



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA
ÁREA TEMÁTICA: BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA**

TESIS

**EFECTO DEL SECADO Y TIEMPO DE ALMACÉN DE HOJAS SOBRE LA
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, ANTIINFLAMATORIA Y EL CONTENIDO
DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y TERPÉNICOS EN INFUSIONES DE
*Hedeoma piperita***

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

QUE PRESENTA:

BIOL. JESSICA OSIRIS RAYA RAMIREZ

Director de Tesis

D.C. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA

Morelia, Michoacán; Junio 2020

“Nunca consideres el estudio como una obligación sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del Saber.”

Albert Einstein.

“Un pedacito de cielo”

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular al Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas, Área Temática de Biotecnología Alimentaria (Facultad de Químico Farmacobiología) por permitirme el ingreso a este posgrado, para seguir adelante con mis estudios.

Al CONACYT, por la beca otorgada durante la realización de mis estudios de la maestría.

Principalmente a mi director de tesis, al Dr. Rafael Salgado Garciglia por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico, por su apoyo y enseñanzas durante estos dos años, sin quien, esta investigación no hubiera sido posible.

También agradezco a los profesores miembros del comité de sinodales, a los Dres. Patricia Ríos Chávez, Ma. Guadalupe Garnica Romo, Salvador Manzo Avalos y Héctor Eduardo Martínez Flores, por sus aportaciones y conocimientos, se alcanzó la calidad de esta tesis.

Un agradecimiento especial a mis padres Xochitl Ramirez y Rogelio Raya por todo el esfuerzo para que no me faltara nada, todos mis logros se los debo a ustedes son mi ejemplo de constancia y dedicación. Papá siempre seras mi héroe y mi estrella en el cielo, mamá siempre seras mi confidente y mi fortaleza, los amaré todos los días de mi vida. A la mejor enfermera Sarahi que además de ser mi hermana es mi mejor amiga y al mejor chef Eddy les agradezco todos los momentos juntos, su apoyo y su cariño los quiero mucho hermanos.

Al mejor M.C en ingeniería eléctrica Alejandro Zavala por todos los momentos vividos, por tu amor y motivación durante tanto tiempo, gracias por ser mi fortaleza eres mi ejemplo a seguir y siempre estaras en mi corazón.

A mis hermanas de corazón Fabiola, Sisara y Pamela por estar siempre en los buenos y malos momentos y por los tantos años de amistad, las adoro. A mis biólogas favoritas Vanessa, Tzitziqui, Aurora y Chochis por todas las experiencias vividas. A Cora, Manju, Vera, Alina y Josue que a pesar de la distancia perdura nuestra amistad.

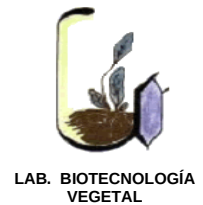
A todos mis compañeros del laboratorio de Biotecnología Vegetal; Rafa Ayala, Semy, Yolanda, Yoshi, Ana, Sol y Sara pero en especial al Dr. Rafael Torres Martínez, por todos los consejos y el apoyo durante el trabajo experimental.

A mis compañeros y amigos del posgrado Ricardo, Osvaldo, Gerardo, Diana y Marina pero en especial a Baruc y Alfonso por su amistad durante el posgrado.

A la M.C. Alejandra Hernández García, responsable técnica del laboratorio de Biotecnología Vegetal, por sus comentarios y observaciones.

A la Bióloga Yolanda García Rodríguez por su apoyo en el análisis de cromatografía de gases y espectrometría de masas.

LA PRESENTE INVESTIGACIÓN FUE REALIZADA EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, BAJO LA DIRECCIÓN Y ASESORÍA DEL DR. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA. ES PARTE DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN APOYADO POR LA COORDINACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA (CIC 2.10 RSG 2018-2020).



ÍNDICE GENERAL

	Página
ABREVIATURAS	i
ÍNDICE DE CUADROS	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. ESTRÉS OXIDANTE E INFLAMACIÓN	4
2.2. ANTIOXIDANTES Y ANTIINFLAMATORIOS	7
2.2.1. Antioxidantes y antiinflamatorios de origen vegetal	8
2.3. COMPUESTOS FENÓLICOS Y TERPÉNICOS	9
2.4. EFECTO DEL SECADO Y ALMACÉN SOBRE EL CONTENIDO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS	13
2.4.1. Infusiones y sus propiedades funcionales	14
2.5. PLANTAS MEDICINALES DE LA FAMILIA LAMIACEAE	15
2.5.1. <i>Hedeoma</i> Epling y Stewart (1939)	16
2.5.2. <i>Hedeoma piperita</i> Benth. (1835)	17
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. HIPÓTESIS	20
5. OBJETIVOS	21
5.1. OBJETIVO GENERAL	21
5.1.1. Objetivos específicos	21
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	22
7. RESULTADOS	23
8. DISCUSIÓN GENERAL	65
9. CONCLUSIÓN GENERAL	72
10. LITERATURA GENERAL CITADA	73
11. ANEXOS	80
11.1 Curva de calibración para la determinación de la IC ₅₀ de la infusión de hojas frescas de <i>Hedeoma piperita</i> por el método DPPH	80
11.2 Curva de calibración para la determinación de la IC ₅₀ de la infusión de hojas frescas de <i>Hedeoma piperita</i> por el método ABTS.	80

11.3 Curva de calibración para la cuantificación de ácidos fenólicos totales, realizada con ácido gálico ($\mu\text{moles/g}$ peso fresco) ($\lambda=725\text{ nm}$) (a) y para la cuantificación de flavonoides totales, realizada con quercetina ($\mu\text{moles/g}$ peso fresco) ($\lambda=415\text{ nm}$) (b).	81
11.4 Curva de calibración para la cuantificación de terpenoides totales, realizada con pulegona en diferentes concentraciones (1, 10, 50 y 100 mg/mL) ($\lambda=558\text{ nm}$).	82

ABREVIATURAS

AG	Ácido gálico
AP-1:	Proteína activadora 1
CAT:	Enzima catalasa
COX:	Ciclooxigenasas
ERO:	Especies reactivas del oxígeno
ERN:	Especies reactivas del nitrógeno
GPX:	Enzima glutatión peroxidasa
GSH:	Glutatión
H ₂ O ₂ :	Peróxido de Hidrógeno
IκB:	Cinasa inhibidora kappa B
IKK:	Cinasa IKB
IL:	Interleucinas
IL- 1β:	Interleucina 1 beta
IL-6:	Interleucina 6
IL-8:	Interleucina 8
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
MAPKs:	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
NF-κB:	Factor nuclear-kappa B
NRF2	Factor 2 de transcripción
NO:	Óxido nítrico
O ₂ ^{•-} :	Anión superóxido
OH [•] :	Radical hidroxilo
PGE2:	Prostaglandina E2
ROO [•] :	Radical lípido peróxido
SIRT1:	Proteína sirtuína 1
SOD:	Enzima superóxido dismutasa
TNF-α:	Factor de necrosis tumoral-α
TRAF1:	Factor 1 Asociado a Receptor de TNF
TRAF2:	Factor 2 Asociado a Receptor de TNF

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Actividad antiinflamatoria de frutos y vegetales en modelos experimentales <i>in vivo</i> .	9
Cuadro 2. Compuestos fitoquímicos de naturaleza fenólica y terpénica con efectos beneficiosos sobre la respuesta inflamatoria.	10
Cuadro 3. Ejemplo de plantas o frutos con actividad antioxidante y antiinflamatoria en modelos experimentales <i>in vivo</i> .	12
Cuadro 4. Tratamientos para la determinación del efecto antiinflamatorio con tratamiento tópico de las infusiones de hojas frescas y secas (almacenadas por 30 días) de <i>H. piperita</i> (n=5).	45
Cuadro 5. Tratamientos para la determinación del efecto antiinflamatorio con tratamiento oral de las infusiones de hojas frescas y secas (almacenadas por 30 días) de <i>H. piperita</i> (n=5).	46
Cuadro 6. Compuestos terpénicos mayoritarios de las infusiones de hojas frescas de <i>Hedeoma piperita</i> , analizados por CG-EM.	58
Cuadro 7. Compuestos terpénicos mayoritarios de las infusiones de hojas secas (30 días de almacenamiento) de <i>Hedeoma piperita</i> , analizados por CG-EM.	58
Cuadro 8. Compuestos fenólicos de la solución de mezcla de estándares, analizados por HPLC (10 µg/mL).	59
Cuadro 9. Contenido de compuestos fenólicos identificados y cuantificados por HPLC en las infusiones de hojas frescas y secas (30 días de almacenamiento) de <i>Hedeoma piperita</i> .	61

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Mecanismos de señalización de la activación del factor nuclear kappa-B (NF-κB) mediada por ERO. Los estímulos inflamatorios (citocinas proinflamatorias, estrés oxidativo, entre otros) y ERO producidas en la mitocondria, la NADPH oxidasa y el retículo endoplásmico desencadenan las vías de la cinasa que resultan en la activación de NF-κB, que después es traslocado al núcleo e induce la transcripción del gen diana, como TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-8.	6
Figura 2. Distribución de la familia Lamiaceae en la República Mexicana.	16
Figura 3. A) Representación gráfica de una especie del género <i>Hedeoma</i> (Fuente: Naturalista); B) Ejemplar de una planta de <i>H. piperita</i> ; C) Flores representativas de <i>H. piperita</i> .	17
Figura 4. Actividad antioxidante de infusiones de hojas de <i>Hedeoma piperita</i> determinada en hojas frescas y secas (30, 60 y 90 días de almacenamiento) y del antioxidante sintético butil hidroxitolueno (BHT): A) Método DPPH; B) Método ABTS. Las letras diferentes indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$, $n=3$, prueba de Tukey).	31
Figura 5. Contenido de ácidos fenólicos totales (A), flavonoides totales (B) y terpenoides totales (C) de infusiones de hojas de <i>Hedeoma piperita</i> , frescas y secas (30, 60 y 90 días de almacenamiento) expresado en μmoles de Ácido Gálico/mg peso fresco ($\lambda=725$ nm), μmoles de Quercetina/mg peso fresco ($\lambda=415$ nm) y mg Eq. Pulegona/g peso ($\lambda=538$ nm), respectivamente. Las letras diferentes indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$, $n=3$, prueba de Tukey).	34
Figura 6. Tamaño del edema (mm) en la pata de la rata inducida con carragenina (1, 2 y 3%) con administración subcutánea de 25 y 50 μL, a partir de 1 h después de la inducción. Los valores son presentados como promedio $\pm$ la desviación estándar ($n=3$).	49
Figura 7. Porcentajes de la actividad antiinflamatoria de infusiones de hojas frescas y secas (almacenada por 30 días) de <i>H. piperita</i> obtenidos con el modelo de edema en pata de ratas macho Wistar inducido por carragenina (50 μL, 1%), con la administración tópica de 50 μL de tres dosis: A) 0.1 mg/kg; B) 1 mg/kg; C) 10 mg/kg. Letras distintas indican diferencia significativa (Tukey, $p \leq 0.05$, $n=5$).	52

	Página
Figura 8. Porcentajes de la actividad antiinflamatoria de infusiones de hojas frescas y secas (almacenada por 30 días) de <i>H. piperita</i> obtenidos con el modelo de edema en la pata de ratas macho Wistar inducido por 50 μ L carragenina (1%), con la administración oral de 50 μ L a dosis de 10 mg/kg. Letras distintas indican diferencia significativa (Tukey, $p \leq 0.05$, $n=5$).	54
Figura 9. Cromatogramas del análisis de la identificación y contenido de compuestos terpénicos por CG-EM de infusiones de hojas frescas (A) y hojas secas (30 días de almacenamiento) (B) de <i>Hedeoma piperita</i> .	57
Figura 10. Cromatograma de la solución mezcla estándar de compuestos fenólicos analizado por HPLC. Picos: 1, ácido gálico; 2, catequina; 3, ácido vainílico; 4, ácido cafeico; 5, epicatequina; 6, ácido p-cumárico; 7, rutina; 8, ácido elágico; 9, quercetina.	60

RESUMEN

La planta *Hedeoma piperita* Benth. (Lamiaceae), cuyo nombre común es “quiensabe” “tabaquillo” o “Hierba de Santo Domingo”, es considerada una planta medicinal, ya que sus hojas y tallos son utilizados tanto en fresco como en seco para preparar infusiones para combatir trastornos digestivos e inflamación estomacal. Es una planta poco estudiada por lo que en el presente trabajo se determinó el efecto del secado y tiempo de almacén (30, 60 y 90 días) de las hojas de *H. piperita* sobre el contenido de compuestos fenólicos y terpénicos en infusiones, y su relación con la actividad antioxidante y antiinflamatoria. Por técnicas espectrofotométricas se determinó el contenido total de ácidos fenólicos, flavonoides y terpenoides; la identificación y cuantificación de los compuestos mayoritarios de tipo terpénico y fenólico se realizó por CG-EM y HPLC. La capacidad antioxidante fue determinada por los métodos DPPH y ABTS, obteniendo los mayores porcentajes en las infusiones de hojas frescas con valores de 90% y 93%, respectivamente. En las infusiones de hojas secas con 30 días de almacenamiento, se obtuvo un 82% de actividad antioxidante, solamente por el método ABTS. El contenido de ácidos fenólicos y flavonoides tuvo una relación directa con la alta actividad antioxidante, ya que las infusiones de hojas frescas mostraron la mayor cantidad con 0.25 μ moles EAG/mg p.f. y 7.69 μ moles EQ/mg p.f. Con el método de terpenoides totales, las infusiones de hojas secas (30 días) mostraron el más alto valor de terpenoides totales (18.75 mg Eq. pulegona/g peso). Para determinar el efecto antiinflamatorio se utilizaron infusiones de hojas frescas y secas almacenadas por 30 días de *H. piperita*, ya que éstas mostraron una alta actividad antioxidante y un mayor contenido de compuestos bioactivos. El efecto antiinflamatorio fue determinado por el método adaptado de edema de pata inducido por carragenina en ratas macho Wistar, tanto con la administración tópica y oral de las infusiones de hojas de *H. piperita*. La administración tópica se realizó con las dosis de 0.1, 1 y 10 mg/kg de ambas infusiones y la administración oral solamente la dosis de mayor efecto antiinflamatorio tópico (10 mg/kg) con la sumministrazione de ambas infusiones por 28 días. El efecto se determinó por la medición del tamaño del diámetro (base plantar al empeine) de la pata mediante un micrómetro manual. Las infusiones de hojas secas (30 días de almacén) de *H. piperita* con la administración tópica, mostraron una mayor actividad antiinflamatoria que las infusiones de hojas frescas, con una dosis de 10 mg/kg, mostrando un porcentaje de actividad antiinflamatoria de 77%, un efecto similar al que produce el ibuprofeno a las 24 h (78.8%) en una dosis de 25 mg/kg. Con la administración oral, la actividad antiinflamatoria fue similar para ambas infusiones en la dosis de 10 mg/kg, con 76% y 83%, respectivamente. En estas infusiones se identificaron los monoterpenos mentol, mentona y pulegona, como los mayoritarios, y el ácido gálico y la catequina como los compuestos fenólicos mayoritarios. La actividad antioxidante y antiinflamatoria de las infusiones de hojas de *H. piperita* se relacionó directamente con el contenido tanto de compuestos fenólicos como terpénicos, de los cuales se identificaron los posibles responsables de tal actividad.

Palabra clave: Antioxidante, antiinflamatoria, fenólicos, *Hedeoma piperita*, terpenos.

ABSTRACT

Hedeoma piperita Benth. (Lamiaceae), whose common name is "quiensabe", "tabaquillo" or "Santo Domingo herb", is considered as a medicinal plant, since fresh and dry leaves and stems are used into infusions to treat digestive and stomach disorders and inflammation. It is a small plant with a few studies. In the present study, the effect of drying and storage time (30, 60 and 90 days) of *H. piperita* leaves were determined on the content of phenolic and terpenes compounds and their relationship with antioxidant and anti-inflammatory activity. Spectrophotometric techniques were used to determine the total content of phenolic acids, flavonoids and terpenoids; the identification and quantification of the terpene and phenolic majority compounds was performed using GS-MS and HPLC. Antioxidant capacity was determined by the DPPH and ABTS methods. The highest antioxidant capacity was found in fresh leaf infusion with values of 90% and 93%, respectively. In infusions of dried leaves with 30 days of storage, 82% antioxidant activity was obtained, only by the ABTS method. The content of phenolic acids and flavonoids had a direct relationship with the high antioxidant activity, infusions of fresh leaves showed the highest amount with 0.25 μ moles EAG/mg p.f. and 7.69 μ moles EQ/mg p.f. Moreover, infusions of dried leaves (30 days) showed the highest total terpenoid value (18.75 mg Eq. pulegone/g weight). Infusions of fresh and dried leaves (stored for 30 days) of *H. piperite* were used to determine the anti-inflammatory effect, as these showed high antioxidant activity and a higher content of bioactive compounds. The anti-inflammatory effect was determined by the adapted method of carrageenan-induced paw edema in male Wistar rats., both with topical and oral administration of *H. piperite* leaf infusions. Topical administration was performed at doses of 0.1, 1 and 10 mg/kg of both infusions and oral administration only the dose with the highest topical anti-inflammatory effect (10 mg/kg) with the supply of both infusions for 28 days. The effect was determined by measuring the size of the diameter (plantar base to the instep) of the paw by a manual micrometer. Infusions of dried leaves (30 days of storage) of *H. piperite* with topical administration, showed greater anti-inflammatory activity than infusions of fresh leaves, with a dose of 10 mg/kg, showing a percentage of anti-inflammatory activity of 77%, an effect similar to that produced by ibuprofen at 24 h (78.8%) at a dose of 25 mg/kg. With oral administration, anti-inflammatory activity was similar for both infusions at the 10 mg/kg dose, with 76% and 83%, respectively. The major monoterpenes menthol, menthona and pulegone were identified in leaf infusions of *H. piperita*, and gallic acid and catechin as the major phenolic compounds. The antioxidant and anti-inflammatory activities of infusions of *H. piperita* leaves were directly related to the content of both phenolic and terpenes compounds, of which were identified as possible responsible for such activity.

Keywords: Antioxidant, anti-inflammatory, phenolic, *Hedeoma piperite*, terpenes.

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

México tiene una gran herencia cultural en el uso de plantas aromáticas y medicinales para tratar diferentes padecimientos; su utilización se remonta a tiempos prehispánicos por lo que ha formado parte de nuestra historia y costumbres (Masarovičová y Kráľová, 2006). Su aprovechamiento sin duda comenzó con la continua experimentación de diferentes plantas, que de acuerdo a sus características únicas ofrecían agradables aromas, sabores en los alimentos, alivio de dolor y cura de ciertas enfermedades (Craker, 2007).

El interés por estas plantas obedece a sus características aromáticas, terapéuticas, pero también a su uso como fuente de productos nutraceuticos, entre otras aplicaciones (Sangwan *et al.*, 2001; Lahlou, 2004). Cabe destacar que las plantas aromáticas medicinales son consideradas como un grupo de las más importantes ya que es bien sabido su uso como infusión en los últimos años entre la población mexicana (Rivera *et al.*, 2008). Para su uso, se utilizan diferentes partes de las plantas como hojas, tallos, flores, frutos, corteza y raíces, tanto en fresco como secas, así como sus extractos y sus principios activos (Cases, 2007). La preferencia en el consumo de estas hierbas se atribuye a su sabor agradable, que adicionalmente proveen efectos benéficos a la salud, entre los que se encuentran la actividad antimicrobiana, capacidad antioxidante y actividad antiinflamatoria, entre otros, los cuales se han relacionado a su contenido de compuestos fenólicos (McKay y Blumberg, 2006; Wiart, 2007) y terpénicos (Miguel 2010; Torres-Martínez y Salgado-Garciglia, 2014).

Se han identificado cerca de 5,000 especies de plantas que tienen aplicaciones curativas, las que son utilizadas comúnmente por más de 60 grupos étnicos en nuestro país. Aunque muchos de los usos están restringidos por las autoridades de salud, en regiones marginales forman parte de la tradición y cultura popular. La Organización Mundial de la Salud (OMS), reporta que el 80% de la población mundial, más de cuatro

mil millones de personas, utiliza las plantas como principal remedio medicinal (WHO, 2002; González-Stuart y Rivera, 2009).

Uno de los grupos de plantas aromáticas y medicinales de los más representativos en México es la familia Lamiaceae, con 236 géneros y más de 7,000 especies conocidas, a la que pertenecen la menta, el tomillo, la hierbabuena, la albahaca, el romero, la salvia, la mejorana, el orégano y la lavanda, algunas de las cuales son ampliamente cultivadas (Harley *et al.*, 2012). Los principales metabolitos secundarios de este tipo de plantas son los compuestos volátiles (terpenoides) y los de naturaleza fenólica, que componen sus aceites esenciales, con diferentes actividades biológicas como sedante, diurética, tónica, antiespasmódica y antiséptica, resaltando propiedades nutraceuticas como la actividad antioxidante y la antiinflamatoria (García-Pérez *et al.*, 2012; Raja, 2012).

La composición y el contenido de los principios activos de las plantas se encuentran definidos por diversos factores como las variaciones de clima, suelo, época de cosecha, características genéticas de la planta, condiciones de secado y tiempo de almacenamiento. La temperatura y el tiempo también son factores que determinan la extracción de los compuestos responsables de la actividad biológica (Montanari *et al.*, 2011). Otro aspecto que puede dar lugar a pequeños cambios en la composición de los principios activos es la humedad, ya que el contenido de ésta en el material vegetal, afecta al momento de la extracción tanto el rendimiento como la variabilidad en la composición química de éstos (Barboza *et al.*, 2006). En plantas como el poleo (*Lippia alba*), el secado tiene un efecto sobre el aumento de la concentración de los componentes principales a diferencia de la materia fresca (Ospina *et al.*, 2016).

Sin embargo, en nuestro país existe una gran cantidad de plantas medicinales silvestres nativas que pertenecen a esta familia, que son utilizadas en la medicina tradicional de pueblos o comunidades locales o regionales, que han sido poco estudiadas y no se han implementado programas para su domesticación y cultivo, y se

desconocen los factores determinantes en el contenido de sus compuestos activos en materia fresca y seca después del corte (Torres-Martínez *et al.*, 2014).

Es por ello, que es necesario realizar investigaciones para determinar la relación de algunos de estos factores como el secado y almacenamiento de la materia vegetal de las diferentes plantas medicinales y aromáticas que se utilizan en México, con las propiedades medicinales como la actividad antioxidante y la antiinflamatoria.

La especie *Hedeoma piperita* Benth (1835), cuyo nombre común es “quiensabe”, “tabaquillo” o “Hierba de Santo Domingo”, pertenece a la familia Lamiaceae, y es considerada como una planta con alto valor cultural y de comercialización en la meseta purépecha de Michoacán, por su uso como planta medicinal, ya que sus hojas y tallos son utilizados para preparar infusiones para combatir trastornos digestivos, inflamación estomacal, mala digestión, diarrea, pero principalmente para aliviar el dolor de estómago (Santos, 2014). Es una planta poco estudiada de la cual se desconocen sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, así como la relación de éstas con los compuestos activos y el efecto sobre estas propiedades y contenido de compuestos del secado de hojas y tiempo de almacenamiento.

El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto del secado y del tiempo de almacén de hojas sobre la actividad antioxidante y antiinflamatoria, así como en el contenido de compuestos fenólicos y terpénicos, en infusiones de *Hedeoma piperita* Benth.

2. ANTECEDENTES

2.1. ESTRÉS OXIDANTE E INFLAMACIÓN

Los organismos vivos se desarrollan en condiciones aeróbicas y están expuestos a diversos agentes oxidantes como las especies reactivas del oxígeno (ERO) y las especies reactivas del nitrógeno (ERN), ambos tipos tienen funciones biológicas esenciales para el desarrollo celular normal (Pitocco *et al.*, 2013). Las ERO son generados en varios sistemas celulares localizados en la membrana plasmática, el citosol, el retículo endoplásmico y la mitocondria, en donde se forma el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo ($OH^{\cdot}$) y el radical lípido peróxido ($ROO^{\cdot}$) (Ibarra, 2006).

Las diferentes ERO son la causa del estrés oxidante, un estado que ocurre a nivel celular, en el que las fuerzas oxidantes (moléculas o porciones de ellas, que presentan al menos un electrón desapareado en su orbital más externo y son extremadamente reactivos) superan los sistemas antioxidantes, causando la pérdida del equilibrio entre ellos, provocando un desbalance de óxido-reducción (Yoshikawa y Naito, 2002; Díaz-Flores *et al.*, 2004). Para contrarrestar el efecto nocivo de estas ERO, los organismos aerobios cuentan con mecanismos antioxidantes, que incluyen moléculas, enzimas y secuestradores químicos que previenen el daño oxidativo (Rahal *et al.*, 2014).

La inflamación es la respuesta del sistema inmunológico de ciertos organismos a estímulos nocivos, causado a sus células y tejidos vascularizados por patógenos bacterianos y por cualquier otro agresor de naturaleza química, física o biológica (Angosto y Barreno, 2007). De esta forma, las agresiones endógenas o exógenas provocan una cascada defensiva, donde la inmunidad innata, a través del proceso inflamatorio, destruye el agente patógeno y repara el tejido con la finalidad de restaurar el órgano afectado. Se trata de un proceso complejo que involucra la acción coordinada de múltiples células, caracterizado por alteraciones en la permeabilidad vascular y la producción de mediadores inflamatorios locales, como esteroides,

prostaglandinas, citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (Abbas *et al.*, 2005).

Durante la inflamación hay un aumento de la producción de ERO a nivel celular o tisular, ya sea a través de la NADPH oxidasa o la cadena de transporte de electrones en la mitocondria (Mittal *et al.*, 2014). Estas moléculas reactivas están directamente relacionadas con la progresión de los procesos inflamatorios, ya que inducen daño celular y/o conducen a la activación de factores de transcripción sensibles a reacciones redox. Los cambios temporales en el estado redox de la célula alteran vías de señalización, como la de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y la de la proteína sirtuina 1 (SIRT1). Estas vías regulan factores de transcripción nuclear como la proteína activadora 1 (AP-1), que induce respuestas mitogénicas y como el factor nuclear-kappa B (NF- κ B) que induce respuestas inflamatorias (Pitocco *et al.*, 2013; Ottum y Mistry, 2015).

El NF- κ B participa en la regulación de los genes proinflamatorios, lo que representa un paso clave en la producción de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y las interleucinas (IL) IL-1 β , IL-6 e IL-8. La actividad de NF- κ B está regulada por las proteínas cinasas inhibitoras kappa B (I κ B) (Gilmore, 2006). La estimulación inflamatoria induce la ruta de la I κ B cinasa (IKK) promoviendo la activación de la MAP cinasa y el factor 1 asociado al receptor de TNF (TRAF1) y 2 (TRAF2). El NF- κ B queda atrapado en el citoplasma en las células estimuladas y se transloca al núcleo después de la presencia de estímulos como el estrés oxidativo (Figura 1) (Kabe *et al.*, 2005; Minatel *et al.*, 2016).

Las ERO a bajas concentraciones tienen un papel importante como mediadores de procesos de señalización intracelular, pero cuando su concentración se incrementa suelen generar daños a nivel celular, que se relaciona con la aparición de enfermedades crónicas degenerativas como la hipertensión, el cáncer y la diabetes, entre otras. Sin embargo, estudios han demostrado que es posible generar un ambiente antiinflamatorio al aumentar el consumo de fotoquímicos. De las plantas

medicinales se utiliza extractos en diversas formas de preparación, como alternativa para el alivio de estos síntomas, debido a que contienen principios activos como ácidos fenólicos, polifenoles, flavonoides y vitaminas como el tocoferol, los cuales pueden reducir significativamente la producción de biomarcadores inflamatorios (Franco *et al.*, 2013; Medina-Remón *et al.*, 2017).

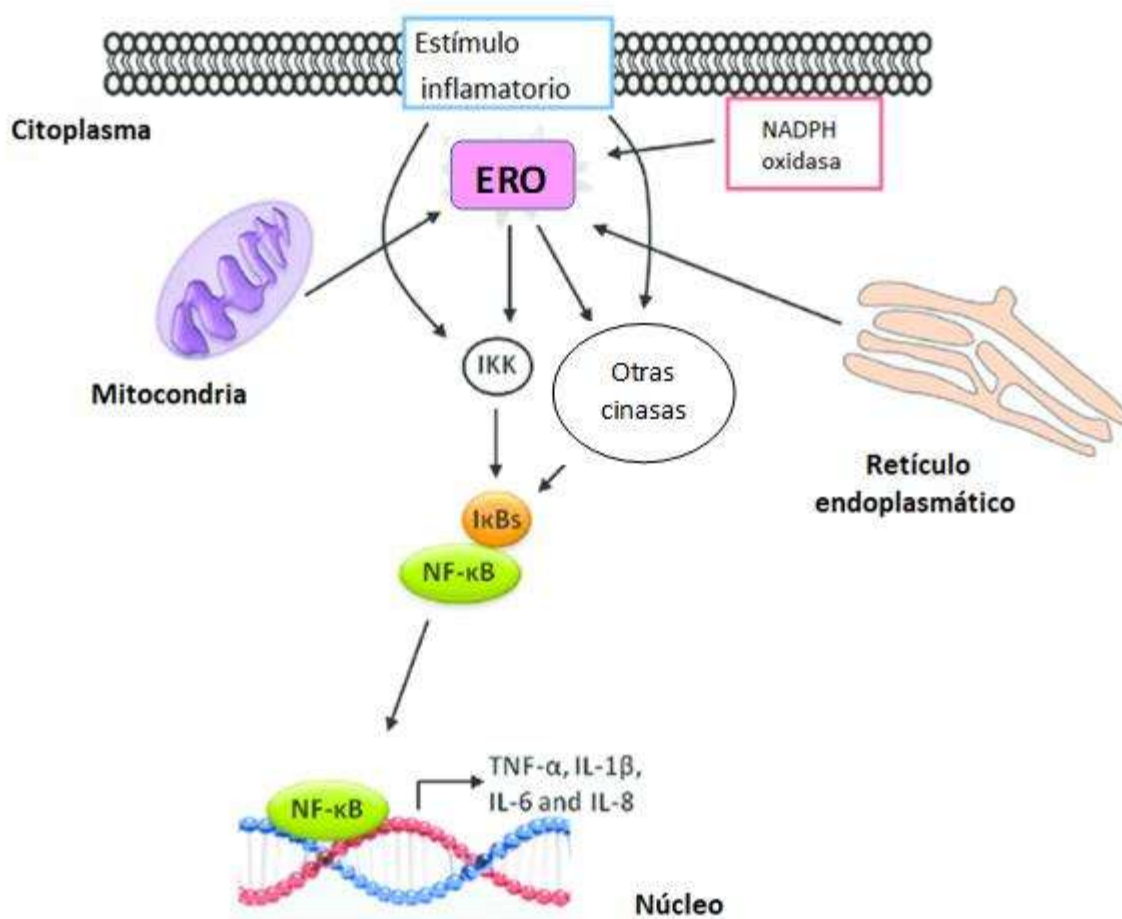


Figura 1. Mecanismos de señalización de la activación del factor nuclear kappa-B (NF-κB) mediada por ERO. Los estímulos inflamatorios (citocinas proinflamatorias, estrés oxidativo, entre otros) y ERO producidas en la mitocondria, la NADPH oxidasa y el retículo endoplásmico desencadenan las vías de la cinasa que resultan en la activación de NF-κB, que después es traslocado al núcleo e induce la transcripción del gen diana, como TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-8 (Minatel *et al.*, 2016).

2.2. ANTIOXIDANTES Y ANTIINFLAMATORIOS

Un antioxidante se define como aquel compuesto capaz de disminuir el daño celular, proteger a las biomoléculas de la oxidación y/o inhibir los procesos apoptóticos generados por las ERO (Ferrari, 2004). Los antioxidantes han sido clasificados de diferentes maneras, de las cuales las más utilizadas establecen las diferencias de acuerdo a la estructura química y función biológica, dividiéndolos en enzimáticos y no enzimáticos.

Los antioxidantes no enzimáticos incluyen los principales amortiguadores celulares redox [ascorbato, glutatión (GSH), ácido ascórbico y tocoferol] y metabolitos de origen fenólico (ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, entre otros), de origen terpénico como algunos monoterpenos y también de ciertos compuestos nitrogenados (alcaloides, derivados de la clorofila, aminoácidos y aminas) (Mittler, 2002; Güereca *et al.*, 2007; Miguel, 2010).

Los flavonoides detienen la oxidación de los lípidos y de otras moléculas por la donación de átomos de hidrógeno a los radicales, dejando radicales fenoxi intermediarios. Estos radicales son relativamente estables y no pueden iniciar reacciones de radicales en cadena (Li *et al.*, 2013).

Los mecanismos enzimáticos en las plantas incluyen enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX) y catalasa (CAT) (Apel y Hirt, 2004). La expresión de estas tres clases de enzimas antioxidantes se eleva de una forma dependiente del nivel de las ERO. Los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, pueden unirse a sitios específicos en la región promotora de los genes de SOD2, GPX y CAT en las células del músculo esquelético y estimular la producción de estas enzimas (Kozakowska *et al.*, 2015).

En las plantas, los antioxidantes cumplen importantes funciones de protección y estabilización frente a las ERO, que funcionan como defensa ante diversos tipos de estrés como exceso de radiación solar, alta o bajas temperaturas, sequía y cuando

son atacadas por patógenos (Tun *et al.*, 2001). En los animales, Mittal *et al.* (2014) describen la función de las ERO en la defensa inmune contra agentes biológicos externos mediante el proceso inflamatorio, resaltando la relación entre una alta actividad antioxidante y la regulación de procesos inflamatorios.

2.2.1. Antioxidantes y antiinflamatorios de origen vegetal

La alimentación constituye un factor importante en la modulación de la respuesta inflamatoria, debido a que los fitoquímicos presentes en los alimentos, en su forma original o al ser metabolizados, son la fuente de antioxidantes o pueden formar metabolitos activos y comportarse como mensajeros intracelulares, activando o inhibiendo la expresión de genes involucrados ya sea en el balance del estrés oxidativo o en los procesos inflamatorios (González, 2012).

Algunos terpenoides, carotenoides, compuestos fenólicos, compuestos nitrogenados y órgano-sulfurados, son obtenidos durante el consumo o uso de plantas o de sus diferentes partes como hojas, tallos, cortezas, raíces, flores y frutos (Edeoga, 2005; Tiwari, 2011; Maluventhan y Sangu, 2010; Bellik *et al.*, 2012), algunos en particular tienen actividad antioxidante y otros también han demostrado su actividad antiinflamatoria en modelos experimentales tanto *in vitro* como *in vivo* (Cuadro 1).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), hasta un 80% de las personas dependen principalmente de las hierbas medicinales, debido a su disponibilidad de bajo costo (Deepa y Renuka, 2014). Los compuestos antioxidantes más representativos en estas plantas son los ácidos simples como el ácido cítrico y el ácido ascórbico (Halliwell, 2001) y los del tipo fenólico, dentro de los que se encuentran los ácidos fenólicos y los polifenoles como los taninos y los flavonoides (Porrás-Loaiza y López-Malo, 2009).

Cuadro 1. Actividad antiinflamatoria de frutos y vegetales en modelos experimentales *in vivo*.

Nombre	Compuesto activo	Modelo	Mecanismo antiinflamatorio	Referencias
Cebolla (<i>Allium Cepa</i>)	Flavonoides Carotenoides Antocianinas Flavonoles Quercetina	Ratas Wistar	-Inhibe expresión COX2, PGE2 -Inhibe NF-κB, TNF -Reduce expresión de IL-1, IL-6, IL8	Griffiths <i>et al.</i> , 2002; López-Lázaro, 2009; Guillamón, 2018
Uva (<i>Vitis vinífera</i>)	Polifenoles Flavonoides Flavonoles Flavonoles	Consumo regular de derivados de uva (vino entre 300-600 mL)	-Reduce expresión NF-κB -Reduce COX2 y PGE2 -Reduce e inhibe, TNFα, IL-1, IL-6, IL-12.	Bertelli y Das, 2009; Latruffe y Rifler, 2013; Hashim <i>et al.</i> , 2013; Chen <i>et al.</i> , 2014
Durazno rojo (<i>Prunus persicarosaceae</i>)	Compuestos fenólicos Flavonoles Flavonoles Quercetina Catequina, Kaempferol	Ratas Dosis empleada 1000 mg/kg	- Reduce NF-κB por inhibición de la translocación al núcleo. - Reduce TNFα e IL6.	Kim <i>et al.</i> , 2013; Shin <i>et al.</i> , 2010

Entre los efectos beneficiosos del consumo de productos de origen vegetal, destaca su influencia positiva sobre la microbiota, salud gastrointestinal e inmunidad. La microbiota desempeña un papel clave, con una influencia directa en numerosas enfermedades relacionadas con el sistema inmune y la inflamación. Mediante intervenciones en la dieta se puede modificar la funcionalidad y composición de la microbiota intestinal, así como influir en el desarrollo de múltiples alteraciones directamente asociadas con la inflamación (Sekirov *et al.*, 2010).

2.3. COMPUESTOS FENÓLICOS Y TERPÉNICOS

La gran mayoría de los fármacos antiinflamatorios presentan una alta incidencia de efectos adversos, por lo que su utilización está limitada en numerosas ocasiones, de tal manera que la búsqueda de compuestos complementarios resulta una posibilidad de ayuda para la población que padece afecciones que cursan con procesos

inflamatorios. Es por eso que en los últimos años han cobrado especial interés los estudios en los fitoquímicos como los compuestos fenólicos y terpénicos, los cuales son capaces de inhibir la producción de citocinas proinflamatorias o bien incrementar la producción de anticuerpos o inmunoglobulinas (Rubió *et al.*, 2013; Jantan *et al.*, 2015). En el cuadro 2 se indican algunos compuestos fitoquímicos de naturaleza fenólica y terpénica con efectos beneficiosos sobre la respuesta inflamatoria.

Cuadro 2. Compuestos fitoquímicos de naturaleza fenólica y terpénica con efectos benéficos sobre la respuesta inflamatoria (Rubió *et al.*, 2013; Jantan *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2018).

Grupo Químico	Compuesto	Mecanismo
Ácidos fenólicos	Curcumina	Inhibe la expresión de TNF- α , IL-1 β , IL-6, NF- κ B
	Resveratrol	Reducción en la producción de TNF- α , IL-1 β e IL-6
	Ácido gálico	Regulación de NF- κ B y reducción de TNF- α e IL-6
Flavonoides	Quercetina	Inhibe la producción de TNF- α , la expresión de iNOS y la producción de NO
	Rutina	Inhibe la producción de TNF- α e IL-6 y reduce la expresión de iNOS y COX-2
Terpenoides	Timol	Inhibe la producción de TNF- α e IL-6 y reduce la expresión de iNOS y COX-2
	Limoneno	Inhibe la señalización de NF- κ B

Los compuestos fenólicos constituyen el grupo más abundante de sustancias bioactivas presentes en los alimentos (González 2012). De acuerdo a Bellik *et al.* (2012), los fenoles pueden subdividirse en ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, cumarinas y taninos. Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. También ejercen una acción antiinflamatoria al inhibir las actividades enzimáticas del metabolismo del ácido araquidónico (Schewe *et al.*, 2001). Por ejemplo, el té verde contiene polifenoles que incluyen flavanoles, flavonoides, ácidos fenólicos y catequinas, que una vez consumidos se absorben, metabolizan, metilan, sulfatan y glucolizan para ejercer numerosos efectos como antiinflamatorios y principalmente antioxidantes (Chow y Hakim, 2011).

En un estudio realizado por López (2012) se mostró una fuerte inhibición en la producción de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α , IL6 y PGE2), con extractos equivalentes a un consumo de entre 6 a 10 tazas de té verde por día, en un periodo de ensayo de 12 meses. Aunque en otros estudios, se ha mostrado que un exceso de éstos, presentan efectos prooxidantes, por lo que es importante profundizar más sobre los estudios del uso, dosis, tiempo y administración de fuentes naturales como las plantas, para utilizarse como antioxidantes o como antiinflamatorios (Lorenz, 2013). Los terpenoides son compuestos aromáticos que se encuentran principalmente en las plantas medicinales aromáticas, los cuales son responsables del sabor, el olor o el aroma, por lo que tienen una función muy importante para su aceptación como remedios herbales (Harman-Ware *et al.*, 2016). Este tipo de compuestos, son metabolitos secundarios presentes en las plantas y tienen actividad antimicrobiana, antiparasitaria, antiviral, anticancerígena y por supuesto, antiinflamatoria (Hortelano, 2009).

En plantas de *Stevia rebaudiana*, el principio activo es el esteviósido, un diterpeno glucósido que a nivel intestinal se modifica a esteviol y ejerce un efecto antiinflamatorio, por inhibir la activación del NF- κ B, regulando el proceso

transcripcional y la liberación de citocinas proinflamatorias (Fengyang *et al.*, 2012). En el cuadro 3 se describen algunos ejemplos de plantas o frutos con actividad antioxidante y antiinflamatoria, demostradas en modelos experimentales *in vivo*.

Cuadro 3. Ejemplo de plantas o frutos con actividad antioxidante y antiinflamatoria en modelos experimentales *in vivo*.

Compuesto activo	Planta	Efecto	Modelo	Referencias
Quercetina	<i>Vitis vinifera</i> (Uva)	Antioxidante/ antiinflamatorio	Células gástricas epiteliales (AGS) e intestinales (Caco- 2) humanas	Sangiovanni <i>et al.</i> , 2015
Ácido linoleico, Alfa- linoleico, Gingerol, Capsaicina	<i>Zingiber officinale</i> (Jengibre)	Antioxidante/ antiinflamatorio	Suero (ratas Wistar)	Thomson <i>et al.</i> , 2012
Ácido rosmarínico, flavonoides, (eriocitrina, luteolina), mentol y la mentona	<i>Mentha piperita</i> (Menta)	Antioxidante/ antiinflamatorio	Edema de oreja de ratón inducido por aceite de crotón	Sun <i>et al.</i> , 2014
Estragol, eugenol, linalol, Flavonoid es (quercetrósido)	<i>Ocimum basilicum</i> (Albahaca)	Antioxidante/ antiinflamatorio	Edema pata de rata por carragenina	Singh, 1999; Hussain <i>et al.</i> , 2008
Quercetina, miricetina, kaempferol	<i>Camellia sinensis</i> (té verde)	Antioxidante/ antiinflamatorio	Artritis reumatoide	Peluso y Serafini, 2017; Mao <i>et al.</i> , 2017; Guo <i>et al.</i> , 2018
Terpenoides (bisabolol, matricina); Flavonoides (apigenina, luteolina)	<i>Chamaemel um nobile</i> (Manzanilla)	Antioxidante/ antiinflamatorio	Ratas Wistar (tópica)	Della, 1990; Merfort <i>et al.</i> , 1994

2.4. EFECTO DEL SECADO Y ALMACÉN SOBRE EL CONTENIDO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

El secado es el proceso que consiste en la eliminación de gran parte del agua de los alimentos, hasta un nivel de humedad aceptable para ser almacenados por largos períodos, evitando el crecimiento de microorganismos como bacterias, levaduras y hongos. Durante y después del secado de los alimentos, ocurren cambios químicos, físicos y organolépticos, tales como la reducción de la actividad de agua (a_w), reducción de la actividad enzimática, degradación de vitaminas hidrosolubles, oxidación de lípidos y desnaturalización de proteínas (Sastre y Hernández, 1999). El mayor problema en el secado y el almacenamiento es la alta sensibilidad del principio biológicamente activo y su conservación (Larrasoña, 2010).

En plantas como *Lippia alba* (Verbenaceae), el rendimiento es mayor en hojas frescas con un 75% de humedad a diferencia de las secas que presentaron un 12% (Mejía *et al.*, 2007). Además, la humedad puede generar variabilidad en la composición química de sus compuestos activos, ya que cuando se utilizan temperaturas por arriba de los 70°C, hay una reducción entre el 12 y 17% del contenido de sus compuestos activos de plantas secas de *L. alba*, en comparación con los contenidos de los mismos compuestos en plantas frescas. Sin embargo, el contenido de algunos compuestos como el citral, fue ligeramente mayor que el obtenido en plantas frescas, los autores consideran que este aumento puede atribuirse a la oxidación del geraniol durante el proceso de secado, al convertirse en geranial (Barboza *et al.*, 2006).

El secado y el almacenamiento son de gran importancia en el producto final de las diferentes partes de las plantas, razón por la cual los productos de mala calidad están asociados con la recolección, procesamiento y almacenamiento inadecuados. Por lo tanto, estos parámetros son fundamentales para lograr un producto de buena calidad, si el secado y el almacenamiento no se realiza adecuadamente, podría comprometer el contenido de principios activos y también podría influir en el color y el olor, así como en la calidad final y por lo tanto en la actividad biológica (Larrasoña, 2010).

2.4.1. Infusiones y sus propiedades funcionales

Hasta el siglo XIX, el uso de las plantas aromáticas y medicinales fueron los únicos medicamentos empleados por el hombre en los países occidentales, debido a que ofrecían agradables aromas, sabores, alivio de dolor y cura de enfermedades (Masarovičová y Kráľová, 2006; Craker, 2007). Se emplean principalmente sus tallos, hojas y/o flores por medio de infusión. Este tipo de plantas medicinales brindan innumerables propiedades funcionales y nutraceuticas en esta bebida debido a la extracción acuosa de los principios activos presentes en estas mediante la adición de agua en ebullición (Carballo *et al.*, 2005).

Debido a la naturaleza acuosa, de alta polaridad de las infusiones, éstas se componen principalmente de compuestos fenólicos y la principal característica de éstos es que en su estructura tienen un grupo fenol, que permite su solubilidad en agua y es responsable de la actividad antioxidante y antiinflamatoria (Muñoz-Velázquez *et al.*, 2012; Ambriz-Pérez *et al.*, 2016), sin embargo, las infusiones de plantas aromáticas contienen algunos compuestos de tipo terpénico (Miguel, 2010; Torres-Martínez y Salgado-Garciglia, 2014).

Como antes se describió, una de las propiedades medicinales de los terpenos, es su actividad antioxidante y hay evidencias científicas de su actividad antiinflamatoria, por lo que algunas infusiones derivadas de plantas aromáticas que contienen terpenos como el eugenol, timol, p-cimeno, linalool, β -cariofileno, 4-terpineol, muestran un efecto antioxidante y antiinflamatorio. Éstos son componentes del aroma de plantas como el clavo (*Eugenia caryophyllus*), albahaca (*Ocimum basilicum*), tomillo (*Thymus vulgaris*), manzanilla (*Matricaria chamomilla*) y mirto (*Myrtus communis*), entre otras. Otros ejemplos de terpenos con estas propiedades, están presentes en el eucalipto, romero, lavanda, pino y mirra; los terpenos p-cimeno y timol del tomillo actúan sobre la inflamación en colon (Miguel, 2010; Torres-Martínez y Salgado-Garciglia, 2014).

En especies de la familia Lamiaceae como *Hedeoma multiflorum*, *Hypericum perforatum*, *Hyptis verticillata*, *Ocimum basilicum*, *Satureja macrostema* y *Thymus vulgaris*, el efecto antioxidante y antiinflamatorio se debe al contenido de compuestos fenólicos y ciertos terpenos (Cañigüeral y Vanaclocha 2000; Piñol *et al.*, 2000; Baranauskienė *et al.*, 2003; Barboza *et al.*, 2006; Picking *et al.*, 2013; Torres-Martínez *et al.*, 2018).

A *Thymus vulgaris* (tomillo), que generalmente se utiliza como condimento de alimentos, se le atribuyen diversas propiedades farmacológicas como actividad antibacteriana, actividad antiinflamatoria y actividad antioxidante (Cañigüeral y Vanaclocha, 2000; Baranauskienė *et al.*, 2003). Las hojas de *Hypericum perforatum* contienen flavonoides, entre los cuales se mencionan a la quercetina, rutina, isoquercetina, bioflavonoides (amentoflavona), procianidinas oligoméricas, taninos catéquicos, derivados del ácido cafeico (ácido clorogénico), con actividad antiinflamatoria y actividad antioxidante (Albert *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2005).

La actividad de estos compuestos, está estrechamente relacionada con la naturaleza química (polaridad) y la presencia de agua, por ello, el secado, tiempo y condiciones de almacenamiento son factores importantes a tomar en cuenta para preservar dicha actividad (Carballo *et al.*, 2005).

2.5. PLANTAS MEDICINALES DE LA FAMILIA LAMIACEAE

La familia Lamiaceae incluye 236 géneros y 7 173 especies. Su distribución es subcosmopolita y es muy diversa en zonas templadas, particularmente en el Mediterráneo y la región central de Asia. En México se encuentra ampliamente distribuida, principalmente a lo largo de las zonas montañosas y en el eje Neovolcánico transversal como se muestra en la figura 2 (Kubitzki *et al.*, 2004).

Esta familia tiene importancia económica en varias partes del mundo, ya que muchas de sus especies se usan como condimentos (*Origanum*, *Thymus*, *Mentha*), para

obtener aceites esenciales (*Lavandula*, *Pogostemon*, *Salvia*) y/o como ornamentales (*Coleus*, *Salvia*, *Scutellaria*) (Martínez-Gordillo, 2013).



Figura 2. Distribución de la familia Lamiaceae en la República Mexicana (Martínez-Gordillo, 2013).

2.5.1. *Hedeoma* Epling y Stewart (1939)

El género *Hedeoma* (Lamiaceae) cuenta con 30 especies americanas mayormente distribuidas en México y Estados Unidos y solo cinco especies en América del Sur (Slanis y Bulacio, 2005). Sus propiedades aromáticas se reflejan en los nombres comunes de varios representantes del género, las que incluyen en su conformación expresiones asociativas como por ejemplo “menta”, “comino”, “orégano”, “peperina” y “tomillo” (Slanis y Bulacio, 2005; Martínez, 2005; Dadé *et al.*, 2009; Viveros-Valdez *et al.*, 2010).

Las especies se caracterizan por ser plantas de altura baja, generalmente son aromáticas, herbáceas o en ocasiones sub-arbustivas con crecimiento anual o perenne; se compone de tallos ramificados ya sea, ascendentes o decumbentes, pubescentes en la parte superior; sus hojas pecioladas a sésiles, pequeñas, ovadas,

elípticas o bien rómbico-lanceoladas o aserradas; la presencia de las flores son de color lila o blanquecinas con tintes violáceos, agrupadas en verticilos laxos, axilares, y de pocas flores que forman pseudorracimos o espicastos terminales; el cáliz es tubular; cuenta con dos estambres fértiles y mericarpios ovoides y lisos. Estas especies se distinguen por ser medicinales y otras se utilizan como especias (Rzedowski y Rzedowski, 2005) (Figura 3A).

2.5.2. *Hedeoma piperita* Benth. (1835)

La especie *Hedeoma piperita*, conocida comúnmente como “quiensabe”, “tabaquillo” o “hierba de Santo Domingo”, es herbácea perenne, aromática, con tallos ascendentes, ramificados desde la base, con una altura de hasta 25 cm (Figura 3B); sus hojas son subsésiles, presenta inflorescencias en forma de verticilos interrumptos, flores pediceladas, cáliz tubular de 5 a 10 mm de largo, color blanca o morada de 6 a 8 mm de largo; filamentos de más o menos 3 mm de largo y mericarpios ovoides o subglobosos, de color pardo de alrededor de un 1 mm de largo, casi lisos.

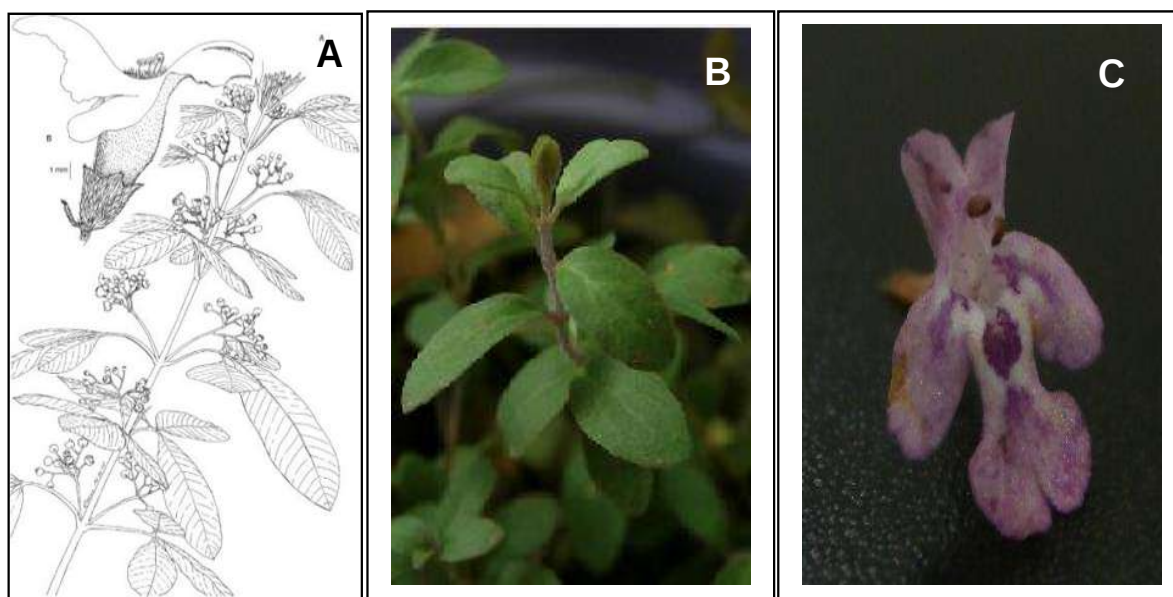


Figura 3. A) Representación gráfica de una especie del género *Hedeoma* (Fuente: Naturalista); B) Ejemplar de una planta de *H. piperita*; C) Flores representativas de *H. piperita* (Fotos: RSalgadoGarciglia).

Esta planta crece en los estados de Veracruz, Puebla, Hidalgo, Michoacán y Estado de México, donde es considerada como planta medicinal (Rzedowski y Rzedowski, 2005) (Figura 3C). Aunque existe poca literatura sobre esta planta, es bien sabido que, en la meseta purépecha del estado de Michoacán, las hojas se utilizan para su consumo como infusión, por lo que es importante realizar estudios que nos comprueben sus propiedades funcionales y nutracéuticas.

Es una planta poco estudiada de la cual se desconocen sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, la relación de éstas con los compuestos activos, así como el efecto del secado de hojas y tiempo de almacenamiento sobre el contenido de los compuestos, objetivo principal de esta investigación.

3. JUSTIFICACIÓN

Infusiones de hojas de *H. piperita* son utilizadas en nuestra región con fines medicinales, pero se desconocen sus propiedades biológicas y los compuestos bioactivos responsables de este uso, así como los posibles cambios si las hojas se utilizan frescas o secas, así como en diferentes tiempos de almacén.

Debido a esto, es importante la determinación del contenido de los principios activos, en particular los de tipo fenólico y terpénico, en infusiones de hojas frescas y secas de *H. piperita*, con el propósito de relacionar el efecto del secado y el tiempo de almacén de las hojas sobre éstos y relacionarlo con la actividad antioxidante y antiinflamatoria

4. HIPÓTESIS

El secado y el tiempo de almacenamiento de las hojas de *Hedeoma piperita* es determinante sobre el contenido de compuestos fenólicos y terpénicos en infusiones, lo que se relaciona directamente con la actividad antioxidante y antiinflamatoria.

5. OBJETIVOS

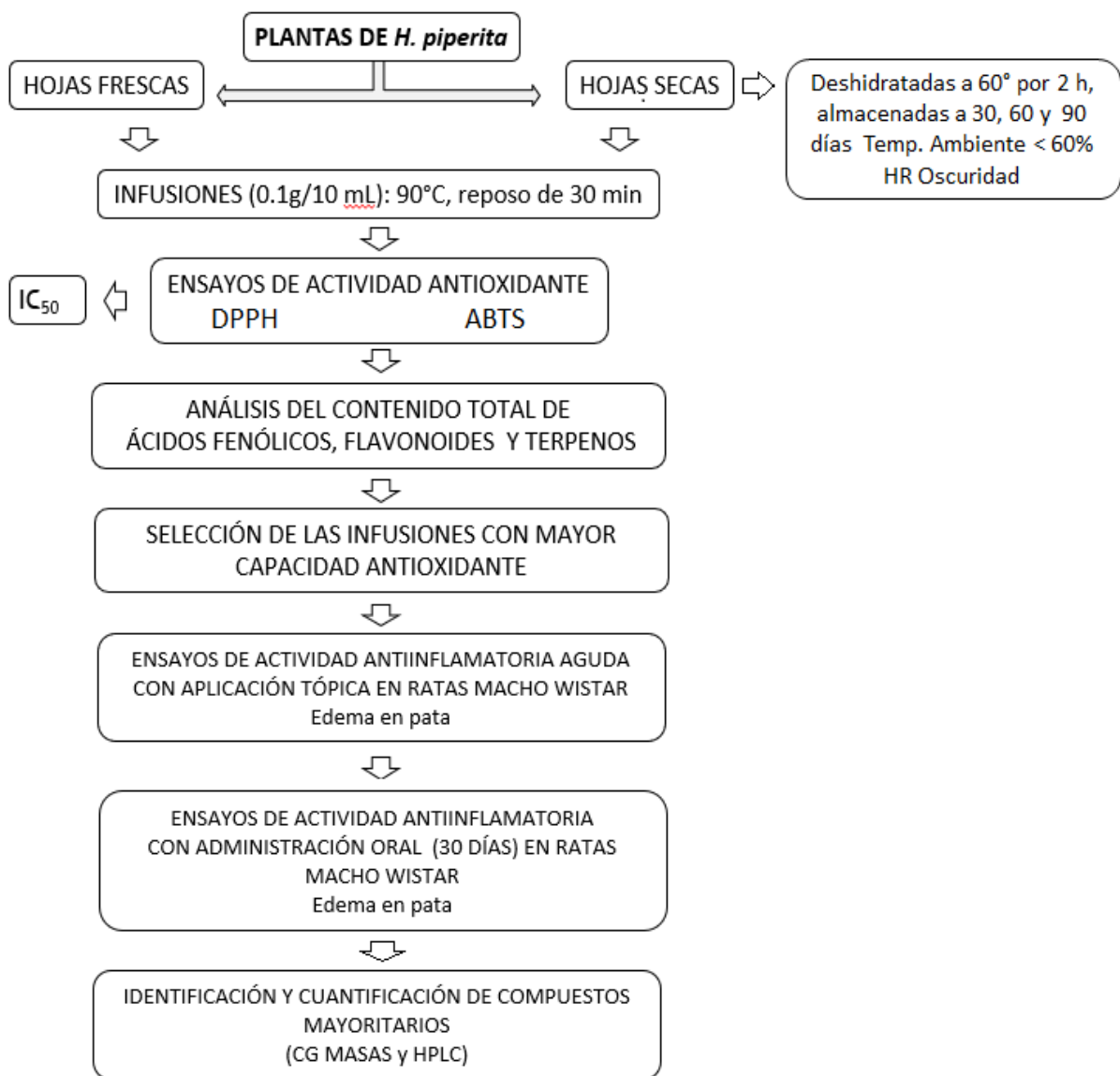
5.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del secado y el tiempo de almacén de las hojas de *Hedeoma piperita* sobre el contenido de compuestos fenólicos y terpénicos en infusiones, y su relación con la actividad antioxidante y antiinflamatoria.

5.1.1. Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto del secado y el tiempo de almacenamiento de las hojas de *H. piperita* sobre el contenido de compuestos fenólicos y terpénicos, y la actividad antioxidante.
2. Determinar la actividad antiinflamatoria de las infusiones de hojas de *H. piperita* con mayor actividad antioxidante
3. Identificar y cuantificar los principales componentes fenólicos y terpénicos de las infusiones de hojas de *H. piperita*.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



7. RESULTADOS

7.1. CAPÍTULO I. Influencia del secado y tiempo de almacén de hojas en infusiones de *Hedeoma piperita* sobre la actividad antioxidante y el contenido total de ácidos fenólicos, flavonoides y terpenoides.

Resumen

El uso de plantas aromáticas y medicinales obedece a sus propiedades antioxidantes, atribuidas a sus compuestos del tipo fenólico y terpénico principalmente. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antioxidante de infusiones de hojas de *Hedeoma piperita*, preparadas en fresco y secas después de un tratamiento de almacenamiento de 30, 60 y 90 días, para determinar la relación de esta propiedad con el contenido de ácidos fenólicos, flavonoides y terpenoides totales, y con el período de secado. La capacidad antioxidante fue determinada por los métodos DPPH y ABTS, obteniendo los mayores porcentajes en las infusiones de hojas frescas con valores de 90% y 93%, respectivamente. Por el método de ABTS, un porcentaje de 82% se obtuvo en las infusiones de hojas secas, almacenadas por 30 días, y valores menores al 50% en las de hojas secas a 60 y 90 días de almacenamiento. El contenido de ácidos fenólicos, flavonoides y terpenoides se determinaron por técnicas espectrofotométricas. Se obtuvo una relación directa con la alta actividad antioxidante y el contenido de ácidos fenólicos y flavonoides, ya que las infusiones de hojas frescas mostraron la mayor cantidad con 0.25 μ moles EAG/mg p.f. y 7.69 μ moles EQ/mg p.f. El contenido de terpenoides totales en las infusiones de hojas secas (30 días) mostraron mayor contenido (18.75 mg Eq. Pulegona/g peso). El tiempo de almacenamiento de las hojas secas, tuvo un efecto de disminución tanto de la actividad antioxidante como del contenido de ácidos fenólicos y flavonoides totales.

Palabras clave: ABTS, DPPH, *Hedeoma piperita*, plantas medicinales, tabaquillo.

Abstract

The use of aromatic and medicinal plants is due to its antioxidant properties, attributed to compounds mainly phenolic and terpenoid. Therefore, the objective of this study was to evaluate the antioxidant activity of *Hedeoma piperita* leaf infusions prepared in fresh and dry after a storage treatment of 30, 60 and 90 days, to determine the relationship of this property with the content of total phenolic acids, flavonoids and terpenoids, with the period of storage. The antioxidant capacity was determined by the DPPH and ABTS methods, obtaining the highest percentages in infusions of fresh leaves with values of 90% and 93%, respectively. By the ABTS method, a percentage of 82% was obtained in infusions of dried leaves, stored for 30 days, and values less than 50% in those of dried leaves at 60 and 90 days of storage. The content of total phenolic acids, flavonoids and terpenoids were determined by spectrophotometric techniques, finding a direct relationship with the high antioxidant activity, since infusions of fresh leaves showed as much with 0.25 μ moles EAG/mg w.f., 7.69 μ moles EQ/mg w.f. With the

method of total terpenoids, infusions of dried leaves (30 days) showed the highest value of total terpenoids (18.75 mg Eq. Pulegona / g weight). Moreover, the time of storage of dry leaves, had a decreasing of antioxidant activity and of total phenolic acids and flavonoids.

Keywords: ABTS, DPPH, *Hedeoma piperita*, medicinal plants, “tabaquillo”.

Introducción

Desde la antigüedad, las plantas aromáticas y medicinales han formado parte de nuestra herencia cultural y actualmente los estudios de éstas han tomado un gran auge en la etnobotánica, fitoterapia y en la fitoquímica, debido a su empleo con fines curativos (Leiva y Leyva, 2012). Las propiedades medicinales son atribuidas principalmente a la gran cantidad de compuestos que sintetizan; varios de estos químicos son metabolitos secundarios con actividad antioxidante, que les permite disminuir los efectos negativos del estrés oxidativo asociado con enfermedades crónico degenerativas, como la diabetes, la hipertensión y el cáncer, entre otras (Kolewe, 2008; Zárate *et al.*, 2008).

Ciertos metabolitos derivados de las plantas medicinales tienen la capacidad de reducir o inhibir la formación de radicales libres, actuando como antioxidantes (Kumar *et al.*, 2004; Fernández-Ginés *et al.*, 2005). Un antioxidante es toda sustancia que encontrándose a bajas concentraciones con respecto a las de un sustrato oxidable, retarda o previene la oxidación de dicho sustrato (Halliwell 1999). Éstos son clasificados de acuerdo a las rutas biosintéticas de las que derivan y se clasifican principalmente los ácidos fenólicos y polifenoles, los terpenos y esteroides, y los alcaloides (Bourgaud *et al.*, 2001).

Entre los fitoquímicos con mayor capacidad antioxidante se señalan a los de tipo fenólico como los ácidos fenólicos simples (ej. ácido elágico, ácido gálico) y los polifenoles como los taninos y los flavonoides (Bernardi *et al.*, 2008). Este tipo de compuestos están ampliamente distribuidos en las plantas y son utilizados en la

actualidad en el campo de la nutrición, salud y en la medicina. Por su estructura química y actividad antioxidante son utilizados como potentes antiinflamatorios, anticancerígenos y antimicrobianos (Fernández-Giusti *et al.*, 2014). Algunos ácidos fenólicos como el cafeico y el rosmarínico, que se encuentran en infusiones de manzanilla y hierbabuena, respectivamente, son responsables de una alta actividad antioxidante (Fecka y Turek, 2008; Muñoz-Velázquez *et al.*, 2012). Diversos tipos de flavonoides como la quercetina y la rutina, presentes en hojas de *Hypericum perforatum* (Hypericaceae) son responsables tanto de la capacidad antioxidante como de la antiinflamatoria (Sosa *et al.*, 2007).

Por otro lado, los terpenos, compuestos que son comercialmente importantes por su uso como aromas y fragancias en las industrias alimentaria y cosmética, también tienen importancia medicinal por sus propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias, antiulcerosas, antimalariales y antimicrobianas (Miguel, 2010; García y Carril, 2011). El eugenol, timol, p-cimeno, linalol y β -cariofileno, son compuestos terpénicos con efecto antioxidante producidos en diversas plantas aromáticas como el clavo (*Eugenia caryophyllus*) (Singh *et al.*, 2009), albahaca (*Ocimum basilicum*), tomillo (*Thymus vulgaris*) (Hussain *et al.*, 2008) y manzanilla (*Matricaria chamomilla*) (Roby *et al.*, 2013).

Las infusiones o extractos etanólicos de especies de Lamiaceae como *Hedeoma multiflorum*, *Hypericum perforatum*, *Hyptis verticillata*, *Satureja* y *Thymus vulgaris*, presentan actividad antioxidante debido a sus compuestos tanto fenólicos como terpénicos (Dade *et al.*, 2009; Feriotto *et al.*, 2018; Pellegrini *et al.*, 2018). La composición del contenido de todos estos compuestos en las plantas medicinales, está definida por diversos factores entre los que se incluyen las condiciones de cultivo, fenología de la planta, así como el secado y el tiempo de almacenamiento de las plantas o las partes de éstas (Barboza *et al.*, 2006).

Existen diferentes métodos de evaluación de antioxidantes, los más utilizados son los métodos de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracil) y el de ABTS (ácido 3-etilbenzotiazolina-

6-sulfónico) (Roginsky y Lissi, 2005; Miguel, 2010). Ambos presentan una excelente estabilidad en ciertas condiciones, aunque también muestran diferencias según la polaridad de los extractos o componentes de éstos. El ABTS decolora en la presencia de antioxidantes (compuestos fenólicos, carotenoides y otros) (Moon y Shibamoto, 2009), este ensayo mide la capacidad antioxidante total, tanto lipofílico como de sustancias hidrófilas, mientras que el DPPH solo puede disolverse en medio orgánico (Arnao, 2000; Arnous *et al.*, 2002). El radical ABTS tiene, además, la ventaja de que su espectro presenta máximos de absorbancia a 414, 654, 754 y 815 nm en medio alcohólico, mientras que el DPPH presenta un pico de absorbancia a 515 nm (Kim *et al.*, 2002).

Debido al gran número de plantas aromáticas utilizadas en nuestro país, es necesario realizar investigaciones dirigidas a aquellas menos estudiadas de importancia en la medicina tradicional, de las que se desconoce la actividad antioxidante y los compuestos responsables de ésta. Es también importante demostrar sus propiedades para las que se usan, sobre todo en enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, además de determinar la influencia en esta propiedad de ciertos factores como el tiempo de almacenado (secado) de las plantas o las partes que de éstas se utilizan.

En la presente investigación, se realizaron estudios con *Hedeoma piperita* Benth. (tabaquillo), una planta herbácea perenne, aromática, con una altura de hasta 25 cm, su periodo vegetativo es entre los meses de agosto a octubre por lo que es utilizada tanto en fresca como en seco. Es considerada como medicinal en la meseta Purépecha (Michoacán), utilizada como infusión para combatir trastornos digestivos (Santos, 2014), de la que se desconocen sus propiedades antioxidantes, los compuestos responsables, así como sus variaciones en esta propiedad durante el secado y almacenamiento de la planta. El objetivo general fue evaluar la actividad antioxidante de las infusiones de hojas preparadas en fresco y después de un tratamiento de secado, para determinar la relación de esta propiedad con el contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y terpenoides.

Materiales y métodos

Material biológico

Se utilizaron plantas de *Hedeoma piperita* Benth. colectadas en el mes de noviembre de 2018, en el Municipio de Zacapu, Michoacán (19°49'00"N 101°47'27"O) en la época de crecimiento vegetativo. Las plantas se confirmaron taxonómicamente por la M.C. Berenice Farfán Heredia de la Universidad Intercultural Indígena de Michoacán, Pichátaro.

Obtención de las infusiones

Se obtuvieron infusiones de hojas tanto de materia fresca y seca, de *H. piperita*. El tratamiento de secado consistió en almacenarlas en oscuridad, con una humedad relativa (HR) menor al 60% y a temperatura ambiente, por 30, 60 y 90 días previo a la obtención de las infusiones. Las infusiones se prepararon colocando 0.05 g de hojas por 2.5 mL de agua en ebullición durante 30 minutos. Posteriormente las infusiones fueron filtradas para separar la materia y se agregó 2.5 mL de etanol quedando todas a una concentración de 5 mg/mL.

Determinación de la actividad antioxidante

Actividad captadora de radicales libres DPPH. La actividad captadora de radicales libres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) de las infusiones se realizó de acuerdo a lo descrito por Karamać *et al.*, (2005) a una concentración 1 mg/mL. Se mezcló 1mL de DPPH en etanol (0.5 mmol/L) con 100 µL de cada muestra. Después de 20 minutos de incubación, la absorbancia se midió a 517 nm con un espectrofotómetro de luz ultravioleta (UV/VIS VELAB-VE51000UV). Los resultados se muestran como el porcentaje de la capacidad de eliminación de radicales libres (actividad antioxidante), calculado según la siguiente ecuación.

$$\text{Actividad antioxidante (\%)} = \frac{(\text{Ablanco} - \text{Amuestra})}{\text{Ablanco}} \times 100$$

Donde Amuestra es la absorbancia del DPPH mezclado con cada infusión y Ablanco es la absorbancia del DPPH, en donde la muestra ha sido reemplazada con metanol.

Actividad antioxidante equivalente Trolox® (TEAC), método ABTS. La determinación de la actividad antioxidante equivalente en Trolox (TEAC) se evaluó utilizando el método del ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS, por sus siglas en inglés) descrito por Arnao *et al.* (2001) a concentraciones de 1 mg/mL. Se mezclaron 100 µL de cada muestra con 1900 µL de la solución del radical ABTS. La absorbancia se midió después de 7 min a una λ de 737 nm con un espectrofotómetro de luz ultravioleta (UV/VIS VELAB-VE51000UV). Los resultados se muestran como porcentaje de actividad antioxidante, calculado con la siguiente ecuación.

$$\text{Actividad antioxidante (\%)} = \frac{(\text{Ablanco} - \text{Amuestra})}{\text{Ablanco}} \times 100$$

Donde Amuestra es la absorbancia del ABTS mezclado con la infusión y Ablanco es la absorbancia del ABTS en donde la muestra ha sido reemplazada con metanol. En cada uno de los métodos, el antioxidante sintético butil hidroxitolueno (BHT) se utilizó como control de comparación a una concentración de 1 mg/mL.

Determinación de la concentración inhibitoria media (IC₅₀). Se calculó la IC₅₀ (µg de sólido soluble/mL) para los métodos ABTS y DPPH, un valor que corresponde a la concentración del extracto que reduce en un 50% la absorbancia de una solución metanólica de ABTS Y DPPH. Los cálculos se obtuvieron, realizando una curva de calibración en concentraciones de 0, 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 mg/mL (Anexos 1.1 y 1.2).

Determinación de compuestos bioactivos

Las infusiones tanto de hojas frescas como secas de *H. piperita* fueron analizados para la determinación de ácidos fenólicos, flavonoides y terpenoides totales.

Ácidos fenólicos totales. El contenido de ácidos fenólicos totales se determinó en las infusiones tanto de hojas frescas como secas de *H. piperita*, utilizando el método de Folin-Ciocalteu (Schwarz *et al.*, 2001). Éste consistió en mezclar 100 µL de cada muestra con 750 µL de la solución de Folin-Ciocalteu, preparada 1:10 con agua estéril. Las mezclas se dejaron reposar por 60 min a temperatura ambiente y en oscuridad, para finalmente obtener las lecturas de absorbancia a 725 nm en un espectrofotómetro (UV-Vis VELAB-VE51000UV). Los resultados se muestran en µmoles equivalentes de ácido gálico por miligramo de peso fresco (µmoles Eq.EAG/mg p.f.), los cuales se obtuvieron a través de una curva de calibración que se preparó usando concentraciones de ácido gálico como estándar entre 0 y 1 µmoles (anexo 1.3a), mediante la siguiente ecuación.

$$[\text{Ácido gálico}] = \frac{\text{Absorbancia} + 0.0016}{6.1652}$$

Determinación de flavonoides totales. El contenido de flavonoides totales se determinó por la técnica de Kim *et al.* (2002), que consistió en mezclar 10 µL de cada muestra (infusiones de hojas frescas y secas de *H. piperita*) con 490 µL de metanol, sometiendo la mezcla a agitación en vortex, para posteriormente agregar 1 mL de metanol, 100 µL de cloruro de aluminio al 10% y 100 µL de acetato de potasio al 1 M. Las muestras se sometieron a agitación en vortex y se dejaron reposar por 30 min en oscuridad, para finalmente obtener las lecturas de absorbancia a 415 nm en un espectrofotómetro (UV-Vis VELAB-VE51000UV). La cuantificación se obtuvo mediante una curva de calibración que se realizó con quercetina, con un rango de concentración de 0 a 100 µmoles (anexo 1.3b). Los resultados se presentaron en equivalentes de µmoles de quercetina/mg peso fresco (µmoles EQ mg p.f.), mediante la siguiente ecuación.

$$[Quercetina] = \frac{Absorbancia + 0.0114}{0.016}$$

Determinación de terpenoides totales. La determinación de terpenoides totales de las infusiones de hojas frescas y secas de *H. piperita* fueron analizados por el método de Ghorai (Ghorai *et al.*, 2012), que consistió en mezclar 1 mL de cada muestra (infusiones de hojas frescas y secas de *H. piperita*) con 3 ml de cloroformo, sometiendo la mezcla a agitación en vortex, para posteriormente agregar 200 µL de ácido sulfúrico y se dejaron reposar durante 1 hora, para finalmente obtener las lecturas de absorbancia a 558 nm en un espectrofotómetro (UV-Vis VELAB-VE51000UV). Se realizó una curva de calibración con pulegona a 1, 10, 50 y 100 mg/mL (Anexo 1.4).

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media ± desviación estándar (n=3) y se procesaron mediante un análisis de varianza de una vía; las medias se compararon con la prueba de *Tukey* con un nivel de significación de $p \leq 0.05$.

Resultados y discusión

La actividad antioxidante de infusiones de hojas de *H. piperita*, frescas y secas (30, 60 y 90 días de almacenamiento) determinada por los métodos DPPH y ABTS, fueron expresados como el porcentaje de la actividad antioxidante y se compararon con el producido por el BHT (Figura 4).

Con el método DPPH, la infusión realizada con hojas frescas de *H. piperita*, mostró la actividad antioxidante más alta con un 90% de captación de radicales libres, valor con una alta diferencia significativa con los porcentajes observados en las infusiones de hojas secas por 30, 60 y 90 días (34.2%, 23.9% y 20.7%, respectivamente) (Figura 4A).

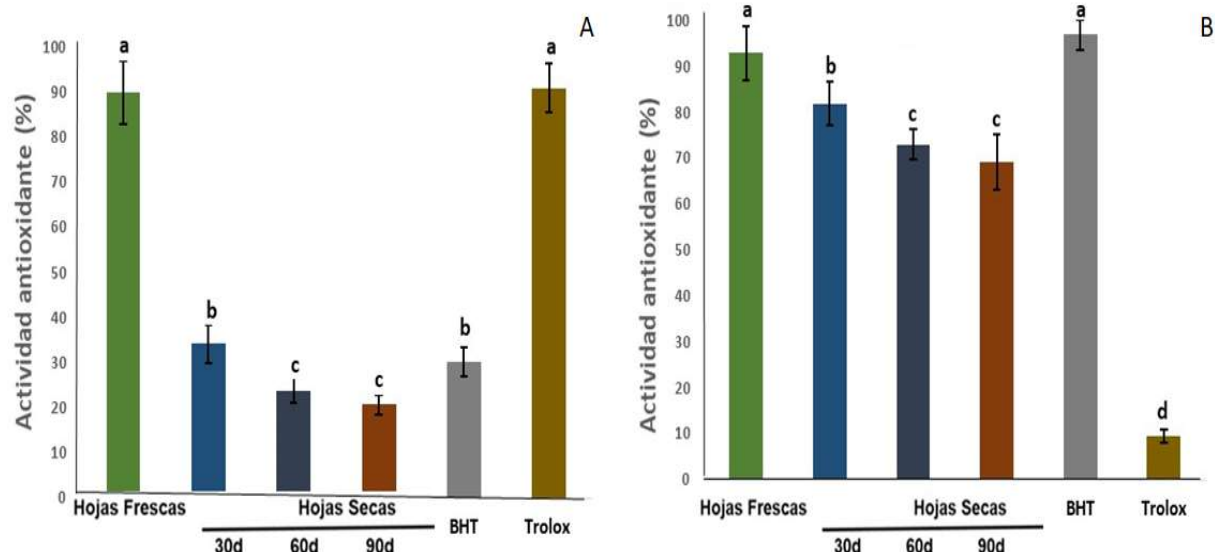


Figura 4. Actividad antioxidante de infusiones de hojas de *Hedeoma piperita* determinada en hojas frescas y secas (30, 60 y 90 días de almacenamiento) y del antioxidante sintético butil hidroxitolueno (BHT): A) Método DPPH; B) Método ABTS. Las letras diferentes indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$, $n=3$, prueba de Tukey).

Este porcentaje presentado por las hojas frescas, además de demostrar el alto potencial antioxidante de las infusiones de *H. piperita*, se encontró que el proceso de secado llevó a una disminución hasta de un 56% en el potencial reductor durante los primeros 30 días de almacenamiento de las hojas, con una mayor pérdida de la actividad a los 60 y 90 días (Figura 4B). La actividad antioxidante presentada por el extracto de las infusiones de hojas frescas fue incluso hasta tres veces mayor que la captación de radicales por el BHT, en un medio acuoso.

Los porcentajes de la actividad antioxidante de las infusiones tanto de hojas frescas como secas de *H. piperita*, determinados por el método ABTS, fueron relativamente altos, aunque la capacidad mayor fue observada en la infusión de hojas frescas con un 93%, un valor similar al mostrado por el BHT (97%), aunque con diferencia significativa con éste y con las infusiones de hojas sometidas a secado por 30, 60 y 90 días, en las que se obtuvo un 82%, 73% y 69.3%, respectivamente (Figura 4B).

El método de captura del radical DPPH es el más utilizado para determinar la actividad antioxidante de extractos herbales o de infusiones de plantas medicinales aromáticas, midiendo el potencial de inactivación de dicho radical en medio acuoso (Hseu *et al.*, 2008). Es por eso que se ha utilizado para infusiones de diversas plantas aromáticas medicinales como orégano (*Origanum vulgare*), tomillo silvestre (*Thymus serpyllum*), la planta rica-rica (*Acantholippia deserticola*), sauzgatillo (*Vitex agnus-castus*) y de té verde (*Camellia sinensis*), entre otras, con porcentajes de actividad antioxidante por arriba del 80% (Kulišić *et al.*, 2006; Morales *et al.*, 2008; Aslantürk y Çelik, 2013; Braud *et al.*, 2015). El que las infusiones de hojas frescas de *H. piperita* hayan presentado una actividad más alta por este método que las realizadas con hojas secas, es indicativo de mayormente la presencia de compuestos hidrosolubles o de alta polaridad, que presumiblemente son los que disminuyen durante el tiempo de secado (Figura 4A).

La IC₅₀ obtenida para las infusiones de hojas frescas de *H. piperita* para DPPH fue de 0.47 mg/mL, un valor que también ha sido reportado para infusiones de diversas plantas como *Cotula cinerea* (0.49 mg/mL), *Zizyphus lotus* (0.46 mg/mL) y *Marrubium vulgare* (0.38 mg/mL) (Bakchiche *et al.*, 2018). Aunque algunos extractos vegetales tienen una IC₅₀ menores como el de albahaca (*Ocimum basilicum*) que llega a valores de hasta 0.02 mg/mL (Bakchiche *et al.*, 2018), este valor puede ser considerado de óptima actividad antioxidante.

El ABTS es otro de los métodos más utilizados para determinar la capacidad de un antioxidante, también es un método práctico, rápido, de elevada sensibilidad y muy estable (Arnao, 2000), que a diferencia del DPPH, principalmente indica la captura de radicales tanto de compuestos de naturaleza hidrofílica como lipofílica (Antolovich *et al.*, 2002). La actividad antioxidante presentada por las infusiones de hojas de *H. piperita* determinada por este método, indica la presencia tanto de compuestos polares y de polaridad intermedia (Kuskoski *et al.*, 2005). La IC₅₀ con este método fue menor que la calculada para DPPH, con 0.35 mg/mL, valor que concuerda con lo reportado para infusiones de *Chenopodium botrys* (IC₅₀ de 0.53 mg/mL) (Ullah *et al.*, 2017).

Debido a la naturaleza acuosa de las infusiones, éstas se componen principalmente de compuestos tanto de polaridad alta como intermedia, como ácidos fenólicos, flavonoides, polifenoles y algunos de tipo terpénico (Miguel 2010; Torres-Martínez y Salgado-Garciglia, 2014), que son responsables muchos de ellos de la actividad antioxidante (Muñoz-Velázquez *et al.*, 2012; Ambriz-Pérez *et al.*, 2016). Debido a esto, las infusiones de hojas de *Hedeoma piperita* muestran actividad antioxidante tanto con DPPH como con ABTS, con el primer método por la presencia de compuestos solubles en agua como los ácidos fenólicos y con el segundo, debido al contenido de compuestos de polaridad intermedia como algunos flavonoides o terpenos.

Con ambos métodos de detección de la actividad antioxidante, se mostró que el proceso de secado de las hojas de *H. piperita* (almacenamiento por 30, 60 y 90 días) afectó dicha propiedad, disminuyendo la captación de radicales libres. Por lo tanto, estos resultados sugieren que durante el secado o almacenamiento de las hojas por 30 días, los compuestos que le confieren la actividad antioxidante a las infusiones de hojas fresca, se degradan o se pierden por lixiviación o volatilización.

Lo anterior es respaldado por lo reportado para infusiones de *Hypericum perforatum*, en las que el secado causó una reducción en el contenido de gran parte de los metabolitos analizados y por lo tanto una disminución en la actividad antioxidante (Mejía *et al.*, 2007). Sin embargo, el secado en otras plantas, no afecta la actividad antioxidante ni el contenido de los compuestos activos, como en hojas de *Lippia alba* (Diniz y Santarém, 2007), por lo que depende de la sensibilidad química de los componentes.

Contenido total de ácidos fenólicos, flavonoides y terpenoides

El contenido de fenoles totales de las diversas infusiones de *H. piperita*, osciló entre los 0.01 y 0.25 $\mu\text{moles EAG/mg p.f.}$, siendo la infusión de hojas frescas la que presentó

el mayor contenido y mostró la diferencia significativa en comparación a los demás tratamientos (Figura 5A).

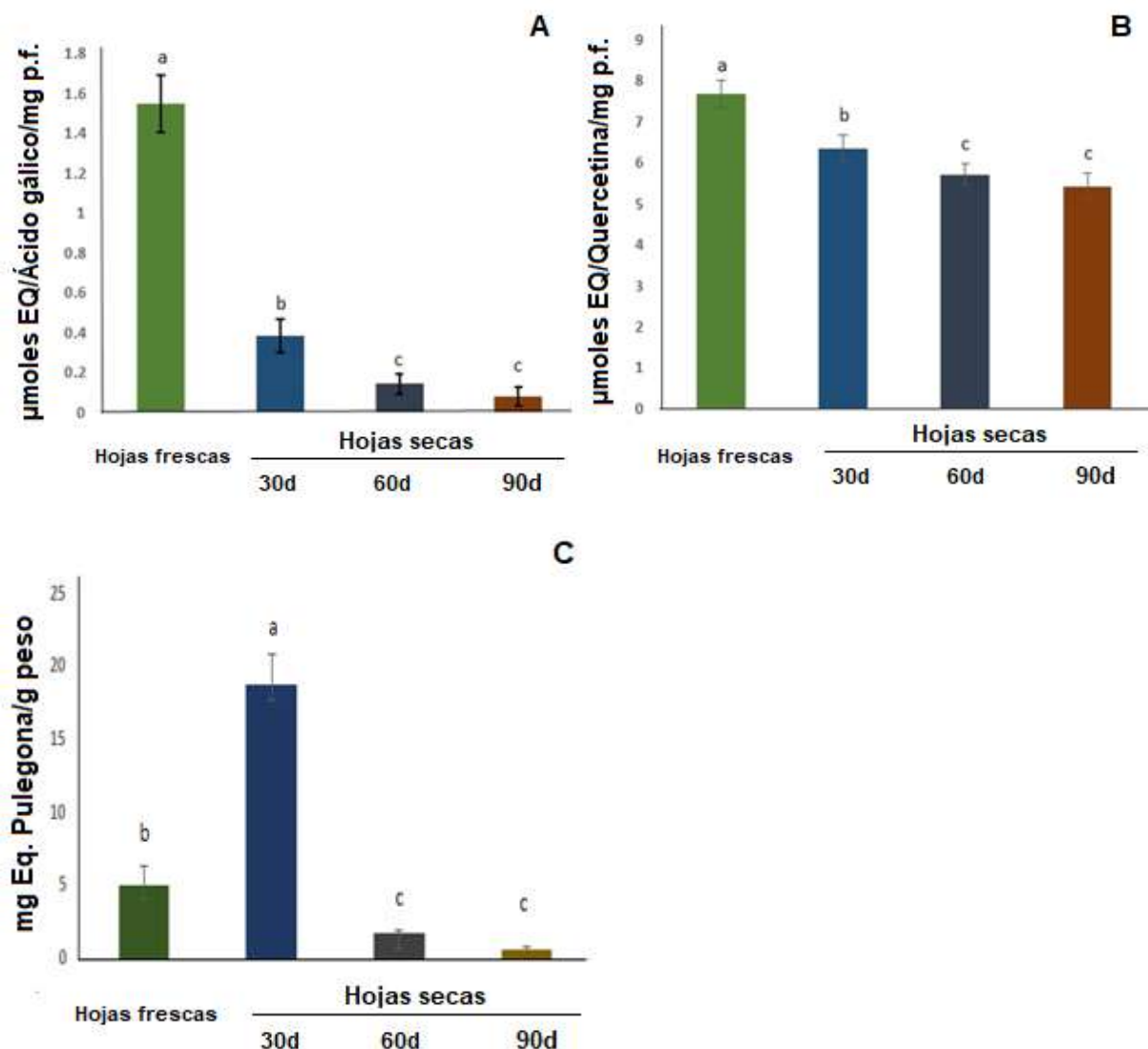


Figura 5. Contenido de ácidos fenólicos totales (A), flavonoides totales (B) y terpenoides totales (C) de infusiones de hojas de *Hedeoma piperita*, frescas y secas (30, 60 y 90 días de almacenamiento) expresado en μmoles de Ácido Gálico/mg peso fresco ($\lambda=725$ nm), μmoles de Quercetina/mg peso fresco ($\lambda=415$ nm) y mg Eq. Pulegona/g peso ($\lambda=538$ nm), respectivamente. Las letras diferentes indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$, $n=3$, prueba de Tukey).

Los resultados de las infusiones de hojas frescas de *Hedeoma piperita*, comparado con lo reportado en las infusiones de manzanilla en diferentes marcas de té, de

acuerdo a Muñoz-Velázquez *et al.* (2012), se encuentran por debajo de los resultados obtenidos (66.72 y 69.28 µg eq. AG/mL). Sin embargo, el contenido de fenoles fue similar a lo reportado en el té verde y el té negro (Moraes-de-Souza *et al.*, 2008).

El contenido de flavonoides también fue mayor en la infusión de hojas frescas de *H. piperita*, con valor de 7.69 µmoles EQ/mg p.f., encontrando diferencia significativa con los valores de las infusiones de hojas secas con 30, 60 y 90 días de almacenamiento, con un contenido menor a los 6.5 µmoles EQ/mg p.f. (Figura 5B).

Los resultados de flavonoides de infusiones de hojas frescas mostraron similitud con infusiones de árnica (Muñoz-Velázquez *et al.*, 2012) y su contenido se encuentra por encima de lo reportado por Padilla *et al.* (2018), quienes obtuvieron valores de 194 mg EQ/taza de bebida para té, en cuatro infusiones diferentes (té negro, té verde y manzanilla).

A diferencia a lo obtenido con el método establecido para la determinación del contenido de terpenoides totales, las infusiones de hojas secas (30 días) mostraron el más alto valor con un 18.75 mg Eq. Pulegona/g peso (Figura 5C) mostrando diferencia significativa a los valores encontrados en las infusiones de hojas frescas y con 60 y 90 días. Debido a la carencia de una cuantificación total de terpenos totales sobre el género *Hedeoma* la comparación con los datos obtenidos en el presente trabajo es difícil. Sin embargo, existen investigaciones en *Salacia oblonga* donde el contenido de terpenos reportado es de 96.2 mg/g, mayor a lo obtenido en infusiones de hojas secas (30 días) de *Hedeoma p.* (Malar, 2017). Posteriormente, los terpenos mayoritarios serán identificados y cuantificados por el método de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

Conclusiones

El tiempo de almacén de las hojas secas de *Hedeoma piperita* tuvo un efecto sobre la disminución en la actividad antioxidante de las infusiones, siendo las infusiones de

hojas frescas y secas almacenadas por 30 días las que mostraron mayor actividad, encontrando una relación directa como el mayor contenido tanto de ácidos fenólicos, flavonoides y terpenoides totales

Referencias

- Ambriz-Pérez, D. L., Leyva-López, N., Gutiérrez-Grijalva, E. P., y Heredia, J. B. 2016. **Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A Review.** *Cogent Food & Agriculture*, 2(1):1131412.
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., y Robards, K. 2002. **Methods for testing antioxidant activity.** *Analyst*, 127(1):183-198.
- Arnao, M.B. 2000. **Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case.** *Trends Food Sci. Technol*, 11(11):419-421.
- Arnao, M.B., Cano, A., y Acosta, M. 2001. **The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity.** *Food Chemistry*; 73(2):239-244.
- Arnous, A., Makris, D. P., y Kefalas, P. 2002. **Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece.** *Journal of Food Composition and Analysis*, 15(6):655-665.
- Aslantürk, Ö., y Çelik, T. 2013. **Antioxidant activity and anticancer effect of *Vitex agnus-castus* L. (Verbenaceae) seed extracts on MCF-7 breast cancer cells.** *Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics*, 66(3):257-267.
- Bakchiche, B., Guenane, H., Rezzoug, M., y Gherib, A. 2018. **DPPH Free Radical Scavenging activity of ethanolic extracts of twenty two medicinal species from south Algeria (Laghouat region).** *Journal of Medical and Surgical Research*, IV(3):469-474.
- Barboza, G. E. C., Núñez, J. J., Espinar, C. O. A., Bonzani, L., Filippa, N. E., Gutiérrez, E. M., y Cantero, J. J. 2006. **Flora Medicinal de la Provincia de Córdoba (Argentina): Pteridófitas y Antofitas silvestres o naturalizadas.** Museo Botánico Córdoba, 8(5):389-94.
- Bernardi, A. P. M., López-Alarcón, C., Aspée, A., Rech, S. B., Von Poser, G. L., Bridi, R. y Lissi, E. 2008. **Antioxidant activity in southern brazil *Hypericum* species.** *Journal of the Chilean Chemical Society*, 53(4):1658-1662.
- Bourgaud, F., Gravot A, Milesi S., y Gontier E. 2001. **Production of plant secondary metabolites: a historical perspective.** *Plant Science*, 161(5):839-51.
- Braud, L., Peyre L., de Sousa G., Armand M., Rahmani R. y Maixent J.M. 2015. **Effect of brewing duration on the antioxidant and hepatoprotective abilities of tea phenolic and alkaloid compounds in at-BHP oxidative stress-induced rat hepatocyte model.** *Molecules*, 20(8):14985-15002.
- Dade, M. M., Fioravanti, D. E., Schinella, G. R., y Tournier, H. A. 2009. **Total antioxidant capacity and polyphenol content of 21 aqueous extracts obtained from native plants of Traslasierra valley (Argentina).** *Boletín*

Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 8(6):529-539.

- Diniz, A. C. B., Astarita, L. V., & Santarém, E. R. 2007. **Alteração dos metabólitos secundários em plantas de *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae) submetidas à secagem e ao congelamento.** *Acta Bot. Bras.*, 21(2):443-450.
- Fagbohun, E. D., Egbebi, A. O., y Lawal, O. U. 2012. **Phytochemical screening, proximate analysis and in-vitro antimicrobial activities of methanolic extract of *Cnidoscolus aconitifolius* leaves.** *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 13(1):28-33.
- Fecka, I., y Turek, S. 2008. **Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques.** *Food Chemistry*, 108(3):1039-1053.
- Feriotto, G., Marchetti, N., Costa, V., Beninati, S., Tagliati, F., y Mischiati, C. 2018. **Chemical composition of essential oils from *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon citratus*, and *Rosmarinus officinalis*, and their effects on the HIV-1 Tat protein function.** *Chemistry & biodiversity*, 15(2):e1700436.
- Fernández-Giusti, A., Muñoz-Jáuregui, A. M., Solís-Ustría, M. F., Cambillo-Moyano, E. N., Ramos-Escudero, F., y Alvarado-Ortiz-Ureta, C. 2014. **Efecto de los polifenoles del vino tinto sobre el estado antioxidante y el estrés oxidativo en hipertensos.** *Rev. Soc. Peru. Med. Interna*, 27(3):110-114.
- García, A. Á., y Carril, E. P. U. 2011. **Metabolismo secundario de plantas.** *Reduca (biología)*, 2(3). 75 p.
- Ghorai, N, Chakraborty S, Gucchait S, Saha, SK, Biswas S. 2012. **Estimation of total terpenoids concentration in plant tissues using a monoterpene, Linalool as standart reagent.** *Protocol Exchange*, 5(10):1038.
- Gracia, N. M. 2009. **Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales.** *Universidad Autónoma de Querétaro. Rev. Acad.*, 1:1-4.
- Halliwell, B. 1999. **Antioxidant defense mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning).** *Free Radical research*, 31(4):261-72.
- Hseu, Y., Chang W., Chen C., Liao J., Huang C., Lu F., Chia Y., Hsu H., Wu J., Yang H. 2008. **Antioxidant activities of *Toona Sinensis* leaves extracts using different antioxidant models.** *Food and Chemical Toxicology*, 46(1):105-114.
- Hussain, A. I., Anwar, F., Sherazi, S. T. H., y Przybylski, R. 2008. **Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations.** *Food chemistry*, 108(3):986-995.
- Karamać, M., Kosińska, A. y Pegg, B.R. 2005. **Comparison of radical-scavenging activities for selected phenolic acids.** *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 14(2):165-170.
- Kim, D. O., Lee, K. W., Lee, H. J., & Lee, C. Y. 2002. **Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals.** *Journal of Agricultural and food chemistry*, 50(13):3713-3717.
- Kolewe, ME, Gaurav V y Roberts SC. 2008. **Pharmaceutically active natural product synthesis and supply via plant cell culture technology.** *Molecular Pharmaceutics*, 5(2):243-56.

- Kulišić, T., Dragović-Uzelac V. y Miloš M. 2006. **Antioxidant activity of aqueous tea infusions prepared from oregano, thyme and wild thyme.** *Food Technol. Biotechnol.*, 44(4):485-492.
- Kumar, R.A, Sridevi K, Kumar NV, Nanduri S. y Rajagopal S. 2004. **Anticancer and immunostimulatory compounds from *Andrographis paniculata*.** *J. Ethnopharmacol.*, 92(2-3):291-295.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J. y Fett, R. 2005. **Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25(4): 726-732.
- Labrinea, E. P y Georgiu, C. A. 2004. **Stopped-flow method for assessment of pH and timing effect on the ABTS total antioxidant capacity assay.** *Analytica Chimica acta*, 526(1):63-68.
- Leiva, Pereda, N. E., y Leyva Pereda, N. K. 2012. **Determinación de los metabolitos secundarios presentes en las hojas de *Crotton* sp (la tunga).** Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú. 61 p.
- Mejía, O., Marcial, J.; Sánchez, M. S.; Bonilla, C. R. y Vanegas, P. 2007. **Efecto de la altura y frecuencia de corte y secado en el rendimiento y calidad del aceite esencial de pronto alivio.** *Scientia et Technica*, 13(33):253-255.
- Miguel, M. G. 2010. **Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants.** *Flavour and Fragrance Journal*, 25(5):291-312.
- Moon, J. K., y Shibamoto, T. 2009. **Antioxidant assays for plant and food components.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5):1655-1666.
- Moraes-de-Souza, R. A., Oldoni, T. L. C., Regitano-d'Arce, M. A. B., y Alencar, S. M. 2008. **Antioxidant activity and phenolic composition of herbal infusions consumed in brazil.** *CYTA-Journal of Food*, 6(1):41-47.
- Morales, G., Paredes, A., Sierra, P. y Loyola, A. 2008. **Antioxidant activity of 50% aqueous-ethanol extract from *Acantholippia deserticola*.** *Biological research*, 41(2):151-155.
- Muñoz-Velázquez, E. E., Rivas-Díaz, K., Loarca-Piña, M., Flavia, G., Mendoza-Díaz, S., Reynoso-Camacho, R., y Ramos-Gómez, M. 2012. **Comparación del contenido fenólico, capacidad antioxidante y actividad antiinflamatoria de infusiones herbales comerciales.** *Revista Mexicana de Ciencias agrícolas*, 3(3):481-495.
- Özlem, S. A. Y Tülay A C. 2013. **Antioxidant activity and anticancer effect of *Vitex agnus-castus* L. (Verbenaceae) seed extracts on MCF-7 breast cancer cells.** *Caryologia: International Journal of Cytology*, 66(3):257-267.
- Padilla, M. F. O., Hernández, G. R., y García, A. C. 2018. **Estimación de compuestos bioactivos en bebidas a base de café y té.** *Jóvenes en la Ciencia*, 4(1):139-144.
- Pellegrini, E., Campanella, A., Cotrozzi, L., Tonelli, M., Nali, C., y Lorenzini, G. 2018. **Ozone primes changes in phytochemical parameters in the medicinal herb *Hypericum perforatum* (St. John's wort).** *Industrial Crops and Products*, 126:119-128.
- Prieto, P., Pineda, M., y Aguilar, M. 1999. **Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum**

- complex: specific application to the determination of vitamin E.** *Analytical biochemistry*, 269(2):337-341.
- Prior, R.L., Wu X. y Schaich K. 2005. **Standardized methods for determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements.** *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10):4290-4302.
- Roby, M. H. H., Sarhan, M. A., Selim, K. A. H., y Khalel, K. I. 2013. **Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.).** *Industrial Crops and Products*, 44:437-445.
- Roginsky, V. y Lissi E.A. 2005. **Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food.** *Food Chem.*, 92(2): 235-254.
- Santos, M. 2014. **Etnoecología, etnobotánica y aspectos ecológicos de las plantas útiles de la comunidad P'urhepecha San Juan Carapan, Michoacán.** Tesis de Lic., Universidad Intercultural Indígena de Michoacán.
- Schwarz, K., Bertelsen G., Nissen L., Gardner P., Heinonem M., Hopia A., Huynh-Ba T., Lambelet P., McPhail D., Skibsted L., y Tijburg L. 2001. **Investigation of plants extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds.** *European Food Research Technology*, 212(3):319-328.
- Singh, A. K., Dhamanigi, S. S., y Asad, M. 2009. **Anti-stress activity of hydro-alcoholic extract of *Eugenia caryophyllus* buds (clove).** *Indian Journal of Pharmacology*, 41(1):28-31.
- Sosa, S., Pace, R., Bornanciny, A., Morazzoni, P., Riva, A., Tubaro, A., y Loggia, R. D. 2007. **Topical anti-inflammatory activity of extracts and compounds from *Hypericum perforatum* L.** *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59(5): 703-709.
- Torres-Martínez, R., García-Rodríguez, Y.M., Ríos-Chávez, P., Saavedra-Molina, A., López-Meza, J.E., Ochoa-Zarzosa, A., y Salgado-Garciglia, R. 2018. **Antioxidant activity of the essential oil and its major terpenes of *Satureja macrostema* (Moc. and Sessé ex Benth.) Briq.** *Pharmacognosy Magazine*, 13(Suppl 4): S875-S880.
- Ullah, F., Iqbal, N., Ayaz, M., Sadiq, A., Ullah, I., Ahmad, S., y Imran, M. 2017. **DPPH, ABTS free radical scavenging, antibacterial and phytochemical evaluation of crude methanolic extract and subsequent fractions of *Chenopodium botrys* aerial parts.** *Pak. J. Pharm. Sci.*, 30(3):761-766.
- Villano, D., Fernández-Pachón M.S., Troncoso A.M y García-Parilla M.C. 2004. **The antioxidant activity of wines determined ABTS•+ method: Influence of simple dilution and time.** *Talanta*, 64(2):501-509.
- Zárate, R, Jaber-Vazdekis N, Cequier-Sánchez E, Gutiérrez-Nicolás F. y Ravelo A. 2008. **Biotechnology for the production of plant natural products.** *Studies in Natural Products Chemistry*, Vol. 34. Elsevier Science Publishers; p. 309-392.

7.2. CAPÍTULO II. Determinación del efecto antiinflamatorio de las infusiones de hojas frescas y secas de *Hedeoma piperita* en un modelo experimental de edema en pata de rata inducida por carragenina e identificación y cuantificación de compuestos bioactivos.

Resumen

Hedeoma piperita (Hierba de Santo Domingo) se utiliza como infusiones de las hojas en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de algunas enfermedades. Sin embargo, no existen estudios sobre las propiedades antiinflamatorias de éstas y se desconoce si hay diferencias de esta actividad entre hojas frescas y secas, así como el tiempo de almacenamiento. El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto antiinflamatorio de las infusiones de hojas frescas y secas almacenadas por 30 días de *H. piperita*, ya que éstas mostraron una alta actividad antioxidante y un mayor contenido de compuestos bioactivos como ácidos fenólicos, flavonoides y terpenoides (Capítulo I). Así mismo, se identificaron y cuantificaron los principales compuestos de tipo terpénico y fenólicos por técnicas cromatográficas (CG-EM y HPLC, respectivamente). Las infusiones se prepararon con 20 g de hojas de *H. piperita* en 1 L de agua a 90 °C durante 10 minutos en un recipiente cerrado. La determinación del efecto antiinflamatorio mediante la administración tópica, fue realizada por el método adaptado de edema de pata inducido por carragenina en ratas macho Wistar. Los tratamientos se administraron a dosis de 0.1, 1 y 10 mg/kg y se midió el tamaño del diámetro (base plantar al empeine) de la pata mediante un micrómetro manual. La actividad antiinflamatoria de las infusiones de hojas de *H. piperita* fue dependiente del secado de las hojas (frescas y secas) y de las dosis (0.1, 1 y 10 mg/kg), ya que las infusiones de hojas secas (30 días de almacén) de *H. piperita* mostraron una mayor actividad antiinflamatoria que las infusiones de hojas frescas, con una dosis de 10 mg/kg, con un porcentaje de actividad antiinflamatoria máximo de 77%, un efecto similar al que produce el ibuprofeno a las 24 h (78.8%). La determinación del efecto antiinflamatorio con tratamiento oral, se realizó con la administración de las dosis de mayor efecto antiinflamatorio por administración tópica durante 28 días en las ratas macho Wistar. Los resultados muestran un efecto antiinflamatorio de 76 y 83% con la administración oral de las infusiones de hojas frescas y secas de *H. piperita* en una dosis de 10 mg/kg. Tanto en las infusiones de hojas frescas como secas, se observó un contenido similar de compuestos terpénicos, encontrando la pulegona, mentol y mentona, como los monoterpenos mayoritarios; en infusiones de hojas frescas fue mayor el contenido de compuestos fenólicos que en hojas secas, con ácido gálico y catequina como los mayoritarios. Estos resultados sugieren que éstos compuestos son responsables de la actividad antiinflamatoria.

Palabras clave: Infusiones de hojas, carragenina, inflamación, hierba de Santo Domingo.

Abstract

Hedeoma piperita (Hierba de Santo Domingo) is used as leaves infusions in traditional Mexican medicine for the treatment of some diseases. However, there are no studies on the anti-inflammatory property and it is unknown if there is difference in this activity between fresh and dried leaves, as well as the storage time. The objective of the present study was to determine the anti-inflammatory effect of infusions of fresh and dried leaves stored for 30 days of *H. piperita*, since they showed a high antioxidant activity and a higher content of bioactive compounds such as total phenolic acids, flavonoids and terpenoids (Chapter I). The main terpene and phenolic compounds were also identified and quantified by chromatographic techniques (GC-MS and HPLC, respectively). The infusions of *H. piperita* were prepared with 20 g leaves in 1 L of water at 90 °C for 10 min in an enclosed container. The anti-inflammatory effect was performed for topical administration in the adapted method of carragenin-induced leg edema in Wistar rats, the treatments were administered at a dose of 0.1, 1 and 10 mg/kg and the diameter size was measured (plantar base at the instep) of the leg using a manual micrometer. The anti-inflammatory activity of leaf infusions of *H. piperita* was dependent on the drying of the leaves (fresh and dried) and dose-dependent (0.1, 1 and 10 mg/kg). The infusions of the leaves (30 days' store) of *H. piperita* showed higher anti-inflammatory activity than infusions of fresh leaves, with a dose of 10 mg/kg, with a maximum percentage of anti-inflammatory activity of 77%, an effect similar to that produced by ibuprofen at 24 h (78.8%). The oral treatment, was performed with the administration of doses with the highest anti-inflammatory effect by topical administration, during 28 days in male Wistar rats. The results show an anti-inflammatory effect of 76 and 83% with oral administration with oral administration of both the infusions of fresh and dried leaves of *H. piperita* at a dose of 10 mg/kg. Infusions of fresh and dried leaves, present similarity in the content of terpenic compounds, the major monoterpenes were pulegone, menthol and menthona. The infusion of fresh leaves had a higher content of phenolic compounds than that of dried leaves, with gallic acid and catechin being the main phenolic compounds. The results suggest that these compounds are responsible for anti-inflammatory activity.

Keywords: Leaf infusions, carrageenan, inflammation, Santo Domingo herb.

Introducción

La actividad antiinflamatoria de compuestos fenólicos (ácidos fenólicos y flavonoides) y de terpenos, está relacionada con el estrés oxidativo y la inflamación. Un incremento de las especies reactivas tanto de oxígeno (ERO) como de nitrógeno (ERN), activan vías de señalización relacionadas con la inflamación, como la activación del factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B) que controla la transcripción de genes que

codifican la expresión de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-2, IL-8, TNF- α), quimiocinas y otras proteínas implicadas en la fase aguda de procesos inflamatorios (Choi *et al.*, 2003; Seo *et al.*, 2008).

Además, se ha comprobado que el estrés oxidativo produce un aumento de enzimas implicadas en la liberación de citocinas proinflamatorias como las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) y la lipoxigenasa (LPO) (Fan *et al.*, 2008). Diversas moléculas con actividad antioxidante suprimen o disminuyen la expresión de estas enzimas en estudios con modelos *in vitro* (líneas celulares de cáncer) e *in vivo* (modelos de inflamación y diabetes). La quercetina, uno de los flavonoides principales de las infusiones del té negro (*Camelia sinensis*) suprime la expresión de la COX-2 en las células de cáncer de colon (Lu *et al.*, 2000).

Diversos metabolitos secundarios producidos por las plantas medicinales, poseen tanto actividad antioxidante como antiinflamatoria. Los componentes activos de la manzanilla (*Chamaemelum nobile*) tales como los terpenoides (bisabolol, matricina, chamazuleno) y los flavonoides (apigenina, luteolina), poseen efectos antiinflamatorios y calmantes en pacientes con diversas dermatosis inflamatorias (Merfort *et al.*, 1994). Esta actividad, recientemente se ha relacionado con el efecto sobre los mediadores de la inflamación, un ejemplo de ello son los efectos antioxidantes de las infusiones de la manzanilla (*Chamaemelum nobile*), de salvilla (*Buddleia scordioides*) y del laurel (*Listea glaucescens*), que se ha relacionado directamente con la disminución de NF- κ B, COX-2, TNF- α , e IL-8 (Herrera-Carrera *et al.*, 2015). Así mismo, algunos flavonoides presentes en el cacao (*Theobroma cacao*) y el té verde (*Camelia sinensis*) han demostrado modular los mediadores de la inflamación, como la IL-6 en el plasma sanguíneo, por lo que se recomienda el consumo de estos productos (Stote *et al.*, 2012).

Uno de los principales modelos de experimentación para estimar la inflamación en fase aguda es el modelo de edema subplantar en ratas inducido con carragenina. Este modelo permite cuantificar, de manera sencilla y reproducible, dos parámetros

característicos de la inflamación como lo es el edema y la extravasación de plasma al inducir una inflamación aguda localizada en la pata del animal, tras la administración de carragenina por vía subplantar (Winyard y Willoughby, 2003). La carragenina al ser un polisacárido sulfatado formado por unidades de galactosa y de anhidrogallactosa, produce una respuesta edematogénica, que desencadena vías inmunitarias innatas de la inflamación y promueve la producción de mediadores inflamatorios como los tromboxanos, prostaglandinas e histamina, entre otras moléculas relacionadas con la inflamación (Vázquez *et al.*, 2015).

En el presente capítulo se presenta el método de estandarización de inflamación aguda en pata de ratas Wistar Macho, inducida con carragenina, con el que se determinó el efecto antiinflamatorio tanto por administración tópica como oral, de las infusiones de hojas de *Hedeoma piperita*, frescas y secas con un tiempo de almacén de 30 días, las que mostraron un mayor contenido de compuestos activos y alta actividad antioxidante (Capítulo I).

Materiales y métodos

Material biológico

Plantas. Se utilizaron plantas de *Hedeoma piperita* Benth. cultivadas por 60 días en condiciones de invernadero del laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Animales. Se utilizaron Ratas Wistar macho con un peso promedio de 350 g. Los animales fueron alojados y aclimatados con ciclos de 12 h luz/oscuridad, con alimento controlado y agua *ad libitum*, siguiendo las recomendaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio).

Obtención de las infusiones

Se obtuvieron infusiones de hojas tanto de materia fresca y seca, de *H. piperita*. El secado de las hojas se realizó en un deshidratador comercial marca Mey key durante 2 h a 60°C y fueron almacenadas por 30 días en oscuridad, con una humedad relativa (HR) menor al 60% y a temperatura ambiente. Las infusiones se prepararon colocando 0.05 g de hojas por 2.5 mL de agua, equivalente a 5 g/250 mL, en agua a temperatura de ebullición, las que se cubrieron y se dejaron reposar por 30 min. Posteriormente, las infusiones fueron filtradas para separar el material vegetal, preparándolas a una concentración de 10 mg/mL, las que se almacenaron en condiciones de congelación (-4° C) hasta su análisis.

Establecimiento del método de edema inducido por carragenina

Con el propósito de determinar la concentración de carragenina para lograr una óptima inflamación, se administraron tres dosis (1, 2 y 3%, en una disolución de NaCl 0.9%) en dos volúmenes (25 y 50 µL) (n=3). La carragenina se administró por vía subcutánea en la pata trasera derecha. El tamaño del diámetro (base plantar al empeine) de la pata fue medido antes de la administración de la carragenina y después de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 24 h, mediante un micrómetro manual (Mitutoyo™). El tamaño promedio de la pata de las ratas en estudio fue de 3.5 mm.

Método para determinar el efecto antiinflamatorio

Determinación del efecto antiinflamatorio con tratamiento tópico. Para la determinación del efecto antiinflamatorio mediante la administración tópica, se usó el método adaptado de edema de pata inducido por carragenina (Winter *et al.*,1962), administrando 50 µL de carragenina al 1%, según los resultados del apartado anterior. Se utilizaron 8 grupos de ratas (n=5) (Cuadro 4), a las que se les aplicaron las infusiones de hojas frescas y secas (almacenadas por 30 días) de *H. piperita* en las dosis de 0.1, 1 y 10 mg/kg, agua y e ibuprofeno (25 mg/kg), con administración tópica

a las 4 h de la inducción de la inflamación, ya que a este tiempo se obtuvo la inflamación máxima.

La inflamación se obtuvo determinando los cambios en el tamaño de la pata, medidos con el micrómetro manual desde la hora inicial (4 h) y por 5, 6, 7 y 8 h posteriores, presentándose los resultados como porcentaje de la actividad antiinflamatoria determinada con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad antiinflamatoria (\%)} = \left(1 - \frac{\text{mm de la extremidad a evaluar} - \text{mm de la extremidad sin inflamar}}{\text{mm que aumenta la extremidad durante la inflamación máxima}}\right) \times 100$$

Cuadro 4. Tratamientos para la determinación del efecto antiinflamatorio con tratamiento tópico de las infusiones de hojas frescas y secas (almacenadas por 30 días) de *H. piperita* (n=5).

Grupos	Tratamiento
1 Control negativo	Agua
2 Control positivo	Ibuprofeno 25 mg/kg
3 Dosis I: Infusión de hojas frescas	0.1 mg/kg de infusión
4 Dosis II: Infusión de hojas frescas	1 mg/kg de infusión
5 Dosis III: Infusión de hojas frescas	10 mg/kg de infusión
6 Dosis I: Infusión de hojas secas	0.1 mg/kg de infusión
7 Dosis II: Infusión de hojas secas	1 mg/kg de infusión
8 Dosis III: Infusión de hojas secas	10 mg/kg de infusión

Determinación del efecto antiinflamatorio con tratamiento oral. Para la determinación del efecto antiinflamatorio oral, se administró un volumen de 50 µL por medio de una cánula de las infusiones de hojas frescas y secas almacenadas por 30 días de *H. piperita* durante 28 días consecutivos, así como de agua e ibuprofeno. Posteriormente, el día 29, se indujo la inflamación por el método adaptado de edema de pata inducido por carragenina (Winter *et al.*, 1962).

Se utilizaron 4 grupos de ratas (n=5) (Cuadro 5), a las que se les aplicaron las infusiones de hojas frescas y secas (almacenadas por 30 días) de *H. piperita* en las dosis de 10 mg/kg, agua y e ibuprofeno (25 mg/kg), con administración oral y se midió con un micrómetro a partir de las 4 h (máxima inflamación) a las 1, 2, 3, 4 y 24 h, para determinar la actividad antiinflamatoria con la fórmula mencionada anteriormente.

Cuadro 5. Tratamientos para la determinación del efecto antiinflamatorio con tratamiento oral de las infusiones de hojas frescas y secas (almacenadas por 30 días) de *H. piperita* (n=5).

Grupos	Tratamiento
1 Control negativo	Agua
2 Control positivo (dosis)	Ibuprofeno 25 mg/kg
3 Dosis I: Infusión de hojas frescas	10 mg/kg de infusión
4 Dosis II: Infusión de hojas secas	10 mg/kg de infusión

Cuantificación e identificación de compuestos terpénicos mayoritarios. La identificación y cuantificación de los compuestos terpénicos se llevó a cabo por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), método reportado por Torres-Martínez *et al.* (2014), realizado en el Laboratorio de Ecología Química del Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad de la UNAM, campus Morelia. Se inyectó un volumen de 1 µL de muestra en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies (7890A) equipado con un detector de masas (Agilent 5975C), que operó utilizando helio como gas acarreador; con un flujo de 1 mL/min; con inyección dividida (split 50:1), a una temperatura de 250 °C en una columna capilar no polar HP 5MS (30 m x 0.25 mm I.D. x 0.25µm Film) con las siguientes condiciones: temperatura inicial de 50 °C; seguida por una rampa de 5 °C min⁻¹ para alcanzar 280 °C por 1 min; otra rampa de 25 °C min⁻¹ para llegar a 380 °C, hasta 3 min. El tiempo de corrida fue de 50 min. El espectrómetro de masas funcionó

a una velocidad de flujo de 1 mL/min, con un voltaje de ionización a 70 eV, a una temperatura de la interfase de 250 °C, en modo SCAN y en un intervalo de masas de 50-500 m/z.

La identificación de los compuestos se llevó a cabo por comparación de su espectro de masas y el tiempo de retención, de acuerdo a la base de datos espectrales NIST/EPA/NIH, “Chem Station” Agilent Technologies Rev. D.04.00 2002). La cuantificación se realizó con el área bajo la curva de cada uno de los picos correspondientes a los compuestos (Velázquez-Becerra *et al.*, 2013).

Cuantificación e identificación de compuestos fenólicos mayoritarios. El análisis se realizó por la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), utilizando el equipo HP 1090 Series II, acoplado a una bomba de separación LPG-3400RS y de auto-inyección WPS-3000, con un detector rápido de separación con arreglo de diodos (DAD-3000RS). Los compuestos fenólicos fueron separados mediante una columna HP C18 (4.6 x 150 mm; 5µm) a una temperatura de 30 °C. Los datos, integración de picos y calibración, se analizaron con el software Dionix Chromeleon (Versión 6.80 RS 10).

Las condiciones del análisis de muestras, consistió en una fase móvil de acetonitrilo (disolvente A), una solución de ácido acético a pH 3.0 (disolvente B) y metanol (disolvente C), utilizando el siguiente programa de gradiente de elución: 0 min, 5%A/95%B; 10 min, 10%A /80%B /10%C; 20 min, 20%A /60%B /20%C y 30 min, 100%A.; con un flujo de 1 mL/min y un volumen de inyección de 10 µL. La detección se realizó con ultravioleta (UV) a una longitud de onda (λ) específico para compuestos fenólicos: λ 280 nm por 18.0 min con un cambio a λ 320 nm y mantenida por 6 min, finalmente se cambió a λ 380 nm, dejando en un rango de 200 nm a 700 nm. Con estas condiciones y longitudes de onda, se realizó la detección (identificación) y cuantificación de ácido cafeico, ácido cumárico, ácido gálico, ácido elágico, ácido vainílico, catequina, epicatequina, quercetina y rutina (Sigma-Aldrich, México).

Cada compuesto fue preparado en una concentración de 10 µg/mL y se mezclaron para tener una solución estándar, que después de preparada fue mantenida en oscuridad a 5°C, utilizada como estándar para corroborar la identidad de cada compuesto. La cuantificación se obtuvo por comparación de los picos obtenidos de cada compuesto estándar, utilizando el tiempo de retención y mediante curvas de calibración, establecidas con las áreas de cada pico respectivas a cada concentración. Los datos se representan como la media $\pm$ la desviación estándar de análisis independiente por triplicado.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media $\pm$ desviación estándar (n=5) y se procesaron mediante un análisis de varianza de una vía; las medias se compararon con la prueba de Tukey con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$, usando el software JMP.

Resultados y discusión

Establecimiento del modelo de inflamación

El establecimiento del modelo de inflamación con aplicación subcutánea en la pata de ratas macho Wistar, de 25 y 50 µL con tres concentraciones de carragenina (1%, 2% y 3%), se estableció el volumen y la concentración óptima para inducir un edema. Con la aplicación de 50 µL de carragenina al 1% se consiguió un volumen de inflamación de 7 mm; un valor considerado como el 100% de inflamación, seleccionado como óptimo para determinar el efecto antiinflamatorio de las infusiones de hojas de *H. piperita*; con 25 µL en cualquiera de las concentraciones de carragenina no se presentó la formación del edema, por lo que el volumen de 50 µL fue elegido para la inducción, ya que con éste se indujo el edema. Aunque con las tres concentraciones de carragenina se observó la formación del edema, con 2 y 3% el volumen fue demasiado alto (8-9 mm), por lo que fueron descartados ya que el modelo indica trabajar con un

tiempo de inflamación máxima de 3-4 h y un volumen de edema no mayor a 7 mm (Figura 6) (Whiteley y Dalrymple, 1998; Kumar *et al.*, 2004).

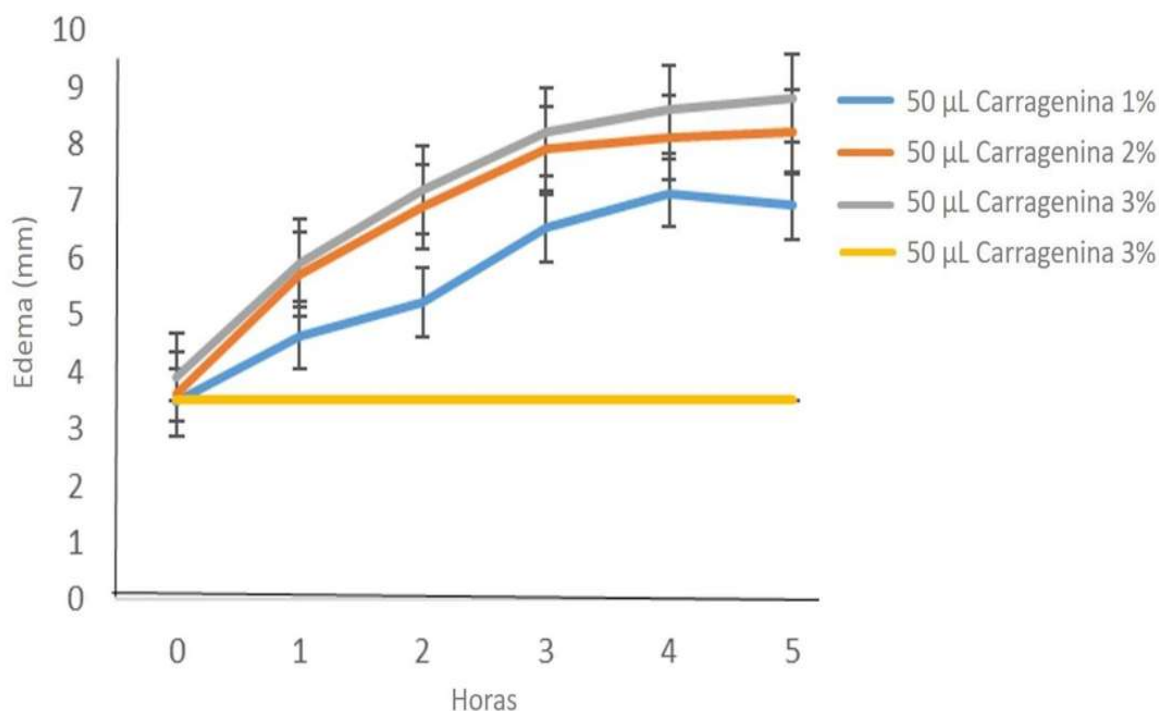


Figura 6. Tamaño del edema (mm) en la pata de la rata inducida con carragenina (1, 2 y 3%) con administración subcutánea de 25 y 50 µL, a partir de 1 h después de la inducción. Los valores son presentados como promedio $\pm$ la desviación estándar (n=3).

Efecto antiinflamatorio de las infusiones de hojas de *H. piperita* con tratamiento tópico

Para la determinación del efecto antiinflamatorio tópico de las infusiones de hojas de *H. piperita*, tanto frescas como secas almacenadas por 30 días, se obtuvieron los valores del porcentaje antiinflamatorio, 4 h después de la inducción de la inflamación, el diámetro de la pata inyectada fue medido a las 4, 5, 6, 7, 8 y 24 h y se comparó con el efecto ejercido con los tratamientos control (agua) e ibuprofeno (25 mg/kg). La dosis de ibuprofeno se seleccionó debido a que a las 8 h mostró una máxima inhibición de la inflamación con un 78.8%, que se mantuvo hasta las 24 h de la medición.

Los resultados muestran un efecto antiinflamatorio dependiente de la dosis de las infusiones tanto de las hojas frescas como secas de *H. piperita*, ya que a una menor dosis (0.1 mg/kg), los porcentajes de la actividad antiinflamatoria estuvieron en intervalos de 30 – 38.9 % desde las 4 hasta las 24 h del ensayo, sin diferencias significativas entre los tiempos de medición y el tipo de infusiones. A las 24 h, las infusiones de hojas secas a esta concentración mostraron 38.5% de actividad antiinflamatoria y las de hojas frescas un 30%, un efecto menor, 2 y 2.7 veces menos al presentado por el ibuprofeno. Con la aplicación de agua como tratamiento control, la inflamación se mantuvo en un 90% (Figura 7A).

Con la dosis de 1 mg/kg, se obtuvo una respuesta antiinflamatoria similar al mostrado con la dosis más baja probada, no encontrando diferencias significativas entre el efecto de las infusiones de hojas frescas con el de las hojas secas, aunque los porcentajes de la actividad antiinflamatoria estuvieron en un intervalo de 44 – 55 %, aproximadamente un 15% más que con 0.1 mg/kg. A las 24 h, los valores fueron de 48% con hojas secas y 42% con hojas frescas, 1.6 y 1.8 veces menos que el efecto del ibuprofeno a este tiempo de la medición (Figura 7B).

Un efecto antiinflamatorio mayor fue obtenido con la aplicación de las infusiones de hojas frescas y secas, en la dosis máxima probada (10 mg/kg), encontrando diferencias significativas entre ambos tipos de infusiones. Los porcentajes de actividad antiinflamatoria de las infusiones de hojas frescas fluctuaron entre 50 – 60 %, sin mostrar diferencias significativas en los diferentes tipos de la medición (4-24 h), aunque hubo un máximo de actividad a las 5 h con un 58% y una tendencia a disminuir con el tiempo del tratamiento. El efecto antiinflamatorio fue menor al ejercido por el ibuprofeno (Figura 7C). Sin embargo, las infusiones de hojas secas en la dosis de 10 mg/kg con un tiempo de almacén de 30 días, mostraron un efecto antiinflamatorio mayor que el presentado por las hojas frescas a esta misma dosis y con las infusiones a las dosis de 0.1 y 1 mg/kg.

El intervalo de los porcentajes de inflamación fue de 63 – 77%, con un efecto antiinflamatorio máximo desde las 5 h de la inducción de la inflamación con un 73%, el que se mantuvo con ligeros cambios hasta las 24 h, sin diferencias significativas, aunque se observó una tendencia a aumentar la actividad a las 24 h, con un 77%, valor similar al que produce el ibuprofeno a las 24 h (78.8%), con el que no hubo diferencias significativas (Figura 7C).

Sin embargo, las infusiones de hojas secas en la dosis de 10 mg/kg con un tiempo de almacén de 30 días, mostraron un efecto antiinflamatorio mayor que el presentado por las hojas frescas a esta misma dosis y con las infusiones a las dosis de 0.1 y 1 mg/kg. El intervalo de los porcentajes de inflamación fue de 63 – 77%, con un efecto antiinflamatorio máximo desde las 5 h de la inducción de la inflamación con un 73%, el que se mantuvo con ligeros cambios hasta las 24 h, sin diferencias significativas, aunque se observó una tendencia a aumentar la actividad a las 24 h, con un 77%, valor similar al que produce el ibuprofeno a las 24 h (78.8%), con el que no hubo diferencias significativas (Figura 7C).

Con estos resultados se demuestra que las infusiones de hojas secas (30 días de almacén) de *H. piperita* administradas de forma tópica, mostraron la mayor actividad antiinflamatoria con una dosis de 10 mg/kg, desde las 5 h de inducida la inflamación y con un porcentaje de actividad antiinflamatoria máximo de 77% a las 24 h, similar al efecto producido por la aplicación del antiinflamatorio comercial (78.8%).

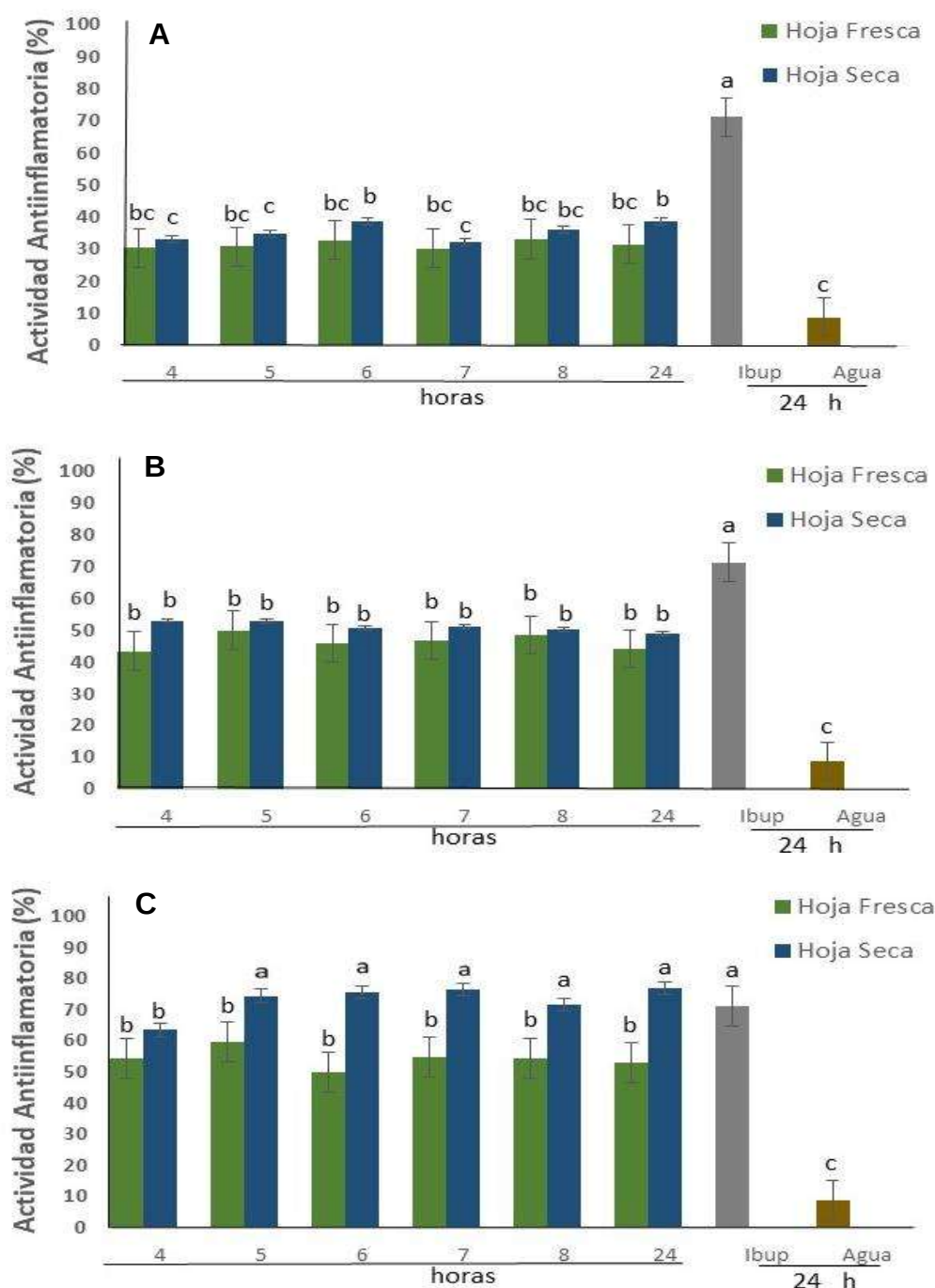


Figura 7. Porcentajes de la actividad antiinflamatoria de infusiones de hojas frescas y secas (almacenada por 30 días) de *H. piperita* obtenidos con el modelo de edema en pata de ratas macho Wistar inducido por carragenina (50 μ L, 1%), con la administración tópica de 50 μ L de tres dosis: A) 0.1 mg/kg; B) 1 mg/kg; C) 10 mg/kg. Se administró ibuprofeno (25 mg/kg) como control positivo (Ibup) y agua como control negativo. Letras distintas indican diferencia significativa (Tukey, $p \leq 0.05$, $n=5$).

Efecto antiinflamatorio de infusiones de hojas de *H. piperita* con tratamiento oral

Para la determinación del efecto antiinflamatorio con tratamiento oral de las infusiones de hojas de *H. piperita*, frescas y secas almacenadas por 30 días, administradas durante 28 días consecutivos, se obtuvieron los valores del volumen del edema en el modelo de inflamación en la pata de ratas macho Wistar inducido por carragenina (50 μ L, 1%). Los resultados se presentan como porcentaje de la actividad antiinflamatoria desde las 1, 2, 3, 4 y 24 h después de la inflamación máxima (4 h) que se comparó con el efecto ejercido con los tratamientos control (agua) e ibuprofeno (25 mg/kg).

Los resultados muestran un efecto antiinflamatorio por arriba del 59% en ambos tratamientos. Con las hojas frescas, los porcentajes de la actividad antiinflamatoria se presentaron en intervalos de 59 – 76 %, mientras que con las hojas secas fueron del 62 al 83%; desde las 1 hasta las 24 h del ensayo, encontrando a las 24 h la mayor actividad antiinflamatoria tanto de hoja fresca como de hoja seca con un 76% y 83% de actividad antiinflamatoria, respectivamente; con un efecto mayor a lo obtenido con el ibuprofeno y mostrando diferencias significativas entre el efecto a las 1, 2, 3 y 4 h, de igual manera que con los tratamientos controles. Con la aplicación de agua como tratamiento control, la inflamación se mantuvo en un 90% (Figura 8).

Con estos resultados se demuestra que las infusiones de hojas frescas y hojas secas (30 días de almacén) de *H. piperita* mostraron la mayor actividad antiinflamatoria con una dosis de 10 mg/kg, con un porcentaje de actividad antiinflamatoria máxima a las 24 h después de ser inducida la inflamación, mayor al efecto producido por la aplicación del antiinflamatorio comercial, el que mostró solo un 60% de actividad antiinflamatoria (Figura 8).

Los valores de los porcentajes de la actividad antiinflamatoria de los extractos vegetales son dependientes de la especie de la planta, de la parte, de la edad, de la fenología y de las condiciones de cultivo y almacén de ésta, así como de la dosis en que se aplican (Barboza *et al.*, 2006). En plantas de poleo (*Lippia alba*), la actividad

antioxidante y antiinflamatoria fue mayor con las hojas secas que con las frescas, encontrando un alto contenido de los componentes principales en las hojas secas (Ospina *et al.*, 2016).

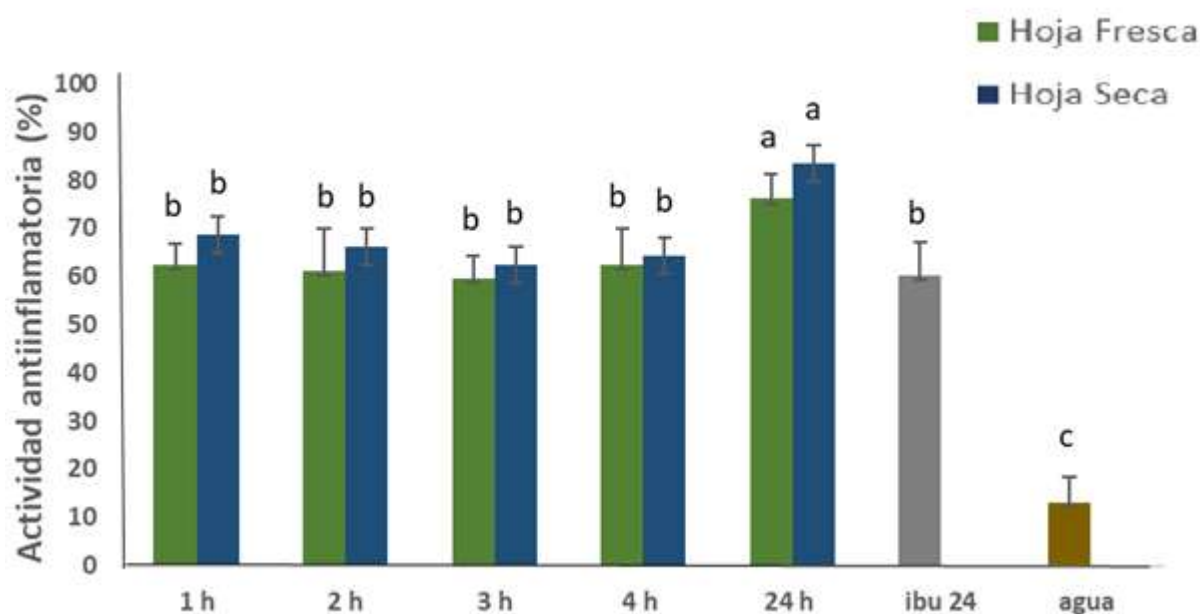


Figura 8. Porcentajes de la actividad antiinflamatoria de las infusiones de hojas frescas y secas (almacenada por 30 días) de *H. piperita* obtenidos con el modelo de edema en la pata de ratas macho Wistar inducido por 50 μ L carragenina (1%), con la administración oral de 50 μ L a una dosis de 10 mg/kg. Se administró ibuprofeno (25 mg/kg) como control positivo (Ibup) y agua como control negativo. Letras distintas indican diferencia significativa (Tukey, $p \leq 0.05$, $n = 5$).

Los porcentajes de actividad antiinflamatoria se han reportado en intervalos mayores al 30% en las dosis más bajas probadas, como el porcentaje de actividad antiinflamatoria del 36% encontrado para *Morinda citrifolia* (Brito *et al.*, 2014) y en *Costus pictus* (Morón *et al.*, 2013), utilizando el modelo de edema en pata de rata inducido por carragenina. Con este mismo modelo se ha descrito que extractos de *Citrus aurantifolia* han mostrado un 55% de actividad antiinflamatoria, un porcentaje considerado con una respuesta antiinflamatoria moderada, pero que se ha propuesto

con gran utilidad desde el punto de vista clínico en los procesos inflamatorios agudos (Brito *et al.*, 2014).

De esta manera, un efecto antiinflamatorio óptimo se considera al encontrar valores de actividad antiinflamatoria superiores al 70%, como lo reportado para dexametasona (1 mg/kg) con un porcentaje de actividad antiinflamatoria mayor al 70% por administración vía tópica (Brogden y Wagstaff, 1997). Pocos son los extractos vegetales que se han reportado con alto efecto antiinflamatorio a dosis menores de 100 mg/kg, tal es el caso de un extracto etanólico de sábila (*Aloe vera*) con un porcentaje de inhibición de 71% con 12.2 mg/kg (Okoli *et al.*, 2002) y del extracto metanólico de hojas de *Bauhinia x blackeana*, con el que se han obtenido porcentajes de actividad antiinflamatoria del 76% a una dosis de 3 mg/kg en extracto metanólico (Radhika y Shravani, 2018).

Villena y Arroyo (2013) han evaluado extractos de *Oenothera rosea* frente a la inflamación crónica, a través del modelo inducido por carragenina en ratas, encontrando evidencias del efecto antiinflamatorio similar al producido por dexametasona e ibuprofeno. Otros ensayos, sobre el modelo experimental del edema subplantar inducido por carragenina en ratas, comprueban el uso de la carragenina para el desarrollo del experimento; el edema que produce es menos modificado por factores ajenos a los propiamente característicos de la inflamación y la actividad antiinflamatoria de esta prueba guarda correlación con la actividad antiinflamatoria en la clínica (CYTED, 1995).

Los resultados obtenidos con la administración tanto tópica como oral de las infusiones frescas y secas por 30 días de *H. piperita*, concuerdan con lo reportado por Casado *et al.* (2010), que mencionan que al evaluar la actividad antiinflamatoria *in vivo* por inducción de edema plantar con carragenina en ratas y la actividad antioxidante *in vitro* mediante la neutralización del radical DPPH del extracto metanólico de *Jungia paniculata*, determinaron que dicho extracto presenta una alta actividad antiinflamatoria y alta actividad antioxidante.

Principales compuestos terpénicos presentes en las infusiones de *H. piperita*

Tanto en las infusiones de hojas frescas como de hojas secas (almacenadas por 30 días) de *H. piperita*, por CG-EM se identificaron cuatro compuestos mayoritarios: pulegona, mentol, neomentol y mentona (Figura 9); el de mayor contenido es la pulegona con 15.12 y 15.6 %, seguidas del mentol 10.77 y 10.02 %, respectivamente (Cuadros 6 y 7). Otros compuestos terpénicos presentes en ambas infusiones, pero en un menor contenido son: isopulegol, isomentol y neo isomentol, este último no se observó en las hojas secas.

Los aceites esenciales de ciertas plantas, compuestos mayormente por terpenos, han sido reportados con actividad antiinflamatoria y cada vez más se estudian para evaluar los componentes responsables. Entre éstos, los monoterpenos han sido algunos de los de mayor actividad, como el 1,8-cineol (eucaliptol), limoneno, citral, α -pineno, mentol, linalol, timol, canfor y borneol, que constituyen el aceite esencial de diversas plantas aromáticas como eucalipto, mejorana, tomillo, lavanda, menta, geranio, pino, salvia y romero, han mostrado un fuerte efecto antiinflamatorio y actividad inmunomoduladora (Kedzia *et al.*, 1998; Frum y Viljoen, 2006). En particular, los terpenos como el mentol, la mentona, del aceite esencial de menta (*Mentha piperita*) son considerados como parte de los compuestos responsables de la actividad tanto antioxidante como antiinflamatoria (Sun *et al.*, 2014).

Además, la mentona y la pulegona han mostrado una alta inhibición de la actividad de COX-2, incluso por encima de la aspirina (Kawata *et al.*, 2008). La pulegona presenta actividad antiinflamatoria debido a que inhibe la producción de No y la expresión de los genes de las enzimas iNOS y COX-2, y regula el NF- κ B así como la activación de MAP cinasas, por lo que este terpeno es considerado con un alto potencial terapéutico y de aplicación preventiva en varias enfermedades que cursan con procesos de inflamación (Anupom *et al.*, 2018).

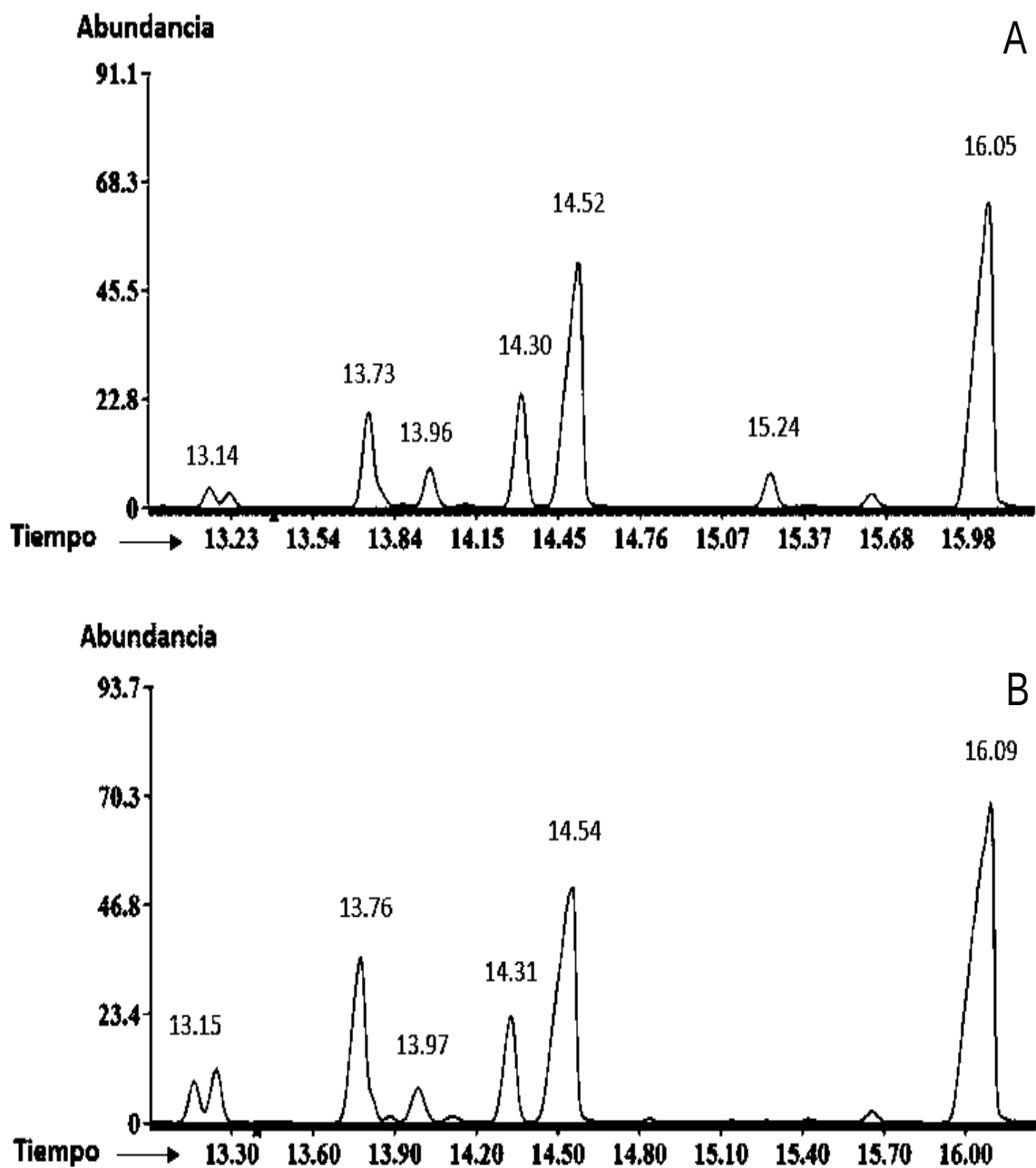


Figura 9. Cromatogramas del análisis de la identificación y contenido de compuestos terpénicos por CG-EM de infusiones de hojas frescas (A) y hojas secas (30 días de almacenamiento) (B) de *Hedeoma piperita*.

Cuadro 6. Compuestos terpénicos mayoritarios de las infusiones de hojas frescas de *Hedeoma piperita*, analizados por CG-EM.

Tiempo retención (min)	Compuesto	Contenido (%)
13.14	Isopulegol	0.6057
13.73	Mentona	3.3427
13.96	Isomentol	1.3066
14.30	Neomentol	3.7237
14.52	Mentol	10.7742
15.24	Neo isomentol	1.1487
16.05	Pulegona	15.1199

Cuadro 7. Compuestos terpénicos mayoritarios de las infusiones de hojas secas (30 días de almacenamiento) de *Hedeoma piperita*, analizados por CG-EM.

Tiempo retención (min)	Compuesto	Contenido (%)
13.15	Isopulegol	1.0493
13.76	Mentona	5.4249
13.97	Isomentol	0.9835
14.31	Neomentol	2.9856
14.54	Mentol	10.0201
16.09	Pulegona	15.5972

El identificar estos compuestos volátiles en las infusiones de *H. piperita*, sugiere que éstos son los responsables de la actividad antiinflamatoria, que se relaciona directamente con la actividad antioxidante y con el contenido de compuestos bioactivos totales.

Principales compuestos fenólicos presentes en las infusiones de *H. piperita*

El análisis de los compuestos fenólicos por HPLC tanto de las infusiones de hojas frescas como de hojas secas por 30 días de *H. piperita*, se comparó como una corrida por 30 min de una solución mezcla de estándares fenólicos (Sigma-Aldrich Co. México), los que fueron separados con una óptima resolución, observando un tiempo de retención (Tr) constante para cada compuesto (Cuadro 8, Figura 10).

Cuadro 8. Compuestos fenólicos de la solución de mezcla de estándares, analizados por HPLC (10 µg/mL).

No. de Pico	Compuesto	Tiempo de Retención (min)	Miliunidades de Absorbancia (mAU)
1	Ácido gálico	5.64	27500
2	Catequina	12.27	5250
3	Ácido vainílico	15	30250
4	Ácido cafeico	15.5	28600
5	Epicatequina	16.5	7250
6	Ácido p-cumárico	20	22500
7	rutina	23	14200
8	Ácido elágico	24.8	11200
9	quercetina	26	24750

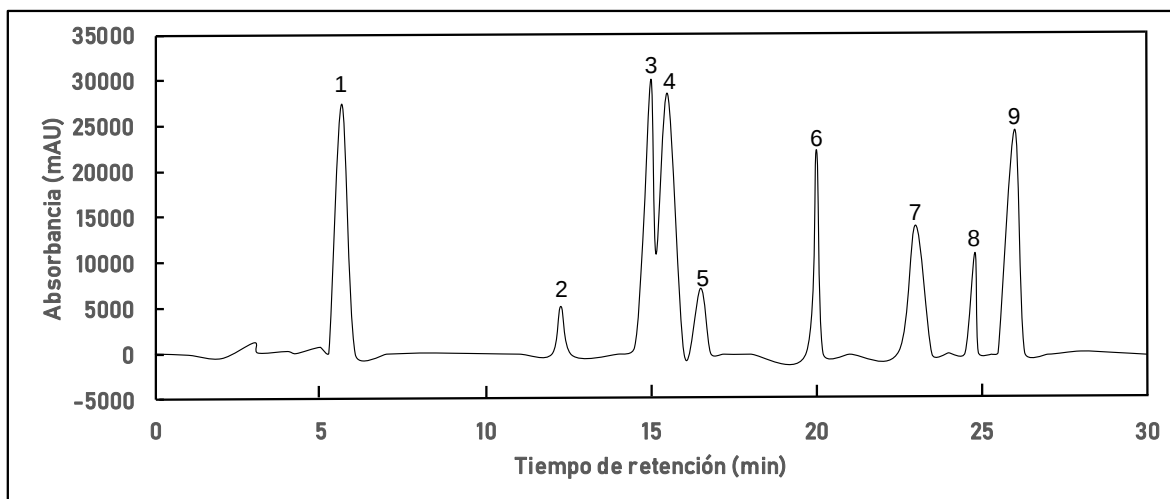


Figura 10. Cromatograma de la solución mezcla estándar de compuestos fenólicos analizado por HPLC. Picos: 1, ácido gálico; 2, catequina; 3, ácido vainílico; 4, ácido cafeico; 5, epicatequina; 6, ácido p-cumárico; 7, rutina; 8, ácido elágico; 9, quercetina.

En la infusión de hojas frescas de *H. piperita* se identificaron los ácidos fenólicos como el ácido gálico (pico 2), ácido cafeico (pico 3) y el ácido elágico (pico 8), pero además los flavonoides catequina (pico 2), epicatequina (pico 5), rutina (pico 7) y quercetina (pico 9). Entre los ácidos fenólicos, el de mayor contenido fue el gálico con 119.2 $\mu\text{g/mL}$ y las concentraciones más bajas de ácido cafeico (88.9 $\mu\text{g/mL}$) y de ácido elágico (91.3 $\mu\text{g/mL}$); el flavonoide de mayor contenido fue la catequina con 373.7 $\mu\text{g/mL}$, seguida de rutina (92.9 $\mu\text{g/mL}$), epicatequina (70.21 $\mu\text{g/mL}$) y quercetina (52.1 $\mu\text{g/mL}$). (Cuadro 9).

Por el contrario, en las infusiones de hojas secas de *H. piperita*, aunque se observaron los mismos compuestos fenólicos, el contenido fue menor, presentando el mayor contenido de flavonoides, pero hasta 6 veces menos que lo mostrado por las infusiones de hojas frescas, ya que el contenido de catequina fue solamente de 61.3 $\mu\text{g/mL}$ y 33.1 $\mu\text{g/mL}$ de ácido gálico (Cuadro 9). Los compuestos fenólicos mayoritarios encontrados en las infusiones de hojas de *H. piperita*, son similares a los reportados en infusiones de diversas plantas como té verde (Muñoz-Velázquez *et al.*, 2012) y comino (Herrera-Carrera *et al.*, 2015).

Cuadro 9. Contenido de compuestos fenólicos identificados y cuantificados por HPLC en las infusiones de hojas frescas y secas (30 días de almacenamiento) de *Hedeoma piperita*.

No. de Pico	Compuesto	Tiempo de Retención (min)	Infusión Hojas Frescas	Infusión Hojas Secas
			µg/mL	
1	Ácido gálico	5.64	119.2	33.1
2	Catequina	12.27	373.3	61.2
3	Ácido vanílico	15	0	0
4	Ácido cafeico	15.5	88.9	0
5	Epicatequina	16.5	70.21	33.7
6	Ácido p-cumárico	20	0	0
7	rutina	23	92.9	19.5
8	Ácido elágico	24.8	91.3	22.7
9	quercetina	26	52.1	11.9

Diversos compuestos fenólicos presentes en el té, como el ácido gálico, el ácido cafeico, la catequina, la epicatequina, la rutina y la quercetina, poseen propiedades antiinflamatorias, tanto en estudios *in vitro* como en modelos animales, particularmente durante el estrés oxidativo (Rahman *et al.*, 2006).

Debido a que el contenido de los compuestos terpénicos es similar tanto en las infusiones de hojas frescas como secas de *H. piperita*, los compuestos fenólicos presentes en éstas, sobre todo en mayor contenido en las infusiones de hojas frescas, podrían ser los responsables de la mayor actividad antiinflamatoria. Diversos estudios comprueban que existe una relación muy estrecha entre las plantas que tienen capacidad antioxidante y su actividad antiinflamatoria (García *et al.*, 2002).

Conclusiones

La actividad antiinflamatoria de las infusiones de hojas de *H. piperita* fue dependiente del tipo de administración y de la dosis. Con la aplicación tópica y a la dosis de 10 mg/kg las infusiones de hojas secas presentaron la mayor actividad antiinflamatoria. Con la administración oral, a la misma dosis, la actividad antiinflamatoria fue similar tanto de las infusiones de hojas frescas (76%) como de hojas secas (83%). Estos resultados demuestran el efecto antiinflamatorio de las infusiones de hojas de *H. piperita*, incluso mayor que el ejercido por ibuprofeno a la dosis de 25 mg/kg.

En las infusiones de hojas frescas, los compuestos considerados como responsables de la actividad antiinflamatoria son principalmente los compuestos fenólicos y en menor medida en las infusiones de hojas secas. Sin embargo, el contenido de los compuestos terpénicos, similares en ambos tipos de infusiones, también sugiere su efecto antiinflamatorio.

Referencias

- Anupom, R., Hee-Juhn P., Qudeer A.A., Hyun A.J. y Jae S. C. 2018. **Pulegone exhibits anti-inflammatory activities through the regulation of NF- κ B and Nrf-2 signaling pathways in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.** *Natural Product Sciences*, 24(1):28-35.
- Barboza, G. E. C., Núñez, J. J., Espinar, C. O. A., Bonzani, L., Filippa, N. E., Gutiérrez, E. M., y Cantero, J. J. 2006. **Flora Medicinal de la Provincia de Córdoba (Argentina): Pteridofitas y Antofitas silvestres o naturalizadas.** *Museo Botánico Córdoba*, 8(5):389-394.
- Brito, Á.G., Frías-Vázquez, A. I., Morón-Rodríguez, F.J., García-Delgado, N., Cabrera-Suárez, H.R., Morejón-Rodríguez, Z., y del Carmen, M. 2014. **Validación preclínica del efecto antiinflamatorio tópico de cinco plantas medicinales.** *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 19(1):40-50.
- Brogden, R.N. y Wagstaff A. J.1997. **Rimexolone. A review of its pharmacological properties and clinical potential in the management of ocular inflammation.** *BioDrugs*, 8(1):68-79.
- Casado, R., Land A, Calvo J, Del Carmen Terencio M, y Calvo MI. 2010. **Anti-inflammatory and antioxidant activities of *Jungia paniculata*.** *Pharmaceutical biology*, 48(8):897-905.
- Choi, J., Lee, K. T., Ha, J., Yun, S. Y., Ko, C. D., Jung, H. J., y Park, H. J. 2003. **Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Niga-ichigoside F1 and**

- 23-hydroxytormentonic acid obtained from *Rubus coreanus*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26(10):1436-1441.**
- CYTED. 1995. **Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Manual de técnicas de investigación. Proyecto X-I Búsqueda de principios activos en plantas medicinales.** 81-3.
- Fan, E., Zhang L., Jiang S., y Bai Y. 2008. **Beneficial effects of resveratrol on atherosclerosis.** *Journal of Medicinal Food*, 11(4): 610-614.
- Frum, Y., y Viljoen, A.M. 2006. ***In vitro* 5-lipoxygenase activity of three indigenous South African aromatic plants used in traditional healing and the stereospecific activity of limonene in the 5-lipoxygenase assay.** *Journal of Essential Oil Research*, 18(1):85-88.
- García, Bacallao, L., Rojo Domínguez, D. M., García Gómez, L. V., y Hernández Ángel, M. 2002. **Plantas con propiedades antiinflamatorias.** *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 21(3), 214-216.
- Herrera-Carrera, E., Moreno-Jiménez, M.R., Rocha-Guzmán, N.E., Gallegos-Infante, J.A., Díaz-Rivas, J.O., Gamboa-Gómez, C.I. y González-Laredo, R.F. 2015. **Phenolic composition of selected herbal infusions and their anti-inflammatory effect on a colonic model *in vitro* in HT-29 cells.** *Cogent Food & Agriculture*, 1(1):1059033.
- Kawata, J., Kameda, M., y Miyazawa, M. 2008. **Cyclooxygenase-2 inhibitory effects of monoterpenoids with a p-methane skeleton.** *International Journal Essential Oil Therapeutics*, 2(4):145-148.
- Kedzia, B., Jankowiak, J., Holonska, J. y Krzyzaniak, M. 1998. **Investigation of essential oils and components with immunostimulating activity.** *Herba Pol.*, 44:126-135.
- Kumar, S., Ganachari, M. S., y Banappa-Nagoor V.S. 2004. **Anti-Inflammatory Activity of *Ziziphus jujuba* Lam. Leaves Extract in Rats.** *Journal of Natural Remedies*, 4(2):183-185.
- Lee, P. J., y Choi, A. M. 2003. **Pathways of cell signaling in hyperoxia.** *Free Radical Biology and Medicine*, 35(4):341-350.
- Lu, J., Ho, C.T., Ghai, G., y Chen, K.Y. 2000. **Differential effects of theaflavin monogallates on cell growth, apoptosis, and Cox-2 gene expression in cancerous versus normal cells.** *Cancer Research*, 60(22):6465-6471.
- Merfort, I., Heilmann, J., Hagedorn-Leweke, U. y Lippold, B.C. 1994. **Estudios de penetración cutánea *in vivo* de flavonas de manzanilla.** *Pharmazie*, 49(7): 509-511.
- Muñoz-Velázquez, E.E., Rivas-Díaz, K., Loarca-Piña, M.G.F., Mendoza-Díaz, S., Reynoso-Camacho, R., y Ramos-Gómez M. 2012. **Comparación del contenido fenólico, capacidad antioxidante y actividad antiinflamatoria de infusiones herbales comerciales.** *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(3):481-495.
- Okoli, C.O., Akah, P.A., y Nwafor S.V. 2002. **Anti-inflammatory activity of plants.** *Journal of Natural Remedies*, 3(1):01-30.
- Ospina, J. D., Orozco, M. S. S., y Correa, C. R. B. 2016. **Efecto del secado y la edad de las plantas en la composición de los aceites esenciales de *Lippia alba* (Mill.) NE Br. ex Britton & P. Wilson y *Lippia organoides* Kunth.** *Acta Agronómica*, 65(2):170-175.

- Radhika, B., y Shravani, K. 2018. ***In vitro* and *in vivo* anti-Inflammatory activity of Bauhinia X Black-eana Linn. Leaves.** *J. Med. Biol. Sci.*, 1(1):102.
- Rubió, L., Motilva, M. J., y Romero, M. P. 2013. **Recent advances in biologically active compounds in herbs and spices: a review of the most effective antioxidant and anti-inflammatory active principles.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(9):943-953.
- Salminen, A., Kauppinen, A., y Kaarniranta, K. 2012. **Phytochemicals suppress nuclear factor- κ B signaling: impact on health span and the aging process.** *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 15(1):23-28.
- Seo, Y. J., Kwon, M. S., Choi, H. W., Jang, J. E., Lee, J. K., Sun, Y., y Suh, H. W. 2008). **Intracerebroventricular ginsenosides are antinociceptive in proinflammatory cytokine-induced pain behaviors of mice.** *Archives of Pharmacol Research*, 31(3):364-369.
- Stote, K., Clevidence, B., Novotny, J., Henderson, T., Radecki, S. y Baer, D. 2012. **Efecto del cacao y el té verde sobre los biomarcadores de la regulación de la glucosa, el estrés oxidativo, la inflamación y la hemostasia en adultos obesos con riesgo de resistencia a la insulina.** *European Journal of Clinical Nutrition*, 66:1153-1159.
- Sun, Z., Wang, H., Wang, J., Zhou, L., y Yang P. 2014. **Chemical composition and anti-inflammatory, cytotoxic and antioxidant activities of essential oil from leaves of *Mentha piperita* grown in China.** *PLoS ONE*, 9(12): e114767.
- Surh, Y. J. 2008. **NF-kappa B and Nrf2 as potential chemopreventive targets of some anti-inflammatory and antioxidative phytonutrients with anti-inflammatory and antioxidative activities.** *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, 17(Suppl 1):269-272.
- Vazquez, E., Navarro, M., Salazar, Y., Crespo, G., Bruges, G., Osorio, C., y López, M. 2015. **Systemic changes following carrageenan-induced paw inflammation in rats.** *Inflammation Research*, 64(5):333-342.
- Velázquez-Becerra, C., L. I. Macías-Rodríguez, J. López-Bucio, I. Flores-Cortez, G. Santoyo, C. Hernández-Soberano y E. Valencia-Cantero 2013. **"The rhizobacterium *Arthrobacter agilis* produces dimethylhexadecylamine, a compound that inhibits growth of phytopathogenic fungi *in vitro*."** *Protoplasma*, 250(6):1251-1262.
- Villena, C. A., y Arroyo, J. L. 2013. **Efecto antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* (Yawar socco) en ratas con inducción a la inflamación aguda y crónica.** *Ciencia e Investigación*, 15(1):15-9.
- Whiteley, P., y Dalrymple S. 1998. **Models of inflammation: Carrageenan-induced paw edema in the rat.** *Current Protocols in Pharmacology*, 5:4-6.
- Winyard, P., y Willoughby, D. 2003. **Inflammation protocols.** In: **Methods in molecular biology.** Humana Press Inc. Totowa. London, UK, pp. 115-121.

8. DISCUSIÓN GENERAL

La mayoría de las especies de la familia Lamiaceae presenta aceites esenciales y otros compuestos de importancia a nivel farmacológico, médico, microbiológico y químico, entre otros. De aquí que los usos comunes de las plantas en general hayan conducido a desarrollar investigaciones que amplían el conocimiento sobre su potencialidad real y los riesgos eventuales por su mal empleo (Velázquez *et al.*, 1995). Diversos estudios han demostrado que los compuestos bioactivos de plantas medicinales, como los fenoles y terpenoides, proveen efectos benéficos a la salud, entre los que se encuentran la capacidad antioxidante y la actividad antiinflamatoria (McKay y Blumberg, 2006; Wiart, 2007; Miguel, 2010; Torres-Martínez *et al.*, 2014).

Entre las plantas medicinales que contienen estos tipos de compuestos están las del género *Hedeoma*, usadas como infusión principalmente. Algunas de sus especies como *Hedeoma multiflorum* contienen compuestos principalmente terpenicos, siendo los monoterpenos los principales constituyentes de éstos; su uso etnobotánico le atribuye propiedades de aromatizante, digestivo y antioxidante (Barboza *et al.*, 2006; Brunetti *et al.*, 2007; Dadé *et al.*, 2011). Los extractos de *Hedeoma patens* se consideran con un alto potencial para tratar enfermedades inflamatorias, debido a que su actividad está mediada por polifenoles y terpenos que respalda la afirmación de su uso tradicional en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la inflamación (Leyva-López *et al.*, 2016).

Por otro lado, la composición de los compuestos fenólicos y terpénicos en las plantas es muy variable según la especie, el genotipo, los tejidos vegetales, el almacenamiento y el secado de la planta o sus diferentes partes como las hojas y los tallos (Henríquez *et al.*, 2010; Baiano, 2014). Las variaciones encontradas en los compuestos de las infusiones de hojas frescas y secas de *H. piperita* demuestran el efecto del secado almacenamiento del material vegetal debido, principalmente, a factores como temperatura y evaporación de los componentes más volátiles. Sin embargo, la concentración de otros compuestos incrementa por; reacciones de oxidoreducción,

(química o enzimática); reacciones de biosíntesis las cuales durante el secado de las hojas pueden seguir ocurriendo y producir un tipo de componente en mayor proporción a expensas de otros, lo cual explica el aumento en la concentración de algunos de los compuestos terpénicos (Ospina *et al.*, 2016).

8.1. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

Con el método DPPH y ABTS, las infusiones realizadas con hojas frescas de *H. piperita*, mostraron la actividad antioxidante más alta con valores de 90% y 93% respectivamente y se observó una disminución en las infusiones de hojas secas por 30, 60 y 90 días (Figura 5). Esto se explica debido a que el método de la decoloración del catión-radical ABTS es aplicable a antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos lo que le permite ser implementado para sistemas tanto acuosos como lipofílicos, además es muy soluble en agua y químicamente estable (Ou *et al.*, 2001; Nenadis *et al.*, 2004). En cambio, el DPPH solo mide la capacidad antioxidante de compuestos poco polares o no polares (Gonzales *et al.*, 2007).

Los efectos antioxidantes reportados para otras especies de la familia Lamiaceae de extractos metanólicos se encuentran por arriba del 65%. *Stachys officinalis* y *Marrubium vulgare* obtuvieron una actividad antioxidante del 78%, mientras que para *Lamium album* y *Lamium purpureum* del 70%, y *Galeopsis speciosa* obtuvo el 65% (Matkowski y Piotrowska, 2006). Diversos estudios correlacionan la actividad antioxidante con el contenido de fenoles y terpenos presentes en los extractos. Algunas especies del genero *Salvia* han mostrado actividad antioxidante, tales como *S. officinalis*, *S. fruticosa* y *S. leucantha*, relacionado con el contenido de fenoles y compuestos del tipo terpenoide (Kruma *et al.*, 2008; Kontogianni *et al.*, 2013).

En infusiones de hojas de *H. piperita* el contenido de ácidos fenólicos y flavonoides tuvo una relación directa con la alta actividad antioxidante, ya que las infusiones de hojas frescas mostraron la mayor cantidad con 0.25 μ moles EAG/mg p.f. y 7.69 μ moles EQ/mg p.f. Con el método de terpenoides totales, las infusiones de hojas secas (30 días) mostraron el más alto valor de terpenoides totales (18.75 mg Eq. Pulegona/g

peso). El tiempo de almacenamiento de las hojas secas, tuvo un efecto de disminución tanto de la actividad antioxidante como del contenido de ácidos fenólicos y flavonoides totales (Figura 5). Estudios demuestran que los diferentes tipos de secado y almacenamiento reducen el total de contenido fenólico y la actividad antioxidante medida con un ensayo DPPH (Valdenegro *et al.*, 2013). Toor y Savage (2006) mencionan que el secado es la causa principal de la pérdida de los antioxidantes, pero también el calentamiento puede inducir a la formación de compuestos, tal como se muestra en el presente estudio donde hubo un aumento de terpenos totales en las infusiones de hojas secas (30 días).

Se ha demostrado que la rutina y otros compuestos fenólicos (por ejemplo, ácido clorogénico y catequina) son susceptibles a altas temperaturas (Madrau *et al.*, 2009). Sin embargo, en *Lippia alba* (Verbenaceae) el contenido de algunos compuestos como el citral fue ligeramente mayor que el obtenido en plantas frescas, los autores consideran que este aumento puede atribuirse a la oxidación del geraniol durante el proceso de secado, al convertirse en geranial (Barboza *et al.*, 2006). Dada la abundancia de los compuestos fenólicos y terpénicos en las plantas medicinales se han reportado diversas propiedades dependiendo de la dosis, entre la que se encuentra el efecto antiinflamatorio (Bonkanka, 2007).

8.2. ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

Se estableció el efecto antiinflamatorio mediante la administración tópica de infusiones de hojas frescas y secas de *H. piperita*. a través del método adaptado de edema de pata inducido por carragenina en ratas macho Wistar. Esta prueba es la más usada como modelo experimental de inflamación aguda para determinar el potencial antiinflamatorio de productos naturales (Sinha *et al.*, 2001). La inflamación producida por carragenina se atribuye a la liberación de varios mediadores y es bifásica. La fase inicial se debe a la liberación de histamina, serotonina y citocinas, en la primera hora, después de aplicada la inyección de carragenina. La segunda fase es atribuida a la liberación de bradiquininas, proteasas, prostaglandinas y lisosomas. La última fase es

la más sensible a la mayoría de los agentes antiinflamatorios usados clínicamente (Sinha, 2001).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la actividad antiinflamatoria de las infusiones de hojas de *H. piperita* fue dependiente del secado de las hojas y de las dosis, ya que las infusiones de hojas secas (30 días de almacén) de *H. piperita* mostraron una mayor actividad antiinflamatoria que las infusiones de hojas frescas, con una dosis de 10 mg/kg, un efecto similar al que produce el ibuprofeno (Figura 7). Se conoce que existe una relación muy estrecha entre la composición química de sustancias antioxidantes en las plantas y su acción antiinflamatoria. Metabolitos secundarios como los terpenos, flavonoides y otros compuestos polifenólicos son reconocidos como sustancias antioxidantes y antiinflamatorias (Poáceas y Piperáceas, 2006; Guimarães *et al.*, 2010). *Hedeoma piperita* contiene este tipo de compuestos (capítulo 1) por lo que el mecanismo de acción puede estar relacionado por atenuar o inhibir el efecto de moléculas oxidantes, como las formadas en un proceso de inflamación, que muestra su habilidad de actuar contra las histaminas y otros mediadores de inflamación, como las prostaglandinas (García *et al.*, 2002; Díaz, 2012).

La determinación del efecto antiinflamatorio con la administración oral de las infusiones de *H. piperita*, demuestran el potencial antiinflamatorio tanto de hojas frescas y secas (Figura 8) y fue mayor a la obtenida con la administración tópica. Acuña *et al.*, (2005) estudiando la actividad antiinflamatoria de *Chenopodium ambrosioides* L. refiere que a una dosis de 1000 mg/Kg muestra un efecto pero no es prolongado; y refiere que *Wemeria pigmea* a una dosis de 0.1 ml/Kg, tiene efecto antiinflamatorio. Los resultados obtenidos con infusiones de *H. piperita* a una dosis de 10 mg/kg presenta un efecto antiinflamatorio.

Diversos fitoquímicos como los fenoles, flavonoides y terpenoides, pueden ejercer sus efectos antiinflamatorios y antioxidante, inhibiendo, modulando o modificando la vía de traslocación del FNkB (Surh, 2008), en las vías dirigidas por MAPK y Nrf2 que

fuertemente inhiben su unión a I κ B (Salminen y Kaarniranta, 2012). La acción antiinflamatoria que poseen muchos flavonoides se relaciona con la inhibición de diversas enzimas implicadas en el metabolismo del ácido araquidónico como la ciclooxigenasa, lipooxigenasa, fosfato dinucleótido adenina nicotinamida (NADPH) oxidasa, xantina oxidasa, de radicales libres y reducen el estrés oxidativo (García *et al.*, 2002). La acción antiinflamatoria de los terpenoides se relaciona con la inhibición de la producción de TNF- α e IL-6, reduce la expresión de iNOS y COX-2 e Inhibe la señalización de NF- κ B (Rubió *et al.*, 2013).

8.3. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PRINCIPALES COMPUESTOS DE TIPO TERPÉNICO Y FENÓLICO

Con la determinación del contenido e identificación de los principales compuestos terpénicos, las infusiones de hojas frescas y hojas secas de *H. piperita*, dieron como resultado un contenido de terpenos similar, encontrando a la pulegona, mentol y mentona, como los mayoritarios. Plantas de la misma familia como *Minthostachys verticillata* y *Hedeoma multiflora* reportan la presencia de pulegona y mentona, siendo la primera el principal componente (Puntieri *et al.*, 2019). El contenido de compuestos fenólicos de *H. piperita*, fue mayor en las hojas frescas, identificando al ácido gálico y a la catequina como los mayoritarios (Figuras 8 y 9; Cuadros 6, 7, 8 y 9). Ambos compuestos se han reportado en infusiones de té verde y en extractos metanólicos (Borse *et al.*, 2007; Wang y Ho, 2009).

En diversas investigaciones se ha reportado la función de algunos monoterpenos en los procesos inflamatorios, el mentol entre otros, presentan actividad inhibitoria en la producción de lucotrieno, un mediador de la inflamación, por lo que las infusiones y aceites esenciales que contienen este compuesto volátil, junto con limoneno, terpinenos, linalol, pinenos, citrales y geraniol, indican que pueden ser utilizadas en tratamientos de enfermedades que cursan inflamación como asma, bronquitis crónica, rinitis alérgica, entre otras (Ahn *et al.*, 2001). Además, el mentol reduce la producción de prostaglandinas (PGE2) y la IL-1 β , en monocitos humanos, lo que comprueba su potencial antiinflamatorio (Juergens y Stober, 1998).

El compuesto volátil pulegona inhibe la expresión de mediadores de la inflamación inducida con lipopolisacárido (LPS) mediante la regulación de iNOS, COX-2, NF- κ B y MAP cinasas, lo cual indica que este compuesto o en las infusiones y aceites esenciales, en los que está presente, previene la inflamación en diversas enfermedades (Anupom *et al.*, 2017).

Recientemente, Yang *et al.* (2020) demostraron que la pulegona reduce los niveles de IL-1 β e IL-18 en un modelo inducido por LPS, así como la producción de ARNm de genes asociados con la inflamación. Además, este compuesto exhibe una significativa reducción de los niveles de ERO y con una alta regulación de NLRP3, el factor de inflamación de la familia NLR, sugiriendo su función de actividad entre inflamación e inmunidad.

Además de los compuestos terpénicos, algunos del tipo fenólico, como ácidos fenólicos y flavonoides, también han mostrado actividad antiinflamatoria, solos o en combinación (Andrade y De Sousa, 2013; Andrade, *et al.*, 2014). En particular, el ácido gálico es un potente inhibidor de la actividad de COX-1 y COX-2 en diferentes líneas celulares, además de suprimir la producción de citocinas proinflamatorias y quimiocinas (Kim *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 2011; Yoon *et al.*, 2012). Kuppan *et al.* (2006) mostraron que el ácido gálico fue responsable de la disminución de la expresión de TNF- α e IL-6 en monocitos humanos (Locatelli *et al.*, 2013).

Los flavonoides como las catequinas han mostrado actividad antiinflamatoria por regular la activación o desactivación de vías de estrés oxidativo relacionado con procesos de inflamación, incidiendo en la inhibición del NF- κ B, de MAP cinasas y del factor de transcripción nuclear tipo eritroide 2 (Nrf2) (Fan *et al.*, 2017).

Catequina es el principal constituyente polifenólico del té verde (*Camelia sinensis*) que junto con otras catequinas, tienen actividad antiinflamatoria. En otras investigaciones se ha mostrado que la catequina sola y en conjunto con otras como la epicatequina, epicatequín galato y epigallocatequina, presentan una marcada actividad inmunomoduladora por la regulación de citocinas proinflamatorias, reducción de la

producción de EROS y de la migración de neutrófilos (Biasi *et al.*, 2011; Marinovic *et al.*, 2015).

Con todo lo anterior, la actividad antiinflamatoria observada con la administración tanto tópica como oral de las infusiones de hojas de *H. piperita*, se debe al contenido de los principales compuestos terpénicos y fenólicos identificados, sugiriendo que intervienen en la regulación de los procesos inflamatorios inhibiendo la producción de leucotrieno, de prostaglandinas, de enzimas como la COX-2 y principalmente de los mediadores proinflamatorios como el FN kB, TNF- α y las principales interleucinas como la IL-1 β , IL6 e IL8.

9. CONCLUSIÓN GENERAL

El tiempo de almacén de las hojas secas de *Hedeoma piperita* fue determinante en la actividad antioxidante, ya que se observó una disminución en la actividad antioxidante de las infusiones almacenadas a 60 y 90 días, encontrando la mayor actividad en las infusiones de hojas frescas y secas, almacenadas por 30 días. Estos resultados demostraron una relación directa entre el mayor contenido tanto de ácidos fenólicos, flavonoides y terpenoides totales.

Con la administración tópica de las infusiones de hojas secas de *H. piperita* con 30 días de almacenamiento, se observó la mayor actividad antiinflamatoria con la dosis de 10 mg/kg, alcanzando un porcentaje de actividad de 77%; sin embargo, con la administración oral, a la misma dosis, la actividad antiinflamatoria fue similar tanto en las infusiones de hojas frescas (76%) como de hojas secas (83%). Este porcentaje de actividad antiinflamatoria es mayor que el ejercido por ibuprofeno a la dosis de 25 mg/kg.

En infusiones de hojas frescas de *H. piperita*, fue mayor el contenido de compuestos fenólicos que en hojas secas, con ácido gálico y catequina como los mayoritarios. Estos resultados sugieren que estos compuestos son responsables de la actividad antiinflamatoria.

10. LITERATURA GENERAL CITADA

- Abbas, A. K., Fausto, N., Cotran, R. S., Kumar, V., Perkins, J. A., y Robbins, S. L. 2005. **Robbins y Cotran Patología estructural y funcional**. Elsevier, España: 47-116.
- Acuña, A., Alva, G., Blas, L., Bustamante, K., López, R., y Ludeña, K. 2005. **Actividad antiinflamatoria y toxicidad aguda del *Chenopodium ambrosioides* L. (paico)**. In Lima, Perú: Congreso Mundial de Medicina Tradicional. Universidad San Martín de Porres (p. 6).
- Ahn, G.S., Jang, H.U., Jung, G.Y., Kim, J.H., Lee, H.G., Lee, I.S., Oh, S.R., y Park, S.H. 2001. **Essential oil component having inhibition activity of leukotriene production**. Korea Patent 12:1020010086473.
- Andrade, L. N., Dos Reis Barreto de Oliveira, R., y De Sousa, D. P. 2014. **A review on anti-inflammatory activity of phenylpropanoids found in essential oils**. *Molecules*, 19(2):1459-1480.
- Andrade, L. N., y De Sousa, D. P. 2013. **A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes**. *Molecules*, 18(1):1227-1254.
- Angosto, M. C., y Barreno, P. G. 2007. **Bioquímica y fisiopatología del sistema inmune**. *Monografías del Instituto de España*. UNED, pp. 248-257.
- Baiano, A. 2014. **Influence of genotype, pedoclimatic conditions, viticultural practices and ripening on the phenolic composition of grapes**. A review. In J. S. Cámara (Ed.), *Grapes: Production, phenolic composition and potential biomedical effects*. pp. 1–26.
- Barboza, G. E. C., Núñez, J. J., Espinar, C. O. A., Bonzani, L., Filippa, N. E., Gutiérrez, E. M., y Cantero, J. J. 2006. **Flora Medicinal de la Provincia de Córdoba (Argentina): Pteridófitas y Antofitas silvestres o naturalizadas**. Museo Botánico Córdoba, 8(5):389-94.
- Bellik, Y., Hammoudi, S.M., Abdellah, F., Iguer-Ouada, M., y Boukraâ, L. 2012. **Phytochemicals to prevent inflammation and allergy**. *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.*, 6(2):147-58.
- Brunetti, P. C., Ortiz, L., Palacio, L., Lloret, C., y Goleniowski, M. 2007. **Micropropagación de "tomillo de las sierras" *Hedeoma multiflorum* Benth.** *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas medicinales y Aromáticas*, 6(6):391-392.
- Bertelli, A. A., y Das, D. K. 2009. **Grapes, wines, resveratrol, and heart health**. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 54(6):468-476.
- Bonkanka, C. 2007. **Evaluación farmacológica de terpenos y flavonoides de origen vegetal**. Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna, España. 147 p.
- Burt, S. 2004. **Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods**. A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94:223-253.
- Casado, R., Land, A., Calvo, J., Terencio M.C., y Calvo, M.I. 2010. **Anti-inflammatory and antioxidant activities of *Jungia paniculata***. *Pharm. Biol.*, 48(8):897-905.
- Cases, C. M. A. 2007. **Las plantas aromáticas y medicinales. Descripción de las especies fundamentales. Principios activos**. En: Jornadas técnicas dedicadas a las plantas aromáticas y medicinales. Brihuega, España, 99 p.

- Chen, X., Lu, J., An, M., Ma, Z., Zong, H., y Yang, J. 2014. **Anti-inflammatory effect of resveratrol on adjuvant arthritis rats with abnormal immunological function via the reduction of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2.** *Molecular Medicine Reports*, 9(6):2592-2598.
- Chow, H. H. S., y Hakim, I. A. 2011. **Pharmacokinetic and chemoprevention studies on tea in humans.** *Pharmacological Research*, 64(2):105-112.
- Craker, L. E. 2007. **Medicinal and aromatic plants-future opportunities.** *Issues in New Crops and New Uses*, 248-257.
- CYTED. 1995. **Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Manual de técnicas de investigación. Proyecto X-I Búsqueda de principios activos en plantas medicinales.** pp. 81-83.
- Dadé, M. M., Schinella, G. R., Fioravanti, D. E., y AlfioTournier, H. 2011. **Antioxidant and cytotoxic properties of an aqueous extract from the Argentinean plant *Hedeoma multiflorum*.** *Pharmaceutical Biology*, 49(6):633-639.
- Deepa, M. y Renuka, D. P. 2014. **Potential anti-inflammatory medicinal plants- a review.** *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(4): 43-49.
- Díaz-Flores, M., Baiza-Gutman, L.A., Ibáñez-Hernández, M.A., Pascoe-Lira, D., Guzmán-Greenfel, A.M y Kumate-Rodríguez, J. 2004. **Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica.** *Gaceta Médica de México*, 40(4):437-447.
- Díaz, M. 2012. **Evaluación de la actividad antiinflamatoria de una crema a partir del extracto purificado de *Baccharis tricuneata* (Lf) Pers. "taya".** *Revista ECIPerú*, 9(1), 6-6.
- Edeoga, H.O, Okwu, D.E, y Mbaebie, B.O. 2005. **Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants.** *African Journal of Biotechnology*, 4(7):685-688.
- Epling, C., y Stewart, W. S. 1939. **A revision of *Hedeoma*: with a review of allied genera.** *Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis Beihefte*, 115:1-49.
- Fan, F.Y., Sang, L.X., y Jiang, M. 2017. **Catechins and their therapeutic benefits to inflammatory bowel disease.** *Molecules*, 22(3):484.
- Fengyang, L., Yunhe, F., Bo, L., Zhicheng, L., Depeng, L., Dejie, L., y Zhengtao, Y. 2012. **Stevioside suppressed inflammatory cytokine secretion by downregulation of NF- κ B and MAPK signaling pathways in LPS-stimulated RAW264. 7 cells.** *Inflammation*, 35(5):1669-1675.
- García, Bacallao, L., Rojo Domínguez, D. M., García Gómez, L. V., y Hernández Ángel, M. 2002. **Plantas con propiedades antiinflamatorias.** *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 21(3), 214-216.
- García-Pérez, E., Castro-Álvarez, F.F., Gutiérrez-Urbe, J. A., y García-Lara, S. 2012. **Revisión de la producción, composición fitoquímica y propiedades nutraceuticas del orégano mexicano.** *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(2):339-353.
- Gilmore, T.D. 2006. **Introduction to NF- κ B: Players, pathways, perspectives.** *Oncogene*, 25(51):6680–6684.
- Gonzáles, B.M. 2012. **Síndrome metabólico, dieta y marcadores de inflamación.** Tesis de Doctorado, Universitat De Les Illes Balears, España. 246 p.

- Gonzales, M. C., Soto, M., Kite, G., y Martínez, M. 2007. **Actividad antioxidante de flavonoides del tallo de orégano Mexicano.** *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30(1):43-49.
- Griffiths, G., Trueman, L., Crowther, T., Thomas, B., y Smith, B. 2002. **Onions—a global benefit to health.** *Phytotherapy Research*, 16(7):603-615.
- Guillamón, E. 2018. **Efecto de compuestos fitoquímicos del género *Allium* sobre el sistema inmune y la respuesta inflamatoria.** *Ars. Pharmaceutica (Internet)*, 59(3):185-196.
- Guimarães, R., Barros, L., Barreira, J. C., Sousa, M. J., Carvalho, A. M., y Ferreira, I. C. 2010. **Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: grapefruit, lemon, lime and orange.** *Food and Chemical Toxicology*, 48(1), 99-106.
- Harley, R. M., y Pastore, J. F. B. 2012. **A generic revision and new combinations in the *Hyptidinae* (Lamiaceae), based on molecular and morphological evidence.** *Phytotaxa*, 58(1):1-55.
- Harman-Ware, A. E., Sykes, R., Peter, G. F., y Davis, M. 2016. **Determination of terpenoid content in pine by organic solvent extraction and fast-GC analysis.** *Frontiers in Energy Research*, 4:1-9.
- Hashim, S. N., Schwarz, L. J., Boysen, R. I., Yang, Y., Danylec, B., y Hearn, M. T. 2013. **Rapid solid-phase extraction and analysis of resveratrol and other polyphenols in red wine.** *Journal of Chromatography*, 1313:284-290.
- Henríquez, C., Speisky, H., Chiffelle, I., Valenzuela, T., Araya, M., Simpson, R., y Almonacid, S. 2010. **Development of an ingredient containing apple peel, as a source of polyphenols and dietary fiber.** *Journal of Food Science*, 75(6):H172-H181.
- Hortelano, S. 2009. **Molecular basis of the anti-inflammatory effects of terpenoids.** *Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)*, 8(1):28-39.
- Ibarra, R.M.L., Gonzales, B.C.M., Meda, G.B.C., y Pérez, A.L. 2006. **Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes.** *Investigation en Salud*, 3(1):1-9.
- Jantan, I., Ahmad, W., y Bukhari, S. N. A. 2015. **Plant-derived immunomodulators: an insight on their preclinical evaluation and clinical trials.** *Frontiers in Plant Science*, 6:655-672.
- Juergens, U.R., y Stober M.V. 1998. **The anti-inflammatory activity of l-menthol compared to mint oil in human monocytes *in vitro*: A novel perspective for its therapeutic use in inflammatory diseases.** *European Journal of Medical research*, 3(12):539-545.
- Jung, H. J., Kim, S. J., Jeon, W. K., Kim, B. C., Ahn, K., Kim, K., Kim, Y. M., Park, E. H., y Lim, C. J. 2011. **Anti-inflammatory activity of n-propyl gallate through down-regulation of NF- κ B and JNK pathways.** *Inflammation*, 34(5):352-361.
- Kabe, Y., Ando, K., Hirao, S., Yoshida, M., y Handa, H. 2005. **Redox regulation of NF- κ B activation: Distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus.** *Antioxidants & Redox Signal*, 7:395-403.
- Kim, G. J., Choi, H. G., Kim, J. H., Kim, S. H., Kim, J. A., y Lee, S. H. 2013. **Anti-allergic inflammatory effects of cyanogenic and phenolic glycosides from the seed of *Prunus persica*.** *Natural Product Comm.*, 8(12):1739-1740.

- Kim, S. H., Jun, C. D., Suk, K., Choi, B. J., Lim, H., Park, S., Lee, S. H., Shin, H. Y., Kim, D. K., y Shin, T. Y. 2006. **Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells.** *Toxicological Sciences*, 91(1):123-31.
- Kontogianni, V. G., Tomic, G., Nikolic, I., Nerantzaki, A. A., Sayyad, N., Stosic-Grujicic, S., y Tzakos, A. G. 2013. **Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity.** *Food Chemistry*, 136(1):120-129.
- Kruma, Z., Andjelkovic, M., Verhe, R., Kreicbergs, V., Karklina, D., y Venskutonis, P. 2008. **Phenolic compounds in basil, oregano and thyme.** *Foodbalt*, 1:99-103.
- Kubitzki, K. 2004. **The families and genera of vascular plants. Volume VII-flowering plants, dicotyledons: Lamiales (except Acanthaceae including Avicenniaceae).** *The families and genera of vascular plants. Volume VII-flowering plants, dicotyledons: Lamiales (except Acanthaceae including Avicenniaceae).* 167-275.
- Kuppan, G., Balasubramanyam, J., Monickaraj, F., Srinivasan, G., Mohan, V., y Balasubramanyam, M. 2010. **Transcriptional regulation of cytokines and oxidative stress by gallic acid in human THP-1 monocytes.** *Cytokine*, 49(2): 229-234.
- Lahlou, M. 2004. **Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils.** *Phytotherapy research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 18(6):435-448.
- Larrasoana, I. O. 2010. **Influencia de la temperatura y tiempo de secado en la calidad de las hojas de *Cymbopogon citratus* dc Staf.** Tesis de Doctorado, Universidade Federal de Viçosa y Universidad Pública de Navarra, Minas Gerais–Brasil. 35 p.
- Latruffe, N., y Rifler, J. P. 2013. **Bioactive polyphenols from grapes and wine emphasized with resveratrol.** *Current Pharmaceutical Design*, 19(34):6053-6063.
- Leyva-López, N., Nair, V., Bang, W. Y., Cisneros-Zevallos, L., y Heredia, J. B. 2016. **Protective role of terpenes and polyphenols from three species of Oregano (*Lippia graveolens*, *Lippia palmeri* and *Hedeoma patens*) on the suppression of lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophage cells.** *Journal of Ethnopharmacology*, 187:302-312.
- López, H. L. 2012. **Nutritional interventions to prevent and treat osteoarthritis. Part II: focus on micronutrients and supportive nutraceuticals.** *PM&R*, 4(5):S155-S168.
- López-Lázaro, M. 2009. **Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin.** *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 9(1):31-59.
- Lorenz, M. 2013. **Cellular targets for the beneficial actions of tea polyphenols.** *The American Journal of Clinical Nutrition*, 98(6):1642S-1650S.
- Madrau, M. A., Piscopo, A., Sanguinetti, A. M., Del Caro, A., Poiana, M., Romeo, F. V., y Piga, A. 2009. **Effect of drying temperature on polyphenolic content and antioxidant activity of apricots.** *European Food Research and Technology*, 228(3):441.

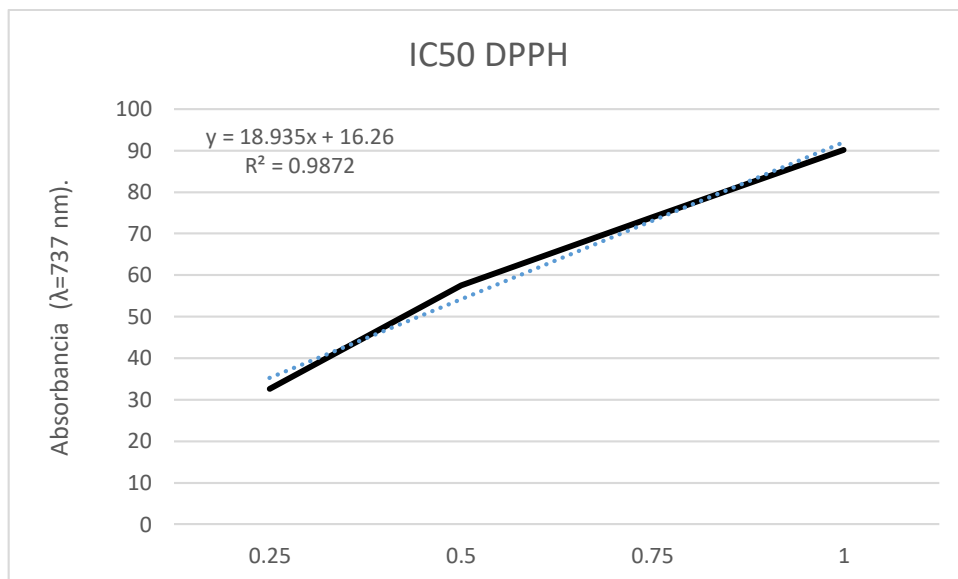
- Malar, G. 2017. **Phytochemical screening, total flavonoid, total terpenoid and anti-inflammatory activity of aqueous stem extract of *Salacia oblonga***. Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences, 0974-2115.
- Maluventhan, V. y Sangu Murugesan. 2010. **Phytochemical analysis and antibacterial activity of Medicinal plant *Cardiospermum halicacabum* Linn.** *Journal of Phytology*, 2(1):68-77.
- Martínez-Gordillo, M., Fragoso-Martínez, I., del Rosario García-Peña, M., y Montiel, O. 2013. **Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo.** *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84(1):30-86.
- Masarovičová, E., y Kráľová, K. 2006. **Medicinal plants-past, nowadays, future.** In: *International Symposium on Chamomile Research, Development and Production* 749 (pp. 19-27).
- Matkowski, A., y Piotrowska, M. 2006. **Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae.** *Fitoterapia*, 77(5): 346-353.
- McKay, D. L. y Blumberg, J. B. 2006. **A review of the bioactivity and potential benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.).** *Phytotherapy research*, 20(7):519-530.
- Medina-Remón, A., Casas, R., Tressserra-Rimbau, A., Ros, E., Martínez-González, M. A., Fitó, M., y PREDIMED Study Investigators. 2017. **Polyphenol intake from a Mediterranean diet decreases inflammatory biomarkers related to atherosclerosis: a substudy of the PREDIMED trial.** *British journal of clinical pharmacology*, 83(1), 114-128.
- Miguel, M.G. 2010. **Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants.** *Flavour and Fragrance Journal.*, 25(5):291-312.
- Mittal, M., Siddiqui, M. R., Tran, K., Reddy, S. y Malik, A. B. 2014. **Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury.** *Antioxidants and Redox Signaling*, 20(7):1126-1167.
- Montanari, R. M., Barbosa, L. C., Demuner, A. J., Silva, C., Carvalho L. S. y Andrade N. J. 2011. **Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from verbenaceae species: Alternative sources of (E)-caryophyllene and germacrene-D.** *Química Nova*, 34(9):1550-1555.
- Mujumdar, A. S., y Law, C. L. 2010. **Drying technology: Trends and applications in postharvest processing.** *Food and Bioprocess Technology*, 3(6):843-852.
- Nenadis, N., Wang, L. F., Tsimidou, M., y Zhang, H. Y. 2004. **Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS•+ assay.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15):4669-4674.
- Okoli, C.O., Akah, P.A. y Nwafor, S.V. 2002. **Anti-inflammatory activity of plants.** *Journal of Natural Remedies*, 3(1):01-30.
- Ospina, J. D., Orozco, M. S. S., y Correa, C. R. B. 2016. **Efecto del secado y la edad de las plantas en la composición de los aceites esenciales de *Lippia alba* (Mill.) NE Br. ex Britton & P. Wilson y *Lippia organoides* Kunth.** *Acta Agronómica*, 65(2):170.
- Ottum, M. y Mistry, A. 2015. **Advanced glycation end-products: modifiable environmental factors profoundly mediate insulin resistance.** *Journal of clinical biochemistry nutrition*, 57(1):1-12.

- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., y Prior, R. L. 2001. **Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10): 4619-4626.
- Pereira, R. P., Fachinetto, R., Prestes, A. S., Puntel, R. L., y Heinzmann, B. M. 2009. **Antioxidant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*.** *Neurochemical research*, 34(5):973-983.
- Pitocco, D., Tesauro, M., Alessandro, R., Ghirlanda, G. y Cardillo, C. 2013. **Oxidative stress in diabetes: implications for vascular and other complications.** *International Journal of Molecular Sciences*, 14(11):21525-21550.
- Poáceas, M., y Piperáceas, L. 2006. **Plantas utilizadas en procesos inflamatorios y cancerosos en el área del Caribe.** *Revista de Fitoterapia*, 6(1), 59-63.
- Puntieri, J. G., Ochoa, J., Guenuleo, B., Torrego, S., Martínez, E., Stefe, S., y Naón, S. 2019. **Estudio de Uñi (*Ugni molinae* Turcz.; Myrtaceae) con fines productivos y de conservación.** Sociedad Argentina de Botánica 181p
- Raja, R. R. 2012. **Medicinally potential plants of Labiatae (Lamiaceae) family: an overview.** *Research Journal of Medicinal Plant*, 6(3):203-213.
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S. y Dhama, K. 2014. **Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay.** *BioMed Research International*, 1:1-19.
- Rivera, J. A., Muñoz-Hernández, O., Rosas-Peralta, M., Aguilar-Salinas, C. A., Popkin, B. M. y Willett, W.C. 2008. **Consumo de bebidas para una vida saludable: recomendaciones para la población mexicana.** *Salud Pública de México*, 50(2):173-195.
- Rubió, L., Motilva, M. J., y Romero, M. P. 2013. **Recent advances in biologically active compounds in herbs and spices: a review of the most effective antioxidant and anti-inflammatory active principles.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(9):943-953.
- Sangwan, N. S., Farooqi A. H. A., Shabih F., y Sangwan R. S. 2001. **Regulation of essential oil production in plants.** *Plant Growth Regulation*, 34(1):3-21.
- Santos, M. 2014. **Etnoecología, etnobotánica y aspectos ecológicos de las plantas útiles de la comunidad P'urhepecha San Juan Carapan, Michoacán.** Tesis de Lic., Universidad Intercultural Indígena de Michoacán.
- Sastre, A. y Hernández, M. 1999. **Tratado de nutrición.** España. Díaz de Santos. 1476 p.
- Schewe, T., Kühn, H., y Sies, H. 2002. **Flavonoids of cocoa inhibit recombinant human 5-lipoxygenase.** *The Journal of nutrition*, 132(7), 1825-1829.
- Sekirov, I., Russell, S.L., Antunes, L.C., y Finlay, B.B. 2010. **Gut microbiota in health and disease.** *Physiol.*, 90(3):859-904.
- Shin, T. Y., Park, S. B., Yoo, J. S., Kim, I. K., Lee, H. S., Kwon, T. K., y Kim, S. H. 2010. **Anti-allergic inflammatory activity of the fruit of *Prunus persica*: Role of calcium and NF- κ B.** *Food and Chemical Toxicology*, 48(10):2797-2802.
- Sinha, S., Murugesan, T., Maiti, K., Gayen, J. R., Pal, M., y Saha, B. P. 2001. **Evaluation of anti-inflammatory potential of *Bergenia ciliata* Sternb. rhizome extract in rats.** *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53(2):193-196.

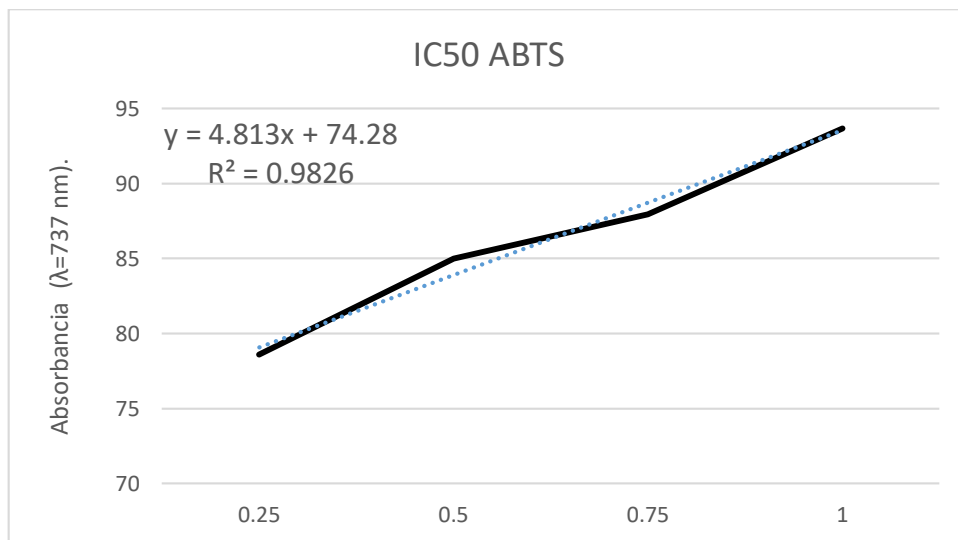
- Slanis, A. C., y Bulacio, E. D. V. 2005. ***Hedeoma mandonianum* (Lamiaceae) en Argentina.** *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 40(3-4):285-287.
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., y Kaur, H. 2011. **Phytochemical screening and extraction, A review.** *International Journal of Pharmaceutica Sciencia*, 1 (1):98-106.
- Tomaino, A., Cimino F., Zimbalatti V., Venuti V., Sulfaro V., De Pasquale A., y Saija A. 2005. **Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils.** *Food Chemistry*, 89(4):549-554
- Toor, R. K., y Savage, G. P. 2006. **Effect of semi-drying on the antioxidant components of tomatoes.** *Food Chemistry*, 94(1), 90-97.
- Torres-Martínez, R., Bello-González, M. Á., Molina-Torres, J., Ramírez-Chávez, E., García-Rodríguez, Y., Fulgencio-Negrete, R., García-Hernández, A., López-Gómez, R., Martínez-Pacheco, M.M., Lara-Chávez, B.N., y Salgado-Garciglia, R. 2014. **Efecto de la fertilización sobre el crecimiento y contenido de compuestos volátiles en *Satureja macrostema* (Benth) Briq.** *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 5(21):122-134.
- Valdenegro, M., Almonacid, S., Henríquez, C., Lutz, M., Fuentes, L., y Simpson, R. 2013. **The effects of drying processes on organoleptic characteristics and the health quality of food ingredients obtained from goldenberry fruits (*Physalis peruviana*).** *Scientific Reports*, 2:642.
- Villena, C. A., y Arroyo, J. L. 2013. **Efecto antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* (Yawar socco) en ratas con inducción a la inflamación aguda y crónica.** *Ciencia e Investigación*, 1561-0861.
- Velázquez, D., de Arriola, E., y Tillett, S. 1995. **Usos populares de Lamiaceae en Venezuela.** *Acta Botánica Venezuéllica*, 5-20.
- Yang, Q., Liu, Q., Lv, H., Wang, F., Liu, R., y Zeng, N. 2020. **Effect of pulegone on the NLPR3 inflammasome during inflammatory activation of THP-1 cells.** *Experimental and Therapeutic Medicine*, 19(2):1304-1312.
- Yoon, C. H., Chung, S. J., Lee, S. W., Park, Y. B., Lee, S. K., y Park, M. C. 2013. **Gallic acid, a natural polyphenolic acid, induces apoptosis and inhibits proinflammatory gene expressions in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes.** *Joint Bone Spine*, 80(3):274-279.
- Yoshikawa T. y Naito Y. 2002. **What is oxidative stress.** *Japan Medical Association Journal*, 45(7):271-276.
- WHO. 2002. **Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005.**
- Wiart, C. 2007. **Anti-inflammatory plants. In: ethnopharmacology of medicinal plants: Asia and the Pacific.** Ed. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey. Chapter 1. 1-56 pp.
- Zhu, F., Du, B., y Xu, B. 2018. **Anti-inflammatory effects of phytochemicals from fruits, vegetables, and food legumes: A review.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(8):1260-1270.

11. ANEXOS

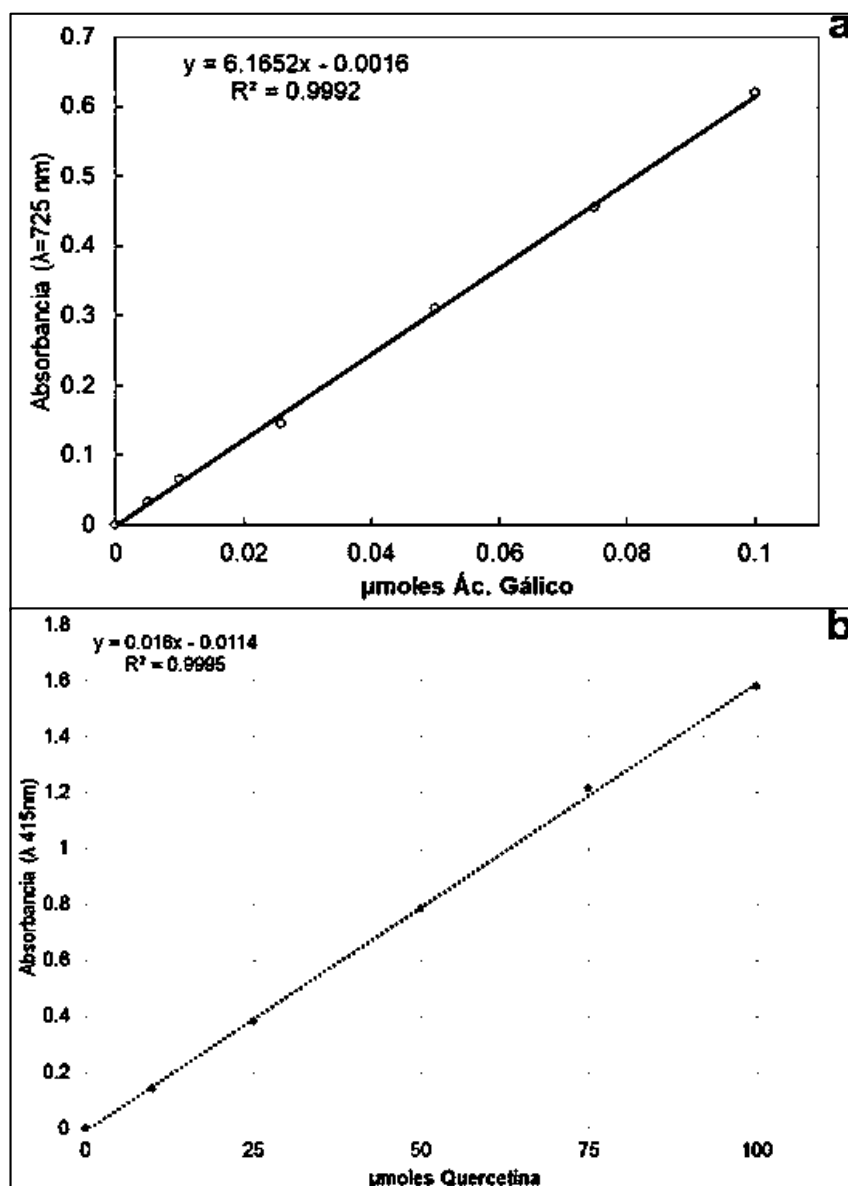
11.1 Curva de calibración para la determinación de la IC₅₀ de la infusión de hojas frescas de *Hedeoma piperita* por el método DPPH.



11.2 Curva de calibración para la determinación de la IC₅₀ de la infusión de hojas frescas de *Hedeoma piperita* por el método ABTS.



11.3 Curva de calibración para la cuantificación de ácidos fenólicos totales, realizada con ácido gálico ($\mu\text{moles/g}$ peso fresco) ($\lambda=725\text{ nm}$) (a) y para la cuantificación de flavonoides totales, realizada con quercetina ($\mu\text{moles/g}$ peso fresco) ($\lambda=415\text{ nm}$) (b).



11.4 Curva de calibración para la cuantificación de terpenoides totales, realizada con pulegona en diferentes concentraciones (1, 10, 50 y 100 mg/mL) ($\lambda=558$ nm).

