

Efecto *in vitro* del aceite de romero (*Rosmarinus officinalis*) sobre la actividad de la acetilcolinesterasa como terapia alternativa

Nayely Carrasco-Nuñez* • Marisa Cabeza Salinas* •
María Luisa de Lourdes Pérez- González*

RESUMEN

En los últimos años las plantas medicinales han adquirido gran relevancia por sus propiedades químicas, bioquímicas y organolépticas que les permiten ser un coadyuvante terapéutico alternativo. El *Rosmarinus officinalis*, mejor conocido como aceite de romero, es una planta cuyas propiedades a partir de la aromaterapia (aceites esenciales inhalados) le atribuyen terapéuticas específicas, tales como antioxidante, antiviral, antidepresivo, diurético, antiinflamatorio, gastrointestinal, entre otros.

El presente trabajo tiene como objetivo presentar el efecto del aceite de romero y de sus componentes (α -pineno y 1,8 cineol), como inhibidores de la actividad *in vitro* de la acetilcolinesterasa. Esta enzima cataliza la hidrólisis de la acetilcolina en las terminales colinérgicas, por lo cual, en algunas demencias, donde este neurotransmisor se encuentra disminuido, como en el Síndrome de Alzheimer, la inhibición de la actividad catalítica de esta enzima, podría ser una ruta alternativa para el control de esta enfermedad.

La concentración de α -pineno y 1,8 cineol necesaria para inhibir el 50 % de la actividad de la acetilcolinesterasa (CI_{50}), se determinó a partir de un gráfico de concentración *versus* actividad. Los resultados mostraron que el α -pineno es más potente que el 1,8 cineol y el aceite de romero, para inhibir su actividad, sin embargo, todos fueron eficaces para inhibir la actividad de esta enzima. Dados estos resultados, se propone el uso del aceite de romero como una terapia potencial para mejorar la cognición en los enfermos de Alzheimer. Sin embargo, este estudio demuestra que en México se distribuyen diferentes marcas de aceites de romero que no contienen los componentes auténticos de éste.

PALABRAS CLAVE: Síndrome de Alzheimer, aceite de romero, acetilcolinesterasa, terapéutica alternativa.

* Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

Dirigir correspondencia a: Dra. Marisa Cabeza Salinas marisa@correo.xoc.uam.mx

Fecha de recepción: 29 de enero de 2019.

Fecha de aceptación: 25 de febrero de 2020.

***In vitro* effect of rosemary oil (*Rosmarinus officinalis*) as inhibitor of acetylcholinesterase activity as an alternative therapy in Alzheimer's Syndrome**

ABSTRACT

Medicinal plants have acquired great relevance in recent years for their chemical, biochemical, and organoleptic properties that allow them to be an alternative therapeutic adjuvant. *Rosmarinus officinalis*, better known as rosemary oil, is a plant whose aromatherapeutic properties (inhaled essential oils) give it a potential such as antioxidant, antiviral, antidepressant, diuretic, anti-inflammatory, gastrointestinal, among others.

The aim of this study was to demonstrate inhibitory effect of rosemary oil and its components (α -pinene y 1,8 cineol) in *in vitro* acetylcholinesterase activity. This enzyme is present in cholinergic nerve terminals and is important in Alzheimer disease, because acetylcholine is decreasing in this syndrome. Thus, inhibition of this enzyme could be a therapeutic target to control this illness α -Pinene y 1,8 cineol concentration to constrain acetylcholinesterase activity by 50% (IC_{50}) was determined from plots of concentration *versus* enzyme activity. These data showed α -pinene was stronger than 1,8 cineol and rosemary oil to inhibit its *in vitro* activity. However, they were all effective in preventing the activity of acetylcholinesterase, so this oil has therapeutic potential to treat Alzheimer's disease. However, this study shows that in Mexico, different brands of Rosemary oils distributed that do not contain the authentic components of it.

KEYWORDS: Alzheimer disease, rosemary oil, α -pinene y 1,8 cineol, acetylcholinesterase, alternative therapy.

Introducción

El Síndrome de Alzheimer (EA) afecta a más de 47.5 millones de personas en el mundo, atribuyendo a esta enfermedad el 60% o 70% del deterioro mental más común en personas mayores de 65 años (World Alzheimer Report AD, 2010).

La EA es un proceso neurodegenerativo, lento y progresivo, caracterizado por un deterioro paulatino de las funciones cognitivas e intelectuales, que se traduce en pérdida de memoria e incapacidad del individuo afectado para realizar por sí mismo las actividades vitales rutinarias. Puede presentarse también un cuadro de ansiedad, irri-

tabilidad, depresión y/o alucinaciones (Alberca, 2007).

Los cambios más significativos que se observan en el cerebro de estos pacientes, son de naturaleza bioquímica, como el aumento de la proteína precursora de péptido amiloide (placas seniles), la hiperfosforilación de la proteína *tau* (ovillos neurofibrilares) y la reducción de acetilcolina (Álvarez et. al., 2008:196). Estudios de mapeo neuroquímico han sugerido que la mayor proyección colinérgica a la corteza, en los pacientes con Alzheimer, se encuentra deteriorada ya que existe

una amplia pérdida de neuronas colinérgicas en el núcleo de Meynert (2008:196; Ozarowski et. al., 2013:261). Algunas evidencias experimentales (Alberca, 2007; Meynert, 2008:196) sugieren que la prolongación de la disponibilidad de acetilcolina liberada en la hendidura sináptica neuronal, puede mejorar la función colinérgica en el EA. Estos datos han inspirado a los investigadores para la búsqueda de inhibidores del hidrólisis de acetilcolina, reacción catalizada por la acetilcolinesterasa (Meynert, 2008:196).

El cerebro humano contiene dos formas principales de colinesterasa: la acetilcolinesterasa (AChE) y la butirilcolinesterasa (BuChE). La AChE se localiza principalmente en las neuronas y la BuChE se asocia principalmente con las células gliales, así como células endoteliales y las neuronas (Meynert, 2008:196).

La mayoría de los fármacos aprobados por la FDA para controlar la EA, como la tacrina, donepezilo, rivastigmina, galantamina, contrarrestan el déficit colinérgico asociado con la disfunción cognitiva, inhibiendo la enzima AChE; sin embargo, estos fármacos pueden producir efectos adversos como hepatotoxicidad (tacrina;) e hiperactividad colinérgica periférica, debida a la hiperestimulación muscarínica, lo que provoca náuseas, vómitos, diarreas, calambres abdominales e hipersecreción glandular. Por esta razón muchos grupos de investigación siguen buscando alternativas para mejorar la terapéutica para esta enfermedad (Savelev et. al., 2003: 283).

Diferentes estudios epidemiológicos, han demostrado que realizar aromaterapia, utilizando algunos aceites esenciales a pacientes con severos problemas cognitivos como lo es el síndrome de Alzheimer tienen un efecto positivo mejorando la

atención disminuyendo su agitación y un resultado sedativo (Jimbo et. al., 2009:173; Ballard et. al., 2002:553; Smallwood et al. 2001:1010). Sin embargo, su efecto sobre el sistema nervioso no ha sido lo suficientemente esclarecido.

Se conoce que los aceites esenciales obtenidos a partir de las plantas de las especies conocidas como: *Salvia oficial*, *Salvia lavandulifolia*, *Hinojo*, *Bandera dulce*, *Aceite del árbol de té* y *Romero*., han demostrado tener una actividad neuroprotectora, manteniendo los niveles de acetilcolina en el surco sináptico. Este dato sugiere que su mecanismo de acción es a través de la inhibición de la actividad de la acetilcolinesterasa (Martínez, 2003; Perry et. al., 1996: 1063; Miyazawa et.al., 2001:205; Irie and Keung, 2003: 283; Savelev et. al., 2004:315; Joshi y Parle, 2006: 413; Miyazawa et al., 1997:677).

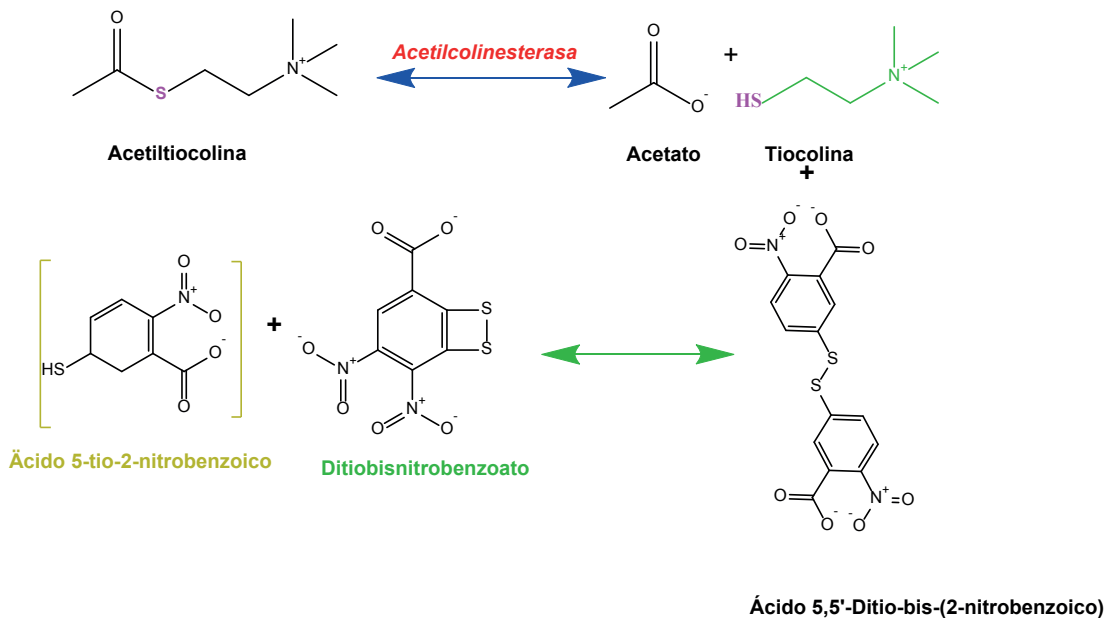
En 2008, Orhan y colaboradores (2008:663) demostraron que el aceite de *Rosmarinus officinalis l*, mejor conocido como *aceite de romero*, compuesto por un 44.4 % de 1,8 cineol y un 12.6 % α -pineno, presentan un efecto sobre la actividad *in-vitro* de la AChE.

Materiales y Métodos

Purificación del aceite comercial de romero

Se utilizaron 5 marcas comerciales de aceite de romero vendidas en 5 farmacias diferentes dentro de la Ciudad de México, sin certificado de autenticidad. Aunque el certificado de autenticidad para probar la originalidad de una sustancia no es requisito obligatorio para su venta, es una formalidad en la Industria Farmacéutica con beneficios tanto para quien vende para quien la compra. La certificación la realiza una entidad acreditada y

Figura 1. Hidrólisis *in vitro* de la acetiltiocolina en presencia de acetilcolinesterasa y DNTB



con personal técnico altamente cualificado. Este dato añade un valor adicional al incremento de competitividad en las organizaciones, que la propia adopción del modelo ISO 9001 ya proporciona con sus requisitos¹

En el presente estudio se demostró que solamente el aceite de romero importado y distribuido por Sigma-Aldrich®, México, con certificado de análisis, contiene 1,8 cineol y α - pineno, mientras que los vendidos y etiquetados en 5 farmacias de la Ciudad de México (con distintas marcas y sin certificado de análisis) como aceite de romero no contienen dichos componentes a pesar de que en México se produce y distribuye y se vende para distintos objetivos sin que contenga estos aceites esenciales. Por estas razones, en este trabajo se

¹ https://spanish.alibaba.com/trade/search?SearchText=fabricantes+de+aceites+esenciales&selectedTab=products&src=sem_ggl&mark=shopping&cmpg

utilizó solamente el aceite de romero importado de los Estados Unidos y distribuido por Sigma-Aldrich®, México (con certificado de autenticidad) con la finalidad de certificar su contenido.

Todos los aceites se sometieron al mismo tipo de destilación simple, utilizando un aparato de Quickfit. Se separaron las diferentes fracciones por su punto de ebullición; para el 1,8 cineol 176°C-177°C y para el α -pineno 155°C-156°C. La pureza de cada una de estas fracciones se comprobó por cromatografía en capa fina (HPTLC sílice gel 60 F₂₅₄, Merck, México), comparando el valor de los factores de retención (Rf) de cada una de las manchas obtenidas en el cromatograma, con un estándar de referencia, vendido por

Sigma-Aldrich® México. (Skoog, 2001) Estos cromatogramas se eluyeron un sistema de solventes de ciclohexano: acetato de etilo=1:1 y se

revelaron con una solución de ácido fosfomolibdico (Sigma-Aldrich®, México) al 2% en etanol, aplicada a la placa utilizando un aspersor.

El valor de los parámetros cinéticos (K_m y de V_{max}) de la acetilcolinesterasa se determinaron a partir de los gráficos de concentración de acetiltiocolina *versus* tiocolina formada, por el método de Lineweaver-Burck.

Para llevar a cabo la reacción de incubación (Figura 1), se colocaron en tubos diferentes concentraciones de acetiltiocolina como sustrato (Sigma-Aldrich®, México; $1,6 \times 10^{-5}$ M, $2,5 \times 10^{-5}$ M, $4,1 \times 10^{-5}$ M, $8,8 \times 10^{-5}$ M, $1,68 \times 10^{-4}$ M, $2,76 \times 10^{-4}$ M, $3,45 \times 10^{-4}$ M y $3,81 \times 10^{-4}$ M en acetona). La acetona se evaporó a sequedad y se agregó un mL de solución tampón Tris-BSA 0.1 M, conteniendo: 40 mM de $MgCl_2$, 100 mM de NaCl y albúmina sérica bovina al 1%. El pH de la reacción se mantuvo en 7.5 (óptimo para la actividad de la acetilcolinesterasa) (Ellman y Courthney, 1961: 88) y la reacción comenzó al agregar AChE en concentración de 0.345 UI/mL (Sigma-Aldrich®, México) previamente determinada para esta reacción. El tubo se mantuvo a baño María a una temperatura de 37°C por 1 min. Finalmente se añadieron 0.125 mL del colorante DTNB (Sigma-Aldrich®) preparado previamente a una concentración 3 mM en etanol absoluto. La producción de tiocolina se midió por la absorbancia producida por el color amarillo de las soluciones a una longitud de onda 412 nm.

Para determinar los valores de concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) para el aceite de romero (Sigma-Aldrich®, México, con certificado de análisis), el 1,8 cineol y α - pineno, se prepararon tubos conteniendo diferentes concentraciones de estas sustancias (1:1 a 1:10000) disueltas en etanol, además de la acetiltiocolina en una concentración

de 378.1 μ M (K_m) y la AChE como se indicó en la sección 2.2.1; las condiciones de incubación y determinación del producto fueron las mismas descritas en 2.2.1. Los resultados obtenidos se graficaron por el método de Dixon; utilizando el Programa Sigma Plot 12®, con la finalidad de determinar gráficamente los valores de CI_{50} .

Resultados

Componentes del aceite comercial de romero

A pesar de que la preparación de aceites esenciales se rige por las normas mexicanas NMX-K-144; NMX-BB 014, NMXK-245 y NMX-K-459-S-1979², en México se distribuyen diferentes marcas de aceites de romero que no contienen los componentes auténticos de éste. Este hecho se evidenció en los destilados de los 5 aceites sin certificado de autenticidad utilizados en este experimento. Dichos aceites etiquetados y distribuidos en diferentes farmacias de la Ciudad de México como aceite de Romero, no contenían los compuestos de interés (1,8 cineol y α - pineno) ya que no se obtuvieron fracciones del destilado a la temperatura 176°C-178 °C correspondiente al punto de ebullición del 1,8 cineol ni al 163°C-166 °C, temperatura de ebullición del α -pineno.

Los factores de retención (R_f) de los estándares puros de 1,8 cineol y α - pineno fueron de =0.42 y 0.51 respectivamente, con el sistema de solventes utilizado. El destilado del aceite, con certificado de autenticidad, obtenido a una temperatura 176°C-178 °C (D1) y purificado por cromatografía en placa fina, mostró un comportamiento cromatográfico semejante al 1,8 cineol (R_f = 0.43)

² <https://www.quiminet.com/productos/aceite-esencial-de-romero1634462127/proveedores.htm>

y el obtenido a 163°C-166 °C (D2) Rf= 0.51, al estándar del α -pineno.

Estos resultados indican que el aceite que garantizó su pureza y que tiene un certificado de análisis, contiene los principales componentes 1,8 cineol y α -pineno.

Valores cinéticos de la acetilcolinesterasa

La Figura 2 muestra el gráfico obtenido por el método de Lineweaver-Burk, por el que se determinaron los valores experimentales de K_m y V_{max} de la AChE que correspondieron a 378 μ M y 47.62 mmol/min respectivamente.

Concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) del aceite de romero, 1,8 cineol y α - pineno

Los valores de CI₅₀ del aceite comercial de romero, del 1,8 cineol y del α - pineno, fueron determinados a partir de la curva de Dixon, Figura 3. Los valores calculados se presentan en la Tabla 4.

Conclusiones

El romero es una planta cuyas propiedades químicas, bioquímicas u organolépticas permiten su utilización con fines terapéuticos. En el presente estudio se pudo comprobar que el aceite de romero fue tan eficaz como el 1,8 cineol y el α - pineno puros para inhibir la actividad *in vitro* de la acetilcolinesterasa.

Sin embargo, su potencia para producir dicho efecto fue menor que los otros componentes químicos. Este decremento de potencia, podría deberse a la presencia del etanol en el medio de incubación, que, aunque no fue un factor limitan-

te para la reacción, sí parece haber favorecido la formación de micelas capaces de obstaculizar la interacción de este aceite con la acetilcolinesterasa, impidiendo así el efecto inhibitorio de sus componentes, cuando éste se utilizó en concentraciones menores.

Savelev et. al. (2003: 283) demostraron que la combinación de 1,8 cineol/ α -pineno produce un efecto inhibitorio sinérgico sobre la actividad de la acetilcolinesterasa, por lo cual, en esta investigación, se esperábamos determinar un valor de CI₅₀ para el aceite de romero menor que para el 1,8 cineol y el α - pineno; sin embargo, esto no fue así, probablemente por el efecto del etanol.

Estudios previos sobre el efecto inhibitorio del aceite obtenido a partir de *Salvia lavandulaefolia officinalis*, (Ellman y Courthney, 1961:88) sobre la actividad de la AChE indican que el valor del CI₅₀ para éste fue de 0.00082 g/ml. Este aceite contiene un 17 % de 1,8 cineol y un 5 % de α - pineno y el resto corresponde a una mezcla de otros terpenos (alcanfor, beta-pineno, borneol, óxido de cariofileno, linalol y acetato de bornilo). En cambio, el aceite obtenido a partir de *Rosmarinus officinalis l.* que como *Salvia lavandulaefolia officinalis*, pertenece a la familia Laminaceae, contiene un 44.42 % de 1,8 cineol, 12.5 % de α - pineno y un 12.21 de ácido rosmarínico (Savelev et. al., 2004: 315; Orhan y col., 2008: 663), sin embargo, el valor del CI₅₀ obtenido para este aceite (1.24 g/mL) fue 1500 veces mayor que el reportado para el aceite de lavanda, lo que indica que los demás componentes de éste último también contribuyen a la acción inhibitoria de esta enzima.

Estas comparaciones son importantes debido a que ambos aceites podrían utilizarse por la vía tópica alrededor de la nariz de los enfermos con el

Figura 2. Representación lineal de Lineweaver-Burk, para determinar los valores de K_m y V_{max} de la acetilcolinesterasa (AChE) obtenidas experimentalmente.

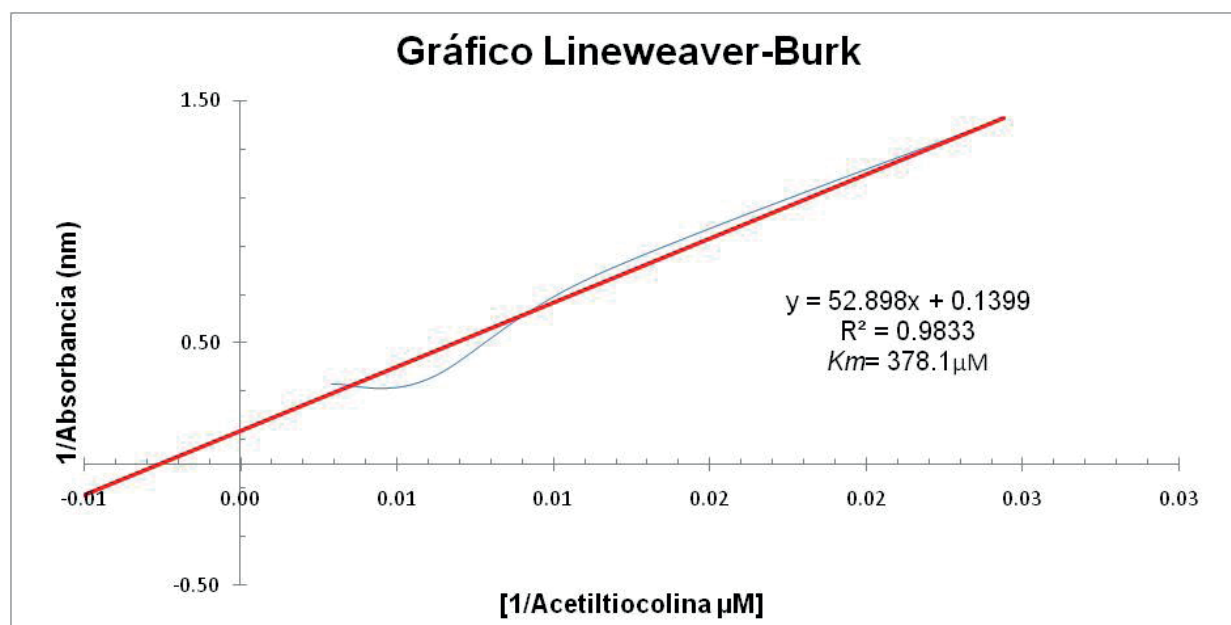


Figura 3. Efecto de los diferentes tipos de aceites esenciales sobre la actividad de acetilcolinesterasa

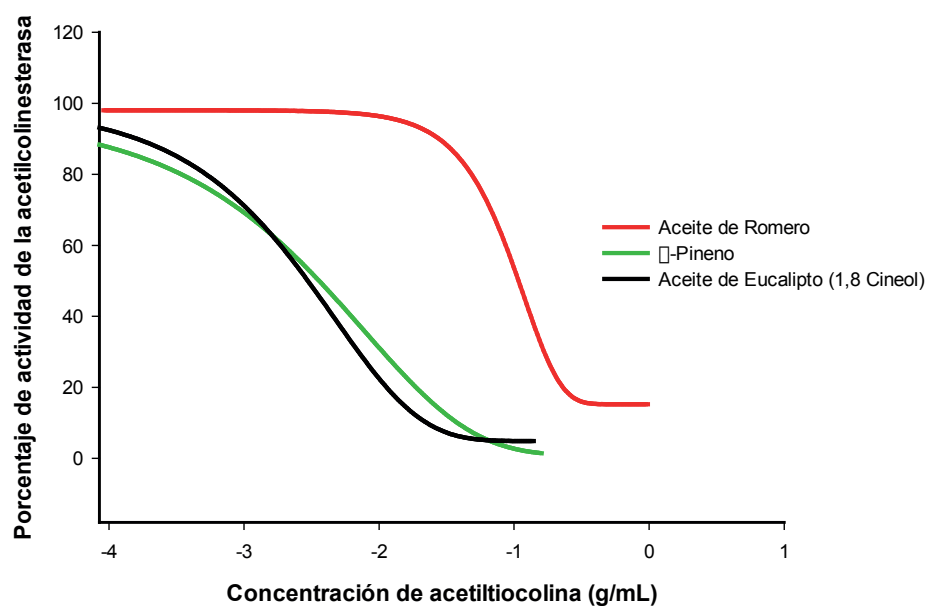
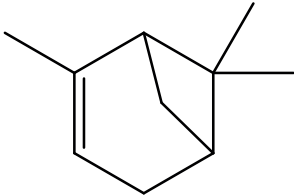
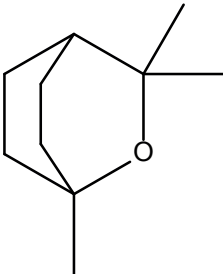


Tabla 1. Estructura y actividad biológica de los componentes del aceite de romero

Estructura molecular	Concentración inhibitoria 50 [g/mL] para la acetilcolinesterasa	Actividad Biológica Reportada
 <p>-Pineno</p>	0.0027	<p>Inhibidor de la acetilcolinesterasa. (Satomi et al. 2009: 43113)</p> <p>Antiespasmódico (Medicherla et al., 2016:3133)</p> <p>Anticancerígeno (González-Vallina et al. 2015: 1221)</p>
 <p>1, 8 Cineol o Eucaliptol</p>	0.00386	<p>Congestión nasal (Perry et al., 2000:895)</p> <p>Antioxidante (Napoli et al., 2015: 1075)</p> <p>Inhibidor de acetilcolinesterasa (Satomi et al. 2009: 43113)</p>
<p>Aceite comercial de romero (Rosmarinus officinalis L.)</p>	1.24	<p>Antioxidante (Perry, 2000: 895)</p> <p>Anticancerígeno (González-Vallina, 2015: 1221)</p> <p>Antiinflamatorio (Napoli et. al. 2015: 1075)</p>

Síndrome de Alzheimer, con la finalidad de por esta ruta acceder rápidamente a las neuronas colinérgicas y optimizar el nivel de acetilcolina en el surco sináptico, para mejorar el cuadro de síntomas que se presentan en esta enfermedad.

Estos datos indican que, en México, se requiere de una legislación más clara y de una vigilancia en materia de extracción y comercialización del mercado de aceites esenciales ya que su potencial uso terapéutico queda limitado al no presen-

tar las óptimas y necesarias condiciones para ello, afectando no solo sus propiedades en la acetilcolinesterasa con los pacientes con síndrome de Alzheimer, sino también aquellos que lo utilizan

con fines antivirales, antioxidantes, antidepresivo, diuréticos, antiinflamatorio, gastrointestinal, antiparasitario, anticonceptivos, preventivos cardiovasculares, entre otros.

Referencias Bibliográficas

- Alberca, S. y López-pousa, S. (2007). *Enfermedad de Alzheimer y otras demencias*. México: Panamericana, 17-27.
- Álvarez, M.; Pedroso, I.; Pedrón, A. y Álvarez, M. (2008). “Fisopatología de la enfermedad de Alzheimer”, *Revista Mexicana de Neurociencias*, vol. 9, Núm. 3: 196-201.
- Ballard, C.; O’Brien, J.; Reichelt, K. y Perry, E. (2002). “Aromatherapy as a safe and effective treatment for the management of agitation in severe dementia: the results of a double-blind, placebo-controlled trial with Melissa”, *Journal Clinical Psychiatry*, vol. 63 Núm. 7: 553-558.
- Ellman, G.; Courthney, D. y Featherstone, R. (1961). “A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity”, *Biochemical Pharmacology*, vol. 7: 88-95.
- Gandia, L.; Álvarez, R.; Hernández-Guijo, J.; González-Rubio, J.; Del Pascual, R.; Rojo, J.; et al. (2006). “Anticolinestéricos en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer”, *Revista de Neurología*, vol 42, Núm. 8: 471-477.
- González-Vallinas, M.; Reglero, G. y Ramírez de Molina, A. (2015). “Rosemary (Rosmarinus officinalis L.) Extract as a Potential Complementary Agent in Anticancer Therapy”, *Nutr Cancer*, vol. 67, Núm. 8: 1221-1229.
- Irie, Y. y Keung, W. (2003) “Rhizomaacorigraminei and its’s active principles protect PC-132 cells from the toxic effect of amyloid-beta peptide”, *Brain Research*, vol. 963: 282-289.
- Jimbo, D.; Kimura, Y.; Taniguchi, M.; Inoue, M. y Urakemi, K. (2009). “Effect of aromatherapy on patients with Alzheimer’s disease”, *Psychogeriatrics*, vol. 9, Núm. 4: 173-179.
- Joshi, H. y Parle, M. (2006). “Cholinergic basis of memory-strengthening effect of Foeniculum Vulgare Linn”, *Journal Medicinal Food*, vol. 9, Núm. 3: 413-417.
- Martínez, M. (2003). *Aceites esenciales*. Medellín: Tesis. Universidad de Antioquia, Facultad de Química Farmaceutica, 189-210.
- Medicherla, K.; Ketkar, A.; Sahu, B.; Sudhakar, G. y Sistla, R. (2016). “Rosmarinus officinalis L. extract ameliorates intestinal inflammation through MAPKs/NF-κB signaling in a murine model of acute experimental colitis”, *Food Functions*, vol. 13, Núm. 7: 3233-3243.
- Miyazawa, M.; Tougo, H. y Ishihara, M. (2001). “Inhibition of acetylcholinesterase activity by essential oil from Citrus Paradisi”, *Natural Products Letters*, vol. 15: 205-210.
- Miyazawa, M.; Watanabe, H. y Kameoka, H. (1997) “Inhibition of Acetylcholinesterase Activity by Monoterpenoids with an p-Menthane skeleton”, *Journal Agriculture Food Chemistry*, vol. 45, Núm 3: 677-679.
- Napoli, E.; et al. (2015). “Wild Sicilian rosemary: phytochemical and morphological screening and antioxidant activity evaluation of extracts and essential oils”, *Chemical Biodiversity*, vol. 12, Núm 7: 1075-1094.

- Orthan, I.; Sinem, A.; Murat, K. y Bilge, K. (2008). "Inhibitory effects of Turkish Rosmarinus Officinalis L. on acetylcholinesterase and butyl cholinesterase enzymes", *Journal Food Chemistry*, vol. 108: 663-668.
- Ozarowski, M.; et. al. (2013). "Leaf extract improves memory impairment and affects acetylcholinesterase and butyryl cholinesterase activities in rat brain", *Fitoterapia*, vol. 91: 261-271.
- Perry, N.; Court, G.; Bidet, N.; Court, J. y Perry, E. (1996) "European Herbs with cholinergic activities: Potency in dementia therapy", *International Journal of Geriatric Psychiatry*, vol. 11: 1063-1069.
- Perry, N.; Houghton, P.; Theobald, A.; Jenner, P. y Perry, E. (2000). "In vitro inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by Salvia Lavandulaefolia essential oil and constituent terpenes", *Journal Pharmacy and Pharmacology*, vol. 52: 895-902.
- Redolat, R. (1998). "¿Es la plasticidad cerebral un factor crítico en el tratamiento de las alteraciones cognitivas asociadas al envejecimiento?", *Anales de Psicología*, vol. 14: 45-53.
- Satomi, D.; Masonori, H y Masakazu, M. (2009). "Acetylcholinesterase inhibitory activity and chemical composition of commercial essential oils", *Journal Agriculture Food Chemistry*, vol. 57: 43113-4318.
- Savelev, S.; Okello, E.; Perry, E. (2004). "Butyryl-and Acetyl- Cholinesterase Inhibitory Activities in Essential Oils of Salvia Species and Their Constituents", *Phitotherapy Research*, vol. 18: 315-324.
- Savelev, S.; Okello, E.; Perry, N.; Wilkins, R. y Perry, E. (2003). "Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in Salvia Lavandulaefolia essential oil", *Pharmacology and Biochemistry Behavior*, vol. 75: 283-289.
- Skoog, A. (2001). *Principios del análisis instrumental*. España: Saunders Collage Publishing, 55-70.
- Smallwood, J.; Brown, R.; Coutler, F.; Irvine, E. y Copland, C. (2001). "Aromatherapy and behavior disturbances in dementia: a randomized controlled trial", *International Journal Geriatric Psychiatry*, vol. 16, Núm 10:1010-1013.
- World Alzheimer Report AD. (2010). <https://www.alz.co.uk/research/files/WorldAlzheimerReport2010.pdf>.