



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS
OPCIÓN EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

**Evaluación del efecto antioxidante y antiinflamatorio
del aceite esencial y compuestos terpénicos
de nurite (*Satureja macrostema*)**

TESIS

Para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
OPCIÓN EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

Presenta:

M.C. RAFAEL TORRES MARTÍNEZ

Directores de tesis:

D.C. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA

D.C. ALEJANDRA OCHOA ZARZOSA

MORELIA, MICHOACÁN, FEBRERO 2018



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS**

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas (IIQB) y el Módulo 3 del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología (CMEB), de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), bajo la asesoría del D.C. Rafael Salgado Garciglia y la Dra. Alejandra Ochoa Zarzosa.

La investigación fue apoyada por la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH, proyectos 2.10 (RSG) y 14.1 (AOZ).



ÍNDICE GENERAL

	Página
ABREVIATURAS	<i>i</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>iii</i>
ÍNDICE DE TABLAS	<i>iv</i>
RESUMEN	<i>v</i>
ABSTRACT	<i>vi</i>
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
2. ANTECEDENTES GENERALES	4
2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA INFLAMACIÓN	4
2.2. RESPUESTA CELULAR DURANTE LA INFLAMACIÓN	8
2.2.1. Las células endoteliales modulan los cambios en el tono vascular y el flujo sanguíneo durante la inflamación	9
2.2.2. El papel del estrés oxidativo en las células endoteliales	15
2.3. INFLAMACIÓN EN ENFERMEDADES CRÓNICAS DEGENERATIVAS	17
2.4. ANTIOXIDANTES Y ANTIINFLAMATORIOS	18
2.4.1. Antioxidantes	18
2.4.2. Antiinflamatorios	20
2.4.3. Antiinflamatorios y antioxidantes de origen vegetal	21
2.4.4. Efecto antiinflamatorio y/o antioxidante de aceites esenciales	22
2.4.5. Propiedades de los aceites esenciales del genero <i>Satureja</i> (Lamiaceae)	26
2.5. MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIINFLAMATORIA	27
2.6. NURITE (<i>Satureja macrostema</i>)	29
3. JUSTIFICACIÓN	33
4. HIPÓTESIS	34
5. OBJETIVOS	34
5.1. OBJETIVO GENERAL	34
5.1.1. Objetivos específicos	34
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	35
7. MATERIALES Y MÉTODOS	36
7.1. MATERIAL BIOLÓGICO	36
7.1.1. Plantas	36
7.1.2. Células endoteliales	36
7.2. MODELOS EXPERIMENTALES	37
8. RESULTADOS	38
8.1. CAPÍTULO I. Antioxidant activity of the essential oil and its major terpenes of <i>Satureja macrostema</i> (Moc. & Sessé ex Benth.) Briq.	38
8.1.1. Resumen	38
8.2. CAPÍTULO II. Efecto protector del aceite esencial y terpenos mayoritarios de <i>Satureja macrostema</i> contra el estrés oxidativo inducido por H ₂ O ₂ en células endoteliales y su participación como reguladores de la respuesta inflamatoria	46
8.2.1. Resumen	46
8.2.2. Abstract	47
8.2.3. Introducción	47

8.2.4. Materiales y métodos	49
8.2.5. Resultados	53
8.2.6. Discusión	63
8.2.7. Conclusiones	66
8.2.8. Referencias	67
9. DISCUSIÓN GENERAL	73
10. CONCLUSIONES GENERALES	82
11. PERSPECTIVAS	83
12. REFERENCIAS GENERALES	84
13. ANEXOS	96
I. ARTÍCULO DE DIVULGACIÓN. ¿Aromas que curan?	96

ABREVIATURAS

ABTS. Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolín-6-sulfonato
ADNc. Ácido desoxirribonucleico complementario
AIES. Antiinflamatorios esteroideos
AINES. Antiinflamatorios no esteroideos
ARNm. Ácido ribonucleico mensajero
BAEC. Células endoteliales aórticas bovina
BHT. Hidroxitolueno butilado
BSA. Albúmina de suero bovino
BUVEC. Células endoteliales de vena umbilical bovina
CAT. Catalasa
CG-EM. Cromatografía de gases acoplada a Espectrofotometría de masas
COX-1. Ciclooxygenasa 1
COX-2. Ciclooxygenasa 2
DAF-2DA. Diacetato de 4,5-diaminofluoresceína
DAMP. Patrones moleculares asociados al daño
DHE. Dihidroetidio
DHR. Dihidrorodamina-123
DMEM. Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco
DPPH. 1,1-difenil-2-picrilhidracilo
eNOS. Óxido nítrico sintetasa endotelial
ERO. Especies reactivas de oxígeno
ERN. Especies reactivas de nitrógeno
GAPDH bovina. Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa bovina
GMPc. Guanosín monofosfato cíclico
GPx. Glutación peroxidasa
H2-DCFDA. Diacetato de 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína
HUVEC. Células endoteliales de vena umbilical humana
ICAM-1. Molécula de adhesión intercelular
IFN- γ . Interferón gamma
IL-1 β . Interleucina 1 β
IL-6. Interleucina 6
IL-8. Interleucina 8
IL-10. Interleucina 10
LPS. Lipopolisácarido
MTT. Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio
NF- κ B. Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de células B
NLR. Receptores tipo NOD
NO. Óxido nítrico
PAF. Factor activador de plaquetas

PAMP. Patrones moleculares asociados a patógenos
PGE2. Prostaglandina E2
PGG2. Prostaglandina G2
PMN. Leucocitos polimorfonucleares
RT-qPCR. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
SFB. Suero fetal bovino
SOD. Superóxido dismutasa
TAC. Capacidad antioxidante total
TLR. Receptores tipo Toll
TNF- α . Factor de necrosis tumoral alfa
TXA2. Tromboxano A2
VCAM-1. Molécula de adhesión vascular

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1.	Mecanismos inflamatorios y de estrés oxidativo en células endoteliales (Modificado de Aoki y Narumiya, 2012).	11
Figura 2.	Diferentes especies de <i>Satureja</i> y sus propiedades relacionadas (Modificado de Jafari <i>et al.</i> , 2016).	26
Figura 3.	Planta en estado vegetativo (A) y durante la floración (B) de <i>Satureja macrostema</i> .	31
Figura 4.	Cromatograma del aceite esencial obtenido por extracción hexánica de partes aéreas de plantas de <i>Satureja macrostema</i> cultivadas en invernadero (Torres-Martínez <i>et al.</i> , 2014).	32
Figura 5.	Imágenes representativas de la citotoxicidad ejercida por los terpenos de <i>Satureja macrostema</i> sobre la viabilidad de las células endoteliales tratadas con: A) vehículo (etanol 2%), B) limoneno (1000 µg/mL), C) timol (1000 µg/mL) y D) cariofileno (1000 µg/mL). Micrografía óptica (40X) de células endoteliales de vena umbilical bovina (BUVEC).	55
Figura 6.	Efecto del aceite esencial y terpenos mayoritarios de <i>Satureja macrostema</i> sobre las células endoteliales bovinas BUVEC. La evaluación se realizó por los métodos: A) reducción del MTT y B) exclusión por azul tripano.	56
Figura 7.	Efecto del aceite esencial y terpenos mayoritarios de <i>Satureja macrostema</i> sobre la producción de ERO citoplasmáticas (A) y mitocondriales (B) en células BUVEC.	57
Figura 8.	Efecto del aceite esencial y terpenos mayoritarios de <i>Satureja macrostema</i> sobre la producción de ERO en células BUVEC; Anión superóxido (A) y radical hidroxilo (B).	59
Figura 9.	Efecto del aceite esencial y terpenos mayoritarios de <i>Satureja macrostema</i> sobre la producción de óxido nítrico (NO) en células BUVEC.	60
Figura 10.	Efecto del aceite esencial y terpenos mayoritarios de <i>Satureja macrostema</i> sobre la actividad de catalasa en células BUVEC.	61
Figura 11.	Efecto del aceite esencial y terpenos mayoritarios de <i>Satureja macrostema</i> sobre la expresión del gen TNF-α en células BUVEC.	62
Figura 12.	Efecto del aceite esencial y terpenos mayoritarios de <i>Satureja macrostema</i> sobre la expresión del gen IL-10 en células BUVEC.	62

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1.	Clasificación y características principales de la inflamación según su intensidad y duración (Modificado de Ashley <i>et al.</i> , 2012).	8
Tabla 2.	Ejemplos de plantas medicinales y sus compuestos terpénicos principales con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.	25
Tabla 3.	Clasificación botánica de <i>Satureja macrostema</i> (Govaerts, 2017)	30
Tabla 4.	Oligonucleótidos específicos utilizados para la determinar la respuesta inflamatoria en las células endoteliales mediante qPCR (Alva-Murillo <i>et al.</i> , 2012).	53

RESUMEN

Los aceites esenciales y los compuestos terpénicos mayoritarios, particularmente de las plantas aromáticas medicinales, son evaluados para determinar su actividad antioxidante y antiinflamatoria con el propósito de comprobar su uso en la medicina tradicional, los principios activos, sus mecanismos de acción, y proponer a éstos como candidatos para la fabricación de nuevos medicamentos. Sin embargo, son pocos los estudios que se realizan para relacionar a los compuestos terpénicos con ambas propiedades y dirigidos a determinar el compuesto más activo. En México, la planta aromática medicinal conocida como nurite (*Satureja macrostema*, Familia Lamiaceae), se consume en preparaciones alimenticias e infusiones para el tratamiento de diversas enfermedades que cursan con estrés oxidativo e inflamación, por lo que surge el interés de evaluar el aceite esencial y sus principales terpenos mayoritarios sobre dichas propiedades. En la presente investigación se evaluó el efecto antioxidante y antiinflamatorio del aceite esencial de nurite (*S. macrostema*) y sus terpenos mayoritarios en procesos de estrés oxidativo e inflamatorios. El aceite esencial fue obtenido por hidrodestilación de parte aérea (hojas y tallos) fresca de plantas de *S. macrostema* cultivadas en invernadero durante 6 meses, analizado mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas para la identificación y cuantificación de los terpenos, resultando como los mayoritarios, pulegona (25.50%), linalol (16.62%), timol (14.64%), limoneno (5.53%), cariofileno (3.98%) y mentona (3.09%). La actividad antioxidante del aceite esencial de *S. macrostema* y los terpenos mayoritarios (1, 10, 100 y 1000 µg/mL) fue demostrada inicialmente mediante la generación de radicales libres *in vitro* con los métodos DPPH, ABTS y TAC, encontrando que el aceite esencial a 100 µg/mL presentó una alta actividad antioxidante con los tres métodos evaluados (53.11%, 92.12% y 98.25%, respectivamente). El timol ejerció una capacidad de atrapamiento de radicales libres mayor a 94% en los tres métodos utilizados superando al antioxidante sintético BHT. Pulegona, linalol, limoneno, cariofileno y mentona mostraron una actividad antioxidante baja (< 20%), indicando que el timol es el responsable de este efecto. Posteriormente, se evaluó la actividad citoprotectora, antioxidante y antiinflamatoria en células endoteliales de vena umbilical bovina (BUVEC) bajo estrés oxidativo inducido por H₂O₂ y un estado inflamatorio inducido por LPS. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de reducción del MTT y exclusión por azul tripano, donde las células BUVEC se incubaron con el aceite esencial y los terpenos mayoritarios (1, 10, 100 y 1000 µg/mL), encontrando que el aceite esencial y los terpenos limoneno, linalol, mentona, pulegona, timol y cariofileno no mostraron citotoxicidad en las BUVEC a las concentraciones de 1, 10 y 100 µg/mL. La producción de ERO y ERN, determinada por citometría de flujo, así como la actividad de catalasa (CAT), fueron evaluadas en las células BUVEC incubadas con H₂O₂ 2% durante 24 h después del pretratamiento con el aceite esencial y terpenos mayoritarios de *S. macrostema*. La cuantificación de la expresión de los genes de las citocinas TNF-α e IL-10, se realizó mediante RT-PCR induciendo la inflamación con LPS (100 ng/mL). En las concentraciones probadas, la producción de ERO citoplasmáticas y mitocondriales, óxido nítrico, anión superóxido y radical hidroxilo, disminuyó en las células BUVEC con el aceite esencial y todos los terpenos mayoritarios; mientras que la actividad de CAT incrementó con el aceite esencial, timol y pulegona; con éstos, la expresión de TNF-α disminuyó y la expresión de IL-10 aumentó con el aceite esencial y timol. Estos resultados revelaron que el aceite esencial de *S. macrostema* y sus terpenos mayoritarios tienen efectos citoprotectores, antioxidantes y antiinflamatorios en las células BUVEC. En conclusión, el aceite esencial de *S. macrostema* presentó un efecto antioxidante y antiinflamatorio dependiente de la concentración, ya que eliminó los radicales libres generados *in vitro* y disminuyó la producción de ERO y ERN, incrementando la actividad de CAT, favoreciendo un estado antiinflamatorio al regular la expresión génica de citocinas involucradas en la respuesta inflamatoria, siendo la concentración de los terpenos mayoritarios del aceite esencial de *S. macrostema* los que favorecieron estos efectos antioxidantes y antiinflamatorios, aunque mayormente son ejercidos por el timol.

Palabras clave: Antioxidante, células de endotelio bovino, citocinas, compuestos terpénicos, inflamación, nurite, planta medicinal, radicales libres.

ABSTRACT

Essential oils and the mayor terpenic compounds, particularly from medicinal aromatic plants, are evaluated to determine the antioxidant and anti-inflammatory activity for the purpose of evaluating their use in traditional medicine, the active compounds, the mechanisms of action, and propose to them as candidates for the manufacture of new drugs. However, few studies are conducted to relate the terpenic compounds with both properties and directed to determine the active compound. In Mexico, the medicinal aromatic plant “nurite” (*Satureja macrostema*, Lamiaceae family), is consumed in food preparations and infusions for the treatment of various diseases that relating oxidative stress and inflammation. So, there is an interest in evaluate both properties of the nurite essential oil and its major terpenes. In this work, the antioxidant and anti-inflammatory effect of the essential oil of nurite (*S. macrostema*) and its major terpenes on oxidative stress and inflammatory processes were evaluated. The essential oil was obtained by hydrodistillation of fresh aerial parts (leaves and stems) of nurite plants cultivated in greenhouse for 6 months, which was analyzed by gas chromatography-mass spectrometry to identification and quantification of terpenes, resulting as major terpenes, pulegone (25.50%), linalool (16.62%), thymol (14.64%), limonene (5.53%), caryophyllene (3.98%) and menthone (3.09%). The antioxidant activity of the essential oil of *S. macrostema* and the major terpenes (1, 10, 100 and 1000 µg/mL) were initially demonstrated by the generation of *in vitro* free radicals with DPPH, ABTS and TAC methods, finding that the essential oil at 100 µg/mL showed a high antioxidant activity with the three methods evaluated (53.11%, 92.12% and 98.25%, respectively). The thymol exerted a free radical scavenging greater than 94% in the three methods assayed, overpassing the activity of synthetic antioxidant BHT. Pulegone, linalool, limonene, caryophyllene and menthone showed a low antioxidant activity (< 20%), indicating that thymol is responsible for this effect. Subsequently, cytoprotective, antioxidant and anti-inflammatory activities were evaluated in endothelial cells of bovine umbilical vein (BUVEC) under oxidative stress induced by H₂O₂ and an inflammatory state induced by LPS. The cellular viability was determined by MTT reduction assay and trypan blue exclusion, where the BUVEC cells were incubated with the essential oil and the major terpenes (1, 10, 100 and 1000 µg/mL), finding that the essential oil of *S. macrostema* and the terpenes limonene, linalool, menthone, pulegone, thymol and caryophyllene showed no cytotoxicity in the BUVEC cells at 1, 10 and 100 µg/mL. ERO and ERN production determined by flow cytometry as well as catalase (CAT) activity were determined in BUVEC cells incubated with H₂O₂ 2% during 24 h after pretreatment with essential oil and major terpenes of *S. macrostema*. The quantification of the gene expression of TNF-α and IL-10 cytokine was performed by RT-PCR inducing inflammation with LPS (100 ng/mL). In the tested concentrations, cytoplasmic and mitochondrial ERO production, nitric oxide, superoxide anion and hydroxyl radical, decreased in BUVEC cells tretated with essential oil and major terpenes; CAT activity increased with essential oil, thymol and pulegone; with these, the expression of TNF-α decreased; and the expression of IL-10 increased with essential oil and thymol. These results revealed that the essential oil of *S. macrostema* and its major terpenes have cytoprotective, antioxidant and anti-inflammatory effects on BUVEC cells. In conclusion, the essential oil of *S. macrostema* presented an antioxidant and anti-inflammatory effect dependent on the concentration, since it eliminated the free radicals generated *in vitro* and decreased the production of ERO and ERN, increasing the activity of CAT, favouring an anti-inflammatory state by regulating the gene expression of cytokines involved in the inflammatory response, being the concentration of the major terpenes of the essential oil of *S. macrostema* those that favored the antioxidant and anti-inflammatory effects, mainly exerted by thymol.

Key words: Antioxidant, bovine endothelial cells, cytokines, terpenic compounds, inflammation, nurite, medicinal plant, free radicals.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La inflamación es una respuesta inmediata del organismo al daño de sus tejidos y células por patógenos, sustancias nocivas (como productos químicos) o lesiones físicas (Weiss, 2008). Este proceso se desarrolla en las formas clásicas de enrojecimiento, hinchazón, calor y la hiperalgesia (dolor) (Banasik, 2000), como resultado de la acción de mediadores inflamatorios, tales como la bradicinina, serotonina, histamina, prostaglandinas, leucotrienos, citocinas pro- y anti-inflamatorias, así como de especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN), que pueden originarse a nivel local o a partir de células que se infiltran en el sitio del trauma (Rasheed, 2003).

Las ERO y ERN tienen una relación directa con las enfermedades inflamatorias, el exceso de éstas tiende a atacar biomoléculas susceptibles causando un desequilibrio oxidativo del sistema antioxidante; el estrés resultante puede conducir al envejecimiento y al desarrollo de enfermedades degenerativas crónicas como el cáncer, diabetes mellitus, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, entre otras (Deng *et al.*, 2011; Wen *et al.*, 2011). En diversas investigaciones se ha demostrado que algunos metabolitos secundarios de origen vegetal como los ácidos fenólicos, flavonoides, carotenoides y terpenos, han mostrado actividad antioxidante e inhiben la inflamación crónica a través de diversos mecanismos. Algunos de estos metabolitos presentan la capacidad de regular diversas actividades celulares relacionadas con la inflamación, como la actividad enzimática de ciclooxigenasas (COX) (Rahman *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2010).

Entre las terapias antiinflamatorias, los fármacos no esteroideos (AINES) y esteroideos (AIES) son de los terapéuticos más prescritos, principalmente para el tratamiento del dolor y la inflamación. Sin embargo, el uso clínico a largo plazo de éstos se asocia con efectos secundarios significativos como daño directo o indirecto en el sistema digestivo y deteriorando la función renal. Este efecto adverso depende de su acción sobre las ciclooxigenasas, inhibiendo la síntesis de prostaglandinas, las

cuales protegen la mucosa gástrica, ya que limitan la secreción ácida gástrica y estimulan la formación de *mucus*. Los AINES además de producir lesión local, reducen el flujo sanguíneo y dificultan el funcionamiento de las defensas en la mucosa del tubo digestivo (Pountos *et al.*, 2011). En el caso de los antiinflamatorios esteroideos, los efectos secundarios más frecuentes son debidos a su efecto antiinflamatorio inespecífico y esto puede contribuir a eventos adversos como un estado inmunosupresor generalizado del sistema inmune (Corley *et al.*, 2003; Ong *et al.*, 2007; Pountos *et al.*, 2011). Por lo tanto, además de la necesidad de desarrollar estrategias para bloquear o reducir la respuesta inflamatoria, se requiere de fármacos antiinflamatorios novedosos y más seguros.

En la búsqueda de nuevos agentes antioxidantes y antiinflamatorios, es importante el empleo de modelos experimentales *in vitro* (células, tejidos, órganos) e *in vivo* (animales), ya que, dependiendo del protocolo experimental, los resultados se pueden extrapolar al posible comportamiento en humanos. Para evaluar la capacidad antioxidante y antiinflamatoria tanto de extractos y compuestos aislados de plantas, las investigaciones se enfocan en puntos importantes de la regulación de ambos procesos, como la producción de ERO (anión superóxido, $\bullet\text{O}_2^-$; peróxido de hidrógeno, H_2O_2 y radical hidroxilo, $\bullet\text{OH}^-$) y ERN (óxido nítrico, NO y anión peroxinitrito, ONOO^-), citocinas pro- y antiinflamatorias (interleucinas y quimiocinas), además de enzimas implicadas en la síntesis de productos involucrados en la inflamación y generación de moléculas oxidativas (ciclooxigenasa 2 y óxido nítrico sintasa endotelial) (Aruoma, 2003; Ríos *et al.*, 2004).

Recientemente, algunas medicinas naturales derivadas de plantas han cobrado interés debido a sus diversas propiedades biológicas y perfil de seguridad en el tratamiento de varias afecciones médicas, incluyendo las que provocan o cursan con procesos de inflamación y estrés oxidativo (Sheir *et al.*, 2001). Las plantas aromáticas son un grupo potencial para la obtención de este tipo de derivados, ya que producen compuestos volátiles 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 y antiinflamatoria, y dichos efectos son atribuidos a sus componentes terpénicos (Cardona y Mejía, 2009; Daniel *et al.*, 2009). Los terpenos eugenol, timol, p-cimeno, linalol, β -cariofileno, 4-terpineol, componentes volátiles de plantas como el clavo (*Eugenia caryophyllus*), albahaca (*Ocimum basilicum*), tomillo (*Thymus vulgaris*), manzanilla (*Matricaria chamomilla*) y mirto (*Myrtus communis*), entre otras, presentan tanto actividad antioxidante como antiinflamatoria. Otros ejemplos de terpenos con estas propiedades están presentes en el eucalipto, romero, lavanda, pino y mirra; los terpenos p-cimeno y timol de tomillo actúan sobre la inflamación en colon, entre otros (Darsham y Doreswamug, 2004; Miguel, 2010; Torres-Martínez y Salgado-Garciglia, 2016 (Anexo 1)). Así mismo, se ha demostrado la actividad antioxidante o antiinflamatoria en modelos *in vitro* o *in vivo* de los aceites esenciales de algunas especies del género *Satureja* (familia Lamiaceae) como *S. montana*, *S. hortensis*, *S. thymbra*, *S. khuzestanica* y *S. cuneifolia* (Amanlou *et al.*, 2005; Ozkan *et al.*, 2007; Hajhashemi *et al.*, 2011). En México, una especie de este género, *Satureja macrostema* 'Moc. & Sessé ex Benth.' Briq., una planta aromática conocida como nurite (nurhitini té), es utilizada en la medicina tradicional como infusión y aditivo en los alimentos debido a sus propiedades como carminativo, expectorante, así como en tratamientos de enfermedades gastrointestinales y hepáticas que cursan con procesos de estrés oxidativo e inflamación. Además, se sabe que el aceite esencial de *S. macrostema* contiene limoneno, linalol, mentona, pulegona y timol, como terpenos mayoritarios (Torres-Martínez *et al.*, 2014); sin embargo, se desconoce su actividad antioxidante y antiinflamatoria, por lo cual es importante realizar estudios que avalen sus propiedades medicinales o funcionales, así como determinar los mecanismos involucrados en el estrés oxidativo o nitrosativo y la inflamación.

En la presente investigación se evaluó el efecto antioxidante y antiinflamatorio del aceite esencial y terpenos de nurite (*S. macrostema*) en modelos experimentales *in vitro*, determinando su implicación en la producción de radicales libres, la expresión de citocinas pro- y anti- inflamatorias, así como en la actividad de enzimas relacionadas con el estrés oxidativo y la inflamación.

2. ANTECEDENTES GENERALES

2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA INFLAMACIÓN

El papel central del sistema inmune es proteger al hospedero de los daños exógenos y endógenos, y así mantener la homeostasis del tejido. La disfunción o desregulación del sistema inmune puede conducir a diversas enfermedades como infecciones recurrentes o trastornos autoinmunes (Lawrence y Gilroy, 2007). La inflamación es una forma generalizada de defensa que se define como una respuesta fisiológica cuando el tejido sufre algún daño y que es empleada tanto por el sistema inmune innato como adaptativo para combatir el daño de origen diverso (infección, ambiental, etc.). Por lo que, la inflamación se ha desarrollado como una respuesta de protección a la infección o lesiones, siendo primordial para eliminar o neutralizar material u organismos extraños, así como células hospederas muertas o dañadas y promover la restauración de la estructura de los tejidos y la función (Eming *et al.*, 2017).

Es importante destacar que los daños colaterales por inflamación no son lo mismo que la inmunopatología, que implica un ataque inmunitario específico sobre el tejido que ya no es reconocido por el sistema inmune como si fuera propio. La patología autoinmune refleja la desregulación de los componentes inmunes adaptativos, como las funciones mediadas por anticuerpos y células, y tiene influencias genéticas y ambientales (Graham *et al.*, 2005). Por su parte, el proceso inflamatorio involucra una serie de eventos inespecíficos que pueden ser provocados por numerosos estímulos o agresiones del medio (por ejemplo: agentes biológicos, isquemia, interacciones antígeno-anticuerpo, traumatismos, lesiones térmicas o fisicoquímicas de otra índole, etc.), desencadenando una cascada de procesos inmunológicos, fisiológicos y conductuales que están orquestados por moléculas de señalización (Eming *et al.*, 2017). Cada tipo de estímulo provoca una respuesta característica que constituye una variante relativamente menor del mismo fenómeno.

El primer paso de la cascada inflamatoria implica el reconocimiento de la infección o daño. Esto se logra típicamente mediante la detección de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, pathogen-associated molecular patterns), que se dirigen específicamente hacia moléculas expresadas por patógenos que son esenciales para la supervivencia de estos. Los patrones moleculares asociados al daño (DAMP, damage-associated molecular patterns), son moléculas endógenas que señalan daño o necrosis que también son reconocidas por el sistema inmune innato. Una ventaja de la detección de estas señales es que se reduce al mínimo el ataque inadvertido de las células y los tejidos del hospedero. A diferencia de la inmunidad adaptativa, el sistema inmune innato no es tan eficiente en su capacidad de distinguir entre diferentes cepas de patógenos, y si tales cepas son nocivas para el hospedero (Hawley y Altizer, 2010).

Muchas señales de daño son reconocidas por receptores específicos, tales como receptores tipo Toll transmembranales (TLR, Toll-like receptors) y dominios de unión a nucleótidos intracelulares y receptores que contienen repeticiones ricas en leucina (NLR, NOD-like receptors) (Roach *et al.*, 2005; Proell *et al.*, 2008). Una vez que se produce el reconocimiento de ligandos, los TLR activan vías de señalización comunes que culminan en la activación del factor de transcripción NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas). Este factor de transcripción se encuentra prácticamente en todos los tipos celulares y permanece en un estado inactivado unido a la proteína inhibidora I κ B (Sears *et al.*, 2011). Como parte de la activación de estos receptores, NF- κ B se libera de I κ B y se transloca al núcleo, donde regula la transcripción de diversos genes diana. Es importante destacar que la activación de NF- κ B no requiere nueva síntesis de proteínas, lo que permite una respuesta rápida. El sistema de señalización del NF- κ B es de los primeros en ser estudiados, pero existe evidencia filogenética de que la regulación de la función inmune por esta vía en los vertebrados evolucionó independientemente de los mecanismos inmunes de los invertebrados (Sorci y Faivre, 2009). Los NLR intracelulares responden a un número creciente de DAMPs que alertan al sistema inmune de la lesión celular y proporcionan una vía próxima

para detectar la exposición a posibles toxinas o contaminantes en el medio ambiente (Proell *et al.*, 2008).

La transcripción y la traducción de proteínas conducen a la tercera etapa de la cascada inflamatoria, la cual comprende la expresión inducible de citocinas proinflamatorias, como la interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), entre otros. Junto con las quimiocinas (quimio-atrayentes) y diversas moléculas co-estimuladoras, estas proteínas solubles facilitan el reclutamiento de células efectoras, tales como monocitos y neutrófilos en el sitio del daño. Los neutrófilos crean un ambiente citotóxico al liberar sustancias químicas nocivas de los gránulos citoplasmáticos (proceso llamado desgranulación) (Hawley y Altizer, 2010).

La liberación rápida de estos productos químicos requiere tanto el consumo de glucosa y oxígeno, conocido como la explosión respiratoria. Los productos químicos tóxicos liberados incluyen especies altamente reactivas denominadas especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno (ERO y ERN, respectivamente). Estas sustancias son destructivas tanto para los patógenos como para las células hospederas e inducen esencialmente la muerte del tejido circundante para evitar la diseminación microbiana. Estos mecanismos efectores son, por lo tanto, los principales contribuyentes al daño colateral de las células del hospedero durante el daño (Hawley y Altizer, 2010; Sears *et al.*, 2011)

El efecto neto de estas interacciones culmina en los signos clásicos típicos de la inflamación local: calor, hinchazón (edema), enrojecimiento (rubor), dolor y pérdida de la función. Las funciones efectoras de la inflamación están además reguladas por el sistema inmune adaptativo. La última fase de la inflamación es su resolución, que es crítica para limitar el daño colateral al huésped (Serhan y Savill, 2005). Después de las primeras horas de inflamación, los macrófagos reclutados y residentes ponen en marcha un programa coordinado de resolución en los tejidos. Durante la inflamación aguda, estas células producen prostaglandinas y leucotrienos

proinflamatorios, pero cambian rápidamente a lipoxinas, que bloquean el reclutamiento de neutrófilos y en su lugar favorecen la infiltración de monocitos importantes para la curación de heridas (Gómez *et al.*, 2011).

La respuesta inflamatoria de manera general ocurre en dos fases distintas, cada una mediada aparentemente por diferentes mecanismos (Tabla 1), la evidencia sugiere que una inflamación crónica de bajo grado contribuye críticamente a muchas enfermedades humanas que anteriormente no se consideraban como trastornos inflamatorios, incluida la obesidad, aterosclerosis, y varios trastornos neurodegenerativos. Es importante destacar que la inflamación y sus secuelas varían tanto espacial como temporalmente. La inflamación generalmente comienza en un área localizada, pero dependiendo de la gravedad de la infección y/o herida, puede extenderse rápidamente a la periferia (Medzhitov *et al.*, 2012; Lathe *et al.*, 2014).

La inflamación está bajo el control de los sistemas enzimáticos plasmáticos y de los mediadores que liberan las células que intervienen en la respuesta inflamatoria. En el proceso global intervienen muchos mecanismos, algunos mediados por una variedad de moléculas de señalización, denominados mediadores inflamatorios (Lathe *et al.*, 2014). Los mediadores inflamatorios pertenecen a diferentes clases químicas y son responsables de iniciar, mantener, agravar y modular el curso de un gran número de enfermedades humanas. Algunos ejemplos de ellos son:

- Aminas biogénicas: histamina y serotonina,
- Proteínas y péptidos: enzimas (óxido nítrico sintasa inducible, ciclooxigenasas y lipooxigenasas), citocinas (pro- y anti- inflamatorias), quimiocinas, factores de complemento, anticuerpos, cininas (bradicinina),
- ERO: anión superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$),
- ERN: óxido nítrico (NO), anión peroxinitrito (ONOO^-) y
- Lípidos (prostanoides, leucotrienos).

Tabla 1. Clasificación y características principales de la inflamación según su intensidad y duración (Modificado de Ashley *et al.*, 2012).

INTENSIDAD	DURACIÓN	
	Aguda	Crónica
Grado Bajo	<ul style="list-style-type: none"> • Para-inflamación • Metaplasia 	<ul style="list-style-type: none"> • Enfermedades inflamatorias (diabetes mellitus, aterosclerosis) • Trastornos autoinmunes • Enfermedades neurodegenerativas • Crecimiento tumoral • Daño tisular (fibrosis)
Grado Alto	<ul style="list-style-type: none"> • Respuesta de fase aguda • Liberación de citocinas • Migración de neutrófilos • Reclutamiento de células efectoras (neutrófilos, macrófagos) • Daño tisular localizado 	<ul style="list-style-type: none"> • Liberación excesiva de citocinas • Septicemia • Destrucción de tejidos

2.2. RESPUESTA CELULAR DURANTE LA INFLAMACIÓN

La activación de la inmunidad innata conduce rápidamente al influjo de células inflamatorias. La infiltración de células inflamatorias en el sitio del daño tisular inicial normalmente progresa de manera ordenada. Las células residentes, tales como las células endoteliales vasculares, los mastocitos, las células dendríticas y los fibroblastos intersticiales, responden liberando mediadores solubles, que incluyen eicosanoides y citocinas proinflamatorias. La señalización de estos eventos altera el perfil de las moléculas de adhesión local y crea un gradiente quimiotáctico que recluta células hematopoyéticas (Aitken *et al.*, 2011). Los mastocitos, en particular, actúan como centinelas y pueden desgranularse en segundos para liberar aminas vasoactivas. En la mayoría de las respuestas agudas, los leucocitos polimorfonucleares (PMN) son las primeras células inflamatorias que se extravasan

de la circulación y llegan al sitio de la lesión, seguidas más adelante por células mononucleares bajo la influencia de señales separadas. La mayoría de los fibroblastos tisulares y las células endoteliales vasculares están en reposo antes de la migración de los PMN al tejido. Sin embargo, estas células residentes pueden dispararse para proliferar y migrar hacia el sitio de la lesión, así como para sintetizar las citocinas, proteasas y los componentes de la matriz extracelular (Ashley *et al.*, 2012).

En el caso de una lesión, las células endoteliales controlan la adhesión y la migración de las células inflamatorias, así como el intercambio de líquido del torrente sanguíneo al tejido dañado. Las células endoteliales recubren los vasos sanguíneos y bajo condiciones homeostáticas llevan a cabo varios procesos esenciales tales como el mantenimiento de la integridad del vaso, el suministro de oxígeno y nutrientes a los tejidos subyacentes y el patrullaje del tráfico de células inmunes. Sin embargo, en circunstancias patológicas tales como enfermedades autoinmunes, las células endoteliales contribuyen a las respuestas inflamatorias y juegan un papel importante en la perpetuación de la inflamación a través de procesos tales como la angiogénesis y el reclutamiento de células inmunes (Al-Soudi *et al.*, 2017).

2.2.1. Las células endoteliales modulan los cambios en el tono vascular y el flujo sanguíneo durante la inflamación

Un cambio en el flujo sanguíneo y el tono vascular, caracterizado por el grado de constricción en relación con la dilatación, se encuentra entre las respuestas iniciales de la vasculatura durante la exposición a un patógeno o daño (Kobayashi *et al.*, 2013). Las células endoteliales producen una variedad de mediadores vasoactivos, como NO, prostaciclina (PGI₂), endotelina-1 e histamina que funcionan de manera autocrina y paracrina para regular la contracción o relajación epitelial. Al comienzo de la inflamación, la enzima óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) se activa como resultado del aumento del calcio intracelular. La activación de eNOS metaboliza la L-arginina en citrulina y NO (Figura 1). Posteriormente, el NO activa la enzima guanilato ciclasa para producir guanosín monofosfato cíclico (GMPc), que inhibe el

flujo de calcio en la célula endotelial permitiendo la relajación del citoesqueleto de actina (Bucci *et al.*, 2005).

Similar a la activación de eNOS y a la biosíntesis de NO, la ciclooxigenasa-1 constitutiva (COX-1) se activa por un aumento en el calcio intracelular para facilitar la síntesis de PGI₂, un oxilípido. Un oxilípido es un ácido graso oxidado y puede sintetizarse enzimáticamente o no enzimáticamente a partir de diferentes ácidos grasos, como el ácido araquidónico en este caso. Durante la inflamación inicial, COX-1 oxida el ácido araquidónico a prostaglandina G₂ (PGG₂), que se reduce rápidamente a PGH₂ por la actividad peroxidasa intrínseca de la COX-1 (Aitken *et al.*, 2011). A continuación, PGH₂ se convierte en PGE₂ por PGE₂ sintasa. Además, la PGE₂ depende de la COX-2 (Figura 1) y también se activa por el aumento de calcio, pero su expresión y actividad óptimas requieren transcripción y traducción inducidas por mediadores proinflamatorios. El aumento de la expresión de COX-2 ayuda a mantener la vasodilatación durante la progresión de la inflamación. Al modular el tono vascular, las células endoteliales se esfuerzan por proporcionar una superficie endotelial óptima para facilitar el enrollamiento, la unión y la migración de los leucocitos para controlar la infección y la inflamación (Andres y Djono, 2010).

Aunque la vasodilatación es fundamental para la progresión de una respuesta inmune apropiada, la vasoconstricción durante las primeras etapas de la infección y la inflamación es protectora en caso de lesión mecánica y hemorragia. Debido a que la vasoconstricción limita el flujo sanguíneo, la liberación de vasoconstrictores dura poco tiempo y se equilibra con la liberación sostenida de vasodilatadores. Dos vasoconstrictores que se sintetizan rápidamente al inicio de la inflamación son el factor activador de plaquetas (PAF) y el tromboxano A₂ (TXA₂). La producción de vasoconstrictores, que también contribuye a la liberación de vasodilatadores, sugiere que la modulación del tono vascular durante la respuesta inflamatoria inicial está estrechamente regulada para evitar daños innecesarios a los vasos sanguíneos y al tejido intersticial (Corl *et al.*, 2010; Predescu *et al.*, 2013).

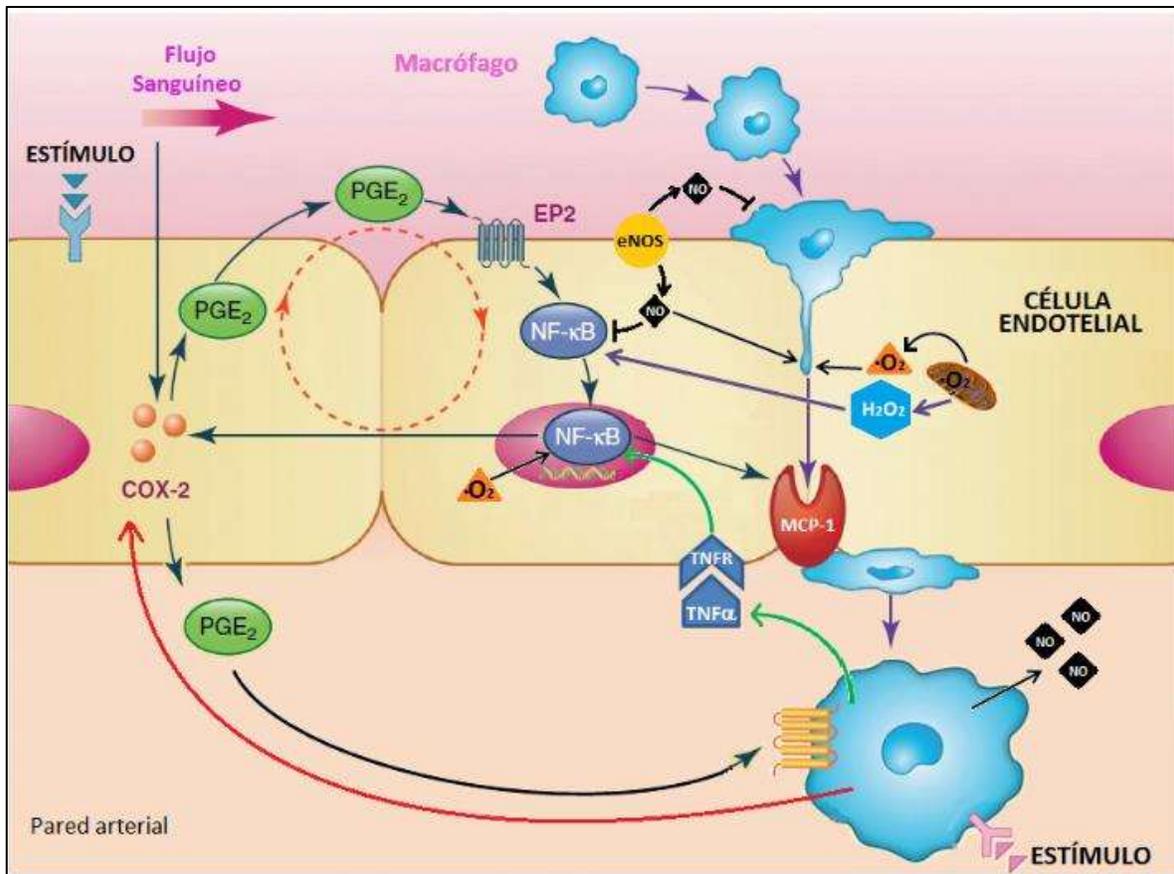


Figura 1. Mecanismos inflamatorios y de estrés oxidativo en células endoteliales (Modificado de Aoki y Narumiya, 2012).

Además de los cambios en el tono vascular, también se requiere una reducción de la fluidez sanguínea durante la respuesta inflamatoria. Durante la inflamación temprana, las células endoteliales inician y propagan la coagulación al aumentar las propiedades procoagulantes y disminuir los anticoagulantes. La trombina convierte fibrinógeno en fibrina dando como resultado la formación de un coágulo de fibrina, lo que ralentiza el flujo sanguíneo en el sitio de la coagulación (Olson *et al.*, 2010).

En células endoteliales aórticas bovinas (BAEC), la exposición a TNF- α disminuye la expresión de trombomodulina, un importante mecanismo regulador de la coagulación que impide la formación de trombina (Olson *et al.*, 2010). Además, la trombina aumenta la migración de leucocitos inducida por citocinas a través de una monocapa de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), apoyando la idea de que

la cascada de coagulación es crítica para la inflamación (Hort *et al.*, 2014). El objetivo de la coagulación es reducir la fluidez sanguínea para evitar la propagación sistémica de bacterias y toxinas, así como para mejorar el contacto de los leucocitos con las células endoteliales y así facilitar su migración (Olson *et al.*, 2010; Predescu *et al.*, 2013).

Las interacciones celulares son esenciales para la regulación de la hematopoyesis y la respuesta inflamatoria; es por ello, que el tráfico de los leucocitos a través de los diferentes tejidos y órganos y su interacción posterior con otras células inmunitarias son esenciales para el desarrollo de las inmunidades innata y adquirida (Aitken *et al.*, 2011). Las integrinas son moléculas fundamentales en la migración celular que controlan las interacciones intercelulares y célula-matriz extracelular durante la recirculación y la inflamación. Una de sus características más importantes es la regulación de su actividad adherente, independientemente de su grado de expresión en membrana. Así, los leucocitos circulantes en sangre mantienen sus integrinas en conformación inactiva para evitar contactos inespecíficos con paredes vasculares no inflamadas, pero cuando encuentran un foco inflamatorio, se produce una rápida activación *in situ* de sus integrinas (Corl *et al.*, 2010).

Los leucocitos circulantes en el torrente sanguíneo deben establecer contacto con la pared vascular y adherirse a ella soportando fuerzas externas de deformación para iniciar la respuesta inflamatoria. El anclaje (tethering) y el rodamiento de los leucocitos sobre el endotelio activado son los primeros pasos del proceso secuencial de extravasación, seguidos de la adhesión firme y la migración transendotelial. Estos contactos iniciales están mediados esencialmente por selectinas y sus ligandos, y requieren que haya flujo para ser eficiente. Aunque las selectinas y sus ligandos tienden a interactuar con afinidad variable, la elevada frecuencia de asociación-disociación de sus interacciones les permite mediar contactos lábiles y transitorios entre leucocitos y endotelio (Aitken *et al.*, 2011; Lubos *et al.*, 2011). Estos contactos producen la disminución de velocidad de los leucocitos y permiten su rodamiento sobre la superficie endotelial, favoreciendo las interacciones mediadas por integrinas

y sus ligandos, aumentando la adherencia de los leucocitos, lo que finalmente los detiene en la pared vascular (Kobayashi *et al.*, 2013).

Las selectinas (P, E y L) son glucoproteínas transmembrana de tipo I que se unen a carbohidratos fucosilados y sialilados presentes en sus ligandos, de forma dependiente de calcio. La selectina L se expresa en la mayoría de los leucocitos, mientras que la E y la P se expresan en células endoteliales activadas por estímulos proinflamatorios, y en el caso de la selectina P también es expresada por plaquetas activadas (Kobayashi *et al.*, 2013). Aparte de la interacción de la selectina L leucocitaria con las selectinas P y E endoteliales, la proteína PSGL1 tiene un papel dominante como ligando de las tres selectinas. De hecho, la unión de PSGL1 a las selectinas E y P promueve la interacción de los leucocitos con el endotelio, mientras que la unión de PSGL1 a la selectina L permite la interacción entre leucocitos, por la cual los leucocitos adheridos facilitan la captura de otros leucocitos circulantes en zonas de endotelio inflamado, independientemente de que éstos expresen ligandos para las selectinas endoteliales, proceso denominado reclutamiento secundario (Mudau *et al.*, 2012).

Las selectinas también pueden unirse a otras glucoproteínas, como CD44 o ESL1, en el caso de la selectina E, cada ligando parece desempeñar un papel diferencial durante el proceso de captura de neutrófilos. Así, PSGL1 es el principal ligando implicado en la captura inicial de los leucocitos, mientras que ESL1 es necesario para convertir las uniones transitorias iniciales en un rodamiento más lento y estable. Por último, CD44 controla la velocidad de rodamiento e interviene en la polarización de PSGL1 y selectina L, probablemente para permitir el reclutamiento secundario (Takeuchi y Akira, 2010; Mudau *et al.*, 2012). Las plaquetas también pueden actuar como reclutadores secundarios de leucocitos debido a su capacidad de interactuar con ellos y con el endotelio simultáneamente. Además, son capaces de secretar quimiocinas que se inmovilizan en la superficie luminal endotelial favoreciendo el proceso de adhesión (Weber y Noels, 2011). La localización de los receptores de adhesión es necesaria para su correcto funcionamiento durante el tráfico leucocitario.

Por ello, las selectinas, sus ligandos y las integrinas se encuentran agrupadas en los extremos de los microvilli (microvellosidades) de los leucocitos. Por otra parte, el anclaje de las selectinas al citoesqueleto de actina mediante proteínas como α -actinina es necesario para su adecuado funcionamiento (Takeuchi y Akira, 2010).

Se ha demostrado que las selectinas activan múltiples rutas de señalización, que conectan con procesos como la reorganización del citoesqueleto de actina, tales como la cascada de MAPK, Ras o Rac2 (Kobayashi *et al.*, 2013). Por otra parte, PSGL-1 activa también diferentes rutas de señalización intracelular que tienen un efecto inductor de la activación de los leucocitos aumentando la expresión de diferentes moléculas como las quimiocinas que están implicadas en los pasos siguientes del proceso de extravasación y en funciones efectoras, así como un papel inesperado en la inducción de funciones tolerogénicas en células dendríticas (Mudau *et al.*, 2012).

Durante el establecimiento de los contactos iniciales con el endotelio vascular, los leucocitos disminuyen su velocidad de rodamiento y se activan al encontrar quimiocinas inmobilizadas y ligandos de integrinas expuestos en la superficie apical endotelial. Este paso de activación permite la parada y la adhesión firme de los leucocitos al endotelio en condiciones de flujo fisiológico (Roome *et al.*, 2008). La activación del leucocito implica un marcado cambio morfológico: la célula redondeada circulante se transforma en una célula promigratoria con morfología polarizada, en la cual se distinguen al menos dos regiones, el frente de avance y el urópodo. La polarización del leucocito permite a la célula la coordinación de las fuerzas intracelulares para producir la locomoción celular necesaria durante el proceso de extravasación (Kim *et al.*, 2008).

Las quimiocinas unidas a los glucosaminoglucanos de la membrana apical endotelial actúan señalizando a través de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) localizados en las microvellosidades del leucocito, induciendo una gran variedad de señales “del interior al exterior” en fracciones de segundo, que conducen a múltiples

cambios conformacionales en las integrinas (Laudanna y Alon, 2006). La complejidad y el corto margen de tiempo de los mecanismos de señalización inducidos por las quimiocinas que controlan la activación de integrinas son compatibles con la existencia de redes proteínicas compartimentadas y preformadas (señalosomas) en los leucocitos (Rudolph y Woods, 2005). La presencia de quimiocinas específicas en diferentes lechos vasculares contribuye a orquestar el reclutamiento selectivo de las diferentes subpoblaciones leucocitarias a los focos inflamatorios o a los órganos linfoides secundarios (Laudanna y Alon, 2006). Además, las quimiocinas pueden producir un efecto diferencial en integrinas específicas dentro del mismo microambiente (Mehrad *et al.*, 2007). La adhesión firme sigue a la captura de leucocitos y es necesaria para la diapedesis de los leucocitos en el tejido inflamado. La firme adhesión se logra mediante la unión del ligando de neutrófilos a la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1) (Corl *et al.*, 2008).

2.2.2. El papel del estrés oxidativo en las células endoteliales

El estrés oxidativo se entiende como el desequilibrio en la producción de ERO, de ERN y la defensa antioxidante, y es un proceso relacionado con la inflamación, que genera una producción excesiva de radicales libres que provienen de diferentes fuentes, algunos participan activamente en la evolución del proceso inflamatorio y sus consecuencias (Kim *et al.*, 2008).

La oxidación en las células endoteliales desempeña un papel clave en el daño endotelial y se considera el mecanismo temprano común que contribuye al desarrollo de muchas enfermedades cardiovasculares. La cantidad de especies reactivas, incluidas ERO y ERN, aumenta cuando se produce la oxidación en las células endoteliales (Kim *et al.*, 2008).

La acumulación de ERO da como resultado una disfunción mitocondrial, que incluye la oxidación de lípidos dentro de las mitocondrias y una disminución del potencial

transmembrana mitocondrial. La disminución en el nivel de enzimas antioxidantes puede obstaculizar la capacidad antioxidante de la célula, lo que lleva a una serie de daños auto-perpetuados. Las ERO promueven la actividad de los factores proinflamatorios nucleares sensibles a cambios redox, como el NF- κ B (Figura 1) (Roome *et al.*, 2008). Éste a su vez aumenta la expresión del gen codificante de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), que promueve la síntesis de NO en las células endoteliales y cuando este se libera en cantidades incontroladas, se produce vasodilatación periférica y necrosis tisular (Leyva y Quezada, 2008).

Durante los procesos inflamatorios, el NO puede ejercer toxicidad generando otras ERN como el anión peroxinitrito, esto al reaccionar con el anión superóxido (Gomes *et al.*, 2008). El peroxinitrito se forma durante el proceso de la fagocitosis para eliminar microorganismos invasores en una infección, ocasionando daños celulares por nitrosilación que puede conllevar a causar diversas enfermedades crónicas. La inflamación crónica se asocia con elevados niveles de ERO y las cascadas antiinflamatorias están vinculados a bajas concentraciones de estas. Por lo tanto, el estrés oxidativo y la inflamación pueden ser vistos tanto como las causas como las consecuencias de la patología celular (Terlecky *et al.*, 2012). Se ha demostrado que el estrés oxidativo induce la disfunción del endotelio, promoviendo el daño y la apoptosis, dando como resultado la muerte de las células endoteliales, lo cual ha sido implicado en el desarrollo de diversas enfermedades cardiovasculares (Chen *et al.*, 2016).

El estrés oxidativo y la inflamación también están asociados con el mecanismo fisiopatológico de más de cien enfermedades crónicas degenerativas, entre las que se pueden destacar el cáncer, artritis reumatoide, obesidad, enfermedad de Alzheimer, diabetes mellitus, entre otras (Rosado-Pérez y Mendoza-Núñez, 2007).

2.3. INFLAMACIÓN EN ENFERMEDADES CRÓNICAS DEGENERATIVAS

Las enfermedades crónicas degenerativas son enfermedades complejas cuya característica en común es la presencia de procesos inflamatorios. Varios factores determinan el desarrollo de dichas enfermedades, por lo que la eficacia de su tratamiento está limitada. Además, son padecimientos de larga duración y por lo general de progresión lenta, consideradas como no transmisibles, pero que producen discapacidades físicas y neurológicas que alteran la calidad de vida por imponer invalidez funcional con el consecuente desajuste familiar. Las enfermedades cardíacas, los infartos, el cáncer, las enfermedades respiratorias y la diabetes son las principales causas de mortalidad en el mundo, siendo responsables del 63% de las muertes (Gershenson y Wisdom, 2013; OMS, 2014).

En este tipo de enfermedades, la inflamación es un mecanismo de la respuesta celular ante la agresión como el estallido oxidativo que se produce en diversas células (monocitos, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, células endoteliales) (Gomes *et al.*, 2008). Cuando un órgano, sistema o todo el cuerpo están continuamente con inflamación generalizada, ésta se convierte en el origen de las enfermedades crónicas degenerativas. Uno de los principales eventos de esta es la destrucción de los fosfolípidos de las membranas celulares que conlleva a la formación de prostaglandinas inflamatorias (PGE₂) mediada por la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2), la cual estimula al sistema inmunitario para producir citocinas proinflamatorias como TNF- α o IL-1 β , creando una cascada de reacciones inflamatorias generalizadas y destructivas (Sordillo, 2005; Alluwaimi, 2004).

La inflamación crónica es una de las principales causas de cáncer e investigaciones han demostrado que el mecanismo de acción involucra la participación de agentes oxidantes. La sobreproducción de oxidantes conduce también a una eliminación de los sistemas antioxidantes endógenos. Por lo tanto, la influencia de los radicales libres en una determinada reacción inflamatoria depende del equilibrio entre la

producción e inactivación de estos metabolitos por las células y tejidos a través de sus mecanismos protectores antioxidantes (Terlecky *et al.*, 2012).

2.4. ANTIOXIDANTES Y ANTIINFLAMATORIOS

Debido a que la tensión oxidativa es un factor desencadenante metabólico potente para el proceso inflamatorio (Lansky *et al.*, 2007), la regulación de las concentraciones de ERO y ERN intracelulares y extracelulares durante la inflamación tienen un papel crucial en el tratamiento de las enfermedades que presenten eventos inflamatorios.

2.4.1. Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias que cuando están presentes, retardan e inhiben la oxidación de sustratos susceptibles al ataque de los radicales libres. Todos los seres vivos que utilizan el oxígeno para obtener energía liberan radicales libres, lo cual es incompatible con la vida a menos que existan mecanismos celulares de defensa que los neutralice. A estas defensas se les denomina antioxidantes y se pueden clasificar en endógenos o exógenos. Dentro de los antioxidantes endógenos, se encuentran tres enzimas que son fundamentales en esta actividad: superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa (Ighodaro y Akinloye, 2017).

Superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa son enzimas antioxidantes que desempeñan un papel indispensable en la capacidad protectora antioxidante de los sistemas biológicos contra el ataque de radicales libres. El radical superóxido generado en los tejidos a través del metabolismo o reacciones en las células se convierte catalíticamente en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular por la enzima superóxido dismutasa (SOD), esta enzima está presente en el citosol (dependiente de cobre y zinc) y la mitocondria (dependiente de manganeso). El H_2O_2 cuando se acumula es tóxico para los tejidos o las células del cuerpo. Además, en presencia de hierro se convierte en un radical hidroxilo nocivo ($OH\cdot$) a través de la

reacción de Fenton. Para prevenir este fenómeno, la catalasa (CAT, dependiente de hierro) que es abundante en los peroxisomas, descompone H_2O_2 en agua y oxígeno molecular, reduciendo consecuentemente el daño inducido por radicales libres. Sin embargo, la catalasa está ausente en la mitocondria, por lo tanto, la reducción del H_2O_2 en agua y de los peróxidos lipídicos en sus alcoholes correspondientes se lleva a cabo por la enzima glutatión peroxidasa (GPx, dependiente de selenio). Este esfuerzo de protección colectivo se denomina defensa antioxidante de primera línea. El papel y la eficacia de los antioxidantes de primera línea que incluyen principalmente superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa son por lo tanto importante e indispensable en toda la estrategia de defensa de antioxidantes, especialmente en referencia al anión superóxido que se genera perpetuamente en el metabolismo normal del cuerpo a través de varios procesos (Ighodaro y Akinloye, 2017).

Los antioxidantes exógenos pueden actuar como barreras físicas de prevención de ERO y ERN, como atrapadores, neutralizadores e inactivadores de las especies reactivas o de los factores que las producen. Como ejemplos de estos tipos de antioxidantes se encuentran los filtros de luz UV, las membranas celulares, pigmentos vegetales como los carotenoides y las antocianinas; algunos compuestos que unen o inactivan metales pesados como la ferritina, ceruloplasmina y las catequinas; antioxidantes destructores de ERO como el ácido ascórbico, tocoferoles, ácido úrico y flavonoides (Karadag *et al.*, 2009).

Con base en el modo de acción, los antioxidantes se clasifican como antioxidantes primarios, secundarios y co-antioxidantes. Los primarios son capaces de donar un átomo de hidrógeno a un radical lipídico, formando un nuevo radical más estable que conlleve a generación de agua y/o oxígeno molecular. Los secundarios reaccionan con los radicales iniciadores, pueden inhibir las enzimas que actúan durante la generación de éstos, o reducir el nivel de oxígeno sin generar ERO. Por lo tanto, estos antioxidantes secundarios pueden retrasar las reacciones de los radicales iniciadores por eliminación de ellos. Generalmente esto ocurre al desactivar las

especies de alta energía como el singulete de oxígeno; absorbiendo luz UV; atrapando oxígeno; por quelación de metales; o inhibiendo enzimas como peroxidasas, la NADPH oxidasa, la xantina oxidasa, entre otras. Los co-antioxidantes son principalmente los iones metálicos que participan como cofactores en la activación de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa, catalasa o glutatión peroxidasa (Singh y Singh, 2008).

2.4.2. Antiinflamatorios

Los antiinflamatorios esteroideos (AIES) son los más potentes antiinflamatorios, actúan sobre la inflamación por diversas vías, por ejemplo, reducen el número y la activación de eosinófilos, desencadenando la apoptosis de estos y disminuyendo algunos de sus factores quimiotácticos que incluyen a la IL-3 y la IL-5, el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), entre otros. También reducen la proliferación de linfocitos T, e inducen la apoptosis de estos, al disminuir la acción de la IL-2. Los AIES disminuyen la cantidad de monocitos (células presentadoras de antígeno), células dendríticas, mastocitos, y otras células inflamatorias, y por lo tanto inducen una disminución en la producción de citocinas y mediadores proinflamatorios. Estos efectos son producidos por diversos mecanismos, que incluyen entre otros la síntesis de proteínas con efecto antiinflamatorio y la inhibición de la síntesis de numerosos factores proinflamatorios y de crecimiento. En este grupo de fármacos se encuentran la dexametasona, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, cortisona, hidrocortisona, entre otros (Gómez *et al.*, 2011).

Por otro lado, los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) que, aunque poseen una alta eficacia, provocan graves efectos secundarios, como dermatitis, osteoporosis, hipertensión, depresión, ganancia de peso y fundamentalmente padecimientos de carácter gastrointestinal (Maroon *et al.*, 2010). Uno de los mecanismos de acción de los AINES es que actúan principalmente a través de la interacción con citocinas

proinflamatorias como interleucina 1 alfa (IL-1 α), IL-1 β , IL-6 y TNF- α (Pountos *et al.*, 2011).

Los AINES actúan a partir de bloquear tanto la COX-1 y COX-2, a sólo el bloqueo selectivo de la COX-2 (meloxicam, celecoxib, rofecoxib, etoricoxib, valdecoxib) con el fin de inhibir la respuesta inflamatoria y reducir la producción de prostaglandinas inflamatorias y tromboxanos. El gran impulso para desarrollar los inhibidores selectivos de la COX-2 ha sido el reconocimiento de complicaciones importantes asociadas con los AINES no selectivos de la COX-1 y COX-2. Los efectos secundarios principales de los AINES no selectivos (piroxicam, diclofenaco e ibuprofeno) incluyen el desarrollo de trastornos gastrointestinales como gastritis, úlceras, hemorragias e incluso la muerte. Mediante el bloqueo de la COX-1, que también actúa normalmente para proteger la mucosa gastrointestinal, los AINES no selectivos pueden causar un daño significativo al tejido gástrico y renal (Harris y Schacky, 2004; Maroon *et al.*, 2010).

Recientemente, la resistencia a los medicamentos como los AINES junto con los efectos secundarios que ocasionan ha llevado a la búsqueda de nuevas moléculas para tratar procesos inflamatorios. Las drogas sintéticas a menudo han fallado en este objetivo, dados los efectos secundarios que ellos presentan y a un mayor riesgo de toxicidad aguda y crónica, lo que ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas de origen natural. Desde este punto de vista, el estudio de los aceites esenciales ha experimentado un notable crecimiento, y muchas plantas que los producen están siendo evaluadas (Sharifi-Rad *et al.*, 2017).

2.4.3. Antiinflamatorios y antioxidantes de origen vegetal

A pesar del enorme progreso en los últimos años en el desarrollo de nuevos fármacos, la mayoría de ellos siguen presentando efectos secundarios, por lo que la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos más eficaces y seguros sigue siendo una parte importante de la investigación farmacéutica. En este sentido, el reino vegetal

continúa siendo una fuente interesante de nuevos agentes farmacológicos, ya que existen múltiples plantas medicinales que poseen una gran diversidad de metabolitos secundarios con variadas aplicaciones, de los que hasta el momento sólo han sido investigados una pequeña parte (Calixto *et al.*, 2003).

La utilización de plantas medicinales en el tratamiento de diversas enfermedades inflamatorias y de estrés oxidativo han sido desde siempre prácticas comunes en la medicina tradicional. Además, actualmente estas sustancias antiinflamatorias y/o antioxidantes de origen vegetal presentan un interés renovado, ya que, además de haber sido demostrada su eficacia, ofrecen en algunos casos ventajas con relación a los antiinflamatorios y antioxidantes clásicos, como es la baja incidencia de efectos secundarios (López-Luengo, 2003).

En la literatura existen varios trabajos sobre la evaluación de la actividad antiinflamatoria y/o antioxidante que se han realizado tanto en extractos como en metabolitos secundarios aislados de plantas (aceites esenciales, flavonoides, iridoides, polifenoles, glucosinolatos, ginsenósidos, lignanos, entre otros). Estos estudios se han realizado de manera guiada a través de diferentes modelos farmacológicos tanto *in vivo* como *in vitro*. Muchos de estos compuestos funcionan mediante la inhibición de las vías inflamatorias en una manera similar a como lo hacen los AINES. Además de la vía de la COX, los compuestos de origen vegetal han mostrado tener propiedades de inhibir la producción de NO, la expresión de iNOS y los niveles de TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6 y NF- κ B (Setty y Sigal, 2005; Fahey *et al.*, 2007; Vazquez *et al.*, 2008).

2.4.4. Efecto antiinflamatorio y/o antioxidante de aceites esenciales

Las plantas aromáticas son especies vegetales cuya importancia radica en poseer aceites esenciales con un aroma y/o sabor que las hace útil por su relevancia económica, además de los grandes beneficios que para la salud humana conlleva su consumo. En los últimos años, la demanda de estas especies y los productos

derivados de ellas, tanto en el mercado nacional como internacional, ha experimentado un aumento constante ya que presentan potencial para la obtención de metabolitos. Más de 250 tipos de aceites esenciales se comercializan anualmente en el mercado internacional, algunos de los cuales se emplean en aromaterapia y para el tratamiento de varias enfermedades, incluidas las enfermedades cardiovasculares y neurológicas, la diabetes y el cáncer (Swamy *et al.*, 2016).

La propiedad aromática está dada por componentes o fracciones volátiles que químicamente se denominan esencias o aceites esenciales, cuyos principales constituyentes son los compuestos volátiles de tipo terpénico. Los terpenos son los compuestos volátiles más relevantes ya que constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios con más de 40,000 moléculas diferentes. Los compuestos terpénicos suelen ser insolubles en agua y derivan todos ellos de la unión de unidades de isopreno (cinco carbonos) e incluyen a otros grupos funcionales como alcoholes, aldehídos, ésteres y cetonas (Ávalos y Pérez-Urría, 2009).

Los principios activos especificados anteriormente se pueden encontrar en hojas, tallos, bulbos, rizomas, raíces, flores, semillas y frutos. A los terpenos se les considera uno de los grupos más importantes de principios activos que han mostrado notables propiedades farmacológicas de utilidad en terapéutica, como analgésicas, antiinflamatorias, antioxidantes y sobre el sistema nervioso central (Forlin, 2012). Este grupo de compuestos son producidos por las plantas aromáticas de algunas familias como Apiaceae, Asteraceae, Campanulatae, Lamiaceae, Lauraceae, Magnoliaceae, Rutaceae y Verbenaceae (Dewick, 2009).

Varios aceites esenciales de diversas plantas aromáticas presentan actividad antioxidante y/o antiinflamatoria, ejemplo de ellos se muestran en la Tabla 2. El aceite esencial de la manzanilla (*Matricaria chamomilla*) ha sido usado desde hace siglos por su efecto antiinflamatorio (Kamatou y Viljoen, 2010). A diferentes terpenos se les ha atribuido un efecto antioxidante y antiinflamatorio, como al eugenol, timol, p-cimeno, linalol, β -cariofileno, tujona, 4-terpineol, componentes de los aceites

esenciales de plantas como clavo (*Eugenia caryophyllus*), albahaca (*Ocimum basilicum*), tomillo (*Thymus vulgaris*), *Persea gamblei*, Artemisia herba-alba, mirto (*Myrtus communis*), entre otras (Daniel *et al.*, 2009; Miguel, 2010).

La actividad antioxidante de los aceites esenciales y de los terpenos ha sido ampliamente estudiada debido al potencial como preservativos, cosmeceúticos o nutraceuticos en la industria de alimentos y de cosméticos (Bakkali *et al.*, 2008). Respecto a las investigaciones sobre la actividad antiinflamatoria de este tipo de compuestos, también se han incrementado en los últimos años, sobre todo por el aumento de la incidencia de las enfermedades crónicas degenerativas, en las que se desarrolla una inflamación generalizada. En algunos trabajos se muestra que los constituyentes de los aceites esenciales actúan de manera sinérgica debido a sus principales componentes, pero cuando se aplican por separado hay una menor actividad. Por lo tanto, el sinergismo y antagonismo deben ser estudiados para definir si los terpenos en mezcla o separados muestran una mayor actividad antioxidante y antiinflamatoria (Sharifi-Rad *et al.*, 2017).

El efecto inhibitorio de estos aceites esenciales o de los terpenos en la producción de citocinas proinflamatorias parece estar mediado por la supresión de la expresión génica de estas citocinas. Hay evidencias de que aceites esenciales suprimen significativamente la expresión del ARNm y la proteína de las citocinas en células estimuladas a inflamación; asumiendo, por lo tanto, que el efecto inhibitorio de estos aceites esenciales sobre la expresión de citocinas proinflamatorias se produce principalmente a nivel transcripcional (Burkovská *et al.*, 2007; Dung *et al.*, 2009; Dutra *et al.*, 2009; Yoon *et al.*, 2010). El aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*), mayormente constituido por timol, significativamente inhibió la expresión total del ARNm de IL-1 β en colon de ratón, en un modelo de colitis inducida con TNBS (ácido 2,4,6-trinitrobencen sulfónico) (Juhás *et al.*, 2008).

Tabla 2. Ejemplos de plantas medicinales y sus compuestos terpénicos principales con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.

Planta	Compuestos	Actividad	Modelo Experimental	Referencia
<i>Artemisia annua</i>	α -pineno, Canfeno, Mirceno, 1,8-cineol, Linalol, Cariofileno	Antioxidante Antiinflamatorio	DPPH Macrófagos RAW 264.7/LPS	Kim <i>et al.</i> , 2015
<i>Cymbopogon citratus</i>	Geranial Neral Mirceno	Antioxidante Antiinflamatorio	DPPH Método TAC Edema en pata por carragenina	Jamuna <i>et al.</i> , 2017 Boukhatem <i>et al.</i> , 2014
<i>Eugenia caryophyllata</i>	Carvacrol, Timol, Eugenol, Cinamaldehido	Antioxidante Antiinflamatorio	DPPH Actividad COX-2 y 15-lipoxigenasa	Leem <i>et al.</i> , 2011
<i>Lavandula angustifolia</i>	Linalol ρ -cimeno Anetol	Antioxidante Antiinflamatorio	DPPH Edema en pata por carragenina	Da Silva <i>et al.</i> , 2015
<i>Lippia organoides</i>	Timol, ρ -cimeno, Mirceno	Antioxidante	DPPH ABTS	Arango <i>et al.</i> , 2012
<i>Matricaria chamomilla</i>	Germacreno, Cariofileno, Chamazuleno	Antiinflamatorio	Edema en pata por carragenina	Kamatou y Viljoen, 2010
<i>Mentha suaveolens</i>	Piperitenona, Pulegona, Limoneno, Cariofileno	Antioxidante Antiinflamatorio	DPPH Edema en pata por carragenina	Bichra <i>et al.</i> , 2012 El-Kashoury <i>et al.</i> , 2014
<i>Ocimum labiatum</i>	ρ -cimeno Linalol Anetol Mirceno 1,8-cineol	Antioxidante Antiinflamatorio	DPPH, ABTS, FRAP Ensayo de matriz de cuentas citométricas (CBA) en células mononucleares de sangre periférica estimuladas con fitohemaglutinina	Kapewangolo <i>et al.</i> , 2015
<i>Salvia officinalis</i>	Tuyona, Canfor, 1,8-cineol, α -pineno	Antioxidante Antiinflamatorio	Modelo de estrés oxidativo e inflamación inducido con LPS en ratas (Determinación de CAT, SOD, NO, TNF- α , NF- κ B)	Kolac <i>et al.</i> , 2017

Güllüce *et al.* (2003) evaluaron la actividad antioxidante del aceite esencial de partes aéreas de *S. hortensis*, encontrando una mayor actividad con el ensayo DPPH. Con este método, también se ha mostrado la actividad antioxidante del aceite esencial de *S. cuneifolia*, *S. spicigera* (Eminagaoglu *et al.*, 2007) y de *S. cilicica* (Ozkan *et al.*, 2007). De igual forma, se ha demostrado la actividad antiinflamatoria del aceite de semilla de *S. hortensis* (Hajhashemi *et al.*, 2011) y de *S. khuzistanica* (Amanlou *et al.*, 2005).

En algunas regiones de México habita la especie *Satureja macrostema*, de la cual su aceite esencial presenta reportes etnobotánicos que indican sus propiedades medicinales y su posible potencial antioxidante y antiinflamatorio, aunque no se han realizado investigaciones que comprueben dicho efecto.

2.5. MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIINFLAMATORIA

Los modelos de inflamación y estrés oxidativo permiten estimar el potencial de los candidatos a ser fármacos antiinflamatorios y/o antioxidantes (Martínez *et al.*, 2004). Existen diversos métodos *in vitro* e *in vivo* que permiten estudiar dichos efectos.

Entre los métodos más utilizados para determinar la actividad antiinflamatoria *in vivo* se reporta el ensayo de edema en pata de rata inducida por carragenina, o la inflamación en la oreja de rata inducida por tetradecanoilforbol-acetato (TPA). Una característica principal de estos modelos en la rata es el perfil bifásico de la reacción inflamatoria que alcanza rápidamente su nivel máximo en pocas horas (1-3 h) y mantiene este nivel hasta por 6 h. En intervalos de 2 a 6 h, las prostaglandinas PGE1, PGE2 y PGF2 son los principales mediadores de la inflamación. La respuesta vascular se hace máxima y estable entre las 4 y 8 h, periodo adecuado para el ensayo de agentes antiinflamatorios (González-Guevara *et al.*, 2011)

Usar células como herramientas para estudiar el mecanismo bioquímico y molecular de muchas enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares es esencial. Las

fuentes de células endoteliales utilizadas en las investigaciones pueden clasificarse por las especies y los órganos de los que se han derivado. El uso de líneas celulares ha permitido conocer el comportamiento *in vitro* de todo tipo de células, en la actualidad esta técnica es utilizada para la producción de nuevos fármacos (Rodríguez-Yanez *et al.*, 2015).

El endotelio constituye una interfaz que separa la sangre circulante de los tejidos, forma un tejido muy activo que modula muchos procesos fisiológicos y patológicos, tales como eventos inmunológicos e inflamatorios. Las células endoteliales más comúnmente utilizadas para el estudio de la inflamación se obtienen de humanos, y algunos animales también son fuentes de tales células para establecer modelos experimentales, que incluyen cerdos, ratas y ganado bovino (por ejemplo, células endoteliales de vena umbilical bovina, BUVEC) (Oviedo-Boyso *et al.*, 2008; Rodríguez-Yanez *et al.*, 2015).

Cada experimento requiere el uso de células específicas de los órganos correspondientes; por ejemplo, las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), que se obtienen de la vena umbilical humana, son ampliamente utilizadas y reconocidas por los investigadores como un modelo bien establecido. Las células HUVEC han sido empleadas en modelos inflamatorios ya que su activación permite la síntesis y liberación de mediadores inflamatorios, incluyendo citocinas, quimiocinas, ERO, ERN o enzimas. La infección de las células endoteliales por bacterias o la presencia de productos bacterianos, activan las HUVEC a través de la ruptura de las barreras físicas y la penetración de los tejidos locales (Schouten *et al.*, 2008; Rodríguez-Yanez *et al.*, 2015).

Los métodos de evaluación de antioxidantes pueden ser directos e indirectos. De manera directa se estudia el efecto sobre sustratos como lípidos, aceites, proteínas, ADN, plasma sanguíneo y membranas biológicas. En estos métodos, los antioxidantes compiten por el radical peroxilo con un radical libre atrapador de referencia como la R-ficoeritrina, crocina y fluoresceína. El principio es medir la

capacidad de absorbanza del radical superóxido, por la adición de AAPH [2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro] o AMVN [2,2'-azobis (2,4-dimetilvaleronitrilo)]. Otro ejemplo es el blanqueamiento del β -caroteno durante la auto-oxidación del ácido linoleico utilizando AAPH (Roginsky y Lissi, 2005).

Con el método indirecto se estudia la capacidad de los antioxidantes para atrapar algunos radicales libres, no asociados con la degradación real oxidativa, un ejemplo clásico es la medición de la capacidad para atrapar radicales libres generados *in vitro*. Alternativamente, diversos compuestos cromógenos son utilizados para determinar la capacidad de los compuestos con potencial antioxidante para captar los radicales libres generados. Los métodos más aplicados son ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato) y DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) (Roginsky y Lissi, 2005, Miguel, 2010).

Ambos presentan una excelente estabilidad en ciertas condiciones, aunque también muestran diferencias. El DPPH es un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa, mientras que el ABTS tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato de potasio), enzimática (peroxidasa), o también electroquímica. Con el ABTS se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, mientras que el DPPH solo puede disolverse en medio orgánico. El radical ABTS^{•+} tiene, además, la ventaja de que su espectro presenta máximos de absorbanza a 414, 654, 754 y 815 nm en medio alcohólico, mientras que el DPPH presenta un pico de absorbanza a 515-520 nm (Mesa-Vanegas *et al.*, 2015).

2.6. NURITE (*Satureja macrostema*)

Satureja macrostema 'Moc. & Sessé ex Benth.' Briq. es una planta dicotiledónea que pertenece a la familia Lamiaceae (Tabla 3), muy utilizada en la meseta Purépecha en Michoacán, México, para sus eventos ceremoniales y religiosos a la que comúnmente llaman nurite (nurhitini té), en donde también es una especie de gran

importancia en la medicina tradicional, considerada como un símbolo de fertilidad (Rzedowski y Rzedowski, 1985; Bello, 1993). De manera tradicional, el nurite es utilizado como infusión o extracto alcohólico para el tratamiento de infecciones y malestares intestinales (estomático, antidiarreico, tónico, espasmolítico y carminativo), también se le atribuyen propiedades para tratar la infertilidad (Bello, 1993; Rodríguez, 1998; Aguilar, 2002).

S. macrostema es una especie compleja y los siguientes taxones han sido incluidos como sus sinonimias: *Melissa macrostema* (Moc. & Sessé ex Benth); *Calamintha macrostema* (Moc. & Sessé ex Benth. Benth.) (Rzedowski y Rzedowski, 1985) y más reciente, *Clinopodium macrostemum* (Moc. & Sessé ex Benth.) Kuntze (Govaerts, 2017).

Tabla 3. Clasificación botánica de *Satureja macrostema* (Govaerts, 2017).

Reino	Plantae
Filo	Tracheophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Género	<i>Satureja</i>
Especie	<i>Satureja macrostema</i> (Moc. & Sessé ex Benth.) Briq.

S. macrostema es una planta arbustiva con olor a menta y flores color naranja, por lo que es considerada como una especie aromática (Figura 3). El aroma es debido al contenido de los compuestos volátiles en su aceite esencial de partes aéreas (hojas y tallos), a los que pudieran atribuirse muchas de sus propiedades. Los compuestos volátiles que se han identificado en el aceite esencial obtenido por extracción

hexánica de hojas y tallos de plantas de *S. macrostema* cultivadas en invernadero son los terpenos limoneno, linalol, mentona, pulegona y timol (Figura 4, Torres-Martínez *et al.*, 2014), algunos de ellos reportados con potencial antioxidante y antiinflamatorio.

Se han realizado investigaciones que confirman algunos de estos efectos como la actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* (Bello *et al.*, 2006; Damián-Badillo *et al.*, 2008). Pérez-Gutiérrez y Gallardo-Navarro en 2010, determinaron la capacidad antioxidante del extracto metanólico de *S. macrostema* el cual exhibió potente captación de radicales libres mediante el método DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidracilo), este efecto fue atribuido al contenido de fenoles presentes en el extracto.



Figura 3. Planta de *S. macrostema* en estado vegetativo (A) y durante la floración (B) (Torres-Martínez, 2013).

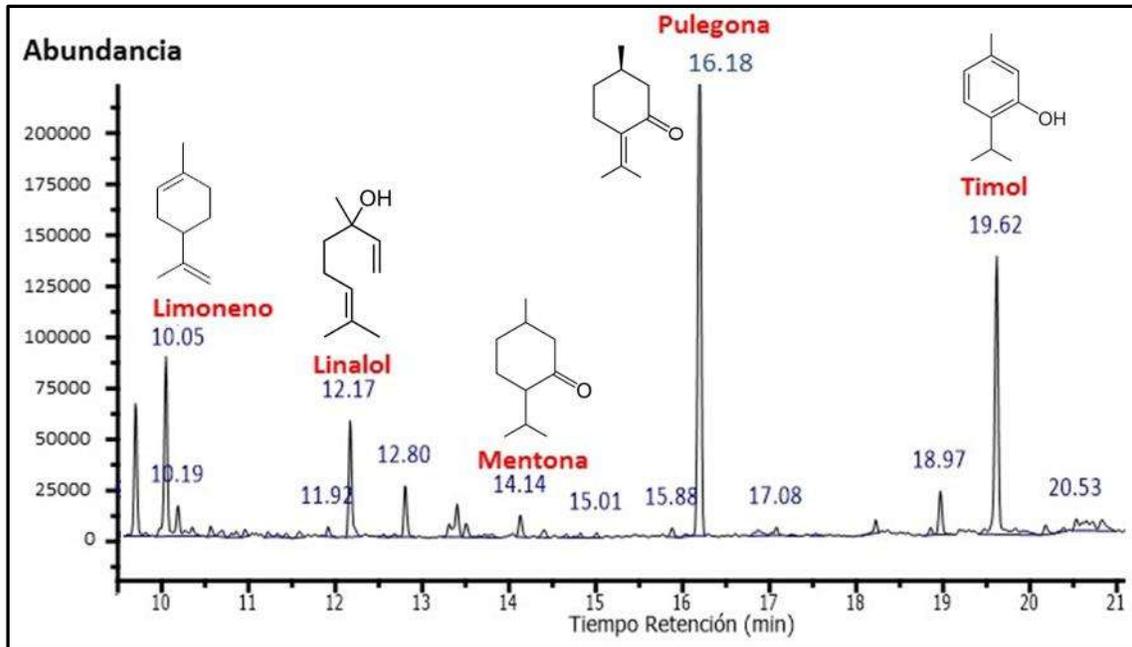


Figura 4. Cromatograma del aceite esencial obtenido por extracción hexánica de partes aéreas de plantas de *S. macrostema* cultivadas en invernadero (Torres-Martínez *et al.*, 2014).

3. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades inflamatorias degenerativas son asociadas a miles de muertes al año, por lo cual, resulta de gran interés la búsqueda de nuevos agentes naturales que permitan controlar el equilibrio entre especies reactivas y mediadores inflamatorios.

En particular, estudios señalan que los aceites esenciales, compuestos principalmente por terpenos, pueden contribuir a modular procesos inflamatorios y/o oxidativos.

El nurite (*Satureja macrostema*), es una planta aromática medicinal utilizada tradicionalmente como antiinflamatorio; por lo cual, su aceite esencial y terpenos, estructuralmente diversos, son candidatos para ser estudiados en modelos experimentales *in vitro*, para determinar su efecto antioxidante y/o antiinflamatorio y así elucidar los principales mecanismos por los cuales modulan la respuesta inflamatoria.

4. HIPÓTESIS

El aceite esencial de nurite (*Satureja macrostema*) presenta actividad antioxidante y antiinflamatoria debido a la concentración de sus compuestos terpénicos mayoritarios.

5. OBJETIVOS

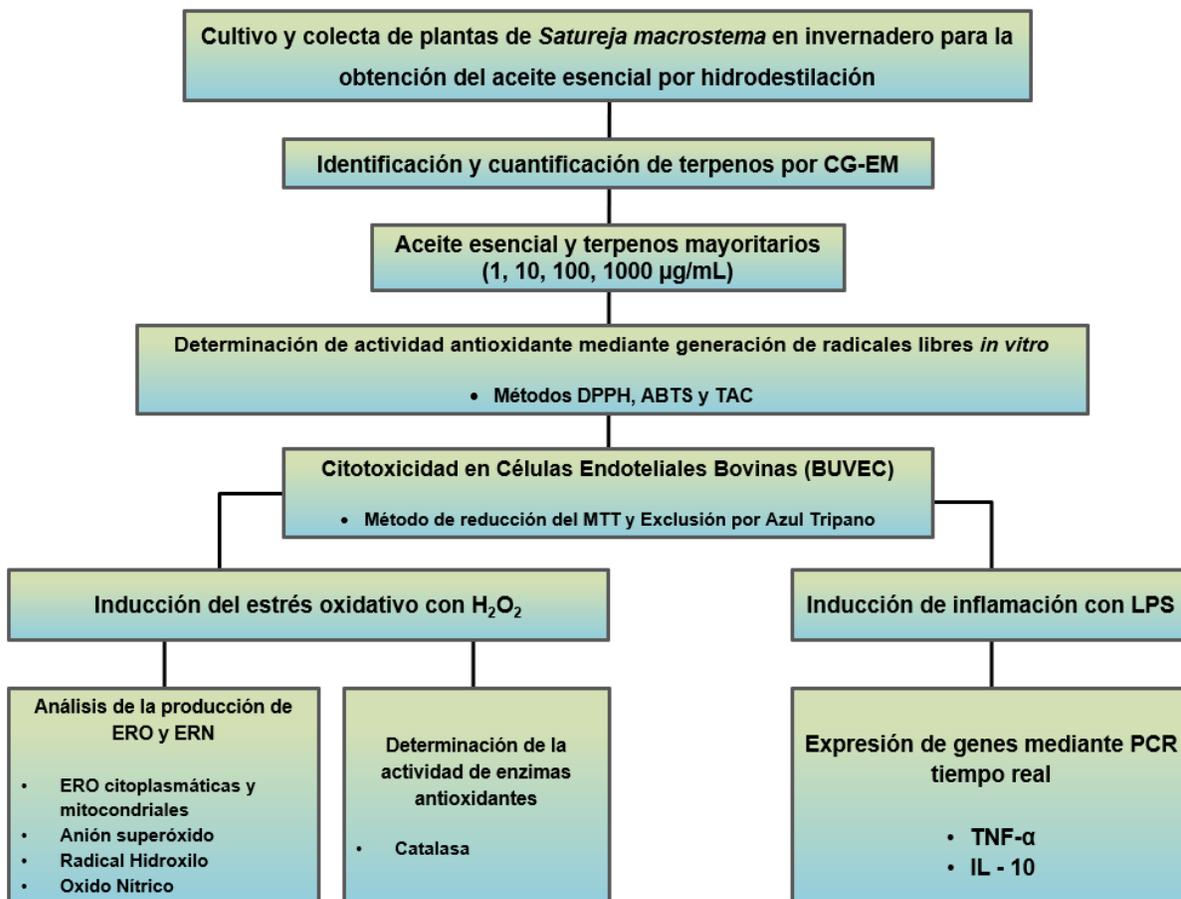
5.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antioxidante y antiinflamatorio del aceite esencial y los compuestos terpénicos de nurite (*Satureja macrostema*).

5.1.1. Objetivos específicos

1. Determinar el efecto antioxidante *in vitro* del aceite esencial y los compuestos terpénicos mayoritarios de nurite.
2. Evaluar el efecto del aceite esencial y los compuestos terpénicos de nurite sobre la actividad enzimática y producción de radicales libres durante el estrés oxidativo y nitrosativo en células de endotelio bovino.
3. Evaluar el efecto del aceite esencial y los compuestos terpénicos de nurite sobre la expresión de genes representativos de mediadores de la inflamación en células de endotelio bovino.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. MATERIAL BIOLÓGICO

7.1.1. Plantas

Las plantas de *Satureja macrostema* (Moc. & Sessé ex Benth.) Briq. utilizadas para la realización de este estudio se obtuvieron por micropropagación (Torres-Martínez, 2013). Las semillas para el cultivo *in vitro* fueron recolectadas de plantaciones establecidas en el área experimental de Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México (19°25'23"N, 102°07'47"O), y la especie fue identificada por el D.C. Miguel Ángel Bello-González (Facultad de Agrobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo). Las plántulas aclimatadas fueron cultivadas en macetas que contenían 1.5 kg de una mezcla de turba y perlita (1:1), en condiciones de 50-60% de humedad relativa sin control de luz y temperatura, y se regaron cada 5 días con agua corriente. Las plantas fueron fertilizadas en el sustrato una vez por mes con 1 g por maceta de Nutrigarden Excelso® (N-P-K, 17-17-17) (Torres-Martínez *et al.*, 2014). Las partes aéreas (hojas y tallos) de plantas de *S. macrostema* de 6 meses de edad fueron recolectadas para obtener el aceite esencial.

7.1.2. Células endoteliales

Las células de endotelio bovino, línea celular BVE-E6E7 (Oviedo-Boyso *et al.*, 2008) empleadas en el desarrollo de este trabajo fueron obtenidas a partir del banco de células del Módulo 3 del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología perteneciente a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Las células endoteliales de vena umbilical bovina (BUVEC) presentan la característica de estar inmortalizadas con el oncogen tipo 16 E6E7 del virus del papiloma humano, su cultivo y manejo se realizó según lo descrito por Alva-Murillo *et al.* (2012).

7.2. MODELOS EXPERIMENTALES

La metodología utilizada para cumplir con los diferentes objetivos del presente trabajo se describe en los capítulos I y II.

Los estándares de los terpenos identificados por CG-EM en el aceite esencial de *S. macrostema* fueron adquiridos comercialmente (Sigma-Aldrich, México) y utilizados a concentraciones de 1, 10, 100 y 1000 µg/mL.

La identificación y cuantificación de los principales terpenos que conforman el aceite esencial de *S. macrostema* se determinó según lo descrito por Torres-Martínez *et al.* (2014).

Los métodos utilizados para la generación de radicales libres *in vitro* fueron DPPH (Karamac *et al.*, 2005), ABTS (Rufino *et al.*, 2010) y TAC (Prieto *et al.*, 1999).

La citotoxicidad en las células BUVEC se determinó por el método de reducción de la sal de tetrazolio MTT y por conteo celular mediante el método de exclusión de azul tripano (Mosmann, 1983).

El efecto del aceite esencial y terpenos de *Satureja macrostema* sobre la producción citoplasmática y mitocondrial de especies reactivas de oxígeno en las células BUVEC se determinó según lo descrito por Tarpey y Fridovich (2001). La producción del anión superóxido y óxido nítrico (da Cunha *et al.*, 2014), radical hidroxilo (Eruslanov y Kusmartsev, 2010) y actividad de catalasa (Bak *et al.*, 2014) de igual forma fue determinada en las células BUVEC expuestas a peróxido de hidrogeno.

La extracción de ARN, ADNc y posterior análisis de la respuesta inflamatoria en células BUVEC se realizó mediante PCR en tiempo real según lo descrito por Alva-Murillo *et al.* (2012).

8. RESULTADOS

8.1. CAPÍTULO I

Antioxidant activity of the essential oil and its major terpenes of *Satureja macrostema* (Moc. & Sessé ex Benth.) Briq. (Anexo 2).

Actividad antioxidante del aceite esencial y sus terpenos mayoritarios de *Satureja macrostema* (Moc. & Sessé ex Benth.) Briq.

8.1.1. Resumen

El objetivo de este estudio fue investigar la actividad antioxidante *in vitro* del aceite esencial de *Satureja macrostema* (Moc. & Sessé ex Benth.) Briq. (Lamiaceae), una planta medicinal mexicana conocida como nurite. Partes aéreas frescas (hojas y tallos) de plantas de *S. macrostema* cultivadas en invernadero durante tres meses se sometieron a hidrodestilación en un aparato tipo Clevenger para obtener el aceite esencial. Los compuestos volátiles se identificaron por cromatografía de gases (CG) y CG/espectrometría de masas. La eficacia antioxidante del aceite esencial y sus principales terpenos de *S. macrostema* fue examinada por tres métodos diferentes de eliminación de radicales en tres concentraciones (0.001, 0.01, 0.1 y 1 mg/mL): 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS) y capacidad antioxidante total (TAC). Los compuestos volátiles mayoritarios del aceite esencial de nurite fueron cariofileno, limoneno, linalol, pulegona, mentona y timol. El aceite esencial de *S. macrostema* mostró la mayor actividad de eliminación de radicales libres con los métodos DPPH y ABTS (53.10% y 92.12%, respectivamente) a 1 mg/mL y 98% con el método TAC a 0.1 mg/mL. El timol ejerció la mayor capacidad antioxidante con 0.1 mg/mL, alcanzando 83.38%, 96.96% y 98.57% mediante los métodos DPPH, ABTS y TAC, respectivamente. El carofileno, limoneno, linalol, pulegona y mentona exhibieron una capacidad antioxidante <25% con los métodos DPPH y ABTS; sin embargo, el limoneno mostró una TAC de 85.41% con 0.01 mg/mL. El aceite esencial de *S. macrostema* y timol mostraron una actividad de eliminación de radicales libres cercana a la del hidroxitolueno butilado sintético.

Palabras clave: Radicales libres, hidrodestilación, planta medicinal, nurite, compuestos volátiles.

ISSN : 0973-1296

Volume 13 | Issue 52 | October-December 2017 (Supplement 4)

PubMed
Included

Pharmacognosy Magazine

Publication of Pharmacognosy Network Worldwide

www.phcog.com

Impact Factor[®] for 2016: 1.069

Medknow

 Wolters Kluwer

Phcog.Net - Bringing Medicinal Plant Researchers Together

CAB-Abstracts, Casper, Chemical Abstracts, CNKI (China National Knowledge Infrastructure), CSA databases, DOAJ, EBSCO Publishing's Electronic Databases, Excerpta Medica / EMBASE, Genamics JournalSeek, Google Scholar, Health & Wellness Research Center, Health Reference Center Academic, Hinari, Index Copenicus, Indian Science Abstracts, Journal Citation Reports, National Science Library, OpenGate, PrimoCentral, ProQuest, PubMed, PubMed Central, Science Citation Index Expanded, Scimago Journal Ranking, SCOPUS, SCOPUS, SIC databases, Summon by Serial Solutions, Ulrich's International Periodical Directory and Web of Science.

Antioxidant Activity of the Essential Oil and its Major Terpenes of *Satureja macrostema* (Moc. and Sessé ex Benth.) Briq.

Rafael Torres-Martínez¹, Yolanda Magdalena García-Rodríguez², Patricia Ríos-Chávez³, Alfredo Saavedra-Molina¹, Joel Edmundo López-Meza⁴, Alejandra Ochoa-Zarzosa⁴, Rafael Salgado Garciglia¹

¹Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), Morelia, ²Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, Universidad Nacional Autónoma de México, Morelia, ³Facultad de Biología, UMSNH, Morelia, ⁴Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, UMSNH, Tzitzimbaro, Michoacán, México

Submitted: 18-07-2017

Revised: 22-08-2017

Published: 31-01-2018

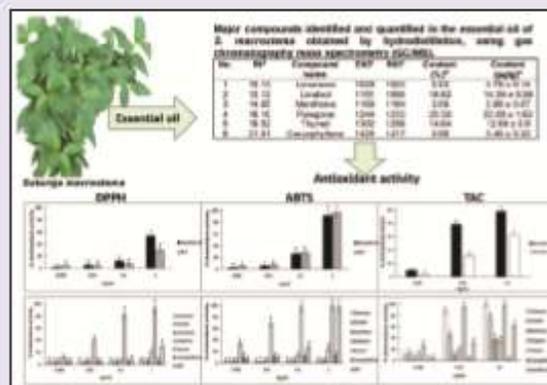
ABSTRACT

Background: The aim of this study was to investigate the *in vitro* antioxidant activity of *Satureja macrostema* (Moc. and Sessé ex Benth.) Briq. (Lamiaceae) essential oil, a Mexican medicinal plant known as nurite. **Materials and Methods:** Fresh aerial parts of *S. macrostema* plants cultivated in greenhouse for 3 months were subjected to hydrodistillation in a Clevenger apparatus to obtain essential oil. Volatile compounds were identified by gas chromatography (GC) and GC/mass spectrometry. Antioxidant effectiveness of essential oil and its major terpenes of *S. macrostema* was examined by three different radical scavenging methods: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), and total antioxidant capacity (TAC). The concentrations tested were 0.001, 0.01, 0.1, and 1 mg/mL. **Results:** The major volatile compounds were caryophyllene, limonene, linalool, pulegone, menthone, and thymol. *S. macrostema* essential oil showed the highest free radical scavenging activity with DPPH and ABTS methods (53.10% and 92.12%, respectively) at 1 mg/mL and 98% with TAC method at 0.1 mg/mL. Thymol exerted the highest antioxidant capacity with 0.1 mg/mL, reaching 83.38%, 96.96%, and 98.57% by DPPH, ABTS, and TAC methods. Caryophyllene, limonene, linalool, pulegone, and menthone exhibited an antioxidant capacity <25% with the DPPH and ABTS methods; however, limonene showed a TAC of 85.41% with 0.01 mg/mL. **Conclusion:** The essential oil of *S. macrostema* and thymol showed a free radical scavenging activity close to that of the synthetic butylated hydroxytoluene.

Key words: Free radicals, hydrodistillation, medicinal plant, nurite, volatile compounds

SUMMARY

- The major volatile compounds of essential oil of *Satureja macrostema* were caryophyllene, limonene, linalool, pulegone, menthone and thymol
- The essential oil of *S. macrostema* showed a high free radical scavenging
- Thymol exerted the highest antioxidant capacity by DPPH, ABTS and TAC methods.



Abbreviations used: GC: Gas Chromatography; DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; ABTS: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); TAC: Total antioxidant capacity.

Correspondence:

Dr. Rafael Salgado Garciglia,
Instituto de Investigaciones Químico
Biológicas, Universidad Michoacana de
San Nicolás de Hidalgo, Edificio B3, Ciudad
Universitaria, CP 58060, Morelia,
Michoacán, México.
E-mail: rsalgadogarciglia@gmail.com
DOI: 110.4103/pm.pm_316_17

Access this article online

Website: www.phcog.com

Quick Response Code:



INTRODUCTION

In recent years, the efficacy of herbal medicines in inflammatory and oxidant-related diseases has been reported.^{1,2} Oxidative stress plays a leading role in the pathogenesis of aging and degenerative diseases such as atherosclerosis, cardiovascular diseases, diabetes, and cancer.³ Free radicals are degraded to nonreactive forms by enzymatic and nonenzymatic antioxidant defenses produced in the body and others supplied by the diet. Among these, essential oils of plants have been studied for their potential antioxidant capacities,⁴⁻⁶ which can be attributed to the presence of terpenes, besides the phenolic compounds that contribute to the free radical scavenging activity.⁷

The terpenes are the main components of the essential oils from medicinal plants, mainly from the aromatic species of the Lamiaceae family; these have been considered as natural antioxidants with high potential, which could be used as additives in food supplements to prevent the oxidative stress that contributes to the appearance of

degenerative diseases.^{8,9} This family is one of the larger families of plants with distinctive flowers, with about 236 genera and approximately 7200 species around the world.¹⁰

The essential oil of basil, cinnamon, clove, nutmeg, oregano, and thyme possesses antioxidant properties due to its major terpenes.¹¹ Thymol and carvacrol are responsible for the antioxidant activity of essential oils of

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 License, which allows others to remix, tweak, and build upon the work non-commercially, as long as the author is credited and the new creations are licensed under the identical terms.

For reprints contact: reprints@medknow.com

Cite this article as: Torres-Martínez R, García-Rodríguez YM, Ríos-Chávez P, Saavedra-Molina A, López-Meza JE, Ochoa-Zarzosa A, et al. Antioxidant activity of the essential oil and its major terpenes of *Satureja macrostema* (Moc. and Sessé ex Benth.) Briq. Phcog Mag 2017;13:S875-80.

Thymus spathulifolius and *Origanum vulgare* ssp. *hirtum*;^[10,11] essential oil of *Melissa officinalis* (its main constituents are nerol, geranial, citronellal, isomenthone, and menthone) shows free radical scavenging activity.^[12] In addition, isomenthone and menthone are also the terpenes of higher capacity antioxidant of the essential oil of *Mentha longifolia* and *Mentha piperita*, while in the essential oil of *Mentha aquatica*, the 1,8-cineole is the responsible of this activity.^[13] Antioxidant capacity in the essential oil of *Melaleuca alternifolia* is due to α -terpinene, γ -terpinene, and α -terpinolene compounds,^[14] and the β -caryophyllene in the essential oil of *Marrubium peregrynium* is the one which presents the greater antioxidant activity.^[15]

To this family belongs the genus *Satureja* L., which includes about 200 species of aromatic plants that contain >0.5% of essential oil,^[16] its main constituents are carvacrol, thymol, phenols, and flavonoids,^[17] responsible compounds of the *in vitro* antioxidant properties of *Satureja hortensis*, *Satureja spicigera*, *Satureja cuneifolia*, and *Satureja ciliatica*.^[18-20] Species from this genus have been used in traditional medicine as analgesic, tonic, or carminative for the treatment of gut disorders.^[21]

In México, a species from *Satureja* (*Satureja macrostema* "Moc. and Sessé ex Benth." Briq.) is used as a medicinal plant in the traditional medicine and is known as *nurite*. It is employed in decoctions and infusions for the treatment of various diseases, including stomach pain and liver and gut diseases.^[22] The essential oil obtained by hexane extraction from the aerial parts of this plant contains mainly terpenes as limonene, pulegone, and thymol, suggesting that some of its pharmacological effects could be attributed to the presence of these valuable constituents.^[23] Limonene and thymol are some of the terpenes with higher antioxidant activity in plants.^[24]

In spite of the high content of terpenes in the essential oil from *S. macrostema*, its antioxidant activity has not been analyzed. This work was conducted to the study of the antioxidant activity of essential oil from *S. macrostema* obtained by hydrodistillation and evaluated individually its major terpenes to elucidate the compound(s) responsible for free radical scavenging activity.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Plants of *S. macrostema* (Moc. and Sessé ex Benth.) Briq. were obtained by micropropagation (data not shown). The seeds for *in vitro* culture were collected from plantations established in the experimental area of Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, Mexico (19°25'23"N, 102°07'47"W), and the species was identified by Miguel Angel Bello-González PhD (Faculty of Agrobotany, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo). Plants were grown in pots of 1.5 kg containing a mix of peat moss and perlite (1:1), under conditions of 50%–60% of relative humidity without light and temperature control, and were irrigated every 5 days. The plants were fertilized in the substrate once per month with 1 g/pot of Nutrigarden Excelso® (N-P-K, 17-17-17).^[25,26] The aerial parts (leaves and stems) of *S. macrostema* plants of 6 months old were collected to obtain the essential oil.

Sample preparation

200 g of washed and fresh aerial part (leaves and stems) of *S. macrostema* plants were subjected to hydrodistillation in a Clevenger-type apparatus, mixing together with 1000 mL of distilled water in a round flask. The operating temperature was 100°C and the extraction was done between 2 and 4 h. The essential oil was separated from the hydrolyte by liquid–liquid partitioning in separating fennel and removed with a micropipette. This was suspended in methanol at a final concentration of 1.0 mg/mL and stored at 4°C in the dark until gas

chromatography–mass spectrometry (GC–MS) and antioxidant activity analysis.

Gas chromatography–mass spectrometry

The chemical composition of the essential oil and major terpene quantification were realized using GC and GC/MS data techniques reported by Torres-Martínez *et al.*^[27] 1 μ L of the sample was injected into an Agilent Technologies (7890A) GC equipped with a mass detector (Agilent 5975C), which operated using helium as a carrying gas, with a flow of 1 mL/min, with a split injection (split 50:1) at a temperature of 250°C in HP 5MS nonpolar capillary column (30 m \times 0.25 mm internal diameter \times 0.25 μ m film), under the following conditions: initial temperature of 50°C, followed by a 5°C/min ramp to attain a temperature of 280°C during 1 min; another 25°C/min ramp to raise the temperature to 380°C, during up to 3 min. The runtime was 50 min. The MS operated at a flow speed of 1 mL/min, with an ionization voltage of 70 eV, at an interface temperature of 250°C, in a SCAN mode, and at a mass interval of 50–500 m/z.

The percentage of essential oil constituents was determined by integration of peak areas, the values shown correspond to the average value of three injections. The compounds were identified by comparison of their retention indices, relative to those of n-alkanes C8–C20, and by comparison with a library of mass spectra with the NIST02 mass spectral library (National Institute of Standards and Technology), as well as by comparison of their retention indices with those described by Adams.^[28] Quantitative determination was based on the total ion count detected by the GC–MS.

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical-scavenging capacity

Measurement of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich, Mexico) radical scavenging capacity was carried out according to Karamać *et al.*^[29] Briefly, two mL of 0.5 mmol/L DPPH in methanol (Meyer, México) was mixed with 100 μ L of different concentrations of essential oil of *S. macrostema* and using major pure terpenes in it (limonene, linalool, pulegone, menthone, thymol, and caryophyllene; Sigma-Aldrich, Mexico) (0.001, 0.01, 0.1, and 1.0 mg/mL). After 20 min incubation, the absorbance was measured at 517 nm with ultraviolet–visible (UV/VIS) spectrophotometer (Genesys 10UV, Thermo Scientific). The percentage of free radical-scavenging capacity was calculated by the following equation:

$$\text{Radical scavenging capacity (\%)} = (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}} \times 100,$$

Where A_{sample} is the absorbance of DPPH mixed with essential oil or terpenes and A_{blank} is the absorbance of DPPH in which sample has been replaced with methanol. All measurements were performed in triplicate and reported as the average value. Butylated hydroxytoluene (BHT, 1.0 mg/mL) (Sigma-Aldrich, Mexico) was used as positive control.

2,2'-Azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid cation radical-scavenging capacity

The radical scavenging capacity of the essential oil and major terpenes of *S. macrostema* were assayed with an 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) (Sigma-Aldrich, Mexico) assay according to the protocol of Rufino *et al.*^[30] with some modifications. The ABTS radical solution was prepared mixing 7.4 mmol/L ABTS and 2.6 mmol/L potassium persulfate (Meyer, México). Samples of 100 μ L were subsequently mixed with 1900 μ L ABTS radical solution, and the absorbance of the resulting mixtures was measured after 7 min at 737 nm with UV/VIS spectrophotometer. The free radical-scavenging capacity was calculated by the following equation:

Radical scavenging (%) = $100 - [(A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}})/A_{\text{control}} \times 100]$.

Where A_{sample} is the absorbance of the ABTS mixed with the sample, A_{control} is the absorbance of the ABTS mixed with deionized water, and A_{blank} is the absorbance of the sample mixed with deionized water. BHT (1.0 mg/mL) (Sigma-Aldrich, Mexico) was used as positive control.

Total antioxidant activity by phosphomolybdenum method

The total antioxidant capacity (TAC) of the essential oil and terpenes was evaluated according to the method described by Prieto et al.^[26] An aliquot of 100 μL of sample solution was combined with 900 μL of reagent solution (0.6 M sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate, and 4 mM ammonium molybdate) (Sigma-Aldrich, Mexico). For the blank, 100 μL of deionized water was used in place of the sample. The tubes were incubated in a boiling water bath at 95°C for 90 min. After the samples were cooled at room temperature, the absorbance of the aqueous solution of each sample was measured at 695 nm in the spectrophotometer (Genesys 10 UV, Thermo Scientific). The total antioxidant activity was calculated by the following equation:

$$\text{TAC (\%)} = [(A_{\text{sample}} - A_{\text{control}})/A_{\text{blank}}] \times 100,$$

Where A_{sample} is the absorbance of the sample mixed with the reagent solution, A_{control} is the absorbance of deionized water mixed with the sample, and A_{blank} is the absorbance of the reagent solution mixed with water. Ascorbic acid (0.001, 0.01, and 0.1 mg/mL) (Sigma-Aldrich, Mexico) was used as positive control.

Statistical analysis

Data were expressed as means \pm standard deviations. Differences in DPPH and ABTS radical scavenging capacities among the essential oil and major terpenes were analyzed by one-way analysis of variance and Tukey's test (JMP8). Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Chemical composition of the *Satureja macrostema* essential oil

The essential oil of the aerial part from *S. macrostema* obtained by hydrodistillation showed amber color with a mild aromatic odor. The average yield was 0.35% on fresh weight basis. The chemical composition of the oil is presented in Table 1, in which the major terpenes are listed in order of their elution. A total of six constituents, representing 69.40% from the total oil, were identified by GC/MS. Results showed that the major compound was the monoterpene ketone pulegone, followed by linalool, thymol, limonene, caryophyllene, and menthone.

Table 1: Major compounds identified and quantified in the essential oil of *Satureja macrostema* obtained by hydrodistillation using gas chromatography-mass spectrometry

Retention time (min)	Compound name	EKI	RKI	Content (%) ^a	Content ($\mu\text{g/g}$) ^b
10.13	Limonene	1028	1024	5.53	4.79 \pm 0.14
12.12	Linalool	1101	1095	16.62	14.39 \pm 0.58
14.95	Menthone	1169	1164	3.09	2.68 \pm 0.07
16.10	Pulegone	1244	1233	25.50	22.08 \pm 1.62
19.52	Thymol	1302	1299	14.64	12.68 \pm 0.8
21.01	Caryophyllene	1425	1417	3.98	3.45 \pm 0.32

^aContent is the peak volume percentage of compounds in the essential oil sample;

^bContent is fresh weight. EKE: Experimental Kovat's retention index; RKE: Reference Kovat's retention index

Antioxidant activity of essential oil

Employing the DPPH method, the essential oil of *S. macrostema* showed antioxidant activity from 0.1 mg/mL, with 12.43% of free radical-scavenging [Figure 1a] and 25.95% by ABTS method [Figure 1b]. The highest antioxidant activities (53.1%) were obtained with 1 mg/mL by DPPH method [Figure 1a], 92.12% with the ABTS method [1 mg/mL, Figure 1b], and 98% of TAC with 0.1 mg/mL [Figure 1c]. The antioxidant activity of essential oil from *S. macrostema* by DPPH method was higher than BHT and similar with ABTS method. The essential oil showed an antioxidant activity more efficient than ascorbic acid with TAC assay [Figure 1c].

Antioxidant activity of the major terpenes

The results related to the antioxidant capacity assays of the major terpenes from *S. macrostema* essential oil show that thymol has the highest activity, reaching 83.38%, 98.29%, and 98.57% with 0.1 mg/mL by DPPH, ABTS, and TAC methods, respectively [Figure 2]. Thymol was most efficient by DPPH method than BHT and showed a similar scavenging free radical activity determined by ABTS [Figure 2a and 2b].

On the other hand, limonene, linalool, menthone, and pulegone exhibited low or almost null antioxidant activity determined by DPPH and ABTS methods, and this activity did not exceed the 25% at 1 mg/mL [Figure 2a and 2b]. However, limonene presented the higher antioxidant activity (98.74%), followed by thymol (98.57%), linalool (75.88%), and ascorbic acid (62.43%) [Figure 2c].

These results indicate that the terpenes present in the essential oil of *S. macrostema*, obtained by hydrodistillation, exert a high free radical scavenging capacity, being the thymol the main responsible of this effect.

DISCUSSION

The chemical analysis by GC/MS of essential oil from aerial parts (stems and leaves) of *S. macrostema* obtained from hydrodistillation indicated that the essential oil mainly contains pulegone, a monoterpene ketone, with a content of 22.08 $\mu\text{g/g}$ weight fresh; which coincides with reports of other medicinal plants from Lamiaceae. Pulegone is the major terpene in *Mentha pulegium*,^[26] *M. piperita*,^[31] and *Satureja* species as *Satureja parvifolia* and *Satureja odora*.^[32] However, linalool and thymol were also found at high contents with 14.39 and 12.68 $\mu\text{g/g}$ weight fresh, respectively. In addition, major volatiles were accompanied by less abundant terpenes as limonene (4.79 $\mu\text{g/g}$ weight fresh), caryophyllene (3.45 $\mu\text{g/g}$ weight fresh), and menthone (2.68 $\mu\text{g/g}$ weight fresh). These are constituents from essential oils of medicinal plants from Lamiaceae such as *M. piperita*,^[33] *M. longifolia*,^[34] *Mitostachys verticillata*,^[35] *Schizonepeta tenuifolia*,^[36] and *Agastache rugosa*.^[37]

Generally, the major components determine the biological properties of the essential oils of medicinal plants. Depending on the type and concentration of terpenes, they can exhibit different biological activities such as antimicrobial, anticancer, and antidiabetic; they have also been associated with hepatoprotective, cardiovascular diseases, spasmolytic, and carminative activities. Recent reports suggest that, at least in part, the encountered beneficial effects of essential oils are due to the pro-oxidant effects at cellular level.^[7,38]

The essential oil from *S. macrostema* showed high antioxidant activity *in vitro* (>50%) at 1 mg/mL with DPPH (53.11%) and ABTS (92.12%), activities higher or similar that those ejected by 1 mg/mL of BHT showing 30.39% and 97.23% of activity, respectively. However, at 0.1 mg/mL, the essential oil reached at 98.25% of TAC, one value greater than the effect observed with ascorbic acid (62.43%).

The antioxidant activity produced at 0.1 or 1 mg/mL of the essential oil of *S. macrostema* is greater that the activity reported for the essential

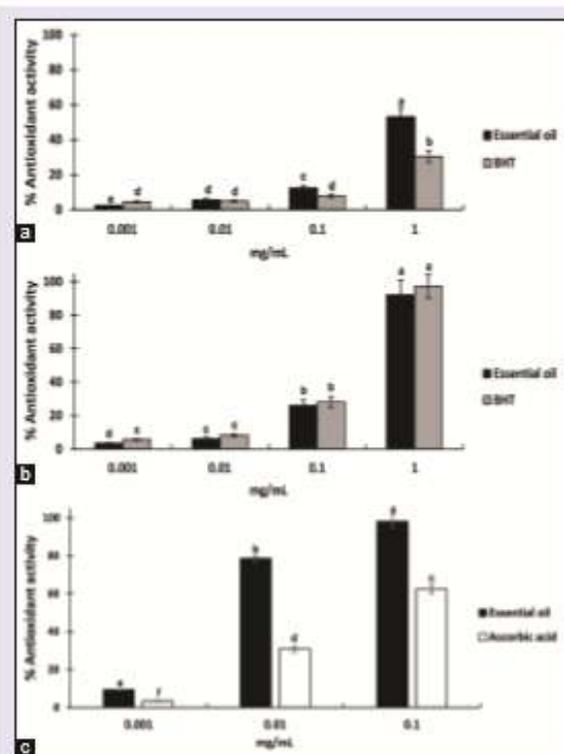


Figure 1: Antioxidant activity of essential oil of *Satureja macrostema* determined by three methods: (a) 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, (b) 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), and (c) total antioxidant capacity. Different letters indicate significant difference ($P \leq 0.05$, $n = 6$, Tukey's test)

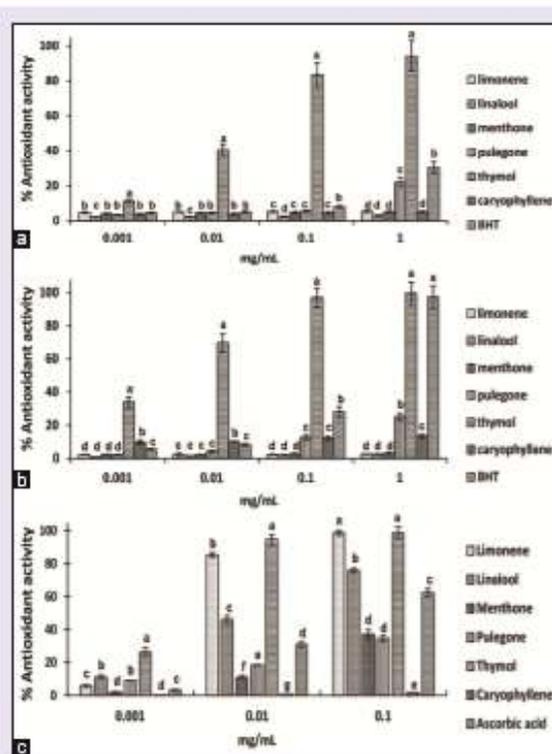


Figure 2: Antioxidant activity of the major terpenes of *Satureja macrostema* essential oil, determined by three methods: (a) 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, (b) 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), and (c) total antioxidant capacity. Different letters indicate significant differences in each block of concentration ($P \leq 0.05$, $n = 6$, Tukey's test)

oil of diverse medicinal plants from Lamiaceae (*Thymus vulgaris*, *M. officinalis*, *Pogostemon cablin* and *Rosmarinus officinalis*), which showed antioxidant activity $>50\%$ at 3 mg/mL.^[39-41]

The antioxidant activity of essential oil from *S. macrostema*, demonstrated by the three methods of free radical scavenging used in the present research, was attributed to the high content of terpenes. The most powerful scavenging constituent by DPPH and ABTS was found to be thymol showing 94.07% and 99.52% of activity, respectively, percentages of antioxidant activity higher than BHT (30.39% and 97.23%, respectively) at 1 mg/mL. Thymol and limonene shown the higher antioxidant activity determined by TAC method with 98.57% and 98.74%, respectively, percentages higher than ascorbic acid (62.43%) at 0.1 mg/mL.

The synergistic effect between terpenes of *S. macrostema* essential oil can be due to the interaction of monoterpenes with hydroxyl substituents, such as thymol and linalool. In addition, the combination of limonene and caryophyllene enhances this effect as has been reported for essential oil from many medicinal plants.^[42,43]

The high content of thymol (36.5%) is responsible of the antioxidant activity ($>80\%$) of *T. spathulifolius*,^[44] *T. vulgaris*,^[44] and oregano essential oil (*O. vulgare* ssp. *hirtum*).^[45] In fact, thymol is responsible for the antioxidant activity of many essential oils where it is present.^[44,45] However, in the essential oil of *Thymus caespitosus*, *Thymus camphoratus*, and *Thymus mastichina*, the antioxidant activity is related to the high

contents of linalool, while thymol is almost absent,^[27,46] nerol/gerantal, citronellal, isomenthone, and menthone in *M. officinalis*^[41] and menthone and isomenthone in *M. longifolia* and *M. piperita*^[41] are related to the antioxidant activity. Some alkene terpenes such as terpinene and caryophyllene also show antioxidant capacity by retarding the peroxidation of linoleic acid.^[47]

Pulegone is an oxygenated monoterpene with a ketone group which gives a low reactivity. The essential oil of *M. pulegium* and *Mentha suaveolens* shown a low free radical scavenging activity due to the high content of pulegone.^[48,49] In agreement with this, in the present work, we detected that although pulegone is the major terpene of the essential oil of *S. macrostema*, it shows a lower antioxidant activity. Thus, this activity could be attributed to thymol content, which is in agreement with other reports.^[6,10,44,45]

With these results, it is possible to establish that the pharmacological effects attributed to *S. macrostema* in Mexican folk medicine are due in part to the antioxidant activity, which has also been linked to other species of *Satureja*.^[18,30,50] The essential oil of *S. macrostema* may be considered as potential natural antioxidants and used to prevent oxidative stress that contributes to many degenerative diseases.

CONCLUSION

The main component found in the essential oil of the aerial part of *S. macrostema* was pulegone, followed by linalool, thymol,

limonene, caryophyllene, and menthone. The essential oil of *S. macrostema* (1 mg/mL) showed a free radical scavenging activity close to that from the synthetic BHT or ascorbic acid. The thymol presented greatest antioxidant activity at 0.1 mg/mL and limonene showed a TAC at 0.01 mg/mL, while caryophyllene, linalool, pulegone, and menthone showed a lower antioxidant activity.

Financial support and sponsorship

Financial support grant from CONACYT (RTM, grant number RFT/249575) and CIC/UMSNH (Project 2.10 to RSG and 14.1 to AOZ).

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Hasani-Ranjbar S, Larjani B, Abdollahi M. A systematic review of the potential herbal sources of future drugs effective in oxidant-related diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2009;8:2-10.
2. Rahimi R, Ghiasi S, Azimi H, Fakhari S, Abdollahi M. A review of the herbal phosphodiesterase inhibitors: future perspective of new drugs. *Cytokine* 2010;49:123-9.
3. Gutteridge JM. Free radicals in disease processes: A compilation of cause and consequence. *Free Radic Res Commun* 1993;19:141-58.
4. Grassmann J. Terpenoids as plant antioxidants. *Vitam Horm* 2006;72:505-35.
5. Emami SA, Fakhrjafari M, Taleghani M, Hassanzadeh MK. Chemical composition and antioxidant activities of the essential oils of different parts of *Cupressus arizonica* Greene. *J Essent Oil Res* 2010;22:103-9.
6. Miguel MG. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. *Flavour Fragr J* 2010;25:291-312.
7. Edris AE. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytother Res* 2007;21:308-23.
8. Tomaino A, Cimino F, Zimbattoli V, Veruti V, Sulbro V, De Pasquale A, et al. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. *Food Chem* 2005;89:549-54.
9. Kulsic T, Radonic A, Katalinic V, Milos M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chem* 2004;85:633-40.
10. Sokmen A, Gulbae M, Akpulat HA, Doleira D, Töpe B, Polissiou M, et al. The *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Control* 2004;15:627-34.
11. Mirmica-Dukic N, Bozin B, Sokovic M, Simin N. Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. *J Agric Food Chem* 2004;52:2485-9.
12. Mirmica-Dukic N, Bozin B, Sokovic M, Mihajlovic B, Motavuj M. Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. *Planta Med* 2003;69:413-9.
13. Kim HJ, Chen F, Wu C, Wang X, Chung HY, Jin Z, et al. Evaluation of antioxidant activity of Australian tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil and its components. *J Agric Food Chem* 2004;52:2849-54.
14. Kautinovic B, Vlaisnjivic S, Popovic M, Vestag D, Djurendic-Brenesel M. Antioxidant properties of *Marrubium pulegioides* L. (Lamiaceae) essential oil. *Molecules* 2010;15:5843-55.
15. Bishri VK, Rana CS, Nagi JS, Bhandari AK, Purohit V, Kuniyal CP, et al. Lamiaceous ethno-medico-botanicals in Uttarakhand Himalaya, India. *J Med Plant Res* 2012;5:4281-91.
16. Mombaz S, Abdollahi M. An update on pharmacology of *Satureja* species, from antioxidant, antimicrobial, antidiabetic and anti-hyperlipidemic to reproductive stimulation. *Int J Pharmacol* 2010;6:346-53.
17. Seftidkon F, Salehyar S, Mirza M, Dabiri M. The essential oil of *Tagetes erecta* L. occurring in Iran. *Flavour Fragr J* 2004;19:579-81.
18. Gülbae M, Sokmen M, Doleira D, Agar G, Ozkan H, Kartal N, et al. *In vitro* antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L. *J Agric Food Chem* 2003;51:3958-65.
19. Eminoglu O, Töpe B, Yumrutas O, Akpulat HA, Doleira D, Polissiou M, et al. The *in vitro* antioxidative properties of the essential oils and methanol extracts of *Satureja spicigera* (K. Koch) Boiss. and *Satureja cuneifolia* Ten. *Food Chem* 2007;100:339-43.
20. Ozkan G, Simsek B, Kaleasan H. Antioxidant activities of *Satureja ciliata* essential oil in butter and *in vitro*. *J Food Eng* 2007;79:1391-6.

21. Zargari A. *Medicinal Plants*. 6th ed., Vol. 2. Teheran: Teheran University Publication; 1996. p. 325-8.
22. Dominguez-Vizquez G, Castro-Ramirez A. Usos medicinales de la familia Labiatae en Chiapas, México (Medicinal uses of Labiatae family in Chiapas, Mexico). *Etnobiología* 2002;2:19-31.
23. Torres-Martínez R, Ballo-González MA, Molina-Torres J, Ramírez-Chávez E, García-Rodríguez Y, Fulgencio-Niegrete R, et al. Effect of fertilization on growth and the content of volatile compounds of *Satureja macrostema* (Benth.) Briq. *Rev Mex Cienc Forestales* 2014;5:122-34.
24. Vuata-Martos M, Pérez-Arce JA, Fernández-López J. Functional antioxidant foods. In: Bartosz G, editor. *Food Oxidants and Antioxidants: Chemical, Biological and Functional Properties*. Ch. 17. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group; 2014. p. 494-5.
25. Camero-Abud Y, Torres-Martínez R, Farfán-Soto B, Hernández-García A, Ríos-Chávez P, Ballo-González MA, et al. Atriscular mycorrhizal symbiosis increases the content of volatile terpenes and plant performance in *Satureja macrostema* (Benth.) Briq. *BLACPMA* 2015;14:273-9.
26. Adams RP. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*. 4th ed. Illinois, USA: Allured Publishing Corporation, Carol Stream; 2007.
27. Karamali M, Kosińska A, Pegg RB. Comparison of radical-scavenging activities for selected phenolic acids. *Polish J Food Nutr Sci* 2005;14:165-9.
28. Rufino MS, Alves RE, de Brito ES, Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F, Mancini-Filho J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chem* 2010;121:996-1002.
29. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of Vitamin E. *Anal Biochem* 1999;269:337-41.
30. Aghel N, Yamini Y, Hadjikhondji A, Pourmortazavi SM. Supercritical carbon dioxide extraction of *Mentha pulegium* L. essential oil. *Talanta* 2004;62:407-11.
31. Zapata JI, Fernández GA. *Mentha piperita* micropropagation and volatile constituents evaluation. *Rev Colombiana Biotechnol* 1999;2:16-22.
32. Muschietti L, Van Baren C, Coussio J, Vila R, Cios M, Carluque S, et al. Chemical composition of the leaf oil of *Satureja odorata* and *Satureja parviflora*. *J Essent Oil Res* 1996;8:681-4.
33. Sokovic M, Marin PD, Brite D, Grieneren van LJ. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of ten aromatic plants against human pathogenic bacteria. *Food* 2007;1:220-6.
34. Sharopov FS, Subaimonova VA, Setzar WN. Essential oil composition of *Mentha longifolia* from wild populations growing in Tajikistan. *J Med Active Plant* 2012;1:76-84.
35. Schmidt-Labutin AN. Ethnobotany, biochemistry and pharmacology of minthospadiys (Lamiaceae). *J Ethnopharmacol* 2008;118:343-53.
36. Park IK, Kim LS, Choi IH, Lee YS, Shin SC. Fumigant activity of plant essential oils and components from *Schözonepeta tenaxifolia* against *Lyconella ingens* (Diptera: Scleridae). *J Econ Entomol* 2006;99:1717-21.
37. Li HQ, Liu QZ, Liu ZL, Du SS, Dong ZW. Chemical composition and nematocidal activity of essential oil of *Agastache rugosa* against *Malotrogyna incognita*. *Molecules* 2013;18:4170-80.
38. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem Toxicol* 2008;46:446-75.
39. Avila-Sosa R, Navarro-Cruz AR, Vera-López O, Dávila-Márquez OR, Melgoza-Palma N, Meza-Pluma R. Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.): A review of non-culinary uses (Romero -*Rosmarinus officinalis* L.: Una revisión de usos culinarios). *Ciencia* 2011;XX: 23-36.
40. Hussain AI, Anwar F, Iqbal T, Bhatti IA. Antioxidant attributes of four Lamiaceae essential oils. *Pak J Bot* 2011;43:1315-21.
41. Baikohli MN, Prakash HS. Antioxidant and anti-inflammatory potential of selected medicinal plants of Lamiaceae family. *Int J Pharm Pharm Sci* 2013;5:100-4.
42. Neffati A, Bouhail I, Sghaier MB, Boubakar J, Limem I, Kilani S, et al. Antigenotoxic and antioxidant activities of *Pituranthus chiovantus* essential oils. *Environ Toxicol Pharmacol* 2009;27:187-94.
43. Asensio CM, Nepote V, Grosso NR. Chemical stability of extra-virgin olive oil added with oregano essential oil. *J Food Sci* 2011;76:5445-50.
44. Aeschbacher R, Löliger J, Scott BC, Murcia A, Butler J, Halliwell B, et al. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food Chem Toxicol* 1994;32:31-6.
45. Baratta MT, Dorman HJ, Deans SG, Biondi DM, Ruberto G. Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. *J Essent Oil Res* 1998;10:618-27.

46. Miguel G, Simões M, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Carvalho L. Composition and antioxidant activities of the essential oils of *Thymus caespitosus*, *Thymus camptorolus* and *Thymus mastichina*. *Food Chem* 2004;95:183-8.
47. Li GX, Liu ZQ. Unusual antioxidant behavior of alpha- and gamma-terpinene in protecting methyl linoleate, DNA, and erythrocyte. *J Agric Food Chem* 2000;57:3943-8.
48. Sarikorkcu C, Eryigit F, Cangiz M, Tepe B, Cakir A, Mete E. Screening of the antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Mentha pulegium* L. *Spectroscopy Lett* 2012;45:352-8.
49. Kasrali A, Alzou Jamal C, Bekkouche K, Wohlmut H, Leach D, Abbad A, *et al.* Comparative evaluation of antioxidant and insecticidal properties of essential oils from five Moroccan aromatic herbs. *J Food Sci Technol* 2015;52:2312-9.
50. Haghshemi V, Zolfaghari B, Yousefi A. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Satureja hortensis* seed essential oil, hydroalcoholic and polyphenolic extracts in animal models. *Med Princ Pract* 2012;21:178-82.

8.2. CAPÍTULO II

Efecto protector del aceite esencial y terpenos mayoritarios de *Satureja macrostema* contra el estrés oxidativo en células endoteliales y su participación como reguladores de la respuesta inflamatoria.

Protective effect of essential oil and major terpenes of *Satureja macrostema* against oxidative stress in endothelial cells and their participation as regulators of the inflammatory response.

8.2.1. Resumen

Este estudio tuvo como objetivo evaluar las actividades citoprotectoras, antioxidantes y antiinflamatorias del aceite esencial de partes aéreas de *Satureja macrostema* y sus terpenos mayoritarios en células endoteliales de vena umbilical bovina (BUVEC) bajo estrés oxidativo inducido por H₂O₂, y un estado inflamatorio inducido por LPS. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de reducción del MTT (Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio) y exclusión por azul tripano. Las células BUVEC se incubaron con el aceite esencial y terpenos (limoneno, linalol, mentona, pulegona, timol y cariofileno) de *S. macrostema* (1, 10, 100 y 1000 µg/mL). La producción de ERO y ERN; así como la actividad de la catalasa, se midieron en las células BUVEC incubadas con H₂O₂ (2%, 24 h) después del pretratamiento con el aceite esencial y terpenos de *S. macrostema* (1, 10 y 100 µg/mL). La cuantificación de la expresión de los genes de las citocinas TNF-α y IL-10, se realizó con el pretratamiento de las BUVEC con el aceite esencial de *S. macrostema* y los terpenos pulegona y timol para su posterior incubación con LPS (100 ng/mL). El pretratamiento de las BUVEC con el aceite esencial de *S. macrostema* y los terpenos limoneno, linalol, mentona, pulegona, timol y cariofileno no mostraron citotoxicidad a concentraciones de 1, 10 y 100 µg/mL. La producción de ERO citoplasmáticas y mitocondriales, así como el NO, anión superóxido y radical hidroxilo en las BUVEC tratadas con H₂O₂ disminuyó con el aceite esencial y los terpenos mayoritarios a concentraciones de 1, 10 y 100 µg/mL. La actividad de la enzima catalasa se incrementó con el aceite esencial y los terpenos timol y pulegona. La expresión de TNF-α disminuyó con el pretratamiento del aceite esencial de *S. macrostema*, timol y pulegona (1, 10 y 100 µg/mL). La expresión de la citocina antiinflamatoria IL-10 se vio incrementada con el aceite esencial y timol a las concentraciones analizadas. Los resultados revelaron efectos citoprotectores, antioxidantes y antiinflamatorios del aceite esencial de *S. macrostema* y sus terpenos mayoritarios contra el estrés oxidativo e inflamación inducidos por H₂O₂ y LPS, respectivamente, en las células BUVEC.

Palabras clave: Células de endotelio bovino, citocinas, compuestos terpénicos, inflamación, radicales libres.

8.2.2. Abstract

The objective of this study was to evaluate the cytoprotective, antioxidant and anti-inflammatory activities of the essential oil of aerial parts of *S. macrostema* and their major terpenes in bovine umbilical vein endothelial cells (BUVEC) under oxidative stress induced by H₂O₂ and an inflammatory state induced by LPS. Cell viability was evaluated by the MTT reduction assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) and trypan blue exclusion. BUVEC cells were incubated with the essential oil and terpenes (limonene, linalool, menthone, pulegone, thymol and caryophyllene) of *S. macrostema* (1, 10 100 and 1000 µg/mL). The production of reactive oxygen and nitrogen species; as well as the activity of catalase, were measured in BUVEC cells incubated with H₂O₂ (2%, 24 h) after pretreatment with the essential oil and terpenes of *S. macrostema* (1, 10 and 100 µg/mL). Quantification of the expression of cytokine genes TNF-α and IL-10, was carried out with pretreatment of BUVEC with essential oil of *S. macrostema* and the terpenes pulegone and thymol for its subsequent incubation with LPS (100 ng/mL). Pretreatment of BUVEC with essential oil of *S. macrostema* and the terpenes limonene, linalool, menthone, pulegone, thymol and caryophyllene showed no cytotoxicity at concentrations of 1, 10 and 100 µg/mL. Production of cytoplasmic and mitochondrial ROS, NO, superoxide anion and hydroxyl radical in BUVEC treated with H₂O₂ decreased with the essential oil and the six major terpenes at concentrations of 1, 10 and 100 µg/mL. The activity of the catalase enzyme was increased with essential oil and terpenes thymol and pulegone. On the other hand, expression of TNF-α decreased with pretreatment of essential oil of *S. macrostema*, thymol and pulegone (1,10 and 100 µg/mL). Expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10 was increased with essential oil and thymol at the concentrations analyzed. The results revealed cytoprotective, antioxidant and anti-inflammatory effects of the essential oil of *S. macrostema* and their major terpenes against oxidative stress and inflammation induced by H₂O₂ and LPS, respectively, in BUVEC cells.

Key words: bovine endothelium cells, cytokines, free radicals, inflammation, medicinal plant, terpenic compounds.

8.2.3. Introducción

La inflamación es la respuesta del sistema inmune para evitar estímulos perjudiciales como patógenos o tejidos dañados. Tanto la inflamación aguda como la crónica juegan un papel esencial en la restauración de la homeostasis (Serhan *et al.*, 2007; Ricciotti y FitzGerald, 2011). En los procesos inflamatorios, las células endoteliales secretan NO en exceso, PGE₂ y citocinas proinflamatorias, como TNF-α y otras interleucinas (IL). Los mediadores proinflamatorios, particularmente la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) para la producción de NO y la ciclooxigenasa (COX-2) para la producción de prostaglandinas, han demostrado la promoción y/o progresión de diversas enfermedades inflamatorias humanas (Zamora *et al.*, 2000; Wright *et al.*, 2010).

El estrés oxidativo es causado principalmente por la reducción de la capacidad de los sistemas antioxidante celulares y la producción de grandes cantidades de ERO y ERN. El anión superóxido, el radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno son las principales ERO; el óxido nítrico y peroxinitrito son las ERN más relevantes (Schulz *et al.*, 2004; Touyz y Briones, 2011). Dichas especies son moléculas altamente reactivas y tóxicas generadas en las células bajo actividades metabólicas normales. Sin embargo, en respuesta a una variedad de factores de estrés, su producción aumenta. Estas especies reactivas pueden causar daño oxidativo a proteínas, lípidos, enzimas y ADN, y también se han relacionado con la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares (Valko *et al.*, 2007; Ray *et al.*, 2012). También el estrés oxidativo puede alterar algunas funciones celulares del tejido endotelial, fomentando el envejecimiento celular como factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Kim y Byzova, 2014; Vara y Pula, 2014; Sies, 2015). El envejecimiento vascular se ha asociado con la reducción de la biodisponibilidad del óxido nítrico, la disfunción de las células endoteliales, la inflamación y la senescencia del endotelio vascular (Dantas *et al.*, 2012; Tian y Li, 2014). Las células endoteliales son reguladores importantes del estado redox esencial para el mantenimiento homeostático (Czypiorski *et al.*, 2013; Konradi *et al.*, 2015).

Las células endoteliales poseen un excelente mecanismo de eliminación para evitar el exceso de lesión celular inducida por radicales libres, estos mecanismos protectores de defensa antioxidante enzimática y no enzimática reducen el estrés oxidativo al atrapar las especies reactivas (Schnabel *et al.*, 2006). Estos incluyen enzimas antioxidantes, como superóxido dismutasa (SOD), que cataliza la dismutación de aniones superóxido a peróxido de hidrógeno; catalasa (CAT), que convierte el H₂O₂ en oxígeno molecular y agua; glutatión peroxidasa (GPx), que cataliza la degradación de H₂O₂ e hidroperóxidos. En el nivel no enzimático, ciertas vitaminas y otros compuestos antioxidantes eliminan los radicales libres y retrasan la oxidación de las moléculas (Schnabel *et al.*, 2006; Bak *et al.*, 2012).

Las sustancias antioxidantes mejoran la función endotelial protegiendo a las células endoteliales de la toxicidad oxidativa, al evitar la formación o neutralizando los radicales libres, mediante la inhibición de las reacciones de oxidación, previniendo así, la peroxidación lipídica y aumentando las respuestas vasodilatadoras dependientes del endotelio (Praticò, 2005; Houston, 2013). Estudios recientes han indicado que un alto consumo de antioxidantes a base de plantas se asocia con un menor riesgo de enfermedades cardiovasculares. Además, estos antioxidantes han demostrado tener efectos anti-apoptóticos sobre las células endoteliales vasculares después de la exposición a agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno (Kris-Etherton y Keen, 2012; Safaeian *et al.*, 2015).

Debido a las necesidades del mercado farmacéutico, los agentes antiinflamatorios y antioxidantes que se originan de los productos naturales utilizados en la medicina tradicional son un importante foco de interés para esta industria (Akkol 2012; Russo *et al.*, 2015). En este contexto, las plantas aromáticas y medicinales, particularmente sus aceites esenciales, están siendo evaluadas para determinar su actividad

antioxidante y antiinflamatoria, con el propósito de comprobar su uso en la medicina tradicional y proponer nuevos medicamentos (Wei y Shibamoto, 2007). Además, la pertinencia de evaluar la actividad antioxidante y antiinflamatoria, entre otras propiedades de los aceites esenciales, recae principalmente a que pueden ser utilizados como aditivos naturales en la industria de alimentos y bebidas (Tongnuanchan y Benjakul, 2014; Rezaie *et al.*, 2015; Božovic y Ragno, 2017).

Diversos aceites esenciales, como los de las plantas de la familia Lamiaceae (*Mentha* spp, *Satureja* spp, *Thymus vulgaris*, *Melissa officinalis* y *Rosmarinus officinalis*), se utilizan ampliamente para diversos fines en todo el mundo (Tomaino *et al.*, 2005), ya que son ricos en compuestos terpénicos y fenólicos con alta capacidad antioxidante (Hashemi *et al.*, 2011; Serrano *et al.*, 2011; Giweli *et al.*, 2012; Bagheri *et al.*, 2013; Ćavar *et al.*, 2013; Carhuapoma *et al.*, 2014; Moghadam, 2015; Benabdallah *et al.*, 2016). Recientemente, en investigaciones realizadas por nuestro grupo de trabajo se demostró que el aceite esencial de *Satureja macrostema* 'Moc. & Sessé ex Benth.' Briq., obtenido por hidrodestilación, presenta una alta actividad antioxidante *in vitro*, siendo el timol el compuesto terpénico responsable de una actividad superior al 80% a 0.1 mg/mL (Torres-Martínez *et al.*, 2018).

S. macrostema es una planta aromática utilizada en la medicina tradicional mexicana, comúnmente conocida como nurite, la cual se consume en preparaciones alimenticias e infusiones, como un efectivo aperitivo y para el tratamiento de diversas enfermedades de tipo intestinales, cutáneas y hepáticas (Domínguez-Vázquez y Castro-Ramírez, 2002).

En la presente investigación se evaluó el efecto protector del aceite esencial de *S. macrostema* obtenido por hidrodestilación, a partir de partes aéreas frescas, así como de los terpenos mayoritarios (pulegona, linalool, timol, limoneno, cariofileno y mentona) en células endoteliales de vena umbilical bovina (BUVEC). Primeramente, se determinó la citotoxicidad en éstas y posteriormente la actividad bajo un modelo de estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno, estimando la producción de ERO y ERN, así como de la enzima antioxidante catalasa. De igual manera, se analizó su actividad antiinflamatoria en BUVEC expuestas a lipopolisacárido, analizando la expresión de citocinas pro- y antiinflamatorias TNF- α e IL-10, respectivamente.

8.2.4. Materiales y Métodos

Obtención del aceite esencial de *Satureja macrostema*

Las hojas y tallos frescos de plantas de *Satureja macrostema* cultivadas en invernadero durante 3 meses (200 g), fueron sometidas a una extracción por hidrodestilación durante 2-4 h (100°C) en un aparato tipo Clevenger para la obtención del aceite esencial, el cual se preparó a concentraciones de 1, 10, 100 y 1000 $\mu\text{g/mL}$ para su análisis. Los terpenos mayoritarios identificados por CG-EM (pulegona, linalool, timol, limoneno, cariofileno y mentona) (Capítulo I, Torres-

Martínez *et al.*, 2018) fueron adquiridos comercialmente (Sigma-Aldrich, México) y utilizados a las mismas concentraciones que el aceite esencial de *S. macrostema*.

Actividad citotóxica en BUVEC

La citotoxicidad se determinó mediante los métodos MTT [Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio, Sigma-Aldrich) y exclusión por azul tripano (Mosmann, 1983), utilizando etanol 2% (vehículo) y actinomicina 0.1% como control positivo de muerte celular. Para este análisis se utilizaron células endoteliales de vena umbilical bovina (BUVEC), crecidas en placas de 96 pozos con medio mínimo esencial DMEM (Sigma-Aldrich, México) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB, Gibco®) e incubadas a 37°C/5% CO₂ por 24 h. Cuando las células alcanzaron el 80% de confluencia, se cambió el medio por DMEM incompleto (sin SFB) durante 12 h. Posteriormente las células se trataron con el aceite esencial de *S. macrostema* y con cada uno de los terpenos que lo constituyen (1, 10, 100 y 1000 µg/mL), disueltos en etanol a una concentración máxima de 2%. Entonces, 10 µL de solución de Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio, 5 mg/mL en Buffer de fosfatos (PBS) fue adicionado a cada pozo e incubados durante 4 h a 37°C. Finalmente, 100 µL de SDS 10% (Dodecilsulfato sódico, Sigma-Aldrich, México) fueron adicionados para disolver los cristales de formazan. La densidad óptica fue medida con lector de microplacas (BIO-RAD) a 595 nm. La viabilidad de las BUVEC también fue determinada usando el ensayo de exclusión por azul tripano, donde las células fueron contadas en un contador celular automatizado (BIO-RAD, TC20).

Producción citoplasmática y mitocondrial de ERO en BUVEC

Para los experimentos de evaluación de producción de ERO, las BUVEC se cultivaron hasta confluencia de 80% en placas de 24 pozos (Corning-Costar). Las células fueron sincronizadas con medio DMEM libre de SFB durante 12 h. Posteriormente, se trataron durante 24 h con el aceite esencial y terpenos de *S. macrostema*, a concentraciones de 1, 10 y 100 µg/mL, utilizando etanol 2% como vehículo. Posteriormente, el estrés oxidativo fue generado agregando peróxido de hidrógeno al 2% a cada condición durante 24 h. Como tratamientos controles, las BUVEC se trataron con vehículo (etanol al 2%), peróxido de hidrógeno al 2% con etanol 2% y 10 µg/mL de BHT (Hidroxitolueno butilado, Sigma-Aldrich, México).

Para detectar las ERO, se utilizaron dos métodos (Tarpey y Fridovich, 2001): Las BUVEC de cada condición se despegaron con tripsina (5 mg/mL) y fueron transferidas a tubos para su centrifugación (5000 rpm/10 min) para un posterior lavado con buffer de fosfatos (PBS) libre de antibióticos; las células fueron incubadas (37°C, 5% CO₂) durante 30 minutos con dihidroetidio (DHE 5 µM, Molecular Probes®, excitación a 500-530 nm y emisión a 590-620 nm) para la determinación de ERO citoplasmáticas. Las ERO mitocondriales se detectaron usando dihidrorodamina-123 (DHR 5 µM, Molecular Probes®, excitación a 500 y emisión a 536 nm) durante el mismo tiempo de incubación; la fluorescencia se detectó para ambos métodos mediante citometría de flujo, utilizando un citómetro de flujo BD

Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences) y el software BD Accuri C6 Analysis Software.

Producción del anión superóxido, radical hidroxilo y óxido nítrico en BUVEC

La determinación de la producción de los radicales superóxido e hidroxilo se realizó cultivando las células BUVEC en placas de 24 pozos (confluencia de 80%). Las células fueron sincronizadas con medio DMEM libre de SFB durante 12 h y tratadas durante 24 h con el aceite esencial de *S. macrostema* y con cada uno de los terpenos que lo constituyen (1, 10 y 100 µg/mL), utilizando etanol al 2% como vehículo. La producción de los radicales libres fue generada con peróxido de hidrógeno al 2% durante 24 h.

Los controles de los ensayos fueron, etanol 2%, la mezcla peróxido de hidrógeno 2% con etanol 2% y el antioxidante comercial BHT (10 µg/mL). Transcurrido el tiempo de los tratamientos, las células BUVEC de cada condición se despegaron con tripsina (5 mg/mL) y fueron recuperadas por centrifugación a 5000 rpm/10 min. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS libre de antibióticos.

Para detectar la producción del anión superóxido y NO se utilizaron dos sondas fluorescentes (da Cunha *et al.*, 2014), incubando las células (37°C, 5% CO₂) durante 20 min con dihidroetidio (DHE 2.5 µM, Molecular Probes®, excitación a 500-530 nm y emisión a 590-620 nm) para determinar el anión superóxido. El óxido nítrico se detectó usando diacetato de 4,5-diaminofluoresceína durante el mismo tiempo de incubación (DAF-2DA 10 µM, Sigma-Aldrich, México) visualizando la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 488 nm y emisión a 515 a 540 nm. La determinación del radical hidroxilo se realizó usando diacetato de 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína (H2-DCFDA 2 µM, Molecular Probes®, Excitación a 492-495 nm y emixión a 517-527 nm), con un tiempo de incubación de 45 min (Eruslanov y Kusmartsev, 2010). La fluorescencia se analizó mediante citometría de flujo, utilizando un citómetro de flujo BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences) y el software BD Accuri C6 Analysis Software.

Actividad de catalasa (CAT) en BUVEC

Las células BUVEC fueron cultivadas en placas de 6 pozos con medio mínimo esencial DMEM, suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB, Gibco®) e incubadas a 37°C y una atmosfera de 5% CO₂ hasta una confluencia del 80%. Después las células fueron sincronizadas con medio DMEM incompleto (libre de SFB) durante 12 h, para después tratarlas durante 24 h con el aceite esencial de *S. macrostema* y los terpenos que lo constituyen (1, 10 y 100 µg/mL), así como con los controles (vehículo, etanol al 2%; peróxido de hidrógeno 2% con etanol 2%; y 10 µg/mL de BHT, Hidroxitolueno butilado). Posteriormente, el estrés oxidativo fue inducido con peróxido de hidrógeno al 2% durante 24 h.

La actividad de CAT fue determinada por el método modificado descrito por Bak *et al.* (2014). Las BUVEC de cada condición se despegaron con tripsina (5 mg/mL) y

fueron homogeneizadas en vortex durante 15 segundos con 1 mL de PBS libre de antibióticos (PBS 50 mM, pH 7.0) para su lisis y posteriormente centrifugadas a 12000 rpm durante 20 min a 4°C. El sobrenadante de la lisis celular fue utilizado para determinar la concentración de la enzima CAT usando el método de Bradford, donde la proteína BSA (albúmina de suero bovino, Sigma-Aldrich, México) se usó como estándar. La actividad de CAT se midió al mezclar el equivalente a 5 µg/mL de lisado celular más 3 µL de H₂O₂ al 3% y completado a un volumen final de 250 µL con buffer de fosfatos (PBS 50 mM, pH 7.0). Las muestras se incubaron durante 5 minutos a 37°C y la absorbancia fue determinada a 240 nm. El cambio en la absorbancia es proporcional a la descomposición del H₂O₂ y por consiguiente a la actividad de la enzima CAT de cada muestra.

Respuesta inflamatoria en BUVEC mediante RT-qPCR

Para determinar el efecto del aceite esencial de *S. macrostema* y los terpenos mayoritarios de éste, sobre la expresión de genes de la respuesta inflamatoria (citocinas pro- y antiinflamatorias), se extrajo ARN de las BUVEC para obtener el ADN complementario (ADNc) y realizar el análisis mediante PCR en tiempo real (qPCR), con el método descrito por Alva-Murillo *et al.* (2012).

Las BUVEC fueron cultivadas en placas de 6 pozos con medio DMEM, suplementado con 10% de SFB, hasta conseguir una confluencia del 80%, éstas fueron sincronizadas durante 12 h y tratadas durante 24 h con el aceite esencial de *S. macrostema*, los terpenos pulegona y timol (1, 10 y 100 µg/mL) y el vehículo etanol 2%. Concluido el tiempo de tratamiento, el estado inflamatorio fue inducido al adicionar 100 ng/mL de lipopolisacárido (LPS) a las BUVEC de cada condición, incubando por un periodo de 24 h. La extracción de ARN total se realizó con Trizol de acuerdo con las indicaciones del proveedor (TRIZOL Reagent, Invitrogen), el cual se utilizó para sintetizar el ADNc mediante el kit First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific). La retrotranscripción se realizó en 20 µL conteniendo 1 µL de Oligo d(T) a 500 µg/mL y 1 µL de dNTPs (10 mM, Invitrogen). La reacción se incubó a 65°C por 5 min e inmediatamente fue transferida a hielo. Se añadió 4 µL de First Strand Buffer 5X (Invitrogen), 2 µL de diotretitol (0.1 M) y 0.5 µL de inhibidor de RNAsa (40 U/µL, Invitrogen) para su incubación a 37°C durante 2 min. Finalmente, la enzima transcriptasa reversa M-MLV (10 U/µL, Invitrogen) fue agregada y se realizó una incubación a 37°C por 50 min, seguido de 15 min a 70°C. Este ADNc se utilizó para establecer los niveles de expresión de los genes de TNF-α e IL-10 mediante reacciones de RT-qPCR.

Los oligonucleótidos específicos utilizados para las BUVEC se muestran en la Tabla 4. Además, se amplificó el gen endógeno GAPDH bovino (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) para verificar la integridad del ARN y la eficiencia de la RT-PCR. La cuantificación relativa de la expresión de genes se realizó con el método Ct comparativo (ΔΔCt) en el sistema StepOne Plus de Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) de acuerdo con las especificaciones del proveedor. La reacción se llevó a cabo con 5 µL de USB® VeriQuest™ Fast SYBR® qPCR Master Mix (Affymetrix® USB® Products), 0.9 µL de cada oligonucleótido (directo y reverso a 10

pmol/ μ L), 3 μ L de ADNc (83.3 ng/mL) y 0.2 μ L de agua grado biología molecular para un volumen final de 10 μ L por reacción.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar o error estándar de la media, con una n variable según cada ensayo. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por una prueba de Tukey (Software JMP 8). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a $P < 0.05$. Para el análisis de RT-qPCR, los valores mayores a 2 y menores a 0.5 fueron considerados como significativamente diferentes (Morey *et al.*, 2006). Los datos fueron normalizados respecto al control vehículo etanol 2%.

Tabla 4. Oligonucleótidos específicos utilizados para la determinar la respuesta inflamatoria en las células endoteliales mediante qPCR (Alva-Murillo *et al.*, 2012).

Oligonucleótido		Secuencia (5'-3')	Tamaño del fragmento (pb)	Temperatura de alineamiento (°C)
Interleucina 10 (IL-10)	F	GATGCGAGCACCTGTCTGA	129	59
	R	GCTGTGCAGTTGGTCCTTCATT-3		
Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)	F	CCCCTGGAGATAACCTCCCA	101	55.5
	R	CAGACGGGAGACAGGAGAGC		
Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH)	F	TCAACGGGAAGCTCACTGG	237	56.9
	R	CCCAGCATCGAAGGTAGA		

8.2.5. Resultados

Efecto citotóxico del aceite esencial y terpenos de *S. macrostema* sobre BUVEC

El aceite esencial de nurite (*S. macrostema*) y los terpenos pulegona, linalool y mentona, no mostraron una disminución sobre la viabilidad de BUVEC, encontrando que no ejercen un efecto inhibitorio sobre éstas a las concentraciones de 1-100

$\mu\text{g/mL}$ durante 24 h, ya que mantienen una absorbancia promedio de 1.2 que equivale a un número superior de 50,000 células vivas/mL.

Sin embargo, a la concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$ de los terpenos limoneno, timol y cariofileno, la viabilidad disminuyó considerablemente al compararlo con el control etanol 2% (Figura 5A y 5B), presentando valores de absorbancia menores de 1 (<50,000 células vivas/mL). En la figura 6 se muestran micrografías de BUVEC, en las que se presentan células sin daño tratadas con etanol 2% (Figura 6A), y células dañadas y en suspensión en el medio de cultivo cuando fueron tratadas con limoneno (Figura 6B), timol (Figura 6C) y cariofileno (Figura 6D). Estos resultados llevaron a seleccionar las concentraciones de 1, 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$ del aceite esencial y terpenos de *S. macrostema* para las siguientes evaluaciones.

Efecto del aceite esencial y terpenos de *S. macrostema* sobre la producción de ERO citoplasmáticas y mitocondriales

Después de los ensayos de citotoxicidad celular, se examinaron los efectos protectores que ejercen el aceite esencial y los terpenos mayoritarios de *S. macrostema*, en las células BUVEC tratadas con H_2O_2 sobre la producción de ERO citoplasmáticas y mitocondriales usando dos sondas fluorescentes; DHE y DHR, respectivamente.

Cuando las células se trataron con etanol al 2% en conjunto con H_2O_2 2%, se observó un aumento de 2.35 veces en la generación de ERO citoplasmáticas en comparación con las células tratadas solo con el vehículo (etanol 2%) (Figura 7A). El pretratamiento durante 24 h con el aceite esencial y los terpenos limoneno, linalol, mentona, pulegona, timol y cariofileno, disminuyó hasta 5.23 veces la producción de ERO citoplasmáticas mediada por H_2O_2 de una manera marcada en las tres concentraciones analizadas (1, 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 7A), destacando que el timol ejerció la mayor disminución de ERO citoplasmáticas (barras azules, Figura 7A).

Las ERO mitocondriales se incrementaron hasta 2.08 veces al tratar las BUVEC con etanol al 2% más H_2O_2 2%, al compararlas con las células tratadas con el vehículo (etanol 2%) (Figura 7B). La disminución en la producción de las ERO mitocondriales ejercida por el aceite esencial y los seis terpenos, puede observarse en la figura 7B, donde la pulegona y cariofileno mostraron la mayor disminución de dichas ERO a 100 $\mu\text{g/mL}$, hasta 6.93 y 8.20 veces, respectivamente (Figura 7B). El BHT (10 $\mu\text{g/mL}$) también disminuyó la formación de ERO citoplasmáticas y mitocondriales en presencia de H_2O_2 en las células BUVEC (Fig. 7A y B), sin llegar a los niveles ejercidos por el aceite esencial y terpenos de *S. macrostema*. Estos resultados sugieren que el aceite esencial y terpenos de *S. macrostema* actúan como antioxidantes al proteger y eliminar directamente la generación excesiva de ERO en las células BUVEC tratadas con H_2O_2 , tanto mitocondriales como citoplasmáticas.

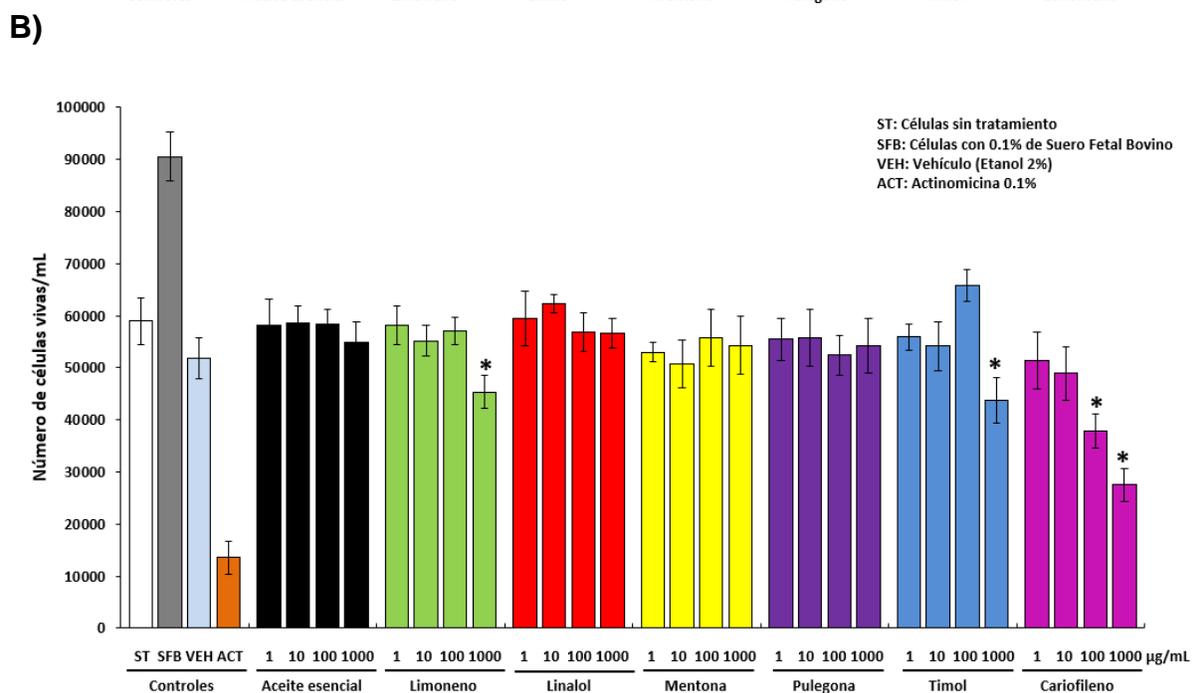
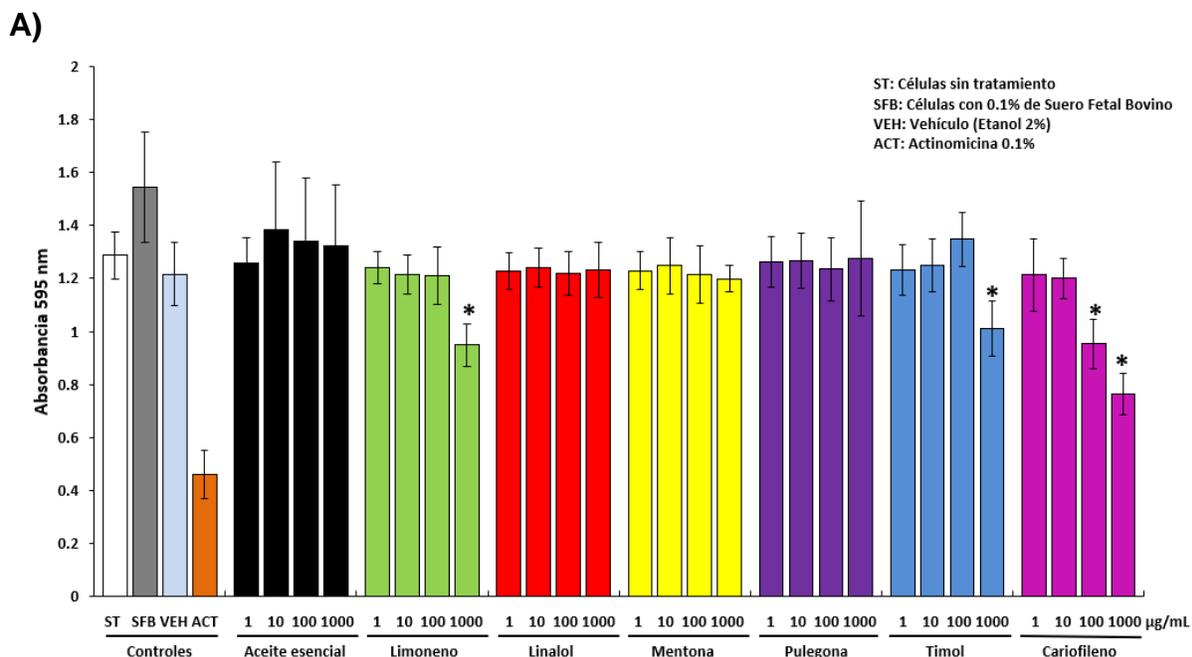


Figura 5. Efecto del aceite esencial y terpenos mayoritarios de *Satureja macrostema* sobre la viabilidad en células endoteliales bovinas BUVEC. La evaluación se realizó por los métodos: **A)** reducción del MTT; y **B)** exclusión por azul tripano. Asteriscos indican diferencia significativa en cada bloque de tratamiento en comparación con el vehículo (etanol 2%) \pm desviación estándar (n=12, Prueba *t*- Student $p \leq 0.05$).

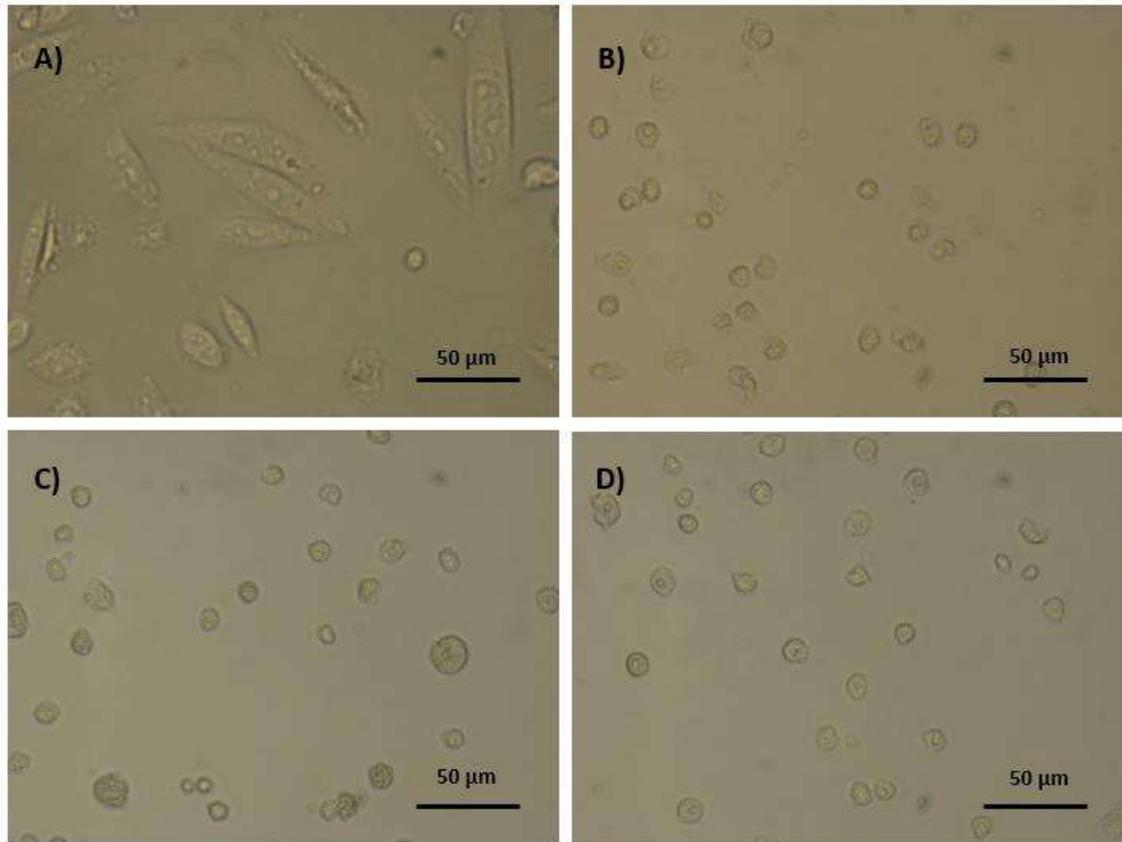


Figura 6. Imágenes representativas de la citotoxicidad ejercida por terpenos de *Satureja macrostema* sobre las células BUVEC; **A)** vehículo (etanol 2%); **B)** limoneno (1000 µg/mL); **C)** timol (1000 µg/mL); y **D)** cariofileno (1000 µg/mL). Micrografía (40X) de células endoteliales de vena umbilical bovina (BUVEC) tomada con un microscopio invertido.

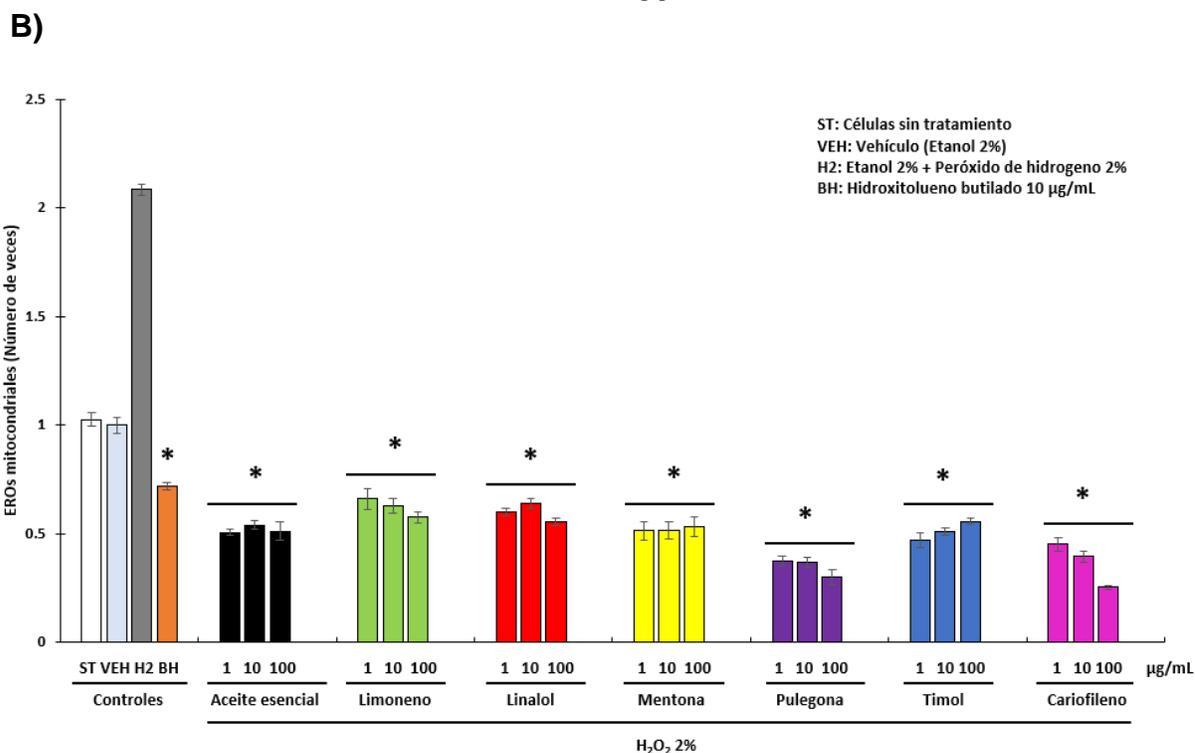
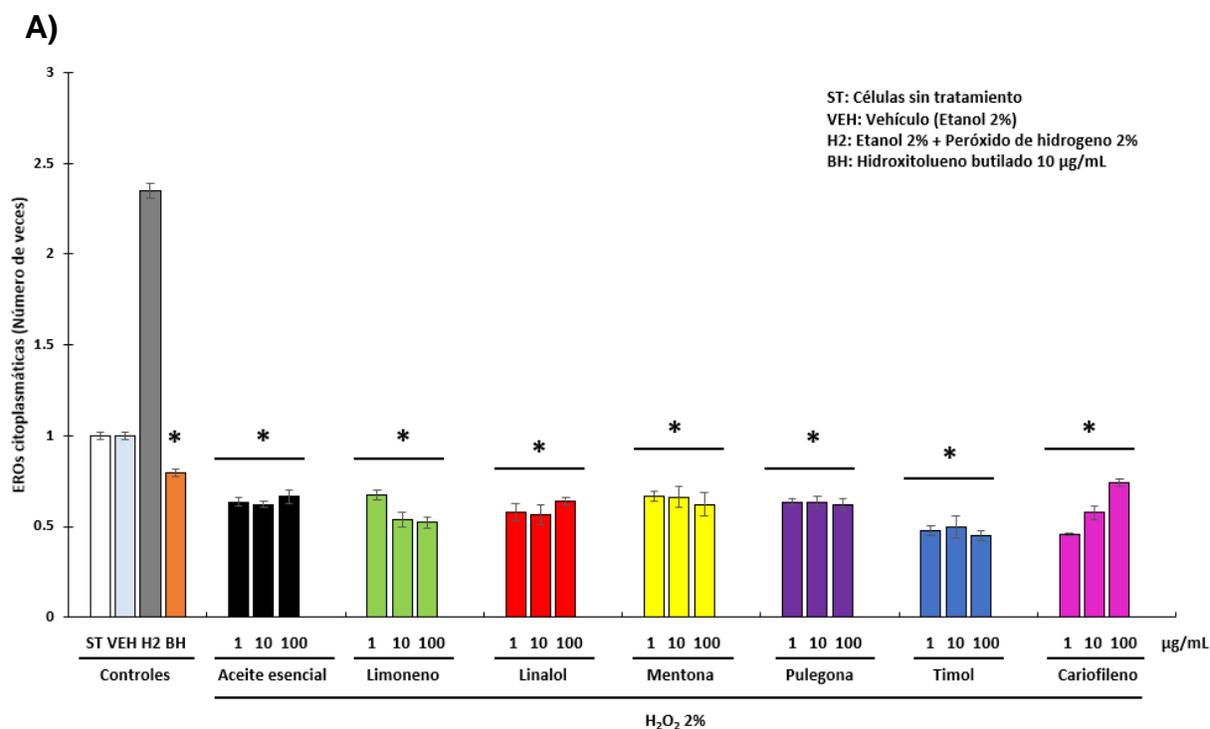


Figura 7. Efecto del aceite esencial y terpenos mayoritarios de *Satureja macrostema* sobre la producción de ERO citoplasmáticas (A) y mitocondriales (B) en células BUVEC. Asteriscos indican diferencias significativas en cada bloque de tratamiento en comparación con el control H2 (etanol 2% + Peróxido de hidrógeno 2%) ± desviación estándar (n=8, Prueba *t*- Student $p \leq 0.05$).

Efecto del aceite esencial y terpenos de *S. macrostema* sobre la producción de anión superóxido y radical hidroxilo

En la figura 8A se muestra la disminución en la producción del anión superóxido en presencia del aceite esencial y los terpenos de *S. macrostema* (hasta de 4.82 veces) en comparación con las BUVEC estimuladas con etanol 2% y H₂O₂ 2% (barra gris), inclusive el efecto en la disminución es mayor que el ejercido por el antioxidante sintético BHT-10 µg/mL (disminución de 2.86 veces, barra naranja). Puede observarse que el timol (1, 10 y 100 µg/mL) presentó el mayor efecto al mostrar la disminución más notoria de hasta 5 veces aproximadamente (barras azules). Así mismo, fue considerable la disminución de 4.75 veces del anión superóxido ejercida por 100 µg/mL de limoneno (barras verdes) y 1 µg/mL de cariofileno (barras color rosa) (Figura 8A).

Utilizando la sonda fluorescente H₂DCFDA para evaluar el nivel de producción del radical hidroxilo en respuesta a la inducción del estrés oxidativo con H₂O₂, las células BUVEC tratadas con etanol 2% y H₂O₂ 2% mostraron un aumento significativo en la producción del radical hidroxilo de hasta 2.08 veces (barra gris, Figura 8B) en comparación con el control VEH (etanol 2%, Figura 8B). Sin embargo, el pretratamiento de las células endoteliales con el aceite esencial y los terpenos de *S. macrostema* redujeron hasta aproximadamente 4.5 veces la producción del radical OH⁻ en comparación al control H₂ (Barra gris, Figura 8B). Además, la intensidad de fluorescencia de las células, indicativa del nivel de OH⁻ intracelular, con el tratamiento previo de timol (1, 10 y 100 µg/mL) fue menor que el control antioxidante BHT-10 µg/mL (disminución de 2.68 veces, barra naranja), mostrando la reducción más significativa en los niveles del radical hidroxilo entre todos los diferentes pretratamientos (Figura 8B).

Efecto del aceite esencial y terpenos de *S. macrostema* sobre la producción de óxido nítrico (NO)

La producción de NO en las BUVEC tratadas con el vehículo-etanol 2% (barra azul claro, Figura 9) fue considerado como el control de comparación (1 número de veces). El estímulo de H₂O₂ 2% más el vehículo aumentó la producción de NO hasta 1.88 veces (barra gris, Figura 9). Sin embargo, la producción de NO disminuyó en las células endoteliales pretratadas con el aceite esencial y terpenos mayoritarios de *S. macrostema*, encontrando la mayor disminución con 100 µg/mL del aceite esencial (disminución de 3.62 veces) y con 100 µg/mL de timol (disminución de 5.74 veces). Dichos valores fueron mayores a los ejercidos por el antioxidante BHT-10 µg/mL (disminución de 2.74 veces, barra naranja), como se observa en la Figura 9.

Efecto del aceite esencial y terpenos de *S. macrostema* sobre la actividad de catalasa (CAT)

Cuando las células se trataron con el aceite esencial de *S. macrostema*, la actividad de CAT aumentó 1.76 veces (barras negras) en comparación con el control etanol 2% más H₂O₂ 2% (barra gris, Figura 10).

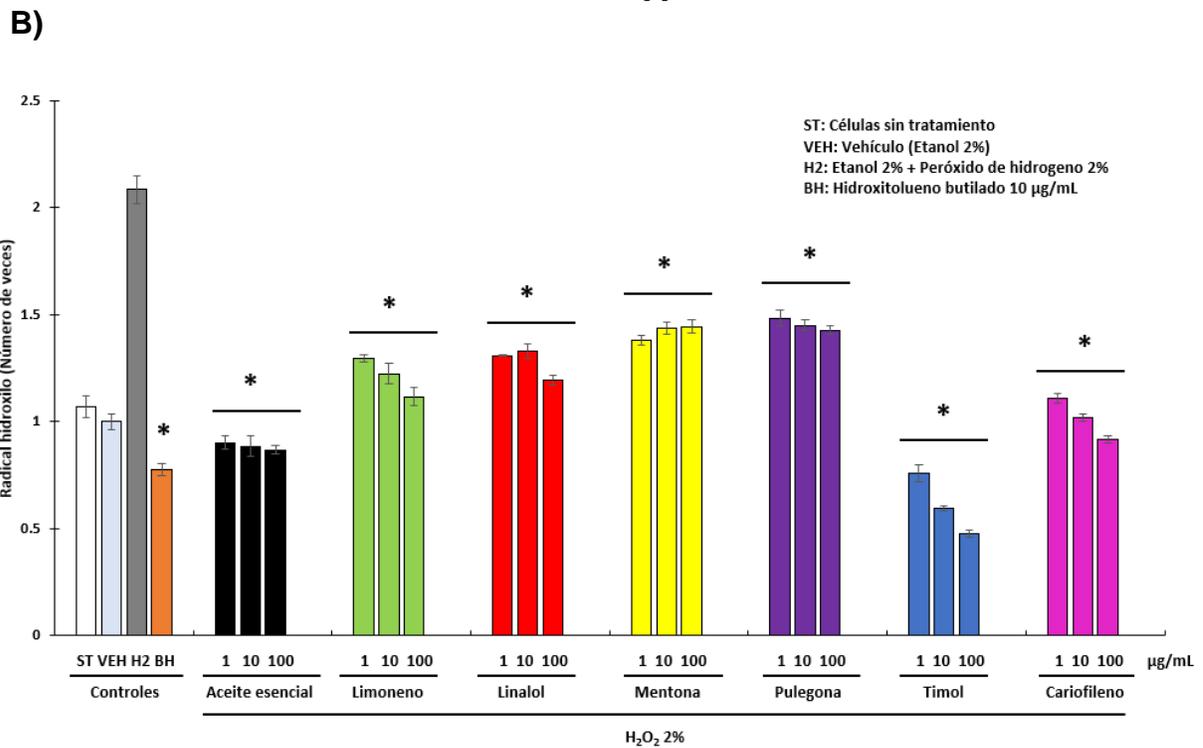
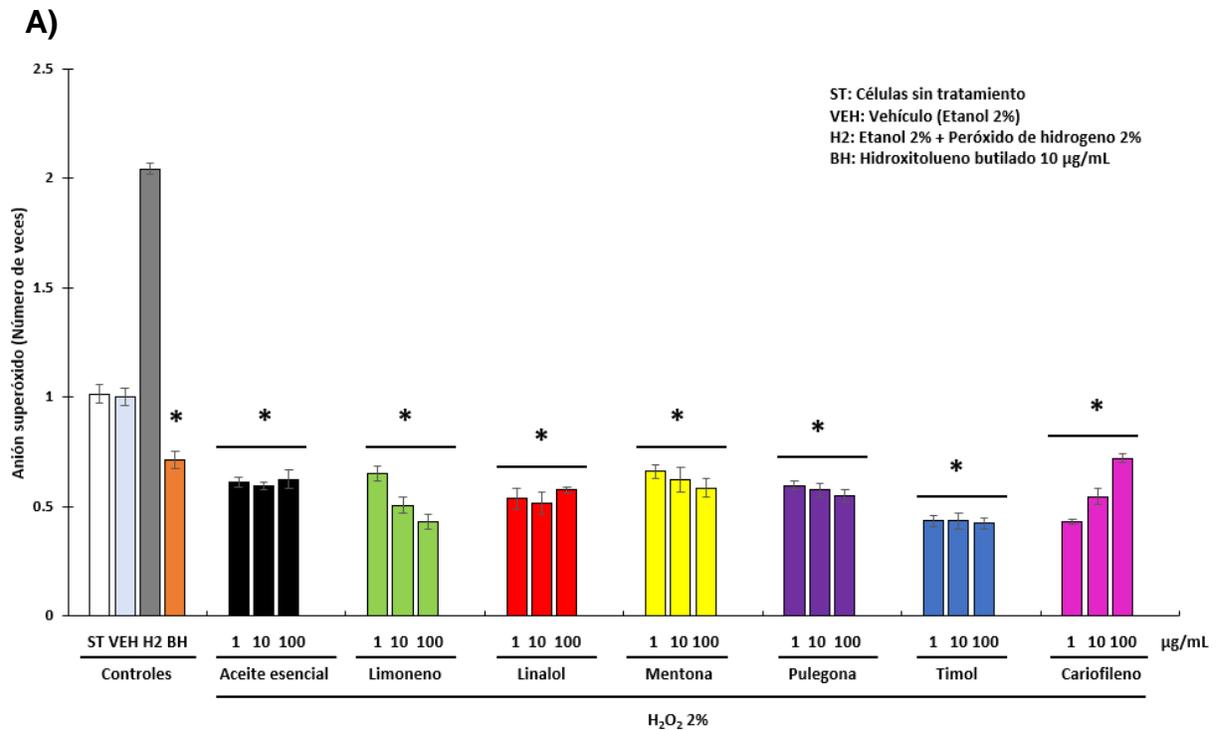


Figura 8. Efecto del aceite esencial y terpenos mayoritarios de *Satureja macrostema* sobre la producción de ERO en BUVEC; Anión superóxido **(A)** y radical hidroxilo **(B)**. Asteriscos indican diferencias significativas en cada bloque de tratamiento en comparación con el control H2 (etanol 2% + peróxido de hidrógeno 2%) \pm desviación estándar (n=8, Prueba *t*- Student $p \leq 0.05$).

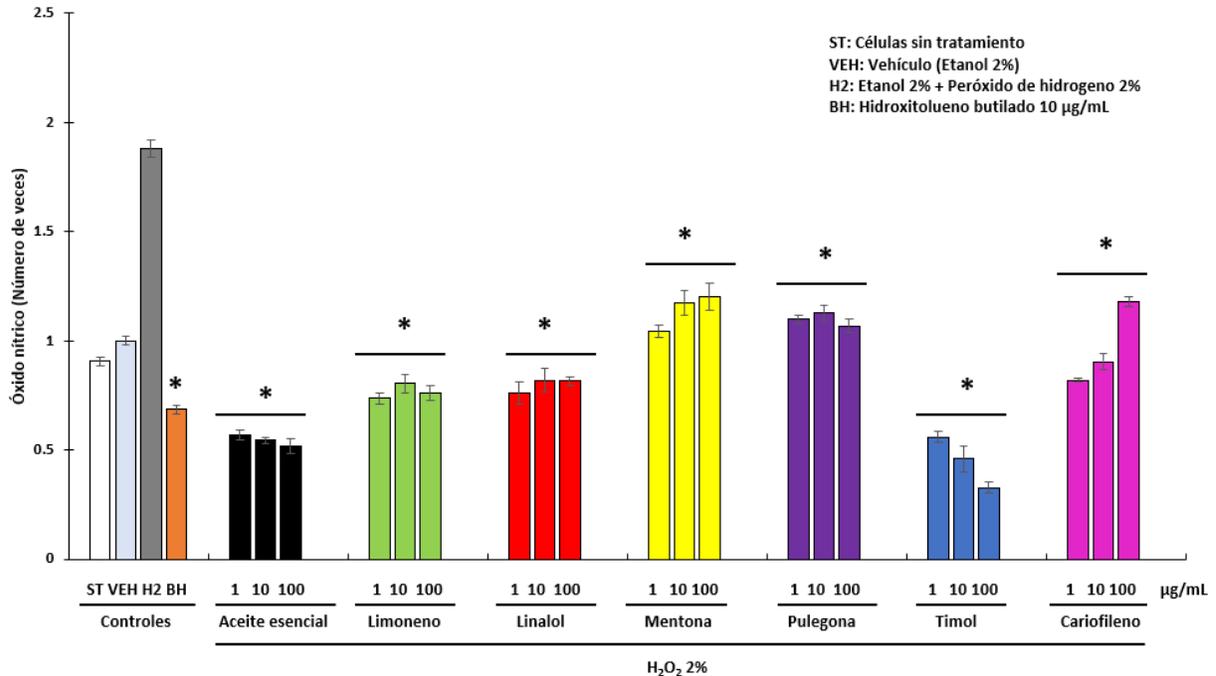


Figura 9. Efecto del aceite esencial y terpenos mayoritarios de *Satureja macrostema* sobre la producción de óxido nítrico (NO) en células BUVEC. Asteriscos indican diferencia significativa en cada bloque de tratamiento en comparación con el control H2 (etanol 2% + peróxido de hidrógeno 2%) \pm desviación estándar (n=8, Prueba t-Student $p \leq 0.05$).

El compuesto timol mostró un efecto positivo al aumentar 1.62, 1.91 y 2.11 veces la actividad de CAT en las tres concentraciones analizadas (1, 10 y 100 µg/mL, barras azules), incluso el incremento fue superior al mostrado por el aceite esencial y el control positivo BHT-10 µg/mL (barra naranja), esto en comparación con el control etanol 2% más H₂O₂ 2% (barra gris) (Figura 10).

Efecto del aceite esencial y terpenos de *S. macrostema* sobre la expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria en células BUVEC

A partir de los resultados de viabilidad celular, el aceite esencial y los terpenos pulegona y timol, éstos fueron utilizados a las concentraciones de 1, 10 y 100 µg/mL para determinar la expresión de genes de la respuesta inflamatoria, utilizando la técnica de qPCR, analizando la expresión del gen de la citocina proinflamatoria TNF- α (Factor de Necrosis Tumoral α) y del gen de la citocina antiinflamatoria IL-10 (Interleucina 10), al inducir un estado inflamatorio en las BUVEC con Lipopolisacárido (LPS, 100 ng/mL). Los terpenos limoneno, linalol, mentona y cariofileno fueron omitidos de este análisis por no presentar resultados significativos sobre la producción de especies reactivas en los distintos métodos utilizados anteriormente.

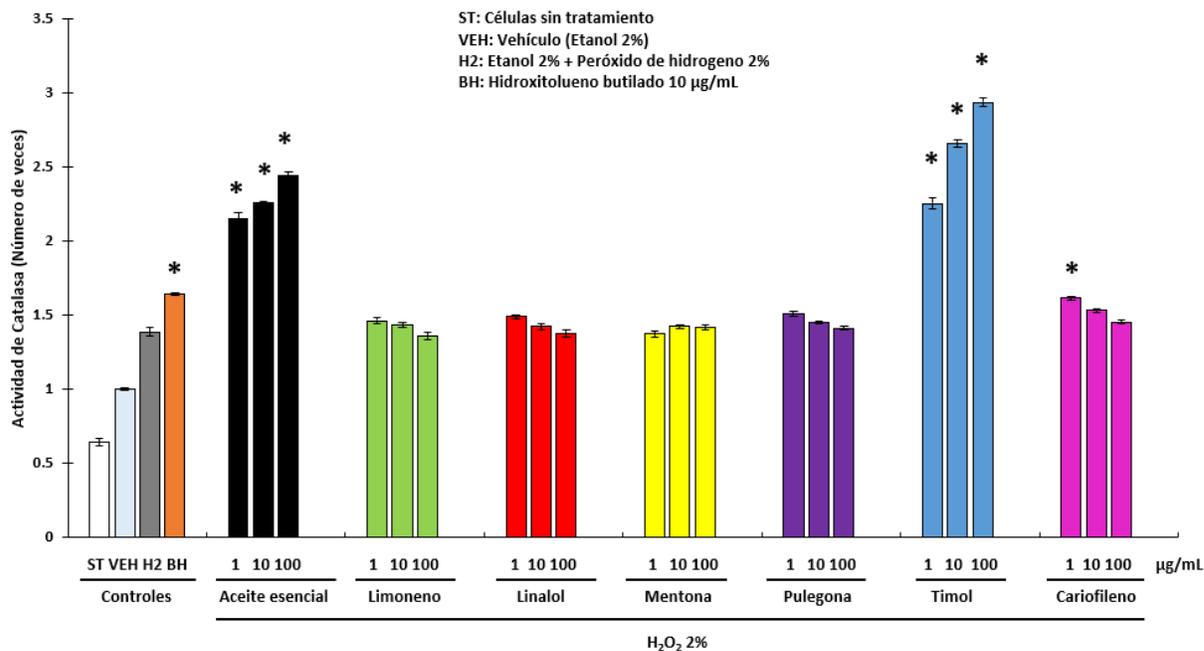


Figura 10. Efecto del aceite esencial y terpenos mayoritarios de *Satureja macrostema* sobre la actividad de catalasa en células BUVEC. Asteriscos indican diferencia significativa en cada bloque de tratamiento en comparación con el control H2 (etanol 2% + peróxido de hidrógeno 2%) \pm desviación estándar (n=8, Prueba *t*-Student $p \leq 0.05$).

Se observó que el tratamiento control de LPS más etanol 2% (LPS-ETOH, barra gris) indujo hasta 7.35 veces la expresión de TNF- α al compararse con el vehículo etanol 2% (número de veces=1), y encontrando que el aceite esencial de *S. macrostema* y los terpenos timol y pulegona a las tres concentraciones analizadas, mostraron un efecto sobre la disminución de la expresión de TNF- α hasta más de 6 veces, comparado con la condición LPS-ETOH (Figura 11).

Por otra parte, la expresión del gen de la citocina antiinflamatoria IL-10 aumentó con el aceite esencial y timol, alcanzando un máximo de hasta 14.46 y 23.76 veces, respectivamente a 100 µg/mL, en comparación con el control LPS-ETOH (3.6 veces) (Figura 12). La pulegona no mostró un efecto significativo sobre la inducción de IL-10 (Figura 12). Estos resultados demuestran que el aceite esencial de *S. macrostema* y sus terpenos pulegona y timol ejercen una actividad antiinflamatoria a las concentraciones analizadas, ya que inhiben la expresión del gen de la citocina proinflamatoria TNF- α inducido por el LPS en las células BUVEC, mientras que inducen la expresión del gen antiinflamatorio IL-10, incluso más que el LPS.

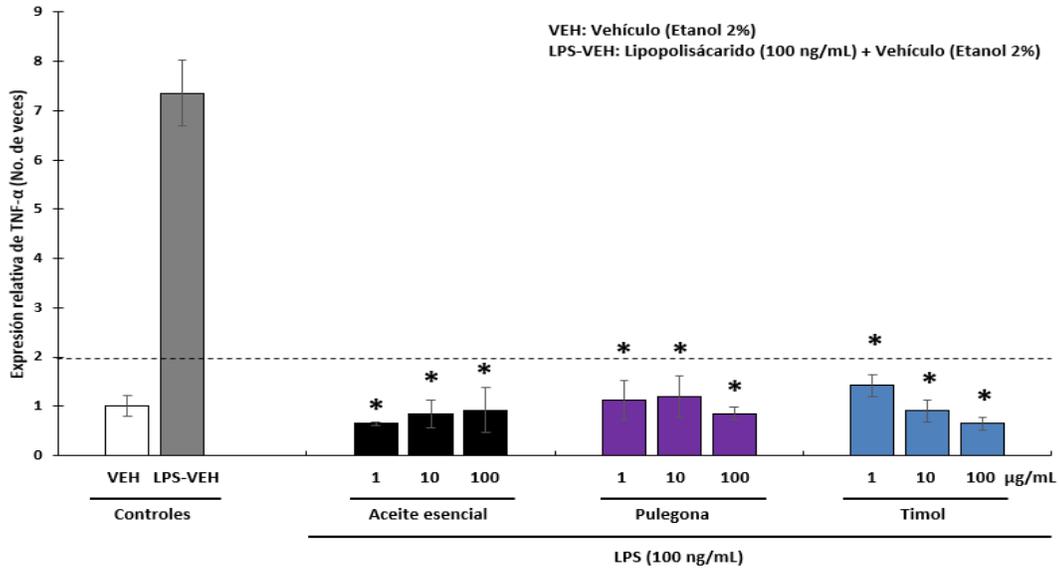


Figura 11. Efecto del aceite esencial y terpenos mayoritarios de *Satureja macrostema* sobre la expresión del gen de TNF- α en células BUVEC. Asteriscos indican diferencia significativa en cada bloque de tratamiento en comparación con el control LPS-VEH (Lipopolisácarido 100 ng/mL + etanol 2%) \pm error estándar (n=4, se consideró significativos los valores mayores a 2 y menores a 0.5).

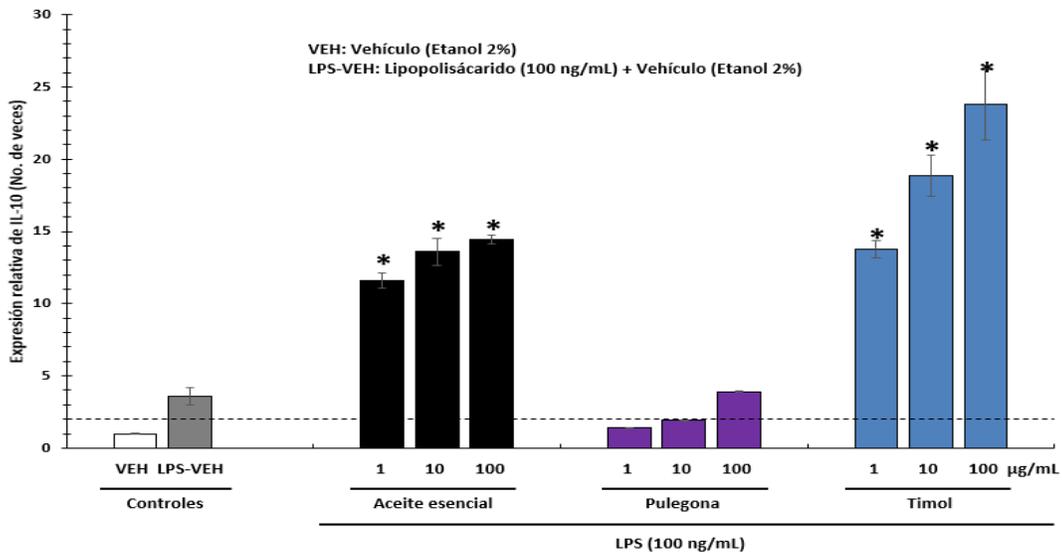


Figura 12. Efecto del aceite esencial y terpenos mayoritarios de *Satureja macrostema* sobre la expresión del gen de IL-10 en BUVEC. Asteriscos indican diferencia significativa en cada bloque de tratamiento en comparación con el control LPS-VEH (Lipopolisácarido 100 ng/mL + etanol 2%) \pm error estándar (n=4, se consideró significativos los valores mayores a 2 y menores a 0.5).

8.2.6. Discusión

Los resultados de esta investigación demuestran el efecto protector del aceite esencial y de los terpenos mayoritarios (pulegona, linalol, timol, limoneno, mentona y cariofileno) de *S. macrostema* contra el estrés oxidativo inducido por H₂O₂ en las células BUVEC, en un intervalo de concentraciones de 1 a 100 µg/mL. Además, se demostró que el aceite esencial y terpenos de *S. macrostema* regulan la expresión de citocinas pro- y antiinflamatorias durante un estado inflamatorio en las BUVEC inducido por LPS.

Las células endoteliales son el blanco de citocinas proinflamatorias, tales como el TNF- α , y también las producen para reclutar leucocitos hacia el sitio de la inflamación, como parte de una respuesta inmune innata. Se ha reportado que un aumento en la producción de citocinas proinflamatorias conduce a la activación de las células endoteliales, lo cual induce la síntesis y liberación de mediadores inflamatorios como las citocinas pro- y antiinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-10), quimiocinas, ROS o RNS. En este sentido, la infección de las células endoteliales por parte de bacterias o la presencia de productos bacterianos, tales como el LPS, también activan a las células endoteliales a través de la ruptura de las barreras físicas y la penetración de los tejidos locales, por lo cual es utilizado como un modelo de activación del endotelio (Schouten *et al.*, 2008; Alva-Murillo *et al.*, 2012).

El aceite esencial y los terpenos mayoritarios de *S. macrostema* no mostraron efecto citotóxico sobre las células BUVEC a las concentraciones de 1, 10 y 100 µg/mL. Las células endoteliales tienen un papel crucial en la regulación de las funciones fisiológicas vasculares. Numerosos estudios han indicado el papel del estrés oxidativo en el desarrollo de la disfunción del endotelio (Higashi *et al.*, 2009; Onat *et al.*, 2011). En esta investigación, se utilizó una línea celular endotelial de vena umbilical bovina (BUVEC), la cual es un modelo comparable con las células endoteliales humanas HUVEC, cuyas características principales son que presentan buena homogeneidad, rápida capacidad de expansión y marcadores de un estado redox bien caracterizados, siendo éstas un modelo de estrés oxidativo en células endoteliales (Kris-Etherton y Keen, 2012; Safaeian *et al.*, 2015).

El peróxido de hidrógeno es un radical no libre con capacidad oxidativa, se usa ampliamente como sustancia patrón para inducir el estrés oxidativo y la apoptosis en diversos tipos celulares, incluidas las células endoteliales (Safaeian *et al.*, 2015). Como molécula pequeña que carece de carga electroquímica, el H₂O₂ puede pasar fácilmente a través de la membrana celular y actuar como un segundo mensajero intracelular en algunos procesos vasculares, como la remodelación, el crecimiento, la inflamación y la apoptosis (Pinazo-Durán *et al.*, 2014). Después de la exposición de las células endoteliales a compuestos tóxicos oxidantes como el H₂O₂, o productos bacterianos como el lipopolisácarido, se produce una respuesta inflamatoria que incluyen expresión aumentada de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), selectina P, regulación ascendente de la proteína 1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1), activación del NF- κ B, liberación de citocinas y quimiocinas al sitio de la

inflamación y producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Donato *et al.*, 2015; Konradi *et al.*, 2015; Sies, 2015).

El aceite esencial de *S. macrostema* disminuyó la producción de especies reactivas de oxígeno a nivel citoplasmático y mitocondrial, reduciendo la cantidad del radical superóxido, hidroxilo y óxido nítrico en las células BUVEC expuestas a peróxido de hidrogeno como inductor del estrés oxidativo. A su vez, el aceite esencial aumentó hasta 1.76 veces más la actividad de la enzima antioxidante catalasa, demostrándose la capacidad antioxidante que presenta este aceite esencial al proteger del daño oxidativo generado por el H₂O₂. En este mismo sentido, el aceite esencial mostró un efecto antiinflamatorio al disminuir la expresión del gen de la citocina proinflamatoria TNF- α y aumentar la expresión de la citocina antiinflamatoria IL-10. En un estudio previo de nuestro grupo de trabajo, se demostró que el aceite esencial de *S. macrostema*, posee capacidad antioxidante al presentar la capacidad de atrapar radicales libres generados en modelos *in vitro* como el DPPH, ABTS y TAC (Torres-Martínez *et al.*, 2018), pero se desconocía si el aceite esencial participaba regulando los mecanismos de estrés oxidativo como producción de ERO y ERN, así como la activación de los sistemas antioxidantes enzimáticos y la regulación de la respuesta inflamatoria en un modelo de endotelio celular.

Se ha reportado que los aceites esenciales de diversas plantas de la familia Lamiaceae (a la cual pertenece *S. macrostema*) presentan actividad antioxidante, entre ellas *Melaleuca alternifolia*, *Melissa officinalis*, *Mentha pulegium*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* y *Thymus vulgaris*. Así mismo, se ha reportado que el aceite esencial de plantas como *Eugenia caryophyllata*, *Lamium garganicum*, *Matricaria chamomilla*, *Schizonepeta tenuifolia* y *Melissa officinalis*, presentan actividad antiinflamatoria. Dichas capacidades son atribuidas a los compuestos terpénicos que están presentes mayoritariamente en sus aceites esenciales (Mimica-Dukic *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004; Dimitrijević *et al.*, 2007; Akkol *et al.*, 2008; Daniel *et al.*, 2009; Kamatou y Viljoen, 2010; Miguel *et al.*, 2011; Tae y Kim, 2012; Müzell *et al.*, 2013; Benabdallah *et al.*, 2016). Los terpenos son compuestos encontrados principalmente en las plantas con efectos beneficiosos sobre el endotelio y el sistema cardiovascular, incluida la relajación vascular, así como la disminución de la presión arterial y la frecuencia cardíaca (Santos *et al.*, 2011).

La pulegona es el terpeno que se encuentra en mayor cantidad en el aceite esencial de *S. macrostema*, al igual que en otras especies de *Satureja* como *S. parvifolia* y *S. odora* (Muschietti *et al.*, 1996; Torres-Martínez *et al.*, 2014). Este compuesto terpénico con grupo funcional cetónico disminuyó la producción de especies reactivas de oxígeno a nivel citoplasmático y mitocondrial, radical superóxido, radical hidroxilo y óxido nítrico en las BUVEC estresadas con peróxido de hidrogeno. De igual manera, disminuyó la expresión del TNF- α en las células expuestas a LPS (100 ng/mL). En cambio, no presentó efecto significativo sobre la actividad de la catalasa y expresión génica de IL-10. Estos resultados son consistentes con los encontrados para mentona; el otro monoterpeno cetónico del aceite esencial de *S. macrostema*, solo que en este caso la expresión génica de TNF- α e IL-10 no fueron evaluados.

Sin embargo, de acuerdo con este trabajo, la pulegona y mentona ejercen una actividad antioxidante al disminuir las especies oxidativas de oxígeno y nitrógeno, la literatura indica que altas concentraciones de dichos monoterpenos cetónicos proporcionan una baja reactividad a los aceites esenciales que los poseen, tal es el caso del aceite esencial de *Mentha pulegium* que mostró una baja actividad para eliminar los radicales libres, lo cual fue atribuido a su alto contenido de pulegona (Sarikurkcu *et al.*, 2012). Según lo reportado por Cariddi *et al.*, 2011; los terpenos pulegona (63.4%) y mentona (15.9%) que son los principales compuestos del aceite esencial de *Minthostachys verticillata*, ejercieron un efecto inmunomodulador, aumentando la proliferación celular, pero disminuyendo los niveles de IL-13 en cultivos de linfocitos estimulados con un alérgeno solo o en combinación con los monoterpenos.

En el caso del terpeno timol, se determinó que posee la mayor actividad antioxidante y antiinflamatoria en el modelo de células endoteliales bovinas (BUVEC), ya que la producción de ERO mitocondriales y citoplasmáticas fue disminuida notablemente. De igual manera disminuyó el radical superóxido, radical hidroxilo y el óxido nítrico, mostrando la mayor disminución en comparación con el aceite esencial de *S. macrostema* y los demás terpenos evaluados (limoneno, linalol, mentona, pulegona y cariofileno). La actividad de la catalasa fue incrementada en las tres concentraciones de timol evaluadas, así como la expresión de IL-10 incrementó más de 20 veces, mientras que la expresión de la citocina proinflamatoria TNF- α fue disminuida más de 6 veces.

El timol ha sido reportado como el responsable de la actividad antioxidante de diversos aceites esenciales, como son aquellos pertenecientes a las plantas *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare*, *Satureja thymbra* y *Satureja parnassica* (Kulisic *et al.*, 2004; Beidokhti y Prakash, 2013; Fitsiou *et al.*, 2016). El timol posee excelentes propiedades antioxidantes debido a la presencia del grupo hidroxilo fenólico en su estructura, que se sabe exhibe una potente actividad antioxidante al absorber y neutralizar los radicales libres (Venu *et al.*, 2013). Los aceites esenciales que contienen al timol como su principal componente demuestran la mayor actividad antioxidante (Jamali *et al.*, 2012). En estudios recientes, se ha demostrado que el aceite esencial de *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* y *Thymus hyemalis* que contienen timol como compuesto mayoritario, regulan la respuesta inflamatoria al aumentar hasta en un 160% la expresión de IL-10 y disminuir más del 50% la expresión de las citocinas IL-1 β , IL-6 y TNF- α en macrófagos THP-1 estimulados con oxLDL (Lipoproteína de baja densidad oxidada) mediante la activación de factor NF- κ B (Ocaña y Reglero, 2012). La actividad antioxidante y antiinflamatoria de los aceites que contienen timol ha sido validada tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, demostrando que este terpeno es el responsable de dichas actividades (Aazza *et al.*, 2011; Fachini-Queiroz *et al.*, 2012; Sharifi-Rad *et al.*, 2017). En este contexto, resultados de nuestro grupo de trabajo muestran que el aceite esencial de *S. macrostema* contiene hasta 12.68 ± 0.8 μ g de timol por cada gramo de aceite esencial (Torres-Martínez *et al.*, 2018), lo cual sugiere que la concentración de 1 μ g/mL de timol utilizada en los análisis de este trabajo es equiparable en contenido de timol con la concentración de 100 μ g/mL del aceite esencial.

Los monoterpenos limoneno y linalol, presentaron actividad antioxidante al proteger a las células BUVEC del estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrogeno, ya que disminuyeron las cantidades de óxido nítrico, así como las especies reactivas de oxígeno mitocondriales y citoplasmáticas, al igual que los radicales superóxido e hidroxilo. Dichos terpenos poseen un grupo funcional hidroxilo en su estructura que les otorga capacidad para donar electrones o dicho grupo funcional para neutralizar los radicales libres (Ruberto y Baratta, 2000). Recientemente se ha demostrado que los terpenos no fenólicos como el limoneno y linalol actúan como antioxidantes potenciadores con su terminación OH, contribuyendo a la actividad antioxidante de los aceites esenciales, siendo estos mas apreciados que sus componentes aislados, debido a la compleja interacción entre componentes, ya que a menudo pueden entrar en acción efectos sinérgicos o antagónicos (Amorati *et al.*, 2013; Baschieri *et al.*, 2017).

La actividad antioxidante mostrada por el terpeno cariofileno fue notoria ya que disminuyó la producción de óxido nítrico y ERO citoplasmáticas y mitocondriales, al igual que los radicales superóxido e hidroxilo. La actividad de la catalasa solo fue aumentada significativamente a la concentración de 1 µg/mL. El sesquiterpeno cariofileno ha sido reportado como el principal terpeno del aceite esencial de *Murraya paniculata*, cuya actividad antioxidante fue alta (mayor a 80%) y dicha actividad fue atribuida al cariofileno (Raina *et al.*, 2006; Rodríguez *et al.*, 2012). Existe un consenso en la literatura de que los aceites esenciales ricos en monoterpenos con anillos aromáticos unidos a grupos hidroxilo tienen buena actividad antioxidante, mientras que los aceites ricos en hidrocarburos sesquiterpénicos tienen una acción débil (Chowdhury *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2012).

En resumen, este estudio mostró los efectos citoprotectores, antioxidantes y antiinflamatorios del aceite esencial obtenido por hidrodestilación de hojas y tallos de *S. macrostema*, esto en condiciones de estrés oxidativo y respuesta inflamatoria aguda (inducida por LPS) en células BUVEC. Con respecto al alto efecto ejercido por los compuestos terpénicos de *S. macrostema*, podrían ser junto con el aceite esencial, buenos candidatos antioxidante y antiinflamatorios naturales para mejorar la función endotelial en condiciones de estrés y prevenir diversas enfermedades degenerativas.

8.2.7. Conclusiones

El aceite esencial de *S. macrostema* presentan un efecto antioxidante y antiinflamatorio al proteger a las células endoteliales bovinas expuestas a peróxido de hidrógeno y lipopolisácarido. Estos efectos pueden ser atribuidos principalmente al timol ya que presentó efectos superiores a los de los terpenos pulegona, mentona, limoneno, linalol y cariofileno que están presentes en el aceite esencial de *S. macrostema*.

8.2.8. Referencias

Akkol, E. K. 2012. New strategies for anti-inflammatory drug development. *J Pharmacogenomics Pharmacoproteomics*. 3(3): 1-2.

Alva-Murillo, N., Téllez-Pérez, A. D., Sagrero-Cisneros, E., López-Meza, J. E. y Ochoa-Zarzosa, A. 2012. Expression of antimicrobial peptides by bovine endothelial cells. *Cellular Immunology*. 280(1): 108-112.

Amorati, R., Foti, M. C. y Valgimigli, L. 2013. Antioxidant activity of essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61(46): 10835-10847.

Bagheri, S., Ahmadvand, H., Khosrowbeygi, A., Ghazanfari, F., Jafari, N., Nazem, H. y Hosseini, R. H. 2013. Antioxidant properties and inhibitory effects of *Satureja khuzestanica* essential oil on LDL oxidation induced-CuSO₄ in vitro. *Asian Pac J Trop Biomed*. 3(1): 22-27.

Bak, M. J., Jeong, W. S. y Kim, K. B. 2014. Detoxifying effect of fermented black ginseng on H₂O₂-induced oxidative stress in HepG2 cells. *International Journal of Molecular Medicine*. 34: 1516-1522.

Bak, M. J., Jun, M. y Jeong, W. S. 2012. Antioxidant and hepatoprotective effects of the red ginseng essential oil in H₂O₂-treated HepG2 cells and CCl₄-treated mice. *Int J Mol Sci*. 13: 2314-2330.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. y Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils: A review. *Food Chem. Toxicol*. 46: 446-475.

Baschieri, A., Ajvazi, M. D., Tonfack, J. L. F., Valgimigli, L. y Amorati, R. 2017. Explaining the antioxidant activity of some common non-phenolic components of essential oils. *Food Chem*. 1(232): 656-663.

Beidokhti, M. N. y Prakash, H. S. 2013. Antioxidant and anti-inflammatory potential of selected medicinal plants of Lamiaceae family. *Int J Pharm Pharm Sci*. 5(1):100-104.

Benabdallah, A., Rahmoune, C., Boumendjel, M., Aissi, O. y Messaoud, C. 2016. Total phenolic content and antioxidant activity of six wild *Mentha* species (Lamiaceae) from northeast of Algeria. *Asian Pac J Trop Biomed*. 6(9): 760–766.

Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Simin, N. y Anackov, G. 2006. Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(5): 1822-1828.

Božovic, M. y Ragno, R. 2017. *Calamintha nepeta* (L.) savi and its main essential oil constituent pulegone: biological activities and chemistry. *Molecules*. 22(290): 1-50.

Carhuapoma, M. Y., López, S. G., Veliz, F. L. M., Inostrosa, L. R., Yuli, R. P. y Carlos, N. C. 2014. Composición química, actividad antioxidante y toxicidad aguda del aceite esencial de *Satureja pulchella* "Panizara". *Theorema*. 1(1): 57-63.

Cariddi, L., Escobar, F., Moser, M., Panero, A., Alaniz, F., Zygadlo, J., Sabini, L. y Maldonado, A. 2011. Monoterpenes isolated from *Minthostachys verticillata* (Griseb.) epling essential oil modulates immediate-type hypersensitivity responses *in vitro* and *in vivo*. *Planta Med*. 77: 1687-1694

Ćavar, S., Šolić, M. E. y Maksimović, M. 2013. Chemical composition and antioxidant activity of two *Satureja* species from Mt. Biokovo. *Botanica Serbica*. 37(2): 159-165.

Chowdhury, J. U., Bhuiyan, M. N. I. y Mohammed, Y. 2008. Chemical composition of the leaf essential oils of *Murraya koenigii* (L.) Spreng and *Murraya paniculata* (L.) Jack. *Bangla J Pharmacol*. 3: 59-63.

Czypiorski, P., Rabanter, L. L., Altschmied, J. y Haendeler, J. 2013. Redox balance in the aged endothelium. *Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie*. 46(7): 635-638.

Dantas, A. P., Jiménez-Altayó, F. y Vila, E. 2012. Vascular aging: facts and factors. *Frontiers in Physiology*. 3(325): 1-2.

Dimitrijević, S. I., Mihajlovski, K. R., Antonović, D. G., Milanović-Stevanović, M. R. y Mijin, D.Ž. 2007. A study of the synergistic antilisterial effects of a sub-lethal dose of lactic acid and essential oils from *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Organum vulgare* L. *Food Chemistry*. 104(2): 774-782.

Domínguez-Vázquez, G. y Castro-Ramírez, A. 2002. Usos medicinales de la familia Labiatae en Chiapas, México (Medicinal uses of Labiatae family in Chiapas, Mexico). *Etnobiología*. 2:19-31.

Donato, A. J., Morgan, R. G., Walker, A. E. y Lesniewski, I. A. 2015. Cellular and molecular biology of aging endothelial cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 89(B): 122-135.

Fitsiou, E., Anestopoulos, I., Chlichlia, K., Galanis, A., Kourkoutas, I., Panayiotidis, M. I. y Pappa, A. 2016. Antioxidant and antiproliferative properties of the essential oils of *Satureja thymbra* and *Satureja parnassica* and their major constituents. *Anticancer Research*. vol. 36(11): 5757-5763.

Giweli, A., Džamić, A. M., Soković, M., Ristić, M. S. y Marin, P. D. 2012. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Essential Oils of *Satureja thymbra* Growing Wild in Libya. *Molecules*, 17: 4836-4850.

Hashemi, M. B., Niakousari, M. y Saharkhiz, M. J. 2011. Antioxidant activity of *Satureja bachtiarica* Bunge essential oil in rapeseed oil irradiated with UV rays. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*. 113: 1132-1137.

Higashi, Y., Noma, K., Yoshizumi, M. y Kihara, Y. 2009. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circulation journal*. 73(3): 411-418.

Houston, M. C. 2013. The role of nutrition, nutraceuticals, vitamins, antioxidants, and minerals in the prevention and treatment of hypertension. *Altern Ther Health Med*. 19:32-49.

Jamali, C. A., El-Bouzidi, L., Bekkouche, K., Lahcen, H., Markouk, H., Wohlmuth, H., Leach, D. y Abbad, A. 2012. Chemical composition and antioxidant and anticandidal activities of essential oils from different wild Moroccan *Thymus* species. *Chem Biodivers*. 9(6): 1188-1197.

Kim, H. J., Chen, F., Wu, C., Wang, X., Chung, X. Y. y Jin, Z. 2004. Evaluation of antioxidant activity of Australian tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil and its components. *J Agric Food Chem*. 52(10): 2849-2854.

Kim, Y. W. y Byzova, T. V. 2014. Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *Blood*. 123(5): 625-631.

Konradi, J., Mollenhauer, M., Baldus, S. y Klinke, A. 2015. Redox sensitive mechanisms underlying vascular dysfunction in heart failure. *Free Radical Research*. 49(6): 721-742.

Kris-Etherton, P. M. y Keen, C. L. 2012. Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. *Current opinion in lipidology*. 13(1): 41-49.

Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V. y Milos, M. 2004. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chem*. 85(4):633-640.

Miguel, G., Cruz, C., Faleiro, M. L., Simões, M. T., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G. y Pedro, L. G. 2011. *Salvia officinalis* L. essential oils: effect of hydrodistillation time on the chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities. *Nat Prod Res*. 25(5): 526-541.

Miguel, M. G. 2010. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. *Flavour Fragr J*. 25(5): 291-312.

Mimica-Dukic, N., Bozin, B., Soković, M., Mihajlovic, B. y Matavulj, M. 2003. Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. *Planta Med*. 69(5):413-419.

Moghadam, A. R. L. 2015. Antioxidant Activity and Essential Oil Evaluation of *Satureja hortensis* L. (Lamiaceae) from Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 18 (2): 455-459.

Morey, J. S., Ryan, J. C. y Van Dolah, F. M. 2006. Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biol Proced Online*. 8: 175-193.

Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.

Muschiatti, L., Van-Baren, C., Coussio, J., Vila, R., Clos, M., Cañigueral, S. y Adzet, T. 1996. Chemical composition of the leaf oil of *Satureja odora* and *Satureja parvifolia*. *J Essent Oil Res*. 8:681-684.

Ocaña, A. y Reglero, G. 2012. Effects of thyme extract oils (from *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis*, and *Thymus hyemalis*) on cytokine production and gene expression of oxLDL-stimulated THP-1-Macrophages. *Journal of Obesity*. 12 (ID 104706):11 p.

Onat, D., Brillon, D., Colombo, P. C. y Schmidt, A. M. 2011. Human vascular endothelial cells: a model system for studying vascular inflammation in diabetes and atherosclerosis. *Current diabetes reports*. 11(3):193-202.

Peschel, W., Sanchez-Rabaneda, F., Dieckmann, W., Plescher, A., Gartzia, I. y Jimenez, D. 2006. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruits wastes. *Food Chemistry*. 97:137-150.

Pinazo-Durán, M. D., Gallego-Pinazo, R., García-Medina, J. J., Zanon-Moreno, V., Nucci, C., Dolz-Marco, R., Martínez-Castillo, S., Galbis-Estrada, C., Marco-Ramirez, C., Lopez-Gálvez, M. I., Galarreta, D. J. y Díaz-Llópiz, M. 2014. Oxidative stress and its downstream signaling in aging eyes. *Journal of clinical interventions in aging*. 11(9): 637-652.

Praticò, D. 2005. Antioxidants and endothelium protection. *Atherosclerosis*. 181(2): 215-224.

Raaz, U., Toh, R., Maegdefessel, L., Adam, M., Nakagami, F., Emrich, F. C., Spin, J. M. y Tsao, P. S. 2014. Hemodynamic regulation of reactive oxygen species: implications for vascular diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*. 20(6): 914-928.

Raina, V. K., Verma, S. C., Dhawan, S. M. K., Ramesh, S., Singh, S. C., Yadav, A. y Srivastava, S. K. 2006. Essential oil composition of *Murraya exotica* from the plains of northern India. *Flavour Fragr J*. 21: 140-142.

Ray, P. D., Huang, B. W. y Tsuji, Y. 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*. 24: 981-990.

Rezaie, M., Farhoosh, R., Sharif, A., Asili, J. y Iranshahi, M. 2015. Chemical composition, antioxidant and antibacterial properties of Bene (*Pistacia atlantica* subsp. *mutica*) hull essential oil. *J. Food Sci. Technol*. 52: 6784-6790.

Ricciotti, E. y FitzGerald, G. A. 2011. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31: 986-1000.

Rodriguez, E. J., Ramis-Ramos, G., Heyden, Y. V., Simo-Alfonso, E. F., Lerma-Garcia, M. J., Saucedo-Hernandez, Y., Monteagudo, U., Morales, Y., Holgado, B. y Herrero-Martínez, J. M. 2012. Chemical composition, antioxidant properties and antimicrobial activity of the essential oil of *Murraya paniculata* leaves from the mountains of Central Cuba. *Nat Prod Commun.* 7: 1527-1530.

Ruberto, G. y Baratta, M. T. 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry.* 69(2): 167-174.

Russo, R., Corasaniti, M. T., Bagetta, G. y Morrone, L. A. 2015. Exploitation of cytotoxicity of some essential oils for translation in cancer therapy. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2015: 397-821.

Safaeian, L., Javanmard, S. H., Mollanoori, Y. y Dana, N. 2015. Cytoprotective and antioxidant effects of human lactoferrin against H₂O₂-induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells. *Advanced biomedical research.* 4(188): 1-6.

Santos, M. R. V., Moreira, F. V., Fraga, B. P., De Sousa, D. P., Bonjardim, L. R. y Quintans-Junior, L. J. 2011. Cardiovascular effects of monoterpenes: a review. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 21(4): 764-771.

Sarikurkcü, C., Eryigit, F., Cengiz, M., Tepe, B., Cakir, A. y Mete, E. 2012. Screening of the antioxidant activity of the essential oil and methanol extract of *Mentha pulegium* L. *Spectroscopy Lett.* 45: 352-358.

Schnabel, D., Salas-Vidal, E., Narváez, V., Sanchez-Carbente, M. del R., Hernandez-Garcia, D., Cuervo, R. y Covarrubias, L. 2006. Expression and regulation of antioxidant enzymes in the developing limb support and function of ROS in interdigital cell death. *Dev Biol.* 291: 291-299.

Schouten, M., Wiersinga, W. J., Levi, M. y van der Poll, T. 2008. Inflammation endothelium, and coagulation in sepsis. *J. Leukoc. Biol.* 83: 536-545.

Schulz, E., Anter, E. y Keaney, J. F. 2004. Oxidative stress, antioxidants, and endothelial function. *Curr Med Chem.* 11:1093-1104.

Serhan, C. N., Brain, S. D., Buckley, C. D., Gilroy, D. W., Haslett, C., O'Neill, L. A., Perretti, M., Rossi, A. G. y Wallace, J. L. 2007. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J.* 21: 325-332.

Serrano, C., Matos, O., Teixeira, B., Ramos, C., Neng, N., Nogueira, J., Nunes, M. L. y Marques, A. 2011. Antioxidant and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. extracts. *J Sci Food Agric.* 91:1554-1560.

Sies, H. 2015. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*. 4: 180-183.

Tian, X. L. y Li, Y. 2014. Endothelial cell senescence and age related vascular diseases. *Journal of Genetics and Genomics*. 41(9): 485-495.

Tomaino, A., Cimino, F., Zimbalatti, V., Venuti, V., Sulfaro, V., De Pasquale, A. y Saija, A. 2005. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. *Food Chem*. 89(4): 549-554.

Tongnuanchan, P. y Benjakul, S. 2014. Essential Oils: Extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *J. Food Sci*. 79: 1231-1249.

Torres-Martínez, R., Bello-González, M. A., Molina-Torres, J., Ramírez-Chávez, E., García-Rodríguez, Y., Fulgencio-Negrete, R., García-Hernández, A., López-Gómez, R., Martínez-Pacheco, M. M., Lara-Chavéz, B. N. y Salgado-Garciglia, R. 2014. Efecto de la fertilización sobre el crecimiento y contenido de compuestos volátiles en *Satureja macrostema* 'Benth.' Briq. *Rev. Mex. Cien. For*. 5(21): 122-134.

Torres-Martínez, R., García-Rodríguez, Y. M., Ríos-Chávez, P., Saavedra-Molina, A., López-Meza, J. E., Ochoa-Zarzosa, A. y Salgado Garciglia, R. 2018. Antioxidant Activity of the Essential Oil and its Major Terpenes of *Satureja macrostema* (Moc. and Sessé ex Benth.) Briq. *Pharmacognosy Magazine*. 13(52): 875-880.

Touyz, R. M. y Briones, A. M. 2011. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. *Hypertens Res*. 34: 5-14.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. y Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 39: 44-84.

Vara, D. y Pula, G. 2014. Reactive oxygen species: physiological roles in the regulation of vascular cells. *Current Molecular Medicine*. 14(9): 1103-1125.

Venu, S., Naik, D. B., Sarkar, S. K., Aravind, U. K., Nijamudheen, A. y Aravindakumar, C. T. 2013. Oxidation reactions of thymol: a pulse radiolysis and theoretical study. *The Journal of Physical Chemistry*. 117: 291-299.

Wei, A. y Shibamoto, T. 2007. Antioxidant activities and volatile constituents of various essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(5): 1737-1742.

Wright, H. L., Moots, R. J., Bucknall, R. C. y Edwards, S. W. 2010. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford)*. 49: 1618-1631.

Zamora, R., Vodovotz, Y. y Billiar, T. R. 2000. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol Med*. 6: 347-373.

9. DISCUSIÓN GENERAL

Desde su domesticación, las plantas han tenido un gran valor económico, no solo desempeñando un papel significativo en el suministro de alimentos, sino también actuando como agentes terapéuticos. Recientemente ha aumentado el interés en la aplicación de productos a base de plantas como agentes medicinales, ya que los fármacos sintéticos generan una gran diversidad de efectos secundarios (Moré *et al.*, 2010).

Se conoce que las plantas tienen capacidad terapéutica y contribuyen a reducir el riesgo de diversas enfermedades, entre las que destacan las que cursan procesos inflamatorios, siendo una de las fuentes más importantes para la producción de medicamentos contra este tipo de enfermedades. Aproximadamente el 50% de las drogas que se producen en todo el mundo son de origen natural (Kamatou y Viljoen, 2010).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), alrededor del 80% de la población depende únicamente de los remedios tradicionales como las plantas medicinales, por lo que actualmente se pueden encontrar diversas formulaciones medicinales a base de plantas. Es conocido que los componentes químicos de las plantas presentes en extractos o aceites esenciales muestran una gran variedad de propiedades medicinales como antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas, anticancerígenas, antidiabéticas y antihipertensivas, entre otras, las cuales han sido demostradas por las investigaciones realizadas en varios modelos animales y sistemas de bioensayos *in vitro*, con los que se ha comprobado su eficacia en el uso medicinal (Rad *et al.*, 2014).

De toda la gama de compuestos químicos de origen vegetal que existe, un grupo particularmente interesante son los que constituyen a los aceites esenciales, que son obtenidos de diversas partes de las plantas que, aunque representan una pequeña fracción de la composición total de las mismas, confieren las características de las

plantas medicinales y aromáticas, por lo que son utilizadas en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica (Sharifi-Rad *et al.*, 2015).

La actividad antioxidante de los aceites esenciales es una propiedad biológica de gran interés, ya que pueden preservar los alimentos de los efectos tóxicos de los compuestos oxidantes. Además, su capacidad para eliminar los radicales libres puede desempeñar un papel importante en la prevención de algunas enfermedades como la disfunción cerebral, cáncer, enfermedades cardiovasculares y el deterioro del sistema inmunitario (Sharifi-Rad *et al.*, 2015).

Una planta que muestra un amplio potencial de actividad biológica es el nurite (*Satureja macrostema*), planta medicinal aromática representativa de la medicina tradicional y uso en comunidades de la meseta Purépecha en Michoacán. Diversos estudios han demostrado que los componentes principales del aceite esencial de la parte aérea (tallos y hojas) del nurite son del tipo terpénico, considerando como mayoritarios a pulegona, limoneno, linalol, mentona y timol (Bello *et al.*, 2006; Torres-Martínez *et al.*, 2014).

Estos estudios muestran además que el aceite esencial de nurite presenta actividad antifúngica y antibacteriana contra diversos hongos y bacterias, cuya propiedad es atribuida al contenido de estos terpenos (Bello *et al.*, 2006; Damián-Badillo *et al.*, 2008). También se han realizado investigaciones para determinar las variaciones del contenido de los componentes de su aceite esencial en plantas silvestres, plantas *in vitro* y cultivadas en invernadero, con lo cual se ha observado que, aunque existen variaciones, los terpenos mayoritarios como la pulegona, el limoneno y el timol, se mantienen presentes (Torres-Martínez *et al.*, 2014).

En la literatura se hace mención que los compuestos terpénicos pueden presentar una amplia gama de actividades farmacológicas, con efectos cardioprotectores, neuroprotectores, antimicrobianos, anticancerosos, analgésicos, antioxidantes, antiinflamatorios, entre otros. El carvacrol, eugenol y timol obtenidos a partir de

plantas medicinales se han probado para inhibir eficazmente los patógenos transmitidos por alimentos tales como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* y *Vibrio vulnificus* (Ebani *et al.*, 2016). Los terpenos β -pineno, careno, bornil acetato, β -terpineol y timol obtenidos de *Abies balsamea* demostraron citotoxicidad sobre seis líneas celulares tumorales sólidas (MCF-7, PC-3, A-549, DLD-1, M4BEU y CT-26) (Legault *et al.*, 2003). El efecto antioxidante ejercido por los terpenos linalol, *p*-cimeno y anetol extraídos de plantas de lavanda demostraron que mejoran la actividad de la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) (Hancianu *et al.*, 2013).

Con el interés de determinar la actividad antioxidante y antiinflamatoria del aceite esencial y conocer la participación en estas propiedades de sus componentes terpénicos, en el presente estudio se evaluó el potencial antioxidante y antiinflamatorio del aceite esencial de *S. macrostema* obtenido por hidrodestilación de partes aéreas frescas (hojas y tallos), identificando la función de los principales terpenos presentes, realizando ensayos *in vitro* de medición de actividad por DPPH, ABTS y Capacidad Total Antioxidante (TAC), pruebas de citotoxicidad en células de endotelio de vena umbilical bovina (BUVEC), así como el efecto antioxidante en las BUVEC tratadas con H₂O₂ sobre la actividad enzimática y producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. De igual manera, se estudió la participación en la expresión de genes de la respuesta inflamatoria de las BUVEC tratadas con LPS.

En el aceite esencial de nurite, los terpenos mayoritarios fueron identificados y cuantificados por CG-EM, siendo los principales pulegona (25.50%), linalol (16.62%), timol (14.64%), limoneno (5.53%), cariofileno (3.98%) y mentona (3.09%). Esta composición al compararse con el extracto hexánico, reportado previamente en nuestro grupo de trabajo (Torres-Martínez *et al.*, 2014), se observó que es similar tanto en el contenido como en sus componentes, con excepción del compuesto cariofileno, no encontrado en el aceite esencial obtenido por extracción hexánica. En ambos, la pulegona es el terpeno mayoritario, lo que ha sido reportado en el aceite esencial de otras plantas de la familia Lamiaceae, a la que pertenece *S. macrostema*,

como *Mentha pulegium*, *M. piperita* y especies de *Satureja* como *S. parvifolia* y *S. odora* (Muschiatti *et al.*, 1996; Zapata y Fernández, 1999; Aghel *et al.*, 2004).

La actividad antioxidante del aceite esencial de *S. macrostema* y los terpenos mayoritarios pulegona, linalol, timol, limoneno, cariofileno y mentona fue demostrada inicialmente mediante la generación de radicales libres *in vitro* con los métodos DPPH, ABTS y TAC, encontrando que el aceite esencial presentó una alta actividad antioxidante con los tres métodos evaluados (53.11%, 92.12% y 98.25%, respectivamente). Dicha actividad antioxidante ha sido reportada para el aceite esencial de diversas plantas de la familia Lamiaceae como *Melissa officinalis*, *Pogostemon cablin* y *Rosmarinus officinalis*, donde la actividad fue superior al 50% a concentraciones superiores de 3 mg/mL (Ávila-Sosa *et al.*, 2011; Hussain *et al.*, 2011; Beidokhti y Prakash, 2013).

Pérez-Gutiérrez y Gallardo-Navarro (2010) determinaron la capacidad antioxidante del extracto metanólico de *S. macrostema* el cual exhibió potente captación de radicales libres mediante el método DPPH, este efecto fue atribuido al contenido de fenoles presentes en el extracto. Sin embargo, previo esta investigación, se desconocía si los compuestos terpénicos del aceite esencial de *S. macrostema* presentaban también actividad antioxidante, lo que fue demostrado por los tres métodos de eliminación de radicales libres utilizados en la presente investigación.

De este aceite esencial, se encontró que el timol ejerce la mayor capacidad de atrapamiento de radicales libres superando el 94% en los tres métodos de eliminación de radicales libres. Mientras que, pulegona, linalol, limoneno, cariofileno y mentona mostraron una actividad antioxidante baja o casi nula; indicando que los terpenos presentes en el aceite esencial de *S. macrostema*, ejercen una capacidad de eliminación de radicales libres, siendo el timol el principal responsable de este efecto. Sin embargo, el limoneno mostró la mayor actividad antioxidante determinada por el método TAC con 98.74%, porcentajes más alto que el ácido ascórbico. El efecto sinérgico entre los terpenos del aceite esencial de *S. macrostema* puede

deberse a la interacción de monoterpenos con sustituyentes hidroxilo, como timol, limoneo y linalol (Beidokhti y Prakash, 2013).

Con base en estos resultados, se determinó la actividad antioxidante y antiinflamatoria en un modelo de endotelio *in vitro* (línea celular BUVEC), en el que se indujo estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno y respuesta inflamatoria con lipopolisacárido. Se ha reportado que la exposición de las células endoteliales a compuestos tóxicos oxidantes como el peróxido de hidrogeno, o productos bacterianos como el lipopolisacárido, activan las células endoteliales produciéndose una respuesta inflamatoria que incluyen expresión aumentada de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), selectina P, regulación ascendente de la proteína 1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1), liberación de citocinas, quimiocinas, especies reactivas de oxígeno y nitrógeno hacia el sitio de la inflamación debido a la activación del NF- κ B, por lo que las células endoteliales son utilizadas como un modelo de la activación del endotelio (Schouten *et al.*, 2008; Alva-Murillo *et al.*, 2012; Donato *et al.*, 2015; Konradi *et al.*, 2015; Sies, 2015).

Los datos indican que el aceite esencial y los terpenos de *S. macrostema* no mostraron efecto citotóxico sobre las células BUVEC a las concentraciones de 1, 10 y 100 μ g/mL. Los principales mecanismos que median los efectos citotóxicos de los aceites esenciales incluyen la inducción de la muerte celular mediante la activación de procesos de apoptosis y/o necrosis, detención del ciclo celular y pérdida de la función de los orgánulos esenciales. Varios de estos efectos son atribuidos a la naturaleza lipofílica y al bajo peso molecular de los componentes principales que comprenden aceites esenciales, como los terpenos, que les permiten atravesar las membranas celulares, alterando la composición de dichas membranas e incrementando la fluidez a través de ellas, provocando la fuga de iones y moléculas citoplásmicas. La alteración de las membranas conduce a una producción reducida de ATP, a una alteración del gradiente de pH y a la pérdida del potencial mitocondrial que puede provocar la muerte celular. Estos mecanismos por los cuales actúan los terpenos son dependientes de su proporción o contenido en que están presentes en

los aceites esenciales. (Bayala *et al.*, 2014; Freires *et al.*, 2015; Russo *et al.*, 2015). En relación con lo anterior, el aceite esencial de *S. macrostema* y sus terpenos a las concentraciones de 1, 10 y 100 µg/mL no mostraron citotoxicidad en las BUVEC debido a que dichas cantidades no fueron suficientes para inducir eventos de necrosis celular como se muestra en la figura 6, debido a que el efecto de los terpenos por los mecanismos antes mencionados es dependiente de la concentración en que se encuentren en el aceite esencial, tal como se hizo énfasis anteriormente.

Algunos aceites esenciales también pueden actuar como elementos generadores de especies oxidantes que pueden alterar el estado redox celular y también comprometer la supervivencia celular (Zitzelsberger y Buchbauer, 2015). A las concentraciones antes indicadas, tanto el aceite esencial de *S. macrostema* como los terpenos mayoritarios, mostraron un efecto sobre la disminución de la producción de especies reactivas de oxígeno a nivel citoplasmático y mitocondrial, así como disminuyeron el radical superóxido, hidroxilo y el óxido nítrico en las células BUVEC expuestas a peróxido de hidrógeno (H₂O₂) como inductor del estrés oxidativo.

Además, el aceite esencial aumentó aproximadamente dos veces más la actividad de la enzima antioxidante catalasa, demostrándose en este trabajo la capacidad antioxidante que presenta este aceite esencial al proteger del daño oxidativo generado por el H₂O₂. Este efecto sobre la enzima catalasa ha sido reportado para los aceites esenciales de plantas como *Panax ginseng* y *Alpiniae zerumbet*, al inducir estrés oxidativo en células HepG2 y HUVEC, respectivamente (Shen *et al.*, 2012; Bak *et al.* 2014).

Adicionalmente, el aceite esencial propició un ambiente antiinflamatorio disminuyendo la expresión del gen de TNF-α (más de 6 veces), una citocina proinflamatoria, y aumentando la expresión de la citocina antiinflamatoria IL-10 (más de 14 veces) en las BUVEC. Anteriormente, se desconocía si el aceite esencial participaba regulando los mecanismos de estrés oxidativo como producción de ERO

y ERN, así como la activación de los sistemas antioxidantes enzimáticos y la regulación de la respuesta inflamatoria en un modelo de cultivo *in vitro* de endotelio vascular, por lo que este trabajo demuestra la primera evidencia de que el aceite esencial de *S. macrostema* y sus principales terpenos participan en la regulación de la activación de las células endoteliales.

Los aceites esenciales de diversas plantas de la familia Lamiaceae muestran actividad antioxidante en células expuestas a compuestos inductores del estrés oxidativo como el H₂O₂, entre ellas *Mentha piperita*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* y *Thymus vulgaris*. De igual forma, se ha reportado que el aceite esencial de plantas como *Eugenia caryophyllata*, *Lippia multiflora*, *Mentha piperita*, *Ocimum basilicum*, *Matricaria chamomilla* y *Melissa officinalis*, presentan actividad antiinflamatoria al regular la producción o expresión génica de mediadores inflamatorios como las citocinas (Dimitrijević *et al.*, 2007; Daniel *et al.*, 2009; Bassolé *et al.*, 2010; Kamatou y Viljoen, 2010; Miguel *et al.*, 2011; Müzell *et al.*, 2013; Benabdallah *et al.*, 2016).

Además, se ha demostrado que el aceite esencial de plantas del género *Satureja* presentan capacidad antioxidante y antiinflamatoria, entre ellas *Satureja montana*, *S. hortensis*, *S. thymbra*, *S. khuzestanica* y *S. cuneifolia*. Los terpenos como timol, *p*-cimeno, linalol, β-ocimeno, carvacrol, terpineno, borneol, eugenol y espatunelol son los principales compuestos encontrados en estas plantas, a los cuales se les han atribuido dichos efectos (Serrano *et al.*, 2011; Giweli *et al.*, 2012; Hajhashemi *et al.*, 2012; Bagheri *et al.*, 2013; Ćavar *et al.*, 2013; Moghadam, 2015; Abbasloo *et al.*, 2016). La mayoría de los aceites esenciales han sido investigados por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias y, en consecuencia, por su uso potencial en el tratamiento de enfermedades inflamatorias (Zitzelsberger y Buchbauer, 2015).

En el caso particular del timol, mostró que posee la mayor actividad antioxidante y antiinflamatoria en el modelo de las células BUVEC, superando al efecto ejercido por

el aceite esencial de *S. macrostema* y los demás terpenos evaluados (limoneno, linalol, mentona, pulegona y cariofileno). Se encontró que la producción de ERO mitocondriales y citoplasmáticas fue disminuida de forma significativa; de igual manera el timol disminuyó el radical superóxido, radical hidroxilo, óxido nítrico; Así mismo, la actividad de la catalasa fue incrementada en las tres concentraciones de timol evaluadas.

Por otro lado, la pulegona siendo el terpeno mayoritario del aceite esencial de *S. macrostema*, disminuyó la producción de especies reactivas de oxígeno a nivel citoplasmático y mitocondrial, del radical superóxido, del radical hidroxilo y del óxido nítrico en las BUVEC estresadas con H₂O₂. De igual manera, disminuyó la expresión del TNF- α en las células expuestas a LPS (100 ng/mL), pero no presentó un efecto significativo sobre la actividad de la catalasa y expresión génica de IL-10.

Se ha reportado que el timol es responsable de la actividad antioxidante de varios aceites esenciales donde está presente, como el caso de *Thymus spathulifolius*, *T. vulgaris* y *Origanum vulgare*, *Satureja thymbra*, *S. montana* y *S. parnassica* (Kulisic *et al.*, 2004; Beidokhti y Prakash, 2013; Fitsiou *et al.*, 2016). Estas propiedades son debidas a la presencia del grupo hidroxilo fenólico en su estructura, el cual presenta una potente actividad antioxidante al absorber y neutralizar los radicales libres (Venu *et al.*, 2013).

Ocaña y Reglero (2012) demostraron que el aceite esencial de *Thymus vulgaris*, *T. zygis* y *T. hyemalis* que contienen timol como compuesto mayoritario, regulan la respuesta inflamatoria de macrófagos THP-1 a través de la activación del factor transcripcional NF- κ B, ya que dichas células sobre-expresan el gen de IL-10 y disminuyen la expresión de las citocinas IL-1 β , IL-6 y TNF- α . La actividad antioxidante y antiinflamatoria de los aceites que contienen timol ha sido validada tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, demostrando que este terpeno es el responsable de dichas actividades (Aazza *et al.*, 2011; Fachini-Queiroz *et al.*, 2012; Sharifi-Rad *et al.*, 2017), lo que concuerda con lo observado en esta investigación.

La pulegona es el terpeno que se encuentra en mayor cantidad en el aceite esencial de *S. macrostema* y de acuerdo con este trabajo, este terpeno ejerce una actividad antioxidante al disminuir las especies oxidativas de oxígeno y nitrógeno, la literatura indica que altas concentraciones de dicho monoterpeno cetónico proporcionan una baja reactividad a los aceites esenciales que los poseen, tal es el caso del aceite esencial de *Mentha pulegium* que mostró una baja actividad para eliminar los radicales libres (Sarikurkcu *et al.*, 2012).

En este contexto, la amplia variación en el perfil químico de los aceites esenciales encontrada en el nuriite significa una gran diversidad en los mecanismos de acción y blancos moleculares. Además, debido a que estos aceites están conformados de una amplia variedad de compuestos con estructuras diversas, cada compuesto puede modular o alterar los efectos de los otros. Por lo que, el efecto sinérgico entre los terpenos del aceite esencial de *S. macrostema* puede deberse a la interacción de monoterpenos con sustituyentes hidroxilo, como timol y linalol. Además, la combinación de limoneno y cariofileno potencia este efecto como se ha reportado para el aceite esencial de varias plantas medicinales (Sitarek *et al.*, 2017).

10. CONCLUSIONES GENERALES

El aceite esencial de *Satureja macrostema* presentó un efecto antioxidante y antiinflamatorio al eliminar los radicales libres generados *in vitro* y al proteger a las células de endotelio de vena umbilical bovina (BUVEC) del generado por la exposición a peróxido de hidrógeno y por lipopolisácarido. El aceite esencial disminuyó la producción de ERO y ERN, incrementando la actividad de la catalasa y favoreciendo un estado antiinflamatorio al regular la expresión génica de citocinas involucradas en la respuesta inflamatoria.

La concentración de los terpenos mayoritarios del aceite esencial de *S. macrostema* determinaron que estos efectos antioxidantes y antiinflamatorios son ejercidos principalmente por el timol, ya que éste presentó efectos superiores que el aceite esencial y los terpenos pulegona, mentona, limoneno, linalol y cariofileno que están presentes en el aceite esencial de *S. macrostema*.

11. PERSPECTIVAS

Determinar el efecto del aceite esencial y los compuestos terpénicos mayoritarios de *S. macrostema* sobre la expresión génica de mediadores inflamatorios enzimáticos como eNOS, COX-1 y COX-2 en células endoteliales bovinas (BUVEC).

Determinar la toxicidad y los efectos antioxidante y antiinflamatorio del aceite esencial y los compuestos terpénicos mayoritarios de *S. macrostema* en modelos *in vivo*.

12. REFERENCIAS GENERALES

Aguilar, R. J. M. 2002. Especiación recombinacional y relaciones filogenéticas en *Satureja macrostema* var. *laevigata*. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Colima. 43 p.

Aitken, S.L., Corl, C. M. y Sordillo, L. M. 2011. Pro-inflammatory and pro-apoptotic responses of TNF-alpha stimulated bovine mammary endothelial cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 140: 282-290.

Alluwaimi, A. M. 2004. The cytokines of bovine mammary gland: prospects for diagnosis and therapy. *Research in Veterinary Science*. 77: 211-222.

Alva-Murillo, N., Ochoa-Zarzosa, A. y López-Meza, J. E. 2012. Short chain fatty acids (propionic and hexanoic) decrease *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells and modulate antimicrobial peptide expression. *Vet. Microbiol*. 155: 324-331.

Al-Soudi, A., Kaaj, M. H. y Tas, S. W. 2017. Endothelial cells: From innocent bystanders to active participants in immune responses. *Autoimmunity Reviews*. 16: 951-962.

Amanlou, M., Dadkhah, F., Salehnia, A. y Farsam, H. 2005. An anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of hydroalcoholic extract of *Satureja khuzistanica* Jamzad extract. *J Pharm Pharmaceut Sci*. 8(1): 102-106.

Ames, B. N., Shinenaga, M. K. y Hagen, T. M. 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 90: 7915-7922.

Andres, A.C. y Djono, V. 2010. The mammary gland vasculature revisited. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 15: 319-328.

Aruoma, O. 2003. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation Res*. 523-524: 9-20.

Ashley, N. T., Weil, Z. M. y Nelson, R. J. 2012. Inflammation: mechanisms, costs, and natural variation. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst*. 43: 385-406.

Ávalos, G. A. y Pérez-Urria, C. E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal. 2(3): 119-145.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. y Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2): 446-475.

Banasik, C. Inflammation and immunity. 2000. En: *Pathophysiology: Biological and Behavioral perspectives*. Pennsylvania: W.B. Saunders Company. pp. 197-201.

Bassolé, I. H. N., Lamien-Meda, A., Bayala, B., Tirogo, S., Franz, C., Novak, J., Nebié, R. C. y Dicko, M. H. 2010. Composition and antimicrobial activities of *Lippia Multiflora moldenke*, *Mentha piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. Essential oils and their major monoterpene alcohols alone and in combination. *Molecules*. 15: 7825-7839.

Bayala, B., Bassole, I. H., Scifo, R., Gnoula, C., Morel, L., Lobaccaro, J. M. y Simpire, J. 2014. Anticancer activity of essential oils and their chemical components: A review. *Am. J. Cancer Res.* 19: 591-607.

Bello, G. M. A. 1993. Plantas útiles no maderables de la Sierra Purépecha, Michoacán, México, INIFAP. México. Folleto Técnico No. 10. 115 p.

Bello, G. M. A. 2006. Catálogo de plantas medicinales de la comunidad Indígena Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán. México. Libro Técnico No. 4. Campo Experimental Uruapan. CIRPAC. INIFAP. Michoacán, México. 138 p.

Bello, G. M. A., Molina, T. J., Calderón, M. J., García, Ch. A. y Salgado, G. R. 2006. Propiedades antimicrobianas y análisis fitoquímico de seis plantas medicinales de la comunidad indígena Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México. 2º Congreso de Investigación Científica. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México.

Bichra, M., El-Modafar, C., El-Boustani, E. y Benkhalti, F. 2012. Antioxidant and anti-browning activities of *Mentha suaveolens* extracts. *Afr. J. Biotechnol.* (11): 8722-8729.

Boukhatem, M. N., Ferhat, M. A., Kameli, A., Saidi, F. y Kebir, H. T. 2014. Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. *Libyan J Med.* 9: 1-10.

Bucci, M., Roviezzo, F., Posadas, I., Yu, J., Parente, L., Sessa, W. C., Ignarro, L. J. y Cirino, G. 2005. Endothelial nitric oxide synthase activation is critical for vascular leakage during acute inflammation *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102: 904-908.

Calixto, J. B., Otuki, M. F. y Santos, A. R. S. 2003. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor κ B (NF- κ B). *Planta Med.* 69: 973-983.

Cañigüeral, S. y Vila, R. 2003. La fitoterapia racional. En *Fitoterapia. Vademecum de prescripción*. Vanaclocha, B., Cañigüeral, S (Eds). Masson. 1091 p.

Cardona, L. E. H. y Mejía, L. F. G. 2009. Evaluación del efecto antioxidante de aceites esenciales y extractos de *Eugenia caryophyllata*, *Origanum vulgare* y *Thymus vulgaris*. *Biosalud*. 8: 58-70.

Carlson, R. P., O'Neill-Davis, L., Chang, J. y Lewis, A. J., 1985. Modulation of mouse ear edema by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacologic agents. *Inflammation Research*. 17(2): 197-204.

Castardo, J. C., Prudente, A.S. y Ferreira, J. 2008. Anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract and two biflavonoids from *Garcinia gardneriana* leaves in mouse paw oedema. *Journal of Ethnopharmacology*. 18: 405-411.

Chen, J. H., Lee, M. S., Wang, C. P., Hsu, C. C. y Lin, H. H. 2016. Autophagic effects of *Hibiscus sabdariffa* leaf polyphenols and epicatechin gallate (ECG) against oxidized LDL-induced injury of human endothelial cells. *European Journal of Nutrition*. 2016: 1–19.

Clevers, H. 2004. At the crossroads of inflammation and cancer. *Cell*. 118(6): 671-674.

Corl, C. M., Gandy, J. C. y Sordillo, L. M. 2008. Platelet activating factor production and proinflammatory gene expression in endotoxin-challenged bovine mammary endothelial cells. *Journal of Dairy Science*. 91: 3067-3078.

Corl, C. M., Contreras, G. A. y Sordillo, L. M. 2010. Lipoxigenase metabolites modulate vascular-derived platelet activating factor production following endotoxin challenge. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 136: 98-107.

Corley, D. A., Kerlikowske, K., Verma, R. y Buffler, P. 2003. Protective association of aspirin/NSAIDs and esophageal cancer: a systematic review and metaanalysis. *Gastroenterology*. 124: 47-56.

Crotan, R., Kumar, V. y Robbins, S. L. 1990. Volumen I Patología estructural y funcional. 4ª. edición. McGraw-Hill Interamericana Editores, Madrid. pp. 39-67.

Da Silva, G. L., Luft, C., Lunardelli, A., Amaral, R. H., Da Silva, D. A., Donadio, M. V. F. *et al.* 2015. Antioxidant, analgesic and anti-inflammatory effects of lavender essential oil. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 87(2): 1397-1408.

Damián-Badillo, L. M., Salgado-Garciglia, R., Martínez-Muñoz, R. E. y Martínez-Pacheco, M. M. 2008. Antifungal properties of some Mexican medicinal plants. *The Open Natural Products Journal*. 1: 27-33.

Daniel, A. N., Sartoretto, S. M., Schmidt, G., Caparroz-Assef, S. M., Bersani-Amado, C. A. y Cuman, R. K. N. 2009. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of eugenol essential oil in experimental animal models. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 19(1B): 212-217

Deng, J. S., Chi, C. S., Huang, S. S., Shie, P. H., Lin, T. H. y Huang, G. J. 2011. Antioxidant, analgesic, and anti-inflammatory activities of the ethanolic extracts of *Taxillus liquidambaricola*. *Journal of Ethnopharmacology*. 137(3): 1161-1171.

Dewick, P. M. 2009. *Medicinal Natural Products (Third Edition)*. John Wiley & Sons Ltd, England. 6: 331-420.

Dudareva, N. y Negre, F. 2005. Practical applications of research into the regulation of plant volatile emission. *Curr. Op. Plant Biol.* 8: 113-118.

Dung, N. T., Bajpai, V. K., Yoon, J. I. y Kang, S. C. 2009. Anti-inflammatory effects of essential oil isolated from the buds of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry. *Food Chem. Toxicol.* 47: 449-453.

Dutra, R. C., Fava, M. B., Alves, C. S. C., Ferreira, A. P. y Barbosa, N. R. 2009. Antiulcerogenic and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Pterodon emarginatus* seeds. *J. Pharm. Pharmacol.* 61: 243-250.

Ebani, V. V., Nardoni, S., Bertelloni, F. *et al.* 2016. Antibacterial and antifungal activity of essential oils against some pathogenic bacteria and yeasts shed from poultry. *Flavour and Fragrance Journal.* 31(4): 302-309.

El-Kashoury, E.A., El-Askary, H.I., Kandi, Z.A., Ezzat, S.M., Salem, M.A. y Sleem, A.A. 2014. Chemical and biological study of *Mentha suaveolens* Ehrh. cultivated in Egypt. *J. Med. Plants Res.* (8): 747-755.

Eminagaoglu, O., Tepe, B., Yumrutas, O., Askin, A., Daferera, D., Polissiou, M., Sokmen, A. 2007. The *in vitro* antioxidative properties of the essential oils and metanol extracts of *Satureja spicigera* (K. Koch.) Boiss. and *Satureja cuneifolia* ten. *Food Chemistry.* 100: 339-343.

Eming, S. A., Wynn, T. A. y Martin, P. 2017. Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. *Science* 356: 1026-1030.

Fahey, A. J., Robins, A. R. y Constantinescu, C. S. 2007. Curcumin modulation of IFN- and IL-12 signalling and cytokine induction in human T cells. *J Cell Mol Med.* 11: 1129-1137.

Food and Drug Administration (FDA). 2005. <http://www.fda.gov/cder/drug/infopage/celebrex/celebrex-hcp.htm>. (Consultado 10.01.2014)

Forlín, A. M. 2012. Plantas aromáticas: diferentes formas de multiplicación. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Primera edición. El Colorado-Formosa, Argentina. pp. 4-13.

Freires, I. A., Denny, C., Benso, B., de Alencar, S. M. y Rosalen, P. L. 2015. Antibacterial activity of essential oils and their isolated constituents against cariogenic bacteria: A systematic review. *Molecules.* 20: 7329-7358.

Gershenson, C. y Wisdom, T. N. 2013. Previniendo enfermedades crónico-degenerativas con vacunas sociales. *Cir Cir.* 81: 83-84.

Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J. L. F. C., Mira, L., Corvo, M. L. 2008. Molecular mechanisms of anti-inflammatory activity mediated by flavonoids. *Curr. Med. Chem.* 15: 1586-1605.

Gómez, H. A. E., González, K. N. R. y Medina, J. D. 2011. Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.* 10(3): 182-217.

González-Guevara, M. C., Ospina-Giraldo, L. F. y Rincón, J. V. 2011. Actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones de *Myrcianthes leucoxila*, *Calea prunifolia*, *Curatella americana* y *Physalis peruviana* en los modelos edema auricular por TPA, edema plantar por carragenina y artritis inducida por colágeno. *Biosalud*. 10(1): 9-18.

Govaerts, R. 2017. WCSP: World Checklist of Selected Plant Families (version Aug 2017). In: Roskov, Y., Abucay, L., Orrell, T., Nicolson, D., Bailly, N., Kirk, P. M., Bourgoin, T., DeWalt, R. E., Decock, W., De Wever, A., Nieukerken, E., Zarucchi, J. y Penev, L. eds. (2018). *Species 2000 & ITIS Catalogue of Life*, 20th December 2017. Digital resource at www.catalogueoflife.org/col. Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands. ISSN 2405-8858.

Graham, A.L., Allen, J.E. y Read, A. F. 2005. Evolutionary causes and consequences of immunopathology. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 36 :373-393.

Güllüce, M., Sokmen, M., Daferera, D., Agar, G., Ozkan, H., Kartal, N. 2003. *In vitro* antibacterial, antifungal and antioxidant activities of the essential oil, methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 3958-3965.

Hajhashemi, V., Zolfaghari, B y Yousefi, A. 2011. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Satureja hortensis* seed essential oil, hydroalcoholic and polyphenolic extracts in animal models. *Med Princ Pract*. 21: 178-182.

Halliwell, B. 1997. What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo? *FEBS Lett*. 411: 157-160.

Halliwell, B. y Gutteridge, J. M. C. 1999. *Free radicals in Biology and Medicine*. 3rd edition. Oxford: Oxford, University press. 896 pp.

Hancianu, M., Cioanca, O., Mihasan, M. y Hritcu, L. 2013. Neuroprotective effects of inhaled lavender oil on scopolamine-induced dementia via anti-oxidative activities in rats. *Phytomedicine*. 20(5): 446-452.

Harris, W. S. y Schacky, C. 2004. The Omega-3 Index: A new risk factor for death from coronary heart disease? *Prev Med*. 39: 212-20.

Hawley, D. M. y Altizer, S. M. 2010. Disease ecology meets ecological immunology: understanding the links between organismal immunity and infection dynamics in natural populations. *Funct. Ecol*. 25:48-60.

Hort, M. A., Straliootto, M. R., de Oliveira, J., Amoêdo, N. D., da Rocha, J. B., Galina, A., Ribeiro-do-Valle, R. M. y de Bem, A. F. 2014. Diphenyl diselenide protects endothelial cells against oxidized low-density lipoprotein-induced injury: involvement of mitochondrial function. *Biochimie*. 105: 172-181.

Ighodaro, O. M. y Akinloye, O. A. 2017. First line defense antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx): their fundamental role in the entire antioxidant defense grid. *Alex J Med*. Article in Press. DOI: 10.1016/j.ajme.2017.09.001.

Jafari, F., Ghavidel, F. y Zarshenas, M. M. 2016. A critical overview on the pharmacological and clinical aspects of popular *Satureja* species. *J Acupunct Meridian Stud.* 9(3): 118-127.

Jamuna, S., Sadullah, S. M. S., Ashokkumar, R., Shanmuganathan, G., Mozhi, S. S. y Devaraj, N. 2017. Potential antioxidant and cytoprotective effects of essential oil extracted from *Cymbopogon citratus* on OxLDL and H₂O₂ LDL induced Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC). *Food Science and Human Wellness.* 6(2): 60-69.

Juhás, Š., Bujňáková, D., Reháč, P., Cikoš, Š., Czikková, S., Veselá, J., Il'ková, G. y Koppel, J. 2008. Anti-inflammatory effects of thyme essential oil in mice. *Acta Vet. Brno.* 77: 327-334.

Kamatou, G. P. P. y Viljoen, A. M. 2010. A review of the application and pharmacological properties of α -bisabolol and α -bisabolol rich oils. *Journal of the American Oil Chemists Society.* 87(1): 1-7.

Kapewangolo, P., Omolo, J. J., Bruwer, R., Fonteh, P. y Meyer, D. 2015. Antioxidant and anti-inflammatory activity of *Ocimum labiatum* extract and isolated labdane diterpenoid. *J Inflamm (Lond).* 12(4): 1-13.

Karadag, A., Ozcelik, B. y Saner, S. 2009. Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Anal. Methods.* 2: 41-60.

Kim, Y. S., Kim, T., Moon, K., Kim, T. J., Shin, D., Cho, Y. S., Moon, H. y Lee K. 2008. Regulation of pro-inflammatory responses by lipoxygenases via intracellular reactive oxygen species *in vitro* and *in vivo*. *Experimental and Molecular Medicine.* 40(4): 461-476.

Kim, W. S., Choi, W. J., Lee, S., Kim, W. J., Lee, D. C., Sohn, U. D, Shin, H. S. y Kim, W. 2015. Anti-inflammatory, Antioxidant and Antimicrobial Effects of Artemisinin Extracts from *Artemisia annua* L. *Korean J Physiol Pharmacol.* 19(1): 21-27.

Kobayashi, K., Oyama, S., Numata, A., Rahman, M. M. y Kumura, H. 2013. Lipopolysaccharide disrupts the milk-blood barrier by modulating claudins in mammary alveolar tight junctions. *PLoS ONE.* 8: e62187.

Kolac, U. K., Ustuner, M. C., Tekin, N., Ustuner, D., Colak, E. y Entok, E. 2017. The anti-Inflammatory and antioxidant effects of *Salvia officinalis* on lipopolysaccharide-induced inflammation in rats. *J Med Food.* 20(12): 1193-1200.

Lange, D. 2006. International trade in medicinal and aromatic plants. En *Medicinal and aromatic plants. Agricultural, commercial, ecological, legal, pharmacological and social aspects.* Bogers, R., Craker, L, Lange, D (Ed). Springer. 309 p.

Lansky, E. P. y Newman, R. A. 2007. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology.* 109: 177-206.

Lathe, R., Saprionova, A. y Kotelevtsev, Y. 2014. Atherosclerosis and Alzheimer-diseases with a common cause? Inflammation, oxysterols, vasculature. BMC Geriatr. 14(36-2318): 14-36.

Laudanna, C. y Alon, R. 2006. Right on the spot. Chemokine triggering of integrin-mediated arrest of rolling leukocytes. Thromb Haemost. 95: 5-11.

Lawrence, T. y Gilroy, D. W. 2007. Chronic inflammation: a failure of resolution?. International Journal of Experimental Pathology. 88: 85-94.

Lee, S. K., Mbwambo, Z. H., Chung H. S., Luyengi, L., Games, E. J. C. y Mehta, R. G. 1998. Evaluation of the antioxidant potential of natural products. Comb. Chem. High T. Scr. 1: 35-46.

Leem, H. H., Kim, E. O., Seo, M. J., y Choi, S. W. 2011. Antioxidant and Anti-Inflammatory activities of Eugenol and its derivatives from Clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 40(10): 1361-1370.

Legault, J., Dahl, W., Debiton, E., Pichette, A. y Madelmont, J. C. 2003. Antitumor activity of balsam fir oil: Production of reactive oxygen species induced by α -humulene as possible mechanism of action. Planta Med. 69: 402-407.

Leyva, H. E. R. y Quezada, R. D. 2008. Respuesta inflamatoria. En: Patología general e inmunología. Editorial Trillas, México. pp. 149-184.

Liu, F., Ooi, V. E. C. y Chang, S. T. 1997. Free radical scavenging activity of mushroom polysaccharide extracts. Life Science. 60: 763-771.

López-Luengo, M. T. 2003. Plantas medicinales antiinflamatorias utilizadas en el tratamiento del reumatismo. Fitoterapia. 22(6): 118-122.

Lubos, E., Kelly, N. J., Oldebeken, S. R., Leopold, J. A., Zhang, Y. Y., Loscalzo, J. y Handy, D. E. 2011. Glutathione peroxidase-1 deficiency augments proinflammatory cytokine-induced redox signaling and human endothelial cell activation. Journal of Biological Chemistry. 286: 35407-35417.

Mamadaliyeva, N. Z., Akramov, D. K., Ovidi, E., Tiezzi, A., Nahar, L., Azimova, S. S. y Sarker, S. D. 2017. Aromatic medicinal plants of the Lamiaceae family from uzbekistan: ethnopharmacology, essential oils composition, and biological activities. Medicines. 4(8): 1-12.

Maroon, J. C., Bost, J. W. y Maroon, A. 2010. Natural anti-inflammatory agents for pain relief. Surg Neurol Int. 1: 80.

Martínez, R. C., García, S. M., Martínez, M. S. M, Larionova, M., Sebazco, P. C., Machí, L. M. y Ruiz, A. V. 2004. Evaluación antiinflamatoria del flavonoide 2''-o-ramnosil 4''-o-metil vitexina en ratas. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 9 (1): 112-125.

Medzhitov, R., Schneider, D. S. y Soares, M. P. 2012. Disease tolerance as a defense strategy. *Science* 335: 936-41.

Mehrad, B. Keane, M. P. y Strieter, R. M. 2007. Chemokines as mediators of angiogenesis. *Thrombosis and Haemostasis*. 97(5): 755-762.

Mesa-Vanegas, A. M., Zapata-Uribe, S., Arana, L. M., Zapata, I. C., Monsalve, Z. y Rojano, B. 2015. Actividad antioxidante de extractos de diferente polaridad de *Ageratum conyzoides* L. *BLACPMA*. 14(1): 1-10.

Miguel, M. G. 2010. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. *Flavour Fragr. J.* 25: 291-312.

Miyasaka, N. y Hirata, Y. 1995. Nitric oxide and inflammatory arthritides (minireview). *Life Sci.* 61:2073-2081.

Montuschi, P., Barnes, P. J. y Jackson, R. L. 2004. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *The FASEB Journal*. 18: 1791-1797.

Moré, E., Fanlo, M., Melero, R., Cristóbal, R. 2010. Guía para la producción sostenible de plantas aromáticas y medicinales. Centro Tecnológico Forestal de Cataluña, Productos Secundarios del Bosque, Solsona. 11-127 pp.

Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65: 55-63.

Mudau, M., Genis, A., Lochner, A. y Strijdom, H. 2012. Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis. *Cardiovascular Journal of Africa*. 23(4): 222-231.

Nathan C. 2002. Points of control in inflammation. *Nature*. 420: 846-852.

Nenadis, N., Wang, L. F., Tsimidou, M. y Zhang, H. Y. 2004. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS^{•+} Assay. *J. Agric. Food Chem.* 52: 4669-4674.

Newman, D. J., Cragg, G. M. y Snader, K. M. 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981 - 2002. *J Nat Prod*. 66: 1022-1037.

Olson, S.T., Richard, B., Izaguirre, G., Schedin-Weiss, S. y Gettins, P. G. 2010. Molecular mechanisms of antithrombin-heparin regulation of blood clotting proteinases. A paradigm for understanding proteinase regulation by serpin family protein proteinase inhibitors. *Biochimie*. 92: 1587-1596.

Ong, C. K. S., Lirk, P., Tan, C. H. y Seymour, R. A. 2007. An Evidence-Based Update on Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Clin Med Res*. 5(1): 19-34.

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2014. http://www.who.int/topics/chronic_diseases/es/. (Consultado 3.01.2014)

- Ozkan, G., Simsek, B., Kuleasan, H. 2007. Antioxidant activities of *Satureja cilicica* essential oil in butter and *in vitro*. Journal of Food Engineering. 79: 1391-1396.
- Pérez-Gutiérrez, R. M. y Gallardo-Navarro, Y. T. 2010. Antioxidant and hepatoprotective effects of the methanol extract of the leaves of *Satureja macrostema*. Pharmacogn Mag. 6(22): 125-131.
- Pountos, I., Georgouli, T., Bird, H. y Giannoudis, P. V. 2011. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: prostaglandins, indications, and side effects. International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research. 3: 19-27.
- Predescu, S., Knezevic, I., Bardita, C., Neamu, R. F., Brovcovich, V. y Predescu, D. 2013. Platelet activating factor-induced ceramide micro-domains drive endothelial NOS activation and contribute to barrier dysfunction. PLoS ONE. 8: e75846.
- Proell, M., Riedel, S. J., Fritz, J. H., Rojas, A. M. y Schwarzenbacher, R. 2008. The Nod-like receptor (NLR) family: a tale of similarities and differences. PLoS ONE. 3:e2199.
- Rad, J. S., Alfatehi, S. M. H. y Rad, M. S. 2014. In vitro assessment of antibacterial activity of *Salicornia herbacea* L. seed extracts against multidrug resistant grampositive and gram-negative bacteria. International Journal of Biosciences. 4(6): 217-222.
- Rahman, I., Biswas, S. K. y Kirkham, P. A. 2006. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. Biochem. Pharmacol. 72: 1439-1452.
- Rasheed, H. 2003. Studies of cyclooxygenase-1(COX-1) and cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors with analgesic, anti-inflammatory and anti-platelet activities. Tesis de doctorado, University of Karachi, <http://www.prr.hec.gov.pk/chapters/872-0.pdf>. (Consultado 6.01.2014).
- Redowski, J. y Redowski, G. 1985. Flora fanerogámica del valle de México. Volumen II. ENCB-INE:674.
- Ríos, J. L., Recio, M.C., Giner, R.M. y Máñez, S. 2004. Métodos de estudio *in vivo* de extractos y productos antiinflamatorios. En Nuevas Fuentes de Antioxidantes Naturales (Rosas A, ed.), CYTED, Caracas, pp. 107-116.
- Roach, J. C., Glusman, G., Rowen, L., Kaur, A., Purcell, M. K., Smith, K. D., Hood, L. E. y Aderem, A. 2005. The evolution of vertebrate Toll-like receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102: 9577-9582.
- Rodríguez, V. M. 1998. Flavonoides de la fase butanólica de la *Satureja macrostema*. Tesis de Licenciatura, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 34 p.
- Rodríguez-Yanez, Y., Bahena-Uribe, D., Chavez-Munguia, B., López-Marure, R., González-Monroy, S., Cisneros, B., Albores, A. 2015. Commercial single-walled carbon nanotubes effects in fibrinolysis of human umbilical vein endothelial cells. Toxicology In Vitro. 29(5): 1201-1214.

- Roginsky, V. y Lissi, E. A. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem.* 92: 235-254.
- Roome, T., Dar, A., Ali, S., Naqvi, S. y Iqbal, C. M. 2008. A study on antioxidant, free radical scavenging, anti-inflammatory and hepatoprotective actions of *Aegiceras corniculatum* (stem) extracts. *Journal of Ethnopharmacology.* 118: 514-521.
- Rosado-Pérez, J. y Mendoza-Núñez, V. M. 2007. Mini-revisión: Inflamación crónica y estrés oxidativo en la diabetes mellitus. *Bioquímica.* 32 (2): 58-69.
- Rudolph, E. H. y Woods, J. M. 2005. Chemokine expression and regulation of angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Current Pharmaceutical Design.* 11(5): 613-631.
- Russo, R., Corasaniti, M. T., Bagetta, G. y Morrone, L. A. 2015. Exploitation of cytotoxicity of some essential oils for translation in cancer therapy. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2015: 397-821.
- Schouten, M., Wiersinga, W. J., Levi, M. y van der Poll, T. 2008. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J. Leukoc. Biol.* 83: 536-545.
- Sears, B. F., Rohr, J. R., Allen, J. E. y Martin, L. B. 2011. The economy of inflammation: when is less more. *Trends Parasitol.* 27: 382-387.
- Serhan, C. N. y Savill, J. 2005. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat. Immunol.* 6: 1191-1197.
- Setty, A. R. y Sigal, L. H. 2005. Herbal medications commonly used in the practice of Rheumatology: Mechanisms of action, efficacy, and side effects. *Seminars Arthritis Rheum.* 34: 773-784.
- Sharifi-Rad, J., Hoseini-Alfatemi, S. M., Sharifi-Rad, M. y Setzer, W. N. 2015. Chemical composition, antifungal and antibacterial activities of essential Oil from *Lallemantia royleana* (benth. in wall.) benth. *Journal of Food Safety.* 35(1): 19-25.
- Sharifi-Rad, J., Sureda, A., Tenore, G. C., Daglia, M., Sharifi-Rad, M., Valussi, M., Tundis, R., Sharifi-Rad, M., Loizzo, M. R., Ademiluyi, A. O., *et al.* 2017. Biological Activities of Essential Oils: From Plant Chemoecology to Traditional Healing Systems. *Molecules.* 22(1): 70.
- Sheir, Z., Nasr, A. A., Massoud, A., Salama, O., Badra, G. A., El-Shennawy, H. 2001. A safe, effective, herbal antischistosomal therapy derived from myrrh. *Am J Trop Med Hyg.* 65: 700-704.
- Shen, X., Tao, L., Li, W., Zhang, Y., Luo, H. y Xia, Y. 2012. Evidence-based antioxidant activity of the essential oil from Fructus *A. zerumbet* on cultured human umbilical vein endothelial cells injury induced by ox-LDL. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* 12(174): 2-10.
- Singh, R., Akhtar, N. y Haqqi, T. M. 2010. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate: inflammation and arthritis. *Life Sci.* 86(25-26): 907-918.

Singh, S. y Singh, R. P. 2008. *In vitro* methods of assay of antioxidants: an overview. *Food Rev. Int.* 24: 392-415.

Sorci, G. y Faivre, B. 2009. Inflammation and oxidative stress in vertebrate host-parasite systems. *Philos. Trans. R. Soc. B.* 364: 71-78.

Sordillo, L. M. 2005. Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Livestock Production Sciences.* 98: 88-99.

Sugishita, E., Amagaya, S. y Ogihara, Y. 1981. Antinflammatory Testing Methods: Comparative Evaluation of Mice and Rats. *J. Pharm. Dyn.* 4: 565-575.

Swamy, M. K., Akhtar, M. S. y Sinniah, U. R. 2016. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: An updated review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* Article ID 3012462, 2016: 1-21.

Takeuchi, O. y Akira, S. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* 140(6): 805-820.

Terlecky, S. R., Terlecky, L. J. y Giordano, C. R. 2012. Peroxisomes, oxidative stress, and inflammation. *World J Biol Chem.* 3(5): 93-97.

Torres-Martínez, R. 2013. Determinación del contenido de compuestos volátiles en etapas de desarrollo y durante la fertilización y micorrización en Nurite [*Satureja macrostema* (Benth.) Briq]. Tesis de maestría en ciencias en biología experimental. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 118 pp.

Torres-Martínez, R., Bello-González, M. A., Molina-Torres, J., Ramírez-Chávez, E., García-Rodríguez, Y., Fulgencio-Negrete, R., García-Hernández, A., López-Gómez, R., Martínez-Pacheco, M. M., Lara-Chavéz, B. N. y Salgado-Garciglia, R. 2014. Efecto de la fertilización sobre el crecimiento y contenido de compuestos volátiles en *Satureja macrostema* 'Benth.' Briq. *Rev. Mex. Cien. For.* 5(21): 122-134.

Torres-Martínez, R. y Salgado-Garciglia, R. 2016. ¿Aromas que curan? *Revista de divulgación Saber Más* ISSN: 2007-7041. Año 4, 5(24): 14-17.

Vazquez, G., Fontenla, E., Santos, J., Freire, M. S., Gonzalez-Alvarez, J. y Antorrena, G. 2008. Antioxidant activity and phenolic content of chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. *Industrial Crops Prod.* 28: 279-285.

Wadsworth, T. L., McDonald, T. L. y Koop, D. R. 2001. Effects of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) and quercetin on lypopolysaccharide-induced signalling pathways involved in the release of tumor necrosis factor-alpha. *Biochem Pharmacol.* 62: 963-974.

Weber, C. y Noels, H. 2011. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nature Medicine.* 17(11): 1410-1422.

Weiss, U. 2008. Inflammation. *Nature*. 454(7203): 427.

Wen, C. L., Chang, C. C., Huang, S. S., Kuo, C. L., Hsu, S. L., Deng, J. S. y Huang, G. J. 2011. Anti-inflammatory effects of methanol extract of *Antrodia cinnamomea* mycelia both *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Ethnopharmacology*. 137(1): 575-584.

Winter, C. A., Risley, E. A. y Nuss, G. W. 1962. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med*. 111: 544-547.

Young, J. M. y De Young, L. M. 1989. Cutaneous Models of Inflammation for the Evaluation of Topical and Systemic Pharmacological Agent en *Pharmacological Methods in the Control of Inflammation* (Spector S y Back N, Eds.), New York. pp. 215-231.

Yoon, W. J., Kim, S. S., Oh, T. H., Lee, N. H. y Hyun, C. G. *Abies koreana* essential oil inhibits drug-resistant skin pathogen growth and LPS-induced inflammatory effects of murine macrophage. *Lipids*. 44: 471-476.

Zitzelsberger, C. y Buchbauer, G. 2015. Essential oils as “a cry for help”. A review. *Nat. Prod. Commun*. 10: 1127-1138.

13. ANEXOS

ANEXO 1. ARTÍCULO DE DIVULGACIÓN

Rafael Torres-Martínez y Rafael Salgado-Garciglia. 2016. ¿Aromas que curan? Saber Más, 5(24):14-17.

RESUMEN

Las plantas son fuente de una amplia variedad de compuestos químicos, conocidos como metabolitos secundarios, que son utilizados como fármacos, colorantes, saborizantes y fragancias, entre otros. Los metabolitos secundarios se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies. Dentro de sus funciones principales se tiene que determinan el color de la planta, protegen a la planta contra herbívoros y microorganismos, atraen a polinizadores, animales dispersores de semillas, y actúan como indicadores cuando la planta se encuentra bajo tensión; sin embargo, muchas de sus funciones siguen siendo desconocidas. Los aceites esenciales o esencias son mezclas complejas de compuestos orgánicos líquidos y aromáticos, conformados por compuestos volátiles que por lo general son sustancias altamente lipofílicas de bajo peso molecular, cuya volatilidad se debe a que se evaporan al ser expuestos al aire o a temperatura ambiente, por lo que sus presiones de vapor son altas. Los terpenos son los compuestos volátiles más relevantes ya que constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios con más de 40,000 moléculas diferentes. La mayoría de estos compuestos se acumulan en estructuras vegetales específicas tales como ductos, cavidades secretoras y tricomas glandulares, los cuales pueden estar distribuidas en las hojas (eucalipto, albahaca), flores (lavanda, menta), rizoma (jengibre), frutos (anís, hinojo), madera (alcanfor), raíz (vetiver), corteza (canela), semilla (nuez moscada), etc. Plantas como la albahaca, manzanilla, mejorana, tomillo, entre otras, son de las principales especies con alta demanda por ser aromáticas y medicinales, características debidas al contenido de sus componentes volátiles, lo cual se explica ampliamente en el artículo de divulgación que se presenta a continuación.

¿AROMAS QUE CURAN?

Rafael Torres Martínez y
Rafael Salgado Garciglia

Quizás lo primero que pensarás al oír sobre aromas que curan, es sobre la aromaterapia, una rama de la medicina no convencional que ha venido tomando auge entre las terapias curativas, de la cual podemos encontrar mucha información, pero poca de ésta es considerada científica. Esto ha permitido que haya incredulidad sobre el potencial curativo de los compuestos responsables de los aromas de las plantas y empezaremos diciendo que no todo lo referente a los aromas de las plantas es aromaterapia, para finalmente comprobar con argumentos científicos, ¡que los aromas sí curan!

Otra idea recurrente que tendrás al leer el título de este artículo, es sobre los tés o las infusiones curativas, sobre todo los que se preparan con plantas aromáticas medicinales como la manzanilla, la hierbabuena y el anís. En efecto, éstas son aromáticas y tienen propiedades medicinales, muchos de ellas confirmadas científicamente para aliviar enfermedades gastrointestinales, respiratorias, de la piel y hasta para tratar la hipertensión y la diabetes.

Los responsables de estos aromas son compuestos químicos, conocidos como aceites esenciales o compuestos volátiles aromáticos, los que mayormente se componen de pequeñas moléculas denominadas terpenos, de los que se han reportado más de treinta y cinco mil diferentes. Cada uno produce un aroma característico y cuando éstos se mezclan, el aroma cambia, es por eso que podemos encontrar una gama interminable de aromas en los tallos, en las hojas y en las flores de estas plantas aromáticas.

¿Qué son los terpenos?

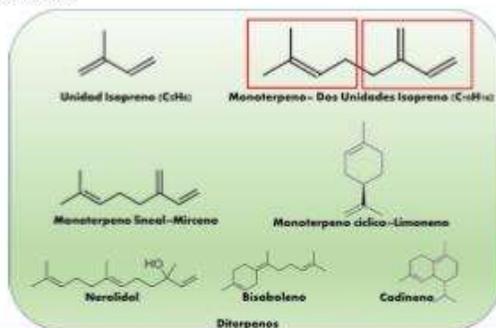
La palabra terpeno proviene de "terpentine", que significa aguarrás en inglés, un producto aromático de la resina de los pinos. Son moléculas muy abundantes en los vegetales, además de encontrarlos en tallos, hojas y flores, también están presentes en raíces, en semillas y en algunos frutos como la uva y los cítricos. Cada compuesto o molécula de este tipo tiene su nombre, generalmente otorgado por el nombre de la planta en donde por primera vez se aisló o mayormente se encuentra. Un ejemplo es el limoneno, presente en los cítricos como la naranja y el limón. Más adelante podremos inferir con sus nombres, en que plantas se producen o podemos encontrarlos.

Los terpenos que dan el aroma particular de las plantas aromáticas medicinales, son de bajo peso molecular y volátiles, que al estrujar las partes que los contienen o bien con el contacto con el aire, éstos se liberan. -Por eso, cuando estrujas una hoja de menta, se libera el mentol, el terpeno mayoritario de esta planta-

Se clasifican por su naturaleza química, es decir, por la estructura que presentan, los de importancia aromática son de dos tipos, los monoterpenos y los diterpenos. Los primeros se componen de 10 átomos de carbono y los otros de 20, ambos provienen de una unidad carbonada llamada unidad isopreno, de 5 carbonos y 8 hidrógenos (C₅H₈). Las unidades pueden arreglarse linealmente (como en el mircenol) o ciclicamente (como en el limoneno), su arreglo conformacional, el número de hidrógenos y la presencia de átomos de

¿Aromas que curan?

átomos de oxígeno, es lo que da lugar a los miles de terpenos y por consiguiente a los miles de aromas.



Plantas, aromas y terpenos

El aroma en las plantas difiere por especie y por variedad, debido a pequeñas diferencias en las cantidades de los terpenos. La naranja y el limón contienen limoneno, pero huelen diferente por la cantidad de éste. También hay variaciones del aroma por la edad de la planta, la época de año (si está en floración o no). A medida que la planta madura, los aromas se intensifican; el clima y el tiempo también afectan a la producción de los terpenos; la misma variedad de una especie vegetal, produce cantidades desiguales y diferentes de terpenos cuando se desarrolla en suelos distintos y con fertilizantes diferentes.

Los terpenos se generan de forma constante, pero se volatilizan con la luz del sol y con las altas temperaturas. Las plantas tienen más terpenos al final del periodo oscuro (noche) que después de un día entero de sol. Se puede comprobar fácilmente –Huele una planta por la mañana y nuevamente al final de la tarde en un día soleado, será más penetrante por la mañana-.

¿Pero, qué terpeno contiene mayormente una planta?

Podemos tener cientos de ejemplos, algunos nombres te serán muy comunes, porque se derivan de alguna planta aromática medicinal en particular: se mencionó al limoneno en la cáscara del limón y al mentol en las hojas de menta; pero quizás también te suenen el alcanfor, anetol, citronelol, eucaliptol, geraniol, humuleno, linalol, nerol, pineno y timol. En la figura siguiente, puedes relacionarlos con las plantas que mayormente los contienen, y a éstos se debe su aroma y sus pro-

iedades medicinales.

Propiedades medicinales de los terpenos

Una de las propiedades medicinales de los terpenos, es su actividad antioxidante, ya que actúan como protectores de los lípidos, la sangre y demás fluidos corporales del ataque de radicales libres de especies del oxígeno como radicales hidroxilo, peróxido y superóxido, así también por especies reactivas de nitrógeno como el óxido nítrico. Estas moléculas son las responsables del envejecimiento y están presentes en las enfermedades como el cáncer, la hipertensión, la diabetes y el hígado graso. También hay evidencias científicas de su actividad antiinflamatoria, ya que los terpenos suprimen la activación o producción de las moléculas que producen la inflamación, denominadas citoquinas pro-inflamatorias.

Alcanfor (<i>Cinnamomum camphora</i>)		alcanfor
Anís común (<i>Pimpinella anisum</i>)		anetol
Geranio aromático (<i>Pelargonium citronellum</i>)		citronelol
Eucalipto (<i>Eucalyptus globulus</i>)		eucaliptol
Geranio (<i>Geranium sanguineum</i>)		geraniol
Lúpulo (<i>Humulus lupulus</i>)		humuleno
Lavanda (<i>Lavandula angustifolia</i>)		linalol
Te limón (<i>Cymbopogon citratus</i>)		nerol
Pino (<i>Pinus palustris</i>)		pineno
Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>)		timol

¿Aromas que curan?

Entre los terpenos con efecto antioxidante y antiinflamatorio, tenemos al eugenol, timol, p-cimeno, linalol, β -cariofileno, 4-terpineol, que son componentes del aroma de plantas como el clavo (*Eugenia caryophyllus*), albahaca (*Ocimum basilicum*), tomillo (*Thymus vulgaris*), manzanilla (*Matricaria chamomilla*) y mirto (*Myrtus communis*), entre otras. Otros ejemplos de terpenos con estas propiedades, están presentes en el eucalipto, romero, lavanda, pino y mirra; los terpenos p-cimeno y timol de tomillo actúan sobre la inflamación en colon.

Otra importante propiedad de los terpenos es la antimicrobiana, las evidencias indican su actividad contra bacterias (bactericida) y hongos (fungicida), microorganismos que afectan nuestra salud, ocasionando enfermedades de la piel, gastrointestinales y respiratorias. Diversas investigaciones han probado su efectividad contra bacterias como *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, varias especies de *Salmonella*, *Staphylococcus* y otras más. La mezcla de terpenos de clavo, tomillo, pimienta, canela y orégano son muy efectivos contra *Clostridium botulinum* y *Listera monocytogenes*; el eucaliptol y linalol de tomillo inhiben el crecimiento

de *P. mirabilis* y *S. aureus*. El eucalipto posee propiedades antisépticas, especialmente de vías respiratorias, debidas fundamentalmente al eucaliptol; el timol, principal terpeno del tomillo, es antifúngico contra *Candida albicans*, también el terpineol y el limoneno inhiben el crecimiento de éste.

Ahora podemos entender por qué cuando utilizamos algunas de estas plantas, nos alivian o curan algunos problemas gastrointestinales, como la colitis y las infecciones bacterianas (diarrea, tifoidea, entre otras), y algunas enfermedades de la piel causadas por hongos.

Pero, además, algunos terpenos tienen actividad anticancerígena, como el lupeol, un terpeno del árbol *Zanthoxylum monophyllum* (palo rubio), que ha mostrado actividad antitumoral contra varias líneas celulares cancerosas. Así, tenemos que también el limoneno, contenido en diversas plantas aromáticas y el elemento de *Curcuma aromatica*, poseen estas propiedades. El taxol, un diterpeno cíclico, es uno de los anticancerígenos de origen vegetal (*Taxus brevifolia*) más potentes contra líneas celulares de pulmón, mama y ovario.



Recientemente se ha confirmado que algunas plantas aromáticas, también muestran actividad antiviral, antihipertensiva, antidiabética, antidepresiva, debida al contenido de terpenos. La actividad de éstos también ha sido relacionada con disminuir los niveles de lípidos o triglicéridos.

Planta aromática	Terpenos	Propiedad Medicinal
Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>)	Eucaliptol y Linalol	Bactericida
Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>)	Timol	Fungicida
Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>)	p-cimeno y timol	
Manzanilla (<i>Matricaria inodora</i>)	Bisabolón	Antiinflamatoria
Té Limón (<i>Cymbopogon citratus</i>)	Citral	
Albahaca (<i>Ocimum basilicum</i>)	Linalol	
Anís Estrella (<i>Illicium verum</i>)	Anetol	Antioxidante
Clavo (<i>Eryngium aromaticum</i>)	Eugenol	
Epazote (<i>Chenopodium ambrosioides</i>)	Ascaridól	Antihelmíntico
Eucalipto (<i>Eucalyptus globulus</i>)	Eucaliptol	Antiséptico y antiexpectorante
Palo rubio (<i>Zanthoxylum monophyllum</i>)	Lupeol	
Cúrcuma (<i>Curcuma aromatica</i>)	Elemeno	Anticancerígena
Tejón (<i>Staus bracteata</i>)	Taxol	
Árbol de Té (<i>Melaleuca alternifolia</i>)	Terpineol	Antiviral
Geranio (<i>Geranium spp</i>)	Geraniol	Hipolipemiante

A pesar de que los terpenos son considerados compuestos GRAS (Sustancias generalmente Reconocidas como Seguras), éstos pueden presentar ciertos tipos de toxicidad, ya que suelen ocasionar alergias y ser tóxicos para el hígado en concentraciones altas. El safrón (en azafrán, anís y alcanfor) y el estragol (en estragón, albahaca y laurel), si se consumen de manera constante por largos periodos de tiempo, pueden actuar como cancerígenos; la tujona (en especies de salvia, estragón y poleo) ocasiona afección respiratoria y cardiovascular; y la mezcla de terpenos de la nuez moscada y ruda, pueden presentar alteraciones del sistema nervioso y actividad abortiva, respectivamente. Es por esto, que aunque mayormente poseen propiedades medicinales muy importantes, se recomienda su consumo en dosis bajas cuando sean por vía oral y deben administrarse con mucha precaución en embarazadas y en infantes.

¡Los aromas, o bien, los compuestos aromáticos de las plantas, si curan!

¿Aromas que curan?

Para Saber Más:

Miguel, M. G. 2010. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. *Flavour Fragr. J.* 25: 291-312.

Juárez-Rosete, C.R., et al. 2013. Hierbas aromáticas y medicinales en México: tradición e innovación. *Rev. Bio. Ciencias*, 2(3): 119-129. <http://biociencias.uan.edu.mx/publicaciones/04-03/biociencias4-3-5.pdf>

Marín-Loaiza, J.C. y Céspedes C.L. 2007. Compuestos volátiles de plantas: origen, emisión, efectos, análisis y aplicaciones al agro. *Rev. Fitotec. Mex.*, 30(4): 327-351. <http://www.redalyc.org/pdf/610/61030401.pdf>



Laurel

El M.C. Rafael Torres Martínez, es estudiante del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas, Opción en Biología Experimental; y el D.C. Rafael Salgado Garciglia es Profesor Investigador, ambos del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.