



Chemical characterization and biological activity of apolar fraction from *Melissa officinalis* L. leaves

Caracterización química y actividad biológica de la fracción apolar de las hojas de *Melissa officinalis* L.

Haydelba D'Armas¹ , Carmita Jaramillo-Jaramillo², Ligia Llovera³, Liz Cubillán³, Mayra D'Armas⁴ 

¹Universidad Estatal de Milagro, Milagro 091050, Provincia de Guayas, Ecuador. Universidad de Oriente, Cumaná, Sucre 6101, Venezuela.

²Universidad Técnica de Machala, Machala, Provincia del Oro, Ecuador.

³Instituto Venezolano de Investigación Científica, Centro de Química, Miranda 1204, Venezuela.

⁴Universidad Estatal de Milagro, Milagro 091050, Provincia de Guayas, Ecuador.

Cite this paper/Como citar este artículo: Haydelba D'Armas, Carmita Jaramillo-Jaramillo, Ligia Llovera, Liz Cubillán, Mayra D'Armas. (2018). Chemical characterization and biological activity of apolar fraction from *Melissa officinalis* L. leaves. *Revista Bio Ciencias* 5, e385. doi : <https://doi.org/10.15741/revbio.05.e385>



ABSTRACT

Medicinal plants have been traditionally used in the treatment of many diseases and their pharmacological and therapeutic properties have been attributed to various chemical constituents isolated from their crude extracts. *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae), or lemon balm, is widely used as herbal tea to treat or relieve nervous sleep disturbance and functional gastrointestinal disorders. For studying the plant, the hexane extract of the leaves of *M. officinalis* collected in the city of Machala, El Oro Province, Ecuador, was analyzed. The antibacterial, antifungal and toxic properties of the crude extract were evaluated, revealing a strong antibacterial activity against bacteria *S. aureus* and *P. aeruginosa*, as well as a significant lethality (LC₅₀ of 78.82 µg/ml) against *Artemia salina*. B and C fractions obtained using column chromatography eluted with hexane:dichloromethane in different proportions exhibited a significant lethality (LC₅₀ between 29-32 µg/ml). All the chromatographic fractions were bioactive against *S. aureus* bacteria, with the exception of E. In addition, fraction B showed moderate antibacterial activity against *B. cereus*

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: October 27th 2017.

Accepted/Aceptado: March 14th 2018.

Available on line/Publicado: November 20th 2018.

RESUMEN

Las plantas medicinales han sido tradicionalmente utilizadas en el tratamiento de muchas enfermedades, debido a que sus propiedades farmacológicas y terapéuticas han sido atribuidas a los distintos constituyentes químicos aislados de sus extractos crudos. *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) o bálsamo de limón, es ampliamente usada como té de hierbas para tratar o aliviar la perturbación nerviosa del sueño y los trastornos gastrointestinales funcionales. Con el objetivo de estudiar dicha planta, se analizó el extracto en hexano de las hojas de *M. officinalis* recolectada en la ciudad de Machala, Provincia del Oro, Ecuador. Se evaluaron las propiedades antibacteriana, antifúngica y tóxica del extracto crudo, revelándose una actividad antibacteriana fuerte frente a las bacterias *S. aureus* y *P. aeruginosa*, así como una letalidad significativa (CL₅₀ de 78,82 µg/ml) contra *Artemia salina*. Las fracciones B y C obtenidas usando cromatografías de columna eluidas con mezclas de hexano:diclorometano en distintas proporciones exhibieron una letalidad muy significativa (CL₅₀ entre 29-32 µg/ml). Todas las fracciones cromatográficas, a excepción de la E, fueron bioactivas frente a la bacteria *S. aureus*. Además, la fracción B presentó actividad antibacteriana moderada frente a la cepa *B. cereus* y actividad antifúngica fuerte contra las

*Corresponding Author: Haydelba D'Armas, Universidad Estatal de Milagro, Milagro, Provincia de Guayas, Ecuador. 00-(593)-967682942. <http://www.unemi.edu.ec/> E-mail: hdarmasr@gmail.com.

strain and strong antifungal activity against the strains *C. albicans* and *Mucor* sp. Through analysis of fraction B by GC/MS some compounds were identified: 7,9- di-tert-butyl-1- oxaspiro [4,5] deca-6,9-diene-2,8-dione, docosanol as majority compound, a mixture of cholestane type sterols and fatty acid ester of a sterol.

KEY WORDS

Bioactivity, campesterol, GC/MS, *Melissa officinalis*, phytochemistry.

Introduction

Medicinal plants have traditionally been used in the treatment of several human diseases and their pharmacological and therapeutic properties have been attributed to different chemical constituents isolated from their crude extracts. Particularly important, chemical components with antioxidant activity are found in high concentrations in plants and may be responsible for their preventive effects in various degenerative diseases, such as cancer, neurological and cardiovascular diseases (Picada *et al.*, 2009).

Melissa officinalis L. (Lamiaceae) or lemon balm is a perennial plant related to the mint family and native from Europe, an edible herb for the Mediterranean region. Its use as a medicinal herb dates back to the Middle Ages, is widely used as herbal tea, and is very well known for its ability to reduce stress and anxiety, stimulate sleep, improve appetite, relieve pain or antispasmodic properties and the discomfort associated with digestion (functional gastrointestinal disorders). Some studies that have demonstrated antitumor and neuroprotective effects of *M. officinalis* are of great importance (De Sousa, 2004; Marongiu, 2004).

The essential oil of *M. officinalis* is recommended for its demonstrated antimicrobial activity (Mimica-Dukic *et al.*, 2004) and the aqueous extracts of this species due to their antiviral and antioxidant properties (Hussain *et al.*, 2011). Additionally, it was reported that *M. officinalis* contains substances that inhibit protein biosynthesis in cancer cells. These biological activities have been attributed to the essential oil (where terpenoids are the major constituents, such as citral or mixture of neral and geranial isomers, citronellal, geraniol, nerol and linalool), tannins (WHO, 2002), flavonoids (Patora

cepas *Mucor* sp y *C. albicans*. Mediante análisis de la fracción B por CG/EM se identificaron los compuestos: 7,9- di-tert-butyl- 1- oxaspiro [4,5] deca-6,9-dieno-2,8-diona, docosanol como compuesto mayoritario, una mezcla de esteroides tipo colestano y un éster de ácido graso de un esteroide.

PALABRAS CLAVE

Bioactividad, campesterol, CG/EM, fitoquímica, *Melissa officinalis*.

Introducción

Las plantas medicinales se han utilizado tradicionalmente en el tratamiento de varias enfermedades humanas y sus propiedades farmacológicas y terapéuticas han sido atribuidas a diferentes constituyentes químicos aislados de sus extractos crudos. De particular importancia, componentes químicos con actividad antioxidante se encuentran en altas concentraciones en las plantas y pueden ser responsables de sus efectos preventivos en diversas enfermedades degenerativas, como el cáncer, enfermedades neurológicas y cardiovasculares (Picada *et al.*, 2009).

Melissa officinalis L. (Lamiaceae) o bálsamo de limón o toronjil, es una planta perenne familia de la menta y nativa de Europa, una hierba comestible para la región mediterránea. Su uso como hierba medicinal se remonta a la Edad Media, es ampliamente utilizada como té de hierbas, y es muy bien conocido por su capacidad para reducir el estrés y la ansiedad, estimular el sueño, mejorar el apetito, aliviar el dolor o propiedades antiespasmódicas y las molestias asociadas con la digestión (trastornos gastrointestinales funcionales). Es de gran importancia, algunos estudios que han demostrado efectos antitumorales y neuroprotectores de *M. officinalis* (De Sousa, 2004; Marongiu, 2004).

Se recomienda el aceite esencial de *M. officinalis* por su actividad antimicrobiana demostrada (Mimica-Dukic *et al.*, 2004) y los extractos acuosos de esta especie porque exhiben propiedades antivirales y antioxidante (Hussain *et al.*, 2011). También se informó de que *M. officinalis* contiene sustancias que inhiben la biosíntesis de proteínas en las células cancerosas. Estas actividades biológicas se han atribuido al aceite esencial (donde los mayores constituyentes son los terpenoides como el citral o mezcla de los isómeros neral y geranial, citronelal, geraniol, nerol y

& Klimek, 2002), anthocyanins (Hossain *et al.*, 2009) and hydroxycinnamic phenolic acids (Caniova & Brandsteterova, 2001).

Qualitative variations of its essential oil have been demonstrated by genetic factors and qualitative changes due to environmental conditions, day length and soil composition. Studies on this essential oil have been extensive, but information on its non-volatile components is scarce (Herodez *et al.*, 2003). Mencherini *et al.*, (2007) isolated and characterized five new triterpenes ursin and oleanene type and a new ursin glycoside from the polar extract of the leaves and stems of *M. officinalis* collected in Italy; as well as the known compounds quadranoside III, luteolin and rosmarinic and salviic acids A. Furthermore, they demonstrated the antimicrobial effect of the extracts and compounds. Several studies suggest that lemon balm is beneficial for a wide variety of human disorders such as cancer, HIV-1, Alzheimer's disease, attention deficit hyperactivity disorder, indigestion, gas, insomnia, and hyperthyroidism (Geuenich *et al.*, 2008; Kennedy *et al.*, 2006; Muller & Klement, 2006).

Materials and methods

Sampling

The specimens of the *Melissa officinalis* plant were collected in the city of Machala, Del Oro Province, southwest region of Ecuador, between 3° 16' 0" S and 79° 59' 0" W, during April 2014. The sample was taxonomically identified by botanist Jesus Inca from the National Herbarium of Quito and filed in the Pilot Plant of Pharmacy of the *Universidad Técnica de Machala* (Ecuador) with the registration PPFMO016.

Extraction

The apolar extract was obtained in the following way: The leaves were washed with distilled water, dried in the shade at room temperature in the laboratory, and then in the oven at 40° for 24 hours. Subsequently, the grinding of the dried leaves was carried out in an electric mill to be macerated with hexane for 48 hours. After filtering the solvent, the residue was again re-extracted with hexane to ensure complete extraction of the secondary metabolites. The total filtering of the

linalol), taninos (WHO, 2002), flavonoides (Patora & Klimek, 2002), antocianinas (Hossain *et al.*, 2009) y ácidos fenólicos hidroxicinámicos (Caniova & Brandsteterova, 2001).

Se han demostrado variaciones cualitativas de su aceite esencial por factores genéticos y variaciones cualitativas debidas a las condiciones ambientales, duración del día y composición del suelo. Los estudios sobre el aceite esencial han sido extensos, pero la información de los componentes no volátiles es escasa (Herodez *et al.*, 2003). Mencherini *et al.*, (2007) aislaron y caracterizaron cinco nuevos triterpenos tipo urseno y oleaneno y un nuevo glucósido urseno del extracto polar de las hojas y tallos de *M. officinalis* recolectada en Italia; así como los compuestos conocidos quadranosido III, luteolin y los ácidos rosmarinico y salviánico A. Además, demostraron el efecto antimicrobial de los extractos y compuestos. Varios estudios sugieren que el toronjil o bálsamo de limón es beneficioso para una amplia variedad de trastornos humanos tales como el cáncer, el VIH-1, la enfermedad de Alzheimer, trastorno de hiperactividad por déficit de atención, indigestión, gas, insomnio, y el hipertiroidismo (Geuenich *et al.*, 2008; Kennedy *et al.*, 2006; Muller & Klement, 2006).

Materiales y métodos

Muestreo

Los ejemplares de la planta *Melissa officinalis* se recolectaron en la ciudad de Machala, Provincia del Oro, región suroeste de Ecuador, entre 3°16' 0" S y 79° 59' 0" W, durante abril de 2014. La muestra fue taxonómicamente identificada por el Botánico Jesús Inca del Herbario Nacional de Quito y archivada en la Planta Piloto de Farmacia de la Universidad Técnica de Machala (Ecuador) con el registro PPFMO016.

Extracción

Para la obtención del extracto apolar de la planta se procedió de la siguiente manera: Las hojas se lavaron con agua destilada, secaron a la sombra y a temperatura ambiente en el laboratorio y luego en la estufa a 40° por 24h. Posteriormente, se realizó la molienda de las hojas secas, en un molino eléctrico, para ser maceradas con hexano durante 48h. Luego de filtrado el solvente, el residuo se maceró con hexano nuevamente para garantizar la extracción completa de los metabolitos secundarios presentes. El filtrado total

two macerations was evaporated and concentrated under reduced pressure in a rota-evaporator to obtain the hexane extract. Afterward, bioactivity and chromatographic separation tests were carried out.

Chromatographic fractionation

The compounds separation of the hexane extract was carried out by gravity Column Chromatography (CC) with silica gel 35-70 mesh (0.2-0.5 mm), in a column of 2.5 cm in diameter and 70 cm in length. 3.8960 g of the extract and 116.8800 g of silica were used in a ratio sample:silica 1:30. Hexane, mixtures of increasing polarity of hexane-dichloromethane, dichloromethane-acetone, acetone-methanol, and 100 % methanol were used as eluents. Thin Layer Chromatographic (TLC) on glass chromatographic plates of 20 x 20 cm² was performed to each one of the obtained eluates. The plates were coated with 60 mesh silica-gel type GF, with a thickness of 0.5 mm, using mixtures of hexane-acetone in proportions of 4:1, 1:1 and 100 % acetone, obtaining six fractions (A-F) by comparing their R_f . Ultraviolet (UV) light of short wavelength (100-280 nm) and a solution of 5 % ammonium molybdate in 10% H₂SO₄ were used as developers.

Structural characterization of fraction B

Gas chromatography and mass spectrums by electronic impact (70eV) were performed in the Mass Spectrometry Laboratory of the *Instituto Venezolano de Investigación Científica* (IVIC), which were registered in VARIAN GC/MS equipment Saturn 2000 model, with an electronic impact ionization source and an ion trap detector. A column of CP-SIL-8CB-MS of 30 m x 0.25 I.D and helium (He) was used as the entraining gas. The injector temperature was 280°C, the initial temperature of the oven was 100° C with a speed of heating of 5°C per minute, until reaching a final temperature of 295°C. Subsequently, the identification of the compounds with 95% confidence was made by computerized comparison with the WILEY and NIST libraries.

Biological assays

The biological activity of *M. officinalis* extract and fractions of the leaves was evaluated by using the following bioassays:

de las dos maceraciones, fue evaporado y concentrado a presión reducida en un rota-evaporador para la obtención del extracto hexánico. Posteriormente, se le realizaron pruebas de bioactividad y separación cromatográfica.

Fraccionamiento cromatográfico

La separación de los compuestos presentes en el extracto en hexano se realizó por cromatografía de columna por gravedad (CC) con sílica-gel 35-70 mesh (0,2-0,5 mm), en una columna de 2,5 cm de diámetro y 70 cm de largo. Se utilizaron 3,8960 g del extracto y 116,8800 g de sílica en una relación muestra: sílica 1:30. Se usaron como eluyentes hexano, mezclas en polaridad creciente de hexano-diclorometano, diclorometano-acetona, acetona-metanol y metanol al 100%. A cada uno de los eluatos obtenidos, se les realizó CCF en placas cromatográficas de vidrio 20x20 cm², recubiertas con sílica-gel de 60 mesh tipo GF, con un espesor de 0,5 mm, empleándose mezclas de hexano-acetona en proporciones de 4:1, 1:1 y acetona al 100 %, obteniéndose seis fracciones (A-F) por comparación de sus R_f . Se empleó como revelador luz ultravioleta (UV) de longitud de onda corta (100-280 nm) y una solución de molibdato de amonio al 5 % en H₂SO₄ al 10%.

Caracterización estructural de la fracción B

La cromatografía de gases y los espectros de masas por impacto electrónico (70eV), se realizaron en el Laboratorio de Espectrometría de Masas del Instituto Venezolano de Investigación Científica (IVIC), los cuales se registraron en un equipo de CG/EM marca VARIAN modelo Saturno 2000, con una fuente de ionización por impacto electrónico y un detector de trampa de iones. Se utilizó una columna de CP-SIL-8CB-MS de 30 m x 0,25 D.I y helio (He) como gas de arrastre. La temperatura del inyector fue de 280°C, la temperatura inicial del horno fue de 100°C con una rapidez de calentamiento de 5°C por minuto, hasta llegar a una temperatura final de 295°C. Posteriormente, la identificación de los compuestos con un 95 % de confianza, se realizó por comparación computarizada con las librerías WILEY y NIST,

Ensayos biológicos

La actividad biológica del extracto y las fracciones de las hojas de *M. officinalis* se evaluó mediante el uso de los siguientes bioensayos:

Antibacterial activity. The presence of antibacterial compounds was detected using strains of certified bacteria: *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* (Gram positive); *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negative), following the agar diffusion technique or antibiogram method (Bauer et al., 1966). The antibiosis was verified by measuring the diameter (mm) of the inhibition zones around the 5 mm diameter discs. The diameters of the inhibition zones were evaluated, taking the methodology of crossings and the criteria exposed for extracts by some researchers of natural products area as a reference (Monks et al., 2002, Ríos et al., 2009).

Antifungal activity. Likewise, this biological activity was measured by inoculating with the strains of pathogenic fungi *Candida albicans*, *Penicillium* sp and *Mucor* sp, following the procedure described by Madubunyi (1995). The appearance of inhibition zones around the disc (5 mm) was indicative of the fungal activity of the extract or fraction, which were measured considering the diameter in mm.

Lethal activity. The degree of lethality or toxicity of the extracts and chromatographic fractions obtained was evaluated in larvae of *Artemia salina*, following the technique described by Meyer et al. (1982). Three replicas and one control with the same number of replicas were made for each concentration. The quantification of the nauplii mortality was carried out 24 hours after having assembled the bioassay. The results obtained of nauplii mortality were analyzed to calculate the median lethal concentration, through the application of LC₅₀ V2.5 software designed by Stephan (1977) for this purpose, which includes computerized statistical analysis methods (Probit, Binomial, Logit and Moving Average) with 95 % confidence limits.

Results and Discussion

The bioassays allowed to evaluate the effects of the hexane crude extract and some fractions obtained from chromatographic separation of *M. officinalis* extract on the microorganisms tested. The results obtained provided information about the bioactive fractions, in which the secondary metabolites causing the observed biological activity were found, and allowed to select the most bioactive fractions to be chemically characterized.

Actividad antibacteriana. La presencia de principios activos antibacterianos se detectó utilizando cepas de bacterias certificadas: *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* (Gram positivas); *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negativas), siguiendo la técnica de difusión en agar o método de antibiograma (Bauer et al., 1966). La antibiosis se verificó midiendo el diámetro (mm) de los halos de inhibición alrededor de los discos de 5 mm de diámetro. Se evaluaron los diámetros de los halos de inhibición, tomando como referencia la metodología de cruces y los criterios expuestos para extractos, por algunos investigadores del área de productos naturales (Monks et al., 2002; Ríos et al., 2009).

Actividad antifúngica. Igualmente, se midió esta la actividad biológica inoculándose con las cepas de hongos patógenos *Candida albicans*, *Penicillium* sp y *Mucor* sp, siguiendo el procedimiento descrito por Madubunyi (1995). La aparición de halos de inhibición alrededor del disco (5 mm), fue el indicativo de la actividad fúngica del extracto o fracción, los cuales se midieron tomando en cuenta el diámetro en mm.

Actividad letal. El grado de letalidad o toxicidad de los extractos y las fracciones cromatográficas obtenidas, fue evaluada en larvas del crustáceo *Artemia salina*, siguiendo la técnica descrita por Meyer et al. (1982). Por cada concentración, se realizaron tres réplicas y un control con igual número de réplicas. La cuantificación de la mortalidad de los nauplios se llevó a cabo pasadas las 24 horas de haber montado dicho bioensayo. Se analizaron los resultados obtenidos de mortalidad de los nauplios para calcular la concentración letal media, mediante la aplicación del software LC50 V2.5 diseñado por Stephan (1977) para tal fin, que comprende métodos de análisis estadísticos computarizados (Probit, Binomial, Logit y Moving Average) con límites de confianza de 95 %.

Resultados y discusión

Los bioensayos realizados permitieron evaluar los efectos del extracto crudo en hexano y algunas fracciones obtenidas en la separación cromatográfica de dicho extracto de *M. officinalis* sobre los microorganismos ensayados. Los resultados obtenidos proporcionaron información acerca de las fracciones bioactivas, donde posiblemente se encontraban los metabolitos secundarios causantes de la actividad biológica observada, permitiendo seleccionar las fracciones más bioactivas para ser caracterizadas químicamente.

Antimicrobial activity

The hexane crude extract showed a strong antibacterial effect against strains *S. aureus* (12 mm) and *P. aeruginosa* (14 mm) in the bioassay conducted against

Actividad antimicrobiana

En el bioensayo realizado contra diversas cepas microbianas (hongos y bacterias), el extracto crudo en hexano mostró un efecto antibacteriano fuerte frente a

Table 1.

Antimicrobial activity shown by the hexane extract and fractions of *M. officinalis* leaves against the strains used.

Tabla 1.

Actividad antimicrobiana mostrada por el extracto hexánico y fracciones de las hojas de *M. officinalis* frente a las cepas utilizadas.

Microorganism	ECH	FA	FB	FC	FD	FE
Bacteria:						
<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	++	+++	+++	+++	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+++	-	-	+	-	> +++
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	++	-	-	-
Fungus:						
<i>Mucor</i> sp	-	-	+++	-	-	-
<i>Penicillium</i> sp	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	+++	-	-	-

various microbial strains (fungi and bacteria); conversely, the bacteria *E. coli* and *B. cereus* did not show sensitivity to the hexane extract. Fractions B and C showed high antibacterial activity against *S. aureus* (13 and 11 mm respectively), while fraction B exhibited a moderate antibiosis against *B. cereus* (9 mm, antagonistic effect). Additionally, *P. aeruginosa* bacteria showed a slight sensitivity (7 mm) to fraction C; however, it showed a very strong bacterial sensitivity (15 mm) when being tested with fraction E (Table 1).

Diameters of the inhibition zones: (-) no antimicrobial activity (diameter <6 mm); (+) mild antimicrobial activity (diameter between 6-8 mm); (++) moderate antimicrobial activity (diameter between 8-10 mm); (+++) high or strong antimicrobial activity (diameter between 10-14 mm). ECH: crude extract in hexane. F: chromatographic fractions.

None of the fractions tested showed bactericidal action against *E. coli* bacteria; however, all fractions except fraction E, exhibited moderate to strong antibacterial activity against *S. aureus*. In addition, it was observed that both the hexane extract and the fractions did not present a fungicidal effect against some of the fungi used, with the exception of fraction B that exhibited a high antifungal activity against *Mucor* sp. (12 mm) and *C. albicans* (11 mm) fungal strains (Table 1).

las cepas *S. aureus* (12 mm) y *P. aeruginosa* (14 mm); al contrario, las bacterias *E. coli* y *B. cereus* no presentaron sensibilidad ante el extracto hexánico. Las fracciones B y C mostraron actividad antibacteriana alta contra *S. aureus* (13 y 11 mm respectivamente), mientras que la fracción B exhibió una antibiosis moderada frente a *B. cereus* (9 mm; efecto antagónico). Adicionalmente, se observó que la bacteria *P. aeruginosa* presentó una sensibilidad leve (7 mm) ante la fracción C; sin embargo, mostró una sensibilidad bacteriana muy fuerte (15 mm) ante la fracción E (Tabla 1).

Diámetros de los halos de inhibición: (-) ninguna actividad antimicrobiana (diámetro <6 mm); (+) actividad antimicrobiana leve (diámetro entre 6-8 mm); (++) actividad antimicrobiana moderada (diámetro entre 8-10 mm); (+++) actividad antimicrobiana alta o fuerte (diámetro entre 10-14 mm). ECH: extracto crudo en hexano. F: fracciones cromatográficas.

Ninguna de las fracciones ensayadas mostraron acción bactericida contra la bacteria *E. coli*; no obstante, todas las fracciones excepto la fracción E, exhibieron actividad antibacteriana de moderada a fuerte frente a *S. aureus*. Además, se observó que tanto el extracto en hexano como las fracciones, no presentaron un efecto fungicida contra alguno de los hongos utilizados, a excepción de la fracción B que exhibió una alta actividad antifúngica frente a las cepas de hongos *Mucor* sp. (12 mm) y *C. albicans* (11 mm) (Tabla 1).

These results indicate the existence of secondary metabolites with antibacterial and antifungal potential in the apolar extract of *M. officinalis*, and the biological activity observed may be due to the high concentration of those components in the fraction, as well as the presence of more than one bioactive compound in the extract. The apolar extract of *M. officinalis* showed an antibacterial effect against the Gram positive *S. aureus* and *P. aeruginosa* strains, and antifungal activity against *Mucor* sp and *C. albicans*; a similar result was obtained in a study carried out with polar extracts of stems and leaves of this plant, where these exhibited a bacteriostatic effect (zone of diffuse inhibition) against *S. aureus* and *S. epidermitis* bacteria, and *B. spizizenii* fungus (Mencherini et al., 2007).

Hancianu et al. (2008) reported on the cytotoxic activity and strong antibacterial (against Gram-positive strains) and antifungal activity against *Candida albicans* fungus, shown by *M. officinalis*; as well as Mimica-Dukic et al. (2004) reported the high antimicrobial activity of the essential oil of this species. These results are similar to those obtained in this research, in relation to the strong bacterial sensitivity exhibited by *S. aureus* (Gram-positive) when being tested with the hexane extract and chromatographic fractions. However, the hexane extract showed no antifungal activity and fraction B showed an antagonistic effect when presenting bioactivity against *C. albicans*, in accordance with that reported by Hancianu et al (2008) in the literature.

Lethal activity

The *in vivo* lethality of *Artemia salina* can be used as a mean for discrimination and fractionation in the discovery of new bioactive natural products; consequently, it is commonly used for the evaluation of natural products and pharmacological activity (Pino & Lazo, 2010). The presence of anticancer and antitumor compounds isolated from marine organisms has been reported, which previously showed toxic activity in the *A. salina* test. This is a simple bioassay that in some way correlates with cytotoxicity (Pino & Lazo, 2010).

The toxicity bioassay showed LC_{50} values of 78.82 $\mu\text{g/ml}$ for the hexane extract; 31.16; 29.06, and 731.08 $\mu\text{g/ml}$ for B, C, and D fractions (obtained by chromatographic separation), respectively (Table 2). The results obtained showed a very significant lethal activity for the hexane extract and B and C fractions,

Estos resultados indican la existencia de metabolitos secundarios con potencial antibacteriano y antifúngico en el extracto apolar de *M. officinalis* y la actividad biológica observada puede deberse a la alta concentración de dichos componentes en la fracción, así como a la presencia de más de un compuesto bioactivo en la misma. El extracto apolar de *M. officinalis* mostró un efecto antibacteriano contra las cepas Gram positiva *S. aureus* y *P. aeruginosa*, y antifúngico contra *Mucor* sp y *C. albicans*; resultado similar fue obtenido en un estudio realizado con extractos polares de tallos y hojas de esta planta, donde éstos exhibieron un efecto bacteriostático (halo de inhibición difuso) contra las bacterias *S. aureus* y *S. epidermitis*, y el hongo *B. spizizenii* (Mencherini et al., 2007).

Hancianu et al. (2008) informaron sobre la actividad citotóxica y actividad antibacteriana fuerte (contra cepas Gram-positivas) y antifúngica frente al hongo *Candida albicans*, mostrada por *M. officinalis*; así como Mimica-Dukic et al. (2004) reportaron la actividad antimicrobiana alta del aceite esencial de la especie en estudio. Dichos resultados son similares a los obtenidos en la presente investigación, en relación a la sensibilidad bacteriana fuerte exhibida por *S. aureus* (Gram-positiva) ante el extracto hexánico y fracciones cromatográficas. No obstante, el extracto hexánico no mostró actividad antifúngica y la fracción B mostró un efecto antagónico al presentar bioactividad contra *C. albicans*, en concordancia con lo reportado por Hancianu et al (2008) en la literatura.

Actividad letal

La letalidad *in vivo* del crustáceo *Artemia salina* puede ser usada como un medio para la discriminación y fraccionamiento en el descubrimiento de nuevos productos naturales bioactivos, por lo que es utilizado comúnmente para la evaluación de productos naturales y de actividad farmacológica (Pino & Lazo, 2010). Se ha reportado la presencia de compuestos anticancerígenos y antitumorales aislados de organismos marinos, los cuales previamente mostraron actividad tóxica en el ensayo de *A. salina*. Este es un bioensayo simple que en alguna forma se correlaciona con la citotoxicidad (Pino & Lazo, 2010).

El bioensayo de toxicidad mostró valores de CL_{50} de 78,82 $\mu\text{g/ml}$ para el extracto hexánico; 31,16; 29,06 y 731,08 $\mu\text{g/ml}$ para las fracciones B, C y D (obtenidas por separación cromatográfica) respectivamente (Tabla 2). Los resultados obtenidos mostraron una actividad letal muy significativa

which shows a significant toxicity (Meyer *et al.*, 1982) for this species and leads to presume the existence of compounds or secondary metabolites with a high cytotoxic activity. Probably, the observed mortality is due to the fact that the extracts increase the rate of oxygen consumption; as a result, the physiological processes act to compensate for the toxic stress, when the animal is exposed to a toxic agent, causing alterations that can lead to death of the organism.

According to reports in the literature, values of LC_{50} <1000 $\mu\text{g/ml}$ are considered toxic and there is a good correlation with anti-cancer cell lines of type 9KB (human nasopharyngeal carcinoma) and 9SP (leukemia) when LC_{50} shows values less than or equal to 30 $\mu\text{g/ml}$, so that the extract or bioactive compounds that constitute a particular

para el extracto hexánico y las fracciones B y C, lo cual evidencia una toxicidad significativa (Meyer *et al.*, 1982) para esta especie y conduce a presumir la existencia de compuestos o metabolitos secundarios con una alta actividad citotóxica. Probablemente, la mortalidad observada se deba a que los extractos hacen que aumente la tasa de consumo de oxígeno, así cuando el animal es expuesto a un agente tóxico, los procesos fisiológicos actúan para compensar el estrés tóxico, provocando alteraciones que pueden llevar hasta la muerte del organismo.

Según reportes en la literatura, valores de CL_{50} < 1000 $\mu\text{g/ml}$ se consideran tóxicos y para CL_{50} menores o igual a 30 $\mu\text{g/ml}$ se tiene una buena correlación con líneas celulares anticancerígenas del tipo 9KB (carcinoma nasofaríngeo humano) y 9SP (leucemia), por lo que el extracto o compuestos bioactivos que constituyen una especie en

Table 2.
Lethal or toxic activity of the hexane extract and fractions of *M. officinalis* leaves against *Artemia salina*.

Tabla 2.
Actividad letal o tóxica del extracto hexánico y fracciones de las hojas de *M. officinalis* frente al crustáceo *Artemia salina*.

Extract or fraction	Statistical method	LC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) (24 h)
ECH	Binomial	78.82
FA	-	-
FB	Binomial	31.16
FC	Binomial	29.06
FD	Logit	731.08
FE	-	-

(LC_{50}): median lethal concentration; (-): high concentration (>1000 $\mu\text{g/ml}$); ECH: crude extract in hexane. F: chromatographic fractions.

species can exhibit an important cytotoxic potential (Carballo *et al.*, 2002); which makes *M. officinalis* a source of chemical compounds with possible antitumor activity.

This study provides interesting results, since investigations of acute toxicity against *Artemia* in the botanical parts of *M. officinalis* are almost non-existent. Nonetheless, there is research on the chemical composition and bioactivity of the essential oil of *M. officinalis* leaves, where its significant cytotoxic activity is reported (Hancianu *et al.*, 2008).

particular pueden exhibir un potencial citotóxico importante (Carballo *et al.*, 2002); lo cual hace a *M. officinalis* una fuente de compuestos químicos con posible actividad antitumoral.

Este estudio proporciona resultados de interés, ya que investigaciones de toxicidad aguda contra *Artemia* de las partes botánicas de *M. officinalis*, son casi inexistentes. A pesar de que existe una investigación sobre la composición química y bioactividad del aceite esencial de las hojas de *M. officinalis*, donde se reporta una actividad citotóxica significativa para el mismo (Hancianu *et al.*, 2008).

Characterization of fraction B

Fraction B was obtained as a beige solid in very little quantity, and was considered the most bioactive fraction. It was decided to analyze this fraction by GC/MS

Caracterización de la fracción B

Se obtuvo en muy poca cantidad, como un sólido beige, y se consideró la fracción más bioactiva. Debido a que esta fracción presentó actividad antibacteriana fuerte y

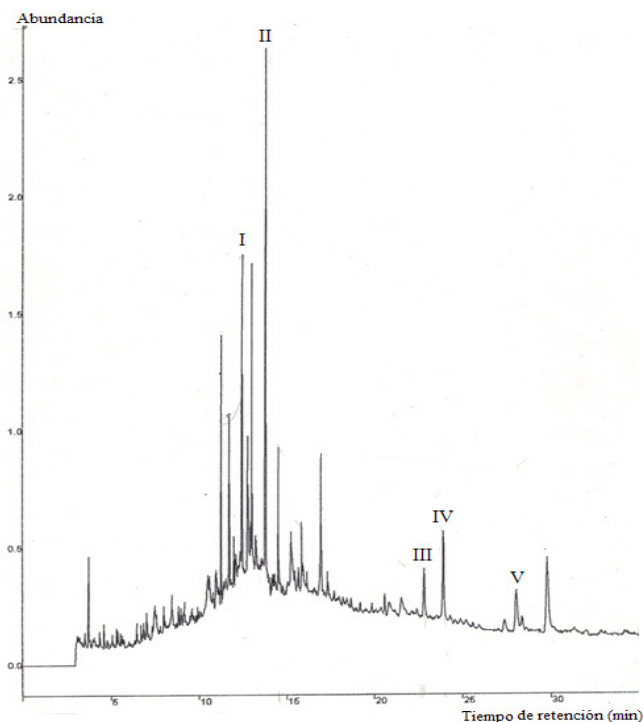


Figure 1. Gas chromatogram of fraction B.

Figura 1. Cromatograma de gases de la fracción B.

since it showed strong and moderate antibacterial activity against *S. aureus* and *B. cereus*, respectively, displayed strong antifungal activity against *Mucor* sp and *C. albicans* strains, exhibited a very significant LC_{50} of 31.16 $\mu\text{g/ml}$, and did not show a good separation of its constituents on TLC. The gas chromatography of this fraction (Figure 1) showed the presence of several compounds, the following being identified: 7,9-di-tert-butyl-1-oxaspiro [4,5] deca-6,9-diene-2,8-dione (I, RT= 12.43 min), docosanol (II, RT= 13.75 min) as the major compound, a mixture of sterols (III, RT= 22.81 and V, RT= 29.77 min), and a fatty acid ester of a sterol (IV, RT= 28.03 min).

The mass spectrum of 7,9-di-tert-butyl-1-oxaspiro [4,5] deca-6,9-diene-2,8-dione (I, RT=12.43 min) displayed a molecular ion at m/z 276 [M^+], according to the molecular formula $C_{17}H_{24}O_3$, and the corresponding fragments to

moderada contra *S. aureus* y *B. cereus* respectivamente, mostró actividad antifúngica fuerte contra las cepas *Mucor* sp y *C. albicans*, exhibió una CL_{50} muy significativa de 31,16 $\mu\text{g/ml}$ y no mostró una buena separación de sus constituyentes en la CCF, se decidió analizarla por CG/EM. La cromatografía de gases de esta fracción (Figura 1), mostró la presencia de varios compuestos, siendo identificados los siguientes: 7,9-di-tert-butyl-1-oxaspiro [4,5] deca-6,9-dieno-2,8-diona (I, TR=12,43 min), docosanol (II, TR=13,75 min) como compuesto mayoritario, una mezcla de esteroides (III, TR=22,81 y V, TR=29,77 min) y un éster de ácido graso de un esteroide (IV, TR=28,03 min).

El espectro de masas del 7,9-di-tert-butyl-1-oxaspiro [4,5] deca-6,9-dieno-2,8-diona (I, TR=12,43 min) desplegó un ión molecular a m/z 276 [M^+], en concordancia con la fórmula molecular $C_{17}H_{24}O_3$, y los fragmentos correspondientes a los

the most abundant ion peaks at m/z 261, 206, 175, 135, 109, 91, and 57 (base peak). This ketone has not been reported in species of the Lamiaceae family; this is the first report of this compound from a plant belonging to that family. There is no information in the literature about some type of pharmacological activity related to this compound; however, it was identified in the apolar extract of rice by GC/MS, in an investigation of allelopathic activity of this cereal (Murillo, 2006).

The mass spectrum of docosanol (II, RT= 13.75 min) exhibited a molecular ion at m/z 308 $[M^+]$, which corresponds to the molecular formula $C_{22}H_{46}O$ and the fragments of the most abundant peaks at m/z 97 and 43 (base peak). This saturated fatty alcohol, used mainly as an anti-viral agent, is the active ingredient of topical creams used for the treatment of diseases caused by the herpes simplex virus and works by inhibiting the fusion of the human host cell with the viral envelope of the herpes virus, preventing replications. Docosanol was reported as one of the fatty acids of the *Nicotiana tabacum* L plant in a study conducted by Sacks *et al.* (2001), and, in addition, the allelopathic activity of this species was reported.

The mass spectrum of sterol 4,4,10,13,17-pentamethyl-17-(1,5-dimethylhexyl)-cholest-8,14-dienyl (III, RT = 22.81 min) showed a molecular ion at m/z 468 $[M^+]$, corresponding to the molecular formula $C_{32}H_{52}O_2$, and the peaks of the most abundant fragments were observed at m/z 393, 355, 295, 239, 159, 119 and 43 (base peak). The mass spectrum of the other compound identified as 4, 4,17-trimethyl cholest-8,14-dien-3-yl dodecanoate (IV, RT= 28.03) exhibited a molecular ion at m/z 608 $[M^+]$, which corresponds to the molecular formula $C_{42}H_{72}O_2$, and the peaks of the most abundant fragments were observed at m/z 564, 489, 409, 393, 375 (base peak), 355, 269, 230, 207, 145 and 55. While that of 4, 4-dimethyl-cholesta-8, 14, 24-trien-3-ol (V, RT = 29.77 min), displayed a molecular ion at m/z 410 $[M^+]$ in accordance with the molecular formula $C_{29}H_{46}O$ and the peaks of the most abundant mass fragments were observed at m/z 396, 382 (base peak), 355, 330, 304, 270, 228, 145 and 41.

The presence of 4,4,17-trimethyl cholest-8,14-dien-3-yl dodecanoate in *M. officinalis* leaves is of medicinal importance since it has been shown that the fatty acids esters of plant sterols decrease the levels of LDL-

picos de los iones más abundantes a m/z 261, 206, 175, 135, 109, 91 y 57 (pico base). Esta cetona no ha sido reportada en especies de la familia Lamiaceae; siendo este el primer reporte de este compuesto en una planta perteneciente a dicha familia. No existe información en la literatura de algún tipo de actividad farmacológica relacionada con este compuesto; sin embargo, el mismo fue identificado mediante CG/EM en el extracto apolar del arroz, en una investigación sobre la actividad alelopática que posee este cereal (Murillo, 2006).

El espectro de masas del docosanol (II, TR= 13,75 min) exhibió un ión molecular a m/z 308 $[M^+]$, que corresponde a la fórmula molecular $C_{22}H_{46}O$ y los fragmentos de los picos más abundantes a m/z 97 y 43 (pico base). Este alcohol graso saturado, utilizado principalmente como agente antiviral, es el ingrediente activo de una crema de uso tópico específica para el tratamiento de enfermedades causadas por el virus del herpes simple y funciona inhibiendo la fusión de la célula huésped humana con la envoltura viral del virus del herpes, previniendo las réplicas. En un estudio realizado por Sacks *et al.* (2001), docosanol fue reportado como uno de los ácidos grasos de la planta *Nicotiana tabacum* L y, además, se informó sobre la actividad alelopática de esta especie vegetal.

En el espectro de masas del esteroide 4,4,10,13,17-pentametil-17-(1,5-dimetilhexil)-colest-8,14-dienilo (III, TR = 22,81 min), se observó un ión molecular a m/z 468 $[M^+]$, correspondiente a la fórmula molecular $C_{32}H_{52}O_2$, y los picos de los fragmentos más abundantes se observaron a m/z 393, 355, 295, 239, 159, 119 y 43 (pico base). El espectro de masas del otro compuesto identificado como 4, 4,17- trimetilcolest-8,14- dien-3-il dodecanoato (IV, TR = 28,03) exhibió un ión molecular a m/z 608 $[M^+]$, el cual corresponde con la fórmula molecular $C_{42}H_{72}O_2$, y los picos de los fragmentos más abundantes se observaron a m/z 564, 489, 409, 393, 375 (pico base), 355, 269, 230, 207, 145 y 55. Mientras que el del 4,4-dimetil-colesta-8, 14,24-trien-3-ol (V, TR = 29,77 min), desplegó un ión molecular a m/z 410 $[M^+]$ en concordancia con la fórmula molecular $C_{29}H_{46}O$ y los picos de los fragmentos de masas más abundantes se observaron a m/z 396, 382 (pico base), 355, 330, 304, 270, 228, 145 y 41.

La presencia del 4, 4,17-trimetilcolest-8,14-dien-3-il dodecanoato, en las hojas de *M. officinalis* es de importancia medicinal, ya que en investigaciones realizadas, se demostró que los ésteres de ácidos grasos de esteroides vegetales no solo disminuyen los niveles de colesterol-LDL

cholesterol and triacylglycerols in the blood (Arnqvist, 2007); as well as the efficacy of phytosterols as medium reduction agents in low density lipoproteins was reported (Eldin & Moazami, 2006).

Although no specific biological activities of natural sterols or phytosterols are known, besides the biological functions mentioned above, it has been shown that they also have immune-modulatory, anti-inflammatory, antitumor, bactericidal and fungicidal properties (Muñoz *et al.*, 2011). Research has shown that aromatic plants (including those of the Lamiaceae family) respond differently to the environment, biosynthesizing chemical families with diverse biological activities in different proportions for their ecological interaction (Ordaz *et al.*, 2011).

Conclusions

The apolar extract of *M. officinalis* L. exhibited a strong antibacterial activity against strains of *S. aureus* and *P. aeruginosa*, as well as a significant lethality (LC₅₀ of 78.82 µg/ml) against *Artemia salina*. Meanwhile, the chromatographic fraction B showed strong and moderate antibacterial activity against *S. aureus* and *B. cereus*, respectively, strong antifungal activity against *Mucor* sp and *C. albicans* fungi, and a very significant toxic activity (LC₅₀ = 31.16 µg/ml).

The leaves of *M. officinalis* L. cultivated in Ecuador are a promising source of bioactive compounds with pharmacological activity (antimicrobial and cytotoxic or antitumor).

Acknowledgment

The authors wish to express their gratitude to the Prometheus Project of *Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia y Tecnología* of the Republic of Ecuador (SENESCYT) for their research funding and *Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas* (IVIC) for the gas chromatography analysis with mass detector.

References

- Arnqvist, L. (2007). Plant sterol metabolism with emphasis on glycoalkaloid biosynthesis in potato. (PhD Thesis). Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala, Sweden. 1-50pp. <https://pub.epsilon.slu.se/1634/>
- Bauer, A., Kirby, A., Sherris, J. and Turk, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathol.*, 45(4): 493-496. https://doi.org/10.1093/ajcp/45.4_ts.493

en la sangre, sino los niveles de triacilglicerolos (Arnqvist, 2007); así como se reportó la eficacia de los fitoesteroles como agentes de reducción media en lipoproteínas de baja densidad (Eldin & Moazami, 2006).

Aunque a los esteroles naturales o fitoesteroles no se les conocen actividades biológicas específicas fuera de las funciones biológicas citadas anteriormente, se ha demostrado que poseen además propiedades: inmuno-moduladoras, antiinflamatorias, antitumorales, bactericidas y fungicidas (Muñoz *et al.*, 2011). Estudios han demostrado que las plantas aromáticas (entre ellas se encuentran las de la familia Lamiaceae), responden de forma distinta al medio ambiente, biosintetizando familias químicas con diversas actividades biológicas en proporciones diferentes para su interacción ecológica (Ordaz *et al.*, 2011).

Conclusiones

El extracto crudo apolar de *M. officinalis* L. exhibió una actividad antibacteriana fuerte frente a las cepas *S. aureus* y *P. aeruginosa*, así como una letalidad significativa (CL₅₀ de 78,82 µg/ml) contra *Artemia salina*. Mientras que, la fracción cromatográfica B presentó actividad antibacteriana fuerte y moderada contra *S. aureus* y *B. cereus* respectivamente, actividad antifúngica fuerte frente a los hongos *Mucor* sp y *C. albicans*, y una actividad tóxica muy significativa (CL₅₀ = 31,16 µg/ml).

Las hojas de la especie *M. officinalis* L. cultivada en Ecuador, son una fuente promisoría de compuestos bioactivos con actividad farmacológica (antimicrobianos y citotóxicos o antitumorales).

Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento al Proyecto Prometeo de la *Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia y Tecnología* de la República de Ecuador (SENESCYT) por el financiamiento de esta investigación y al *Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas* (IVIC) por permitir la realización de los análisis de cromatografía de gases con detector de masas.

- Caniova, A. & Brandsteterova, E. (2001). HPLC Analysis of Phenolic Acids in *Melissa officinalis*. *J Liq. Chromatogr. Relat. Technol., Journal of liquid chromatography & related technologies* 24: 2647-2659. <https://doi.org/10.1081/JLC-100106092>
- Carballo, J., Hernández, Z., Pérez, P. and García, D. (2002). A comparison between two brine shrimp assay to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. *Biotechnology*, 2: 17-21. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-2-17>
- De Sousa, A. C., Alviano, D. S., Blank, A.F., Alves, P.B., Alviano, C.S. and Gattass, C. R. (2004). *Melissa officinalis* L essential oil: antitumoral and antioxidant activities. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 56: 677-681. <https://doi.org/10.1211/0022357023321>
- Eldin, A. & Moazzami, A. (2009). Plant sterols and stanols as cholesterol-lowering ingredients in functional foods. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*. 1(1): 1-14. <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/pfna/2009/00000001/00000001/art00001#Refs>
- Geuenich, S., Goffinet, S., Venzke, S., Nolkemper, S., Baumann, I., Plinkert, P., Reichling, J. and Keppler, O.T. (2008). Aqueous extract from peppermint, sage and lemon balm leaves display potent anti- HIV-1 activity by increasing the virion density. *Retrovirology*, 5: 27. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-5-27>
- Hancianu, M., Aprotosoiaie, A., Gille, E., Poiata, A., Tuchilus, C., Spac, A. and Stanescu, U. (2008). Chemical composition and *in vitro* antimicrobial activity of essential oil of *Melissa officinalis* L. from Romania. *Revista Medico- Chirurgica a Societati de Medici si Naturalisti din Iasi.*, 112(3): 843-847. <https://europemc.org/abstract/med/20201279>
- Herodez, S.S., Hadolin, M., Skerget, M. and Knez, Z. (2003). Solvent extraction study of antioxidants from balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *Food Chemistry*, 80(2): 275-282. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00382-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00382-5)
- Hossain, M.A., Kim, S., Kim, K.H., Lee, S.J. and Lee, H. (2009). Flavonoids compounds are enriched in lemon balm (*Melissa officinalis*) leaves by a high level of sucrose and confer antioxidant activity. *American Society for Horticultural Science*, 44: 1907-1913. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.44.7.1907>
- Hussain, A.I., Anwar, F., Iqbal, T. and Bhatti, I.A. (2011). Antioxidant attributes of four Lamiaceae essential oils. *Pak. J. Bot.*, 43(2): 1315-1321. [http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/43\(2\)/PJB43\(2\)1315.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/43(2)/PJB43(2)1315.pdf)
- Kennedy, D., Little, W., Haskell, C. and Sholey, A.B. (2006). Anxiolytic effects of a combination of *Melissa officinalis* and *Valeriana officinalis* during laboratory induced stress. *Phytotherapy Research.*, 20(2): 96-102. <https://doi.org/10.1002/ptr.1787>
- Madubunyi, I. (1995). Antimicrobial activities of the constituents of *Garcinia kola* seeds. *International Journal of Pharmacognosy*. 33: 232-237. <https://doi.org/10.3109/13880209509065369>
- Marongiu, B., Porcedda, S., Piras, A., Rosa, A., Deiana, M. and Dessi, M.A. (2004). Antioxidant activity of supercritical extract of *Melissa officinalis* subsp. officinalis and *Melissa officinalis* subsp. inodora. *Phytotherapy Research*. 18: 789-792. <https://doi.org/10.1002/ptr.1549>
- Mencherini, T., Picerno, P., Scesa, C. and Aquino, R. (2007). Triterpene, Antioxidant, and Antimicrobial Compounds from *Melissa officinalis*. *Journal of Natural Products*. 70(12): 1889-1894. <https://doi.org/10.1021/np070351s>
- Meyer, B., Ferrigni, N., Putnam, J., Jacobsen, L., Nicols, D. and McLaughlin, J. (1982). Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45: 31-34. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971236>
- Mimica-Dukic, N., Bozin, B., Sokovic, M. and Simin, N. (2004). Antimicrobial and antioxidant activities of *M. officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 52: 2485-2489. <https://doi.org/10.1021/jf030698a>
- Monks, N., Lerner, C., Henriques, A., Farias, F., Schapoval, E., Suyenaga, E., Da Rocha, A., Schwartzmann, G. and Mothes, B. (2002). Anticancer, antichemotactic and antimicrobial activities of marine sponges collected off the coast of Santa Catarina, Southern Brazil. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 281: 1-12. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(02\)00380-5](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(02)00380-5)
- Muller, S.F. & Klement, S. (2006). A combination of valerian and lemon balm is effective in the treatment of restlessness and dyssomnia in children. *Phytomedicine*, 13: 383-387. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2006.01.013>
- Muñoz, A.M., Alvarado-Ortiz, U.C. and Encina, Z.C. (2011). Fitoesteroles y Fitoestanoles: Propiedades saludables. *Revista Horizonte Medico*, 11(2): 93-100. http://www.medicina.usmp.edu.pe/medicina/horizonte/2011_2/Art6_Vol11_N2.pdf
- Murillo, E., Vina, A., Pérez, C. and Ruiz, V. (2006). Actividad alelopática de las arvenses asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.) en el Tolima-Colombia. *Informacion Tecnologica*, 17: 15-24. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642006000200004>

- Ordaz, G., D'Armas, H., Yáñez, D. and Moreno, S. (2011). Composición química de los aceites esenciales de las hojas de *Helicteres guazumifolia* (Sterculiaceae), *Piper tuberculatum* (Piperaceae), *Scoparia dulcis* (Arecaceae) y *Solanum subinerme* (Solanaceae), recolectadas en Sucre, Venezuela. *Revista. Biol. Trop*, 59(2): 585-595. <https://www.redalyc.org/html/449/44922367005/>
- Patora, J. & Klimek, B. (2002). Flavonoids from lemon balm (*Melissa officinalis* L., Lamiaceae). *Acta Pol Pharm.*, 59: 139-143.
- Picada, R., Fachineto, E., de Souza, A., Luiz, R., Santos, G., Heinzmann, B., Krapf, T., Athayde, M., Escobar, M., Farias, A., Morsch, V. and Teixeira, J. (2009). Antioxidant Effects of Different Extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*. *Neurochemical Research*, 34: 973–983. <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9861-z>
- Pino, O. & Lazo, F. (2010). Ensayo de *Artemia*: útil herramienta de trabajo para Ecotoxicólogos y Químicos de productos naturales. *Revista Protección Vegetal*, 22: 34-43. http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-27522010000100008&script=sci_arttext&lng=pt
- Ríos, N., Medina, G., Jiménez, J., Yáñez, C., García, M., Di Bernardo, M. and Guaitia, M. (2009). Actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de algas venezolanas. *Revista Peruana de Biología*, 16: 097-100. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1727-99332009000100012&script=sci_arttext
- Sacks, S., Thisted, R., Jones, T., Barbarash, R. and Mikolich, D. (2001). Clinical efficacy of topical docosanol 10% cream for herpes simplex labialis: a multicenter, randomized, placebo controlled trial. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 45: 222-230. <https://doi.org/10.1067/mj.2001.116215>
- Stephan, C. (1977). Methods for calculating in LC₅₀. In *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*. Mayer FL and Hamelink J, eds. 54-68 pp. Philadelphia, EEUU. American Society for Testing and Materials. <https://doi.org/10.1520/STP32389S>
- WHO. (World Health Organization) (2002). *Monographs on Selected medicinal plants*, Vol. 2. <http://apps.who.int/medicine-docs/pdf/s4927e/s4927e.pdf> [Last checked february 10th 2017].