

## “Actividad antioxidante del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunt) Govaerts “panizara”

“Antioxidant activity of the essential oil of *Clinopodium pulchellum* (Kunt) Govaerts “panizara”

Edgar Robert Tapia Manrique<sup>1</sup>, Fidel Ernesto Acaro Chuquicaña<sup>2</sup>, Américo Jorge Castro Luna<sup>3</sup>

### RESUMEN

**Objetivo:** La especie *Clinopodium pulchellum* (Kunt) Govaerts “panizara” es una especie aromática nativa del Perú, según datos etnofarmacológicos presenta propiedades medicinales. El objetivo fue evaluar la actividad captadora de radicales y el efecto antioxidante del aceite esencial de las hojas de “panizara” mediante técnicas químicas y bioquímicas *in vitro*. **Materiales y Métodos:** La determinación de la actividad antioxidante, fue realizada por dos métodos de decoloración de los radicales DPPH y ABTS, a través del método espectrofotométrico. **Resultados:** Los resultados obtenidos en la concentración inhibitoria media (IC50) para el aceite esencial de panizara fue 2288,31 µg/mL y 3,8 µg/mL para el Trolox con el método del DPPH. Mientras con el método del ABTS, el IC50 para el aceite esencial de panizara fue 30,87 µg/mL y 17,04 µg/mL para el Trolox. **Conclusión:** En conclusión, los resultados indican que el aceite esencial de “panizara” posee actividad antioxidante dicha actividad se deben a la estructura química y propiedades redox, comparables con la literatura internacional.

**Palabras claves:** *Clinopodium pulchellum* (Kunt) Govaerts, aceite esencial, antioxidantes

### ABSTRACT

**Objective:** The species *Clinopodium pulchellum* (Kunt) Govaerts "Panizara" is an aromatic species native to Peru, according to ethnopharmacological data it presents medicinal properties. The objective was to evaluate the activity of radical scavengers and the antioxidant effect of the essential oil of "Panizara" leaves by chemical and biochemical techniques *in vitro*. **Material and Methods:** The determination of the antioxidant activity was performed by two methods of discoloration of the radicals DPPH and ABTS, through the spectrophotometric method. **Results:** The results obtained in the. Mean concentration (IC 50) of 2288,31 µg/mL in Panizara, in Trolox 3,8 µg/mL with the DPPH method. While with the ABTS assay, the IC50 was 30,87 µg/mL in the sample and 17.04 µg/mL in the standard. **Conclusion:** In conclusion, the results indicate that the essential oil of "Panizara" possesses antioxidant activity. Such activity is due to chemical structure and redox properties, comparable with the international literature.

**Key words:** *Clinopodium pulchellum* (Kunt)Govaerts, essential oil, antioxidants

<sup>1</sup> Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Universidad María Auxiliadora. Facultad de Farmacia y Bioquímica  
E-mail: edgar\_tapia1706@hotmail.com

<sup>2</sup> Universidad Alas Peruanas, Universidad María Auxiliadora. Facultad de Farmacia y Bioquímica  
E-mail: eacaro\_farmacutico@yahoo.es

<sup>3</sup> Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica  
E-mail: [amercaslu@gmail.com](mailto:amercaslu@gmail.com)

### INTRODUCCIÓN

El uso de plantas medicinales por seres humanos se remonta a miles de años debido a sus propiedades medicinales y nutricionales. Muchos compuestos naturales extraídos de las plantas tienen importantes actividades biológicas. Entre estos compuestos destacan los aceites esenciales, que cada vez más atraen la atención de diversos segmentos de la industria debido a sus múltiples funciones, especialmente propiedades antioxidantes (1).

El hombre ha usado especias, decocciones, frutas, verduras e infusiones que ahora se reconocen como conteniendo potentes metabolitos secundarios contra enfermedades. En las últimas dos décadas, los estudios han demostrado que los metabolitos secundarios, incluyendo flavonoides, alcaloides y compuestos de aceites esenciales son considerados potentes antioxidantes (1,2).

Los aceites esenciales son definidos como los productos obtenidos de diferentes partes de las plantas aromáticas obtenidas por técnicas de

destilación con vapor, destilación hidráulica y prensado (3). Son mezclas líquidas complejas de sustancias volátiles y lipófilas, formadas por el metabolismo secundario de plantas caracterizadas por un olor agradable en la mayoría de ellos presentados (4, 5).

Los radicales libres son especies químicas con electrones desapareados en su capa de valencia, esta característica les permite participar en reacciones de cadena que comprende inicio, propagación y terminación. Generalmente son inestables, altamente reactivos y de tiempos de vida muy cortos; aunque depende de su estructura química y del medio donde se producen. Las reacciones generadas por los radicales libres se relacionan frecuentemente con el metabolismo del oxígeno, la participación de enzimas oxidativas y metales de transición como hierro, cobre, manganeso y otros (6).

Los sistemas de defensa antioxidante enzimáticos que comprenden superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (G-Px) y otras moléculas antioxidantes endógenas, especialmente el glutatión (GSH), eliminan los radicales libres derivados del oxígeno producidos en procesos fisiológicos y patológicos. Sin embargo, la inhibición de tales especies reactivas derivadas del oxígeno tales como superóxido ( $O_2 \cdot$ ), óxido nítrico ( $NO \cdot$ ), hidroxilo ( $HO \cdot$ ) y peróxido lipídico ( $PL \cdot$ ) generado a partir de actividades metabólicas del cuerpo así como radicales inducidos por el medio ambiente desacoplando los sistemas de defensa natural de los antioxidantes (7,8).

El género *Clinopodium* ha reportado propiedades en la medicina tradicional tales como las hojas de *Clinopodium mexicanum* Benth. Govaerts ("Toronjil de Monte"), se utiliza para inducir el sueño, sedante y analgésico (9). La hierba fresca de Muña-Muña (*Clinopodium odorum*) se utiliza como agente aromatizante para los alimentos y las partes aéreas se utiliza como anticatarral, antiespasmódico, carminativo, digestivo, diurético, laxante, estomacal, soporífero, vermífugo, supresión menstrual, flatulento, cólico y antiespasmódico y en el trabajo de parto (10,11). Mientras que la especie *Clinopodium gilliesii* (Benth.) Kuntze se utiliza en medicina tradicional para tratar problemas gástricos, dolores de estómago y esterilidad femenina (12). Aunque la especie *Clinopodium vulgare* L. presenta propiedades antioxidantes significativa (13,14).

Hasta donde sabemos, no hay informes previos sobre la actividad antioxidante y la actividad biológica del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunt) Govaerts "panizara" procedente de las zona altas del Perú. Dada la creciente importancia de los aceites esenciales en

el mercado mundial, su potencial biológico y la diversidad de especies existentes aún no explorada, se necesitan estudios adicionales que hagan viable su uso. El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antioxidante del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunt) Govaerts "panizara" mediante técnicas químicas, y con ello suplir parte de la información científica nacional que carece nuestro país, como una fuente potencialmente nueva de productos naturales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se realizó en los Laboratorios de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú, durante los meses de enero a mayo de 2017.

### Material vegetal

*Clinopodium pulchellum* (Kunt) Govaerts "panizara", se recolectó en el distrito de Huacaschique, provincia de Pallasca, región Ancash, Perú y se identificó en el herbario del Departamento de Botánica del Museo de Historia Natural. El material se secó a la sombra y se molió hasta obtener una textura fina en una máquina rectificadora.

### Procesamiento de la muestra

Las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunt) Govaerts "panizara" fueron sometidas a un proceso de secado bajo sombra a 21 °C y 0,72 atm, en la cámara a 21 -30 °C, para luego obtener una muestra que fuera fácil de triturar al frotar con las manos, luego se guardó en bolsas de papel, hasta su utilización.

### Aislamiento del aceite esencial

El método a utilizarse para la obtención de los aceites esenciales estuvo sujeto a la morfología de la especie vegetal, variedad de la especie y porcentaje de rendimiento. A partir de 5 kg de hojas secas de *Clinopodium pulchellum* (Kunt) Govaerts "panizara" fueron sometidos a destilación por el método de arrastre por vapor de agua en un equipo de destilación de acero inoxidable. El procedimiento de la destilación procedió a separar tomando en cuenta sus propiedades de inmiscibilidad y diferencia de densidades entre el agua y el aceite esencial, utilizando una pera de separación o decantación de vidrio, se deshidrata las impurezas de agua en el aceite esencial con sulfato de sodio anhidro, con posterior filtración y conservación del aceite en un frasco de vidrio de color ámbar cristalino bajo temperatura de refrigeración de 4 °C (15).

### Determinación de la actividad antioxidante

#### Ensayo de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

La actividad antioxidante se determinó por el método del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), según Joyeux et al (1995) (16), modificado por los autores. En una primera evaluación se preparan diluciones del aceite esencial de panizara a concentraciones de 2333,33; 1666.667; 1000; 652; 326 y 163 µg/mL.

El 2,2-difenilpicrilhidrazil (DPPH) es un radical libre estable, presenta una coloración púrpura con absorbancia a 517 nm. Las sustancias atraparoras de radicales libres (donadores de H) reaccionan con este compuesto y producen la desaparición del color. La reacción es seguida midiendo la disminución de la absorbancia a 517 nm. Los resultados se pueden expresar como IC50, % de inhibición, % de actividad antiradical o equivalentes a trolox.

Se prepararon diluciones del aceite esencial de panizara a concentraciones de 2333,33, 1666.667, 1000, 652, 326 y 163 µg/mL. Se empleó como sustancia de referencia de captación del DPPH al trolox y la muestra problema fue tratada con etanol. Se mezcló la muestra problema con el DPPH y se dejó en reposo a temperatura ambiente alejado de la luz 30 minutos. Se registró la absorbancia a 517 nm. El DPPH se preparó en metanol a una concentración de 20 mg/L. Se preparó una curva patrón de trolox. Se preparó una solución hidroalcohólica (1:1) de trolox en concentración 36 µg/mL y se agregó una batería de concentración de 7,2; 3,6 y 1,2 siguiendo el procedimiento indicado en la Tabla 1.

	Blanco	Control	Muestra	Trolox
Metanol (mL)	0,4	0,4	-	-
Etanol (mL)	0,8	-	-	-
Muestra (mL)	-	-	0,4	-
Trolox (mL)	-	-	-	0,4
DPPH (mL)	-	0,8	0,8	0,8

Tabla 1. Procedimiento de la actividad antioxidante.

Los resultados se expresan en:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A= Lectura DPPH

B= Lectura del aceite esencial y DPPH

La actividad secuestradora de radicales libres es expresada como una concentración efectiva 50% (CE 50; la concentración de sustancia de prueba requerida para reducir la absorbancia de la solución blanco de DPPH en 50%). El trolox se utilizó como patrón de referencia.

#### Ensayo de ABTS (Acido 2,2-azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato])

De acuerdo a la técnica de Re et al (1999) (17), el radical ABTS es preparado por la

oxidación del ABTS con persulfato de potasio. La formación del radical está centrado en el nitrógeno exhibe un intenso color verde. Cuando se coloca frente a una sustancia estabilizadora de radical libre, el radical ABTS+ se decolora. Su máximo de absorbancia es de 734 nm.

Se realizó la activación del radical ABTS, preparando una solución acuosa stock de ABTS 7 mM y añadiéndole persulfato de potasio para una concentración final de 2.45 mM. Se dejó reaccionar durante 16 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego se preparó una dilución para obtener una absorbancia de 734 nm. En la preparación de la muestra del aceite esencial de panizara se coloca en medio acuoso, con amortiguador de fosfato sódico 0,05 M, pH 7,4; se agrega en metanol 70° y etanol 60°. Los tubos de reacción fueron preparados con 20 µL de aceite esencial y 980 µL de ABTS. El tubo blanco contenía 20 µL del solvente del aceite esencial. Cada dilución del aceite esencial fue seguida cinéticamente durante 15 minutos a 734 nm. Los resultados se calcularon el porcentaje de inhibición medio, IC50, con la misma expresión matemática empleada para el análisis de la actividad inhibitoria del radical DPPH son expresados como el IC50 y TEAC.

## RESULTADOS

### Capacidad antioxidante total empleando el radical DPPH

Los resultados obtenidos se presentan en las Figuras N° 1 y 2

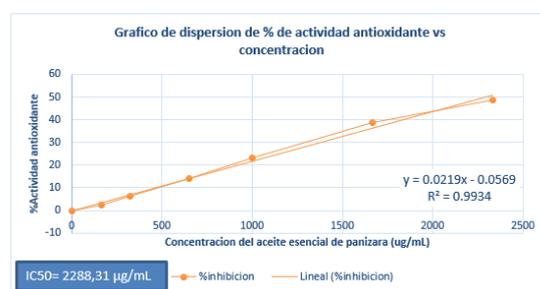


Figura 1. Curva de captación de DPPH del aceite esencial de "panizara"

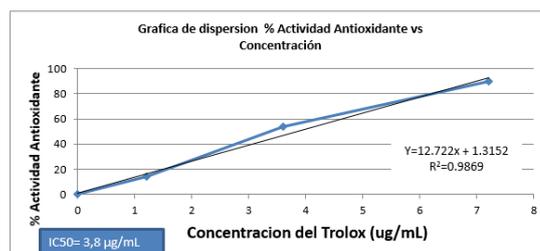


Figura 2. Curva de captación de DPPH del trolox

### Capacidad antioxidante empleando el radical ABTS

Los resultados obtenidos se presentan en las Figuras N° 3 y 4

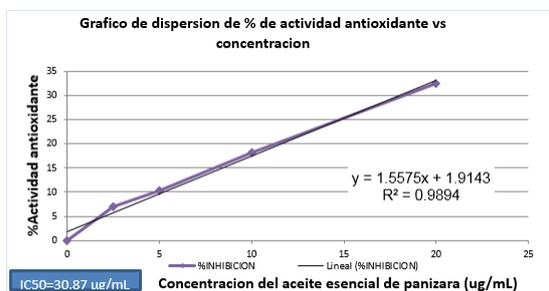


Figura 3. Curva de captación de ABTS del aceite esencial de "panizara"

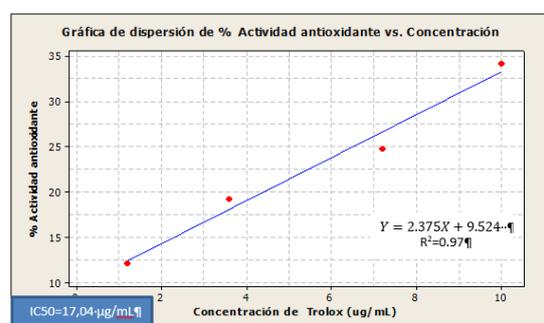


Figura 4. Curva de captación de ABTS del trolox

### DISCUSIÓN

El aceite esencial de las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunt) Govaerts "panizara" posee actividad antioxidante variable cuando es probada en diversos sistemas. Esta actividad antioxidante en el modelo del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) comparado con el Trolox. De esta manera estaría justificándose la estructura y actividad antioxidante del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunt) Govaerts "panizara". En este modelo todas las moléculas del aceite esencial actuarían en sinergismo, potenciando su capacidad antirradicalaria, dando una protección a las macromoléculas biológicas, como las proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y carbohidratos. Si bien los metabolitos antioxidantes en plantas son estudiados principalmente en base a sus estructuras polifenólicas, existe en la literatura científica refiere que también se halla actividad antioxidante en los aceites esenciales cuyos componentes principalmente son terpenos (pineno, mirceno, limoneno, terpineno, p-cimeno), terpenoides, compuestos alcohólicos (geraniol, mentol, linalool), fenoles (carvacrol, timol, safrol, eugenol) (18).

En el ensayo con DPPH, el compuesto permite poner en evidencia la actividad donadora de

electrones o de átomo de hidrógeno no específico se observa un  $IC_{50} = 2288,31 \mu\text{g/mL}$  (Figura 1) y el secuestrante de referencia al Trolox (Figura 2) exhibe un  $IC_{50} = 3,8 \mu\text{g/mL}$  estos resultados sugieren el buen comportamiento del aceite esencial como donador de electrones al radical libre DPPH. En la investigación realizada in vitro sobre las propiedades antioxidantes de las hojas y los aceites esenciales del tallo de *Jatropha gossypifolia* hallaron por el ensayo con DPPH mostraron  $IC_{50}$  de  $0,07 \text{ mg/mL}$ . Los resultados de este estudio sugieren la importancia antibacterianas y antirradicales notables que pueden ser seleccionadas en la búsqueda de síntesis de nuevos antibióticos potentes (19). Los mismo investigadores estudiaron las propiedades antioxidantes de los aceites esenciales de los frutos maduros de *Dennettia tripetala* G. Baker, se observó  $IC_{50}$  de  $0,62 \pm 0,12 \text{ mg/mL}$  mostró que tiene una mayor resistencia a los antioxidantes de la vitamina C ( $3,39 \pm 0,12 \text{ mg/mL}$ ), pero una menor actividad comparada con  $\beta$ -caroteno ( $0,32 \pm 0,22 \text{ mg/mL}$ ) con el método DPPH. Los aceites esenciales también demostraron una gran capacidad para eliminar otros 2 radicales (peróxido de lípido y radicales de óxido nítrico) en función de la concentración (20). En el estudio, de los aceites esenciales de hojas de *Syzygium cumini* con metanol mostró una actividad mayor con el barrido de DPPH que el extracto de cloruro de metileno. Los efectos de barrido de los extractos de metanol (compuesto polar) y cloruro de metileno (apolar) sobre los radicales DPPH aumentaron a medida que aumentaba la concentración del extracto. La reducción en el color del radical DPPH debido a la capacidad de barrido de los extractos de metanol y el estándar antioxidante hidroxitolueno butilado (BHT) fue significativa ( $P \leq 0,05$ ). Los efectos de barrido de diferentes extractos y la norma sobre el radical DPPH disminuyeron en el orden de los extractos de metanol > BHT > cloruro de metileno, que eran 70,45%, 67,55% y 64,55% de eliminación de oxidantes a una concentración de  $50 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Estos resultados indican que los extractos de metanol tienen un efecto notable en la eliminación de radicales libres. Sin embargo, el efecto de barrido de BHT fue mayor que el cloruro de metileno. Las acciones antioxidantes fenólicas son principalmente debido a sus propiedades redox y su estructura química, que pueden desempeñar un papel importante en la quelación de los metales de transición, inhibiendo la lipoxigenasa y eliminando los radicales libres. Los compuestos fenólicos son también donantes de hidrógeno eficaces, lo que los convierte en buenos antioxidantes (21).

Los valores obtenidos por el método del ABTS estuvieron en  $30.87 \mu\text{g/mL}$  en la curva de

captación de ABTS del aceite esencial de "Panizara" (Figura 3) y IC50 = 17.04 µg/mL con Trolox (Figura 4). La matriz de las hojas de "Panizara" encontramos componentes antioxidantes como los compuestos fenólicos, que van a influir en los resultados. El extracto hidrofílico del aceite esencial de "Panizara" mostró mayor actividad con el método de ABTS. En los estudios con el extracto de corteza de tallos de *Schotia latifolia* Jacq contra el radical ABTS de una manera dependiente de la concentración. Se observó una actividad de barrido comparable entre el extracto y los fármacos estándar (BHT y rutina). A 0,2 mg/ml, el porcentaje de antioxidantes del extracto de *Schotia latifolia*, BHT y rutina fue de 94,94%, 84,38% y 85,36%, respectivamente. Los valores de IC50 del BHT y rutina estándar a 0,2 mg/ml fueron 0,124 y 0,117 mg/ml, respectivamente, mientras que del extracto de *Schotia latifolia* fue de 0,105 mg/ml. Tanto el extracto como los patrones de plantas registraron altas actividades antioxidantes en todas las concentraciones ensayadas en un orden creciente (22). En la investigación en las fracciones de hojas de *Chromolaena perglabra* se aplicó el método de decoloración del ABTS, se utilizaron concentraciones variadas (12,5; 25; 62,5; 125 y 250 miligramos por litros de metanol). Para éste método se observó tendencia de mayor actividad antioxidante a medida que aumenta la concentración en las soluciones de los extractos, su mayor porcentaje de captación se presentó a 250 miligramos de extracto por litro de metanol con un porcentaje de 35,94% de captación (23).

## CONCLUSIONES

En conclusión, los resultados indican que el aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* (Kunt) Govaerts "panizara" posee actividad antioxidante al radical DPPH y ABTS, dichas actividades se deben a la estructura química y a sus propiedades redox del aceite esencial que posee. Así mismo se puede utilizarse como ingredientes conservantes naturales en las industrias alimentaria y/o farmacéutica.

## AUTOR DE CORRESPONDENCIA

Edgar Robert Tapia Manrique  
Universidad María Auxiliadora  
Av. Canto Bello N° 431  
Lima 36 – Perú  
Teléfono: +51-1-3891212  
E-mail: [edgar\\_tapia1706@hotmail.com](mailto:edgar_tapia1706@hotmail.com)

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tuttolomondo T., La Bella S., Licata M., et al. Biomolecular characterization of wild sicilian oregano: phytochemical screening of essential oils and extracts, and evaluation of their antioxidant activities. *Chemistry and Biodiversity*. 2013;10(3):411–433.
2. Penoel M. D., Penoel R. *Natural Health Care Using Essential Oils*. Auckland, New Zealand: Abundant Health; 2012.
3. Amorati R, Foti MC, Valgimigli L. Antioxidant activity of essential oils. *J Agric Food Chem*. 2013 Nov 20;61(46):10835-47.
4. Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. *Farmacognosia: da Planta ao medicamento*, 6th ed.; UFSC/UFRGS: Porto Alegre, Brazil, 2007; p. 1104.
5. Bandoni, A.L.; Czepak, M.P. *Os Recursos Vegetais Aromáticos no Brasil: Seu Aproveitamento Industrial Para a Produção de Aromas e Sabores*, 1st ed.; EDUFES: Vitória, Brazil, 2008; pp. 345–367.
6. Suárez S. Actividad captadora de radicales libres y efecto antioxidante de metabolitos secundarios del extracto acuoso del *Allium sativum* var. Huaralino (AJO) en modelos in vitro. [Tesis Doctoral]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2014
7. Morten H., Mygind T. L., Rikke M. Essential oils in food preservation: mode of action synergies and interactions with food matrix components. *Front Microbiology*. 2012;3.
8. Saikat S., Chakraborty R., Sridhar C. Y., Reddy S. R., Biplab D. Free radicals, antioxidants diseases and phytomedicine: current status and future prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2010;3:91–100.
9. Estrada R, Martínez VM, Gallegos AS, Heinze G, Moreno J. Depressant effects of *Clinopodium mexicanum* Benth. Govaerts (Lamiaceae) on the central nervous system. *J Ethnopharmacol*. 2010 ;130(1):1-8.
10. Mahady GB. Medicinal plants for the prevention and treatment of bacterial infections. *Current Pharmaceutical Design*. 2005;11(19):2405–2427.
11. Harley RM, Paucar AG. List of species of tropical American *Clinopodium* (Labiatae), with new combinations. *Kew Bulletin*. 2000; 55(4):917–927.
12. Viturro CI, Molina A, Guy I, et al. (2000). Essential oils of *Satureja boliviana* and *S. parvifolia* growing in the region of Jujuy, Argentina. *Flavour Fragr J*. 2000; 15:377–82.

13. Nikolova M. Screening of radical scavenging activity and polyphenol content of Bulgarian plant species. *Pharmacognosy Res.* 2011 ; 3(4): 256–259.
14. Tepea B, Tepea AS, Dafererab, Polissioub DM, Sokmenc A. Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Clinopodium vulgare* L. *Food Chemistry.* 2007; 103 (3): 766–770.
15. Bandoni, A. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. 1ª Ed, Editorial U. Nacional de la Plata, La Plata. 2000. p.p. 13 – 42.
16. Joyeux M, Lobtein A, Antón R, Mortier F. Comparative antilipoperoxidant, antinecrotic and scavenging properties of terpenes and biflavones from Gingo and some flavonoids. *Planta Med.* 1995;61:126-129.
16. Re R., Pellegrini Ni., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine;* 1999; 26: 1231–1237.
17. Pandey AK, Kumar P, Singh P, Tripathi NN, Bajpai VK. Essential Oils: Sources of Antimicrobials and Food Preservatives. *Front Microbiol.* 2016; 7: 2161.
18. Okoh SO, Iweriebor BC, Okoh OO, Nwodo UU, Okoh AI. Antibacterial and Antioxidant Properties of the Leaves and Stem Essential Oils of *Jatropha gossypifolia* L. *BioMed Research International.* 2016; 1-9.
19. Okoh SO, Iweriebor BC, Okoh OO, Nwodo UU, Okoh AI. Bactericidal and antioxidant properties of essential oils from the fruits *Dennettia tripetala* G. Baker. *BMC Complement Altern Med.* 2016; 1-12.
20. Mohamed AA, Ali SI, El-Baz FK. Antioxidant and Antibacterial Activities of Crude Extracts and Essential Oils of *Syzygium cumini* Leaves. *PLoS One.* 2013; 8(4):1-7.
21. Mbaebie B, Edeoga H, Afolayan AJ. Phytochemical analysis and antioxidants activities of aqueous stem bark extract of *Schotia latifolia* Jacq. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2012 ; 2(2): 118–124.
22. Orejuela A. Determinación de actividad antioxidante de extractos y fracciones de hojas de *Chromolaena perglabra* (B. L. Robinson) R.M. King & H. Robinson. [Tesis Doctoral]. Bogota: Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales. Facultad de Ciencias de Productos Naturales; 2015.