

PRODUCTOS NATURALES

Extracción, caracterización y actividad antioxidante del aceite esencial de *plectranthus amboinicus L*

Extraction, characterization and antioxidant activity of essential oil from *plectranthus amboinicus L*

QF Glicerio León Méndez,^I MSc. María del Rosario Osorio Fortich,^I
MSc. Miladys Esther Torrenegra,^I Dr.C. Jesús Gil González^{II}

^I Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Cartagena. Grupo de Investigación en Tecnología Farmacéutica, Cosmética y de Alimento (GITFCA). Cartagena, Colombia.

^{II} Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Medellín, Colombia.

RESUMEN

Objetivo: extraer, caracterizar y determinar la actividad antioxidante del aceite esencial de orégano francés (*Plectranthus amboinicus L*) cultivado en la zona norte del departamento de Bolívar, Colombia.

Método: el aceite esencial se obtuvo por hidrodestilación e hidrodestilación asistida por radiación con microondas, a partir de las hojas; se determinó densidad relativa a 20 °C, índice de refracción; solubilidad de los aceites esenciales en etanol (70 % v/v) y rotación óptica. La composición química se evaluó mediante cromatografía de gases/espectrómetro de masa. La actividad antioxidante fue determinada mediante las técnicas de actividad antiradicalaria por los métodos DPPH[·], ABTS^{·+}, y ORAC.

Resultados: los rendimientos oscilaron entre 0,05 y 0,78 %, dependiendo del método de extracción utilizado. Los resultados de la prueba de actividad antioxidante mostró que los aceites esenciales de orégano francés (*Plectranthus amboinicus L*) obtenidos mediante ambos métodos de extracción tuvieron resultados promisorios; además, estos aceites presentaron altos contenidos de monoterpenos oxigenados con reconocida actividad antioxidante, como son el carvacrol y el timol.

Conclusiones: El aceite esencial de orégano francés (*Plectranthus amboinicus L*) se considera como promisorio para diseñar productos magistrales con actividad antioxidante.

Palabras clave: actividad antioxidante, aceite esencial, *Plectranthus amboinicus* L.

ABSTRACT

Objectives: to extract, to characterize and to determine the antioxidant activity of the essential oil of French Oregano (*Plectranthus amboinicus* L) grown in the northern part of the Department of Bolívar, Colombia.

Methods: essential oil was extracted by distillation and radiation microwave-assisted hydrodistillation, from the leaves; relative density at 20 °C, refractive index; solubility of the essential oils in ethanol (70 % v/v) and optical rotation were determined. The chemical composition was assessed using gas chromatography/mass spectrometer. The antioxidant activity was determined using the techniques of antiradical activity by the DPPH., ABTS.+ and ORAC methods.

Results: yields ranged from 0.05 to 0.78 %, depending on the extraction method used. The results of the test of antioxidant activity showed that the essential oils of French oregano (*Plectranthus amboinicus* L) obtained by both methods of extraction had promising results; in addition, these oils had high contents of ,oxygenated monoterpenes with recognized antioxidant activity, such as carvacrol and thymol.

Conclusions: the essential oil of French oregano (*Plectranthus amboinicus* L) is considered as promising to design products with antioxidant activity.

Keywords: antioxidant activity, essential oil, *Plectranthus amboinicus* L.

INTRODUCCIÓN

Los antioxidantes son sustancias que pueden impedir, retrasar o inhibir las oxidaciones catalíticas y los procesos que inducen a la formación de radicales libres.^{1,2} Existe actualmente un creciente interés en los aditivos naturales como antioxidantes potenciales, por lo cual en los últimos años han sido objeto de estudio muchas fuentes de origen vegetal.

Entre las propiedades antioxidantes de muchas plantas aromáticas se destaca la capacidad de regular las alteraciones relacionadas con el estrés oxidativo inducido por las especies reactivas de oxígeno (ERO) y radicales libres (RL), por lo cual ganan en el interés de muchos grupos de investigación.^{2,3}

Los aceites esenciales (AE) de plantas aromáticas y medicinales contienen principios activos que exhiben bioactividades como la antioxidante, antifúngica, antimicrobiana, entre otras.⁴⁻⁵ En particular, el AE de la especie vegetal *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng perteneciente al género *Plectranthus* conocida en Colombia como Orégano Francés, contiene compuestos fenólicos como el timol y el carvacrol, a los cuales se les atribuye propiedades antisépticas, bactericidas y antioxidantes.⁵⁻⁷

Adicionalmente, hoy por hoy, la tendencia de los consumidores se inclina hacia el consumo de "cosméticos naturales" libres de productos de síntesis y aditivos químicos (neutralizantes, preservantes, antioxidantes, colorantes y saborizantes),

por lo que resulta interesante estudiar la actividad antioxidante de los aceites esenciales (AE) de plantas nativas. Este se trazó como objetivo extraer, caracterizar y evaluar la actividad antioxidante *in vitro* del aceite esencial del Orégano francés (*Plectranthus amboinicus L.*) cultivado en la zona norte del departamento de Bolívar, Colombia.

MÉTODOS

RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Las hojas de las plantas orégano francés (*P. amboinicus*), fueron recolectadas en el barrio Membrillal, cerca de la carretera que conduce a la zona industrial de la ciudad de Cartagena, Colombia, aproximadamente a 12 kilómetros de la región suroriental. Se tomaron 1 000 g de hojas por semana, en el periodo comprendido de febrero a marzo del 2014. El material vegetal fue identificado en el Herbario Gabriel Gutiérrez V. (MEDEL) de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, registro nacional de colecciones biológicas. El números de colección de dicha planta fue conservado con Nº de colección Torrenegra M. Nº02.

PROCESAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL

Las hojas colectadas fueron lavadas con agua y seleccionadas para garantizar buen estado; seguidamente se trocearon, pesaron y procesaron inmediatamente. Obtención del AE por HD, se realizó en un equipo de hidrodestilación del tipo *Clevenger* 500 g del material vegetal, se introdujeron en el balón de extracción, el cual contenía 500 mL de agua destilada. El tiempo de extracción fue de 3 horas.⁸⁻¹⁰

En la obtención del AE por MWHD, se llevó a cabo en un equipo de destilación tipo *Clevenger* con un reservorio de destilación Dean Stark adaptado a un sistema de calentamiento por radiación de microondas, un horno microondas convencional marca (Samsung, Estados Unidos), con una potencia del 70 %, dentro del cual se colocó un balón de extracción de 4 L con 500 mL de agua destilada y 500 g del material vegetal. El tiempo de extracción fue de 1 hora.⁸⁻¹⁰

En ambos casos los aceites esenciales obtenidos se separaron por decantación e inmediatamente fueron almacenaron en viales ámbar a 4 °C hasta la realización de los respectivos análisis.

DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES FÍSICAS DEL AE

A cada muestra de AE se le midieron las siguientes propiedades físicas: a) densidad relativa a 20 °C; b) índice de refracción; c) solubilidad del AE en etanol 70% (v/v): en un tubo de plástico con tapa de 1,5 mL se adicionaron 100 µL de etanol al 70 % (v/v) y 2 µL del AE. La mezcla se homogenizó en un vórtex a 200 rpm hasta obtener una solución homogénea; d) rotación óptica: se preparó una disolución al 10 % (p/v) del AE en etanol (96 %). El análisis fue realizado utilizando un polarímetro (*Sper Scientific*, Estados Unidos) provisto de una celda de 10 mL, a una temperatura de 20 °C y la línea D del sodio (589 nm).¹⁰⁻¹²

ANÁLISIS DEL AE POR CROMATOGRAFÍA DE GASES/ESPECTRÓMETRO DE MASA (CG/EM)

Se empleó un equipo CG/EM 7890A/5975C Agilent (Estados Unidos) en interfase con un detector selectivo de masas HP5973 Network conectado en línea con un sistema HP-MS ChemStation y la base de datos NIST-2008. Las condiciones de operación fueron: columna capilar HP-5MS (5% phenyl methyl silox, 30 m x 250 μ m x 0.25 μ m), temperatura inicial 45 °C, temperatura de la línea de transferencia de 280 °C y volumen de inyección 1,0 μ L en modo *split* (20:1), con temperatura del inyector de 250 °C.¹⁰⁻¹⁵ La detección de los compuestos se realizó por comparación del espectro de masas, en cada tiempo de retención, con los reportados en la base de datos NIST-2008.

MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS AE

Para determinar la actividad antioxidante de cada AE se emplearon tres metodologías: DPPH[•], ABTS^{•+} y ORAC.

MÉTODO DEL RADICAL DPPH[•]

La actividad captadora de radicales libres DPPH[•] se determinó empleando el método descrito por Silva *et al*¹⁶ (con algunas modificaciones 75 μ L de muestra fueron adicionados a 150 μ L de una solución metanólica de DPPH[•] (100 ppm) y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min, luego de los cuales se determinó espectrofotométricamente la desaparición del radical DPPH[•] a 550 nm en lector de microplacas *Multiskan Ex* (*Thermoscientific*). Se utilizó ácido ascórbico (25 μ g/mL como control positivo de captación de los radicales DPPH[•]).

$$\% \text{ Inhibición} = [(AO - AF) / AO] \times 100 \text{ (Ecuación 1)}$$

Donde AO y AF son los valores de absorbancia del blanco (solución de DPPH en alcohol) y la muestra (solución de DPPH más antioxidante disueltos en alcohol) respectivamente.

MÉTODO DEL RADICAL ABTS^{•+}

La actividad captadora del radical libre ABTS[•] se determinó empleando el método descrito por Re *et al*¹⁷ con algunas modificaciones. El radical ABTS[•] se formó tras la reacción de 3.5 mM de ABTS con 1.25 mM de persulfato potásico (concentración final). Las muestras fueron incubadas entre 2-8 °C y en oscuridad durante 16-24 h. Una vez formado el radical ABTS se diluyó con etanol hasta obtener una absorbancia de 0,7±0,05 a 734 nm. A un volumen de 190 μ L de la dilución del radical ABTS se le adicionaron 10 μ L de la muestra de AE y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos; luego de transcurrido este tiempo, se determinó espectrofotométricamente la desaparición del radical ABTS a 734 nm en el lector de microplacas *Multiskan Ex* (*Thermoscientific*). Se utilizó ácido ascórbico (4 μ g/mL) como control positivo de captación de los radicales ABTS[•].

MÉTODO ORAC

a) *ORAC hidrofílico*: en esta evaluación se empleó *trolox* como estándar y condiciones controladas de temperatura (37 °C) y pH (7,4). Las lecturas se realizaron a una λ de excitación de 493 nm y de emisión de 515 nm. Para el desarrollo de la técnica se utilizaron soluciones de fluoresceína 1×10^{-2} M en PBS (75 mM) y AAPH 0,6 M en PBS (75 mM). La muestra se preparó mezclando 21 μ L de fluoresceína, 2,899 μ L de PBS, 30 μ L del extracto (muestra problema) y 50 μ L de AAPH. Como referencia se usó *trolox*. El efecto protector del antioxidante se calculó usando las diferencias de áreas bajo la curva de decaimiento de la fluoresceína con el blanco y la muestra, y el resultado se comparó con la curva obtenida para el *trolox*. Los resultados se expresaron en micromoles de equivalentes de *trolox* por cada 100 gramos de muestra (μ mol Tx/100 g muestra), de acuerdo a la siguiente ecuación (2).^{18,19}

$$\text{ORAC} = [(AUC - AUC^\circ) / (AUC_{Trolox} - AUC^\circ)] \times f(Trolox) \text{ (Ecuación 2)}$$

Donde AUC es el área bajo la curva de la muestra, AUC° es el área bajo la curva para el control, AUC_{Trolox} área bajo la curva para el *trolox*, f es el factor de dilución de los extractos.

b) *ORAC lipofílico*: se siguió el procedimiento previamente descrito a excepción de que la muestra y el *trolox* fueron preparados con ciclodextrina metilada (7 %) y en una mezcla de acetona-agua al 50 %. Las disoluciones se agitaron durante 1 hora y se procedió al análisis de acuerdo con lo descrito en el método ORAC hidrofílico.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los ensayos se realizaron por triplicado siguiendo los protocolos establecidos anteriormente, los resultados se expresaron como el promedio \pm el error estándar de la media (ESM) y se analizaron mediante Prueba *t de Student*. Valores de $P < 0,05$ fueron considerados significativos. Para los análisis estadísticos el paquete *GraphPadPrism Versión 5 para Windows*.

RESULTADOS

La eficiencia de la extracción, las propiedades físicas y el análisis de la composición química del AE por CG/EM se presentan en la tabla 1 y 2.

La actividad antioxidante del AE de *P. amboinicus*, se evaluó por tres métodos diferentes: DPPH \bullet , ABTS \bullet^+ y ORAC. Los antioxidantes pueden actuar por múltiples mecanismos, dependiendo del sistema de reacción o de la fuente radicalaria u oxidante utilizada.²⁰ Los resultados se expresan como actividad antiradical o IC_{50} , la cual está definida como la concentración del antioxidante que disminuye la absorción del radical a un 50% de la cantidad inicial.²¹

El valor IC_{50} mide la capacidad captadora de radicales ABTS \bullet^+ o DPPH \bullet de los AE con respecto a un estándar antioxidante como el ácido ascórbico, el cual cede un hidrógeno, produciéndose una transferencia de electrones de doble enlace, hacia el oxígeno, que sufrió la pérdida de un electrón, repitiendo la misma acción en el

siguiente átomo de oxígeno, que sufrió la pérdida del átomo de hidrógeno, hasta establecerse el equilibrio de energía. De acuerdo a esta reacción, el ácido ascórbico cede dos hidrógenos.²²

Tabla 1. Rendimiento y propiedades físicas de los AE de la especie *Plectranthus* obtenidos a través del método de hidrodestilación por arrastre de vapor (HD) e hidrodestilación asistida por microondas (MWHD)

ANÁLISIS	<i>P. amboinicus</i>	
	HD	MWHD
Rendimiento (%)	0,05±0,002 ^a	0,078±0,001 ^b
Índice de refracción 20 °C	1,4753±0,0004 ^a	1,5065±0,00045 ^b
Solubilidad EtOH 70 % (v/v)	Positiva	Positiva
Rotación óptica	-0,283±0,02887 ^a	-0,267±0,02887 ^b
Densidad (g/mL) a 20 °C	0,9471±0,0052 ^a	0,9473±0,0043 ^a

Filas sin ninguna letra en común presentaron diferencias estadísticas significativas a un nivel de confianza (P<0,05).

Tabla 2. Componentes mayoritarios detectados en el AE de *P. amboinicus* obtenido mediante HD y MWHD

Compuesto	% Abundancia relativa , (tr, min)	
	<i>P. amboinicus</i>	
	HD	MWHD
p-Cimeno	N.P	2,31 (5,957)
α-pineno	0,59 (9,957)	N.P
β-Mirceno	N.P	N.P
o-cimeno	6,71 (13,464)	N.P
Limoneno	N.P	N.P
γ -Terpineno	6,25 (14,709)	0,91 (6,485)
Linalool	N.P	N.P
Timol	10,11 (22,148)	10,74 (20,854)
Citral	N.P	6,49 (10,102)
Carvacrol	64,55 (22,521)	69,97 (11,684)
Eugenol	N.P	N.P
Cariofileno	4,00 (25,361)	2,75 (12,58)

Tiempo de retención (tr) y abundancia relativa (%) de los aceites esenciales, No presento (NP), identificados por comparación con espectro de masas de referencia de la base de datos NIST-2008.

En la tabla 3 se presentan los resultados obtenidos en la determinación de la capacidad antioxidante de las muestras provenientes de los AE extraídos por los métodos HD y MWHD analizadas por los métodos DPPH[•], ABTS^{•+} y ORAC.

Tabla 3. Capacidad antioxidante del AE de *P. amboinicus* extraídos por los métodos HD y MWHD analizadas por los métodos DPPH[•], ABTS^{•+} y ORAC

Aceite Esencial	Método de extracción	Métodos para determinar la actividad antioxidante			
		DPPH [•] IC ₅₀ (μ g/mL)	ABTS ^{•+} IC ₅₀ (μ g/mL)	ORAC μ mol trolox/100 g de muestra	
				Hidrofilico	Lipofílico
<i>P. amboinicus</i>	HD	327,5 \pm 2,35	23,97 \pm 0,07	392 918,53 \pm 0,12	682 952,60 \pm 0,05
	MWHD	240,3 \pm 4,60	29,08 \pm 0,09	244 093,15 \pm 0,26	575 294,10 \pm 0,22

DISCUSION

Los AE de la especie vegetal obtenidos por los dos métodos de extracción presentaron propiedades físicas en común, tales como: olor intenso y característico, líquidos a temperatura ambiente, arrastrables por vapor de agua e insolubles en ella, rango de color amarillo pálido a intenso.

Con respecto al rendimiento se encontraron diferencias estadísticas significativas por ambos métodos; cabe resaltar que para MWHD, además de utilizar menos tiempo de extracción, mostró un porcentaje de rendimiento mayor que el valor obtenido por el método de HD, esto posiblemente puede atribuirse a que las microondas involucran un flujo de calor más eficiente que el obtenido por los métodos clásicos de calentamiento conductivo, las microondas pueden calentar toda la muestra casi simultáneamente y a un ritmo muy alto, generando un menor consumo de energía.^{9-12,23}

La prueba de solubilidad en etanol al 70 % fue positiva para los diferentes AE obtenidos ambos métodos. El comportamiento de solubilidad es semejante al reportado por Torrenegra;¹⁰ lo anterior, se debe principalmente al contenido de compuestos oxigenados en los AE. La presencia de compuestos oxigenados aumenta la afinidad por el solvente y, adicionalmente, los aldehídos y alcoholes poseen la capacidad de formar puentes de hidrógeno; por tal razón, el contenido de compuestos oxigenados, además de proveer las notas aromáticas agradables a los AE, aumentan su solubilidad en etanol haciéndolos más aptos para su aplicación en la industria.^{2,10}

Los resultados de los análisis de CG/EM indican que en ambas metodologías se obtienen componentes que aparecen a un mismo tiempo de retención y con un porcentaje de abundancia relativa similar.

Muñoz-Acevedo y otros encontraron como componente mayoritario del aceite esencial de *Plectranthus amboinicus* al carvacrol (53,7 %),⁶ resultado que este compuesto está presente en el perfil cromatográfico mostrados y es el componente mayoritario igualmente.

Sin embargo es visible una pequeña variación con respecto a los componentes minoritarios encontrados por Muñoz-Acevedo,⁶ ocasionado por el efecto de diferentes factores ambientales sobre el contenido de compuestos en plantas

medicinales.^{2,10,12} La intensidad de la luz y el fotoperíodo, que varían de región en región; época de recolección y edad de las plantas afectan la composición del aceite esencial.²⁴

Castillo *et al*²⁵ y Loziene *et al*²⁶ encontraron que la oxidación del AE de orégano es dependiente del contenido de timol y carvacrol. Por su parte, el grupo de Yanishlieva y Marinova²⁷ informa sobre algunos aspectos del mecanismo y la cinética de la oxidación de diferentes sistemas lipídicos inhibidos por la presencia timol y carvacrol, hallando mayor efectividad del timol, debido a la mayor estabilidad del radical timoil, originada por el efecto inductivo del grupo isopropil localizado en la posición orto con relación al grupo hidroxilo.

Los resultados de la actividad captadora de radicales DPPH[•] y ABTS^{•+} del AE de *P. amboinicus* obtenido por los dos métodos de extracción variaron entre 240,3 y 327,5 µg/mL para el DPPH[•], y de 23,97 a 29,08 µg/mL para el ABTS^{•+}. De los dos AE que se estudiaron el más promisorios, debido a que mostró actividad significativa, fue el AE de *P. amboinicus* obtenido por HD. Es posible inferir que cada técnica de extracción por sus condiciones de reacción y solubilidad propicie la existencia de diversos compuestos con potencial antioxidante en la mezcla.

Los resultados muestran que para los dos AE los valores obtenidos con el ABTS^{•+} y expresados como µg/mL, son menores que los obtenidos con la técnica del DPPH[•]; el método de la decoloración del catión-radical ABTS^{•+} es aplicable a antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos lo que le permite ser implementado para sistemas tanto acuosos como lipofílicos,^{17,28,29} además, el ABTS es muy soluble en agua y químicamente estable,³⁰⁻³² en cambio, el DPPH[•] solo puede disolverse en medio orgánico por lo que mide preferentemente la capacidad antioxidante de compuestos poco polares o no polares.³²

La mayor actividad antioxidante se obtuvo para el AE de *P. amboinicus* obtenido por HD. El valor ORAC lipofílico e hidrofílico fue de 682 952,60 y 392 918,53 µmol *trolox*/100 g de muestra, respectivamente. El resultado anterior demuestra que este AE tiene una alta capacidad de inhibir la decoloración de la molécula de fluoresceína.

La mayor actividad antioxidante del AE de *P. amboinicus* se obtuvo por el método ORAC lipofílico, obteniéndose el menor valor de decoloración que representa la mayor actividad antioxidante con un valor de 682 952,60 µmol *trolox*/100 g de muestra, este valor supera los reportados en la literatura para muchas frutas, vegetales, aceites y legumbres.^{18,19,33,34}

Se puede decir que el rendimiento del AE de *P. amboinicus* es dependiente del método de extracción utilizado para su obtención. El mayor contenido de AE se obtiene cuando se emplea la extracción mediante hidrodestilación asistida por microondas (MWHD), en comparación con el método de hidrodestilación (HD) y químicamente el aceite esencial contiene mayoritariamente monoterpenos siendo el carvacrol el que se encuentra con un mayor porcentaje de abundancia relativa, destacando que AE obtenido por HD presentó resultados promisorios; lo cual, convierte a este AE, en un excelente activo para el diseño de productos magistrales con actividad antioxidante.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de Cartagena por facilitar espacio, recursos y tiempo de los investigadores.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Matiz G, Osorio MR, Camacho F, Atencia M, Herazo J. Diseño y evaluación *in vivo* de fórmulas para acné basadas en aceites esenciales de naranja (*Citrus sinensis*), albahaca (*Ocimum basilicum* L) y ácido acético. Biomédica: Revista del Instituto Nacional de Salud. 2012;32(1):125-133.
2. Granados C., Yáñez Y, Santafé G. Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander. Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas. 2012;10(1):12-23.
3. Rojano BA, Gaviria CA, Saez JA. Antioxidant activity determination in a lipidic peroxidation model of butter inhibited by isoespintanol. VITAE. 2008;15(2):212-218.
4. Manjamalai A, Alexander T, Grace VM. Bioactive evaluation of the essential oil of *Plectranthus amboinicus* by GC-MS analysis and its role as a drug for microbial infections and inflammation. Int J Pharm Pharm Sci. 2012;4(3):205-211.
5. El-Hawary SS, El-sofany RH, AbdelMonem AR, Ashour RS, Sleem AA. Polyphenolics content and biological activity of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) spreng growing in Egypt (Lamiaceae). Pharmacognosy Journal. 2012;4(32):45-54.
6. Muñoz-Acevedo A, Kouznetsov VV, Stashenko EE. Composición y capacidad antioxidante in-vitro de aceites esenciales ricos en Timol, Carvacrol, trans-Anetol o Estragol. Salud UIS 2009;41:287-294.
7. Patel RD, Mahobia NK, Singh A. Antioxidant Potential of Leaves of *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng. Der Pharm Lett. 2010;2(4):240-245.
8. Ferhat AM, Meklati YB, Smadja J, Chemat F. An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel. Journal of Chromatography A. 2006;1112:121-126.
9. Golmakani MT, Rezaei K. Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. Food Chemistry. 2008;109:925-30.
10. Torrenegra M, Granados C, Osorio M, León G. Method comparison of hydrodistillation microwave radiation-assisted (MWHD) front hydrodistillation (HD) in the extraction of essential oil of *Minthostachys mollis*. Inf. Tecnol. 2015;26(1):117-122.
11. Torrenegra M, Matiz G, León G, Gil J. Actividad antibacteriana in vitro de aceites esenciales frente a microorganismos implicados en el acné. Revista Cubana de Farmacia. 2015;49(4). En prensa (Oct-Dic).

12. León G, Osorio MR, Martínez SR. Comparación de dos métodos de extracción del aceite esencial de *Citrus Sinensis* L. Revista Cubana de Farmacia. 2015;49(4). En prensa (Oct-Dic).
13. Baharum SN, Bunawan H, Ghani MaA, Mustapha WAW, Noor NM. Analysis of the chemical composition of the essential oil of *Polygonum minus* Huds. using two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry (GC-TOF MS). Molecules. 2010;15(10):7006-15.
14. Tomy GT, Stern GA, Muir DC, Fisk AT, Cymbalisty CD, Westmore JB. Quantifying C10-C13 polychloroalkanes in environmental samples by high-resolution gas chromatography/electron capture negative ion high-resolution mass spectrometry. Anal Chem. 1997;69(14):2762-71.
15. Matiz G, Osorio M, León G. Actividad antibacteriana in vitro de diecinueve aceites esenciales frente a bacterias asociadas al acné. Revista Cubana de Farmacia. 2015 [citado: 30 Sep 2015];49(1). Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/far/vol49_1_15/far11115.htm
16. Silva B, Andrade P, Valentao P, Ferreres F, Seabra R, Ferreira M. Quince (*Cydonia oblonga* Miller) Fruit (Pulp, Peel, and Seed) and Jam: Antioxidant Activity. J. Agric. Food Chem. 2004;52:4705-12.
17. Re R, Pellegrini A, Proteggente A, Pannala A. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Rad. Biol. Med. 1999;26:1231-37.
18. Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior R.L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. J Agric Food Chem. 2001;49:4619-26.
19. Naranjo M, Velez LT, Rojano B. A. Antioxidant activity of different grades of Colombian coffee. Rev Cubana Plant Med. 2011;16:164-173.
20. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J. Agric. Food Chem. 2005;53:4290-4302.
21. Floegel A, Kim DO, Chung SJ, Koo SI, Chun OK. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. Journal of Food Composition and Analysis. 2011;24(7):1043-1048.
22. Villanueva J, Condezo L, Asquieri E. Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante, en la cáscara de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K) McVaugh). Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas. 2010;30(1):151-160.
23. Hong-Wu W, Yan-Qing L, Shou-Lian W, Zi-Jun Y; Kuan L. Comparison of Microwave-Assisted and Conventional Hydrodistillation in the Extraction of Essential Oils from Mango (*Mangifera indica* L.) Flowers. Molecules 2010;15:7715-23.
24. Rincón CA, Castaño JC, Ríos E. Actividad biológica de los aceites esenciales de *Acmeella ciliata* (Kunth) Cass. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2012;17(2):160-171.

25. Castillo-Herrera G, Garcia-Fajardo J, Estarrón-Espinosa M. Extraction method that enriches phenolic content in oregano (*Lippia graveolens* H.B.K.) Essential oil. *Journal of Food Process Engineering*. 2007;30:661-669.
26. Loziene K, Venskutonis PR, Sipailiene A, Labokas J. Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. *Food Chem.* 2007;103:546-559.
27. Yanishlieva NV, Marinova EM, Gordon MH, Raneva V. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chem.* 1999;64(1):59-66.
28. Castro-Guerrero JP, Ocampo-Buendía YC, Franco-Ospina LA. Actividad antiinflamatoria y antioxidante de *Merremia umbellata* (L.) Hallier f. *Revista Ciencias Biomédicas*. 2013;4(1):13-19.
29. Nenadis N, Wang LF, Tsimidou M, Zhang HY. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS.+ Assay. *J. Agric. Food Chem.* 2004; 52:4669-74.
30. Kuskoki ME, Asuero GA, García MC. Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 2004;24(4):691-93.
31. Kuskoski EM, Asuero AG, Troncoso AM. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Cien. Tecnol. Aliment.* 2005;25(4):726-32.
32. Gonzales MC, Soto M. Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano Mexicano. *Rev. Fitotec. Mex.* 2007;30(1):43-49.
33. Apak R, Güclü K, Demirata B, Özyürek M, Celik SE, Bektasoglu B, Berker KI, Özyurt D. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules* 2007;12:1496-1547.
34. Rautenbach F, Venter I. Hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity of commonly consumed South African fruits, vegetables, grains, legumes, fats/oils and beverages. *J Food Compos Anal.* 2010;23(7):753-61.

Recibido: 7 de febrero de 2015.

Aprobado: 21 de abril de 2015.

Glicerio León Méndez Químico . Universidad de Cartagena, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Campus de Ciencias de la Salud Barrio Zaragocilla, Cartagena, Colombia. Teléfono: (575)6699771. Correo electrónico: gleonm1@unicartagena.edu.co