cis-linalool citronela1 Linalool β -cariofileno Neral Geranial Acetato de genarilo Citronelol Geraniol Óxido de cariofileno Hidrocarburos Cetonas Óxidos Aldehídos Alcoholes Ésteres

Compuestos antioxidantes

En la tabla 13 se muestran los compuestos antioxidantes reportados por diversos autores para *Melissa officinalis*; en general, los compuestos difieren de los encontrados en este trabajo (Tabla 10).

En 2007, Dastmalchi et al. llevaron a cabo la identificación de los compuestos químicos presentes en las hojas secas de *Melissa Officinalis*, empleando como agente extractante etanol:agua. En ese estudio se identificó como el componente mayoritario al ácido rosmarínico con un concentración de 96.45 ± 0.13 mg/g y al ácido *m*-cumaríco con una concentración de 0.23 ± 0.01 mg/g como el menos abundante. De igual manera, se identificaron ácido hidroxicinámico y flavonoides, entre otros (Tabla13).

Picada et. al., (2014) llevaron a cabo la identificación de los componentes químicos en *Melissa Officinalis*. Para ello utilizaron HPLC, GC-MS y RMN. La identificación se llevó a cabo en extractos de acetato de etilo, diclorometano, butanol y acuoso. BHT y ácido n-hexadecanoico fueron identificados en el extracto de acetato de etilo. Esto último es comparable con este trabajo, ya que de igual manera fueron identificados el BHT y ácido n-hexadecanoico en el extracto de éter etílico con una abundancia de 4.69% y 16.8%, respectivamente.

Tabla 13. Compuestos antioxidantes reportados en *Melissa officinalis*.

Parte de la planta utilizada.	Extracto	Compuestos identificados	Referencia bibliográfica
Hojas secas	Acuoso:etanol	Ácido rosmarínico (96.45 ± 0.13 mg/g) Ácido <i>m</i> -cumaríco (0.23 ± 0.01 mg/g). Ácido hidroxicinámico Flavonoides Ácido cafeico Eriodictyol-7-O-glucoside Naringina Hesperidina Naringenina	Keyvan Dastmalchi et. al., 2007
Planta seca	Acetato de etilo	Butilhidroxitolueno Ácido galico Ácido n-hexadecanoico Éster etílico del ácido butanoico	Picada Pereira et. al., 2013
	Diclorometano	β-Sitosterol Éster butílico del ácido hexadecanoico Cafeína	
Planta seca	Hidrodestilación	Limoneno β-pineno Timol Acetato de mentilo Mirceno	Ouadi et al., 2017
Planta seca	Hidrodestilación	Carvacrol Mirceno Timol	Pouyanfaret al.,2018

Como se mencionó, los compuestos identificados en este trabajo son diferentes a los reportados en la literatura, ya que en trabajos anteriores no ha sido reportada la presencia de vitamina E y de fitol, el cual es un precursor para la síntesis de dicha vitamina.

Estas diferencias se pueden atribuir a las condiciones climáticas, los nutrientes del suelo y el estado fisiológico de la planta. Según lo reportado por Duda et. al. (2015) el estado fenológico de las plantas es algo de suma importancia, en dicho trabajo se llegó a la conclusión de que el mejor momento para cosechar *Melissa officinalis* y que se obtenga un máximo de compuestos bioactivos es al comienzo de la floración. En ese mismo trabajo se reporta la presencia de ácido sinapínico y ácido

rosmaríco con una concentración 22.5 mg/100 g y 13.4 mg/100 respectivamente, los cuales son antioxidantes.

6.2 Actividad antimicrobiana

Los resultados de este estudio mostraron actividad antimicrobiana de los extractos orgánicos de *Melissa officinalis*; principalmente del extracto metanólico, el cual inhibió los tres microorganismos estudiados. Estos resultados coinciden con lo reportado por Velez et al., (2017), quienes obtuvieron por maceración en metanol (20g/ml) extractos de ésta planta, obteniendo halos de inhibición de 6, 12 y 12 mm contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente. También observaron que a una concentración superior del extracto (40 mg/ml) había una mayor inhibición; los halos obtenidos fueron de 15 mm para *Escherichia coli* y 13 mm para *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

En otro estudio, se analizó la actividad antimicrobiana de extractos de *Melissa Officinalis* obtenidos con etanol al 70% y ultrasonido; los resultados mostraron inhibición en el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* (8.17 ± 0.29 mm), *Staphylococcus aureus* (8.50 ± 0.50 mm), *Enterococcus faecalis* (8.17 ± 0.27 mm), *Bacillus subtilis* (9.17 ± 0.54 mm), *Penicillium chrysogenum* (8.00 ± 0.20 mm), *Candida utilis* (8.67 ± 0.58 mm) (Vasileva et al., 2018). Esto indicaría que el solvente empleado tiene una función selectiva durante la extracción de los diferentes compuestos bioactivos presentes en la planta analizada, tal como fue observado en nuestro estudio (Tablas 5 a 8).

En el mismo estudio, se reportó que el extracto etanólico de *Melissa Officinalis* no tuvo un efecto inhibitorio en el crecimiento de *Listeria monocytogenes*; en este trabajo de investigación los extractos en metanol y éter de petróleo inhibieron el crecimiento de este microorganismo mostrando halos de inhibición de 8 y 13 mm, respectivamente. Estos resultados confirmarían que el solvente empleado en la

extracción determinan el tipo de compuestos presentes y sus propiedades antimicrobianas.

Otro factor que influye en las propiedades antimicrobianas de extractos de plantas es el método de obtención del extracto. Al respecto, Mimica et al., (2004) observaron inhibición del aceite esencial de *Melissa officinalis* al 20 y 50% (obtenido por hidrodestilación y hexano como solvente), sobre los microorganismos: *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. enteritidis*, *S. typhi*, *S. sonei*, *Sarcina lutea*, *Micrococcus flavus*, *S. aureus*, *S. epidermidis* y *B. subtilis*.

En otro estudio citado por Shakeri et al., (2016) se observó un efecto inhibitorio sobre *Sarcina lutea* de extractos de la misma planta obtenidos por maceración en éter de petróleo y acetato de etilo. En nuestro estudio, el extracto obtenido con acetato de etilo no presentó inhibición alguna sobre los microorganismos ensayados; sin embargo puede ser eficaz contra otro tipo de microorganismo tal como se observó en el estudio citado por Shakeri et al., (2016). En ese mismo estudio se reportó que los extractos de *Melissa officinalis* obtenidos por decocción exhibieron actividad inhibitoria contra *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *P. funiculosum*.

Respecto a los compuestos responsables de dicha actividad antimicrobiana, en el estudio realizado por Manilal et al., (2009) se analizó la actividad antibacteriana de cuatro extractos (acetato de etilo, diclorometano, metanol y un amortiguador de fosfatos) del alga roja *Falkenbergia hillebrandii* (Born), encontrando la mayor actividad antimicrobiana en el extracto metanólico y como responsables de dicha actividad a los ácidos oleico y n-hexadecanoico. Estos resultados coinciden con los encontrados en nuestro estudio, en donde el extracto metanólico fue el que inhibió todas las cepas analizadas (Tabla 11) y en donde se encontró entre otros compuestos la presencia del ácido n-hexadecanoico (Tabla 8).

Es importante mencionar que los extractos de *Melissa officinalis* obtenidos con éter etílico y éter de petróleo inhibieron *S. aureus* y *L. monocytogenes*, respectivamente;

en el análisis por GC-MS se encontró también la presencia de ácido *n*-hexadecanoico (Tablas 5,6). Por lo que se puede decir que éste compuesto es responsable de la actividad antimicrobiana observada en los diferentes extractos de *Melissa officinalis*.

Por otra parte Murabakali et al., (2012) reportan la actividad antimicrobiana de los ésteres metílicos de los ácidos grasos extraídos de *Scenedesmus bijugatus*. En este estudio se reporta la presencia del éster metílico del ácido graso 11,14,17 eicosatrienoico ($1.70 \pm 0.01\%$), al cual junto con otros ésteres metílicos de los ácidos grasos, se le atribuye el efecto inhibitorio contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

En nuestro estudio, el éster metílico del ácido graso 11,14,17 eicosatrienoico se encuentra presente solamente en el extracto metanólico de *Melissa Officinalis*, como ya se menciona anteriormente dicho extracto mostró la mejor inhibición; inhibiendo el crecimiento de las 3 cepas utilizadas.

Otros compuestos presentes en el extracto metanólico han sido reportados con actividad antimicrobiana tal es el caso del farnesol isómero a (Jabra Rizk et al. 2006), y el ácido linoleico ambos para inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*. Greenway & Dyke, (1979) propusieron el mecanismo de acción del ácido linoleico, estos autores dicen que dicho ácido probablemente inhibe el crecimiento al aumentar la permeabilidad de la membrana bacteriana como resultado de su acción surfactante.

Por ello es importante considerar que en el extracto metanólico, podría haber un efecto sinérgico debido a la presencia del ácido *n*-hexadecanoico, éster metílico del ácido graso 11,14,17 eicosatrienoico y farnesol isómero a, los cuales podrían ser los responsables del efecto inhibitorio del crecimiento de *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*.

7. Conclusiones

El método utilizado para la extracción de los diversos compuestos presentes en *Melissa officinalis*, así como el tipo de solvente, son factores fundamentales que definen el tipo de compuestos químicos extraído.

Se identificaron por GC-MS diversos compuestos químicos en los extractos orgánicos de *Melissa officinalis*; algunos de ellos, como antioxidantes y vitaminas, de interés por las propiedades benéficas que han sido reportadas.

Los compuestos identificados en los diferentes extractos de *Melissa officinalis* difieren en general de lo reportado en la literatura; esto debido a que durante la extracción de los mismos no se aplicó temperatura lo que permitió detectar formas químicas como aldehídos y alcoholes, entre otros.

El análisis del solvente residual por medio de RMN fue de gran utilidad ya que permitió determinar la presencia de los solventes orgánicos empleados, tal como ocurrió en el extracto metanólico el cual mostró señal de dicho solvente en el espectro.

Los extractos orgánicos de *Melissa officinalis*, a excepción del extracto en acetato de etilo, mostraron actividad antimicrobiana contra los microorganismos patógenos siendo el principal compuesto responsable el ácido n-hexadecanoico.

El extracto metanólico fue el que mostró mayor actividad inhibiendo a los tres microorganismos estudiados, esto podría atribuirse a la presencia de el ácido n-hexadecanoico, al éster metílico del ácido graso 11,14,17 eicosatrienoico y al farsenol isómero a; los cuales en conjunto parecen tener un efecto sinérgico que permite la inhibición de los microorganismos ensayados.

8. Referencias

- Acevedo, D., Navarro, M., & Montero, P. (2013). Composición química del aceite esencial de las hojas de toronjil (*Melissa Officinalis* L.). *Información tecnológica*, 49-54.
- Aguilar, A., Camacho, J., Chino, S., Jácquez, P., López, M., 1994. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información Etnobotánica. Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), México, p. 253.
- Alonso, J.R. (2003). Bosques y selvas tropicales como fuente de medicamentos. *Bol. Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*, 2(2), 16-21.
- Argueta-Villamar, A., Caro, L.M., Rodarte, M.E. (Eds.), 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana. Instituto National Indigenista, Mexico.
- Argyropoulos, D., Müller, J., 2014. Changes of essential oil content and composition during convective drying of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). *Ind. Crops Prod.* 52, 118–124.
- Awad, R., Muhammad, A., Durst, T., et al., 2009. Bioassay-guided fractionation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) using an in vitro measure of GABA transaminase activity. *Phytother. Res.* 23, 1075–1081.
- Bakht, N., Humaira, F., Ahmad, M., & Haq, I.-u. (2015). Recent trends and methods in antimicrobial drug discovery from plant sources. *Austin journal of microbiology*, 1-12.
- Barquero, AA. (2007). Plantas sanadoras: pasado, presente y futuro. *Química Viva*, 6(2), 20.

- Bernard S. W. Dawson, Robert A. Franich, Roger Meder. December 1988 Essential oil of *Melissa officinalis* L. subsp. *altissima* (Sibth. et Smith) Arcang Flavor and Fragrance Journal
- Blumenthal M, Goldberg A, Brinckmann J (2000). Herbal Medicine-Expanded Commission E Monographs. Newton, MA: Integrative Medicine Communications, 123: 230-232.
- Bolkent S, Yanardag R, Karabulut-Bulan O, Yesilyaprak B (2005).Protective role of *Melissa officinalis* L. extract on liver of hyperlipidemic rats: a morphological and biochemical study. *Ethnopharmacol.*, 14: 391-8.
- Bruneton, J. *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*, 2nd ed.; Intercept Ltd.: London, Paris, New York, 1999.
- Callejas, CM. (2006). Flora medicinal de San Bartolo Tutotepec, Hidalgo. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca de soto, Hidalgo. Recuperado de: <http://repository.uaeh.edu.mx/bitstream/bitstream/handle/123456789/10636/flora%20medicinal.pdf?sequence=1>
- Carnat, A., Carnat, A., Fraisse, D., & Lamaison, J. (1998). The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa Officinalis* L. subsp. *officinalis*) tea. *Pharmaceutica acata helvetiae*, 301-305.
- Carocho, M.,Barros,L.,Calhelha,R.C.,etal.,2015. *Melissa officinalis* L. decoctionsas functional beverages:abioactiveapproachandchemicalcharacterization.*Food funct.* 6,2240–2248.
- Costa, J., Cervera, S., Cunill, F., Esplugas, S., Mans, C., & Mata, J. (2004). Curso de ingeniería química. Introducción a los procesos, las operaciones unitarias y los fenómenos de transporte. Barcelona, España: Reverté, S.A.

- Dastmalchi, K., Damien Dorman, H., Oinonen, P., Darwis, Y., Laakso, I., & Hiltunen, R. (2008). Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa Officinalis* L.) extract. *LWT*, 391-400.
- De Sousa AC, Alviano DS, Blank AF, Alves PB, Alviano CS, Gattas CR (2004). *Melissa officinalis* L. Essential oil: Antitumoral and antioxidant activities. *J. Agric. Food Chem.*, 52 (9):2485-2489.
- Duda, S. C., Marguitas, L. A., Dezmiorean, D., Duda, M., Margaoan, R., & Bobis, O. (2015). Changes in major bioactive compounds with antioxidant activity of *Agastache foeniculum*, *Lavanda angustifolia*, *Melissa officinalis* and *Nepeta cataria*: Effect of harvest time and plant species. *Industrial Crops and Products*, 499-507.
- Essawi, T., Srour, M., 2000. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 70,343–349.
- Faggio, C., Sureda, A., Morabito, S., Sanchez-Silva, A., Mocan, A., Fazel Nabavi, S., & Mohammad Nabavi, S. (2017). Flavonoids and platelet aggregation: A brief review. *European Journal pharmacology*, 91-101.
- Feldman, GL. (2011). *Coca y wachuma: sus prácticas y significados en la cultura andina y en Lima*. Tesis doctoral. Facultad de ciencias sociales; Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima. Perú. 105p.
- Ferreyra, M., Rius, S., & Casati, P. (2012). Flavonoids: Biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in plant science*, 1-15.
- Gheno, HY.; Nava GA.; Martínez, AR.; Sánchez, E. (2011). Las plantas medicinales de la organización de Parteras y Médicos indígenas tradicionales de Ixhuatlancillo, Veracruz, México y su significancia cultural. *Polibotánica*, 31: 191-251.

- Gómez-Pompa, A., 1993. "Las raíces de la etnobotánica mexicana". *Logros y perspectivas del conocimiento de los recursos vegetales de México en vísperas del siglo XXI*. (Comps.) P. Moreno-Casas y J. Rzedowski. Instituto de Ecología, A.C.
- Greenway, D., & Dyke, K. (1979). Mechanism of the inhibitory action of linoleic acid on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Journal of general microbiology*, 233-245.
- Harris, D. C. (2007). *Análisis Químico Cuantitativo*. Barcelona, España: Reverté.
- Heitz, A., Carnat, A., Fraisse, D., Carnat, A., Lamaison, J. (2000). Luteolin 3'-glucuronide, the major flavonoid from *Melissa officinalis*. *Fitoterapia*, 70, 201-202.
- Huerta, C. (1997). La herbolaria: mito o realidad. CONABIO. *Biodiversitas*, 12, 1-7.
- Jabra-Rizk, M., Meiller, T., James, C., & Shirliff, M. (2006). Effect of Farnesol on *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation and antimicrobial Susceptibility. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1463-1469.
- Janina MS (2003) *Melissa officinalis*. The Int. J. Aromather., 10: 132-139.
- Khan, M.R., Ndaalio, G., Nkunya, M.H.H., Wevers, H., Sawhney, A.N., 1980. Studies on African medicinal plants. Part 1: Preliminary screening of medicinal plants for antibacterial activity. *Planta Medica Supplement*, 91-97.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., & Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioprocess Processing*, 217-233.
- López Luego, M. T. (2004). Aceites esenciales. *Offarm*, 88-91.

- Manilal, A., Sujith, S., Kiran, G., Selvin, J., & Shakir, C. (2009). Antibacterial activity of *Falkenbergia hillebrandii* (Born) from the Indian coast against human pathogens. *Internacional Journal of experimental botany*, 161-166.
- Marongiu B, Porcedda S, Piras A, Rosa A, Deiana M (2004). Antioxidant activity of supercritical extract of *Melissa officinalis* subsp. *officinalis* and *Melissa officinalis* subsp. *inodora*. *Phytother. Res.*18(10): 789-792.
- Masakova S, Holedin M, Ginberg A (1979) Chemical composition of volatile oil in lemon balm. *inodora*. *Phytother. Res.*, 8: 89-94.
- Meftahizade H, Moradkhani H, Naseri B, Lotfi M, Naseri A (2010). Improved in vitro culture and micropropagation of different *Melissa officinalis* L. genotypes. *J. Med. Plant Res.*, 4(3). 240-246.
- Mimica-Dukic, N., Bozin, B., Sokovic, M., & Simin, N. (2004). Antimicrobial and Antioxidant activities of *Melissa Officinalis* L. (Lamiaceae) Essential Oil. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2485-2489.
- Miraj, S., Azizi, N., & Kiani, S. (2016). A review of chemical components and pharmacological effects of *Melissa officinalis* L. *Der Pharmacia Lettre*, 229-237.
- Molina, J. L., Galván, R., Patiño, A., & Fernández, R. (2012). Plantas medicinales y listado florístico preliminar del municipio de Huasca, Hidalgo, México. *Polibotanica*, 259-291.
- Moradkhani , H., Sargsyan, E., Bibak, H., Naseri , B., Sadat-Hosseini, M., Fayazi-Barjin, A., & Meftahizade, H. (2010). *Melissa officinalis* L., a valuable medicine plant: A review. *Journal of medicinal plants* , 2753-2759.
- MubarakAli, D., Praveenkumar, R., Shenbagavalli, T., Nivetha, T., Ahamed, A., Al-Dhabi, N., & Thajuddin, N. (2012). New reports on anti-bacterial and anti-candidal activities of fatty acid methyl esters (FAME) obtained from

Scenedesmus bijugatus var. *bicellularis* bionass. *RSC Advances*, 11552-11556.

Navarro García, V., Gonzalez, A., Fuentes, M., Aviles, M., Rios, M., Zepeda, G., & Rojas, M. (2003). Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. *Journal ethnopharmacology*, 85-88.

Orio, L., Cravotto, G., Binello, A., Pignata, G., Nicola, S., & Chemat, F. (2012). Hydrodistillation and in situ microwave generated hydrodistillation of fresh and dried mint leaves: a comparison study. *SCI*, 3085-3090.

Ouadi, Y., Manssouri, M., Bouyanzer, A., Majidi, L., Bendaif, H., Elmsellem, H., . . . Hammouti, B. (2017). Essential oil composition and antifungal activity of *Melissa Officinalis* originating from north-Est Morocco, against postharvest phytopathogenic fungi in apples. *Microbial Pathogenesis*, 321-326.

Ozturk A, Unlukara A, Ipek A, Gurbuz B (2004). Effects of salt stress and water deficit on plant growth and essential oil content of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.). *Pak. J. Bot.*, 36(4): 787-792.

Palá, P., J. (2002). *Contribución al conocimiento de los aceites esenciales del género Eryngium, en la península ibérica*. (Tesis de doctorado). Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.

Peredo, H., Palou, E., & López, A. (2009). Aceites esenciales: métodos de extracción. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 29-32.

Pérez, B., Villavicencio, M. y Ramírez, A. (2003). *Lista de plantas útiles en el Estado de Hidalgo. Centro de Investigaciones Biológicas*. Pachuca, Hidalgo: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Picada Pereira, R., Augusti, A., Stori, A., Fachinetto, R., Speroni, C., Tanus-Santos, J., . . . Teixeira, J. (2014). Chemical composition, antioxidant and

anticholinesterase activity of *Melissa Officinalis*. *Industrial Crops and Products*, 34-45.

Picada Pereira, R., Fachinetto, R., De Souza Prestes, A., Puntel, R., & Santos da Silva, G. (2009). Antioxidant effects of different extracts from *Melissa Officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*. *Neurochem Res*, 973-983.

Pouyanfar, E., Hadian, J., Akbarzade, M., Hatami, M., Kanani, M., & Ghorbanpour, M. (2018). Analysis of phytochemical and morphological variability in different wild and agro-ecotypic populations of *Melissa officinalis* L. growing in northern habitats of Iran. *Industrial Crops & Products*, 262-273.

Rivera, AE. (1999). Investigación reciente sobre plantas medicinales mexicanas. *Arqueología mexicana*, 7(39), 54-59.

Rose J (2000). An Herb for Skin Care. *Aromatic Plant Project Pres Release*, 8: 897-901.

Samy, R.P., Ignacimuthu, S., Sen, A., 1998. Screening of 34 Indian medicinal plants for antibacterial properties. *Journal of Ethnopharmacology* 62, 173–182.

Sánchez García, E., Castillo Hernández, S., & García Palencia, P. (2016). *Capítulo 3. Actividad antimicrobiana*. Nuevo León: Universidad Autónoma de Nuevo León.

Sarer E. & Kokdil G (1991). Constituents of the essential oil from *Melissa officinalis*. *Planta. Medicus*, 57: 89- 95.

Shakeri, A., Sahebkar, A., & Javadi, B. (2016). *Melissa Officinalis* L. A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 204-228.

- Sharapin, N. (2000). Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Colombia: CYTED.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2008). *Principios de análisis instrumental*. México, D.F.: Cengage Learning.
- Stashenko, E. E. (2009). Aceites esenciales. Colombia: Universidad Industrial de Santander.
- Tenorio López, F. A., Del Valle Mondragon, L., & Pastelín Hernández, G. (2006). Los flavonoides y el sistema cardiovascular: ¿Pueden ser una alternativa terapéutica? . *Medigraphic*, 33-45.
- Turhan M (2006) Hand book of herbal plants, chapter 4. *Melissa officinalis*, 3: 184-245.
- Valnet, J (1990). Aromatherapy. 11th Edn. France: Maloine, Paris, 11:242-246
- Vasileva, I., Denkova, R., Chochkov, R., Teneva, D., Denkova, Z., Dessev, T., . . . Slavov, A. (2018). Effect of lavender (*Lavandula angustifolia*) and melissa (*Melissa Officinalis*). *Food Chemistry*, 13-21.
- Vasileva, I., Denkova, R., Chochkov, R., Teneva, D., Denkova, Z., Dessev, T., . . . Slavov, A. (2018). Effect of lavender (*Lavandula angustifolia*) and melissa (*Melissa officinalis*) waste on quality and shelf life of bread. *Food Chemistry*, 13-21.
- Werker J (1993) Function of Essential Oil Secreting Glandular Hairs in Aromatic Plants of the Lamiaceae – A Review. *Flavor and Fragrance J.* 8: 249-255.
- Yasunaka, K., Abe, F., Nagayama, A., Okabe, H., Lozada-Pérez, L., López-Villafranco, E., . . . Reyes Chilpa, R. (2005). Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purifies coumarins and xanthones. *Journal of ethnopharmacology*, 293-299.

Ziakova, A. y Brandsteterova, E. (2002). Application of different preparation techniques for extraction of phenolic antioxidants from lemon balm (*Melissa officinalis*) before HPLC analysis. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technology*, 25, 3017–3032