

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (*Lippia origanoides* *H.B.K*) DEL ALTO PATIA

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS OF OREGANO (*Lippia origanoides H.B.K*) GROWN IN ALTO PATIA

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESENCIAL DE ORÉGANO (*Lippia origanoides* *H.B.K*) DO ALTO PATIA

OSCAR ARANGO B.¹, DIANA PANTOJA D.², LORENA SANTACRUZ CH², ANDRÉS M. HURTADO B.³

RESUMEN

*Debido a los posibles efectos carcinogénicos de algunos antioxidantes sintéticos las investigaciones sobre la obtención y evaluación de antioxidantes naturales tienen un creciente interés. En este trabajo se analizó la composición y se evaluó la capacidad antioxidante de una especie de orégano (*Lippia origanoides H.B.K*) que crece de forma silvestre en la región del Alto Patía al suroccidente de Colombia. El aceite esencial de las hojas de orégano (AEO) se extrajo por la técnica de arrastre con vapor. La composición química se analizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), identificando los constituyentes con base en sus patrones de fragmentación y sus índices de retención de Kovat's. La actividad antioxidante se evaluó mediante los métodos espectrofotométricos*

Recibido para evaluación: 16/20/2011. **Aprobado para publicación:** 16/06/2012

- 1 Ingeniero Agroindustrial. M.Sc. Universidad de Cantabria, M.Sc. Universidad Autónoma de Madrid. Profesor asociado, Universidad de Nariño.
- 2 Ingeniero Agroindustrial, Facultad de Ingeniería Agroindustrial, Universidad de Nariño.
- 3 Ingeniero Químico. Ph.D. Universidad Autónoma de Madrid. España. Profesor asociado, Universidad de Nariño.
Grupo de Investigación Tecnologías Emergentes en Agroindustria, Facultad de Ingeniería Agroindustrial, Universidad de Nariño,

Correspondencia: oscar769@hotmail.com

de DPPH• y ABTS•+. Los componentes principales fueron timol (73,7%), *o*-cimeno (10,5%), mirceno (3,1%) y γ -terpineno (2,9%). Los valores de EC_{50} (concentración de aceite esencial que reduce el 50% de radicales DPPH•) para el AEO y para el BHT fueron 5,58 y 1,33 mg/mL, respectivamente; por su parte los valores TEAC (actividad antioxidante equivalente al Trolox) para el AEO y para el BHT fueron 0,33 y 0,68 mg/mL respectivamente, lo que indica que la capacidad antioxidante del AEO es similar a la del BHT, lo cual se puede atribuir a la acción sinérgica de sus compuestos fenólicos. El alto rendimiento de extracción y contenido de timol en el aceite esencial de orégano del Alto Patía hacen que esta especie tenga un alto potencial para la obtención de antioxidantes naturales.

ABSTRACT

Because of the potential carcinogenic effects of some synthetic antioxidants research on the collection and evaluation of natural antioxidants have a growing interest. In this work was analyzed the composition and evaluated the antioxidant activity of an oregano species (*Lippiaoriganoides* H.B.K) that grows wild in the region of Alto Patía, southwestern Colombia. The essential oils were obtained from oregano leaves by steam distillation technique. The chemical composition was analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), identifying the constituent based on their fragmentation patterns and Kovat's indices. The antioxidant activity was evaluated by spectrophotometric methods DPPH• and ABTS•+. The main components were thymol (73.7%), *o*-cymene (10.5%), myrcene(3.1%) and γ -terpinene (2.9%). EC_{50} values (essential oil concentration that reduces 50% of DPPH• radicals) and TEAC (Trolox equivalent antioxidant activity) for the oregano essential oils (OEO) and BHT were 5.58 and 1.33 mg/mL and 0.33 and 0.68 mg/mL, respectively, indicating that the antioxidant capacity of the OEO is similar to that of BHT, which can be attributed to the synergistic action of its phenolic compounds. The high extraction yield and content of thymol in oregano essential oil of Alto Patía make this species has a high potential for obtaining natural antioxidants.

RESUMO

Devido aos possíveis efeitos carcinogênicos que têm alguns antioxidantes sintéticos, as pesquisas na obtenção e avaliação de antioxidantes naturais têm um crescente interesse. Neste trabalho foi analisada a composição e a capacidade antioxidante de uma espécie de orégano (*Lippiaoriganoides* H.B.K) que cresce em forma silvestre na região de Alto Patía ao sudoeste da Colômbia. O óleo essencial das folhas de orégano (OEO), foi extraído pela técnica de arraste com vapor. A composição química foi analisada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS), os compostos foram identificados baseado nos padrões de fragmentação e seus índices de retenção de Kovat's. A atividade antioxidante foi avaliada mediante os métodos espectrofotométricos de DPPH• y ABTS•+. Os

PALABRAS CLAVES

Lippiaoriganoides, Actividad antioxidante, DPPH, ABTS.

KEY WORDS

Lippiaoriganoides, Antioxidant activity, DPPH, ABTS.

PALAVRAS-CHAVE

Lippiaoriganoides, Atividade antioxidante, DPPH, ABTS.

principais componentes foram timol (73,7%), α -cimeno (10,5%), mirceno (3,1%) y γ -terpineno (2,9%). Os valores de EC_{50} (concentração do óleo essencial que reduz o 50% de radicais DPPH•) e de TEAC (atividade antioxidante equivalente ao Trolox) para o OEO e para o BHT foram 5,58y 1,33mg/mL e 0,33 e 0,68 mg/mL respectivamente, isto indica que a capacidade antioxidante do OEO é similar ao do BHT, que pode se atribuir a ação sinérgica dos compostos fenólicos. O alto rendimento de extração e conteúdo de timol no óleo essencial de orégano do Alto Patía fazem desta espécie, um potencial para a obtenção de antioxidantes naturais.

INTRODUCCIÓN

Al suroccidente de Colombia, entre los departamentos de Cauca y Nariño, se encuentra la región del Alto Patía, caracterizada por un clima tropical muy seco, en la que crece de forma abundante y silvestre una especie perteneciente a la familia *Verbenaceae*, conocida popularmente como “orégano de monte” (*Lippiaoriganoides* H.B.K). Investigaciones etnobotánicas han encontrado que las hojas de esta planta se usan como condimento y en medicina popular sus infusiones se emplean como tratamiento contra dolores de estómago, indigestión, diarrea, náuseas, flatulencias, dolores menstruales, así como antiséptico oral [1, 2]. También se ha demostrado que el aceite esencial de orégano (AEO) podría ser usado para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias multiresistentes [3].

En estudios previos sobre la composición de los aceites esenciales de ésta planta se han encontrado al menos tres quimiotipos diferentes, en dos de los cuales los componentes principales son timol y carvacrol y un tercero menos común donde estos compuestos no están presentes o lo están en muy baja cantidad [4].

Un antioxidante puede definirse como una sustancia que, cuando está presente a baja concentración comparada con la de un substrato oxidable, previene o retrasa significativamente la oxidación del sustrato [5].

El butilhidroxianisol (BHA), y el butilhidroxitolueno (BHT) son los antioxidantes sintéticos de mayor uso en la industria de alimentos y farmacéutica; sin embargo, se han encontrado efectos secundarios en humanos, como

el aumento del colesterol, hepatomegalia e inducción de cáncer hepático, entre otras [6, 7, 8], por lo cual algunos países están aplicando fuertes restricciones a su uso y existe una tendencia a sustituirlos por antioxidantes naturales, lo que ha ocasionado que actualmente exista una demanda creciente por encontrar más información concerniente al potencial antioxidante de nuevas especies de plantas para su utilización en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica.

Adicionalmente, muchos desordenes de la salud como cáncer, enfermedad cardiovascular, aterosclerosis, gastritis, daños en el sistema nervioso central y aceleración del envejecimiento, entre otros, son atribuidos a la acción de los radicales libres [9, 10].

Los alimentos juegan un papel importante en el control del estrés oxidativo. Una dieta rica en antioxidantes como vitaminas C, E, carotenoides, selenio, zinc y polifenoles reduce la incidencia de cáncer y enfermedades cardiovasculares y degenerativas [11].

Los polifenoles son un grupo de compuestos con propiedades reconocidas entre las que se encuentran la estabilización de radicales libres, inhibición de enzimas hidrolíticas y oxidativas y acción antiinflamatoria [12]. En varios casos se ha determinado que la actividad antioxidante del extracto o del aceite esencial de una planta está relacionada directamente con la cantidad de compuestos fenólicos presentes en ella [13], uno de tales compuestos es el timol, el cual constituye el componente mayoritario en el aceite esencial del orégano de monte.

Celis *et al.* [14], estudiaron la actividad biológica de tres plantas pertenecientes a la familia *Verbenaceae* siendo *Lippiaoriganoides* la más promisoría por su capacidad de captura de radicales y su baja toxicidad. En otro estudio se determinó que el potencial inhibitorio de radicales ABTS fue mayor en los aceites esenciales que contienen fenoles como el timol y carvacrol

Debido al alto porcentaje de timol (73%) encontrado en el aceite esencial del orégano del Alto Patía y a sus características como un antioxidante promisorio para usar en diferentes medios, en este trabajo se evaluó la capacidad de estabilización de radicales DPPH y ABTS del AEO comparada con la de los antioxidantes sintéticos BHA y BHT.

MÉTODO

Material vegetal. El material vegetal (solo hojas) fue colectado en la zona conocida como Cordón Panamericano del Alto Patía, municipio de Taminango, corregimiento de El Remolino, en límites de los departamentos de Cauca y Nariño, al suroccidente de Colombia. La región se caracteriza por tener un clima cálido y seco con altitud de 800 msnm y precipitación media de 809 mm al año, con vegetación típica de un enclave subxerofítico. La colecta se realizó en la época inmediatamente posterior al periodo de lluvias, entre los meses de julio y agosto. La identificación taxonómica de las muestras se realizó en el Herbario de la Universidad de Nariño.

El material vegetal fue pesado, seleccionado y se dejó secar en sombra a temperatura ambiente (promedio de 18 °C) por espacio de ocho días.

Extracción del aceite esencial. El proceso de extracción del AEO se realizó en la Planta Piloto de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad de Nariño, utilizando la técnica de arrastre con vapor. Las condiciones de operación del equipo de extracción fueron tiempo 2h, densidad de lecho 80g/L y presión de vapor 0,32 PSI. Se obtuvo un rendimiento de 3,27% p/p (g de aceite/100 g de hojas secas).

Análisis de la composición del aceite esencial

Se realizó en los Laboratorios Especializados de la Universidad de Nariño utilizando un cromatógrafo de gases Shimadzu GC 17A versión 3, equipado con un inyector split/splitless a temperatura de 250 °C, relación split 1:100 y un detector de ionización en llama (FID) (280 °C). Los datos cromatográficos fueron adquiridos y procesados con un programa Shimadzu Class VP 4.3. Para la separación de mezclas se utilizó una columna apolar DB-5 (J&W) de 30 m x 0,25 mm D.I. y 0,25 μ m de una fase estacionaria de 5% fenil-polietilsiloxano. La temperatura del horno fue programada de 40 °C (5 min) hasta 250 °C a 5 °C min⁻¹. El gas de arrastre y gas auxiliar empleado fue helio (99.9995%, Aga-Fano S.A) a flujo de 1 ml min⁻¹, las velocidades de flujo para gases de combustión en el FID fueron 300 mL min⁻¹ para el aire y 30 mL min⁻¹ para el hidrógeno, el volumen inyectado de los extractos fue de 1.0 μ L. Los espectros de masas se obtuvieron en modo SCAN en un intervalo de masas de 38 a 450 m/z.

Para la identificación de los compuestos por medio de índices de Kovats se utilizó como referencia la mezcla de parafinas de C₆–C₃₂. Para confirmar la identificación de los metabolitos secundarios del aceite esencial se realizó un análisis por GC-MS en el Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander, en la cual se utilizó un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies* 6890N acoplado a un detector selectivo de masas (MSD) *Agilent Technologies* 5975 *Inert*, operado en el modo barrido completo (*full scan*) de radio frecuencia. La columna empleada en dicho análisis fue DB-WAX (*J & W Scientific*, Folsom, CA, USA). La identificación de los compuestos químicos se basó en sus índices de retención y por comparación de sus espectros de masas con aquellos de las librerías de Wiley y Adams.

Evaluación de la actividad antioxidante.

La capacidad de captura de radicales libres del AEO se determinó mediante los métodos espectrofotométricos de DPPH [15, 16] y ABTS [6].

El aceite de orégano se evaluó en un intervalo de concentraciones de 0,1 – 8,97 mg mL⁻¹ y las muestras de BHA y BHT en concentraciones de 0,0085 – 0,102 mM.

Las mediciones del cambio de absorbancia que se producen en la reacción, se hicieron a temperatura ambiente en un espectrofotómetro Genesys 10 UV-VIS Scanning 335907. Las longitudes de onda empleadas fueron 516 y 734 nm para DPPH• y ABTS•+ respectivamente. Diariamente, antes de cada medición se equilibró el espectrofotómetro durante 10 minutos. Para el blanco se utilizó etanol grado HPLC. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Ensayo de DPPH. Se preparó la solución de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•) (Sigma Aldrich), pesando 0,014 g de DPPH• que se disolvieron en 100 mL de etanol. Tras una agitación de diez minutos, se tomaron 20 mL se enrasó hasta 100 mL en etanol y se agitó de nuevo.

La recta de calibración resultó del promedio de tres ensayos, utilizando concentraciones de DPPH• de 0 a 0,025 mM. Se tomaron 30 μ L de cada una de las concentraciones de aceite esencial y se adicionaron a 3,0 mL de a solución de DPPH• midiéndose la absorbancia cada 5 minutos hasta la estabilización de la

reacción. El valor de absorbancia que se obtuvo en cada ensayo se extrapola en la recta de calibrado de DPPH•, para obtener el equivalente a la concentración de DPPH• a tiempo t, ($C_{DPPH\bullet(t=t)}$), con el cual se calculó el porcentaje de DPPH• remanente (% DPPH• rem) usando la ecuación que se muestra a continuación:

$$\% DPPHrem = \frac{C_{DPPH\bullet(t=t)}}{C_{DPPH\bullet(t=0)}} * 100 \quad (Ec.1)$$

La gráfica del porcentaje de DPPH• remanente frente al tiempo, es la representación de la cinética de la reacción, y con la gráfica del porcentaje de DPPH• remanente frente a la concentración del aceite en el medio de reacción (mg/mL), se determinó por regresión de mínimos cuadrados la ecuación que permitió encontrar el valor EC_{50} (concentración eficaz al 50%) que se define como la cantidad de antioxidante (mg/mL) necesario para reducir la concentración de DPPH• a la mitad.

También se calculó el porcentaje de estabilización, según la ecuación (2), como sigue:

$$\%E = \frac{[A - A_t]}{A} * 100 \quad (Ec.2)$$

Donde:

A = Absorbancia en el tiempo 0

A_t = Absorbancia después de un periodo de tiempo en reposo.

Con la ecuación encontrada en la representación del porcentaje de estabilización frente a las concentraciones se calculó el valor EC_{50} que corresponde al valor de la concentración de aceite esencial que estabiliza el 50% del radical libre.

Ensayo de ABTS. En un tubo de ensayo se mezclaron la solución de ABTS• + (2,2'-azino-bis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico) (Sigma Aldrich) 7mM y persulfato de potasio 2,45mM en proporciones 1:1 (v/v). La solución de ABTS• + fue preparada diluyendo la mezcla con etanol grado HPLC hasta alcanzar absorbancia 0,700 +/- 0,050 en una longitud de onda de 734 nm. La solución fue almacenada en la oscuridad a temperatura ambiente durante 12-16 h antes de su uso.

La actividad antioxidante se expresó como porcentaje de estabilización, según la ecuación (2). Otro indicador que se obtuvo es el TEAC (actividad antioxidante equivalente

al Trolox, mM y mg/mL) que se calculó tomando la curva de patrón Trolox (análogo vitamina E).

RESULTADOS

Composición del aceite esencial de *L. origanoides*. Los componentes mayoritarios presentes en el aceite esencial de orégano utilizado en este estudio son en su orden: timol (73,7%), *o*-cimeno (10,6%), mirceno (3,1%) y γ -terpineno (2,9%). Por picnometría se determinó que la densidad del aceite es 0,9546 g/mL.

Los resultados obtenidos en cuanto a la composición del aceite esencial coinciden con el quimiotipo II citado en el trabajo de Ruiz *et al.* [17], cuyos compuestos mayoritarios fueron timol (56,3%), *o*-cimeno (11,8%) y γ -terpineno (7,3%) y con el quimiotipo C descrito por Stashenko *et al.* [4], en el cual el timol es el componente mayoritario (56%), seguido de *o*-cimeno (9,0%) y γ -terpineno (5,0%).

Los constituyentes volátiles del AEO del Alto Patía fueron iguales a los encontrados por Muñoz *et al.* [18], aunque con diferencias en sus cantidades relativas timol 14,3% y carvacrol 44,4%, lo que sugiere que se trata de quimiotipos diferentes. Rojas *et al.* [19], evaluaron la composición del aceite esencial de *Lippia origanoides* colectado en dos estaciones del año (lluviosa y seca) en Venezuela, encontrando que el timol fue el componente principal, aunque su presencia fue mayor en la estación lluviosa (61,9%) que en la seca (44,7%).

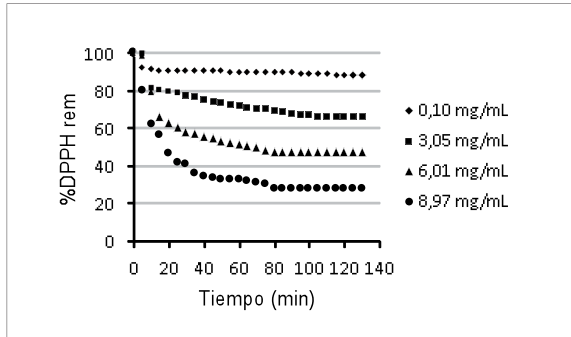
Evaluación de la actividad antioxidante

Ensayo de DPPH. La figura 1 muestra una velocidad de reacción proporcional a la concentración del aceite, de esta manera, la mayor concentración de AEO (8,97 mg/mL) deja cerca del 20% de DPPH remanente. El estado estacionario para las reacciones de DPPH• se alcanzó en el intervalo de 90-120 min.

A un tiempo estacionario (t_e) de reacción de 105 min se determinaron los porcentajes de DPPH• remanente para cada concentración de AEO, los resultados se presentan en el cuadro 1.

Con los datos del cuadro 1 se obtuvo una ecuación para la recta de ajuste ($R^2 = 0,99$) con la cual se determinó

Figura 1. Porcentaje de DPPH• remanente respecto al tiempo para diferentes concentraciones de AEO



Cuadro 1. % DPPH rem a diferentes concentraciones de AEO en el tiempo estacionario

AEO mg/mL	% DPPH•rem
0,10	87,59 ± 0,95
3,05	66,07 ± 1,24
6,01	46,73 ± 1,02
8,97	27,81 ± 0,88

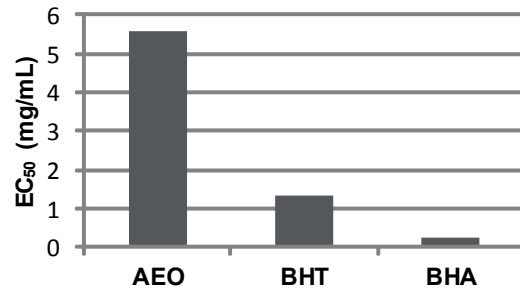
que la concentración de AEO necesaria para disminuir la concentración de DPPH inicial al 50% (EC_{50}) es $5,58 \pm 0,035$ mg AEO/mL DPPH.

Ensayo de ABTS. Se elaboró una curva de calibrado con diluciones de concentración conocida del patrón Trolox, obteniéndose la ecuación $y = -0,205x + 0,691$ ($R^2 = 0,999$) que relaciona la absorbancia con la concentración de Trolox. Con los datos obtenidos en la curva de calibrado se calcularon los porcentajes de estabilización y se determinó la concentración de antioxidante que da el mismo porcentaje de estabilización que 1 mM de Trolox. Los resultados de este ensayo se suelen expresar en unidades TEAC (actividad antioxidante equivalente a Trolox). Se determinó que 1 mM de Trolox (0,250 mg/mL), estabiliza el 30,16% de radical $ABTS^{\bullet+}$, este dato se utilizó para calcular el TEAC de los antioxidantes evaluados.

Con los datos del porcentaje de estabilización de radicales ABTS a diferentes concentraciones de AEO a 1 min de reacción se calculó el TEAC, obteniendo como resultado $1,16 \pm 0,5$ mg/mL, por lo tanto, con 1,16 mg/mL de AEO se consigue el mismo porcentaje de estabilización del radical $ABTS^{\bullet+}$ que con 1 mM de Trolox, equivalente a 30,16% de reducción del radical $ABTS^{\bullet+}$.

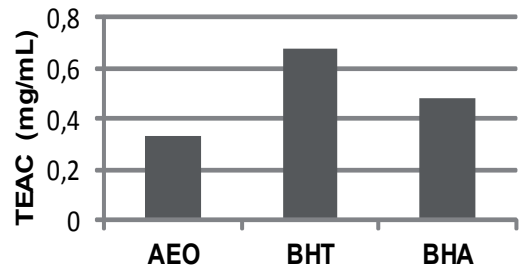
Al evaluar la capacidad para estabilizar los radicales

Figura 2. EC_{50} * para AEO y antioxidantes sintéticos



* EC_{50} = Concentración de antioxidante que reduce en 50% la cantidad de radicales DPPH. Valores menores indican mayor actividad antioxidante

Figura 3. TEAC* para AEO y antioxidantes sintéticos



*TEAC = Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox. Valores menores indican mayor actividad antioxidante.

DPPH• y $ABTS^{\bullet+}$ de los antioxidantes sintéticos BHA y BHT se obtuvieron resultados similares a los reportados en la literatura [6, 20, 21]. En las figuras 3 y 4 se presenta una comparación de la actividad antioxidante del AEO frente a la del BHA y BHT.

El orden de actividad antioxidante según el método DPPH fue BHA > BHT > AEO, mientras que en el método ABTS se evidenció que AEO > BHA > BHT. Se debe resaltar que en ambos métodos la capacidad de estabilización de radicales libres del AEO fue semejante en orden de magnitud a la de los antioxidantes sintéticos BHT y BHA.

Algunas veces los resultados obtenidos por diferentes métodos no son comparables, debido a varios factores como: la estructura física del sistema, la naturaleza del sustrato, la presencia de compuestos que pueden

interactuar, la forma de iniciar la oxidación y el método para medir la oxidación [22, 23].

Algunas investigaciones relacionan la actividad antioxidante de los aceites esenciales con su contenido de compuestos fenólicos [24], para el caso del aceite esencial de orégano del Alto Patía (*L. origanoides*) empleado en esta investigación esta capacidad antioxidante puede atribuirse principalmente a su alto contenido de timol (73%).

La actividad antioxidante del aceite esencial de *L. origanoides* ($EC_{50} = 5,58 \pm 0,035$ mg/mL DPPH•) resultó ser muy superior frente a la de los aceites esenciales de otras plantas de la misma especie tales como *Lippia alba* (quimiotipocarvona), *Lippia alba* (quimiotipocitral) y *Phyladulcis* que mostraron valores de EC_{50} de 289, 305 y 8,47 mg/mg DPPH• respectivamente [20].

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que el aceite esencial del orégano silvestre del Alto Patía (*L. origanoides*) presenta una capacidad de estabilización de radicales libres superior a la de los aceites esenciales de otras plantas de la misma especie y que la misma es comparable a la de los antioxidantes sintéticos BHA y BHT. Dicha actividad se atribuye principalmente a su alto contenido de timol (73%) lo que sumado al alto rendimiento de extracción (3,27%) convierten a esta planta en una especie promisoría para la obtención de antioxidantes naturales.

REFERENCIAS

- [1] OLIVEIRA, D., LEITAO, G., BIZZO, H., LOPES, D., ALVIANO, D., ALVIANO C. and LEITAO, S. microbial analysis of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. Food Chemistry, 101, 2007, p. 236-240.
- [2] PASCUAL, M., SLOWING, K., CARRETO, E., SÁNCHEZ, D., VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. Journal of Ethnopharmacology, 76, 2001, p. 73-79.
- [3] VELASCO, J., ROJAS, J., SALAZAR, P., RODRÍGUEZ, M., DÍAZ, T., MORALES, A., y RONDÓN, M. Antibacterial activity of the essential oil of *Lippia origanoides* against multiresistant bacterial strains of nosocomial origin. Natural Products Communication. 2(1), 2007, p. 85-88.
- [4] STASHENKO, E., MARTINEZ, J., RUIZ, C., ARIAS, G., DURAN, C., SALGAR, W., CALA, M. *Lippia origanoides* chemotypic differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. J. Sep. Sci. 33, 2010, p. 93-103.
- [5] HUANG, D., OU, B. y PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. J. Agric. Food Chem. 23; 53(6), 2005, p. 1841-56.
- [6] RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., and RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free radicals in Biology and Medicine, 26 (9), 1999, p. 1231-1237.
- [7] DOS SANTOS, F., LOPES, J., CITO, G., de OLIVEIRA, E., de LIMA, S., de AM REIS, F. Composition and biological activity of essential oils from *Lippia origanoides* H.B.K. J. Essen. Oil Res, 16, 2004, p. 504 - 506.
- [8] VARGAS, A., BOTTIA, E. Estudio de la composición química de los aceites esenciales de seis especies vegetales cultivadas en los municipios de Bolívar y el peñón - Santander, Colombia. Proyecto de grado, Universidad Industrial de Santander Facultad de Ciencias, Escuela de Química. 2008. 201 p.
- [9] KUMPULAINEN, J., SALONEN, J. Natural Antioxidants and anticarcinogens in nutrition, health and disease. The Royal Society of Chemistry, 1999, p. 178 - 187.
- [10] COOK NC, SAMMAN, S. Flavonoids- chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. Nutritional Biochemistry, 7, 1996, p. 66 - 76.
- [11] ROUSSEL, A., NEVE, J., HININGER, I. In Radicaux libres et stress oxydant. aspects biologiques et pathologiques, J. Delattre, J.-L. Beaudoux, D. Bonnefont-Rousselot (eds). Editions TEC & DOC, Lavoisier: Paris, 2005, 261 p.
- [12] FRANKEL, E. Nutritional benefits of flavonoids. International conference on food factors: Chemistry and Cancer Prevention, Hamamatsu, Japan. Abstracts, C6- 2. 1995. 86 p.
- [13] MIGUEL, M.G. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. Flavour and Fragrance Journal, 25, 2010, p. 291-312.
- [14] CELIS, N., ESCOBAR, P., ISAZA, J., STASHENKO, E., MARTÍNEZ, J. Estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los

- aceites esenciales extraídos de *Lippia alba*, *Lippiaoriganoidesyphyla* (*Lippia*) *dulcis*, especies de la familia Verbenaceae. *Scientia et Technica*, 13 (33), 2007, p. 103 – 105.
- [15] BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. and BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28 (1), 1995, p. 25 – 30.
- [16] CAVERO, M. Obtención de extractos de plantas aromáticas mediante fluidos subcríticos y supercríticos. Caracterización Química y Funcional. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Departamento de Química Física Aplicada. 2003. 254 p.
- [17] RUIZ, C., TUNAROSA, F., MARTINEZ, J., STASHENKO, E. Estudio comparativo por GC-MS de metabolitos secundarios volátiles de dos quimiotipos de *Lippiaoriganoides* H.B.K., obtenidos por diferentes técnicas de extracción. *Scientia et Technica*. 33, 2007, p. 325 – 328.
- [18] MUÑOZ, A., KOUZNETSOV, V., STASHENKO, E. Composición y capacidad antioxidante in-vitro de aceites esenciales ricos en timol, carvacrol, trans-anetol o estragol. *Salud UIS*, 41(3), 2009, p. 287-294.
- [19] ROJAS, J., MORALES, A., PASQUALE, S., MÁRQUEZ, A., RONDÓN, M., IMRÉ, M. y VERES, K. Comparative study of the chemical composition of the essential oil of *Lippiaoreganoides* L. collected in two different seasons. *Natural Products communication*. 1(3), 2006, p. 205-207.
- [20] STASHENKO, E., JARAMILLO, B. y MARTÍNEZ, J. Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante in vitro de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias*, 27, 2003, p. 579 – 597.
- [21] SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology*, 8 (3), 2002, p. 121 – 137.
- [22] BECKER, E., NISSEN, L., SKIBSTED, H. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *European Food Research and Technology*, 219 (6), 2004, p. 561 – 571.
- [23] FRANKEL, E., MEYER A. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J. Sci. Food Agric.* 80, 2000, p. 1925 – 1941.
- [24] SHAHIDI, F., WANASUNDARA, P. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32, 1992, p. 67 – 103.