

## Effect of extraction conditions on the concentration of phenolic compounds in Mexican oregano (*Lippia graveolens* Kunth) residues

## Efecto de las condiciones de extracción sobre la concentración de compuestos fenólicos en residuos de orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth)

M. Estela Frías-Zepeda & Martha Rosales-Castro\*

Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR Durango. Av. Sigma 119, fraccionamiento 20 de noviembre II. C. P. 34220. Durango, Durango, México.

\*Corresponding author: mrciidirdgo@yahoo.com; tel.: +52 618 100 4640.

### Abstract

**Introduction:** Mexican oregano (*Lippia graveolens* Kunth) leaves are marketed for use in food and for essential oil extraction. Phenolic compounds with antioxidant properties can be obtained from the residues (leaves without oil and stems) under appropriate extraction conditions.

**Objective:** To evaluate the effect of extraction solvent and mass/volume ratio on phenolic compounds concentration and their antioxidant capacity in oregano residues.

**Materials and methods:** Residual leaf (without oil) and stems of oregano were used to obtain extracts with 30, 50 and 80 % aqueous ethanol (ET30, ET50, ET80, respectively) and solvent mass/volume ratios (1:10, 1:20 and 1:30). Yield in solids, total phenols concentration and flavonoids, and antioxidant capacity were evaluated in the extracts. Similarity analysis between extracts was performed by HPLC-DAD and the main phenols were identified by UPLC-MS.

**Results and discussion:** Extract yields, phenol concentrations and flavonoids and antioxidant capacity for leaves were higher than for stems. The maximum concentration of phenols was obtained with ET80 and 1:30 ratio, which indicates better dissolution in ethanol than in water. The extracts ET50 and ET80 had chromatographic similarity of phenols in both residues; naringenin, taxifolin, eriodictyol, caffeic acid and luteolin were the major compounds.

**Conclusion:** Ethanol-water concentrations and mass/solvent ratios are feasible for obtaining flavonoid and non-flavonoid phenolic compounds with antioxidant capacity from oil-free leaves and stems of oregano.

**Keywords:** ethanolic extraction; total phenols; antioxidant capacity; flavonoids; naringenin.

### Resumen

**Introducción:** Las hojas de orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth) se comercializan para su uso en alimentos y para la extracción de aceite esencial. De los residuos (hojas sin el aceite y tallos) pueden obtenerse compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes, mediante condiciones de extracción adecuadas.

**Objetivo:** Evaluar el efecto del solvente de extracción y la relación masa/volumen sobre la concentración de compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante en residuos de orégano.

**Materiales y métodos:** La hoja residual (sin aceite) y los tallos del orégano se utilizaron para la obtención de extractos con etanol acuoso al 30, 50 y 80 % (ET30, ET50, ET80, respectivamente) y relaciones masa/volumen de solvente (1:10, 1:20 y 1:30). El rendimiento en sólidos, la concentración de fenoles totales y flavonoides, y la capacidad antioxidante se evaluaron en los extractos. Se realizó un análisis de similitud entre extractos por HPLC-DAD y se identificaron los fenoles principales por UPLC-MS.

**Resultados y discusión:** Los rendimientos de los extractos, la concentración de fenoles y flavonoides y la capacidad antioxidante en las hojas fueron mayores que en los tallos. La concentración máxima de fenoles se obtuvo con ET80 y relación 1:30, lo cual indica mejor disolución en etanol que en agua. Los extractos ET50 y ET80 tuvieron semejanza cromatográfica de fenoles en ambos residuos; la naringenina, taxifolina, eriodictiol, ácido cafeico y luteolina fueron los compuestos mayoritarios.

**Conclusión:** Las concentraciones de etanol-agua y las relaciones masa/solvente son factibles para la obtención de compuestos fenólicos tipo flavonoide y no flavonoide con capacidad antioxidante, a partir de hojas sin aceite y tallos de orégano.

**Palabras clave:** extracción etanólica; fenoles totales; capacidad antioxidante; flavonoides; naringenina.

## Introduction

Phenols are a group of organic compounds with a wide distribution in the plant kingdom. These compounds are divided into phenolic acids, phenylpropanoids, xanthenes, flavonoids, lignans, biflavonoids, lignins and tannins. Phenols have important biological, therapeutic and pharmaceutical characteristics, due to antioxidant properties (Caleja, Ribeiro, Barreiro, & Ferreira, 2017; Gutiérrez-Grijalva, Ambriz-Pérez, Leyva-López, Castillo-López, & Heredia, 2016).

Considering the diversity of phenolic compounds and plant sources they contain, there is no specific method for extraction, because the structure varies from simple to polymerized molecules (Del Rio et al., 2013). Extraction depends on the method used (maceration, Soxhlet, ultrasound or microwave), chemical nature of the compounds, polarity of solvent, particle size, among other parameters (Nacz & Shahidib, 2004). Acetone, ethyl acetate, methanol, ethanol, water, and mixtures of alcohols with water are used for extraction. Ethanol and ethanol-water mixtures are efficient, safe and low-toxicity solvents for food applications or for human consumption (Lim, Cabajar, Lobarbio, Taboada, & Lacks, 2019).

A wide variety of agro-industrial residues are an important source of phenolic compounds with antioxidant potential; some reports on residue valorization are those of grape seeds (Dang, Zhang, & Xiu, 2014), avocado (Rosero, Cruz, Osorio, & Hurtado, 2019) and pomegranate (Ambigaipalan, Costa de Camargo, & Shahidi, 2016) that may have application as nutraceutical ingredients with benefit to human health (Caleja et al., 2017).

*Lippia graveolens* Kunth and *Lippia berlandieri* Shauer are known as Mexican oregano. Leaves are used as a condiment in fresh and processed foods, as well as for obtaining essential oil, which is used in the production of cosmetics and pharmaceuticals (Martínez-Hernández, Villa-Castorena, Catalán-Valencia, & Inzunza-Ibarra, 2017). *Lippia graveolens* report phenolic compounds in leaf extracts with methanol/water and methanol (Gutiérrez-Grijalva et al., 2018; Lin, Sudarsan, Robbins, & Harnly, 2007; Pérez-Gutiérrez, 2014); in an extract of stems with hexane/ethyl acetate/methanol (González, Soto-Hernández, Kite, & Martínez-Vázquez, 2007); and for leaves without essential oil in which a process with supercritical carbon dioxide/ethanol was applied (Arias et al., 2020). The use of ethanol or mixtures with water for the extraction of phenolic compounds from the species has not been reported.

In Durango, Mexico, *L. graveolens* is located in 16 municipalities, including El Mezquital, Nazas, Cuencamé

## Introducción

Los fenoles son un grupo de compuestos orgánicos con distribución amplia en el reino vegetal. De forma general, estos compuestos se dividen en ácidos fenólicos, fenilpropanoides, xantonas, flavonoides, lignanos, biflavonoides, ligninas y taninos. Los fenoles tienen características biológicas, terapéuticas y farmacéuticas importantes, debido a sus propiedades antioxidantes (Caleja, Ribeiro, Barreiro, & Ferreira, 2017; Gutiérrez-Grijalva, Ambriz-Pérez, Leyva-López, Castillo-López, & Heredia, 2016).

Por la diversidad de compuestos fenólicos y las fuentes vegetales que los contienen, no existe un método específico para la extracción, ya que la estructura varía desde moléculas simples hasta polimerizadas (Del Rio et al., 2013). La extracción depende del método que se utilice (maceración, Soxhlet, ultrasonido o microondas), la naturaleza química de los compuestos, la polaridad del solvente, el tamaño de partícula, entre otros parámetros (Nacz & Shahidib, 2004). Para la extracción se utiliza acetona, acetato de etilo, metanol, etanol, agua y mezclas de alcoholes con agua. El etanol y las mezclas de etanol-agua son solventes eficientes, seguros y de baja toxicidad para aplicaciones alimentarias o para consumo humano (Lim, Cabajar, Lobarbio, Taboada, & Lacks, 2019).

Una variedad amplia de residuos agroindustriales son una fuente importante de compuestos fenólicos con potencial antioxidante; algunos reportes sobre la valoración de residuos son los de semillas de uva (Dang, Zhang, & Xiu, 2014), aguacate (Rosero, Cruz, Osorio, & Hurtado, 2019) y granada (Ambigaipalan, Costa de Camargo, & Shahidi, 2016) que pueden tener aplicación como ingredientes nutraceuticos con beneficio a la salud humana (Caleja et al., 2017).

Las especies *Lippia graveolens* Kunth y *Lippia berlandieri* Shauer son conocidas, de manera genérica, como orégano mexicano. Las hojas se utilizan como condimento en alimentos frescos y procesados, así como para la obtención de aceite esencial, el cual se emplea en la elaboración de cosméticos y fármacos (Martínez-Hernández, Villa-Castorena, Catalán-Valencia, & Inzunza-Ibarra, 2017). De la especie *L. graveolens* se reportan compuestos fenólicos en extractos de hojas con metanol/agua y metanol (Gutiérrez-Grijalva et al., 2018; Lin, Sudarsan, Robbins, & Harnly, 2007; Pérez-Gutiérrez, 2014); en un extracto de tallos con hexano/acetato de etilo/metanol (González, Soto-Hernández, Kite, & Martínez-Vázquez, 2007); y en hojas sin aceite esencial en el que se aplicó un proceso con dióxido de carbono supercrítico/etanol (Arias et al., 2020). No se ha reportado el uso de etanol o sus mezclas con agua para la extracción de compuestos fenólicos de la especie.

and Mapimí (Granados-Sánchez, Martínez-Salvador, López-Ríos, Borja-De la Rosa, & Rodríguez-Yam, 2013; López-Enríquez et al., 2011). In the municipality of Cuencamé, the Oro Verde del Semidesierto Cooperative was established, and its main economic activity is the collection of oregano leaves, although it also receives the complete plant material. Leaves are screened for cleaning and used both for bulk sale and for extracting essential oil using a supercritical carbon dioxide process without adding organic solvents. Residues generated in this cooperative is the remnant of leaves without the essential oil and stems, both are discarded because they have no apparent commercial value and cause disposal and accumulation problems.

The objective of this study was to evaluate the effect of extraction conditions of phenolic compounds on yield in solids, concentration of total phenols and flavonoids, as well as antioxidant capacity in oregano residues (leaves without oil and stems). The extraction was done using ethanol in three mixtures with water and three mass/volume ratios. The assessment was conducted with the purpose of evaluating residues and suggesting their applications.

## Materials and Methods

### Collection of plant material

The plant material was provided by the Oro Verde del Semidesierto Cooperative, located in Cuencamé, Durango. This cooperative collects oregano from *L. graveolens* from eight localities in the municipality. Sampling was carried out in August 2018. A total of two kg of leaves (remaining leaf material without oil) were collected with a particle size of 60 mesh and moisture content of 8.0 %, as well as 5 kg of stem with a particle size of 30 mesh and 8.5 % moisture. The material was stored in closed plastic bags and kept refrigerated at 4 °C until use.

### Extract preparation

Extraction was performed with the maceration method and aqueous ethanol was used as solvent at concentrations of 30, 50 and 80 % (ET30, ET50, ET80, respectively). The mass:solvent ratios evaluated were 1:10, 1:20 and 1:30, for a total of nine extracts for each raw material. To perform the extraction, each treatment was macerated at room temperature (25 °C) with stirring for 24 h. After this time, the extract was separated by filtration with Whatman paper No. 4. The remaining material was subjected to a second extraction with fresh solvent under the same conditions as in the first stage. Extracts from the first and second maceration were combined and concentrated in a rotary evaporator at 45 °C under

En el estado de Durango, México, *L. graveolens* se localiza en 16 municipios, entre los que se encuentran El Mezquital, Nazas, Cuencamé y Mapimí (Granados-Sánchez, Martínez-Salvador, López-Ríos, Borja-De la Rosa, & Rodríguez-Yam, 2013; López-Enríquez et al., 2011). En el municipio de Cuencamé se estableció la Cooperativa Oro Verde del Semidesierto que tiene como actividad económica principal el acopio de hojas de orégano, aunque también recibe el material vegetal completo. Las hojas se someten a un cribado para su limpieza y se utilizan tanto para venta a granel como para la extracción de aceite esencial mediante un proceso con dióxido de carbono supercrítico, sin adición de solventes orgánicos. Los residuos que se generan en esta cooperativa son el remanente de las hojas sin el aceite esencial y los tallos, ambos se desechan por no tener valor comercial aparente y causan problemas de disposición y acumulación.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de las condiciones de extracción de compuestos fenólicos sobre el rendimiento en sólidos, la concentración de fenoles totales y flavonoides, así como la capacidad antioxidante en residuos de orégano (hojas sin aceite y tallos). La extracción se hizo a través del uso de etanol en tres mezclas con agua y tres relaciones masa/volumen. La evaluación se realizó con el propósito de valorar los residuos y sugerir aplicaciones de estos.

## Materiales y métodos

### Recolecta de material vegetal

El material vegetal fue proporcionado por la Cooperativa Oro Verde del Semidesierto, ubicada en Cuencamé, Durango. Esta cooperativa acopia orégano de la especie *L. graveolens* proveniente de ocho localidades del municipio. El muestreo se realizó en agosto del 2018. Se recolectaron 2 kg de hojas (material remanente de las hojas sin el aceite) con un tamaño de partícula de malla 60 y contenido de humedad de 8.0 %, así como 5 kg de tallo con un tamaño de partícula de malla 30 y 8.5 % de humedad. El material se almacenó en bolsas plásticas cerradas y se mantuvo en refrigeración a 4 °C hasta su utilización.

### Preparación de extractos

La extracción se realizó por el método de maceración y se utilizó etanol acuoso como solvente a concentraciones de 30, 50 y 80 % (ET30, ET50, ET80, respectivamente). Las relaciones masa:solvente evaluadas fueron 1:10, 1:20 y 1:30, para un total de nueve extractos por cada materia prima. Para realizar la extracción, cada tratamiento se maceró a temperatura ambiente (25 °C) con agitación durante 24 h. Transcurrido este tiempo, el extracto se separó por filtración con papel Whatman núm. 4. El

vacuum, from which a concentrated aqueous extract was obtained and dried by lyophilization.

### Determination of phenolic compounds and antioxidant capacity

Yield in solids was evaluated by the total solids method and expressed as a percentage. Calculation corresponds to the quotient between the mass of crude extract (g) and the mass of material used (g), both on a dry basis.

Total phenol content was quantified by the Folin-Ciocalteu method, according to the methodology reported by Rosales-Castro, González-Laredo, Rivas-Arreola, and Karchesy (2017). The standard curve ( $y = 0.0012x + 0.0076$ ;  $R^2 = 0.9990$ ) was prepared with gallic acid. Results were expressed as mg gallic acid equivalents per g of dry extract ( $\text{mg EAG}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Total flavonoids were evaluated according to the methodology described by Rosales-Castro et al. (2017). The standard curve ( $y = 0.0034x - 0.03$ ;  $R^2 = 0.9981$ ) was prepared with catechin (Sigma-Aldrich). Results were expressed as mg catechin equivalents per g of dry extract ( $\text{mg EC}\cdot\text{g}^{-1}$ ).

Antioxidant capacity of extracts was evaluated through inhibition of free radicals by three *in vitro* methods: DPPH, ABTS and FRAP. This evaluation was performed at ET30, ET50 and ET80 in an ultraviolet-visible spectrophotometer (UV-VIS Hach, DR 5000, Germany), although only for the 1:30 m/v ratio, because it was the one with the highest concentration of total phenols and flavonoids.

The DPPH analysis was performed with the method reported by Rosales-Castro, Honorato-Salazar, Reyes-Navarrete, and Gonzalez-Laredo (2015) which is based on the transformation of DPPH- (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) as a stable radical to reduced DPPH. Such transformation is measured by the gradual color change (purple to yellow) at a wavelength of 515 nm for 30 min. Color change increases gradually according to the number of electrons accepted. The radical was used at a concentration of  $2.4 \text{ mg}\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$  dissolved in methanol. Extracts were analyzed over a range of 300 to  $1\ 800 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  to obtain  $\text{CE}_{50}$  corresponding to the effective concentration of extract to inhibit 50 % of the radical.

The ABTS radical (2,2'-azino-bis[3-ethylbenzothiazolin]-6-sulfonic acid) was measured at a wavelength of 754 nm, dissolved in ethanol at an absorbance value of  $0.70 \pm 0.1$ . The extracts were analyzed at a concentration of  $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  and the results were expressed as percent inhibition. The methodology reported by Rosales-Castro et al. (2015) was used.

material remanente se sometió a una segunda extracción con solvente fresco, bajo las mismas condiciones de la primera etapa. Los extractos de la primera y segunda maceración se combinaron y concentraron en un rotaevaporador a  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  aplicando vacío, del cual se obtuvo un extracto acuoso concentrado que se secó por liofilización.

### Determinación de los compuestos fenólicos y capacidad antioxidante

El rendimiento en sólidos se evaluó por el método de sólidos totales y se expresó en porcentaje. El cálculo corresponde al cociente entre la masa del extracto crudo (g) y la masa de material utilizado (g), ambos en base seca.

El contenido de fenoles totales se cuantificó por el método de Folin-Ciocalteu, de acuerdo con la metodología reportada por Rosales-Castro, González-Laredo, Rivas-Arreola, y Karchesy (2017). La curva estándar ( $y = 0.0012x + 0.0076$ ;  $R^2 = 0.9990$ ) se preparó con ácido gálico. Los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico por g de extracto seco ( $\text{mg EAG}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Los flavonoides totales se evaluaron de acuerdo con la metodología descrita por Rosales-Castro et al. (2017). La curva estándar ( $y = 0.0034x - 0.03$ ;  $R^2 = 0.9981$ ) se preparó con catequina (Sigma-Aldrich). Los resultados se expresaron en mg equivalentes de catequina por g de extracto seco ( $\text{mg EC}\cdot\text{g}^{-1}$ ).

La capacidad antioxidante de los extractos se evaluó a través de la inhibición de radicales libres por tres métodos *in vitro*: DPPH, ABTS y FRAP. Esta evaluación se realizó en ET30, ET50 y ET80 en un espectrofotómetro ultravioleta-visible (UV-VIS Hach, DR 5000, Alemania), aunque solo para la relación 1:30 m/v, ya que fue la que presentó mayor concentración de fenoles totales y flavonoides.

El análisis DPPH se realizó con el método reportado por Rosales-Castro, Honorato-Salazar, Reyes-Navarrete, y González-Laredo (2015) que se basa en la transformación del DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) como radical estable a DPPH reducido. Dicha transformación se mide por el cambio gradual de color (púrpura a amarillo) a una longitud de onda de 515 nm durante 30 min. El cambio de color aumenta gradualmente de acuerdo con el número de electrones aceptados. El radical se utilizó a una concentración de  $2.4 \text{ mg}\cdot 100 \text{ mL}^{-1}$  disuelto en metanol. Los extractos se analizaron en un rango de 300 a  $1\ 800 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  para obtener la  $\text{CE}_{50}$  que corresponde a la concentración efectiva de extracto para inhibir 50 % del radical.

El radical ABTS (ácido 2,2'-azinobis[3-etilbenzotiazolin]-6-sulfónico) se midió a una longitud de onda de 754 nm, disuelto en etanol a un valor de absorbancia de 0.70

The FRAP method or iron reducing antioxidant power was evaluated according to the methodology of Rosales-Castro et al. (2015). The extracts were dissolved in ethanol at a concentration of 200 mg·L<sup>-1</sup>. A calibration curve was performed with trolox and the results were expressed as millimoles trolox equivalent (mmol ET).

### Qualitative comparison of phenolic compounds by HPLC-DAD

This evaluation consisted of a chromatographic analysis of the extracts (ET30, ET50, ET80) of leaves and stems, m/v ratio 1:30, to determine the effect of the solvent on the extraction of compounds with the three ethanol concentrations and to compare them qualitatively.

The analysis was performed in a high-performance liquid chromatography equipment coupled to a diode array detector (HPLC-DAD Infinity 1260 Series, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), according to the methodology described by Gutiérrez-Macías, Peralta-Cruz, Borja-De la Rosa, and Barragán-Huerta (2016). Extracts were used at concentration of 1 000 mg·L<sup>-1</sup>, injection volume 20 µL, C<sub>18</sub> column (Agilent Technologies) 4.6 x 150 mm, 5 µm, 2.5 % acetic acid mobile phase (phase A) and acetonitrile (phase B) with flow rate of 1 mL·min<sup>-1</sup>. Phenolic compounds were monitored at 280 nm. Only compounds showing the highest absorbance were considered.

After obtaining the chromatograms, a presence (1) and absence (0) analysis was carried out at the different retention times (between 0 and 35 min), where compounds eluted in the six samples analyzed. With the presence/absence information, a dendrogram was elaborated to analyze the grouping of the solubilized compounds when using the three ethanol concentrations.

### Identification of phenolic compounds by UPLC-MS

ET80 1:30 samples, both leaves and stems, were analyzed using the methodology proposed by Villegas-Novoa et al. (2019). Extracts were dissolved at 1 000 mg·L<sup>-1</sup> in 80 % ethanol. An Acquity UPLC-MS (mass spectrometry coupled to high-performance liquid chromatography) system consisting of an automatic injector, pumps, and a Xevo TQ-S tandem triple quadrupole mass spectrometer (Waters Corp., Milford, MA, USA) was used. Phenolic compounds were separated on a C<sub>18</sub> 100 x 2.1 mm, 1.7 µm column employing 7.5 mM formic acid mobile phase (phase A) and acetonitrile (phase B) with 210 µL·min<sup>-1</sup>, flow rate. Compounds were identified by interpreting mass spectra, through MS/MS array and using standards (Sigma-Aldrich) of various phenolic compounds (phenolic acids and flavonoids) by negative ionization.

± 0.1. Los extractos se analizaron a una concentración de 200 mg·L<sup>-1</sup> y los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición. Se utilizó la metodología reportada por Rosales-Castro et al. (2015).

El método FRAP o poder antioxidante reductor del hierro se evaluó de acuerdo con la metodología de Rosales-Castro et al. (2015). Los extractos se disolvieron en etanol a concentración de 200 mg·L<sup>-1</sup>. Se realizó una curva de calibración con trolox y los resultados se expresaron como milimoles equivalentes de trolox (mmol ET).

### Comparación cualitativa de los compuestos fenólicos por HPLC-DAD

Esta evaluación consistió en un análisis cromatográfico de los extractos (ET30, ET50, ET80) de hojas y tallos, relación m/v 1:30, con la finalidad de determinar el efecto del solvente sobre la extracción de los compuestos con las tres concentraciones de etanol y compararlos cualitativamente.

El análisis se hizo en un equipo de cromatografía líquida de alta resolución acoplado a un detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD Infinity 1260 Series, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA), de acuerdo con la metodología descrita por Gutiérrez-Macías, Peralta-Cruz, Borja-De la Rosa, y Barragán-Huerta (2016). Los extractos se utilizaron a concentración de 1 000 mg·L<sup>-1</sup>, volumen de inyección 20 µL, columna C<sub>18</sub> (Agilent Technologies) 4.6 x 150 mm, 5 µm, fase móvil de ácido acético al 2.5 % (fase A) y acetonitrilo (fase B) con flujo de 1 mL·min<sup>-1</sup>. Los compuestos fenólicos se monitorearon a 280 nm. Solo se consideraron los compuestos que mostraron mayor absorbancia.

Después de obtener los cromatogramas se efectuó un análisis de presencia (1) y ausencia (0) a los diferentes tiempos de retención (entre 0 y 35 min) en los que los compuestos eluyeron en las seis muestras analizadas. Con la información de presencia/ausencia se elaboró un dendrograma, para analizar el agrupamiento de los compuestos solubilizados al utilizar las tres concentraciones de etanol.

### Identificación de los compuestos fenólicos por UPLC-MS

Las muestras ET80 1:30, tanto de hojas como de tallos, se analizaron con la metodología propuesta por Villegas-Novoa et al. (2019). Los extractos se disolvieron a 1 000 mg·L<sup>-1</sup> en etanol al 80 %. Se utilizó un sistema UPLC-MS Acquity (espectrometría de masas acoplado a cromatografía líquida de alta resolución) que consta de un inyector automático, bombas y un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Xevo TQ-S tandem

Quantification was done from the standard curve of each of the compounds (standards) and results were reported as relative percentage of the response of each compound compared to the total response in a UPLC chromatogram.

### Statistical analysis

The experiment for the evaluation of yield, total phenols and flavonoids was carried out in a 3<sup>2</sup> factorial design: two factors (ethanol concentration and mass/volume ratio) and three levels (ET30, ET50, ET80; 1:10, 1:20, 1:30), both for leaves and stems. An analysis of variance and Tukey's mean comparison test ( $P \leq 0.05$ ) were applied with the STATISTICA v.7 statistical package (StatSoft Inc., 2007). The chromatographic comparison was done with the PAST version 3.21 program (Hammer, Harper, & Ryan, 2018).

### Results and Discussion

Extraction is a mass transfer process involving three stages: penetration of solvent into the solid phase (internal transport), dissolution of the solute (solubility) and diffusion of the solute from the solid phase to the solvent (external transport).

Extraction yield in materials studied was from 24.3 % (ET30-1:10) to 31.18 % (ET50-1:30) for leaves and from 13.0 % (ET30-1:10) to 19.95 % (ET50-1:30) for stems, which indicates that for every 100 g of dry leaf residue up to 31 g of dry extract could be obtained and 19.95 g in the case of stems. The highest yield was for the m/v ratio of 1:30 and ET50, both for leaves and stems, while extractions with the 1:10 ratio had the lowest yield. The m/v ratio of 1:20 showed no statistical difference ( $P > 0.05$ ) with the 1:30 ratio. M/v ratios of 1/40 are reported as optimal in extractions of the *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl. fruit (Lim, Sook, Yusoff, Mudalipa, & Gim bun, 2019) and yields of 7.92, 15.17 and 37.0 % in agro-industrial residues of grape, peanut and mango, respectively (Costa et al., 2016). For *L. graveolens* leaves, yields of 25.74 % in extractions with methanol and 19.73 % in extractions with water are reported (González-Trujano et al., 2017). For the solvent concentration, the highest yield in solids was achieved with ET50, being significantly higher ( $P < 0.05$ ) than with ET30 and ET80. Solubility of phenolic compounds depends on the type and polarity of the solvent, the chemical structure of the compounds, degree of polymerization, interaction with other constituents in plant material and formation of insoluble complexes. Therefore, there is no single procedure that is satisfactory and suitable for the extraction of all phenols or a specific class of phenolic substances in plant materials (Ajila et al., 2011).

(Waters Corp., Milford, MA, EUA). Los compuestos fenólicos se separaron en una columna C<sub>18</sub> 100 × 2.1 mm, 1.7 μm, empleando fase móvil de ácido fórmico 7.5 mM (fase A) y acetonitrilo (fase B) con flujo de 210 μL·min<sup>-1</sup>. Los compuestos se identificaron mediante la interpretación de sus espectros de masas, a través del arreglo MS/MS y utilizando estándares (Sigma-Aldrich) de varios compuestos fenólicos (ácidos fenólicos y flavonoides) mediante el modo de ionización negativa. La cuantificación se hizo a partir de la curva estándar de cada uno de los compuestos (estándares) y los resultados se reportaron como porcentaje relativo de la respuesta de cada compuesto con respecto a la respuesta total en un cromatograma de UPLC.

### Análisis estadístico

El experimento para la evaluación de rendimiento, fenoles totales y flavonoides se condujo en un diseño factorial 3<sup>2</sup>: dos factores (concentración de etanol y relación masa/volumen) y tres niveles (ET30, ET50, ET80; 1:10, 1:20, 1:30), tanto en hojas como en tallos. Se aplicó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) con el paquete estadístico STATISTICA v.7 (StatSoft Inc., 2007). La comparación cromatográfica se hizo con el programa PAST versión 3.21 (Hammer, Harper, & Ryan, 2018).

### Resultados y discusión

La extracción es un proceso de transferencia de masa que involucra tres etapas: la penetración del solvente a la fase sólida (transporte interno), la disolución del soluto (solubilidad) y la difusión del soluto desde la fase sólida al solvente (transporte externo).

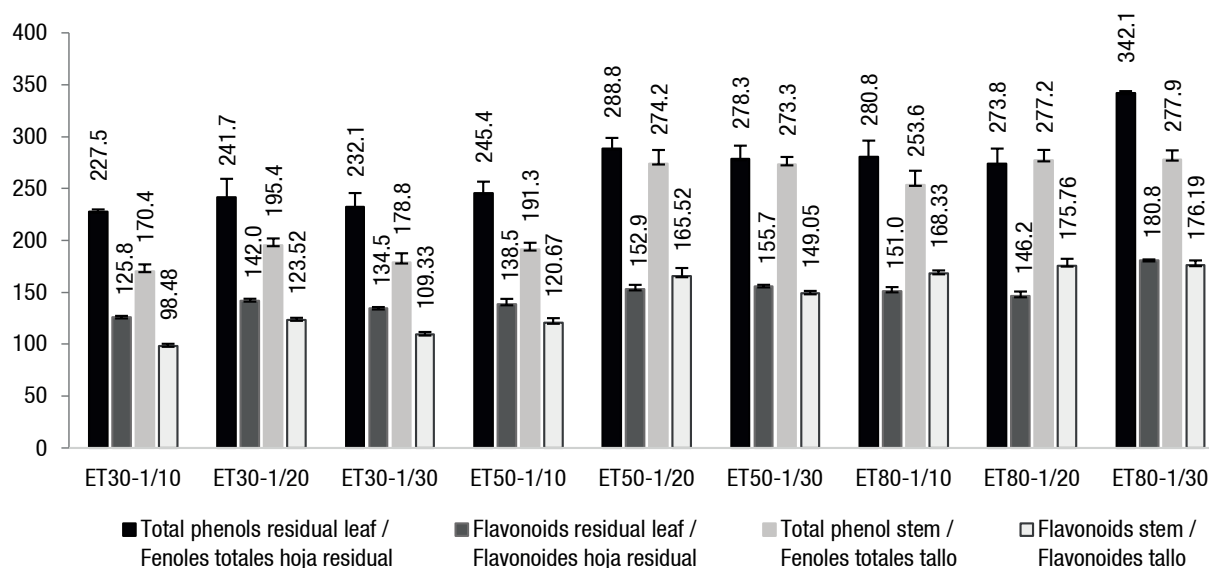
El rendimiento de extracción en los materiales evaluados fue de 24.3 % (ET30-1:10) a 31.18 % (ET50-1:30) en las hojas y de 13.0 % (ET30-1:10) a 19.95 % (ET50-1:30) en los tallos, lo que indica que por cada 100 g secos del residuo de hojas se pudieran obtener hasta 31 g de extracto seco y 19.95 g en el caso de tallos. El mayor rendimiento se obtuvo con la relación m/v de 1:30 y con ET50, tanto en hojas como en tallos, mientras que las extracciones con la relación 1:10 tuvieron los rendimientos más bajos. La relación m/v de 1:20 no mostró diferencia estadística ( $P > 0.05$ ) con la relación 1:30. Se reportan relaciones m/v de 1/40 como óptimas en extracciones del fruto de *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl. (Lim, Sook, Yusoff, Mudalipa, & Gim bun, 2019), así como rendimientos de 7.92, 15.17 y 37.0 % en residuos agroindustriales de uva, cacahuete y mango, respectivamente (Costa et al., 2016). Para hojas de *L. graveolens* se reportan rendimientos de 25.74 % en extracciones con metanol y 19.73 % en extracciones con agua (González-Trujano et al., 2017). Con respecto a la

Total phenol concentration was higher in leaf extracts compared to stem extracts. Leaf concentration ranged from 227.5 to 342.1 mg EAG·g<sup>-1</sup> and from 170.4 to 277.9 mg EAG·g<sup>-1</sup> in stems (Figure 1). In both leaves and stems, the maximum concentration was obtained with ET80 and 1:30 ratio. Statistical difference ( $P < 0.05$ ) was observed in the concentration of phenols depending on the solvent used, as well as between the two materials evaluated; however, in the m/v ratio, only the 1:10 ratio showed difference with the rest. A methanolic extract of *L. graveolens* leaves free of essential oil (Martínez-Rocha, Puga, Hernández-Sandoval, Loarca-Piña, & Mendoza, 2008) reported total phenol concentrations of 211 to 270 mg EAG·g<sup>-1</sup>, values lower than those obtained in this study. In another study, from mango residues, Lim et al. (2019) used ethanol-water mixtures in proportions from 0 to 100 % ethanol and found that the 50/50 ethanol mixture was the most favorable to obtain the maximum yield in total phenols. These authors attribute their results to the "like dissolves like" principle, where water dissolves polar compounds, while ethanol dissolves less polar ones.

Flavonoids are a group of compounds that are part of the total phenolic content; the concentration ranged from 125.8 to 180.7 mg EC·g<sup>-1</sup> for leaves and from 98.4 to 176.2 mg EC·g<sup>-1</sup> for stems (Figure 1). In both leaves and stems, the highest concentrations were

concentración del solvente, el rendimiento más alto en sólidos se alcanzó con ET50, siendo significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) que con ET30 y ET80. La solubilidad de los compuestos fenólicos depende del tipo y polaridad del solvente, de la estructura química de los compuestos, su grado de polimerización, la interacción de estos con otros constituyentes en el material vegetal y la formación de complejos insolubles. Por tanto, no existe un procedimiento único que sea satisfactorio y adecuado para la extracción de todos los fenoles o una clase específica de sustancias fenólicas en materiales vegetales (Ajila et al., 2011).

La concentración de fenoles totales fue mayor en extractos de hojas con respecto a los de tallos. La concentración en hojas varió de 227.5 a 342.1 mg EAG·g<sup>-1</sup> y de 170.4 a 277.9 mg EAG·g<sup>-1</sup> en tallos (Figura 1). Tanto en las hojas como en los tallos, la concentración máxima se obtuvo con ET80 y relación 1:30. Existe diferencia estadística ( $P < 0.05$ ) en la concentración de fenoles dependiendo del solvente utilizado, así como entre los dos materiales evaluados; sin embargo, en la relación m/v, solo la relación 1:10 presentó diferencia con el resto. En un extracto metanólico de hojas de *L. graveolens* libres de aceite esencial (Martínez-Rocha, Puga, Hernández-Sandoval, Loarca-Piña, & Mendoza, 2008) se reportaron concentraciones de fenoles totales de 211 a 270 mg EAG·g<sup>-1</sup>, valores menores que los



**Figure 1.** Concentration of total phenols (milligram equivalents of gallic acid per gram of dry extract) and flavonoids (milligram equivalents of catechin per gram of dry extract) in oil-free residual leaf and stems of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) from an aqueous ethanol extract as solvent at concentrations of 30, 50 and 80 % (ET30, ET50, ET80, respectively) with mass:solvent ratio of 1/10, 1/20 and 1/30.

**Figura 1.** Concentración de fenoles totales (miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco) y flavonoides (miligramos equivalentes de catequina por gramo extracto seco) en hoja residual sin aceite y tallos de orégano mexicano (*Lippia graveolens*) a partir de un extracto etanol acuoso como solvente a concentraciones de 30, 50 y 80 % (ET30, ET50, ET80, respectivamente) con relación masa:solvente de 1/10, 1/20 y 1/30.

obtained with ET80 and 1:30 ratio, although with no statistical difference for the 1:20 ratio. Differences between solvents ET50 and ET80 were significant ( $P < 0.05$ ) compared to ET30. These results indicate that flavonoids from oregano leaves and stems have better dissolution in ethanol than in water. Martínez-Rocha et al. (2008) reported 136 to 200 mg EC·g<sup>-1</sup> of flavonoids in a methanolic extract of leaves free of essential oil, values similar to those obtained with ET80.

From total phenol and flavonoid data, the flavonoid/phenol ratio was estimated for the three ethanol concentrations. For leaves, the flavonoid/phenol ratio decreased with increasing ethanol concentration, as the ratio was 57.3 % with ET30 and decreased to 53.3 % when increased to ET80, indicating that this concentration favors the extraction of non-flavonoid phenolic compounds, possibly phenolic acids and stilbenes. For the stems, the behavior was reversed, since the flavonoid/phenol ratio was 60.7 % when using ET30 and increased to 62.6 % with ET80, which favored the extraction of flavonoid-type phenolic compounds.

### Antioxidant capacity

Regarding the antioxidant capacity in the evaluation with the DPPH radical, leaf extracts had higher inhibition compared to stem extracts. Figure 2a shows the results CE<sub>50</sub>, which corresponds to the effective concentration of extract to inhibit 50 % of the radical; the lower concentration of the extract (mg·L<sup>-1</sup>) indicates that the activity is higher. The highest capacity was for leaf samples with ET80 (447 mg·L<sup>-1</sup> extract) and for stems with ET50 (748 mg·L<sup>-1</sup> extract), although with no statistical difference ( $P > 0.05$ ) for stems with ET80 (750 mg·L<sup>-1</sup>).

For the ABTS (Figure 2b) and FRAP (Figure 2c) analyses, extracts showed similar trend of antioxidant capacity in both techniques. For ABTS, the results were expressed as percentage of inhibition, so the higher the percentage, the better the inhibitory capacity. The highest inhibition was for stems ET50 with 46 %, followed by leaves ET80 with 44 %. For FRAP, the results indicate that the extract with the highest capacity was for leaf ET80 with 346 mmol ET, followed by stems ET50 with 320 mmol ET. In a study on the extraction of phenolic compounds in mango residues, Lim et al. (2019) report that the best results in DPPH and FRAP analyses were obtained with ethanol/water extraction at 50/50 (v/v) ratio.

The correlation between the concentration of total phenols and flavonoids was analyzed concerning the antioxidant capacity; the highest correlation was obtained between total phenols and FRAP ( $R^2 = 0.87$ ). The values obtained for the correlations with flavonoids were low: flavonoids and DPPH ( $R^2 = 0.62$ ), flavonoids

obtenidos en este trabajo. En otro estudio, a partir de residuos de mango, Lim et al. (2019) utilizaron mezclas de etanol-agua en proporciones de 0 a 100 % etanol y encontraron que la mezcla etanol 50/50 fue la más favorable para obtener el rendimiento máximo en fenoles totales. Estos autores atribuyen sus resultados al principio de "similar disuelve a lo similar", donde el agua disuelve compuestos polares, mientras que el etanol disuelve los menos polares.

Los flavonoides son un grupo de compuestos que forman parte del contenido fenólico total; la concentración varió de 125.8 a 180.7 mg EC·g<sup>-1</sup> en hojas y de 98.4 a 176.2 mg EC·g<sup>-1</sup> en tallos (Figura 1). Tanto en hojas como en tallos, las concentraciones mayores se obtuvieron con ET80 y relación 1:30, aunque sin diferencia estadística para la relación 1:20. Las diferencias entre los solventes ET50 y ET80 fueron significativas ( $P < 0.05$ ) con respecto a ET30. Estos resultados indican que los flavonoides de las hojas y los tallos de orégano tienen mejor disolución en etanol que en agua. Martínez-Rocha et al. (2008) reportaron 136 a 200 mg EC·g<sup>-1</sup> de flavonoides en un extracto metanólico de hojas libre de aceite esencial, valores similares a los obtenidos con ET80.

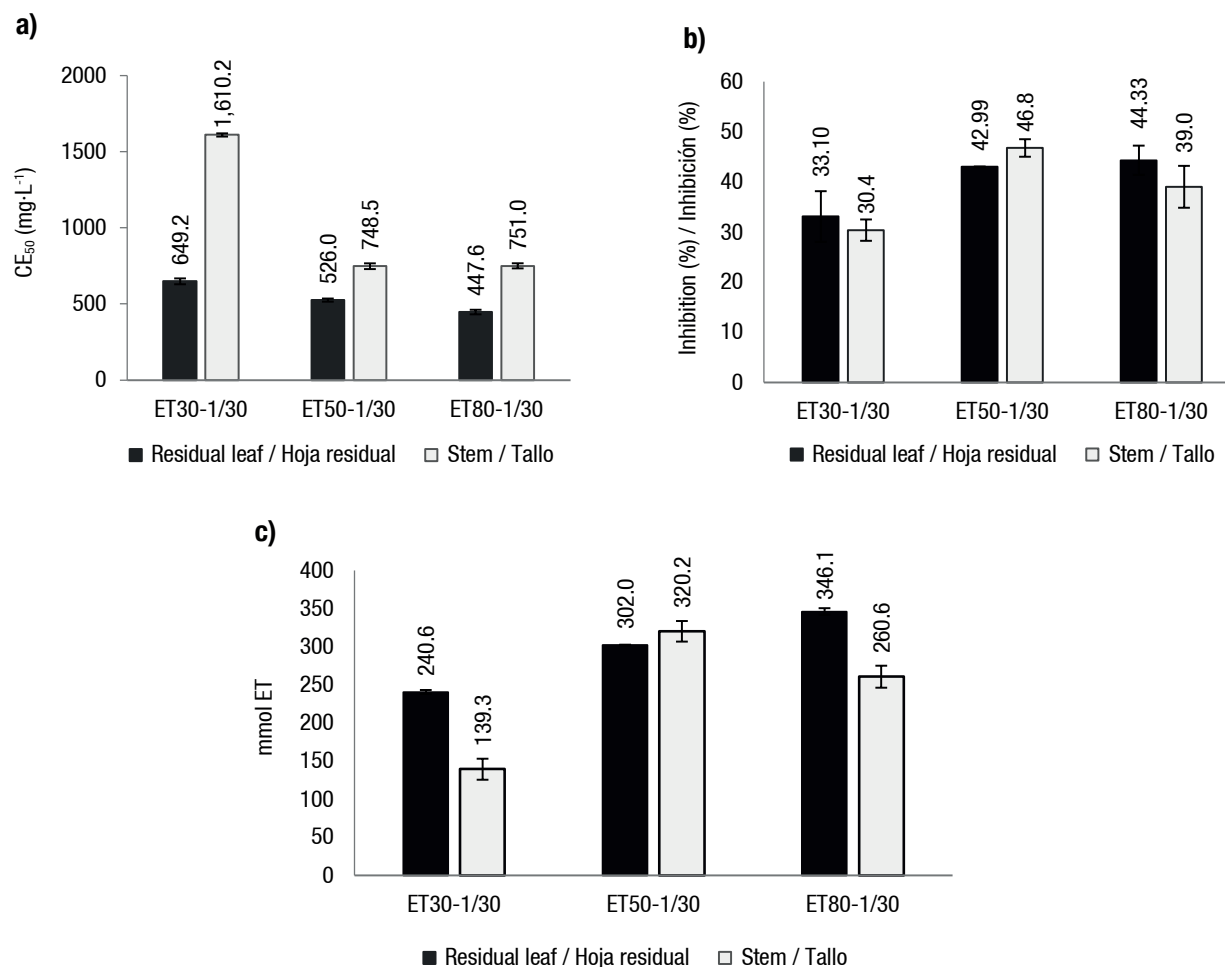
A partir de los datos de fenoles totales y flavonoides, la relación flavonoides/fenoles se calculó en las tres concentraciones de etanol. En las hojas, la relación de flavonoides/fenoles disminuyó al aumentar la concentración de etanol, ya que la relación fue de 57.3 % con el ET30 y disminuyó a 53.3 % cuando aumentó a ET80, lo que indica que esta concentración favorece la extracción de compuestos fenólicos no flavonoides, posiblemente ácidos fenólicos y estilbenos. En los tallos, el comportamiento fue inverso, ya que la relación flavonoides/fenoles fue de 60.7 % al utilizar ET30 y aumentó a 62.6 % con ET80, la cual favoreció la extracción de compuestos fenólicos de tipo flavonoide.

### Capacidad antioxidante

Con respecto a la capacidad antioxidante en la evaluación con el radical DPPH, los extractos de hojas tuvieron mayor inhibición que los extractos de tallos. La Figura 2a muestra los resultados CE<sub>50</sub>, que corresponde a la concentración efectiva de extracto para inhibir 50 % del radical; la concentración menor del extracto (mg·L<sup>-1</sup>) indica que la actividad es mayor. La mayor capacidad se obtuvo en las muestras de hojas con ET80 (447 mg·L<sup>-1</sup> de extracto) y en tallos con ET50 (748 mg·L<sup>-1</sup> de extracto), aunque sin diferencia estadística ( $P > 0.05$ ) para tallos con ET80 (750 mg·L<sup>-1</sup>).

Para los ensayos con ABTS (Figura 2b) y FRAP (Figura 2c), los extractos mostraron tendencia similar de capacidad antioxidante en ambas técnicas. En el ensayo ABTS, los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición,





**Figure 2.** Antioxidant capacity of residual leaf extracts (without oil) and stems of oregano (*Lippia graveolens*) by techniques a) DPPH, expressed as effective concentration to inhibit 50% of the radical (EC<sub>50</sub>), b) ABTS expressed as percentage inhibition and c) FRAP in millimol equivalents of trolox (mmol ET) from an aqueous ethanol extract as solvent at concentrations of 30, 50 and 80% (ET30, ET50, ET80, respectively) with mass ratio: solvent of 1/30.

**Figura 2.** Capacidad antioxidante de extractos de hoja residual (sin aceite) y tallos de orégano (*Lippia graveolens*) por las técnicas a) DPPH, expresado como concentración efectiva para inhibir 50% del radical (CE<sub>50</sub>), b) ABTS expresada como porcentaje de inhibición y c) FRAP en milimoles equivalentes de trolox (mmol ET) a partir de un extracto etanol acuoso como solvente a concentraciones de 30, 50 y 80% (ET30, ET50, ET80, respectivamente) con relación masa:solvente de 1/30.

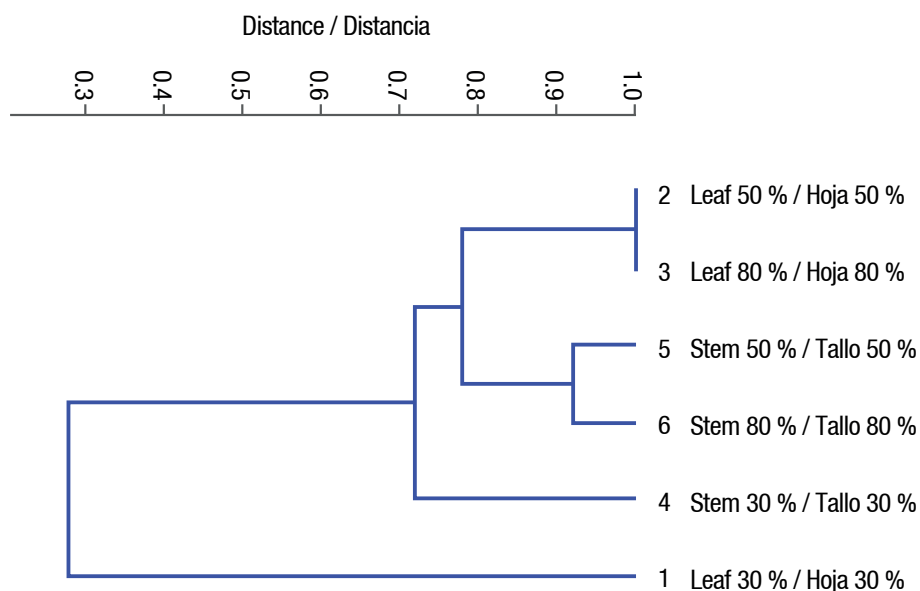
and ABTS ( $R^2 = 0.50$ ), flavonoids and FRAP ( $R^2 = 0.66$ ). The above indicates that, although the concentration of flavonoids in both leaves and stems is high, the chemical structure of some of these compounds does not allow them to have good free radical trapping capacity.

#### Qualitative comparison of phenolic compounds by HPLC-DAD

The similarity of the compounds extracted with ET30, ET50 and ET80 ethanol concentrations, both for leaves and stems, is shown in the cluster analysis in Figure 3. The results showed that, for leaves, the compounds solubilized with ET50 are the same as those dissolved

por lo que a mayor porcentaje la capacidad inhibitoria es mejor. La mayor inhibición se obtuvo en tallos ET50 con 46%, seguido por hojas ET80 con 44%. Para FRAP, los resultados indican que el extracto con la mayor capacidad fue el de hoja ET80 con 346 mmol ET, seguido por el de tallos ET50 con 320 mmol ET. En un estudio sobre la extracción de compuestos fenólicos en residuos de mango, Lim et al. (2019) reportan que los mejores resultados en los análisis de DPPH y FRAP se obtuvieron con la extracción etanol/agua en proporción 50/50 (v/v).

La correlación entre la concentración de fenoles totales y flavonoides se analizó con respecto a la capacidad antioxidante; la mayor correlación se obtuvo entre fenoles totales y FRAP ( $R^2 = 0.87$ ). Los valores obtenidos



**Figure 3.** Cluster analysis from the presence (1) and absence (0) of compounds (chromatographic peaks) extracted with aqueous ethanol at concentrations of 30, 50 and 80 % at different retention times (between 0 and 35 min), in oil-free leaves and stems of oregano (*Lippia graveolens*).

**Figura 3.** Análisis de conglomerados a partir de la presencia (1) y ausencia (0) de compuestos (picos cromatográficos) extraídos con etanol acuoso en concentraciones de 30, 50 y 80 % a diferentes tiempos de retención (entre 0 y 35 min) en hojas sin aceite y tallos de orégano (*Lippia graveolens*).

in ET80 qualitatively and, for stems, the similarity between those soluble in ET50 and ET80 is 95 %. For ET30 stem extracts, the similarity with the rest is 70 %, while for ET30 leaves, the similarity is less than 30 %. From this information, it can be deduced that the solvent concentrations ET50 and ET80 did not affect the solubility of the compounds qualitatively, although they did affect the solubility of the compounds quantitatively. The compounds solubilized with ET30 are different from the rest.

#### Identification of phenolic compounds by UPLC-MS

Table 1 shows the compounds identified in the ET80-1:30 extracts and their concentrations in residual leaf and stems. The leaf extract had 14.67 % caffeic acid, while in the stem extract this compound represented 7.34 %. For the compound 2-hydroxybenzoic acid, contents were 2.01 % for leaves and 2.86 % for stems. The flavonoids in the leaf extract were naringenin (25.95 %), taxifolin (17.61 %), eriodictyol (15.13 %), acacetin (10.44 %), luteolin (4.43 %), quercetin 3-O-glycoside (3.59 %), apigenin (1.53 %), floridzin (1.0 %) and quercetin (0.80 %). For the stem extract, the flavonoids identified were naringenin (30.11 %), taxifolin (21.31 %), eriodictyol (20.59 %), luteolin (6.12 %), quercetin 3-O-glycoside (2.82 %), apigenin (2.18 %), quercetin (0.96 %), acacetin (0.94 %) and floridzin (0.9 %).

para las correlaciones con flavonoides fueron bajos: flavonoides y DPPH ( $R^2 = 0.62$ ), flavonoides y ABTS ( $R^2 = 0.50$ ), flavonoides y FRAP ( $R^2 = 0.66$ ). Lo anterior indica que, aunque la concentración de flavonoides tanto en hojas como en tallos sea alta, la estructura química de algunos de estos compuestos no permite que tengan buena capacidad de atrapamiento de radicales libres.

#### Comparación cualitativa de los compuestos fenólicos por HPLC-DAD

La semejanza de los compuestos extraídos con las concentraciones de etanol ET30, ET50 y ET80, tanto en hojas como en tallos, se muestra en el análisis de conglomerados de la Figura 3. Los resultados mostraron que, en las hojas, los compuestos solubilizados con ET50 son los mismos que se disolvieron en ET80 de forma cualitativa y, en el caso de los tallos, la semejanza entre los solubles en ET50 y ET80 es de 95 %. Para los extractos de tallos ET30, la semejanza con el resto es del 70 %, mientras que en las hojas ET30, la semejanza es menor de 30 %. De esta información se deduce que las concentraciones del solvente ET50 y ET80 no afectaron la solubilidad de los compuestos de forma cualitativa, aunque sí de manera cuantitativa. Los compuestos que se solubilizan con ET30 son diferentes del resto.

**Table 1. Phenolic compounds identified in ethanolic extracts (80 % in 1:30 m/v ratio) of oil-free leaves and stems of Mexican oregano.****Cuadro 1. Compuestos fenólicos identificados en extractos etanólicos (80 % en proporción 1:30 m/v) de hojas sin aceite y tallos de orégano mexicano.**

Content / Compuesto	Classification / Clasificación	Retention time (min) / Tiempo de retención (min)	Extract of leaves without oil (%) / Extracto de hojas sin aceite (%)	Stem extract (%) / Extracto de tallos (%)
Quinic acid / Ácido quínico	Phenolic Acid / Ácido fenólico	1.33	0.35	0.50
Protocatechuic acid / Ácido protocatecuico	Phenolic Acid / Ácido fenólico	2.70	0.69	0.85
4-hydroxybenzoic acid / Ácido 4-hidroxibenzoico	Phenolic Acid / Ácido fenólico	3.74	0.18	0.27
Caffeic acid / Ácido cafeico	Phenolic Acid / Ácido fenólico	4.32	14.67	7.34
Coumaric acid / Ácido cumárico	Phenolic Acid / Ácido fenólico	5.51	0.37	0.59
Quercetin-3-O-glucoside / Quercetina-3-O-glucósido	Flavonol	5.80	3.59	2.82
Rutin / Rutina	Flavonol	6.35	0.32	0.35
Taxifolin / Taxifolina	Flavanone / Flavanona	6.41	17.61	21.31
2-Hydroxybenzoic acid / Ácido 2-hidroxibenzoico	Phenolic Acid / Ácido fenólico	7.56	2.01	2.86
Neohesperidin / Neohesperidina	Dihydrochalcone / Dihidrochalcona	7.79	0.63	0.60
Floridzin / Floridzina	Dihydrochalcone / Dihidrochalcona	7.79	1.00	0.90
Eriodictyol / Eriodictiol	Flavanone / Flavanona	8.67	15.13	20.59
Luteolin / Luteolina	Flavone / Flavona	8.92	4.43	6.12
Quercetin / Quercetina	Flavone / Flavona	8.96	0.80	0.96
Naringenin / Naringenina	Flavanone / Flavanona	9.73	25.95	30.11
Apigenin / Apigenina	Flavone / Flavona	9.84	1.53	2.18
Acacetin / Acacetina	Flavone / Flavona	12.51	10.44	0.94

Compounds coincide with those identified for leaves without essential oil (Arias et al., 2020), in methanolic extracts of leaves (Gutiérrez-Grijalva et al., 2018; Pérez-Gutiérrez, 2014) and for stem extracts obtained with hexane/ethyl acetate/methanol mixture (González et al., 2007). Some other compounds reported for *L. graveolens* were not identified in this study, because reference standards for their identification and quantification were not available.

ET80 favored the extraction of non-flavonoid phenolic compounds in leaves and agrees with the results obtained in the identification section, because the concentration of caffeic acid is higher for leaves than stems. The analysis also showed that ET80 favored the extraction of flavonoids in stems, because concentration was higher than in leaf extract.

There are several mechanisms to determine antioxidant activity of phenolic compounds (Apak, Özyürek, Güçlü, & Çapanoğlu, 2016). One of them is through free radical scavenging, which depends on the number of hydroxyl groups and their position in the molecule, as well as the substituent groups, whether hydroxyl, methoxyl,

### Identificación de los compuestos fenólicos por UPLC-MS

El Cuadro 1 presenta los compuestos identificados en los extractos ET80-1:30 y sus concentraciones en hoja residual y tallos. El extracto de hojas tuvo 14.67 % de ácido cafeico, mientras que en el extracto de tallos este compuesto representó 7.34 %. Para el compuesto ácido 2-hidroxibenzoico, los contenidos fueron 2.01 % en hojas y 2.86 % en tallos. Los flavonoides del extracto de hojas fueron naringenina (25.95 %), taxifolina (17.61 %), eriodictiol (15.13 %), acetina (10.44 %), luteolina (4.43 %), quercetina 3-O-glicósido (3.59 %), apigenina (1.53 %), floridzina (1.0 %) y quercetina (0.80 %). En el extracto de tallos, los flavonoides identificados fueron naringenina (30.11 %), taxifolina (21.31 %), eriodictiol (20.59 %), luteolina (6.12 %), quercetina 3-O-glicósido (2.82 %), apigenina (2.18 %), quercetina (0.96 %), acetina (0.94 %) y floridzina (0.9 %).

Los compuestos coinciden con los identificados en hojas sin aceite esencial (Arias et al., 2020), en extractos metanólicos de hojas (Gutiérrez-Grijalva et al., 2018; Pérez-Gutiérrez, 2014) y en extractos de tallos obtenidos

glycosides, among others (Yi-Zhong, Sun, Xing, Luo, & Cork, 2006). In the case of flavonoids, the free radical trapping capacity increases with increasing degree of hydroxylation; flavonoids without hydroxyl groups have no radical scavenging capacity (Chen et al., 2018). Substitution patterns in the A- and B-rings, as well as the double bond between C2-C3 and the 4-oxo group in the C-ring are related to the low or high antioxidant activity of flavonoids. DPPH and ABTS radical trapping capacity of groups of phenolic compounds is reported to be in the sequence Flavan-3-ol > flavonols > chalcones > stilbenes > phenolic acids > flavones > flavanones > flavanones > isoflavones, with some exceptions within each group (Yi-Zhong et al., 2006).

For the extracts of oregano residual leaves and stems, the major compound is the flavanone naringenin, which, due to its chemical structure, has low free radical trapping capacity, so it is suggested that the flavonoids taxifolin, eriodictyol, quercetin, quercetin-3-O-glucoside, luteolin, apigenin, as well as caffeic acid are the ones giving antioxidant capacity to the extracts ET80 and ET50. Although naringenin has no free radical trapping capacity, it is reported that, in biological assays, this flavonoid has anti-diabetic properties, regulates glucose and lipid metabolism (Den & Tsiani, 2019; Ren et al., 2016), so its biological activity is important. Antioxidant activity and therapeutic properties of flavonoids contained by the Mexican oregano have been reported, which correspond to those identified in the present study, as well as pharmacological and biological properties of taxifolin (Sunil & Xu, 2019), eriodictyol (Islam, Islam, Rahman, Uddin, & Akanda, 2020), apigenin and luteolin (Liu, Shi, Fu, & Zhao, 2019). Therefore, the extraction of these compounds from by-products such as oregano residues may have potential in pharmacological applications and as nutraceutical ingredients.

## Conclusions

Ethanol-water concentrations (30, 50 and 80 %) and mass/solvent ratios (1:10, 1:20 and 1:30) are feasible for obtaining flavonoid and non-flavonoid phenolic compounds with antioxidant capacity from oil-free leaves and stems of oregano (*Lippia graveolens*). Solvent concentrations at 50 and 80 % had no qualitative effect on the solubility of the compounds, although they did have a quantitative effect. The maximum concentration of phenols was obtained with 80 % and 1:30 ratio, which indicates better dissolution in ethanol than in water. Oil-free leaves and stems of oregano contain flavonoids and phenolic acids with beneficial biological properties for human health, making these residues a valuable resource for therapeutic and pharmacological purposes. This study represents the first research on

con mezcla de hexano/acetato de etilo/metanol (González et al., 2007). Algunos otros compuestos reportados para *L. graveolens* no se identificaron en este trabajo, debido a que no se tuvieron los estándares de referencia para su identificación y cuantificación.

El ET80 favoreció la extracción de compuestos fenólicos no flavonoides en hojas y concuerda con los resultados obtenidos en la sección de identificación, ya que la concentración del ácido cafeico es mayor en hojas que en tallos. De la misma forma, el análisis mostró que el ET80 favoreció la extracción de flavonoides en los tallos, ya que la concentración fue mayor que en el extracto de hojas.

Existen varios mecanismos para determinar la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos (Apak, Özyürek, Güclü, & Çapanoğlu, 2016). Uno de ellos es a través de la eliminación de radicales libres que depende del número de grupos hidroxilo y su posición en la molécula, así como de los grupos sustituyentes, ya sea hidroxilos, metoxilos, glucósidos, entre otros (Yi-Zhong, Sun, Xing, Luo, & Cork, 2006). En los flavonoides, la capacidad de atrapamiento de radicales libres aumenta con el grado creciente de hidroxilación; los flavonoides sin grupos hidroxilo no tienen capacidad de eliminación de radicales (Chen et al., 2018). Los patrones de sustitución en los anillos A y B, así como el doble enlace entre C2-C3 y el grupo 4-oxo en el anillo C están relacionadas con la baja o alta actividad antioxidante de los flavonoides. De forma general, se reporta que la capacidad de atrapamiento de radicales DPPH y ABTS de los grupos de compuestos fenólicos es en la secuencia Flavan-3-ol > flavonoles > chalconas > estilbenos > ácidos fenólicos > flavonas > flavanonas > isoflavonas, con algunas excepciones dentro de cada grupo (Yi-Zhong et al., 2006).

En los extractos de hojas residuales y tallos de orégano, el compuesto mayoritario es la flavanona naringenina, el cual, debido a su estructura química, tiene capacidad baja de atrapamiento de radicales libres, por lo que se sugiere que los flavonoides taxifolina, eriodictiol, quercetina, quercetina-3-O-glucósido, luteolina, apigenina, así como el ácido cafeico sean los que les otorguen la capacidad antioxidante a los extractos ET80 y ET50. Aunque la naringenina no tiene capacidad de atrapamiento de radicales libres, se reporta que, en ensayos biológicos, este flavonoide tiene propiedades antidiabéticas, regula la glucosa y el metabolismo de lípidos (Den & Tsiani, 2019; Ren et al., 2016), por lo que su actividad biológica es importante. Se ha reportado la actividad antioxidante y propiedades terapéuticas de los flavonoides que el orégano mexicano contiene, los cuales corresponden a los identificados en el presente estudio, así como las propiedades farmacológicas y biológicas de la taxifolina (Sunil & Xu, 2019), eriodictiol

the use of ethanol with water for the extraction of phenolic compounds in residues from the oregano oil extraction industry.

### Acknowledgments

The authors thank for the funding support granted by the Instituto Politécnico Nacional to the project SIP 20181944, as well as the BEIFI-IPN grant and CONACYT grant for María Estela Frías-Zepeda. The authors thank to Dra. B. E. Barragán-Huerta and Dra. P. Gutiérrez-Macías of ENCB-IPN for HPLC-DAD support and to the Dra. N. E. Rocha-Guzmán of UPIDET-ITD for UPLC-MS analysis. The authors also thank to the Cooperativa Oro Verde del Semidesierto for providing the plant material.

*End of English version*

### References / Referencias

- Ajila, C. M., Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., Godbout, S., & Valéro, J. R. (2011). Extraction and analysis of polyphenols: Recent trends. *Critical Reviews in Biotechnology*, 31(3), 227–249. doi: 10.3109/07388551.2010.513677
- Ambigaipalan, P., Costa de Camargo A., & Shahidi, F. (2016). Phenolic compounds of pomegranate byproducts (outer skin, mesocarp, divider membrane) and their antioxidant activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(34), 6584–6604. doi: 10.1021/acs.jafc.6b02950
- Apak, R., Özyürek, M., Güclü, K., & Çapanoğlu, E. (2016). Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(5), 997–1027. doi: 10.1021/acs.jafc.5b04739
- Arias, J., Mejía, J., Córdoba, Y., Martínez, J. R., Stashenko, E., & Del Valle, J. M. (2020). Optimization of flavonoids extraction from *Lippia graveolens* and *Lippia organoides* chemotypes with ethanol-modified supercritical CO<sub>2</sub> after steam distillation. *Industrial Crops and Products*, 146, 112170. doi: 10.1016/j.indcrop.2020.112170
- Caleja, C., Ribeiro, A., Barreiro, F. M., & Ferreira, I. (2017). Phenolic compounds as nutraceuticals or functional food. *Current Pharmaceutical Design*, 23(19), 2787–2806. doi: 10.2174/1381612822666161227153906
- Chen, L., Teng, H., Xie, Z., Cao, H., Cheang, W. S., Skalicka-Woniak, K., Georgiev, M. I., & Xiao, J. (2018). Modifications of dietary flavonoids towards improved bioactivity: An update on structure–activity relationship. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(4), 513–527. doi: 10.1080/10408398.2016.1196334
- Costa, B. G., Melo, P. S., Bergamaschi, K. B., Tiveron, A. P., Massarioli, A. P., & de Alencar, S. M. (2016). Extraction yield, antioxidant activity and phenolics from grape, mango, and peanut agro-industrial by-products. *Ciência Rural, Santa Maria*, 46(8), 1498–1504. doi: 10.1590/0103-8478cr20150531
- (Islam, Islam, Rahman, Uddin, & Akanda, 2020), apigenina y luteolina (Liu, Shi, Fu, & Zhao, 2019). Por lo anterior, la extracción de dichos compuestos, a partir de subproductos como los residuos de orégano puede tener potencial en aplicaciones farmacológicas y como ingredientes nutraceuticos.

### Conclusiones

Las concentraciones de etanol-agua (30, 50 y 80 %) y las relaciones masa/solvente (1:10, 1:20 y 1:30) son factibles para la obtención de compuestos fenólicos de tipo flavonoide y no flavonoide con capacidad antioxidante, a partir hojas sin aceite y tallos de orégano (*Lippia graveolens*). Las concentraciones del solvente al 50 y 80 % no afectaron cualitativamente la solubilidad de los compuestos, aunque sí de manera cuantitativa. La concentración máxima de fenoles se obtuvo con 80 % y relación 1:30, lo cual indica mejor disolución en etanol que en agua. Las hojas sin aceite y los tallos de orégano contienen flavonoides y ácidos fenólicos con propiedades biológicas benéficas para la salud humana, por lo que estos residuos son un recurso valioso de aprovechamiento con fines terapéuticos y farmacológicos. Este estudio constituye la primera investigación sobre uso de etanol con agua para la extracción de compuestos fenólicos en residuos de la industria de extracción de aceite de orégano.

### Agradecimientos

Se agradece el apoyo económico otorgado por el Instituto Politécnico Nacional al proyecto SIP 20181944, así como la beca BEIFI-IPN y beca CONACYT para María Estela Frías-Zepeda. Agradecemos a la Dra. B. E. Barragán-Huerta y Dra. P. Gutiérrez-Macías de ENCB-IPN por el apoyo en HPLC-DAD y a la Dra. N. E. Rocha-Guzmán de la UPIDET-ITD por el análisis de UPLC-MS. A la Cooperativa Oro Verde del Semidesierto por proporcionar el material vegetal.

*Fin de la versión en español*

- Dang, Y-Y., Zhang, H., & Xiu, Z-L. (2014). Microwave-assisted aqueous two-phase extraction of phenolics from grape (*Vitis vinifera*) seed. *Chemical Technology and Biotechnology*, 89(10), 1576–1581. doi: 10.1002/jctb.4241
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P. E., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Dietary (Poly) phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(14), 1818–1892. doi: 10.1089/ars.2012.4581
- Den, H. D. J., & Tsiani, E. (2019). Antidiabetic properties of naringenin: A citrus fruit polyphenol. *Biomolecules*, 9(3), 99. doi: 10.3390/biom9030099

- González, G. M. C., Soto-Hernández, M., Kite, G., Martínez-Vázquez, M. (2007). Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK var. *berlandieri* Schauer). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30(1), 43–49. Retrieved from <https://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/30-1/6a.pdf>
- González-Trujano, M. E., Hernández-Sánchez, L. Y., Muñoz, V., Dorazco-González, A., Guevara, P., & Aguirre-Hernández, E. (2017). Pharmacological evaluation of the anxiolyticlike effects of *Lippia graveolens* and bioactive compounds. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 1569–1576. doi: 10.1080/13880209.2017.1310908
- Granados-Sánchez, D., Martínez-Salvador, M., López-Ríos, G. F., Borja-De la Rosa, A., Rodríguez-Yam, G. A. (2013). Ecología, aprovechamiento y comercialización del orégano (*Lippia graveolens* H. B. K.) en Mapimí, Durango. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 19(2), 305–321. doi: 10.5154/r.rchscfa.2012.05.035
- Gutiérrez-Grijalva, E. P., Ambriz-Pérez, D. L., Leyva-López, N., Castillo-López, R. I. & Heredia, J. B. (2016). Review: dietary phenolic compounds, health benefits and bioaccessibility. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 66(2), 87–100. Retrieved from <https://www.alanrevista.org/ediciones/2016/2/art-1/>
- Gutiérrez-Grijalva, E. P., Picos-Salas, M. A., Leyva-López, N., Criollo-Mendoza, M. S., Vázquez-Olivo, G., & Heredia, J. B. (2018). Flavonoids and phenolic acids from oregano: Occurrence, biological activity and health benefits. *Plants*, 7(1), 2. doi: 10.3390/plants7010002
- Gutiérrez-Macías, P., Peralta-Cruz, J., Borja-de-la-Rosa, A., & Barragán-Huerta, B. E. (2016). Peltomexicanin, a peltogynoid quinone methide from *Peltogyne mexicana* Martínez purple heartwood. *Molecules*, 21(2), 186. doi: 10.3390/molecules21020186
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2018). PAST (Paleontological STatistics) 3.21 [Miscellaneous Software]. Retrieved from <https://www.fileeagle.com/software/1986/Past/>
- Islam, A., Islam, S., Rahman, K., Uddin, N., & Akanda, R. (2020). The pharmacological and biological roles of eriodictyol. *Archives of Pharmacal Research*, 43, 582–592. doi: 10.1007/s12272-020-01243-0
- Leyva-López, N., Gutierrez-Grijalva, E. P., Ambriz-Pérez, D. L., & Heredia, J. B. (2016). Flavonoids as cytokine modulators: A possible therapy for inflammation-related diseases. *International Journal Molecular Science*, 17(6), 921. doi: 10.3390/ijms17060921
- Lim, K. J. A., Cabajar, A. A., Lobarbio, C. F. Y., Taboada, E. B., & Lacks, D. J. (2019). Extraction of bioactive compounds from mango (*Mangifera indica* L. var. Carabao) seed kernel with ethanol–water binary solvent systems. *Journal of Food Science and Technology*, 56, 2536–2544. doi: 10.1007/s13197-019-03732-7.
- Lim, Y. P., Sook, F. P., Yusoff, M. M., Mudalipa, S. K. A., & Gimbut, J. (2019). Correlation between the extraction yield of mangiferin to the antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid content of *Phaleria macrocarpa* fruits. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 14, 100224. doi: 10.1016/j.jarmap.2019.100224
- Lin, L-S., Sudarsan, M., Robbins, R. J., & Harnly, J. M. (2007). Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(5), 361–369. doi: 10.1016/j.jfca.2006.09.005
- Liu, W-N., Shi, J., Fu, Y., & Zhao, X-H. (2019). The stability and activity changes of apigenin and luteolin in human cervical cancer hela cells in response to heat treatment and Fe<sup>2+</sup>/Cu<sup>2+</sup> addition. *Foods*, 8(8), 346. doi: 10.3390/foods8080346
- López-Enríquez, I. L., González-Elizondo, S., González-Elizondo, M., Ruacho-González, L., Retana-Rentería, F. I., & Tena-Flores, J. A. (2011). Distribución geográfica de las especies de orégano en Durango. In G. Pérez, M. P. González, G. Alexandre, & M. C. González (Eds.), *El orégano mexicano: Estado actual del conocimiento* (pp. 23–32). Durango, CIIDIR Instituto Politécnico Nacional: La Casa Editorial de Durango.
- Martínez-Hernández, R., Villa-Castorena, M. M., Catalán-Valencia, E. A., & Inzunza-Ibarra, M. A. (2017). Production of oregano (*Lippia graveolens* Kunth) seedling from seeds in nursery for transplanting. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 23(1), 61–73. doi: 10.5154/r.rchscfa.2015.11.051
- Martínez-Rocha, A., Puga, R., Hernández-Sandoval, L., Loarca-Piña, G., & Mendoza, S. (2008). Antioxidant and antimutagenic activities of Mexican oregano (*Lippia graveolens* Kunth). *Plant Foods for Human Nutrition*, 63, 1–5. doi: 10.1007/s11130-007-0061-9
- Naczki, M., & Shahidib, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 95–111. doi: 10.1016/j.chroma.2004.08.059
- Pérez-Gutiérrez, R. M. (2014). Effect of Mexican oregano (*Lippia graveolens* Kunth) on streptozotocin induced diabetic mice and its role in regulating carbohydrate metabolic enzymes and their inhibitory effect on the formation of advanced glycation end products. *Annual Research & Review in Biology*, 4(23), 3470–3491. doi: 10.9734/ARRB/2014/11159
- StatSoft Inc. (2007). STATISTICA software, kernel release 7.0. Tulsa, Oklahoma, USA: Author.
- Ren, B., Qin, W., Wu, F., Wang, S., Pan, C., Wang, L., ...Liang, J. (2016). Apigenin and naringenin regulate glucose and lipid metabolism, and ameliorate vascular dysfunction in type 2 diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*, 773, 13–23. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.01.002
- Rosales-Castro, M., González-Laredo, R. F., Rivas-Arreola, M. J., & Karchesy, J. (2017). Chemical analysis of polyphenols with antioxidant capacity from *Pinus durangensis* Bark. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 37(5), 393–404. doi: 10.1080/02773813.2017.1310898
- Rosales-Castro, M., Honorato-Salazar, J. A., Reyes-Navarrete, M. G., & González-Laredo, R. F. (2015). Antioxidant phenolic

- compounds of ethanolic and aqueous extracts from pink cedar (*Acrocarpus fraxinifolius* Whight & Arn.) Bark at two tree ages. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 35(4), 270–279. doi: 10.1080/02773813.2014.946619
- Rosero, J. C., Cruz, S., Osorio, C., & Hurtado, N. (2019). Analysis of phenolic composition of byproducts (seeds and peels) of avocado (*Persea americana* Mill.) cultivated in Colombia. *Molecules*, 24(17), 3209. doi: 10.3390/molecules 24173209
- Sunil, C., & Xu, B. (2019). An insight into the health-promoting effects of taxifolin (dihydroquercetin). *Phytochemistry*, 166, 112066. doi: 10.1016/j.phytochem.2019.112066
- Villegas-Novoa, C., Gallegos-Infante, J. A., González-Laredo, R. F., García-Carrancá, A. M., Herrera-Rocha, K. M., Jacobo-Karam, J. S., ...Rocha-Guzmán, N. E. (2019). Acetone effects on *Buddleja scordioides* polyphenol extraction process and assessment of their cellular antioxidant capacity and anti-inflammatory activity. *Medicinal Chemistry Research*, 28, 2218–2231. doi: 10.1007/s00044-019-02448-9
- Yi-Zhong, C., Sun, M., Xing, J., Luo, Q., & Cork, H. (2006). Structure–radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*, 78(25), 2872–2888. doi: 10.1016/j.lfs.2005.11.004

