

Compuestos Fenólicos y Capacidad Antioxidante de Aceite Esencial de Orégano Proveniente de dos Entidades de México

Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Essential Oregano Oil from two Federal Entities in Mexico

Julio César Ríos Saucedo^a, Rigoberto Rosales Serna^a, Sahian Enitze Velazquez-Quiñones^b, Jesús Adrián López^c, Mayra Denise Herrera^{d*}

^aCampo Experimental Valle del Guadiana, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Carretera Durango—El Mezquital km 4.5. Durango, México, C. P. 34170.

^bInstituto Tecnológico de Durango-Posgrado en Ingeniería Bioquímica, Tecnológico Nacional de México, Felipe Pescador 1803, Col. Nueva Vizcaya, Durango, México. C. P. 34080. ^cUnidad Académica de Ciencias Químicas, Zacatecas, Zacatecas, México. C.P. 98000. ^dCampo Experimental Zacatecas, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Carretera Zacatecas-Fresnillo km 24.5, Calera de V. R., Zacatecas, México. C. P. 98500.

Autor de correspondencia*: mayradherrera@gmail.com

RESUMEN

El orégano (*Lippia* spp.) es un grupo de especies silvestres, endémicas y ecológicamente exitosas en varias regiones de México. El objetivo fue evaluar el rendimiento y propiedades antioxidantes del aceite esencial de orégano de dos entidades de México. Entre abril y agosto de 2022, se colectaron muestras de orégano en El Mezquital, Durango y Xichú, Guanajuato. El clima de los sitios es templado-semiárido, con régimen de lluvias en verano. Las muestras fueron secadas naturalmente “al sol” y usadas para extracción de aceite esencial por arrastre de vapor de agua. Se cuantificó fenoles individuales mediante cromatografía líquida de alta resolución, y el contenido de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. Además, se evaluó la capacidad antioxidante mediante los ensayos de DPPH, ABTS, ORAC y FRAP. Los compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial del orégano colectado en Durango, fueron: carvacrol (2,934.5 µg/mL) y timol (16.3 µg/mL), además, mayor contenido de fenoles totales 1,940.0 mEqAG/mL y de éstos, los flavonoides mostraron la proporción más alta 227.9 mEqCA/mL. En el caso de Guanajuato, se observó menor concentración de carvacrol (66.5 µg/mL), y mayor de timol (593.6 µg/mL), la concentración de fenoles fue menor debido principalmente a la cosecha del material biológico durante la época de lluvias, cuando el nivel de estrés ambiental es inferior. Se observó variaciones en la composición de los aceites esenciales de orégano colectado en diferentes localidades. En todos los ensayos de actividad antioxidante, se registró superioridad del aceite esencial de orégano obtenido en Durango con

ABSTRACT

Oregano (*Lippia* spp.) is a group of wild, endemic, and ecologically successful species in several regions of Mexico. The objective was to evaluate the yield and antioxidant properties of oregano essential oil from two entities in Mexico. Between April and August 2022, oregano samples were collected in El Mezquital, Durango and Xichú, Guanajuato. The climate of the sites is temperate-semiarid, with a summer rainfall regime. The samples were naturally “sundried” and used for essential oil extraction by steam distillation. Individual phenols were quantified by high-resolution liquid chromatography, and the total phenol content by the Folin-Ciocalteu method. In addition, the antioxidant capacity was evaluated by DPPH, ABTS, ORAC and FRAP assays. The major compounds present in the essential oil of oregano collected in Durango were: carvacrol (2,934.5 µg/mL) and thymol (16.3 µg/mL), in addition, a higher content of total phenols 1,940.0 AGmEq/mL and of these, flavonoids showed the highest proportion 227.9 CA mEq/mL. In the case of Guanajuato, a lower concentration of carvacrol (66.5 µg/mL) and a higher concentration of thymol (593.6 µg/mL) were observed. The concentration of phenols was lower mainly due to the harvest of biological material during the rainy season, when the level of environmental stress is lower. Variations were observed in the composition of the essential oils of oregano collected in different locations. In all the antioxidant activity tests, the superiority of the essential oil of oregano obtained in Durango was recorded with levels between 183.9 TEAC mM/mL in FRAP up to 1,558.2 TEAC mM/mL for ORAC. The harvesting of oregano after regrowth and before the

niveles entre 183.9 CAET mM/mL en FRAP hasta 1,558.2 CAET mM/mL para ORAC. La recolecta de orégano después del rebrote y antes de la época de lluvias, incrementó los compuestos bioactivos que convierten a esta planta en una especie promisoriosa para la obtención de antioxidantes naturales.

Palabras clave: *Lippia*, industrialización, valor agregado, salud.

INTRODUCCIÓN

El orégano (*Lippia graveolens* Kunth) es una especie arbustiva, perenne y endémica de varias entidades de México, todas ellas, ubicadas en la región del Altiplano Semiárido y algunas áreas de la zona serrana del sur de Durango (Dgo). En esta entidad, se ha fomentado la recolección de orégano, para la obtención de las hojas que son apreciadas por su calidad cuando se utilizan como condimento alimenticio. Con ello, se generan recursos económicos que contribuyen al mejoramiento del nivel de vida de la población de áreas marginadas de Dgo y otras entidades de México. También, se ha reforzado el uso integral de esta planta silvestre en la industria de los cosméticos, fármacos y licores; motivos que lo han convertido en un producto de exportación. Se considera que los efectos que tiene el ambiente sobre la fenología y fisiología de la planta de orégano influyen en la acumulación de los metabolitos secundarios presentes en las hojas, tallos y flores (Arcila et al., 2004; López-Enríquez et al., 2011).

Las condiciones meteorológicas registradas el ciclo previo y actual de colecta de los tallos, hojas y flores influyen sobre la acumulación de compuestos que proporcionan al orégano calidad alimenticia e industrial. La técnica de arrastre de vapor es considerada la más difundida para la extracción de aceites esenciales a partir del orégano (Arcila et al., 2004). Los componentes químicos principales del aceite esencial de orégano son alcoholes, éteres, aldehídos y cetonas, los cuales son responsables de las fragancias y de las propiedades biológicas de las plantas aromáticas y medicinales (Yañes et al., 2013). Algunos de los metabolitos secundarios más importantes que están presentes en el orégano en proporciones altas son limoneno, alcanfor, linalool, carvacrol, *p*-cimeno, timol, 3-*tert*-butil-4-hidroxianisol, óxido de cariofileno, α -pineno y β -cariofileno (Arcila et al., 2004; Arango et al., 2012; Galván et al., 2023). Algunos de los compuestos del aceite esencial de orégano tienen propiedades antioxidantes, que se han relacionado con la protección de las células humanas contra el daño oxidativo, el cual provoca envejecimiento y enfermedades crónico-degenerativas, como el cáncer, enfermedad cardiovascular y diabetes (Arcila et al., 2004). Además, se han descrito propiedades antimicrobiales y antifúngicas (Portillo et al., 2012). Con base en lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del sitio de recolección

rainy season increased the bioactive compounds that make this plant a promising species for obtaining natural antioxidants.

Key words: *Lippia*, industrialization, added value, health.

INTRODUCTION

Oregano (*Lippia graveolens* Kunth) is a perennial shrub species endemic to several states in Mexico, all of them located in the region of the Semi-arid plateau and some parts of the mountainous area of southern Durango. In this state, the collection of oregano has been encouraged to obtain the leaves that are appreciated for their quality when used as a food condiment. This generates economic resources that help elevate the standard of living for populations in marginalized areas of Durango and other states in Mexico. Additionally, the comprehensive use of this wild plant in the cosmetics, pharmaceutical and liquor industry has been reinforced; which have turned it into an export product. It has been considered that environmental effects on the phenology and physiology of the oregano plant influence the accumulation of secondary metabolites in the leaves, stem and flowers (Arcila et al., 2004 López-Enríquez et al., 2011).

The meteorological conditions recorded during the previous and current cycle of harvesting the stems, leaves and flowers influence the accumulation of compounds that give oregano its nutritional and industrial quality. The steam distillation technique is considered the most widely used for extracting essential oils from oregano (Arcila et al., 2004) collected in Durango. The main chemical components of oregano essential oil are alcohols, ethers, aldehydes and ketones, which are responsible for the fragrances and biological properties of aromatic and medicinal plants (Yañes et al., 2013). Oregano is rich in several key secondary metabolites, including limonene, camphor, linalool, carvacrol, *p*-cymene, thymol, 3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole, caryophyllene oxide, α -pinene, and β -caryophyllene (Arcila et al., 2004; Arango et al., 2012; Galván et al., 2023).

Some of the compounds in oregano essential oil have antioxidant properties, which have been linked to the protection of human cells against oxidative damage, which causes aging and chronic-degenerative diseases, such as cancer, cardiovascular disease and diabetes (Arcila et al., 2004). In addition, antimicrobial and antifungal properties have been described (Portillo et al., 2012). Based on the above, the objective of the present study was to evaluate the effect of the collection site on the antioxidant properties of essential oils obtained from oregano populations in Durango and Guanajuato, Mexico.

sobre las propiedades antioxidantes de los aceites esenciales obtenidos de poblaciones de orégano en Dgo y Guanajuato (Gto), México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de material vegetal

Entre los meses de abril y agosto de 2022, se colectaron tallos finos y hojas de plantas de orégano en el Ejido Troncón y Agua Zarca municipio de El Mezquital (15 de abril), en el sur de Dgo y en el Ejido Adjuntas de Xichú, Xichú, Gto (20 de agosto) (Cuadro 1). El clima de los sitios de corte es templado semiárido BS1, con régimen de lluvias en verano. El corte de tallos se realizó a 15 cm del suelo y las estructuras vegetativas (tallos y hojas) fueron secadas de manera natural "al sol" de 2 a 5 días y almacenadas hasta su procesamiento. Se utilizó el método tradicional, que es comúnmente empleado por los recolectores locales en cada una de las entidades bajo estudio.

Cuadro 1. Información relacionada con el sitio de colecta de plantas de orégano en dos entidades de México.

Table 1. Information related to the oregano plant collection site in two entities in Mexico.

| Entidad | Municipio | Coordenadas | Clima ¹ | Etapas de Corte |
|------------|--------------|----------------------------------|--------------------|-----------------|
| Durango | El Mezquital | 23° 51' 93.9'' N 104° 41' 96.4'' | TS | Pre-Floración |
| Guanajuato | Xichú | 21° 20' 51.6'' N 99° 57' 33.8'' | TS | Pre-Floración |

¹TS= templado semiárido.

Extracción de aceite esencial

Las muestras de orégano deshidratadas, incluyendo todas las estructuras obtenidas de las plantas, se utilizaron para la extracción de aceite esencial por arrastre de vapor de agua Según lo propuesto por Arango et al. (2012). La extracción se llevó a cabo por 2 h, con una densidad de lecho de 80 g/L y presión de vapor de 22 mbar.

Análisis de la composición del aceite esencial

Se realizó una evaluación del perfil químico mediante cromatografía líquida de alta resolución. Se utilizó un sistema Acquity UPLC (Waters Corp., Milford, MA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Xevo TQ-Striple en tándem (Waters Corp., Milford, MA, USA). La determinación se realizó utilizando una columna Acquity UPLC BEH C8 de 100 nm x 2.1 × 1.7 mm (Waters Corp., Milford, MA, USA), y el sistema de cromatografía líquida consistió en un gestor de muestras y un gestor binario de solventes. El solvente A para el perfil de elución fue ácido fórmico 7.5 mM, y el solvente B fue acetonitrilo LC-MS. Las condiciones fueron las siguientes: 98 % de A al inicio, por 0–2 min, 68 % de A, por 2–3.8 min, 55 % de A, por 3.8–4.5 min, y 45 % de A, por 4.5–6.0 min, 5 % de B (gradiente

MATERIALS AND METHODS

Collection of plant material

The collection of plant material was conducted between the months of October and August 2022, thin stems and leaves of oregano plants were collected in the Ejido Troncón and Agua Zarca, municipality of El Mezquital (April 15), in the south of Durango and in the Ejido Adjuntas de Xichú, Xichú, Guanajuato (August 20) (Table 1). The climate of the cutting sites is temperate semi-arid BS1, with a summer rainfall regime. The stems were cut 15 cm from the ground and the vegetative structures (stems and leaves) were dried naturally "in the sun" during 2 to 5 days and stored until processing. The traditional method was used, which is commonly used by local collectors in each of the entities under study.

Essential oil extraction

The dehydrated oregano samples, including all the structures obtained from the plants, were used for the extraction of essential oil by steam distillation. As proposed by Arango et al. (2012). The extraction was carried out for 2 h, with a bed density of 80 g/L and a steam pressure of 22 mbar.

Analysis of the composition of essential oil

A chemical profile evaluation was performed using high-resolution liquid chromatography. An Acquity UPLC system (Waters Corp., Milford, MA, USA) coupled to a tandem Xevo TQ-Triple quadrupole mass spectrometer (Waters Corp., Milford, MA, USA) was used. The determination was carried out using an Acquity UPLC BEH C8 column of 100 nm x 2.1 × 1.7 mm (Waters Corp., Milford, MA, USA), and the liquid chromatography system consisted of a sample manager and a binary solvent manager. Solvent A for the elution profile was 7.5 mM formic acid, and solvent B was acetonitrile LC-MS. The conditions were as follows: 98% A at the start, for 0–2 min, 68% A, for 2–3.8 min, 55% A, for 3.8–4.5 min, and 45% A, for 4.5–6.0 min, 5% B (linear

lineal), y 98 % A por 6.0–9.5 min. Para los ensayos de espectrometría de masas (MS), se utilizó el modo de ionización negativa. Los parámetros fueron: voltaje de capilar de 2.5 kV, temperatura de desolvación de 400 °C, temperatura de la fuente de 150 °C, flujo de gas de desolvación a 800 L/h, flujo de gas del cono a 150 L/h, flujo de gas de colisión a 0.13 mL/min, energía de colisión en modo MS de 5.0, y energía de colisión en modo MS/MS de 20.0. Para la identificación y cuantificación se utilizó una mezcla de estándares (20 ng/μL), entre los que se incluyó timol y carvacrol, para monitorear el tiempo de retención, valores de m/z y transiciones MS/MS. Se utilizó el modo de monitoreo de reacción múltiple (Herrera et al., 2021).

Determinación del contenido de fenoles totales

El contenido de fenoles totales se evaluó con el método de Folin-Ciocalteu, el cual cuantifica el poder reductor de los compuestos fenólicos sobre el reactivo correspondiente, mediante la formación de un complejo azul que se evalúa en el espectrofotómetro a 750 nm. En una microplaca de 96 pocillos se colocaron 25 μL del extracto a evaluar, 80 μL de agua destilada y 5 μL del reactivo Folin-Ciocalteu (grado analítico, Merck). Se agitó y luego se dejó en reposo por 5 min. Posteriormente, se agregaron 80 μL de Na₂CO₃ al 7.5% y luego de 30 min en reposo, bajo condiciones de oscuridad total, se leyó la absorbancia a 750 nm. Se usaron soluciones de ácido gálico (Sigma-Aldrich®) entre 0-250 μg/mL para establecer la curva de calibración con un rango lineal de 0 to 0.032 mg/mL ($R^2 = 0.99$). Los resultados se expresaron como miliequivalentes de ácido gálico por mililitro (mEqAG/mL) (Singleton et al., 1999).

Determinación del contenido de flavonoides

Los flavonoides totales se determinaron de acuerdo con Liu et al. (2002), se mezclaron 0,25 mL de la muestra con 1,25 mL de agua destilada, seguido de la adición de 75 μL de una solución de NaNO₂ al 5%. Después de 6 min, se añadieron 150 μL de una solución de AlCl₃ al 10%. Después de 5 min, se añadieron 0,5 mL de NaOH 1 M. La absorbancia se midió a 510 nm. Los resultados se expresaron como mg de equivalentes de (+)-catequina por gramo de muestra seca (mEqCA/mL), utilizando una curva de calibración de 0-0,074 mg/mL ($R^2 = 0,99$).

Evaluación de la capacidad antioxidante

Ensayo de DPPH

La evaluación de la capacidad antioxidante se evaluó mediante la capacidad de las muestras para eliminar el radical estable 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) según Xu y Chang (2007). Brevemente, se mezclaron 100 μL del aceite de orégano con 1 mL de solución de etanol DPPH 0,1 mM. La mezcla se dejó a temperatura ambiente en la oscuridad, luego se midió la absorbancia a 517 nm contra un

gradient), and 98% A for 6.0–9.5 min. For mass spectrometry (MS) assays, the negative ionization mode was used. The parameters were: capillary voltage of 2.5 kV, desolvation temperature of 400 °C, source temperature of 150 °C, desolvation gas flow at 800 L/h, cone gas flow at 150 L/h, collision gas flow at 0.13 mL/min, collision energy in MS mode of 5.0, and collision energy in MS/MS mode of 20.0. For identification and quantification, a mixture of standards (20 ng/μL), including thymol and carvacrol, was used to monitor retention time, m/z values, and MS/MS transitions. The multiple reaction monitoring mode was used (Herrera et al., 2021).

Total phenols content assay

The total phenol content was evaluated using the Folin-Ciocalteu method, which quantifies the reducing power of phenolic compounds on the corresponding reagent by forming a blue complex that is evaluated in a spectrophotometer at 750 nm. Using a 96-well microplate, 25 μL of the extract to be evaluated, 80 μL of distilled water and 5 μL of the Folin-Ciocalteu reagent (analytical grade, Merck) were placed in. The mixture was shaken and then left to stand for 5 min. Subsequently, 80 μL of 7.5% Na₂CO₃ were added and after 30 min standing under total darkness conditions, the absorbance was read at 750 nm. Gallic acid solutions (Sigma-Aldrich®) between 0-250 μg/mL were used to establish the calibration curve with a linear range of 0 to 0.032 mg/mL ($R^2 = 0.99$). The results were expressed as milliequivalents of gallic acid per milliliter (GAmEq/mL) (Singleton et al., 1999).

Total Flavonoid content assay

Total flavonoids were determined according to Liu et al. (2002), 0.25mL of sample was mixed with 1.25 mL of distilled water, followed by adding 75 μL of a 5% NaNO₂ solution. After 6 min, 150 μL of a 10% AlCl₃ solution was added. After 5 min 0.5 mL of NaOH 1 M was added. The absorbance was measured at 510 nm. Results were expressed as mg of (+)-catechin equivalents per gram of dry sample (CAmEq/mL), using a calibration curve of 0-0.074 mg/mL ($R^2 = 0.99$).

Antioxidant capacity assays

DPPH assay

The antioxidant capacity assessment was evaluated by the ability of samples to scavenge the stable radical 1,1-diphenil-2-picrylhydrazyl (DPPH) according to Xu and Chang (2007). Briefly, 100 μL of oregano oil was mixed with 1 mL of DPPH ethanol solution 0.1 mM. The mixture was left at room temperature in the dark, thereafter the absorbance was measured at 517 nm against an ethanol blank. Results were expressed as Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) equivalents of

blanco de etanol. Los resultados se reportaron como capacidad antioxidante equivalente a Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) por mL de muestra (CAET mM/mL) con una curva de calibración a una concentración de 0-200 μM ($R^2=0,99$).

Ensayo ABTS

Se evaluó la capacidad de eliminación de radical ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) de las muestras siguiendo la metodología de Managa et al. (2020). Se utilizó agua destilada como blanco y Trolox como curva de calibración a una concentración de 0-200 μM ($R^2=0,99$). La solución radical ABTS se preparó añadiendo ABTS a un tampón de fosfato 0,1 mM pH=7,4 y persulfato de potasio 2,45 mM. Posteriormente, la mezcla se mantuvo en oscuridad durante 16 h a 25 °C y se diluyó con 0,1 de tampón de fosfato hasta obtener una absorbancia de 0,70 \pm 0,03 a 734 nm; luego, se mezclaron 100 μL del extracto acetónico con 1 mL de la solución radical. La absorbancia de las muestras y de un control (tampón de fosfato 100 en lugar de muestra) se midió a 734 nm. Se utilizó agua destilada como blanco y Trolox como curva de calibración a una concentración de 0-200 μM ($R^2=0,99$). Los resultados se reportaron como CAET mM/mL.

Ensayo ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

Se determinó por la metodología descrita por Ou et al., (2001), con algunas modificaciones. Se realizó en buffer de fosfatos 7.5 mM (pH 7,4) a 37°C, usando una solución de fluoresceína 0.108 μM y AAPH 79.65 mM. La reacción se realiza a partir de 20 μL de muestra, los cuales se mezclaron con 180 μL de fluoresceína 0.108 μM en placas oscuras de 96 pocillos, se llevó a incubación durante 15 minutos a 37°C y pasado el tiempo se agregaron 75 μL de AAPH 79,65 mM. La fluorescencia se registró cada 210 s a 37 °C durante 150 minutos. Las lecturas se realizaron a una λ de excitación de 485 nm y una λ de emisión de 580 nm. Se utilizó como estándar Trolox en una curva con concentración concentraciones de 0-50 mM ($R^2=0,99$). Los resultados se reportaron como CAET mM/mL.

Ensayo FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Para determinar el potencial de reducción de atrapamiento férrico (FRAP) se llevó a cabo la metodología de Benzie y Choi (2014). Esta se basa en la reducción rápida de la tripiridiltriiazina férrica (TPTZ) por antioxidantes presentes en las muestras que forman la tripiridiltriiazina ferrosa (FeII-TPTZ). La solución FRAP se preparó en proporción 10:1:1 de buffer de acetato 400 mM, TPTZ 30 mM, y $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 60 mM. Se utilizó una placa de 96 pocillos para el ensayo; 20 μL de muestra se diluyeron directamente en los pocillos con 180 μL de radical para posteriormente registrar su absorbancia a 593 nm, utilizando como estándar Trolox en concentración de 10-200 μM

antioxidant capacity per mL of sample (TEAC mM/mL) using a calibration curve at a concentration of 0-200 μM ($R^2=0,99$).

ABTS assay

The ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical scavenging capacity of the samples was evaluated following the methodology of Managa et al. (2020). The ABTS radical solution was prepared by adding ABTS to 0.1 mM phosphate buffer pH=7.4 and potassium persulfate 2.45 mM. Afterward, the mixture was held in darkness for 16 h at 25 °C and diluted with 0.1 the phosphate buffer until an absorbance of 0.70 ± 0.03 was obtained at 734 nm; then, 100 μL of the acetonic extract was mixed with 1 mL of the radical solution. The absorbance of samples and a control (100 phosphate buffer instead of sample) was measured at 734 nm. Distilled water was used as a blank and Trolox as a calibration curve at a concentration of 0-200 μM ($R^2=0,99$). Results were expressed as TEAC mM/mL.

ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) assay

The ORAC assay was determined as described by Ou et al., (2001), with some modifications. It was performed in phosphate buffer 7.5 mM (pH 7.4) at 37 °C, using a solution of fluorescein 0.108 μM and AAPH 79.65 mM. The reaction was performed from 20 μL of sample, which was mixed with 180 μL of fluorescein 0.108 μM in dark 96-well plates, incubated for 15 minutes at 37 °C, afterwards, 75 μL of AAPH 79.65 mM were added. The fluorescence was recorded every 210 s at 37 °C for 150 minutes. Readings were performed at an excitation λ of 485 nm and an emission λ of 580 nm. Trolox was used as a standard at concentrations of 0-50 mM ($R^2=0,99$). Results were expressed as TEAC mM/mL.

FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) assay

For the determination of the ferric trapping reduction potential (FRAP), the methodology described by Benzie and Choi (2014) was carried out. This assay is based on the rapid reduction of ferric tripyridyltriazine (TPTZ) by the antioxidants present in the samples that form ferrous tripyridyltriazine (FeII-TPTZ). The FRAP solution was prepared in a 10:1:1 ratio of acetate buffer 400 mM, TPTZ 30 mM, and $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 60 mM. A 96-well plate was used for the assay; 20 μL of sample was diluted directly in the wells with 180 μL of radical to subsequently record its absorbance at 593 nm, using Trolox as a standard at concentrations of 10-200 μM ($R^2=0,99$). Results were expressed as TEAC mM/mL.

Statistical analysis

Statistical evaluation of the data was determined by analysis of variance (ANOVA) at a confidence level of 95%.

Análisis estadístico

La evaluación estadística de los datos se determinó mediante el análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de confianza de 95%. Se realizó el análisis de comparación de medias, considerando tres réplicas por variable respuesta, aplicando la prueba de t de Student. Los análisis estadísticos se realizaron en el programa estadístico JMP 5.0.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición del aceite esencial de orégano

Los componentes mayoritarios presentes en el aceite esencial del orégano colectado en Durango, fueron: carvacrol (2,935 $\mu\text{g/mL}$) y en un nivel inferior el compuesto timol (16 $\mu\text{g/mL}$). En el caso de Guanajuato se observó un nivel inferior de carvacrol (67 $\mu\text{g/mL}$), comparado con Durango; sin embargo, registró un nivel alto de timol (Cuadro 2). Los resultados mostraron variación en la composición de los aceites esenciales obtenidos a partir del orégano colectado en Durango y Guanajuato, ya que se observó que la detección de intensidad de los compuestos detectados para las muestras de Durango fue superior (Figura 1). Es posible que además de la fecha de cosecha, las variaciones en el método de secado del orégano, técnica de extracción de aceite y proporciones de los órganos de la planta usadas durante el proceso, hayan influido sobre el rendimiento y composición de los aceites esenciales (Leyva et al., 2017). Además, se ha reportado influencia de las condiciones agroclimáticas registradas durante el crecimiento y desarrollo de las plantas, sobre la concentración final de fitoquímicos (Arcila et al., 2004; Batool et al., 2024). También, se reportó variación en el contenido de aceite de plantas de orégano en relación con algunos caracteres morfoagronómicos (altura de la planta, relación hoja-tallo, rendimiento de hojas por planta y rendimiento de hojas por hectárea) (Kassahun et al., 2014).

El orégano colectado en Dgo mostró niveles altos de fenoles totales 1,940 mEqAG/mL y de éstos, los flavonoides mostraron una proporción más alta 228 mEqCA/mL. En ambos componentes se observó nivel significativamente bajo en Guanajuato, debido principalmente a la cosecha del material biológico durante la época de lluvias, cuando el nivel de estrés ambiental es inferior al observado en Durango. En esta entidad se inicia la temporada seca desde octubre y se registra también el descenso de la temperatura, entre noviembre y marzo, lo que fomenta la acumulación de metabolitos secundarios. Se ha observado que, en condiciones de estrés hídrico, las plantas responden mediante el envío de señales, relacionadas con el ácido abscísico, para inducir el cierre de estomas en las hojas y esto, reduce la fijación de carbono y acumulación excesiva de especies reactivas de oxígeno. Lo anterior, hace necesaria la biosíntesis de compuestos fenólicos, especialmente flavonoides, para depurar los radicales y evitar el daño celular en las plantas (Malisch et al., 2016).

($R^2=0.99$). Los resultados se reportan como CAET mM/mL. The comparison of means analysis was performed, considering three replications per response variable, applying the Student t test. Statistical analyses were performed in the statistical program JMP 5.0.1.

RESULTS AND DISCUSSION

Oregano essential oil composition

The main components present in the essential oil of oregano collected in Durango were: carvacrol (2,935 $\mu\text{g/mL}$) thymol (16 $\mu\text{g/mL}$), and at a lower level. In the case of Guanajuato, a lower level of carvacrol (67 $\mu\text{g/mL}$) was observed, compared to Durango; however, a high level of thymol was recorded (Table 2). The results showed variation in the composition of the essential oils obtained from oregano collected in Durango and Guanajuato, since it was observed that the detection intensity of the compounds detected for the Durango samples was higher (Figure 1).

It is possible that in addition to the harvest date, variations in the oregano drying method, oil extraction technique and proportions of the plant organs used during the process, have influenced the yield and composition of the essential oils (Leyva et al., 2017).

In addition, the influence of agroclimatic conditions recorded during plant growth and development on the final concentration of phytochemicals has been reported (Arcila et al., 2004; Batool et al., 2024). Also, variation in the oil content of oregano plants was reported in relation to some morpho-agronomic traits (plant height, leaf:stem ratio, leaf yield per plant, and leaf yield per hectare) (Kassahun et al., 2014).

The oregano collected in Durango showed high levels of total phenols 1,940 GAmEq/mL and of these, flavonoids showed a higher proportion 228 CAmEq/mL. In both components, a significantly low level was observed in Guanajuato, mainly due to the harvest of biological material during the rainy season, when the level of environmental stress is lower than that observed in Durango. In this state, the dry season begins in October and a drop in temperature is also recorded between November and March, which encourages the accumulation of secondary metabolites.

It has been observed that, under conditions of water stress, plants respond by sending signals related to abscisic acid to induce the closure of stomata in the leaves and this reduces carbon fixation and excessive accumulation of reactive oxygen species. The above makes the biosynthesis of phenolic compounds, especially flavonoids, necessary to purify radicals and prevent cellular damage in plants (Malisch et al., 2016).

Cuadro 2. Caracterización fenólica de aceite esencial de orégano colectado en dos entidades.

Table 2. Phenolic characterization of essential oil from oregano collected in two entities.

| Entidad | Carvacrol (µg/mL) | Timol (µg/mL) | Fenoles Totales (mEqAG/mL) | Flavonoides (mEqCA/mL) |
|------------|-------------------|---------------|-------------------------------|---------------------------|
| Durango | 2,935 ± 90 a | 16 ± 2 b | 1,940 ± 58 a | 228 ± 20 a |
| Guanajuato | 67 ± 13 b | 594 ± 10 a | 429 ± 4 b | 28 ± 2 b |

Los datos se muestran como la media ± la desviación estándar de tres réplicas. Letras diferentes entre filas indican diferencia significativa con la prueba de t de Student.

Data are shown as mean ± standard deviation of three replicas. Different letters among lines indicate significant difference using Student's t test.

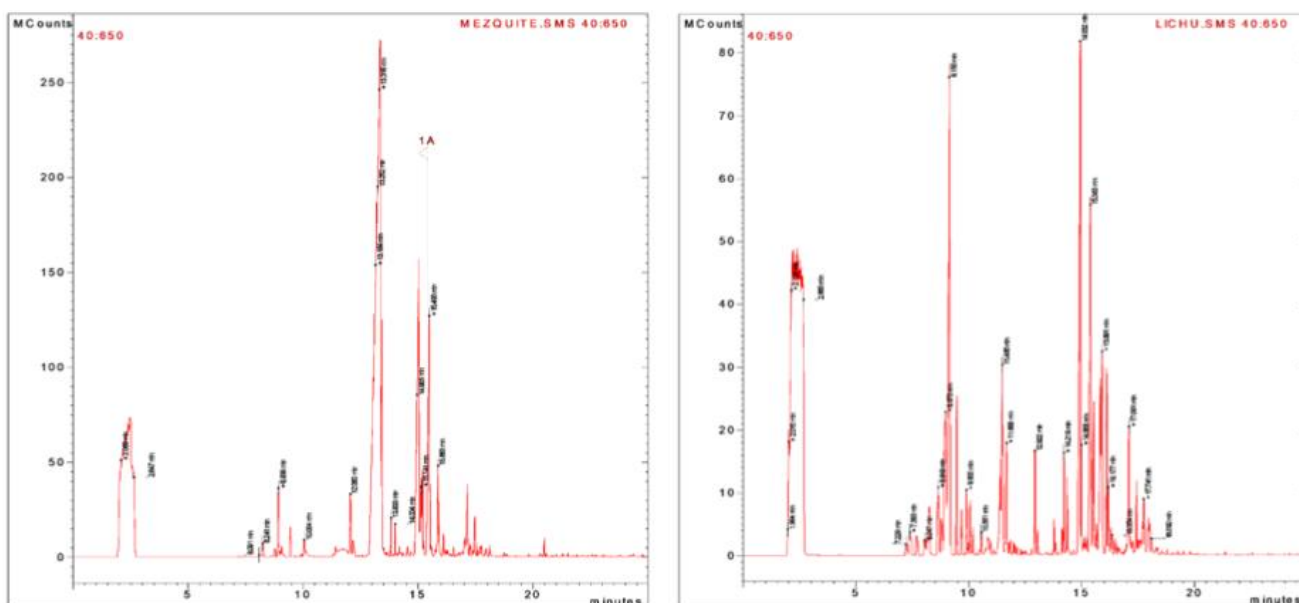


Figura 1. Cromatograma representativo de la caracterización química mediante cromatografía líquida de alta resolución de muestras de aceite de orégano obtenido de El Mezquite, Durango (a la izquierda) y Xichú, Guanajuato (a la derecha).

Figure 1. Representative chromatogram of the chemical characterization by high-performance liquid chromatography of oregano oil samples obtained from El Mezquite, Durango (on the left) and Xichú, Guanajuato (on the right).

Evaluación de la capacidad antioxidante

Según Kotha et al. (2022) se han desarrollado varios métodos analíticos para evaluar las propiedades antioxidantes de los fitoquímicos de origen vegetal. La actividad antioxidante depende de su estructura química; en concreto, depende de su capacidad para donar hidrógeno con electrones, la quelación de metales y su capacidad para deslocalizar el electrón desapareado dentro de la estructura aromática.

Antioxidant capacity evaluation

According to Kotha et al. (2022), several analytical methods have been developed to assess the antioxidant properties of plant-derived phytochemicals. Antioxidant activity depends on their chemical structure; specifically, it depends on their ability to donate hydrogen with electrons, metal chelation, and their ability to delocalize the unpaired electron within the aromatic structure. Numerous analytical methods have been described in the literature to assess each

En la bibliografía se han descrito numerosos métodos analíticos para evaluar cada aspecto de su acción antioxidante, por ejemplo, los métodos ABTS y FRAP se basan en la transferencia de electrones, mientras que la metodología ORAC se basa en la transferencia de átomos de hidrógeno. Por otro lado, DPPH se basa en la transferencia mixta (electrón/hidrógeno).

En todos los ensayos de actividad antioxidante, se observó superioridad del aceite esencial de orégano obtenido en Durango con niveles registrados entre 184 CAET mM/mL en FRAP y hasta 1,558 CAET mM/mL para ORAC (Cuadro 3). Esto concuerda con los resultados obtenidos en la concentración de fenoles totales y flavonoides.

Los resultados muestran que la recolección de orégano luego del rebrote y antes de la época de lluvias, incrementó los niveles de los compuestos bioactivos presentes en la planta de orégano. Los valores de ABTS fueron intermedios (1,347 mM/mL), al igual que el DPPH (963 CAET mM/mL). Los valores registrados en Guanajuato fueron significativamente inferiores, con 3 CAET mM/mL para DPPH, 35 mM/mL FRAP, 127 mM/mL ABTS y 1,333 mM/mL para ORAC.

aspect of their antioxidant action, for example, ABTS and FRAP are based on electron transfer, while ORAC is based on hydrogen atom transfer. On the other hand, DPPH is based on mixed (electron/hydrogen) transfer.

In all antioxidant activity assays, the oregano essential oil obtained in Durango was the outstanding sample, with antioxidant capacity levels recorded between 184 CAET mM/mL in FRAP and 1,558 CAET mM/mL for ORAC (Table 3). This is consistent with the results obtained in the concentration of total phenols and flavonoids.

The results show that the collection of oregano after regrowth and before the rainy season increased the levels of bioactive compounds present in the oregano plant. The ABTS values were intermediate (1,347 mM/mL), as was the DPPH (963 mM/mL). The values recorded in Guanajuato were significantly lower, with 3 mM/mL for DPPH, 35 mM/mL FRAP, 127 mM/mL ABTS and 1,333 mM/mL for ORAC.

Cuadro 3. Capacidad antioxidante de aceite esencial de orégano colectado en dos entidades.

Table 3. Antioxidant capacity of essential oil from oregano collected in two entities.

| Entidad | ABTS CAET mM/mL | DPPH CAET mM/mL | FRAP CAET mM/mL | ORAC CAET mM/mL |
|------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Durango | 1,347± 67 a | 963 ± 28 a | 184 ± 1 a | 1,558 ± 60 a |
| Guanajuato | 127 ± 6 b | 3 ± 0 b | 35 ± 1 b | 333 ± 14 b |

Los datos se muestran como la media ± la desviación estándar de tres réplicas. Letras diferentes entre filas indican diferencia significativa con la prueba de t de Student.

Data are shown as mean ± standard deviation of three replicas. Different letters among lines indicate significant difference using Student's t test.

CONCLUSIONES

La recolección de orégano luego del rebrote en primavera y antes de la época de lluvias, incrementó los niveles de los compuestos bioactivos presentes en la planta de esta especie usada como condimento y fuente de antioxidantes naturales. La recolección de orégano en Durango, durante la época seca del año, generó cantidades altas de compuestos bioactivos, con niveles altos de capacidad antioxidante, esto está en función de las condiciones agroclimáticas en las que se desarrolla la planta. Ante una condición de temporal errático, en donde la precipitación pluvial es menor, la planta induce la activación de su mecanismo de respuesta al estrés oxidativo, lo que incrementa la síntesis de compuestos con propiedades antioxidantes.

REFERENCIAS

Arango BO, Pantoja DD, Santacruz CL, Hurtado BM. (2012)

CONCLUSIONS

The harvesting of oregano after the regrowth in spring and before the rainy season increased the levels of bioactive compounds present in the plant of this species used as a condiment and source of natural antioxidants. The harvesting of oregano in Durango, during the dry season of the year, generated high quantities of bioactive compounds, with high levels of antioxidant capacity, this is a function of the agroclimatic conditions in which the plant develops. In the face of erratic weather conditions, where rainfall is lower, the plant induces the activation of its response mechanism to oxidative stress, which increases the synthesis of compounds with antioxidant properties.

- Actividad antioxidante del aceite esencial de orégano (*Lippia organoides* H. B. K.) del Alto Patia. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial 10(2): 79-86. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612012000200010
- Arcila Lozano AC, Loarca-Piña G, Lecona-Uribe S, González de Mejía E. (2004). El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 54(1): 100-111. https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222004000100015
- Batool U, Nawaz R, Ahmad S, Irshad MA, Irfan A, Gaafar ARZ, Arshad M, Wondmie GF, Qayyum MMN, and Bourhia M. (2024). Physico-and phytochemical properties of Brassica juncea as affected by agroclimatic conditions. Scientific Reports 14(1): 797. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-48808-9>.
- Benzie IF & Choi SW. (2014). Antioxidants in food: content, measurement, significance, action, cautions, caveats, and research needs. Advances in food and nutrition research, 71, 1-53. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800270-4.00001-8>.
- Galván CZ, Ramos C-MG, Marzalek JE, Vargas GG. (2023). Revisión sobre el orégano mexicano *Lippia graveolens* HBK. (*Sinonimia Lippia berlandieri Schauer*) y su aceite esencial. Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos 8: 861-871. <https://doi.org/10.29105/idcyta.v8i1.109>
- Herrera Mayra Denise, Jiménez-Ocampo Rafael, Rosales-Serna Rigoberto, Rodríguez-González Jorge Alberto, Santos-De la Cruz Juan Luis, Cruz-Bravo Raquel Karina, Alvarado-Aguilar Pablo, Gamboa-Gómez Claudia Ivette, Guerrero-Romero Fernando (2021). A simple thermal-detoxified method for castor bean (*Ricinus communis* L.) cake, and its potential nutraceutical properties, Industrial Crops and Products, 174, 114151. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114151>
- Kassahun, B. M., S. Tilahun, Z. D. Zigene, Z. Teferi, M. Mekonnen and B. Melka. (2014). Morpho-agronomic characteristics, essential oil content and essential oil yield of oregano (*Origanum vulgare* L.) in Ethiopia. Scholarly Journal of Agricultural Science 4(12): 565-571.
- Kotha, R.R., Tareq, F.S., Yildiz, E., Luthria, D.L. (2022). Oxidative stress and antioxidants—a critical review on in vitro antioxidant assays. Antioxidants, 11, 2388. <https://doi.org/10.3390/antiox11122388>
- Leyva-López N, Gutiérrez-Grijalva EP, Vazquez-Olivo G, Basilio HJ. (2017). Essential oils of oregano: biological activity beyond their antimicrobial properties. Molecules 22(6): 989. <https://doi.org/10.3390/molecules22060989>.
- Liu M, Qi Li X, Weber C, Yong LC, Brown J, Hai LR. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 5 p. <https://doi.org/10.1021/jf0111209>.
- López-Enríquez, IL, González-Elizondo, MS, González-Elizondo, M, Ruacho-González, L, Retana-Rentería, FI, Tena-Flores, JA. (2011). Distribución geográfica de las especies de orégano en Durango. En D.R. (1era Ed.), El orégano mexicano: estado actual del conocimiento. Durango, Dgo. (pp. 23-32).
- Malisch, CS, Salminen JP, Kölliker R, Engström MT, Suter D, Studer B, Lüscher A. (2016). Drought effects on proanthocyanidins in sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) are dependent on the plant's ontogenetic stage. Journal of Agricultural and Food Chemistry 64(49): 9307-9316. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02342>
- Managa, M.G., Sultanbawa, Y., & Sivakumar, D. (2020). Effects of different drying methods on untargeted phenolic metabolites, and antioxidant activity in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. subsp. chinensis) and nightshade (*Solanum retroflexum* Dun.). Molecules 25(6), 1326. <https://doi.org/10.3390/molecules25061326>
- Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. Journal of agricultural and food chemistry, 49(10), 4619-4626. <https://doi.org/10.1021/jf010586o>
- Portillo-Ruiz MC, Ávila-Sosa SR, Viramontes-Ramos S, Torres-Muñoz JV, Nevárez-Moorillón GV. (2012). Antifungal effect of Mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) essential oil on a wheat flour-based medium. Food Science 77(8): M441-M445. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02821.x>.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods in Enzymology, 299, 152-178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Yáñez-Chávez LG, Escobar-Pedraza JJ, Campos AG, Flores-Hernández A. (2013). Aprovechamiento del orégano (*Lippia graveolens*) producción de biomasa y rendimiento de aceite esencial extraído por el método de arrastre con vapor de agua en Mapimí, Dgo. Memoria: Resúmenes y artículos en extenso. I Congreso Internacional, IX Congreso Nacional Sobre Recursos Bióticos de Zonas Áridas y VI Reunión Nacional de Orégano y otras aromáticas. Universidad Autónoma Chapingo-Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas. Bermejillo, Dgo., México. pp. 402-413.
- Xu, B.J., & Chang, S.K. (2007). A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. Journal of Food Science, 72, S159-S166. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00260.x>.