

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE FLAVONOIDES DEL TALLO DE ORÉGANO MEXICANO (*Lippia graveolens* HBK var. *berlandieri* Schauer)

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF FLAVONOIDS FROM THE STEM OF THE MEXICAN OREGANO (*Lippia graveolens* HBK var. *berlandieri* Schauer)

Martha Celina González Güereca^{1,2}, Marcos Soto Hernández^{1*}, Geoffrey Kite³
y Mariano Martínez Vázquez⁴

¹Programa de Botánica, Colegio de Postgraduados. km. 35.5 Carr. México-Texcoco. 56230, Montecillo, Estado de México. Tel. y Fax: 01 (595) 952-0247.

²Programa de Biotecnología, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, COFAA, Instituto Politécnico Nacional, Unidad Durango. Sigma s/n, Fraccionamiento 20 de Noviembre II. 34220, Durango, Dgo. ³Jodrell Laboratory, Royal Botanic Gardens. Kew, Richmond, UK.

⁴Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circ. Ext., Cd. Universitaria, Coyoacán, 04510, México, D.F.

* Autor para correspondencia (msoto@colpos.mx)

RESUMEN

México es el principal exportador a nivel mundial de orégano mexicano (*Lippia graveolens*), con 35 – 40 % del mercado internacional; su alta demanda se debe al contenido de aceite esencial de calidad en la hoja. Su recolección es complementaria a la agricultura de temporal o secano en zonas áridas y semiáridas. El desaprovechamiento del tallo y los escasos estudios fitoquímicos y farmacológicos reportados, indujeron esta investigación en la que determinó el tipo de flavonoides y se evaluó la actividad antioxidante de extractos crudos del tallo de *Lippia graveolens* H.B.K. var. *berlandieri* Schauer recolectado en el Mezquital, Durango, México. Los extractos se prepararon por maceración del tallo molido a temperatura ambiente con extracciones sucesivas de hexano, acetato de etilo y metanol. El extracto acuoso se preparó por ebullición del tallo en agua (10 %) con posterior liofilización. Los extractos fluidos de acetato de etilo y de metanol se fraccionaron en columnas de cromatografía convencional sobre silicagel-G. Dos fracciones del extracto de acetato de etilo y una del extracto de metanol se analizaron por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas. Se detectó pilosina, cirsimarina, naringenina, kaempferol, isokaempferido, un derivado de catequina y un hexósido de quercetina no identificado. La actividad antioxidante se evaluó en los extractos por el método del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH). La reducción del radical con los extractos de prueba fue mayor a 91.2 % en 100 mgL⁻¹ excepto para el extracto acuoso que fue de 87.6 % en 50 mgL⁻¹. Los valores de IC₅₀ fueron relevantes para el extracto de acetato de etilo (sólido: 11.24 ± 1.10; extracto fluido: 12.94 ± 0.63). Estos resultados muestran la presencia en el tallo de moléculas bioactivas útiles para el desarrollo de fármacos derivados de productos naturales.

Palabras clave: *Lippia graveolens* var. *berlandieri*, flavonoides, actividad antioxidante.

SUMMARY

México is the main exporter around the world of Mexican orégano (*Lippia graveolens*) with 35-40 % of the international market; its high demand is due to the quality of essential oil contained in the leaf. It is gathered as a complementary activity to the rainfed agriculture in arid and semi arid zones. The stem has not been exploited and the scarce studies on phytochemical and pharmacological aspects encouraged us to conduct this research. The type of flavonoids and the antioxidant activity of crude extracts of the stem of *Lippia graveolens* H.B.K. var. *Berlandieri* Schauer gathered in the Mezquital, Durango México, were evaluated. The extracts were prepared by maceration of the milled stem at room temperature with successive extractions of hexane, ethyl acetate and methanol. The aqueous extract was prepared by boiling the stem in water (10 %) and then lyophilized. The fluid extracts of ethyl acetate and methanol were fractionated by column chromatography on silica gel G. Two fractions of the ethyl acetate extract and one of the methanolic extract were analyzed by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. We detected pilosin, cirsimartin, narigenin, kaempferol, isokaempferide, a derivative of catechin and a non identified. hexoside of quercetin The antioxidant activity of the extracts was evaluated by the method of the radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydracyl (DPPH). The reduction of the radical by the extracts was higher than 91.2% in 100 mg L⁻¹, except for the aqueous extract in which reduction was 87.6 % in 50 mg L⁻¹. The IC₅₀ values were relevant for the ethyl acetate extract (solid: 11.24 ± 1.10; fluid extract: 12.94 ± 0.63). These results show the presence in the stem of bioactive molecules useful for the development of drugs from natural products.

Index words: *Lippia graveolens* var. *berlandieri*, flavonoids, antioxidant activity.

INTRODUCCIÓN

En México se desarrollan dos especies de *Lippia* con características semejantes a las del orégano europeo (*Origanum* spp.), consideradas sustitutos de éste: *L. palmeri* Wats en Baja California, Sonora y parte de Sinaloa, y *L. graveolens* de mayor distribución en el resto de la República Mexicana. Por la calidad del aceite esencial contenido en la hoja, su explotación comercial es superior a las 4000 t anuales y más de 90 % de la producción de la hoja se exporta a Estados Unidos de América y Japón (Huerta, 1997). Además del aceite, la planta contiene flavonoides, sustancias relevantes en el área farmacológica principalmente por su capacidad antioxidante que contrarresta la formación de radicales libres, cuya influencia se revela en propiedades antialérgicas, antivirales o vasodilatadores (Pietta, 1999), antimicrobianas, antiinflamatorias, antitumorales, espasmolíticas, estrogénicas, entre otras (Craker y Simon, 1992; Heras *et al.*, 1998; Pérez, 2002).

En el mundo se han realizado numerosas investigaciones enfocadas al estudio de la composición química y efectos antimicrobianos del aceite esencial del género *Lippia* (Pascual *et al.*, 2001; Abena *et al.*, 2003; Bassole, *et al.*, 2003; Salgueiro *et al.*, 2003) o con relación a su efecto antihipertensivo y vasodilatador (Guerrero *et al.*, 2002). Con respecto a flavonoides, Tomas-Barberan *et al.* (1987) identificaron en *L. nodiflora* y *L. canescens* a 15 flavonoides, tres agliconas de flavonas y 12 sulfatos de flavona, entre ellos: mono y di sulfatos de nepetina, jaceosidina, hispidulina, 6-hidroxluteolina y nodifloretilina, y sus derivados sulfatados. De *L. citriodora*, Skaltza y Shammas (1988) aislaron: salvigenina, eupatorina, eupafolina, 6-hidroxluteolina, luteolina, luteolin-7-O- β -glicósido, hispidulina, cirsimaritina, diosmetina, crisoeriol, apigenina, pectolarigenina y circiliol. Domínguez *et al.* (1989) identificaron naringenina en *L. graveolens*. En *L. turbinata*, Hernández *et al.* (2000) correlacionaron la presencia de glucósidos en el anillo B en las posiciones 7-O y 3-O, con un aumento de la actividad antimicrobiana del flavonoide contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. Otros flavonoides reportados por Costa *et al.* (2001) en *L. sidoides* son: quercetina, luteolina, glucoluteolina y taxifolina, entre otros. En *L. alba*, Zétola *et al.* (2002) demostraron la actividad sedante y miorelajante del extracto de etanol, posiblemente relacionada con la presencia de flavonoides. Con respecto a su actividad antioxidante, en la infusión de hojas de *Lippia citriodora* Valentao *et al.* (2002) encontraron una potente actividad antioxidante probablemente debida a la presencia de un feniletanoide (verbascósido) y de derivados de luteolina. No obstante, la información acerca de la actividad farmacológica y química de flavonoides disponible en este género es pobre todavía (Pascual *et al.* 2001), y en particular para *L. graveolens*, cuyos tallos son

desaprovechados porque se tiran o se queman. Dado el potencial que se reporta de la planta, en este trabajo se hizo un estudio fitoquímico para conocer el tipo de flavonoides presentes en el tallo de orégano silvestre (*Lippia graveolens* var. *berlandieri*) y para evaluar el potencial antioxidante de sus extractos y así contribuir al conocimiento de las propiedades químicas y farmacológicas de dicha planta, así como dejar abierta la posibilidad de un aprovechamiento integral de la misma a nivel industrial como fuente de materia prima en la obtención de nuevos productos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis fotoquímico

Recolección de material vegetal y procesamiento. Se recolectaron partes aéreas de *L. graveolens* en los alrededores del km 48 de la carretera Durango-Mezquital, Municipio del Mezquital, Durango, Méx., en octubre de 1998. En esa localidad prevalece un clima Bso: el más seco de los BS (secos o esteparios) con temperatura media anual de 16 °C, precipitación media anual de alrededor de 650 mm y 2230 m de altitud (González, 1983). Se preparó un ejemplar de herbario para su identificación con el Número 16543 y se depositó en el Herbario CIIDIR del Instituto Politécnico Nacional (Durango, México). Los tallos se separaron de la planta, se secaron a temperatura ambiente y se molieron en un molino de cuchillas y se cribaron a través de malla 10.

Obtención de extractos. El material vegetal (1.7 kg) se sometió a un proceso de extracción exhaustiva con hexano (Hex) (5x48 h), seguido de una decantación del disolvente, el cual se concentró a sequedad mediante vacío y se calculó su rendimiento. El disolvente del sólido remanente de la maceración se eliminó por evaporación en una campana de extracción. Posteriormente se adicionó acetato de etilo (AcOEt) a temperatura ambiente (9x48 h), con el mismo proceso anterior. Finalmente se realizó la extracción con metanol (MeOH) y se repitió la misma operación. Del extracto de AcOEt se obtuvo un precipitado (PAcOEt), el cual se separó por filtración. El extracto acuoso (W) se preparó por extracción en ebullición de una mezcla de tallo en agua a 10 % (m/v) durante 5 min. La mezcla se filtró y el filtrado se liofilizó.

Fraccionamiento cromatográfico de extractos. Los extractos de AcOEt (10 g) y MeOH (14.8 g) se fraccionaron por separado de manera convencional por columna empacada con silicagel G 60 (Merck). Se utilizaron mezclas de disolventes de polaridad creciente (Hex, AcOEt y MeOH) para eluir ambas columnas y se tomaron fracciones de 200 mL en cada caso. Del extracto de AcOEt se obtuvieron 153 fracciones, y del extracto de MeOH 192

fracciones. Cada fracción se redujo a un volumen de 2-3 mL. Posteriormente se hizo un monitoreo de estas fracciones por cromatografía en capa fina en gel de sílice, las cuales se revelaron inicialmente bajo luz ultravioleta (UV) e inmediatamente por aspersión sucesiva de los reactivos NP (ácido 2-amino etil éster difenilbórico a 1 % en metanol, p/v) y PEG (polietilenglicol 4000 a 5 % en metanol, p/v) (Wagner y Bladt, 1996). A continuación se combinaron las fracciones semejantes y se concentraron nuevamente a sequedad, a presión reducida. Para este trabajo se seleccionaron las fracciones 49 (I) del extracto de AcOEt y la 41 (II) del extracto de MeOH con base en las características detectadas en el monitoreo previo: abundancia, tamaño de mancha y separación de los componentes acompañantes en la polaridad fraccionada.

Preparación de las fracciones para el análisis de CL-EM

Del fraccionamiento del extracto de AcOEt, se seleccionó una fracción (I) obtenida por la mezcla de elución Hex/AcOEt (7:3), la cual es soluble en cloroformo, metanol y poco soluble en agua. Del extracto de MeOH fraccionado por columna, se seleccionó la fracción (II) eluida de la mezcla eluyente AcOEt/MeOH (8:2), muy soluble en agua y de apariencia semejante a la melaza. Se observaron pequeños cristales blancos (punto de fusión 74-75 °C), poco solubles en MeOH y solubles en H₂O. Las fracciones se disolvieron por separado en metanol acuoso (80 %), se centrifugaron y el sobrenadante previamente filtrado se inyectó al cromatógrafo de líquidos acoplado al espectrómetro de masas (CL-EM).

Análisis cromatográfico de las fracciones (CL-EM).

La caracterización de los flavonoides se efectuó en un cromatógrafo de líquidos acoplado en interfase a un espectrómetro de masas marca Waters (Watford, Reino Unido), modelo LC600 y un detector de arreglo diodos modelo 996 equipado con el programa operativo Millennium. Se utilizó una columna Hypersil-ODS, Phenomenex Luna C₁₈ (150 mm x 4 mm de d.i. y tamaño de partícula de 5 µm). Como fase móvil se empleó un gradiente de elución para la mezcla H₂O/MeOH/AcOH 5 % en MeOH: 80:0:20 (0'); 0:80:20 (20'); 0:80:20 (25'), 80:0:20 (27') y 80:0:20 (37'), a una velocidad de flujo de 1 mL min⁻¹ y un volumen de inyección de 20 µL. Para el detector del espectrómetro de masas se utilizó una trampa de iones cuadrupolo (Finnigan LCQ, Hemmel Hempstead, Reino Unido) acoplado con una fuente iónica APCI. La temperatura de vaporización fue de 550 °C, y la de calentamiento de la columna capilar fue de 150 °C. Se utilizó una corriente de nitrógeno y un flujo auxiliar del mismo gas a 80 y 10 unidades, respectivamente. La identificación de los flavonoi-

des en las fracciones estudiadas se llevó a cabo por comparación con muestras auténticas y por cotejo con la biblioteca del equipo.

Evaluación de la actividad antioxidante. Con base en el método de Cottele *et al.* (1996) se evaluaron los extractos del tallo de orégano para determinar la actividad antioxidante. Se utilizó el método del radical libre DPPH, el cual reduce el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) en la 2,2-difenil-1-picril hidrazina por la acción antioxidante de compuestos que contienen grupos -OH que decoloran el reactivo DPPH.

El diseño experimental fue completamente al azar, en el que cada tratamiento se refiere a las diferentes concentraciones analizadas. Los resultados obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Dunnett para encontrar diferencias significativas entre los valores de la concentración inhibitoria media (IC₅₀), para cada tratamiento entre el grupo control y el experimental, con una P ≤ 0.01 con respecto al control.

Preparación de los extractos a evaluar. Los extractos concentrados de hexano, acetato de etilo y metanol se disolvieron por separado en dimetilsulfóxido (DMSO) hasta obtener concentraciones de 20 mg mL⁻¹. A partir de esta disolución concentrada, se efectuaron las diluciones correspondientes con etanol para lograr soluciones de 10, 100 y 1000 mg L⁻¹. El extracto acuoso se disolvió en agua, se trabajó de igual forma y se prepararon soluciones de 5, 50 y 500 mg L⁻¹.

Preparación del estándar de DPPH. La solución del estándar se preparó a una concentración de 100 mM de DPPH en etanol (EtOH).

Reacción de neutralización del radical. La mezcla de reacción se llevó a cabo por triplicado en placas de ELISA de 96 pozos por adición 50 µL de cada una de las disoluciones por cada muestra disueltas en DMSO y 150 µL de la solución del radical DPPH. Como blanco se utilizó solución de DPPH sin extractos para determinar la actividad antioxidante. Las mezclas de reacción se mantuvieron en agitación a temperatura ambiente y se incubaron a 37 °C por 30 min. La absorbancia se midió de inmediato a 515 nm, en un lector de microplacas (Elx 808, Ultra Microplate Reader) (Cottele *et al.* 1996; Tamil *et al.*, 2003).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis fotoquímico

Rendimiento de extractos. Se obtuvieron 5.3 g (0.30 %) del extracto de Hex, 37.5 g (2.13 %) del extracto de AcOEt, 3.9 g (0.22 %) del precipitado de PAcOEt, 184.5 g (10.5 %) del extracto de MeOH y 0.67 g (6.7 %) del extracto acuoso liofilizado.

Análisis de CL-EM. La información obtenida del análisis de cromatografía de líquidos con acoplamiento a la espectrometría de masas se presenta en el Cuadro 1. Los espectros de masas de los flavonoides detectados en las fracciones analizadas por CL-EM señalan un patrón de fragmentación característico para flavonas, flavonoles y flavanonas (Dey y Harborne, 1989).

De acuerdo con la biblioteca de espectros del equipo usado, en la fracción I del extracto de AcOEt se detectó la presencia de varios flavonoides: el flavonol kaempferol, dos flavonas metoxiladas (isokaempferido y pilosina). Estos tres compuestos no se han descrito para el género *Lippia*. En esta fracción también se encontró la flavona cirsimaritina, documentada anteriormente en *Lippia citriodora* HBK por Skaltza y Shamma (1988) y la flavanona naringenina ya identificada por Domínguez *et al.* (1989) en *L. graveolens*. Un derivado de catequina se localizó también en este mismo extracto (Figura 1). En la fracción II del extracto de MeOH, se encontró un hexósido de quercetina en concentración superior a 90 % (Cuadro 1).

Los datos obtenidos en el análisis cromatográfico con respecto a su absorción de luz UV se compararon con la información citada por otros autores en estudios semejantes. A pesar de las diferencias evidentes por las características de las muestras, los datos derivados de la absorción en el UV de naringenina, kaempferol y cirsimaritina son coincidentes con los reportados en la literatura disponible, así como el correspondiente al ion molecular del espectro de masas (Harborne, 1984; Dey y Harborne, 1989; Mansoury *et al.*, 2005).

Actividad antioxidante

La actividad antioxidante depende de la estructura química del flavonoide, de la posición y número de sustituciones en el núcleo del flavonoide y en el anillo B (Pietta, 2000). La presencia de la doble ligadura entre C-2 y C-3, así como un -OH en C-3, y la orto-sustitución en el anillo B en C-3' y C-4', son indispensables para incrementar la potencia de la actividad antioxidante de flavonoides (Lien

et al. 1999; Harborne y Williams, 2000). Algunas de las estructuras de los compuestos identificados en el extracto de AcOEt, contienen grupos -OH libres en C-3, C-5, C-7 y C-4' o mono o di-metoxilados (-OCH₃) en C-6, C-7 o C-4'. La sustitución del -OH libre por un -OMe en C-4', disminuye la capacidad de depuración de radicales libres.

Estos resultados sugieren que en este extracto de acetato de etilo hay un mayor número de estructuras con grupos -OH libres en posiciones estratégicas, que le confieren una actividad antioxidante más alta que la que pudiera encontrarse en el extracto de MeOH, el cual por su consistencia contiene gran cantidad de azúcares que probablemente reducen su actividad. Sin embargo, el derivado de quercetina detectado en la fracción II contiene -OH libres en C-3, C-5, C-7, C-3' y C-4', los cuales le confieren una actividad antioxidante importante, tal vez semejante a la de la quercetina (Harborne y Williams, 2000).

Los datos estadísticos obtenidos fueron significativos, con excepción del obtenido en el extracto de Hex en el cual prácticamente no hubo actividad antioxidante (Cuadro 2). En el resto de las muestras examinadas, la proporción de reducción del radical DPPH fue alta a la concentración de 100 mg L⁻¹. El extracto acuoso liofilizado también presentó buen margen de neutralización del radical a la concentración de 50 mg L⁻¹. Los valores obtenidos en la curva de IC₅₀ demuestran un poder antioxidante notable para los extractos de prueba, entre los que destacan los obtenidos del precipitado proveniente del extracto de AcOEt. El extracto acuoso (W) mostró actividad antioxidante moderada, de acuerdo con el valor obtenido de IC₅₀. En trabajos similares para otras especies de *Lippia* (*L. citriodora*), se ha documentado el alto poder antioxidante para una infusión acuosa liofilizada y los autores han señalado como principales responsables de esta actividad a otros componentes presentes, entre ellos al verbascósido y a algunos derivados de luteolina (Valentão *et al.*, 2002).

CONCLUSIONES

Los flavonoides identificados en los extractos estudiados son contribuciones importantes en la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas. El extracto de acetato de etilo presentó la actividad antioxidante más alta, lo cual es ventajoso para el aislamiento de nuevos compuestos con actividad biológica. El tallo de *L. graveolens* var. *berlandieri* demuestra ser una fuente potencial de flavonoides que podría contribuir al desarrollo de nuevos compuestos con aplicaciones en agronomía y medicina.

Cuadro 1. Características de los compuestos detectados en el análisis cromatográfico.

Flavonoide	Fracción	T. R. (EM/UV) (min)	Fórmula condensada	Ion molecular (M ⁺) en m/z	Absorción $\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
Naringenina	I	12.56/12.53	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	M ⁺ = 273.15	240, 288
Kaempferol	I	13.73/13.73	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	M ⁺ = 287.25	240, 264, 368
Isokaempferido	I	14.01/14.45	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	M ⁺ = 301.19	240, 268, 356
Pilosina	I	14.54/14.87	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	M ⁺ = 331.15	240, 272, 324
Cirsimaritina	I	14.90/14.83	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	M ⁺ = 315.18	240, 276, 332
Derivado de catequina	I	15.83/15.84	nd	M ⁺ = 306.99	224, 240, 320
Hexósido de quercetina	II	8.35/8.43	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	M ⁺ = 464.99	236, 256, 368

I = Fracción 49 del extracto de AcOEt; II = Fracción 41 del extracto de MeOH; T. R. (EM/UV) = Tiempo de retención (Espectro de masas/Absorción en el ultravioleta); nd = No determinado; EE = Error estándar

Cuadro 2. Actividad antioxidante de los extractos de tallo de orégano por reducción del radical DPPH.

Extracto	Concentración (mg L ⁻¹)	Reducción del radical DPPH (%)	IC ₅₀ ± EE (mg L ⁻¹)
W	5	18.1	
	50	87.6	31.83 ± 3.94
	500	100	
MeOH	10	13.4	
	100	91.5	16.40 ± 1.31
	1000	81.5	
AcOEt	10	37.1	
	100	94.0	12.94 ± 1.10
	1000	94.2	
PAcOet	10	38.9	
	100	94.8	11.24 ± 0.63
	1000	95.0	
Hex	10	0	
	100	3.4	nd
	1000	27.1	

W = Extracto acuoso liofilizado; MeOH = Extracto de metanol; AcOEt = Extracto de acetato de etilo; PAcOet = Precipitado obtenido del extracto de AcOEt; Hex = Extracto de hexano; nd = No determinado; EE = Error estándar.

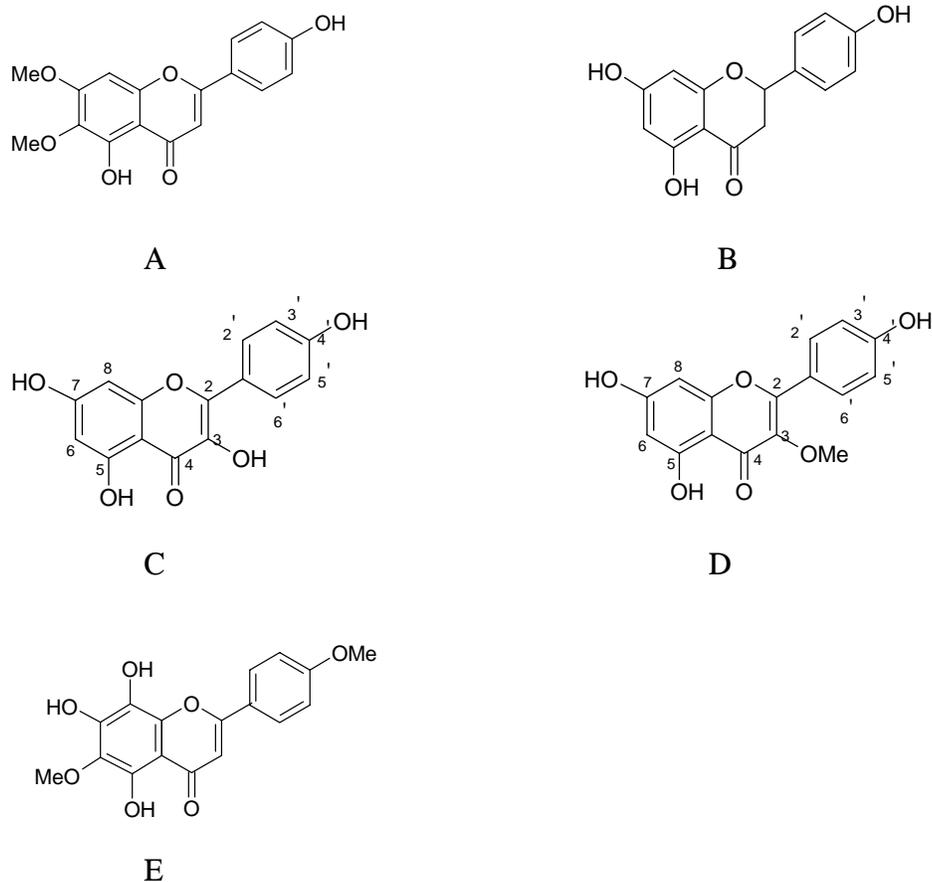


Figura 1. Estructura química de compuestos detectados en el extracto de acetato de etilo del tallo de *Lippia graveolens* var. *berlandieri*. Cirsimaritina (A), Naringenina (B), Kaempferol (C), Isokaempferido (D) y Pilosina (E).

AGRADECIMIENTOS

Al M. C. Antonio Nieto Camacho del Laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, por el apoyo en la evaluación de la actividad antioxidante.

BIBLIOGRAFÍA

- Abena A A, M Diatwa, G Gakosso, M Gbeasson, Th Hondi-Assah, J M Ouamba (2003) Analgesic, antipyretic and anti-inflammatory effects of essential oil of *Lippia multiflora*. *Fitoterapia* 74:231-236.
- Bassole H N, A S Ouattara, R Nebie, C A T Ouattara, Z I Kabore, S A Traore (2003) Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. *Phytochemistry* 62:209-212.
- Bilia A R, F Flammini, G Flammini, I Morelli, A Marsili (1993) Flavonoids and saponin from *Spartium junceum*. *Phytochemistry* 34:847-852.
- Costa S M, T L G Lemos, O D L Pessoa, C Pessoa, R C Montenegro, R Braz-Filho (2001) Chemical constituents from *Lippia sidoides* and cytotoxic activity. *J. Nat. Prod.* 64:792-795.
- Craker L, J E Simon (1992) Herbs, Spices and Medicinal Plants. Recent Advances in Botany, Horticulture and Pharmacology, Vol.3. Food Products Press, New York. pp:103-144.
- Cottele N, J L Bernier, J P Catteau, P Pommery, J C Wallet, E M Gaydou (1996) Antioxidants properties of hydroxyl-flavones. *Free Radical Biol. Med.* 20:35-43.
- Dey P M, J B Harborne (1989) Methods in Plant Biochemistry. Vol. I: Plant Phenolics. Academic Press. 540 p.
- Domínguez X A, V Sánchez, M Suárez, J H Baldas, M R González (1989) Chemical constituents of *Lippia graveolens*. *Planta Medica* 55:208-209.
- González E S (1983) La vegetación de Durango. Cuadernos de Investigación Tecnológica. CIIDIR-IPN, Unidad Durango. Durango, México. 114 p.
- Guerrero M F, P Puebla, R Carrón, M L Martín, L Arteaga, L San Román (2002) Assessment of the antihypertensive and vasodilator effects of ethanolic extracts of some Colombian medicinal plants. *J. Ethnopharm.* 80:37-42.
- Harborne J B (1984) *Phytochemical Methods. A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis.* 2nd ed. Chapman and Hall. London. 288 p.
- Harborne J B, C A Williams (2000) Advances in flavonoids research since 1992. *Phytochemistry* 55:481-504.

- De las Heras B, K Slowing, G Benedí, E Carretero, T Ortega, C Toledo, P Bermejo, I Iglesias, M J Abad, P Gómez-Serranillos, P A Liso, A Villar, X Chiriboga (1998) Antinflammatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador. *J. Ethnopharm.* 61:161-166.
- Hernández N E, M L Tereschuk, L R Abdala (2000) Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafi del Valle (Tucumán, Argentina). *J. Ethnopharm.* 73:317-322.
- Huerta C (1997) Orégano mexicano: Oro vegetal. *Biodiversitas. Bol. CONABIO* 3:8-13.
- Lien E J, R Shijun, B Huynh-Hoa, R Wang (1999) Quantitative structure-activity relations analysis of phenolic antioxidants. *Free Radical Biol. Med.* 26:285-294.
- Mabry T J, K R Markham, M B Thomas (1970) The systematic identification of flavonoids. Springer Verlag. New York. 354 p.
- Manzouri A, G Embarek, E Kokkalou, P Kefalas (2005) Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chem.* 89:411-420.
- Pascual M E, K Slowing, E Carretero, D Sánchez, A Villar (2001) *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: A review. *J. Ethnopharm.* 76:201-214.
- Pérez G R M (2002) Compuestos Aislados de Plantas con Actividad Antiinflamatoria, Antiviral e Hipoglucemiante. Instituto Politécnico Nacional, México. 192 p.
- Pietta P G (2000) Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod.* 63:1035-1042.
- Salgueiro L R, C Cavaleiro, M J Gonçalves, A P da Cunha (2003) Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Lippia graveolens* from Guatemala. *Planta Medica* 69:80-83.
- Skaltsa H, G Shammis (1988) Flavonoids from *Lippia citriodora*. *Planta Medica* 54:465.
- Tamil S A, G S Joseph, G K Jayaprakasha (2003) Inhibition of growth and aflatoxins production in *Aspergillus flavus* by *Garcinia indica* extract and its antioxidant activity. *Food Microbiol.* 20:455-460.
- Tomas-Barberan F A, J B Harborne, R Self (1987) Twelve 6-oxygenated flavone sulphates from *Lippia nodiflora* and *Lippia canescens*. *Phytochemistry* 26:2281-2284.
- Valentao P, E Fernández, F Carvalho, P Branquinho Andrade, R M Seabra, M L Bastos (2002) Studies on the antioxidant activity of *Lippia citriodora* infusión: scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *Biol. Pharm. Bull.* 25:1324-1327.
- Wagner H, S Bladt (1996) Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas. 2nd ed. Springer Verlag. Berlin. 384 p.
- Zétola M, T C M De Lima, D Sonaglio, G González-Ortega, R P Limberger, P R Petrovick, V L Bassani (2002) CNS activities of liquid and spray-dried extracts from *Lippia alba* - Verbenaceae (Brazilian false melisse). *J. Ethnopharm.* 82:207-215.