

MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SMPE) DE COMPUESTOS VOLÁTILES DEL GÉNERO *Origanum*

Nils Huamán Castilla^a, Erik Allcca^a, Gregorio Arroyo^a, José Quintana^a

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo por finalidad identificar los compuestos volátiles del género *Origanum*. Para tal fin se recolectó 50 muestras de las localidades de Porobaya, San June, Otorá, Doce quebradas y Tala; pertenecientes al distrito de Torata-Moquegua; las muestras recolectadas fueron caracterizadas taxonómicamente encontrándose tres especies *Origanum majoricum* (forma compacta y laxa), *Origanum majorana* y *Origanum plegatifolium*. Posteriormente, se analizó los compuestos volátiles mediante microextracción en fase sólida (SMPE) y GC-MS. Se identificaron 31 compuestos por comparación con la literatura, co-elución con estándares y comparación de índices de retención, encontrándose que el contenido de timol y carvacrol varían de 7 a 14 mg/g y de 37 a 49 mg/g, respectivamente. Las muestras de Porobaya y San June presentaron la mayor cantidad de timol; mientras que Otorá presentó el mayor contenido de carvacrol. Por lo cual la SMPE resulta ser un método rápido y sencillo para identificar volátiles en plantas aromáticas.

Palabras clave: *Origanum*, compuestos volátiles, timol, carvacrol.

SOLID PHASE MICROEXTRACTION (SMPE) VOLATILE COMPOUNDS OF GENUS *Origanum*

ABSTRACT

This research aims to identify the volatile compounds of genus *Origanum*. For this purpose 50 samples was collected locations: Porobaya, San June, Otorá, Doce Quebradas and Tala; belonging at district of Torata-Moquegua; Samples collected were characterized taxonomically finding four species *Origanum majoricum* (compact and loosely), *Origanum majorana* and *Origanum plegatifolium*. Subsequently the volatiles were analyzed by solid phase microextraction (SMPE) and GC-MS. 31 compounds were identified by comparison with literature, co-elution with standard and comparing retention indices, finding that the content of thymol and carvacrol range from 7 to 14 mg/g and 37 to 49 mg/g respectively. Porobaya samples and San June are increasing the amount of thymol present; Otorá samples

^a Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Nacional de Moquegua, Av. Ancash s/n, Moquegua, Perú,
e-mail: nilefox@gmail.com; Teléfono: +51-988538896

being more carvacrol content. Therefore the SMPE turns out to be a quick and easy method for identifying volatile aromatic plants.

Key words: *Origanum*, compounds volatile, timol, carvacrol.

INTRODUCCIÓN

El género *Origanum* (familia Lamiaceae, subfamilia Nepetoideae, tribu Mentheae) es originario de las regiones templadas de Europa y Asia, se encuentra distribuido en los 5 continentes¹. Perteneció a la familia de las Lamiaceas, introducido en Perú desde tiempos remotos, donde se viene cultivando en forma extensiva. Maximixe, empresa consultora de investigación de mercado, demostró que el orégano puede ser diez veces más rentable que otros productos tradicionales, por lo que es una alternativa para las zonas alto andinas más pobres de la región de Moquegua².

La ventaja competitiva de la región Moquegua, se debe a las buenas condiciones edafoclimáticas; sin embargo, uno de los grandes problemas que ha restringido la comercialización del “orégano” ha sido la calidad del producto, ya que se ha encontrado una elevada heterogeneidad del cultivo producido en una misma o en diferentes zonas y altitudes, restringiendo la comercialización en el mercado internacional; otro problema es debido al desconocimiento de las especies de “orégano” cultivadas en la región; así como un inadecuado manejo del cultivo, que disminuye la calidad y precio del mismo y más aún si el mercado internacional desea un orégano con valores altos de timol y carvacrol. Diversos estudios se centran en el aceite esencial del género *Origanum* y diferencian hasta de 10 fenotipos químicos distintos basándose en sus componentes mayoritarios³. Este aceite varía mucho dependiendo de la zona, el clima y la temporada de colecta⁴. Bisht y colaboradores⁵ encuentran dos grupos que se diferencian porque uno tiene un alto contenido de timol/carvacrol y sus precursores biosintéticos, mientras que el otro tiene un mayor contenido de sesquiterpenos y linalool. La microextracción en fase sólida (SPME) es usada para la caracterización de volátiles en plantas aromáticas; sin generar cambios térmicos como ocurre en la hidrodestilación, permitiendo observar cambios estacionales, especialmente en la variación de la relación timol/carvacrol, según la temporada⁶.

No existen muchos reportes acerca del proceso de secado y su efecto sobre la composición de monoterpenos en orégano. Tampoco existen artículos que relacionen la distribución geográfica, altura y ambiente con la composición obtenida final. El análisis por SPME provee una herramienta importante para analizar la composición sin intervención y alteración térmica por la generación del aceite esencial por hidrodestilación. El objetivo del presente estudio es caracterizar taxonómicamente e identificar los monoterpenos y sesquiterpenos (compuestos volátiles) mediante la microextracción en fase sólida (SMP) en las especies del género *Origanum*.

PARTE EXPERIMENTAL

Se recolectó 50 muestras de orégano en estado de floración (100 g c/u) de las localidades de: San June (2973,1 msnm), Otorá (2600,3 msnm), Porobaya (2763,8 msnm), Tala (3403,8 msnm) y Doce Quebradas (2173,7 msnm); pertenecientes al distrito de Torata - Moquegua, las cuales fueron transportadas en papel microperforado y colocadas bajo sombra para su posterior análisis mediante SPME.

Caracterización taxonómica: para identificar las especies del género *Origanum* se siguió la metodología propuesta por Berlyn y Miksche⁷; se realizó secciones transversales, longitudinales y paradermales de los órganos en estudio, cortadas a mano alzada; se analizó fragmentos del tallo a partir de 10 cm del ápice caulinar, de la porción inferior del limbo foliar, incluida la nervadura central y del pecíolo proximal y distal de hojas adultas.

Análisis de las muestras del género *Origanum* por SPME (micro-extracción en fase sólida) y GC-MS (cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas): Para la sorción de los compuestos volátiles se utilizó una fibra SPME triple de CARBOXEN/DVB/PDMS (Sigma Aldrich) con espesor de 50/30µm, la cual permite la captura de un mayor rango de compuestos volátiles. Antes de cada análisis, las fibras fueron activadas a 260°C durante 30 minutos, siguiendo las instrucciones del fabricante, para eliminar cualquier compuesto que se haya quedado adherido a la fibra. Se pesó 6 g de material y se les colocó en una recámara de vidrio con 3 entradas con septos de teflón para colocar los SPMEs y con un volumen de 500 mL (figura 1). Se dejó equilibrar a 40°C en una estufa durante una hora para saturar la recámara de volátiles y alcanzar un equilibrio entre las muestras y la atmósfera. Al cabo de este tiempo se expuso las fibras a la recámara durante quince minutos para capturar los compuestos volátiles. El análisis se hizo directamente en material seco sin moler; y la fibra captura los compuestos volatilizados en el espacio de cabeza de la recámara.



Figura 1. Sistema SMPE, para el análisis de compuestos volátiles.

Una vez finalizada la captura de compuestos volátiles, se colocó la fibra en el inyector del cromatógrafo de gases a 260 °C durante cinco minutos para desorber (retirarlo de la superficie de la fibra) los volátiles que se encontraban adheridos a la fibra y se analizaron los compuestos capturados por GC-MS utilizando el siguiente método: a) Programa de temperatura del horno: 40 °C durante 2 minutos. De 40 – 150 °C a 5 °C/min, de 150 a 170 °C a 10 °C/min, de 170 -250 °C a 30 °C/min y a 250 °C por 2 minutos. b) Flujo: 0,9 ml/min, c) Temperatura del inyector: 260 °C d) Modo de división de flujo: Splitless (sin división), e) Se utilizó una columna HP-5ms ((5%-fenil)-metilpolisiloxano), 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 µm de espesor de fase estacionaria, f) Equipo y detector: Cromatógrafo Agilent 7890B con inyector Multimodo (MMI) y detector selectivo de masas de cuadrupolo, Agilent 5977C con ionización por electrones a 70eV.

Para la identificación de los compuestos volátiles se utilizó base de datos de espectros de masa NIST (2011), estándares del laboratorio y la comparación de índices de retención lineal. La pureza fue evaluada adicionalmente usando el software de deconvolución de espectros de masas AMDIS versión 2.68. La cuantificación de áreas bajo los picos del cromatograma se realizó con la ayuda del programa ChemStation versión F.01.00.1903 de Agilent. Para cada compuesto obtenido se calculó el índice de retención experimental a partir de una muestra de estándares de calibración de alcanos lineales (C8 a C20 – Sigma-Aldrich). Asimismo, para verificar la identidad de los compuestos, se comparó los tiempos de retención y los perfiles de fragmentación con los estándares respectivos. Los perfiles de cada muestra de orégano fueron comparados utilizando el programa DataAnalysis versión 4.0 (Bruker).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La caracterización taxonómica se detalla en la tabla 1, al respecto los datos aportados por Ayqui-Vilca⁸ y Fátima Cáceres⁹, de *Origanum majoricum*, *Origanum majoricum* forma compacta y *Origanum majoricum* forma laxa y *O. plegatifolium*, coinciden con la descripción del presente estudio. Si se consideran los caracteres exomorfológicos (tipo de brácteas, cáliz y corola y pilosidad foliar) y anatómicos de los ejemplares de referencia, se puede establecer que existen tres especies como es el caso de: *Origanum majoricum* forma compacta y *Origanum majoricum* forma laxa, *Origanum majorana* y *Origanum plegatifolium*.

Con el fin de estudiar la distribución del aceite esencial en las diversas muestras de las especies del género *Origanum*, es deseable analizar las glándulas de aceite individuales en cada hoja de orégano¹⁰. Esta tarea es posible mediante la extracción del aceite de las glándulas con una fase sólida de micro-extracción (SPME) de fibra, junto con un sistema GC-MS. Esto permitirá tener un muestreo rápido y eficiente de la extracción de los analitos adheridos en la fibra (SMPE), la cual representa la misma cantidad que una gota de aceite esencial según el espacio de cabeza y la temperatura del medio¹¹. Para evitar distorsiones de cuantificación debido a la saturación del espacio de cabeza, se realizaron experimentos preliminares para optimizar la concentración de la muestra. Se encontró que, si se ha utilizado 50 g de muestra, el contenido carvacrol y timol es sub representado por esta cantidad de muestra diferenciando la materia seca y el contenido de humedad (figura 1).

Dentro de los 32 monoterpenos y sesquiterpenos (compuestos volátiles) identificados en el presente trabajo (figura 2), los más importantes son el timol y carvacrol; estos dos compuestos son responsables del aroma característico de las especies del género *Origanum*. Diversas investigaciones mencionan que la presencia y alta concentración de timol en aceite esencial del género *Origanum*; se debe a la actividad de la enzima terpeno-sintetasa que regula la conversión de terpineno a timol¹². Lukas *et al.*¹³ a partir de aceite esencial obtenido por hidrodestilación; identificaron además de timol y carvacrol otros 21 monoterpenos y sesquiterpenos en *Origanum vulgare* L. Es importante resaltar que la composición de los compuestos volátiles es extremadamente variable entre especies de este género; por lo general estas diferencias se encuentran en la distribución y composición de sus monoterpenos. Asimismo, la microextracción en fase sólida captura de manera adecuada la fracción más ligera de monoterpenos y sesquiterpenos, representando mejor la composición de aceite esencial; evitando cambios estructurales debido a rearrreglos u oxidación en las moléculas de monoterpenos; como comúnmente sucede en la hidrodestilación¹⁴.

Tabla 1. Caracterización taxonómica de las especies del género *Origanum*.

| Nº | Código | Descripción taxonómica | Nº | CÓDIGO | descripción taxonómica |
|----|--------|--|----|--------------------|--|
| 1 | T-01 | <i>Origanum majoricum forma laxa</i> | 26 | SJ-10 | <i>Origanum majorana</i> L. |
| 2 | T-02 | <i>Origanum majoricum forma compacta</i> | 27 | SJ-11 | <i>Origanum majoricum forma compacta</i> |
| 3 | T-03 | <i>Origanum majorana</i> | 28 | SJ-12 | <i>Origanum majoricum forma compacta</i> |
| 4 | T-04 | <i>Origanum majorana</i> | 29 | SJ-13 | <i>Origanum plegatifolium</i> |
| 5 | T-05 | <i>Origanum majorana</i> | 30 | SJ-14 | <i>Origanum plegatifolium</i> |
| 6 | T-06 | <i>Origanum majorana</i> | 31 | SJ-15 | <i>Origanum majorana</i> L. |
| 7 | T-07 | <i>Origanum majoricum forma compacta</i> | 32 | SJ-16 | <i>Origanum majorana</i> L. |
| 8 | T-09 | <i>Origanum majoricum forma compacta</i> | 33 | SJ-17 | <i>Origanum majoricum forma compacta</i> |
| 9 | T-10 | <i>Origanum majoricum forma laxa</i> | 34 | SJ-18 | <i>Origanum majoricum forma compacta</i> |
| 10 | T-11 | <i>Origanum majorana</i> | 35 | SJ-19 | <i>Origanum majoricum forma compacta</i> |
| 11 | T-12 | <i>Origanum majorana</i> | 36 | SJ-20 | <i>Origanum majoricum forma compacta</i> |
| 12 | DC-1 | <i>Origanum majorana</i> | 37 | SJ-21 | <i>Origanum majoricum forma laxa</i> |
| 13 | DC-2 | <i>Origanum majorana</i> | 38 | SJ-22 | <i>Origanum majoricum forma laxa</i> |
| 14 | DC-3 | <i>Origanum majorana</i> | 39 | SJ-23 | <i>Origanum majoricum forma compacta</i> |
| 15 | DC-4 | <i>Origanum majorana</i> | 40 | SJ-24 | <i>Origanum majoricum forma compacta</i> |
| 16 | DC-5 | <i>Origanum majorana</i> | 41 | SJ-25 | <i>Origanum majorana</i> L. |
| 17 | SJ-01 | <i>Origanum majorana</i> L. | 42 | SJ-26 | <i>Origanum majoricum forma compacta</i> |
| 18 | SJ-02 | <i>Origanum majorana</i> L. | 43 | OT-01 | <i>Origanum majoricum forma laxa</i> |
| 19 | SJ-03 | <i>Origanum majorana</i> L. | 44 | OT-02 | <i>Origanum majoricum forma laxa</i> |
| 20 | SJ-04 | <i>Origanum majoricum forma compacta</i> | 45 | OT-03 | <i>Origanum majoricum forma compacta</i> |
| 21 | SJ-05 | <i>Origanum majoricum forma compacta</i> | 46 | PO-01 ^a | <i>Origanum majoricum forma compacta</i> |
| 22 | SJ-06 | <i>Origanum majoricum forma compacta</i> | 47 | PO-02 ^a | <i>Origanum majoricum forma compacta</i> |
| 23 | SJ-07 | <i>Origanum majoricum forma compacta</i> | 48 | PO-02B | <i>Origanum majoricum forma compacta</i> |
| 24 | SJ-08 | <i>Origanum majorana</i> L. | 49 | PO-03 ^a | <i>Origanum majoricum forma compacta</i> |
| 25 | SJ-09 | <i>Origanum majorana</i> L. | 50 | PO-03C | <i>Origanum majoricum forma compacta</i> |

T: Tala; DC: Doce quebradas; SJ: San June; OT: Otorá; PO: Porobaya

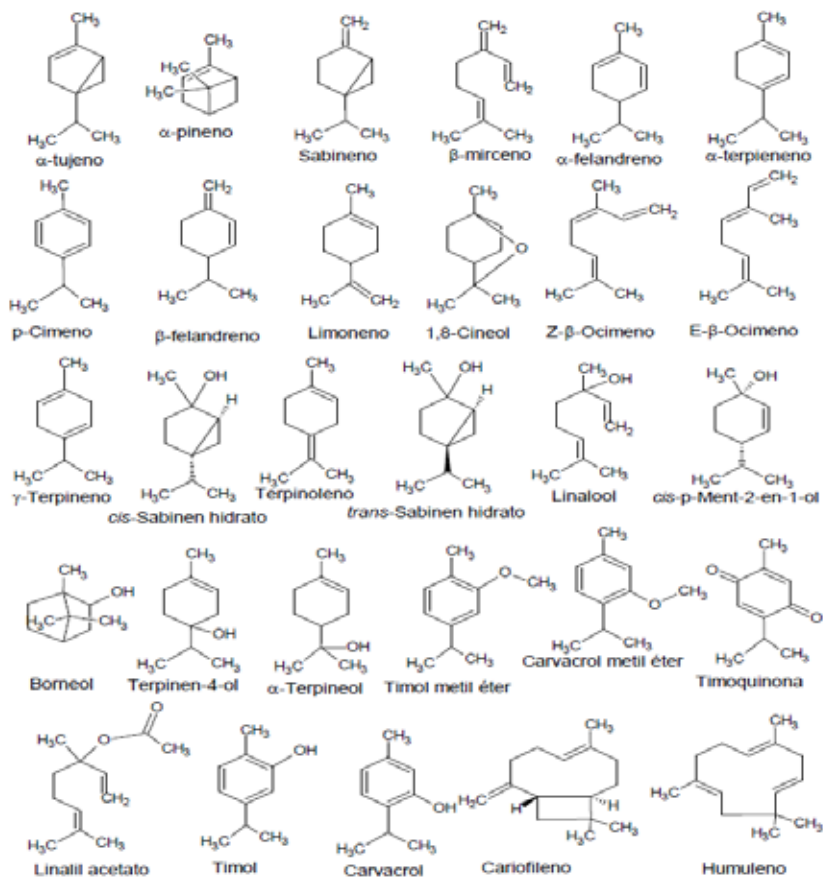


Figura 2. Estructuras de los monoterpenos y algunos sesquiterpenos encontrados en las especies del género *Origanum*

La tabla 2 muestra los promedios más altos de monoterpenos y sesquiterpenos de las tres especies encontradas en el género *Origanum*; se puede observar que las concentraciones más importantes pertenecen a linalool + trans sabinen hidrato, seguido de γ -terpineno, p-cimeno, α -terpineno, limoneno, terpinen-4-ol, timol y carvacrol; es notable también la cantidad de cis-sabinen hidrato y sabineno que existen en las especies estudiadas. Asimismo, las muestras de San June y Porobaya presentan contenidos altos de timol, a diferencia de Otor que presentan el contenido más alto de carvacrol; solo el código SJ8 presentó contenidos similares de timol y carvacrol. Los resultados obtenidos en comparación con otros estudios presentan valores relativamente altos en el contenido de timol y carvacrol^{12, 14, 15}. Al respecto, se sabe que las especies del género *Origanum* contienen una mayor proporción de carvacrol y timol en el verano que en el otoño; es decir, si se cosecha en verano los días son largos y habrá mayor exposición a la radiación solar, a diferencia del otoño los días cortos y tienen una menor exposición a la radiación solar¹⁵. Las muestras fueron recolectadas en el mes

de enero (verano) periodo de floración, esto explica la variación encontrada. El análisis de varianza realizado a los factores en estudio tales como distribución geográfica y tipo de especie, muestran un p-valor de 0,042 y 0,038 respectivamente ($\alpha < 0,05$), entonces podemos concluir que existe suficiente evidencia estadística con un 95% de confiabilidad para aceptar que dichos factores influyen sobre el contenido de monoterpenos y sesquiterpenos de las especies del género *Origanum*.

Tabla 2. Contenido de monoterpenos y sesquiterpenos en especies del género *Origanum*

| Descripción | <i>O. majorana</i> | <i>O. plegatifolium</i> | <i>O. majoricum</i> | |
|---|--------------------|-------------------------|---------------------|----------------|
| | | | forma laxa | forma compacta |
| <i>α-thujene</i> | 7,3079 | 17,5177 | 13,5151 | 10,2135 |
| <i>α-pinene</i> | 1,8085 | 2,5165 | 1,5711 | 1,6978 |
| <i>Sabinene</i> | 14,4719 | 30,8062 | 22,5566 | 22,6833 |
| <i>l-octen-3-ol</i> | 2,7447 | 5,1555 | ---- | ---- |
| <i>β-myrcene</i> | 12,2187 | 28,1613 | 13,0152 | 9,87456 |
| <i>α-phellandrene</i> | 5,0112 | 33,9326 | 27,3161 | 21452 |
| <i>α-terpinene</i> | 30,3898 | 38,4517 | 20,6882 | 20,8149 |
| <i>p-cymene</i> | 31,5344 | 92,4885 | 61,7596 | 61,8863 |
| <i>Limonene</i> | 21,0219 | 72,3406 | 56,3281 | 56,4548 |
| <i>(Z)-β-ocimene</i> | 17,606 | 14,5917 | 5,639 | 5,7657 |
| <i>(E)-β-ocimene</i> | 5,5923 | 8,1212 | 2,722 | 2,8487 |
| <i>g-terpinene</i> | 67,7364 | 72,9458 | 23,6764 | 23,8031 |
| <i>cis-sabinene hydrate</i> | 20,3883 | 21,4205 | 11,441 | 11,5677 |
| <i>Terpinolene</i> | 11,9988 | 52,9171 | 32,5682 | 32,6949 |
| <i>trans-sabinene hydrate</i> | ----- | 10,969 | 52,8264 | 52,9531 |
| <i>Linalool</i> | 27,3598 | 18,4651 | 8,1506 | 8,2773 |
| <i>cis-p-menthen-2-en-1-ol</i> | 6,3823 | 22,7786 | 10,3957 | 10,5224 |
| <i>trans-p-menthen-2-en-1-ol</i> | 3,0571 | 16,2468 | 5,3694 | 5,4961 |
| <i>terpinen-4-ol</i> | 53,7126 | 48,147 | 70,3251 | 70,4518 |
| <i>α-terpineol</i> | 24,519 | 55,4875 | 15,7101 | 15,8368 |
| <i>thymol methyl ether</i> | 24,0342 | 46,2043 | 15,3088 | 15,4355 |
| <i>carvacrol methyl ether</i> | 45,1914 | 86,257 | 22,7326 | 22,8593 |
| <i>Thymoquinone</i> | 6,9976 | 2,5254 | 0,9198 | 1,0465 |
| <i>Linalyl acetate</i> | 7,8921 | 82,849 | 27,0293 | 27,156 |
| Thymol | 7,7252 | 11,053 | 15,5045 | 14,857 |
| Carvacrol | 37,6106 | 49,0984 | 39,0564 | 37,0564 |
| <i>Caryophyllene</i> | 37,9032 | 67,8147 | 25,4174 | 25,5441 |
| <i>Aromadendrene</i> | 6,2333 | 9,4568 | 2,5593 | 2,686 |
| <i>Humulene</i> | 5,8054 | 11,744 | 3,0114 | 3,1381 |
| <i>Alloaromadendrene</i> | ---- | 1,5654 | 0,4866 | 0,6133 |
| <i>α-muroloeno</i> | 31,8592 | 20,211 | 4,1324 | 4,2591 |
| <i>β-bisabolene</i> | 0,8389 | 2,91 | 0,5622 | 0,6889 |

La composición de monoterpenos y sesquiterpenos está expresado en mg/g m.s (materia seca)

CONCLUSIONES

Se identificaron las especies de *Origanum majuricum* (forma laxa y forma compacta), *Origanum plegatifolium* y *Origanum majorana*; el análisis por microextracción en fase sólida permitió identificar 32 monoterpenos y sesquiterpenos; por comparación con una base de datos, co-elución con estándares y comparación de índices de retención; asimismo, el contenido de timol varía de 7 a 14 mg/g y el contenido de carvacrol varía de 37 a 49 mg/g; las muestras que mayor cantidad de timol presentan pertenecen a las localidades de San June y Porobaya, mientras que el mayor contenido de carvacrol pertenecen a la localidad de Otora. El tipo de especie y la distribución geográfica influyen sobre el contenido de estos compuestos.

AGRADECIMIENTO

Se agradece a la Universidad Nacional de Moquegua - Perú, por financiar el presente proyecto de investigación. Al Dr. Eric Cossio, Docente Principal del departamento de Ciencias – sección Química de la Pontificia Universidad Católica del Perú.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Banchio E, Bogino P, Zygodlo J, Giordano W. Plant growth promoting rhizobacteria improve growth and essential oil yield in *Origanum majorana* L. *Biochem Syst Ecol.* 2008; 36: 766–771.
2. Castillo A. Propagación de plantas por cultivo in vitro. *Revista de investigación Agraria.* 2004; 12 (1):382-392.
3. Mockute D, Bernotiene G, Judzentiene A. The essential oil of *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* growing wild in Vilnius district (Lithuania). *Phytochemistry.* 2001; 57 (1): 65-72.
4. Alves-Pereira I y Fernandes-Ferreira M. Essential oils and hydrocarbons from leaves and calli of *Origanum vulgare* ssp. *Virens* *Phytochemistry.* 1998; 48 (5): 795-801.
5. Bisht D, Chanotiya Ch, Rana M, Semwal M. Variability in essential oil and bioactive chiral monoterpenoid compositions of Indian oregano (*Origanum vulgare* L.) populations from northwestern Himalaya and their chemotaxonomy. *Ind Crops Prod.* 2009; 30 (3): 422-432.
6. Yousif A, Durance T, Scaman C, Girard B. Flavor volatiles and physical properties of vacuum-microwave- and air-dried sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Int J Food Sci.* 2000; 65 (5): 926 - 932.
7. Berlin G, Miksche P. Botanical microtechnique and cytochemistry. 3rd edition. Iowa: Iowa State University Press; 1976.
8. Ayqui-Vilca S. Comportamiento Agronómico de Orégano Negro, Mejorana, Zambito, Chinito en la Región de Arequipa. *Natural Sciencie.* 2010; 2 (1): 57-62.

9. Cáceres de Baldárrago F. Identificación y Caracterización Botánica de especies del género *Origanum* L. cultivados en la Región de Arequipa. *Natural Sciencie*. 2009; 3 (1): 36-42
10. Johnson Ch, Kazantzis A, Skoula M, Mitteregger U, Novak. Seasonal, populational and ontogenic variation in the volatile oil content and composition of individuals of *Origanum vulgare* subsp. Hirtum, assessed by GC headspace analysis and by SPME sampling of individual oil glands. *Phytochem Anal*. 2004; 15 (5): 286 - 292.
11. Grassi P, Novak J, Steinlesberger H, Franz Ch. A direct liquid, non-equilibrium solid-phase micro-extraction application for analysing chemical variation of single peltate trichomes on leaves of *Salvia officinali*. *Phytochem Anal*. 2004; 15 (3): 198 - 203.
12. Crocoll Ch, Asbach J, Novak J, Gershenzon J. Terpene synthases of oregano (*Origanum vulgare* L.) and their roles in the pathway and regulation of terpene biosynthesis. *Plant Mol Biol*. 2010; 73(6):587–603.
13. Lukas B, Schmiderer C, Novak J. Essential oil diversity of European *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae). *Phytochemistry*. 2015; 119 (1): 32–40
14. Gong HY, Liu WH, Lv G.Y, Zhou X. Analysis of essential oils of *Origanum vulgare* from six production areas of China and Pakistan. *Rev Bras Farmacogn*. 2014; 24 (1): 25–32.
15. Kubezka KH. New approaches in essential oil analysis using polymer coated silica fibers. In: Franz Ch, Mathé A, Buchbauer G. (Eds.). *Essential Oils, Basic and Applied Research. Proceedings of the 27th International Symposium on Essential Oils*; 8 – 11 september 1996; Vienna. Carol Stream: Allured Publishing Corp; 1997. pp. 139-146.