



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

FACULTAD DE QUÍMICO-FARMACOBIOLOGÍA

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE *in vitro* DE LOS EXTRACTOS Y
COMPUESTOS TERPÉNICOS DE TORONJIL (*Agastache mexicana*)”**

TESIS

que presenta:

EMILIO CORIA OROZCO

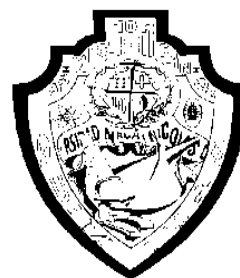
**COMO REQUISITO PARA OBTENER
EL TÍTULO PROFESIONAL DE**

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

**Director de Tesis:
Doctor en Ciencias en Biotecnología de Plantas
RAFAEL SALGADO GARCIGLIA**

**Co-Director de Tesis:
Maestro en Ciencias en Biología Experimental
RAFAEL TORRES MARTÍNEZ**

Morelia, Michoacán, Marzo de 2016



EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS DE LA UMSNH, BAJO LA DIRECCIÓN DEL D.C. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA Y CO-DIRECCIÓN DEL M.C RAFAEL TORRES MARTÍNEZ. PROYECTO DE INVESTIGACIÓN CIC/2014-2015 RSG.

DEDICATORIA

a Mateo

Agradecimientos

Quiero agradecer a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, por la beca otorgada para la realización de la presente tesis. A la facultad de Químico Farmacobiología por permitirme formarme en sus aulas como profesionista.

Deseo expresar un sincero y enorme agradecimiento para el Dr. Rafael Salgado Garciglia, por aceptarme como tesista en el laboratorio de Biotecnología vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas y por dirigirme sabiamente con disponibilidad y paciencia en la elaboración de la presente tesis; de igual manera agradezco afectuosamente al M.C. Rafael Torres Martínez por compartir conmigo sus conocimientos...

A los profesores, revisores e integrantes del comité sinodal.

A mis compañeros de laboratorio, mis amigos y compañeros, a todos ellos mil gracias.

CONTENIDO

I-ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS	I
II-RESUMEN	1
1-INTRODUCCIÓN	3
2-ANTECEDENTES	5
2.1. USO DE PLANTAS MEDICINALES EN MÉXICO	5
2.1.1. Principios activos de las plantas medicinales	6
2.1.1.1. <i>Fenoles</i>	7
2.1.1.2. <i>Flavonoides</i>	7
2.1.1.3. <i>Terpenos</i>	8
2.1.2. Antioxidantes de origen vegetal	8
2.2. ESTRÉS OXIDATIVO	9
2.2.1. Radicales libres	9
2.2.2. Especies reactivas del oxígeno	10
2.2.2.1. <i>Anión superóxido</i>	11
2.2.2.2. <i>Peróxido de hidrógeno</i>	11
2.2.2.3. <i>Hidroxilo</i>	11
2.2.2.4. <i>Peroxilo</i>	11
2.2.2.5. <i>Oxígeno singulete</i>	11
2.2.3. Especies reactivas del nitrógeno	12
2.2.3.1. <i>Óxido nítrico</i>	12
2.2.3.2. <i>Peroxinitrito</i>	12
2.2.4. Oxidación proteica	12
2.2.5. Oxidación del ácido desoxirribonucleico	13
2.2.6. Peroxidación lipídica	13
2.3. ANTIOXIDANTES	14
2.3.1. Mecanismo de acción de los antioxidantes	15
2.3.2. Antioxidantes primarios	15
2.3.2.1. <i>Superóxido dismutasa (SOD)</i>	15
2.3.2.2. <i>Glutación peroxidasa (GPx)</i>	15
2.3.2.3. <i>Otras enzimas</i>	16
2.3.3. Antioxidantes secundarios	16
2.3.3.1. <i>Vitamina C</i>	16
2.3.3.2. <i>Vitamina E</i>	17
2.3.3.3. <i>Urato</i>	17

2.3.3.4. <i>Bilirrubina</i>	17
2.3.3.5. <i>Ubiquinonas</i>	17
2.3.4. Antioxidantes terciarios	17
2.3.5. Antioxidantes sintéticos	18
2.3.5.1. <i>BHA</i>	18
2.3.5.2. <i>BHT</i>	18
2.3.5.3. <i>TROLOX</i>	18
2.4. MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANT	19
2.4.1. Método DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil)	19
2.4.2. ABTS/TAC	
[Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)]	19
2.4.3. TBARS (Especies reactivas del ácido tiobarbitúrico)	20
2.4.4. Peroxidación lipídica y malonildialdehído (MDA)	21
2.4.5. Formación del complejo MDA-TBA2	21
2.4.6. Determinación de TBA y MDA	21
2.5. DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL EN ESTUDIO	21
2.5.1. <i>Agastache mexicana</i>	21
2.5.2. Uso medicinal, etnobotánica y antropología	22
2.5.3. Taxonomía y distribución	25
2.5.4. Clasificación científica	25
2.5.5. Fitoquímica	25
3. JUSTIFICACIÓN	26
4. OBJETIVO GENERAL	27
4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
5. MÉTODOS Y MATERIALES	28
5.1. MATERIAL BIOLÓGICO	28
5.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS	28
5.3. PREPARACIÓN DE LOS RADICALES	29
5.3.1. Elaboración de reactivos para el ensayo TBARS	29
5.3.2. Preparación de medios y determinación de proteína	30
5.3.3. Proceso para el aislamiento de mitocondria de hígado de rata	30
5.4. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	31
5.4.1. Método DPPH	31
5.4.2. Método ABTS	31
5.4.3. Método TBARS	31

5.5. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS POR CG/EM	32
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
6.1. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE TORONJIL MORADO	33
6.1.1. Actividad antioxidante por el método DPPH	33
6.1.2. Actividad antioxidante por el método ABTS	34
6.1.3. Actividad antioxidante por el método TBARS	36
6.2. IDENTIFICACIÓN POR CG/EM DE LOS COMPUESTOS DEL EXTRACTO METANOLICO DE TORONJIL	37
6.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS COMPUESTOS MAYORITARIOS DE TORONJIL	39
6.3.1. Actividad antioxidante por el método DPPH	39
6.3.2. Actividad antioxidante por el método ABTS	40
6.3.3 Actividad antioxidante por el método TBARS	41
7. CONCLUSIONES	43
8. LITERATURA CITADA	44

I. ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros

1. Clasificación científica de <i>A. mexicana</i>	25
2. Preparación de reactivos para llevar acabo el ensayo de lipoperoxidación inducida en riñón de rata.	29
3. Composición nutrimental para el medio 1.	30
4. Composición nutrimental para el medio 2.	30
5. Compuestos mayoritarios del extracto metanólico de toronjil morado (<i>A. mexicana</i> spp <i>mexicana</i>) por análisis CG/EM.	38

Figuras

1. Mecanismo de inhibición del DPPH.	19
2. Mecanismo de Inhibición de ABTS.	20
3. <i>Agastache mexicana</i> spp <i>mexicana</i> (H.B.K) Lint & Epl. (Toronjil morado).	22
4. Actividad antioxidante de los extractos hexánico, hidroalcohólico y metanólico de <i>A. mexicana</i> spp <i>mexicana</i> así como del control butil hidroxitolueno mediante el método DPPH.	34
5. Actividad antioxidante de los extractos hexánico, infusión y metanólico de <i>A. mexicana</i> spp <i>mexicana</i> así como del control butil hidroxitolueno por el método ABTS.	35
6. Actividad antioxidante de los extractos metanólico, infusión y hexánico de <i>A. mexicana</i> por el método TBARS.	36
7. Cromatograma de gases correspondiente a un extracto metanólico de parte aérea (hojas y tallo) de toronjil (<i>Agastache mexicana</i>).	38
8. Actividad antioxidante de los compuestos terpénicos de <i>A. mexicana</i> por el método DPPH.	39
9. Actividad antioxidante de los compuestos terpénicos de <i>A. mexicana</i> por el método ABTS	40
10. Actividad antioxidante de los extractos de <i>A. mexicana</i> por el método TBARS.	41

II. RESUMEN

En la actualidad diversas plantas medicinales se utilizan de manera tradicional por sus propiedades benéficas. Entre las plantas que se distribuyen en el estado de Michoacán y que se han utilizado de manera sobresaliente en la medicina popular, destaca el toronjil morado (*Agastache mexicana* 'Kunth' Lint et Epling), la cual se ha estudiado desde el punto de vista etnobotánico, farmacológico, quimiotaxonómico y fitoquímico. El toronjil se consume como infusión o decocción para tratar desórdenes gastrointestinales, ansiedad, insomnio, alteraciones cardiovasculares y como analgésico y anti-inflamatorio. A pesar de su amplio uso como remedio herbolario no existen estudios científicos que corroboren alguna de sus propiedades terapéuticas. El uso del toronjil (*A. mexicana*) recae principalmente por su contenido de compuestos volátiles, ya que se han reportado a canfeno, β -pineno, limoneno, 1,8-cineol, furfural, citronelal, mentona y pulegona, como compuestos mayoritarios. Este tipo de metabolitos tienen actividad antioxidante y, sin embargo hay pocas evidencias de dicha actividad en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*. Es por ello, que en la presente investigación, el objetivo fue evaluar el efecto antioxidante de diferentes extractos de *A. mexicana* y sus principales compuestos terpénicos en modelos experimentales *in vitro*. Los extractos fueron obtenidos a partir de parte aérea (hoja, tallo y flor) de plantas de *A. mexicana*, mediante maceración metanólica, infusión y reflujo hexánico en aparato tipo Soxhlet. Los tres extractos fueron filtrados y llevados a sequedad con gas nitrógeno, resuspendiendo en metanol a las concentraciones de 0.001, 0.01, 0.1 y 1 mg/mL. La actividad antioxidante se determinó por los métodos DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo), ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) y TBARS (ácido tiobarbitúrico); encontrando que el extracto metanólico fue el que alcanzó la mayor inhibición de radicales libres con los tres ensayos (92.54%, DPPH; 99.30%, ABTS; y 93.69%, TBARS) a concentraciones de 0.01 mg/mL. El análisis por CG-EM de dicho extracto mostró que los compuestos mayoritarios presentes fueron de tipo terpénico, siendo limoneno, linalol, mentona, α -terpineol, pulegona y eugenol, los mayoritarios. De éstos, el eugenol mostró la mayor capacidad antioxidante en los tres métodos *in vitro* (98.10%, TBARS; 94.35%, DPPH; y 98.26%, ABTS) a partir de las concentraciones de 0.001, 0.01 y 1 mg/mL, respectivamente. Los terpenos limoneno, linalol, mentona, α -terpineol y pulegona exhibieron una actividad antioxidante baja. Se concluye que el extracto metanólico de *A. mexicana* exhibió la mayor capacidad antioxidante en los modelos *in vitro* ensayados, siendo el eugenol el responsable de esta actividad.

Palabras clave: Capacidad antioxidante, extractos vegetales, radicales libres, terpenos y Toronjil morado.

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE *in vitro* DE LOS EXTRACTOS Y COMPUESTOS TERPÉNICOS DE TORONJIL (*Agastache mexicana*)”

ABSTRACT

Actually many medicinal plants traditionally are used for its beneficial properties. Among the plants that are distributed in Michoacán State (México), purple toronjil (*Agastache mexicana* 'Kunth' Lint et Epling) has been studied from the ethnobotanical, pharmacological, chemotaxonomic and phytochemical point of view. Toronjil is consumed as infusion or decoction to treat anxiety, insomnia, gastrointestinal disorders, cardiovascular disorders and as analgesic and anti-inflammatory. Despite its wide use as folk medicine, there are no scientific studies that corroborate any of its therapeutic properties. The use of toronjil (*A. mexicana*) is mainly due to its content of volatile compounds such as camphene, β -pinene, limonene, 1,8-cineol, furfural, citronellal, menthone and pulegone, as major compounds. This type of metabolites have antioxidant activity and there is little evidence of such activity in experimental *in vivo* and *ex vivo* assays. It is therefore, that in this research, the objective was to evaluate the antioxidant effect of different extracts of *A. mexicana* and its major terpene compounds *in vitro* experimental models. Extracts were obtained from aerial part (leaf, stem and flower) of *A. Mexicana* plants, using maceration methanolic, infusion and reflux hexanic in type Soxhlet apparatus. The three extracts were filtered and taken to dryness with gas nitrogen, resuspending in methanol at concentrations of 0.001, 0.01, 0.1 and 1 mg/mL. The antioxidant activity was determined by the DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrilhidracilo), ABTS methods (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico acid) and TBARS (thiobarbituric acid); finding that the methanolic extract was the one who reached a greater inhibition with the three assays (92.54%, DPPH; 99.30%, ABTS; y 93.69%, TBARS) at concentrations of 0.01 mg/mL. Analysis by GC-MS of this extract showed that the present major compounds were limonene, linalool, menthone, α -terpineol, pulegone and eugenol. The compound eugenol was which showed the greater antioxidant capacity *in vitro* methods three (98.10, TBARS; 94.35, DPPH and 98.26%, ABTS) at concentrations of 0.001, 0.01, and 1 mg/mL, respectively. The terpenes limonene, linalool, menthone, α -terpineol and pulegone exhibited a lower antioxidant activity. It is concluded that methanol extract of *A. mexicana* and eugenol exhibit greater antioxidant capacity *in vitro* models tested.

Keywords: Antioxidant capacity, plant extracts, free radicals, purple toronjil.

1. INTRODUCCIÓN

Los radicales libres además de dañar a las membranas celulares también tienen una gran afinidad hacia el núcleo y su contenido genético, causan destrucción o mutilación de los ácidos nucleicos, los encargados de almacenar la información genética, provocan así de esta manera que sea más factible que se desarrollen diversos tipos de enfermedades. La primera evidencia se recoge de diversos estudios epidemiológicos los cuales muestran correlaciones estadísticas entre presencia insuficiente de nutrientes del tipo antioxidante en el plasma sanguíneo, así como la relación entre alimentos y la incidencia de patologías (Murray *et al.*, 1997).

La acción de tipo cadena que los radicales libres llevan a cabo al entrar en contacto e interaccionar con otro tipo de moléculas con un equilibrio electroquímicamente estable, está ligada al cáncer y al daño arterial causado por la acción de los lípidos de baja densidad oxidados directa o indirectamente, relacionando entonces a las especies reactivas también con enfermedades cardiovasculares (Murray *et al.*, 1997).

En el caso del organismo humano se produce un problema cuando se ve sometido a tener que tolerar constantemente un exceso de radicales libres, es que se denominan esencias o aceites esenciales, cuyos principales constituyentes son los terpenos (Dudareva y Negre, 2005).

Los aceites esenciales de diversas especies de plantas ejercen actividad antioxidante, dichos efectos son atribuidos a sus componentes terpénicos (Cardona y Mejía, 2009; Daniel *et al.*, 2009).

En el estado de Michoacán existe una gran diversidad vegetal y se ha demostrado que muchas especies poseen actividad antioxidante, para el desarrollo del presente trabajo se utilizó la especie *Agastache mexicana* spp. *mexicana* de la familia Lamiaceae, comúnmente denominada toronjil morado, a la que se le aplicaron tres ensayos de capacidad antioxidante DPPH, ABTS y TBARS. Se cuantificó la actividad de tres tipos de extractos con diferente

polaridad, así como la realización de un perfil cromatográfico para identificar el tipo de metabolitos secundarios presentes en el o los extractos con mayor actividad antioxidante de *A. mexicana*.

normal que el sistema genere radicales libres, pero cuando factores externos actúan sobre nuestro organismo. Dichas concentraciones se elevan considerablemente, algunas de estas especies reactivas del oxígeno son más dañinas que otras y además factores como la contaminación ambiental, polución industrial y acústica, humo de tabaco, pesticidas, herbicidas, alimentación descontrolada y poco consiente, aumenta tanto la concentración que puede llegar a superar la resistencia metabólica (capacidad de reponer la homeostasis) (Flores, 2000).

Recientemente, muchas medicinas naturales derivadas de plantas son de gran interés debido a sus diversas propiedades biológicas y perfil de seguridad en el tratamiento de diversas afecciones médicas, incluyendo las que provocan estrés oxidativo (Sheir *et al.*, 2001). Las plantas aromáticas son un grupo potencial para la obtención de este tipo de compuestos, ya que producen fracciones volátiles

2. ANTECEDENTES

2.1. USO DE PLANTAS MEDICINALES EN MÉXICO

Desde la antigüedad las plantas han sido un recurso al alcance del ser humano para su alimentación y para la curación de sus enfermedades, veneradas como virtudes por la humanidad entera desde siempre, poseen propiedades por las cuales se les ha reconocido y transmitido sus conocimientos acerca de ellas por generaciones. Las plantas curativas históricamente son el recurso terapéutico por excelencia en la medicina tradicional mexicana (Argueta *et al.*, 1994), es por esto que siempre han sido de vital importancia para el hombre, supliendo necesidades básicas como alimento y medicina. Por tal razón, se han estudiado desde hace muchos años, demostrando sus grandes efectos biológicos en la salud humana; ya sea como reguladores, inhibidores enzimáticos, conservadores, antioxidantes, entre otros (Raskyn *et al.*, 2002).

Un referente importante acerca de las plantas en México es la obra del "Códice de la Cruz Badiano" de Martín de la Cruz, una recopilación de información y dibujos de plantas medicinales escrito en Náhuatl traducido al latín por Juan Badiano que incluye nombres de 240 plantas, 4 muestras vegetales, 26 animales y 18 minerales. Relacionado más específicamente a la vegetación en Michoacán se encuentra el "Códice Florentino" con amplio contenido herbolario, este tipo de obra fungió como una fuente útil para la farmacopea europea (Maldonado, 2004).

En México, el obispo Vasco de Quiroga fundo el Hospital de Santa Fe para atender a los enfermos, posteriormente hizo lo mismo en Santa Fe de la Laguna, Michoacán, donde se empleó la medicina indígena y su terapéutica herbolaria (Cámpos *et al.*, 2008; INEGI, 2010).

Las comunidades indígenas poseen un profundo contacto de su medio ambiente y su ecología (Leonti *et al.*, 2003), tienen el conocimiento de los numerosos usos que se les pueden dar a las plantas (Ankli *et al.*, 2002). Estos conocimientos constituyen una base importante para la conservación de la biodiversidad global y para su uso sustentable (Frey *et al.*, 1998), la información sobre plantas

medicinales utilizadas en Michoacán está dispersa en muchas publicaciones (Bello, 2006).

2.1.1. Principios activos de las plantas medicinales

La ciencia moderna ha estado analizando y estudiando los efectos terapéuticos de las plantas, gran parte de la comunidad científica se ha dado a la tarea de revisar, comparar y clasificar las diversas propiedades para conocer los principios activos, determinar sus estructuras químicas, procurar su síntesis, proponer modificaciones estructurales en busca de mayor actividad y, finalmente, dar a conocer a la humanidad los resultados de los estudios (Bequette, 1997).

Un gran porcentaje de los principios activos de plantas está comprendido dentro de los llamados productos naturales o metabolitos secundarios, son definidos como compuestos químicos de estructura relativamente compleja y de distribución más restringida y más característica de fuentes botánicas específicas (Lock, 1994).

Durante muchos años las plantas han sido usadas en muchos campos, incluyendo medicina, nutrición, saborizantes, bebidas, repelentes, fragancias, cosméticos, cigarrillos y otros propósitos industriales. Desde épocas remotas las plantas han sido la base para casi todas las terapias medicinales, hasta cuando las drogas sintéticas se desarrollaron en el siglo XIX (Djeridane *et al.*, 2006).

La dieta juega un papel importante en la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, fundamentalmente a través del aporte de compuestos bioactivos de origen vegetal cuya actividad antioxidante y las evidencias epidemiológicas se asocian al consumo de vegetales y frutas con una menor incidencia de enfermedades crónicas (Prior *et al.*, 2005).

Una amplia gama molecular clasificados por su origen como metabolitos secundarios, se encuentran distribuida entre las familias de plantas existentes conocidas, entre sus propiedades nuestro equipo de trabajo se enfoca en la actividad antioxidante. La investigación de las propiedades antioxidantes de las

plantas medicinales y alimenticias lleva décadas marcando un crecimiento sostenido. Un número importante de productos obtenidos del reino vegetal, como los aceites esenciales, alcaloides y los polifenoles, posee efectos antioxidantes los cuales son evidenciados mediante diferentes ensayos *in vitro* e *in vivo* (Lock, 1994).

Un incremento global del interés por la búsqueda y obtención de antioxidantes de origen natural como alternativas para sustituir a los antioxidantes sintéticos utilizados por la industria, debido a sus efectos nocivos para la humanidad y el medio ambiente.

2.1.1.1. Fenoles

Estabilizan los radicales libres al ceder un hidrógeno de sus grupos hidroxilos, formándose un puente de hidrógeno entre dos grupos cercanos. El grado de actividad de éstos y de otros muchos antioxidantes, está relacionado con el número de grupos hidroxilo que posee la molécula (Rice *et al.*, 1996; Nicolaiew *et al.*, 1998).

Los compuestos fenólicos son conocidos por su habilidad de realiza un barrido de moléculas radicales (Hall *et al.*, 1997). El término, reúne a todas aquellas sustancias que poseen varias funciones fenol, el nombre popular del hidroxibenceno, unido a estructuras aromáticas o alifáticas. Se encuentran casi en todos los alimentos de origen vegetal, ricos en grupos hidroxilo, son sustancias que influyen en la calidad, aceptabilidad y estabilidad de los alimentos, es importante mencionar que no toda ingesta de compuestos fenólicos es nutricionalmente favorable (Rice *et al.*, 1996). Muchos compuestos antioxidantes actúan por un único mecanismo, pero otros como por ejemplo los compuestos fenólicos pueden tener acciones combinadas. (Ramón *et al.*, 1998).

2.1.1.2. Flavonoides

Los flavonoides están presentes en casi cualquier vegetal superior y se les puede encontrar en cualquier parte del vegetal, son compuestos que presentan dos anillos de 6 miembros, denominados A y B, unidos por tres átomos de carbono (C6-C3-C6). Es muy común que se forme un heterociclo y 2-pirona al cual se le denomina anillo C, la mayoría de los flavonoides naturales presentan 12

diferentes tipos de núcleos y se encuentran comúnmente en forma de glicósidos (Pratt, 1976).

2.1.1.3. Terpenos

El término proviene de “Turpentine”, también llamado resina del árbol del pino, se creía que contenía ácidos resinosos y algunos hidrocarburos a los cuales se les llamaba terpenos, tradicionalmente todos los compuestos que son creados por plantas a partir de subunidades del isopreno son denotados como terpenos. Muchas plantas producen terpenos volátiles en orden de atraer diferentes especies de insectos para la polinización, de lo contrario para expulsar ciertos animales que usan las plantas como comida, algunos terpenos son tóxicos (Breitmaier, 2006).

2.1.2. Antioxidantes de origen vegetal

Los radicales libres tienen una función crucial en el desarrollo del tejido dañado en varias enfermedades humanas como cáncer, enfermedades neurodegenerativas, malaria, aterosclerosis y diversos eventos patológicos (Gutteridge, 1994).

Los antioxidantes tal vez tienen una función importante en la prevención de estas enfermedades, por lo que existe un creciente interés en los efectos antioxidantes de los compuestos derivados de las plantas, los cuales pueden ser relevantes en relación a su incidencia nutricional y el papel que representan para el equilibrio salud-enfermedad (Steinmetz *et al.*, 1996; Aruoma, 1998; Bandoniene *et al.*, 2000; Pieroni *et al.*, 2002; Couladis *et al.*, 2003).

Un gran número de reportes acerca del aislamiento y pruebas de derivados antioxidantes en plantas han sido descritos en las décadas pasadas, constituyen un amplio rango de sustancias, incluyendo compuestos que contienen fenoles o nitrógeno y carotenoides (Shahidi *et al.*, 1992; Velioglu *et al.*, 1998). Un gran número de diferentes plantas aromáticas han sido investigadas por su potencial antioxidante, en algunas, particularmente en aquellas pertenecientes a la familia Lamiaceae, se han encontrado ser muy efectivas con respecto a los antioxidantes naturales (Pietta *et al.*, 1998).

2.2. ESTRÉS OXIDATIVO

En determinadas situaciones, las defensas antioxidantes pueden verse desbordadas por la excesiva generación de especies reactivas del oxígeno. Este desequilibrio entre especies oxidantes y antioxidantes está relacionado en varias etapas de la patogénesis de muchas enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson; además del cáncer, problemas vasculares como la aterosclerosis, desórdenes inflamatorios (Miglior *et al.*, 2009) y al proceso de envejecimiento (Lee *et al.*, 2004).

Algunos estudios recientes indican que la manera más efectiva de evitar el daño producido por dichos radicales es su estabilización por parte de antioxidantes (Ramírez *et al.*, 2007), los cuales constituyen uno de los principales recursos de la biología humana para contrarrestar los daños causados por los derivados del oxígeno, que actúan como desestabilizadores (Siddhuraju *et al.*, 2007). Es debido a esto, que en los últimos años, el estrés oxidativo y sus efectos adversos en la salud humana han llegado a ser un tema de gran interés en los campos biológico, medicinal, nutricional y agroquímico (Magalhães *et al.*, 2008).

2.2.1. Radicales libres

Dentro de la homeostasis metabólica normal, los radicales libres son productos intermediarios en diversos procesos vitales, los cuales son regulados por el organismo de manera natural, existe así un equilibrio (Starkke, 2003).

Para el año de 1954 la doctora Rebeca Gerschman sugirió que los agentes pro-oxidantes radicales libres eran tóxicos y generadores de patologías. Estableció tres postulados básicos:

- 1- Los radicales libres constituyen un mecanismo molecular común de daño cuando los animales en experimentación son sometidos a altas presiones de oxígeno y radiaciones ionizantes.
- 2- El desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes produce efectos tóxicos.
- 3- La producción de radicales libres es un fenómeno continuo con implicaciones en el envejecimiento y la carcinogénesis (García *et al.*, 2001).

Un radical libre puede definirse como una molécula o fragmento de ella con uno o más electrones desapareados en los orbitales externos, dándole la propiedad de estar electroquímicamente inestable, es por este motivo que son capaces de reaccionar con casi cualquier tipo de moléculas que pueden o no ser estables. Los radicales libres provocan así una reacción que convierte a las moléculas estables en moléculas radicales con la misma inestabilidad que el radical libre que fue el encargado de iniciar dicha reacción, su vida media es del orden de milisegundos, variando según el tipo de radical libre (Halliwell, 1994).

La acumulación excesiva de estos agentes en el organismo puede provocar daños en las células, originando degeneración de los tejidos, lo que conlleva al desarrollo de diferentes enfermedades. Aquellos radicales derivados del oxígeno representan la clase más importante de muchas especies reactivas generadas en los sistemas vivos (Valko *et al.*, 2004).

2.2.2. Especies reactivas del oxígeno

Gran parte de estas especies derivadas del oxígeno son producidas de manera normal en concentraciones bajas como parte del metabolismo aeróbico, producidas principalmente en la cadena de transporte de electrones mitocondrial.

El daño celular causado por la acción de este tipo de moléculas normalmente es reparado de manera constante por parte de diferentes adaptaciones evolutivas que sirven como defensas por parte de los organismos aerobios. La producción elevada de especies reactivas del oxígeno causa agotamiento de energía (Adenosín trifosfato o ATP) que ocasionan la muerte anormal de las células cercanas (Fina, 2003).

2.2.2.1. Anión superóxido

El estado de reducción del oxígeno de uno de sus electrones (O_2^-) relativamente es poco reactivo y se forma en muchas reacciones como el producto de una autooxidación. Es un producto principalmente de reacciones del oxígeno con la cisteína o riboflavina así como también en la cadena respiratoria mitocondrial (Boveris *et al.*, 1972).

2.2.2.2. Peróxido de hidrógeno

El H_2O_2 conocido también como agua oxigenada es el resultado de la reducción de dos electrones del oxígeno es formado partir del radical superóxido, ofrecido por dismutación o directamente del oxígeno, se convierte en agua por acción de la catalasa, no es propiamente un radical libre pero su toxicidad es importante ya que atraviesa fácilmente las membranas (Liovech *et al.*, 1994).

2.2.2.3. Hidroxilo

Es el estado de reducción de tres electrones de las moléculas de oxígeno ($OH\cdot$) puede generarse *in vivo* como consecuencia de radiaciones de alta energía de rayos X y rayos gamma (γ), puede además provocar rotura hemolítica del agua corporal. La luz ultravioleta no tiene suficiente energía para escindir una molécula del agua pero puede dividir el agua oxigenada en dos moléculas de radical hidroxilo, otro proceso más importante en la formación del radical hidroxilo es la reacción de Fenton, también la reacción de Haber-Weiss catalizada por hierro o cobre, a partir de agua oxigenada y del radical superóxido (Liovech *et al.*, 1994).

2.2.2.4. Peroxilo

Es una molécula formada a partir de hidroperóxidos orgánicos por ejemplo lípidos o ácidos por pérdida de hidrógeno ($ROO\cdot$) (Liovech *et al.*, 1994).

2.2.2.5. Oxígeno singulete

Es una forma excitada del oxígeno molecular, no se cataloga como un radical libre y es formado por la acción de la luz sobre las moléculas del oxígeno en un proceso *in vivo*. Interacciona con las moléculas combinándose químicamente con ellas o bien transfiriéndoles energía de excitación. También puede formarse en la oxidación del NADPPH en los microsomas (Kanofsky, 1989).

2.2.3. Especies reactivas del nitrógeno

La sobreproducción de especies reactivas del nitrógeno es denominada como estrés nitrosativo, provocando reacciones de nitrosilacion, lo que altera la estructura de las proteínas, inhibiendo sus funciones (Klatt *et al.*, 2000; Ridnour *et al.*, 2004).

2.2.3.1. Óxido nítrico

Es un radical abundante que funge como un importante señalizador biológico oxidativo (NO) y actúa en una variedad de diversos procesos fisiológicos incluyendo la neurotransmisión, presión sanguínea, mecanismos de defensa, relajación de músculos y de sistema inmune (Nisoli, 2003). Esta molécula desempeña también un papel importante en la función vascular durante las respuestas inflamatorias y provoca aumento de la vasodilatación, la permeabilidad vascular y la quimiotaxis (Fubini *et al.*, 2003).

Se sintetiza a partir de L-arginina, oxígeno molecular, NADPH y otros cofactores por la acción de la enzima óxido nítrico sintetasa (Spitzer *et al.*, 2002).

2.2.3.2. Peroxinitrito

El (NOOO⁻) bajo condiciones de estrés, el anión superóxido y el óxido nítrico pueden reaccionar para producir cantidades significativas de esta molécula mucho más reactiva, el cual es un potente agente oxidante que causa la fragmentación del DNA y la peroxidación lipídica en membranas biológicas (Carr *et al.*, 2000).

2.2.4. Oxidación proteica

La oxidación proteica se define como una modificación covalente en una proteína inducida por especies reactivas. Los cambios oxidativos en proteínas pueden provocar diversas consecuencias en sus funciones, tales como la inhibición de la actividad enzimática, un incremento de la susceptibilidad a la agregación y la proteólisis, así como también un aumento o disminución de la captación celular y una alteración de la inmunogénesis (Shacter, 2000).

Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, pueden oxidar los aminoácidos de proteínas formando los carbonilos proteicos, marcadores que han sido asociados con el envejecimiento y la severidad de algunas patologías (Chevion *et al.*, 2000).

2.2.5. Oxidación del ácido desoxirribonucleico

Las lesiones constantes a nivel celular por parte de los radicales libres cuando el daño es intenso, se extiende hasta el núcleo, desfragmentando así el ADN. Los productos de las lesiones oxidativas del ADN, como nucleósidos y bases oxidadas, tienen una naturaleza hidrofílica y suelen excretarse en orina sin sufrir cambios metabólicos (Loft *et al.*, 1998).

2.2.6. Peroxidación lipídica

Los radicales libres inician y causan la peroxidación de los lípidos (triglicéridos, fosfolípidos y lipoproteínas), particularmente aquellos que componen las membranas celulares. Se trata de una serie de reacciones radicalarias autocatalíticas que transcurre en tres etapas o fases: La etapa de iniciación se desarrolla cuando los radicales libres captan un átomo de hidrógeno (H^+) de un carbono metileno de un ácido graso polinsaturado (AGPI), formándose un doble enlace alterno coplanar (DC). Tras la pérdida del átomo de hidrógeno, el átomo de carbono queda con un electrón desapareado generándose un radical carbonilo (R) que se estabiliza formando un DC (Chait *et al.*, 1994).

En la etapa de propagación el DC reacciona con el oxígeno dando lugar a un radical peróxilo (ROO), el cual seguidamente capta otro H^+ de otro AGPI, dando lugar a un lipoperóxido ($ROOH$) y a otro radical carbonilo, iniciándose una reacción en cadena autocatalítica (Gutteridge, 1995).

Por último, en la fase de terminación, dos radicales carbonilos reaccionan entre ellos formando un producto estable e inactivo ($R-R$) o cuando un radical peroxilo es estabilizado por un antioxidante. Un lipoperóxido es una especie químicamente bastante estable pero en presencia de metales divalentes como el Fe^{2+} , puede generar un radical alcohoxilo, que conlleva la formación de determinados productos terminales de oxidación con toxicidad diversa como el malonildialdehído, hidroxino nenal y hexanal (Jialal *et al.*, 1996).

Ha sido reportado que en humanos infectados con el virus del VIH, de la hepatitis C o del dengue, se presentan niveles elevados de NO y malondialdehído (MDA)

en sangre y otros líquidos corporales, lo que indica la instalación al mismo tiempo de un estrés nitrosante y un estrés oxidativo (Muller, 1992; Schoshces *et al.*, 1999; Hazan *et al.*, 2005).

Lo anterior no es de extrañar, puesto que ambas condiciones metabólicas pueden convivir en un mismo sistema, ya que ha sido descrito que los radicales libres derivados del oxígeno pueden inducir la producción de radicales libres derivados del nitrógeno y viceversa (Nielsen *et al.*, 1997; Elbim *et al.*, 1999; Gutiérrez *et al.*, 2004).

La peroxidación lipídica tiene un papel trascendental en la fisiopatología de la arteriosclerosis, sobre todo si se considera la hipótesis oxidativa de la enfermedad arteriosclerótica (Gutteridge, 1995).

2.3. ANTIOXIDANTES

En la naturaleza existen moléculas que tienen la capacidad de poder neutralizar la inestabilidad energética de los radicales libres, evitando o disminuyendo así el daño, el cual está controlado en el organismo humano mediante un amplio espectro de antioxidantes endógenos (enzimas antioxidantes) y antioxidantes exógenos, estos últimos de origen dietario y bajo peso molecular (Gutteridge, 1995).

Según su modo de acción en el organismo son:

1. Primarios: impiden la formación de radicales libres.
2. Secundarios: interrumpen la reacción de propagación por inactivación o desplazan a las especies reactivas de oxígeno.
3. Terciarios: reparan el daño causado a las moléculas o eliminan aquellas que se han estropeado (García *et al.*, 2001).

2.3.1. Mecanismo de acción de los antioxidantes

Los antioxidantes pueden donar un átomo de hidrógeno o un electrón a los radicales formados para dar como resultado productos más estables, o completamente inertes, con la propiedad de no quedar desestabilizados

energéticamente. La velocidad de reacción oxidante se puede controlar al producir una serie de interacciones mediante la intervención de antioxidantes tanto endógenos como exógenos, los cuales interfieren con el proceso de oxidación (Maniak *et al.*, 1996).

2.3.2. Antioxidantes primarios

Este tipo de moléculas previenen la formación de nuevas especies reactivas de oxígeno, esto se consigue convirtiéndolas en moléculas menos perjudiciales, antes de que puedan reaccionar, o evitando su producción a partir de otras moléculas, en este grupo se destacan las enzimas (Katalinic *et al.*, 2005).

2.3.2.1. Superóxido dismutasa (SOD)

Son metaloenzimas que pueden dividirse en dos familias filogenéticas diferentes CuZn-SOD y múltiples isómeros Fe/Mn-SOD, las cuales catalizan la conversión del anión superóxido a hidroperóxido y consecuentemente a oxígeno molecular, en los organismos eucariotas existen cuatro tipos diferentes de SOD:

- Cu/ZnSOD: forman parte de la primera línea de defensa antioxidante.
- Fe/MnSOD: participan en el control inmune.
- EC-SOD: son extracelulares y participan en el control primario de la inactivación del óxido nítrico.
- NiSOD: se encuentra presente en los microorganismos (Pareja *et al.*, 2010).

2.3.2.2. Glutación peroxidasa (GPx)

Son dos enzimas selenio-dependientes, puesto que éste las mantiene activas para que ejerzan su acción destoxificante por la reducción del hidroperóxido o los lipoperóxidos. Se encuentran ampliamente distribuidas en los tejidos humanos y animales, su forma reducida “glutathiona” (GSH), dona electrones y se encuentra a concentraciones intracelulares a menudo en el rango mM, son consideradas enzimas con la mayor capacidad de remover peróxidos encontradas en el tejido humano (Cemeli *et al.*, 2009).

2.3.2.3. Otras enzimas

Este grupo de antioxidantes primarios se completa con el sistema de las tioredoxinas, las cuales soportan muchos procesos cruciales para la función celular, proliferación celular, defensa antioxidante y regulación REDOX (Arnér, 2009).

Transferrina: regulan la producción extracelular de hierro y así prevén la oxidación de los tejidos (Kim *et al.*, 2008).

Lactoferrina: tiene la capacidad de capturar iones de Hierro libre lo que le confiere muchas propiedades de antioxidante (Mulder *et al.*, 2008).

Ferritina: funciona capturando el hierro libre intracelular que puede convertirse en tóxico para la células (MacKenzie *et al.*, 2008).

Ceruloplasmina y Albúmina: representan el antioxidante más predominante presente en el plasma, el cual está expuesto a estrés oxidativo continuo (Roche *et al.*, 2008).

2.3.3. Antioxidantes secundarios

Estas moléculas capturan a los radicales y evitan las reacciones en cadena, ejemplos son: la vitamina E, C, β -caroteno y sustancias endógenas con capacidad antioxidante, entre las cuales se encuentran glutatión, urato, bilirrubina y ubiquinona (Doria *et al.*, 2012).

2.3.3.1. Vitamina C

La vitamina C presenta muchas actividades biológicas en el cuerpo humano; se ha encontrado que puede reducir los niveles de proteína C-reactiva, un marcador de la inflamación y posiblemente un anunciador de enfermedades del corazón (Podsdek, 2007).

2.3.3.2. Vitamina E

La vitamina E pertenece a los antioxidantes liposolubles, su actividad biológica incluye tocoferoles y tocotrienoles, especialmente α -tocoferol, la reacción predominante responsable de la actividad antioxidante del tocoferol es la

donación de átomos de hidrógeno, donde se forma el radical tocoperoxil (Podsedeck, 2007).

2.3.3.3. Urato

Está presente en el plasma y es capaz de quelar al Hierro y Cobre; además, reacciona con ácido hipocloroso (HClO), atenúa la oxidación inducida por ozono de lípidos de lipoproteínas y ácidos grasos poliinsaturados así como también eliminando directamente los radicales peroxilo, alcoholoxilo e hidroxilo (Asad *et al.*, 2001).

2.3.3.4. Bilirrubina

La bilirrubina, de igual manera, se encuentra en el plasma y es capaz de eliminar el oxígeno singulete y radicales peroxilo. La bilirrubina unida a la albúmina plasmática contribuye significativamente a las defensas antioxidantes no enzimáticas presentes en el plasma (Bentiger *et al.*, 2007).

2.3.3.5. Ubiquinonas

Las ubiquinonas contienen una cola de isopreno, está presente en la cadena de transporte de electrones mitocondrial, su deficiencia llega a ser bastante mortal (Bentiger *et al.*, 2007)

2.3.4. Antioxidantes terciarios

Son moléculas que están encargadas de la reparación de las biomoléculas dañadas. En este grupo se incluyen las enzimas endonucleasa apurínica/apirimidínica y la polimerasa β , reparadoras del ADN (Page *et al.* 2009).

2.3.5. Antioxidantes sintéticos

Son moléculas creadas en laboratorios con la característica de tener el mismo tipo de configuración estructural que los productos naturales encontrados en las plantas, se utilizan principalmente como conservadores alimenticios, específicamente para retardar el deterioro, rancidez o decoloración producida por la peroxidación lipídica (Estévez, 2006).

2.3.5.1. BHA

Es un compuesto por dos isómeros orgánicos llamados 3-tert-butil-4-hidroxianisol y 2-tert-butil-4-hidroxianisol, es de consistencia cerosa, soluble en grasa, lo que le permite combinarse bien con alimentos que contienen grasas animales, frecuentemente utilizado para conservar carnes, mantequilla, cereales, algunos productos de panadería, cerveza, papas deshidratadas y goma de mascar, de igual manera se utiliza en cosméticos y drogas farmacéuticas que contienen grasas y aceites (Giese, 1996).

2.3.5.2. BHT

Es una molécula que normalmente se añade a las mantecas vegetales y a los cereales debido a que es un antioxidante que evita que las grasas se descompongan cuando se les expone al oxígeno, además impide la formación de espuma que ocurre a partir de la presencia de levaduras (Morse, 1974).

2.3.5.3. TROLOX

El trolox tiene características similares a las de la vitamina E de origen natural, la cual generalmente es eliminada durante el procesamiento de las grasas en los alimentos. El uso de los antioxidantes sintéticos en productos alimenticios está bajo estricta regulación, debido a la incertidumbre sobre su seguridad, por esta razón hay un interés creciente en los antioxidantes naturales para atenuar el daño oxidativo, puesto que estos antioxidantes derivados de plantas funcionan como captadores de oxígeno singulete y triplete, eliminadores de peróxidos e inhibidores de enzimas (Madai *et al.*, 1995).

2.4. MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

No existe un único parámetro para evaluar la capacidad antioxidante de alimentos, fluidos biológicos u otro tipo de muestras, por ello es recomendado utilizar más de un método de determinación de capacidad antioxidante (Starkke *et al.*, 2003).

Los ensayos espectrofotométricos se basan en medir la capacidad de un antioxidante de reducir un oxidante, el cual cambia de color cuando se reduce. El grado de cambio de color ya sea un aumento o disminución de absorbancia a

una determinada longitud de onda se encuentra correlacionado con la concentración de antioxidantes en la muestra (Resat *et al.*, 2007).

2.4.1. Método DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil)

La capacidad de un compuesto como depurador de radicales libres puede ser registrada espectrofotométricamente mediante la transformación del DPPH a su forma reducida DPPH-H, por acción de una sustancia antioxidante. La reacción es medida a 517 nm y luego por diferencia de absorbancia se determina el porcentaje de captación del radical libre DPPH* (Figura 1).

2.4.2. ABTS/TAC [Ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)]

La técnica mejorada para la generación del radical catión ABTS, implica la producción directa del cromóforo ABTS•+ verde-azul a través de la reacción entre ABTS y el persulfato de potasio (K₂S₂O₈), éste presenta tres máximos de absorción a las longitudes de onda de 645 nm, 734 nm y 815 nm. La adición de los antioxidantes al radical preformado lo reduce a ABTS (Pulido *et al.*, 2000).

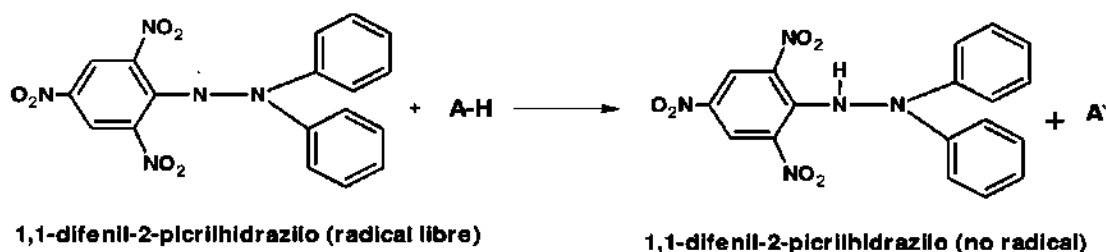


Figura 1. Mecanismo de inhibición del DPPH. Cambio de color de azul a verde.

(A) es un antioxidante que actúa como antirradical donando átomos de hidrogeno, obteniendo como resultado radicales con estructuras moleculares estables que detendrán la reacción en cadena. El Nuevo radical formado (A) puede interactuar con moléculas estables. La reacción entre el DPPH• y un compuesto, depende de la conformación estructural del mismo por lo que las comparaciones cuantitativas no siempre son apropiadas (Bilia, 2004).

El grado de decoloración como porcentaje de inhibición del radical catión ABTS•+ está determinado en función de la concentración y el tiempo. El ensayo

ABTS / TAC (Trolox Antioxidant Capacity) mide la decoloración de un radical ABTS⁺, el cual presenta un color verde intenso, los resultados de los compuestos a analizar se expresan en relación con equivalentes de Trolox, utilizado como reactivo de calibración (Prior *et al.*, 2005). La reacción en la que se basa este ensayo puede resumirse en la figura 2.

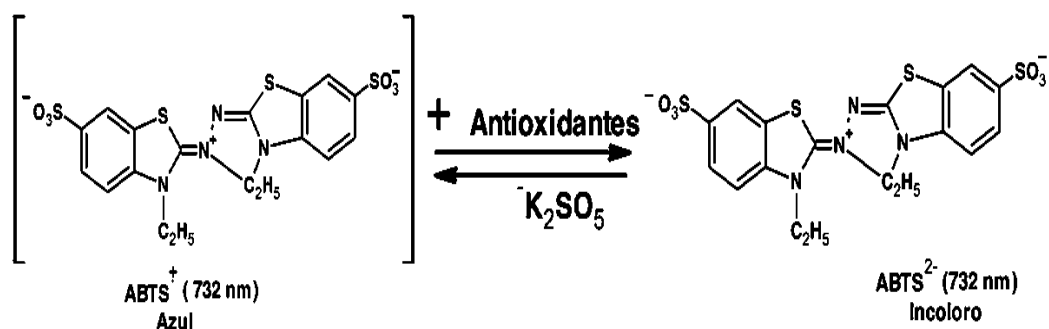


Figura 2. Mecanismo de Inhibición de ABTS. De verde a incoloro

2.4.3. TBARS (Especies reactivas del ácido tiobarbitúrico)

En el año de 1968, Yagi y colaboradores aplicaron la reacción de ácido tiobarbitúrico (TBA) con malonildialdehído (MDA) y unieron cromógenos a lipoperóxidos en biomateriales, esta reacción fue llevada a cabo a 95°C en condiciones acidas, lo que resultó en el ya conocido método.

2.4.4. Peroxidación lipídica y malonildialdehído (MDA)

Lo que ocurre en el proceso de lipoperoxidación, para el caso de las membranas biológicas, es el blanco más común para algunas especies reactivas de oxígeno (ERO's), resulta en una deterioración de lípidos poliinsaturados, en ocasiones irreparable. Al ser propagada esta reacción, aumenta por efecto de productos tóxicos incluyendo endoperóxidos y aldehídos, causando más daño (Rosenblum *et al.*, 1989).

El MDA es uno de los productos secundarios más conocidos de la peroxidación lipídica, además puede ser usado como un marcador de lesión de la membrana celular (Esterbauer *et al.*, 1991).

2.4.5. Formación del complejo MDA-TBA2

En este tipo de reacción ocurre una aducción por un ataque nucleofílico, en donde está involucrado el carbono 5 del TBA y el carbono 1 del MDA, seguido de una deshidratación y una reacción similar con una segunda molécula de TBA, que produce como resultado un pigmento rojo de la condensación de MDA-TBA, al reaccionar en presencia de calor se forma un pigmento de color rosa que indica la peroxidación de lípidos (Knight *et al.*, 1988).

2.4.6. Determinación de TBA y MDA

El proceso puede ser evaluado mediante la medición de derivados conjugados, el producto de dicha reacción puede ser determinado por colorimetría a 532-535 nm o bien por fluorometría que tiene una excitación a 532nm y emisión a 553nm, así como también por medio de HPLC directo con diferentes detectores (Ohkawa *et al.*, 1979).

2.5. DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL EN ESTUDIO

2.5.1. *Agastache mexicana*

A. mexicana (H.B.K) Lint & Epl. [Sinonimia: *Cedronella mexicana*] (Kunth) Briq.], pertenece a la familia Lamiaceae y es conocida popularmente en México como toronjil morado, olotillo, abejera, cidronela y melisa (Lint *et al.*, 1945). *A. mexicana* crece como una planta herbácea perene, es nativa de México, está presente en climas cálido, semicálido y templado, es una hierba asociada a bosques tropicales caducifolio, subcaducifolio y perennifolio y a bosques del tipo espinoso, mesófilo de montaña, de encino, de pino y mixto de encino-pino. Presenta inflorescencia terminal, en forma de verticilios laxos, interruptos; cáliz ligeramente bilabiado, tubular, de 6.5 a 11.5 mm de largo; corola de color rojizo-morado, de 2 a 3 cm de largo, el tubo angosto en la parte cubierta por el cáliz y ensanchándose en la parte superior, labio superior plano, el inferior trilobulado; estambres exsertos, filamentos delgados, de más o menos 6 mm de largo; mericarpios de 1.5 a 2 mm de largo, de color pardo oscuro. Esta subespecie

también es conocida como toronjil morado por el color de sus flores (Rzedowski y Rzedowski, 1985; Linares *et al.*, 1999) (Figura 3).



Figura 3. *Agastache mexicana* spp *mexicana* (H.B.K) Lint & Epl. (Toronjil morado).

2.5.2. Uso medicinal, etnobotánica y antropología

En el siglo XVI, Martín de la Cruz la reporta como antiescabiótica, antiséptica, astringente y para las quemaduras. Francisco Hernández, menciona que, “aplicada a la nariz y aspirado su olor, cura el resfriado y el dolor de cabeza provoca estornudos y evacúa la pituita por boca, ojos y nariz, machacada y untada cura las cuartanas, de igual manera, aprovecha al útero, evacua la orina y abre las obstrucciones.” Agrega también que, “calienta las partes enfriadas, provoca sudor, mitiga los dolores, fortalece tomada o aplicada el estómago, el corazón, la cabeza, cura la hidropesía, alivia el salpullido, la sarna y restregada quita la tina” (UNAM, 2009).

Por su parte Gregorio López, en el siglo XVII relata que “las hojas bebidas con vino y aplicadas como emplasto son contra mordeduras de perro rabioso y picaduras de alacrán. Su cocimiento en fomentación sirve a lo mismo y provoca menstruación, quita dolor de dientes. Las hojas son útiles a los que no pueden resollar y si son aplicadas con sal resuelven lamparones, purifican llagas, mitigan el dolor de junturas y son útiles al estómago. Comido despierta el sentido, fortifica el corazón y cerebro, quita tristezas y temor que procede de melancolía, ataja imaginaciones extrañas y despierta sueños horribles” (UNAM, 2009).

Más adelante, la Sociedad Farmacéutica de México en el siglo XIX señala su uso como antiespasmódico y estimulante. En el siglo XX, Alfonso Herrera la describe como antiespasmódico y sucedáneo del toronjil europeo. Posteriormente, Maximino Martínez la refiere como antiespasmódico. Luis Cabrera cita que es antirreumático, diaforético, digitálico, eupéptico, que sirve para las contusiones y provoca parálisis de la respiración. Finalmente, la Sociedad Farmacéutica de México consigna su uso como antiespasmódico, diaforético, estimulante y eupéptico. (UNAM, 2009).

El cocimiento de esta planta junto con flores de cempasuchil (*Tagetes erecta*) o las hojas de toronjil blanco (*A. mexicana* spp. *xolocotziana*), más toronjil extranjero (*Dracocephalum moldavica*), mastranso (*Mentha rotundifolia*) y hierba del burro (*Eupatorium petiolare*), maceradas en agua o alcohol, se utilizan para bañar al enfermo de “espanto”, o también basta tomar por las mañanas un té preparado con toronjil rojo (*Agastache mexicana* spp. *mexicana*) y Santo Domingo (*Hedeoma piperita*), antes de las doce del día (UNAM, 2009).

En el tratamiento de enfermedades de los nervios y el susto, que se adquieren cuando se reciben impresiones fuertes (como ver un accidente, un muerto o por salir de un lugar caliente a un lugar frío), la planta se prepara combinada con los toronjiles blanco y azul. Otros curanderos recomiendan darlos junto con canela (*Cinnamomum zeylanicum*), manita (*Chiranthodendron pentadactylon*) y tila (*Tilia mexicana*) (UNAM, 2009).

En algunas comunidades también se emplea en la curación del mal de ojo, provocado principalmente por la mirada pesada de las personas que afecta a los niños. Además entre mixes, zapotecos y totonacos, se usa para resolver la caída de mollera, de la cual se dice que afecta a niños y adultos a consecuencia de golpes en el cráneo, por cargar objetos pesados en la cabeza o por caídas. Este padecimiento se describe como hundimiento de la mollera (depresión de la fontanela, que en los niños es muy fácil que suceda, cuando se les agita, se caen o se les arrebató la teta), además se presenta vómito, diarrea, heces fétidas, ojos hundidos, fiebres, llanto sin lágrimas, boca seca, labios resacos, ronquidos al respirar o mamar, tristeza, ojos semiabiertos al dormir, inquietud en el sueño, no

pasan el alimento, piel seca, arrugada, caída de la campanilla, debilidad y una pierna aparece más corta que la otra. Se trata mediante los procedimientos llamados chupar la mollera, paladear o cubrir la mollera. En estos casos el toronjil es utilizado como infusión, a la que se agrega un trozo de tela nueva, carbón y corcho quemado, por dos o tres veces al día (UNAM, 2009).

El cocimiento administrado por vía oral, se recomienda en diversos padecimientos principalmente en problemas gástricos como dolor de estómago, cólico de estómago, corajes, dolor intestinal, empacho y para la digestión. También se usa en alteraciones cardiovasculares como dolor de corazón y cuando se tapan las venas (UNAM, 2009).

Se refiere útil en casos de regla retrasada, en alferecía morada o amarilla, cuando hay tos, insomnio, diabetes y venteados. Junto con hojas de guayaba (*Psidium sartorianum*), estafiate (*Artemisia ludoviciana*) y muicle (*Jacobina spicigera*) tomado en ayunas, es provechoso contra la diarrea. La maceración en agua o alcohol de las hojas junto con las de toronjil blanco, toronjil extranjero, mastranso y hierba del burro se indica en baños, o utilizando las ramas en té para el tratamiento de los nervios (UNAM, 2009).

2.5.3. Taxonomía y distribución

De tallos prismáticos de 40 a 50 cm de largo con hojas opuestas lanceoladas u ovalo-lanceoladas de 4 a 6 cm, aserradas y olorosas. Las flores son de aproximadamente 3 cm, tubulosas, rojas bilabiadas, cuentan con 4 estambres salientes. En México se encuentra distribuida en los estados de Michoacán, Puebla, Querétaro, Zacatecas Edo. de México y Veracruz (Martinez *et al.*, 1987).

Dentro del estado de Michoacán, forma parte de la diversidad de la flora dentro de los municipios de Tinganbato, Nahuatzen, Hidalgo, Villa Escalante, Morelia, Acuitzio del Canje, Zitácuaro y Pátzcuaro (EBUM, 2015).

2.5.4. Clasificación científica

Su clasificación botánica de acuerdo a Lint y Epling (1945) se presenta en el cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación científica de *A. mexicana*

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Género	<i>Agastache</i>
Especie	<i>A. mexicana</i> (H.B.K) Lint & Epl.

2.5.5. Fitoquímica

Este pequeño género de Lamiaceae comprende 22 plantas perennes aromáticas. El perfil fitoquímico de *Agastache* comprende básicamente 2 clases de metabolitos, fenilpropanoides y terpenoides. La parte de los metabolitos no volátiles pertenece principalmente al ácido rosmarínico, así como algunas flavonas y flavonas glicosídicas como la acacetina y la tilianina (Fuentes-Granados *et al.*, 1998).

Los estudios que se han realizado sobre esta especie han conducido al aislamiento de diversos metabolitos secundarios, destacando el nonano (alcano); canfeno, β -pineno, limoneno, 1-8 cineol, furfural, citronelal y mentona (monoterpenos); pulegona (terpenos); crisina, apigenina, luteolina, diosmetina (flavonoides) (Trease *et al.*, 1991)

3. JUSTIFICACIÓN

El uso de antioxidantes es estudiado y explotado de forma intensiva por parte de las industrias del rubro farmacológico textil, agroquímico, alimentario y cosmetológico, lo que ha conducido a un amplio y arraigado uso de antioxidantes sintéticos. En la actualidad se conoce por medio de numerosos estudios el potencial de los extractos vegetales como sustitutos de compuestos específicamente antioxidantes de origen sintético los cuales están causando un gran daño a la salud humana y teniendo en cuenta que el estrés oxidativo se relaciona directamente con procesos etiológicos, de desarrollo y complicaciones en enfermedades de interés médico, aunado a que no existe tratamiento formal para tal desbalance osmótico.

La búsqueda de alternativas de origen natural dentro del estado de Michoacán y la reincorporación de la medicina tradicional a través de extractos vegetales y sus componentes activos a la investigación científica a enfocado la realización del presente trabajo.

Este estudio tiene la intención de determinar la actividad antioxidante de la especie *Agastache mexicana spp. mexicana* (toronjil morado), debido al potencial terapéutico que presenta y a que no existe información que corrobore de manera científica alguna de sus propiedades medicinales, es necesario realizar ensayos para determinar la actividad antioxidante de los extractos y los compuestos volátiles mayoritarios del tipo terpénico de esta especie.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos y los compuestos terpénicos mayoritarios de toronjil morado (*Agastache mexicana spp. mexicana*).

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el efecto antioxidante *in vitro* de los extractos de toronjil morado (*Agastache mexicana spp. mexicana*).
2. Analizar e identificar los compuestos terpénicos presentes en el extracto de toronjil morado (*Agastache mexicana spp. mexicana*) con mayor actividad antioxidante.
3. Determinar el potencial antioxidante de los compuestos terpénicos mayoritarios de toronjil morado (*Agastache mexicana spp. mexicana*).

5. MÉTODOS Y MATERIALES

5.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Tejido vegetal. La recolección de la especie vegetal (toronjil morado, *Agastache mexicana spp. mexicana*) en estado de floración se realizó en la región de Pátzcuaro Michoacán.

Ratas. Se utilizaron Ratas albinas del tipo Wistar, mantenida en condiciones óptimas, sacrificadas y manipuladas según los parámetros requeridos para la realización de los ensayos, de las cuales se extrajeron los riñones para su posterior procesado y poder así recuperar las mitocondrias.

5.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

Los extractos se obtuvieron de la parte aérea de toronjil morado (*Agastache mexicana spp. mexicana*), a través de una maceración con disolventes de polaridad en orden ascendente. Dichos extractos obtenidos fueron de tres diferentes tipos: metanólico, hidroalcohólico y hexánico. La maceración se llevó a cabo con 40 g de la parte aérea secada a la sombra en 400 mL de disolvente respectivamente durante 5 días, posterior a esto se filtraron y se ajustaron a cuatro diferentes concentraciones: 0.001, 0.01, 0.1, 1 mg/mL.

Además del uso de extractos naturales se utilizaron también seis compuestos terpénicos y dos tipos de radicales libres de origen sintético.

5.3. PREPARACIÓN DE LOS RADICALES

Se preparó una disolución 1000 μM la cual contenía 0.0039 g de DPPH de la marca Sigma-Aldrich® y 10 mL de metanol. La activación del radical ABTS marca Sigma-Aldrich® se llevó a cabo al mezclarlo a una concentración de [7.4 μM] con una solución de persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) a concentración de [2.6 μM] en una proporción 1:1 durante un periodo de 12 horas (h) en agitación constante.

5.3.1. Elaboración de reactivos para el ensayo TBARS

Cuadro 2. Preparación de reactivos para llevar a cabo el ensayo de lipoperoxidación inducida en riñón de rata.

Buffer	75.5 g/L de glicina y 54.4 g/L de cloruro de sodio en agua y ajustado a pH de 3.5 (500 mL)
Cromógeno (cromóforo)	5 g/L de ácido tiobarbitúrico en dodecilsulfato sódico al 0.3% (500 ml)
Catalizador (oxidante)	2.7 g/L de tricloruro de hierro en agua (50 mL)
Antioxidante (control)	2.2 g/L de butilhidroxitolueno en agua a [1000µm]
Solución de extracción	2.5 mL de solución de 1butanol-piridina (15:1) y 0.5 mL de agua. La solución 1-butanol-piridina, está preparada con: 300 mL y 20 mL respectivamente, los cuales se mezclan con 64 mL de agua.
Disolución patrón de malondialdehído	al 20 % (v/v) del 1,1,3,3- tetrametoxipropano (TEP) en disolución buffer a pH 3.5 con adición de 400 µL de ácido clorhídrico 1 N.

5.3.2. Preparación de medios y determinación de proteína

Para la determinación de la proteína procedente de la mitocondria de rata Wistar fue necesario elaborar dos medios diferentes, el primero fue el medio 1 para el aislamiento de mitocondrias de riñón (Cuadro 3).

Cuadro 3. Composición nutricional para el medio 1 (Saavedra-Molina y Devlin, 1997).

COMPUESTO	PESO MOLECULAR	CONCENTRACIÓN (mM)	CANTIDAD (g/L)
Manitol	182.2	220	40.084
Sacarosa	342.3	70	23.961

Mops	209.3	2	0.4186
EGTA	380.4	1	0.3804

El segundo de los medios fue el medio 2 para el aislamiento de mitocondrias de hígado (Cuadro 4).

Cuadro 4. Composición nutrimental para el medio 2 (Saavedra-Molina y Devlin, 1997).

COMPUESTO	PESO MOLECULAR	CONCENTRACIÓN (mM)	CANTIDAD (g/L)
Manitol	182.2	220	40.084
Sacarosa	342.3	70	23.961
Mops	380.4	2	0.4186

5.3.3. Proceso para el aislamiento de mitocondria de riñón de rata

- Rata macho Wistar de 150-200 g de peso. Sacrificar por decapitación y desangrar, extraer los riñones mediante la incisión en el abdomen.
- Poner riñones en un vaso de 25 mL con medio 1 sobre hielo, cortarlo en pedazos, hacer dos lavados en el medio 1.
- Transferir a tubo para homogenizar con 20 mL de medio y homogenizar a 1000-1500 revoluciones por minuto (rpm) de 2 a 3 veces.
- Repartir el homogenado en dos tubos previamente fríos, aforar a tres cuartas partes con medio 1.
- Centrifugar a 2000 rpm durante 10 min a 4 °C.
- Dividir el sobrenadante en 2 tubos previamente fríos, aforar a tres cuartas partes del volumen y centrifugar a 7500 rpm por 10 min.
- Desechar el sobrenadante y resuspender el precipitado cuidadosamente en 2 mL de medio 2, poner 80 µL de albumina al 0.2 % por mL de suspensión de mitocondrias por 10 min, agitando de vez en cuando, pasado el tiempo aforar a tres cuartas partes del volumen y centrifugar a 9000 rpm por 10 min.
- Desechar el sobrenadante y resuspender en 1 mL de medio 2.
- Determinar proteína por el método Biuret.

5.4. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

5.4.1. Método DPPH

Se preparó el reactivo DPPH a [1 μ M] en etanol y se utilizó en proporción de 2 mL y otro mL fue repartido entre el solvente (mtOH) y el volumen stock en concentración ascendente de 25 a 600 mM para el caso de la curva patrón con trolox y el control [1000 mM], después de una incubación en completa oscuridad por 20 min se leyó a 517 nm en el espectrofotómetro. El blanco utilizado contenía 3mL de mtOH.

5.4.2. Método ABTS

Para preparar el radical catiónico ABTS, es necesario activarlo previamente al reaccionarlo con persulfato de potasio [2.6 mM] en proporción 1 a 1 con ABTS [7.4 mM] durante 12 h con temperatura ambiente y completa oscuridad. La solución de trabajo se diluye en el solvente hasta alcanzar una lectura en el espectro < 3.

De esta manera se mezclaron volúmenes de 950 μ L del radical y 50 μ L de las soluciones de trabajo, previo a su lectura a 517 nm, estuvieron 7 min en incubación a completa oscuridad.

5.4.3. Método TBARS

Ya que se obtuvieron las concentraciones proteicas de las muestras de riñón se prosiguió a cambiar el solvente de dos de los extractos que serán usados como tratamientos para el ensayo y ajustar a cuatro diferentes concentraciones.

Los extractos metanólico y hexánico de *A. mexicana* fueron evaporados con nitrógeno hasta sequedad y re suspendidos en 10 mL de etanol, a partir de las cuales se dejó a concentraciones de 0.1, 0.01 mg/mL

Para la metodología se prepararon las muestras de 1 mg de mitocondria a las que se les añadió 1.5 mL de buffer y 100 µL de tratamiento distribuido en las muestras según el tipo y concentración del mismo, después se incubo en hielo por 15 min.

Acto seguido se adiciono 100 µL de catalizador (oxidante) y se regresó a incubación en hielo otros 15 min. Transcurrido la incubación de hielo se agrega el cromógeno y se llevó a 1 h en oscuridad a 4 °C

Una vez que paso el tiempo, se llevan las muestras cubiertas a baño en ebullición a 95-100 °C por 1 h. Transcurrido este tiempo se enfriaron en hielo antes de agregar 3 mL de solución de extracción y se agitaron en vortex hasta homogeneidad.

Para finalizar, las muestras son llevadas a centrifugación a 7500 (rpm) por 10 min a 20 °C y se tomó lectura espectrofotométrica a una longitud de onda de 532 nm.

5.5. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS POR CG/EM

La identificación de los compuestos presentes en la fracción metanólica del extracto de *Agastache mexicana* se realizó en un cromatógrafo 7890A (Agilent Technologies) acoplado a un espectrómetro 5975C (Agilent Technologies), el volumen de inyección de la muestra fue mediante inyección tipo Split (50:1), se utilizó la columna capilar HP 5MS (30 m x 0.25 mm I.D. x 0.25 µm de Film) con un gradiente de temperatura, iniciando con 50°C/1min, con un aumento de 5°C/min hasta alcanzar 180°C/3min (tiempo de corrida 50 min), usando helio ultra puro constante como gas acarreador (1mL/min). Los espectros fueron comparados en la librería NIST/EPA/NIH2011 (Torres Martínez *et al.*, 2014).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE TORONJIL MORADO

En el presente trabajo se realizó un barrido sistemático de la actividad antioxidante de los extractos metanólicos, hidro-alcohólicos y hexánicos de *A. mexicana spp. mexicana* (toronjil morado), mediante el uso de métodos que evalúan dicha capacidad antioxidante *in vitro*, con el fin de obtener conocimiento para analizar lo que puede ocurrir en situaciones complejas *in vivo*.

6.1.1. Actividad antioxidante por el método DPPH

Los resultados expresan la proporción en que el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil es inhibido por acción de las diferentes concentraciones de los extractos de toronjil morado (Figura 4).

Se determinó que el extracto metanólico de concentración 1 mg/mL fue el que presentó la mayor actividad antioxidante (92.54%) seguido por el extracto hidroalcohólico de concentración similar con 90.85 % de actividad. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Ibarra-Alvarado (2010), los que muestran unidades IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) de 502.3 ± 1.0 .

Otro dato relacionado con la especie y de aplicación específica fue llevada a cabo en el año de 2012 por González *et al.*, donde implementaron el uso de extracto acuoso de *A. mexicana spp mexicana* para probar el efecto ansiolítico, a una dosis de 300 mg/kg, en esta investigación el extracto metanólico presentó un IC_{50} de 4.78.

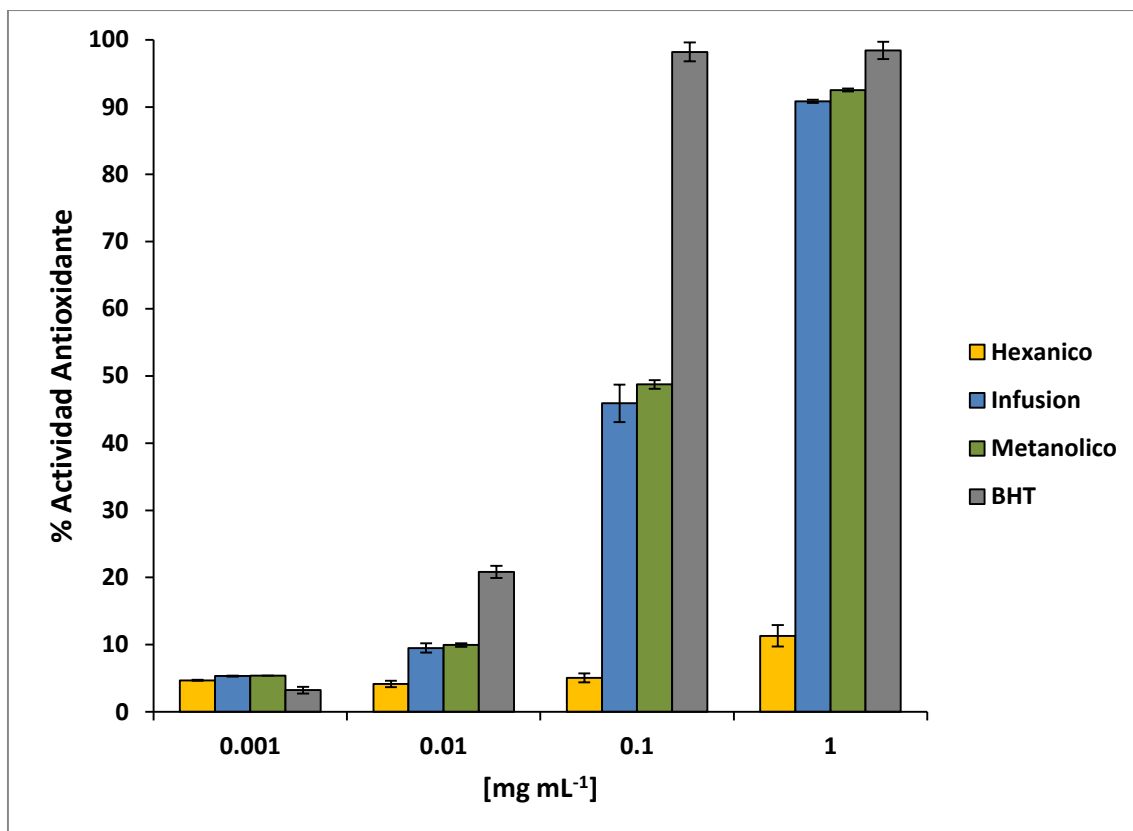


Figura 4. Actividad antioxidante de los extractos hexánico, hidroalcohólico y metanólico de *A. mexicana* spp *mexicana* así como del control butil hidroxitolueno mediante el método DPPH.

6.1.2. Actividad antioxidante por el método ABTS

La inhibición del radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) por parte de los extractos, arrojó datos que aunque difieren, a su vez coinciden con el ensayo DPPH con porcentajes por arriba del 90 %. La mayor actividad antioxidante se presentó en el extracto metanólico con un 99.30 %, es importante también resaltar que el extracto hidroalcohólico, de concentración 0.1 mg/mL rebasa a los otros dos extractos, pues alcanza una actividad antioxidante del 52.85 % (Figura 5).

En este ensayo, el extracto hexánico fue el que mostró la actividad antioxidante más representativa, llegando a inhibir un 37.70 %, esto podría interpretarse como la presencia en cantidades mucho más bajas de compuestos de naturaleza apolar (Figura 5).

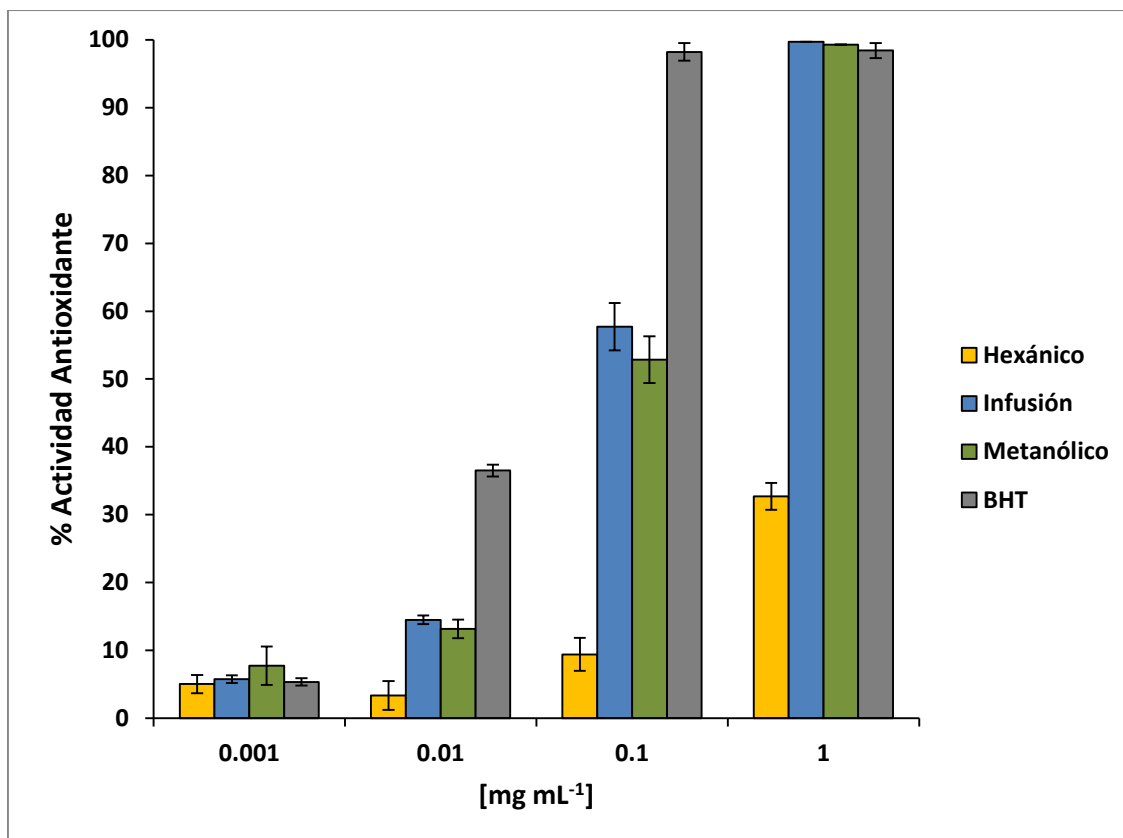


Figura 5. Actividad antioxidante de los extractos hexánico, infusión y metanólico de *A. mexicana* spp *mexicana* así como del control butil hidroxitolueno por el método ABTS

Se encontró un reporte de *A. mexicana* spp *xolocotziana* (toronjil blanco) por González-Trujano en 2012, y en ese mismo año pero reportado por González-Ramírez, donde demuestran que sus extractos exhibieron actividad antinociceptiva, y que al inducir inflamación en ratas se puede inhibir con el extracto metanólico principalmente. Ellos mencionan que se debe a la alta concentración de flavonoides como la acetina y la tilianina.

Por otro lado Hernández-Abreu *et al.* en 2009 obtuvieron tilianina de *Agastache mexicana* spp *mexicana* y le atribuyeron las propiedades hipertensivas. Lo que pone en evidencia como es que ambas subespecies comparten algunos compuestos en común.

Sé encontró que Capecka *et al.* en el 2005, reportaron que *Melissa officinalis* (toronjil europeo), *Mentha x piperita* (menta) y *Origanum vulgare* (orégano), plantas de la familia Lamiaceae, presentaron más del 90 % de inhibición en el

ensayo DPPH, con excepción del orégano que fue menor de 84 %. Esto concuerda con los resultados de la presente investigación, considerando que *A. mexicana* spp *mexicana* presenta una alta capacidad reductora de radicales.

6.1.3. Actividad antioxidante por el método TBARS

Los resultados expresan el porcentaje de inhibición de la lipoperoxidación inducida en riñón de rata de los tres extractos en dos diferentes concentraciones. Al inducir la reacción de lipoperoxidación en riñón de rata, se observó la inhibición de este proceso por la acción antioxidante de los extractos hidroalcohólico y metanólico con valores de 94.37 % y 93.69 % respectivamente, ambos en la misma concentración 0.01 mg/mL (Figura 6).

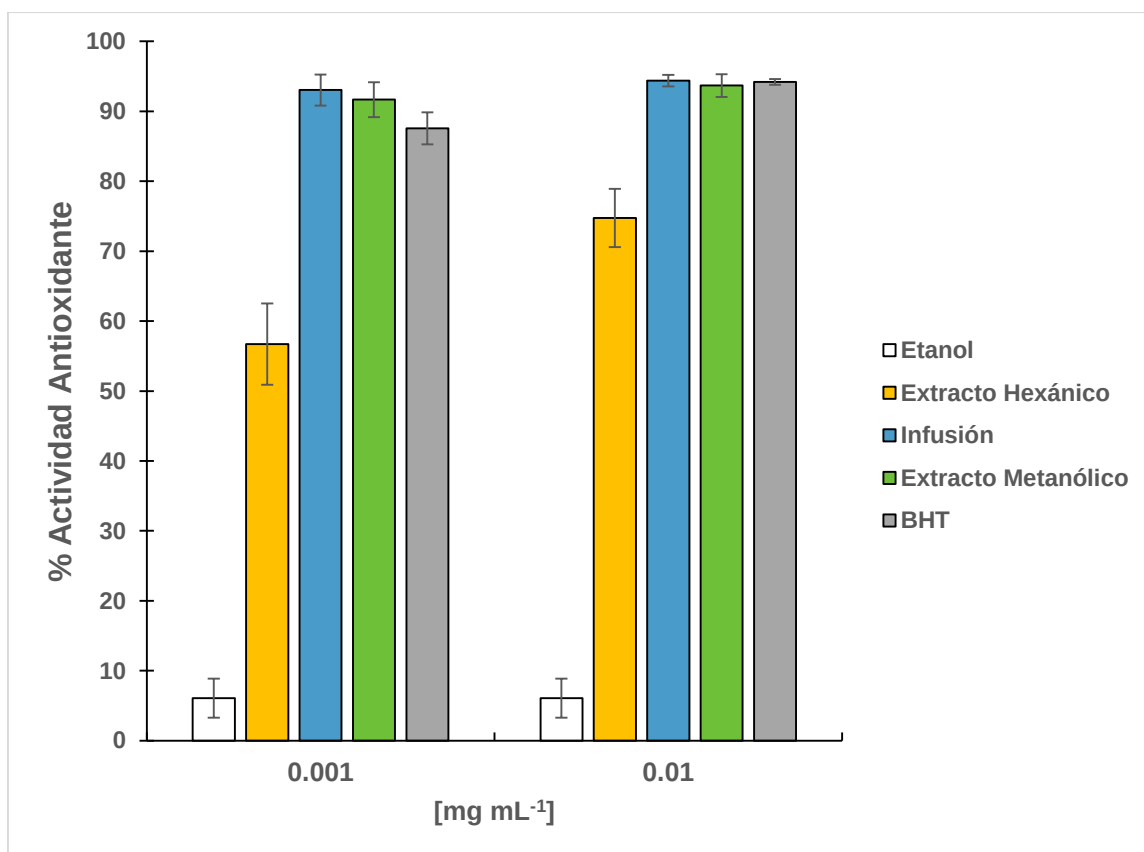


Figura 6. Actividad antioxidante de los extractos metanólico, infusión y hexánico de *A. mexicana* spp *mexicana* por el método TBARS.

Bozin *et al.*, en 2006 observaron que los aceites esenciales de las especies *Origanum vulgare* (orégano), *Thymus vulgaris* (tomillo) y *Ocimum basilicum* (albahaca), plantas de la misma familia que *A. mexicana*, presentaron efectos protectores al ser ensayados en dos sistemas diferentes de inducción de lipoperoxidación, con valores de inhibición en un rango de 74.54 % a 88.46 %. Lo anterior es indicativo que los extractos de *A. mexicana* spp *mexicana* son altamente antioxidantes.

Los resultados una vez contrastados apuntan a que *A. mexicana* posee una mayor actividad inhibitoria frente a estas especies de la misma familia, lo que supone una mejor opción para futuras pruebas donde se relacione la inhibición de un proceso de lipoperoxidación.

Cabe mencionar como algunos autores como Knight, *et al.* (1988), mencionan que el ensayo TBARS no puede ser considerado representativo de estrés oxidativo, puesto que es inespecífico para lipoperoxidación, debido a que otros aldehídos y materiales no lipídicos presentes en muestras biológicas pueden formar también aductos de TBA.

6.2. IDENTIFICACIÓN POR CG/EM DE LOS COMPUESTOS DEL EXTRACTO METANOLICO DE TORONJIL

Por los resultados obtenidos, el extracto metanólico de *A. mexicana* spp *mexicana* fue analizado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM). La cromatografía permitió la identificación de los compuestos mayoritarios y de manera cualitativa sus proporciones.

En el cromatograma típico fueron identificados compuestos de tipo terpénico como el limoneno, linalol, mentona, α -terpineol, pulegona y eugenol, la pulegona es el compuesto mayoritario con un tiempo de retención de 15.85 min (Figura 7, Cuadro 5).

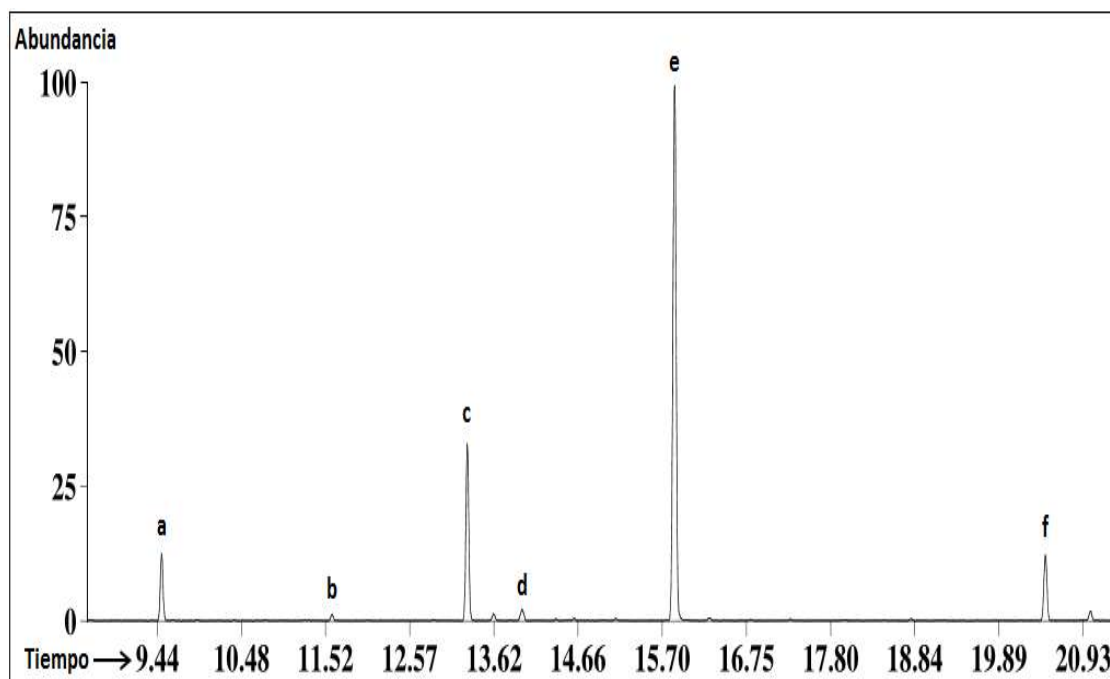


Figura 7. Cromatograma de gases correspondiente a un extracto metanólico de parte aérea (hojas y tallo) de toronjil morado (*A. mexicana* spp *mexicana*). Se indican principales compuestos volátiles; a) limoneno, b) linalol, c) mentona, d) α -terpineol, e) pulegona y f) eugenol.

Cuadro 5. Compuestos mayoritarios del extracto metanólico de toronjil morado (*A. mexicana* spp *mexicana*) por análisis CG/EM.

COMPUESTO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	ABUNDANCIA (%)
Limoneno	9.48	6.94
Linalol	11.59	0.52
Mentona	13.28	19.22
α -terpineol	14.83	0.07
Pulegona	15.85	64.77
Eugenol	20.46	7.57
β -cariofileno	21.03	0.88

6.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS COMPUESTOS MAYORITARIOS DE TORONJIL

Una vez que se identificaron los metabolitos terpénicos mayoritarios del extracto metanólico de toronjil morado, se realizaron los ensayos para determinar la actividad antioxidante de limoneno, linalol, mentona, α -terpineol, pulegona y eugenol. La actividad fue comparada con el antioxidante sintético BHT.

6.3.1. Actividad antioxidante por el método DPPH

Con este método, el eugenol fue el que presentó la mayor actividad antioxidante con un 94.35 % por la concentración de 0.1 mg/mL y un 96.19 % para la concentración 1 mg/mL (Figura 8).

Un estudio que relaciona la estructura molecular con la actividad antioxidante en 2011 por Gulcin, muestra como el eugenol alcanza un valor por el ensayo DPPH en IC₅₀ de 16.06 μ g/mL, confirmando el resultado obtenido en la presente investigación. El eugenol podría ser el mayor responsable de efecto antioxidante del extracto en estudio.

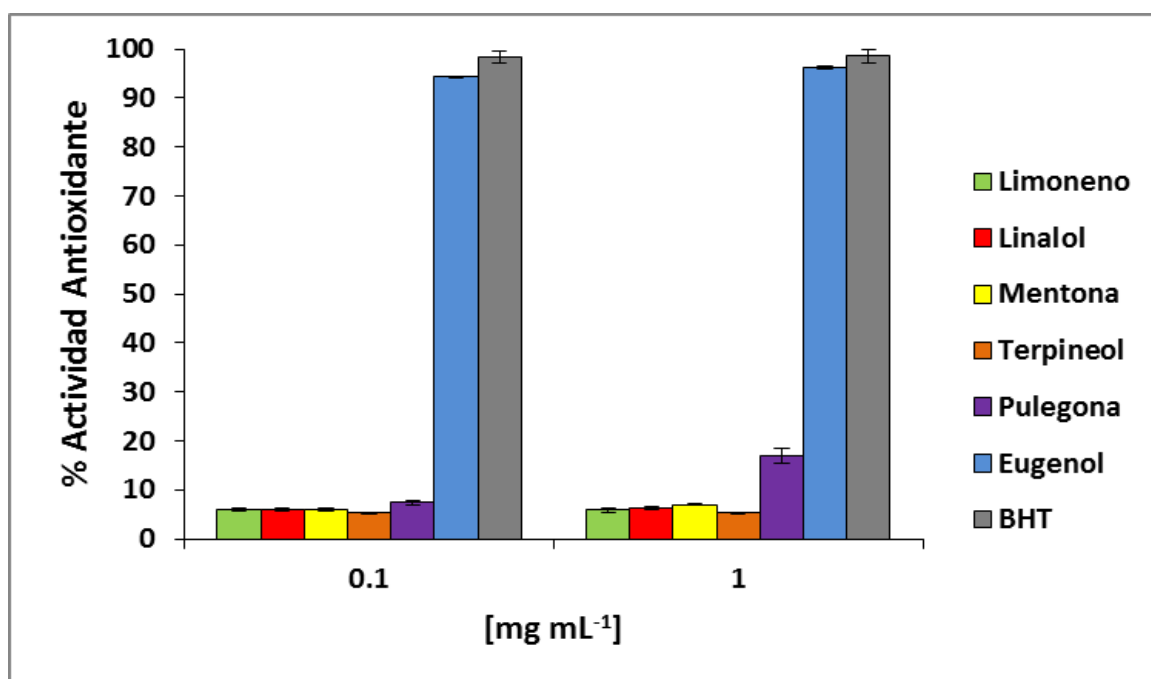


Figura 8. Actividad antioxidante de los compuestos terpénicos de toronjil morado (*A. mexicana* spp *mexicana*) por el método DPPH.

6.3.2. Actividad antioxidante por el método ABTS

Con este método, también se observa que el eugenol presenta los mayores porcentajes de actividad antioxidante, a una concentración de 0.1 mg/mL presenta un 78.66 % y a 1 mg/mL casi alcanza el 100 % (98.26 %), esto indica que de los compuestos es el único que desde concentraciones bajas presenta ya una alta actividad antioxidante (Figura 9).

La pulegona, el compuesto más abundante detectado por el análisis de CG/EM, muestra un valor de inhibición a concentración 1 mg/mL de 64.70 %, con 0.1 mg/mL no alcanzó más que el 11 %, mostrando así un comportamiento dosis-dependiente de la pulegona en *A. mexicana*. Los otros compuestos terpénicos no sobrepasan el 5% de la actividad antioxidante (Figura 9).

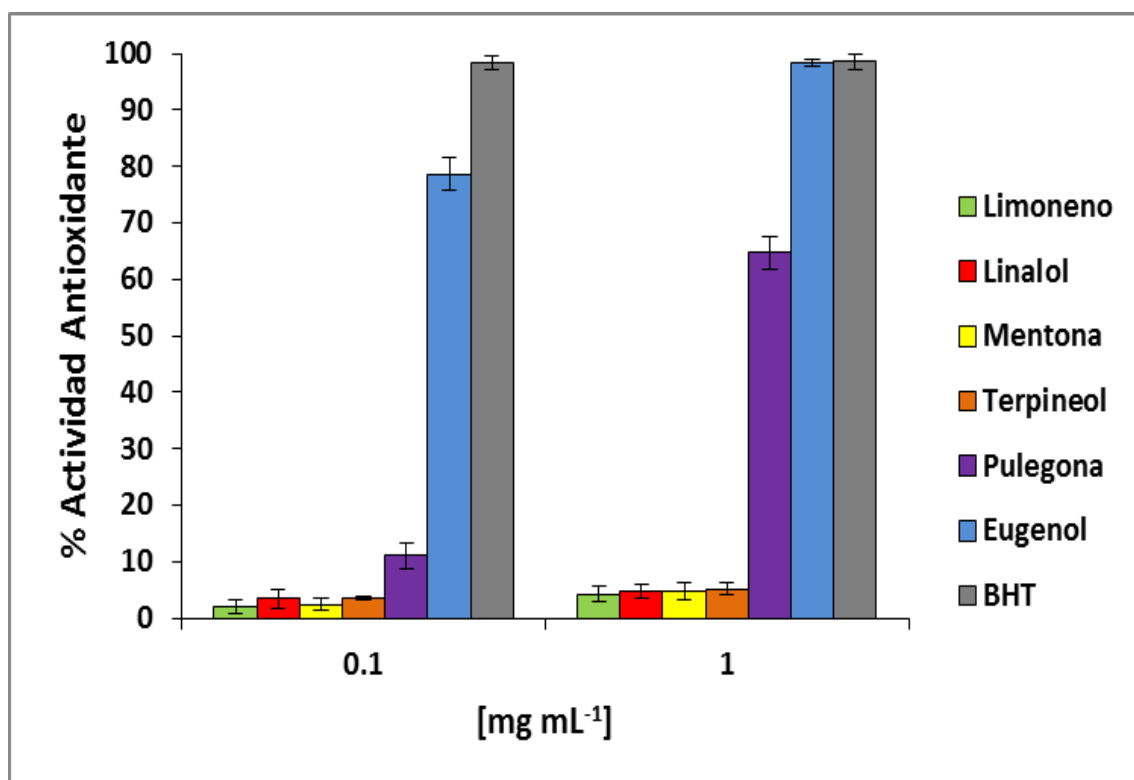


Figura 9. Actividad antioxidante de los compuestos terpénicos de toronjil morado (*A. mexicana* spp *mexicana*) por el método ABTS.

La actividad antioxidante del eugenol fue reportado por Gulcin en el año de 2011 con el método ABTS con un valor de 7.84 μ g/mL en EC₅₀, de esta manera se

puede contrastar el resultado de la investigación y así confirmar el efecto antioxidante del eugenol por el mismo método.

6.3.3 Actividad antioxidante por el método TBARS

También con el método de TBARS, el eugenol alcanzó el valor más alto de inhibición de 97.11 % en la menor concentración (0.001 mg/mL), demostrando de esta manera como es que a partir de concentraciones muy bajas, resultó ser el más activo de los compuestos, incluso que el antioxidante sintético butil hidroxitolueno (Figura 10). Con este método, se observó que los demás componentes del extracto, también mostraron actividad antioxidante, sin embargo, la respuesta del eugenol es sobresaliente.

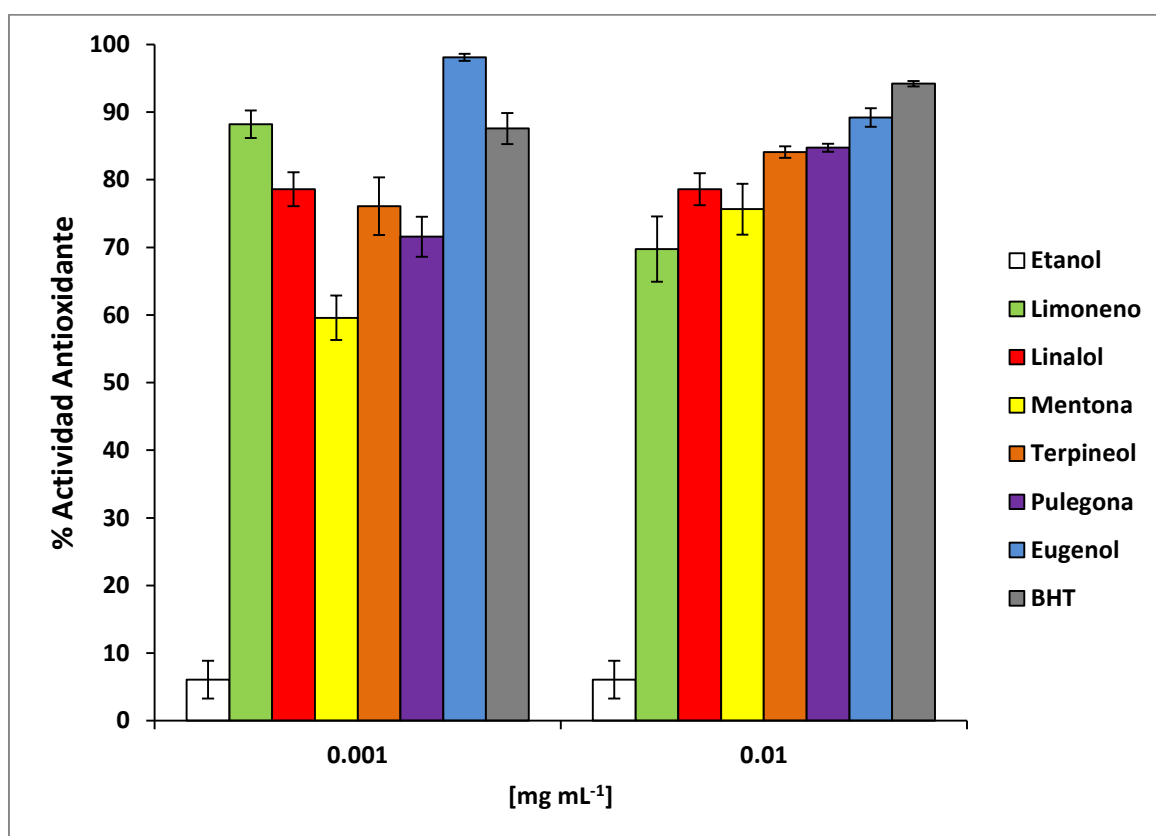


Figura 10. Actividad antioxidante de los extractos de toronjil morado (*A. mexicana* spp *mexicana*) por el método TBARS.

Ibarra-Alvarado en 2010 demostró la eficacia como antihipertensivo en un ensayo de relajación de segmentos preconcentrados de aorta de rata, con un 24 % para *A. mexicana* y un 60 % de relajación en el caso de *Dracocephalum moldavica* (toronjil azul), esto pudiera estar relacionado con la actividad

antioxidante demostrada por el extracto metanólico de toronjil morado (*A. mexicana spp mexicana*).

De esta manera se contribuye un poco para poder comprobar un poco más como el uso etnobotánico que tienen en conjunto *A. mexicana spp mexicana*, *A. mexicana spp xolocotziana* y *Dracocephalum moldavica*, puede llegar a ser comprobado de manera científica, puesto que al parecer los compuestos y sus diferentes efectos se complementan para obtener el efecto deseado, en este caso la cura para el espanto, o susto.

7. CONCLUSIONES

El extracto metanólico de la parte aérea de *Agastache mexicana spp mexicana*, posee la mayor actividad antioxidante inhibitoria de radicales, seguido por el extracto hidroalcohólico.

Los compuestos identificados en los extractos de toronjil morado, son de tipo terpénico, donde la pulegona es el compuesto mayoritario.

El compuesto terpénico eugenol mostró la mayor capacidad inhibitoria, neutralizando los radicales libres a concentraciones bajas.

8. LITERATURA CITADA

Aguirre, H.E., 2003. Estudio fitoquímico y farmacológico de *Agastache mexicana* ssp. *mexicana* y *Agastache mexicana* ssp. *xolocotziana*. Tesis de maestría, Colegio de Postgraduados, Montecillo. Texcoco, Estado de México. 121.

Argueta, A., Cano, L., Rodarte, M., 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, primera edición. Instituto Nacional Indigenista Press, México, D.F p. 1193.

Arnér Elias S.J. 2009. Focus on mammalian thioredoxin reductases Important selenoproteins with versatile functions. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1790: 495– 526.

Aruoma OI. 1998. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J Am Oil Chem Soc* 75: 199–212.

Assad S.F., Singh S., Ahmad A., Khan N., Hadi S.Y. 2001. Prooxidant and antioxidant activities of bilirubin and its metabolic precursor biliverdin: a structure-activity study. *Chemic-Biological Interactions*; 37: 59-74.

Ankli A., Henrich M., Bork P., Wolfram L., Bauerfeind P., Brun R., Schmid C., Weiss C., Bruggisser R., Gertsch J., Wesescha M. y Sticher O. 2002. Yucatec Mayan medicinal plants: evaluation based on indigenous uses. *Journal of Ethnopharmacology.*, 79: 43-52.

Antolovich, M., Prenzler P.D., Patsalides E., McDonald S., Robards, K. 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst.* 127: 183-198.

Bandoniene D, Pukalskas A, Venskutonis PR, Gruzdiene D. 2000. Preliminary screening of antioxidant activity of some plant extracts in rapeseed oil. *Food Res Int* 33: 785–791.

Bello M.A., 2006. Catálogo de plantas medicinales de la comunidad Indígena Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán. México. Campo Experimental Uruapan. CIRPAC. INIFAP. Michoacán, México. Libro Técnico. 138 (4).

Bello GMA. 1993. Plantas útiles no maderables de la Sierra Purépecha, Michoacán, México, Campo Experimental Uruapan. CIRPAC, INIFAP, Michoacán, México. Folleto Técnico.

Bentiger N., Brismark K., Dallner G. 2007. The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion*; 7:541-550.

Bequette F., 1997. Los hombres y las plantas. El correo de la UNESCO.

Bergendi, L., Benes, L., Durackova, Z., y Ferencik, M. 1999. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Science.*, 65, 1865-1874.

Biljana Bozin, Neda Mimica-Dukic, Natasa Simin y Gora Anackov. 2006 Characterization of the volatile composition of essential oils of some lamiaceae species and the antimicrobial and antioxidant activities of entire oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry. University of Novi Sad, Trg D. Obradovica 3, 21000 Novi Sad, Serbia y Montenegro.

Boveris A., Oshino N. 1972. The cellular production of hydrogen peroxide. Biochemistry Journal. 128 (3): 617-30.

Bravo L. 1998. Polyphenols: chemistry and dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutrition Reviews; 56:317-33.

Breitmaier E. 2006. Terpenes: Importance, General Structure, and Biosynthesis. Terpenes, flavours, fragrances, pharma y pheromones. Weinheim, Germany. Wiley-VCH.

Bye, R., Linares, E., Ramamoorthy, T.R., García, E., Collera, O., Palomino, G., Corona, V. 1987. *Agastache mexicana* subs. *xolocotziana* (Lamiaceae). A new taxon from Mexican medicinal plants. Phytologia 62, 156–163.

Cardona LEH, Mejía LFG. 2009. Evaluación del efecto antioxidante de aceites esenciales y extractos de *Eugenia caryophyllata*, *Origanum vulgare* y *Thymus vulgaris*. Biosalud 8: 58 - 70

Campos S.M y Boada M. 2008. Integración de diferentes modelos de protección para el diseño de un área natural protegida en Michoacán, México. Documentos de Análisis Geográfico. (51): 39-57.

Capecka, E., Anna Mareczek, Maria Leja. 2005. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. Departments of Plant Physiology, and vegetable crops of the Faculty of Horticulture, University of Agriculture in Krakow, 29 Listopada 54, 31-425 Kraków, Poland.

Carr, A., McCall, M. R., & Frei, B. 2000. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species-reaction pathways and antioxidant protection. Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol., 20, 1716-1723.

Cemeli E., Baumgartner A., Anderson D. 2009. Antioxidants and the Comet assay. Mutation Research/Reviews in Mutation Research; 681: 51–67.

Couladis M, Tzakou O, Verykokidou E, Harvala C. 2003. Screening of some Greek aromatic plants for antioxidant activity. Phytother Res 17: 194–195.

Cuvelier ME, Richard H, Berset C. 1996. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. J Am Oil Chem Soc 73: 645–652.

Chait A., Heinecke J.W. 1994 Lipoprotein modification: cellular mechanisms. Curr Opin Lipidol. 5: 365-370.

Chevion M., Berenshtein., E., Stadtman, E.R. 2000. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. Free Radicals Research: 33 S: 99-108.

Daniel AN, Sartoretto SM, Schmidt G, CaparrozAssef SM, Bersani-Amado CA, Cuman RKN. 2009. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of eugenol essential oil in experimental animal models. Br J Pharmacol 19: 212 - 217.

De la Cruz M y Badiano J. 1552. Libellus de medicinalibus indorum herbis, edición 1991. Fondo de Cultura Economica, Instituto Mexicano del Seguro Social. México D.F. pp 258.

Del Valle G. 2011. Oxidative stress in ageing theorectico outcomes and clinical evidences in humans. Biomedicine and agein pathology. 1: 1-7.

Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D ., Stocker P., Vidal N. 2006. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food Chemistry; 97: 654-660.

Doria E., Buonocore D., Focarelli A., Marzatico F. 2012. Relationship between human aging muscle and oxidative system pathway. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. Volume 2012: 13 páginas.

Dudareva Natalia y Negre Florence. 2005. Practical applications of research into the regulation of plant volatile emission. Current Opinion in Plant Biology, 8: 113-118.

Elbim C., Pillet S., Prevost M.H., Preira A., Girard P.M. 1999. Redox and activation status of monocytes from human immunodeficiency virus-infected patients: relationship with viral load. Virology. 73: 4561-4566.

Erdemoglu, N. Nilufer N. Turan, Iclal Cakici, Bilge Sener, Ahmet Aydin. 2006. Antioxidant activities of some Lamiaceae plant extracts. Department of Pharmacognosy, faculty of Pharmacy, Gazi University, 06330, Ankara, Turkey. Gulhane Military Medical Academy, department of Pharmaceutical Sciences, Ankara, Turkey. Phytotherapy Research. Phytoter. Res. 20, 9-13. DOI: 10.1002/ptr. 1816.

Esterbauer, H.; Schaur, R. J.; Zollner, H. 1991 Free Radical Biol. Med. 11, 81.

Estévez M. 2006. Desarrollo de nuevos transformados cárnicos cocidos a partir de carne, hígado y grasa de cerdo Ibérico con antioxidantes naturales. Universidad de Extremadura, España. ISBN: 84-7723-743-3.

Estrada Reyes Rosa, Aguirre Hernández Eva, García Argáez Aida, Soto Hernández Marco, Edelmira Linares, Bye Robert, Heinze Gerardo y Martínez-Vazquez Mariano. 2004. Comparative chemical composition of *Agastache mexicana subsp. mexicana* y *Agastache Mexicana subsp. xolocotziana*. Biochemical Systematics and Ecology 32, pp 685-694.

Ferreira R. 1995. El sistema de defensas antioxidantes. Monografía. Estres oxidativo y antioxidantes. Buenos Aires, Argentina.

Fina B. 2006 Laboratorio de Biología ósea y metabolismo mineral. Estrés oxidativo. Facultad. CS. Medicas-UNR. Rosario, Argentina.

Flores J. 2000. Farmacología humana, tercera edición. Masson. Barcelona, España.

Frankel EN. 1999. Food antioxidants and phytochemicals: present and future perspectives. *Fett/Lipid* 101: 450–455.

Frankel EN, Huang SW, Aeschbach R. 1997. Antioxidant activity of green tea in different lipid systems. *J Am Oil Chem Soc* 74: 1309–1315.

Frankel EN, Huang SW, Aeschbach R, Prior E. 1996. Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol and rosmarinic acid in bulk oil and oil-in water emulsion. *J Agric Food Chem* 44: 131–135.

Frankel EN, Huang SW, Prior E, Aeschbach R. 1996. Evaluation of antioxidant activity of a rosemary extracts, carnosol and carnosic acid in bulk vegetable oils and fish oil and their emulsions. *J Sci Food Agric* 72: 201–208.

Fubini B., Hubbard A. 2003. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species, generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radical Biology and Medicine*. 34(12): 1507-16.

Fuentes-Granados, R.G., Widrlechner, M.P., Wilson, L.A., 1998. An Overview of *Agastache*. *J. Herbs, Spices Med. Plants* 61 (1), 69–97.

García L., García V., Rojo D.M. Y Sánchez E. 2001. Plantas con propiedades antioxidantes. *Revista Cubana de investigaciones Biomédicas*. Ciudad de la Habana.

Giese J. 1996. Antioxidants: tools for preventing lipid oxidation. *Food Atechnology*. 73-81.

Gonzalez Ramirez Adriana. GonzalezTrujano Maria Eva. Pellicer Francisco. Lopez-Muñoz Francisco 2012. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of the *Agastache mexicana* extracts by using several experimental models in rodents. *Journal of Ethnopharmacology* 142 (2012) pp. 700-705

González M.C., Ospina L.F., Calle J., Rincón J., 2007. Evaluación de extractos y fracciones de plantas colombianas en modelos de inflamación aguda, subcrónica y crónica. *Rev. Colombiana. Científica. Químico Farmacología*. 36(2): 166-174.

Gutiérrez J., Morales J.A. 2004. Producción de radicales libres derivados del oxígeno y el daño al hepatocito. *Med Int Mex*. 287-295.

Gutteridge JMC. 1994. Biological origin of free radicals and mechanisms of antioxidant protection. *Chem Biol Interact* 91: 133–140.

Gutteridge J.M. 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*;41: 1819-28.

Hall C.A, Cuppett S.L 1997. Structure-activities of natural antioxidants methodology in vivo and in vitro concepts, Hudson B.J.F (ed.). Elsevier Applied Science: London; 1-18.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C., 1986. Oxygen free radicals and iron relation to biology and medicine: Some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys.* 246: 501-514.

Halliwell B., 1994. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence. *Lancet.* 344: 721-24.

Harold Lint and Carl Epling 1945. A Revision of *Agastache*. American Midland Naturalist. Vol. 33. No. 1: 207–230.

Hasan M., Akuta T. Akaike T. 2000. Nitric oxide-induced nitrative stress involved in microbial pathogenesis. *J Pharmacological Science.* 98: 117-129.

Hernández-Abreu O, Castillo-España P, León-Rivera I, Ibarra- Barajas M, Villalobos-Molina R, González-Christen J, Vergara- Galicia J, Estrada-Soto S 2009. Antihypertensive and vasorelaxant effects of Tiliarin isolated from *Agastache mexicana* are mediated by NO/cGMP pathway and potassium channel opening. *Biochem. Pharmacol.* 78(1):54-61.

Ibarra-Alvarado C, Rojas A, Mendoza S, Bah M, Gutiérrez DM, Hernández-Sandoval L, Martínez M. 2010. Vasoactive and antioxidant activities of plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of cardiovascular diseases. *Pharm Biol*;48: 7329.

Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. 2010. Anuario estadístico de Michoacán de Ocampo. INEGI y Gobierno del Estado de Michoacán. México. 645 pp.

Jialal I., Devaraj S. 1996. Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants, and atherosclerosis: a clinical biochemistry perspective. *Clinical Chemistry*; 42: 498-506.

Kanofsky J.R. 1989. Singlet oxygen production by biological systems. *Chemistry and Biology Interact.* 70 (1-2): 1-28.

Katalinic V., Modun D., Music I., Boban M. 2005. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power FRAP assays. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*; 140: 47-52.

Kim B.Y., Lee K.S., Choo Y.M., Kim I., Je Y.H., Woo S.D., Lee S.M., Park H.C., Sohn H.D., Jin B.R. 2008. Insect transferrin functions as an antioxidant protein in a beetle larva. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*; 150: 161–169.

- Klatt, P., & Lamas, S. 2000. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur. J. Biochem.*, 267, 4928-4944.
- Knight, J. A.; Pieper, R. K.; Mc Clellan, L. 1988. *Clin. Chem.* 34, 2433.
- Lee K.J., Dabrowski K., Rinchar J. 2004. Supplementation of maca (*Lepidium meyenii*) tuber meal in diets improves growth rate and survival of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) alevins and juveniles. *Aquaculture research*. 35: 215-23.
- Lee L. 2002. Blockade of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activity by quercetin and luteolin leads to growth inhibition and apoptosis of pancreatic tumour cells. *Anticancer Res.* 22(3): 1615-27.
- Leonti M., Sticher O. y Henrich M. 2003. Antiquity of medicinal plants usage in two Macro-Mayan ethnic groups (México). *Journal of Ethnopharmacology*. 88: 119-124.
- Linares, E., Flores, B., Bye, R., 1999. Plantas Medicinales de México, usos y remedios tradicionales. Jardín Botánico del Instituto de Biología. UNAM, México, D.F. México p. 195
- Lint, H., Epling, C., 1945. A revision of *Agastache*. *Am. Midl. Nat.* 33, 207–230.
- Liovech S.I., Fridovich I. 1994. The role of $O_2^{\cdot-}$ in the production of HO: in vitro and in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*. 16 (1): 29-33.
- Lock O. 1994. Analisis Fitoquímico y Metabolitos Secundarios. Cap. 4. Pontificia Universidad Católica del Perú. Métodos de Estudios de Productos Naturales. Fondo Editorial. PUCP. Capítulo 4.
- Loft S., Poulsen HE. 1998. Estimation of oxidative DNA damage in man from urinary excretion of repair products. *Acta Biochemistry Pol*; 45:133- 44.
- MacKenzie E.L., Ray P.D., Tsuji Y. 2008. Role and regulation of ferritin H in rotenone-mediated mitochondrial oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*; 44: 1762–1771.
- Magalhães L.M., Santos F., Segundo M.A., Reis S., Lima J. (2010). Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity. *Talanta*; 83: 441–447.
- Maldonado J.L. 2004. La flora de Michoacán 1790-1791. Instituto de Investigaciones Históricas de la Universidad Michoacana de san Nicolás de Hidalgo. Departamento de Historia de la ciencia del consejo superior de investigaciones científicas de Madrid. Gobierno del Estado de Michoacán. Secretaria de Urbanismo y Medio ambiente. 227 pp.
- Maniak B., Targonski Z., w y wnosei. Antioxidants naturally occur in food *Przem Farm Owoc warz. przeciwutleniacze naturalnie wystepujase*. 4: 7-9. In polish.

- Martínez M. 1987. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de cultura económica. 900-901.
- Miglior F, Wong W, Wang Y, Kistemaker C.J, Sewalem A y Jamrozik J. Short communication: Genetics parameters of production traits in Chinese Holsteins using a random regression test-day model. 2009. Journal Dairy Science. 92: 4697-4706.
- Morse R.E., 1974. Antioxidant, Encyclopedia of food technology. Connecticut, USA: Avi Publishing Company. 6.
- Mulder A.M., Connellan P.A., Oliver C.J., Morris C.A. 2008. Bovine lactoferrin supplementation supports immune and antioxidant status in healthy human males. Nutrition Research; 28: 583–589.
- Muller F. 1992. Reactive oxygen intermediates and human immunodeficiency virus (HIV) infection. Free Radical Biology and Medicine. 13: 65-657.
- Murray R., Mayes., P., Granner D., Rodwell V. 1997. Bioquímica de Harper. Manual moderno. 14 edición. México, D.F. 678.
- Nicolaiew N., Lemort N., Adorni L., Berra B., Montorfano G., Rapelli S. 1998; Comparison between extra virgin olive oil and oleic acid rich sunflower oil: effects on postprandial lipemia and LDL susceptibility to oxidation. Nutritional Metabolism. 42:251-60.
- Nielsen F., Mikkelsen B.B., Nielsen J.B., Andersen H.R., Grandjean P. 1997. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: Reference interval and effects of lifestyle factors. Clinical Chemistry. 43: 1209-1214.
- Nisoli, E. Clementi, E. 2003. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. Science 299 (5608): 896-9.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. 1979 Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem. 95: 351-358.
- Page H., Salmon A., Leiser S., Robb E., Brown M., Milter R., Stuart J. 2009. Mechanisms of stress resistance in snell dwarf mouse fibroblast: enhanced antioxidant and DNA base excision repair capacity, but no differences in mitochondrial metabolism. Free Radical Biology and Medicine; 46: 1109-1118.
- Pieroni A, Janiak V, Dürr CM, Lüdeke S, Trachsel E, Heinrich M. 2002. In vitro antioxidant activity of non-cultivated vegetables of ethnic Albanians in Southern Italy. Phytother Res 16: 467–473.
- Pietta P, Sionetti P, Mauri P. 1998. Antioxidant activity of selected medicinal plants. J Agric Food Chem 46: 4487– 4490.
- Podsedeck A. 2007. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. LWT Food Science and Technology; 40: 1–11.

Portel R.P., Conwell D., Usmar V.M. 1999. The Biochemistry of nitric oxide and peroxynitrite Implications for mitochondrial function. Understanding the process of aging: The roles of mitochondria. Free radicals and antioxidants. New York. Marcel Dekker. 39-56.

Pratt D.E 1976. Role of flavones and related compounds in retarding lipoperoxidative flavor changes in foods. ACS Symp Ser 26: 1-13.

Prior R.L., Wu X., Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53: 4290-4302.

Pulido R., Bravo L., Saura F. 2000. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. Agric. Food Chemistry. 48: 3396-3402.

Ramírez, R., Echeverri, F., (2007). ¿Son seguros y efectivos los antioxidantes?. Scientia et Technica; 1: 41-43.

Ramón J.R., Alonso M.B., Rubio S., Ramon B.M., Plaza L., Mostaza J.M. 1998. Antioxidantes de la dieta y enfermedad coronaria. Clinica Cardiovascular; 14: 29-38.

Raskyn I., Ribnicky D.M., Komarnnytsky S., Llic N., Poulev A., Borisjuk N., Brinker A., MorenoD.A., Ripoll C., Yakoby N. 2002. Plants and human health in twenty first century. Trends in Biotechnology; 20:12.

Rice C.A., Miller N.J., Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology and Medicine;20: 933-56.

Ridnour, L. A., Thomas, D. D., Mancardi, D., Espey, M. G., Miranda, K. M., Paolocci, N. 2004. The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. Biol. Chem., 385: 1-10.

Roche M., Rondeau P., Singh N.R., Tarnus E., Bourdon E. 2008. The antioxidant properties of serum albumin. FEBS letters; 582: 1783–1787.

Rosenblum, E. R.; Gavalier, J. S.; Van Thiel, D. H. 1989. Free Radical Biol. Med. 7, 569.

Rzedowski, J. y de Rzedowski G.C. 1985. Flora Fanerogámica del Valle de México. Tomo II. ENCBIPN e Instituto de Ecología. México. 586-590.

Rzedowski, J., Calderon, G., 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. CONABIO. Instituto de Ecología y Centro Regional del Bajío, México. p. 1405.

Sanders R.W., 1987. Taxonomy of *Agastache* section *Brittonastrum* (Lamiaceae Nepeteae). Syst. Botany Monogr. 15, 1–92.

Shacter E. 2000. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metabolism Review*: 32: 307-26.

Shahidi F, Janitha PK, Wanasundara PD. 1992. Phenolic anti- oxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr* 32: 67–103.

Siddhuraju P., Becker, K. (2007). The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) seed extracts. *Food Chemistry*; 101: 10–19.

Spitzer JA. 2002. Ethanol and LPS modulate NF-kappaB activation, inducible NO synthase and COX-2 gene expression in rat liver cells in vivo. *Front Biosci.* 7: 99-108.

Starkke P. 2003. Antioxidantes. *Nutrición*. Instituto nacional de estudios sobre el envejecimiento. Maryland, Estados Unidos.

Steinmetz KA, Potter JD. 1996. Vegetables, fruit, and cancer prevention: A review. *J A Diet Association*. 96: 1027–1039.

Trease G. y Evans W. 1991. *Farmacognosia*, México: Interamericana McGraw-Hill.

Universidad Nacional Autonoma de México. (2009) *Atlas de plantas de la medicina tradicional mexicana*. Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana. Toronjil. Monografía. Recopilación:
<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=toronjil&id=7433> (Consultado el 2 de febrero del 2016).

Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes C.J., Telser J. 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence, *Molecular Cell. Biochemistry*. 266: 37-56.

Velioglu YS, Mazza G, Gao YL, Oomah BD. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *J Agric Food Chem* 46: 4113–4117.