

Cromatografía de gases–espectrometría de masas de compuestos fitobioactivos del aceite esencial de *Satureja incana*

Chromatography by gas-spectrometry mass of *Satureja Incana* 's essential oil fitobioactives compounds

Joseph O. Ricaldi Sarapura¹, Alejandro Martínez Martínez²
Universidad Nacional del Centro del Perú

RESUMEN

Objetivos: Analizar la composición de fitobioactivos del aceite esencial de *Satureja incana* por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS, por sus siglas en inglés); y determinar rendimiento extractivo y características físico-químicas del aceite esencial de *Satureja incana*. **Métodos:** Se colectó ramas tiernas en estado de floración, con cortes de 20-35 cm, ubicación de recolecta a una altitud 2 682 msnm; distrito de Palca, provincia Tarma, región Junín. Extracción: equipo extractor de acero inoxidable, tiempo 1 hora. Caracterización físico-química: Norma Técnica Peruana. Análisis GC-SM: gas helio flujo 20 ml.min⁻¹, inyección de 0,2 µl de aceite esencial, configuración térmica en gradiente. **Resultados:** El rendimiento de extracción fue 0,49 base seca con densidad relativa 0,9816; índice de refracción 1,4879 e índice de acidez 1,9860; y la composición fitoquímica: predomina concentración sesquiterpenica 66,37 % y monoterpenos 30,07 %; siendo los compuestos mayoritarios: germacreno D 25,91 %, β cariofileno 22,10 %, α-ocimeno 12,62 %, 4(8)-p-mentona 6,73 %, humuleno 3,95 %, cariofileno óxido 3,08 %, limoneno 2,44 %; y minoritarios: β-bourbeneno 1,95 %, β-ocimeno 1,78 %, espatulenol 1,66 %, β-linalol 1,64 %, dl-isopulegol 1,66 %, α-cubebeno 1,51 %, δ-Cadineno 0,89 %, α-pineno 0,45 %, β-pineno 0,52 %. **Conclusiones:** La presencia de algunos compuestos químicos respalda su uso etnofitofarmacobotánico. Presenta potencial característica para utilizarlo en formulaciones para plaguicidas debido a la presencia de germacreno D en alta concentración.



Joseph Ricaldi

joseph_ric@hotmail.com

Historial del artículo:

Recibido: 17 de julio de 2014

Aprobado: 29 de octubre de 2014

Disponible en línea: 30 de diciembre de 2014

Palabras clave: Compuestos fitobioactivos, aceite esencial, *Satureja incana*, cromatografía de gases-espectrometría de masas.

¹ Ingeniero agroindustrial, M. Sc. en Tecnología y Gestión de la Calidad de Alimentos, investigador en el Laboratorio de Calidad Total OFATYSA de la Universidad Nacional del Centro del Perú.

² Investigador de la Universidad de Antioquia, Medellín – Colombia, profesor de Farmacognosia y Fitoquímica.

ABSTRACT

Objectives: To analyze the Satureja Incana's essential oil fitobioactives compounds by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); and to determine the extractive yield and Satureja Incana's essential oil physico-chemical characteristics. **Methods:** Young branches in bloom were collected, with cuts of 20-35 cm, collects location at an altitude of 2682 msl; Palca district, Tarma province, Junín region. Extraction: stainless steel extractor machine, time 1 hour. Physicochemical characterization: Peruvian Technique Norm. GC-MS analysis: helium gas flow 20 ml.min⁻¹, essential oil injection of 0,2 ul, gradient thermal configuration. **Results:** The extraction yield was 0,49 dry basis with relative density 0,9816; refractive index of 1,4879 and acid index of 1,9860; and the phytochemical composition: mainly 66,37 % sesquiterpene and 30,07 % monoterpenes concentration; being the main compounds: germacrene D 25,91 %, β cariofilene 22,10 %, α -ocimene 12,62 %, 4(8)-p-mentone 6,73 %, humulene 3,95 %, oxide caryophyllene 3,08 %, limonene 2,44 %; and minority: β bourbeneno 1,95 %, β -ocimene 1,78 %, espatulenol 1,66 %, β -linalool 1,64 %, dlisopulegol 1,66 %, α -cubebeno 1,51 %, δ -Cadinene 0,89 %, α - pinene 0,45 %, β -pinene 0,52 %. **Conclusions:** some compound chemical's bioactive identified would provide proof for his use ethnopharmacobotanical. Present characteristic potential to utilize in formulations so as to pesticides due to germacrene D's presence in high concentration to it.

Keywords: Phytobioactives compound, essential oil, Satureja incana, CG-SM

INTRODUCCIÓN

Esta investigación nace del interés de conocer los compuestos fitobioactivos presentes en el aceite esencial (AE) de la especie *Satureja incana* conocida comúnmente como chiuysche. Hoy existe un interés creciente por la identificación de compuestos fitobioactivos presentes en la

flora nativa, con la finalidad de consolidar información de interés georreferenciado y validado científicamente. En términos de conocimiento etnofitocultural, debe conservarse el conocimiento de propiedades medicinales y farmacológicas, potenciales de las especies aromáticas que deben ser valoradas (1).

Según la octava edición de la Farmacopea Francesa de 1965, los aceites esenciales son "productos de composición general muy compleja que contienen los principios volátiles que se encuentran en los vegetales más o menos modificados durante su biosíntesis" (2). Dada su composición, presentan una alta probabilidad de sufrir modificaciones físico-químicas por reacciones entre sus propios constituyentes o entre estos y el medio (la luz, la temperatura, presencia de enzimas, los componentes del reservorio donde almacena la esencia, entre otros). International Standard Organization (ISO) define al aceite esencial como "producto obtenido de un material vegetal, ya sea por destilación con agua o vapor, o del pericarpio de frutos cítricos por procesos mecánicos, o por destilación seca" (3).

Los procesos extractivos para la obtención de aceites esenciales son diversos y aplican propiedades físicas, químicas, biotecnológicas o combinadas, que aseguren una calidad. Existen diversos métodos de obtención de las esencias se acuerdo con su naturaleza, características de material, grado de volatilidad de la esencia, y porcentaje extractivo promedio. El método de fluido de arrastre hidrotérmico (vapor de agua) en sistema abierto es lo usual en las industrias. El proceso de extracción tiene muy bajo rendimiento que oscila entre 0,01 a 10 %, siendo necesario el uso de gran cantidad de material vegetal, con tratamientos adecuados de deshidratación para tener un mayor rendimiento.

Existen tres grandes grupos de metabolitos secundarios en aceites esenciales: terpenos, compuestos fenólicos y alcaloides (4), los que cumplen importantes funciones ecobiológicas en las plantas como agentes

atrayerentes de polinizadores, sustancias de reserva de la planta, regulan los procesos de evaporación de agua, hacen parte del mecanismo de defensa contra depredadores y otros vegetales (alelopatía) (5, 6, 7).

La especie *Satureja incana* es una planta herbácea perenne, muy aromática, tallos semileñosos, altura variable; tiene hojas opuestas, ovaladas, agudas, haz liso, envés blanquecino, 1 a 2 cm de largo; flores rojiamarilladas, jaspeado amarillo en el interior, verticilios pedunculados, cáliz tubular. La población le atribuye propiedades curativas contra las afecciones respiratorias (béquico), gripes, dolores estomacales (carminativo) y calambres. El género *Satureja* (familia Lamiaceae) contiene 130-150 especies de hierbas y arbustos llamados ajedreas o hisopillos. Esta especie presenta tricomas glandulares, como se observa en la figura N° 1. Estos tricomas tienen relación con la segregación de aceites esenciales (8). La especie vegetal de acuerdo con la familia a la que pertenece, acumula sustancias volátiles en órganos anatómicos específicos. La diferencia entre un aceite y un aceite esencial es su composición y estructura química, por triglicérido y gama de compuestos químicos de diferente peso molecular y naturaleza química, respectivamente.

El acoplamiento de un cromatógrafo de gas con un espectrómetro de masa (GC-SM, por sus siglas en inglés) es comúnmente usado para el análisis de aceites esenciales, manejando un sistema con alta sensibilidad,

adquisición de datos y proceso confiable, y bajo costo en relación con el gasto de reactivos. El análisis GC-MS sirve para la identificación de componentes de aceites esenciales, con aplicaciones comparativas de bibliotecas de masas espectrales NIST/EPA/NIH; Wiley (9). La masa de iones de los terpenos tiene mucha similitud, pero difieren en su abundancia lo cual permite identificarlos. La GC-MS permite realizar en una sola operación, para una muestra del orden de 1 μ l, un análisis cualitativo junto con una indicación de las proporciones en las que se encuentran componentes. Cuando se dispone de sustancia patrón, la calibración del equipo permite un análisis cuantitativo exacto de la muestra.

La determinación del rendimiento de extracción a nivel de laboratorio sirve para las proyecciones de escalamiento de producción, diseño de planta y equipos. Las características físico-químicas orientan en cierta medida la naturaleza química de la muestra. El análisis instrumental GC-SM ayuda en un tiempo corto la identificación y cunatificación de la gama de compuestos fitoquímicos presentes en el AE.

El estudio de los aceites esenciales viene transformándose en una de las áreas de investigación y de desarrollo agroindustrial con la tendencia global para el biocomercio sostenible y su potencial aprovechamiento tendientes a la producción orgánica, fármacos, conservación de alimentos, aromas, entre otros.

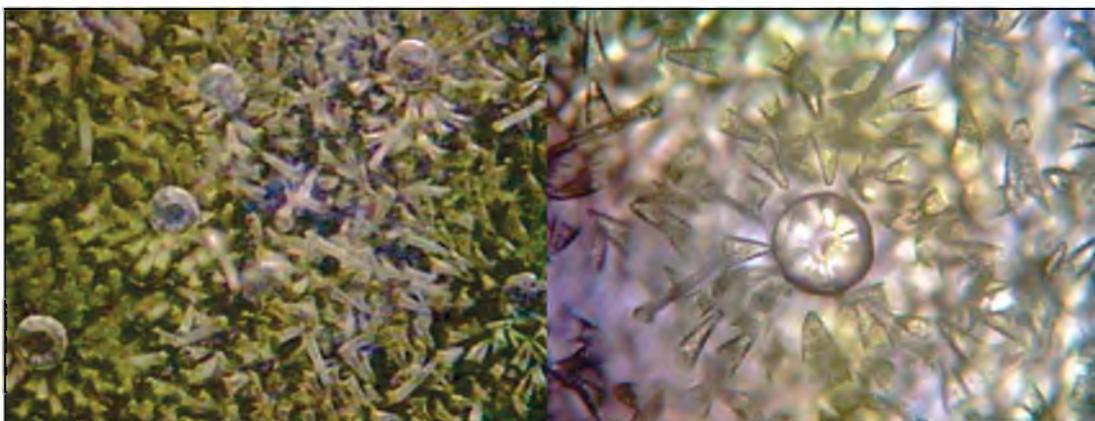


Figura N° 1: Microfotografía óptica de la glándula secretora con cabezuela: a) distribución en haz hoja, b) saco odorífero.

El objetivo de esta investigación fue analizar la composición de fitobioactivos del aceite esencial de Satureja incana por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS); y determinar rendimiento extractivo y características físico-químicas del aceite esencial de Satureja incana.

MATERIAL Y MÉTODOS

La investigación fue de naturaleza básica y descriptiva. La georreferencia de recolecta se realizó mediante instrumento GPS-Garmin 60, el cual genera un registro de posicionamiento geográfico en coordenadas UTM. El material recolectado fue de ramas tiernas en estado de floración, con cortes de 20-35cm. La zona de recolección fue el distrito de Palca, provincia Tarma, región Junín.

La deshidratación de tejido vegetal fue realizada en una cámara protegida de la radiación solar, sin ventilación asistida. La extracción de aceite esencial fue por fluido

de arrastre hidrotérmico y depositado en un vial color ámbar para gas de 1,5 ml, siguiendo los parámetros óptimos determinados en relación con el volumen de equipo extractor de acero inoxidable, carga, tiempo de extracción (10).

La caracterización físico-química se realizó según Norma Técnica Peruana: densidad relativa (11), índice de refracción (12) e índice de acidez (13). Para el análisis GC-SM, se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent; la configuración del equipo GC-SM en el horno inicia con isoterma de 50 °C por 1 min, luego una gradiente creciente de temperatura a 150 °C, 250 °C y 300 °C con tres rampas de 2,5 °C.min⁻¹, 10 °C.min⁻¹, 15 °C.min⁻¹, y una vez alcanzada la temperatura de la rampa se mantuvo isoterma por 3 min, 1 min, y 1,67 min, respectivamente. Fue usado gas helio a un flujo 20 ml.min⁻¹, con una inyección de 0,2 µl del aceite esencial de Satureja incana.

Tabla N° 1: Reporte GC-SM de compuestos fitoquímicos del aceite esencial de Satureja incana.

| Pico | TR (min) | Compuesto fitoquímico * | (%) | Pico | TR (min) | Compuesto fitoquímico * | (%) |
|------|----------|-------------------------|-------|------|----------|----------------------------------|-------|
| 1 | 1,374 | Desconocido | 0,42 | 19 | 24,736 | 2,6-Dimethyl-3,5,7-octatriene-2- | 0,28 |
| 2 | 9,972 | α-pineno | 0,45 | 20 | 30,118 | 8Neocarveol | 0,31 |
| 3 | 11,848 | β-felandreno | 0,55 | 21 | 33,633 | α-cubebeno | 1,51 |
| 4 | 12,104 | β-pineno | 0,52 | 22 | 34,047 | β-bourbeneno | 1,95 |
| 5 | 12,218 | desconocido | 0,17 | 23 | 34,249 | β-cubebeno | 0,14 |
| 6 | 12,650 | β-mirceno | 0,71 | 24 | 35,923 | Caryofileno | 22,10 |
| 7 | 14,755 | limoneno | 2,44 | 25 | 36,407 | (+)-epi-biciclo sesquifelandreno | 0,42 |
| 8 | 14,940 | 1,8-cineol (eucaliptol) | 0,46 | 26 | 37,253 | 4(8)-p-mentona | 6,73 |
| 9 | 15,107 | β-ocimeno | 1,78 | 27 | 37,702 | humuleno | 3,95 |
| 10 | 15,689 | α-ocimeno | 12,62 | 28 | 39,015 | Germacreno D | 25,91 |
| 11 | 17,195 | desconocido | 0,19 | 29 | 39,675 | biciclogermacreno | 4,12 |
| 12 | 18,367 | desconocido | 0,15 | 30 | 40,248 | β-elemento | 0,63 |
| 13 | 18,666 | β-linalol | 1,64 | 31 | 40,768 | δ-Cadineno | 0,89 |
| 14 | 19,054 | Octen-1-ol | 0,52 | 32 | 43,877 | espatulenol | 1,66 |
| 15 | 19,529 | desconocido | 0,14 | 33 | 44,168 | cariofileno oxido | 3,08 |
| 16 | 22,859 | isopulegona | 0,20 | 34 | 44,441 | Anozol | 1,29 |
| 17 | 23,062 | dl-isopulegol | 1,66 | 35 | 55,461 | Ácido octadecanoico | 0,13 |
| 18 | 23,793 | Desconocido | 0,14 | 36 | 55,928 | 3,3,7,11-Tetramethyltricyclo[5.4 | 0,13 |

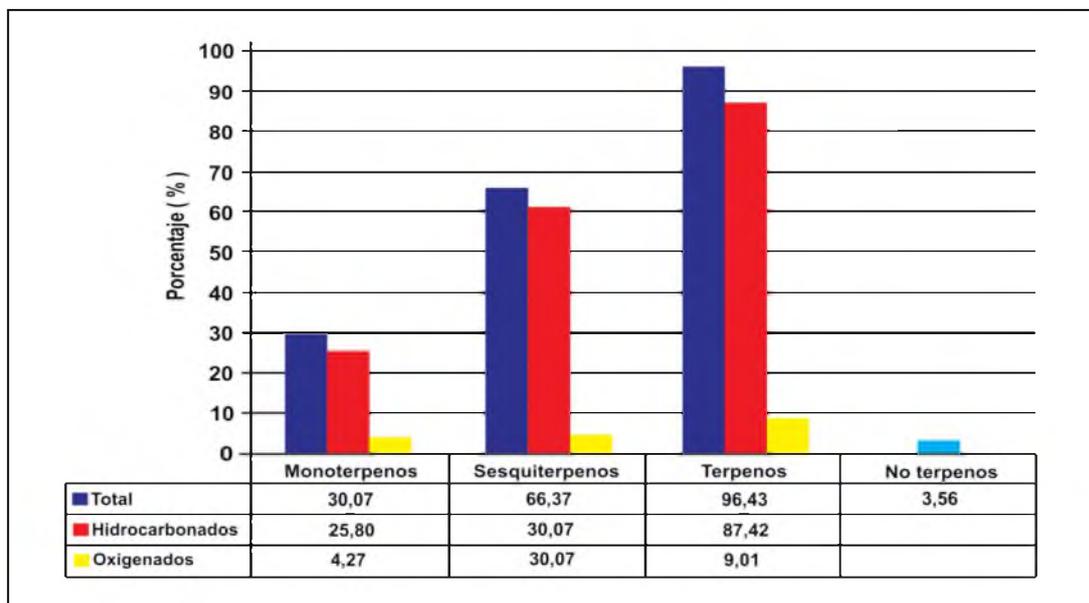


Figura N° 2: Composición terpénica del aceite esencial de *Satureja incana*.

RESULTADOS

La recolección de *Satureja incana* se realizó aproximadamente a las 17:00 horas, en la localidad de Chiuychepata, zona de Shig Shag, distrito de Palca, provincia de Tarma, región Junín, y los datos de ubicación georreferenciado son: altitud: 2 682 m s.n.m.; latitud UTM (x)0499572 - 11°18'37,06"; longitud UTM (y)8749707 - 75°00'14,12"; zona ceja de selva, cuenca hidrográfica del río Tarma, en la cual existe áreas de tupida vegetación con diversas especies endémicas. Se encuentra cercano a un bosque de pinos. El material recolectado presentaba una humedad promedio de $76,90 \pm 1,3$. Este fue sometido a deshidratación en un ambiente oscuro y alcanzó una humedad de $35,72 \pm 1,69$, con un rendimiento extractivo de aceite esencial de 0,32 % peso/peso. La característica del aceite esencial fue densidad relativa 0,9816; índice de refracción 1,4879 e índice de acidez 1,9860.

Fueron elucidados 36 compuestos fitoquímicos por GC-MS, detallado en la tabla N° 1, siendo el compuesto mayoritario germacreno D con 25,91 %, α -ocimeno 12,62 %, cariofileno 22,10.

El aceite esencial contiene monoterpenos

30,07 %, sesquiterpenos 66,37 % y otros compuestos no terpenicos 3,56 %. El AE es mayoritariamente sesquiterpénico, la concentración de terpenos hidrocarbonados es 87,42 % y los terpenos oxigenados 9,01 %. La composición terpénica se detalla en la figura N° 2, cuyos componentes están diferenciados notoriamente en monoterpenos y sesquiterpenos, y terpenos hidrocarbonados y oxigenados.

DISCUSIÓN

El análisis GC-SM del aceite esencial de *Satureja incana* extraído por fluido de arrastre hidrotérmico elucidó 36 compuestos fitobioactivos, teniendo como compuestos con mayor concentración germacreno D 25,91 %.

El rendimiento de extracción está bastante relacionado con las características propias del material vegetal, como también con el equipo de extracción y configuración de tiempo de extracción, mostrándose una variación notable del rendimiento de fitoquímicos, incluso para las mismas especies en diferentes puntos geográficos: Carhuapoma (14) reporta pulegona 27,2 %, linalool 20,3 %, mentona 11,1 %, como compuestos mayoritarios para aceite

esencial de *Satureja Brevicalyx*, procedente de Vinchos, región Ayacucho.

En varios estudios descriptivos de compuestos fitoquímicos en especies de *Satureja* analizados mediante GC-SM se observa la notable variación de compuestos fitoquímicos en los reportes: Michaelakis et al. (15) reportan cariofileno 1,07 %, germacreno D 0,25 %, linalool 1,22 % en AE de *Satureja montana*; Mahbouni y Kazempour (16) establecen p-cimeno 19,6 %, timol 28,2 %, carvacrol 11,2 % en AE de *Satureja hortensis*; Hassanpouraghdam et al. (17) consideran γ -terpineno 42,2 %, carvacrol 31,9 % en AE de *Satureja sahendica* procedente de Maragheh-Irán; Babadi et al. (18) indican carvacrol 44,87 %, timol 14,95 %, γ -Terpineno 18,7 % en AE de *Satureja bachtiarica*, Bakhtiari-Irán; Markolic et al. (19) precisan carvacrol 74,5 %, γ -Terpineno 8,12 %, p-cimeno 5,62 % en AE de *Satureja spicata*, Nagref-Grecia; Chizzola (20) estima p-cimeno 12,6 %, γ -Terpineno 12,0 %, carvacrol 54,7 % en AE de *Satureja montana*, montaña Venteux, Francia; Viturro et al. (21) señalan p-cimeno 4,7 %; germacreno D 15,8 % en AE de *Satureja boliviana* y *Satureja tucum* (Argentina); Güllüse et al. (22) mencionan p-cimeno 10,0 %, γ -terpineno 21,5 %, timol 28,9 %, carvacrol 26,1 % en AE *Satureja hortensis*, Turquía; Jakusic et al. (23) refieren timol 63,73 %; carvacrol 4,92 % en AE *Satureja horvatti*, Locke-Serbia; y Pirbalouti y Dadfar (24) registran p-cimeno 40,46 %, timol 17,93 %, γ -terpineno 6,89 %, geraniol 4,69 % en *Satureja bachtiarica* procedente de Irán.

El aceite esencial de *Satureja incana* tiene un rendimiento de extracción en base seca de 0,49 %, con características físico-químicas: densidad relativa 0,9816, índice de refracción 1,4879 e índice de acidez 1,9860. La posibilidad de aplicación de diversos métodos de extracción física, química, bioquímicos y procesos de separación, aislamiento y concentración en la preparación y el análisis de características físico-químicas y su composición de aceites esenciales, deben ser investigados vigorosamente (25).

Los fenómenos propios que controlan el proceso de extracción son: la exudación térmica del aceite esencial desde los tricomas glandulares; la evaporación instantánea del aceite en la interfase de la película superficial y la corriente de vapor circundante; y la difusión por convección del aceite en la corriente de vapor que atraviesa el lecho vegetal (26). En estos procesos los parámetros, dimensiones de equipo extractor, tipo de material del extractor, y las variables de operación como el acondicionamiento determinan el rendimiento. La fecha de recolección es también una variante en el rendimiento de extracción. Dunkic (27) reporta esta relación, fecha de extracción–rendimiento de extracción, experimentando la extracción por hidrodestilación en aparato Clevenger por 3 h con muestras recolectadas en tres fechas diferentes en Croacia, cuyos resultados para *Satureja subspicata* ssp. *subspicata* fueron: julio (1,7 %), septiembre (2,0 %) y noviembre (0,6 %), y para *Satureja subspicata* ssp. *Liburnica*, julio (0,9 %), setiembre (1,8 %) y noviembre (0,6 %).

El aceite esencial de *Satureja incana* analizado por GC-SM no presenta dentro de su composición fitoquímica carvacrol y timol, a diferencia de otros aceites reportados por diversos autores; pero elucido germacreno D (7-iso-propil-4-ciclo-deca-5,10-dieno) con alto porcentaje 25,91 %, sesquiterpeno con potencial biocida como plaguicida en el control integrado de plagas, debido a que los componentes de los AEs presentan acción biodegradable (1), a diferencia de los productos agrícolas plaguicidas nocivos para la salud debido a su residualidad.

La composición fitoquímica de aceites esenciales procedentes de especies de *Satureja* spp muestran una alta variabilidad de interespecies e intraespecies, lo cual depende de factores genéticos, factores ambientales, y etapa del desarrollo de la planta (27), método de extracción, purificación, tiempo y modo de almacenamiento. La volatilidad y la presión de vapor son propiedades físico-químicas relacionadas directamente con el proceso de extracción, la volatilidad está relacionada

con la facilidad que una sustancia presenta para vaporizar (28), esta también influye en la densidad del aceite esencial.

Muchos factores como el tiempo de colección, condiciones de secado, modo de destilación, facilidad para vaporizar, factores geográficos y climáticos, altitud, partes de la planta (29, 30, 31, 32), tienen un rol importante en la composición fitoquímica del aceite esencial. Estas condiciones ambientales alteran respuestas de la planta (activando la expresión de algunos genes) y sus rutas internas de biosíntesis fitoquímica de la planta armoniosamente proporcionan para su supervivencia y la adaptación, especialmente en hábitats silvestres (17). Es debido a estas variaciones que actualmente se realizan estudios de valoración georreferenciado de la biodiversidad de especies vegetales orientadas en tendencia a la aplicación nutracéutica y aplicaciones tecnológicas de interés comercial.

Agradecimientos

Al Dr. Jair Gaviria Arango, coordinador del Laboratorio de Análisis Instrumental de la Universidad Nacional de Colombia (Medellín), al Ing. Luis Ártica Mallqui, jefe del Laboratorio de Calidad Total OFATYSA FAIA de Universidad Nacional del Centro del Perú, al empresario de Mecánica Industrial VEGA E.I.R.L. Antonio Vega Zerpa y al Lic. José Miguel Domínguez Ricaldi.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Koul O, Dhaliwal GS, Koul K. Phytochemical biopesticides. Advances in biopesticide research. Singapore: CRC Press; 2001.
2. Shiva CM. Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento. [Tesis doctoral]. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona; 2007.
3. International Standar Organization. Aromatic natural raw materials - Vocabulary. Génova: ISO/DIS 9235:2013; 1997.
4. Peres L. Metabolismo Secundario. São Paulo: Escola Superior de Agricultura; 2004.
5. Azcón J, Talón M. Fundamentos de Fisiología vegetal. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 2002.
6. Dudareva N, Picherski E. Biology of Floral Scent. New York: Taylor & Francis Group; 2006.
7. Smid E, Witte Y, Gorris L. Secondary plant metabolites as control agents of postharvest *Penicillium* rot on tulip bulbs. *Biol. Technol.* 1995; 6(3): 303-312
8. Zamfirache M, Burzo I, Gostin I, Olteanu Z, Stefan M, Badea M, et al. Glandular trichomes and essential oil constituents of *Perovskia atriplicifolia* Benth. *Sec. Gen. Biol. Mol.* 2009; Tomo X: 73-80.
9. Baser K, Buchbauer G. Essential oils-science, technology and applications. London: CRC Press; 2010.
10. Ricaldi JO. Determinación de rendimientos de extracción y caracterización físico química del aceite esencial de Chiuysche Satureja incana obtenida por arrastre de vapor. [Tesis de pregrado]. Huancayo: Universidad Nacional del Centro del Perú; 2006.
11. Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual. NTP ISO 279. Aceites Esenciales, Determinación de la densidad y densidad Relativa a 20°C. Lima: INDECOPI; 2011.
12. Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual. ISO 280. Aceites esenciales, Determinación del Índice de Refracción. Lima: INDECOPI; 2011.
13. Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual. NTP 319.085. Aceites esenciales, Determinación de acidez. Lima: INDECOPI; 1974.
14. Carhuapoma M. Composición química, actividad anti-*Helicobacter pylori* y antioxidante del aceite esencial de Satureja brevicalyx Epling "urqu muña". [Tesis doctoral]. Lima: Universidad

- Nacional Mayor de San Marcos; 2007.
15. Michaelakis A, Theotokatos S, Koliopoulos G, Chorianopoulos N. Essential oils of *Satureja* Species: Insecticidal Effect on *Culex pipiens* Larvae (Diptera: Culicidae). *Molecules*. 2007; 12: 2567-2578
 16. Mahbouni M, Kazempour N. Chemical composition and antimicrobial activity of *Satureja hortensis* and *trachyspermum* essential oil. *Iranian J. Microb.* 2011; 3(4):194-200.
 17. Hassanpouraghdam MB, Shalamzari M, Aazami MA, Shoja A. γ -Terpinene and carvacrol rich volatile oil of *Satureja sahendica* Bornm. from Maragheh district in Northwest Iran: *lietuvos moksl akademija. CHEMIJA*. 2009; 20(3):186-189.
 18. Babadi E, Pirbalouti A, Nourafcan H, Hamed B. Bioactivity of Essential Oil of *Bakhtiari Savory* (Lamiaceae). *Elec. J. Biol.* 2012; 8(4):73-78.
 19. Marković T, Chatzopoulou P, Šiljegović J, Nikolić M, Glamočlija J, Ćirić A, et al. Chemical analysis and antimicrobial activities of the essential oils of *Satureja thymbra* L. and *thymbra spicata* L. and their main components. *Arch. Biol. Sci.* 2011; 63(2): 457-464.
 20. Chizzola R. Volatile Oil Composition of four population of *Satureja Montana* L. from Southern France. *Proc. IS on Sust. Use of Plant Biodiv. Acta Hort.* 2003; 143-147.
 21. Viturro C, Molina A, Heit C, Elechosa M, Molina A, Juarez M. Evaluación de la composición de los aceites esenciales de *Satureja boliviana*, *S. odora* Y *S. parvifolia*, obtenidos de colectas en Tucumán, Argentina. *Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromaticas.* 2007; 6(5): 288-289.
 22. Güllüse M, Sökmen M, Deferera D, Agar G, Özkan H, Kartal N, et al. In vitro antibacterial, antifungal and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 3958-3965.
 23. Jakusic B, Ristn M, Slavkouska V, Stankovic J, Milenkovic M. Chemical composition and antimicrobial activity on the essential oil from *Satureja horvatti*. *J. Serb. Chem. Soc.* 2008; 73(7): 703-711.
 24. Pirbalouti AG, Dadfar S. Chemical constituents and antibacterial activity of essential oil of *Satureja bachtiarica* (Lamiaceae). *Acta Pol. Pharm. – Drug Research.* 2013; 70(5): 933-938.
 25. Cseháti T. Chromatography of aroma compounds and fragrances. New York: Springer; 2010.
 26. Cerpa MG. Hidrodestilación de aceites esenciales. Modelado y caracterización. [Tesis doctoral]. Valladolid: Universidad de Valladolid, Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente; 2007.
 27. Dunkic V, Bezic N, Ljubescic N, Bocina I. Glandular hair ultrastructure and essential oils in *Satureja subspicata* VIS. ssp. *subspicata* and ssp. *liburnica* Silic. *Acta Biol. Cracoviensia Series Bot.* 2007; 49(2): 45-51.
 28. Alves PM. A química da criação de perfumes - uma abordagem educativa. Brasília: Universidad de Brasília, Instituto de Química; 2011.
 29. Baser KHC. Essential oil of Anatolian *Labiatae*: A Profile. *Acta Hort.* 1993; 333: 217-237.
 30. Kokkini S, Karousou R, Dardioti A, Krigas N, Lanaras T. Autumn essential oils of Greek oregano. *Phytochem.* 1997; 44: 883-886.
 31. Ozguben M, Tansi S. Drug Yield and Essential Oil of *Thymus vulgaris* L. as influenced by ecological and Ontogenetical variation. *Tr. J. Agric. Forest.* 1998; 22: 537-742.
 32. Ijaz A. Characterization and biological activities of essential oils of some species of Lamiaceae. [Tesis doctoral]. Pakistan: University of Agriculture; 2009.