



**QUANTIFICATION BY HPLC OF THYMOL
AND CARVACROL CONTENT IN LIPPIA
GRAVEOLENS HBK S.L., NATIVE FROM
REYNOSA, TAMAULIPAS, MÉXICO**

**CUANTIFICACIÓN POR HPLC DEL
CONTENIDO DE TIMOL Y CARVACROL
EN LIPPIA GRAVEOLENS HBK S.L.,
NATIVA DE REYNOSA, TAMAULIPAS,
MÉXICO**

Received 03 02 2017
Accepted 04 17 2017
Published 04 30 2017

Vol. 34, No.1, pp. 33-39, Ene./Abr. 2017
34(1), 33-39, Jan./Apr. 2017
Bolivian Journal of Chemistry

Full original article

Jesús Di Carlo Quiroz Velásquez, Alejandro Sánchez Varela, Jorge A. Torres Ortega, Jesús G. García Olivares, Ángel Salazar Bravo, J. Luis Hernández Mendoza*

Laboratorio de Biotecnología Experimental - Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional IPN, Boulevard del Maestro s/n esq. Elías Piña, Col. Narciso Mendoza, Cd. Reynosa, Tamaulipas, C.P. 88710, México, phones: Institution network +52(55)5729 6000, Ext.87749, Fax: 87746 y 87766, Direct: +52(899)9243627, jquiroz@ipn.mx, asanchezv@ipn.mx, jatorreso@ipn.mx, jggarcia@ipn.mx, asalazarb@ipn.mx, jhernandezm@ipn.mx.

Keywords: *Lippia graveolens* HBK s.l., Detection, HPLC, Quantification.

ABSTRACT

Most of the studies in Tamaulipas *Lippia graveolens* HBK s.l., are based on agronomic conditions; therefore, it is of interest to carry out studies of the quality of its essential oils depending on the content of thymol and carvacrol. The optimized methodology included, the use of a HPLC Hewlett Packard System ® Model 1100, the column employed is RP-C18, 150 mm long and 4.6 mm internal diameter detector is set to a wavelength of 280 nm, with an injection volume 20 µL, flow 1.0 mL / min, 10 min run time. The samples come from Reynosa, Tamaulipas, identified as Rey 01-A, Rey 01-B (Oxford site) contain on average 49.92 ppm and 19.92 ppm carvacrol and thymol, Viad 01-A, Viad 01-B (Viaducto site) contain on average 53.04 ppm and 11.65 ppm carvacrol and thymol, and Rey 02-A, Rey 02-B (Esfuerzo site) containing on average 102.32 ppm and 0.0 ppm carvacrol and thymol respectively. The chemical composition that was present in the population of *Lippia graveolens* HBK s.l., present in the municipality of Reynosa Tamaulipas belongs to the chemotype Carvacrol, with the ability to inhibit the growth of bacterial strains, and can be used as an additive to prevent contamination in food.

*Corresponding author: jhernandezm@ipn.mx

RESUMEN

Spanish title: *Cuantificación por HPLC del contenido de timol y carvacrol en Lippia graveolens HBK s.l., nativa de Reynosa, Tamaulipas México.* La mayoría de los estudios en *Lippia graveolens* HBK s.l., de Tamaulipas se basan en condiciones agronómicas; por tanto, es de interés realizar estudios de la calidad de sus aceites esenciales dependiendo del contenido de timol y carvacrol. La metodología optimizada incluyo, el uso de un HPLC Hewlett Packard System ® Modelo 1100, la columna empleada fue RP-C18, 150 mm de largo y 4,6 mm de diámetro interno; el detector se estableció en una longitud de onda de 280 nm, con un volumen de inyección de 20 µL, el flujo 1,0 ml/min, el tiempo de funcionamiento fue de 10 min. Las muestras procedentes de Reynosa, Tamaulipas, identificadas como Rey 01-A, Rey 01-B (sitio de Oxford) contienen en promedio 49,92 ppm y 19,92 ppm de carvacrol y timol, Viad 01-A, Viad 01-B (sitio Viaducto) Promedio de 53,04 ppm y 11,65 ppm de carvacrol



y timol, y Rey 02-A, Rey 02-B (sitio de Esfuerzo) que contiene en promedio 102,32 ppm y 0,0 ppm de carvacrol y timol, respectivamente. La composición química presente en la población de *Lippia graveolens* HBK sl, endémica en el municipio de Reynosa Tamaulipas, pertenece al quimiotipo Carvacrol, con la capacidad de inhibir el crecimiento de cepas bacterianas y puede ser utilizada como aditivo para prevenir la contaminación en comida.

INTRODUCCION

Los compuestos químicos principales del orégano son el timol, carvacrol y p-cimeno; los cuales son fáciles de obtener por medio de la extracción del aceite esencial; a estos se les atribuyen actividades antioxidantes y antimicrobianas, además que son los responsables del olor y sabor característico (Silva Vázquez & Dunford, 2005 [1]). Los alimentos orgánicos están adquiriendo gran relevancia debido a la tendencia de utilizar en la elaboración de alimentos preparados sustancias naturales como conservadores, potencializadores de sabor y aromatizantes, entre otros (Ávila-Sosa *et al.*, 2010 [2]). Por esta razón, uno de los principales enfoques actuales en la industria alimentaria es el uso de especies vegetales con fotoquímicos que ayuden en la preservación y mejoramiento del aspecto del alimento. México, por su ubicación geográfica, características orográficas y climáticas es uno de los principales países productores de especias en el mundo (Meléndez *et al.*, 2009 [3]). Poco se sabe de los verdaderos tesoros que guardan los desiertos y semidesiertos mexicanos; su biodiversidad es de las más ricas del mundo, en cuestión de especies vegetales, siendo una de las más utilizadas en el arte culinario nacional, debido a su amplia gama de olores, aromas y sabores. (Silva Vázquez, 2003 [4]). El orégano es una herbácea, perenne y aromática ampliamente distribuida en el mundo (Mata-González y Meléndez-González, 2005 [5]). Taxonómicamente se representa en cuatro familias: *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Lamiaceae* y *Verbenaceae*, siendo las dos últimas las más reconocidas (Kintzios, 2002 [6]). En base a criterios morfológicos, el género *Origanum* se ha clasificado en tres grupos, 10 secciones, 38 especies, seis subespecies y 17 híbridos. Lawrence en 1984 [7], reportó cuatro grupos de orégano comúnmente usados con propósitos culinarios: el griego (*Origanum vulgare* spp. *Hirtum*) (Ietswaart), el español (*Coridohymus capitatus* (L.) Hoffmanns), el turco (*Origanum onites* L.) y el mexicano (*Lippia graveolens* Kunth). La producción global se estima alrededor de 15,000 toneladas, siendo México el segundo país productor después de Turquía (García *et al.* 2012 [8]). El estado de Tamaulipas cuenta con una gran biodiversidad que incluye zonas áridas cubiertas por matorrales espinosos, zonas húmedas bajas y calientes con vegetación tropical, zonas subalpinas con vegetación de alta montaña, zonas montañosas con vegetación arbórea, zonas inundables y de dunas costeras con vegetación halófila, además de ambientes acuáticos tanto lénticos como loticos (Treviño y Valiente, 2005 [9]). Esta gran variedad de vegetación se traduce en una amplia riqueza potencial presente en la región. En Tamaulipas existen especies de importancia económica por los usos que se les confiere, algunas de estas especies, conocidas con el nombre de orégano, son: *Lantana involucrata*, *Lantana velutina*, *Lippia graveolens* y *Poliomintha longiflora* (Benavides, 1989 [10], Conacyt-Conafor, 2006 [11]; Huerta, 1997 [12]) y se distribuye principalmente en zonas áridas y semiáridas que se ubican en los municipios de: Jaumave, Bustamante, Miquihuana, Tula, Llera, Victoria, Casas, Burgos, Méndez, Padilla, Hidalgo, San Carlos, San Nicolás y Cruillas (Quezada, *et al.* 2011 [13]). La mayor parte de los estudios en el orégano de Tamaulipas están basados en las condiciones agronómicas, por lo que, el objetivo del presente estudio es cuantificar mediante el uso de Cromatografía líquida de Alta Resolución (HPLC), el contenido de timol y carvacrol, de poblaciones naturales de orégano del municipio de Reynosa Tamaulipas.

RESULTADOS

Identificación y linealidad

Los tiempos de retención de los estándares utilizados, para realizar la evaluación de los quimiotipos en HPLC, se obtuvieron a los 7.6 min., para el carvacrol y a los 8.6 min., para el timol. Por otra parte, para la estimación de los resultados, se realizó la curva de calibración, construida a partir de intervalos de disoluciones que contienen concentraciones en función del analito para cuantificarlo, obteniendo valor de R² de 0.95, la representación gráfica, se muestra en las figuras 1 y 2.



Límites de detección y cuantificación

El límite de detección (LD), es decir la mínima concentración de detección del analito, fue calculada en 20,0, 8,77 ppm, para carvacrol y timol, respectivamente. El límite de cuantificación o determinación (LC), que sirve para obtener la mínima cantidad del analito presente en un compuesto, fue realizado, teniendo como resultado 23,8, 10,64 ppm, para carvacrol y timol, respectivamente.

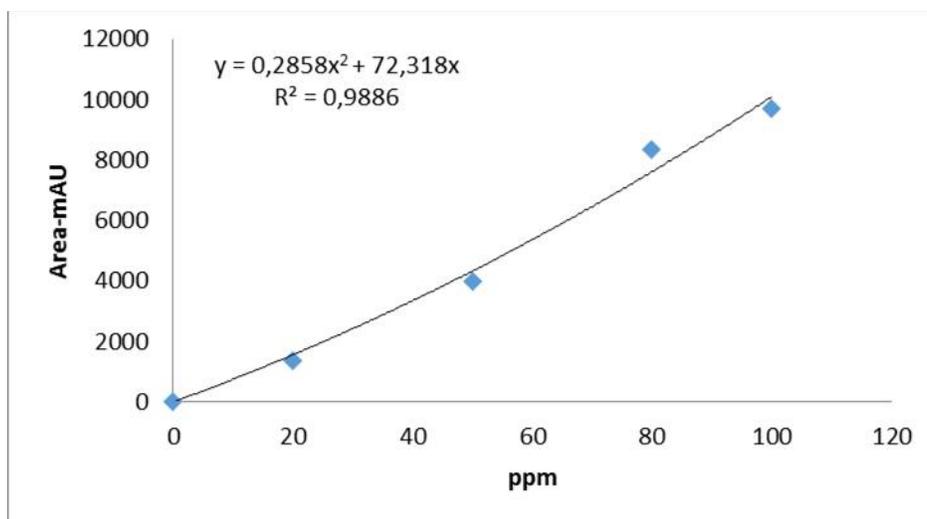


Figura 1. Curva de calibración para el quimiotipo carvacrol

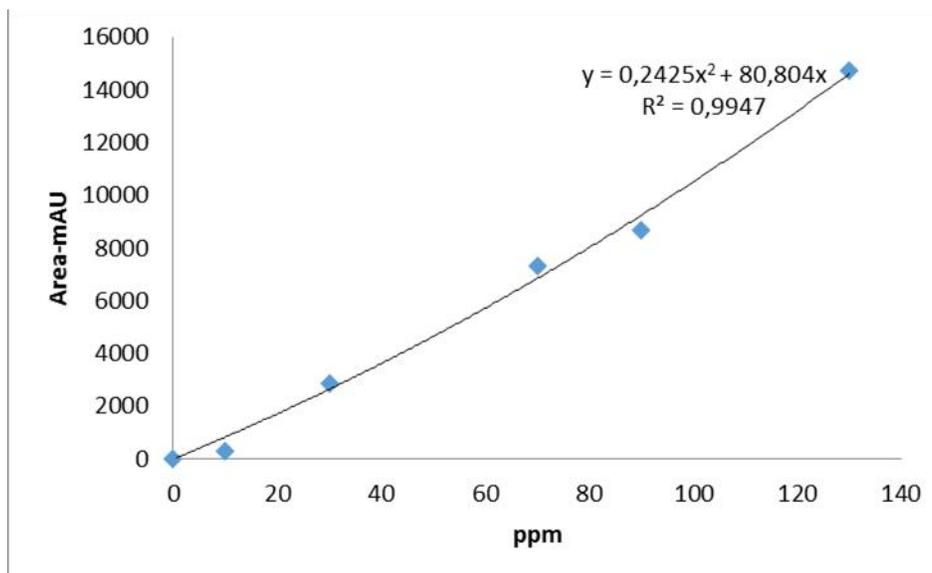


Figura 2. Curva de calibración para el quimiotipo timol



Cuantificación de los extractos de *Lippia graveolens* HBK s.l.

Se encontró que las muestras identificadas como Rey 01-A, Rey 01-B (sitio 1 Oxford) contiene en promedio 49.92 ppm y 19.92 ppm de carvacrol y timol respectivamente, mientras que las muestras Viad 01-A y Viad 01-B (sitio 3 Viaducto) contienen en promedio 53.04 ppm de carvacrol y 11.65 ppm de Timol. Por otro lado, Rey 02-A y Rey 02-B (sitio 2 Unidad y Esfuerzo) contienen 102.32 ppm de carvacrol y 0.0 ppm de timol. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que *Lippia graveolens* HBK s.l. acumula concentraciones más elevadas de carvacrol que de timol (figura 3).

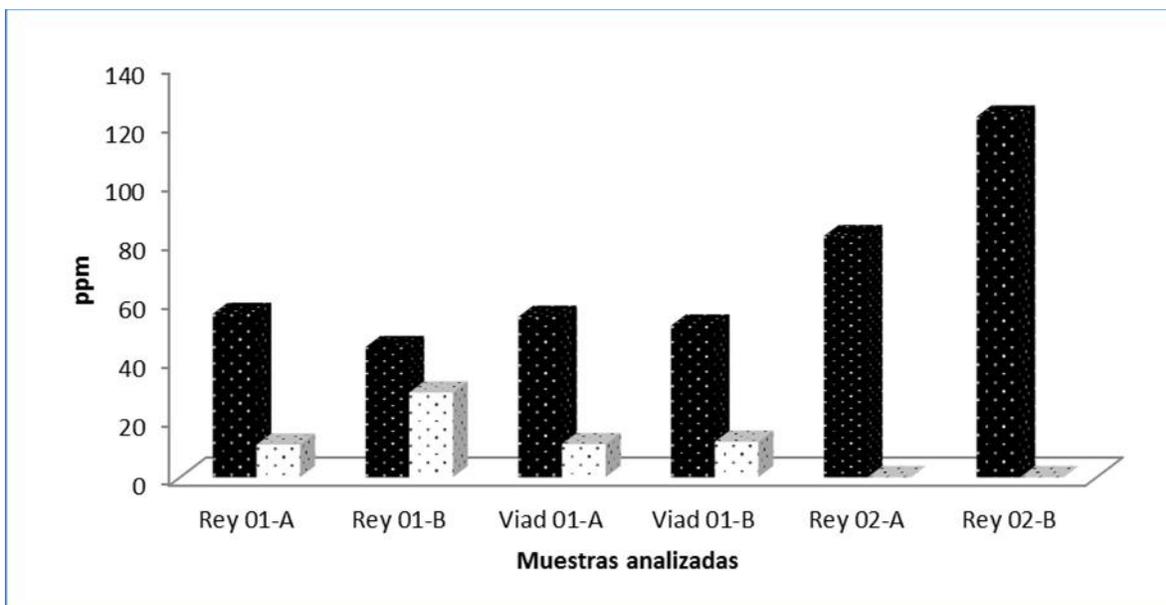


Figura 3. Cuantificación de carvacrol (barras oscuras) y timol (barras claras), en muestras obtenidas de Reynosa Tamaulipas, en la muestra de Reynosa 02, se cuantificaron en promedio 102 PPM, siendo la de mayor capacidad antifúngica.

DISCUSION

Rueda de León *et al.* (2013) [14] reportaron, valores aproximados de 4.605ppm (240mAU) y 12.375ppm (350mAU) de timol y carvacrol respectivamente, en *Lippia berlandieri*. Mientras que los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que *Lippia graveolens* Kunth s.l., de la zona Norte del estado de Tamaulipas, acumula concentraciones más elevadas de carvacrol [$C_6H_3CH_3(OH)(C_3H_7)$] que de timol. En el trabajo de Valenzuela *et al.* (2012) [15], se observó que el extracto esencial de orégano con alto contenido de carvacrol, es una alternativa profiláctica o complemento viable a los antibióticos comerciales, para el tratamiento de camarones en cultivo contra bacterias patógenas u oportunistas. Burt *et al.*, 2007 [16] realizó una investigación, en la que demostró que, durante un periodo de incubación por toda una noche, en presencia de carvacrol, previene el desarrollo de flagelo en *E. coli* O157:H7.

El timol, (2-isopropil-5-metilfenol), ha sido reportado como agente antimicrobiano de los aceites esenciales. (Lambert *et al.*, 2001 [17], Falcone *et al.*; 2005 [18]; 2007 [19]). Se reporta que el aceite esencial del orégano silvestre del Alto Patía corresponde a un quimiotipo muy rico en timol, resaltando el potencial de aprovechamiento industrial que puede tenerla acción antimicrobiana y que la sensibilidad al timol es dependiente de factores como el tipo de microorganismo, pH del medio, y temperatura de incubación (Falcone *et al.*, 2005 [18], Arango *et al.*, 2015 [20]).

Los materiales aquí reportados, de acuerdo a sus contenidos corresponden al quimiotipo carvacrol. Esta detección es relevante pues este compuesto tiene función como antibacteriano y un amplio uso como aditivo en la conservación de la vida de anaquel de los alimentos (Arana-Sánchez *et al.*, 2010 [21]; Rocha-Guzmán *et al.*, 2007 [22]; Martínez-Velázquez *et al.*, 2011 [23]).



EXPERIMENTAL

Recolección del material vegetal de Lippia sp.

Se seleccionaron 3 sitios de muestreo en el municipio de Reynosa, Tamaulipas, México; de acuerdo a estudios observacionales realizados por el Laboratorio de Biotecnología Experimental del CEBIOGEN-IPN, etiquetados como: Rey 01-A y Rey 02 (sitio 1 Oxford) Viad 01-A y Viad 01-B (sitio 3 Viaducto) y Rey 02-A y Rey 02-B (sitio 2 Unidad y Esfuerzo). La distribución geográfica de los sitios se muestra en la Figura 4 (<https://www.google.com.mx/maps/>).

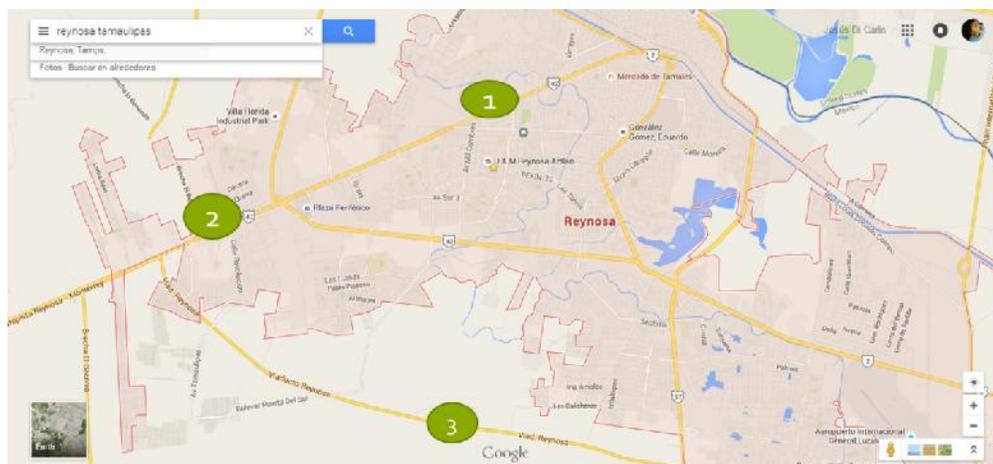


Figura 4. Sitios de colecta en el municipio de Reynosa, Tamaulipas. (mapa realizado a través de la herramienta: <https://www.google.com.mx/maps/>).

El material vegetal colectado, fue separado cuidadosamente, una muestra de la planta fue herborizada y enviada para su identificación taxonómica al Herbario del Centro Interdisciplinario De Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Durango del Instituto Politécnico Nacional, obteniendo la confirmación de la especie como *Lippia graveolens* Kunth s.l., la otra fracción del follaje para el análisis se dejó secar a 30°C durante 72 horas.

Tratamiento de la muestra

Las hojas colectadas de *L graveolens* Kunth s.l., fueron lavadas para eliminar los contaminantes que pudieran interferir con el ensayo. Para el proceso de desinfección, el material vegetal se colocó en un recipiente esterilizado con una solución de hipoclorito al 3%, dejándolo reposar por 5 min; posteriormente se enjuagó con agua destilada para eliminar los residuos de cloro.

Obtención de extractos etanólicos.

Se procedió a realizar la extracción de metabolitos, empleando 10g de orégano seco colocados en un vaso de precipitado de 250 mL y añadiendo 100 mL de etanol absoluto; se cubrió el vaso con papel parafilm® y se dejó reposar durante 72 h. Los extractos obtenidos fueron filtrados con acrodiscos® LC PVDF con una membrana de 0.45 µm de porosidad y 25 mm de diámetro; finalmente fueron colocados en frascos de vidrio ámbar, para evitar que se degradaran y se almacenaron en refrigeración a 4 °C.

Condiciones cromatografías

La muestra fue depositada en microtubos de 1.5 mL y centrifugada a 10000 rpm durante 3 minutos, enseguida se transfirió a viales (Agilent Technologies 5182-0553). Considerando lo descrito previamente por Hajimehdipoor, H., et al., 2010 [24], Tellez, L., et al., 2014 [25]; se realizaron las adecuaciones pertinentes, de acuerdo al objetivo del estudio y el equipo de cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC, Hewlett Packard® modelo 1100, Ramsey,



Minnesota, 55303 USA), se ajustó por 60 min con la fase móvil constituida por metanol grado HPLC y agua mili-Q (CH₃CH): H₂O (50:50), fue calibrado con estándares de timol y carvacrol ambos de sigma® a 100 partes por millón (ppm), a una temperatura de 30°C, flujo de 1 mL/min y 280 nm, columna RP-C18 (Beckman Ultrasphere®) de 150 mm de largo y 4.6 mm de diámetro interno y con tamaño de partícula de 5 µm, el volumen de inyección de todas las muestras y estándares fue de 20 µL y un tiempo de corrida para las muestras de 10 min.

Linealidad y Cuantificación

La verificación de la distribución normal de los resultados, se evaluó con la linealidad a través de la relación entre la concentración del timol/carvacrol y la absorbancia del detector de HPLC. La línea de calibración fue realizada tanto para timol como para carvacrol, y de esta manera conocer la extensión de la variabilidad total de la respuesta que puede ser explicada por el modelo de regresión lineal (Hajimehdipoor, H., *et al.*, 2010 [24], Tellez, L., *et al.*, 2014 [25]).

La cuantificación de la concentración de timol y carvacrol, se determinó a través de un factor de trabajo que se obtuvo dividiendo la concentración del estándar de trabajo (ppm) entre las Mili-Unidades de absorbancia (mAU) del área en el estándar. Posteriormente se obtuvieron los valores de la muestra y se multiplicó el respectivo factor del estándar por el área de la muestra problema.

CONCLUSIONES

La composición química que se presentó en la población de *Lippia graveolens* HBK *s.l.*, presente en el municipio de Reynosa Tamaulipas, pertenece al quimiotipo Carvacrol de acuerdo al resultado de los análisis en HPLC; la estandarización del método analítico, representa una vía para el uso y manejo adecuado del cultivo de acuerdo a la región donde se siembra, permitiendo su explotación a nivel alimentaria y uso farmacéutico como agente antimicrobiano.

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Biotecnología Experimental del Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional, por el financiamiento para la realización del proyecto. A los Maestros Israel García León y Cristian Lizarazo Ortega (Planeación y logística del trabajo de campo) y a la Dra. Guadalupe Rodríguez Castillejos de la Universidad Autónoma de Tamaulipas, Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa Aztlán.

REFERENCIAS

1. Silva-Vázquez, R, Dunford, N.T. **2005**, Bioactive components of Mexican oregano oil as affected by moisture and plant maturity. *J. Essential Oil Res.*, 17, 668-671.
2. Avila-Sosa, R., Gastélum-Franco, M.G., Camacho-Dávila, A., Torres-Muñoz, J.V., Nevárez-Moorillón, G.V. **2010**, Extracts of mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) with antioxidant and antimicrobial activity. *Food and Bioprocess Technology* 3, 434-440.
3. Meléndez-Rentería, N., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar-González, C., Silva-Vázquez, R., Nevárez-Moorillon, G. **2009**, El orégano mexicano. *CIENCIACIERTA*, 20.
4. Silva, V.R.Y., Dunford, N.T. **2003**, Bioactive components of Mexican oregano oil as effected by moisture and plant growth phase. Oklahoma State University, Stillwater, Ok. American Oil Chemistry society (AOCS) Kansas, City, Mo.
5. Mata-González, R., Meléndez-González, R. **2005**, Growth characteristics of Mexican oregano (*Lippia berlanieri* Schauer) under salt stress. *The Southwestern Naturalist*, 50, 1-6.
6. Kintzios, S.E. **2002**, Profile of the multifaceted prince of the herbs. In: Kintzios, S. E. The genera *Origanum* and *Lippia*. 1st Edition. Taylor and Francis, New York, pp. 3-8.
7. Lawrence, B.M. **1984**, The botanical and chemical aspects of oregano. *Perfum. Flavorist.* 9 (5), 41-44, 49-51.
8. García-Pérez, E., Castro-Álvarez, F.F., Gutiérrez-Urbe, J.A., García-Lara, S. **2012**. Revisión de la producción, composición fitoquímica y propiedades nutraceuticas del orégano mexicano. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 3(2), 339-353.
9. Treviño, J., Valiente, A. **2005**. La vegetación de Tamaulipas y sus principales asociaciones vegetales, en: Barrientos, L., Correa, A. Horta, J. V. y García, J. (eds.). Biodiversidad tamaulipeca, vol. 1. Ciudad Victoria: Dirección General de Educación Superior Tecnológica/Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria.
10. Benavides, C. **1989**. Reproducción de dos especies de orégano (*Lippia graveolens* H.B.K. y *Poliomintha longiflora* A. Gray.) en la región semiárida de Tamaulipas, en Biotam. (2). [En línea]. Disponible en: <http://ecologia.uat.mx/paginaiea/biotam/vin2/art9.html>. Accessed 3/04/2016
11. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Comisión Nacional Forestal (Conacyt-Conafor). **2006**, Fondo Sectorial para la Investigación, el Desarrollo y la Innovación Tecnológica Forestal. Anexo B. Demandas del sector 2006.



12. Huerta, C. **1997**, Orégano mexicano: oro vegetal, en *Conabio. Biodiversitas*. 15, 8-13.
13. Quezada, F.H., Sánchez, R.G., Lara, V.M., Medina, M.T., Pérez, Q.L.M. **2011**. Parámetros ambientales y abundancia del orégano mexicano (*Lippia graveolens*) en el estado de Tamaulipas. *Ciencia UAT*. 6 (1), 24-31.
14. Cáceres R.de L., I., Colorado, V. R., Salas Muñoz, E., Muñoz Castellanos, L.N., Hernández Ochoa, L.; **2013**. Actividad Antifúngica in vitro de Extractos Acuáticos de Especies contra *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum*, *Trichoderma spp.*, *Penicillium digitatum* y *Aspergillus niger*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 105-112.
15. Valenzuela-Gracia, M., Orozco-Medina, C., Molina-Maldonado, C. **2012**, Efecto antibacteriano del aceite esencial de orégano (*Lippia berlandieri*) en bacterias patógenas de camarón *Litopenaeus vannamei*, *Hidrobiológica*, 22(3), 201-206.
16. Burt, S.A., Van der Zee, R., Koets, A.P., De Graaff, A.M., Van Knapen, F., Gaastra, W., Veldhuizen, E.J.A. **2007**. Carvacrol Induces Heat Shock Protein 60 and Inhibits Synthesis of Flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (14), 4484-4490.
17. Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J., Nychas, G.J.E. **2001**, A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol*, 91, 453-462.
18. Falcone, P., Speranza B., Del Nobile, M.A., Corbo, M.R. y Sinigaglia M. **2005**, A study on the antimicrobial activity of thymol intended as a natural preservative. *Journal of Food Protection* 68 (8), 1664-1670.
19. Falcone, P., Mastromatteo, M., Del Nobile, M., Corbo, M., Sinigaglia M. **2007**, Evaluating *in vitro* antimicrobial activity of thymol toward higiene-indicating and pathogenic bacteria. *Journal of Food Protection*. 70 (2), 425-431.
20. Arango Bedoya, O., Hurtado Benavides, A., Pantoja Daza, D., Santacruz Chazatar, L. **2015**, Actividad inhibitoria del aceite esencial de *Lippia origanoides* H.B.K sobre el crecimiento de *Phytophthora infestans*, *Acta Agronómica*, 64 (2), 116-124.
21. Arana-Sanchez, A., Estarrón-Espinosa, M., Obledo-Vázquez, E.N. **2010**, Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* H.B.K.) with different composition when microencapsulated in beta-cyclodextrin. *Lett. Appl. Microbiol.*, 50, 585-590.
22. Rocha-Guzmán, N.E., Gallegos-Infante, J.A., González-Laredo, R.F., Ramos-Gómez, M., Rodríguez-Muñoz, M.E., Reynoso-Camacho, R., Rocha-Urbe, A., Roque-Rosales, M.R. **2007**, Antioxidant effect of oregano (*Lippia berlandieri* v. Shauer) essential oil and mother liquors. *Food Chem*, 102, 330-335.
23. Martínez-Velázquez, M., Rosario-Cruz, R., Castillo-Herrera, G., Flores-Fernández, J.M., Álvarez, A.H., Lugo-Cervantes, E. **2011**. Acaricidal effect of essential oils from *Lippia graveolens* (Lamiales: Verbenaceae), *Rosmarinus officinalis* (Lamiales: Lamiaceae), and *Allium sativum* (Liliales: Liliaceae) against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 48, 822-827.
24. Hajimehdipoor, H., Shekarchi, M., Khanavi, M., Adib, N., & Amri, M. **2010**. A validated high-performance liquid chromatography method for the analysis of thymol and carvacrol in *Thymus vulgaris* L. volatile oil. *Pharmacognosy Magazine*, 6 (23), 154-158.
25. Téllez, L., Arévalo, F., Juárez, H., Altamirano, P., Ccapa, K., Chávez, J., Visitación, L. **2014**. Determinación de timol y carvacrol en hojas de orégano por HPLC FL. *Rev. Soc. Quím. Perú*, 80 (4), 279-286.