

Cromatografía de gases como herramienta de estudio de la composición química y capacidad antioxidante de especies vegetales ricas en timol y carvacrol, cultivadas en Colombia

Amner Muñoz-Acevedo, Jairo R. Martínez y Elena E. Stashenko*

Laboratorio de Cromatografía, Centro de Investigación en Biomoléculas – CIBIMOL
Centro de Investigación de Excelencia – CENIVAM,
Carrera 27 calle 9. Bucaramanga
Colombia
elena@tucan.uis.edu.co

Resumen

Se determinó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) la composición química de extractos y aceites esenciales (AE) aislados por destilación-extracción simultánea con solvente (SDE), extracción con fluido supercrítico (SFE) e hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD), de especies vegetales pertenecientes a las familias Lamiaceae (*Thymus vulgaris*, *Plectranthus amboinicus*, *Satureja brownei* y *Origanum majorana*) y Verbenaceae (*Lippia organoides* y *Lippia micromera*). La capacidad antioxidante de los aceites esenciales con alto contenido de timol y carvacrol, de las especies *T. vulgaris*, *P. amboinicus*, *L. organoides* y *L. micromera*, se determinó usando los ensayos de decoloramiento del catión-radical ABTS⁺ por metodologías convencional y con dilución en microplacas, y el de oxidación del ácido linoleico, inducida por Fe⁺² en presencia de O₂. La capacidad de atrapamiento de radicales medida en el ensayo con ABTS⁺ fue mayor para los aceites esenciales que contenían carvacrol, como constituyente mayoritario (*P. amboinicus* ≥ *L. organoides*), que para los aceites que ricos en timol (*T. vulgaris* > *L. micromera*). Tanto los compuestos puros como los aceites esenciales evaluados mostraron tendencias similares en los resultados de los dos tipos de ensayo de capacidad antioxidante empleados.

Palabras clave

GC-MS, GC-ECD, MWHD, SDE, SFE, timol, carvacrol, aceites esenciales, Lamiaceae, Verbenaceae, oxidación del ácido linoleico, ensayo ABTS⁺.

Abstract

The chemical composition of both extracts and essential oils isolated from Lamiaceae (*Thymus vulgaris*, *Plectranthus amboinicus*, *Satureja brownei* and *Origanum majorana*) and Verbenaceae (*Lippia organoides* and *Lippia micromera*) families by Distillation-Solvent Extraction (SDE), Supercritical Fluid Extraction (SFE), and Microwave Assisted Hydrodistillation (MWHD) was determined by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC/MS)

Keywords

GC-MS, GC-ECD, MWHD, SDE, SFE, timol, carvacrol, essential oils, Lamiaceae, Verbenaceae, linoleic acid oxidation, analysis, ABTS.

* Los autores agradecen la financiación del trabajo a través del Contrato RC-432-2004 Colciencias -CENIVAM. A.M.A. agradece a Colciencias por su apoyo económico a través de una beca doctoral.

1. Introducción

La familia Lamiaceae comprende unos 210 géneros y alrededor de 3.500 especies, que incluyen hierbas perennes y algunos subarbustos que contienen aceite esencial distribuido en todas las partes de la planta¹. Los géneros *Thymus*, *Origanum*, *Satureja*, *Thymbra*, hacen parte de esta familia, siendo el género *Origanum* el que provee la fuente más conocida de especies de orégano – tipos griego y turco². Por otro lado, la familia Verbenaceae, distribuida principalmente en los trópicos, subtropicos y algunas zonas templadas, consta de 86 géneros y 1.900 especies, con un gran número de plantas de interés económico, que proporcionan maderas (*Tectona grandis*, géneros *Melina*, *Vitex*, etc.), aceites o frutos comestibles (*Verbena officinalis*, *Aloysia citrodora*), poseen un valor ornamental (*Lantana sp.*, *Duranta sp.*) y jardinería y además, gozan de diversas propiedades medicinales^{3,4}.

Los fenoles naturales timol y carvacrol, han sido identificados como componentes principales en muchos de los aceites y extractos aislados de las especies pertenecientes a los géneros *Origanum*, *Lippia*, *Satureja* y *Thymus*, con variaciones en su contenido⁴. Tanto los dos fenoles monoterpénicos como los aceites esenciales y extractos que los contienen, han demostrado propiedades biológicas notables como agentes antifúngicos, antibacteriales y antioxidantes⁵, lo que abre la posibilidad de emplearlos como conservantes para alimentos y cosméticos⁶, por lo menos, donde su uso no esté afectado por sus características organolépticas. Debido a la relación existente entre timol y carvacrol y sus potenciales actividades, muchos estudios se han enfocado en la determinación de la composición química de especies pertenecientes a los géneros *Thymus*, *Origanum*, *Satureja*, *Thymbra*, etc.

La búsqueda de antioxidantes de origen natural es un tema actual, debido a que estas sustancias se usan ampliamente en alimentos y como ingredientes de muchos preparados farmacéuticos y permiten reemplazar los antioxidantes sintéticos debido a las restricciones

generadas por la posible carcinogenicidad de estos últimos⁷. Diversas especies autóctonas, ricas en timol y carvacrol, son interesantes como posibles fuentes de extractos y aceites esenciales con propiedades biológicas beneficiosas, entre ellas, antioxidantes⁸.

En este trabajo, se aislaron por métodos extractivos (SDE y SFE) y destilativos (MWHHD) e identificaron por GC-MS, los metabolitos secundarios volátiles de seis especies vegetales, ricas en timol y carvacrol, cultivadas en la granja experimental del Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM. Se evaluó la capacidad antioxidante *in vitro* de los aceites esenciales de *L. origanoides*, *L. micromera*, *P. amboinicus* y *T. vulgaris*, ricos en timol o carvacrol, usando dos métodos: el ensayo de decoloración del catión radical ABTS⁺ en modos convencional y en microplacas, y el monitoreo de la oxidación del ácido linoleico por medio de la cuantificación del hexanal (derivación y análisis GC-ECD), producto final de su degradación oxidativa inducida por Fe⁺² en presencia de O₂.

2. Experimental

2.1. Reactivos

Los patrones certificados utilizados fueron Trolox[®] (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico; 97%), ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico; 99%), α -tocoferol (97%), BHA (99%), BHT (99%), timol (99%), carvacrol (99%), pentaflúorfenilhidracina, PFPH (97%), hexanal (98%), ácido linoleico (97%) adquiridos de *Sigma-Aldrich* (St. Louis, EE.UU.). Persulfato de potasio (97%), sulfato de hierro (98%), dodecilsulfato de sodio (98%), *Tris*, cloruro de potasio y *n*-tetradecano fueron comprados a Merck (Darmstadt, Alemania). Gases especiales para cromatografía se obtuvieron de *Aga-Fano S.A.* (99,995-99,999%, Bogotá, Colombia). Todos los solventes (metanol, etanol, hexano, agua) fueron grado HPLC de Mallinckrodt Baker Inc. (J.T. Baker, Phillipsburg, EE.UU.).

2.2. Material vegetal

Las hojas de *T. vulgaris*, *P. amboinicus*, *L. origanoides*, *L. micromera*, *S. brownei* y *O. majorana* se obtuvieron de plantas frescas, cultivadas en el Complejo Agroindustrial Piloto CENIVAM en la Universidad Industrial de Santander, de la ciudad de Bucaramanga (Colombia). La identificación taxonómica de muestras botánicas se llevó a cabo en el Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia (Bogotá). Los pliegos testigo de cada planta quedaron depositados como muestra permanente en el Herbario Nacional Colombiano (COL, Bogotá), así: *Lippia origanoides* (N° COL 512270), *Lippia micromera* Schauer (N° COL 519797), *Plectractus amboinicus* (Lour.) Spreng (N° COL 523701) y *Satureja brownei* (Sw.) Briqñ (N° COL 519796). Las plantas fueron identificadas por el doctor J.L. Fernández, a quien los autores expresan su agradecimiento. *O. majorana* y *T. vulgaris* fueron cultivadas en la granja experimental de CENIVAM a partir de semillas certificadas (Fercon Ltda., Cali, Colombia).

2.3. Métodos

2.3.1. Destilación-extracción simultánea con solvente (SDE)

Los metabolitos secundarios de las especies se extrajeron utilizando un equipo tipo Likens & Nickerson a microescala, modificado por Godefroot para solventes de alta densidad⁹. Se utilizaron 10 g de material vegetal finamente picado y como solvente de extracción, diclorometano (2 mL), durante un tiempo de 1 h 20 min para el aislamiento de los volátiles. Del extracto obtenido se inyectó 1 µL directamente al GC-MS.

2.3.2. Extracción con fluido supercrítico (SFE)

Para la obtención de los componentes de mediana a baja volatilidad presentes en las plantas de interés se utilizó un extractor Soxhlet de alta presión (J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.), con base en la metodología descrita por Stashenko *et al.*¹⁰ y se utilizó el material vegetal (10 g) junto con hielo seco (300 g) (CO₂)

como fuente de fluido supercrítico. La extracción se llevó a cabo entre 45-50°C durante 2 h, a una presión de 1100 psi. El extracto obtenido se disolvió en diclorometano (2 mL) y un 1 µL de la solución se inyectó al GC-MS.

2.3.3. Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHHD)

Se realizó en un equipo de destilación tipo *Clevenger* con reservorio de destilación *Dean-Stark* usando como fuente de calor un horno microondas (Kendo, modelo MO-124, 2450 MHz, 700 W). El material vegetal (300 g) se introdujo en un balón (1L) con agua (300 mL). Se realizaron 3 extracciones consecutivas con un tiempo de extracción individual de 20 min. El aceite esencial se separó del agua por decantación y una alícuota del aceite (50 µL) se diluyó en diclorometano (1 mL) para el análisis cromatográfico. Todas las extracciones se realizaron por triplicado y los datos de cantidad relativa de cada compuesto en la mezcla se presentan como el promedio de tres extracciones.

2.4. Ensayos de capacidad antioxidante

2.4.1. Decoloramiento del catión-radical ABTS⁺

La capacidad de atrapamiento del catión-radical ABTS⁺ se llevó a cabo por la metodología descrita por Re *et al.*¹¹, mediante espectroscopía VIS (espectrofotómetro Genesys 20, Thermospectronic, Waltham, EE.UU.) a 734 nm. Se preparó una solución de ABTS⁺ (7 mM) con persulfato de potasio (2,45 mM) disueltos en agua (5 mL) grado HPLC, dejándose reaccionar durante 16 h a temperatura ambiente y en ausencia de luz, y ajustando la absorbancia hasta 0,700±0,02. Las muestras fueron diluidas hasta que la adición de 30 µL de ellas a 3 mL de la solución de ABTS⁺, resultara en una inhibición entre el 20 y el 80 % del blanco de la absorbancia. El porcentaje de inhibición medido a los 6 min se graficó como una función de la concentración evaluada. La respuesta-concentración de las sustancias, como porcentaje de la absorbancia del catión-radical ABTS⁺ sin inhibir se calculó de acuerdo con la Ecuación 1.

$$\begin{aligned} \text{Inhibición de } A_{734} (\%) &= \\ &= (1 - A_f/A_o) \times 100 \end{aligned} \quad (\text{eq.1})$$

Donde A_o es la absorbancia del catión-radical sin inhibir y A_f es la absorbancia medida a los 6 min después de la adición del antioxidante. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se utilizaron Trolox[®] (sustancia de referencia) y sustancias “control” α -tocoferol (vitamina E), BHT y BHA. Para estas sustancias se determinó la actividad antioxidante total TAA (mmol de Trolox[®]/kg sustancia evaluada).

2.4.2. Medición en microplacas

La solución del catión-radical ABTS⁺ se preparó de la forma descrita en el Numeral 2.4.1, pero las diluciones y las mediciones se realizaron en microplacas (Versamax, Molecular Devices, Sunnyvale, EE.UU.). Para las sustancias evaluadas, se prepararon soluciones *stock* de 1×10^{-3} M, las cuales se diluyeron hasta que, después de introducir alícuotas de 10 μ L de estas soluciones a las nuevas soluciones de ABTS⁺ (200 μ L), se produjeran inhibiciones entre el 20 y 80% de la absorbancia del blanco. El porcentaje de inhibición medido a los 30 min se graficó como una función de la concentración evaluada. La respuesta-concentración se calculó con base en la Ecuación 1. Todos los ensayos se realizaron por cuadruplicado y para el cálculo del TAA se utilizó la relación entre las concentraciones inhibitorias al 50% (IC₅₀) de Trolox[®] y las sustancias evaluadas.

2.4.3. Inhibición de la oxidación del ácido linoleico

Para el ensayo *in vitro* de la oxidación del ácido linoleico se siguió la metodología descrita por Tamura y Yamagami¹². El ácido linoleico (8,9 mM) se diluyó con solución *buffer* de Trizma (0,25 mM, pH 7,4), compuesta de KCl (0,75 mM) y dodecilsulfato de sodios (2000 ppm). La peroxidación lipídica se indujo por iones Fe⁺² [sulfato de hierro (20 mM) en presencia de oxígeno]. Seguidamente, se le añadió la solución antioxidante (AE, sustancias de referencia y patrones) en concentraciones de 10,0 g/L (0,5 mL). La incubación se efectuó a 37°C durante 16 h en un cuarto oscuro y se

detuvo la reacción adicionando una solución alcohólica de BHT (90,8 mM).

El hexanal, producto final principal de la degradación oxidativa del ácido linoleico, se utilizó como marcador del avance del proceso, para lo cual éste se derivó con pentaflúorfenilhidracina (PFPH) en hexano (6800 ppm) seguido de la extracción líquido-líquido en fase condensada, según la metodología descrita por Stashenko *et al.*¹³. Cada solución se inyectó luego al GC-ECD para su análisis cromatográfico.

Los efectos protectores de los aceites esenciales y las sustancias de referencia y patrones se determinaron mediante la Ecuación 2, usando el valor del área del pico del derivado del hexanal, en los cromatogramas de los productos de oxidación del ácido linoleico (derivatizados con PFPH).

$$\begin{aligned} \text{Efecto protector } (\%) &= \\ &= (A_{\text{Blanco}} - A_{\text{Sustancia}}/A_{\text{Blanco}}) \times 100 \end{aligned} \quad (\text{eq.2})$$

A_{Blanco} : Área del derivado del hexanal determinada en el sistema sometido a peroxidación sin antioxidante (blanco); $A_{\text{Sustancia}}$: Área del derivado del hexanal determinada en el sistema sometido a peroxidación en la presencia de antioxidante.

2.5. Análisis cromatográfico

2.5.1. GC-MS

El análisis cromatográfico de los extractos y aceites se realizó en dos equipos:

Equipo I – Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Plus* (*Agilent Technologies*, Palo Alto, CA, EE.UU.) acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5973* (EI, 70 eV), con una columna capilar apolar DB-5MS (*J & W Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.) de 60 m (L) x 0,25 mm (D.I.) x 0,25 μ m (d_f), con fase estacionaria de 5%-fenil-poli(metilsiloxano). Se utilizó helio como gas de arrastre (99,999%, *Agafano S.A.*, Bogotá, Colombia), presión de entrada en la cabeza de la columna de 30 psi y una velocidad lineal de 26 cm/s. Volumen de inyección fue de 1 μ L, la inyección se realizó en modo *split* (1:30). La rampa de calentamiento del horno fue de 45°C durante 5 min, @ 4°C/min hasta 150°C (2 min), @ 5°C/min hasta 250°C (5

min) y @ 10°C/min hasta 275°C (15 min). Las temperaturas del inyector, la cámara de ionización y la línea de transferencia se mantuvieron en 250, 230 y 285°C, respectivamente. Los datos cromatográficos se procesaron con el programa *MS ChemStation* (Version 1.05).

Equipo II – Cromatógrafo *Agilent Technologies 6890 Network Series GC System* (*Agilent Technologies*, Palo Alto, CA, EE.UU.) y detector selectivo de masas (MS) *Agilent Technologies 5975* (EI, 70 eV), con columna capilar polar DB-Wax (*J & W Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.), de 60 m (L) x 0,25 mm (D.I.) x 0,25 µm (d_f), con fase estacionaria entrecruzada e inmovilizada de poli(etilenglicol). La programación de la temperatura del horno fue de 45°C (5 min) hasta 150°C (3 min) @ 3°C/min, y hasta 220°C (5 min) @ 4°C/min. Presión de entrada en la cabeza de la columna de 30 psi y una velocidad lineal de 26 cm/s. Volumen de inyección fue de 1 µL, la inyección se realizó en modo *split* (1:30). Las temperaturas del inyector, la cámara de ionización y la línea de transferencia se mantuvieron en 250, 230 y 250°C, respectivamente. Los datos cromatográficos se procesaron con el programa *MS ChemStation* (Version D.02.00.275).

Los índices de retención se calcularon usando datos de GC de una serie homóloga de hidrocarburos alifáticos saturados C₁₀–C₂₅, analizados bajo las mismas condiciones usadas en GC (Equipos 1 y 2) para cada aceite o extracto. La identificación de los compuestos presentes en los aceites y extractos se realizó por comparación de los espectros de masas con los de las bases de datos Wiley138K, Adams 2004 y NIST 2002 y por comparación de los índices de retención y espectros de masas reportados en la literatura^{14,15}, así como con los obtenidos con sustancias patrón.

2.5.2. GC-ECD

La determinación del hexanal en forma de su derivado hidrazónico, C₆-PFPH, se llevó cabo en un cromatógrafo de gases HP5890A Series II, (*Hewlett-Packard*, Palo Alto, CA, USA) con inyector *split/splitless* (relación *split* 1:10), equipado con un detector de captura de electrones ⁶³Ni (ECD), operado a 280°C, con gas

auxiliar Ar/CH₄ (mezcla 10:1, flujo de 10 mL/min). Se usó una columna capilar HP-5 [5%-fenil-poli(metilsiloxano)] de 30 m x 0,25 mm (D.I.) y con un espesor de fase estacionaria de 0,25 µm. El gas de arrastre fue helio (*Aga-Fano S. A.*, 99.995%, Bogotá, Colombia) con presión de entrada de 15 psi y un flujo de 1 mL/min. La programación de la temperatura del horno fue desde 100°C con una rampa de 10°C/min, hasta 250°C mL durante 5min.

3. Resultados y discusión

3.1. Composición química

Con el fin de seleccionar las especies ricas en timol y carvacrol, se seleccionaron los extractos obtenidos por SDE, con base en las cantidades relativas de estos dos componentes de interés. Se encontró que *O. majorana* y *S. brownei* contenían los dos fenoles a nivel de trazas y como constituyentes minoritarios (<3%). Entre los componentes mayoritarios identificados en los extractos obtenidos por SDE de las 6 especies reportadas, se encontraron el carvacrol, timol, mentona, pulegona y terpinen-4-ol en cantidades relativas entre 25-62%. El terpinen-4-ol fue el constituyente principal para *O. majorana*; mientras que, mentona y pulegona lo fueron para *S. brownei*. Las otras cuatro especies (*L. micromera*, *L. origanoides*, *T. vulgaris* y *P. amboinicus*), sí contuvieron a timol y carvacrol como componentes principales (>30%). La clasificación, con base en familias de compuestos y contenido de timol y carvacrol, de los aceites y extractos de las especies vegetales obtenidos por MWHD, SDE y SFE se presenta en la Tabla 1.

En general, en los extractos obtenidos por SDE y SFE y en los aceites esenciales de las especies *L. micromera*, *L. origanoides*, *T. vulgaris* y *P. amboinicus*, se encontraron timol y carvacrol como componentes principales; sin embargo, para el extracto SFE de *P. amboinicus*, los hidrocarburos no terpénicos, C₂₀ – C₃₀, fueron los constituyentes más abundantes (63,5%). En ningún otro extracto SDE y aceites esenciales de las plantas bajo estudio, se detectaron hidrocarburos no terpénicos. Por otro

Tabla 1. Clasificación de los aceites y extractos estudiados, por familias de compuestos y contenido de timol y carvacrol.

| Planta | Parte usada | Rendimiento aceite (p/p) | Familia de compuestos, cantidad relativa (%) | | | |
|----------------|-------------|--------------------------|--|-----|------|-----|
| | | | Constituyentes | SDE | MWHD | SFE |
| L. micromera | Hojas | 16% | Timol | 341 | 258 | 328 |
| | | | Carvacrol | 10 | 35 | 15 |
| | | | Monoterpenoides | 388 | 366 | 287 |
| | | | Sesquiterpenoides | 53 | 100 | 115 |
| | | | Otros compuestos* | 144 | 165 | 140 |
| | | | Hidrocarburos** | — | — | 25 |
| L. origanoides | Flores | — | Timol | 69 | — | — |
| | | | Carvacrol | 423 | — | — |
| | | | Monoterpenoides | 311 | — | — |
| | | | Sesquiterpenoides | 78 | — | — |
| | | | Otros compuestos* | 39 | — | — |
| | | | Hidrocarburos** | — | — | — |
| L. origanoides | Hojas | 23% | Timol | 106 | 143 | 88 |
| | | | Carvacrol | 426 | 444 | 518 |
| | | | Monoterpenoides | 288 | 294 | 183 |
| | | | Sesquiterpenoides | 69 | 49 | 64 |
| | | | Otros compuestos* | 46 | 29 | 42 |
| | | | Hidrocarburos** | — | — | 34 |
| O. majorana | Hojas | — | Timol | tr | — | — |
| | | | Carvacrol | — | — | — |
| | | | Monoterpenoides | 905 | — | — |
| | | | Sesquiterpenoides | 33 | — | — |
| | | | Otros compuestos* | — | — | — |
| P. amboinicus | Hojas | 1% | Timol | 9 | 8 | — |
| | | | Carvacrol | 620 | 537 | 142 |
| | | | Monoterpenoides | 211 | 251 | 24 |
| | | | Sesquiterpenoides | 97 | 159 | 46 |
| | | | Otros compuestos* | 25 | — | 147 |
| | | | Hidrocarburos** | — | — | 635 |
| S. brownei | Hojas | — | Timol | 20 | — | — |
| | | | Carvacrol | 9 | — | — |
| | | | Monoterpenoides | 847 | — | — |
| | | | Sesquiterpenoides | 16 | — | — |
| | | | Otros compuestos* | 78 | — | — |
| T. vulgaris | Hojas | 2% | Timol | 363 | 347 | 208 |
| | | | Carvacrol | 43 | 64 | 31 |
| | | | Monoterpenoides | 442 | 402 | 46 |
| | | | Sesquiterpenoides | 17 | 57 | 23 |
| | | | Otros compuestos* | 81 | 47 | 223 |
| | | | Hidrocarburos** | — | — | 339 |

*Alcoholes, cetonas y éteres

**Hidrocarburos no terpénicos

Tabla 2. Identificación y cantidad relativa (%) de los metabolitos secundarios volátiles, obtenidos por diferentes métodos de extracción de *S. brownnei*, *O. majorana*, *L. origanoides*, *L. micromera*, *P. amboinicus* y *T. vulgaris*.

| No. Pico | Compuesto | IR | | CANTIDAD RELATIVA, % | | | | | | | | | | | | | | |
|----------|------------------------------|------|--------|----------------------|-------------|----------------|-----|-----|--------------|-----|-----|---------------|-----|-----|-------------|-----|-----|-----|
| | | DB-5 | DB-Wax | S. brownnei | O. majorana | L. origanoides | | | L. micromera | | | P. amboinicus | | | T. vulgaris | | | |
| | | | | | | SDE | SDE | SDE | SFE | SDE | HD | SFE | SDE | HD | SFE | SDE | HD | SFE |
| 1 | trans-3-Hexen-1-ol | 849 | 1386 | — | tr | tr | 6 | tr | — | tr | — | — | 8 | — | — | 7 | tr | — |
| 2 | α -Tujeno | 925 | 1023 | tr | 8 | 16 | 15 | 13 | tr | 18 | 21 | 9 | 5 | tr | — | 18 | 13 | tr |
| 3 | α -Pino* | 935 | 1018 | 11 | 9 | 4 | tr | tr | tr | 9 | 8 | Tr | tr | tr | — | 11 | 9 | tr |
| 4 | Canfeno* | 952 | 1061 | — | tr | tr | tr | tr | — | tr | tr | — | — | tr | — | 7 | 9 | — |
| 5 | Sabineno | 976 | 1118 | 5 | 58 | tr | tr | tr | — | 16 | tr | 4 | — | tr | — | tr | tr | — |
| 6 | β -Pino* | 980 | 1103 | 8 | 6 | tr | tr | tr | — | tr | tr | tr | — | tr | — | 5 | 5 | tr |
| 7 | 1-Octen-3-ol* | 982 | 1395 | — | — | tr | tr | tr | — | tr | — | — | 17 | tr | — | 12 | 13 | tr |
| 8 | 3-Octanona* | 986 | 1254 | 7 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | tr | — | tr | tr | — |
| 9 | β -Mirreno* | 990 | 1162 | 5 | 21 | 24 | 24 | 22 | 15 | 22 | 21 | 15 | 8 | 9 | — | 19 | 15 | tr |
| 10 | α -Felandreno | 1011 | 1025 | tr | tr | 4 | tr | 5 | tr | tr | tr | tr | tr | tr | — | tr | tr | — |
| 11 | α -Terpineno | 1022 | 1176 | 4 | 81 | 28 | 27 | 26 | tr | 22 | 18 | 9 | 18 | 22 | — | 19 | 14 | tr |
| 12 | p-Cimeno* | 1030 | 1269 | 9 | 26 | 98 | 101 | 95 | 88 | 63 | 192 | 77 | 75 | 86 | 9 | 195 | 177 | 46 |
| 13 | Limoneno* | 1034 | 1195 | 4 | 21 | 4 | 7 | tr | tr | 9 | 6 | 5 | tr | 8 | — | 6 | 5 | tr |
| 14 | Eucaliptol* | 1038 | 1208 | 5 | 22 | 11 | tr | 5 | tr | 66 | 28 | 22 | — | — | — | 7 | 7 | tr |
| 15 | γ -Terpineno | 1063 | 1244 | 22 | 116 | 89 | 82 | 100 | 69 | 96 | 48 | 114 | 95 | 106 | 15 | 97 | 68 | 6 |
| 16 | trans-4-Tujanol | 1079 | 1553 | tr | 27 | tr | 4 | 5 | tr | 5 | 5 | tr | — | 12 | — | 9 | 16 | tr |
| 17 | α -Terpinoleno | 1092 | 1179 | tr | 37 | tr | tr | tr | — | tr | tr | tr | tr | tr | — | tr | tr | — |
| 18 | Linalol* | 1104 | 1547 | 4 | 42 | 4 | tr | tr | tr | tr | tr | tr | — | tr | — | 19 | 27 | 4 |
| 19 | cis-4-Tujanol | 1114 | 1553 | tr | 61 | tr | tr | tr | tr | tr | 5 | tr | — | tr | — | tr | 4 | tr |
| 20 | cis-p-Ment-2-en-1-ol | 1135 | 1570 | — | 39 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | tr | tr | — |
| 21 | trans-p-Ment-2-en-1-ol | 1159 | 1636 | — | 17 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 22 | Alcanfor* | 1158 | 1526 | — | — | — | — | — | — | tr | 4 | — | — | — | — | 6 | 12 | tr |
| 23 | Ipsdienol | 1162 | 1680 | — | — | 6 | 7 | 6 | tr | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 24 | Mentona | 1171 | 1472 | 360 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 25 | iso-Mentona | 1177 | 1498 | 41 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 26 | Mentol | 1180 | 1602 | 20 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 27 | Borneol | 1184 | 1712 | — | — | — | — | — | — | tr | — | — | — | tr | — | 8 | 12 | 4 |
| | Butirato de trans-3-hexenilo | 1188 | 1462 | — | — | tr | tr | — | tr | — | — | — | — | — | — | 8 | 13 | tr |
| 28 | iso-Pulegona | 1186 | 1592 | 10 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | iso-Mentol | 1188 | 1646 | 5 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 29 | Terpinen-4-ol* | 1191 | 1615 | tr | 259 | 15 | 16 | 8 | 5 | 16 | 14 | tr | 10 | 8 | — | 16 | 13 | tr |
| 30 | α -Terpineol | 1201 | 1702 | tr | 45 | tr | — | tr | — | 6 | tr | tr | — | tr | — | tr | tr | — |
| 31 | Estragol* | 1211 | 1675 | tr | — | — | — | — | — | — | — | tr | — | — | — | tr | — | 5 |
| 32 | cis-Piperitol | 1212 | 1682 | — | 15 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 33 | trans-Piperitol | 1222 | 1682 | — | 10 | — | tr | — | — | tr | — | — | — | — | — | tr | tr | — |
| 34 | Metil-timil-éter | 1237 | 1595 | 20 | — | 28 | 17 | 16 | 10 | 138 | 165 | 124 | — | — | — | 33 | 12 | tr |
| 35 | Carvacril-metil-éter | 1244 | 1607 | — | — | 4 | 4 | tr | tr | — | — | — | — | — | — | 21 | 9 | tr |
| 36 | Acetato de linalilo | 1253 | 1558 | — | 7 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 37 | Pulegona | 1254 | 1662 | 335 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 38 | Acetato de trans-4-tujanilo | 1258 | 1534 | — | 4 | — | — | — | — | 6 | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 39 | Piperitona | 1264 | 1739 | 4 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 40 | 2-Isopropil-4-metil-fenol | 1282 | 2168 | — | — | tr | tr | tr | tr | tr | 11 | tr | tr | tr | — | 5 | 7 | tr |

* Se usaron sustancias patrón. ** Identificado tentativamente tr: < 0,4%

Tabla 2. Continuación.

| No. Pico | Compuesto | IR | | CANTIDAD RELATIVA, % | | | | | | | | | | | | | | |
|----------|--|------|--------|----------------------|-------------|----------------|-----|-----|--------------|-----|-----|---------------|-----|-----|-------------|-----|-----|-----|
| | | DB-5 | DB-Wax | S. brownei | O. majorana | L. origanoides | | | L. micromera | | | P. amboinicus | | | T. vulgaris | | | |
| | | | | SDE | SDE | SDE | SDE | HD | SFE | SDE | HD | SFE | SDE | HD | SFE | SDE | HD | SFE |
| 41 | Timol* | 1291 | 2186 | 20 | tr | 69 | 106 | 143 | 88 | 341 | 247 | 328 | 9 | 9 | — | 358 | 340 | 208 |
| | trans-Anetol* | 1293 | 1834 | 40 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 42 | Carvacrol* | 1295 | 2223 | 9 | — | 423 | 426 | 444 | 518 | 10 | 35 | 15 | 620 | 537 | 142 | 43 | 64 | 31 |
| 43 | Acetato de terpinen-4-ilo | 1302 | 1623 | — | 6 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 44 | Acetato de timilo | 1348 | 1855 | tr | — | tr | tr | tr | — | 34 | tr | 25 | — | — | — | tr | tr | — |
| 45 | Acetato de carvacrilo | 1375 | 1880 | — | — | 24 | 9 | 9 | — | tr | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 46 | trans- β -Cariofileno* | 1434 | 1607 | 16 | 21 | 40 | 34 | 27 | 35 | 33 | 45 | 62 | 47 | 66 | 25 | 17 | 28 | 10 |
| 47 | trans- α -Bergamoteno | 1443 | 1591 | — | — | 6 | 8 | 4 | 5 | tr | 4 | tr | 23 | 37 | 15 | — | tr | — |
| 48 | 2,6-Dihidroxi-3-metilacetofenona** | 1445 | — | — | — | — | — | — | 8 | 6 | — | 11 | — | — | — | — | — | 54 |
| 49 | Aromadendreno | 1453 | 1650 | — | — | — | — | — | — | tr | 4 | tr | — | — | — | — | — | — |
| 50 | trans- β -Farneseno | 1454 | 1668 | — | — | tr | tr | tr | tr | — | — | — | tr | tr | — | tr | tr | 5 |
| 51 | α -Humuleno* | 1474 | 1682 | tr | tr | 25 | 20 | 15 | 18 | 7 | 8 | 8 | 15 | 25 | 6 | tr | tr | — |
| 52 | 4,6-Dihidroxi-2,3-dimetilacetofenona** | 1481 | 2455 | — | — | 11 | 23 | 13 | 24 | tr | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 53 | γ -Muuroleno | 1486 | 1699 | — | — | — | — | — | — | tr | 5 | tr | — | — | — | — | tr | — |
| 54 | Germacreno D | 1495 | 1723 | tr | — | tr | tr | tr | — | 13 | 7 | 31 | — | — | — | tr | 5 | tr |
| 55 | Viridifloreno | 1503 | 1697 | — | — | — | — | — | — | tr | 4 | tr | — | — | — | — | — | — |
| 56 | Biciclogermacreno | 1511 | 1748 | — | 12 | — | tr | 7 | — | tr | 5 | 8 | — | — | — | — | tr | — |
| 57 | β -Bisaboleno | 1516 | 1733 | — | — | 7 | 7 | — | 6 | — | — | — | tr | — | — | — | — | — |
| 58 | γ -Cadineno | 1525 | 1772 | — | — | tr | tr | tr | — | tr | 5 | 6 | — | — | — | tr | 6 | tr |
| 59 | Espatulenol | 1593 | 2143 | — | tr | — | — | — | — | tr | 5 | tr | — | — | — | — | tr | — |
| 60 | Óxido de cariofileno | 1598 | 2013 | — | tr | tr | tr | tr | tr | tr | 20 | tr | 12 | 18 | tr | tr | 12 | 8 |
| 61 | Epóxido de humuleno** | 1628 | 2011 | — | — | tr | tr | tr | tr | tr | tr | — | tr | 5 | — | — | tr | — |
| 62 | τ -Cadinol | 1656 | 2136 | — | — | — | — | — | — | tr | — | — | — | — | — | tr | 6 | tr |
| 63 | 14-Hidroxi-9-epi-trans- β -cariofileno** | 1686 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 4 | 8 | — | — | — | — |
| 64 | Acido palmítico | 1958 | — | — | — | — | — | — | tr | — | — | 5 | — | — | — | — | — | 36 |
| 65 | Fitol | 2112 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | tr | — | — | — | — | — | 20 |
| 66 | Acido linoleico | 2131 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 7 |
| 67 | Ácido linolénico | 2138 | — | — | — | — | — | — | tr | — | — | — | — | — | — | — | — | 42 |
| 68 | Ácido esteárico | 2158 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 11 |
| 69 | Tricosano | 2299 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 6 |
| 70 | α -Tocoferol | 2394 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 65 | — | — | — |
| 71 | Hexacosano | 2610 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | tr | tr | — | — | — | — | 8 |
| 72 | Tetracosanal | 2655 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 8 |
| 73 | Heptacosano | 2738 | — | — | — | — | — | — | tr | — | — | 4 | tr | — | — | — | — | 19 |
| 74 | Octacosano | 2894 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | tr | — | — | — | — | — | 8 |
| 75 | Escualeno | 2919 | — | — | — | — | — | — | 5 | — | — | tr | — | — | 9 | — | — | 27 |
| 76 | Hexacosanal** | 2963 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 11 |
| 77 | Nonacosano | 3083 | — | — | — | — | — | — | 4 | — | — | 25 | — | — | 11 | — | — | 148 |
| 78 | γ -Sitosterol | 3108 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 73 | — | — | — |
| | Hidrocarburo, C20-C30 | — | — | — | — | — | — | — | 29 | — | — | — | — | — | 615 | — | — | 123 |

* Se usaron sustancias patrón. ** Identificado tentativamente tr: < 0,4%

lado, para *S. brownei* y *O. majorana* los monoterpenoides fueron los constituyentes mayoritarios con cantidades relativas de 84,7 y 90,5%, respectivamente; se observó muy bajo contenido de timol y carvacrol, razón por la cual estas dos plantas se excluyeron de los ensayos de actividad antioxidante.

La Tabla 2 registra los compuestos identificados y las cantidades relativas (%) de los aceites y extractos obtenidos por MWHD, SDE y SFE, de las plantas de los géneros *Plectranthus*, *Satureja*, *Lippia*, *Thymus* y *Origanum* estudiados. Por cada método de extracción, se detectaron por GC-MS entre 20-84 componentes en cantidades relativas >0,4%, de los cuales se identificaron positivamente 87-97%, con base en los índices de retención (en columnas polar y no-polar), espectros de masas (EI, 70 eV) y usando algunas sustancias patrón.

La Figura 1 presenta los perfiles cromatográficos (corrientes iónicas totales reconstruidas) típicos de los aceites esenciales de *T. vulgaris* (A.), *L. origanoides* (B.) *P. amboinicus* (C.) y *L. micromera* (D.), ricos en timol y carvacrol, aislados por MWHD.

Según la composición dada para los aceites esenciales de las especies estudiadas, se encontró que *P. amboinicus* presentó el

contenido de carvacrol más alto (~54%); mientras que *T. vulgaris* posee el más alto contenido de timol (34%).

La composición química de los aceites esenciales y extractos de cada especie, obtenidos por MWHD y SDE, respectivamente, fue muy similar; mientras que los extractos, aislados por SFE, para las especies *T. vulgaris* y *P. amboinicus*, sí presentaron diferencias composicionales.

3.2. Evaluación de la capacidad antioxidante de aceites esenciales

La exactitud del método ABTS⁺ se estimó con base en los resultados obtenido para α -tocoferol, BHT y BHA en concentraciones entre 5×10^{-6} a 4×10^{-5} M. La capacidad antioxidante estimada por el método convencional espectroscópico de decoloración del ABTS⁺ presentó valores de actividad antioxidante total TAA (mmol de Trolox®/kg de AE) de 2040 ± 21 , 890 ± 32 , 800 ± 24 , 670 ± 24 para *L. origanoides*, *P. amboinicus*, *T. vulgaris* y *L. micromera*, respectivamente (Tabla 3). La capacidad antioxidante medida por este método mostró que los AE evaluados presentaron una menor actividad comparada con las de los antioxidantes BHA (7000 ± 487) y α -tocoferol (2590 ± 33). Sin embargo, tres de estas especies presentaron capacidad

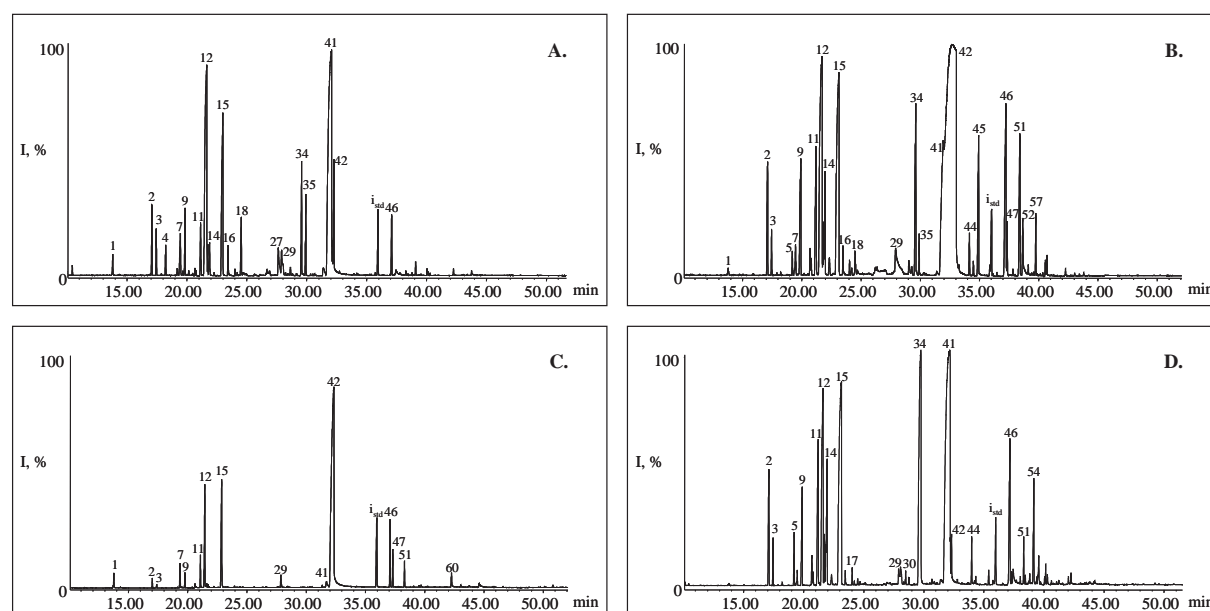


Figura 1. Corrientes iónicas totales reconstruidas (cromatogramas) obtenidas por GC-MS (DB-5, 60 m; EI, 70 eV) de los aceites esenciales ricos en timol y carvacrol, aislados por MWHD de A. *Thymus vulgaris*, B. *Lippia origanoides*, C. *Plectranthus amboinicus* y D. *Lippia micromera*.

antirradicalaria cercana a la del BHT (990 ± 31); para el aceite de *L. origanoides*, el valor de TAA fue más alto que el del BHT.

La realización del ensayo ABTS⁺ convencional tiene varios inconvenientes; entre ellos figuran: es muy laborioso, la cantidad de muestra y disolvente requerida es muy grande y hay diferencias sustanciales en los valores de TAA¹⁶ para las muestras que tienen una cinética de reacción muy lenta o múltiple cinética¹⁷, debido a la presencia de más de un grupo funcional reactivo en la molécula, o en el caso de los extractos de origen natural, debido a la complejidad de la composición de éstos^{18,19}. Por esta razón, se implementó el ensayo de ABTS⁺ con dilución en microplacas para así mejorar la metodología existente y ampliar el número de muestras analizadas por unidad de tiempo; además, fue necesario incrementar el tiempo de ensayo de 6 a 30 min para permitir que la reacción entre el antioxidante y el catión-radical alcanzara condiciones cercanas al equilibrio y así no se subestimara la capacidad antioxidante total¹⁶.

Por otro lado, los valores de TAA obtenidos por el método microescalado para las mismas especies vegetales disminuyeron así: 5000 ± 198 (*P. amboinicus*) > 4800 ± 337 (*L. origanoides*) > 3100 ± 84 (*T. vulgaris*) > 1840 ± 3 (*L. micromera*). El atrapamiento de radicales por el método microescalado evidenció que los AE evaluados presentaron una menor actividad

comparada con la de los antioxidantes BHT (21000 ± 308) y BHA (8000 ± 184). Sin embargo, *T. vulgaris* exhibió capacidad antirradicalaria cercana a la del α -tocoferol (3300 ± 47) y *P. amboinicus*, junto con *L. origanoides*, exhibieron valores de TAA superiores al del α -tocoferol.

Cuando se considera la composición de los aceites y la actividad de compuestos individuales, timol (6200 ± 43) y del carvacrol (6100 ± 69), la diferencia con la capacidad antioxidante de estos aceites puede atribuirse a los contenidos diferentes de estos dos componentes en dichos aceites²⁰. El carvacrol constituye aproximadamente el 54% del aceite de *P. amboinicus*, mientras que, (timol+carvacrol) conforman ca. 28% del aceite de *L. micromera*. Sin embargo, quizá lo más interesante es la supuesta falta de actividad de los componentes restantes de los aceites (46 y 72%, respectivamente). Por esta razón los AE, en su totalidad mostraron valores inferiores a los de sus componentes principales individuales, timol y carvacrol, lo que podría atribuirse a un posible efecto antagónico^{20, 21} entre los constituyentes mayoritarios y minoritarios en estos AE.

Los ensayos de peroxidación lipídica se realizaron empleando 5 mg de las sustancias. Los AE de las 4 especies vegetales mostraron un efecto protector mayor que la vitamina E y Trolox[®] siendo los más activos *P. amboinicus* y *L. origanoides*, seguidos de *L. micromera* y *T. vulgaris*.

Tabla 3. Valores de TAA y del efecto protector (%) para las sustancias de referencia, de control y aceites esenciales, obtenidos en los ensayos de decoloramiento de ABTS⁺ e inhibición del ácido linoleico.

| Sustancia evaluada | Inhibición ABTS ⁺ TAA (mmol Trolox [®] /kg muestra) | | Inhibición ácido linoleico Efecto protector, % (5 mg de antioxidante) |
|-----------------------|--|-------------------------------|---|
| | Tiempo, 6 min | Tiempo, 30 min (multipozo) | |
| Vitamina E | 2590 ± 33 | 3300 ± 47 | 39,8 ± 0,7 |
| Trolox [®] | — | — | 60 ± 3 |
| BHA | 6900 ± 487 | 8000 ± 184 | 90 ± 4 |
| BHT | 990 ± 31 | 21000 ± 308 | 80 ± 2 |
| Carvacrol | — | 6100 ± 69 | 70 ± 5 |
| Timol | — | 6200 ± 43 | 64,2 ± 0,2 |
| <i>L. micromera</i> | 670 ± 24 | 1840 ± 3 | 70 ± 6 |
| <i>P. amboinicus</i> | 800 ± 24 | 5000 ± 198 | 80 ± 8 |
| <i>L. origanoides</i> | 2040 ± 21 | 4800 ± 337 | 80 ± 5 |
| <i>T. vulgaris</i> | 890 ± 32 | 3100 ± 84 | 70 ± 6 |

Al comparar los valores de inhibición de los componentes mayoritarios individuales con los de AE obtenidos por este método, se encuentra que no hay una diferencia significativa; siendo la inhibición de los AE igual o mayor a la del timol y el carvacrol, lo que podría presumir un posible efecto sinérgico entre todos los constituyentes.

La confrontación de los resultados del ensayo de decoloración de ABTS⁺ y los de la oxidación del ácido linoleico mostró similitudes, sin embargo, los mecanismos de acción antioxidante son diferentes, con lo cual se podría considerar que: 1. Debido a la presencia de fenoles en los AE, éstos presentarían la habilidad de atrapamiento de radicales por transferencia de un electrón y/o un hidrógeno^{22, 23}; 2. Los otros constituyentes presentes *i.e.* hidrocarburos insaturados, activan otro mecanismo de protección, *e.g.* a través del “sacrificio” de moléculas que se oxidan más rápidamente que el ácido linoleico^{24,25}, que puede obstruir la propagación en cadena de la peroxidación lipídica.

4. Conclusiones

La identificación y la cuantificación de componentes de mezclas naturales y de productos de oxidación lipídica, posibilitadas por los métodos basados en GC-MS y en GC-ECD fueron el soporte de este estudio comparativo y constituyen la base para posteriores investigaciones que busquen relacionar la composición química con la actividad biológica. De los seis aceites esenciales estudiados, se encontró que *T. vulgaris* posee el contenido de timol más alto (34%), mientras que el carvacrol fue el componente mayoritario (~54%) en el AE de *P. amboinicus*, siendo este aceite una fuente importante de este compuesto.

La comparación de los valores TAA entre el ensayo ABTS⁺, bajo las metodologías convencional y la modificación empleando microplacas, permitió encontrar diferencias significativas. El valor TAA se subestima en el ensayo convencional debido a que bajo las

condiciones en que se realiza, la reacción entre la mayoría de antioxidantes fenólicos y el catión-radical es incompleta.

Los dos métodos mostraron que los AE evaluados presentaron actividad antioxidante inferior a la de los antioxidantes “control”, vitamina E, BHT y BHA. El potencial inhibitorio de ABTS⁺ presentado por los AE disminuyó en el siguiente orden: *P. amboinicus* > *L. origanoides* > *T. vulgaris* > *L. micromera*.

Referencias

1. B.H. García. *Flora medicinal de Colombia*. Vol. III, Bogotá: Tercer Mundo, 1992, 507 p.
2. S.E. Kintzios. Oregano. In: *Handbook of herbs and spices*. Vol 2. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd., 2004, pp. 536-50.
3. G.A. López González. *Guía de los árboles y arbustos de la península ibérica y baleares*. 2^a ed. Madrid: Mundi Prensa, 2004, p. 749.
4. H. Baydar, O. Sagdiç, G. Özkan and T. Karadogan. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control*, **15**: 169–172 (2004).
5. M. Lahlou. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytother. Res.*, **18**: 435-436 (2004).
6. M.T. Baratta, H.J.D. Dorman, S.G. Deans, A.C. Figueiredo, J.G. Barroso and G. Ruberto. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour Fragr. J.*, **13**: 235-244 (1998).
7. R.S. Lanigan and T.A. Yamarik. Final report on the safety assessment of BHT. *Int. J. Toxicol.*, **21**(Suppl. 2): 19-94 (2002).
8. W. Zheng and S. Wang. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric. Food Chem.*, **49**: 5165-5170 (2001).
9. M. Godefroot, P. Sandra and M. Verzele. New method for quantitative essential oil analysis. *J. Chromatogr.*, **203**: 325-335 (1981).
10. E.E. Stashenko, R. Acosta and J.R. Martínez. High-resolution gas-chromatographic analysis of the secondary metabolites obtained by subcritical-fluid extraction from Colombian rue (*Ruta graveolens* L.). *J. Biochem. Biophys. Methods*, **43**: 379-390 (2000).
11. R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans. Antioxidant activity applying

- an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.*, **26**: 1231-1237 (1999).
12. H. Tamura and A. Yamagami. Antioxidative activity of monoacylated anthocyanins isolated from muscat bailey a grape. *J. Agric. Food Chem.*, **42**: 1612-1615 (1994).
 13. E.E. Stashenko, M.C. Ferreira, L.G. Sequeda, J.R. Martínez, and J.W. Wong. Comparison of extraction methods and detection systems in the gas chromatographic analysis of volatile carbonyl compounds. *J. Chromatogr. A*, **779**: 360-369 (1997).
 14. R. Adams. Identification of essential oils components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation. 2004, 456 p.
 15. N.W. Davies. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and carbowax 20M phases. *J. Chromatogr.*, **503**: 1-24 (1990).
 16. M.J.T.J. Arts, J.S. Dallinga, H.P. Voss, G.R.M.M. Haenen, and A. Bast. A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. *Food Chem.*, **88**: 567-570 (2004).
 17. M.J.T.J. Arts, G.R.M.M. Haenen, H.P. Voss, and A. Bast. Antioxidant capacity of reaction products limit the applicability of the trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. *Food Chem. Toxicol.*, **42**: 45-49 (2004).
 18. R. van den Berg, G.R.M.M. Haenen, H. van den Berg, and A. Bast. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem.*, **66**: 511-517 (1999).
 19. M. Ozgen, R.N. Reese, A.Z. Tulio Jr, J.C. Sheerens, and A.R. Miller. Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *J. Agric. Food Chem.*, **54**: 1151-1157 (2006).
 20. H.J.D. Dorman, A.C. Figueiredo, J.G. Barroso, and S.G. Deans. *In vitro* evaluation of antioxidant activity of essential oils and their components. *Flavour Fragr. J.*, **15**: 12-16 (2000).
 21. A.E. Edris. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytother. Res.*, **21**: 308-323 (2007).
 22. N. Nenadis, L.F. Wang, M. Tsimidou, and H.Y. Zhang. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS⁺ assay. *J. Agric. Food Chem.*, **52**: 4669-4674 (2004).
 23. N.V. Yanishlieva, E.M. Marinova, M.H. Gordon, and V.G. Raneva. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chem.*, **64**: 59-66 (1999).
 24. M.C. Foti and K.U. Ingold. Mechanism of inhibition of lipid peroxidation by γ -terpinene, and unusual and potentially useful hydrocarbons antioxidant. *J. Agric. Food Chem.*, **51**: 2758-2765 (2003).
 25. G. Ruberto and M.T. Baratta. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chem.*, **69**: 167-174 (2000).