

Efecto de las condiciones de cultivo en la producción de fenoles, flavonoides totales y su capacidad antioxidante en el árnica (*Heterotheca inuloides*)

María Isabel Nieto Ramírez¹
Juan Fernando García Trejo^{1§}
Valeria Caltzontzin Rabell¹
Ruth Chávez Jaime¹
María de la Luz Estrada Sánchez¹

¹Facultad de Ingeniería- Campus Amazcala. Universidad Autónoma de Querétaro. Carretera a Chichimequillas s/n km, 1 Amazcala, el Marqués, Querétaro, CP. 76265. Tel: 442 192 12 00. (isabelnieto33@gmail.com; valeria.caltzontzinrabell@gmail.com; ruth_cha_ja@hotmail.com; luzsanc_25@hotmail.com).

[§]Autor para correspondencia: juanfernando77@gmail.com.

Resumen

En la actualidad, *Heterotheca inuloides* o árnica para su nombre común, ha sido utilizada por su actividad anti inflamatoria, además, esta planta tiene otras aplicaciones como tratamiento contra el reumatismo, desordenes gastrointestinales, entre otros. Estas propiedades terapéuticas, son debido a metabolitos secundarios como los fenoles y flavonoides. La concentración de estos compuestos puede ser influenciada por estrés biótico o abiótico, en donde las condiciones de cultivo como la humedad relativa, la temperatura del ambiente e incluso el tipo de riego, representan un estrés abiótico. Es por esto que el objetivo de este trabajo es comparar diferentes condiciones de cultivo sobre la producción de fenoles, flavonoides totales y su capacidad antioxidante en el árnica (*Heterotheca inuloides*). Para cumplir con este objetivo se obtuvieron las plantas del árnica de manera comercial, colocándose 14 plantas dentro de un invernadero y 14 plantas en cultivo a cielo abierto. Además, cada uno de estos sistemas de cultivo tuvo dos tipos de sistemas de riego, el primero de agua con solución nutritiva y el segundo con agua residual acuícola. También, se elicitó con ácido salicílico a las concentraciones 0.0 mM, 0.5 mM y 1 mM, en dos ocasiones cada 14 días. Se determinó la concentración de fenoles, flavonoides totales y la capacidad antioxidante antes de cada elicitación. Los compuestos fenólicos máximos se presentaron en las plantas cultivadas en campo, regadas con solución nutritiva y elicitadas a 0.5 mM. Los flavonoides totales y la actividad antioxidante se presentaron en las plantas en invernadero, regadas con solución nutritiva, sin efecto sobre la elicitación. De acuerdo con algunos de los resultados obtenidos se concluye en que las condiciones de cultivo para la producción de fenoles no son diferentes para la producción de flavonoides y la capacidad antioxidante de dichos compuestos.

Palabras clave: capacidad antioxidante, condiciones de cultivo, fenoles, flavonoides.

Recibido: enero de 2018

Aceptado: marzo de 2018

Introducción

El cultivo de plantas medicinales cada vez es mayor debido al incremento de su uso con fines terapéuticos y en la producción de fórmulas para productos de cuidado personal y salud a base de las mismas. El 40% de la población mexicana usa plantas medicinales como la única alternativa para el tratamiento de enfermedades, siendo el principal recurso terapéutico en México (Fernández *et al.*, 2008). Hoy en día existen manuales de producción de plantas medicinales donde se especifican los requerimientos para el cultivo (CONAFOR, 2009; Villavicencio *et al.*, 2010); sin embargo, no hay un monitoreo de las concentraciones o condiciones del principio activo.

El árnica (*Heterotheca inuloides*) es una planta comúnmente usada como anti-inflamatorio. Sin embargo, también se usa para el tratamiento del reumatismo, problemas gastrointestinales y actualmente se ha usado como tratamiento alternativo contra el cáncer (Alonso-Castro *et al.*, 2011) y la diabetes (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Johnson *et al.*, 2006). Los compuestos que le confieren estas propiedades medicinales son principalmente sesquiterpenos, fitoesteroles y flavonoides (Delgado *et al.*, 2001). Esta planta se encuentra en las regiones frías y templadas de México (Guerrero-Hernández *et al.*, 2014; Gutiérrez y Solano, 2014). En México, es considerada una de las plantas medicinales de mayor demanda (García de Alba *et al.*, 2012; Juárez-Rosete *et al.*, 2013; Monroy-Ortíz *et al.*, 2013), se obtiene principalmente de manera silvestre, aunque ya se comienza a cultivar en pequeña escala (Cesín-Vargas *et al.*, 2010; Cristians *et al.*, 2015).

Los compuestos activos son los que le confieren las propiedades terapéuticas y aromáticas a dichas plantas. Estos compuestos activos están conformados por metabolitos secundarios, principalmente de compuestos fenólicos que funcionan en la planta contra daño oxidativo y flavonoides que le confieren protección contra patógenos (Ávalos y Pérez-Urria, 2009). De acuerdo con Petinatti (2012), la concentración de los compuestos fenólicos se ve modificada por estrés biótico y abiótico al que se somete la planta. Factores como la temperatura, la radiación, la nutrición y el riego, son factores de estrés abiótico que afectan la concentración de fenoles. Tal es el caso de las plantas *Ruta graveolens*, donde los fenoles se ven afectados por la radiación UV Vialart *et al.* (2012).

Además, el estrés hídrico, considerado como estrés abiótico, es estudiado sobre su influencia en la producción de fenoles y flavonoides. Algunas de las plantas estudiadas sobre este tipo de estrés es el plátano (*Musa spp.*) (Moreno-Bermúdez *et al.*, 2017), arroz (*Oryza sativa* L.) (Ramírez, 2017), entre otros. Por otro lado, la influencia del estrés abiótico en las plantas aromáticas puede influenciar en compuestos específicos, tal como el efecto de la alta radiación sobre la biosíntesis de carvacrol en orégano en donde se logró incrementar la concentración de este compuesto Teraza *et al.* (2014). De acuerdo a esto el objetivo de este trabajo es comparar las condiciones de cultivo sobre la producción de fenoles, flavonoides totales y su capacidad antioxidante en el árnica (*Heterotheca inuloides*).

Materiales y métodos

Para la experimentación de este trabajo, se obtuvieron comercialmente 28 plantas de árnica (*Heterotheca inuloides*) de un invernadero cercano al campus Amazcala y fueron identificadas por el herbario QMEX. Se trasplantaron en bolsas con sustrato inerte y se dejaron en aclimatación por 5 días.

El experimento se llevó a cabo en el campus Amazcala de la Universidad Autónoma de Querétaro durante un periodo de 28 días. El diseño experimental fue factorial de 2 x 2 x 3; es decir, dos tipos de cultivo, dos tipos de riego y tres concentraciones de elicitor. Se cultivaron 14 plantas en invernadero de tipo gótico con ventilación cenital y 14 plantas en campo, aplicando dos tipos de riego en cada cultivo; el primero consistió en agua con solución nutritiva (fertilizante) y el segundo con agua residual acuícola. Además, se realizó dos elicitaciones cada 14 días con ácido salicílico, a las concentraciones 0.5 mM, 1 mM y un control, siendo el muestreo antes de cada aplicación. La temperatura ambiental (°C) y el (%) de humedad relativa ambiental fueron monitoreadas durante todo el periodo de la experimentación.

Calidad del agua

La calidad del agua fue determinada por métodos espectrofotométricos. El análisis de nitritos (NO_2^- -N) fue por el método de diazotización (método HACH 8507, 2010), nitratos (NO_3^- -N) mediante el método de reducción de cadmio (método HACH 8171, 2010) y fósforo total (FT) por el método de molibdovanadato (Método HACH 8048, 2010).

Extracción de compuestos fenólicos

La extracción de compuestos fenólicos totales se realizó por el método de Hassan *et al.* (2011). Se pesó 0.1 g de muestra y se extrajo primeramente en una solución acuosa con metanol al 50%. Después se realizó una segunda extracción con acetona al 70%. Este método permite la extracción de compuestos extraíbles en metanol y en acetona.

Compuestos fenólicos totales

Los fenoles totales se determinaron espectrofotométricamente por el método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton y Rossi (1965). Este método se produce por la oxidación de los grupos hidroxilo mediante el reactivo de Folin. Este reactivo está compuesto de una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico. En la determinación de fenoles totales se realizó la solución de carbonato de sodio anhidro al 20% y el reactivo Folin-Ciocalteu se preparó al 1 N. Para la curva de concentración el ácido gálico se preparó a una concentración final de 0.1 mg/ml. La reacción redox producida genera una coloración azul detectada a una longitud de onda de 765 nm.

Flavonoides totales

Para la cuantificación de flavonoides se preparó una solución de 2-aminoetildifenilborato y se tomaron 50 μl de la extracción de fenoles, la fracción de fenoles extraíbles, y se les añadió 180 μl de metanol más 20 μl de la solución preparada con 2-aminoetilfenilborato. Se preparó Nitrito de sodio (NaNO_2) al 5%, cloruro de aluminio (AlCl_3) al 10%, hidróxido de sodio

(NaOH) al 1 M y la solución estándar de catequina con metanol. La lectura se realizó en un espectrofotómetro a 404 nm y se obtuvieron las concentraciones de flavonoides con una curva estándar de catequina.

Capacidad antioxidante, DPPH

La capacidad antioxidante por el método DPPH es un método muy usado basado en la donación de un átomo de hidrógeno o en la formación de complejos (DPPH-H y DPPH-R) mediante la estabilidad del radical 1, 1-difenil-2-picrilhidrazil. Las concentraciones de las capacidades antioxidantes para cada planta se determinaron por medio del porcentaje de inhibición (IC50).

La determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH se preparó en reactivo DPPH (1,1-difenil- 2-picrilhidrazil) con metanol. Se preparó en reactivo DPPH con metanol. Se colocaron alícuotas de 1.865 ml del reactivo en microtubos de 2 ml y 0.135 ml del extracto metanólico de cada muestra. Se dejó reposar por 30 min protegido de la luz y se realizó la lectura a una longitud de onda de 480 nm.

Capacidad antioxidante, FRAP

Para la determinación de la capacidad antioxidante por el método de FRAP se preparó el reactivo con la mezcla de una solución 20 mM de tricloruro de hierro (FeCl₃), buffer de acetatos con acetato de sodio anhidro y acetato de sodio trihidratado a un pH de 3.7 y por último se preparó TPTZ (tripiridil-2-tiazide) a 10 mM disuelto en ácido clorhídrico al 40 mM. Se colocó 1.865 ml del reactivo FRAP y 0.135 ml del extracto metanólico de las muestras en microtubos de 2 ml. Se dejó reaccionar por 30 min bajo protección de la luz. Se utilizó trolox para la curva de calibración. La lectura de la absorbancia se realizó a una longitud de onda de 630 nm.

Resultados y discusión

Determinación de fenoles totales

Los resultados de la concentración de fenoles totales se muestran en la Figura 3. La concentración máxima de compuestos fenólicos se presentó en las plantas cultivadas en campo, regadas con agua con solución nutritiva y elicidadas a una concentración de 0.5 mM. Sin embargo, no existe una diferencia significativa entre cada concentración de elicitación. Por otra parte, se puede advertir un incremento significativo de la concentración cuando las plantas son elicidadas por primera vez. También, es evidente el efecto del cultivo debido a que las plantas cultivadas en campo presentaron una concentración mayor a diferencia de las plantas cultivadas en invernadero. Estos resultados concuerdan con Petinatti *et al.* (2012), en donde el estrés abiótico efectivamente modifica la concentración de metabolitos secundarios, en este caso de compuestos fenólicos.

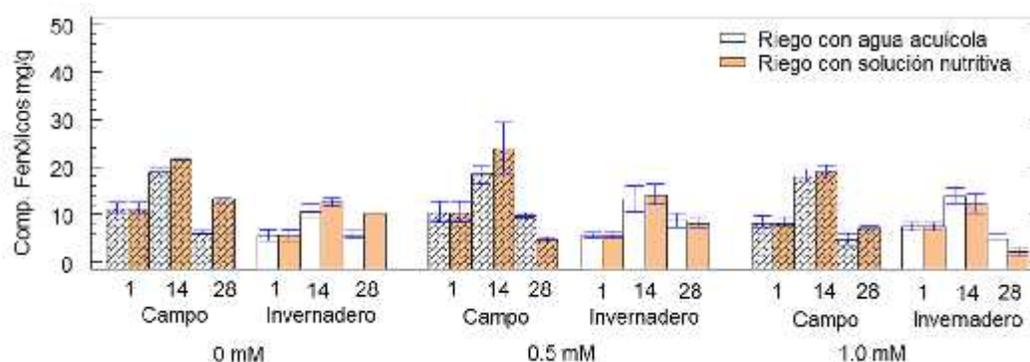


Figura 1. Concentración de compuestos fenólicos totales (mg eq. ác. Gálico/g) en árnica cultivada en diferentes condiciones. Los resultados se expresan en error estándar. 1, 14, 28, días de muestreo y elicitación.

El efecto del cultivo en campo sobre la concentración de compuestos fenólicos puede ser influenciado por las diferentes temperaturas que se observaron en el monitoreo de la temperatura ambiental, observándose temperaturas máximas de 45 °C y mínimas de 1.6 °C. Además, la temperatura ambiental en el invernadero no presenta cambios significativos, manteniendo su rango de temperatura entre 17 °C y 22 °C. Además, se observó el mismo comportamiento en el porcentaje de humedad relativa ambiental. Estos resultados se demuestran en la Figura 2.

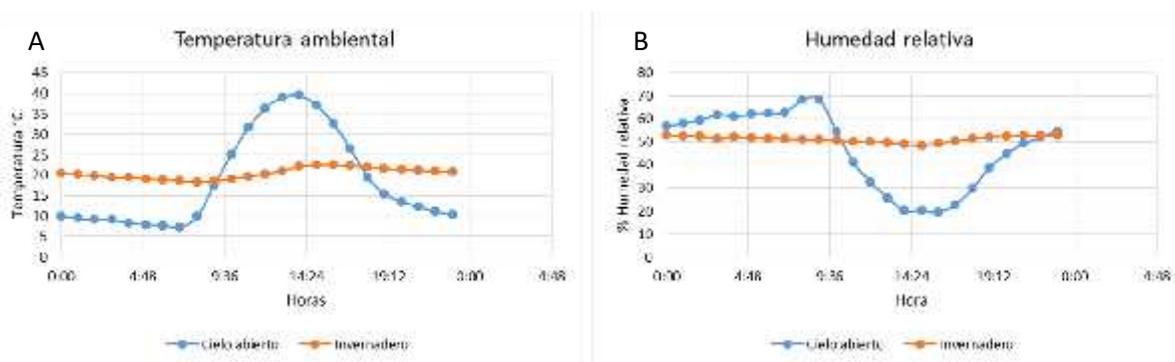


Figura 2. A. Temperatura ambiental; y B. Porcentaje de humedad relativa en los dos tipos de cultivo (invernadero y campo) en un ciclo de 24 h.

Por otro lado, el incremento de la concentración de fenoles totales en las plantas regadas con solución nutritiva está relacionada a la concentración de nutrientes suministrados. El análisis de la calidad de agua demostró que la concentración de nitrógeno en el agua con nutrientes es mayor debido a que se preparó de acuerdo a las necesidades de la planta. Estos resultados se presentan en el Cuadro 1. Además, la concentración de fosfatos en la solución nutritiva fue mayor como era de esperarse. La influencia de la nutrición está estudiada en diferentes plantas como en el orégano (*Lippia organoides*) en donde el tipo de nutrición incrementa el rendimiento del aceite esencial Teles *et al.* (2014).

Cuadro 1. Calidad de agua de cada sistema de riego.

Tipo de riego	Nitratos mg/L	Nitritos mg/L	Fosfatos mg/L
Solución nutritiva	215.175	1.341	69.45
Agua residual acuícola	118.375	0.321	14.35

Determinación de flavonoides totales

Las concentraciones de flavonoides totales en las plantas de árnica se presentan en la figura 4. Los resultados muestran un incremento significativo en la concentración de flavonoides totales cuando son cultivados en las diferentes condiciones. Las concentraciones máximas se observan en las plantas cultivadas en invernadero y regadas con solución nutritiva. No se observaron cambios significativos entre las concentraciones elicidadas en cada cultivo. Sin embargo, el mayor incremento de la concentración es cuando las plantas son elicidadas por primera vez.

Por otro lado, se puede observar que solo en las plantas elicidadas a una concentración de 1 mM se comportaron de manera distinta a las anteriores; es decir, existe un incremento en la concentración de flavonoides cuando las plantas son cultivadas en invernadero, regadas con solución nutritiva y elicidadas en dos ocasiones con ácido salicílico a una concentración de 1 mM. El efecto de la elicitación con ácido salicílico fue el esperado ya que en diferentes plantas tal como el maíz, se ha observado un incremento en la biomasa total, así como el contenido de N, P, K, el contenido de fenoles, flavonoides y de compuestos puntuales como la capsaicina Tucuch-Haas *et al.* (2017).

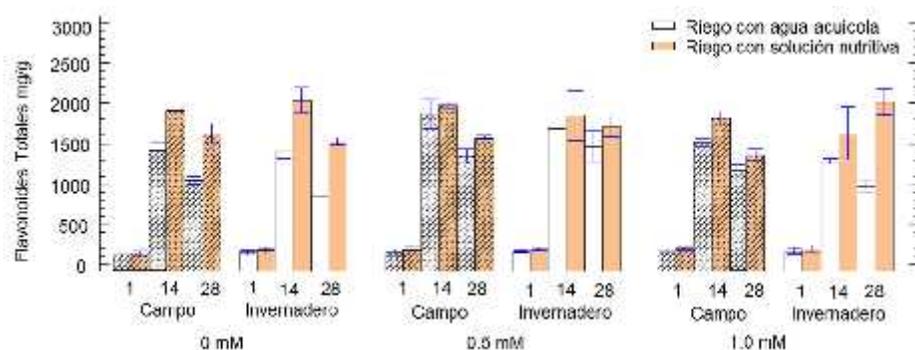


Figura 4. Concentración de flavonoides totales (mg eq. Catequina/g) en árnica cultivada en diferentes condiciones de cultivo. Los resultados se expresan en error estándar. 1, 14, 28, días de muestreo y elicitación.

Capacidad antioxidante, DPPH

Los resultados de la capacidad antioxidante se presentan en la Figura 5. Las capacidades antioxidantes en las plantas de árnica fueron en incremento en cultivos particulares; es decir, para las plantas cultivadas en campo, regadas con agua con solución nutritiva y elicidadas a 0.0 mM en dos ocasiones, tuvieron un incremento en la capacidad antioxidante. Este resultado se puede atribuir a las variaciones de temperatura y humedad relativa a las que fueron sometidas en el cultivo en campo. Para las plantas cultivadas elicidadas a una concentración de 0.5 mM en dos ocasiones, el incremento de la capacidad antioxidante se presentó en las plantas cultivadas en campo, sin diferencias significativas entre el tipo de

cultivo. Estos resultados se pueden atribuir a la respuesta de la planta respecto al tiempo y concentración de elicitación.

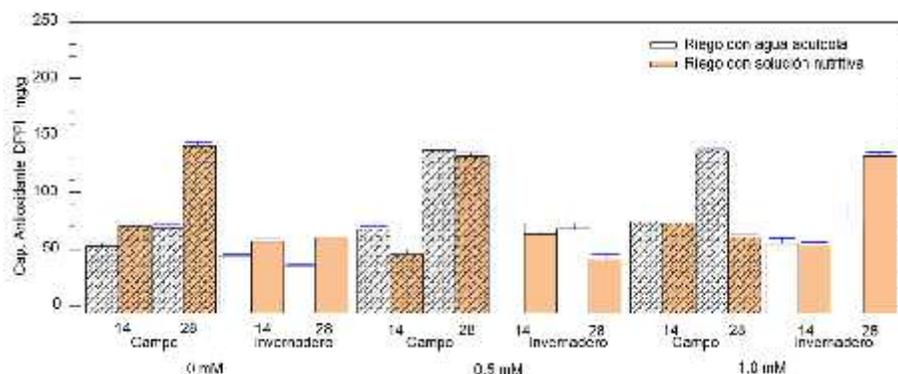


Figura 5. Capacidad antioxidante (mg eq. Trolox/g) por el método DPPH en las plantas de árnica cultivada en diferentes condiciones. Los resultados se expresan en error estándar. 14 y 28, días de muestreo y elicitación.

Los resultados de la capacidad antioxidante en las plantas elicidadas a una concentración de 1 mM en dos ocasiones, presentaron un incremento significativo cuando las plantas son cultivadas en campo y regadas con agua residual acuícola y en las plantas cultivadas en invernadero, regadas con solución nutritiva. De acuerdo con Rodríguez *et al.* (2017), *Heterotheca inuloides* contiene una gran variedad de sesquiterpenos, flavonoides y terpenos, compuestos que están presentes en la planta de acuerdo a la edad, tiempo de floración e incluso de acuerdo a la región geográfica de origen. Por ejemplo, el cadaleno y el 4-metoxi-isocadaleno, son compuestos que están ausentes en ramas jóvenes de la planta. De acuerdo con esto, atribuimos los resultados de la actividad antioxidante por el método DPPH a la variedad de compuestos que pudieron tener una actividad antioxidante en las diferentes condiciones de cultivo.

Capacidad antioxidante, FRAP

Los resultados de la capacidad antioxidante por el método FRAP se presentan en la Figura 6. La capacidad antioxidante determinada por el método FRAP mostraron diferencias significativas entre el tipo de cultivo, siendo el cultivo en campo con la capacidad antioxidante más alta. Sin embargo, la capacidad antioxidante entre los sistemas de riego fue mayor cuando la planta es regada con solución nutritiva, pero sin efecto por la elicitación (0.0 mM). Por otro lado, la capacidad antioxidante en las plantas elicidadas a una concentración de 0.5 mM por dos ocasiones, fueron mayores cuando se tiene un sistema de riego con agua residual acuícola. De la misma manera se comportó la capacidad antioxidante en las plantas elicidadas a 1 mM en dos ocasiones. Estos resultados muestran que hay un sinergismo entre dos tipos de estrés abiótico, la nutrición y la elicitación.

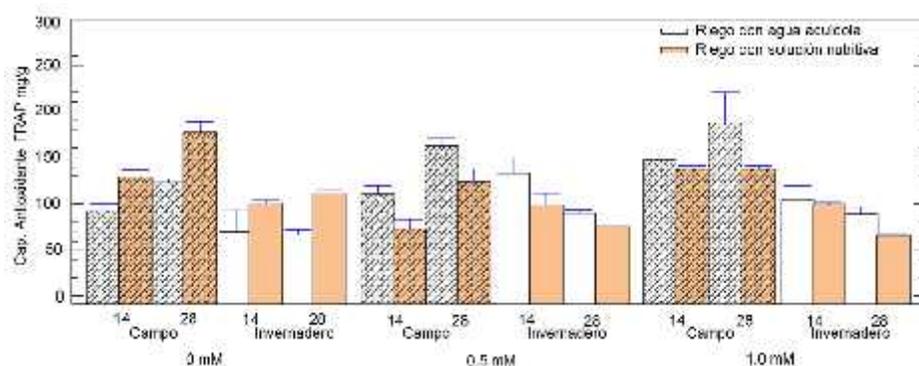


Figura 6. Capacidad antioxidante (mg eq. Trolox/g) por el método FRAP en las plantas de árnica cultivadas en diferentes condiciones. Los resultados se expresan en error estándar. 14 y 28, días de muestreo y elicitación.

De acuerdo a estos resultados, la capacidad antioxidante está relacionada con el estrés abiótico al que fueron sometidas las plantas de árnica. De acuerdo con Hossain *et al.* (2010), el método de secado del material vegetal, en este caso en plantas *Lamiaceae*, tiene una influencia sobre la capacidad antioxidante medida por el método FRAP.

Conclusiones

El cultivo en campo y la concentración del elicitor aplicado incrementa la concentración de compuestos fenólicos. La concentración de flavonoides se incrementó de manera significativa cuando la planta es cultivada en ambos tipos de cultivo (invernadero y campo), teniendo diferencias entre el tipo de riego. La capacidad antioxidante es muy variante al tipo de cultivo en el que se tiene a la planta, esto debido a los compuestos específicos y al tipo de actividad antioxidante que presenten.

Literatura citada

- Alonso, C. A. J.; Villarreal, M. L.; Salazar, O. L. A.; Gómez, S. M.; Domínguez, F. and García-Carranca, A. 2011. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *J. Ethnopharmacol.* 133(3):945-972.
- Andrade, C. A. and Heinrich, M. 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J. Ethnopharmacol.* 99:325-348.
- Ávalos, G. A.; Pérez, U. y Carril E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal.* 2(3):119-145.
- Cesín, V. A.; Ramírez, V. B.; Aliphath, F. M. and Martínez, C. D. 2010. Production of forage and dairy in southeast of the State of Tlaxcala, Mexico. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 12:639-648.
- Comisión Nacional Forestal (CONAFOR). 2009. Paquete tecnológico para la producción de orégano (*Lippia spp.*). (5360). Zapopan, Jalisco, México.
- Cristians, N. S.; Madariaga, M. A. y Mendoza, M. K. L. 2015. Catálogo de plantas medicinales selectas cultivadas en la Ciudad de México enfocado al control de calidad. Secretaría de Desarrollo Rural y Equidad para las Comunidades (SEDEREC). Graph Heritage, México.

- Delgado, G.; Olivares, M. S.; Chávez, M. I.; Ramírez, A. T.; Linares, E.; Bye, R. and Espinosa, G. F. J. 2001. Antiinflammatory constituents from *Heterotheca inuloides*. *J. Nat. Prod.* 64(7):861-864.
- García de Alba, J. E.; Ramírez, H. B. C.; Robles, A. G.; Zañudo, H. J.; Salcedo, R. A. L. y García de Alba, V. J. E. 2012. Conocimiento y uso de las plantas medicinales en la zona metropolitana de Guadalajara. *Desacatos.* 39:29-44.
- Guerrero, H. R.; González, G. J. G. and Castro, C. A. 2014. Floristic analysis of *Abies* forest and adjacent cloud forest in Juanacatlán, Mascota, Jalisco, Mexico Mascota, Jalisco, México. *Bot. Sci.* 92(4):541-562.
- Gutiérrez, J. and Solano, E. 2014. Floristic and phytogeographical affinities of the vegetation in the municipality of San José Iturbide, Guanajuato, México. *Acta Bot. Mex.* 107:27-65.
- Hossain, M. B.; Barry, R. C.; Martin, D. A. B. and Brunton, N. P. 2010. Effect of drying method on the antioxidant capacity of six *Lamiaceae* herbs. *Food Chemistry.* 12:85-91.
- Johnson, L.; Strich, H.; Taylor, A.; Timmermann, B.; Malone, D.; Teufel, Sh. N.; Drummond, R.; Woosley, R.; Pereira, E. and Martínez. A. 2006. Use of herbal remedies by diabetic Hispanic women in the southwestern United States. *Phytother. Res.* 20:50-255.
- Juárez, R. C. R.; Aguilar, C. J. A.; Juárez, R. M. E.; Bugarín, M. R.; Juárez, L. P. y Cruz, C. E. 2013. Hierbas aromáticas y medicinales en México: Tradición e Innovación. *Bio Ciencias.* 2(3):119-129.
- Monroy, O. C.; García, M. E.; Romero, M. A.; Sánchez, Q. C.; Luna, C. M.; Uscanga, M. E.; Flores, G. J. S. and González, R. V. 2013. Plants of local interest for medicinal and conservation purposes in Morelos, Mexico. *Ethno. Med.* 7(1):13-26.
- Moreno, B. L. J.; Reyes, M.; Rodríguez, M.; Kosky, R. G.; Roque, B. y Chong, P. B. 2017. Respuesta de cultivares de *Musa* spp. Al estrés hídrico *in vitro* inducido con polietilenglicol 6000. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 19(2):75-85.
- Ramírez, J. G. 2017. Los ácidos húmicos de vermicompost protegen a plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) contra un estrés hídrico posterior/the humic acids from vermicompost protect rice (*Oryza sativa* L.) plants against a posterior hidric stress. *Cultivos tropicales.* 38(2):53.
- Rodríguez, C. J. L.; Egas, V.; Linares, E.; Bye, R.; Hernández, T.; Espinosa, G. F. I. and Delgado, G. 2017. Mexican Arnica (*Heterotheca inuloides* Cass. Asteraceae: Astereae): Ethnomedical uses, chemical constituents and biological properties. *J. Ethnopharmacol.* 195:39-63.
- Teles, S.; Pereira J. A.; Muniz de Oliveira, L.; Malheiro, R.; Machado, S. S.; Lucchese, A. M. and Silva, F. 2014. Organic and mineral fertilization influence on biomass and essential oil production, composition and antioxidant activity of *Lippia organoides* H.B.K. *Industrial Crops and Products.* 59:189-176.
- Tezara, W.; Coronel, I.; Herrera, A.; Dzib, G.; Canul, P. K.; Calvo, I. L. M. and M. G. M. 2014. Photosynthetic capacity and terpene production in populations of *Lippia graveolens* (Mexican oregano) growing wild and in a common garden in Yucatán Peninsula. *Industrial Crops and products.* 57:1-9.
- Tucuch, H. C.; Alcátara, G. G.; Trejo, T. L. I.; Volke, H. H.; Salinas, M. Y. y Larqué, S. A. 2017. Efecto del ácido salicílico en el crecimiento, estatus nutricional y rendimiento en maíz (*Zea mays*). *Agrociencia.* 51(7):771-781.
- Vialart, G.; Hehn, A.; Olry, A.; Ito, K.; Krieger, C.; Larbat, R.; Paris, C.; Shimizu, B. I.; Sugimoto, Y.; Mizutani, M. and Bourgaud, F. 2012. A 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase from *Gruta graveolens* L., exhibits p-cumaril CoA 2'-hydroxylase activity (C2'H): a missing step in the synthesis of umbelliferone in plants. *Plant J.* 70:460-470.

Villavicencio, G. E. E.; Cano, P. A. y X. G. C. 2010. Metodología para determinar las existencias de orégano (*Lippia graveolens* H.B.K) en rodales naturales de Parras de la Fuente, Coahuila, Saltillo, Coahuila: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.1ª (Ed.). 42