

Efecto del origen, la época de recolección y la edad de las hojas en el rendimiento y el contenido de timol de aceites esenciales de *Lippia origanoides* H.B.K.

Effect of origin, harvest time and leaves age on the yield and thymol content of essential oils from *Lippia origanoides* H.B.K.

Oscar Arango-Bedoya^{1*}, Andrés Mauricio Hurtado-Benavides^{1†}, e Inés Toro-Suárez^{2‡}

¹Profesor Asociado. Universidad de Nariño. Facultad de Ingeniería Agroindustrial. Grupo de Investigación Tecnologías Emergentes en Agroindustria (TEA). Pasto. Colombia. ²Investigadora Corpoica. Bogotá. Colombia.

*Autor para correspondencia: Oscar769@udenar.edu.co; †ahurtadob@hotmail.com; ‡itoro@corpoica.org.co

Rec.: 09.06.11 Acept.: 13.07.12

Resumen

En este estudio se evaluó el efecto del origen (cuatro zonas), la época de recolección (lluviosa y seca) y la edad de las hojas (jóvenes y maduras) sobre el rendimiento y el contenido de timol del aceite esencial (AE) de plantas de *Lippia origanoides*, que crecen en estado silvestre en la región del Alto Patía al sur-occidente de Colombia. Las extracciones de AE se realizaron mediante la técnica de hidro-destilación asistida por radiación de microondas (MWHD) y fueron analizadas por cromatografía de gases. Los rendimientos de AE variaron entre 2.53 y 3.28% y sólo se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) para la zona de origen de las plantas. Para el contenido de timol se observaron diferencias relacionadas con la época de recolección, siendo mayor el contenido en las muestras recolectadas en época seca. Los compuestos principales identificados en los AE fueron timol (50.8 - 81.6%), ρ -cimeno (7.5 - 19.5%) y γ -terpineno (2.3 - 7.4%).

Palabras clave: Aceite esencial, *Lippia origanoides*, MWHD, orégano de monte, timol.

Abstract

The purpose of this research was to evaluate the effect of the origin (4 localities), the plant's leaves age (young and mature) and the season (rainy and dry season) on the essential oil's (EOs) yield and thymol content of *Lippia origanoides* growing wild in the Alto Patía region (south-west of Colombia). The extractions were performed through microwave-assisted hydrodistillation technique (MWHD) and the EOs were analyzed by gas chromatography. Yields of EOs varied between 2.5 and 3.3% and were obtained where the origin factor showed statistical differences ($P \leq 0.05$) over the yielding. Taking into account the thymol content, differences related to the season were observed. The highest thymol content in the EOs were obtained in the dry season. The major compounds identified in the EOs were thymol (50.8 - 81.6%), ρ -cymene (7.5 - 19.5%) and γ -terpinene (2.3 - 7.4%).

Key words: Essential oil, *Lippia origanoides*, MWHD, thymol, wild oregano.

Introducción

Lippia origanoides H.B.K. es una planta conocida popularmente como 'orégano de monte' que llega a crecer hasta 3 m de longitud, posee hojas verdes ovaladas muy aromáticas e inflorescencias en racimo, axilares y blancas. En Colombia se encuentra con frecuencia en los departamentos de Guajira, Magdalena, Cauca, Cundinamarca, Norte de Santander y Santander (García-Barriga, 1992).

Esta planta es utilizada en medicina popular para el tratamiento de dolencias estomacales, náuseas, flatulencias y como antiséptico para boca y garganta (Pascual *et al.*, 2001). Debido al alto rendimiento de extracción del aceite esencial (AE) y sus propiedades antimicrobianas y antioxidante demostradas en varios estudios (Dos Santos *et al.*, 2004; Olivera *et al.*, 2007; Muñoz *et al.*, 2007) ésta es una especie promisoría para la obtención de compuestos aplicables por las industrias farmacéutica, cosmética y de alimentos.

La composición del aceite esencial de *L. origanoides* es afectada por las condiciones edafológicas y ambientales durante el crecimiento de la planta, como son las características del suelo, la duración de la luz solar, la temperatura, el estrés por agua y la edad de la planta (Dos Santos *et al.*, 2004).

Debido a los factores que afectan la composición y el rendimiento de los AE de *L. origanoides*, es conveniente estudiar su actividad biológica la cual varía con la genética y los parámetros ambientales locales, por tanto, es necesario caracterizar los nichos de producción y la definición de potencialidades para el desarrollo de plantas con un perfil óptimo de ingredientes específicos biológicamente activos, y asegurar así la calidad y la eficiencia del producto. En este sentido, entre los factores que afectan la composición de los AE del orégano de monte, los más importantes son la zona de origen de la planta, la parte de la planta utilizada, el estado de desarrollo, el clima y las condiciones de crecimiento (temperatura, suelo, fertilización), así como el tipo de extracción y las condiciones de almacenamiento (Cosentino *et al.*, 1999; McGimpsey *et al.*, 1994).

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del origen, la edad de las hojas de la

planta y la época de recolección (lluviosa o seca) sobre el rendimiento y el contenido de timol del aceite esencial del orégano silvestre (*L. origanoides*) de la región Alto Patía, Colombia, con el fin de obtener información que permita un mejor aprovechamiento con fines comerciales.

Materiales y métodos

Las hojas de *Lippia origanoides* se recolectaron manualmente en la zona del Alto Patía, municipio de Taminango, en límites de los departamentos de Nariño y Cauca, al suroccidente de Colombia. Esta micro-región se caracteriza por un clima tropical seco, con temperatura promedio de 24 °C, suelos semiáridos, escaso nivel de lluvias (700 - 900 mm/año) y con vegetación típica de un enclave sub-xerofítico. La recolección del material de hojas se hizo en junio y julio (época seca) y en febrero y marzo (época lluviosa). En cada época se recolectaron dos tipos de hojas de la misma planta, jóvenes y maduras. Las hojas jóvenes correspondían a aquellas de menor tamaño, más turgentes y de color verde; mientras que las hojas maduras se caracterizaban por su mayor tamaño, menos turgentes y de color amarillo.

Las hojas se separaron de los materiales extraños, se pesaron y después se secaron a la sombra a temperatura ambiente por espacio de ocho días, hasta alcanzar una humedad aproximada de 12%, luego se empacaron en sacos de polietileno y se almacenaron en un lugar limpio y libre de humedad hasta su procesamiento.

Se utilizó un diseño experimental multifactorial categórico, con dos repeticiones, lo que permitió estudiar el efecto del origen (cuatro zonas de producción), la edad de las hojas de la planta (jóvenes y maduras) y la época de recolección de las hojas (lluviosa y seca), sobre el rendimiento y el contenido de timol del aceite esencial de *L. origanoides*. Las zonas de producción (veredas) seleccionadas fueron El Cardo y Las Juntas, localizadas entre 740 y 990 m.s.n.m. y San Juanito y Alto de Mayo entre 1100 y 1200 m.s.n.m.

La extracción de los metabolitos secundarios volátiles se realizó en el Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad de

Nariño, mediante la técnica de hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHD), con el uso de un horno microondas (Electrolux, EME281D28S, 120 v, 60 Hz, 850 W) con un orificio en la parte superior a través del cual se conectó un equipo de destilación tipo Clevenger, según el procedimiento descrito por Stashenko *et al.* (2004). Para la extracción de cada muestra se utilizaron 50 g de hojas picadas en trozos superiores a 1.18 mm, que fueron sumergidos en 300 ml de agua. El aceite esencial se separó del agua por decantación y se secó con Na₂SO₄ anhidro. Para el análisis cromatográfico, se diluyó una alícuota del aceite (20 µl) en 1 ml de diclorometano.

El análisis para determinar la composición de los aceites esenciales se desarrolló en los Laboratorios Especializados de la Universidad de Nariño, con el empleo de 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 obtenidos 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 µm 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. El gas de arrastre y gas auxiliar empleado fue helio (99.9995%, Aga-Fano S.A) a flujo de 1 ml/min, las velocidades de flujo para gases de combustión en el FID fueron 300 ml/min para el aire y 30 ml/min para el hidrógeno, el volumen inyectado de los extractos fue de 1.0 µL. Los espectros de masas se obtuvieron en modo SCAN en un intervalo de masas de 38 a 450 m/z.

La identificación de los compuestos se desarrolló utilizando los índices de retención de Kovats con una serie de n-alcenos (C₆-C₃₂) y mediante comparación de los espectros de masas obtenidos con aquellos de la librería de espectros Wiley. La cuantificación tuvo lugar mediante el cálculo del porcentaje relativo de áreas de cada compuesto, considerando aquellos compuestos en una concentración mayor que 0.1%.

Resultados y discusión

Composición de aceite esencial.

En el Cuadro 1 se presenta la identificación de los metabolitos secundarios volátiles obtenidos por MWHD y sus porcentajes relativos en AE procedente de hojas maduras cosechadas en época seca en la vereda Alto de Mayo. Los compuestos principales identificados en el AE fueron timol, cuya media de concentración en todas las muestras analizadas fue 72.6%, ρ-cimeno (10.7%) y γ-terpineno (4.8%).

Las variaciones en la composición química de metabolitos secundarios en plantas de la misma especie han permitido designar quimiotipos. Castañeda *et al.* (2007) estudiaron la composición química de los aceites esenciales de las hojas de diez plantas aromáticas colombianas, entre ellas *L. origanoides*, encontrando dos quimiotipos para el aceite esencial de esta especie. El quimiotipo A (típico) cuyos componentes principales fueron: carvacrol (36.6%), ρ-cimeno (14%), γ-terpineno (13.3%) y timol (9.1%); mientras que para el quimiotipo B (atípico) los componentes principales fueron: ρ-cimeno (15.7%), trans-β-cariofileno (9.4%), α-felandreno + δ-3-careno (8.7%) y limoneno (6.9%).

Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas de 100 o más componentes cuya naturaleza química puede corresponder a compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcenos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos (Lee *et al.*, 2003). La composición química del aceite esencial del orégano de monte de la región del Alto Patía, corresponde en su mayor parte a los monoterpenos aromáticos timol (72.6%), ρ-cimeno (10.7%) y γ-terpineno (4.8%), por lo cual se asemeja bastante a la composición del *Thymus vulgaris*, cuyos compuestos principales son los mismos (Solomakos *et al.*, 2008). Orégano es el nombre comercial dado a aquellas especies ricas en monoterpenos fenólicos, principalmente carvacrol y timol. En los mercados internacionales es generalmente aceptado que el orégano griego (*Origanum vulgare hirtum*) tiene las mejores calidades

Cuadro 1. Cantidad relativa (%) e identificación de los metabolitos secundarios volátiles de *Lippia organoides* extraídos por MWHHD.

Pico (No.)	Tr (min)	Área (%)	IK Experimental	Compuesto*
1	11.449	0.39	924	Triciclono
2	11.758	0.22	931	α pineno
3	14.416	2.76	991	Mirceno
4	15.082	0.29	1006	α Felandreno
5	15.600	1.21	1018	α -terpineno
6	16.100	10.23	1029	ρ -Cimeno
7	16.190	0.68	1031	Limoneno
8	17.500	3.85	1061	γ -terpineno
9	17.990	0.31	1073	Cis-Hidrato de Sabineno
10	19.290	1.20	1102	Linalool
11	23.473	0.57	1205	Terpinen-4-ol
12	24.482	0.79	1231	cis-Carveol
13	24.460	0.47	1230	Timol metil éter
14	27.562	69.19	1311	Timol
15	27.590	0.41	1313	Carvacrol
16	28.490	0.64	1350	Acetato de timilo
17	30.448	0.22	1392	Isomero de Timpol / ainilla
18	31.606	1.54	1423	trans-Cariofileno
19	32.448	0.23	1446	β -Humuleno
20	32.940	0.61	1459	α -Humuleno
21	33.773	0.39	1481	γ -Muuroloeno
22	34.831	0.17	1510	β - Bisaboleno
23	37.598	1.00	1589	Oxido de Cariofileno

Tr: tiempo de retención (min), IK: índices de Kovats.

de aceite esencial y sus principales constituyentes son el carvacrol y/o el timol, variando su composición básica de acuerdo con las áreas geográficas de cultivo. En contraste con la composición hallada en el aceite de *L. organoides*, el de *O. vulgare hirtum* presenta un alto nivel de carvacrol (90.3%) y bajo de timol (3.5%) (Ariza *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos en los compuestos más abundantes en el aceite esencial del orégano de monte del Alto Patía (timol 72.6%, ρ -cimeno 10.7% y γ -terpineno 4.8%) difieren de los quimiotipos encontrados por Castañeda *et al.* (2007), no obstante coinciden con el quimiotipo II, citado en el trabajo de Ruiz *et al.* (2007), cuyos compuestos más frecuentes son timol (56.3%), ρ -cimeno (11.8%) y γ -terpineno (7.3%) y con el quimiotipo C descrito por Stashenko *et al.* (2010) en el cual el timol es el componente más abundante (56%), seguido de ρ -cimeno (9%) y γ -terpineno (5%), aunque el aceite de orégano del Alto Patía se diferencia por su mayor contenido de timol.

Efectos del origen, la edad y época de recolección de hojas en el rendimiento de AE

La matriz experimental y los resultados obtenidos para determinar el efecto de la zona de recolección (vereda), la edad de las hojas (jóvenes y maduras) y la época de recolección de las hojas (lluviosa y seca) sobre el rendimiento y el contenido de timol del aceite esencial de *L. organoides* aparecen en el Cuadro 2.

Se observan diferencias estadísticas significativas entre promedios de los rendimientos de extracción de AE según la zona de recolección de muestras (Cuadro 3). Con la prueba de mínima diferencia significativa de Fisher a un 95% de nivel de confianza, se determinó que las muestras procedentes de la vereda San Juanito fueron las que proporcionaron mayores rendimientos de extracción de AE, con un promedio de 3.3%; por el contrario, no se hallaron diferencias en los rendimientos de AE entre las veredas Alto de Mayo y El Cardo (2.96%), mientras que en la vereda Las Juntas se hallaron los rendimientos más bajos, con un promedio de 2.6%.

EFFECTO DEL ORIGEN, LA ÉPOCA DE RECOLECCIÓN Y LA EDAD DE LAS HOJAS EN EL RENDIMIENTO Y EL CONTENIDO DE TIMOL DE ACEITES ESENCIALES DE *LIPPIA ORIGANOIDES* H.B.K.

Cuadro 2. Rendimientos y contenido de timol del aceite esencial de *Lippia origanoides* en función de la zona de producción (vereda), edad de las hojas (jóvenes y maduras) y época de recolección (lluviosa y seca).

Experimento	Vereda	Edad de las hojas	Época de recolección	Rendimiento (%)	Timol (%)
1	San Juanito	Joven	Lluviosa	2.7	69.2
2	San Juanito	Joven	Lluviosa	3.1	59.9
3	San Juanito	Madura	Lluviosa	3.0	70.2
4	San Juanito	Madura	Lluviosa	3.0	50.8
5	Alto de Mayo	Joven	Lluviosa	3.5	58.0
6	Alto de Mayo	Joven	Lluviosa	3.2	52.3
7	Alto de Mayo	Madura	Lluviosa	3.2	64.2
8	Alto de Mayo	Madura	Lluviosa	3.2	67.8
9	El Cardo	Joven	Lluviosa	3.1	70.3
10	El Cardo	Joven	Lluviosa	3.2	56.6
11	El Cardo	Madura	Lluviosa	2.7	67.8
12	El Cardo	Madura	Lluviosa	2.9	68.1
13	Las Juntas	Joven	Lluviosa	2.6	81.6
14	Las Juntas	Joven	Lluviosa	2.5	64.3
15	Las Juntas	Madura	Lluviosa	2.5	68.2
16	Las Juntas	Madura	Lluviosa	2.5	69.7
17	San Juanito	Joven	Seca	3.7	79.8
18	San Juanito	Joven	Seca	3.4	79.4
19	San Juanito	Madura	Seca	4.0	83.4
20	San Juanito	Madura	Seca	3.4	83.0
21	Alto de Mayo	Joven	Seca	2.7	78.1
22	Alto de Mayo	Joven	Seca	2.7	77.1
23	Alto de Mayo	Madura	Seca	2.4	86.7
24	Alto de Mayo	Madura	Seca	2.7	87.3
25	El Cardo	Joven	Seca	2.6	74.2
26	El Cardo	Joven	Seca	3.5	74.2
27	El Cardo	Madura	Seca	2.9	82.1
28	El Cardo	Madura	Seca	3.0	82.5
29	Las Juntas	Joven	Seca	2.0	77.2
30	Las Juntas	Joven	Seca	1.9	77.5
31	Las Juntas	Madura	Seca	2.9	82.1
32	Las Juntas	Madura	Seca	3.6	80.9

Cuadro 3. Análisis de varianza para rendimiento en función del origen, la época de recolección y la edad de las hojas de la planta de *Lippia origanoides*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrados medios	Valor 'F'	P <
A: Vereda	2.12344	3	0.707813	10.44	0.0005
B: Edad de las hojas	0.0703125	1	0.0703125	1.04	0.3237
C: Época de recolección	0.0078125	1	0.0078125	0.12	0.7387
AB	0.888437	3	0.296146	4.37	0.0199
AC	1.76094	3	0.586979	8.66	0.0012
BC	0.340312	1	0.340312	5.02	0.0396
ABC	0.603437	3	0.201146	2.97	0.0634
Residual	1.085	16	0.0678125		
Total corregido	6.87969	31			

Las interacciones vereda x edad de la hoja, vereda x época de recolección y edad de la hoja x época de recolección, igualmente mostraron efecto significativo sobre el rendimiento de AE ($P < 0.05$). Las muestras de hojas maduras procedentes de la vereda San Juanito produjeron los más altos rendimientos (3.4%), mientras que los más bajos se obtuvieron en las muestras de hojas jóvenes procedentes de la vereda Las Juntas (2.2%). La interacción edad de las hojas x época de recolección también fue significativa ($P < 0.05$) ya que en la época seca se observó un aumento en el rendimiento a medida que las hojas maduraron, pasando de 2.8% en hojas jóvenes para 3.1% en hojas maduras.

Los rendimientos de la extracción de AE en época seca coinciden con los encontrados por Stashenko *et al.* (2010) para muestras recolectadas en la misma zona ($3.1 \pm 0.2\%$). Es posible afirmar que la época de recolección es un factor que no influye sobre el rendimiento de AE de orégano, ya que los resultados de este estudio están de acuerdo con los de Rojas *et al.* (2006) quienes estudiaron la composición del AE de *L. origanoides* recolectado en épocas seca y lluviosa en el estado de Mérida, Venezuela, con un rendimiento de extracción de AE de 1.1% en ambas épocas.

Efectos del origen, la edad y época de recolección de hojas en el contenido de timol

El análisis de varianza (Cuadro 4) mostró diferencias significativas entre los promedios

de los porcentajes de timol del aceite de *L. origanoides*, según la época del año en que fueron recolectadas las muestras. En época seca, el contenido promedio fue mayor (80.3%) que en época lluviosa (64.9%). Estos resultados coinciden con los de Rojas *et al.* (2006) quienes encontraron que el contenido de este compuesto fue más alto en muestras recolectadas en época seca.

Conclusiones

- El orégano de monte (*L. origanoides*) de la región del Alto Patía (sur-occidente de Colombia) es una especie altamente promisorio debido a que constituye un quimiotipo rico en timol (50.8 – 81.6%), compuesto con demostrada actividad antimicrobiana y antioxidante. Además, el rendimiento promedio de extracción de su aceite esencial es bastante alto (2.76%) comparado con el de otras especies de plantas aromáticas.
- Se observó que las zonas de origen de la planta tienen un efecto significativo sobre el rendimiento de extracción del AE. Se alcanzaron rendimientos más altos (3.28%) en las muestras procedentes de zonas ubicadas entre 1100 y 1200 m.s.n.m. (vereda San Juanito) que los obtenidos (2.53%) de una zona entre 740 y 990 m.s.n.m. (vereda las Juntas). No obstante es necesario ampliar el estudio y considerar otros aspectos, tales como las características del suelo.

Cuadro 4. Análisis de varianza para el contenido de timol en el aceite esencial de orégano.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Cuadrados medios	Valor 'F'	P <
A: Vereda	70.6959	3	23.5653	0.75	0.5364
B: Edad de las hojas	132.438	1	132.438	4.23	0.0563
C: Época de recolección	1898.82	1	1898.82	60.70	0.0000
AB	152.086	3	50.5963	1.62	0.2240
AC	216.318	3	72.1061	2.31	0.1157
BC	40.2753	1	40.2753	1.29	0.2732
ABC	29.7284	3	9.90948	0.32	0.8131
Residual	500.495	16	31.2809		
Total corregido	3040.86	31			

- La época de recolección de las hojas de orégano (lluviosa o seca) influyó significativamente sobre el contenido de timol en el AE; en las muestras recolectadas en época seca se obtuvieron contenidos de timol más altos (80.3%) que en época lluviosa (64.9%).

Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia, por la financiación del presente trabajo. Se agradece el apoyo de las instituciones Corpoica y Universidad de Nariño, así como a la Asociación Vencedores del Verano, del Alto Patía.

Referencias

- Ariza, C., Afanador, G., Betancourt, L., Hurtado, A., Arango, O., y Toro, I. 2011. Caracterización de los aceites esenciales del cordón panamericano del Alto Patía. En: Afanador, G.; Ariza, C.; Avellaneda, Y.; y Rodríguez, D. (eds.). Aceites esenciales de oregano: un aditivo funcional con amplio potencial de uso en la industria avícola. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica). Primera edición, Bogotá. p. 12 - 18.
- Castañeda, M.; Muñoz, A., y Stashenko, E. 2007. Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas. *Sci. Tech.* 33:165 - 167.
- Cosentino, S. C.; Tuberoso, I. G.; Pisano, B.; Satta, M.; y Mascia, V. 1999. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of *sardinian thymus* essential oils. *Lett. Appl. Microbiol.* 29:130 - 135.
- Dos Santos, F. J.; Lopes, J. A.; y Cito, G. L. 2004. Composition and biological activity of essential oils from *Lippia origanoides* H.B.K. *J. Essen. Oil Res.* 16(5):504 - 506.
- García-Barriga, H. G. 1992. Flora medicinal de Colombia, Botánica Médica. Tomo II. 2ª ed, Bogota: Tercer Mundo. p. 508.
- Lee, K. W.; Everts, H.; y Beynen, A. C. 2003. Essential oils in broiler nutrition. *Int. J. Poult. Sci.* 3:738 - 752.
- McGimpsey, J.; Douglas, M.; Vanklink, J.; y Beauregard, D. 1994. Seasonal variation in essential oil yield and composition from naturalized *Thymus vulgaris* l in New Zealand. *Flavour and Fragrance Journal* 9:347 - 352.
- Muñoz, A.; Castañeda, M.; y Stashenko, E. 2007. Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol. *Sci. Tech.* 33:125 - 129.
- Oliveira, D. R.; Leitao, G. G., Bizzo, H. R.; Lopes, D., Alviano, D. S.; Alviano, C. S.; y Leitao, S. G. 2007. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. *Food Chem.* 101:236 - 240.
- Pascual, M. E.; Slowing, K.; Carretero, E.; Mata, D. S.; y Villar, A. 2001. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology. A review. *J. Ethnophar.* 76:201 - 214.
- Rojas, J.; Morales, A.; Pasquale, S.; Márquez, A.; Rondón, M.; Imré, M.; y Veres, K. 2006. Comparative study of the chemical composition of the essential oil of *Lippia oreganoides* collected in two different seasons. *Nat. Prod. Comm.* 1(3):205 - 207.
- Ruiz, C.; Tunarosa, F.; Martínez, J.; y Stashenko, E. 2007. Estudio comparativo por GC-MS de metabolitos secundarios volátiles de dos quimiotipos de *lippia origanoides* H.B.K., obtenidos por diferentes técnicas de extracción. *Sci. Techn.* 33:325 - 328.
- Solomakos, N.; Govaris, A.; Koidis, P.; y Botsoglou, N. 2008. The antimicrobial effect of *thyme* essential oil, nisin and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. *Food microb.* 25:120 - 127.
- Stashenko, E. E.; Jaramillo, B. E.; y Martínez, J. R. 2004. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, grown in Colombia and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *J. Chromatogr. A.* 1025:93 - 103.
- Stashenko, E.; Martinez, J.; Ruiz, C.; Arias, G.; Duran, C.; Salgar, W.; y Cala, M. 2010. *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. *J. Sep. Sci.* 33:93 - 103.