



Universidad autónoma de Querétaro
Facultad de ingeniería

ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO
PARA INCREMENTAR LA PRODUCCION DE CARVACROL
EN ORÉGANO (*Lippia graveolens*)

Tesis

Que como parte de los requisitos para
obtener el grado de

Maestro en ciencias (Ingeniería de Biosistemas)

Presenta

Lic. María Isabel Nieto Ramírez

Dirigido por

Dr. Juan Fernando García Trejo

Querétaro, Qro. a Noviembre, 2019



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Maestría en Ciencias en Ingeniería de Biosistemas

ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO PARA INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DE CARVACROL EN ORÉGANO (*Lippia graveolens*)

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestro en Ciencias (Ingeniería de Biosistemas)

Presenta:

Lic. María Isabel Nieto Ramírez

Dirigido por:

Dr. Juan Fernando García Trejo

Dr. Juan Fernando García Trejo
Presidente

Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez
Secretario

Dr. Ramón Gerardo Guevara González
Vocal

Dra. Claudia Gutiérrez Antonio
Suplente

M. en C. Humberto Aguirre Becerra
Suplente

Centro Universitario Querétaro, Qro.
Noviembre, 2019
México.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgar el financiamiento de manutención y para el desarrollo de este proyecto de posgrado con el objetivo de la obtención del grado como maestro en ciencias.

Al laboratorio de bioingeniería del campus Amazcala de la facultad de ingeniería, especialmente al Dr. Juan Fernando García Trejo por su paciencia y apoyo académico y personal.

A mi comité sinodal, por sus consejos y correcciones en este camino científico.

A mi familia por el apoyo incondicional y por la paciencia de tener una integrante con aspiraciones científicas.

A mis amigas Vane y Montse por su paciencia y comprensión en los momentos de estrés y trabajo y por su apoyo incondicional.

A mis compañeros de laboratorio en general por su ayuda y comprensión en las actividades del laboratorio.

Dirección General de Bibliotecas UNQ

RESUMEN

Orégano es el nombre con el que se le conocen al menos a un grupo de 40 especies de plantas. Su principal uso es como condimento, sin embargo, también se le atribuyen propiedades medicinales para el tratamiento de enfermedades como diabetes, problemas gastrointestinales y como antiparasitario. Estas características se deben a los compuestos químicos, como antioxidantes que son generados por la planta y que se relacionan a diversos factores como la temperatura, la humedad, patógenos, entre otros. Uno de los principales compuestos del orégano es el carvacrol, compuesto de gran relevancia debido a su función como antimicrobiano. Debido a esto, el objetivo de este trabajo fue establecer las condiciones de cultivo que permiten incrementar la concentración de carvacrol en la planta. Para cumplir con este objetivo se realizó una búsqueda de los municipios del estado de Querétaro en donde se localiza de manera silvestre el orégano. Además se comparó la precipitación y la temperatura de cada municipio. Se obtuvieron muestras de las plantas silvestres de los municipios de Peñamiller, Tolimán y Cadereyta. También se cultivó plantas de orégano bajo condiciones de invernadero dentro de las instalaciones de la facultad de ingeniería en el campus Amazcala. Se realizó la cuantificación de los compuestos fenólicos y flavonoides totales, así como la capacidad antioxidante por los métodos DPPH y FRAP a cada una de las muestras de orégano silvestre y cultivado. Los resultados presentaron una mayor concentración de compuestos fenólicos en las plantas silvestres del municipio de Peñamiller. La concentración de flavonoides más alta se registró en las plantas pertenecientes a Cadereyta y la capacidad antioxidante más alta en las plantas de Tolimán.

Palabras clave; Carvacrol, Cultivo, Orégano.

ABSTRACT

Oregano is the Known name of at least 40 species of plants. It is mainly used as a condiment; however its medicinal properties have been demonstrated for the treatment of different diseases such as diabetes, gastrointestinal problems and as an antiparasitic. These characteristics are due to chemical compounds, such as antioxidants that are generated by the plant according to various factors such as temperature, humidity, pathogens, among others. One of the main oregano compounds is carvacrol, a compound of great relevance due to its function as an antimicrobial. Due to this, the aim of this work is to establish the culture conditions that allow increasing the concentration of carvacrol in the plant. To accomplish this aim, a search was made of the municipalities of the state of Querétaro where oregano is wildly located. Then, the precipitation and temperature of each municipality were compared. Samples were obtained from wild plants in the municipalities of Peñamiller, Tolimán and Cadereyta. Oregano plants were also grown under greenhouse conditions within the facilities of the engineering faculty of Amazcala campus. The quantification of the total phenolic and flavonoid compounds was determinate, as well as antioxidant activity by DPPH and FRAP methods to each of the wild and cultivated oregano samples. The results showed a higher concentration of phenolic compounds in wild plants of the municipality of Peñamiller. The highest flavonoid concentration was in the plants belonging to Cadereyta and the highest antioxidant activity in the Tolimán plants.

Key words; Carvacrol, Culture, Oregano

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
1. INTRODUCCIÓN	5
2. ANTECEDENTES	8
3. HIPÓTESIS	14
4. OBJETIVOS	14
4.1. GENERAL	14
4.2. ESPECÍFICOS	14
5. MATERIALES Y MÉTODOS	14
5.1. EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES	15
5.1.1. Búsqueda de <i>Lippia graveoles</i> en el estado de Querétaro	15
5.1.2. Evaluación de las condiciones ambientales por localidad	17
5.1.3. Material vegetal	17
5.1.4. Análisis del material vegetal	18
5.1.5. Extracción de compuestos bioactivos	18
5.1.6. Determinación de fenoles totales	18
5.1.7. Determinación de flavonoides totales	19
5.1.8. Determinación de capacidad antioxidante DPPH	20
5.1.9. Determinación de la capacidad antioxidante FRAP	20

5.1.10. Comparación de carvacrol	21
5.2. VALIDACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO	21
5.2.1. Diseño del sistema de producción	21
5.2.2. Monitoreo de las condiciones ambientales	22
5.3. Análisis estadístico	22
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
6.1. CONDICIONES AMBIENTALES	23
6.1.1. Orégano de la especie <i>Lippia graveolens</i> en el estado de Querétaro	23
6.1.2. Evaluación de las condiciones ambientales por localidad	23
6.1.3. Determinación de compuestos por localidad	32
6.1.4. Flavonoides totales	33
6.1.5. Capacidad antioxidante método DPPH	34
6.1.6. Capacidad antioxidante por el método FRAP	35
6.1.7. Comparación del contenido de carvacrol	35
6.2. VALIDACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO	39
6.2.1. Monitoreo de temperatura del cultivo en campo e invernadero	39
6.2.2. Establecimiento de la temperatura ambiental	39
6.2.3. Determinación de compuestos específicos	41
7. CONCLUSIONES	45
8. REFERENCIAS	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Representación gráfica de la estructura química del carvacrol. Tomado de Isman, 2000	11
2. Demostración gráfica de las rutas biosintéticas de los terpenos (Tholl, 2006)	12
3. Diagrama general de las etapas realizadas para establecer las condiciones de cultivo del orégano (<i>Lippia graveolens</i>).	15
4. Diagrama ombrotérmico del municipio de Arroyo Seco. Se presenta el monitoreo de temperatura en grados Celsius (°C) y mm de precipitación. Datos obtenidos del Sistema Meteorológico Nacional.	24
5. Diagrama ombrotérmico del municipio de Cadereyta. Se presenta el monitoreo de temperatura en grados Celsius (°C) y mm de precipitación. Datos obtenidos del Sistema Meteorológico Nacional.	25
6. Diagrama ombrotérmico del municipio de Peñamiller. Se presenta el monitoreo de temperatura en grados Celsius (°C) y mm de precipitación. Datos obtenidos del Sistema Meteorológico Nacional.	26
7. Diagrama ombrotérmico del municipio de Jalpan de Serra. Se presenta el monitoreo de temperatura en grados Celsius (°C) y mm de precipitación. Datos obtenidos del Sistema Meteorológico Nacional.	27
8. Diagrama ombrotérmico del municipio de Landa de Matamoros. Se presenta el monitoreo de temperatura en grados Celsius (°C) y mm de precipitación. Datos obtenidos del Sistema Meteorológico Nacional.	27
9. Diagrama ombrotérmico del municipio de Tolimán. Se presenta el monitoreo de temperatura en grados Celsius (°C) y mm de precipitación. Datos obtenidos del Sistema Meteorológico Nacional.	28

10. Comparación de las temperaturas máximas y mínimas correspondientes a cada uno de los municipios del estado de Querétaro en donde se localiza *Lippia graveolens*. 29
11. Precipitación de cada uno de los municipios de Querétaro en donde se localiza la planta de orégano (*L. graveolens*). 30
12. Comportamiento de las temperaturas mínimas y máximas de las localidades de Peñamiller, Tolimán y Cadereyta en donde se localiza *Lippia graveolens* en el estado de Querétaro de acuerdo a los datos del Sistema Meteorológico Nacional. 31
13. Precipitación para los municipios de Peñamiller, Cadereyta y Tolimán pertenecientes al municipio de Querétaro en donde se localiza de manera silvestre la planta de orégano (*L. graveolens*). 31
14. Concentración de fenoles totales en plantas de orégano de dos diferentes localidades. Los resultados se muestran como la varianza individual ($p < 0.05$). 32
15. Concentración de flavonoides totales para las plantas de orégano cultivadas en dos localidades diferentes. Los resultados presentan la varianza individual ($p < 0.05$) 33
16. Capacidad antioxidante por el método DPPH en plantas de orégano de tres municipios de colecta diferentes. Los resultados se expresan como la varianza individual ($p < 0.05$). 34
17. Capacidad antioxidante por el método FRAP en plantas de orégano de dos localidades diferentes. Los resultados se expresan como la varianza individual ($p < 0.05$). 35
18. Monitoreo de temperatura en el cultivo de orégano (*Lippia graveolens*) en campo e invernadero. 39
19. Temperaturas máximas y mínimas de las localidades (sombreado). Temperaturas dentro del invernadero (línea morada), temperaturas en campo (línea negra). 40

20. Concentración de fenoles totales (mg eq. Ácido gálico/g peso seco) para las plantas de orégano cultivadas bajo condiciones ambientales en campo e invernadero. Los resultados se expresan como el error estándar. 42
21. Concentración de flavonoides totales (mg eq. Catequina/g peso seco) para las plantas de orégano cultivadas bajo condiciones ambientales en campo e invernadero. Los resultados se expresan como el error estándar. 43
22. Capacidad antioxidante por el método DPPH (mg eq. Trolox/g peso seco) para las plantas de orégano cultivadas bajo condiciones ambientales en campo e invernadero. Los resultados se expresan como el error estándar. 44
23. Capacidad antioxidante por el método FRAP (mg eq. Trolox/g peso seco) para las plantas de orégano cultivadas bajo condiciones ambientales en campo e invernadero. Los resultados se expresan como el error estándar. 45

1. INTRODUCCIÓN

Los compuestos activos que contienen las plantas son aquellas moléculas que le confieren sus propiedades aromáticas y terapéuticas. Estos compuestos activos, sintetizados en el metabolismo secundario, presentan un papel importante en la defensa química contra el daño de patógeno e incluso de herbívoros (Neilson y col., 2013); además, dichos compuestos activos son los responsables del color, aroma y sabor los alimentos que contienen este tipo de plantas (Asadi-Samani y col., 2018). Esta defensa química se atribuye a los compuestos fenólicos tales como los fenoles y flavonoides que presentan propiedades antioxidantes (Ávalos y col., 2009).

El cultivo de plantas medicinales cada vez es mayor debido al incremento de su uso con fines terapéuticos así como a la producción de fórmulas para productos de cuidado personal y salud (Soto-Armenta y col., 2019). El 40 % de la población mexicana usa plantas medicinales como la única alternativa para el tratamiento de enfermedades, siendo el principal recurso terapéutico (Fernández y col., 2008). Estas plantas pueden usarse con fines terapéuticos ya que los compuestos activos que contiene (Haidé-Quezada y col., 2011). Debido a la demanda de este tipo de plantas, actualmente se busca acelerar su producción y propagación, así como mejorar la concentración de los compuestos activos mediante el uso de elicitores (Moreno-Rodríguez y col., 2019; Muñoz-Miranda y col., 2019).

En particular, el carvacrol es un compuesto activo que presenta un grupo fenólico con un alto poder hidrofóbico siendo su estructura química un fenol monoterpénico. Este compuesto puede encontrarse en altas concentraciones (80-85 %) en el aceite esencial del orégano y del tomillo (Arrebola y col., 1994). El gran interés por este compuesto se debe a sus múltiples propiedades como antioxidante, antiespasmódico, antibacteriano, antiviral, anti-inflamatorio, promotor de crecimiento, entre otros (Alagawany y col., 2015). Además de ser

biosintetizado en plantas, actualmente se puede sintetizar de manera química y biotecnológica por ingeniería de vías metabólicas en microorganismos (More y col., 2007). La concentración de este componente puede ser modificado cuando el riego no cumple con los requerimientos de la planta y las condiciones ambientales no son favorables (Tezara y col., 2014). Así mismo, Bueno-Duran y col. (2013) demostraron un incremento en la concentración de carvacrol cuando la planta es estimulada con luz roja. En general, el carvacrol se encuentra en el aceite esencial en un porcentaje entre el 60-70 % en el orégano, y en un 45 % en el tomillo (Ultee y col., 2002).

Los aceites esenciales se producen en cantidades apreciables en las plantas aromáticas, que generalmente son hierbas o arbustos que poseen un fuerte y característico olor o fragancia y a menudo son atrayentes de insectos (More y col., 2007). Dichos compuestos pueden contener desde 50 hasta más de 300 sustancias compuestas por hidrocarburos terpénicos, sus derivados oxigenados, alcoholes, aldehídos y cetonas, así como éteres, ésteres, compuestos fenólicos, fenilpropanoides y otros derivados (Leung y col., 1996).

En México existe una extensa variedad de tratamientos fitoterapéuticos que forman parte de la herbolaria tradicional mexicana. El orégano, como parte de esta herbolaria tradicional, es una de las especies aromáticas que presentan mayor relevancia debido a sus notables propiedades medicinales, que se explican por su compleja composición química contenida en el aceite esencial (Huerta, 1997). El aceite esencial de orégano se caracteriza por el contenido de carvacrol, timol, y sus precursores como γ -terpineno y p-cimeno y sus derivados (Baser, 2002). El uso principal de esta planta es como condimento alimenticio, y actualmente se extrae su aceite esencial para el uso en la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética (Morton, 1981). Además, se usa terapéuticamente por su efecto anti-microbiano, anti-inflamatorio, anti-diarreico, anti-espasmódico, tratamiento contra enfermedades respiratorias, diabetes, desórdenes

menstruales, principalmente (Morton, 1981; Compadre y col., 1987; Dominguez, 1989). En la actualidad, se ha descubierto que esta planta sirve para el tratamiento y/o prevención de ciertas enfermedades tales como el cáncer. García y col (2017) demostraron el efecto de *Lippia graveolens* como foto-quimiprotector contra la radiación UVB que induce cáncer de piel, siendo los compuestos pinocembrina, naringenina y galangina los generadores de dicho efecto.

La recolección de orégano es una de las prácticas más comunes para su obtención, sin embargo, en algunas ocasiones resulta ilícita. Estudios relacionados demostraron que la intensidad de recolección de esta planta tiene un impacto en las poblaciones silvestres de *Lippia graveolens* (Verbenacea, Lamiales) en el semi-desierto de Querétaro, México (Osorno-Sánchez y col., 2012). Debido a esta problemática, se han realizado trabajos de domesticación de la planta. Uno de los primeros sistemas de producción fue a cielo abierto cultivando la planta a inicio del temporal de lluvia hasta antes de la etapa de floración (CONAFOR, 2009). También se implementaron paquetes tecnológicos para el manejo del orégano que son considerados como una forma de transmitir los conocimientos generados a los productores, y cuyo fin es el aporte innovador sobre prácticas silviculturales (CONAFOR, 2007). Estos manuales o paquetes tecnológicos describen las buenas prácticas de labranza y manejo del cultivo, como la temperatura, humedad relativa, pH del suelo y las condiciones de riego requeridos para el desarrollo correcto de la planta (Villavicencio y col., 2010; Aguillar-Murillo y col., 2013). Además, se ha buscado incrementar el rendimiento de producción de la planta. Flores y col. (2011) estudiaron el efecto de cultivo a tres niveles de humedad en plantas de orégano sobre el rendimiento de hojas y tallos consumibles; los resultados mostraron un mayor rendimiento cuando las plantas son cultivadas con una humedad de 2/3 de la capacidad de campo.

La producción comercial del orégano mexicano demanda homogeneidad, volumen y calidad. Sin embargo los conocimientos actuales se usan para una

producción intensiva sin evaluar la calidad del aceite esencial que está contenido en esa producción. Es por ello que se propone la búsqueda de las condiciones de cultivo de orégano que mejoren el rendimiento en materia seca con una alta calidad del aceite esencial, principalmente en la concentración de carvacrol.

2. ANTECEDENTES

El orégano es el nombre común al que se refieren a más de 40 especies de las familias Verbenaceae, Lamiaceae, Compositae y Leguminoseae; de estas, las de mayor demanda son el orégano mediterráneo o europeo (*Origanum vulgare*) y el orégano mexicano (*Lippia graveolens*, *Lippia palmeri*, *Lippia alba*) (Huerta, 1997).

El orégano mexicano (*Lippia graveolens*) es una planta aromática, perenne, arbustiva y leñosa que alcanza hasta 2.5 m de alto; esta desarrolla en promedio 1.2 m de follaje, sus hojas son opuestas, inflorescencia axilar o terminal, sus flores son pequeñas de color blanco, y los frutos son pequeñas cápsulas que contienen las semillas color café (Nash y col., 1984; Huerta, 1997). Los tallos a menudo adquieren una tonalidad rojiza, se ramifican en su parte superior, tienden a deshojarse en las partes inferiores, y contienen sustancias tánicas. Toda la planta posee unas pequeñas glándulas donde está almacenada la esencia aromática, de color amarillo limón, compuesta por dos tipos de fenoles, uno de ellos carvacrol y el otro timol (Villavicencio y col., 2010). El rango de concentración de carvacrol en *Lippia graveolens* va desde 0.1-74.37 % (Flores, 2009), aunque algunos autores han reportado hasta 72.2-83.49 % (Calvo-Irabién y col., 2014).

Esta especie habita en lugares poco accesibles como cerros, laderas y cañadas entre los 400 y 2000 m de altitud, aunque se le encuentra en mayor abundancia entre los 1,400 y 1,800 m de altitud (Huerta, 1997). Además, se adapta a condiciones muy variadas de clima árido y semiárido, con temperaturas que

varían desde 20 a 24°C, una precipitación de 182 – 267 mm (Huerta, 2005; Villavicencio y col., 2010), suelo pedregoso (García, 1973), de textura franco arenosa y un pH de 7.3 a 8.5 (Huerta, 2002).

La obtención de esta planta es principalmente de manera silvestre o recolección, que en algunas ocasiones resulta ilícita (Osorno-Sánchez y col., 2012). Debido a esta problemática, se han implementado paquetes tecnológicos para el manejo y producción del orégano; en dichos paquetes se describen las buenas prácticas de labranza y manejo de cultivo (temperatura, humedad relativa, pH del suelo y riego) (CONAFOR, 2009; Villavicencio y col., 2010; Aguillar-Murillo y col., 2013). Los requerimientos de agua para esta planta son mínimos, por lo que sólo se realizan dos o tres riegos al año dependiendo de la región de cultivo y la época de mayor demanda de la planta (Ortega, 1991). De acuerdo con Flores y col., (2011), los requerimientos de humedad para cultivar orégano deben ser a 2/3 de la capacidad de campo del suelo.

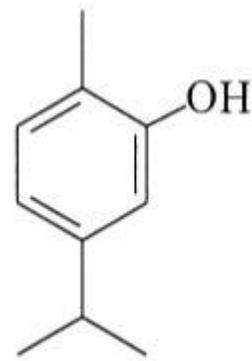
La siembra de orégano se realiza recolectando previamente la semilla cuando el fruto está seco y de color café, lo cual ocurre de noviembre a enero. Para su germinación se prepara una combinación de turba, perlita y vermiculita (80:10:10), para permitir un buen crecimiento de la plántula (Martínez-Hernández y col., 2017). Se puede realizar la propagación de la planta por diferentes métodos; por esquejes o estacas, utilizando ácido índole-butírico como enraizador (Corella y col., 2008). Para realizar esta práctica se deben hacer cortes de 15 cm de largo por rama, se retiran las hojas verdes inferiores y se colocan en charolas con sustrato. Otra de las técnicas de propagación es por cultivo de tejidos (propagación clonal), que permite la producción a gran escala de plantas con las mejores características (crecimiento vigoroso, mayor contenido de sustancias aromáticas, etc.) (Huerta, 1997).

En relación con los requerimientos nutrimentales, debido a que se cosecha la parte aérea de la planta, la demanda de nutrientes es mayor, siendo el nitrógeno

uno de los nutrientes elementales para su óptimo desarrollo. La fertilización en cultivo convencional se realiza principalmente en el suelo (Aguillar-Murillo y col., 2013). Además, se sabe que el tipo de fertilización que se aplique en el cultivo no interfiere en el crecimiento de la planta ni en la producción del aceite esencial. Sin embargo, el potencial bioactivo puede ser afectado dependiendo de la variedad de la planta (Teles y col., 2014).

Además de la propagación y mantenimiento de la planta, el sistema de producción implementado convencionalmente para el cultivo de orégano fue a cielo abierto realizando la plantación a inicio del temporal de lluvia manteniendo el cultivo hasta antes de la etapa de floración (CONAFOR, 2009). Mattana y col., (2017) trabajaron con diferentes temperaturas de germinación de *Lippia graveolens*, siendo la temperatura óptima de 15 °C con un porcentaje de germinación del 50 %. Estos estudios ayudan a determinar las condiciones para obtener mayor rendimiento de biomasa. Teles y col., (2014), estudiaron los requerimientos nutrimentales del orégano, obteniendo como resultado que la especie como tal no demanda una alta concentración de fertilización mineral. Sin embargo, los autores sugieren implementar abonos orgánicos como estimulación de la biosíntesis de compuestos.

En la actualidad, además de aumentar el rendimiento de producción del orégano, se ha buscado incrementar el contenido de compuestos específicos como el carvacrol o el timol. El carvacrol (Figura 1) es un fenol monoterpénico (5-isopropil-2-metilfenol) isómero del timol (5-metil-2-isopropilfenol); ambos fenoles tienen el mismo peso molecular, pero se diferencian en la posición del grupo hidroxil del anillo fenólico y en su ocurrencia física, es decir, el timol es cristalino y el carvacrol es líquido, siendo el carvacrol más volátil (Yanishlieva y col., 1999; Zheng y col., 2001; Burt, 2004; Vaiciulyte y col., 2016).



Carvacrol

Figura 1. Representación gráfica de la estructura química del carvacrol. Tomado de Isman, 2000

Una forma de separar a las plantas de orégano es por el compuesto químico mayoritario o también llamado quimio-tipo, es decir, el orégano se puede dividir en el quimio-tipo para el carvacrol o el quimio-tipo para el timol. De acuerdo con Calvo y col. (2014) las plantas de orégano con el quimio-tipo para el carvacrol se encuentran en las zonas con climas semi-áridos y templadas; lo anterior a diferencia de las plantas con el quimio-tipo para el timol que se encuentran en zonas menos áridas y más frías.

La biosíntesis de aceite esencial se realiza en los tricomas situados en las partes aéreas de la planta. Los tricomas glandulares consisten en un conjunto de células escritoras, con una cavidad subcuticular donde se acumula el aceite esencial (Crocchi y col., 2016). Los terpenos contenidos en el aceite esencial se sintetizan a partir de moléculas de cinco carbonos, por la vía plastídica metileritriol y la vía citosólica del mevalonato (Figura 2) (Gershenzon y Kreis, 1999).

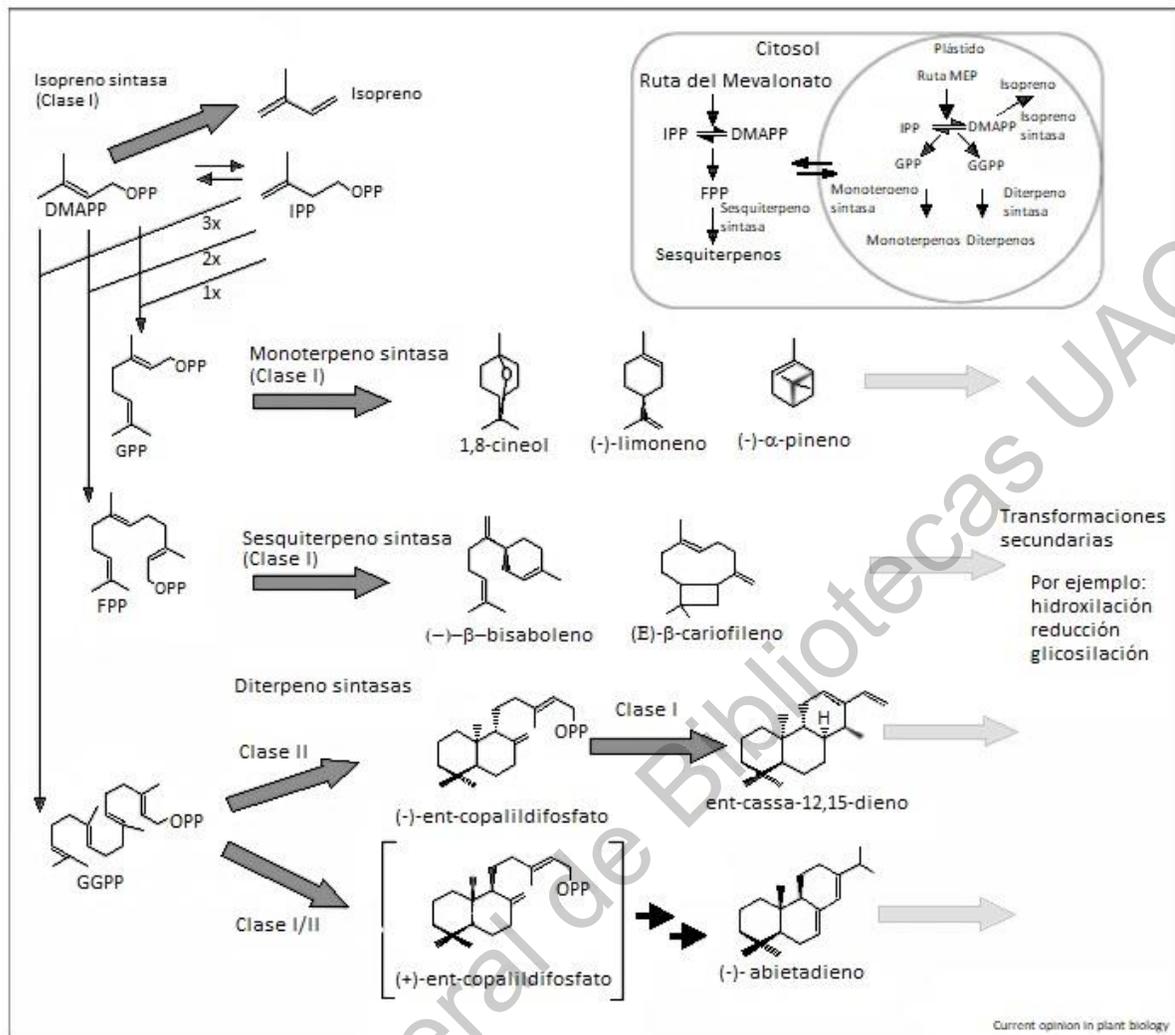


Figura 2. Demostración gráfica de las rutas biosintéticas de los terpenos (Tholl, 2006)

Los principales precursores de la formación de estos metabolitos son el difosfato geranil (GPP) y el difosfato farnesil (FPP). Estos precursores son transformados en estructuras básicas de terpenos por la actividad de enzimas terpeno sintasas. (Tholl, 2006). Monoterpenos como el carvacrol son derivados del difosfato isopentil (IPP) y de su isómeros difosfato dimetilalil (DMAPP). Estos compuestos son sintetizados en el citosol, en siete reacciones enzimáticas de la vía del mevalonato (Schaller y col., 1995).

Vargas-Mendoza y col., (2016) demostraron que la biosíntesis de carvacrol o timol (compuestos mayoritarios en la planta) depende de las condiciones ambientales, principalmente de la temperatura y humedad concluyendo que se debe a un proceso de adaptación local. Por otro lado, se ha demostrado el efecto meteorológico general (temperatura, lluvia, la radiación solar y su duración) sobre la acumulación de carvacrol en *Thymus pulegioides*, planta del mismo género que el orégano, resultando la mayor concentración de carvacrol entre los meses de Octubre y Diciembre, siendo este último el de la concentración más alta (Vaiciulyte y col., 2016).

Además del efecto generado por las diferentes condiciones de cultivo sobre la concentración de los compuestos activos, se ha demostrado un incremento en la concentración de carvacrol cuando la planta *Lippia graveolens* es estimulada con radiación Tezara y col., (2014). Así mismo, Bueno-Duran y col. (2013) demostraron un incremento en la concentración de carvacrol cuando la planta es estimulada con luz roja.

Conjuntamente, se ha estudiado el funcionamiento del orégano como planta medicinal. García y col., (2017) demostraron el efecto de *Lippia graveolens* como foto-quimiprotector contra la radiación UVB que induce cáncer de piel, siendo los compuestos pinocembrina, naringenina y galangia los generadores de dicho efecto. Asimismo, Potočnjak y Domitrović (2016) demostraron que el carvacrol puede disminuir el estrés oxidativo y la inflamación generada en daño renal, esto por la intervención del compuesto en rutas de señalización tal como ERK y PI3K/Akt. Por otro lado, una de las aplicaciones de este compuesto es como conservador en alimentos enlatados. Debido a esto, Ruiz-Cabello y col. (2016) demostraron la genotoxicidad que podía tener el carvacrol in vivo, es decir, cuando es ingerido. Los resultados demostraron que no hay ningún tipo de riesgo de genotoxicidad al ingerir el compuesto.

3. HIPÓTESIS

El cultivo de orégano (*Lippia graveolens*) bajo condiciones de invernadero como la temperatura, humedad y radiación modifica la ruta de biosíntesis de metabolitos secundarios como el carvacrol a diferencia del cultivo en condiciones de campo, debido a que en otras especies los niveles de carvacrol se incrementan cuando son cultivadas en alta temperatura, alta humedad y alta radiación.

4. OBJETIVOS

4.1. GENERAL

Establecer las condiciones de cultivo que permitan estandarizar la concentración de carvacrol en orégano (*Lippia graveolens*).

4.2. ESPECÍFICOS

- Evaluar las condiciones de cultivo de campo del orégano (*Lippia graveolens*)
- Establecer las condiciones de cultivo del orégano (*Lippia graveolens*) en el invernadero
- Análisis estadístico de los resultados obtenidos

5. MATERIALES Y MÉTODOS

El procedimiento para determinar las condiciones de cultivo para *L. graveolens* consistió en dos etapas. En la primera etapa se realizó la búsqueda de las localidades dentro del estado de Querétaro en donde se encuentra la planta; también se efectuó una revisión de las condiciones climatológicas en bases de datos para cada una de las localidades del estado de Querétaro y así poder establecer tres lugares de toma de muestra. La segunda etapa consistió en la toma de muestra vegetal en tres localidades, su conservación, el análisis de la

composición química, así como el análisis estadístico de cada resultado. Estas etapas se pueden observar en la Figura 3.

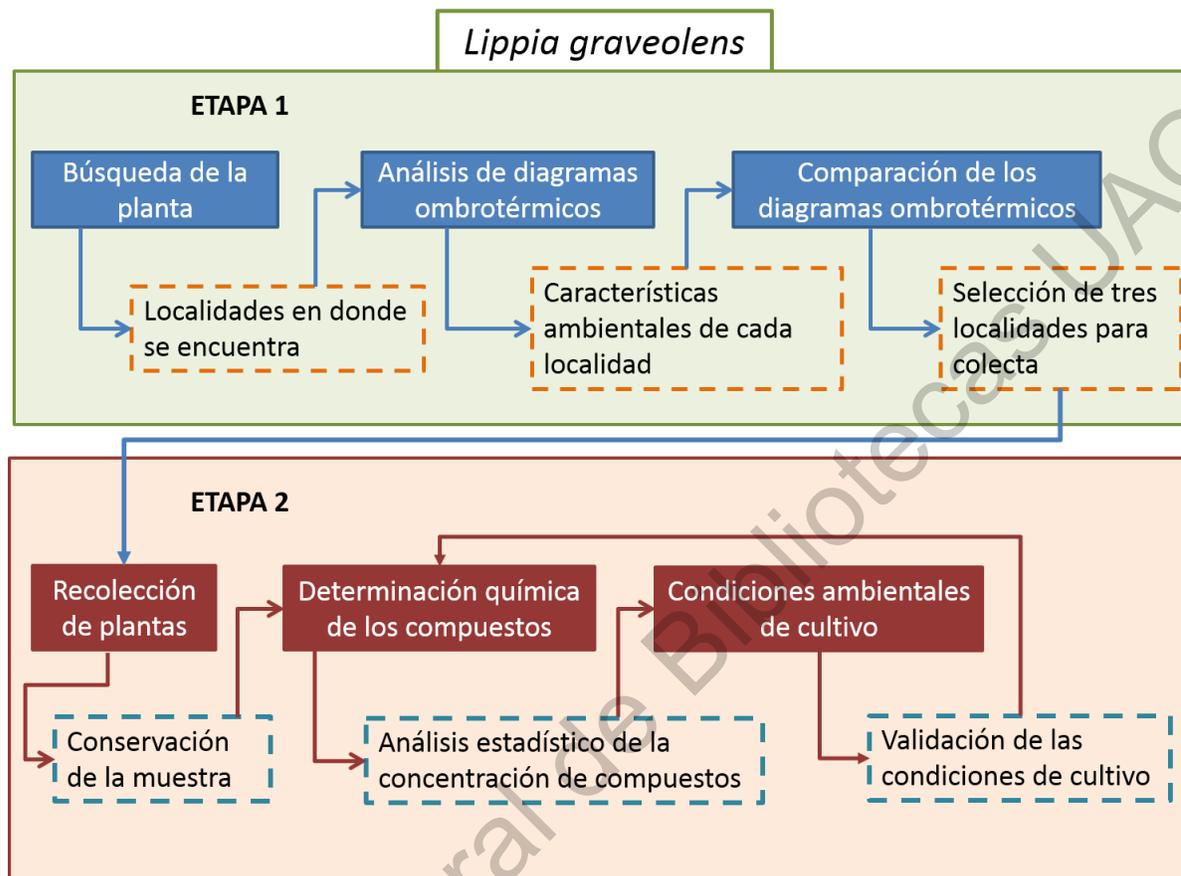


Figura 3. Diagrama general de las etapas realizadas para establecer las condiciones de cultivo del orégano (*Lippia graveolens*).

5.1. EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES

5.1.1. Búsqueda de *Lippia graveolens* en el estado de Querétaro

Se realizó una búsqueda del orégano de la especie *Lippia graveolens* en la base de datos de la Red Mundial de Información sobre Biodiversidad (REMIB) de la CONABIO. Esta base de datos es un sistema computarizado de información biológica que incluye bases de datos de tipo curatorial, taxonómico, ecológico, cartográfico, bibliográfico, etnobiológico, de uso y catálogos sobre recursos

naturales y otros temas; dicho sistema está basado en una organización académica interinstitucional, descentralizada, e internacional formada por centros de investigación y de enseñanza superior, públicos y privados, que posean tanto colecciones biológicas científicas como bancos de información. Sus tres principales objetivos son: 1) Promover el intercambio de información biótica a través de una red internacional de bases de datos, así como analizar y acordar políticas conjuntas sobre la propiedad intelectual, el control de calidad y las formas de distribución de los datos; 2) Incrementar y mejorar la accesibilidad y calidad de esta información, manteniéndola actualizada; y 3) Ofrecer el conocimiento básico de la biodiversidad al público en general, bajo las normas y procedimientos establecidos.

Para el ingreso a la base de datos se llenaron los campos requeridos como se muestra en el Cuadro 1. La información ingresada en cada uno de los campos fue para determinar específicamente las localidades, colonias y municipios en donde se encuentra la planta de orégano (*Lippia graveolens*) para el estado de Querétaro. Los resultados se recopilaron y se organizaron por municipio y localidad creando una base de datos en el programa Excel.

Cuadro 1. Información requerida para el ingreso a la información de la base de datos de la REMIB

Datos a ingresar	Información ingresada
Categoría taxonómica	Familia
¿Buscas por?	<i>Lippia graveolens</i>
País	México
Estado (sólo para México)	Querétaro
Crear mapa	NO
Mapa base	Estados
Formato de salida	Delimitado por comas

5.1.2. Evaluación de las condiciones ambientales por localidad

Las condiciones ambientales por localidad se obtuvieron de las estaciones climatológicas de la Comisión Estatal de Aguas Querétaro (CEA) y de la Secretaría de Desarrollo Agropecuario (SEDEA). Se obtuvieron los registros de precipitación, evaporación y temperatura mínima y máxima desde el año de 1995 hasta el 2010 de diferentes estaciones meteorológicas ubicadas en cada uno de los municipios en los que se encuentra el orégano (22036, 22021, 22038, 22051, 22008, 22019, 22070, 22016 y 22034). De acuerdo a los registros obtenidos se realizaron diagramas ombrotérmicos de cada municipio. Un diagrama ombrotérmico es un gráfico de doble entrada en que se representan las temperaturas medias (en grados centígrados, °C) y las precipitaciones (medidas en milímetros por metro cuadrado) de un lugar. Los datos se obtienen de estaciones meteorológicas y deben tener datos de al menos 30 años de mediciones.

Con base en los registros obtenidos de las estaciones meteorológicas se realizaron diagramas ombrotérmicos, de acuerdo con Gaussen, para cada uno de los municipios en donde se encuentra la especie; estos diagramas se realizaron usando el programa de Microsoft office Excel® 2010. Después de la realización de los diagramas ombrotérmicos, se hizo una comparación estadística de las temperaturas máximas y mínimas, así como de la precipitación por cada localidad en donde se encuentra de manera silvestre la planta de orégano. Esta comparación se realizó para seleccionar tres localidades de colecta de orégano obteniendo una localidad con la temperatura más alta, otra con la temperatura media y una última con una temperatura mínima.

5.1.3. Material vegetal

El material vegetal se obtuvo por triplicado de la parte aérea de las plantas recolectadas en los puntos señalados para los municipios de Cadereyta, Peñamiller, y Tolimán. Las plantas fueron trasplantadas a bolsas negras de plástico con el suelo del lugar de origen y fueron conservadas en un invernadero

ubicado en la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ) Campus Amazcala hasta su análisis químico.

5.1.4. Análisis del material vegetal

Una vez que se obtuvo el material vegetal en campo se procedió al trabajo de gabinete en el Laboratorio de Bioingeniería de la UAQ. El primer paso en el procesamiento del material vegetal fue la eliminación de la humedad, dejando secar a temperatura ambiente en bolsas de papel durante una semana. Después se procesó la muestra en un molino para café de la marca KRUPS tipo F408, y se separó mediante el uso de un tamiz (No. 40) de la marca MONT INOX hasta llegar a un tamaño de partícula menor de 0.4191 milímetros. Las muestras procesadas y separadas se conservaron en frascos ámbar hasta la extracción y cuantificación de los compuestos bioactivos.

5.1.5. Extracción de compuestos bioactivos

La extracción de compuestos bioactivos fenóles extraíbles y no extraíbles consistió en pesar por triplicado 1 g de muestra seca y finamente molida. Se agregaron 10 ml de una solución de metanol: ácido fórmico: agua destilada (80:2:18). Se homogenizaron las muestras en un vortex por 30 segundos, y se llevaron a sonicación en un baño ultrasónico durante 30 minutos a temperatura ambiente (23 °C). Transcurrido este tiempo, las muestras fueron centrifugadas a 9500 rpm por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y el residuo sólido fue sometido al mismo procedimiento de extracción. Los dos sobrenadantes se conservaron en el mismo tubo y se midió el volumen de extracción final. Después se realizó una separación en un filtro de nylon para jeringa con un tamaño de 45 µm y un diámetro de 25 mm. Los extractos fueron almacenados a 4°C protegidos de la luz.

5.1.6. Determinación de fenóles totales

Los fenóles totales se determinaron espectrofotométricamente por el método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton y Rossi (1965). Este método se basa por

la oxidación de los grupos hidroxilo mediante el reactivo de Folin. Este reactivo está compuesto de una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico.

Para la determinación de fenoles totales se colocaron 30 μl de cada extracto (sección 5.1.5) en una placa de 96 pozos. Después se colocó 120 μl de una solución de carbonato de sodio al 7.5 % (p/v). Posteriormente se diluyeron 150 μl del reactivo Folin & Ciocalteu en una relación 1:10 con agua destilada. Se cubrió la placa con papel aluminio y se conservó durante 2 horas protegido de la luz. Después del tiempo transcurrido realizó la lectura de las absorbancias en un espectrofotómetro UV/VIS MultiSkan Go® a una longitud de onda de 765 nm.

Los resultados se calcularon con base en la curva de calibración realizada con el estándar de ácido gálico (0.2 mg/ml). Los resultados se expresaron como mg equivalente a ácido gálico por los gramos de materia vegetal seca (mg eq. Ág/g peso seco).

5.1.7. Determinación de flavonoides totales

Los flavonoides totales se determinaron espectrofotométricamente de acuerdo a lo descrito por Zhishen *et al.*, 1999. Este método consiste en la formación de un complejo aluminio-flavonoide en medio básico que presenta una coloración rosa salmón. La absorbancia medida será proporcional a la concentración, la cual está expresada como equivalente del estándar por gramo de muestra seca.

Se determinó la concentración total de flavonoides en cada muestra tomando 100 μL del extracto (obtenido en la sección 5.1.5) en tubos de 2 ml de capacidad con 40 μl de agua destilada agregada previamente al tubo. Posteriormente se colocan 30 μl de una solución de nitrito de sodio al 5 % (p/v) y se deja reposar por 5 minutos. Después del tiempo requerido se agregan 30 μl de una solución de tricloruro de aluminio al 10 % (p/v) y se deja reposar por un minuto. A continuación se agregan 200 μl de una solución de hidróxido de sodio 1 N e inmediatamente se colocan 240 μl de agua destilada. Se agita gentilmente para

homogenizar. Se colocan 300 µl de cada reacción en una placa de 96 pozos para su lectura espectrofotométrica. La longitud de onda medida fue a 510 nm en un espectrofotómetro UV/VIS MultiSkan Go®.

Los resultados se calcularon con base en la curva de calibración realizada con el estándar de hidrato de catequina (0.6 mg/ml). Los resultados se expresaron como mg equivalente a hidrato de catequina por los gramos de materia vegetal seca (mg eq. hq/g peso seco).

5.1.8. Determinación de capacidad antioxidante DPPH

La determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH se basa en la estabilidad del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), la cual se atribuye a la deslocalización del electrón desapareado lo cual genera una coloración violeta que puede ser visible a una longitud de onda de 480 nm. Cuando una disolución de DPPH entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno o con otra especie de radical (R) se produce la forma reducida DPPH-H o DPPH-R generando una pérdida de color en la solución.

Para la determinación de este método se tomaron alícuotas de 20 µl del extracto (sección 5.1.5) y se colocaron en placas de 96 pozos. Después se agregó la solución DPPH preparada con metanol hasta obtener una absorbancia cercana a 1. Se dejó reposar por 30 minutos, y posteriormente se realizó la lectura a una longitud de onda de 480 nm en un espectrofotómetro UV/VIS MultiSkan Go®.

Los resultados se calcularon con base en la curva de calibración realizada con el estándar de trolox (1 mg/ml). Los resultados se expresaron como mg equivalente a trolox por los gramos de materia vegetal seca (mg eq. trolox/g peso seco).

5.1.9. Determinación de la capacidad antioxidante FRAP

La determinación de la capacidad antioxidante se realizó por el método espectrofotométrico FRAP. Este método se basa en el poder que tiene una sustancia antioxidante de reducir el hierro de Fe^{3+} a Fe^{2+} que es menos

antioxidante. El complejo férrico-2.4.5-tripiridil-s-triazina (TPTZ) incoloro es reducido al complejo ferroso coloreado. El complejo será reducido por productos con potenciales redox menores a 0.7 V (potencial redox del Fe^{3+} -TPTZ).

Para la determinación de este método se preparó 1 L de buffer de fosfatos, 100 ml de ácido clorhídrico 40 mM y 10 ml de tricloruro de aluminio 20 mM. Para el reactivo FRAP se pesaron 15.6 mg del reactivo TPTZ y se diluyeron en 5 ml de la solución de ácido clorhídrico. Después se agregaron 50 ml del buffer de fosfatos y se mezcló. Por último se agregaron 5 ml del tricloruro de aluminio. Para la reacción se tomaron 20 μl del extracto (sección 5.1.5) y se colocaron en una placa de 96 pozos. Se adicionaron 280 μl del reactivo FRAP y se dejó reposar por 30 minutos. Después del tiempo de reposo se realizó la lectura a una absorbancia de 630 nm en un espectrofotómetro UV/VIS MultiSkan Go®. Los resultados se calcularon como se describió para el método DPPH.

5.1.10. Comparación de carvacrol

Se realizó la comparación del contenido de carvacrol obtenido por diferentes autores en diferentes condiciones ambientales para determinar las condiciones específicas para el incremento de este compuesto en las plantas de orégano. La comparación se realizó de acuerdo a las condiciones de localización geográfica, de temperatura y precipitación, así como el porcentaje de carvacrol que se obtiene.

5.2. VALIDACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO

5.2.1. Diseño del sistema de producción

Se realizaron dos sistemas de producción del orégano; el primero se realizó en un invernadero estilo gótico con ventana cenital en la parte superior, con un tamaño de 45 m de largo por 16 m de ancho y una cubierta plástica blanca. Y el segundo se realizó en la parte exterior del invernadero delimitando un área de 7

m de ancho por 8 m de largo con malla, creando un sistema de producción convencional o en campo.

Se colocaron 9 plantas de orégano de la localidad de Cadereyta en cada uno de los sistemas de producción, teniendo un total de 18 organismos. Se sustituyó el suelo del lugar de origen por sustrato peat moss y tezontle. Las plantas se aclimataron durante una semana en cada sistema de cultivo. Se aplicó un riego constante por goteo con solución nutritiva balanceada.

El cultivo de orégano tuvo una duración de 30 días, obteniendo una muestra de hoja inicial y una final, ambas por triplicado. Se realizaron las determinaciones de fenoles totales, flavonoides totales, capacidad antioxidante por los métodos de DPPH y FRAP como se describió anteriormente en los apartados 5.1.4, 5.1.5, 5.1.6, 5.1.7, 5.1.8 y 5.1.9.

5.2.2. Monitoreo de las condiciones ambientales

El monitoreo de las condiciones ambientales se realizó colocando dos sensores, uno para temperatura y otro para la humedad relativa, en un dispositivo data logger para cada uno de los sistemas de cultivo (invernadero y campo). El registro de los datos de humedad relativa y temperatura se realizó durante 30 días cada 30 minutos. Al finalizar el experimento, se descargaron y almacenaron los datos obtenidos en una hoja de Excel® para su posterior análisis.

5.3. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de las determinaciones de carvacrol y de las respuestas explicativas (timol, fenoles y flavonoides totales, capacidad antioxidante) fueron tratados estadísticamente mediante un análisis de varianzas (ANDEVA) con un nivel de significancia de 95 % ($p < 0.05$); primeramente, dentro de los tratamientos y posteriormente entre éstos. Además, se realizó un análisis multivariable para determinar el efecto entre las diferentes condiciones de cultivo sobre la producción de metabolitos especializados (Cochran y col., 1974).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. CONDICIONES AMBIENTALES

6.1.1. Orégano de la especie *Lippia graveolens* en el estado de Querétaro

De acuerdo a la búsqueda realizada en la base de datos de la REMIB, el orégano de la especie *Lippia graveolens* se encuentra en los municipios de Peñamiller, Tolimán, Landa de Matamoros, Ezequiel Montes, Arroyo Seco y Cadereyta. Estos resultados se presentan en el Cuadro 2. Las localidades antes mencionadas se encuentran en el semidesierto de Querétaro, y presentan las condiciones ambientales requeridas por *Lippia graveolens* de acuerdo con Huerta (1997).

Cuadro 2 Localización de orégano (*Lippia graveolens*) para el estado de Querétaro (Remib, 2017)

MUNICIPIO	LOCALIDAD
Cadereyta de Montes	La Mora
	Las Moras
	El Infiernillo
	Rio Moctezuma
Tolimán	San Pablo Tolimán
Peñamiller	Peñamiller
	ND
Ezequiel Montes	Las Rosas
Arroyo Seco	Trapiche
	Río Carrizal
Landa de Matamoros	Carretera La vuelta-Tancoyol
Jalpan de Serra	Tanchanaquito
	Jalpan

6.1.2. Evaluación de las condiciones ambientales por localidad

Los resultados obtenidos de los diagramas ombrotérmicos para la evaluación de las condiciones ambientales por localidad presentaron condiciones climáticas para el municipio de Arroyo Seco con temperaturas entre 16.7°C y 26°C, con

altas lluvias entre los meses de junio y octubre. La precipitación en este municipio está entre los 66.4 mm y 151.6 mm. Estos resultados se presentan en la Figura 4.

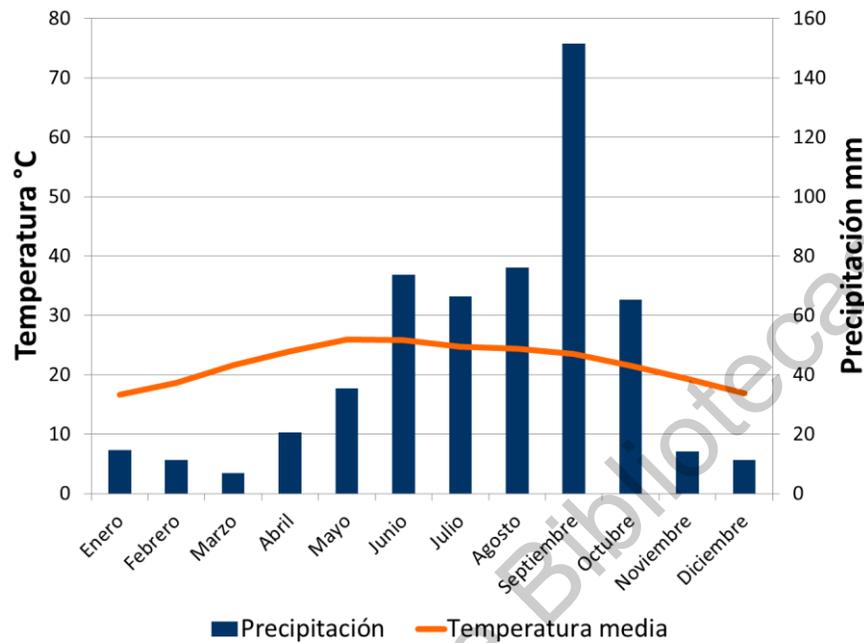


Figura 4. Diagrama ombrotérmico del municipio de Arroyo Seco. Se presenta el monitoreo de temperatura en grados Celsius (°C) y mm de precipitación. Datos obtenidos del Sistema Meteorológico Nacional.

El diagrama ombrotérmico para el municipio de Cadereyta presenta temperaturas entre 12.2°C y 19.3°C. Por otro lado, las lluvias se intensifican en el mes de mayo y disminuyen al final del mes de octubre. Las temperaturas más bajas se presentan en los meses de enero y febrero, mientras que las más altas entre los meses de mayo y junio. Estos resultados se presentan en la Figura 5.

Las condiciones climáticas para el municipio de Peñamiller presentan temperaturas entre 13.7°C y 20.9°C. La temperatura máxima se presenta en el

mes de mayo y la mínima en enero. La temporada de lluvias es entre los meses de mayo a octubre con valores entre 3 mm y 91.4 mm de precipitación. El diagrama ombrotérmico se presenta en la Figura 6.

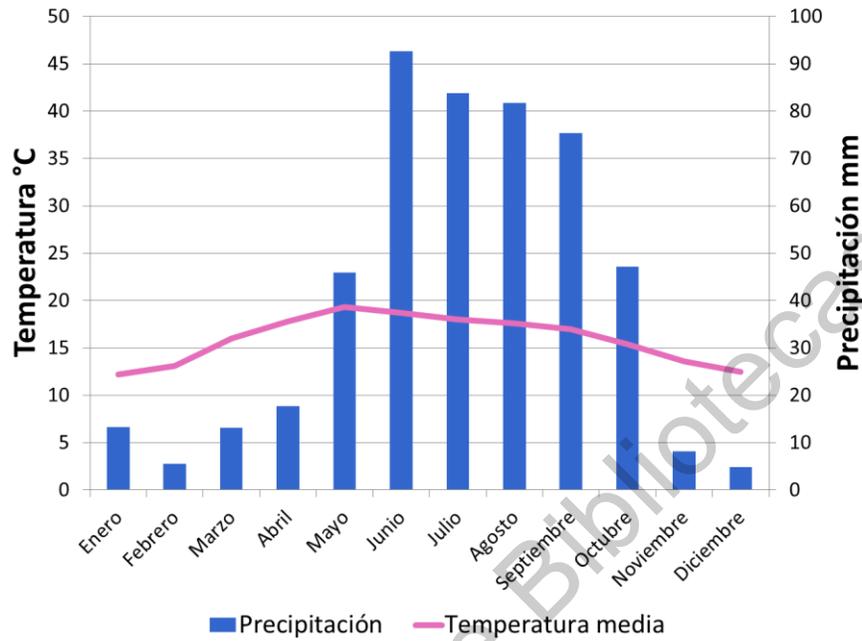


Figura 5. Diagrama ombrotérmico del municipio de Cadereyta. Se presenta el monitoreo de temperatura en grados Celsius (°C) y mm de precipitación. Datos obtenidos del Sistema Meteorológico Nacional.

El municipio de Jalpan de Serra presenta temperaturas entre 17.4°C y 28°C durante los meses de diciembre y mayo, respectivamente. La temporada de lluvias se presenta de manera similar a los municipios anteriores, entre los meses de mayo a octubre. Sin embargo, la precipitación es mayor durante los meses de junio, julio y septiembre, 135 mm, 189.5 mm y 212.3 mm, respectivamente. Estos resultados se muestran en la Figura 7.

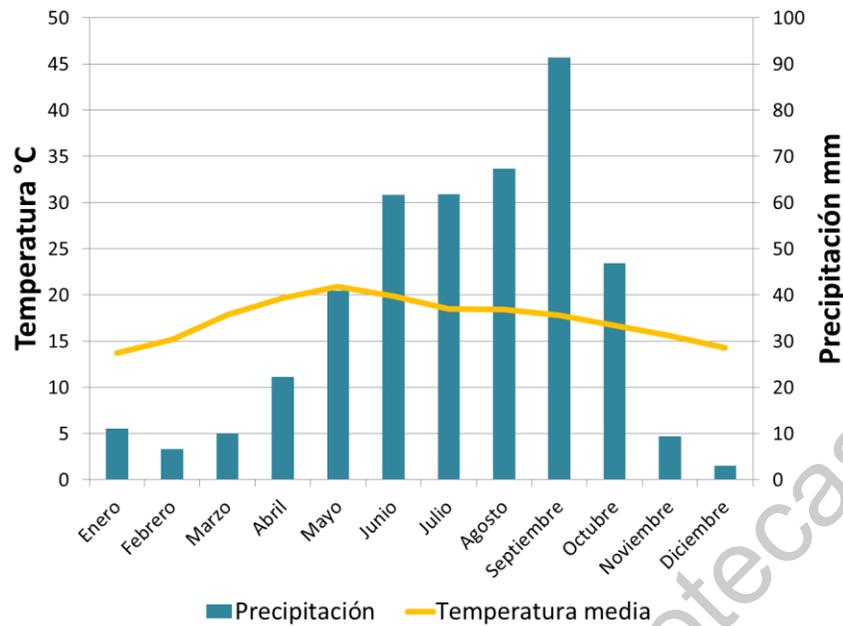


Figura 6. Diagrama ombrotérmico del municipio de Peñamiller. Se presenta el monitoreo de temperatura en grados Celsius (°C) y mm de precipitación. Datos obtenidos del Sistema Meteorológico Nacional.

El municipio de Landa de Matamoros presentó en su diagrama ombrotérmico temperaturas entre 18.5°C y 28.8°C para los meses de enero y mayo, respectivamente. Las lluvias más intensas se presentan en los meses de agosto y septiembre, 108 mm y 180.8 mm, respectivamente. Los meses de mayor sequía se son febrero y diciembre, 7.7 mm y 10 mm, respectivamente. Estos resultados se presentan en la Figura 8.

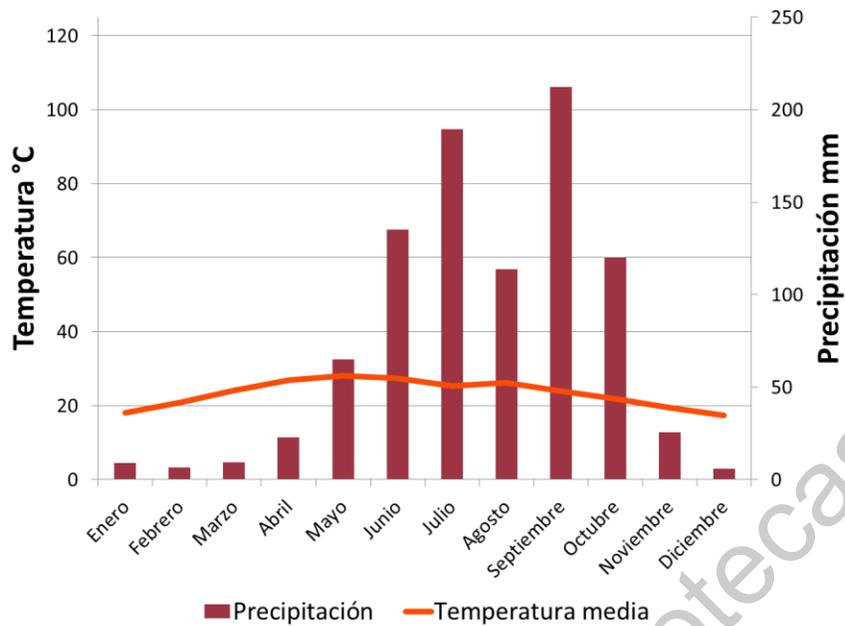


Figura 7. Diagrama ombrotérmico del municipio de Jalpan de Serra. Se presenta el monitoreo de temperatura en grados Celsius (°C) y mm de precipitación. Datos obtenidos del Sistema Meteorológico Nacional.

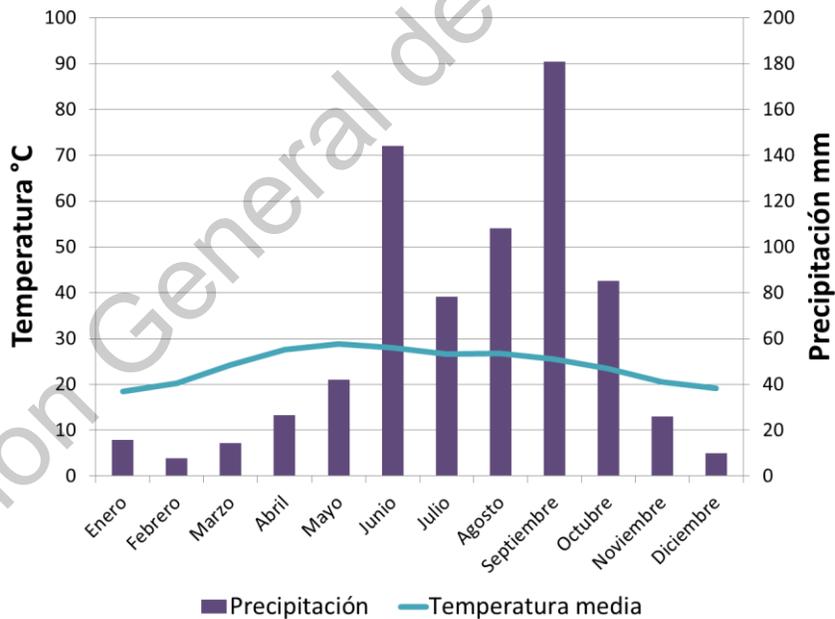


Figura 8. Diagrama ombrotérmico del municipio de Landa de Matamoros. Se presenta el monitoreo de temperatura en grados Celsius (°C) y mm de precipitación. Datos obtenidos del Sistema Meteorológico Nacional.

El análisis ombrotérmico para el municipio de Tolimán mostró temperaturas entre 15°C y 23°C, diciembre y mayo respectivamente. Los meses de mayor precipitación se presentaron igualmente que para los otros municipios entre mayo y octubre. Las precipitaciones más altas fueron en junio, julio y septiembre, 65.5 mm, 63.1 y 62.1 respectivamente. Estos resultados se pueden observar en la Figura 9.

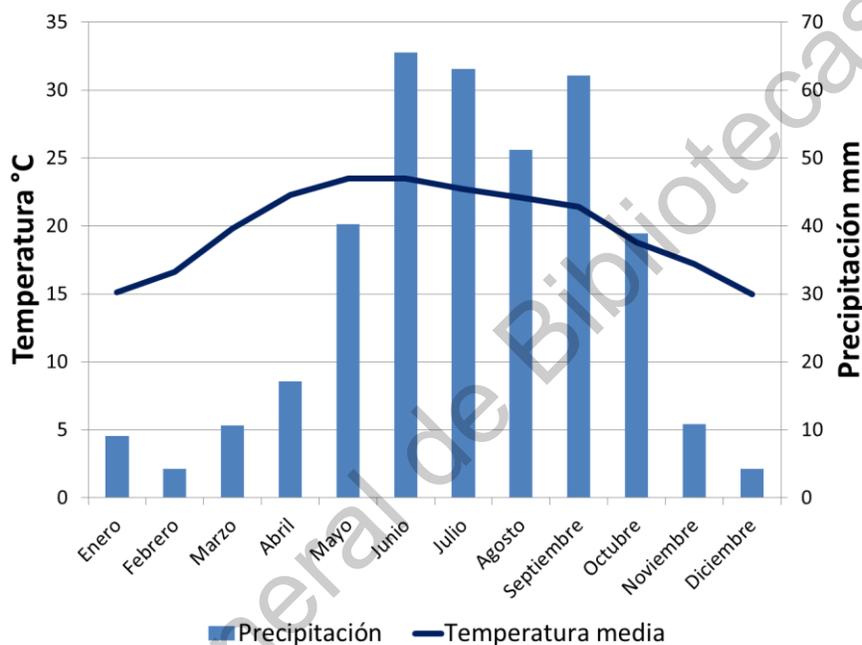


Figura 9. Diagrama ombrotérmico del municipio de Tolimán. Se presenta el monitoreo de temperatura en grados Celsius (°C) y mm de precipitación. Datos obtenidos del Sistema Meteorológico Nacional.

De acuerdo a los resultados de estos diagramas ombrotérmicos, se realizó un análisis para comparar las temperaturas máximas y mínimas de cada uno de los municipios en donde se encuentra de manera silvestre la planta de orégano; estos resultados pueden observarse en la Figura 10. El municipio de Landa de

Matamoros presentó la temperatura más alta (28.8°C), y el municipio de Cadereyta presentó la temperatura más baja (12.2°C).

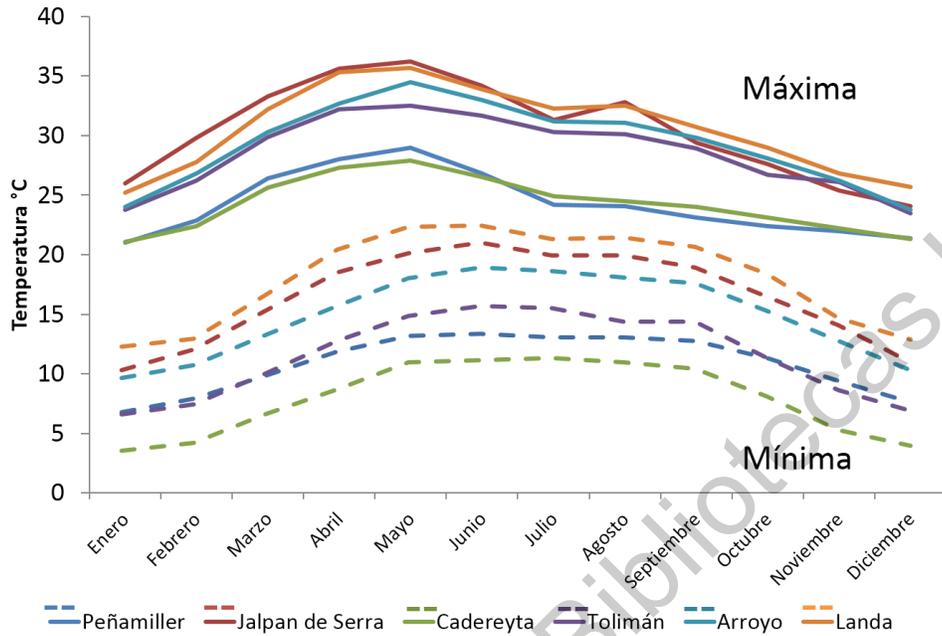


Figura 10. Comparación de las temperaturas máximas y mínimas correspondientes a cada uno de los municipios del estado de Querétaro en donde se localiza *Lippia graveolens*.

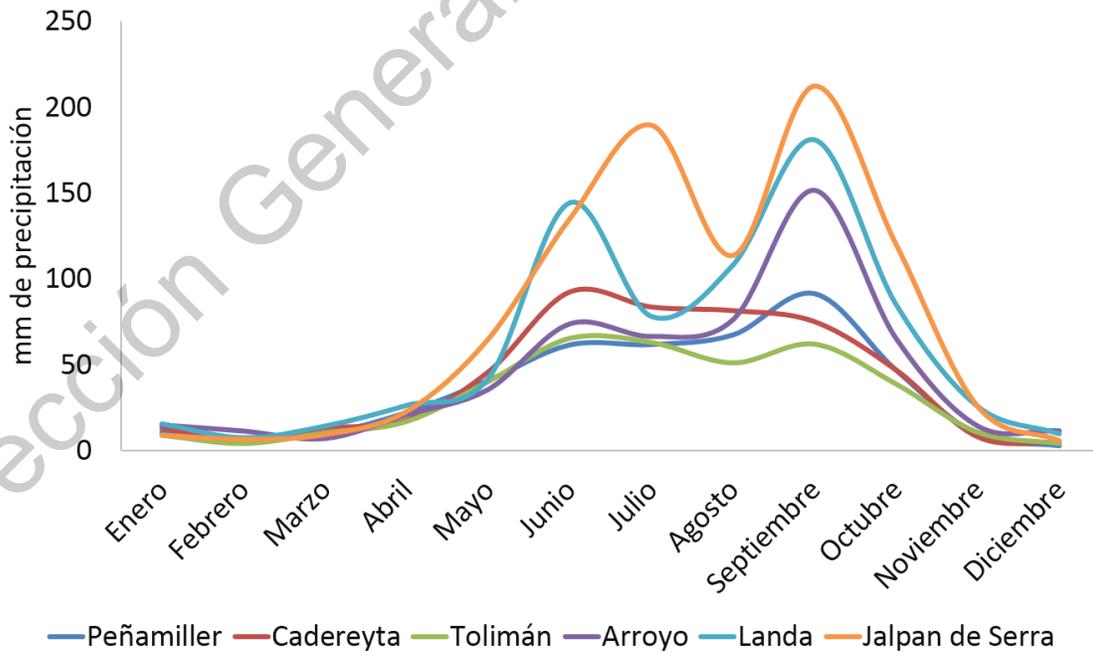


Figura 11. Precipitación de cada uno de los municipios de Querétaro en donde se localiza la planta de orégano (*L. graveolens*).

Adicionalmente, se realizó un análisis de las precipitaciones que se presentan en cada localidad. Los resultados se muestran en la Figura 11, en donde el municipio de Jalpan de Serra tiene la mayor precipitación en el año, ente los meses de junio y octubre. Por otro lado, el municipio de Tolimán presentó una precipitación mínima de 4.3 mm en los meses de febrero y diciembre. Los cambios de estas dos condiciones ambientales permitieron determinar tres lugares del estado de Querétaro para la colecta de la planta silvestre de orégano siendo los municipios de Peñamiller, Tolimán y Cadereyta los municipios seleccionados.

Después de la selección de las localidades para colectar la muestra, se realizó una comparación de las temperaturas máximas y mínimas para los municipios que fueron seleccionados para colectar las muestras de las plantas de orégano, Figura 12. La temperatura máxima se presenta en el municipio de Tolimán con 31.7°C, y la temperatura mínima se registró en el municipio de Cadereyta con 3.3°C. Estos resultados permiten obtener un intervalo de temperatura en donde se puede encontrar el orégano silvestre.

Además del análisis de temperaturas máximas y mínimas para las tres localidades seleccionadas, se evaluaron las diferencias entre la incidencia de lluvias en mm de precipitación observándose mayor cantidad de precipitación en el municipio de Cadereyta durante los meses de Junio y Julio en contra parte en el municipio de Tolimán se presenta menor incidencia de lluvias durante los mismos meses. Estos resultados se pueden observar en Figura 13, en donde la mayor precipitación (mm) para el municipio de Peñamiller fue entre los meses de agosto y octubre.

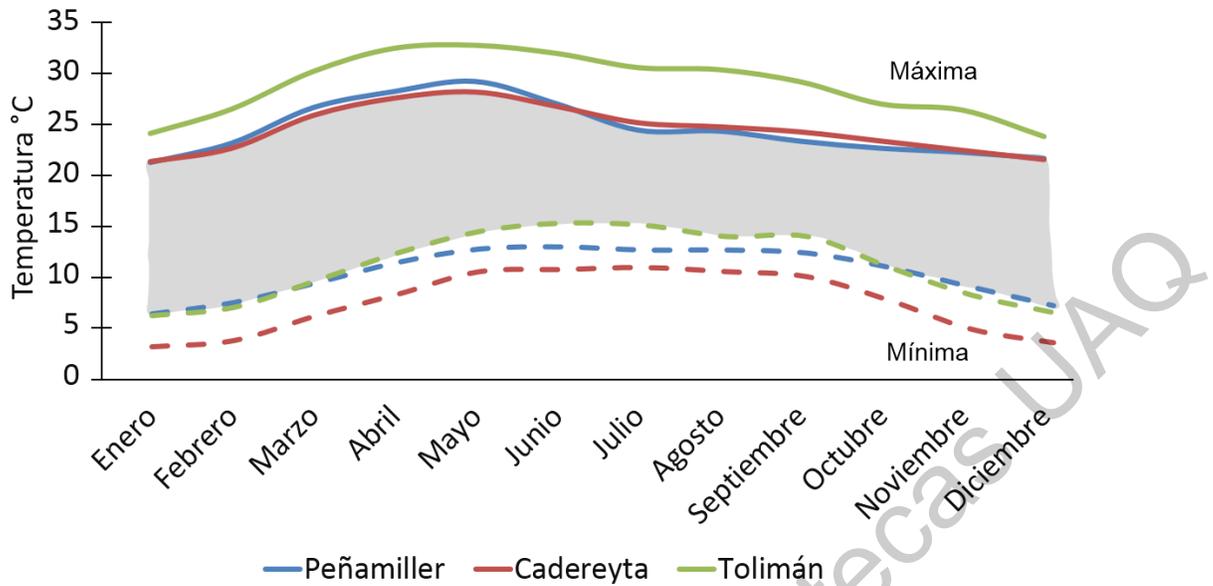


Figura 12 Comportamiento de las temperaturas mínimas y máximas de las localidades de Peñamiller, Tolimán y Cadereyta en donde se localiza *Lippia graveolens* en el estado de Querétaro de acuerdo a los datos del Sistema Meteorológico Nacional.

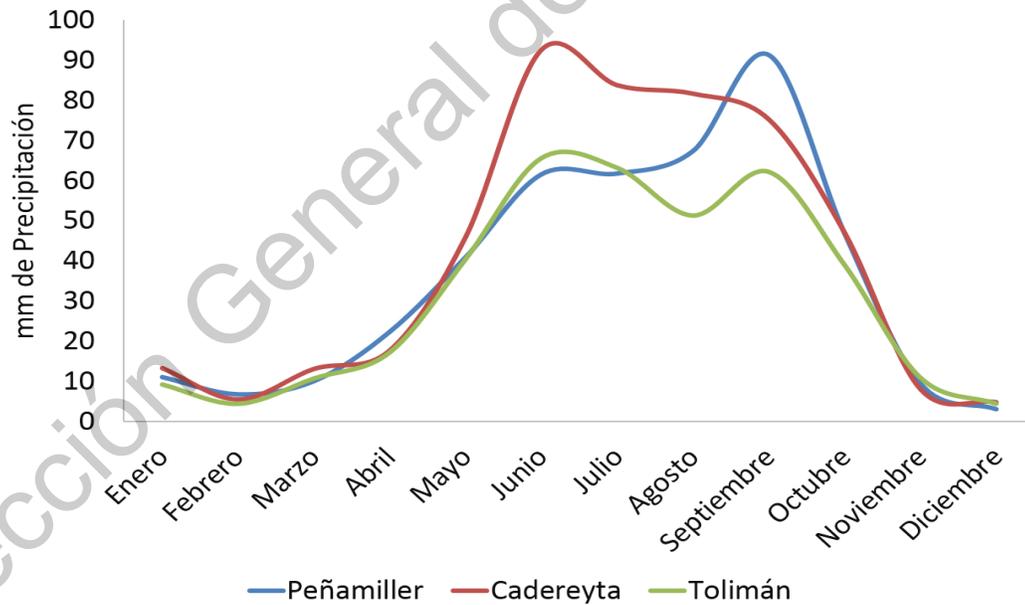


Figura 13. Precipitación para los municipios de Peñamiller, Cadereyta y Tolimán pertenecientes al municipio de Querétaro en donde se localiza de manera silvestre la planta de orégano (*L. graveolens*).

6.1.3. Determinación de compuestos por localidad

6.1.3.1 Fenoles totales

Los resultados de la determinación de la concentración de fenoles totales en las plantas de orégano de cada municipio mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre cada uno. Las plantas de orégano recolectadas en el municipio de Peñamiller contienen la concentración más alta de estos compuestos con un valor promedio de 97.26 mg eq. AG/g muestra seca, con diferencias significativas con las plantas recolectadas de Tolimán y Cadereyta. Por otro lado, la concentración más baja de fenoles totales se presentó en las plantas del municipio de Tolimán. Estos resultados se muestran en la Figura 14. La diferencia de las concentraciones para cada localidad se atribuye a las condiciones ambientales; es decir, la diferencia de temperatura ambiental, así como de la precipitación. La precipitación es uno de los factores ambientales que influyen en la biosíntesis de compuestos en las plantas de orégano de la especie *Oreganum vulgare* de acuerdo con Tezara y col. (2014) así como Morshedloo y col. (2017).

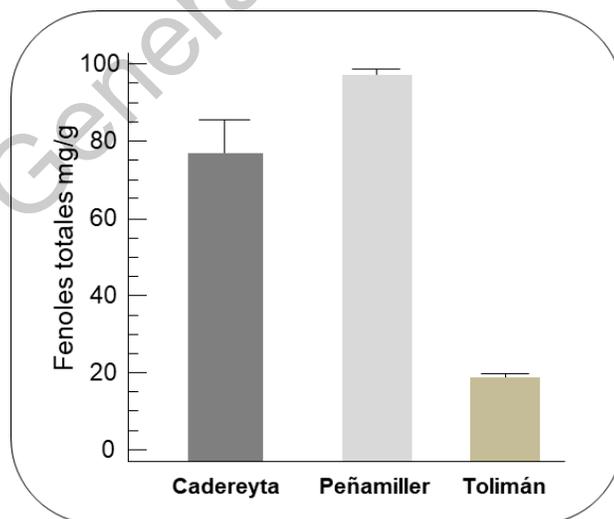


Figura 14. Concentración de fenoles totales en plantas de orégano de dos diferentes localidades. Los resultados se muestran como la varianza individual ($p < 0.05$).

6.1.4. Flavonoides totales

La concentración de flavonoides totales en las plantas silvestres fue mayor en aquellas pertenecientes al municipio de Cadereyta. Las plantas del municipio de Tolimán presentaron la concentración de flavonoides más baja. Estos resultados se presentan en la Figura 15 donde se observa una diferencia significativa en las plantas de orégano que se encuentran en los municipios de Cadereyta y Tolimán. A diferencia de la concentración de fenoles totales, se presenta una mayor concentración de flavonoides cuando las plantas se encuentran en bajas temperaturas, de al menos 5°C de diferencia entre cada localidad. Además, de acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis para la incidencia de lluvias (mm de precipitación), la diferencia en la concentración de flavonoides totales está influenciada por esta condición ambiental. De acuerdo con Dunford y col. (2005) el riego o el estrés hídrico en la planta es un factor importante para la síntesis de compuestos bioactivos (fenoles, flavonoides y terpenos).

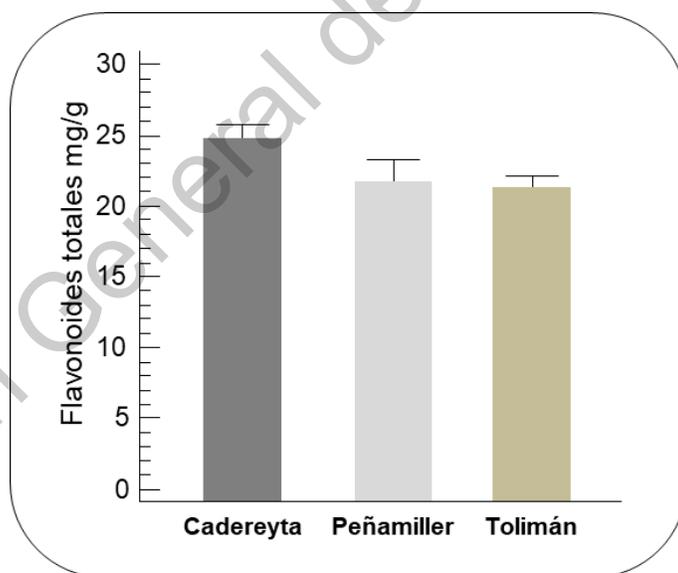


Figura 15. Concentración de flavonoides totales para las plantas de orégano cultivadas en dos localidades diferentes. Los resultados presentan la varianza individual ($p < 0.05$)

6.1.5. Capacidad antioxidante método DPPH

De acuerdo al análisis de varianza realizado, en la capacidad antioxidante por el método DPPH sí existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las plantas cultivadas en Cadereyta y Peñamiller, respecto a las plantas de la localidad de Tolimán; es decir, las plantas de orégano que se recolectaron del municipio de Tolimán presentan una mayor capacidad antioxidante, a diferencia de las plantas obtenidas de los municipios de Peñamiller y Cadereyta. De manera contraria, las plantas presentaron una capacidad antioxidante similar entre las pertenecientes a la localidad de Cadereyta y Peñamiller. Estos resultados se presentan en la Figura 16, y se atribuyen a la concentración de fenoles y flavonoides totales obtenidos; a mayor concentración de compuestos bioactivos se tendrá una mayor capacidad antioxidante (González y col., 2007; Calvo-Irabién y col., 2009). La importancia de la determinación de la capacidad antioxidante es debido a que se encarga de impedir la iniciación y propagación de las especies reactivas de oxígeno (García-Pérez, 2012; Stanojevic, 2016).

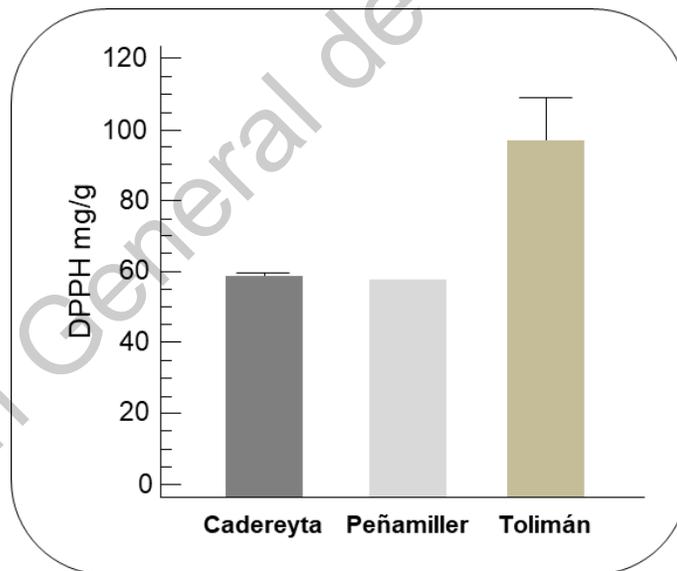


Figura 16. Capacidad antioxidante por el método DPPH en plantas de orégano de tres municipios de colecta diferentes. Los resultados se expresan como la varianza individual ($p < 0.05$).

6.1.6. Capacidad antioxidante por el método FRAP

La determinación de la capacidad antioxidante por el método de FRAP permite detectar los antioxidantes que se relacionan con el Hierro (Fe^{2+} , Fe^{3+}). Los resultados de esta determinación mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las plantas pertenecientes al municipio de Cadereyta y Toluán; es decir, no se encontraron diferencias significativas en relación a la capacidad antioxidante por el método FRAP entre las plantas recolectadas en los municipios de Cadereyta y Toluán. Sin embargo, la capacidad antioxidante en las plantas recolectadas en el municipio de Toluán es mayor a diferencia de los otros dos municipios. Estos resultados se observan en la Figura 17. De acuerdo con Linde (2016), las condiciones ambientales son factores clave para las diferencias en las concentraciones de compuestos bioactivos.

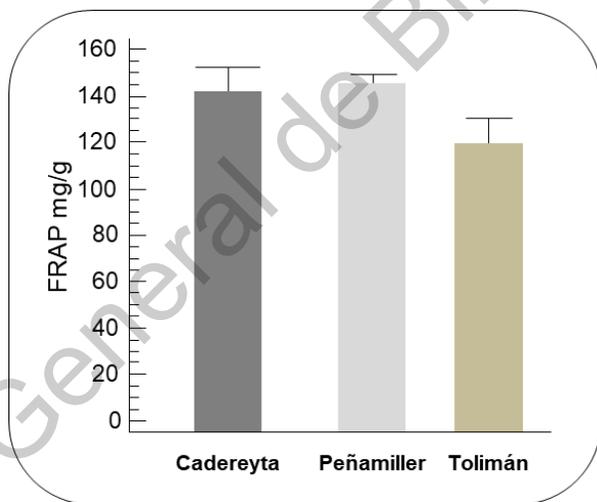


Figura 17. Capacidad antioxidante por el método FRAP en plantas de orégano de dos localidades diferentes. Los resultados se expresan como la varianza individual ($p < 0.05$).

6.1.7. Comparación del contenido de carvacrol

El establecimiento de las condiciones de cultivo para el incremento de carvacrol se obtuvo mediante una comparación de diferentes condiciones de cultivo presentadas por diferentes autores. Estas condiciones se presentan en el

Cuadro 3, en donde se muestra la localización geográfica de diferentes especies de *Lippia* principalmente de *Lippia graveolens* así como la altitud, temperatura media anual, la precipitación anual, y el porcentaje de carvacrol obtenido. Estos resultados presentan diferencias significativas en cuanto a la altitud de cada localidad siendo Yucatán el estado con una altitud a nivel del mar más baja. Por el contrario, el municipio de Cadereyta del estado de Querétaro posee la mayor altitud en cuanto al nivel del mar. En relación a la temperatura media anual de cada lugar, el cultivo realizado en Jalisco, México se realizó a una temperatura de 36°C, obteniendo en las plantas cultivadas en ese lugar un porcentaje de carvacrol del 54.6 % en relación al peso seco de la muestra. Además, Castillo-Herrera (2007) obtuvo un porcentaje de carvacrol del 31.6 % en plantas obtenidas del estado de Querétaro, y un porcentaje del 26.68 % de carvacrol en plantas pertenecientes al estado Coahuila a temperaturas entre 18 y 22°C. En relación a la precipitación, el lugar con menor precipitación fue Paraupebas en el municipio de Pará, Brasil, y en ese lugar las plantas poseen un porcentaje de carvacrol del 22.6 y 23.6 %. La precipitación más alta se presentó en el estado de Yucatán, México y en Feira de Santana, Brasil con 746 mm y 750 mm, respectivamente. El porcentaje de carvacrol en las plantas de ambos sitios fue de 80.07 % y 56.53 %, respectivamente.

Además de las condiciones de temperatura y precipitación, se debe considerar la altitud a la que se realiza el cultivo; de acuerdo al

Cuadro 3, los cultivos con un alto porcentaje de carvacrol se encuentran en altitudes muy bajas, casi a nivel del mar. El cultivo realizado en Yucatán, México por Calvo-Irabién (2014) se encontró a una altitud de 4 m y 6 m sobre el nivel del mar, y este presentó la concentración más alta de carvacrol. De acuerdo a estos resultados las condiciones para obtener la mayor concentración de carvacrol deben de ser a una altitud muy baja, es decir, a casi nivel del mar, a una temperatura ambiente de entre 22 y 26°C, siendo preferentemente 25°C. Además, la precipitación óptima para el cultivo en cielo abierto es de más de 700

mm. Sin embargo, cuando se tienen altitudes elevadas las condiciones de cultivo se modifican de manera que la mayor concentración de carvacrol se obtiene a temperaturas entre los 18°C y 22°C con un porcentaje de carvacrol del 31 % (Castillo-Herrera y col., 2007).

En los municipios de Tolimán, Cadereyta y Peñamiller del estado de Querétaro presentaron condiciones ambientales y geográficas que justifican la presencia silvestre de la especie *Lippia graveolens*. Las alturas de cada municipio varían hasta en 700 m, siendo el municipio de Cadereyta con mayor altitud y el municipio de Peñamiller el de menor altitud. Las temperaturas medias ambientales tienen una variación de hasta 6°C, es por ello que las concentraciones de compuestos fenólicos tuvieron diferencias significativas entre cada lugar. Además, las concentraciones de carvacrol obtenidos por los diferentes autores (

Cuadro 3) evidencian que la mayor concentración de carvacrol se tiene en el municipio de Tolimán por la altitud presentada (1720 m) y una temperatura media ambiental de 19°C. Además, este municipio puede presentar temperaturas de más de 25°C cumpliendo así otra de las condiciones ambientales para el cultivo (Figura 12).

Es por ello que las condiciones de cultivo en condiciones controladas o semi-controladas para la obtención de resultados similares deben ser de 18 a 22°C a una altitud mayor de los 1700 m, con un sistema de riego bajo (0.2 L/15 días) de acuerdo a lo establecido por Dunford y col., (2005). Además, este tipo de especies tiene requerimientos nutrimentales muy bajos, es decir con una fertilización orgánica es suficiente para mantener el cultivo (Teles y col., 2014). Por otro lado, la etapa fenológica es una variable importante para las etapas de cosecha de la planta, es decir, la cosecha se debe de hacer en la etapa de floración o en su defecto en la etapa madura (Castillo-Herrera, 2007; Buen-Duran, 2014; Soto-Armenta y col., 2019).

Cuadro 3. Comparación de los porcentajes de carvacrol obtenidos en diferentes lugares geográficos con diferentes condiciones de cultivo.

<i>Lippia origanoides</i>	Paraapebas, Pará, Brasil	6°04'08.0"S 49°54'13.8"W	168	25.6°C	NA	308	Madurez	22.6-23.6	Ribeiro y col., 2014
<i>Lippia graveolens</i>	Guadalajara, Jalisco, México	21°31'03" N 104°23'00" W	1380	21 °C	NA	510.4	Madurez	9.03	Castillo-Herrera y col., 2007
<i>Lippia graveolens</i>	Querétaro, México	20°01'16" N 99°00'46" W	1813	18°C	NA	324.8	Madurez	31.79	
<i>Lippia graveolens</i>	Coahuila, México	25°32'40" N 103°26'33" W	1120	18-22°C	NA	227.9	Madurez	26.68	Calvo-Irabien y col., 2014
<i>Lippia graveolens</i>	Yucatán, México	21.338° N 89.115° W	4	25.7 °C	NA	684	Madurez	50-78.5	
<i>Lippia graveolens</i>	Jalisco, México	20°41'39.0" N 103°20'48.3" W	1598	36°C	Cada 3 día	NA	Floración	54.5	Bueno-Duran y col., 2014
<i>Lippia graveolens</i>	Tetiz, Yucatán, México	20° 56' N 89° 54' W	6	24°C	NA	746.4	Madurez	80.07	Soto-Armenta y col., 2019
<i>Lippia graveolens</i>	Peñamiller, Querétaro, México	21°03'00" N 099°48'00" W	1342	21.9	NA	393.1	Madurez		
<i>Lippia graveolens</i>	Cadereyta, Querétaro, México	20°42'18" N 099°48'50" W	2040	15.7	NA	466.4	Madurez		
<i>Lippia graveolens</i>	Tolimán, Querétaro, México	20°51'26" N 099°53'59" W	1720	19.2	NA	396.6	Madurez		

6.2. VALIDACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO

6.2.1. Monitoreo de temperatura del cultivo en campo e invernadero

El monitoreo de las condiciones de temperatura en los dos tipos de cultivo, campo e invernadero, se presentan en la Figura 18. El análisis estadístico de varianza presenta diferencias significativas respecto a las temperaturas obtenidas en cada cultivo. Se obtuvieron temperaturas semi-controladas en el cultivo en invernadero con un intervalo entre 18°C y 23°C, a diferencia del cultivo en campo que presentó picos de temperatura contrastantes, con un intervalo de temperatura de 7°C a 38°C. El resultado de los dos tipos de cultivos presentó un mejor control de las condiciones ambientales dentro del invernadero.

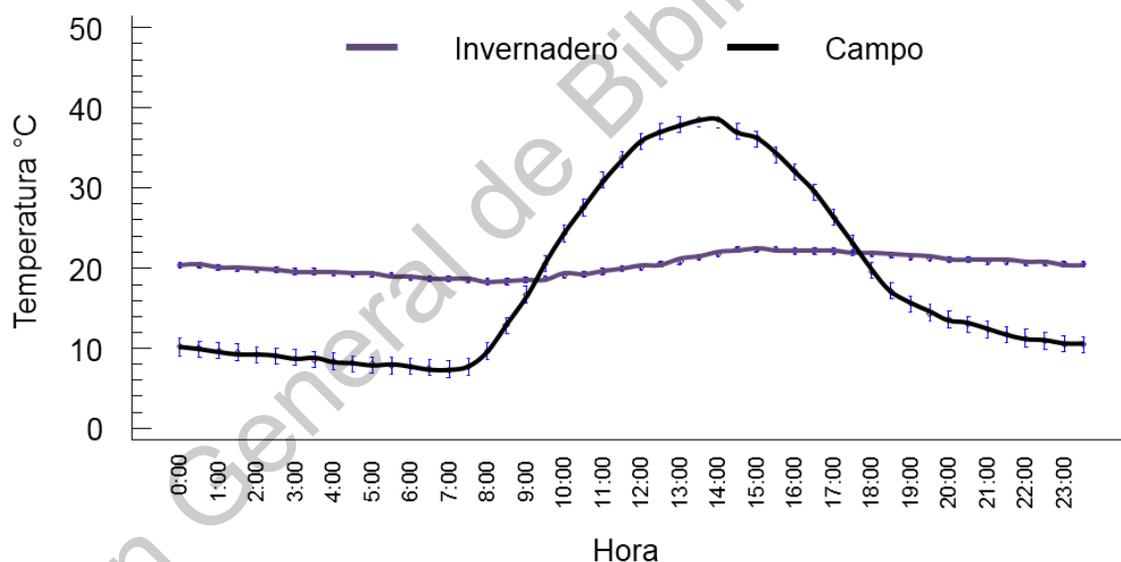


Figura 18. Monitoreo de temperatura en el cultivo de orégano (*Lippia graveolens*) en campo e invernadero.

6.2.2. Establecimiento de la temperatura ambiental

El establecimiento de la temperatura ambiental se realizó al comparar las temperaturas que requiere la planta, las temperaturas a las que la planta está

sometida en su localidad de origen y las temperaturas que se pueden mantener bajo condiciones de cultivo en invernadero.

De acuerdo a los análisis ombrotérmicos de las localidades, las temperaturas óptimas de cultivo de orégano se encuentran en el intervalo entre 18°C y 23°C. El monitoreo de la temperatura en el invernadero presentó una temperatura promedio de 19°C. Estos resultados se presentan en la Figura 19 donde se observa que la temperatura dentro del invernadero estuvo dentro del intervalo marcado por los análisis ombrotérmicos por localidad; es decir, se pueden simular condiciones ambientales como de temperatura dentro de un invernadero que puedan ser muy similares a las condiciones ambientales a las que la planta está acostumbrada en la naturaleza. De acuerdo con Huerta (1997) las condiciones ambientales para el cultivo o el mantenimiento de la planta de orégano de la especie *Lippia graveolens* son 20°C a 24°C, de manera que el cultivo en invernadero de la planta cubre con el requerimiento de las condiciones ambientales.

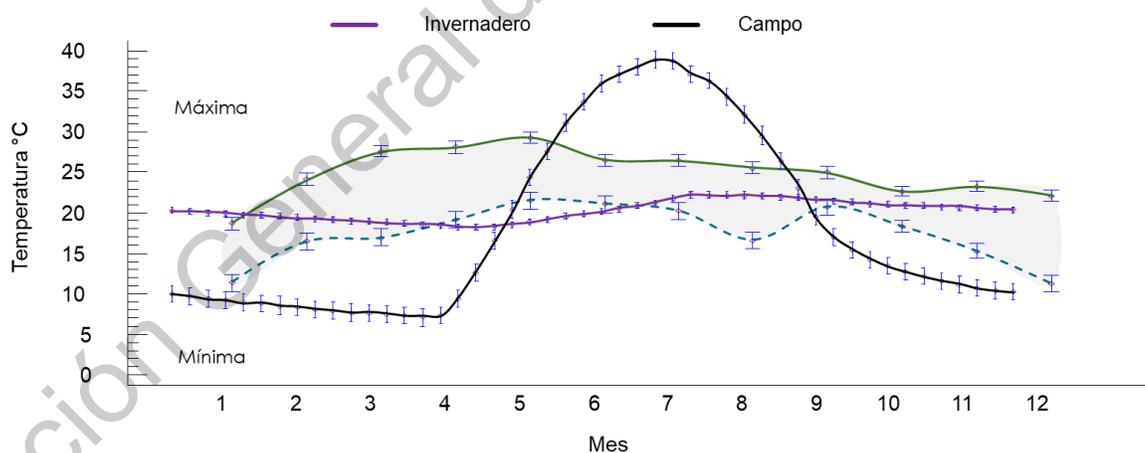


Figura 19. Temperaturas máximas y mínimas de las localidades (sombreado). Temperaturas dentro del invernadero (línea morada), temperaturas en campo (línea negra).

De acuerdo a los resultados obtenidos de las condiciones ambientales, las plantas de orégano (*Lippia graveolens*) incrementa la concentración de bioactivos cuando se encuentran en un constante cambio de temperatura (hasta 25 °C). Además de las condiciones por temperatura, la incidencia de lluvias presentada en los climogramas de los municipios de Cadereyta, Peñamiller y Tolimán presentan contrastes, observándose mayor precipitación en el municipio de Cadereyta y menor precipitación en el municipio de Tolimán. De acuerdo con Tezara y col. (2014), la mayor concentración de compuestos bioactivos, especialmente para el carvacrol y timol, se presenta en lugares donde hay mayor precipitación; a diferencia de esto, la mayor concentración de estos compuestos se observó en las plantas recolectadas en el municipio de menor precipitación (Tolimán).

6.2.3. Determinación de compuestos específicos

6.2.3.1 Fenoles totales

Los resultados de fenoles totales para las plantas de orégano cultivadas en invernadero, durante un periodo de un mes, presentan un incremento en la concentración de fenoles totales respecto a la concentración inicial de estas plantas. Por otro lado, las plantas de orégano cultivadas en campo presentaron una disminución en la concentración de estos compuestos. La concentración final de los fenoles totales en las plantas cultivadas en ambos sistemas, no presentaron cambios significativos ($p < 0.05$). Estos resultados se observan en la Figura 20.

Estos resultados pueden atribuirse a los cambios significativos de temperatura en el cultivo en campo. Por otro lado, de acuerdo al análisis de temperatura por localidad para el estado de Querétaro, las condiciones semi-controladas en el invernadero entran dentro del intervalo de temperaturas para el cultivo de la planta.

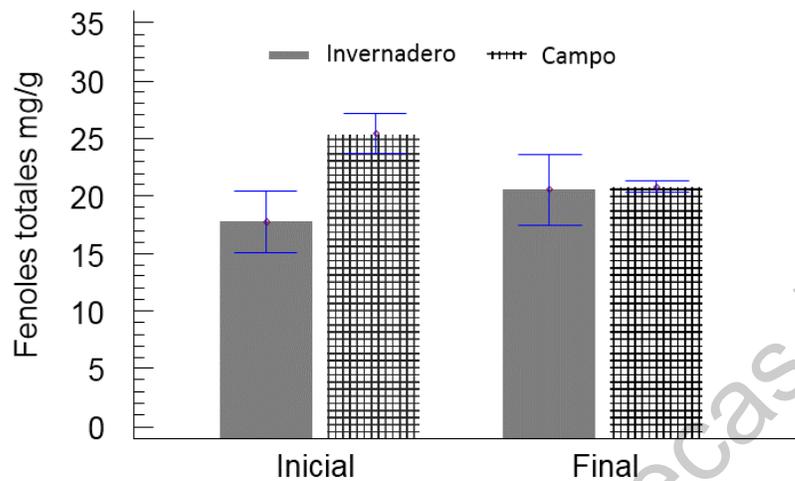


Figura 20. Concentración de fenoles totales (mg eq. Ácido gálico/g peso seco) para las plantas de orégano cultivadas bajo condiciones ambientales en campo e invernadero. Los resultados se expresan como el error estándar.

6.2.3.2 Flavonoides totales

La concentración de flavonoides totales para las plantas de orégano incrementó de manera similar a la concentración de fenoles totales. Las plantas cultivadas bajo condiciones de invernadero (semi-controladas) presentaron mayor concentración de flavonoides, a diferencia de las plantas cultivadas en campo durante el periodo de cultivo siendo esta concentración de 58.2 mg eq. Catequina/g peso seco y 17.8 mg eq. Catequina/g peso seco, respectivamente. La concentración de flavonoides en las plantas de orégano disminuyó significativamente, esto puede deberse a la variación de temperatura en este tipo de cultivo. Estos resultados se presentan en la Figura 21.

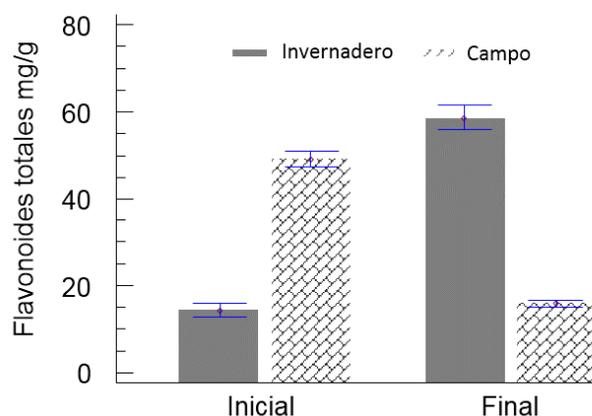


Figura 21. Concentración de flavonoides totales (mg eq. Catequina/g peso seco) para las plantas de orégano cultivadas bajo condiciones ambientales en campo e invernadero. Los resultados se expresan como el error estándar.

6.2.3.3 Capacidad antioxidante DPPH

Los resultados de la capacidad antioxidante por el método DPPH (pérdida de moléculas hidroxilo) fueron mayores en las plantas cultivadas en campo, con diferencias significativas a diferencia de las plantas cultivadas en invernadero. Además, este tipo de capacidad antioxidante en las plantas cultivadas en invernadero disminuyó significativamente. De acuerdo a estos resultados, se puede inferir que el tipo de antioxidantes o compuestos fenólicos que se biosintetizan en condiciones de invernadero (semi-controladas) no tienen una capacidad antioxidante mediante la pérdida de moléculas hidroxilo. Estos resultados se presentan en la Figura 22.

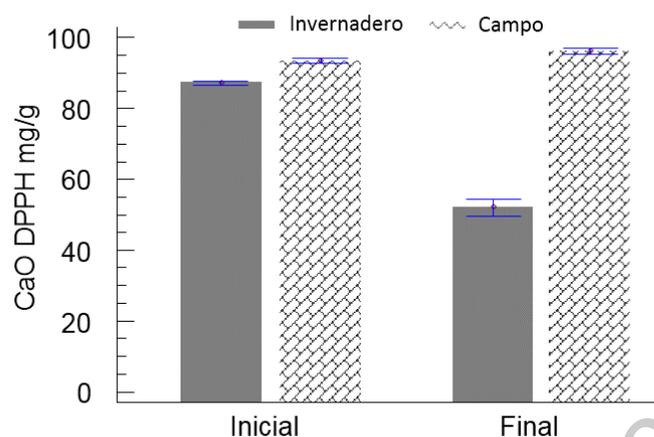


Figura 22. Capacidad antioxidante por el método DPPH (mg eq. Trolox/g peso seco) para las plantas de orégano cultivadas bajo condiciones ambientales en campo e invernadero. Los resultados se expresan como el error estándar.

6.2.3.4 Capacidad antioxidante FRAP

La determinación de la capacidad antioxidante por el método FRAP (óxido-reducción) resultó similar a la capacidad antioxidante determinada por el método DPPH. La capacidad antioxidante máxima obtenida fue en las plantas de orégano cultivadas en campo, a diferencia de las plantas cultivadas en condiciones de invernadero. Por otro lado, la capacidad antioxidante en las plantas en invernadero no disminuyó después de ser cultivada en estas condiciones por un periodo de 30 días. Estos resultados se presentan en la Figura 23.

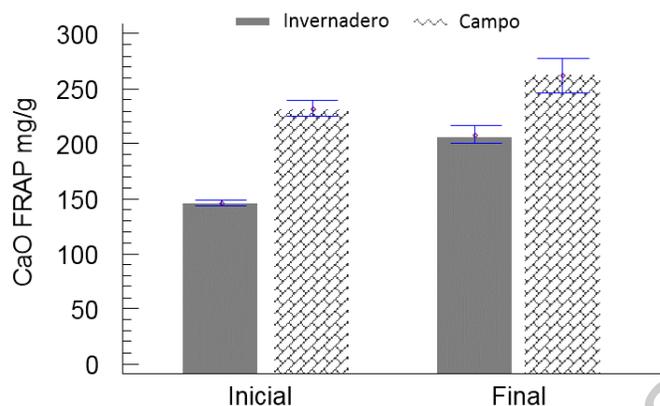


Figura 23 Capacidad antioxidante por el método FRAP (mg eq. Trolox/g peso seco) para las plantas de orégano cultivadas bajo condiciones ambientales en campo e invernadero. Los resultados se expresan como el error estándar.

Como se ha reportado por varios autores (Dunford y col., 2005; García-Pérez y col., 2012; Tezara y col., 2014; Linde y col., 2016; Stanojevic y col., 2016), la concentración de los compuestos bioactivos se relaciona con las condiciones ambientales en las que puede estar sometida la planta. Los avances científicos se enfocan principalmente en promover que la planta de orégano sintetice mayor concentración de carvacrol y/o timol, mediante el cultivo controlado para garantizar la uniformidad de la composición del aceite esencial en la planta.

7. CONCLUSIONES

De acuerdo a las condiciones de esta experimentación los resultados sugieren que la producción de carvacrol está afectada por las condiciones ambientales tal como temperatura ambiental y precipitación. El cultivo de orégano para la síntesis estándar de carvacrol es óptimo a temperatura de 23°C con un riego mayor de 2/3 de capacidad de campo, y con fertilización orgánica. Se recomienda evaluar las condiciones geográficas principalmente de altura para controlar la temperatura ambiental adecuada. Para la comunidad de Amazcala se recomiendan

temperaturas bajas de 21°C para un cultivo con una concentración uniforme de bioactivos, principalmente de carvacrol. Además, la concentración de compuestos fenólicos y flavonoides en el orégano (*Lippia graveolens*) incrementan cuando se mantiene una temperatura ambiental en un intervalo de 18°C y 23°C.

8. REFERENCIAS

- Aguillar-Murillo, X., Valle-Meza, G., González-Rosales G., & B, M.-A. (2013). *Guía de cultivo de orégano*. La Paz, Baja California Sur, México.
- Alagawany, M., Abd El-Hack M. E., Ragab Farag M., Tiwari R., & K., D. (2015). Biological effects and modes of action of carvacrol in animal and poultry production and health- A Review. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 3(2), 73.
- Arrebola, M. L., Navarro, M. C., Jiménez, J., & Ocaña, F. A. (1994). Yield and composition of the essential oil of *Thymus serpylloides* subsp. *serpylloides*. *Phytochemistry*, 36(1), 67-72. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)97014-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(00)97014-6).
- Asadi-Samani, M., Rafieian-kopaei, M., Lorigooini, Z., & Shirzad, H. (2018). A screening to determine total phenol and flavonoid content of some Iran's medicinal plants grown in Chaharmahal va Bakhtyari province. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 9, 296-302.
- Ávalos, G. A., & Pérez-Urria., E. (2009). Metabolismo secundario. *Reduca (Biología)*. Serie *Fisiología Vegetal*, 2, 119-145.
- Baser, K. (2002). The Turkish origanum species. . In K. SE (Ed.), *Oregano, the Genera Origanum and Lippia* (pp. 109-126). London and New York: Taylor and Francis.
- Bueno-Duran, A. Y., Cervantes-Martínez J., & N., O.-V. E. (2013). Composition of essential oil from *Lippia graveolens*. Relationship between spectral light quality and thymol and carvacrol content. *Journal of Essential Oil Research*, 26, 153-160.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Calvo-Irabién, L. M., Parra-Tabla V., Acosta-Arriola V., Escalante-Erosa F., Dias-Vera L., Dzib G. R., & M., P.-R. L. (2014). Phytochemical diversity of the essential oils of Mexican oregano (*Lippia graveolens* KUNTH) populations along an Edapho-Climatic gradient. *CHEMISTRY & BIODIVERSITY*, 11, 1010-1021.

- Castillo-Herrera, G. A., García-Fajardo, J. A., y Estarrón-Espinosa, M. (2007). Extraction method that enriches phenolic content in oregano (*Lippia graveolens* H.B.K.) essential oil. *Journal of Food Process Engineering*, 30(6), 661-669- doi:10.1111/j.1745-4530.2007.00134.x
- Compadre, C. M., Hussain, R. A., Leon, I., & Enríquez, R. G. (1987). Volatile Constituents of *Montanoa tomentosa* and *Lippia graveolens*. *Planta Med*, 53(05), 495-496. doi: 10.1055/s-2006-962781
- CONAFOR, C. N. F. (2007). *Fichas de información comercial de productos forestales*. Fondo Sectorial para la Investigación, el Desarrollo y la Innovación Tecnológica Forestal, SEMARNAT. México, D.F.
- CONAFOR, C. N. F. (2009). *Paquete tecnológico para la producción de orégano (Lippia spp.)*. (5360). Zapopan, Jalisco, México.
- Corella, R., Ortega M., Robles M., Borboa J., & D., M. (2008). El cultivo de orégano *Lippia palmeri* Watson, en el estado de Sonora. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 1.
- Dominguez, X. A., Sánchez V.H., Suárez M., Baldas J.H., González M.R. (1989). Chemical constituents of *Lippia graveolens*. *Planta Med*, 55, 208.
- Dunford, N., y Silva-Vázquez R. (2005). Effect of water stress on plant growth and thymol and carvacrol concentrations in Mexican oregano grown under controller condition. *Journal of Applied Horticulture*, 7, 20-22.
- Flores, H. A., Hernández Herrera J. A., López Medrano J. I., Valenzuela Núñez L M., Martínez Salvador M., & H., M. R. (2011). Producción y extracción de aceite de orégano (*Lippia graveolens* Kunth) bajo cultivo en la comarca lagunera. *Revista Mexicana de Ciencia Forestal*, 2(113-120).
- Flores, R. (2009). *Potencial productivo del orégano (Lippia graveolens HBK.) y calidad de su aceite esencial en dos localidades de el Mezquital, Dgo.*, Intituto Politecnico Nacional, Victoria de Durango, Dgo.
- García-Bores, A. M., Espinosa-González A. M., Reyna-Campos A., Cruz-Toscano S., Benítez-Flores J. C., Hernández-Delgado C. T., . . . G., A.-A. J. (2017). *Lippia graveolens* photochemopreventive effect against UVB radiation-induced skin carcinogenesis. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 167, 72-81.
- García de Alba García, J. E., Ramírez Hernández, B. C., Robles Arellano, G., Zañudo Hernández, J., Salcedo Rocha, A. L., & García de Alba Verduzco, J. E. (2012). Conocimiento y uso de las plantas medicinales en la zona metropolitana de Guadalajara. *Desacatos*, 29-44.
- Haidé-Quezada, F., Sánchez-Ramos, G., Lara-Villalón, M., Medina-Martínez, T., & Pérez-Quilantán, L. M. (2011). Parámetros ambientales y abundancia del orégano mexicano (*Lippia graveolens*) en el estado de Tamaulipas. 2011, 8.
- Huerta, C. (1997). Orégano mexicano: oro vegetal. *CONABIO. Biodiversitas*, 15, 8-13.
- Huerta, C. (2002). Oregano mexicano. Oro vegetal. *Revista BIODIVERSITAS*, 15(30-38).
- Huerta, C. (2005). Orégano mexicano, oro vegetal. from <http://www.maph49.com/biodiv2/oregano.html>

- Leung, A. Y., & S., F. (1996). *Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetics* (Vol. 2). New York.
- Martínez-Hernández, R., Villa-Casterona M. M., Catalán-Valencia E. A., & M., I.-I. (2017). Production of oregano (*Lippia graveolens* Kunth) seedling from seeds in nursery for transplanting. *Revista de Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 23, 61-73.
- Mattana, E., Sacande, M., Abdul Sanogo, K., Lira, R., Gomez-Barreiro, P., Rogledi, M., & Ulian, T. (2017). Thermal requirements for seed germination of underutilized Lippia species. *South african Journal of Botany*, 109, 223-230. doi: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.12.020>
- More, U. B., Narkhede, H. P., Dalal, D. S., & Mahulikar, P. P. (2007). Synthesis of Biologically Active Carvacrol Compounds using Different Solvents and Supports. *Synthetic Communications*, 37(12), 1957-1964. doi: 10.1080/00397910701354608
- Moreno-Rodríguez, A., Santos-Castro, R., Vázquez-Medrano, J., Quintanar-Zúñiga, R. E., García-García, F. A., Hernández-Portilla, L. B., & Flores-Ortiz, C. M. (2019). Effect of jasmonic acid on major terpenes and density of glandular trichomes in *Lippia graveolens* kunth (Verbenaceae). *Natural Product Research*, 1-5. doi: 10.1080/14786419.2019.1566721
- Morton, J. F. (1981). *Atlas of medicinal plants of middle America: Bahamas to Yucatan*. Springfield: Charles C. Thomas.
- Muñoz-Miranda, L., Rodríguez-Sahagun, A., Acevedo-Hernandez, G., Cruz-Martínez, V., Torres-Morán, M. I., Lépiz-Ildefonso, R., . . . Castellanos-Hernandez, O. (2019). Evaluation of Somaclonal and Ethyl Methane Sulfonate-Induced Genetic Variation of Mexican Oregano (*Lippia graveolens* H.B.K.). *Agronomy*, 9, 166. doi: 10.3390/agronomy9040166
- Nash, D. L., & M., N. (1984). Flora de Veracruz, fasc. 41, Verbenaceae *Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos, Xalapa*.
- Neilson, E. H., Goodger, J. Q. D., Woodrow, I. E., & Møller, B. L. (2013). Plant chemical defense: at what cost? *Trends in Plant Science*, 18(5), 250-258. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.01.001>
- Ortega, R. S. (1991). Plantación de orégano en bordos con aplicación de pequeñas láminas de rirgo. In INIRAP-CIFAP (Ed.), *Estado actual del conocimiento sobre orégano en México*. Bermejillo, Durango.
- Osorno-Sánchez, T., Torres Ruiz A., & R., L.-C. (2012). Effects of harvesting intensity on population structure of *Lippia graveolens* (Verbenaceae, Lamiales) in the semidesert of Querétaro, México. *African Journal of Agricultural Research*, 7, 100-108.
- Ruiz-Cabello, M. L., Maisanaba S., Puerto M., Prieto A. I., Pichardo S., Moyano R., . . . M., C. A. (2016). Genotoxicity evaluation of carvacrol in rats using a combined micronucleus and comet assay. *Food and Chemical Toxicology*, 98, 240-250.
- 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. doi: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.12.018>
- Teles, S., Pereira J. A., Muniz de Oliveira L., Malheiro R., Santiago Machado S., Lucchese A. M., & F., S. (2014). Organic and mineral fertilization influence on biomass and essential oil production, composition and antioxidant activity of *Lippia origanoides* H.B.K. *Industrial Crops and products*, 59, 169-176.
- Tezara, W., Coronel I., Herrera A., Dzib G., Canul-Puc K., Calvo-Irabién L. M., & M., G.-M. (2014). Photosynthetic capacity and terpene production in populations of *Lippia graveolens* (Mexican oregano) growing wild and in a common garden in Yucatán peninsula. *Industrial Crops and products*, 57, 1-9.
- Tholl, D. (2006). Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(3), 297-304. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.03.014>
- Ultee, A., Bennik, M. H. J., & Moezelaar, R. (2002). The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1561-1568.
- Vaiciulyte, V., Butkiene R., & K., L. (2016). Effects of meteorological conditions and plant growth stage on the accumulation of carvacrol and its precursors in *Thymus pulegioides*. *Phytochemistry*, 128, 20-26.
- Vargas-Mendoza, C. F., Ortégón-Campos I. G., & M., C. I. L. (2016). Natural selection under contrasting ecological conditions in the aromatic plant *Lippia graveolens* (H.B.K., Verbenaceae). *Plant Syst. Evol.*, 302, 275-289.
- Villavicencio, G. E. E., Cano Pineda A., & X., G. C. (2010). *Metodología para determinar las existencias de orégano (Lippia graveolens H.B.K) en rodales naturales de Parras de la Fuente, Coahuila* (Primera edición ed. Vol. 42). Saltillo, Coahuila: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.
- Yanishlieva, N. V., Marinova, E. M., Gordon, M. H., & Raneva, V. G. (1999). Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry*, 64(1), 59-66. doi: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00086-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00086-7)
- Zheng, W., & Wang, S. Y. (2001). Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5165-5170. doi: 10.1021/jf010697n
- Aguillar-Murillo, X., Valle-Meza, G., González-Rosales G., & B, M.-A. (2013). *Guía de cultivo de orégano*. La Paz, Baja California Sur, México.
- Alagawany, M., Abd El-Hack M. E., Ragab Farag M., Tiwari R., & K., D. (2015). Biological effects and modes of action of carvacrol in animal and poultry production and health- A Review. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 3(2), 73.
- Arrebola, M. L., Navarro, M. C., Jiménez, J., & Ocaña, F. A. (1994). Yield and composition of the essential oil of *Thymus serpylloides* subsp. *serpylloides*.

- Phytochemistry*, 36(1), 67-72. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)97014-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(00)97014-6)
- Asadi-Samani, M., Rafieian-kopaei, M., Lorigooini, Z., & Shirzad, H. (2018). A screening to determine total phenol and flavonoid content of some iran's medicinal plants grown in chaharmahal va Bakhtyari province. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 9, 296-302.
- Ávalos, G. A., & Pérez-Urria., E. (2009). Metabolismo secundario. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*, 2, 119-145.
- Baser, K. (2002). The Turkish origanum species. . In K. SE (Ed.), *Oregano, the Genera Origanum and Lippia* (pp. 109-126). London and New York: Taylor and Francis.
- Bueno-Duran, A. Y., Cervantes-Martínez J., & N., O.-V. E. (2013). Composition of essential oil from *Lippia graveolens*. Relationship between spectral light quality and thymol and carvacrol content. *Journal of Essential Oil Reserch*, 26, 153-160.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Calvo-Irabién, L. M., Parra-Tabla V., Acosta-Arriola V., Escalante-Erosa F., Dias-Vera L., Dzib G. R., & M., P.-R. L. (2014). Phytochemical diversity of the essential oils of mexican oregano (*Lippia graveolens* KUNTH) populations along an Edapho-Climatic gradient. *CHEMISTRY & BIODIVERSITY*, 11, 1010-1021.
- Compadre, C. M., Hussain, R. A., Leon, I., & Enríquez, R. G. (1987). Volatile Constituents of *Montanoa tomentosa* and *Lippia graveolens*. *Planta Med*, 53(05), 495-496. doi: 10.1055/s-2006-962781
- CONAFOR, C. N. F. (2007). *Fichas de información comercial de productos forestales*. Fondo Sectorial para la Investigación, el Desarrollo y la Innovación Tecnológica Forestal, SEMARNAT. México, D.F.
- CONAFOR, C. N. F. (2009). *Paquete tecnológico para la producción de orégano (Lippia spp.)*. (5360). Zapopan, Jalisco, México.
- Corella, R., Ortega M., Robles M., Borboa J., & D., M. (2008). El cultivo de orégano *Lippia palmeri* Watson, en el estado de Sonora. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 1.
- Dominguez, X. A., Sánchez V.H., Suárez M., Baldas J.H., González M.R. (1989). Chemical constituents of *Lippia graveolens*. *Planta Med*, 55, 208.
- Flores, H. A., Hernández Herrera J. A., López Medrano J. I., Valenzuela Núñez L M., Martínez Salvador M., & H., M. R. (2011). Producción y extracción de aceite de orégano (*Lippia graveolens* Kunth) bajo cultivo en la comarca lagunera. *Revista Mexicana de Ciencia Forestal*, 2(113-120).
- Flores, R. (2009). *Potencial productivo del orégano (Lippia graveolens HBK.) y calidad de su aceite esencial en dos localidades de el Mezquital, Dgo.*, Intituto Politecnico Nacional, Victoria de Durango, Dgo.
- García-Bores, A. M., Espinosa-González A. M., Reyna-Campos A., Cruz-Toscano S., Benítez-Flores J. C., Hernández-Delgado C. T., . . . G., A.-A. J. (2017).

- Lippia graveolens* photochemopreventive effect against UVB radiation-induced skin carcinogenesis. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 167, 72-81.
- García de Alba García, J. E., Ramírez Hernández, B. C., Robles Arellano, G., Zañudo Hernández, J., Salcedo Rocha, A. L., & García de Alba Verduzco, J. E. (2012). Conocimiento y uso de las plantas medicinales en la zona metropolitana de Guadalajara. *Desacatos*, 29-44.
- Haidé-Quezada, F., Sánchez-Ramos, G., Lara-Villalón, M., Medina-Martínez, T., & Pérez-Quilantán, L. M. (2011). Parámetros ambientales y abundancia del orégano mexicano (*Lippia graveolens*) en el estado de Tamaulipas. 2011, 8.
- Huerta, C. (1997). Orégano mexicano: oro vegetal. *CONABIO. Biodiversitas*, 15, 8-13.
- Huerta, C. (2002). Oregano mexicano. Oro vegetal. *Revista BIODIVERSITAS*, 15(30-38).
- Huerta, C. (2005). Orégano mexicano, oro vegetal. from <http://www.maph49.com/biodiv2/oregano.html>
- Leung, A. Y., & S., F. (1996). *Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetics* (Vol. 2). New York.
- Martínez-Hernández, R., Villa-Casterona M. M., Catalán-Valencia E. A., & M., I.-I. (2017). Production of oregano (*Lippia graveolens* Kunth) seedling from seeds in nursery for transplanting. *Revista de Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 23, 61-73.
- Mattana, E., Sacande, M., Abdul Sanogo, K., Lira, R., Gomez-Barreiro, P., Rogledi, M., & Ulian, T. (2017). Thermal requirements for seed germination of underutilized *Lippia* species. *South african Journal of Botany*, 109, 223-230. doi: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.12.020>
- More, U. B., Narkhede, H. P., Dalal, D. S., & Mahulikar, P. P. (2007). Synthesis of Biologically Active Carvacrol Compounds using Different Solvents and Supports. *Synthetic Communications*, 37(12), 1957-1964. doi: 10.1080/00397910701354608
- Moreno-Rodríguez, A., Santos-Castro, R., Vázquez-Medrano, J., Quintanar-Zúñiga, R. E., García-García, F. A., Hernández-Portilla, L. B., & Flores-Ortiz, C. M. (2019). Effect of jasmonic acid on major terpenes and density of glandular trichomes in *Lippia graveolens* kunth (Verbenaceae). *Natural Product Research*, 1-5. doi: 10.1080/14786419.2019.1566721
- Morton, J. F. (1981). *Atlas of medicinal plants of middle America: Bahamas to Yucatan*. Springfield: Charles C. Thomas.
- Muñoz-Miranda, L., Rodríguez-Sahagun, A., Acevedo-Hernandez, G., Cruz-Martínez, V., Torres-Morán, M. I., Lépiz-Ildefonso, R., . . . Castellanos-Hernandez, O. (2019). Evaluation of Somaclonal and Ethyl Methane Sulfonate-Induced Genetic Variation of Mexican Oregano (*Lippia graveolens* H.B.K.). *Agronomy*, 9, 166. doi: 10.3390/agronomy9040166
- Nash, D. L., & M., N. (1984). Flora de Veracruz, fasc. 41, Verbenaceae *Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos, Xalapa*.

- Neilson, E. H., Goodger, J. Q. D., Woodrow, I. E., & Møller, B. L. (2013). Plant chemical defense: at what cost? *Trends in Plant Science*, 18(5), 250-258. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.01.001>
- Ortega, R. S. (1991). Plantación de orégano en bordos con aplicación de pequeñas láminas de rirgo. In INIRAP-CIFAP (Ed.), *Estado actual del conocimiento sobre orégano en México*. Bermejillo, Durango.
- Osorno-Sánchez, T., Torres Ruiz A., & R., L.-C. (2012). Effects of harvesting intensity on population structure of *Lippia graveolens* (Verbenaceae, Lamiales) in the semidesert of Querétaro, México. *African Journal of Agricultural Research*, 7, 100-108.
- Ruiz-Cabello, M. L., Maisanaba S., Puerto M., Prieto A. I., Pichardo S., Moyano R., . . . M., C. A. (2016). Genotoxicity evaluation of carvacrol in rats using a combined micronucleus and comet assay. *Food and Chemical Toxicology*, 98, 240-250.
- 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. doi: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.12.018>
- Teles, S., Pereira J. A., Muniz de Oliveira L., Malheiro R., Santiago Machado S., Lucchese A. M., & F., S. (2014). Organic and mineral fertilitation influence on biomass and essential oil production, composition and antioxidant activity of *Lippia organoides* H.B.K. *Industrial Crops and products*, 59, 169-176.
- Tezara, W., Coronel I., Herrera A., Dzib G., Canul-Puc K., Calvo-Irabién L. M., & M., G.-M. (2014). Photosynthetic capacity and terpene production in populations of *Lippia graveolens* (Mexican oregano) growing wild and in a common garden in Yucatán peninsula. *Industrial Crops and products*, 57, 1-9.
- Tholl, D. (2006). Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(3), 297-304. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.03.014>
- Ultee, A., Bennik, M. H. J., & Moezelaar, R. (2002). The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1561-1568.
- Vaiciulyte, V., Butkiene R., & K., L. (2016). Effects of meteorological conditions and plant growth stage on the accumulation of carvacrol and its precursors in *Thymus pulegioides*. *Phytochemistry*, 128, 20-26.
- Vargas-Mendoza, C. F., Ortegón-Campos I. G., & M., C. I. L. (2016). Natural selection under contrasting ecological conditions in the aromatic plant *Lippia graveolens* (H.B.K., Verbenaceae). *Plant Syst. Evol.*, 302, 275-289.
- Villavicencio, G. E. E., Cano Pineda A., & X., G. C. (2010). *Metodología para determinar las existencias de orégano (Lippia graveolens H.B.K) en rodales naturales de Parras de la Fuente, Coahuila* (Primera edición ed. Vol. 42). Saltillo, Coahuila: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.

- Yanishlieva, N. V., Marinova, E. M., Gordon, M. H., & Raneva, V. G. (1999). Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry*, 64(1), 59-66. doi: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00086-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00086-7)
- Zheng, W., & Wang, S. Y. (2001). Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5165-5170. doi: 10.1021/jf010697n

Dirección General de Bibliotecas UAG