

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA



“Caracterización fisicoquímica y funcional de la planta de orégano (*Lippia graveolens*) de diferentes localidades”

Por:
MARIANA SOFÍA LAVREDA LOZANO

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Saltillo, Coahuila, México

Diciembre 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA



“Caracterización fisicoquímica y funcional de la planta de orégano (*Lippia graveolens*) de diferentes localidades”

Por:

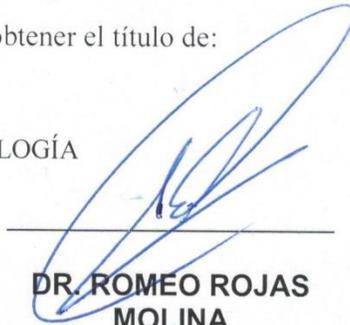
MARIANA SOFÍA LAVREDA LOZANO

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA


**DR. JULIO CÉSAR
TAFOLLA ARELLANO**
Asesor Principal UAAAN


**DR. ROMEO ROJAS
MOLINA**
Asesor Principal Externo

Saltillo, Coahuila, México

Diciembre 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA

“Caracterización fisicoquímica y funcional de la planta de orégano (*Lippia graveolens*) de
diferentes localidades”

Por:

MARIANA SOFÍA LAVREDA LOZANO

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

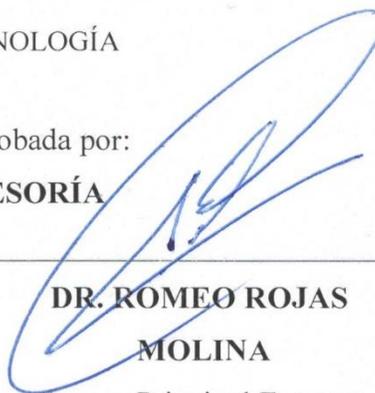
La cual fue revisada y aprobada por:

EL COMITÉ DE ASESORÍA



**DR. JULIO CÉSAR
TAFOLLA ARELLANO**

Asesor Principal



**DR. ROMEO ROJAS
MOLINA**

Asesor Principal Externo



**Q.F.B. MARÍA DEL CARMEN
JULIA GARCÍA**

Asesor



**DR. GUILLERMO CRISTIAN
GUADALUPE MARTÍNEZ ÁVILA**

Asesor



M.C. SERGIO SÁNCHEZ MARTÍNEZ

Coordinador de la División de Ingeniería

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, diciembre 2021

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por otorgarme la vida, salud y por darme una familia; gracias a ellos por apoyarme, orientarme y por siempre confiar en mí, sin ellos no habría llegado a donde estoy, su apoyo incondicional me sirvió de sostén en cada paso de esta etapa.

Al **Dr. JULIO CÉSAR TAFOLLA ARELLANO** por confiar en mí desde el inicio, por verme como alguien capaz de lograr lo que se propone, por brindarme su apoyo en cada uno de los proyectos realizados y por estar ahí siempre con la mejor disposición para ayudarnos. Excelente asesor, maestro y mentor.

Al **Dr. Romeo ROJAS** porque gracias a su apoyo se nos dio la oportunidad de poder realizar este proyecto. Por transmitirme su gran conocimiento y siempre orientarme hacia la dirección correcta.

Al **Dr. GUILLERMO CRISTIAN GUADALUPE MARTÍNEZ ÁVILA** por su excelente asesoría y tutoría en todo momento. Por brindarnos las facilidades de instalación para poder realizar el proyecto.

A la maestra **MARÍA DEL CARMEN JULIA GARCÍA** por ser una excelente maestra, por tener siempre la disponibilidad, por su apoyo y entrega.

Al **FONDO SECTORIAL PARA LA INVESTIGACIÓN, EL DESARROLLO Y LA INNOVACIÓN TECNOLÓGICA FORESTAL CONACYT-CONAFOR** por la beca tesis asignada del proyecto B-S-65769 “Estandarización de proceso de extracción de aceites esenciales de especies aromáticas: diseño y construcción de equipo microindustrial”.

A mi **Alma Terra Mater**, la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** y al Departamento de Ciencias Básicas por brindarme la oportunidad de crecer, de aprender y de formarme como profesional.

A mis compañeros del **LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**, por la unión, el apoyo, por las enseñanzas, las nuevas amistades encontradas y el cariño originado. A todos los maestros por brindarme sus conocimientos que me hicieron llegar hasta donde estoy.

DEDICATORIA

A mis padres **CÉSAR MARTÍN LAVREDA GUTIERREZ** y **ANA MARÍA LOZANO SALAZAR** por estar siempre presentes durante mi formación académica, por apoyarme en cada una de las decisiones que he tomado, por los cimientos con los que me formaron. Por ser las maravillosas personas que han sido durante mi aprendizaje en la vida, innumerables agradecimientos.

A **EVER ASTORGA ARZOLA** por ser mi más grande apoyo durante esta etapa. Por estar siempre ahí para sostenerme y nunca soltarme.

ÍNDICE

ÍNDICE	
AGRADECIMIENTOS	III
DEDICATORIA	VI
ÍNDICE	VII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	X
RESUMEN	XI
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1 Hipótesis	13
1.2 Objetivo General	13
1.3 Objetivos específicos	14
2. REVISIÓN DE LITERATURA	15
2.1 Taxonomía	15
2.2 Descripción morfológica de la planta	15
2.2.1 Características de la semilla	16
2.2.2 Características de la raíz	17
2.2.3 Características del tallo	17
2.2.5 Características de las flores	18
2.2.6 Características del fruto	19
2.3 Composición química de <i>Lippia graveolens</i>	20
2.4 Hábitat y distribución	20
2.5 Usos de <i>Lippia graveolens</i>	21
2.6 Análisis Físico – Químico Proximal	22
2.6.1 Materia Seca Total	23
2.6.2 Humedad	23
2.6.3 Proteína Cruda	23
2.6.4 Cenizas	23
2.6.5 Extracto etéreo – Grasas	23
2.6.6 Fibra Cruda	24
2.6.7 Extracto Libre de Nitrógeno	24
2.7 Capacidad antioxidante	24
2.7.1 Métodos empleados para determinar la capacidad antioxidante	26
2.8 Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)	27
3. MATERIALES Y MÉTODOS	29

3.1	Material Vegetal.....	29
3.2	Reactivos químicos.....	29
3.3	Métodos para el análisis físico – químico proximal.....	29
3.3.2	Determinación de % Cenizas.....	30
3.3.3	Determinación de Proteína Cruda.....	30
3.3.4	Determinación de Extracto etéreo o grasa.....	30
3.3.5	Determinación de Fibra cruda.....	31
3.3.6	Determinación de Extracto libre de nitrógeno (ELN).....	31
3.4	Extracción de Polifenoles.....	32
3.4.1	Extracción y purificación de la muestra.....	32
3.5	Evaluación de la actividad antioxidante.....	32
3.5.1	Preparación de las muestras para analizar.....	32
3.5.2	Ensayo DPPH'.....	32
3.5.3	Ensayo FRAP.....	33
3.5.3	Ensayo ABTS ⁺	34
3.6	Análisis de Espectroscopia Infrarroja Transformada de Fourier (FTIR).....	35
3.7	Análisis estadístico.....	35
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
4.1	Análisis Químico Proximal.....	36
4.1.1	Determinación de Materia Seca Total.....	36
4.1.2	Determinación de Humedad (%).....	36
4.1.3	Determinación de Proteína Cruda (%).....	37
4.1.4	Determinación de Ceniza (%).....	38
4.1.5	Determinación de Extracto Etéreo – Grasas (%).....	38
4.1.6	Determinación de Fibra Cruda (%).....	38
4.1.7	Determinación de Extracto Libre de Nitrógeno (%).....	39
4.2	Rendimiento de proceso de extracción de Polifenoles.....	40
4.3	Análisis de la actividad antioxidante.....	41
4.3.1	Análisis de la capacidad de eliminación de radicales DPPH'.....	42
4.3.2	Análisis de la capacidad de la técnica de determinación del poder de reducción de hierro (FRAP).....	42
4.3.4	Análisis de la capacidad de la técnica de determinación de inhibición de radicales ABTS ⁺ 43	
4.4	Análisis por espectroscopia Infrarroja Transformada de Fourier (FTIR).....	44
5.	CONCLUSIONES.....	46
6.	REFERENCIAS.....	47
7.	ANEXOS.....	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Longitud de onda para distintos rangos en el infrarrojo (adaptado de Piqué, 2012).	28
Tabla 2. Ubicación geográfica de las colectas de las tres localidades evaluadas..	29
Tabla 3. Curva de Calibración de Ácido Gálico.	35
Tabla 4. Curva de Calibración de Ácido Gálico	36
Tabla 5. Curva de calibración de Trolox..	37
Tabla 6. Análisis químico – físico proximal de <i>Lippia graveolens</i> .	39
Tabla 7. Rendimiento del proceso de extracción de polifenoles.	42
Tabla 8. Análisis de Actividad antioxidante.	43
Tabla 9. Ensayos de eliminación de radicales de DPPH'	44
Tabla 10. Ensayos de inhibición de radicales ABTS ^{•+}	45
Tabla 11. Resultados de análisis FT-IR.	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta de orégano, <i>Lippia graveolens</i> .	15
Figura 2. Semilla de <i>Lippia graveolens</i> .	15
Figura 3. Hojas de <i>Lippia graveolens</i> .	17
Figura 4. Flor de <i>Lippia graveolens</i> .	18
Figura 5. Fruto de <i>Lippia graveolens</i> .	18
Figura 6. Mapa de distribución de <i>Lippia graveolens</i> , <i>Lippia alba</i> y <i>Lippia berlandieri</i> .	20
Figura 7. Aceite esencial de orégano.	21
Figura 8. Proceso de digestión y destilación para determinación de proteína cruda.	37
Figura 9. Proceso para la determinación de extracto etéreo.	38
Figura 10. Proceso para la determinación de fibra cruda.	39
Figura 11. Polifenoles purificados.	40
Figura 12. Calibración de espectrofotómetro.	41
Figura 13. Muestras para análisis ABTS ⁺ .	43
Figura 8. Espectro infrarrojo de polifenoles purificados de orégano (<i>Lippia graveolens</i>).	47

RESUMEN

El orégano (*Lippia graveolens*) es un arbusto aromático encontrado en diferentes estados de México, en el sur de EE.UU., además de en países de Centroamérica. México es uno de los principales países comercializadores en el mundo lo cual representa una gran importancia económica. Dentro de sus usos está el culinario, empleado como una especia; o para la extracción de aceites esenciales debido a sus propiedades antioxidantes, como anti fúngicas, antivirales, antimutagénicas, antiinflamatorias, espasmolíticos, antimicrobianas, debido a los compuestos antioxidantes presentes en su composición. Sin embargo, existen pocos estudios sobre esta planta en regiones del noreste de México, y se desconocen aspectos fisicoquímicos y funcionales. El objetivo de esta investigación fue caracterizar fisicoquímica y funcionalmente los compuestos polifenólicos obtenidos de la planta orégano (*Lippia graveolens*) de tres diferentes comunidades: Estanque de León, Cuatro Ciénegas, Tortuga, Ramos Arizpe, Coahuila; y San Jerónimo, Melchor Ocampo, Zacatecas. En la composición físico – química, los porcentajes más altos en los análisis de % materia seca total (88.39 ± 0.63), % proteína cruda (13.12 ± 0.28), % materia orgánica (88.66 ± 0.184), fueron obtenidos por la localidad Estanque de León; los resultados más altos en % ceniza (10.16 ± 0.31) y %ELN (64.44 ± 0.92) fueron obtenidos por la localidad Tortuga; por último la localidad San Jerónimo obtuvo los resultados más altos en los parámetros de % de Humedad (25.19 ± 0.63) Extracto etéreo – grasas (3.83 ± 0.42) y en fibra cruda (14.37 ± 0.67). La localidad de Tortuga (12.21 ± 0.247 mg/g) obtuvo el mayor rendimiento de compuestos fenólicos. Los resultados más altos obtenidos en las técnicas DPPH* (IC_{50} de 37.205 ± 0.850 $\mu\text{g/mL}^{-1}$) y ABTS*+ (IC_{50} de 14.598 ± 1.424 $\mu\text{g/mL}^{-1}$) se obtuvieron en la localidad de San Jerónimo. Los resultados más altos obtenidos en la técnica FRAP (44.6961 ± 1.1886 de porcentaje de inhibición) se obtuvieron en la localidad de Tortuga. Las variaciones entre la composición, y el rendimiento de capacidad antioxidante de las plantas de las diferentes localidades se pueden asociar a factores como su localización y ambiente. El análisis FTIR mostró once señales, entre las que destacan la de 1600 cm^{-1} asociada a grupos aromáticos de compuestos fenólicos y la de 1025 cm^{-1} , asociada al grupo funcional C-O-H en alcoholes.

Palabras clave: orégano, composición físico – química, compuestos fenólicos, actividad antioxidante

1. INTRODUCCIÓN

México es uno de los principales países productores de especies aromáticas y medicinales en el mundo. Esto se debe a que, en nuestro país, el uso de estas plantas con fines terapéuticos se remonta desde tiempos prehistóricos en donde la investigación y la observación de cómo era que ciertas especies calmaban dolores, aliviaban ciertas enfermedades o desprendían aromas agradables, las hacía aprovechables para la población (Juárez-Rosete, 2013).

Con el aumento de distintas enfermedades crónico degenerativas en la población, como lo es la *Diabetes mellitus*, arterosclerosis, porfirias, artritis, entre otras, se han realizado investigaciones en donde se les relaciona con una alimentación con una baja calidad nutricional, además de con el estrés oxidativo. En la actualidad se ha observado que algunas plantas contienen metabolitos secundarios utilizados para prevenir y tratar algunas de estas enfermedades (Dwyer, 2006).

La especie de *Lippia graveolens*, también conocida como orégano mexicano, es una especie estudiada tanto en el campo industrial y médico, se ha reportado que, debido a sus compuestos fenólicos, posee propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antimutagénicas, antialérgicas, antivirales, vasodilatadoras, antimicrobianas, antiinflamatorias, espasmolíticos, estrogénicas, entre otras (Bueno, 2014; Gonzáles, 2009),

El orégano mexicano es un arbusto perenne, delgado y aromático que alcanza hasta tres metros de altura; presenta tallos cuadrangulares, glandulares, densamente vilosos y delgados. *Lippia graveolens* se encuentra en los países de Estados Unidos de América, específicamente en el sur de Texas, México, Belice, Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicaragua y Costa Rica. Los principales estados de aprovechamiento de orégano en México son Chihuahua, Coahuila, Durango y Tamaulipas, seguidos de Jalisco, Zacatecas, Querétaro, Hidalgo y Baja California Sur, con una menor producción (CONAFOR, 2017).

Esta planta aromática originaria de México, presenta una alta importancia económica. Nuestro país es el segundo productor más importante en el mundo, además, el aceite esencial es rico en timol y carvacrol lo que le otorga un alto valor comercial (Soto, 2018).

Las capacidades antioxidantes que presenta la especie tienen gran importancia ya que el estrés oxidativo de las células, ejerce efectos celulares destructivos que están asociados con ciertas enfermedades (Shahidi, 2015). Dichas capacidades se deben a la presencia de compuestos como los ácidos rosmarínico y caféico, además, de timol y carvacrol (Bueno, 2014).

Los antioxidantes son compuestos químicos que eliminan radicales libres, dichos introducen oxígeno en las células y generan la oxidación de las mismas, alteran el ADN, además, de generar ciertos cambios que ocasionan el envejecimiento corporal (Ramírez, 2012). La capacidad antioxidante de un alimento o un producto alimenticio se establece por las relaciones entre diferentes compuestos que poseen diversos mecanismos de acción. (Mercado, 2013).

Se realizan diversos procedimientos complementarios, para evaluar el mecanismo de acción de los compuestos antioxidantes. Estos son FRAP, poder antioxidante reductor del hierro, por sus siglas en inglés; DPPH^{*}, depleción del óxido 2,2-difenil-1-picrilhidrazil; ABTS⁺⁺, depleción del 2, 2'-Azinobis-3-etil- benzotiazolina-6-ácido sulfónico (Mercado, 2013). A pesar que el orégano ha sido estudiado debido a sus propiedades funcionales, en el desierto Chihuahuense ha sido poco estudiado. Es por lo anterior que el presente trabajo fue desarrollado para caracterizar y explorar la planta de orégano como fuente potencial de compuestos antioxidantes.

1.1 Hipótesis

La planta de orégano (*Lippia graveolens*), es una fuente potencial de compuestos polifenólicos con actividad antioxidante.

1.2 Objetivo General

Caracterizar fisicoquímica y funcionalmente los compuestos polifenólicos obtenidos de la planta orégano (*Lippia graveolens*) de tres diferentes comunidades.

1.3 Objetivos específicos

1. Realizar la caracterización proximal de la planta de orégano (*Lippia graveolens*) de tres diferentes comunidades, Localidad San Jerónimo, Melchor Ocampo, Zacatecas; Localidad Estanque de León, Cuatro Ciénegas, Coahuila y Tortuga, Ramos Arizpe, Coahuila, México.
2. Extraer y purificar los compuestos polifenólicos de las diferentes muestras de orégano.
3. Determinar la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos por DPPH[•], ABTS^{•+}, y FRAP.
4. Identificar mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) los grupos funcionales en las muestras de orégano.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

En nuestro país, el término orégano, comprende, en términos morfológicos, una amplia variedad de grupos vegetales que abarcan 38 especies, y taxonómicamente lo representan cuatro familias, *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Lamiaceae* y *Verbenaceae* (García, 2012). La familia *Verbenaceae* es la de mayor importancia gracias a su distribución y características aromáticas (Conafor, 2009). Dentro de esta familia encontramos a *Lippia graveolens*, una planta aromática conocida como orégano mexicano, de gran importancia económica en el país debido al uso como condimento y en la medicina tradicional (Martínez-Natarén, 2013).

2.1 Taxonomía

La clasificación taxonómica del orégano mexicano es la siguiente (Semarnat, 2001):

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsidae

Orden: Lamiales

Familia: *Verbenaceae*

Género: *Lippia*

Especie: *Graveolens*

2.2 Descripción morfológica de la planta

El orégano es una clase de arbusto aromático, caducifolio y ramificado el cual cuenta con una altura de entre 2.5 - 3 metros de altura y un aproximado de 1.20 metros de diámetro de cobertura foliar. En especies silvestres, de bajo aprovechamiento, alcanzan una altura de aproximadamente 0.70 a 1.20 metros y en cuanto al diámetro de cobertura foliar, alcanzan

desde 0.30 a 0.80 m aproximadamente. Estos parámetros dependen de las condiciones de desarrollo, además, de la edad de la planta (Martínez, 1990).



Figura 1. Planta de orégano, *Lippia graveolens*.

2.2.1 Características de la semilla

Presentan una tonalidad café, con una forma ovoide y de un tamaño menor a 0.5 mm. En condiciones óptimas en cuanto humedad y temperatura, aproximadamente de 15 a 20°C, la semilla germina después de una semana.



Figura 2. Semilla de *Lippia graveolens* en relación con la punta de un lápiz (Conafor, 2009).

2.2.2 Características de la raíz

Las raíces contienen nódulos, los cuales se forman gracias a microorganismos que forman estos nódulos a una temperatura óptima de 25°C; por medio de estas estructuras se realiza el proceso de nitrificación. Cuando transcurren nueve días desde la germinación, se forman los primeros nódulos, y transcurridas tres semanas la fijación del nitrógeno atmosférico ocurre (Martínez, 1990).

2.2.3 Características del tallo

Los tallos del orégano mexicano son cuadrangulares, finos, densamente vilosos, además de granulares. Presentan ramas que cuentan con una corteza exfoliante (Bueno, 2014). El tallo es un parámetro variable que se mide de acuerdo a la edad de la planta, las condiciones ambientales del hábitat de la planta; además influye la cantidad y la distribución de agua, ya sea por medio de lluvia, que reciba durante el año. Los tallos pueden alcanzar hasta 2.5 metros de altura. Los brotes anuales, que dan origen a las demás partes de la planta, es decir, ramas, hojas, flores o frutos, crecen con mayor velocidad a los tallos (Martínez, 1990). La composición química de esta estructura, ha sido estudiada debido a su importante contenido de flavonoides, los cuales contribuyen al desarrollo de compuestos nuevos que podrán tener importantes aplicaciones en la agronomía y a la medicina (Martínez, 2017).

2.2.4 Características de las hojas

La caracterización botánica de las hojas es la siguiente, presenta hojas opuestas, con una forma ovalada/alanceolada, además tiene peciolos delgados, un envés piloso, un haz clasificado como rugoso / escabroso y también estrigoso – glandular, un ápice y un margen clasificados como obtuso y crenado, respectivamente (Bueno, 2014).

Cuando se habla sobre un riego temporal, la aparición de follaje en las poblaciones de orégano silvestre o natural, se inicia cuando pasan dos semanas después de que inician las lluvias de temporal; la formación completa o total del follaje concluye cuando al formarse los brotes vegetativos, pasan aproximadamente seis semanas (Martínez, 1990).



Figura 3. Hojas de *Lippia graveolens* (CONAFOR, 2009).

2.2.5 Características de las flores

Una de las características de las espigas en las flores del orégano subglobosas, presenta cuatro estambres y corolas blancas y zigomorfas (Bueno, 2014). En cuanto a la floración de la planta, inicia basándose en la formación del follaje, aproximadamente siete semanas después de este fenómeno iniciado. Se producen cantidades excedentes de flores, de las cuales, tomando el 100% de estas, únicamente llegan a un estado maduro aproximadamente el 65%. La autopolinización es una de las características que presentan las flores de esta especie bajo condiciones normales de crecimiento. Aquí, el polen cae sobre el propio estigma de la flor, y de esta manera se produce la fertilización.

El proceso de floración está regulado por diversas características, dentro de las cuales se encuentran la temperatura, la cantidad de nutrientes a las que está sujeta la planta, así como las condiciones físicas del suelo, la disponibilidad del agua, además del fotoperiodo (Martínez, 1990).



Figura 4. Flor de *Lippia graveolens* (CONAFOR, 2009).

2.2.6 Características del fruto

Los frutos que genera la planta de orégano son pequeños, formando una cápsula indehiscente, esta se comienza a formar después de haber iniciado la floración, aproximadamente de 15 a 20 días después. La consiguiente maduración de la planta provoca que dicha cápsula se abra y se esponga y posteriormente se expulse la semilla, esta se presenta, generalmente sin endospermo. El periodo por el cual se producen los frutos varía dependiendo de la zona ecológica en la que se encuentre (Martínez, 1990).



Figura 5. Frutos de *Lippia graveolens*, cápsulas a la izquierda y listos para remover las semillas a la derecha (CONAFOR, 2009).

2.3 Composición química de *Lippia graveolens*

El orégano mexicano cuenta dentro de su composición química metabolitos secundarios vegetales, de los cuales, la cantidad encontrada y la composición de estos, depende de diversos factores como lo son la altitud, hábitat, clima, entre otros. La influencia de estos cultivos repercute en el aprovechamiento y la explotación de la planta (Bueno, 2014).

Para obtener la composición química de esta planta, se han identificado diversos flavonoides, su estructura química se caracteriza por tener dos anillos aromáticos unidos por una cadena de tres átomos de carbono; dentro de estos, se incluye a la apogenia, luteolina, alcoholes alifáticos, agliconas, algunos derivados del genilpropano, además de compuestos terpénicos (Bueno, 2014).

El aceite esencial del orégano mexicano tiene en su composición hidrocarburos alicíclicos y aromáticos, alcoholes, aldehídos, ésteres y cetonas, que son los derivados oxigenados, además de sustancias azufradas y nitrogenadas (González, 2009). La composición de los aceites esenciales puede variar de acuerdo al quimiotipo, sin embargo, estos contienen β -cariofileno, limoneno, canfor, ρ -cimeno, linalol, timol y α -pineno (Arcila, 2004). Los principales compuestos, que se han estudiado y a los cuales se les atribuyen las propiedades antioxidantes y antimicrobianas en los sistemas son el carvacrol, timol y ρ -cimeno (González, 2009).

2.4 Hábitat y distribución

Lippia graveolens es una especie que está conformada por diferentes poblaciones que cuentan con características morfológicas, fitoquímicas, además de fenólicas diferentes. Esta especie es nativa de regiones áridas. Dichas poblaciones se encuentran distribuidas en el sur de Estados Unidos, específicamente en Texas y en Centro América (Long-Ze, 2007). Esta planta es encontrada en al menos 24 estados dentro de México, se considera como la especie con distribución más amplia en nuestro país (Trópicos, 2016).

Dentro de las áreas de aprovechamiento encontramos Chihuahua, Coahuila, Durango, Tamaulipas, Jalisco, Zacatecas, Querétaro, Hidalgo y Baja California Sur (CONAFOR, 2017).

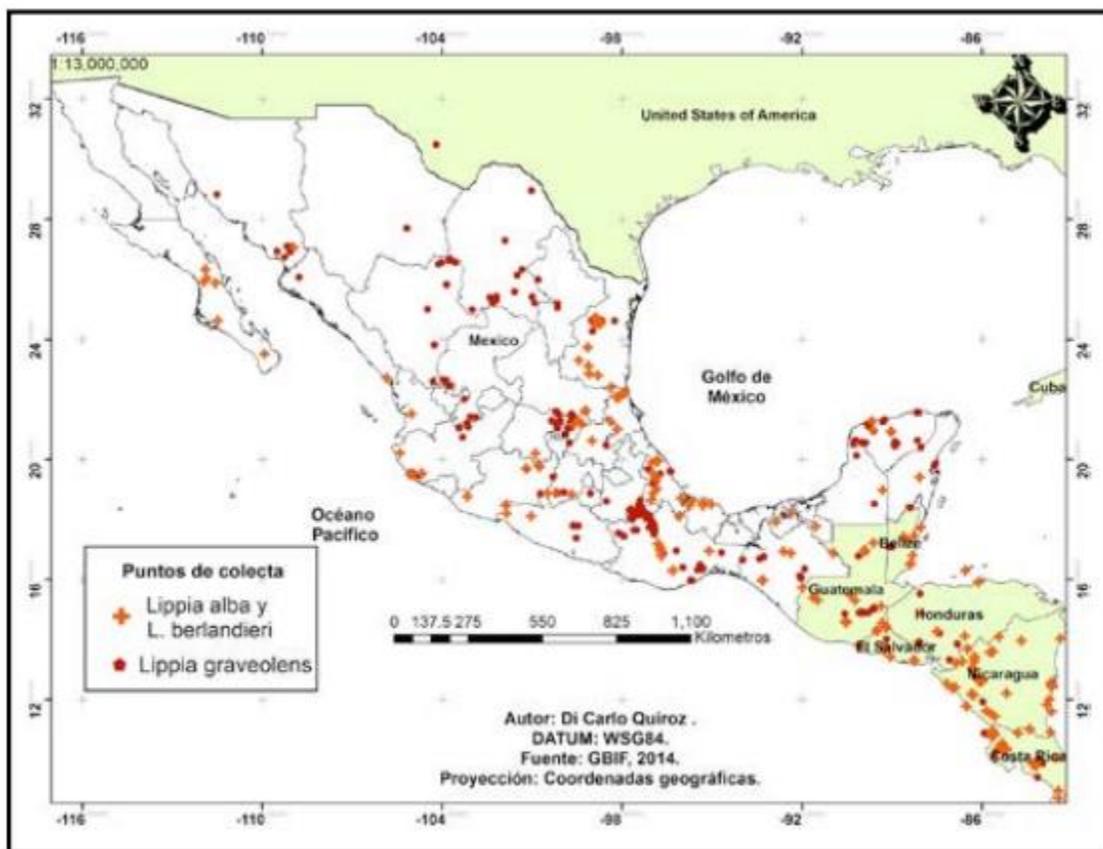


Figura 6. Mapa de distribución de *Lippia graveolens*, *Lippia alba*, y *Lippia berlandieri* (Quiroz, 2016).

2.5 Usos de *Lippia graveolens*

El orégano es una especie que tiene un gran potencial económico gracias a la demanda con la que cuenta a nivel internacional, debido a sus usos dentro de la industria farmacéutica, en la cosmética, además de la industria alimentaria como un conservador de alimentos, como plaguicida por sus actividades antifúngicas, como antimicrobiano y anticancerígeno (Martínez, 2007).

Una aplicación que tiene esta planta, a través de los aceites esenciales es la producción de películas comestibles que también cuentan con propiedades antimicrobianas contra bacterias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* y *Lactobacillus plantarum* (Seydim y Sarikus, 2006).

Las hojas de la planta del orégano se emplean para uso culinario en la preparación de platillos, como condimentos, para productos cárnicos y lácteos, en las bebidas alcohólicas. También se emplean como remedios naturales como analgésicos, contra los espasmos, la inflamación, y se usan como un tratamiento para enfermedades gastrointestinales y respiratorias.



Figura 7. Aceite esencial de orégano.

Dentro de la industria alimenticia, el aceite esencial del orégano es empleado para reducir la peroxidación lipídica, ayuda durante las etapas del procesamiento, la preparación y el almacenamiento, esto es gracias a la actividad antioxidante que presenta. Otra manera para evitar este fenómeno mencionado es emplear el aceite esencial como un suplemento alimenticio para los animales de engorda, que son destinados para consumo humano, y así, evitar la peroxidación de los ácidos grasos contenidos en dicha carne. La capacidad para poder evitar que dicho proceso suceda es a través de los compuestos antioxidantes contenidos en la planta, se absorben y se incorporan al sistema circulatorio; lo cual genera una posible respuesta frente a enfermedades crónico degenerativas (González, 2009).

2.6 Análisis Físico – Químico Proximal

Los procedimientos químicos realizados nos muestran el valor nutritivo de un producto, y nos señalan las bases para un control de calidad, y para observar si se cumplen con los estándares establecidos con los requerimientos de mercado (Pineda, 2016).

2.6.1 Materia Seca Total

El porcentaje de materia seca es la disminución del agua contenida en un alimento en dicho alimento. Esto se logra al someterse la muestra a un calor constante moderado, para que el agua contenida en la muestra se evapore y de esta manera únicamente queda la porción de materia seca (Ramírez, 2011).

2.6.2 Humedad

Se define como el contenido de agua de los alimentos. Este es un parámetro que determina la descomposición de los alimentos, aproximadamente mayor a 12.5%, el alimento es susceptible a descomposición parcial o total, lo cual también afecta el contenido de nutrientes (Pineda, 2016).

2.6.3 Proteína Cruda

La proteína es un compuesto orgánico que está formado por polímeros de aminoácidos que están unidos por enlaces peptídicos. Son biomoléculas que están formadas por carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, en algunos casos pueden contener azufre, fósforo, hierro, magnesio, cobre, entre otros. Generalmente podemos determinarla en un alimento por el método Kjeldahl, que está basado en la cantidad que contiene de nitrógeno por medio de un proceso de digestión (Bedoya, 2016).

2.6.4 Cenizas

Se refiere al residuo inorgánico generado después de calcinar la materia orgánica. Este parámetro se emplea para determinar la calidad de los alimentos; estas no son generalmente las mismas sustancias inorgánicas que se encuentran en el alimento, gracias a la volatilización o las interacciones químicas entre las partes que lo constituyen (Corona, 2016).

2.6.5 Extracto etéreo – Grasas

La grasa se forma a partir de los hidratos de carbono, constituyen una de las principales fuentes de energía. Representan vehículos de las vitaminas liposolubles (A, D, E y K). se

refiere al conjunto de sustancias de un alimento que se extraen con solventes orgánicos (Bedoya, 2016).

2.6.6 Fibra Cruda

Se refiere a sustancias que se encuentran en los alimentos de origen vegetal, las cuales no son digeridas por los procesos del estómago ni del intestino delgado, está formada por celulosas y lignocelulosas provenientes de la pared celular (Bedoya, 2016). Su determinación se basa en el tratamiento secuencial con ácidos, además de álcalis; esto es debido a que gran parte de los compuestos como la hemicelulosa, lignina, y la celulosa son digeridos (Corona, 2016)

2.6.7 Extracto Libre de Nitrógeno

La determinación del extracto libre de nitrógeno es una de las fracciones para la determinación de fibra. Es calculada con base a las demás determinaciones, esto es porque no puede determinarse de manera directa gracias a las diversas sustancias químicas que lo conforman, además que no puede aislarse analíticamente.

Dentro de este extracto se encuentra una mezcla de sustancias orgánicas en las cuales no se encuentra ninguna que presente nitrógeno, es una mezcla de almidones, azúcares, hemicelulosa, lignina, además de vitaminas hidrosolubles. Pueden disolverse en las soluciones ácidas y también en las alcalinas (Corona, 2016).

2.7 Capacidad antioxidante

Los antioxidantes son aquellos compuestos que tienen la capacidad de inhibir o limitar la oxidación de proteínas, DNA, o en términos generales, biomoléculas. Esta capacidad es gracias a que detienen la propagación u obstaculizan la iniciación de especies reactivas de oxígeno. Estas especies, se relacionan con la generación de enfermedades humanas crónico-degenerativas, así como del proceso de envejecimiento (García, 2012). Un antioxidante puede ser definido también como una sustancia que al estar presente en una baja concentración en comparación con la de un sustrato oxidable puede retrasar o prevenir la oxidación de dicho sustrato (Bedoya, 2012).

La actividad antioxidante es importante ya que protege a las células del daño oxidativo. En el caso de los alimentos, la oxidación de los lípidos es una de las causas principales por las que la calidad de los alimentos se deteriora. El proceso de oxidación de estas moléculas está influenciado por factores que actúan como catalizadores, estos son el calor, las enzimas, metales algunos microorganismos, entre otros, y sus efectos se perciben en el sabor, en la pérdida de compuestos como los aminoácidos esenciales o vitaminas liposolubles (Shahidi, 2015).

Los alimentos son importantes en el control del estrés oxidativo. Al consumir una dieta con una amplia cantidad de antioxidantes reduce la probabilidad de presentar enfermedades cardiovasculares y degenerativas. Parte de la capacidad antioxidante se encuentra en los polifenoles, que son un grupo de compuestos que presentan propiedades para poder estabilizar los radicales libres, la inhibición de enzimas tanto hidrolíticas como oxidativas (Bedoya, 2012).

La oxidación de los lípidos es provocada por el proceso de metabolismo aeróbico. Los reactivos que son primordialmente afectados son los ácidos grasos insaturados que están contenidos en los fosfolípidos de las membranas, además del colesterol. Este metabolismo produce hiperoxidos de lípidos, los cuales, al ser inestables se descomponen en productos considerados de oxidación secundaria, entre los cuales se encuentran los alcoholes, aldehídos, hidrocarburos y cetonas. También podemos encontrar la formación de polímeros, que son causantes de la viscosidad que se genera al freír con los aceites vegetales; otra de las respuestas que genera la formación de polímeros es la reducción de la fluidez de membranas, repercutiendo en el transporte y la señalización celular, esto observado en la enfermedad del Alzheimer (Shahidi, 2015).

Los compuestos polifenólicos que se encuentran en las plantas, son metabolitos secundarios que poseen al menos un anillo aromático, y a este, está unido el grupo hidroxilo. Están clasificados en tres grupos, los ácidos fenólicos, flavonoides y taninos (Mercado, 2013). El orégano mexicano contiene en sus metabolitos secundarios antioxidantes a la quercetina, este compuesto forma parte de los flavonoides. Entre otros compuestos con las mismas propiedades están la rutina, naringenina, floridzina, luteolina y apigenina. Dichos

compuestos hacen que la planta sea estudiada por el papel que desempeñan tanto en la prevención de enfermedades como en la industria alimenticia (Kahkoren, 1999).

2.7.1 Métodos empleados para determinar la capacidad antioxidante

Dentro de las técnicas para evaluar la capacidad antioxidante, encontramos las técnicas *in vitro*, y dentro de estas se encuentran las técnicas convencionales. El principio de estas técnicas se basa en la presencia de rasgos estructurales; deben existir donadores de electrones y la interacción de estos con los radicales libres. Dichos donadores deben contener potenciales de reducción apropiados, y, por último, la habilidad para deslocalizar el radical resultante. La capacidad antioxidante se mide principalmente por los compuestos fenólicos, algunas técnicas para medir esta propiedad son: FRAP; Poder Antioxidante Reductor de Hierro, DPPH[•]; 1,1 – difenil – 2 – picrilhidrazil, ABTS^{•+}; depleción del 2, 2'-Azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfónico, entre otros (González, 2009).

2.7.1.1 FRAP

Esta técnica tiene como principio el medir la capacidad del sustrato para reducir Fe³⁺ a Fe²⁺. Después de ocurrida esta reacción, lo siguiente es la capacidad del Fe²⁺ para formar un complejo colorido con tripiridil – s – triazina (TPTZ). Esta reacción se encarga de detectar los compuestos que tengan potenciales redox menor a 0.7V (<0.7V) (Prior, 2005).

2.7.1.2 DPPH[•]

Se conoce como método de neutralización del radical libre 2,2 – difenil – 1 pierilhidracil (DPPH[•]). Con este radical estable, se mide la capacidad de secuestro de los compuestos a analizar que cuenten con capacidad antioxidante. La solución que genera este reactivo presenta un color violeta y un máximo de 517 nm de absorbancia. Aquí, el radical libre (DPPH[•]) aparta un átomo de hidrogeno, que proviene de un donador; esta reacción genera un cambio de color, que puede ser de violeta a amarillo, provocado por la disminución de la concentración de dicho radical libre. La medición de dicha intensidad es leída en el espectrofotómetro. La actividad antioxidante se expresa en porcentaje (Toro, 2008).

2.7.1.3 ABTS^{•+}

Otro de los métodos de medición de actividad antioxidante es el ensayo de decoloración con el radical catiónico (ABTS^{•+}). Este método está basado en la medición de la decoloración del radical ABTS^{•+}. Se debe a la interacción de las especies que donan el hidrogeno o lo electrones. La reacción del radical catiónico, cromóforo, es la oxidación del ABTS^{•+} con persulfato de potasio (Sotelo, 2015).

2.8 Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

En términos generales, la espectroscopia infrarroja (IR) es empleada en el análisis cuali-cuantitativo de los diversos grupos funcionales presentes en un material. Estudia la absorción o la emisión de energía radiante que es originada mediante la interacción entre la radiación electromagnética y la muestra a estudiar (Piqué, 2012).

Uno de los fundamentos de la espectroscopia infrarroja es que las moléculas poseen la función de rotar y vibrar a diversas frecuencias; o sea, que las moléculas tienen la posibilidad de absorber la energía de fotones en un rango energético IR una vez que exista una diferencia en un rato bipolar de esa molécula a medida que está ocurriendo un desplazamiento vibracional rotacional, además una vez que la frecuencia vinculada con la radiación resuena con el desplazamiento vibracional. Los componentes contenidos en los enlaces químicos presentan movimientos vibracionales que tienen frecuencias naturales, los cuales están en el rango de frecuencias infrarrojo (Piqué, 2012).

<i>Infrarrojo</i>	<i>cm⁻¹</i>
<i>Lejano</i>	10 a 650
<i>Medio (IR)</i>	650 a 4000
<i>Próximo</i>	4000 a 12500

Tabla 1. Longitud de onda para distintos rangos en el infrarrojo (adaptado de Piqué, 2012).

La espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier es uno de los métodos de espectroscopia de infrarrojos, en donde cuando la radiación de infrarrojos alcanza la muestra,

parte de la radiación es absorbida por esta, y otra parte es transmitida o atravesada. Esta técnica genera espectros con patrones que nos proporcionan información de tipo estructural. En esta metodología se emplea la interferometría que sirve para registrar información sobre el material o la muestra a la cual se le aplicará el haz de infrarrojos. El resultado es una serie de espectros que nos sirven para interpretar y cuantificar el material. Esto, nos brinda un análisis reconocible ya que las moléculas cuentan con huellas de infrarrojos específicas.

Esta técnica basada en espectroscopía vibracional, se ha reportado que es simple, no daña el tejido, es reproducible, además de requerir pequeñas cantidades de muestra (microgramos a nanogramos), y tampoco requiere un procesamiento específico. Nos proporciona información a nivel molecular para la identificación de grupos funcionales, enlaces y formación molecular. Cada uno de los espectros vibracionales obtenidos mediante el análisis son específicos para cada molécula, lo cual nos brinda información sobre la composición bioquímica de estas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

El material fue colectado en tres diferentes ejidos (Cuadro 2). Una vez recolectadas las muestras vegetales fueron transportadas al Laboratorio e Biotecnología y Biología Molecular en el Departamento de Ciencias Básicas de la UAAAN, se secaron a 50°C/24 h en una estufa Novatech, y se redujo el tamaño de partícula en un molino Homend, HC-500 a 600 µm (malla No. 30). Se almacenaron en bolsas negras hasta los análisis.

Tabla 2. Ubicación geográfica de las colectas de las tres localidades evaluadas.

Especie	Municipio	Localidad	Latitud	Longitud	Altitud
<i>Lippia graveolens</i>	Melchor Ocampo, Zac.	San Jerónimo	22°39'11.95"	102°29'24.32"	2275
<i>Lippia graveolens</i>	Cuatro Ciénegas, Coah.	Estanque de León	25°42'35.55"	103°18'02.27"	1115
<i>Lippia graveolens</i>	Ramos Arizpe, Coah.	Tortuga	25°51'39.77"	101°16'30.53"	984

*Zacatecas (Zac), Coahuila (Coah).

3.2 Reactivos químicos

Etanol, ácido gálico, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]), persulfato de potasio (K₂S₂O₈), Fosfato de potasio dibásico (K₂HPO₄) 1 M, Fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄) 1 M, Ferrocianuro de potasio (C₆N₆FeK₄), Ácido tricloroacético (CCl₃COOH), Cloruro férrico (FeCl₃), reactivos como Amberlita XAD-16, solventes metanol, H₂O destilada.

3.3 Métodos para el análisis físico – químico proximal

3.3.1 Determinación de Materia Seca Total (%)

Los materiales y equipos empleados fueron: una estufa a 50°C, crisol de porcelana, desecador, pinzas para crisol, espátula de acero inoxidable, mechero, balanza analítica. La muestra seca se colocó en una estufa, a 50 °C/24 h hasta peso constante. Se pasó a un desecador por 30 min y se pesó. Se pesó 1 g de muestra y se colocó dentro del crisol. Los análisis se realizaron por triplicado. El porcentaje de materia seca total se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% MST = \frac{\text{Peso del crisol} + \text{Muestra seca} - \text{Peso de crisol vacío}}{\text{Gramos de muestra}} \times 100$$

% MST = % Materia Seca Total.

3.3.2 Determinación de % Cenizas

Los materiales y equipos empleados fueron crisoles de porcelana, desecador, pinzas y balanza analítica. Se pesaron los crisoles vacíos, se agregó un gramo de muestra, se pre incineró en un mechero cada una de las muestras contenidas en el crisol hasta su combustión. Los crisoles se colocaron dentro de la mufla a 500°C/24 h. Posteriormente, se colocaron en un desecador por 30 minutos. Finalmente se pesó. El porcentaje de cenizas se obtuvo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Ceniza} = \frac{\text{Peso del crisol} + \text{ceniza} - \text{Peso de crisol vacío}}{\text{Gramos de muestra}} \times 100$$

3.3.3 Determinación de Proteína Cruda

Los materiales y equipos empleados fueron los siguientes, matraz Kjeldhal de 800 ml, aparato de digestión y destilación Kjeldhal, matraz Erlenmeyer de 500 ml, bureta, ácido sulfúrico 0.1 N, hidróxido de sodio 45%, ácido bórico 4%, indicador mixto, agua destilada, mezcla de selenio, perlas de vidrio, ácido sulfúrico concentrado siguiendo el protocolo de la AOAC, 1980.

Las fórmulas para obtener el porcentaje de proteína son las siguientes:

$$\% N = \frac{(\text{ml de ácido sulfúrico gastados en muestra} - \text{ml de ac. sulfúrico gastados en blanco})(\text{normalidad del ácido})(0.014) \times 100}{\text{gr de muestra}}$$

$$\% \text{ Proteína Cruda} = \% N \times 6.25$$

3.3.4 Determinación de Extracto etéreo o grasa

Los materiales y equipo empleados fueron aparato extractor tipo Soxhlet, dedales de asbesto, matraces bola fondo plano y boca esmerilada, estufa pinzas balanza analítica, 28 desecador, hexano o éter anhídrido, perlas de vidrio, papel filtro, algodón siguiendo el protocolo de la AOAC, 1980.

La fórmula para determinar el extracto etéreo es la siguiente.

$$\%EE = \frac{\text{peso de matraz} + \text{grasa} - \text{peso de matraz vacío} \times 100}{\text{gr de muestra}}$$

% EE = porcentaje de extracto etéreo.

3.3.5 Determinación de Fibra cruda

El material y equipo que se utilizó fue un digestor Labconco, vasos de Berzelius de 600 ml, ácido sulfúrico 0.255N, hidróxido de sodio 0.313 N, agua destilada, filtros de tela, embudos de vidrio Se utilizaron 2 g de muestra desengrasada siguiendo el protocolo de la AOAC, 1980

La fórmula empleada para calcular el porcentaje de fibra cruda fue la siguiente:

$$\%FC = \frac{\text{peso del crisol} + \text{muestra seca} - \text{peso del crisol} + \text{cenizas}}{\text{gr de muesyta desengrasada}} \times 100$$

%FC = porcentaje de fibra cruda.

3.3.6 Determinación de Extracto libre de nitrógeno (ELN)

El ELN se calcula por diferencia, que corresponde a los azúcares, el almidón y gran parte del material clasificado como hemicelulosa. El ELN es necesario para realizar el cálculo total de nutrientes digestibles (TND). Se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\begin{aligned} \% \text{ de E. L. N.} &= \% \text{ cenizas} + \% \text{ extracto etéreo} + \% \text{ proteína cruda} \\ &+ \% \text{ fibra cruda} - 100 \end{aligned}$$

% de E.L.N. = porcentaje de extracto libre de nitrógeno.

3.4 Extracción de Polifenoles

3.4.1 Extracción y purificación de la muestra

De acuerdo con lo reportado por Ascacio-Valdés et al. (2010), se pesaron 20 g de muestra deshidratada (50°C/24 h) y pulverizada (tamiz No. 30). Se colocaron en un vaso de precipitado con 100 mL de agua (relación 1:20). La extracción se llevó a cabo a 60 °C/30 min. Después, el extracto se filtró con papel Whatman #41 para eliminar las partículas de gran tamaño. Una columna cromatográfica con Amberlita XAD-16 fue usada para purificar el extracto; primero, se usó agua como eluyente para descartar compuestos indeseables, y después, se usó etanol como eluyente para recuperar la fracción rica en polifenoles. El solvente (EtOH) fue eliminado por evaporación y los compuestos fenólicos fueron recuperados como un polvo fino. La muestra fue guardada en recipientes ámbar y conservada en refrigeración hasta su uso.

3.5 Evaluación de la actividad antioxidante

3.5.1 Preparación de las muestras para analizar

Para las pruebas de DPPH[•], FRAP y ABTS^{•+} se prepararon soluciones madre (1000 mg L⁻¹), posteriormente se realizaron diferentes diluciones para obtener el valor de IC₅₀ (concentración necesaria para alcanzar el 50% de la inhibición del radical) en las técnicas de DPPH[•] y ABTS^{•+}.

3.5.2 Ensayo DPPH[•]

Se preparó una solución stock de ácido gálico a una concentración de 200 ppm y se realizó la siguiente curva de calibración.

Curva de calibración de ácido gálico			
[ppm]	µl de solución stock	µl de H₂O	Volumen final

0	0	1000	1 mL
20	100	900	1 mL
50	250	750	1 mL
70	350	650	1 mL
90	450	550	1 mL
110	550	450	1 mL
150	750	250	1 mL

Tabla 3. Curva de calibración de ácido gálico.

Para determinar la capacidad de eliminación de radicales libres de la muestra empleada, se empleó una solución de radical DPPH^{*}, se utilizó metanol como disolvente (60 mM). Se añadió un volumen de 2950 μ L de radical DPPH^{*} a cada uno de los tubos de ensayo por cada 50 μ L de muestra y en su caso, de curva estándar (ácido gálico). Se incubó en oscuridad por 30 minutos. Se registró la absorbancia de cada una de las muestras a una longitud de onda de 517 nm. El porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \left[\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}}} \right] \times 100$$

Donde A_{control} representa el valor de la absorbancia del control y A_{muestra} representa el valor de la absorbancia que se obtuvo de cada una de las muestras. El resultado obtenido se expresó por el valor IC_{50} , el cual se refiere a la concentración necesaria para alcanzar el 50% de inhibición del radical.

3.5.3 Ensayo FRAP

Se preparó una solución stock de ácido gálico a una concentración de 200 ppm y realizó la siguiente curva de calibración.

Curva de calibración de ácido gálico

<i>[ppm]</i>	μl de solución stock	μl de H ₂ O	Volumen final
0	0	1000	1 mL
20	100	900	1 mL
50	250	750	1 mL
70	350	650	1 mL
90	450	550	1 mL
110	550	450	1 mL
150	750	250	1 mL

Tabla 4. Curva de calibración de ácido gálico.

Un volumen de 500 μL de muestra se mezcló con 120 μL de buffer de fosfato (pH 7), que fue preparado mediante una mezcla de fosfato de potasio dibásico (61.5 mL, 1M), fosfato de potasio monobásico (38.1 mL, 1M) y se aforó la mezcla a 1000 mL. Después, se agregaron 220 μL de ferrocianuro de potasio al 1% (C₆FeK₄N₆) a la mezcla de reacción, esta se homogeneizó y se incubó a 50°C durante veinte minutos. Posteriormente, se añadieron 12 μL de ácido tricloroacético al 10%, 45 μL de agua destilada y 10 μL de cloruro férrico al 0.1%. La absorbancia fue registrada a una longitud de onda de 734 nm. Los resultados fueron reportados como μg de ácido gálico equivalente por mililitro basados en la curva de calibración con el mismo estándar

3.5.3 Ensayo ABTS⁺

Se preparó una solución stock de Trolox a una concentración de 200 ppm y realizar la siguiente curva de calibración.

Curva de calibración de Trolox			
<i>[ppm]</i>	μl de solución stock	μl de H ₂ O	Volumen final
0	0	2000	2 mL
20	200	1800	2 mL
40	400	1600	2 mL
60	600	1400	2 mL
80	800	1200	2 mL
100	1000	1000	2 mL

Tabla 5. Curva de calibración de Trolox.

Se generó el catión radical ABTS^{•+} por medio de una solución acuosa de ABTS^{•+} (7mM) con presulfato de potasio (2.45 mM); se mezclaron estos compuestos en la oscuridad a temperatura ambiente doce horas posteriores a su uso. Se ajustó la solución en etanol a 0.700±0.002 nm de absorbancia. Se añadió un volumen de muestra de 50 µL para reaccionar con 950 µL de la solución de ABTS^{•+}; después de 1 minuto de reposo de la reacción, se midió la absorbancia a 734 nm. La capacidad de inhibición se calculó por medio de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Inhibición} = \left[\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}}} \right] \times 100$$

Donde A_{control} representa el valor de la absorbancia del control y A_{muestra} representa el valor de la absorbancia que se obtuvo de cada una de las muestras. El resultado se expresó como el valor IC₅₀.

3.6 Análisis de Espectroscopia Infrarroja Transformada de Fourier (FTIR)

El análisis se realizó utilizando un FTIR Agilent Cary 630 acoplado a un cristal de seleniuro de zinc (ZnSe) ATR. El extracto fenólico seco purificado se depositó sobre toda la superficie del lector y se aseguró mediante la prensa equipada. La lectura se realizó mediante el programa de PC MicroLab en el rango espectral de 4000 a 650 cm⁻¹, con un ciclo de 32 barridos con una resolución de 2 cm⁻¹.

El análisis del espectro y los grupos funcionales detectados se realizó con el programa MicroLab Expert y el gráfico se construyó con el programa OriginPro 8.

3.7 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se reportaron como medias ajustadas. Los datos se analizaron mediante pruebas de Tukey con significancia de p<0.05. Se realizó análisis estadístico utilizando el software InfoStat (versión 2017).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis Químico Proximal

El análisis proximal se refiere a las determinaciones que se realizan para conocer la composición de macrocomponentes presentes en un alimento. Se analizaron los parámetros de materia seca, humedad, proteína cruda, cenizas, extracto etéreo o grasas, fibra cruda y el extracto libre de nitrógeno (Vásquez, & Fernández, 2020).

Análisis físico – químico proximal							
Localidad	%MST	%H	%PC	%C	%EE	%FC	%ELN
San Jerónimo	74.81±0.63 c	25.19±0.63 a	9.26±0.29 c	9.64±0.12 b	3.83±0.42 a	14.37±0.675 a	62.91±0.34 a
Tortuga	85.41±0.8 b	14.59±0.8 b	10.27±0.22 b	10.16±0.035 a	3.49±0.385 a	11.64±0.869 a	64.44±0.92 a
Estanque de León	88.39±0.63 a	11.61±0.63 c	13.12±0.28 a	8.90±0.267 c	3.60±0.31 a	11.99±1.82 a	62.47±1.53 a

Tabla. 6 Análisis químico – físico proximal de *Lippia graveolens*; se muestran los promedios de cada valor (cada localidad se analizó por triplicado). % MST (Materia seca total), %H (Humedad), %PC (Proteína Cruda), %C (Cenizas), %EE (Extracto Etéreo – Grasas), %FC (Fibra Cruda), %ELN (Extracto Libre de Nitrógeno). *Letras iguales significan que no hay diferencia estadística. Las pruebas fueron realizadas con una significancia a ($p < 0,05$).

4.1.1 Determinación de Materia Seca Total

Los resultados obtenidos para la medición del parámetro de materia seca total (MST) se presentan en el cuadro 6. Donde podemos observar que en la localidad de Estanque de León se obtuvo un mayor porcentaje promedio de materia seca total, con un 88.39 ± 0.63 ; seguido de San Jerónimo con 74.81 ± 0.63 y por último en Tortuga con 85.41 ± 0.8 . Las tres localidades presentan diferencias significativas entre ellas. En este sentido, Aquino-López (2020) reportó en la especie de orégano mexicano *Lippia berlandieri*, diferente a la en estudio, un porcentaje de $93.68 \% \pm 0.25$; lo cual puede ser asociado a la diferencia de especies, estado de desarrollo o localidad.

4.1.2 Determinación de Humedad (%)

Los resultados para la determinación del porcentaje (%) de humedad se presentan en el cuadro 6.

Podemos observar que la planta de la localidad de San Jerónimo contiene un mayor porcentaje de humedad, con un promedio de 25.19 ± 0.63 ; seguido por Tortuga con un 14.59 ± 0.8 y finalmente Estanque de León con 11.61 ± 0.63 . Las tres localidades presentan una diferencia significativa entre ellas. García – Pérez (2012) reporta para *Origanum vulgare*, 9.93% de humedad, debido a que se encuentra en zonas con alta disponibilidad de agua, no le es necesario albergar un alto porcentaje de humedad. Por otro lado, el análisis de humedad, está relacionado con el contenido de materia seca teniendo como resultado más cercano al obtenido en este estudio es el de la especie *berlandieri* (Aquino-López, 2020).

4.1.3 Determinación de Proteína Cruda (%)

Los resultados de la determinación de proteína cruda (%), se muestran en el **cuadro 6**. Podemos observar que la planta de la localidad de Estanque de León, cuenta con el porcentaje más alto con 13.12 ± 0.28 , seguido de Tortuga con 10.27 ± 0.22 y finalmente San Jerónimo con 9.26 ± 0.29 . Se observaron diferencias significativas entre las tres localidades. Por su parte, Gallina-Tesaro (2019) reporta 20.96% de proteína cruda en la misma especie a la estudiada, en comparación con nuestros resultados obtenidos, mostrando una diferencia significativa; por otro lado, Aquino-López (2020) reporta para *berlandieri*, 11.57 ± 0.29 , donde se observa una mayor similitud a los resultados obtenidos por la localidad de Tortuga, y considerablemente cercana a las otras dos localidades.



Figura 8. Proceso de determinación de proteína cruda

4.1.4 Determinación de Ceniza (%)

En el **cuadro 6** se muestran los datos obtenidos del análisis para determinar el porcentaje de ceniza. Podemos observar que la localidad que cuenta con un mayor porcentaje es la de Tortuga, con un 10.16 ± 0.035 , seguido de San Jerónimo con 9.64 ± 0.12 y finalmente Estanque de León con 8.90 ± 0.27 ; presentando diferencia significativa entre ellas. Gallina-Tesaro (2019) reporta 9.51%, valor similar a los obtenidos en este trabajo, la variación entre estas puede atribuirse a los diferentes minerales presentes en las especies.

4.1.5 Determinación de Extracto Etéreo – Grasas (%)

Los resultados obtenidos de la determinación del porcentaje del extracto etéreo o las grasas contenidas en el orégano se muestran en el **cuadro 6**. La localidad de San Jerónimo mostró el mayor valor con 3.83 ± 0.42 ; seguido de Estanque de León con 3.6 ± 0.31 y por último Tortuga con 3.49 ± 0.385 . No se observan diferencias significativas entre las tres localidades en las pruebas estadísticas. Gallina-Tesaro (2019), reportó un contenido del 7.56% en la planta de Mapimí, Durango, las diferencias entre los resultados pueden estar relacionadas con varios factores como con el ambiente con el que interactúa la especie, estado de desarrollo de la planta, entre otros.



Figura 9. Proceso para la determinación de extracto etéreo.

4.1.6 Determinación de Fibra Cruda (%)

Los resultados obtenidos del análisis de fibra cruda se muestran en el **cuadro 6**. Con base a los resultados obtenidos, la localidad de San Jerónimo obtuvo el mayor porcentaje con 14.37

± 0.675 , seguido de Estanque de León con 11.99 ± 1.82 y finalmente Tortuga, con 11.64 ± 0.87 ; los valores no cuentan con una diferencia significativa entre ellos. Gallina-Tesaro (2019) reporta que *Lippia graveolens* cuenta con 11.06% de fibra cruda, resultado que es muy similar con Tortuga y Estanque de León.



Figura 10. Proceso para la determinación de fibra cruda.

4.1.7 Determinación de Extracto Libre de Nitrógeno (%)

En el **cuadro 6** se muestran los resultados obtenidos para la determinación del porcentaje del extracto libre de nitrógeno (ELN). La localidad de Tortuga mostró el porcentaje más alto con 64.44 ± 0.92 , seguido de San Jerónimo con 62.91 ± 0.343 y finalmente Estanque de León con 62.47 ± 1.53 . Las muestras no presentan diferencias estadísticas entre ellas. En este sentido, Gallina-Tesaro (2019), reportó 45.88% para extracto libre de nitrógeno, la diferencia se puede atribuir al mayor porcentaje de lignina, celulosa y hemicelulosa que contienen las tres localidades.

4.2 Rendimiento de proceso de extracción de Polifenoles

Localidad	Muestra Utilizada (g)	Gramos obtenidos	Mg/g
<i>San Jerónimo</i>	20	0.237 ± 0.017	11.887 ± 0.877 a
<i>Estanque de León</i>	20	0.153 ± 0.014	7.686 ± 0.247 b
<i>Tortuga</i>	20	0.242 ± 0.005	12.21 ± 0.712 a

Tabla 7. Rendimiento del proceso de extracción de polifenoles. *Letras iguales significan que no hay diferencia estadística. Las pruebas fueron realizadas con una significancia a ($p < 0,05$).

En el cuadro 7 se puede observar el rendimiento de polifenoles en mg/g que se obtuvieron de la extracción por cada 20 gramos de muestra empleada. No se presentó una diferencia significativa entre las localidades de San Jerónimo y Tortuga; por otro lado, la localidad de Estanque de León sí presenta diferencias significativas con las otras dos localidades.



Figura 11. Polifenoles purificados.

En este sentido, Cortés (2021) reportó para tres diferentes localidades, un total de fenoles (mg/mL) de 4.41 ± 0.052 , 4.28 ± 0.008 y 4.54 ± 0.030 , dicha extracción se realizó con las partes aéreas de la planta, incluyendo hojas y flores, las cuales se molieron y se almacenaron en una solución de agua – etanol siguiendo las condiciones descritas por Flores – Martínez, y la cuantificación de los fenoles totales se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu; se encontraron diferencias significativas con las muestras de las tres localidades, las diferencias son atribuibles a la variación en la metodología empleada, así como a las partes de la planta usadas.

Por otro lado, Domínguez (2012) reporta, en estudios basados en extracto acuoso, un rendimiento, para muestras de tres estados diferentes, de 357.15 ± 11.84 , 397.99 ± 22.02 y 406.96 ± 15.14 mg/mL, presentando diferencias significativas con nuestros datos. También, Zavala-Nigoa, en un estudio realizado en extracto acuoso, para tres estados diferentes, observaron un rendimiento de 231.56 ± 2.50 , 211.01 ± 1.90 y 186.52 ± 0.72 mg/g de extracto liofilizado, estas diferencias de rendimientos pueden asociarse al método empleado para la extracción, así como la localidad de procedencia del material vegetal.

4.3 Análisis de la actividad antioxidante

Análisis de Actividad antioxidante				
Localidad	DPPH [*]	ABTS ^{*+}	FRAP	
	(IC ₅₀ , μg/mL ⁻¹)	(IC ₅₀ , μg/mL ⁻¹)	mE Ácido Gálico	
			25 μg/mL ⁻¹	50 μg/mL ⁻¹
San Jerónimo	37.205±0.850 c	14.598±1.424 c	31.363±0.612 a	43.765±1.060 a
Tortuga	51.935±0.42 a	21.131±0.466 b	30.088±2.196 a	44.696±1.188 a
Estanque de León	44.517±0.583 b	22.191±0.52 a	25.823±0.255 b	33.568±0.225 b

Tabla 8. Análisis de Actividad antioxidante. *Letras iguales significan que no hay diferencia estadística. Las pruebas fueron realizadas con una significancia a ($p < 0,05$).

La actividad antioxidante de la muestra empleada fue obtenida mediante ensayos ABTS^{*+}, DPPH^{*} y FRAP, de los cuales cada una de las muestras fue realizada por triplicado.



Figura 12. Calibración de espectrofotómetro.

4.3.1 Análisis de la capacidad de eliminación de radicales DPPH*

En la tabla 8 se muestran los valores reportados como la concentración media inhibitoria (IC_{50}) obtenida para cada una de las localidades. La que tuvo el menor IC_{50} fue San Jerónimo con un valor de $37.205 \pm 0.850 \mu\text{g/mL}^{-1}$, lo que nos refleja que la planta de esta localidad presenta una mayor capacidad antioxidante, seguida por Estanque de León con $44.517 \pm 0.583 \mu\text{g/mL}^{-1}$, y por último Tortuga con $51.935 \pm 0.42 \mu\text{g/mL}^{-1}$, esta es la que menos capacidad antioxidante, por este método, presenta. Se presentaron diferencias estadísticas entre las tres localidades.

Soto-Hernández (2007) observó la actividad antioxidante en los extractos de tallo de orégano, en extracto de metanol a una concentración de 10 mg/L^{-1} presenta 13.4%, el cual se relaciona con el porcentaje de inhibición obtenido a $20 \mu\text{g/mL}^{-1}$, de 16.98 ± 0.98 , por la localidad de Tortuga. En este sentido Soto-Hernández reportó valores similares con un extracto acuoso liofilizado; un IC_{50} de 31.83 ± 3.94 , resultado similar al obtenido por San Jerónimo (37.205 ± 0.850). Martínez-Rocha (2007), reportó para plantas de orégano, de Guanajuato, Puebla y Querétaro, un IC_{50} de 207.96 ± 1.43 , 172.58 ± 1.47 y $152.76 \pm 1.48 \mu\text{g/mL}^{-1}$ respectivamente. Las diferencias observadas pueden atribuirse a las partes de la planta empleadas o tipo de extracto. Por ejemplo, Martínez-Rocha, (2007) utilizó un extracto metanólico libre de aceite, lo que pudo afectar la capacidad antioxidante, viéndose reducida y requiriendo una mayor concentración. Otros factores a considerar son el estado de desarrollo o ambiente de las muestras.

4.3.2 Análisis de la capacidad de la técnica de determinación del poder de reducción de hierro (FRAP)

En el análisis FRAP se obtuvieron resultados para una concentración de 25 ppm donde no existió diferencia significativa entre lo obtenido por la localidad de San Jerónimo y Tortuga; se presentó una diferencia significativa entre la localidad de Estanque de León y las otras dos localidades. Para la concentración de 50 ppm, no se presentaron diferencias significativas entre las localidades de San Jerónimo y Tortuga; sin embargo, la localidad de Estanque de León presentó una diferencia significativa en comparación con las otras dos localidades. En **la tabla 8** se observa que la localidad Tortuga a una concentración de 50 ppm presenta la

mayor capacidad antioxidante con un porcentaje de inhibición de 44.6961 ± 1.1886 , lo cual mostró una variación del 50% más con la concentración de 25 ppm, en la cual se obtuvo 30.0882 ± 2.1961 .

La localidad Estanque de León es la que presenta la actividad antioxidante más baja en ambas concentraciones a diferencia de las otras dos localidades, a 25 ppm obtuvo un porcentaje de inhibición de 25.8235 ± 0.2547 y a 500 ppm 33.5686 ± 0.2246 , difiriendo de las otras dos localidades.

4.3.4 Análisis de la capacidad de la técnica de determinación de inhibición de radicales ABTS^{•+}

En el cuadro 8 podemos observar los valores reportados para el IC₅₀, se puede observar que la localidad con un menor IC₅₀ es San Jerónimo, con $14.598 \pm 1.424 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, lo que representa que, a una muy baja concentración, puede inhibir los radicales ABTS^{•+}, teniendo una gran capacidad antioxidante. Este resultado es seguido por la localidad de Tortuga con $21.131 \pm 0.466 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ y finalmente Estanque de León con $22.191 \pm 0.52 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, Dentro de las pruebas estadísticas, se observó una variabilidad significativa entre las tres localidades. La localidad de San Jerónimo es la que presenta una mayor capacidad antioxidante, ya que, se usaron concentraciones menores a las empleadas por las otras dos localidades.



Figura 13. Muestras para análisis ABTS^{•+}

4.4 Análisis por espectroscopia Infrarroja Transformada de Fourier (FTIR)

En el siguiente análisis se observan las lecturas de absorbancia obtenidas en cada una de las tres localidades. En la figura 8, se pueden observar once picos a los cuales se les atribuye un grupo funcional, y en el cuadro 11 podemos observar los valores de las lecturas.

Se ha reportado que dentro de los rangos de $3300 - 3000 \text{ cm}^{-1}$, la señal determina la existencia del grupo funcional OH, principalmente en compuestos alifáticos, alcohólicos aromáticos y fenólicos hidrogenados (Bautista – Hernández *et al.* 2021). Barbieri 2018 reporta la señal a 2928 cm^{-1} el estiramiento del grupo C – H. Por otro lado, Rincón *et. al.* 2021, asociaron la señal entre 2924 y 2853 cm^{-1} a los grupos CH_2 relacionados con cadenas de hidrocarburos de lípidos o ligninas.

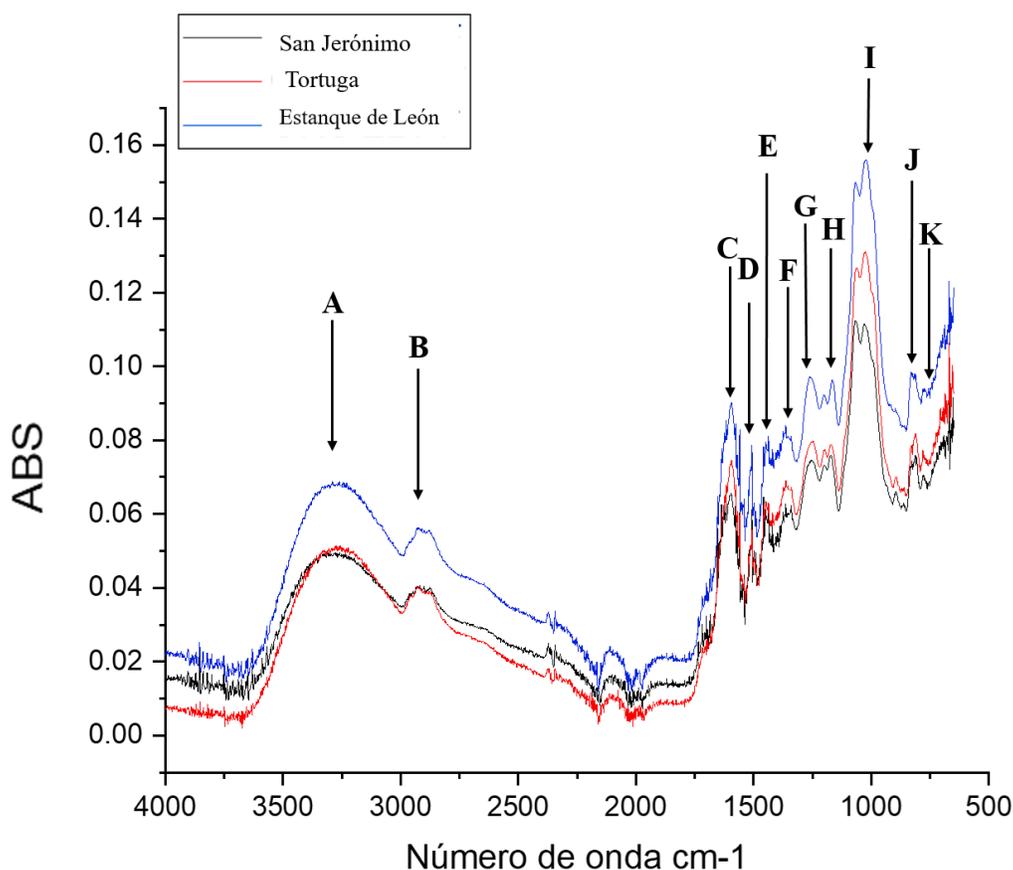


Figura 14. Espectro infrarrojo de polifenoles purificados de orégano (*Lippia graveolens*).
**La longitud de onda está dada en cm^{-1}

La señal cercana a 1600 cm^{-1} indica la presencia del estiramiento de $\text{C}=\text{O}$ y los grupos aromáticos $\text{C}=\text{C}$, como los compuestos fenólicos. Así como entre las señales de 1500 y 1400

cm⁻¹ corresponden al alargamiento de los grupos carbonilo. Para las señales entre 1300 y 1100 cm⁻¹ el estiramiento del C-O para fenoles, Rincón *et. al* (2021), asociaron las señales entre 1373 – 1249 cm⁻¹ a estructuras con polisacáridos con la flexión del metilo fuera del plano a 1377 – 1035 cm⁻¹. La señal de 1200 cm⁻¹ se le atribuye al grupo O – H para la deformación de polifenoles, así como el grupo funcional de alcoholes C-O-H se encuentra entre las bandas 1150 y 1000 cm⁻¹ (Bautista – Hernández *et. al.*, 2021). Barbieri reporta para las bandas entre 1154 y 1026 cm⁻¹ la presencia del estiramiento del grupo C – O – C. Por otro lado, Rincón-López reporta que la señal de 1027 cm⁻¹ se encuentra dentro del rango de 1100 – 100 cm⁻¹, que está asociado al grupo funcional C-O-H de los alcoholes.

Farag *et. al.* (2018), reporta señales características debidas a la agitación de los grupos CH y CH₂, en donde a 813 cm⁻¹ se le atribuye *p*-cymeno. Las señales de 813 y 779 cm⁻¹ se encuentran dentro del rango de 900 -600 cm⁻¹ en donde Ahmed *et. al.* 2009, reporta una flexión dentro del plano de C-H.

FT-IR	
Clave	cm⁻¹
A	3269 cm ⁻¹
B	2925 cm ⁻¹
C	1596 cm ⁻¹
D	1506 cm ⁻¹
E	1467 cm ⁻¹
F	1363 cm ⁻¹
G	1254 cm ⁻¹
H	1170 cm ⁻¹
I	1025 cm ⁻¹
J	813 cm ⁻¹
K	779 cm ⁻¹

Tabla 11. Señales identificadas en el espectro infrarrojo de polifenoles purificados de orégano (*Lippia graveolens*). **La longitud de onda está dada en cm⁻¹

5. CONCLUSIONES

El presente estudio demostró el potencial que tiene la planta de orégano (*Lippia graveolens*) como una fuente importante potencial de compuestos polifenólicos con actividad antioxidante que puede tener aplicaciones biotecnológicas, alimentarias, entre otras.

La extracción de polifenoles tuvo mayor rendimiento en el ejido Tortuga (12.21 ± 0.24 mg/g) en comparación con las localidades de San Jerónimo y Estanque de León.

El ejido que presentó San Jerónimo ⁺presentó la mayor capacidad antioxidante respecto a ABTS^{•+} (el IC_{50} 14.598 ± 1.424 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) y DPPH[•] (IC_{50} 37.205 ± 0.850 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$). En el caso de FRAP, observamos que los resultados más altos los obtuvo la localidad de Tortuga. Se obtuvo 44.6961 ± 1.1886 de inhibición a una concentración de 50ppm.

Con el análisis mediante FTIR se logró identificar a los diferentes grupos funcionales que se encuentran en la planta de orégano. Se identificaron once señales, entre las que destacan la de 1600 cm^{-1} asociada a grupos aromáticos de compuestos fenólicos y la de 1025 cm^{-1} , asociada al grupo funcional C-O-H en alcoholes.

6. REFERENCIAS

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1990. Official methods of analytical chemist. Arlington, Virginia. Association of Official Analytical Chemists.
- Aquino-López, J. L., Chávez-Martínez, A., García-Macías, J. A., Méndez-Zamora, G., Rentería-Monterrubio, A. L., Dalle-Zotte, A., & García-Flores, L. R. (2020). El aceite esencial y bagazo de orégano (*Lippia berlandieri* Schauer) afectan el comportamiento productivo y la calidad de la carne de conejo. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 11(3), 701-717.
- Arcila-Lozano, Cynthia Cristina, Loarca-Piña, Guadalupe, Lecona-Urbe, Salvador, & González de Mejía, Elvira. (2004). El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(1), 100-111. Recuperado en 31 de marzo de 2021, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222004000100015&lng=es&tlng=es
- Barbieri, N., Sanchez-Contreras, A., Canto, A., Cauich-Rodriguez, J. V., Vargas-Coronado, R., & Calvo-Iraben, L. M. (2018). Effect of cyclodextrins and Mexican oregano (*Lippia graveolens* Kunth) chemotypes on the microencapsulation of essential oil. *Industrial Crops and Products*, 121(December 2017), 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.081>
- Baker, M. J., Trevisan, J., Bassan, P., Bhargava, R., Butler, H. J., Dorling, K. M., Fielden, P. R., Fogarty, S. W., Fullwood, N. J., Heys, K. A., Hughes, C., Lasch, P., Martin-Hirsch, P. L., Obinaju, B., Sockalingum, G. D., Sulé-Suso, J., Strong, R. J., Walsh, M. J., Wood, B. R., ... Martin, F. L. (2014). Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. *Nature Protocols*, 9(8), 1771–1791. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.110>
- Bautista-Hernández, I., Aranda-Ledesma, N. E., Rojas, R., Tafolla-Arellano, J. C., & Martínez-Ávila, G. C. G. (2021). Antioxidant activity of polyphenolic compounds obtained from *Euphorbia antisyphilitica* by-products. *Heliyon*, 7(4). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06734>

- Bedoya Vergara, C. (2016). Metodologías para el análisis bromatológico, físico y químico del cacao fermentado y seco, dentro del marco normativo internacional (Licenciatura). Facultad de Ingeniería.
- Bedoya, O. A., Pantoja, D., & Santacruz, L. (2012). Actividad antioxidante del aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides hbk*) del alto Patia. Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, 10(2), 79-86.
- Bueno, A. (2014). Estimulación abiótica de la acumulación de compuestos bioactivos en dos especies de *Lippia* (Doctor). Centro De Investigación Y Asistencia En Tecnología Y Diseño Del Estado De Jalisco, A.C.
- Bueno, A. (2014). Estimulación abiótica de la acumulación de compuestos bioactivos en dos especies de *Lippia* (Doctor). Centro De Investigación Y Asistencia En Tecnología Y Diseño Del Estado De Jalisco, A.C.
- Casillas-Alcalá, C. (1992). El orégano en México: panorama del primer exportador mundial. ITESO.
- Castillo, I. O., Almazán, A. J. S., Arellano, J. D. J. E., & Vázquez, C. V. (2017). Recoleccion Y Comercializacion Del Oregano (*Lippia spp*) En El Semi-Desierto Mexicano, Un Caso De Estudio: Reserva Ecologica Municipal Sierra Y Cañon De Jimulco, Mexico. Revista Mexicana de Agronegocios, 41(1345-2018-028), 684-695.
- CASTILLO-HERRERA, G. A., GARCÍA-FAJARDO, J. A., & ESTARRÓN-ESPINOSA, M. I. R. N. A. (2007). Extraction method that enriches phenolic content in oregano (*Lippia graveolens HBK*) essential oil. *Journal of Food Process Engineering*, 30(6), 661-669.
- Comisión Nacional Forestal (Conafor).2017. Programa PRODEFOR. Plan de Manejo Forestal y Estudios Técnicos Justificativos. Saltillo Coahuila, México.http://www.sema.gob.mx/SRN/DESCARGABLES/PROGRAMA ESTRATEGICO FORESTAL_2005-2025.pdf (20 de enero de 2017).O
- Corona Gonzáles, D., & Garduño Robles, F. (2016). Calidad bromatológica de líneas avanzadas de trigo (*Triticum aestivum L.*) evaluadas en tres localidades del valle de toluca (Licenciatura). Universidad Autónoma del Estado de México.

- Cortés-Chitala, M. D. C., Flores-Martínez, H., Orozco-Ávila, I., León-Campos, C., Suárez-Jacobo, Á., Estarrón-Espinosa, M., & López-Muraira, I. (2021). Identification and Quantification of Phenolic Compounds from Mexican Oregano (*Lippia graveolens HBK*) Hydroethanolic Extracts and Evaluation of Its Antioxidant Capacity. *Molecules*, 26(3), 702.
- Dwyer J., 2006, Starting down the right path: nutrition connections with chronic diseases of later life, *American Journal of Clinical Nutrition*, 83(2S): 415S-420S.
- Farag, N. F., El-Ahmady, S. H., Abdelrahman, E. H., Naumann, A., Schulz, H., Azzam, S. M., & El-Kashoury, E. S. A. (2018). Characterization of essential oils from Myrtaceae species using ATR-IR vibrational spectroscopy coupled to chemometrics. *Industrial Crops and Products*, 124(June), 870–877. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.066>
- Fay Vásquez, F. M., & Zumbado Fernández, H. (2019). Análisis proximal en alimentos. Fundamentos teóricos y técnicas experimentales.
- Flores-Martinez, H., León-Campos, C., Estarron-Espinosa, M., & Orozco-Avila, I. (2016). Process optimization for the extraction of antioxidants from mexican oregano (*Lippia graveolens HBK*) by the response surface methodology (RSM) approach. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 15(3), 773-785.
- Gallina-Tessaro, S. (Ed.). (2019). *Ecology and Conservation of Tropical Ungulates in Latin America*. Springer International Publishing.
- García-Pérez, E., Fernando Francisco, C. Á., Gutiérrez-Uribe, J. A., & García-Lara, S. (2012). Revisión de la producción, composición fitoquímica y propiedades nutraceuticas del orégano mexicano. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 3(2), 339-353.
- Gonzalez Guereca, M. C., Hernandez, M. S., Kite, G., & Martinez Vazquez, M. (2007). Antioxidant activity of flavonoids from the stem of the Mexican oregano (*Lippia graveolens HBK* var. *berlandieffi* Schauer). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30(1), 43-49.
- Gutiérrez-Grijalva, E. P., Angulo-Escalante, M. A., León-Félix, J., & Heredia, J. B. (2017). Effect of in vitro digestion on the total antioxidant capacity and phenolic content of 3

species of oregano (*Hedeoma patens*, *Lippia graveolens*, *Lippia palmeri*). Journal of food science, 82(12), 2832-2839.

Gutiérrez-Grijalva, E. P., Picos-Salas, M. A., Leyva-López, N., Criollo-Mendoza, M. S., Vazquez-Olivo, G., & Heredia, J. B. (2018). Flavonoids and phenolic acids from oregano: Occurrence, biological activity and health benefits. *Plants*, 7(1), 2.

Juárez-Rosete, C., Aguilar-castillo, J., Juárez-Rosete, M., Bugarín-Montoya, R., Juárez-López, P., & Cruz-Crespo, E. (2013). Herbs and Medicinal Plants in Mexico: Tradition &. *Bio Ciencias*, 2(3), 119–129.

Lin, L. Z., Mukhopadhyay, S., Robbins, R. J., & Harnly, J. M. (2007). Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis. *Journal of food composition and analysis*, 20(5), 361-369.

Luo, S., Tian, J., Liu, Z., Lu, Q., Zhong, K., & Yang, X. (2020). Rapid determination of styrene-butadiene-styrene (SBS) content in modified asphalt based on Fourier transform infrared (FTIR) spectrometer and linear regression analysis. *Measurement: Journal of the International Measurement Confederation*, 151, 107204. <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2019.107204>

Martínez D. M. 1993. Guía para el aprovechamiento del orégano *Lippia berlandieri Schauer* para su aprovechamiento en el norte de Jalisco. Folleto técnico No. 2. INIFAP. SAGAR. Guadalajara Jalisco. 16 p.

Martínez-Hernández, R., Villa-Castorena, M. M., catalán-Valencia, E. A., & Inzunza-Ibarra, M. A. (2017). Production of oregano (*Lippia graveolens Kunth*) seedling from seeds in nursery for transplanting. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 23(1), 61-73.

Martínez-Natarén, D. A., Parra-Tabla, V., Ferrer-Ortega, M. M., & Calvo-Irabién, L. M. (2014). Genetic diversity and genetic structure in wild populations of Mexican oregano (*Lippia graveolens H.B.K.*) and its relationship with the chemical composition of the essential oil. *Plant Systematics and Evolution*, 300(3), 535–547. <https://doi.org/10.1007/s00606-013-0902-y>

- Martínez-Rocha, A., Puga, R., Hernández-Sandoval, L., Loarca-Piña, G., & Mendoza, S. (2008). Antioxidant and antimutagenic activities of Mexican oregano (*Lippia graveolens Kunth*). *Plant foods for human nutrition*, 63(1), 1-5.
- Muedas Taipe, G., La Rosa Toro Gómez, A., & Robles Caycho, J. (2008). Evaluación Electroquímica de la actividad antioxidante del extracto alcohólico de la *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 74(4), 233-246.
- Pastor, J., Jawhari, T. & Merino, J. (2013). Caracterización de materiales polímeros mediante la utilización de la microespectroscopia vibracional (Raman, Ftir Y Ft-Raman). *Revisa Iberoamericana de Polímeros*, 4, -.
- Peter, T. O., & Tolulope, A. O. (2015). Proximate analysis and chemical composition of *cortinarius* species. *European Journal of Advanced Research in Biological and Life Sciences*, 3(3), 1-9.
- Pineda, G., & Rivera, E. (2016). Determinacion del analisis bromatologico proximal y minerales en pupusas a base de *zea mays* (maiz), comercializadas dentro y en los alrededores del campus central de la universidad de el salvador. (Licenciatura). Universidad del Salvador.
- Piqué, T. M., & Vázquez, A. (2012). Uso de Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) en el estudio de la hidratación del cemento. *Concreto y cemento. Investigación y desarrollo*, 3(2), 62-71.
- Quiroz Velásquez, J. D. C., Reyes Lara, M., García Olivares, J. G., Salazar Bravo, Á., Bazán Cruz, B. E., & Hernández Mendoza, J. L. (2016). Factores climáticos, geográficos y fisiográficos que contribuyen a la distribución potencial del orégano (*Lippia spp.*) en México. *Investigación y Ciencia de La Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 69, 21–25. <https://doi.org/10.33064/iycuaa2016691862>
- Ramírez, M. I. N., Trejo, J. F. G., Pérez, A. A. F., González, R. G. G., & Pacheco, B. P. (2019). Efecto del riego, temperatura y humedad ambiental sobre compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante en orégano. *Revista Perspectivas de la Ciencia y la Ingeniería*, 2(3), 58-67.

- Ríos Reyes, R. (2010). Comparación de los perfiles de flavonoides de orégano (*Lippia graveolens* HBK. s.l.) de varias poblaciones del Estado de Durango (Maestría). Instituto Politécnico Nacional.
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of functional foods*, 18, 757-781.
- Sotelo, L., Alvis, A., & Arrázola, G. (2015). Evaluación de epicatequina, teobromina y cafeína en cáscaras de cacao (*Theobroma cacao* L.), determinación de su capacidad antioxidante. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 9(1), 124-134.
- Soto-Armenta, L. C., Sacramento-Rivero, J. C., Ruiz-Mercado, C. A., Lope-Navarrete, M. C., & Rocha-Uribe, J. A. (2019). Extraction yield and kinetic study of *Lippia graveolens* with supercritical CO₂. *The Journal of Supercritical Fluids*, 145, 205-210.
- Soto-Domínguez, A., García-Garza, R., Ramírez-Casas, Y., Morán-Martínez, J., & Serrano-Gallardo, L. B. (2012). El extracto acuoso de orégano (*Lippia graveolens* HBK) del norte de México tiene actividad antioxidante sin mostrar un efecto toxico in vitro e in vivo. *International Journal of Morphology*, 30(3), 937-944.
- Trevisan, M. T., Marques, R. A., Silva, M. G., Scherer, D., Haubner, R., Ulrich, C. M., & Owen, R. W. (2016). Composition of essential oils and ethanol extracts of the leaves of *Lippia* species: identification, quantitation and antioxidant capacity. *Records of Natural Products*, 10(4), 485.
- Velásquez, J. D. C. Q., Lara, M. R., Olivares, J. G. G., Bravo, Á. S., Cruz, B. E. B., & Mendoza, J. L. H. (2016). Factores climáticos, geográficos y fisiográficos que contribuyen a la distribución potencial del orégano (*Lippia spp.*) en México. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, (69), 21-25.
- Waksman, S. A., & Stevens, K. R. (1930). A system of proximate chemical analysis of plant materials. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, 2(2), 167-173.
- Zavala-Nigoa, J., Loarca-Piña, G., & García-Gasca, T. (2006). Evaluación del contenido fenólico, capacidad antioxidante y actividad citotóxica sobre células CaCo-2 del extracto acuoso de orégano (*Lippia graveolens kunth*). Querétaro, México, 4.

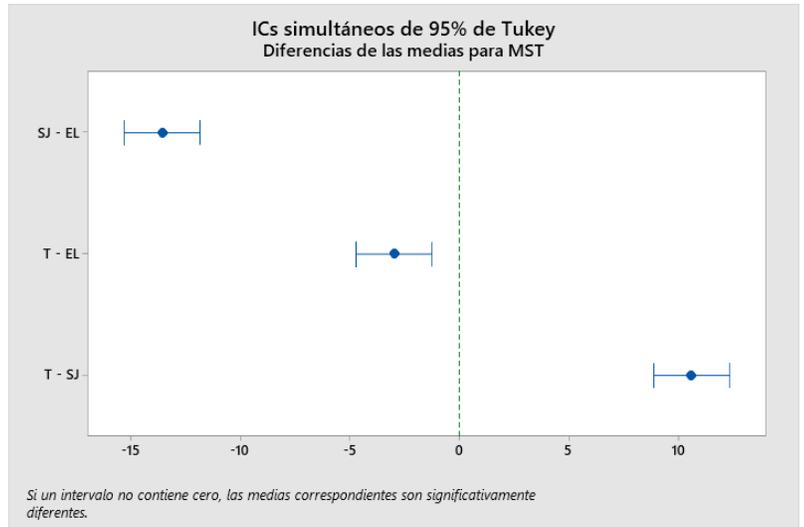
7. ANEXOS

Resultado de análisis estadístico

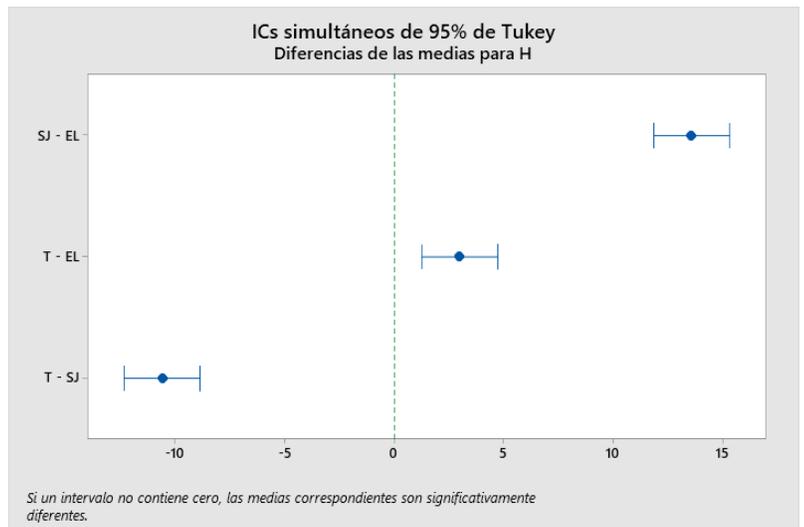
Correlación entre variables

7.1 Comparación de medias de los análisis químicos proximales

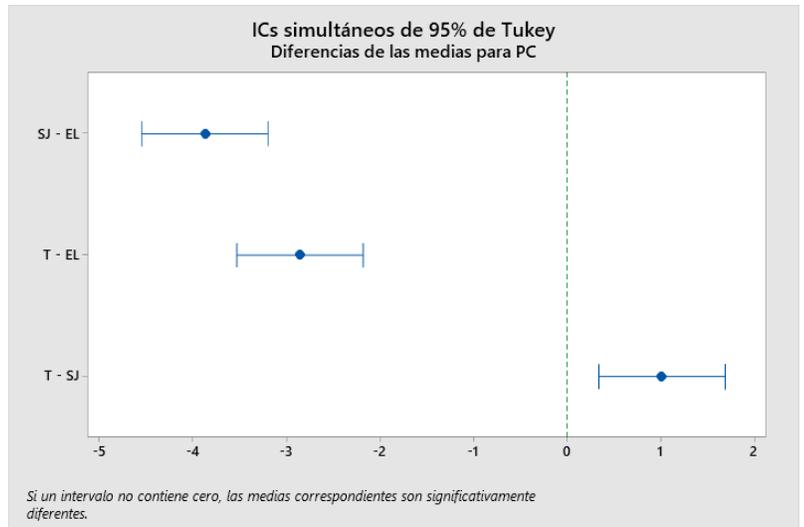
7.1.1 % Materia Seca Total



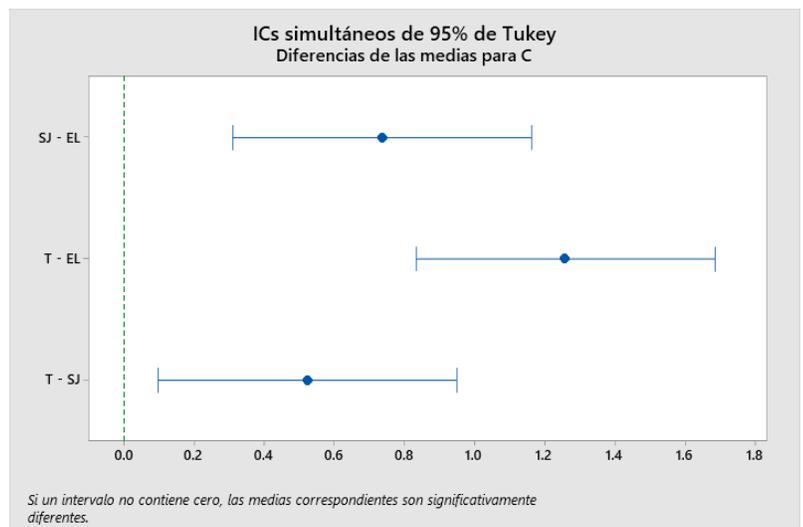
7.1.2 % Humedad



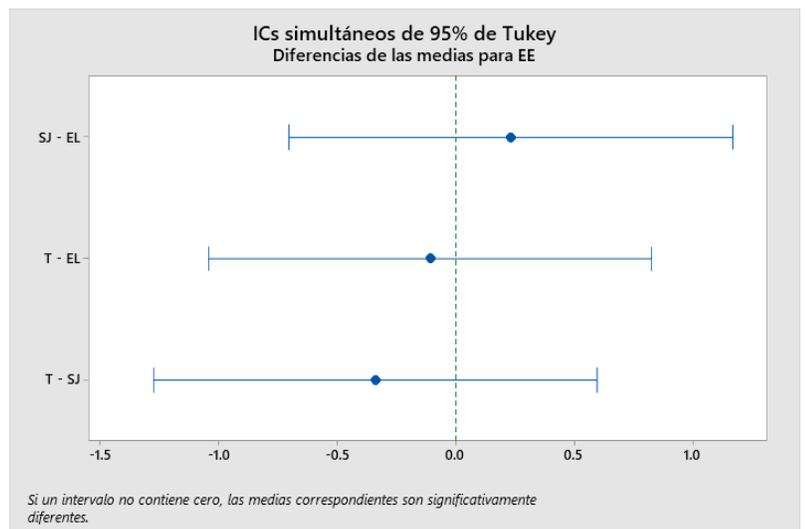
7.1.3 % Proteína Cruda



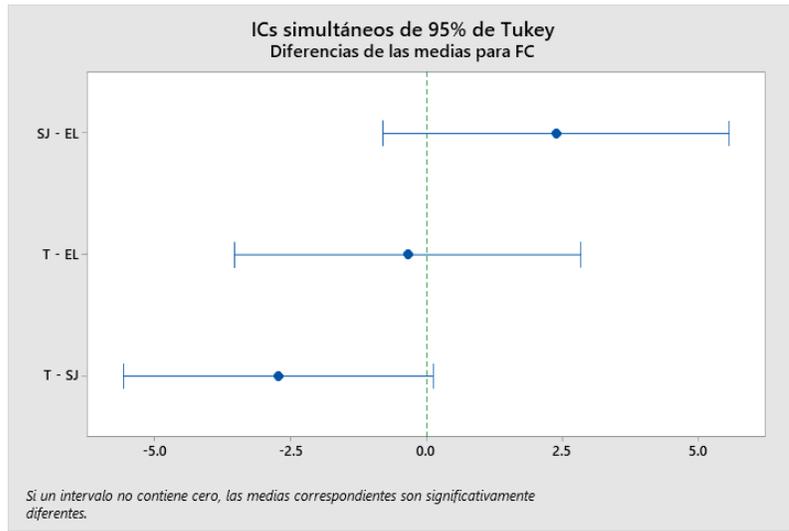
7.1.4 % Cenizas



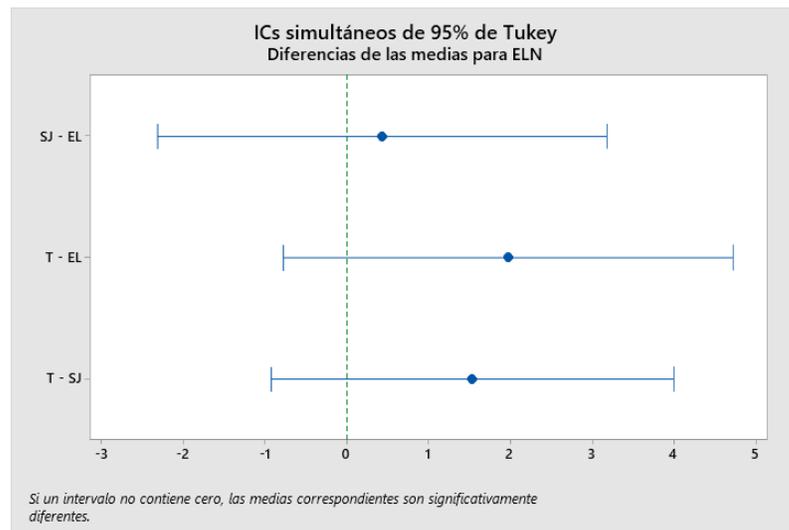
7.1.5 % Extracto Etéreo – Grasas



7.1.6 % Fibra Cruda



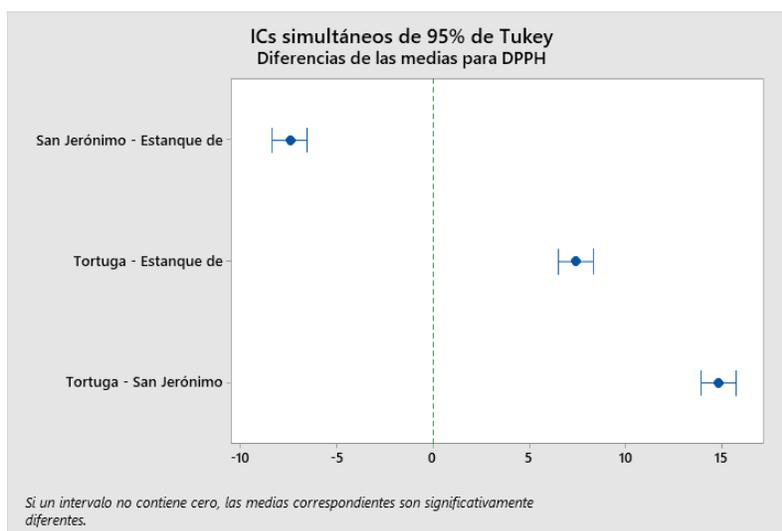
7.1.6 % Extracto Libre de Nitrógeno



7.2 Comparación de medias de técnicas antioxidantes

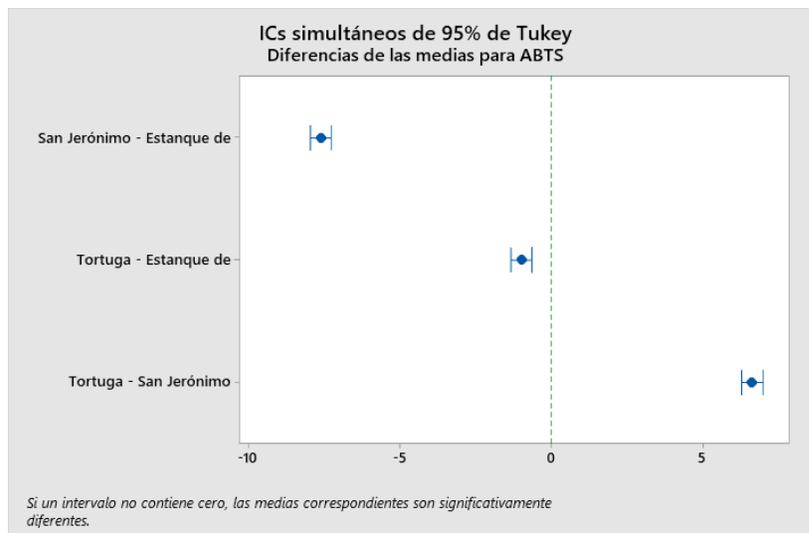
7.2.1 DPPH'

DPPH'								
Estanque de León			Tortuga			San Jerónimo		
<i>ppm</i>	%Inhibición	<i>mE</i>	<i>ppm</i>	%Inhibición	<i>mE</i>	<i>ppm</i>	%Inhibición	<i>mE</i>
0	0	-11.11±0.42	0	0	-11.11±0.42	0	0	4.806±3.61
20	26.53±0.52	45.98±1.11	20	16.98±0.98	25.43±2.11	20	22.93±0.28	53.958±0.61
30	37.81±0.51	70.26±1.09	30	31.54±0.32	56.75±0.69	30	40.05±0.28	90.657±0.61
40	46.09±0.91	88.07±1.95	50	48.48±0.48	93.21±1.03	40	56.06±0.32	124.971±0.69
50	52.21±0.79	101.25±1.7	100	95.69±0.13	194.79±0.27	50	67.24±1.68	148.951±3.61

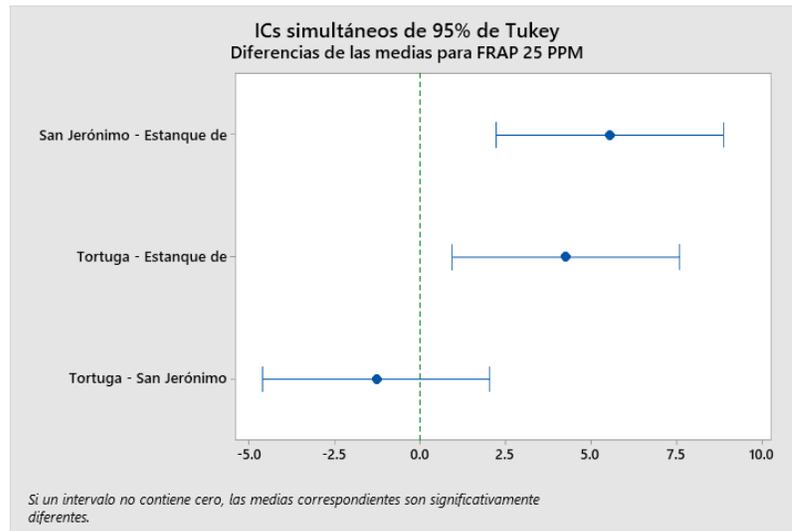


7.2.2 ABTS⁺

ABTS ⁺								
Estanque de León			Tortuga			San Jerónimo		
<i>ppm</i>	%Inhibición	<i>mE</i>	<i>ppm</i>	%Inhibición	<i>mE</i>	<i>ppm</i>	%Inhibición	<i>mE</i>
0	0±0.12	0.74±0.19	0	0±0.12	0.74±0.19	0	0±1.77	0.23±1.77
10	24.77±0.39	39.89±0.62	10	33.31±0.37	53.39±0.59	5	23.69±2.33	24.82±0.78
20	49.60±0.94	79.15±1.5	20	48.62±0.52	77.59±0.82	10	39.63±1.22	39.39±0.43
30	66.97±0.48	106.59±0.76	30	74.03±0.59	117.75±0.94	15	50.78±1.31	50.76±1.15
35	74.50±0.64	118.49±1.01	40	82.41±0.72	130.99±1.14	20	64.29±0.48	64.53±0.48



7.2.3 FRAP a 25 ppm



7.2.4 FRAP a 50 ppm

