

Valorización del bagazo residual de orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK) mediante la obtención de fracciones enriquecidas en pinocembrina

María Fernanda Cuevas-González ¹, Irma Guadalupe López-Muraira ¹, José Daniel Padilla-de la Rosa ², Carolina León-Campos ¹ y Héctor Flores-Martínez ^{1,*}

¹ TecNM/ITTlajomulco. Km. 10 Carretera Tlajomulco-San Miguel Cuyutlán, Tlajomulco de Zúñiga 45640, Jalisco, México; mafer_cuglez@hotmail.com; lopezmuraira@hotmail.com; caroleon03@hotmail.com

² Tecnología Alimentaria, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Camino Arenero 1227, el Bajío del Arenal, Zapopan 45019, Jalisco, México; jdpadilla@ciatej.mx.

* Autor de correspondencia: hector.fm@tlajomulco.tecnm.mx

Recibido: 23 de abril de 2021 Aceptado: 10 de mayo de 2021

Resumen: El orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK) constituye una especia de gran valor comercial principalmente por la presencia de timol y carvacrol, compuestos volátiles liposolubles contenidos en su aceite esencial. Sin embargo, poco aprovechamiento se ha dado a su alto contenido de compuestos fenólicos hidrosolubles, con probadas capacidades antioxidantes. Dentro de ellos, destaca su elevado contenido de pinocembrina, flavanona con propiedades de gran importancia alimenticia y para la salud por su actividad protectora contra la isquemia cerebral. México ocupa el segundo lugar como productor mundial de orégano mexicano. Durante el proceso extractivo del aceite esencial derivado de su hoja, se genera una gran cantidad de residuos sólidos ricos en flavonoides, los cuales son mínimamente aprovechados e incluso llegan a constituir una fuente de contaminación por su mala disposición como desecho. Con el fin de valorizar este desecho agroindustrial, se caracterizó mediante la determinación del contenido de fenoles totales, actividad antioxidante (DHHP) y contenido de pinocembrina, observando un mayor contenido de pinocembrina en el extracto de orégano sin aceite esencial (0.766 mg/ml) con respecto al correspondiente al orégano sin tratamiento (0.659 mg/ml). Los resultados sugieren que el bagazo residual de la extracción del aceite esencial puede ser aprovechado con gran potencial por su alto contenido de polifenoles, capacidad antioxidante y pinocembrina (27.93 mg/g BS). Para lograr la concentración de pinocembrina, se evaluaron dos métodos de separación: columna cromatográfica con silica gel (hidrofílica) y separación con extracción automatizada en fase sólida hidrofóbica (Ultra C18) con eficiencias de recuperación de pinocembrina de 56.6 y 90.1 %, respectivamente, pudiendo generarse productos enriquecidos en pinocembrina con un 74.8 % de pureza. El presente trabajo contribuye al potencial desarrollo de nuevos productos y procesos de valorización de residuos en la creciente industria de extracción de aceites esenciales naturales.

Palabras clave: Residuos sólidos; orégano mexicano; aprovechamiento; flavonoides; pinocembrina.

Valorization of the residual bagasse of Mexican oregano (*Lippia graveolens* HBK) by obtaining fractions enriched in pinocembrin

Abstract: Mexican oregano (*Lippia graveolens* HBK) constitutes a spice of great commercial value mainly due to the presence of thymol and carvacrol, volatile fat-soluble compounds contained in its essential oil. However, little use has been made of its high content of water-soluble phenolic compounds, with proven antioxidant capacities. Among them, it stands out its high content of pinocembrin, flavanone with properties of great nutritional importance and for health due to its protective activity against cerebral ischemia. Mexico ranks second as a world producer of Mexican oregano. During the extractive process of the essential oil derived from its leaf, a large amount of solid waste rich in flavonoids is generated, which is minimally used and even becomes a source of contamination due to its poor disposal as waste. In order to value this agro-industrial waste, it was characterized by determining the content of total phenols, antioxidant activity (DHHP) and content of pinocembrin, observing a higher content of pinocembrin in the extract of oregano without essential oil (0.766 mg / ml) with respect to that corresponding to oregano without treatment (0.659 mg / ml). The results suggest that the residual bagasse from the extraction of the essential oil can be used with great potential due to its high content of polyphenols, antioxidant capacity and pinocembrin (27.93 mg / g BS). To achieve the concentration of pinocembrin, two separation methods were evaluated: chromatographic column with silica gel (hydrophilic) and separation with automated extraction in hydrophobic solid phase (Ultra C18) with pinocembrin recovery efficiencies of 56.6 and 90.1 %, respectively, being able to generate products enriched in pinocembrin with a 74.8 % purity. This work contributes to the potential development of new products and waste recovery processes in the growing natural essential oil extraction industry.

Keywords: Solid waste; Mexican oregano; use; flavonoids; pinocembrin.

Introducción

El orégano es una planta de distribución mundial, el cual está representado principalmente por dos especies: *Origanum vulgare* (Lamiaceae) nativo de Europa, y *Lippia graveolens* HBK (Verbenaceae) originaria de América. Su importancia económica se debe a sus usos, no sólo como condimento de alimentos sino también en la elaboración de cosméticos, fármacos, licores, entre otros, motivos que lo han convertido en un producto de exportación (Arcila *et al.*, 2004). La producción global del orégano es estimada en alrededor de 15 000 toneladas, siendo Turquía el principal productor con exportaciones que superan las 10 000 toneladas anuales seguido de México con 3 600 toneladas, Grecia con 2 300 toneladas y otros países (CONABIO, 2005; Villavicencio *et al.*, 2007; Koksai *et al.*, 2010).

Su valor comercial radica principalmente como especia por su contenido de los compuestos liposolubles (aceite esencial) derivado de la hoja de esta planta, considerado de excelente calidad en el mercado internacional por su alta concentración de timol y carvacrol (Mastelić *et al.*, 2008). El aceite esencial de orégano se extrae principalmente en empresas estadounidenses y europeas que lo comercializan a nivel mundial, teniendo diferentes aplicaciones por sus múltiples propiedades en la industria alimentaria, automotriz y farmacéutica (SEMARNAT, 2015). Sin embargo, al realizar la extracción del aceite esencial a partir de las hojas de orégano se genera una gran cantidad de subproducto, residuo al que se le conoce como “bagazo” formado por las hojas que quedan después de la extracción que, de acuerdo con SEMARNAT (2001), éste constituye aproximadamente el 95 % en peso seco del peso inicial. El bagazo es considerado un desecho (Rolando, 2007) ya que actualmente es mínimamente utilizado como materia de compostaje, mientras que el resto comúnmente se quema a cielo abierto o se deja en campo y se deposita en sitios no regulados, contaminando el ambiente. Evidentemente, existe la necesidad de gestionar e industrializar adecuadamente estos residuos agroindustriales y así dar solución a los problemas e impactos ambientales ocasionados por su mal manejo y disposición, ya que emiten malos olores, compuestos orgánicos volátiles, contaminación por lixiviados y gases de efecto invernadero (GEI) (Nava *et al.*, 2019). La presente investigación permite establecer las bases en la generación potencial de un producto de mayor valor a partir de los residuos generados en la extracción del aceite esencial para el orégano mexicano mediante la extracción de los compuestos hidrosolubles bioactivos presentes dentro de los residuos, ya que se ha reportado que el bagazo contiene importantes compuestos bioactivos como flavonoides con actividad antioxidante y antimicrobiana (Corral, 2011; Rolando, 2007).

Existen muy pocos estudios sobre el aprovechamiento y extracción de dichos compuestos bioactivos hidrosolubles que se encuentran en el orégano mexicano (*L. graveolens* HBK) y sus subproductos, tal es el caso de la pinocembrina. La pinocembrina es un compuesto flavonoide abundante dentro del orégano mexicano (Lin *et al.*, 2007). Es una molécula considerada como multifuncional en la industria farmacéutica. Su amplia gama de actividades farmacológicas ha sido bien estudiada, incluidas las actividades antimicrobianas, antiinflamatorias, antioxidantes y anticancerígenas. La pinocembrina tiene potencial como fármaco para tratar la isquemia cerebral (Chung *et al.*, 2011), las enfermedades cardiovasculares y la aterosclerosis, así como otras afecciones clínicas (Liu *et al.*, 2014). La pinocembrina también exhibe varias actividades biológicas interesantes como antibacteriana, antifúngica y antiinflamatoria (Zheng *et al.*, 2018). Además, la pinocembrina desempeña un papel fundamental en la prevención y cura de diversas enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson y otras disfunciones neuronales.

En la búsqueda de conocer las tendencias aplicadas hacia el aprovechamiento y separación de compuestos flavonoides como la pinocembrina, Osti *et al.* (2010) aislaron dicho compuesto de *Sphaeralcea angustifolia*, planta mexicana común en la medicina tradicional. Estos autores realizaron la separación utilizando cromatografía en columna y gel de sílice como fase fija con partícula de 0.063-0.20 mm y como fase móvil hexano, acetato de etilo y metanol en orden creciente de polaridad, logrando separar la pinocembrina (0.066 mg/mg Ex). Por otro lado, Nyotia *et al.* (2016) aislaron pinocembrina proveniente de *Artocarpus odoratissimus*, fruta tropical, los extractos brutos se fraccionaron usando cromatografía líquida de vacío en gel de sílice (VLC) con un sistema de disolventes en gradiente escalonado de hexano, hexano-acetato de etilo, acetato de etilo-metanol y metanol. Utilizando este mismo método de separación Granados *et al.* (2018) aislaron diferentes flavonoides provenientes de 3 propóleos mexicanos, entre ellos la pinocembrina (19, 33 y 55 mg/g Ex), a diferencia de que estos autores emplearon como fase móvil una mezcla en gradiente de diclorometano-acetona (1: 0-0: 1).

Tomando como base los antecedentes sobre la separación de pinocembrina de diferentes fuentes, en la presente investigación se desarrollaron y evaluaron dos métodos de separación de pinocembrina, evaluando el uso de fases separativas polar y no polar, a partir de los residuos sólidos obtenidos tras el proceso de extracción del aceite esencial de orégano mexicano (*L. graveolens* HBK). Lo anterior con el fin de obtener fracciones con alto contenido y buenas eficiencias de recuperación de pinocembrina, ya que hasta el momento no se han desarrollado métodos de separación de este compuesto a partir de dicha materia prima, la cual es rica en compuestos flavonoides con gran potencial de uso en la industria farmacéutica y alimenticia.

Materiales y Métodos

Materia prima

El orégano mexicano (*L. graveolens* HBK) seleccionado es proveniente de la localidad de Huejuquilla, se encuentra en el estado de Jalisco ubicada a una latitud de 22° 45' N, una longitud de 103° 45' O y a una altura de 1.450 metros sobre el nivel del mar; la muestra de orégano mexicano fue obtenida tras el proceso tradicional de vareo y secado al sol durante 3 días después del corte en etapa floración al 10 %, manteniendo un contenido de humedad del 10 % w/w.

Reactivos y estándares

Los estándares flavonoides de galangina (99.3 %) y naringenina (99.4 %) se adquirieron de Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemania); mientras que pinocembrina (99.8 %), hispidulina (98.9 %) y taxifolina (99.1 %) se adquirieron de PhytoLab (Vestenbergsgreuth, Alemania). El reactivo de Folin-Ciocalteu, ácido gálico y di (phenyl)-(2, 4, 6-trinitrophenyl) iminoazanium (DPPH) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. Otros reactivos y productos químicos fueron de grado reactivo analítico.

Extracción de aceite esencial del orégano mexicano (L. graveolens HBK) por arrastre de vapor de agua

La extracción de aceite esencial del orégano mexicano se realizó con el método de hidrodestilación con arrastre de vapor (Hernández *et al.*, 2008). Para extraer el aceite esencial, fueron seleccionadas las hojas y las flores del orégano mexicano de las cuales se colocaron 50 g en un matraz balón de 1000 mL, posteriormente se añadieron 500 mL de agua destilada. Se montó el equipo de destilación cuyas partes incluyen un condensador vertical, controlador de presión y una trampa de decantación. La muestra se llevó a ebullición suave manteniendo un tiempo de extracción constante de 4 h. Transcurrido el tiempo se midió y se recuperó el aceite esencial obtenido con ayuda de la trampa de decantación. Finalmente, los residuos sólidos obtenidos (orégano) fueron filtrados, se pesaron y se sometieron a un proceso de secado a temperatura de 40 °C en una estufa (GL-70A - Fab, Nacional), colocando la muestra en charolas de aluminio, hasta obtener peso constante. Eliminada el agua de los residuos sólidos (8-10 % de humedad), se procedió a realizar un extracto hidroetanólico de los residuos sólidos generados en la extracción del aceite esencial.

Obtención del extracto hidroetanólico de los residuos sólidos generados en la extracción del aceite esencial de orégano mexicano (L. graveolens HBK)

La obtención del extracto hidroetanólico, se realizó utilizando el método de maceración con agitación y temperatura controlada, optimizado por Flores *et al.*, (2016). El sistema de operación contó con reflujo para evitar pérdidas por evaporación. Los residuos sólidos (orégano mexicano sin aceite esencial) fueron sometidos a molienda y tamizado, con el propósito de obtener la granulometría deseada (0.423 mm) y así facilitar el proceso de extracción. La extracción se realizó en un matraz balón de 500 mL, con una relación soluto-solvente 1:20, siendo 7.5 g de orégano seco sin aceite esencial como material de extracción y como solvente 150 mL de etanol en agua al 58 %. El tiempo de extracción se mantuvo constante en 1 h con agitación controlada de 300 rpm. Una vez terminada esta operación, el extracto obtenido se filtró y se concentró 10 volúmenes en un roto-evaporador al vacío (40-45 °C y 500 mmHg).

El proceso fue repetido utilizando como material de extracción orégano mexicano (*L. graveolens* HBK) sin tratamiento previo, es decir con aceite esencial.

Determinación de fenoles totales

La cuantificación de los fenoles totales se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu (Cortés *et al.*, 2021). Los extractos se diluyeron al 10 % y la reacción se llevó a cabo mezclando 0.5 mL de reactivo Folin 0.67 N y 0.5 mL de Na_2CO_3 1.9 M. Después de 1 h de reposo, las muestras se leyeron a 760 nm por espectrofotometría. Se utilizó ácido gálico (GA) como patrón de referencia.

Capacidad antioxidante por DPPH

La capacidad antioxidante de los extractos se determinó mediante espectrofotometría visible en presencia del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazina (DPPH) a 518 nm. Se tomaron 2 mL de metanol al 80 % (blanco) y extractos diluidos al 0.1 %, respectivamente, luego se añadieron 2 mL de DPPH 2.5 mM recién preparado. La lectura del blanco y las muestras se realizaron después de 30 min. El porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo con la Ecuación 1, descrita por Cortés *et al.* (2021).

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Abs blanco} - \text{Abs muestra}}{\text{Abs muestra}} \times 100 \quad (1)$$

Métodos separativos de los extractos concentrados de orégano mexicano.

a) Fraccionamiento por purificador automatizado Isolera, Biotage.

Se realizó por duplicado una separación utilizando un sistema de extracción en fase sólida con ayuda de un purificador automatizado de laboratorio marca Isolera, Biotage. Se utilizó un cartucho SNAP Ultra C18 de 30 g, un bastidor de 16x100 mm y como solventes de la fase móvil: Solvente A (0.1 % ácido fórmico-agua) y solvente B (0.1 % ácido fórmico-acetonitrilo). El gradiente utilizado consistió en 5:24 min 5 % A, 3:00 min 5 % A, 9:00 min 5 % A, 9:00 min 100 % A, 3:00 min 100 % A, 3:00 min 5 % A; a un caudal de 25 mL/min y un volumen de inyección de ½ mL de la muestra. La detección se realizó a una longitud de onda de 280 y 365 nm.

Al terminar la corrida, las fracciones obtenidas con mayor concentración se sometieron a un proceso de secado a una temperatura de 40 °C en una estufa (GL-70A - Fab, Nacional), colocando las muestras en capsulas de cristal, hasta la evaporación total del solvente. Una vez evaporado el solvente, los residuos obtenidos fueron re suspendidos utilizando 1 mL de etanol al 58 %, los residuos se colocaron en tubos eppendorf y se almacenaron en refrigeración (5°C) hasta su posterior análisis.

b) Fraccionamiento por columna cromatográfica y silica gel

La separación por columna cromatográfica se realizó por duplicado utilizando una columna de 80 cm, empacada con 178 g de silica gel 60 A (0.075-0.030 mm) rehidratada en acetonitrilo. El disolvente empleado como fase móvil fue acetonitrilo a distintas concentraciones (100, 90, 70, 50 %). Una vez montada la columna cromatográfica se sembraron 8 mL de extracto concentrado (2 g de extracto seco y 6 mL de etanol al 58 %). Las fracciones fueron captadas con un recolector de muestras automático conectado a la columna cromatográfica, esta contó con un flujo de 1 mL/min. Al terminar el proceso, las fracciones obtenidas se analizaron por cromatografía en Capa Fina (TLC) para la identificación de los flavonoides presentes.

Identificación de flavonoides presentes en las fracciones por cromatografía en Capa Fina (TLC).

Para la identificación de los flavonoides presentes en las fracciones se procedió a realizar cromatografía en capa fina usando una placa de aluminio TLC Silica gel 60 F₂₅₄ de 10 cm x 10 cm, como fase móvil se utilizó tolueno, éter etílico y ácido acético (10:9:1, v/v/v). Se aplicaron estándares de pinocembrina, naringenina, hispidulina, galangina y taxifolina a una concentración de 1000 ppm, para comparar el factor de retención (RF). Los extractos y las fracciones se sembraron en la placa sobre la línea de origen trazada a 0.7 cm del borde inferior, colocando 1 aplicación del extracto concentrado y 5 aplicaciones para las fracciones; posteriormente la placa se colocó en la cámara cromatográfica la cual contenía un volumen de 20 mL de fase móvil. Se dejaron pasar 15 min, tiempo necesario para la corrida del solvente desde el origen hasta la marca de frente de solvente, una vez corrida la placa, esta se retiró de la cámara y se secó con

ayuda de la campana de extracción. Finalmente, para el revelado de las fracciones se usó una lámpara de luz UV con una longitud de onda de 302 nm.

Cuantificación de pinocembrina por densitometría.

La cuantificación de pinocembrina se realizó con el software ImagenJ (Image Processing & Analysis in Java), midiendo la densidad generada por las muestras sembradas en las placas TLC.

La curva de calibración se realizó con una placa TLC Silica gel 60 F254, 10 cm x 20 cm, utilizando como patrón de referencia pinocembrina en 15 concentraciones de 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000 y 7500 mg/L. En la misma placa se sembraron las muestras a analizar. Posteriormente se colocó la placa en la cámara cromatográfica la cual contenía un volumen de 20 mL de fase móvil (tolueno, éter etílico y ácido acético 10:9:1, v/v/v). Una vez corrida la placa, esta se retiró de la cámara y se secó con ayuda de la campana de extracción. El revelado de la placa se realizó con una lámpara de luz UV a una longitud de onda de 302 nm, finalmente las placas se fotografiaron para ser procesadas mediante el uso del software.

Resultados y Discusión

Contenido de fenoles totales, actividad antioxidante (DPPH) y pinocembrina de los extractos.

Los extractos de orégano mexicano (*L. graveolens* HBK) obtenidos fueron analizados y comparados mediante el contenido de fenoles, actividad antioxidante (DPPH) y contenido de pinocembrina (Tabla 1). El análisis de Folin-Ciocalteu mostró que el contenido de compuestos polifenólicos para el extracto del orégano fue de 4.25 mg GA/mL, valor similar al reportado por Cortés *et al.* (2021) quien empleó la misma variedad de orégano y obtuvo un valor de 4.41 mg GA/mL; para el extracto de orégano sin aceite esencial se obtuvo un valor de 3.31 mg GA/mL, valor mayor al reportado por Cid *et al.* (2019) quien realizó un extracto etanólico de los residuos sólidos del orégano mexicano (*Poliomintha longiflora*) con un contenido de fenoles totales de 1.32 mg GA/mL.

La capacidad antioxidante (DPPH) del extracto de orégano presentó un valor de 8.56 mg EqTx/mL, mayor al reportado por Cortés *et al.* (2021) (7.54 EqTx/mL), dicha variación puede deberse al impacto sobre control en las condiciones de cultivo y de secado de la materia prima (Mulinacci, 2011), mientras que el extracto de orégano sin aceite esencial mostró un valor de 6.97 mg EqTx/mL, el cual es ligeramente menor al obtenido con el extracto de orégano al que no se le ha extraído el aceite esencial.

Aunque el orégano sin aceite esencial es considerado como residuo, el extracto de este subproducto presentó un valor similar al obtenido para el extracto obtenido a partir del orégano sin tratamiento. Esta variación se atribuye evidentemente a la diferencia en la composición química del orégano tras el proceso de extracción de su aceite esencial, ya que es bien sabido que el aceite esencial de orégano es rico en compuestos antioxidantes insolubles en medios polares (Loeza *et al.*, 2020). Sin embargo, respecto al contenido de pinocembrina, compuesto de interés para la presente investigación, el extracto de orégano sin aceite esencial fue el que presentó una concentración mayor de este compuesto con un valor de 0.766 mg/mL Ex, mientras que el extracto de orégano sin tratar presentó un valor de 0.659 mg/mL Ex, concentración ligeramente mayor a la obtenida por Flores *et al.* (2016), quien reportó un valor de 0.574 mg/mL Ex., quien utilizó para dicha cuantificación la metodología de cromatografía de líquidos LC-ESI-QTOF-MS, pudiendo deberse la diferencia obtenida a las características propias en el manejo de la materia prima. Cabe mencionar que con respecto a la cuantificación de pinocembrina presente en el orégano sin aceite esencial (bagazo residual), no existen a la fecha trabajos científicos al respecto.

Tabla 1. Determinación de fenoles totales y actividad antioxidante (DPPH) de diferentes extractos de orégano mexicano.

Muestra	Fenoles totales (mg GA/mL Ex)	DPPH (mg EqTx/mL Ex)	Pinocembrina (mg/mL Ex)
Extracto de orégano	4.25 ± 0.015 ^a	8.56 ± 0.033 ^a	0.659 ± 0.026 ^b
Extracto de orégano sin aceite esencial	3.31 ± 0.005 ^b	6.97 ± 0.033 ^b	0.766 ± 0.029 ^a

GA, ácido gálico; EqTx, equivalente trolox. Las diferentes letras en superíndice indicaron diferencias significativas entre muestras según la prueba de Tukey (p < 0.05).

Fraccionamiento de los extractos de orégano con Isolera Biotage.

Los extractos de orégano mexicano (*L. graveolens* HBK) se concentraron 10 volúmenes con ayuda de un roto-evaporador al vacío (40-45 °C y 500 mm Hg de vacío) y posteriormente se procedió a realizar el fraccionamiento de los extractos concentrados utilizando el purificador automatizado Isolera, Biotage, en el cual se inyectaron 0.5 ml de extracto en el cartucho. En la Figura 1 se muestra el cromatograma obtenido en el proceso de separación para el extracto de orégano, en el cual se utilizaron detecciones UV de 280 nm (rojo) y 365 nm (negro). Se observaron distintas absorbancias entre la fracción 11 hasta la fracción 28, donde los picos más concentrados se presentaron en la longitud de onda de 280 nm, fracción 14. De acuerdo con Bedascasburre *et al.* (2006) los espectros de absorción UV de los flavonoides presentan 2 bandas características asociadas al anillo B (banda I) con un máximo de absorción en la región de 365 nm, y al anillo A (banda II) con una absorción mayor en la región de 280 nm. De tal modo que la presencia de dichas bandas y las detecciones UV programadas en el equipo permitieron observar distintos picos representando las fracciones de la muestra.

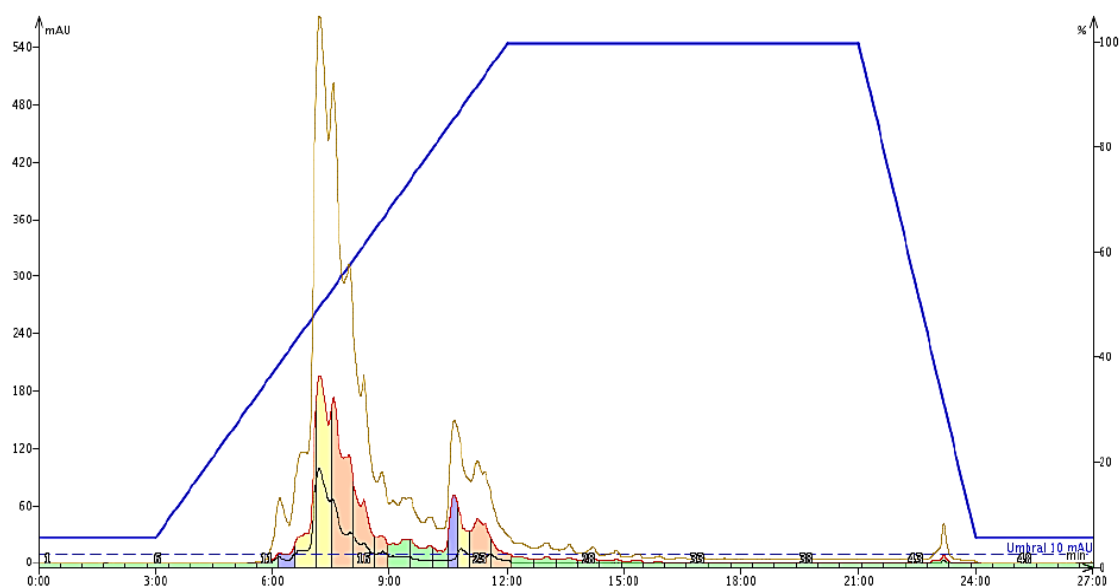


Figura 1. Cromatograma obtenido en el fraccionamiento del extracto concentrado de orégano mexicano.

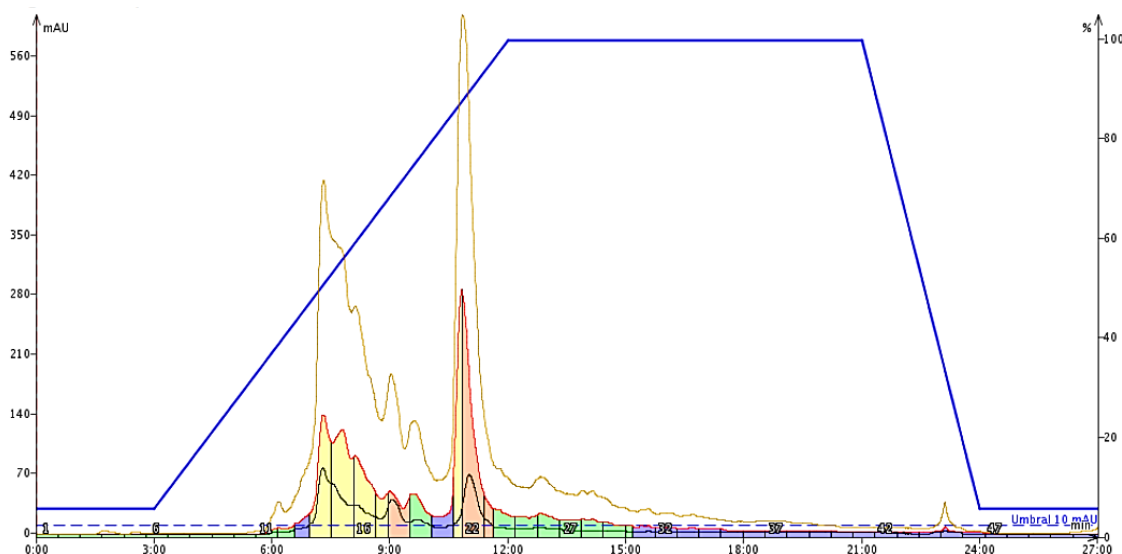


Figura 2. Cromatograma obtenido en el fraccionamiento del extracto de orégano mexicano concentrado sin aceite esencial.

En la Figura 2 se muestra el cromatograma obtenido en fraccionamiento del extracto de orégano sin aceite esencial, en el cual se obtuvieron 15 fracciones con una concentración mayor en los picos generados, comparado con el

fraccionamiento del extracto de orégano original, destacando la fracción 22 la cual mostró una alta detección en la absorbancia de 280 nm, este comportamiento puede deberse a la concentración de algunos compuestos durante el proceso de extracción del aceite esencial del orégano.

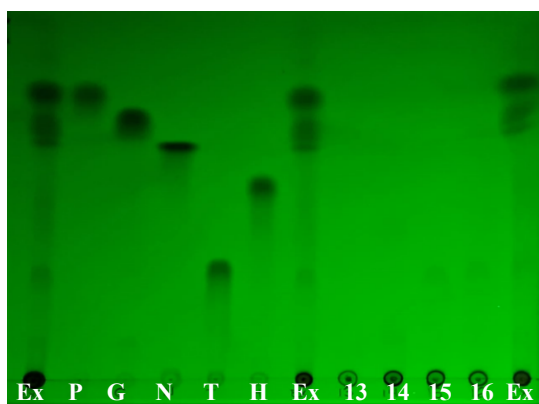
Identificación de los flavonoides presentes en las fracciones.

Al obtener las distintas fracciones de los extractos, se procedió realizar una identificación de los flavonoides presentes por cromatografía en capa fina (TLC), utilizando como estándares pinocembrina, naringenina, hispidulina, eridictol, galangina y taxifolina, que de acuerdo con Flores *et al.* (2016) y Cortés *et al.* (2021) son los compuestos mayoritarios presentes en el extracto de orégano mexicano. La identificación se pudo establecer haciendo una comparativa de los valores RF de los estándares y los obtenidos en las fracciones.

Identificación de los flavonoides presentes en el extracto de orégano sin tratamiento.

En la Figura 3 se muestra el cromatograma obtenido de los flavonoides estándares, el extracto y las fracciones 13, 14, 15 y 16, donde las fracciones 15 y 16 presentaron trazas de taxifolina. Dichos resultados se verifican en la Tabla 2 donde se muestran el valor de Rf para taxifolina de 0.30.

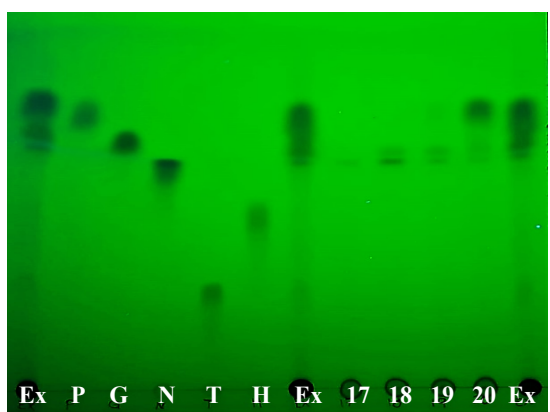
Tabla 2. Valores de Rf obtenidos en el análisis de TLC de los estándares y las fracciones, 13, 14, 15 y 16.



Muestra	RF				
Extracto	0.30	0.50	0.61	0.68	0.77
Pinocembrina	-	-	-	-	0.77
Galangina	-	-	-	0.68	-
Naringenina	-	-	0.61	-	-
Taxifolina	0.30	-	-	-	-
Hispidulina	-	0.50	-	-	-
Fracción 13	-	-	-	-	-
Fracción 14	-	-	-	-	-
Fracción 15	0.30	-	-	-	-
Fracción 16	0.30	-	-	-	-

Figura 3. Cromatograma de identificación TLC (Silica gel 60 F₂₅₄, fase móvil: tolueno, éter etílico y ácido acético (10:9:1, v/v/v), UV $\lambda=302$ nm) de flavonoides estándares, extracto hidroetanólico de orégano mexicano y fracciones obtenidas en la separación. Ex-Extracto de orégano mexicano. P-pinocembrina. G-galangina. N-naringenina. T-taxifolina. H-hispidulina. 13-fracción 13. 14-fracción 14. 15-fracción 15. 16-fracción 16.

Tabla 3. Valores de Rf obtenidos en el análisis de TLC de los estándares y las fracciones, 17, 18, 19 y 20.



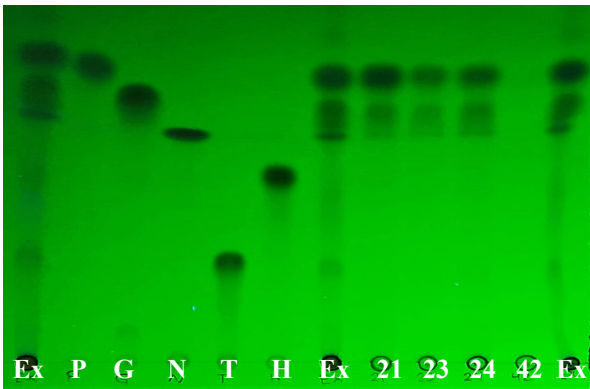
Muestra	RF				
Extracto	0.30	0.50	0.61	0.68	0.77
Pinocembrina	-	-	-	-	0.77
Galangina	-	-	-	0.68	-
Naringenina	-	-	0.61	-	-
Taxifolina	0.30	-	-	-	-
Hispidulina	-	0.50	-	-	-
Fracción 17	-	-	0.61	-	-
Fracción 18	-	-	0.61	0.67	-
Fracción 19	-	-	0.61	0.67	0.76
Fracción 20	-	-	0.61	0.68	0.76

Figura 4. Cromatograma de identificación TLC (Silica gel 60 F₂₅₄, fase móvil: tolueno, éter etílico y ácido acético (10:9:1, v/v/v), UV $\lambda=302$ nm) de flavonoides estándares, extracto hidroetanólico de orégano mexicano y fracciones obtenidas en la separación. Ex-Extracto de orégano mexicano. P-pinocembrina. G-galangina. N-naringenina. T-taxifolina. H-hispidulina. 17-fracción 17. 18-fracción 18. 19-fracción 19. 20-fracción 20.

En la Figura 4 se muestra la identificación de los flavonoides presentes en las fracciones 17, 18, 19 y 20, donde la fracción 17 presentó naringenina con un Rf de 0.61 y la fracción 18 presentó naringenina y galangina con valores de 0.61 y 0.67 respectivamente, mientras que las fracciones 19 y 20 presentaron naringenina, galangina y pinocembrina con un Rf de 0.61, 0.67 y 0.76 respectivamente.

La Figura 5 muestra el cromatograma correspondiente a las fracciones 21, 23, 24 y 42, en el cual se observa que las fracciones 21, 23 y 24 tienen la presencia de naringenina, galangina y pinocembrina con un Rf de 0.61, 0.68 y 0.77 respectivamente, resaltando el compuesto de interés (pinocembrina) que se observa en mayor concentración que el resto de los compuestos.

Tabla 4. Valores de Rf obtenidos en el análisis de TLC de los estándares y las fracciones, 21, 23, 24 y 42.



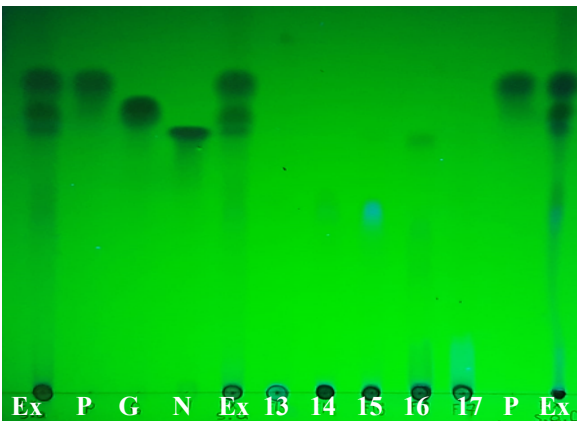
Muestra	RF				
Extracto	0.30	0.50	0.61	0.68	0.77
Pinocembrina	-	-	-	-	0.77
Galangina	-	-	-	0.68	-
Naringenina	-	-	0.61	-	-
Taxifolina	0.30	-	-	-	-
Hispidulina	-	0.50	-	-	-
Fracción 21	-	-	0.61	0.68	0.77
Fracción 23	-	-	0.61	0.68	0.77
Fracción 24	-	-	0.61	0.68	0.77
Fracción 42	-	-	-	-	-

Figura 5. Cromatograma de identificación TLC (Silica gel 60 F₂₅₄, fase móvil: tolueno, éter etílico y ácido acético (10:9:1, v/v/v), UV $\lambda=302$ nm) de flavonoides estándares, extracto hidroetanólico de orégano mexicano y fracciones obtenidas en la separación. Ex-Extracto de orégano mexicano. P-pinocembrina. G-galangina. N-naringenina. T-taxifolina. H-hispidulina. 21-fracción 21. 23-fracción 23. 24-fracción 24. 42-fracción 42.

Identificación de los flavonoides presentes en el extracto de orégano sin aceite esencial.

En las siguientes Figuras y Tablas se muestran los resultados obtenidos en la identificación de los flavonoides presentes en las fracciones del extracto de orégano sin aceite esencial. La fracción 14 y 15 mostraron trazas de eriodictiol con un Rf de 0.47, mientras que la fracción 17 presentó naringenina con Rf de 0.64 (Tabla 5, Figura 6).

Tabla 5. Valores de Rf obtenidos en el análisis de TLC de los estándares y las fracciones, 14, 15, 16 y 17.



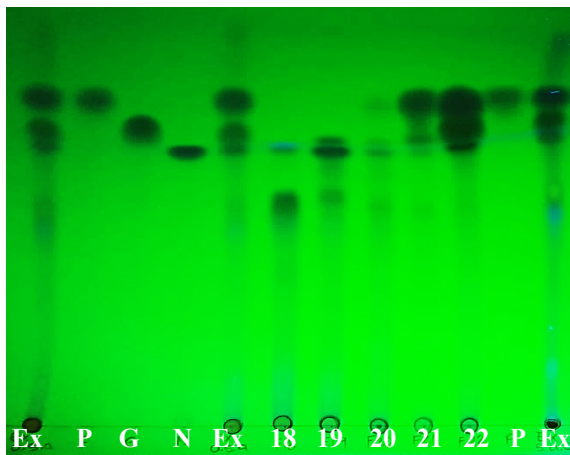
Muestra	RF				
Extracto	0.47	0.50	0.64	0.71	0.77
Pinocembrina	-	-	-	-	0.77
Galangina	-	-	-	0.71	-
Naringenina	-	-	0.64	-	-
Hispidulina	-	0.50	-	-	-
Eriodictiol	0.47	-	-	-	-
Fracción 14	0.47	-	-	-	-
Fracción 15	0.47	-	-	-	-
Fracción 16	-	-	0.64	-	-
Fracción 17	-	-	-	-	-

Figura 6. Cromatograma de identificación TLC (Silica gel 60 F₂₅₄, fase móvil: tolueno, éter etílico y ácido acético (10:9:1, v/v/v), UV $\lambda=302$ nm) de flavonoides estándares, extracto hidroetanólico de orégano mexicano y fracciones obtenidas en la separación. Ex-Extracto de orégano mexicano sin aceite esencial. P-pinocembrina. G-galangina. N-naringenina. E-Eriodictiol. H-hispidulina. 14-fracción 14. 15-fracción 15. 16-fracción 16. 17-fracción 17.

En la Figura 7 se muestra el cromatograma obtenido de los flavonoides estándares, el extracto y las fracciones 18, 19, 20, 21 y 22, donde la fracción 18 presentó hispidulina y naringenina, la fracción 19 hispidulina, naringenina y galangina,

mientras en las fracciones 20, 21 y 22 se observó la presencia de hispidulina, naringenina, galangina y pinocembrina, destacando la fracción 22 en la cual se presentó de manera más concentrada la pinocembrina. Dichos resultados se verifican en la Tabla 9 donde se muestran los valores de Rf para cada compuesto.

Tabla 6. Valores de Rf obtenidos en el análisis de TLC de los estándares y las fracciones 18, 19, 20, 21 y 22.

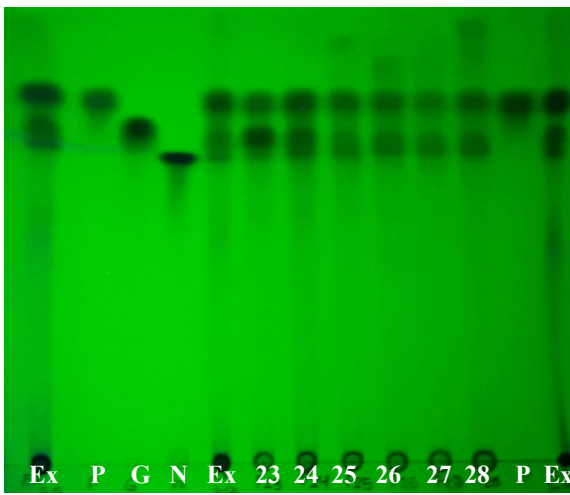


Muestra	RF				
Extracto	0.47	0.50	0.64	0.71	0.77
Pinocembrina	-	-	-	-	0.77
Galangina	-	-	-	0.71	-
Naringenina	-	-	0.64	-	-
Hispidulina	-	0.50	-	-	-
Eriodictiol	0.47	-	-	-	-
Fracción 18	-	0.50	0.64	-	-
Fracción 19	-	0.50	0.64	0.71	-
Fracción 20	-	0.50	0.64	-	0.77
Fracción 21	-	0.50	0.64	-	0.77
Fracción 22	-	-	0.64	0.71	0.77

Figura 7. Cromatograma de identificación TLC (Silica gel 60 F₂₅₄, fase móvil: tolueno, éter etílico y ácido acético (10:9:1, v/v/v), UV $\lambda=302$ nm) de flavonoides estándares, extracto hidroetanólico de orégano mexicano y fracciones obtenidas en la separación. Ex-Extracto de orégano mexicano sin aceite esencial. P-pinocembrina. G-galangina. N-naringenina. E-Eriodictiol. H-Hispidulina. 18-fracción 18. 19-fracción 19. 20-fracción 20. 21-fracción 21.

Finalmente, en la Figura 8 se muestra el cromatograma obtenido de los flavonoides estándares, el extracto y las fracciones 23, 24, 25, 26, 27 y 28, en las cuales se observó la presencia de naringenina, galangina y pinocembrina, éstas en menor saturación comparadas con las fracciones anteriores (21 y 22). Los valores de Rf para cada compuesto se muestran en la Tabla 10.

Tabla 7. Valores de Rf obtenidos en el análisis de TLC de los estándares y las fracciones 23, 24, 25, 26, 27 y 28.



Muestra	RF				
Extracto	0.47	0.50	0.64	0.71	0.77
Pinocembrina	-	-	-	-	0.77
Galangina	-	-	-	0.71	-
Naringenina	-	-	0.64	-	-
Hispidulina	-	0.50	-	-	-
Eriodictiol	0.47	-	-	-	-
Fracción 23	-	-	0.64	0.71	0.77
Fracción 24	-	-	0.64	0.71	0.77
Fracción 25	-	-	0.64	0.71	0.77
Fracción 26	-	-	0.64	0.71	0.77
Fracción 27	-	-	0.64	0.71	0.77
Fracción 28	-	-	0.64	-	0.77

Figura 8. Cromatograma de identificación TLC (Silica gel 60 F₂₅₄, fase móvil: tolueno, éter etílico y ácido acético (10:9:1, v/v/v), UV $\lambda=302$ nm) de flavonoides estándares, extracto hidroetanólico de orégano mexicano y fracciones obtenidas en la separación. Ex-Extracto de orégano mexicano sin aceite esencial. P-pinocembrina. G-galangina. N-naringenina. E-Eriodictiol. H-Hispidulina. 23-fracción 23. 24-fracción 24. 25-fracción 25. 26-fracción 26. 27-fracción 27. 28-fracción 28.

Una vez analizados los resultados de identificación cromatográfica (TLC), éstos permitieron verificar el fraccionamiento y la presencia de los principales flavonoides que se encuentran en los distintos extractos evaluados de orégano mexicano, con y sin aceite esencial, destacando la presencia de pinocembrina, uno de los flavonoides mayoritarios en el orégano mexicano seguido de galangina y naringenina, de acuerdo a Cortés *et al.* (2021). Estos 3 flavonoides se

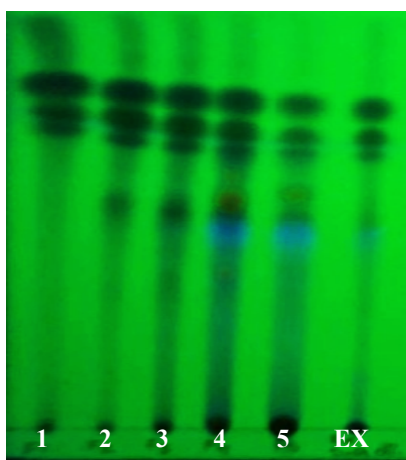
encontraron juntos en algunas fracciones de los dos extractos, con base en lo señalado por Flores *et al.* (2016) esto puede deberse a la gran similitud estructural y abundancia de estos flavonoides específicamente.

Como se observa, aun cuando en el extracto de orégano sin tratamiento y en el extracto del bagazo residual, existe la presencia y separación de pinocembrina, en el extracto del bagazo residual se encuentra mayoritariamente (0.766 mg/ml), destacando la fracción 22, una fracción con importante saturación de este flavonoide por su mayor pureza (Figura 7), a diferencia de los resultados obtenidos con extracto de orégano sin tratamiento, el cual presentó fracciones con concentraciones menores de los flavonoides identificados (Figura 5).

De esta manera, como el objetivo del presente trabajo es el aprovechamiento del bagazo residual y sus potenciales compuestos bioactivos, el segundo método de separación se aplicó únicamente con el extracto de orégano proveniente del bagazo residual (sin aceite esencial), ya que dicho extracto presentó adecuadas características.

Fraccionamiento del extracto de orégano sin aceite esencial por cromatografía en columna y silica gel.

Tabla 8. Valores de Rf obtenidos en el análisis de TLC de las fracciones 1, 2, 3, 4 y 5.



Muestra	RF				
Extracto	0.47	0.5	0.64	0.71	0.77
Pinocembrina	-	-	-	-	0.77
Galangina	-	-	-	0.71	-
Naringenina	-	-	0.64	-	-
Hispidulina	-	0.5	-	-	-
Eriodictiol	0.47	-	-	-	-
Fracción 1	-	-	0.64	0.71	0.77
Fracción 2	-	0.5	0.64	0.71	0.77
Fracción 3	-	0.5	0.64	0.71	0.77
Fracción 4	-	0.5	0.64	0.71	0.77
Fracción 5	-	0.5	0.64	0.71	0.77

Figura 9. Cromatograma de identificación TLC (Silica gel 60 F₂₅₄, fase móvil: tolueno, éter etílico y ácido acético (10:9:1, v/v/v), UV $\lambda=302$ nm) de extracto hidroetanólico de orégano mexicano sin aceite esencial y fracciones obtenidas en la separación. Ex- Extracto de orégano mexicano sin aceite esencial. 1-fracción 1. 2-fracción 2. 3-fracción 3. 4-fracción 4. 5-fracción 5.



Figura 10. Columna cromatografía de silica gel y colector de fracciones automático.

El fraccionamiento del extracto de orégano sin aceite esencial obtuvo un buen fraccionamiento empleado el equipo Isolera Biotage, sin embargo, se comparó con otro método de separación con el objetivo de poder fraccionar cantidades

mayores de extracto y utilizar cantidades menores de solventes, por lo que se empleó cromatografía en columna y silica gel (Figura 10). La columna se alimentó con 2 g de extracto, en el cual se obtuvieron alrededor de 60 fracciones que fueron analizadas por TLC y se juntaron, de acuerdo con su similitud, en 5 fracciones combinadas. En la fracción 1 se observó la presencia de naringenina, galangina y pinocembrina, encontrándose con mayor saturación este último, mientras que en el resto de las fracciones, adicionalmente estos compuestos, se encontró hispidulina y otro compuesto no identificado (Figura 9).

Cuantificación de pinocembrina de las fracciones del extracto de orégano sin aceite esencial

Una vez identificados los flavonoides presentes en las fracciones obtenidas mediante los dos diferentes métodos de separación, se procedió a evaluar la concentración de pinocembrina presente en cada una de las fracciones correspondientes a cada método. La cuantificación de pinocembrina se llevó a cabo por medio del software ImagenJ (Image Processing & Analysis in Java), midiendo la densidad óptica generada en las placas TLC. Se realizó una curva de calibración empleando como estándar pinocembrina a distintas concentraciones (Figura 11).

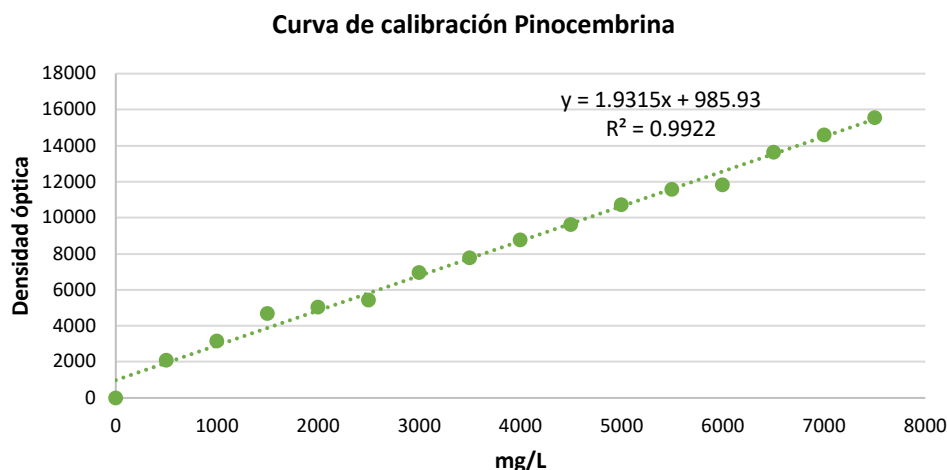


Figura 11. Curva de calibración de la densidad óptica generada por pinocembrina.

En la Tabla 9 se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación de pinocembrina presente en las fracciones resultantes del fraccionamiento con el equipo Isolera, Biotage, además de los rendimientos de recuperación correspondientes los cuales dieron un total de 90.1 % de recuperación de pinocembrina. La fracción 22 destacó por presentar una concentración mayor de pinocembrina la cual fue de 11.22 mg/mL representando por sí sola, una eficiencia de recuperación del 64 %, mientras que el resto de las fracciones presentaron concentraciones en un rango de 2.87-0.33 mg/mL y una recuperación de 1.89-5.15 %. Con esta cuantificación se demuestra la importante saturación que presentó la fracción 22 en la placa TLC en la cual se concentró la mayoría de la cantidad de pinocembrina presente en el extracto alimentado (Figura 7).

Tabla 9. Fracciones del extracto de orégano mexicano sin aceite esencial obtenidas mediante el equipo Isolera, Biotage.

Muestras	Pinocembrina (mg/mL)	Rendimiento (%)
21	0.87 ± 0.015 ^b	4.98 %
22	11.22 ± 0.001 ^a	64.27 %
23	0.76 ± 0.000 ^d	4.35 %
24	0.90 ± 0.001 ^c	5.15 %
25	0.63 ± 0.002 ^e	3.60 %
26	0.57 ± 0.001 ^f	3.26 %
27	0.33 ± 0.001 ^h	1.89 %
28	0.46 ± 0.000 ^g	2.63 %
Total		90.1 %

En la Tabla 10 se observan los resultados para las fracciones obtenidas con cromatografía en columna y silica gel, en las cuales se obtuvo una eficiencia total de recuperación de pinocembrina del 56.6 %, en donde las fracciones 3, 2 y 1

presentaron las concentraciones mayores con valores de 35.15, 27.73 y 8.56 mg/mL respectivamente, con un porcentaje de recuperación del 25.24, 18.51 y 6.14 % respectivamente, mientras que las fracciones 4 y 5 presentaron concentraciones de pinocembrina menores y por tanto una eficiencia de recuperación menor.

Tabla 10. Fracciones del extracto de orégano mexicano sin aceite esencial obtenidas con cromatografía en columna y silica gel.

Muestras	Pinocembrina (mg/mL)	Rendimiento (%)
1	8.56 ± 0.000 ^a	6.14 %
2	25.73 ± 0.000 ^b	18.51 %
3	35.15 ± 0.000 ^c	25.24 %
4	7.37 ± 0.029 ^d	5.29 %
5	1.99 ± 0.012 ^e	1.42 %
Total		56.6 %

Al comparar los métodos de separación empleando el extracto de orégano sin aceite esencial, se puede observar que ambos métodos realizan una buena concentración de pinocembrina, sin embargo, en el fraccionamiento con el equipo Isolera, Biotage existió mayor eficiencia de recuperación de pinocembrina (90.1 %) y mayor pureza en las fracciones obtenidas (fracción 22), método que presentaba una fase hidrofóbica. Sin embargo, la separación mediante columna cromatográfica de silica hidrofílica, aunque permite fraccionar mayor cantidad de extracto, las concentraciones de pinocembrina en las fracciones fueron menores y por tanto la eficiencia de recuperación de pinocembrina también fue menor (56.6 %). Estas variaciones pueden deberse a las interacciones y condiciones de trabajo en cada método, ya que el purificador automatizado Isolera, Biotage cuenta con un cartucho flash de fase inversa de alto rendimiento (30 g) con un caudal de 25 mL/min, mientras que la columna cromatográfica con silica gel (178 g) corresponde a una fase normal con caudal de 1 mL/min. Dichos factores pueden intervenir directamente en la eficiencia de recuperación y separación de los compuestos flavonoides, ya que de éstos depende la asimetría de las bandas eluidas y la aptitud de separación del sistema en general (Hernández *et al.*, 2014). Aun así, los resultados obtenidos empleando el método de separación con el purificador automatizado Isolera Biotage, presentaron una concentración de pinocembrina adecuada, principalmente la fracción 22 con un valor de 16.02 mg/g de extracto (equivalente a 748 mg/g BS), siendo este cercano a lo obtenido por Granados *et al.* (2018) quienes obtuvieron concentraciones totales de pinocembrina de 19, 33 y 55 mg/g Ex en propóleos mexicanos, principal fuente de pinocembrina (Salatino *et al.*, 2011; Przybyłek y Karpiński, 2019). Sin embargo, considerando los resultados obtenidos por Osti *et al.* (2010), los resultados obtenidos en los dos métodos de separación aquí desarrollados para orégano mexicano fueron superiores, ya que ellos obtuvieron concentraciones de 0.066 mg/mg Ex de pinocembrina en *Sphaeralcea angustifolia*, planta mexicana común en la medicina tradicional, rica en compuestos bioactivos. Cabe mencionar que estas diferencias pueden deberse a la eficiencia y condiciones de operación de los métodos empleados y la naturaleza de la materia de extracción.

Es así que, una eficiencia de recuperación mayor en el proceso puede garantizar un mejor aprovechamiento de los residuos sólidos a tratar del orégano mexicano, así como de los compuestos bioactivos presentes (pinocembrina), favoreciendo así el proporcionar un mayor valor agregado a esa importante materia prima, perfilándose el extracto y las fracciones obtenidas como potenciales productos de interés comercial para la industria alimenticia y farmacéutica.

Conclusiones

A partir de la realización de dos diferentes extractos de orégano mexicano (*L. graveolens* HBK), con y sin aceite esencial, se pudo realizar una comparación del contenido fenólico, actividad antioxidante (DPPH) y contenido de pinocembrina, observando valores mayores de fenoles totales y capacidad antioxidante en el extracto de orégano original, sin embargo, en el contenido de pinocembrina, compuesto de interés en el presente trabajo, el valor mayor lo presentó el extracto de orégano sin aceite esencial, el cual le otorga un importante potencial de uso ya que esta materia de extracción es considerada un residuo sólido generado tras el proceso de extracción del aceite esencial.

El método de separación automatizada con el equipo Isolera, Biotage, mismo que utiliza fase estacionaria no polar, constituyó el mejor método separativo probado, dado que permitió obtener una eficiencia de recuperación de pinocembrina considerable (90.1 %) así como obtener una fracción con una saturación importante de este compuesto

(74.8 %) pudiendo éste constituir un producto de interés para futuras investigaciones dirigidas hacia el desarrollo de nuevos productos en la industria alimenticia y farmacéutica.

Dados los resultados obtenidos, como parte de los trabajos futuros se trabajará con las fracciones de pinocembrina realizando inclusiones moleculares y modificaciones enzimáticas para poder mejorar la solubilidad y estabilidad de este flavonoide, de esta manera se podrá generar un mejor aprovechamiento biológico e industrial de este importante compuesto flavonoide. Asimismo, el presente trabajo contribuye al potencial desarrollo de nuevos procesos de valorización de residuos en la creciente industria de extracción de aceites esenciales naturales.

Bibliografía

- Cortés, C. M. del C., Flores, M. H., Orozco, A. I., León, C. C., Suárez, J. Á., Estarrón, E. M., y López, M. I. (2021). Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos de extractos hidroetanólicos de orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK) y evaluación de su capacidad antioxidante. *Moléculas*, 26 (3), 702.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). (2005). El Orégano Mexicano: Oro Vegetal. Comisión Nacional de Biodiversidad.
- Corral T. L. (2011) Aprovechamiento de los residuos que se generan en la extracción del aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens* HBK.s.l.). Instituto Politécnico Nacional. Durango, México.
- Chung, A. S. & Ferrara, N. (2011). Developmental and pathological angiogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 27:563-84.
- Flores, M. H.; León, C. C.; Estarrón, E. M.; Orozco, A. I. (2016). Optimización del proceso de extracción de sustancias antioxidantes a partir del orégano mexicano (*Lippia graveolens* H.B.K.) utilizando la metodología de superficie de respuesta (MSR). *Rev. Mex. Ing. Química*. 15, 773–785.
- García, P. E., Castro, A. F. Gutiérrez, U. J., & García, L. S. (2012). Revisión de la producción, composición fitoquímica y propiedades nutraceuticas del orégano mexicano. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*. 3(2), 339-353.
- Granados, P. J., Uribe, U. N., García, L. P., Ramos, G. M., Rivero, V. R., y Pérez, R. M. (2018). Effect of Pinocembrin Isolated from Mexican Brown Propolis on Diabetic Nephropathy. *Molecules*. 23-852.
- Hernández, F. A., Hernández, H. J., Medrano, L. J., Valenzuela, N. L., Martín, M. S., y Madinaveitia, R. L. (2008). Producción y extracción de aceite de orégano (*Lippia graveolens* Kunth) bajo cultivo en la Comarca Lagunera. *Revista mexicana de ciencias forestales*. 2(3) 2007-1132.
- Koksal, O., Gunes, E.; Orkan, O. and Ozden, M. (2010). Analysis of effective factor on information sources at Turkish oregano farms. *African J. Agric. Res*. 5:142-149.
- Liu, R., Li, J. Z., Song, J. K., Zhou, D., Huang, C., Bai, X. Y., Xie, T., Zhang, X., Li, Y. J., Wu, C. X. and Zhang, L. (2014). Pinocembrin improves cognition and protects the neurovascular unit in Alzheimer related deficits. *Neurobiology of Aging* 35(6): 1275 – 1285.
- Mastelić J., Jerković I., Blazević I., Poljak-Blaži M., Borović S., Ivančić-Baće I., Smrečki V., Žarković N., Brcic-Kostić K., Vikić-Topić D. (2008). Comparative study on the Antioxidant and Biological Activities of Carvacrol, Thymol and Eugenol Derivatives. *J. Agric. Food Chem.* 56:3989–3996.
- Nava P. D., Juárez, G. I., Landeta, E. O., Del Moral, S. & Rosas, M. E. (2019). Potencial bioenergético a partir de residuos agroindustriales del estado de Veracruz. *Renewable Energy, Biomass & Sustainability*. 2683-2658
- Nyotia, N., Khong, H. Y., Ahmad, S. H, Isabel, F. L., Aimi, S. S. (2016). Isolation and synthesis of pinocembrin and pinostrobin from *Artocarpus odoratissimus*. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*. 1156 – 1161.
- Osti, C.M., Torres, V. J., Villagómez, J.R., Castelan, P. I. (2010). Estudio químico de cinco plantas mexicanas de uso común en la medicina tradicional. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9 (5): 359 - 367
- Przybytek, I., Karpiński, T. (2019). Antibacterial Properties of Propolis. *Molecules*. 24(11):2047.
- Rolando A. (2007). Aceite esencial de orégano: tratamiento por digestión anaeróbica de los residuos generados en su obtención. Buenos Aires, Argentina. Universidad Nacional de Luján.
- Villavicencio, E.; Martínez, O.; Cano, A. y Berlanga, C. (2007). Orégano, recurso con alto potencial. *Ciencia y Desarrollo*. 33:60-66.
- Zheng, Y., Wang, K.; Wu, Y., Chen, Y., Chen, X., Hu, C.W., Hu, F. (2018). Pinocembrin induces ER stress mediated apoptosis and suppresses autophagy in melanoma cells. *Cancer Lett*. 431, 31–42.