

Efecto antioxidante en aceite vegetal de girasol de polifenoles obtenidos del bagazo residual de orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth)

Antioxidant Effect of Polyphenols from Mexican Oregano (*Lippia graveolens* Kunth) Residual Bagasse in Sunflower Vegetable Oil

Cuevas González, M. F. , Flores Martínez, H. ^{*}, León Campos, C. ,
López Muraira, I.G. 

División de Estudios de Posgrado e Investigación.
TecNM/ITTlajomulco. Km. 10 Carretera Tlajomulco-
San Miguel Cuyutlán, Tlajomulco de Zúñiga 45640,
Jalisco, Mexico.



Please cite this article as/Como citar este artículo: Cuevas González, M. F., Flores Martínez, H., León Campos, C., López Muraira, I.G. (2023). Antioxidant Effect of Polyphenols from Mexican Oregano (*Lippia graveolens* Kunth) Residual Bagasse in Sunflower Vegetable Oil. *Revista Bio Ciencias*, 10, e1468.

<https://doi.org/10.15741/revbio.10.e1468>

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: February 23th 2023.

Accepted/Aceptado: August 30th 2023.

Available on line/Publicado: October 16th 2023.

RESUMEN

El orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth) es una especie de gran valor comercial como condimento principalmente por el perfil que proporciona su aceite esencial. Sin embargo, poco aprovechamiento se ha dado a su alta concentración de compuestos fenólicos hidrosolubles presentes, como la pinocembrina, flavanona con propiedades antioxidantes de gran importancia alimenticia y para la salud. En el proceso de extracción del aceite esencial de sus hojas, se produce una gran cantidad de residuos ricos en flavonoides, que pocas veces son aprovechados, e incluso se convierten en fuente de contaminación por la inadecuada disposición de los mismos. Con el fin de valorizar este desecho agroindustrial, el bagazo se caracterizó encontrando un contenido de fenoles totales de 2.99 mg GA/mL Ex y de pinocembrina de 0.71 mg/mL Ex así como una actividad antioxidante de 5.48 mg EqTx/mL Ex, los cuales son valores similares a los encontrados en la materia vegetal sin procesamiento alguno. Se elaboraron extractos ricos en pinocembrina mediante separación por columna cromatográfica pudiendo generarse productos enriquecidos (1.38 mg/mL). Se evaluó la capacidad de estabilización oxidativa del extracto y su fracción enriquecida provenientes del bagazo residual de orégano en aceite de girasol, encontrando capacidades de protección contra peroxidación lipídica sobresalientes, comparadas con las proporcionadas por el butil hidroxitolueno, antioxidante sintético comúnmente utilizado con este fin.

PALABRAS CLAVE : Polifenoles, Orégano mexicano, Antioxidante natural, Bagazo residual.

*Corresponding Author:

Héctor Flores-Martínez. División de Estudios de Posgrado e Investigación. TecNM/ITTlajomulco. Km. 10 Carretera Tlajomulco-San Miguel Cuyutlán, Tlajomulco de Zúñiga 45640, Jalisco, México.. E-mail: hector_fm@tlajomulco.tecnm.mx

ABSTRACT

Mexican oregano (*Lippia graveolens* Kunth) is a spice of great commercial value as a condiment, mainly due to the profile provided by its essential oil. However, little use has been made of its high concentration of water-soluble phenolic compounds, such as pinocembrin, a flavanone with antioxidant properties of great nutritional and health importance. The process of essential oil extraction from its leaves produces a large amount of waste rich in flavonoids, which is rarely used and even becomes a source of contamination due to its inadequate disposal. In order to evaluate this agro-industrial waste, the bagasse was characterized and found to have a high content of total phenolic and pinocembrin (0.71 mg/mL), as well as antioxidant activity of 5.48 mg EqTx/mL Ex., with values similar to those found in plant matter without any processing. Extracts rich in pinocembrin were prepared by separation on a chromatographic column, being able to generate enriched products (1.38 mg/mL). The oxidative stabilization capacity of the extract and its enriched fraction from the residual bagasse of oregano in sunflower oil was evaluated, finding outstanding protective capacities against lipid peroxidation compared to those provided by butylated hydroxytoluene, a synthetic antioxidant commonly used for this purpose.

KEY WORDS : Polyphenols, Mexican oregano, natural antioxidant, residual bagasse.

Introducción

Los aceites vegetales constituyen una parte esencial en prácticamente todas las dietas de la alimentación humana. Los grupos principales de los lípidos presentes en aceites son los triglicéridos, los cuales se encuentran en las células responsables del almacenamiento de constitutivos de las membranas biológicas (González *et al.*, 2006). Los lípidos vegetales suelen ser más insaturados que los de origen animal, lo que provoca una mayor velocidad de inicio de las reacciones de oxidación y un consumo más rápido de los antioxidantes presentes. Además, existe una notoria variabilidad en la composición relativa de grasas saturadas, poliinsaturadas y monoinsaturadas en los distintos aceites vegetales (Xing *et al.*, 2019). Específicamente, el aceite de girasol se caracteriza por presentar una elevada proporción de grasas poliinsaturadas, las cuales, si bien son buscadas por sus efectos benéficos para la salud, también son más propensas a la peroxidación lipídica, razón por la cual ha sido seleccionado como objeto de estudio.

La oxidación del aceite vegetal es una reacción natural e irreversible relacionado con la oxidación de los ácidos grasos insaturados por el oxígeno del aire, que aumenta fuertemente a altas temperaturas. Se ha documentado que la formación y presencia de los peróxidos es un buen indicador de la rancidez oxidativa de un aceite por ser unos de los primeros compuestos que se forman durante el proceso de oxidación lipídica (Vanhanen & Savage, 2006) generando

sabores y olores desagradables. Con base en lo anterior, en el campo de la biotecnología, uno de los desafíos interesantes es lograr la estabilización de los aceites vegetales comestibles mediante el uso de agentes antioxidantes eficaces y seguros (Jan *et al.*, 2001). Tradicionalmente, se han utilizado antioxidantes sintéticos, como el butilhidroxitolueno (BHT), el butilhidroxianisol (BHA) y la tert-butilhidroquinona (TBHQ), para retrasar la degradación oxidativa de los lípidos durante el almacenamiento y la preparación de alimentos. Sin embargo, se ha asociado su uso con importantes problemas de salud (Engin *et al.*, 2011). De este modo, el interés de la población a nivel mundial por consumir productos naturales que promuevan la conservación y mejora de la salud está en constante aumento; se ha reportado que algunas hierbas y especias poseen propiedades antioxidantes (Katalinic., *et al* 2006; Gutiérrez-del-Río *et al.*, 2021) y consiguen retardar el enranciamiento de aceites mediante el ensayo de oleorresinas de romero y extractos de hisopo, melisa, salvia, tomillo y orégano español, entre otras plantas de la familia de las labiadas (Pokorny & Trojakova, 2004). Sin embargo, cabe mencionar que la eficacia de este tipo de compuestos depende en mucho de la especie utilizada, el tipo y polaridad de solvente utilizado, el procedimiento de extracción y la pureza e identidad de los compuestos activos presentes en el extracto obtenido a partir de los productos naturales, lo que ha provocado que la aplicación de los antioxidantes naturales se haya visto limitada, debido principalmente a la alta variabilidad en su eficacia y alto precio (Mustafa *et al.*, 2022).

El orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth) es altamente valorado en el mercado debido a la presencia de compuestos volátiles liposolubles, como el timol y el carvacrol, que se encuentran en el aceite esencial. Durante el proceso de extracción del aceite esencial de las hojas de esta planta, se genera una gran cantidad de residuos sólidos (bagazo), que representan aproximadamente el 95 % en peso seco con respecto al peso inicial (Martínez-Nataren *et al.*, 2012). Estos residuos son ricos en flavonoides, los cuales han demostrado poseer propiedades antioxidantes. Sin embargo, actualmente se les da un aprovechamiento mínimo, ya que suelen utilizarse únicamente como piensos, composta o se desechan de manera inadecuada, generando posibles problemas ambientales. Dentro de los flavonoides presentes tanto en el orégano mexicano (*L. graveolens*) como en el bagazo residual, destaca la pinocembrina, una flavanona con importantes beneficios nutricionales y propiedades antioxidantes naturales (Lin *et al.*, 2007). A pesar de su potencial, todavía existe una escasez de estudios que exploren su extracción a partir del orégano mexicano y bagazo residual, así como la importante aplicación que podría presentar en el sector alimentario.

Estudios realizados por Lin *et al.* (2007) y Cortés-Chitala *et al.* (2017) han demostrado la presencia del flavonoide pinocembrina (Figura 1) en el orégano mexicano mismo que ha sido reportado como un importante agente antimicrobiano, antiinflamatorio, antioxidante, anticancerígeno, así como un compuesto protector contra la isquemia cerebral y enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson, por lo cual ha sido considerado un compuesto de especial interés en la industria farmacéutica (Chung *et al.* 2011; Liu *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2018). Dentro de la industria alimenticia, la pinocembrina también ha mostrado un, importante potencial de aplicación en productos alimenticios dadas sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes probadas por Vargas-Sánchez *et al.* (2014) para extender la vida de anaquel de patés de carne de res al utilizar extractos de propóleos como agente conservante natural.

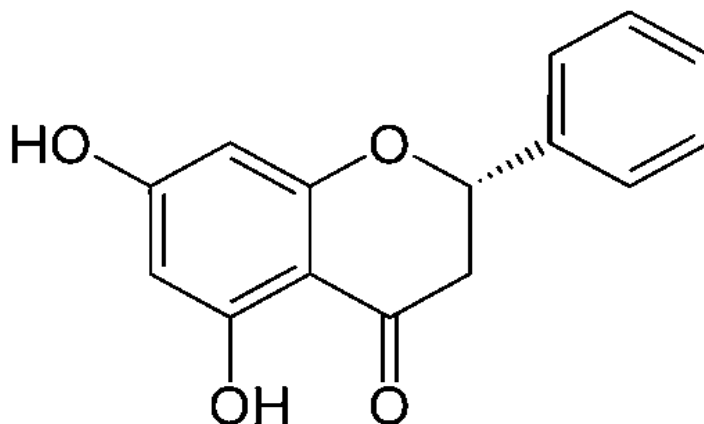


Figura 1. Estructura química de pinocembrina (Nyotia et al., 2016).

En la búsqueda de investigar las tendencias y enfoques aplicados en el aprovechamiento y separación de compuestos flavonoides, como la pinocembrina, se han llevado a cabo estudios por parte de diversos investigadores. Osti *et al.* (2010) aislaron dicho compuesto de *Sphaeralcea angustifolia*, planta mexicana común en la medicina tradicional, utilizando cromatografía en columna, logrando separar la pinocembrina (0.066 mg/mg Ex). Por otro lado, Nyotia *et al.* (2016) aislaron pinocembrina proveniente de *Artocarpus odoratissimus*, fruta tropical, los extractos brutos se fraccionaron usando cromatografía líquida de vacío en gel de sílice (VLC). Utilizando este mismo método de separación Granados *et al.* (2018) aislaron diferentes flavonoides provenientes de 3 propóleos mexicanos, entre ellos la pinocembrina (19, 33 y 55 mg/g Ex), a diferencia de que estos autores emplearon como fase móvil una mezcla en gradiente.

Partiendo de los antecedentes que resaltan los efectos significativos de la pinocembrina en diversas aplicaciones, el presente estudio empleó un método de separación de pinocembrina desarrollado por nuestro grupo de investigación (Cuevas-González *et al.*, 2021). Dicho método se utilizó para obtener fracciones enriquecidas en pinocembrina a partir de extractos hidroetanólicos obtenidos de los residuos sólidos generados durante el proceso de extracción del aceite esencial de orégano mexicano (*L. graveolens*), con el objetivo de evaluar el potencial antioxidante de la pinocembrina en aceite vegetal de girasol, un aceite ampliamente comercializado y consumido a nivel mundial.

Material y Métodos

Materia prima

El orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth) se obtuvo de la localidad de Huejuquilla, Jalisco, ubicada a una latitud de 22° 450' N, una longitud de 103° 450' W y a una altura de 1.450 metros sobre el nivel del mar; la muestra de orégano mexicano fue obtenida tras el proceso

tradicional de vareo y secado al sol durante 3 días después del corte en etapa de floración al 10 %, manteniendo un contenido de humedad del 10 % w/w.

La semilla de girasol sin cáscara fue adquirida en un mercado municipal de Zapopan, Jalisco, manteniéndose a temperatura ambiente (20 °C) y un contenido de humedad menor al 8 %.

Reactivos y estándares

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

Extracción de aceite esencial del orégano mexicano (*Lippia graveolens*) por arrastre de vapor de agua

La extracción de aceite esencial del orégano mexicano se realizó mediante el método de hidrodestilación por arrastre de vapor (Hernández *et al.*, 2008) utilizando para ello sólo parte aérea (hojas y flores). Se colocaron 50 g de material vegetal en un matraz balón de 1000 mL con 500 mL de agua destilada, manteniendo un tiempo de extracción constante de 4 h. Transcurrido el tiempo de destilación, se recuperó y cuantificó el aceite esencial. El extracto acuoso obtenido se caracterizó en cuanto a su contenido de pinocembrina.

Los residuos sólidos generados en la extracción de aceite esencial (bagazo de orégano) fueron filtrados mediante papel filtro poro mediano, se pesaron y se sometieron a un proceso de secado con temperatura de 40 °C hasta peso constante en una estufa (GL-70 A - Fab, Nacional). Con los residuos sólidos secos (humedad 8-10 % w/w), se procedió a obtener un extracto hidroetanólico.

Obtención del extracto hidroetanólico de los residuos sólidos generados en la extracción de aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia graveolens*)

La obtención del extracto hidroetanólico, se realizó utilizando el método de maceración con agitación y temperatura controlada, optimizado por Flores-Martínez *et al.* (2016). El sistema de operación cuenta con reflujo para evitar pérdidas por evaporación. Los residuos sólidos (orégano mexicano sin aceite esencial) se sometieron a molienda y tamizado, con el propósito de obtener la granulometría deseada (0.423 mm) y así facilitar el proceso de extracción. La extracción se realizó en un matraz balón de 500 mL, con una relación soluto-solvente 1:20, utilizando como solvente etanol al 58 %. El tiempo de extracción fue de 1 h con temperatura de 68 °C y agitación controlada de 300 rpm. Una vez terminada esta operación, el extracto obtenido se filtró y concentró 10 volúmenes en un rotavapor vertical a vacío (IKA RV 10) (45 °C y 500 mmHg).

Fraccionamiento por columna cromatográfica de silica gel

La separación por columna cromatográfica se realizó por duplicado utilizando una columna de 80 cm, empacada con 178 g de silica gel 60 A (malla 0.075-0.030 mm) previamente rehidratada con acetonitrilo (Cuevas-González *et al.*, 2021). La fase móvil fue acetonitrilo:agua a distintas concentraciones (100:0, 90:10, 70:30, 50:50 %), donde la elución inicial fue acetonitrilo al 100 %. En la columna cromatográfica se sembraron 8 mL de extracto concentrado (2 g de extracto seco y 6 mL de etanol al 58 %). Las fracciones fueron captadas con un recolector de muestras automático conectado a la columna cromatográfica, con un flujo de 1 mL/min.

Al terminar el proceso de elución de la muestra, las fracciones obtenidas fueron secadas en una estufa (GL-70A - Fab, Nacional) a una temperatura de 40 °C hasta la evaporación total del solvente. Una vez evaporado el solvente, las fracciones secas se colocarán en microtubos y se almacenaron en refrigeración hasta ser analizadas por cromatografía en Capa Fina (TLC) para la identificación de los flavonoides presentes.

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

La identificación de los flavonoides presentes en las fracciones obtenidas en el proceso de purificación se realizó por cromatografía en capa fina usando una placa de aluminio TLC Silica gel 60 F254 de 10 cm x 10 cm, como fase móvil se utilizó tolueno, éter etílico y ácido acético (10:9:1, v/v/v) (Cuevas-González *et al.*, 2021). Los estándares que se aplicaron fueron pinocembrina, naringenina, hispidulina, galangina y taxifolina a una concentración de 1000 ppm, para comparar los valores de retención (R_f). Los extractos y las fracciones secas fueron resuspendidas en 2 mL de etanol al 58 %, se sembraron en la placa sobre la línea de origen trazada a 0.7 cm del borde inferior, colocando 1 aplicación del extracto concentrado y 5 aplicaciones de las fracciones; posteriormente la placa se colocó en la cámara cromatográfica con un volumen de 20 mL de fase móvil, permitiendo la elución del solvente hasta la marca de frente de solvente (9 cm). La placa se retiró de la cámara y una vez seca se reveló con una lámpara de luz UV a una longitud de onda de 302 nm. Se obtuvieron 60 fracciones que se juntaron según su similitud TLC en 5 fracciones combinadas (1-5).

Cuantificación de pinocembrina por densitometría

Identificados los flavonoides de las fracciones obtenidas, se evaluó la concentración de pinocembrina en las fracciones en donde se detectó su presencia. La cuantificación de pinocembrina se realizó con el software ImageJ (Image Processing & Analysis in Java), midiendo la densidad generada por las muestras sembradas en las placas TLC Silica gel (Cuevas-González *et al.*, 2021). La curva de calibración se realizó con una placa TLC Silica gel 60 F254, 10 cm x 20 cm, utilizando como patrón de referencia pinocembrina en 15 Concentraciones de 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000 y 7500 mg/L. En la misma placa se sembraron las muestras a analizar. Posteriormente se colocó la placa en la cámara cromatográfica la cual contenía un volumen de 20 mL de fase móvil (tolueno, éter etílico y ácido acético 10:9:1, v/v/v). Una vez corrida la placa, esta se retiró de la cámara y se secó con

ayuda de la campana de extracción. El revelado de la placa se realizó con una lámpara de luz UV a una longitud de onda de 302 nm, finalmente las placas se digitalizaron para ser procesadas mediante el uso de software.

Cinética de inhibición en aceites vegetales

La operación inicia mediante la extracción de la muestra de aceite crudo, para lo cual se molió la semilla de girasol en un molino de cuchillas hasta un diámetro de partícula promedio de 2.5 mm. La extracción del aceite se desarrolló con un equipo soxhlet utilizando 4 volúmenes de recambio de solvente (éter de petróleo) hasta agotamiento de la muestra. El éter de petróleo se evaporó con ayuda del equipo rotavapor (40 °C, 470 mmHg) para la obtención de aceite vegetal puro. Las muestras de aceite se colocaron en charolas de aluminio en una estufa de secado, la cual se mantuvo a una temperatura constante de 45 °C. Adicionalmente, se adaptó una bomba de circulación de aire con una capacidad de 500 mL/min a fin de mantener una concentración de oxígeno constante al interior de la cámara de secado.

Los tratamientos correspondieron a muestras de aceite adicionadas con extracto simple y extracto enriquecido con pinocembrina, dosificadas al 0.1 % con base en su contenido de fenoles totales, incluyendo un testigo positivo (BHT, 100 ppm) y un testigo negativo o prueba control sin utilización de extracto. Para realizar la cinética de inhibición de rancidez oxidativa, se realizaron 7 muestreos periódicos de cada tratamiento, para completar el estudio en 21 días. A cada muestra se le realizó la prueba de determinación de índice de peróxidos por cuadruplicado.

A fin de determinar el efecto de la dosis de la fracción enriquecida en pinocembrina del extracto, se sometieron muestras de aceite de girasol a dosis del 50, 100 y 150 % (con respecto a la dosis inicial ensayada) a las mismas condiciones de almacenamiento acelerado (45 °C) realizando los ensayos de índice de peróxido a los 0, 5, 9, 14 y 18 días de almacenamiento con 6 repeticiones. Para determinar el tratamiento con mejor actividad antioxidante, se procedió a determinar la velocidad promedio de formación de Peróxidos para cada uno de ellos, dada por la pendiente de la ecuación lineal correspondiente. La relación entre la velocidad de oxidación (meq Peróxidos formados/kg día) del control con respecto a la velocidad de oxidación de cada tratamiento nos dará el Índice de capacidad antioxidante (ACI), siendo el valor mayor el correspondiente al mejor tratamiento (Peñaloza *et al.*, 2017).

Determinación de Fenoles Totales

La cuantificación de los fenoles totales se realizó mediante el método de Folin Ciocalteu (Cortés-Chitala *et al.*, 2021). Los extractos se diluyeron al 10 % y la reacción se llevó a cabo mezclando 0.5 mL de reactivo Folin 0.67 N y 0.5 mL de Na₂CO₃ 1.9 M. Después de 1 h de reposo, las muestras se leyeron a 760 nm en un espectrofotómetro UV/Visible utilizando ácido gálico (GA) como patrón de referencia.

Capacidad Antioxidante por DPPH

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

Determinación de índice de peróxidos con método volumétrico

El índice de peróxidos se evaluó mediante el método reportado por Ruiz (2015) basado en la oxidación del yoduro de potasio. Se disuelve una pequeña cantidad de la muestra en una solución de ácido acético/diclorometano (3:2), se hace reaccionar con yoduro de potasio por 60 seg, el yodo liberado forma una coloración azul oscuro con almidón por lo que puede ser titulado con una solución de tiosulfato de sodio. El resultado es expresado en miliequivalentes de oxígeno activo por kg de aceite.

Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los datos se expresaron como media \pm desviación estándar. Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) y las comparaciones de medias entre tratamientos se realizaron mediante la prueba de LSD, las diferencias se consideraron significativas a $p < 0.05$ (STATGRAPHICS Centurion XVI versión 16.1.18.).

Resultados y Discusión

Caracterización de extractos de orégano mexicano

Los extractos de orégano mexicano (*L. graveolens*) obtenidos fueron analizados y comparados mediante el contenido de fenoles, actividad antioxidante (DPPH) y contenido de pinocembrina (Tabla 1). El análisis de Folin-Ciocalteu mostró que el contenido de compuestos polifenólicos para el extracto del orégano sin aceite esencial se obtuvo un valor de 3.09 mg GA/mL, valor mayor al reportado por Cid *et al.* (2019) quien realizó un extracto etanólico de los residuos sólidos del orégano (*Poliomintha longiflora*) con un contenido de fenoles totales de 1.32 mg GA/mL.

La capacidad antioxidante (DPPH) del extracto de orégano sin aceite esencial mostró un valor de 6.97 mg EqTx/mL. Cabe mencionar que no existen reportes de contenido de fenoles ni actividad antioxidante de la caracterización de bagazo residual de orégano mexicano más que los obtenidos por nuestro grupo de investigación (Cuevas-González *et al.*, 2021).

Aunque el orégano sin aceite esencial es considerado como residuo, el extracto de este subproducto presentó un valor similar al reportado en un estudio anterior (Flores- Martínez *et al.*, 2016) para el extracto obtenido a partir del orégano mexicano sin tratamiento. Esta variación se atribuye evidentemente a la diferencia en la composición química del orégano tras el proceso de extracción de su aceite esencial, ya que es bien sabido que el aceite esencial de orégano es rico en compuestos antioxidantes insolubles en medios polares (Loeza *et al.*, 2020). Sin embargo, respecto al contenido de pinocembrina, compuesto de interés para la presente investigación, el extracto de orégano sin aceite esencial fue el que presentó una concentración mayor de este compuesto con un valor de 0.766 mg/mL Ex, mientras que el extracto de orégano sin tratar presentó un valor de 0.659 mg/mL Ex, concentración ligeramente mayor a la obtenida por Flores- Martínez *et al.* (2016), donde se reporta un valor de 0.574 mg/mL Ex determinado mediante cromatografía de líquidos LC-ESI-QTOF-MS/MS. La diferencia obtenida puede deberse a las características propias en el manejo de la materia prima. Cabe mencionar que al igual que el residuo sólido, se estudió la presencia de pinocembrina en el residuo acuoso obtenido tras el proceso de extracción del aceite esencial, este se descartó ya que no tenía presencia de pinocembrina, compuesto de interés.

Tabla 1. Determinación de fenoles totales, DPPH y pinocembrina de extractos de orégano mexicano.

Muestra	Fenoles totales (mg GA/mL Ex)	DPPH (mg EqTx/mL Ex)	Pinoembrina (mg/mL Ex)
<i>Extracto de orégano sin aceite esencial</i>	2.99 ± 0.015 ^a	5.48 ± 0.033 ^a	0.71 ± 0.026 ^b
<i>Fracción enriquecida en pinocembrina</i>	3.09 ± 0.005 ^a	4.36 ± 0.033 ^b	1.38 ± 0.029 ^a

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

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

A fin de identificar los principales flavonoides presentes en el extracto de orégano sin aceite esencial, se realizó el fraccionamiento del mismo a través de la columna de silica gel colectándose 60 fracciones. Dichas fracciones fueron inyectadas para su corrimiento cromatográfico en TLC en conjunción con los estándares disponibles, bajo las condiciones mencionadas en el apartado de metodología. De la fracción 27 a la 41 se detectaron los compuestos flavonoides presentes, identificándose mediante comparación de su R_f con los de los estándares puros, los siguientes componentes: Pinoembrina (R_f= 0.77), Galangina (R_f= 0.71), Naringenina (R_f= 0.64), Hispidulina (R_f= 0.50), Eriodictiol (R_f= 0.47), no encontrándose el compuesto Taxifolina (Tabla 2).

Las fracciones en las que se encontraba presente en mayor cantidad la pinocembrina correspondieron a las muestras 32 a la 36, por lo que estas fracciones fueron mezcladas entre sí para conformar la fracción enriquecida en pinocembrina a ensayar en las pruebas como agente antioxidante. Estos resultados fueron equivalentes a los reportados por Cuevas-González *et al.* (2021).

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

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

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

La cuantificación de pinocembrina se efectuó considerando la curva de calibración construida para tal efecto, representada por la ecuación de la recta ($y = 1.9315x + 985.93$) con $R^2 = 0.9922$, donde y = densidad óptica y x = concentración de pinocembrina (mg/mL). En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación de pinocembrina en las fracciones seleccionadas (denominadas del 1 a 5 según su similitud en TLC), además de sus rendimientos de recuperación de correspondientes, obteniendo un rendimiento total de recuperación del 56.6 %.

Tabla 3. Fracciones del extracto de orégano mexicano sin aceite esencial obtenidas con cromatografía en columna de silica gel.

Muestras	Pinocebrina (mg/mL)	Rendimiento (%)
1	8.56 ± 0.000 ^c	6.14 ± 0.010 ^c
2	25.73 ± 0.000 ^b	18.51 ± 0.098 ^b
3	35.15 ± 0.000 ^a	25.24 ± 0.030 ^a
4	7.37 ± 0.029 ^d	5.29 ± 0.070 ^d
5	1.99 ± 0.012 ^e	1.42 ± 0.018 ^e
Total		56.6 %

Las diferentes letras en superíndice indicaron diferencias significativas entre muestras según la prueba de LSD ($p < 0.05$).

La separación mediante columna cromatográfica de silica hidrofílica aquí ensayada permitió fraccionar el extracto obteniendo concentraciones de pinocebrina cercanas a las obtenidas por Granados *et al.* (2018) quienes obtuvieron concentraciones totales de pinocebrina de 19, 33 y 55 mg/g Ex en propóleos mexicanos, principal fuente de pinocebrina (Salatino *et al.*, 2011; Przybyłek & Karpiński, 2019).

Cabe mencionar que, considerando los resultados obtenidos por Osti *et al.* (2010), quienes obtuvieron concentraciones de 0.066 mg/mg Ex de pinocebrina en *Sphaeralcea angustifolia*, nuestros resultados obtenidos con el método de separación aquí desarrollado para orégano mexicano fueron superiores. Estas diferencias pueden deberse a la eficiencia y condiciones de operación de los métodos empleados y la naturaleza de la materia de extracción.

Cinética de oxidación de Aceite de Girasol

Con el objeto de facilitar la visualización de los resultados obtenidos en la cinética de oxidación del aceite de girasol con los diferentes tratamientos, solo se muestra en la Figura 2, el promedio aritmético correspondiente a las 4 repeticiones para cada tratamiento.

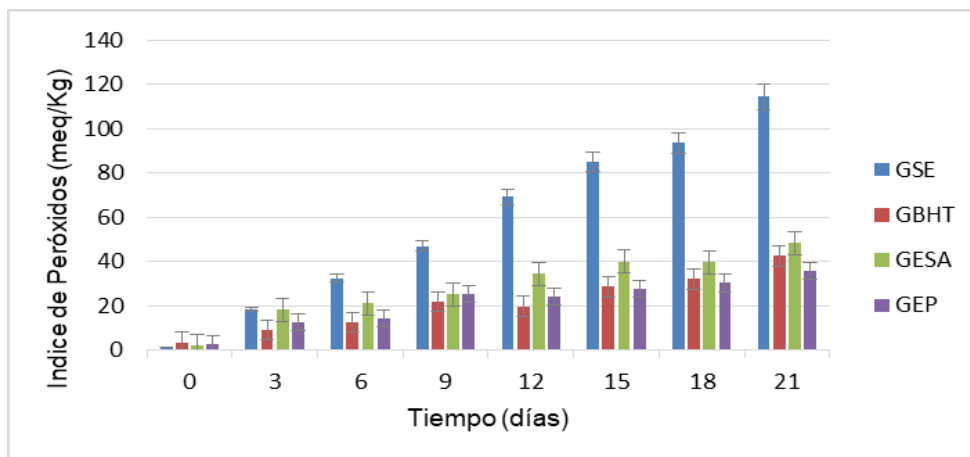


Figura 2. Cinética de Oxidación de aceite de girasol con los diferentes tratamientos. GSE (Aceite de girasol puro), GBHT (Adicionado con BHT), GESA (Con extracto sin aceite esencial) y GEP (con extracto enriquecido en pinocembrina).

De manera general, puede observarse que el aceite de girasol sin extracto de orégano (GSE), a partir del día 6 ya presenta índices de alteración oxidativa considerables 32.6 ± 0.98 meq/Kg, llegando a obtener Índices de Peróxido (PI) de 114.6 ± 4.01 meq/Kg al término del ensayo (21 días), lo cual refleja un claro deterioro de dicho aceite a este tiempo y bajo las condiciones de almacenamiento probadas, lo cual confirma la alta labilidad del aceite de girasol ante procesos oxidativos por su alta concentración de ácidos grasos insaturados (69 %) y su alta relación de grasas insaturadas/saturadas mucho mayor a uno (6.27).

Asimismo, los resultados indican que a partir del día 9, los tratamientos generan un efecto protector significativo ($p < 0.05$) considerando el proceso de oxidación lipídica del aceite de girasol sin tratamiento (47.1 ± 1.65 meq/Kg), siendo el BHT el mejor agente protector (PI= 21.9 ± 0.66 meq/Kg). Al término del ensayo (día 21), se encontró una diferencia significativa entre todos los tratamientos ($p < 0.05$) siendo el extracto enriquecido en pinocembrina (GEP) el mejor agente protector (PI= 35.9 ± 1.07 meq/Kg) al reducir la formación de peróxidos en valores cercanos al 69 % con respecto al grado de oxidación encontrado al final del tratamiento GSE, hecho que indica que los polifenoles antioxidantes provenientes de *Lippia graveolens* son capaces de interaccionar en el proceso oxidativo con las especies reactivas al oxígeno en formación, extendiendo potencialmente con ello la vida útil del aceite de girasol.

Estos resultados muestran, el importante efecto protector del extracto de orégano y el acentuado efecto del extracto enriquecido en pinocembrina, presentando incluso un mejor efecto antioxidante que el mostrado por el BHT en concentraciones estándar de aplicación comercial para tal efecto (100 ppm).

En la Tabla 4 se muestran las ecuaciones del modelado lineal correspondiente a la producción de hidroperóxidos en función del tiempo, así como los valores de Índice de capacidad antioxidante que corresponden a cada tratamiento. Con estos resultados se obtuvo el Índice de capacidad antioxidante (ACI), siendo el valor mayor el correspondiente al mejor tratamiento.

Tabla 4. Ecuaciones modelo de formación de peróxidos en aceite de girasol e índices de capacidad antioxidante para los diferentes tratamientos.

Tratamiento	Ecuación	R ²	ACI
GSE (Control)	PI = 5.3649 t + 2.2706	0.9805	1.000
GBHT	PI = 1.7448 t + 0.1293	0.9463	3.075
GESA	PI = 1.8459 t + 7.4923	0.9168..	2.906
GEP	PI = 1.3967 t + 4.4842	0.9339..	3.841

R² coeficiente de correlación lineal. ..Los asteriscos indican que los valores presentan una diferencia significativa comparados con el control ($p < 0.05$).

Como puede observarse, las curvas de oxidación pueden representarse mediante modelos lineales debido a que los grados de oxidación obtenidos corresponden a las primeras fases del proceso de enranciamiento oxidativo del aceite.

Los resultados anteriores indican que el tratamiento correspondiente al extracto enriquecido en pinocembrina presentó un grado mayor de protección para el aceite de girasol, con velocidades de oxidación 3.8 veces menores a las obtenidas para el aceite sin tratamiento. Los tratamientos con extracto sin aceite esencial y BHT presentan velocidades de oxidación hasta 3 veces menores con respecto a la velocidad oxidativa del aceite de girasol original sin tratamiento. Cabe mencionar que los valores de mejora en la estabilidad oxidativa aquí logrados son mayores a los reportados por Peñaloza *et al.* (2017) quienes utilizaron extractos de *Rosmarinus officinalis* como agente antioxidante en el proceso de oxidación de aceite de palma durante el proceso de freído.

Para determinar la concentración óptima del extracto enriquecido en pinocembrina, considerando los resultados por sextuplicado de formación de peróxidos a los 0, 5, 9, 14 y 18 días para cada concentración ensayada, se determinó el tiempo requerido (en días) para alcanzar un valor de índice de peróxidos de 30 meq/Kg en el aceite para cada concentración de antioxidante empleado conforme a la ecuación lineal correspondiente (PI vs t). Además, se calculó la relación P entre los tiempos requeridos para cada concentración ensayada (tm) con respecto al requerido para el tratamiento control (tc), correspondiendo el valor más alto de P obtenido, a la mejor concentración de extracto para ser utilizada. Siendo un valor de $P > 1$ un indicativo de un efecto protector antioxidante para el ensayo (Peñaloza *et al.*, 2017).

En la Tabla 5 se muestran las ecuaciones de modelado para la producción de hidroperóxidos en función del tiempo, así como los valores de P que corresponden a cada concentración ensayada.

Tabla 5. Ecuaciones modelo de formación de peróxidos en aceite de girasol e índices P para diferente concentración.

Concentración %	Ecuación	R ²	Tiempo (días) para PI=30meq/kg	P(tm/tc)
Cero (Control)	PI = 5.2329 t + 1.3665	0.9958	5.47	1.000
0.05	PI = 2.1076 t + 3.5467	0.9651	12.55	2.294
0.10	PI = 2.0323 t + 1.8060	0.9682	13.87	2.535
0.15	PI = 1.2782 t + 4.4842	0.9789	21.69	3.965

R² coeficiente de correlación lineal. Los valores no presentan una diferencia significativa comparados con el control ($p < 0.05$).

Los resultados mostrados indican que todas las concentraciones ensayadas presentan un buen grado de protección al aceite de girasol ($p > 2$). Asimismo, la velocidad de formación de peróxidos (dada por la pendiente de la ecuación lineal mostrada) va disminuyendo conforme se incrementa la concentración del extracto ensayado, lo que involucra un mayor efecto protector antioxidante. Asimismo, se observa comportamiento inverso con respecto al tiempo requerido para alcanzar la concentración de peróxidos estipulada (30 meq/Kg), es decir, a mayor concentración de extracto, menores tiempos requeridos.

Los resultados anteriores también indican que la concentración con un significativamente mayor grado de protección para el aceite de girasol es la correspondiente a la concentración más alta ensayada (0.15 %) del extracto enriquecido en pinocembrina con índices de protección cercanos a 4 unidades, es decir, incrementando la vida de anaquel del aceite aproximadamente 4 veces con respecto al aceite sin tratamiento. Los tratamientos con concentraciones media y baja ensayadas presentan tiempos de formación de peróxidos e índices P similares, lo que genera un incremento en vida de anaquel cercano al 100 %. Considerando lo anterior, la mejor concentración a utilizar para protección del aceite de girasol bajo las condiciones de almacenamiento aceleradas corresponde al extracto con 0.15 % w/w, el cual mostró una respuesta antioxidante dosis-dependiente incrementando la estabilidad del aceite de girasol hasta en un 400 % mediante su aplicación.

Conclusiones

El bagazo residual de orégano mexicano obtenido tras haber sido extraído su aceite esencial, constituye una buena fuente de compuestos antioxidantes de potencial interés en

la industria de grasas y aceites alimenticios por su alto contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante asociada. Los extractos hidroalcohólicos provenientes de este bagazo, así como el extracto enriquecido en pinocembrina generado, presentan un buen efecto protector contra el proceso de oxidación lipídica del aceite de girasol bajo condiciones de almacenamiento aceleradas, siendo el extracto enriquecido en pinocembrina el que mostró los mayores efectos antioxidantes, incluso sobre el antioxidante sintético ensayado (BHT). El presente estudio demostró la eficacia de los extractos sin aceite esencial y enriquecidos en pinocembrina provenientes del orégano mexicano en la estabilización oxidativa del aceite vegetal de girasol, posicionándose como una buena alternativa para estabilizar matrices lipídicas, con efectos protectores incluso mayores a algunos antioxidantes sintéticos por lo que estos extractos constituyen un producto antioxidante natural con un importante impacto potencial en el sector alimenticio a nivel comercial.

Contribución de los autores

Conceptualización del trabajo, MFC-G, HF-M.; desarrollo de la metodología, MFC-G.; manejo de software, CC-L.; validación experimental, CC-L, HF-M.; análisis de resultados, CC-L, HF-M, MFC-G.; Manejo de datos, CC-L.; escritura y preparación del manuscrito, MFC-G, HF-M, IL-M.; redacción, revisión y edición, CC-L, HF-M, IL-M.; administrador de proyectos, CC-L.; adquisición de fondos, HF-M. Todos los autores de este manuscrito han leído y aceptado la versión publicada del mismo.

Financiamiento

Esta investigación fue financiada por el TecNM, proyecto con clave 15109.22-P.

Agradecimientos

Los autores agradecen al TecNM/ITTIajomulco por el apoyo brindado para el desarrollo del proyecto

Conflicto de interés

Los autores declaran que no tienen intereses financieros en competencia ni relaciones personales conocidas que pudieran haber influido en el trabajo informado en este documento.

Referencias

Aladedunye, F. A. (2014). Natural antioxidants as stabilizers of frying oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116 (6), 688-706. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201300267>

- Chung, A. S., & Ferrara, N. (2011). Developmental and pathological angiogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27 (1), 563-584. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154002>
- Cid-Pérez, T. S., Ávila-Sosa, R., Ochoa-Velasco, C. E., Rivera-Chavira, B. E., & Nevárez-Moorillón, G. V. (2019). Antioxidant and antimicrobial activity of Mexican oregano (*Poliomintha longiflora*) essential oil, hydrosol and extracts from waste solid residues. *Plants*, 8 (1), 22. <https://doi.org/10.3390/plants8010022>
- Cortés-Chitala, M. C., Flores-Martínez, H., Orozco-Ávila, I., León-Campos, C., Suárez-Jacobo, Á., Estarrón-Espinosa, M., & López-Muraira, I. (2021). Identification and Quantification of Phenolic Compounds from Mexican Oregano (*Lippia graveolens* HBK) Hydroethanolic Extracts and Evaluation of Its Antioxidant Capacity. *Molecules*, 26 (3), 702. <https://doi.org/10.3390/molecules26030702>
- Cuevas-González, M. F., Flores-Martínez, H., León-Campos, C., López-Muraira, I. G., & Padilla-Rosa, J. D., (2021) Valorization of the residual bagasse of Mexican oregano (*Lippia graveolens* HBK) by obtaining fractions enriched in pinocembrin. *Renewable Energy, Biomass & Sustainability*, 3 (1), 11-23. <https://aldeser.org/ojs/index.php/REBS/issue/view/4>
- Engin, A. B., Bukan, N., Kurukahvecioglu, O., Memis, L., & Engin, A. (2011). Effect of butylated hydroxytoluene (E321) pretreatment versus l-arginine on liver injury after sub-lethal dose of endotoxin administration. *Environmental toxicology and pharmacology*, 32 (3), 457-464. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2011.08.014>
- Flores-Martínez, H., León-Campos, C., Estarrón-Espinosa, M., & Orozco-Avila, I. (2016). Process optimization for the extraction of antioxidants from mexican oregano (*Lippia graveolens* HBK) by the response surface methodology (RSM) approach. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 15 (3), 773-785. <http://www.rmiq.org/ojs311/index.php/rmiq/article/view/1034>
- González-Gallego, J., Sánchez -Collado, P., & Mataix-Verdú, J. (2006). Nutrición en el deporte. *Ediciones Díaz de Santos*, 1, 23-31. <https://www.editdiazdesantos.com/libros/9788479787707/Gonzalez-Gallego-Nutricion-en-el-deporte.html>
- Granados-Pineda, J., Uribe-Uribe, N., García-López, P., Ramos-Godínez, M. D. P., Rivero-Cruz, J. F., & Pérez-Rojas, J. M. (2018). Effect of pinocembrin isolated from Mexican brown propolis on diabetic nephropathy. *Molecules*, 23 (4), 852. <https://doi.org/10.3390/molecules23040852>
- Gutiérrez-del-Río, I., López-Ibáñez, S., Magadán-Corpas, P., Fernández-Calleja, L., Pérez-Valero, Á., Tuñón-Granda, M., Migueles, E. M., Villar, C. J., & Lombó, F. (2021) Terpenoides y Polifenoles como Agentes Antioxidantes Naturales en la Conservación de Alimentos. *Antioxidantes*, 10, 1264. <https://doi.org/10.3390/antiox10081264>
- Hernández, F. A., Hernández, H. J., Madinaveitia, R. L., Martín, M. S., Medrano, L. J., & Valenzuela, N. L., (2008). Producción y extracción de aceite de orégano (*Lippia graveolens* Kunth) bajo cultivo en la Comarca Lagunera. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 2 (3), 120-113. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-11322011000100009&script=sci_abstract
- Jan, P., Nedyalka, Y., & Michael, G. (2001). Antioxidants in Food: Practical Applications: Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition (Doctoral dissertation, Woodhead Publishing). <http://dx.doi.org/10.1079/BJN2001510>
- Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., & Jukic, M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts

- for antioxidant capacity and total phenols. *Food chemistry*, 94 (4), 550-557. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.12.004>
- Lin, L. Z., Mukhopadhyay, S., Robbins, R. J., & Harnly, J. M. (2007). Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis. *Journal of food composition and analysis*, 20 (5), 361-369. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.09.005>
- Liu, R., Li, J. Z., Song, J. K., Zhou, D., Huang, C., Bai, X. Y., Zhang, L., & Du, G. H. (2014). Pinocembrin improves cognition and protects the neurovascular unit in Alzheimer related deficits. *Neurobiology of aging*, 35 (6), 1275-1285. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-10-105>
- Loeza-Concha, H., Salgado-Moreno, S., Avila-Ramos, F., Gutiérrez-Leyva, R., Domínguez-Rebolledo, A., Ayala-Martinez, M., & Escalera-Valente, F. (2020). Revisión del aceite de orégano spp. en salud y producción animal. *Abanico agroforestal*, 2, 201. <http://dx.doi.org/10.37114/abaagrof/2020.1>
- Martínez-Natarén, D. A., Parra-Tabla, V., Dzib, G., Acosta-Arriola, V., Canul-Puc, K. A., & Calvo-Irabién, L. M. (2012). Essential oil yield variation within and among wild populations of Mexican oregano (*Lippia graveolens* HBK- Verbenaceae), and its relation to climatic and edaphic conditions. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 15 (4), 589-601. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2012.10644093>
- Mustafa, A. M., Angeloni, S., Abouelenein, D., Acquaticci, L., Xiao, J., Sagratini, G., Caprioli, G., Maggi, F., & Vittori, S. (2021). A new HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of 36 polyphenols in blueberry, strawberry and their commercial products and determination of antioxidant activity. *Food Chemistry*, 367, 130743. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130743>
- Nyotia, N., Khong, H. Y., Ahmad, S. H., Isabel, F. L., & Aimi, S. S. (2016). Isolation and synthesis of pinocembrin and pinostrobin from *Artocarpus odoratissimus*. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*. 21 (5), 1156 – 1161. <https://doi.org/10.17576/mjas-2017-2105-19>
- Osti-Castillo, M. R., Torres-Valencia, J. M., Villagómez-Ibarra, J. R., & Castellán-Pelcastre, I. (2010). Estudio químico de cinco plantas mexicanas de uso común en la medicina tradicional. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9 (5), 359-367. <http://www.redalyc.org/revista.oa?id=856>
- Peñaloza, J. K., Rojano, B. A., & Piedrahita, A. M. (2017). Selection and role of a mix rosemary (*Rosmarinus officinalis*) palmitate ascorbyl as antioxidant in a frying process. *Vitae, Revista de la facultad de ciencias farmacéuticas y alimentarias*, 24 (2), 113-123. <http://dx.doi.org/10.17533/udea.vitae.v24n2a04>
- Pokorny, J., Aramayona, J. J., Yanishlieva, N., & Gordon, M. (2004). Antioxidants in food. Practical applications. *Zaragoza Acribia*. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=5818>
- Przybyłek, I., & Karpiński, T. M. (2019). Antibacterial Properties of Propolis. *Molecules*, 24 (11), 2047. <https://doi.org/10.3390/molecules24112047>
- Ruiz-Domínguez, M. L. (2015). Técnicas y prácticas de laboratorio para el análisis de aceite de oliva virgen proyecto mejora de las economías regionales y desarrollo local. *Cuaderno Tecnológico*, 23, 1-40. <https://docplayer.es/48807425-Tecnicas-y-practicas-de-laboratorio-para-el-analisis-de-aceite-de-oliva-virgen-%20%20proyecto-mejora-de-las-economias-regionales-y-desarrollo-local.html>
- Salatino, A., Fernandes-Silva, C. C., Righi, A. A., & Salatino, M. L. F. (2011). Propolis research and the chemistry of plant products. *Natural product reports*, 28 (5), 925-936. <https://doi.org/10.1039/c1np20000a>

[org/10.1039/c0np00072h](https://doi.org/10.1039/c0np00072h)

- Vanhanen, L. P., & Savage, G. P. (2006). The use of peroxide value as a measure of quality for walnut flour stored at five different temperatures using three different types of packaging. *Food chemistry*, 99 (1), 64-69. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.020>
- Vargas-Sánchez, R. D., Torrescano-Urrutia, G. R., Acedo-Félix, E., Carvajal-Millán, E., González-Córdova, A. F., Vallejo-Galland, B., Torres-Llanez, M. J., & Sánchez-Escalante, A. (2014). Antimicrobial Activity of Commercial Propolis Extract in Beef Patties. *Journal of Food Science*, 79 (8), C1499-C1505. [c](https://doi.org/10.1016/j.jfs.2014.08.001)
- Xing, C., Yuan, X., Wu, X., Shao, X., Yuan, J., & Yan, W. (2019). Chemometric classification and quantification of sesame oil adulterated with other vegetable oils based on fatty acids composition by gas chromatography. *LWT - Food Science and Technology*, 108, 437-445. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.085>
- Zheng, Y., Wang, K., Wu, Y., Chen, Y., Chen, X., Hu, C. W., & Hu, F. (2018). Pinocembrin induces ER stress mediated apoptosis and suppresses autophagy in melanoma cells. *Cancer Letters*, 431, 31-42. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.05.026>