



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

Área Académica de Química

TESIS

“Caracterización de la actividad biológica *in vitro* de compuestos fenólicos presentes en *Heterotheca inuloides* Cass en dos estadios de desarrollo”

Que para obtener el grado de

Licenciada en Química en Alimentos

P r e s e n t a:

Maribel Soto Islas

Dirigida por:

Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa

M. en C. Enaim Aída Vargas León



Mineral de la Reforma, Hidalgo, octubre, 2018.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
Institute of Basic Sciences and Engineering
Dirección
 Dean

Mineral de la Reforma, Hgo., a 4 de septiembre de 2018

Número de control: ICBI-D/731/2018
 Asunto: Autorización de impresión.

M. EN C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR

Por este medio le comunico que el Jurado asignado a la Pasante de Licenciatura en Química en Alimentos **Maribel Soto Islas**, quien presenta el trabajo de titulación **“Caracterización de la actividad biológica *in vitro* de compuestos fenólicos presentes en *Heterotheca inuloides* Cass en dos estadios de desarrollo”** después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación firman de conformidad los integrantes del Jurado:

PRESIDENTE:	Dr. Javier Castro Rosas	
PRIMER VOCAL:	Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa	
SEGUNDO VOCAL:	M. en. C. Enaim Aída Vargas León	
TERCER VOCAL:	Dra. Reyna Nallely Falfán Cortés	
SECRETARIO:	Dr. Israel Oswaldo Ocampo Salinas	
PRIMER SUPLENTE:	Dra. Fabiola Araceli Guzmán Ortiz	
SEGUNDO SUPLENTE:	Dra. Esmeralda Rangel Vargas	

Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

Atentamente
 “Amor, Orden y Progreso”

Dr. Oscar Rodolfo Suárez Cañillo
 Director del ICBI

ORSC/SEPC



Ciudad del Conocimiento
 Carretera Pachuca - Tulancingo km. 4.5
 Colonia Carboneras
 Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, C.P. 42184
 Tel. +52 771 7172000 exts 2231, Fax 2109
 direccion_icbi@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx

DEDICATORIA

A mis padres, Fermín Soto Cortés y Ma. Isabel Islas Hernández, en reconocimiento a todo el sacrificio puesto para que yo pudiera estudiar y como testimonio de mi eterno agradecimiento por dedicar gran parte de su vida a darme lo mejor de sí, por sus esfuerzos, sacrificios, oraciones, enseñanzas y consejos. Con todo mi amor para ustedes, que me han apoyado en cada paso que doy, que han confiado en mis decisiones y han estado conmigo en los momentos difíciles, suyo es mi triunfo. Los amo.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por haberme dado la oportunidad de estudiar una carrera universitaria, por su gran esfuerzo, su confianza y su amor.

Papá, gracias por tu apoyo incondicional, por el esfuerzo que día a día realizas para que no nos falte nada, por el gran ejemplo de lucha, trabajo y dedicación que siempre nos has dado y por las palabras de aliento que me has dado en todo momento, pero sobre todo por tu amor, te amo y te estaré eternamente agradecida.

Mamá, tú que pasas mucho tiempo escuchándome hablar de mis sueños y de mi forma de pensar, hoy, una meta más he cumplido. Gracias por estar pendiente de mí, por tu compañía cuando hacía la tarea, por prepararme la comida más deliciosa que puede existir, por tu amor, tu comprensión y tu apoyo incondicional en todo momento, por alegrar mis días e impulsarme a no rendirme y levantarme por más fuertes que fueran los vientos, por quererme tanto y por abrazarme cuando lo necesito aún en la distancia. Gracias por cuidarme cuando estoy enferma y darme té de árnica para aliviarme, de aquí la inspiración de este trabajo. Por todo y más, te estaré eternamente agradecida, te amo mamá.

A Enaim, quien con su espíritu investigador me inspiró para seguir este camino fascinante de la investigación científica. Además fue la persona que me acompañó en todo momento y fue mi faro de luz cuando estuve navegando sin rumbo en el laboratorio, quien ha sabido transmitirme sus conocimientos y experiencia y me tuvo paciencia desde mis primeros pasos por el laboratorio, quien me brindó su invaluable apoyo y confianza durante esta etapa de mi vida y mi desarrollo profesional. Enaim, a quien tuve el privilegio de conocer y considero como una excelente persona, sensible y atenta a los aspectos más humanos, entusiasta, optimista y amante de la ciencia. Gracias por todo Enaim, Te quiero.

A mi hermana Isa, por enseñarme que el esfuerzo y la perseverancia son el camino para lograr los objetivos, siempre serás un ejemplo y un orgullo para mí, eres una mujer maravillosa, te amo.

A mi hermano Fermín, por enseñarme que nada que valga la pena es fácil y que no hay que conformarse con ser bueno en algo, sino con ser el mejor, eres de las personas más inteligentes que conozco y mi ejemplo a seguir, te amo.

A mi hermana Zaira, por motivarme en el proceso de mi formación académica y enseñarme que no hay mejor manera de adquirir conocimiento que investigando. Gracias por escucharme hablar sobre mis sueños y por ofrecerme tu ayuda y participación para lograrlos, por las veces que me hiciste reír cuando estaba triste y por los pequeños detalles que me diste y que alegraban mi día, te amo hermana.

A mis amigas y amigos, Alma, Tere, Ale, Julio, Lalo y Oscar, por compartir días y noches de desvelo, hambruna, exámenes y entrega de reportes. Gracias por motivarme y no dejarme caer en ningún momento, por enseñarme a confiar en mí y en mis capacidades. Gracias por todos los momentos que hemos pasado juntos, llenos de risas y compartiendo el gusto y amor por la ciencia y la química de los alimentos.

A mis sinodales y revisores de este documento, por su apoyo, observaciones y críticas constructivas, por permitirme ser parte de su equipo y por los conocimientos que me brindaron.

A todos y cada uno de mis profesores de la universidad, quienes participaron en mi desarrollo profesional. Gracias por todas y cada una de las maravillosas clases y prácticas de laboratorio que me permitieron enamorarme de la química de los alimentos.

ÍNDICE

ÍNDICE	VI
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	X
RESUMEN	12
I. INTRODUCCIÓN.....	13
II. ANTECEDENTES.....	14
2.1 Estrés oxidativo	14
2.2 Enfermedades crónicas degenerativas	15
2.3 Hipertensión arterial como enfermedad crónica degenerativa	16
2.3.1 Prevalencia de la hipertensión arterial.....	17
2.3.2 Tratamiento farmacológico de la hipertensión arterial	17
2.3.2.1 Los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina	18
2.4 Plantas medicinales ante enfermedades crónicas degenerativas.....	19
2.4.1 Plantas medicinales ante hipertensión arterial.....	20
2.5 <i>Heterotheca inuloides</i> Cass	21
2.5.1 Morfología y estadio de desarrollo.....	21
2.5.2 Distribución y hábitat	22
2.5.3 Composición de <i>H. inuloides</i>	22
2.5.4 Usos tradicionales de <i>H. inuloides</i>	25
2.5.5 Actividad biológica de <i>H. inuloides</i>	27
2.5.6 Toxicidad de <i>H. inuloides</i>	29
2.6 Análisis de compuestos fenólicos presentes en plantas	30
2.6.1 Extracción de compuestos fenólicos en plantas	31
2.6.2 Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos	32
2.6.2.1 Análisis espectrofotométrico.....	32
2.6.2.2 Análisis por cromatografía líquida de alta resolución	32

2.6.2.3 Hidrólisis ácida como etapa preparativa para el análisis por HPLC	32
III. JUSTIFICACIÓN	34
IV. HIPÓTESIS	35
V. OBJETIVOS	35
5.1 Objetivo general	35
5.2 Objetivos específicos	35
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	36
6.1 Descripción general de la metodología	36
6.2 Colecta de la planta.....	36
6.3 Molienda de la planta deshidratada	38
6.3.1 Obtención de extractos hidrolizados	40
6.4 Caracterización de extractos.....	42
6.4.1 Obtención de espectros de UV-vis.....	42
6.4.2 Cuantificación de fenoles totales	42
6.4.3 Cuantificación de flavonoides totales.....	43
6.4.4 Determinación de la capacidad captora de radicales libres	45
6.4.4.1 Radical ABTS	45
6.4.4.2 Radical DPPH.....	46
6.4.5 Determinación de la capacidad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina	46
6.4.6 Cuantificación de flavonoides por HPLC.....	48
6.4.6.1 Preparación de muestras.....	48
6.4.6.2 Análisis de flavonoides por HPLC	49
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
7.1 Análisis de espectros de los extractos.	51
7.2 Cuantificación de fenoles totales.....	54
7.2.1 Extractos no hidrolizados.....	54
7.2.2 Extractos hidrolizados.....	56
7.3 Cuantificación de flavonoides totales	58
7.3.1 Extractos no hidrolizados.....	58

7.3.2	Extractos hidrolizados.....	60
7.4	Determinación de la capacidad captora de radicales libres	61
7.4.1	Radical ABTS	62
7.4.1.1	Extractos no hidrolizados.....	62
7.4.1.2	Extractos hidrolizados.....	64
7.4.2	Radical DPPH.....	65
7.4.2.1	Extractos no hidrolizados.....	65
7.4.2.2	Extractos hidrolizados.....	65
7.5	Inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina	66
7.5.1	Extractos no hidrolizados.....	66
7.5.2	Extractos hidrolizados.....	68
7.6	Correlación de Pearson para extractos no hidrolizados.....	69
7.7	Cuantificación de flavonoides por HPLC	71
7.7.1	Identificación del tiempo de hidrólisis.....	71
7.7.2	Cuantificación de flavonoides por HPLC con el tiempo adecuado de hidrólisis.....	72
VIII.	CONCLUSIONES.....	76
IX.	REFERENCIAS.....	77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Aplicación terapéutica y modo de uso de <i>Heterotheca inuloides</i>	26
Tabla 2. Cuantificación de fenoles totales y flavonoides en extractos no hidrolizados de <i>H. inuloides</i>	55
Tabla 3. Cuantificación de fenoles totales y flavonoides en extractos hidrolizados de <i>H. inuloides</i>	57
Tabla 4. Capacidad captora de radicales libres de extractos no hidrolizados de <i>H. inuloides</i>	63
Tabla 5. Capacidad captora de radicales libres de extractos hidrolizados de <i>H. inuloides</i>	64
Tabla 6. Porcentaje de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina de extractos no hidrolizados de <i>H. inuloides</i>	67
Tabla 7. Porcentaje de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina de extractos de <i>H. inuloides</i> hidrolizados	68
Tabla 8. Coeficientes de correlación de Pearson para las variables respuesta estudiadas en los extractos no hidrolizados de <i>H. inuloides</i>	70
Tabla 9. Cuantificación de flavonoides por HPLC en extractos de <i>H. inuloides</i> con diferentes tiempos de hidrólisis.	71
Tabla 10. Cuantificación de flavonoides por HPLC en extractos de <i>H. inuloides</i>	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Heterotheca inuloides</i> Cass	22
Figura 2. Compuestos sesquiterpénicos aislados de <i>H. inuloides</i>	23
Figura 3. Flavonoides y glucósidos aislados de flores de <i>H. inuloides</i>	24
Figura 4. Otros compuestos aislados de flores de <i>H. inuloides</i>	25
Figura 5. Diagrama general de la metodología.	36
Figura 6. <i>Heterotheca inuloides</i> Cass, en dos estadios de desarrollo.....	37
Figura 7. Pétalo de <i>H. inuloides</i> Cass.	37
Figura 8. Secado y pesado de hoja de <i>H. inuloides</i> Cass.	37
Figura 9. Tamiz malla 70 (A), hoja de la planta en floración molida y tamizada (B)..	38
Figura 10. Obtención de extractos de hoja y pétalo de planta en floración de <i>H. inuloides</i>	39
Figura 11. Centrífuga mini Spain, plus, Eppendorf.....	39
Figura 12. Extractos acuosos de hoja y tallo de la planta en floración, previos a ser aforados.	39
Figura 13. Extractos acuosos aforados a 10 mL.	40
Figura 14. Hidrólisis ácida de extractos a 90°C.....	40
Figura 15. Extracción de la fase orgánica con acetato de etilo.	41
Figura 16. Extractos acuosos hidrolizados.....	41
Figura 17. Residuo de extracto hidrolizado al evaporar el solvente.	41
Figura 18. Diagrama de flujo de la cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.	43
Figura 19. Diagrama de flujo de la cuantificación de flavonoides empleando como estándar catequina.....	44

Figura 20. Diagrama de flujo de la cuantificación de flavonoides empleando como estándar quercetina.....	44
Figura 21. Diagrama de flujo de la determinación de la capacidad captora de radicales libres empleando el radical ABTS.....	45
Figura 22. Diagrama de flujo de la determinación de la capacidad captora de radicales libres empleando el radical DPPH.....	46
Figura 23. Diagrama de flujo de la determinación de la capacidad inhibitoria de enzima convertidora de angiotensina.....	47
Figura 24. Diagrama de flujo de la preparación de muestras para la cuantificación de flavonoides por HPLC.	48
Figura 25. Espectros de absorción de la planta de 25 cm.....	52
Figura 26. Espectros de absorción de la hoja de la planta en floración.	53
Figura 27. Espectros de absorción del tallo de la planta en floración.....	53
Figura 28. Espectros de absorción del pétalo de la planta en floración.	54

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue cuantificar compuestos fenólicos en extractos de partes aéreas de *Heterotheca inuloides* Cass en dos estadios de desarrollo y su actividad biológica *in vitro* (capacidad captadora de radicales libres y capacidad inhibitoria de la enzima convertidora de la angiotensina). Se recolectaron diversas plantas de *H. inuloides* Cass, en dos estadios de desarrollo (de 25 cm y en floración), en la Laguna de Atexca, en el municipio de Zacatlán, Puebla, México. Se fraccionaron en sus diferentes partes y se obtuvieron extractos en etanol al 40% y en agua a 25 °C y a 92 °C, crudos e hidrolizados. De los extractos se analizaron sus espectros de absorción, se cuantificaron fenoles y flavonoides totales, y como parte de la actividad biológica *in vitro*, se determinó la capacidad captora de radicales libres (CCRL) y el porcentaje de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (%IECA); por último, se cuantificaron flavonoides por HPLC. La hoja y el pétalo de la planta en floración, fueron las partes con mayor contenido de fenoles y flavonoides totales, relacionándose directamente, con su mayor CCRL y %IECA, en ambos casos el agua a 92°C y el etanol al 40%, fueron los disolventes con mayor eficiencia de extracción. La hidrólisis ácida de extractos ricos en compuestos fenólicos, tuvo un efecto favorable en la capacidad captora de radicales libres, por el incremento de la reactividad de las agliconas resultantes y un efecto negativo en la actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina, por la posible degradación de compuestos fenólicos. En la determinación de flavonoides por HPLC se detectaron y cuantificaron concentraciones significativas de miricetina, daidzeina, quercetina y kaempferol, con un tiempo de hidrólisis de 20 min, para estos flavonoides existen reportes de actividad biológica, mediante diversos mecanismos de acción. *H. inuloides*, al tener altas concentraciones de compuestos fenólicos, CCRL y actividad IECA, es una planta con potencial para su uso ante enfermedades crónicas degenerativas como la hipertensión y problemas cardiovasculares.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la prevalencia de enfermedades crónicas degenerativas (ECD), como diabetes mellitus, aterosclerosis e hipertensión arterial, afecta a una porción importante de la población; debido a los cambios de estilo de vida. Entre los factores que propician las ECD, se encuentra la predisposición genética y el estrés oxidativo, como resultado de malos hábitos alimenticios, exposición a la radiación ultravioleta y contaminación ambiental. En el caso de la hipertensión arterial (HTA), según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT, 2016), afecta a 17.3 millones de mexicanos adultos entre 20 y 85 años. Personas con diabetes mellitus e HTA, necesitan de un tratamiento de por vida, para controlar los efectos; estos tratamientos representan un alto costo para el paciente y para el sector salud, ya que, los tratamientos pueden causar hipersensibilidad o efectos adversos, que originan el cambio constante, a nuevos tratamientos. La investigación de plantas con propiedades medicinales, ha permitido el aislamiento de compuestos activos, empleados como base para el desarrollo de agentes terapéuticos, convirtiéndolos en alternativas farmacológicas, que podrían contribuir a reducir el impacto de las ECD, así, la investigación de plantas con actividad biológica, ha adquirido importancia, con el fin de encontrar alternativas para complementar los tratamientos farmacológicos, destacando aquellas con altas concentraciones de compuestos fenólicos. *Heterotheca inuloides* Cass, mejor conocida como árnica, es una planta ampliamente utilizada en la medicina tradicional mexicana, con un alto contenido de compuestos activos con actividad antioxidante, por lo que su estudio, representa una alternativa frente a ECD, asociadas al estrés oxidativo. En el presente trabajo, se caracterizaron las partes aéreas de *Heterotheca inuloides* Cass, en dos estadios de desarrollo, colectadas en el municipio de Zacatlán, Puebla, con la finalidad de establecer, si los extractos ricos en compuestos fenólicos, pueden ser una alternativa para complementar el tratamiento de padecimientos relacionados con el estrés oxidativo, como la hipertensión arterial.

II. ANTECEDENTES

2.1 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es el resultado de un desequilibrio de origen externo e interno, de situaciones que incrementan la concentración de especies reactivas de oxígeno (ERO), provocando la disminución de mecanismos para eliminarlas. El incremento de ERO, afecta las membranas celulares, proteínas estructurales y funcionales, aumenta la peroxidación de los lípidos y ocasiona daños en el ADN celular, provocando mutaciones y transformaciones carcinogénicas; además, el estrés oxidativo provoca un aumento de la concentración de mediadores pro-inflamatorios (Lawal, 2017).

En los campos de la biología y medicina, los radicales libres son generalmente conocidos como ERO, sin embargo, no todas las ERO son radicales libres (RL), los RL son moléculas o fragmentos de moléculas que contienen uno o más electrones desapareados, lo cual, los hace altamente reactivos, provocando reacciones en cadena que destruyen los lípidos de la membrana, desnaturalizan proteínas y dañan el ADN, hasta provocar la muerte celular (Munné-Bosch y Pintó-Marijuan, 2017; Poprac *et al.*, 2017).

Los RL pueden ser producidos por factores endógenos o exógenos, y sus efectos pueden ser contrarrestados por sustancias conocidas como antioxidantes, entre los cuales se encuentra, la vitamina E, vitamina C, carotenoides y flavonoides, estos últimos, tienen la capacidad de donar hidrógenos según su número y posición de grupos hidroxilos, así como, de la presencia de electrones donadores en el anillo estructural, ya que, el grupo aromático puede soportar el desapareamiento de electrones, y por lo tanto, las ERO y los RL vuelven a ser estables. Cuando los niveles de ERO y por ende de RL, exceden a los mecanismos para eliminarlos, se produce estrés oxidativo (Kuskoski *et al.*, 2009; Poprac *et al.*, 2017).

Dentro de los principales factores ambientales que propician el estrés oxidativo y en consecuencia ERO, se encuentran los hábitos alimenticios, la contaminación del aire, las radiaciones ionizantes y no ionizantes, la exposición a radiación ultravioleta, humo de cigarro, pesticidas, sustancias presentes en pinturas como lacas y productos de limpieza y aromatizantes para casa y oficinas (Leiner *et al.*, 2008).

Todas las enfermedades degenerativas, están relacionadas con el incremento del estrés oxidativo, este tipo de estrés facilita la expresión de los genes responsables del desarrollo de dichas enfermedades; diversos estudios han vinculado los efectos cardiovasculares y ateroscleróticos a la contaminación del aire, que a su vez, aumenta el estrés oxidativo (Lawal, 2017).

2.2 Enfermedades crónicas degenerativas

Las enfermedades crónicas degenerativas (ECD), son aquellas que provocan una serie de alteraciones fisiopatológicas, que se reflejan en una producción excesiva, disminuida y/o modificación estructural y funcional, de varias biomoléculas, tejidos y órganos. Dentro de las ECD más reconocidas se encuentran: obesidad, cáncer, osteoartritis, asma, enfermedades reumáticas (artritis reumatoide), esclerosis múltiple, Alzheimer, Parkinson, diabetes mellitus e hipertensión arterial (Leiner *et al.*, 2008; Pinedo *et al.*, 2017).

En México y en otros países las ECD, se han convertido en un problema serio de salud pública, ya que, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2005 las ECD fueron la causa del 60% de las muertes alrededor del mundo, además, el Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS), reportó que el 45% de las muertes en México, en el mismo año, fueron causadas por las ECD; se sabe que el padecimiento de estas, se asocia a una predisposición genética, factores ambientales y adquiridos como hábitos alimenticios, estilo de vida y estrés, que presenta cada persona (Leiner *et al.*, 2008; González *et al.*, 2014; González *et al.*, 2015). Es importante mencionar, que la mayoría de las personas que padecen estas enfermedades, siguen tratamientos terapéuticos que les ayudan a controlar los síntomas ocasionados, como es el caso de la diabetes y las enfermedades cardiovasculares como la hipertensión, pero no son curables (Leiner *et al.*, 2008).

2.3 Hipertensión arterial como enfermedad crónica degenerativa

La tensión arterial es la fuerza que ejerce la sangre contra las paredes de los vasos sanguíneos (arterias), al ser bombeada por el corazón. Cuando los vasos sanguíneos tienen una tensión persistentemente alta, se genera un trastorno denominado hipertensión, generando un daño en los vasos sanguíneos. Los principales factores para desarrollar hipertensión arterial (HTA), son la predisposición genética, la edad, la obesidad, alcoholismo, tabaquismo, alimentación no balanceada y estrés. Se han sugerido varios mecanismos, para el mantenimiento de la presión sanguínea en el cuerpo humano; uno de los sistemas más conocidos es el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRA) (Vargas-León *et al.*, 2016).

El SRA tiene un papel crítico en la homeostasis de la presión arterial, el balance hidroelectrolítico y el desarrollo renal. Un componente fundamental del SRA, es la enzima convertidora de la angiotensina o ECA, la cual, influye significativamente en la absorción de sodio y agua, estimula la sed y la secreción de hormona antidiurética, además de provocar indirectamente el aumento de la presión arterial y la constricción en los vasos sanguíneos. Esto se logra mediante la conversión de la angiotensina I a la angiotensina II, que tiene la capacidad de contraer los vasos sanguíneos, además de ello, induce la retención de sodio y el incremento del estrés oxidativo. Las ERO inducidas por estos factores, inician una reacción auto catalítica, responsable de la producción sostenida de vasoconstrictores, con lo que se perpetúa la hipertensión. Existen compuestos inhibidores de la ECA que bloquean la enzima de conversión de la angiotensina, lo que da lugar a vasos sanguíneos ensanchados y relajados, facilitando el flujo de la sangre a través de los vasos sanguíneos y reduciendo la presión arterial (Feldsten y Romero, 2007; Vargas-León *et al.*, 2016).

Es muy importante la participación de la angiotensina II en la hipertensión arterial, por lo cual, se ha intentado suprimir o atenuar su influencia a través de medicamentos que interfieran con su formación o con la transmisión de sus señales por medio de inhibidores de la ECA (IECA) (De la Serna, 2010).

2.3.1 Prevalencia de la hipertensión arterial

La HTA, es una de las ECD de mayor prevalencia en México. Alrededor del 34.4% de la población de 20 a 69 años la padece y cerca del 40 % de los individuos afectados, desconoce tener esta enfermedad, lo que significa que en nuestro país existen más de 14 millones de personas con este padecimiento, de las cuales más de 6 millones, no han sido diagnosticadas. La HTA es un factor de riesgo importante para sufrir accidentes cerebrovasculares e insuficiencia cardiaca y renal, las cuales se encuentran entre las primeras causas de muerte (González *et al.*, 2014; Campos-Nonato *et al.*, 2018).

Estudios epidemiológicos, sugieren una prevalencia del 50 al 65% de HTA, en personas mayores de 60 años, la edad es un factor que incrementa la tensión arterial, sin embargo, la prevalencia en personas con sobrepeso y obesidad es de 64.2 y 126.5%, respectivamente, siendo los hábitos alimenticios y el estilo de vida los factores que propician el desarrollo de la HTA, aún en edades tempranas. Cerca del 80% de individuos afectados y diagnosticados con HTA tienen un tratamiento farmacológico, sin embargo, sólo el 45.6% de ellos tiene la tensión arterial controlada, lo que infiere un inadecuado control de tensión arterial. La consecuencia, más de 185 mil muertes anuales y más del 70% causadas por ataques cardiacos y cerebrales (Secretaría de Salud, 2015; Campos-Nonato *et al.*, 2018).

2.3.2 Tratamiento farmacológico de la hipertensión arterial

En algunos casos, la HTA tiene remedio y en su mayoría solo control, con esto, se puede salvar vidas y reducir significativamente las limitaciones funcionales, y la discapacidad en las personas que la padecen. El tratamiento farmacológico ha demostrado que reduce la mortalidad y la morbilidad cardiovascular, disminuyendo las complicaciones asociadas (Vargas-León *et al.*, 2016).

Los principales medicamentos utilizados en México, se agrupan por su mecanismo de acción en cuatro grupos.

- Diuréticos, cuyo efecto antihipertensivo se debe al aumento en la excreción de agua y sodio, que disminuye la respuesta vasoconstrictora.

- Betabloqueadores, disminuyen la presión arterial al disminuir la frecuencia cardíaca y la fuerza de contracción miocárdica.
- Antagonistas de calcio, evitan parcialmente la entrada de Ca^{2+} a las células, ocasionando la disminución del tono contráctil, de la resistencia vascular y las cifras de presión arterial.
- Inhibidores de la ECA, bloquean la enzima dipeptidilcarboxipeptidasa evitando la transformación de angiotensina I en angiotensina II, que es la sustancia vasoconstrictora más potente del organismo.

Se ha considerado adecuado el uso de combinaciones de algunos de estos fármacos, que permitan un mejor control de la HTA, con dosis más bajas y menos efectos secundarios (Reverte *et al.*, 1998). Por otra parte, los inhibidores de la ECA son los fármacos más efectivos en el control de HTA, por lo cual, es importante abordar más sobre su mecanismo de acción.

2.3.2.1 Los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina

Se ha demostrado que los IECA, producen dos efectos principales, por un lado, impiden la formación de la angiotensina II y por ende, los efectos hormonales que produce la misma, como vasoconstricción, estimulación de secreción de aldosterona y retención de sodio y agua; además de ello, evitan la lisis de la bradiquinina (BK), que realiza la ECA (también llamada quininasa II), ya que la BK, produce vasodilatación arterial y venosa (Espinoza y Castillo, 1992; Hernández et al., 2011).

Para explicar la acción favorable de los IECA, han establecido que durante el mecanismo de inhibición aumenta la vasodilatación, por medio de la bradiquinina (BK), que a su vez, activa la producción de óxido nítrico (NO) y de la prostaciclina. Al incrementar los niveles de BK, aumenta la síntesis de varias prostaglandinas (las cuales también actúan como vasodilatadoras). Por lo tanto, los IECA tienen una acción combinada, disminuyendo la generación de angiotensina II e incrementando los niveles de BK y varias prostaglandinas (Espinoza y Castillo, 1992; De la Serna, 2010).

Los IECA más utilizados son el Captopril y el Enalapril, sin embargo, efectos adversos como tos seca, angioedema, hiperkalemia, eritema, disgeusia, leucopenia han sido asociados a su uso (Hernández *et al.*, 2011). Por lo anterior, resulta importante la búsqueda de nuevos agentes con propiedades antihipertensivas, donde las plantas son una fuente rica en compuestos con actividad biológica (Guerrero *et al.*, 2012).

2.4 Plantas medicinales ante enfermedades crónicas degenerativas

El retorno progresivo al uso de los productos de origen natural en el tratamiento de diversos padecimientos, ha sido estimulado por la demanda de un sector poblacional, que se suma a otros factores como: el descubrimiento de efectos adversos de fármacos sintéticos, el mejor conocimiento químico de compuestos activos de origen vegetal y sus derivados con gran diversidad química, la disponibilidad creciente de técnicas de aislamiento e identificación, la introducción de ensayos farmacológicos que permiten detectar moléculas potencialmente promisorias como la diversidad de pruebas *in vitro* e *in vivo*, el desarrollo de nuevos métodos analíticos de control de calidad y de nuevas formas de preparación y administración, así como el reconocimiento por parte de la OMS de la medicina tradicional, como un gran bloque de conocimiento para la atención primaria en salud (Vargas-León *et al.*, 2016).

Desde tiempos remotos, los humanos han usado plantas para el tratamiento de distintas enfermedades, entre ellas las ECD como diabetes mellitus e HTA, entre otras, y en la actualidad, se ha observado una estrecha relación entre su capacidad antioxidante y sus múltiples efectos benéficos a la salud.

En la actualidad, entre las plantas propuestas como complemento para el tratamiento de diversas ECD, se encuentran aquellas que tienen un efecto significativo en la reducción de azúcar en sangre y han sido evaluadas en modelos *in vivo*, entre estas se encuentran, *Atriplex halimus*, cuya administración de 3 g de hojas secas reducen significativamente los niveles de azúcar en sangre en modelos de animales diabeticos (Bever y Zahnd, 1979); *Camellia sinensis*, conocida como té verde, rica en catequina, epicatequina, epigallocatequina y galocatequina, le han atribuido propiedad antidiabética (Bogdanski *et al.*, 2012); *Ginkgo biloba*, conocida como árbol

de los cuarenta escudos, tiene efecto sobre las complicaciones de la diabetes, aumenta la circulación sanguínea y ayuda en la curación de heridas diabéticas (Mansour *et al.*, 2011), *Momordica charantia L.*, conocida como melón amargo, cuyo fruto, extracto seco y jugo, son efectivos, ya que contiene un polipéptido similar en estructura a la insulina y reduce los niveles de azúcar en sangre (Welihinda *et al.*, 1982). Es importante mencionar, que los metabolitos más comunes que tienen “actividad antidiabética” son los flavonoides como quercetina y algunos alcaloides (Bahmani *et al.*, 2014). Estos son solo algunos ejemplos de los efectos reportados a la fecha, sin embargo, existe una gran diversidad de estudios, que están demostrando la efectividad de diversas plantas, incrementando así el campo de estudio. A pesar de la incertidumbre sobre la seguridad, eficiencia y costo-efectividad de tratamientos complementarios y alternativos de ECD, el uso de estas plantas podría proporcionar beneficios económicos y de salud para los pacientes (Rawat *et al.*, 2016).

2.4.1 Plantas medicinales ante hipertensión arterial

Diversas plantas, han sido reportadas con propiedades antihipertensivas, con diversos mecanismos de acción, por ejemplo, la administración de extracto de hojas de *Ginkgo biloba*, reduce la presión sistólica y la actividad de la ECA vía efecto antioxidante en ratas Wistar hipertensas, dicho efecto se atribuye a la presencia de flavonoides como kaempferol y quercetina glucoramnósidos (Mansour *et al.*, 2011; Bahmani *et al.*, 2014; González *et al.*, 2015). *Allium sativum* (ajo), ha demostrado efecto antihipertensivo en estudios en humanos (Karou *et al.*, 2011); *Camelia sinensis*, por su propiedad antioxidante provoca un decremento significativo en la presión sistólica y diastólica en personas obesas e hipertensas (379 mg de extracto acuoso) (Bogdanski *et al.*, 2012); los extractos hidroalcohólicos de hojas y flores de *Crataegus curvisepala* (espino blanco), han demostrado *in vivo* efectos vasodilatadores (Wang *et al.*, 2013); *Crocus sativus* (azafrán), provocó el decremento de la presión sistólica al suministrar tabletas de esta planta de 400 mg a un grupo de 30 voluntarios de 20 a 50 años (Mohammad-Hadi *et al.*, 2008); el extracto acuoso de *Eucommia ulmoides* (árbol de corteza de caucho), fue administrado por un periodo de 2 semanas a 30 personas saludables y ocasionó una reducción significativa de la

presión sanguínea (Greenway *et al.*, 2011); el extracto de *Panax quinquefolius* (ginseng), redujo significativamente la presión sistólica en un 11.7%, después de 12 semanas con una dosis diaria de 3 g (Mucalo *et al.*, 2013); por su parte *Hibiscus sabdariffa* (flor de jamaica), ha demostrado actividad antihipertensiva en diversos estudios *in vitro* e *in vivo*, sugerido como mecanismos de acción, la inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina, la relajación directa del músculo liso vascular, disminución del nivel de acetilcolinesterasa y Na⁺ en el suero, y disminución del perfil elevado de lípidos en sangre (McKay *et al.*, 2009; Vargas-León *et al.*, 2018).

2.5 *Heterotheca inuloides* Cass

Heterotheca inuloides Cass, de la familia *Asteraceae*, conocida como árnica mexicana, acahual, árnica de peluche, entre otros; es una planta herbácea y perenne, que se desarrolla favorablemente en un clima templado y húmedo. Es utilizada con fines terapéuticos por comunidades indígenas, rurales y urbanas de México, ya que, le atribuyen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas (Castillo-Juárez *et al.*, 2009; Rosas-Piñón *et al.*, 2012; Rosas, 2012; Rodríguez-Chávez *et al.*, 2017).

2.5.1 Morfología y estadio de desarrollo

H. inuloides, mide entre 25-70 cm de alto y en ocasiones llega a medir hasta 1 m. Según su estadio de desarrollo, entre los primeros 3 y 5 meses mide alrededor de 25 a 35 cm, y en su estado de floración mide entre 70 y 100 cm de alto. Cuando se encuentra en el estadio de 25 a 35 cm, la planta solo está conformada por hojas y un tallo tierno (Fig. 1-A), mientras que, en su estadio de floración, cuenta con un tallo erecto y leñoso, poco ramificado y con vellosidades cortas (Fig. 1-B), sus hojas tienen forma de limbo ovado, ensanchadas en la base y miden de 3 a 10 cm de largo y de 1 a 3.5 cm de ancho. En cuanto a su inflorescencia, las flores están agrupadas en una cabezuela (150 flores), estas miden de 8-15 mm de largo (Fig.1-C) (Maldonado, 2004; Maldonado-López *et al.*, 2008; Rosas, 2012).



Figura 1. *Heterotheca inuloides* Cass (A-planta en estadio de 25 a 35 cm, B-planta en floración, C-flor) (Propia).

2.5.2 Distribución y hábitat

El género *Heterotheca*, se distribuye ampliamente desde Canadá hasta el centro de México. Este género incluye plantas anuales, bienales y perennes; las principales especies endémicas de México son *H. leptoglosa* y *H. inuloides* Cass, las cuales están distribuidas en la región central de México, principalmente en estados como Veracruz, Tlaxcala y Puebla (Nesom, 1990; Sagrero-Nieves, 1996).

H. inuloides Cass crece como hierba silvestre, principalmente, en las regiones más frías y templadas de México, a altitudes entre 2000 y 3000 m sobre el nivel del mar, en bosques templados constituidos de abetos, pinos, enebros, robles y encinos, en un periodo de mayo a diciembre. También se encuentra entre vegetación secundaria, así como, malezas y campos de pastos abandonados (Rodríguez-Chávez *et al.*, 2017).

2.5.3 Composición de *H. inuloides*

H. inuloides es fuente de una gran variedad de compuestos químicos, aislados del aceite esencial y extractos orgánicos de tallo, hoja y flor. Entre las técnicas más utilizadas para su aislamiento, se encuentra el ultrasonido, la cromatografía en capa fina, cromatografía de gases, cromatografía de gases acoplada a masas y HPLC (Sagrero-Nieves, 1996; Maldonado, 2004; Stipanovic *et al.*, 2006; Mijangos *et al.*, 2011).

El análisis de partes aéreas de *H. inuloides* en distintos estudios, reporta la presencia de compuestos como el 7-hidroxicalaleno (1), calaleno (2), 4-metoxi-isocalaleno (3), 4-hidroxiisocalaleno (4), 7-hidroxi-3,4-dihidroxicalaleno (5), 1 α -hidroxi-1(4H)-isocalaleno-4-1 (6), 2,3-epoxi-7-hidroxi- β -calacoreno (7), dicadaleno (8), 2,7-dihidroxi- β -calacoreno (9, inuloidina) y 3,7-dihidroxi-3(4H)-isocalaleno-4-1 (10) (Fig. 2) (Sagrero-Nieves, 1996; Maldonado-López *et al.*, 2008; Rodríguez-Chávez *et al.*, 2015; Rodríguez-Chávez *et al.*, 2017; Egas *et al.*, 2018).

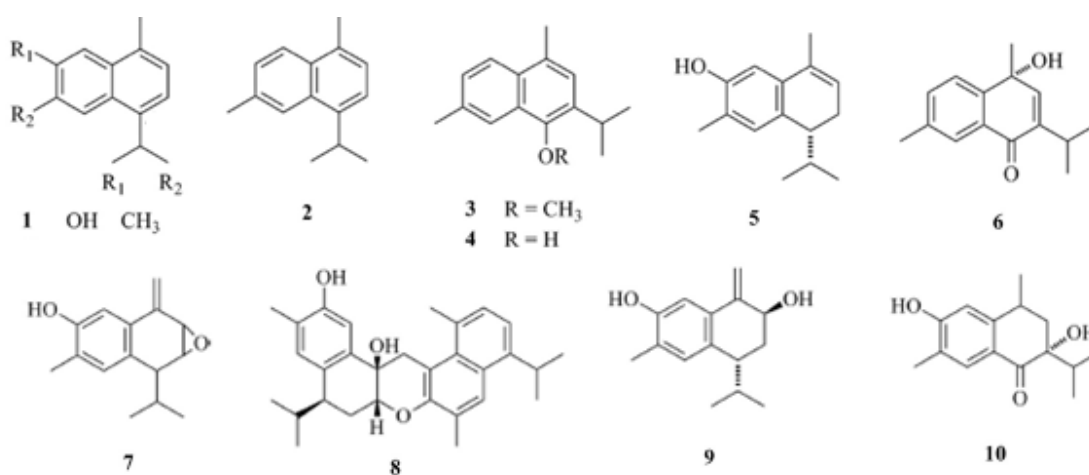


Figura 2. Compuestos sesquiterpénicos aislados de *H. inuloides*.
(Rodríguez-Chávez *et al.*, 2017)

Los compuestos fenólicos han sido reconocidos como agentes potenciales, para la prevención de muchas enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, como cáncer, diabetes mellitus, procesos inflamatorios, enfermedades cardiovasculares, entre otras. Por esto, diversos estudios han analizado el contenido fenólico total en extractos y en infusiones comerciales de *H. inuloides*, utilizando diversas técnicas espectrofotométricas y cromatográficas, para identificar y cuantificar compuestos fenólicos individuales (Delgado *et al.*, 2001; Coballase-Urrutia *et al.*, 2010; Muñoz-Velázquez *et al.*, 2012; Bahmani *et al.*, 2014; Rodríguez-Chávez *et al.*, 2015).

En el caso de las flores secas, han aislado agliconas como, luteolina (11), kaempferol (12), kaempferol-3,7-dimetil éter (13), quercetina (14), quercetina-3,3'-dimetil éter

(15), quercetina- 3,4'-dimetil éter (16), quercetina-3,7-dimetil éter (17), quercetina-3,7,3'-trimetil éter (18), eriodictol-3'-metil éter (19), catequina (20) (Fig. 3). Así como, los O-glucósidos, kaempferol 3 β -glucopiranosido (21), 3 β -arabinósido (22), quercetina 3 β -glucopiranosido (23), 3 β -galactopiranosido (24), 3- α -L-arabinósido (25), 3-O-ramnosilgalactopiranosido (26) (Fig. 3) (Haraguchi *et al.*, 1997; Delgado *et al.*, 2001; Coballase-Urrutia *et al.*, 2010; Rodríguez-Chávez *et al.*, 2015; Rodríguez-Chávez *et al.*, 2016).

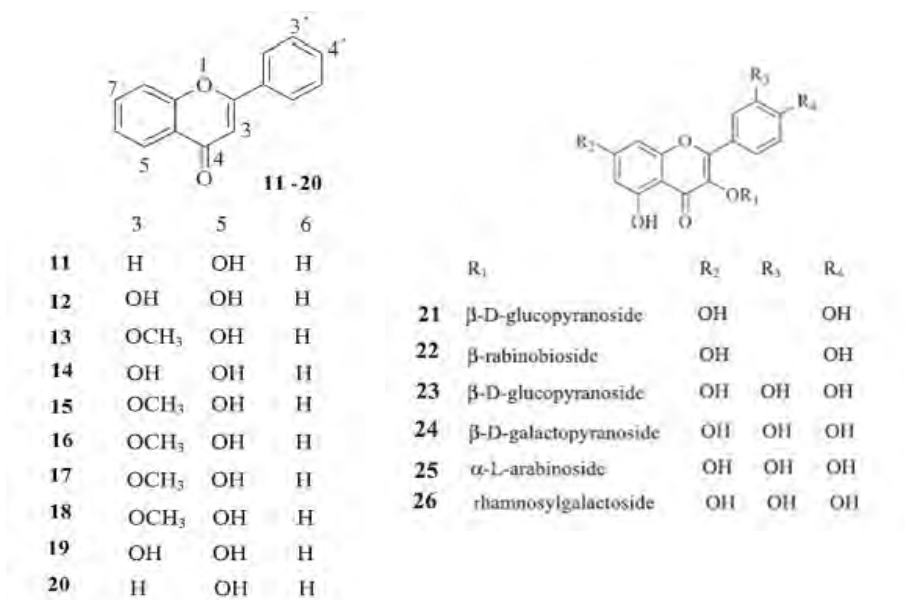


Figura 3. Flavonoides y glucósidos aislados de flores de *H. inuloides* (Rodríguez-Chávez *et al.*, 2017).

Otros compuestos identificados, son el guayacol (27), ácido elágico (28), fenol (29), ácido p-cumárico (30), hidroxicinamatos como ácido 1-cafeoilquínico (31), ácido 3-cafeiloquinico (32), ácido caféico (33), ácido protocatecúico (34), 7-(3,3-dimetil aliloxi) cumarina (35), vainillina (36), ácido vanílico (37), pirocatecol (38) y ácido gálico (39) (Fig. 4) (Delgado *et al.*, 2001; Mijangos *et al.*, 2011; Lin y Harnly, 2012).

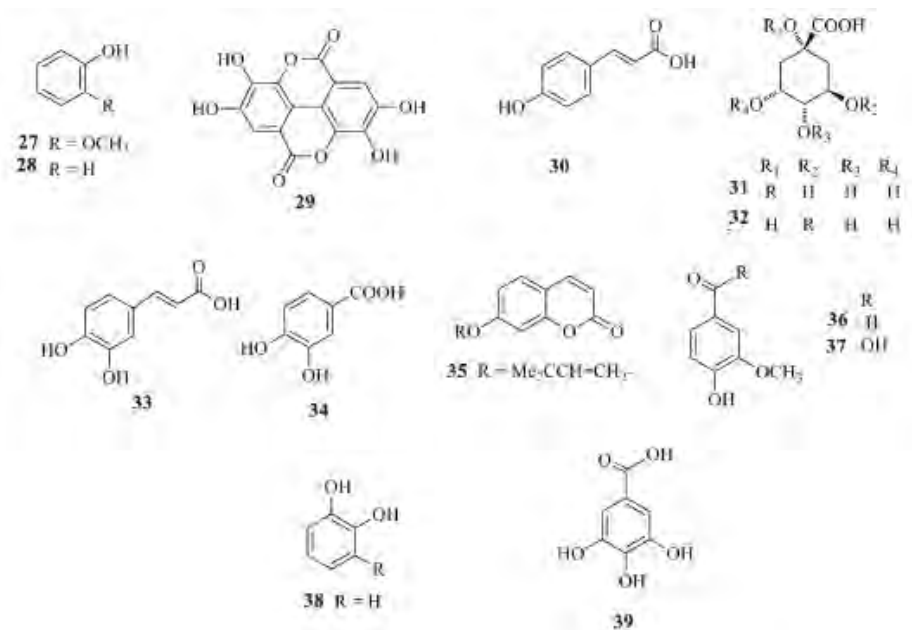


Figura 4. Otros compuestos aislados de flores de *H. inuloides* (Rodríguez-Chávez *et al.*, 2017).

2.5.4 Usos tradicionales de *H. inuloides*

Esta planta ha sido utilizada desde la antigüedad para aliviar el dolor producido por golpes o caídas. En el siglo XVII, se le dio un uso externo para contribuir a disminuir el dolor provocado por artritis, reumatismo, desgarros musculares, golpes, etc. En cuanto al uso interno, el árnica se ha utilizado para problemas gastrointestinales como ardor o inflamación de estómago y gastritis o úlceras (Moreno-Salazar *et al.*, 2008; Andrade-Cetto, 2009).

H. inuloides, es muy conocida por su uso en la medicina tradicional mexicana, algunos estudios han documentado métodos tradicionales de preparación y vías de administración para fines medicinales, en la Tabla 1 se describen algunas de sus aplicaciones terapéuticas y preparación. Las partes de la planta comúnmente utilizadas son las flores, seguidas de hojas y tallos, entre los métodos de preparación se encuentran la infusión, maceración y remojo. Para la administración vía oral se colocan las partes de la planta en agua hirviendo y se ingieren en forma de té (Loredo-Medina *et al.*, 2002; Cruz, 2007; Rodríguez-Chávez *et al.*, 2017).

Tabla 1. Aplicación terapéutica y modo de uso de *Heterotheca inuloides*.

Enfermedad	Preparación y modo de uso	Referencia
Trastornos biliares, disminución del apetito, úlceras gástricas, problemas de riñón y venas varicosas	Se recomienda tomar una infusión oral de las flores, hojas y ramas.	Aguilar <i>et al.</i> , 1994; INI, 1994; Loredo-Medina <i>et al.</i> , 2002.
Golpes, inflamación y úlceras	Preparar una infusión con 3 g de flor fresca por litro de agua y beber una taza después de cada comida durante 15 días.	CONAFOR, 2010.
Tos y problemas respiratorios	Preparar una infusión con 5 g en 0.5 L de agua. Beber una taza antes de cada comida durante 3 días, suspender 3 días y repetir el tratamiento 3 días.	INI, 1994.
Heridas y mordeduras de perro	Hervir la planta entera en 1 L de agua. Lavar las heridas con la infusión.	Gallardo, 2008.
Gastritis	Hervir las hojas de la planta en 0.5 L de agua con <i>Baccharis salicifolia Pers</i> (hierba de golpe) y <i>Aloe barbadensis</i> (sábila), combinado con jugo de naranja.	Cruz, 2007.
Hemorroides	Hervir una rama con inflorescencias en 5 L de agua. Tomar baños de asiento con la infusión todas las noches durante una semana.	Cruz, 2007.
Inflamación de hígado	Preparar una infusión con 4 hojas o 5 g en 500 mL de agua y administrarla por vía oral (una taza) durante 3 días, suspender y retomar 3 días más.	INI, 1994; Cruz, 2007.
Reumatismo	Preparar una infusión con 3 flores frescas en un litro de agua. Beber una taza después de cada comida durante 15 días. Empapar 5 g de planta en 0.5 L de alcohol y frotar en el área afectada durante 8 días.	CONAFOR, 2010; INI, 1994.
Espinillas, erupción cutánea, urticaria y picazón	Hervir 14 plantas en 15 o 20 L de agua. Tomar un baño una vez al día durante 3 días. Beber la infusión con todo y planta.	INI, 1994.
Inflamación del estómago	Preparar una infusión con 3 ramas en 500 mL de agua y administrarla por vía oral.	Cruz, 2007.
Heridas hinchadas	Preparar una infusión con 3 ramas en 500 mL de agua y administrarla por vía oral. Preparar una infusión con 3 ramilletes de ramas en 3 L de agua y aplicar con un pañuelo en la herida.	Cruz, 2007.
Dolor de muelas	Preparar una infusión y aplicar compresas calientes en el área del dolor.	Linares <i>et al.</i> , 1988.

2.5.5 Actividad biológica de *H. inuloides*

H. inuloides es una gran fuente de compuestos químicos, aislados de diferentes extractos orgánicos de hoja y flor, siguiendo diversas metodologías. La presencia de estos compuestos, le ha otorgado distintas propiedades, como actividad antimicrobiana, analgésica, antiinflamatoria y antioxidante. Es importante mencionar que la composición y concentración de metabolitos presentes en cualquier planta, varía entre regiones geográficas y hábitats (Kubo *et al.*, 2000; Delgado *et al.*, 2001; Maldonado-López *et al.*, 2008; Coballase-Urrutia *et al.*, 2010; Juárez-Flores *et al.*, 2010; Muñoz-Velázquez *et al.*, 2012; Rosas-Piñón *et al.*, 2012; Flores-San Martín *et al.*, 2013; Rodríguez-Chávez *et al.*, 2016).

La capacidad antimicrobiana de *H. inuloides*, se ha evaluado utilizando diferentes cepas de interés. Castillo-Juárez *et al.* (2009), reportan que extractos metanólicos, tienen actividad contra *Helicobacter pylori*; Rosas-Piñón *et al.* (2012), reportan que extractos etanólicos, tienen actividad frente a *Streptococcus mutans*. Freixa *et al.* (1998), reportan actividad anti fúngica contra *Microsporium gypseum*. Por su parte Kubo *et al.* (1994), reportan que los sesquiterpenos 7-hidroxicadalenol y 7-hidroxi-3,4-dihidroxicadalenol presentes en flores de *H. inuloides*, ejercen actividad contra *Bacillus subtilis*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans*, con valores de concentración mínima inhibitoria, entre 6.23 y 12.5 mg/mL.

Con respecto a la actividad antiparasitaria Rodríguez-Chávez *et al.* (2015), evaluaron la actividad giardicida de metabolitos de *H. inuloides* seleccionados, utilizando un modelo experimental *in vitro* de giardiasis, para este, realizaron una extracción con acetona del material vegetal seco y en polvo a temperatura ambiente, evaporaron el disolvente y el residuo lo purificaron por cromatografía líquida por vacío y lo fraccionaron con distintas proporciones de hexano-etanol-acetona; los compuestos 7-hidroxi-3,4-dihidroxicadalenol y 7-hidroxicadalenol, redujeron significativamente la supervivencia de los trofozoítos de *G. intestinalis*. También se ha encontrado que el 7-hidroxicadalenol tiene actividad contra promastigotes de *Leishmania chagasi*, con una concentración mínima inhibitoria de 15.6 µg/mL (Rodríguez *et al.*, 2013).

Por otra parte, *H. inuloides* ha sido evaluada como una opción contra las plagas de gorgojo de maíz (*Sitophilus zeamais* Motsch) y gorgojo de frijol (*Zabrotes subfasciatus* Boheman), ya que, en un estudio realizado por Juárez-Flores *et al.* (2010), los polvos de hojas y flores causaron un 87.7% de mortalidad para *S. zeamais* en granos de maíz, tratados 15 días después de la infestación .

Entre otras propiedades, *H. inuloides*. tiene actividad antiinflamatoria y analgésica, que ha sido utilizada en la medicina tradicional mexicana, dichas propiedades han sido evaluadas en diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*. Gené *et al.*. (1998), encontraron que extractos acuosos de flores secas (100 g por 3 L de agua a ebullición), produjeron un 29.2% de inhibición de la inflamación, usando la prueba de edema inducido por carragenano (100 mg/Kg en ratas hembras Wistar). En el año 2000, Segura *et al.*, reportan resultados similares, para la administración intraperitoneal de una dosis de 100 mg/Kg, de extracto acuoso de *H. inuloides*, el cual produjo una inhibición del 29% en el edema de pata, inducido por carragenina en ratas.

La actividad antiinflamatoria y analgésica que presentan los extractos acuosos de las flores de *H. inuloides*, está relacionada con la presencia de compuestos como 7-hidroxicaleño, dicadalenol y quercetina, siendo el dicadalenol el que tiene una actividad antiinflamatoria *in vivo* de $70.15 \pm 10.3\%$ de inhibición, la cual es mayor que la de la indometacina, comparando las dosis efectivas de 0.11 y 0.18 mg/oreja, respectivamente (Delgado *et al.*, 2001). Además, se ha encontrado que el aceite esencial de *H. inuloides*, tiene un efecto antiinflamatorio equivalente al de Calecoxib (fármaco antiinflamatorio no esteroideo), ambos a una concentración de 30 $\mu\text{g/mL}$ (Flores-San Martín *et al.*, 2013). Por otra parte, han demostrado que extractos acetónicos y metanólicos de *H. inuloides*, tienen un efecto hepatoprotector contra la toxicidad de CCl_4 en ratas (Coballase-Urrutia *et al.*, 2011).

Con respecto a la actividad antioxidante, ciertos constituyentes de *H. inuloides*, principalmente flavonoides, han sido reportados como antioxidantes. Extractos acetónicos y metanólicos, así como, metabolitos aislados de *H. inuloides*, tienen la capacidad de captar radicales libres como $\text{ABTS}^{\bullet+}$, DPPH^{\bullet} , ONOO^- , $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 y

OH• (Coballase-Urrutia *et al.*, 2010; Rodríguez-Chávez *et al.*, 2015). Por su parte Haraguchi *et al.* (1997), reportan que flavonoides presentes en flores secas de *H. inuloides*, como quercetina, kaempferol y sus glucósidos, tienen actividad contra el radical DPPH, además, kaempferol y quercetina inhiben la peroxidación lipídica microsomal; por otra parte, los sesquiterpenos 7-hidroxicadaleno y 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno, inhiben la auto oxidación de lípidos y la peroxidación de lípidos mitocondrial. Rodríguez-Chávez *et al.* (2015), reportaron que metabolitos aislados de extractos acetónicos de la flor seca de *H. inuloides*, de tipo flavonoide tienen valores de IC₅₀ entre 6.97±0.14 y 13.11±1.2, para la reducción del radical DPPH. Además de los estudios antes mencionados, Muñoz-Velázquez *et al.* (2012), reportaron la capacidad antioxidante de un extracto acuoso a temperatura de ebullición de una bolsa comercial de té de *H. inuloides* (1 g), el cual tuvo un valor de 1.47±0.010 µmol eq. Trolox/mL, empleando el método del radical ABTS.

2.5.6 Toxicidad de *H. inuloides*

La toxicidad de esta planta no ha sido muy estudiada, sin embargo, Rodríguez-Chávez *et al.* (2015), reportaron que se requerían concentraciones equivalentes a 2000 mg/Kg de peso corporal de 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno, en ratones para proporcionar evidencia de efectos tóxicos. Por otra parte, las infusiones terapéuticas de *H. inuloides*, para el consumo oral se hacen con 3 a 10 g de planta seca por litro de agua a ebullición, y el periodo de ingesta recomendado (3 tazas al día), no debe extenderse más allá de 15 días (Tabla 1) (Rodríguez-Chávez *et al.*, 2017). Según los datos publicados, la cantidad de este compuesto es inferior a 2 mg/g de material vegetal seco, comparando con un estudio realizado por Rodríguez-Chávez *et al.* (2015), aislaron 0.2682 mg/g de planta de 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleno, para extractos acetónicos; por lo anterior, las cantidades ingeridas de este compuesto según la preparación de la infusión, están muy por debajo de la dosis que tiene efectos tóxicos en ratones.

2.6 Análisis de compuestos fenólicos presentes en plantas

Las plantas producen un gran número de metabolitos secundarios que no son requeridos para su crecimiento y desarrollo primario, pero son de vital importancia para su interacción con el entorno, reproducción y como mecanismo de defensa en respuesta a un estrés biótico y abiótico (Bhattacharya *et al.*, 2010; Cheynier *et al.*, 2013). Entre los metabolitos secundarios más comunes producidos por plantas se encuentran los compuestos fenólicos, los cuales existen en forma de ácidos fenólicos, lignanos, cumarinas, taninos y flavonoides (Holland *et al.*, 2017). La estructura básica de un compuesto fenólico es un anillo de benceno con sustituyentes hidroxilo, de esta estructura parte la formación de ácidos fenólicos (ácido elágico), fenoles simples y aminoácidos aromáticos como fenilalanina, tirosina y triptófano. La producción de fenoles más complejos comienza con la desaminación de fenilalanina en ácido cinámico (directamente hacia la producción de cumarinas) y luego la conversión en ácido p-cumárico. Por acción de enzimas, los ácidos cumáricos son convertidos en flavonoles (quercetina) y flavan-3-oles (antocianinas) (Dias *et al.*, 2016).

En particular las plantas tienen la necesidad de mantener el transporte eficiente de metabolitos, rigidez estructural y una regulación fina de la homeostasis, para lo cual, después de la biosíntesis realizan la acilación, metilación y glicosilación de metabolitos secundarios incluidos los compuestos fenólicos, estas modificaciones químicas estructurales son catalizadas por enzimas (Caputi *et al.*, 2012). La glicosilación de compuestos fenólicos como flavonoides (flavonoles y flavanoles), se realiza en una región específica por acción de enzimas glicosiltransferasas, dicha reacción genera miles de variantes moleculares en número y tipo de glicósidos flavonoides, lo cual altera la polaridad, volatilidad, estabilidad química y habilidad para interactuar con otros compuestos, así como su actividad biológica, esta última se define como la capacidad inherente de una sustancia para alterar una o más funciones químicas o fisiológicas de una célula, tejido, órgano u organismo (Mosby, 2009; Cheynier *et al.*, 2013). Dicha biosíntesis tiene lugar en el citosol para posteriormente ser almacenados en las vacuolas, siendo las hojas de las plantas las que contienen la mayor cantidad de flavonoides glicosilados, especialmente flavonas

y flavonoles, así, cuando la planta requiere los compuestos libres, genera una hidrólisis enzimática (Ferreira *et al.*, 2017).

Por lo anterior, las plantas son fuentes ricas de polifenoles y otros fitoquímicos, los cuales han sido promovidos en dietas humanas, alimentos funcionales y nutracéuticos por sus propiedades biológicas y como alternativas naturales para el control y la prevención de enfermedades. Sin embargo, antes de que puedan ser utilizados como ingredientes alimentarios, deben ser extraídos de manera eficiente y segura del material vegetal (Holland *et al.*, 2017).

2.6.1 Extracción de compuestos fenólicos en plantas

La extracción eficiente de fenoles a partir de plantas requiere la preparación previa de la muestra para garantizar que los compuestos estén libres y disponibles para su extracción, los pasos de esta preparación dependen de la naturaleza fisicoquímica de la matriz y de la concentración y propiedades químicas de los fenoles de interés (Khoddami *et al.*, 2013). En el caso de las plantas, la preparación previa de la muestra generalmente incluye el secado, la reducción de tamaño de partícula y el uso de disolventes (Gião *et al.*, 2009). La extracción con disolventes es el método más utilizado para aislar compuestos fenólicos de plantas. Considerando el complejo perfil fenólico que tienen estas, un solo disolvente es incapaz de extraer todos los compuestos fenólicos presentes, por ello, es recomendable el uso de mezclas compatibles de diferentes disolventes, los más utilizados para la extracción de fenoles y flavonoides a partir de plantas son agua, alcoholes, éteres, acetona y acetato de etilo (Bhebhe *et al.*, 2016). La elección del solvente depende del tipo de fenol y de la glicosilación, para la extracción de compuestos más polares como los glucósidos, se usan mezclas de agua con metanol o etanol (Murkovic, 2016). Es importante mencionar que el uso final del extracto de la planta también influye en la elección del disolvente, ya que, vale la pena considerar la toxicidad del disolvente y si este es considerado como seguro para su uso y aplicación alimentaria (Holland *et al.*, 2017).

2.6.2 Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos

Después de la extracción de compuestos fenólicos a partir de plantas, la determinación de su contenido se puede llevar a cabo por análisis espectrofotométrico, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o cromatografía de gases (GC), estas últimas son ampliamente utilizadas tanto para la separación como para la cuantificación de compuestos fenólicos (Chandrasekara, 2018).

2.6.2.1 Análisis espectrofotométrico

La espectrofotometría es una de las técnicas relativamente simples para la cuantificación de compuestos fenólicos. Los métodos de Folin-Denis y Folin-Ciocalteu, son los dos ensayos espectrofotométricos más utilizados. Ambos métodos se basan en la reducción química de reactivos que contienen tungsteno y molibdeno, al entrar en contacto con los compuestos fenólicos, los productos de dicha reducción son compuestos de coloración azul, con amplio espectro de absorción de luz, alrededor de 760 nm. Sin embargo, los reactivos para ambos métodos no reaccionan específicamente sólo con fenoles, sino también, con otras sustancias como ácido ascórbico, aminas aromáticas y azúcares (Khoddami *et al.*, 2013).

2.6.2.2 Análisis por cromatografía líquida de alta resolución

La cromatografía líquida de alta resolución, HPLC por sus siglas en inglés (High Performance Liquid Chromatography), es la técnica más utilizada tanto para la separación como para la cuantificación de compuestos fenólicos, generalmente se emplea una fase móvil con un disolvente polar acidificado como ácido acético acuoso y una fase estacionaria, menos polar como acetonitrilo (Khoddami *et al.*, 2013; Murkovic, 2016).

2.6.2.3 Hidrólisis ácida como etapa preparativa para el análisis por HPLC

La preparación de extractos crudos de plantas es un aspecto clave en el análisis cualitativo y cuantitativo de sus constituyentes químicos como los flavonoides. Generalmente la identificación de flavonoides por HPLC, se basa en el tiempo de retención y los espectros de absorción, ambos datos se comparan con flavonoides estándar que generalmente son agliconas, ya que algunos flavonoides glucosilados no están disponibles comercialmente, la mayoría de los investigadores hidrolizan los

glucósidos en agliconas, para posteriormente cuantificarlos por HPLC (Bae *et al.*, 2012; Lv *et al.*, 2015).

Cuando las formas glucosiladas de los flavonoides son de interés no es necesaria la hidrólisis, sin embargo, si se desea determinar y cuantificar un gran número de flavonoides, generalmente se requieren las agliconas de los flavonoides (Merken y Beecher, 2000). Un ejemplo claro de la importancia de realizar la hidrólisis para determinar y cuantificar flavonoides por HPLC es la rutina (quercetina 3-*o*-ramnopiranosil-(1-6)-glucopiranosido), la cual tiene moléculas de ramnosa y glucosa unidas a la aglicona flavonoide; cuando los extractos de flavonoides se hidrolizan completamente, los glucósidos se rompen y la quercetina (su aglicona) queda libre, siendo posible su detección y comparación con el estándar del equipo (Lv *et al.*, 2015). Por lo anterior para la determinación y cuantificación de flavonoides por HPLC, es necesario realizar la hidrólisis de los glucósidos flavonoides, para que exista una correcta y respectiva comparación con los estándares del equipo, sin embargo, la hidrólisis de los glucósidos flavonoides requiere concentraciones relativamente altas (1-2 M) de ácidos en condiciones de reflujo y estas condiciones pueden degradar o destruir algunos flavonoides (Merken y Beecher, 2000).

III. JUSTIFICACIÓN

El crecimiento en la prevalencia de ECD, tales como la hipertensión arterial, diabetes y aterosclerosis, entre otras, ha aumentado gradualmente y se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial. En la ENSANUT, realizada en el 2016, la hipertensión arterial afecta a 17.3 millones de adultos mexicanos, de los cuales, casi la mitad, tienen valores de tensión arterial por arriba de los considerados normales, la prevalencia de esta enfermedad cada vez es mayor a partir de los 20 años de edad y en aquellas personas de 80 o más años. El impacto económico de los tratamientos de las ECD es relevante, estos son aplicados de por vida, lo que representa un alto costo económico tanto para pacientes, como para el sector salud, pacientes hipertensos gastan de 3 a 15 mil pesos al año en su tratamiento, dependiendo del avance de la enfermedad y de las intervenciones por complicaciones que esta ocasione, así como, de si es atendido en el sector público o privado. Las cifras incrementan año con año, debido al creciente número de pacientes hipertensos (Villarreal *et al.*, 2002). Anualmente se destinan alrededor de 564 935.7 millones de pesos al sector salud y cerca de 18 millones son destinados al gasto total en hipertensión arterial (Morales, 2018). Por otra parte, la aparición de efectos adversos o reacciones de hipersensibilidad, son situaciones que obligan a suspender el tratamiento o cambiarlo con frecuencia, sumándose esto al alto costo y las complicaciones de la enfermedad. Por lo anterior, resulta importante la búsqueda de nuevos agentes con propiedades antihipertensivas, donde las plantas son una fuente rica en compuestos con actividad biológica. *Heterotheca inuloides* Cass, es una planta muy utilizada en la medicina tradicional, con altas concentraciones de compuestos activos, como sesquiterpenos, triterpenos, fitoesteroles, flavonas, flavonoides, etc., con propiedades antiinflamatorias y antioxidantes; teniendo así, potencial frente a problemas cardiovasculares como la hipertensión, por lo que su estudio favorecería el aprovechamiento de esta especie, que crece de manera silvestre en la zona centro de México, dándole valor agregado y obteniendo una alternativa económica, para complementar los tratamientos antihipertensivos.

IV. HIPÓTESIS

El estadio de desarrollo de *Heterotheca inuloides* Cass y el tipo de extracción, influye en la concentración de compuestos fenólicos y por lo tanto en su actividad biológica.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Cuantificar compuestos fenólicos y la actividad biológica *in vitro* en extractos de *Heterotheca inuloides* Cass en dos estadios de desarrollo.

5.2 Objetivos específicos

1. Obtener extractos acuosos y etanólicos, de diferentes partes aéreas de *H. inuloides* Cass, en dos estadios de desarrollo.
2. Caracterizar los extractos, mediante la cuantificación de fenoles totales, flavonoides totales y capacidad captora de radicales libres.
3. Determinar el efecto de la hidrólisis ácida, sobre los extractos obtenidos y su actividad biológica.
4. Evaluar la actividad inhibitoria de la enzima convertidora de la angiotensina *in vitro* de los extractos como mecanismo hipotensor.
5. Establecer el tiempo de hidrólisis para la identificación de flavonoides por cromatografía líquida de alta resolución.
6. Cuantificar flavonoides por cromatografía líquida de alta resolución en los extractos con mayor actividad biológica.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Descripción general de la metodología

El diagrama general, que se presenta en la Figura 5, describe la metodología general que se siguió en el presente trabajo.

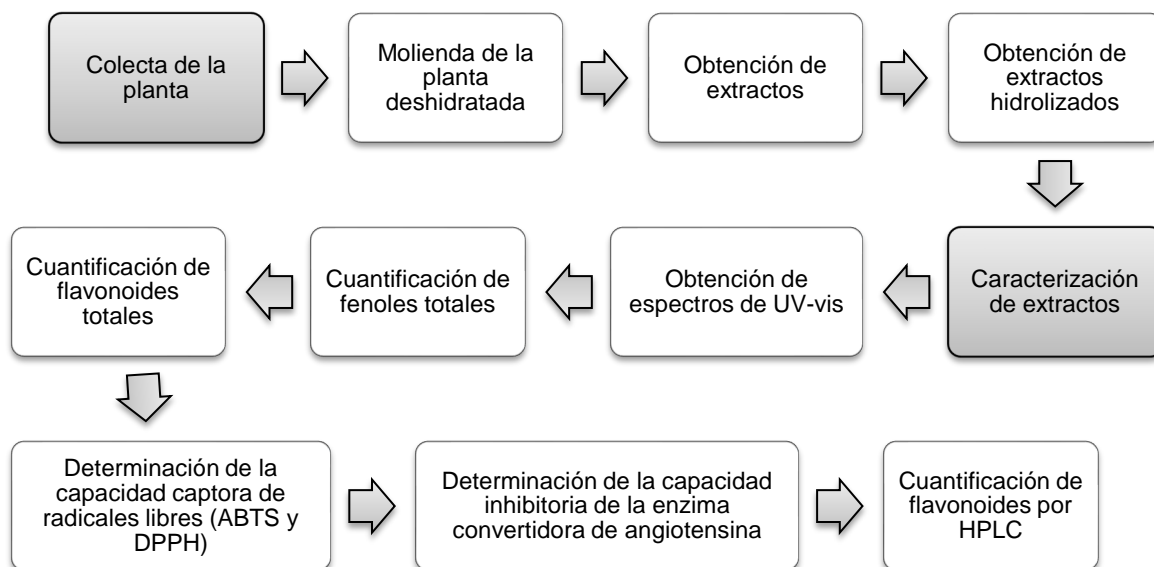


Figura 5. Diagrama general de la metodología.

6.2 Colecta de la planta

Se recolectaron diversas plantas de *H. inuloides* Cass, en dos estadios de desarrollo, planta con altura de 25 cm (P25) (Fig. 6-A) y planta en floración (PF) (Fig. 6-B), el 28 de Julio del 2016, en la Laguna de Atexca, en el municipio de Zacatlán, Puebla, México.

A la P25 se le retiró la raíz y la PF se fraccionó en hojas, raíz y flor, descartando la raíz, cada parte se deshidrató en una estufa con recirculación de aire (SL Shel lab, E.U.A.) a 40°C por 24 h (Fig. 7 y 8).



Figura 6. *Heterotheca inuloides* Cass, en dos estadios de desarrollo. A- planta con altura de 25 cm (P25), B- planta en floración (PF).

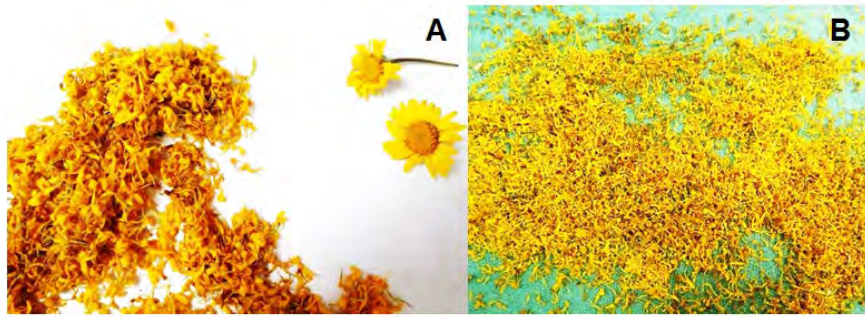


Figura 7. Pétalo de *H. inuloides* Cass. Antes (A) y después del secado (B).



Figura 8. Secado y pesado de hoja de *H. inuloides* Cass. Fraccionamiento (A) y pesado de planta de 25 cm (B).

6.3 Molienda de la planta deshidratada

Cada parte (hoja, tallo y pétalo), se molió en un molino ciclónico (NutriBullet, China), hasta obtener un tamaño de partícula de 212 μm , empleando un tamiz con número de malla 70 (Fig. 9-A). Cada muestra se almacenó en recipientes plásticos, hasta su uso (Fig. 9-B).



Figura 9. Tamiz malla 70 (A), hoja de la planta en floración molida y tamizada (B).

6.3 Obtención de extractos

Se obtuvieron extractos con etanol al 40% (EtOH 40) y con agua a 25°C (A. 25°C) y agua a 92°C (A. 92°C), en sus versiones hidrolizadas y no hidrolizadas.

Se colocaron 50 mg de muestra en tubos Eppendorf, se añadió 1 mL de disolvente y se dejó reposar durante 5 min (Fig. 10). Transcurrido el tiempo se centrifugó a 12000 rpm por 10 min en una microcentrífuga (mini Spin plus, Eppendorf, Alemania), (Fig. 11), se recuperó el sobrenadante en tubos de ensayo (Fig. 12), se realizaron 3 lavados para obtener 3 mL y el extracto se aforó a 10 mL (Fig. 13); el procedimiento mencionado se realizó tanto con EtOH 40 como con agua. En el caso de la extracción con agua a 92°C, el reposo de 5 min antes de la separación, se sustituyó por un baño María a 92 °C por 15 min.

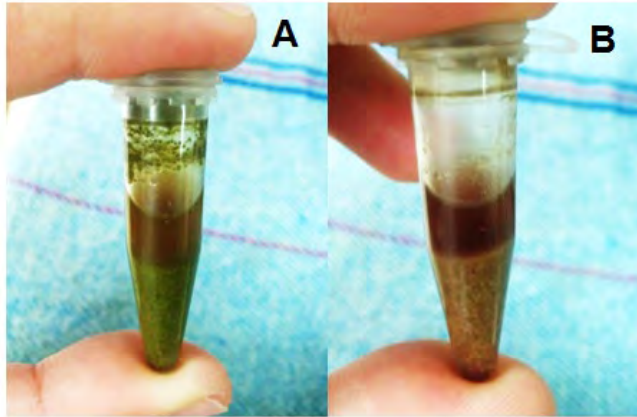


Figura 10. Obtención de extractos de hoja y pétalo de planta en floración de *H. inuloides*.
Muestra de hoja (A) y tallo de la planta en floración (B).



Figura 11. Centrífuga mini Spain, plus, Eppendorf.

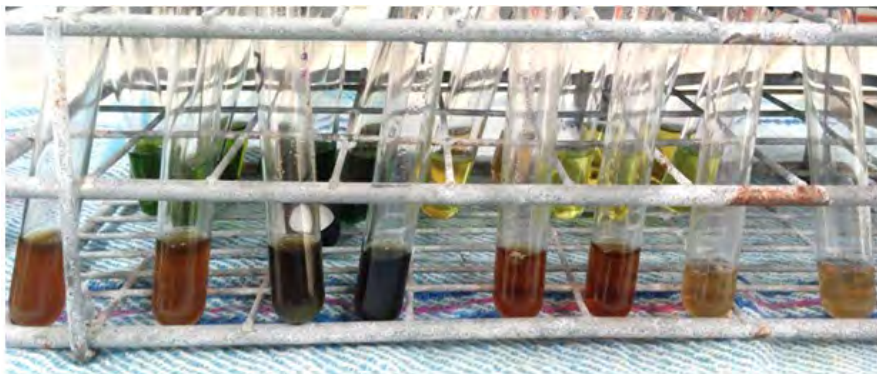


Figura 12. Extractos acuosos de hoja y tallo de la planta en floración, previos a ser aforados.

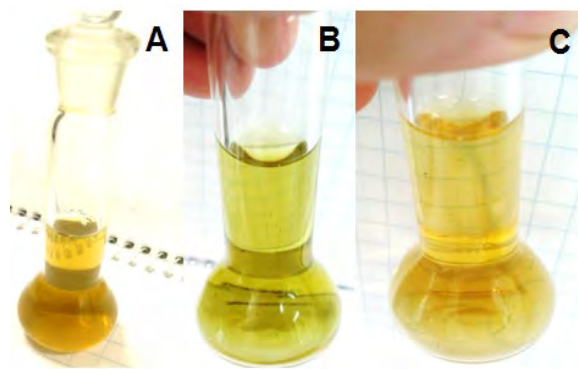


Figura 13. Extractos acuosos aforados a 10 mL.

Hoja de la planta en floración(A), hoja de la planta de 25 cm (B) y tallo de la planta en floración (C).

6.3.1 Obtención de extractos hidrolizados

Siguiendo la metodología del apartado 6.3 se obtuvieron los extractos, previamente a ser aforados, se colocaron en una estufa (SL Shel lab, E.U.A.) a 45°C durante 24 h para evaporar la mayor cantidad de disolvente, posteriormente se les añadió 3 mL de HCl 2 N y se colocaron en un baño María (90-92°C) por 2 h (Fig.14). Una vez fríos se agregaron 3 mL de acetato de etilo (Fig.15), se agitaron vigorosamente y se extrajo la fase orgánica; esta se depositó en viales (Fig.16), para evaporar el disolvente en la estufa a 50 °C (Fig.17); el residuo se disolvió en etanol al 40% y se aforó a 10 mL.



Figura 14. Hidrólisis ácida de extractos a 90°C.



Figura 15. Extracción de la fase orgánica con acetato de etilo.



Figura 16. Extractos acuosos hidrolizados.

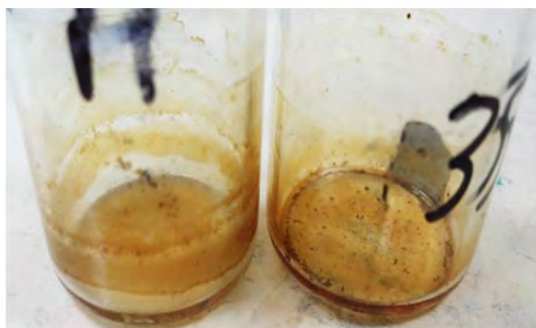


Figura 17. Residuo de extracto hidrolizado al evaporar el solvente.

6.4 Caracterización de extractos

De los extractos no hidrolizados e hidrolizados, se obtuvieron sus espectros de absorción y se cuantificaron fenoles y flavonoides totales, así como su capacidad captadora de radicales libres, mientras que la capacidad IECA, se determinó en todos los extractos no hidrolizados y solo en algunos extractos hidrolizados.

6.4.1 Obtención de espectros de UV-vis

Un espectro de absorción es la representación gráfica (curva característica), de la absorbancia de compuestos presentes en una muestra a varias longitudes de onda, el rango Ultravioleta y visible (UV-Vis) va de los 190 a los 750 nm (Silva, 2006; Skoog *et al.*, 2008).

Los espectros de cada extracto se obtuvieron, colocando 50 μ L de los extractos en 1050 μ L de su respectivo disolvente en celdas de cuarzo, realizando un barrido de los 210 a 800 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo, E.U.A.). Los datos obtenidos fueron graficados en el software Statistica 8.0, para realizar el análisis correspondiente.

6.4.2 Cuantificación de fenoles totales

Los compuestos fenólicos totales, se determinaron por el método de Folin-Ciocalteu partiendo de la metodología descrita por Pękal y Pyrzynska (2014), con modificaciones de Vargas-León *et al.* (2018). El reactivo de Folin-Ciocalteu, es una mezcla de ácidos de coloración amarilla (fosfowolfrámico y fosfomolibdico). Estos compuestos se reducen al interaccionar con los compuestos fenólicos, dando origen a óxidos de coloración azul (óxidos de wolframio y molibdeno), los cuales exhiben una amplia absorción de luz, con un máximo de 760 nm (Pękal y Pyrzynska, 2014). La intensidad de la absorción de la luz a esta longitud de onda, es proporcional a la concentración de compuestos fenólicos. Se utilizó una curva estándar de 0 a 100 ppm de ácido gálico (ÁG), y se determinaron las concentraciones de fenoles totales (FT), siguiendo el diagrama de flujo de la Figura 18. Los resultados se expresan como mg equivalentes de ácido gálico por cada 100 g de planta deshidratada (mg EÁG/100 g pd).

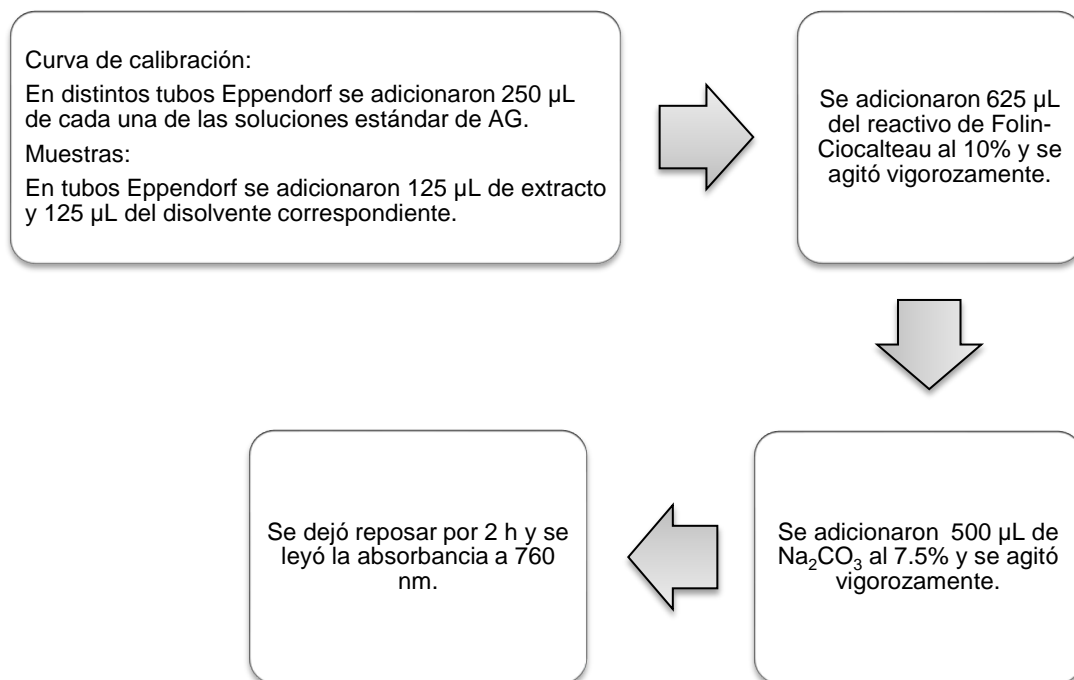


Figura 18. Diagrama de flujo de la cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.

6.4.3 Cuantificación de flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales, se determinó en los extractos utilizando dos ensayos de formación de complejos de aluminio, reportados por Pękal y Pyrzyńska (2014), con modificaciones de Vargas-León *et al.* (2018).

Se determinaron dos grupos de flavonoides, flavanoles y flavonoles; los flavanoles son aquellos que no tienen la capacidad de quelar al ión Al^{3+} directamente, por ello, es necesaria la nitración del anillo aromático y un medio básico para poder formar el complejo, el flavanol más representativo es la catequina, por otra parte, los flavonoles sí pueden formar complejos con el ión Al^{3+} directamente, el flavanol más representativo es la quercetina (Pękal y Pyrzyńska, 2014). El primer ensayo consistió en la reacción de los extractos, en presencia de NaNO_2 , con solución de AlCl_3 , en medio alcalino y la posterior medición de la absorbancia a 505 nm (Fig.19), se utilizó una curva de 0 a 50 ppm de catequina, los resultados fueron expresados en mg equivalentes de catequina por cada 100 g de planta deshidratada (mg EC/100 g pd).

El segundo ensayo consistió en la reacción de los extractos con AlCl_3 , utilizando una curva de 0 a 25 ppm de quercetina, midiendo la absorbancia a 430 nm (Fig.20), los resultados fueron expresados como mg equivalentes de quercetina por cada 100 g de planta deshidratada (mg EQ/100 g pd). Finalmente, el contenido de flavonoides totales se reporta como la suma de las concentraciones de los dos ensayos en mg totales por cada 100 g de planta deshidratada (mg T/100 g pd).

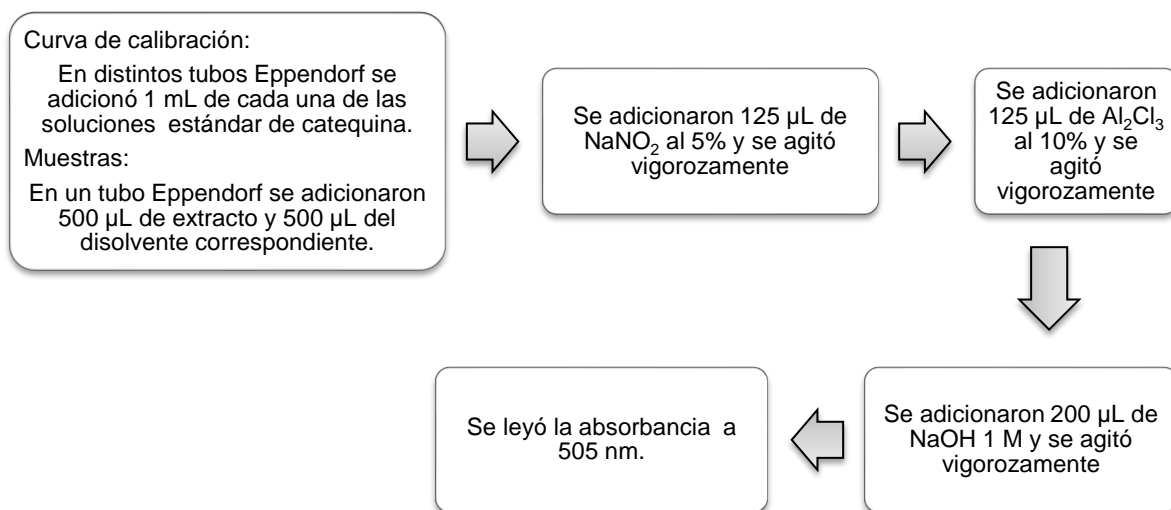


Figura 19. Diagrama de flujo de la cuantificación de flavonoides empleando como estándar catequina.

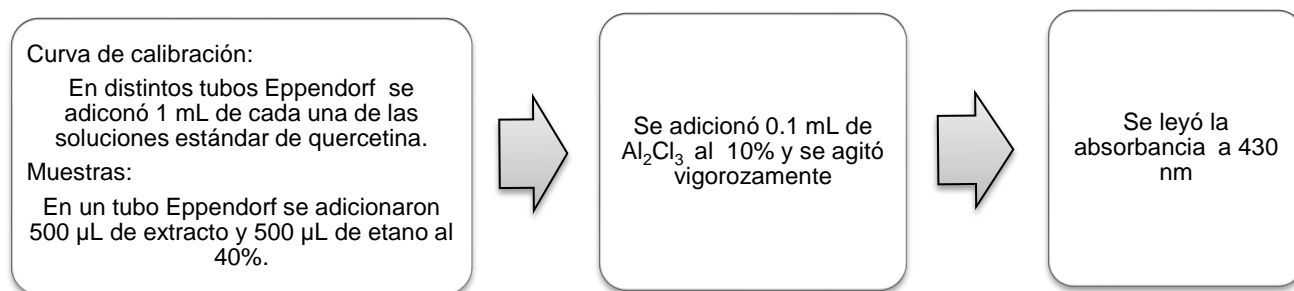


Figura 20. Diagrama de flujo de la cuantificación de flavonoides empleando como estándar quercetina.

6.4.4 Determinación de la capacidad captora de radicales libres

La determinación de la capacidad captora de radicales libres (CCRL), es importante para predecir el potencial antioxidante *in vitro* de especies vegetales. Los métodos para su determinación se basan en distintos sistemas generadores de RL. Los radicales reaccionan con la muestra y en virtud de su capacidad captora de RL, se inhibirá la generación de los primeros. En la actualidad, debido a la complejidad de los procesos de oxidación, no existe un método que refleje de forma completa el perfil antioxidante de una muestra, por tanto, es bueno trabajar con varios métodos para facilitar la comparación e interpretación de los resultados (Sánchez-Moreno, 2002).

6.4.4.1 Radical ABTS

Según la metodología desarrollada por Re *et al.* (1999) y descrita por Kuskoski *et al.* (2009), con modificaciones de Vargas-León *et al.* (2018), el radical ABTS^{•+}, se obtuvo tras la reacción del ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) (7 mM) con persulfato potásico (2.45 mM), incubados a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) y en la oscuridad durante 16 h. Una vez formado el radical ABTS^{•+}, se diluyó con etanol hasta obtener un valor de absorbancia de 0.70 (± 0.1) a 732 nm (longitud de onda de máxima absorción). Se utilizó una curva de Trolox, como antioxidante de referencia, de 0 a 150 ppm y se siguió el diagrama de flujo de la Figura 21, reportando los resultados en mg equivalentes de Trolox por cada 100 g de planta deshidratada (mg ET/100 g pd), según la parte y estadio de desarrollo de la planta.

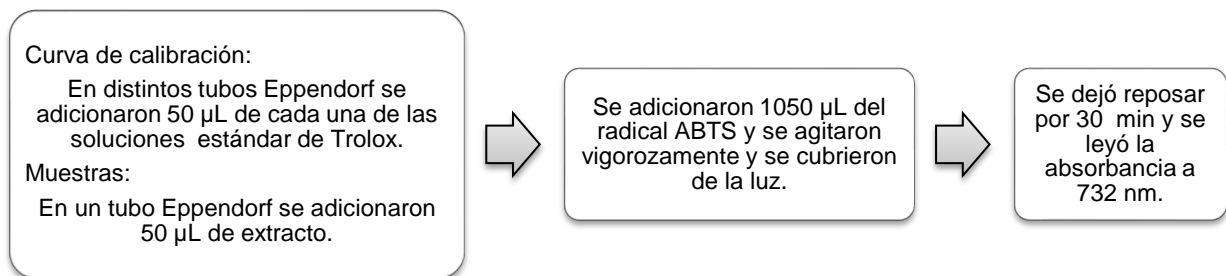


Figura 21. Diagrama de flujo de la determinación de la capacidad captora de radicales libres empleando el radical ABTS.

6.4.4.2 Radical DPPH

Este método, desarrollado por Brand-Willams *et al.* (1995), se basa en la reducción de la absorbancia a 510 nm del radical DPPH• por antioxidantes. Con modificaciones de Vargas-León *et al.* (2018), en el método descrito por Kim *et al.* (2002), se basa en la medida de la absorbancia del radical DPPH• 100 μ M (3.9 mL) (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), disuelto en metanol, a la longitud de onda de 510 nm. Se utilizó una curva patrón de ácido ascórbico de 0 a 150 ppm, siguiendo el diagrama de flujo de la Figura 22 y reportando los resultados en mg equivalentes de ácido ascórbico por cada 100 g de planta deshidratada (mg EÁA/100 g pd).

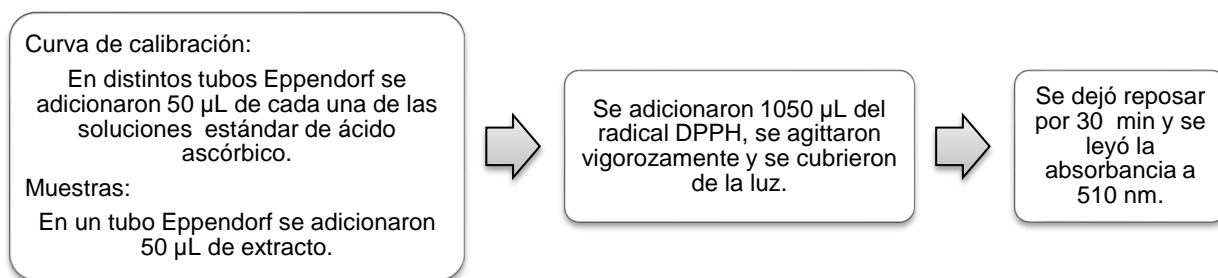


Figura 22. Diagrama de flujo de la determinación de la capacidad captora de radicales libres empleando el radical DPPH.

6.4.5 Determinación de la capacidad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina

La actividad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), se determinó con el método de Cushman y Cheung (1971), modificado por Hernández-Ledesma *et al.* (2003), y modificaciones de Vargas-León *et al.* (2018). El método se basa en la medida espectrofotométrica a 228 nm del ácido hipúrico formado por la reacción del sustrato Hipuril-Histidil-Leucina (HHL) con la ECA, en presencia y ausencia de inhibidor. De los extractos en etanol al 40%, se tomó un volumen, al que se le retiró etanol por evaporación y se completó el volumen evaporado con agua desionizada, con el fin de evitar el efecto del disolvente sobre la actividad de la

enzima. Se preparó el sustrato, constituido por HHL 10 mM, disuelto en un tampón de fosfato potásico 200 mM y cloruro sódico 300 mM, de pH 8.3. La enzima (ECA), se preparó a 4 mU, disueltas en glicerol al 50%. Se siguió el diagrama de flujo de la Figura 23 y se reportan los resultados como porcentaje de inhibición de la ECA (%IECA).

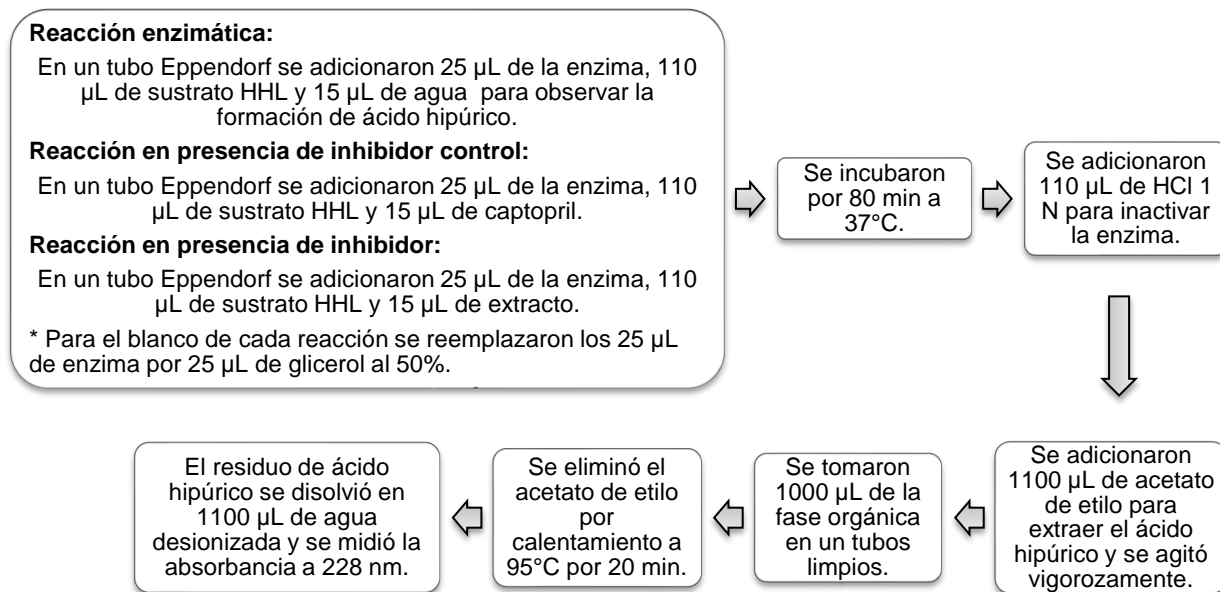


Figura 23. Diagrama de flujo de la determinación de la capacidad inhibitoria de enzima convertidora de angiotensina.

Para determinar el %IECA de cada muestra se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Actividad IECA} = \frac{(Ab_{\text{control}} - Ab_{\text{blanco}}) - (Ab_{\text{muestra}} - Ab_{\text{blanco}})}{(Ab_{\text{control}} - Ab_{\text{blanco}})} \times 100$$

Donde:

Ab_{control} : Absorbancia del ácido hipúrico formado tras la acción de la ECA sobre el HHL, sin inhibidor.

Ab_{blanco} : Absorbancia del HHL que no ha reaccionado, en ausencia de enzima, y que ha sido extraído con el acetato de etilo.

Ab_{muestra} : Absorbancia del ácido hipúrico formado tras la acción de la ECA sobre el HHL, en presencia de sustancias inhibitoras.

$Ab_{\text{blanco muestra}}$: Absorbancia del HHL y de la muestra que no han reaccionado, en ausencia de enzima, que han sido extraídos con el acetato de etilo.

6.4.6 Cuantificación de flavonoides por HPLC

6.4.6.1 Preparación de muestras

Para realizar la cuantificación de flavonoides por HPLC es necesaria la hidrólisis de los extractos a analizar, para establecer las condiciones óptimas, se probaron cuatro tiempos de hidrólisis (0, 10, 20 y 40 min), siguiendo la metodología descrita en la Figura 24, con variación del tiempo.

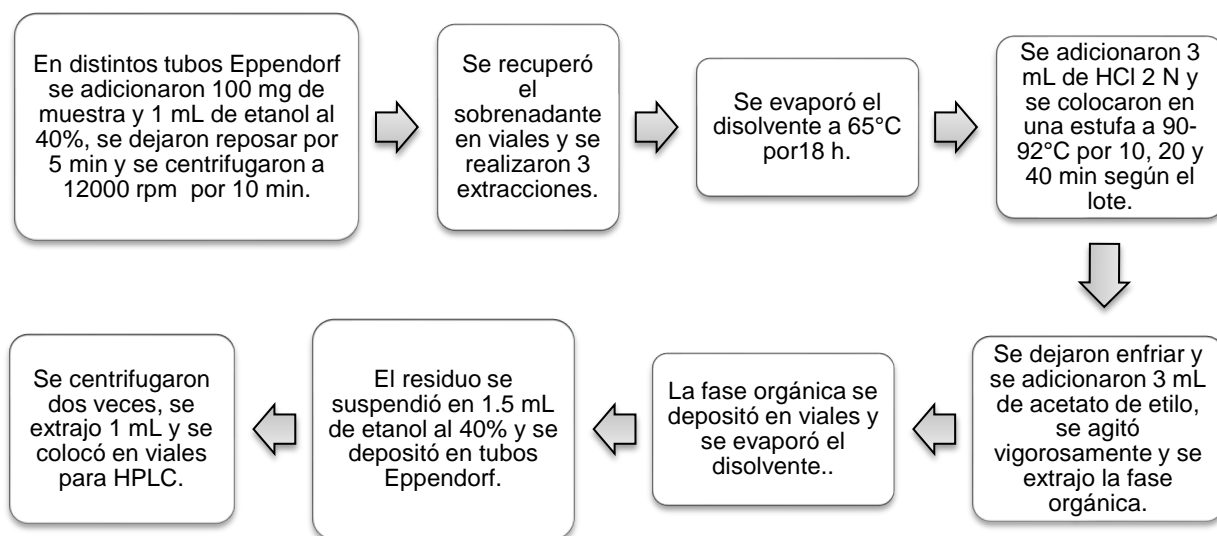


Figura 24. Diagrama de flujo de la preparación de muestras para la cuantificación de flavonoides por HPLC.

6.4.6.2 Análisis de flavonoides por HPLC

La cuantificación de flavonoides se realizó utilizando una curva de calibración de la mezcla de flavonoides catequina, quercetina, miricetina, daidzeina, apigenina y kaempferol de 12.5 a 200 ppm, con base en la metodología descrita por Díaz-Batalla *et al.* (2006), utilizando estándares Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Alemania). Se usó un equipo HPLC (Dionex Ultimate 3000, ThermoFisher Scientific, E.U.A.), utilizando una columna C18 Acclaim 120, C18 (ThermoFisher Scientific, E.U. A), con un detector de UV-vis.

La fase móvil A, fue agua acidificada con ácido acético (pH 2.8) y la fase móvil B, acetonitrilo, ambos disolventes grado HPLC, con un flujo de 1 mL/min, presión inicial de 72.3 bares y una inyección de 20 μ L de muestra. Se utilizó un gradiente lineal de elución de 5 min-30% (B); 8 min-45% (B); 14 min-55%(B); 14.5 min-60% (B); 14.6min-95% (B); 17.5 min-96% (B): 18 min-0% (B) y 20 min isocrático de 0% (B). Las longitudes de onda fueron 252 nm (daidzeina), 280 nm (catequina), 336 nm (apigenina) y 370 nm (miricetina, quercetina y kaempferol) nm. Los resultados se reportan como mg de cada flavonoide por cada 100 g de planta deshidratada (mg/100 g pd)

6.4.7 Análisis estadístico

Cada determinación se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como la media \pm la desviación estándar. Se utilizó un ANOVA, para comparar los resultados ($p \leq 0.05$) y se hizo una comparación de medias de Tukey de dos vías (parte de la planta- disolvente) utilizando el Software STATISTICA versión 8.0.

Utilizando el mismo Software, para los extractos no hidrolizados se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson, para determinar la correlación lineal entre los compuestos fenólicos presentes en los extractos, con la capacidad captadora de RL y la actividad IECA

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron 24 extractos diferentes y sus abreviaturas se describen en la siguiente lista, para facilitar su identificación a lo largo de este apartado.

Abreviatura	Extracto
P25 EtOH 40 S/H	Extracto etanólico al 40% de la planta de 25 cm no hidrolizado
P25 EtOH 40 C/H	Extracto etanólico al 40% de la planta de 25 cm hidrolizado
P25 A. 25 °C S/H	Extracto acuoso a 25°C de la planta de 25 cm no hidrolizado
P25 A. 25°C C/H	Extracto acuoso a 25°C de la planta de 25 cm hidrolizado
P25 A. 92°C S/H	Extracto acuoso a 92°C de la planta de 25 cm no hidrolizado
P25 A. 92°C C/H	Extracto acuoso a 92°C de la planta de 25 cm hidrolizado
Hoja PF EtOH 40 S/H	Extracto etanólico al 40% de la hoja de la planta en floración no hidrolizado
Hoja PF EtOH 40 C/H	Extracto etanólico al 40% de hoja de la planta en floración hidrolizado
Hoja PF A. 25°C S/H	Extracto acuoso a 25°C de hoja de la planta en floración no hidrolizado
Hoja PF A. 25°C C/H	Extracto acuoso a 25°C de hoja de la planta en floración hidrolizado
Hoja PF A. 92°C S/H	Extracto acuoso a 92°C de hoja de la planta en floración no hidrolizado
Hoja PF A. 92°C C/H	Extracto acuoso a 92°C de hoja de la planta en floración hidrolizado
Tallo PF EtOH 40 S/H	Extracto etanólico al 40% de tallo de la planta en floración no hidrolizado
Tallo PF EtOH 40 C/H	Extracto etanólico al 40% de tallo de la planta en floración hidrolizado
Tallo PF A. 25°C S/H	Extracto acuoso a 25°C de tallo de la planta en floración no hidrolizado
Tallo PF A. 25°C C/H	Extracto acuoso a 25°C de tallo de la planta en floración hidrolizado
Tallo PF A. 92°C S/H	Extracto acuoso a 92°C de tallo de la planta en floración no hidrolizado
Tallo PF A. 92°C C/H	Extracto acuoso a 92°C de tallo de la planta en floración hidrolizado
Pétalo PF EtOH 40 S/H	Extracto etanólico al 40% de pétalo de la planta en floración no hidrolizado
Pétalo PF EtOH 40 C/H	Extracto etanólico al 40% de pétalo de la planta en floración hidrolizado
Pétalo PF A. 25°C S/H	Extracto acuoso a 25°C de pétalo de la planta en floración no hidrolizado
Pétalo PF A. 25°C C/H	Extracto acuoso a 25°C de pétalo de la planta en floración hidrolizado
Pétalo PF A. 92°C S/H	Extracto acuoso a 92°C de pétalo de la planta en floración no hidrolizado
Pétalo PF A. 92°C C/H	Extracto acuoso a 92°C de pétalo de la planta en floración hidrolizado

7.1 Análisis de espectros de los extractos.

Los compuestos fenólicos absorben luz en la región UV, en el caso de los flavonoides, estos presentan dos bandas de absorción características, la banda I con un máximo entre los 300-550 nm, y la banda II con un máximo entre 240-28 nm (Meiken y Beecher, 2000), con base en lo anterior, en la Figura 25 (planta de 25 cm), Figura 26 (hoja), Figura 27 (tallo) y Figura 28 (pétalo), se puede observar la presencia de las bandas características, estableciendo así, la presencia de flavonoides, con variaciones en la concentración, determinadas por el tipo de disolvente utilizado, partes y estadios de desarrollo de *H. inuloides*.

Tanto la hoja (Fig.26), como el pétalo de la planta en floración (PF) (Fig.28), mostraron un pico de absorbancia mayor, que la planta de 25 cm (P25) (Fig.25), siendo la hoja la que tuvo una mayor intensidad en las bandas, lo que se asocia a una mayor cantidad de compuestos fenólicos (CF), sin embargo, el tallo de la PF (Fig.27), tiene menor intensidad (menor concentración de CF) que la P25, ya que, conforme la planta se desarrolla aumenta la concentración de CF, acumulándose principalmente en hojas y flor. Según Berezina *et al.* (2017), el aumento de compuestos fenólicos se relaciona con la exposición a diferentes factores de estrés, siendo las hojas la parte más expuesta, además, los flavonoides son empleados en procesos de polinización y reproducción sexual, lo que se atribuye a una mayor concentración en los pétalos en la planta en floración.

Los extractos EtOH 40 S/H (Fig. 25, 26 y 27), tuvieron un pico de absorbancia mayor (320-340 nm), indicando una concentración de CF más alta, en comparación con los hidrolizados; así mismo, los extractos A.92°C S/H, tuvieron la misma banda de mayor intensidad, con una diferencia menor de 0.1 unidades de absorbancia, en comparación con los extractos EtOH 40 S/H. Se ha reportado que la extracción de compuestos fenólicos es más efectiva, al emplear disolventes acuosos-orgánicos, ya que dichos compuestos contienen fragmentos polares y no polares en su estructura (Rojas-Llanes *et al.*, 2014); así mismo, si están en su forma soluble (glucosilados), presentan una mayor bioaccesibilidad y por lo tanto biodisponibilidad, ya que, aquellos que se encuentran unidos a azúcares como glucosa, galactosa o xilosa, se

absorben en el intestino delgado después de la desglicosilación, por la acción de enzimas como la β -glucosidasa y lactasa florocina hidrolasa, las cuales liberan la aglicona dentro del intestino para ser absorbidas por difusión (Gutiérrez-Grijalva *et al.*, 2016). Con la extracción acuosa a 92°C S/H, se tuvo una mayor extracción de CF en comparación con la extracción a 25°C S/H, ya que la temperatura alta favorece el rompimiento de las vacuolas y por lo tanto la liberación de los metabolitos secundarios almacenados en ella (Ferreira *et al.*, 2017). En el caso del pétalo PF (Fig.28), los extractos A.92°C S/H, tuvieron el pico de absorción mayor, superando a los extractos EtOH 40 S/H, según Kubo *et al.* (2000), esto puede relacionarse con que el principal compuesto fenólico presente en el pétalo PF, que es la quercetina, la cual es altamente soluble en agua.

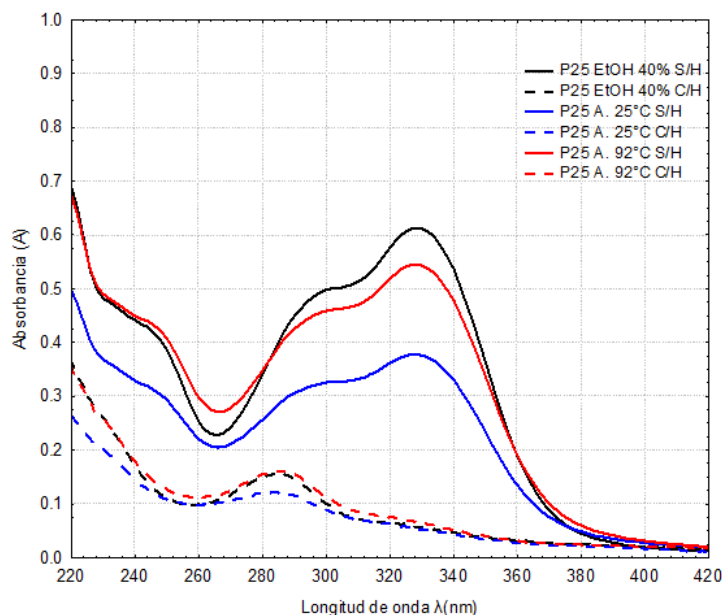


Figura 25. Espectros de absorción de la planta de 25 cm.

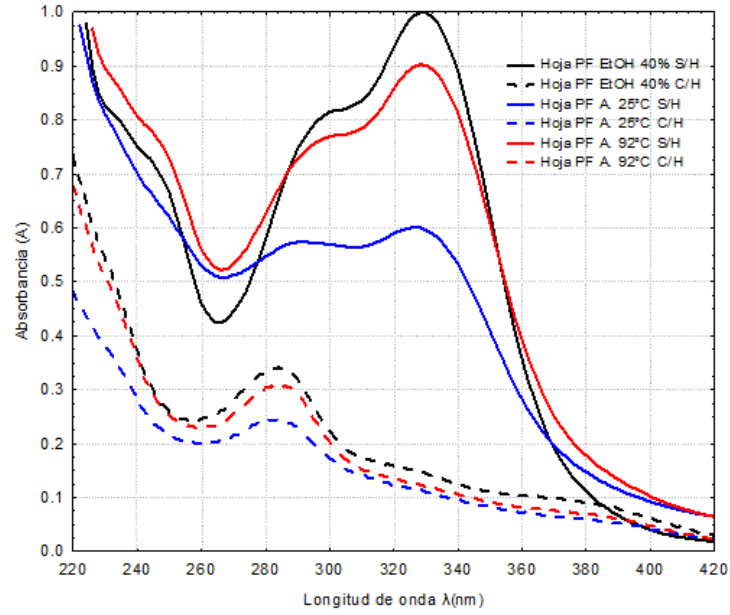


Figura 26. Espectros de absorción de la hoja de la planta en floración.

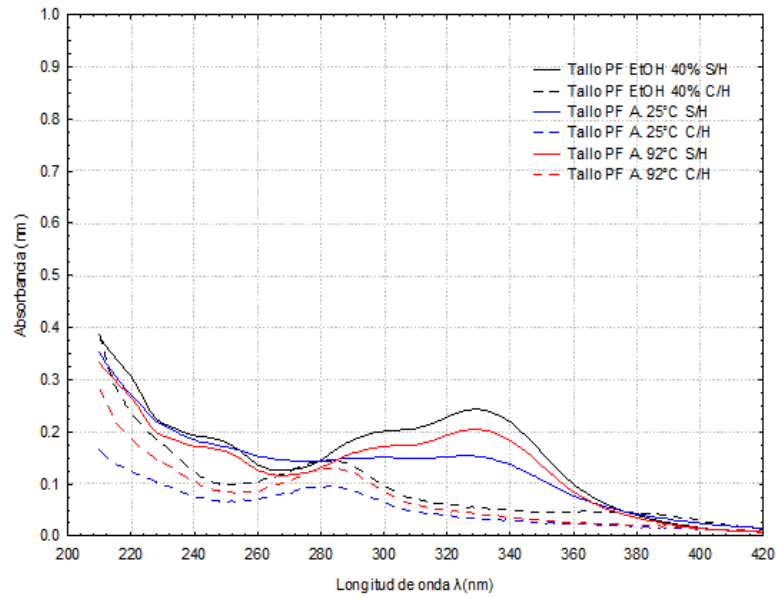


Figura 27. Espectros de absorción del tallo de la planta en floración

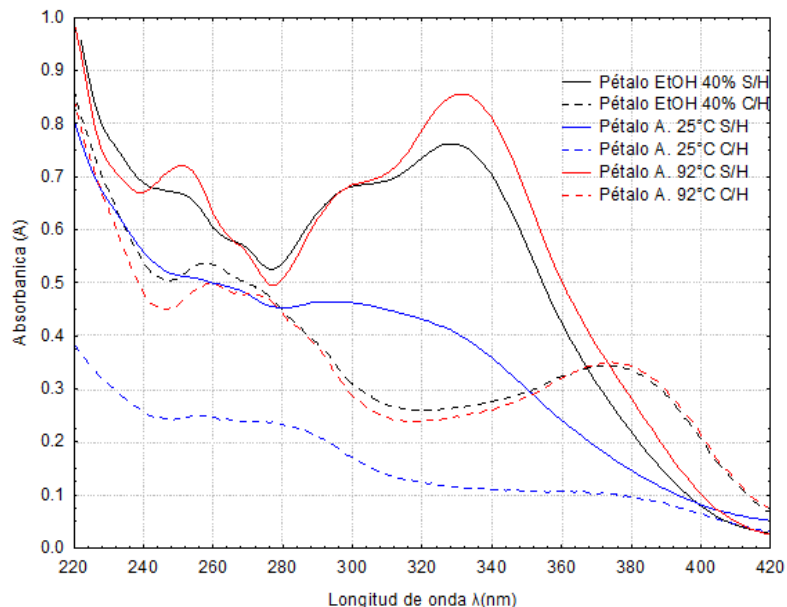


Figura 28. Espectros de absorción del pétalo de la planta en floración.

En los espectros, también se puede observar que tras la hidrólisis ácida (HA), las bandas I y II se modifican, por efecto de la degradación de algunos poli fenoles sensibles a estas condiciones (Arranz, 2010). La hidrólisis en medio ácido y a altas temperaturas, busca liberar aquellos compuestos fenólicos (flavonoides), que se encuentran como glucósidos en el tejido vegetal, rompiendo los enlaces éster, generando un azúcar (glucosa o galactosa) y una aglicona (Ibargüengoitia, 2007), favoreciendo su determinación por técnicas instrumentales.

7.2 Cuantificación de fenoles totales

7.2.1 Extractos no hidrolizados

El contenido de fenoles totales (FT), para los extractos no hidrolizados (Tabla 2), tiene variación con respecto al estadio de desarrollo, las partes anatómicas, el disolvente de extracción, y en el caso de los extractos acuosos, la temperatura tiene un efecto significativo. Los valores se obtuvieron en un rango de 688 ± 16 a 2992 ± 114 mg EÁG/100 g pd (tallo PF A. 25°C y pétalo PF A.92°C, respectivamente).

Tabla 2. Cuantificación de fenoles totales y flavonoides en extractos no hidrolizados de *H. inuloides*

Parte de la planta	Extracto (S/H)	Fenoles totales mg EÁG/ 100 g pd	Flavonoides		Flavonoides totales (mg T/100 g pd)
			mg EC/ 100 g pd	mg EQ/ 100 g pd	
P25	EtOH 40	2534±215 ^{ef}	2236±302 ^{fe}	57±8 ^a	2293±297 ^d
	A. 25°C	1100±67 ^b	1711±106 ^{cd}	77±13 ^a	1788±95 ^c
	A. 92°C	2122±132 ^{cd}	2566±145 ^{fg}	74±2 ^a	2640±146 ^d
Hoja PF	EtOH 40	2980±45 ^g	3712±107 ^h	168±7 ^b	3880±112 ^f
	A. 25°C	2342±53 ^{de}	2103±93 ^{de}	230±8 ^c	2333±90 ^d
	A. 92°C	3092±193 ^g	3275±175 ^h	195±4 ^{bc}	3470±179 ^{ef}
Tallo PF	EtOH 40	996±57 ^{ab}	1202±48 ^b	56±2 ^a	1259±47 ^b
	A. 25°C	688±16 ^a	736±129 ^a	60±3 ^a	796±126 ^a
	A. 92°C	933±51 ^{ab}	1210±8 ^b	68±2 ^a	1278±6 ^b
Pétalo PF	EtOH 40	2841±234 ^g	2681±86 ^{fg}	417±24 ^d	3098±86 ^e
	A. 25°C	1754±172 ^c	1566±62 ^{bc}	190±16 ^{bc}	1756±73 ^c
	A. 92°C	2992±114 ^g	2744±289 ^g	406±47 ^d	3149±249 ^e

Valores expresados como la media ± la DE (n=3), por cada 100 g de planta deshidratada.

Valores en la misma columna con letras diferentes muestran diferencias significativas (p <0.05).

Comparación de medias de Tukey de dos vías (parte de la planta- disolvente)

EÁG = Equivalentes de ácido gálico; EC = Equivalentes de catequina; EQ = Equivalentes de quercetina; mg T= mg totales.

La P25, tuvo un contenido de FT menor en el extracto A. 25°C (1100±215 mg EÁG/100 g pd), con respecto a los extractos A. 25°C de la hoja y el pétalo PF (2342±53 y 1754±172 mg EÁG/100 g pd, respectivamente), sin embargo, los valores son mayores a los del tallo PF (688±16 mg EÁG/100 g pd para A.25°C). Para ambos estadios y sus diferentes partes, los valores se ven afectados por el disolvente de extracción, teniendo los extractos A. 25°C los valores más bajos, donde el de tallo PF tuvo el más bajo (688±16 mg EÁG/100 g pd), mientras que los valores más altos los tuvieron los extractos EtOH 40 y A. 92°C, siendo los de hoja PF la que tuvo los más altos (2980±45 y 3092±193 mg EÁG/100 g pd, respectivamente); es importante mencionar que en la P25, existe una diferencia significativa (p<0.05) entre los

extractos EtOH 40 y A. 92°C, siendo el extracto EtOH 40, el que tuvo el mayor contenido de FT (2534 ± 215 mg EÁG/100 g pd), sin embargo, para hoja, tallo y pétalo de la PF, no existe diferencia significativa ($p < 0.05$), entre los extractos EtOH 40 y A. 92°C (Tabla 2).

Muñoz-Velázquez *et al.* (2012), mencionan, que el contenido de FT para una infusión, obtenida a temperatura de ebullición, a partir de una bolsa comercial de té (1 g) de *H. inuloides*, es de 173.31 ± 1.87 µg EÁG/mL, en comparación con los resultados obtenidos de los extractos A. 92°C, el valor es considerablemente menor, lo que puede deberse al tiempo de extracción y a que probablemente la bolsa esté constituida por una mezcla de tallo, hoja y pétalo en diferentes proporciones y cada parte, puede aportar diferente concentración. Además, la región donde se cultiva la planta, también tiene un efecto significativo en el contenido de poli fenoles por la influencia de los factores ambientales.

Coballase-Urrutia *et al.* (2010), realizaron un estudio para cuantificar FT, de extractos acetónicos y metanólicos de *H. inuloides* obtenidos a partir de 2 kg de planta deshidratada y en polvo, los autores mencionan que 0.1 mL de extracto (100 mg de extracto de planta), tuvo un contenido de FT de 19.35 y 50.03 mg EC/mL, para extractos acetónicos y metanólicos respectivamente. Las diferencias que se observan entre los estudios revisados y los resultados obtenidos, se debe al contraste de concentraciones de compuestos fenólicos, a las técnicas de extracción, al disolvente utilizado, parte de la planta y región donde es cultivada.

7.2.2 Extractos hidrolizados

Con respecto al contenido de FT, para los extractos hidrolizados (Tabla 3), las concentraciones se encontraron en un rango de 907 ± 80 a 3248 ± 406 mg EÁG/100 g pd (tallo PF EtOH 40 y Pétalo PF A.92°C, respectivamente). Los valores para ambos estadios y sus diferentes partes se ven afectados por la hidrólisis, en comparación con los extractos no hidrolizados (Tabla 2). Los valores más bajos los tuvieron los extractos A. 25°C, donde el pétalo PF tuvo el valor más bajo (1482 ± 103 mg EÁG/100 g pd), mientras que los valores más altos los tuvieron los extractos EtOH 40 y A. 92°C, donde el pétalo PF tuvo los valores más altos (2996 ± 257 y 3248 ± 406 mg

EÁG/100 g pd, respectivamente). En el caso de la P25, el extracto A.25°C tuvo el valor más alto (3193.30±285.06 mg EÁG/100 g de pd), con respecto a su extracto EtOH 40 y A. 92°C (1410±120 y 1622±110 mg EÁG/100 g pd, respectivamente). Es importante mencionar que, tras la HA, para la P25, la hoja PF y el pétalo PF, no existe una diferencia significativa ($p < 0.05$), del contenido de FT entre los extractos EtOH 40 y A. 92°C, sin embargo, en el caso del tallo, el extracto A. 92°C (2434±15 mg EÁG/100 g pd), tuvo el valor más alto con respecto al A. 25°C y EtOH 40.

Tabla 3. Cuantificación de fenoles totales y flavonoides en extractos hidrolizados de *H. inuloides*

Parte de la planta	Extracto (C/H)	Fenoles totales mg EÁG/ 100 g pd	Flavonoides		Flavonoides totales (mg T/100 g pd)
			mg EC/ 100 g pd	mg EQ/ 100 g pd	
P25	EtOH 40	1410±120 ^{ab}	1567±250 ^{ef}	76±9 ^{bc}	1643±259 ^c
	A. 25°C	3193±285 ^e	891±110 ^c	42±1 ^a	933±110 ^b
	A. 92°C	1622±110 ^b	1727±28 ^{fg}	56±3 ^{ab}	1783±31 ^c
Hoja PF	EtOH 40	2749±335 ^e	2326±169 ⁱ	241±6 ^e	2567±173 ^d
	A. 25°C	1822±178 ^b	1385±93 ^{de}	169±6 ^d	1554±99 ^c
	A. 92°C	2666±305 ^{ed}	2297±83 ^{hi}	171±8 ^d	2468±75 ^d
Tallo PF	EtOH 40	907±80 ^a	695±49 ^b	95±5 ^c	790±49 ^b
	A. 25°C	1488±148 ^{ab}	301±41 ^a	41±3 ^a	342±43 ^a
	A. 92°C	2434±15 ^{cd}	620±28 ^{ab}	50±1 ^{ab}	670±29 ^{ab}
Pétalo PF	EtOH 40	2996±257 ^e	2002±124 ^{ghi}	693±27 ^f	2695±126 ^d
	A. 25°C	1482±103 ^{ab}	1220±62 ^{cd}	227±4 ^e	1447±64 ^c
	A. 92°C	3248±406 ^e	1985±82 ^{gh}	678±16 ^f	2663±96 ^d

Valores expresados como la media ± la DE (n=3), por cada 100 g de planta deshidratada.

Valores en la misma columna con letras diferentes muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).

Comparación de medias de Tukey de dos vías (parte de la planta- disolvente).

EÁG = Equivalentes de ácido gálico; EC = Equivalentes de catequina; EQ = Equivalentes de quercetina; mg T= mg totales.

Comparando los valores tras la HA (Tabla 3), con aquellos no hidrolizados (Tabla 2), se observan algunos incrementos. En el tallo PF, se generó un aumento en la concentración con los diferentes disolventes, siendo en los extractos A. 25°C y A. 92°C, en los que hubo un incremento del 116 y 160%, respectivamente (1488±148 y

2434±15 mg EÁG/100 g pd), para el caso de la P25 el incremento sólo fue en el extracto A. 25°C (3193±285 mg EÁG/100 g pd), esto puede estar relacionado con la liberación de agliconas, originada por el rompimiento del enlace glucosídico por efecto de la hidrólisis, ya que estas, tienen mayor capacidad de reacción y se concentran en los extractos obtenidos (Martínez-Flórez *et al.*, 2002). Por efecto de la HA, el contenido de FT también puede disminuir, como es el caso de los extractos EtOH 40 y A. 92°C de la hoja PF (2749±335 y 2666±305 mg EÁG/100 g pd, respectivamente) con un 7.7 y 13.7%, menos que aquellos no hidrolizados, la disminución de los valores podría deberse a las condiciones de hidrólisis y/o a la extracción selectiva realizada con el acetato de etilo durante la recuperación (Nuutila *et al.*, 2002).

7.3 Cuantificación de flavonoides totales

7.3.1 Extractos no hidrolizados

El contenido de flavonoides totales (reportado como la suma de las concentraciones de EC y EQ), en los extractos no hidrolizados (Tabla 2), tuvo variaciones con respecto al estadio de desarrollo, parte de la planta, disolvente de extracción y en los extractos acuosos, la temperatura tuvo un efecto significativo. En el primer ensayo, se cuantificaron flavanoles, como equivalentes de catequina (EC), los valores obtenidos fueron en un rango de 736±129 a 3712±107 mg EC/100 g de pd (tallo PF A.25°C y hoja PF EtOH 40, respectivamente). La P25 tuvo menor concentración de EC que la hoja PF y mayor que el tallo PF en los tres disolventes utilizados, sin embargo, no existe diferencia significativa ($p < 0.05$) en comparación con el pétalo PF. Las concentraciones para ambos estadios y sus diferentes partes, se ven afectados por el disolvente de extracción, ya que las concentraciones más bajas los tuvieron los extractos A. 25°C, siendo el tallo el que tuvo la concentración más baja (736±129 mg EC/100 g de pd), mientras que las más altas las tuvieron los extractos A. 92°C y EtOH 40, para los cuales, la hoja PF tuvo las concentraciones más altas (3275±175 y 3712 ±107 mg EC/100 g de pd, respectivamente); es importante mencionar que no existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los extractos A. 92°C y EtOH 40 para las diferentes partes y ambos estadios de desarrollo.

Muñoz-Velázquez *et al.* (2012), mencionan que en un extracto acuoso a temperatura de ebullición, de una bolsa comercial de té (1 g), el contenido de EC es de 227.37 ± 8.48 μg , comparando con los resultados obtenidos de los extractos A. 92°C , el valor es considerablemente menor, lo que puede deberse al tiempo de extracción (10 min), ya que la temperatura favorece la liberación de los metabolitos secundarios (Muñoz *et al.*, 2015), además, la bolsa estaba constituida por una mezcla de tallo, hoja y pétalo en diferentes proporciones y cada parte aporta diferente concentración (Tabla 2).

Con el segundo ensayo, para cuantificar flavonoles, como equivalentes de quercetina (EQ), la P25 tuvo menor concentración de EQ que la hoja y pétalo PF en los tres disolventes, sin embargo, no se observó diferencia significativa ($p < 0.05$) entre esta y el tallo PF. Maldonado-López *et al.* (2008), mencionan que para extractos acetónicos de hojas de *H. inuloides*, tanto las concentraciones de metabolitos secundarios como los sesquiterpenos, están relacionadas con la edad de las plantas y son más altas en aquellas de 15 meses de edad que en las de 4-8 meses de edad, por lo cual, se puede inferir que, conforme se desarrolla la planta, la concentración de metabolitos secundarios aumenta, como se observa en los resultados (Tabla 2). Las concentraciones de flavonoles, se ven afectadas por el disolvente de extracción, teniendo las concentraciones más bajas, los extractos EtOH 40, siendo el tallo PF el que tuvo la más baja (56 ± 2 mg EQ/100 g pd), a excepción del extracto A. 25°C del pétalo PF, el cual tuvo la concentración más bajo (189.95 ± 16.18 mg EQ/100 g pd) en comparación con EtOH 40 y A. 92°C (417 ± 24 y 406 ± 47 mg EQ/100 g pd respectivamente); por otra parte, los extractos acuosos a 92°C , tuvieron las concentraciones más altas en ambos estadios de desarrollo y sus diferentes partes, siendo el pétalo de PF, el que tuvo la mayor concentración (406 ± 47 mg EQ/100 g pd). Kubo *et al.* (2000), reportan que uno de los principales compuestos fenólicos presentes en el pétalo de *H. inuloides* es la quercetina, la cual es altamente soluble en agua, además es uno de los principales flavonoides empleados en procesos de polinización y reproducción sexual (Berezina *et al.*, 2017). Es importante mencionar que para el contenido flavonoles, no existe diferencia significativa ($p < 0.05$), entre extractos EtOH 40 y A. 92°C de las diferentes partes y estadios de desarrollo.

Por su parte, Coballase-Urrutia *et al.* (2010), obtuvieron extractos acetónicos y metanólicos a partir de 2 kg de *H. inuloides* deshidratada y en polvo, donde 0.1 mL de extracto, contiene 100 mg de extracto de planta, para dichos extractos reportan concentraciones de 0.030 y 0.070 mg EQ/mL, en extractos acetónicos y metanólicos, respectivamente. Las diferencias que se observan entre el estudio citado y el presente trabajo, con respecto a las concentraciones de flavonoles, se deben directamente a las técnicas de extracción, al disolvente utilizado, a la parte de la planta y a la región donde esta se cultiva.

7.3.2 Extractos hidrolizados

La concentración de flavonoides, en los extractos hidrolizados se encuentra en la Tabla 3. Las concentraciones se obtuvieron en un rango de 301±41 a 2326±169 mg EC/100 g pd (tallo PF A. 25°C y hoja PF EtOH 40, respectivamente) y de 41±3 a 693±27 mg EQ/100 g pd (tallo PF A. 25°C y pétalo PF EtOH 40, respectivamente). La concentración de flavanoles (EC) de la P25 es mayor en el tallo PF y menor en la hoja y pétalo PF en los tres disolventes. Para ambos estadios de desarrollo y sus diferentes partes, existe diferencia significativa ($p < 0.05$), en la concentración de los extractos A. 92°C y EtOH 40, siendo estos últimos los que tuvieron las concentraciones más altas. Comparando las concentraciones de los extractos tras la HA (Tabla 3), con aquellas de los no hidrolizados (Tabla 2), se observó que las concentraciones de todos los extractos hidrolizados disminuyeron, lo cual se debe a la sensibilidad de los flavonoides al proceso y/o solubilidad en acetato de etilo, durante su recuperación tras la HA (Nuutila *et al.*, 2002).

En la cuantificación de flavonoles (EQ) para extractos hidrolizados (Tabla 3.), la P25 tuvo concentraciones similares a las del tallo PF en los diferentes disolventes, pero menores a las de hoja y pétalo PF, sin existir diferencia significativa ($p < 0.05$), entre los extractos con EtOH 40 y A. 92°C, para ambos estadios y sus diferentes partes, a excepción de la hoja PF y tallo PF, donde las concentraciones más altas las tuvieron los extractos EtOH 40 (241.33±6.40 y 95±5 mg EQ/100 g pd, respectivamente). Comparando las concentraciones de flavonoles de los extractos hidrolizados (Tabla 3) con aquellas de los no hidrolizados (Tabla 2), algunas incrementaron y otros

disminuyeron. En el caso del pétalo, la concentración de flavonoles incrementó en los tres disolventes, sin embargo, para hoja PF, tallo PF y P25, las concentraciones sólo aumentaron en los extractos EtOH 40 (241.33±6.40, 94.68±5.94 y 75.76±9.69 mg EQ/100 g pd, respectivamente), mientras que en los acuosos disminuyeron, esto se debe a la sensibilidad o resistencia que tienen algunos flavonoides al proceso de hidrólisis (Merken y Beecher, 2000).

Por otra parte, la concentración de flavonoides totales tras la HA (Tabla 3), tuvo variación entre ambos estadios de desarrollo, partes de la planta y disolventes de extracción, donde las concentraciones están en un rango de 342±43 a 2695±126 mg T/100 g pd (tallo PF A.25°C y pétalo PF EtOH 40, respectivamente). La P25 tiene menor concentración de flavonoides totales que la hoja y pétalo de la PF, pero mayor a la del tallo PF en los tres disolventes, así, los extractos EtOH y A. 92°C, tuvieron las concentraciones más altas, sin existir diferencia significativa ($p < 0.05$) entre estas, para las diferentes partes y estadios de desarrollo. Comparando las concentraciones de los extractos tras la HA (Tabla 3), con aquellas de los extractos no hidrolizados (Tabla 2), todas las concentraciones disminuyeron.

7.4 Determinación de la capacidad captora de radicales libres

Existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una de las estrategias más aplicadas en determinaciones *in vitro* es la capacidad antioxidante de un compuesto, mezcla o alimento, esta consiste en determinar la capacidad antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical; la pérdida de color ocurre de forma proporcional a la concentración. No obstante las determinaciones de la capacidad antioxidante realizadas *in vitro* nos dan tan sólo una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo*. (Kuskoski et al., 2005).

Los métodos más aplicados son ABTS y DPPH. Ambos presentan una excelente estabilidad en ciertas condiciones, aunque también muestran diferencias. El DPPH es un radical libre que puede obtenerse directamente sin preparación previa, mientras que el ABTS tiene que ser generado, tras una reacción química con dióxido

de manganeso y persulfato de potasio. Con estos métodos se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza lipofílica (con ABTS) e hidrofílica (con DPPH) (Gutiérrez *et al.*, 2008; Kuskoski *et al.*, 2009; Boligon *et al.*, 2014).

Varios investigadores han examinado la actividad antioxidante de los extractos de *H. inuloides*, utilizando diferentes disolventes de extracción y diferentes partes de la planta (Coballase-Urrutia *et al.*, 2010; Muñoz-Velázquez *et al.*, 2012; Rodríguez-Chávez *et al.*, 2015). La comparación entre los diferentes estudios es complicada debido a las cantidades de planta y los diferentes protocolos de extracción utilizados, por lo que cada estudio informa diferentes resultados para la capacidad antioxidante *in vitro*.

7.4.1 Radical ABTS

7.4.1.1 Extractos no hidrolizados

La máxima capacidad captora de radicales libres (CCRL), expresada en $\mu\text{M ET}/100 \text{ g pd}$, se encontró en el pétalo PF, con valores de 11004 ± 9 y $10993 \pm 17 \mu\text{M ET}/100 \text{ g pd}$ (EtOH 40 y A. 92°C, respectivamente), sin existir diferencia significativa ($p < 0.05$) entre estas (Tabla 4). Estudios previos reportan que el principal compuesto fenólico presente en el pétalo PF es la quercetina, para la cual se ha reportado una gran capacidad antioxidante tanto para ABTS como para DPPH (Kubo *et al.*, 2000; Rodríguez-Chávez *et al.*, 2015). Entre las distintas partes de la planta PF y ambos estadios no hay diferencia significativa de la CCRL en los extractos EtOH 40 (10965 ± 35 , 10970 ± 9 , 11033 ± 9 y $11004 \pm 9 \mu\text{M ET}/100 \text{ g pd}$, P25, hoja, tallo y pétalo PF, respectivamente). Por otra parte, en el caso de los extractos A. 92°C, la P25 tuvo mayor CCRL que la hoja PF (10840 ± 29 y $10687 \pm 34 \mu\text{M ET}/100 \text{ g pd}$, respectivamente), lo cual se debe, a que durante su desarrollo, es más sensible al daño por radicales libres y por tanto, produce una mayor cantidad de metabolitos secundarios como mecanismo de defensa (Rodríguez-Chávez *et al.*, 2017). Además de lo anterior, la CCRL se ve afectada por el disolvente de extracción, teniendo la más baja, los extractos A. 25°C y la más alta los extractos EtOH 40 y A.92°C.

Tabla 4. Capacidad captora de radicales libres de extractos no hidrolizados de *H. inuloides*

Parte de la planta	Extracto (S/H)	Radical	
		DPPH mg EAA/100 g pd	ABTS μM ET/100 g pd
P25	EtOH 40	1957±8 ^d	10965±35 ^{ef}
	A. 25°C	1867±18 ^{cd}	10823±68 ^{cd}
	A. 92°C	1877±15 ^{cd}	10840±29 ^d
Hoja PF	EtOH 40	1946±8 ^d	10970±9 ^{ef}
	A. 25°C	1792±8 ^{bc}	10749±42 ^{bc}
	A. 92°C	1751±25 ^b	10687±34 ^b
Tallo PF	EtOH 40	1960±7 ^d	11033±9 ^f
	A. 25°C	1470±123 ^a	9582±17 ^a
	A. 92°C	1929±13 ^d	11004±25 ^f
Pétalo	EtOH 40	1930±16 ^d	11004±9
	A. 25°C	1860±12 ^{bcd}	10897±9 ^{de}
	A. 92°C	1936±31 ^d	10993±17 ^f

Valores expresados como la media ± la DE (n=3), por cada 100 g de planta deshidratada. Valores en la misma columna con letras diferentes muestran diferencias significativas (p < 0,05). Comparación de medias de Tukey de dos vías (parte de la planta- disolvente). EAA = Equivalentes de ácido ascórbico; ET = Equivalentes de Trolox

Muñoz-Velázquez *et al.* (2012), reportaron que la capacidad antioxidante de un extracto acuoso a temperatura de ebullición de una bolsa comercial de té de *H. inuloides* (1g), es de 1.47±0.010 μM ET/mL, empleando el método de ABTS, comparando con los resultados obtenidos de los extractos A. 92°C, el valor es considerablemente menor, lo que se debe al tiempo de extracción, ya que la temperatura favorece la liberación de metabolitos secundarios (Muñoz *et al.*, 2015), por otra parte la bolsa comercial de té es una mezcla de las diferentes partes de la planta y en distinta proporción, por lo cual la CCRL es menor. Por su parte Coballase-Urrutia *et al.* (2010), reportan un IC₅₀ (mg/mL), contra ABTS de 1.02±0.16 y 0.52±0.70, para extractos acetónicos y metanólicos de *H. inuloides*, respectivamente, en este caso la comparación no es viable debido al disolvente de extracción utilizado.

7.4.1.2 Extractos hidrolizados

Comparando los valores de la CCRL de los extractos hidrolizados (Tabla 5), con aquellos no hidrolizados (Tabla 4), se puede observar que, en algunos casos, los valores disminuyeron, esto se debe a que durante el proceso de hidrólisis algunos flavonoides son degradados (Merken y Beecher, 2000). Para los valores de la Tabla 5, no existe diferencia significativa entre ambos estadios de desarrollo, sus partes y sus disolventes de extracción, a excepción del extracto A.25°C del tallo, el cual tuvo el valor más bajo (8131 ± 176 μM ET/100 g pd).

Tabla 5. Capacidad captora de radicales libres de extractos hidrolizados de *H. inuloides*

Parte de la planta	Extracto (C/H)	Radical	
		DPPH mg EAA/100 g pd	ABTS μM ET /100 g pd
P25	EtOH 40	1941 ± 20^b	11021 ± 19^b
	A. 25°C	1930 ± 8^b	11027 ± 17^b
	A. 92°C	1903 ± 10^b	11027 ± 0^b
Hoja PF	EtOH 40	1939 ± 17^b	11016 ± 9^b
	A. 25°C	1916 ± 14^b	11004 ± 9^b
	A. 92°C	1920 ± 12^b	11016 ± 9^b
Tallo PF	EtOH 40	1887 ± 10^b	11027 ± 0^b
	A. 25°C	1179 ± 85^a	8131 ± 176^a
	A. 92°C	1912 ± 15^b	11021 ± 9^b
Pétalo	EtOH 40	1937 ± 1^b	10925 ± 29^b
	A. 25°C	1894 ± 3^b	10970 ± 9^b
	A. 92°C	1957 ± 22^b	11021 ± 19^b

Valores expresados como la media \pm la DE (n=3), por cada 100 g de planta deshidratada. Valores en la misma columna con letras diferentes muestran diferencias significativas ($p < 0,05$). Comparación de medias de Tukey de dos vías (parte de la planta- disolvente). EAA = Equivalentes de ácido ascórbico; ET = Equivalentes de Trolox

7.4.2 Radical DPPH

7.4.2.1 Extractos no hidrolizados

La máxima CCRL expresada en mg equivalentes de ácido ascórbico (mg EÁA), la tuvieron la P25 y el pétalo de la PF (1957±8 y 1936±31 mg EÁA/100 g pd, para EtOH 40 y A.92°C, respectivamente), sin existir diferencia significativa entre estas y entre sus diferentes disolventes de extracción.

Rodríguez-Chávez *et al.* (2015), reportaron que metabolitos aislados (tipo flavonoide), de extractos acetónicos de la flor seca de *H. inuloides*, tienen valores de IC₅₀ entre 6.97±0.14 y 13.11±1.2, para la reducción del radical DPPH. Por su parte Coballase-Urrutia *et al.* (2010), reportaron que extractos acetónicos y metanólicos de *H. inuloides* tienen un IC₅₀ (mg/mL) de 1.38±0.24 y 1.14±0.16 contra DPPH, de planta, respectivamente; la forma de reportar los resultados es diferente en ambos casos, además de las técnicas de extracción y los disolventes utilizados.

7.4.2.2 Extractos hidrolizados

Comparando los valores de la CCRL de los extractos hidrolizados (Tabla 5), con aquellas de los extractos no hidrolizados (Tabla 4), para el radical DPPH se observa la misma tendencia que con ABTS, ya que la CCRL de los A. 25°C y A. 92°C del tallo disminuyó debido a la sensibilidad de los compuestos a las condiciones de hidrólisis (1179±85 y 1912±15 mg EÁA/100 g pd, respectivamente) (Merken y Beecher, 2000); sin embargo, la CCRL aumentó para las demás partes y la P25 (Tabla 5). Por otra parte, el aumento de la CCRL está directamente relacionado con la ruptura del enlace glicosídico entre los compuestos fenólicos y los azúcares, quedando libres las agliconas, las cuales tienen mayor reactividad (Martínez-Flórez *et al.*, 2002), además, diversos estudios han reportado que la actividad antioxidante de las agliconas de los flavonoides es mejor que la de su forma glucosilada y estos flavonoides son absorbidos por el cuerpo humano en forma de agliconas (Nuutila *et al.*, 2002; Lv *et al.*, 2015). Es importante mencionar, que entre ambos estadios de desarrollo, sus partes y sus disolventes de extracción, no existe diferencia significativa, a excepción

del extracto A.25°C del tallo, el cual tuvo la CCRL más baja (1179±85 mg EÁA/100 g pd).

7.5 Inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina

El sistema renina-angiotensina (SRA), tiene entre sus principales funciones, mantener la homeostasis de la presión arterial y del balance hidroelectrolítico. Uno de sus principales componentes es la enzima convertidora de angiotensina (ECA), la cual, es capaz de remover el dipéptido carboxílico terminal del decapeptido angiotensina I para generar la angiotensina II (potente vasoconstrictor) y degradar la bradiquinina (vasodilatador), produciendo así, el aumento de la presión arterial (Feldsten y Romero, 2007), por lo tanto, la inhibición de esta enzima puede generar un efecto antihipertensivo. De hecho, los inhibidores sintéticos de la ECA, como captopril y enalapril, se usan ampliamente para el tratamiento de la hipertensión arterial, sin embargo, los efectos colaterales que provocan como tos seca, deficiencia renal e hipotensión afectan la salud de los pacientes (De la Serna, 2010).

7.5.1 Extractos no hidrolizados

La inhibición de la ECA se reporta en porcentaje de inhibición (%IECA), los resultados se compararon con una solución de Captopril (medicamento hipotensor de referencia), de 2.5 mg/mL, el cual inhibe entre el 87% de la enzima utilizada para la prueba. El %IECA de los extractos no hidrolizados (Tabla 6), se encuentra en un rango de 43±3 a 70±1% (P25 EtOH 40 y P25 A. 92°C, respectivamente). Los porcentajes más bajos, los tuvieron los extractos A. 25 °C, a excepción de la P25, cuyo extracto A. 25°C, tuvo un porcentaje mayor en comparación con el extracto EtOH 40. Los porcentajes más altos los tuvieron los extractos A. 92°C y EtOH 40 para las diferentes partes de la planta en floración, entre los cuales no hay diferencia significativa ($p < 0.05$). Tanto los extractos A. 92°C de P25 y de hoja PF como el extracto EtOH 40 del pétalo PF tuvieron los %IECA más altos (70±1, 65±4 y 66±5, respectivamente), numéricamente el extracto A. 92°C de P25 tuvo la mayor inhibición, sin embargo, no existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre estos. Para la P25, hoja PF y pétalo PF, su efecto se puede atribuir a la alta concentración de compuestos fenólicos y su CCRL. Diversos estudios han reportado que flavonoides

como flavonas, flavonoles y flavanoles, tienen la capacidad para inhibir diferentes metaloproteinasas de zinc, incluida la ECA, debido a su capacidad de formación de complejos quelantes con el átomo de zinc, así mismo, se ha reportado que concentraciones micromolares de estos flavonoides tienen un 50% de IECA y su capacidad IECA se ha evaluado *in vitro* e *in vivo*, para ratas y humanos hipertensos (Mansour *et al.*, 2011; Guerrero *et al.*, 2012; Bahmani *et al.*, 2014; González *et al.*, 2015). Esto explica que extractos de *H. inuloides* ricos en flavanoles y flavonoles, tengan porcentajes de IECA altos (70±1, 65±4 y 66±5% para extractos A. 92° de P25 y hoja PF, respectivamente).

Tabla 6. Porcentaje de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina de extractos no hidrolizados de *H. inuloides*

Parte de la planta	Extracto S/H	% IECA
P25	EtOH 40	43±3 ^a
	A. 25 °C	64±1 ^{cde}
	A. 92 °C	70±1 ^e
Hoja PF	EtOH 40	58±4 ^{bcd}
	A. 25 °C	57±4 ^{bcd}
	A. 92 °C	65±4 ^{cde}
Tallo PF	EtOH 40	55±4 ^{bc}
	A. 25 °C	51±3 ^{ab}
	A. 92 °C	52±6 ^{ab}
Pétalo PF	EtOH 40	66±5 ^{de}
	A. 25 °C	57±2 ^{bcd}
	A. 92 °C	65±4 ^{cde}

Valores expresados como la media ± la DE (n=3).

Valores con letras diferentes muestran diferencias significativas (p <0,05). Comparación de medias de Tukey de dos vías (parte de la planta-disolvente).

7.5.2 Extractos hidrolizados

Para los extractos hidrolizados, se probaron aquellos que tuvieron mayores concentraciones de compuestos fenólicos y CCRL (Tabla 7), la hoja tuvo el mayor porcentaje (55±4), seguido del pétalo (39±2) y la P25 (19±4). Comparando los valores de los extractos hidrolizados, con los no hidrolizados (Tabla 6), se observa que, en el caso de los hidrolizados, la actividad se mantiene en la hoja PF, pero no en el pétalo PF ni en la P25, lo cual indica que durante el proceso de hidrólisis un cierto porcentaje de compuestos fenólicos de los extractos de la P25 y el pétalo PF, son degradados o descartados por la extracción con acetato de etilo (Merken y Beecher, 2000).

Tabla 7. Porcentaje de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina de extractos de *H. inuloides* hidrolizados

Parte de la planta	Extracto	%IECA
P25	A. 92°C (C/H)	19±4 ^a
Hoja PF	EtOH 40 (C/H)	55±4 ^c
Pétalo	A. 92°C (C/H)	39±2 ^b

Valores expresados como la media ± la DE (n=3).
Valores con letras diferentes muestran diferencias significativas (p <0,05). Comparación de medias de Tukey de dos vías (parte de la planta- disolvente).

Se ha reportado que plantas empleadas en la medicina tradicional tienen efectos antihipertensivos, entre ellas se encuentran aquellas de la familia *Asteraceae*, a la que pertenece *H. inuloides* (Rawat *et al.*, 2016). Sin embargo, para esta planta no hay reportes de efectos ante HTA, pero si de CCRL.

Entre los mecanismos sugeridos para el mantenimiento de la presión sanguínea en el cuerpo humano, se encuentra el SRA, en el cual la ECA aumenta directamente la presión arterial por causar la constricción en los vasos sanguíneos, debido a la

conversión de angiotensina I en angiotensina II, los inhibidores de la ECA, bloquean la enzima, provocando así la dilatación de los vasos sanguíneos, lo que reduce la presión sanguínea (Feldsten y Romero, 2007). Otro mecanismo para la reducción de la hipertensión es el bloqueo de los canales de calcio incrustados en la membrana (Rawat *et al.*, 2016), extractos hidroalcohólicos de las hojas de *Achillea wilhelmsii* (*Asteraceae*), han sido reportados con efectos antihipertensivos, su mecanismo de acción radica en el bloqueo de los canales de calcio (Asgary *et al.*, 2000). Hakkoua *et al.* (2017), investigaron el efecto antihipertensivo del extracto metanólico de *Inula viscosa* (*Asteraceae*), en ratas Wistar, un grupo fue administrado con enalapril (15mg/kg/día como agente antihipertensivo de referencia) y otro con extracto metanólico de *Inula viscosa* L (40 mg/kg/día); después de 4 semanas de tratamiento, el grupo tratado con enalapril tuvo un valor de 123±1 mm Hg y el grupo tratado con extracto metanólico de *Inula viscosa* tuvo un valor de 115± 1mm Hg.

7.6 Correlación de Pearson para extractos no hidrolizados

Los coeficientes de correlación de Pearson (Tabla 8), se determinaron para los extractos no hidrolizados, de los cuales se obtuvo su caracterización completa, determinando así, el efecto de las concentraciones de compuestos fenólicos cuantificados sobre la CCRL y la actividad IECA. Teniendo así, que para DPPH hubo correlación significativa ($p < 0.05$) de la concentración de flavanoles ($r = 0.37$) y de flavonoides totales ($r = 0.36$); para ABTS hubo correlación con la concentración de fenoles totales ($r = 0.40$), flavanoles ($r = 0.41$) y flavonoides totales ($r = 0.42$). Finalmente para el %IECA, hubo efecto de la concentración de fenoles totales ($r = 0.26$), flavanoles ($r = 0.38$), flavonoles ($r = 0.39$) y flavonoides totales ($r = 0.41$), siendo esta última la de mayor correlación.

Para el caso de la CCRL, es posible que exista el efecto de algunos otros compuestos presentes en los extractos, como ácidos orgánicos o fenólicos, observando a su vez, que esta actividad, no tuvo correlación significativa con la actividad IECA.

Tabla 8. Coeficientes de correlación de Pearson para las variables respuesta estudiadas en los extractos no hidrolizados de *H. inuloides*

	Fenoles totales	Flavanoles (Catequina)	Flavonoles (Quercetina)	Flavonoides totales	DPPH	ABTS	%IECA
Fenoles totales	1.00						
Flavanoles (Catequina)	*0.91	1.00					
Flavonoides totales	*0.66	*0.48	1.00				
Flavonoides totales	*0.94	*0.99	*0.58	1.00			
DPPH	0.32	*0.37	0.18	*0.36	1.00		
ABTS	*0.40	*0.41	0.27	*0.42	*0.95	1.00	
%IECA	*0.26	*0.38	*0.39	*0.41	0.15	0.27	1.00

*Correlación significativa a $p < 0.05$.

7.7 Cuantificación de flavonoides por HPLC

Se analizaron las partes anatómicas de la planta en floración, ya que sus extractos tuvieron los mejores perfiles de compuestos fenólicos.

7.7.1 Identificación del tiempo de hidrólisis

Se probaron cuatro tiempos de hidrólisis (Tabla 9), siguiendo la metodología del apartado 6.3.1. En el caso del pétalo, el tiempo de hidrólisis que permitió la mayor cuantificación de quercetina y kaempferol fue de 10 min, seguido de 40 min, a los 20 min las concentraciones disminuyen. En el caso de la hoja, no hubo diferencia significativa ($p < 0.05$), entre las concentraciones de quercetina a los 10, 20 y 40 min, sin embargo, numéricamente la concentración con 20 min de hidrólisis es la mayor (132 ± 21 mg Q/100 g pd); en el caso de kaempferol, este no es detectado hasta los 20 min de hidrólisis, cuando ocurre una mayor hidrólisis de los flavonoides glucosilados, quedando libre la aglicona para su detección y cuantificación (Lv *et al.*, 2015).

Tabla 9. Cuantificación de flavonoides por HPLC en extractos de *H. inuloides* con diferentes tiempos de hidrólisis.

Parte de la planta	Extracto	Tiempo de hidrólisis (min)	Quercetina mg Q/100 g pd	Kaempferol mg K/100 g pd
Pétalo PF	A. 92°C	0	433±30 ^b	60±6 ^c
		10	555±4 ^d	54±1 ^{bc}
		20	432±2 ^b	43±5 ^{abc}
		40	492±9 ^c	58±8 ^{bc}
Hoja PF	A. 92°C	0	ND	ND
		10	77±11 ^a	ND
		20	132±21 ^a	38±7 ^{ab}
		40	99±1 ^a	32±1 ^a

Valores expresados como la media \pm la DE (n=2), por cada 100 g de planta deshidratada; Valores en la misma columna con letras diferentes muestran diferencias significativas ($p < 0,05$). Comparación de medias de Tukey de dos vías (parte de la planta- disolvente) ND= No detectado.

Es importante mencionar que las concentraciones de los flavonoides disminuyen o se mantienen debido a la sensibilidad o resistencia del flavonoide a las condiciones de hidrólisis, así como, al tipo de glucosilación que tenga (Merken y Beecher, 2000).

7.7.2 Cuantificación de flavonoides por HPLC con el tiempo adecuado de hidrólisis

Con base en los resultados anteriores, se determinó que el tiempo adecuado para la hidrólisis era de 20 min. Considerando este tiempo, las concentraciones de los flavonoides detectados en los extractos se encuentran en la Tabla 10. Las concentraciones más altas de miricetina las tuvieron los extractos hidrolizados del pétalo (72 ± 1 y 73 ± 2 mg de M/100 g pd para A. 92°C y EtOH 40, respectivamente), entre los cuales, no existe diferencia significativa ($p < 0.05$); por otra parte, el flavonoide miricetina no fue detectado en hoja y tallo. Las concentraciones más altas de quercetina las tuvieron los extractos hidrolizados del pétalo (3511 ± 183 y 3776 ± 77 mg Q/100 g pd para A. 92°C y EtOH 40, respectivamente), seguidos de los extractos crudos (1027 ± 15 y 1114 ± 13 mg Q/100 g pd para A. 92°C y EtOH 40, respectivamente), entre los cuales no hubo diferencia significativa ($p < 0.05$). En el caso de la hoja y el tallo, el equipo sólo detectó concentraciones de quercetina para los extractos hidrolizados, siendo la hoja la que tuvo mayor concentración (657 ± 38 y 670 ± 51 mg Q/100 g pd, para extractos A. 92°C y EtOH 40, respectivamente).

En la cuantificación de kaempferol, el equipo sólo detectó concentraciones en los extractos hidrolizados del pétalo y en el extracto A. 92°C hidrolizado de hoja, estas fueron de 48 ± 4 y 56 ± 0.2 mg K/100g pd para los extractos A. 92°C y EtOH 40 del pétalo y 39 ± 5 para A. 92°C de hoja, el extracto EtOH 40 hidrolizado del pétalo tuvo una concentración significativamente mayor ($p < 0.05$), que los demás extractos. daidzeina, se detectó en extractos hidrolizados de hoja, tallo y pétalo PF, con excepción del extracto EtOH 40 del pétalo PF. Las concentraciones más altas las tuvo la hoja, siendo el extracto A. 92°C , el que tuvo la concentración mayor (88 ± 5 mg D/100 g pd), así mismo, se puede observar que la menor concentración tanto de quercetina como daidzeina, las tuvieron los extractos hidrolizados del tallo.

Tabla 10. Cuantificación de flavonoides por HPLC en extractos de *H. inuloides*

Parte de la planta	Extracto	Tratamiento	Miricetina mg M/100g pd	Quercetina mg M/100g pd	Kaempferol mg M/100g pd	Daidzeina mg M/100g pd
Hoja	A. 92 °C	Crudo	ND	ND	ND	ND
		Hidrolizado	ND	657±38 ^b	39±5 ^a	88±5 ^d
	EtOH 40	Crudo	ND	ND	ND	ND
		Hidrolizado	ND	670±51 ^b	ND	46±0.1 ^c
Tallo	A. 92 °C	Crudo	ND	ND	ND	ND
		Hidrolizado	ND	328±40 ^a	ND	16±0.2 ^a
	EtOH 40	Crudo	ND	ND	ND	ND
		Hidrolizado	ND	707±37 ^b	ND	16±0.3 ^a
Pétalo	A. 92 °C	Crudo	15±0.4 ^a	1027±15 ^c	ND	ND
		Hidrolizado	72±1 ^b	3511±183 ^d	48±4 ^b	38±0.8 ^b
	EtOH 40	Crudo	ND	1114±13 ^c	ND	ND
		Hidrolizado	73±2 ^b	3776±77 ^e	56±0.1 ^c	ND

Valores expresados como la media ± la DE (n=2), por cada 100 g de planta deshidratada
 Valores en la misma columna con letras diferentes muestran diferencias significativas (p <0,05).
 Comparación de medias de Tukey de dos vías (parte de la planta- disolvente) ND= No detectado.

Como se puede ver en la Tabla 9, en los extractos crudos (no hidrolizados), no se detecta la presencia de ningún flavonoide, al ser hidrolizados, la detección es evidente, comprobando así, la importancia de la hidrólisis para la detección y cuantificación de flavonoides por HPLC (Lv *et al.*, 2015).

Diversos estudios han analizado cualitativa y cuantitativamente diferentes tipos de extractos de las hojas y flores de *H. inuloides*, entre estos Kubo *et al.* (1994), evaluaron en un bioensayo la inhibición de la tirosinasa por flavonoides aislados de *H. inuloides* como una alternativa para controlar plagas de insectos, en el cual reportan que por métodos espectroscópicos, en el extracto metanólico de flores secas de *H. inuloides*, la quercetina es el flavonol más común y el principal compuesto activo presente en las flores secas; también aislaron y estudiaron la actividad de cuatro flavonoles más, entre ellos quercetina 3-β-glucósido (isoquercitrina), kaempferol, kaempferol 3-β-glucósido y rutina (quercetina 3-β-

rutinósido). Considerando este reporte, se comprueba que los principales flavonoides presentes en el pétalo PF de *H. inuloides* son quercetina y kaempferol.

Por su parte Mijangos *et al.* (2011), realizaron la extracción de compuestos presentes en *H. inuloides* con ultrasonido y emplearon la cromatografía líquida con detección de matriz de diodos para la caracterización de la fracción fenólica. Los fenoles detectados fueron guayacol (41.5 µg), catequina (38.7 µg), ácido elágico (35.9 µg), ácido carbólico (24.2 µg) y ácido cumárico (19.5 µg). La fracción fenólica contiene cantidades significativas de antioxidantes, cuya acción en la medicina ha sido ampliamente demostrada, ya que, el ácido elágico tiene propiedades antiproliferativas y antioxidantes, la catequina es un flavonoide que actúa como antioxidante en el metabolismo de la planta, el guayacol es un antiséptico y el ácido cumárico tiene propiedades antioxidantes y anticancerígenas .

Rodríguez-Chávez *et al.* (2015), aislaron y cuantificaron distintos constituyentes de flores secas de *H. inuloides*, empleando la cromatografía líquida con vacío de extractos acetónicos, reportando 3.142 g de quercetina. Recientemente Egas *et al.* (2018), evaluaron la actividad anti *Helicobacter pylori* de metabolitos presentes en un extracto acetónico de hojas de *H. inuloides* y detectaron cualitativamente por HPLC con detector de matriz de diodos, 7-hidroxi-3,4-dihidrocadaleneno, 7-hidroxi-cadaleneno y quercetina.

Comparando los resultados obtenidos con los reportados existentes en la bibliografía, cualitativa y/o cuantitativamente, la detección de flavonoides en *H. inuloides*, se puede observar que, independientemente del tipo de disolvente utilizado en la extracción, su técnica, detector y/o cuantificación, el compuesto predominante en la flor es la quercetina, sin embargo, no existen reportes sobre la presencia de flavonoides como miricetina y daidzeina en extractos de *H. inuloides*, por otra parte tampoco hay estudios del análisis del tallo, observando con los resultados de este trabajo que dicha parte de la planta también aporta una cantidad considerable de flavonoides con actividad biológica.

Por otro lado, no es viable la comparación cuantitativa con respecto a quercetina y kaempferol, ya que en los estudios donde se reporta la presencia de estos flavonoides se emplearon diferentes disolventes, técnicas de extracción, técnicas de cuantificación y además la región geográfica donde la planta fue recolectada determina la concentración de estos compuestos (Maldonado-López *et al.*, 2008).

VIII. CONCLUSIONES

1. De los dos estadios de desarrollo, la planta en floración, fue la que tuvo mayores concentraciones de compuestos fenólicos, capacidad captadora de radicales libres y actividad inhibitoria de la enzima convertidora de la angiotensina, en los extractos acuoso a 92 °C y etanólico al 40%.
2. Con tiempos de hidrólisis superiores a 2 horas, se generó un efecto favorable en la capacidad captadora de radicales libres y un efecto negativo en la inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina. Sin embargo, con un tiempo de 20 min, se identificaron y cuantificaron por cromatografía líquida de alta resolución, altas concentraciones de miricetina, quercetina, daidzeina y kaempferol.
3. El estadio de desarrollo de *Heterotheca inuloides* Cass, sus diferentes partes aéreas y el tipo de extracción, determinan la concentración de compuestos fenólicos y por lo tanto su actividad biológica.
4. *Heterotheca inuloides* Cass, es una planta con alto potencial frente a problemas cardiovasculares, por su capacidad inhibitoria de la enzima convertidora de la angiotensina como mecanismo hipotensor, sus altas concentraciones de compuestos fenólicos y su capacidad captadora de radicales libres.

IX. REFERENCIAS

- Aguilar, A., Camacho, J. R., Chino, S., Jácquez, P., y López, M. E. (1994). *Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social Información etnobotánica*. México: IMSS.
- Andrade-Cetto, A. (2009). Ethnobotanical study of the medicinal plants from Tlanchinol, Hidalgo, México. *Journal of Ethnopharmacology*, 122 (1), 163-171.
- Arranz, M. S. (2010). *Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española: metodología para su determinación e identificación*. Madrid: Universidad complutense de madrid.
- Asgary, S., Naderi, G. H., Sarrafzadegan, N., Mohammadifard, N., Mostafavi, S., y Vakili, R. (2000). Antihypertensive and antihyperlipidemic effects of *Achillea Wilhelmsii*. *Drugs under experimental and clinical research*, 26 (3), 89-93.
- Bae, H., Jayaprakasha, G. K., Jifon, J., y Patil, B. S. (2012). Extraction efficiency and validation of an HPLC method for flavonoid analysis in peppers. *Food Chemistry*, 130, 751-758.
- Bahmani, M., Golshahi, H., Saki, K., Rafieian-Kopaei, M., Delfan, B., y Mohammadi, T. (2014). Medicinal plants and secondary metabolites for diabetes mellitus control. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4 (2), 687-692.
- Berezina, E. V., Brilkina, A. A., y Veselov, A. P. (2017). Content of phenolic compounds, ascorbic acid, and photosynthetic pigments in *Vaccinium macrocarpon* Ait. dependent on seasonal plant development stages and age (the example of introduction in Russia). *Scientia Horticulturae*, 218, 139-146.
- Bever, B. O., y Zahnd, G. R. (1979). Plants with oral hypoglycemic action. *Pharmaceutical Biology*, 17, 139-196.
- Bhattacharya, A., Sood, P., y Citovsky, V. (2010). The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection. *Molecular Plant Pathology*, 11, 705-719.
- Bhebhe, M., Nogueira Füller, T., Chipurura, B., y Muchuweti, M. (2016). Effect of Solvent Type on Total Phenolic Content and Free Radical Scavenging Activity of Black Tea and Herbal Infusions. *Food Analytical Methods*, 9 (4), 1060-1067.

- Bogdanski , P., Suliburska, J., Szulinska, M., Stepien, M., Pupek-Musialik, D., y Jablecka, A. (2012). Green tea extract reduces blood pressure, inflammatory biomarkers, and oxidative stress and improves parameters associated with insulin resistance in obese, hypertensive patients. *Nutrition research*, 32, 421-427.
- Boligon, A. A., Machado, M. M., y Athayde, M. L. (2014). Technical evaluation of antioxidant activity. *Medicinal chemistry*, 4 (7), 517-522.
- Brand-Williams, W. C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technology* , 25-30.
- Campos-Nonato, I., Hernández-Barrera, L., Pedroza-Tobías, A., Medina, C., y Barquera , S. (2018). Hipertensión arterial en adultos mexicanos: prevalencia, diagnóstico y tipo de tratamiento. *Salud pública de méxico*, 60 (3), 233-243.
- Caputi, L., Malnoy, M., Goremykin, V., Nikiforova, S., y Martens, S. (2012). A genome-wide phylogenetic reconstruction of family 1 UDP-glycosyltransferases revealed the expansion of the family during the adaptation of plants to life on land. *The Plant Journal*, 69, 1030-1042.
- Castillo-Juárez, I., Bonzález, V., Jaime-Aguilar, H., Martínez, G., Linares, E., Bye , R., y Romero, I. (2009). Anti-Helicobacter pylori activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *Journal of ethnopharmacology*, 122, 402-405.
- Chandrasekara, A. (2018). Phenolic Acids. *Reference Module in Food Science*, 1-12.
- Cheyrier, V., Comte, G., Davies, K. M., Lattanzio, V., y Martens, S. (2013). Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry*, 72, 1-20.
- Coballase-Urrutia, E., Pedraza-Chaverri, J., Camacho-Carraza, R., Cárdenas-Rodríguez, N., Huerta-Gertrudis, B., Medina-Campos, O. N., . . . Espinosa-Aguirre, J. J. (2010). Antioxidant activity of Heterotheca inuloides extracts and of some its metabolites. *Toxicology*, 276, 41- 48.
- Coballase-Urrutia, E., Pedraza-Chaverri, J., Cárdenas-Rodríguez, N., Huerta-Gertrudis, B., García-Cruz, M. E., Ramírez-Morales, A., . . . Espinosa-Aguirre, J. J. (2011). Hepatoprotective effect of acetonic and methanolic extracts of Heterotheca inuloides against CCl₄-induced toxicity in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 63, 363-370.

- CONAFOR (Comisión Nacional Forestal). (2010). Árnica del País (*Heterotheca inuloides* Cass.). En *Plantas medicinales de la Farmacia Viviente del Cefofo: usos terapéuticos tradicionales y dosificación* (págs. 12-14). Jalisco.
- Cruz, G. R. (2007). *Plantas medicinales de nueve comunidades en la frontera entre Chignahuapan, Ixtacamaxtitlán y Aquixtla, Puebla*. México: Universidad Autónoma de Chapingo.
- Cushman, D. W. y Cheung, H. S. (1971). Spectrophotometric assay and properties of the Angiotensin Converting Enzyme of rabbit lung. *Biochemical pharmacology*, 48-1637.
- De la Serna, F. (2010). Acciones farmacológicas sobre el eje Renina-angiotensina-aldosterona. En *Insuficiencia cardíaca crónica* (págs. 387-390). Argentina: Federación Argentina de Cardiología.
- De la Serna, F. (2010). Efectos colaterales de los IECA. En F. d. Serna, *Insuficiencia cardíaca crónica*. (págs. 399-401). Tucumán: Editorial Federación Argentina de Cardiología.
- Delgado, G., Olivares, M., Chávez, M. I., Ramírez-Apan, T., Linares, E., Bye, R., y Espinosa-García, F. J. (2001). Antiinflammatory constituents from *Heterotheca*. *Natural Products*, 64, 861-864.
- Dias, M. I., Sousa, M. J., Alves, R. C., y Ferreira, I. C. (2016). Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. *Industrial Crops and Products* 82, 9-22.
- Díaz-Batalla, L., Widhlm, J. M., Fahey, G. C., Castaño-Tostado, E., y Paredes-López, O. (2006). Chemical Components with Health Implications in Wild and Cultivated Mexican Common Bean Seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2045-2052.
- Egas, V., Salazar-Cervantes, G., Romero, I., Méndez-Cuesta, C. A., Rodríguez-Chávez, J. L., y Delgado, G. (2018). Anti-*Helicobacter pylori* metabolites from *Heterotheca inuloides* (Mexican Arnica). *Fitoterapia*, 1-8.
- Espinoza, S. J., y Castillo, C. R. (1992). Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina. *Revista peruana de cardiología*, 23 (3), 104-106.
- Feldsten, C. A., y Romero, J. C. (2007). El sistema renina angiotensina en la hipertensión esencial. *Revista latinoamericana de hipertensión*, 2 (2), 49-58.

- Ferreira, I. C., Martins, N., y Barros, L. (2017). Phenolic Compounds and Its Bioavailability: In Vitro bioactive Compounds or Health Promoters? *Advances in Food and Nutrition Research*, 82, 1-44.
- Flores-San Martin, D., Perea-Flores, M., Morales-López, J., Centeno-Álvarez, M., Pérez-Ishiwara, G., Pérez-Hernández, N., y Pérez-Hernández, E. (2013). Effect of Heterotheca inuloides essential oil on rat cytoskeleton articular chondrocytes. *Natural Products*, 2347-2350.
- Freixa, B., Vila, R., Vargas, L., Lozano, N., Adzet, T., y Cañigueral, S. (1998). Screening for antifungal activity of nineteen Latin American plants. *Phytotherapy Research*, 12 (6), 427-430.
- Gallardo, A. C. P. (2008). *Curanderos y Medicina Tradicional en la Huasteca*. México: Instituto Veracruzano de la Cultura.
- Gené, R. M., Segura, L., Adzet, T., Marín, E., y Iglesias, J. (1998). Heterotheca inuloides: Anti-inflammatory and analgesic effect. *Journal of Ethnopharmacology*, 60, 157-162.
- Gião, M. S., Pereira, C. I., Fonseca, S. C., Pintado, M. E., y Malcata, F. X. (2009). Effect of particle size upon the extent of extraction of antioxidant power from the plants Agrimonia eupatoria, Salvia sp. and Satureja montana. *Food Chemistry*, 117, 412-416.
- González, B. R., León, C. S., Aldret, R. G., Contreras, E. M., Hidalgo, S. G., y Hidalgo, G.L. (2014). Enfermedades crónico-degenerativas en profesionales de salud en Guadalajara (México). *Salud Uninorte*, 30 (3), 302-310.
- González González, R., Dávila, H. A., y Santana, P. J. A. (2015). Visión panorámica de las enfermedades crónico-degenerativas. *Revista internacional de acupuntura*, 9 (2), 57-69.
- Greenway, F., Liu, Z., Yu, Y., y Gupta, A. (2011). A Clinical Trial Testing the Safety and Efficacy of a Standardized Eucommia ulmoides Oliver Bark Extract to Treat Hypertension. *Alternative Medicine Review*, 16 (4), 338-347.
- Guerrero, L., Castillo, J., Quiñones, M., Garcia-Vallvé, S., Arola, L., Pujadas, G., y Muguerza, B. (2012). Inhibition of Angiotensin-Converting Enzyme Activity by Flavonoids: Structure-Activity Relationship Studies. *PLOS ONE*, 7 (11), 1-11.
- Gutiérrez, A. D. M., Ortiz, G., C. A., y Mendoza, C. A. (2008). Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. *Simposio de Metrología*.

- Gutiérrez-Grijalva, E. P., Ambriz-Pérez, D. L., Leyva-López, N., Castillo-López, R. I., y Heredia, J. (2016). Bioavailability of dietary phenolic compounds: Review. *Spanish Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 20 (2), 140-147.
- Hakkoua, Z., Maciukb, A., Leblais, V., Bouanani, N. E., Mekhfi, H., Bnouham, M., . . . Legssyer, A. (2017). Antihypertensive and vasodilator effects of methanolic extract of *Inula viscosa*: Biological evaluation and POM analysis of cynarin, chlorogenic acid as potential hypertensive. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 62-69.
- Haraguchi, H., Ishikawa, H., Sanchez, Y., Ogura, T., Kubo, Y., y Kubo, I. (1997). Antioxidative Constituents in *Heterotheca inuloides*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 5 (5), 865-871.
- Hernández, Á. M., Lezana, F. M. Á., Barriguete-Meléndez, J. A., Mancha, M. C., Ortiz, S. G. R., García de León, F. A., . . . Verdejo, P. J. (2011). Guía de Tratamiento Farmacológico y Control de la Hipertensión Arterial Sistémica. *Revista Mexicana de Cardiología*, 22 (1), 1A-21A.
- Hernández-Ledesma, B., Martín-Álvarez, P.J., y Pueyo, E. (2003). Assessment of the Spectrophotometric Method for Determination of Angiotensin-Converting-Enzyme Activity: Influence of the Inhibition Type. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4175-4179.
- Holland, B., Agyei, D., Akanbi, T. O., Wang, B., y Barrow, C. J. (2017). Bioprocessing of Plant-Derived Bioactive Phenolic Compounds. *Food Biosynthesis*, 135-181.
- Ibargüengoitia Cervantes, M. E. (2007). Tradiciones mexicanas: del agua de jamaica a la bandera nacional. *Educación química*, 110-113.
- INI(Instituto Nacional Indigentista). (1994). Treinta y cinco monografías del Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. En I. N. Indigentista), *Flora Medicinal Indígena de México*. México.
- Juárez-Flores, B., Jasso-Pineda, Y., Aguirre-Rivera, J., y Jasso-Pineda, I. (2010). Effect of Asteraceae powder against the maize weevil (*Sitophilus zeamais* Motsch). *Polibotánica*, 30, 123–135.
- Karou, S. D., Tchacondo, T., Djikpo Tchibozo, M. A., Abdoul-Rahaman, S., Anani, K., Koudouvo, K., . . . de Souza, C. (2011). Ethnobotanical study of medicinal plants used in the management of diabetes mellitus and hypertension in the Central Region of Togo. *Pharmaceutical Biology*, 49 (12), 1286–1297.

- Khoddami, A., Wilkes, M. A., y Roberts, T. H. (2013). Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*, 18, 2328-2375.
- Kim, J. K., Noh, J. H., Lee, S., Choi, J. S., Suh, H., Chung, H. Y., . . . Choi, W. C. (2002). The first total synthesis of 2, 3, 6-tribromo-4, 5-dihydroxybenzyl methyl ether (TDB) and its antioxidant activity. *Bull Korean Chem Soc*, 661-662.
- Kubo, I., Kinst-Hori, I., Chaudhuri, S. K., Kubo, Y., Sánchez, Y., y Ogura, T. (2000). Flavonols from *Heterotheca inuloides*: Tyrosinase Inhibitory Activity and Structural Criteria. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 8, 1749-1755.
- Kubo, I., Muroi, H., Kubo, A., Chaudhuri, S. K., Sánchez, Y., y Ogura, T. (1994). Antimicrobial agents from *Heterotheca inuloides*. *Planta Medica*, 60, 218-221.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., y Fett, R. (2005). Determinación de la capacidad antioxidante de pulpa de frutos. *Ciencia y tecnología de alimentos*, 25 (4), 726-732.
- Kuskoski, E. M.-P. (2009). Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Food Science and Technology*, 24 (4), 691-693.
- Lawal, A. O. (2017). Air particulate matter induced oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease and atherosclerosis: The role of Nrf2 and AhR-mediated pathways. *Toxicology Letters*, 1-26.
- Leiner, D.L.C.M., Ortiz, D. J., y Ávila, M. C. (2008). Un nuevo paradigma de la responsabilidad social corporativa: El aumento de enfermedades crónico-degenerativas en la fuerza laboral. *Contaduría y Administración*, 225, 105-199.
- Lin, L. Z., y Harnly, J. M. (2012). LC-PDA-ESI/MS identification of the phenolic components of three compositae spices: chamomile, tarragon, and Mexican arnica. *Natural Product Communications*, 7 (6), 749-752.
- Linares, E., Flores, B., y Bye, R. (1988). *Selección de plantas medicinales de México*. México: Limusa.
- Loredo-Medina, O. L., Rodríguez-Chávez, J. M., y Ramos-Espinoza, M. C. (2002). Aprovechamiento de recursos vegetales en una localidad de la reserva de la biosfera mariposa monarca, Michoacán, México. *Etnobiología*, 2, 32-60.
- Lv, H., Wang, X., He, Y., Wang, H., y Suo, Y. (2015). Identification and quantification of flavonoid aglycones in rape bee pollen from Qinghai-Tibetan Plateau by HPLC-DAD-APCI/MS. *Journal of Food Composition and Analysis*, 38, 49-54.

- Maldonado, L. Y. (2004). *Cuantificación de caladenos e isocadalenos anti-inflamatorios de Árnica (Heterotheca inuloides Cass) en plantas sometidas a fertilización y cortes sucesivos*. Morelia: Universidad michoacana de San Nicolas de Hidalgo.
- Maldonado-López, Y., Linares-Mazari, E., Bye , R., Delgado, G., y Espinosa-García, F. J. (2008). Mexican Arnica Anti-Inflammatory Action: Plant Age is Correlated with the Concentration of Anti-Inflammatory Sesquiterpenes in the Medicinal Plant *Heterotheca inuloides* Cass (Asteraceae). *Economic Botany*, 20 (10), 161-170.
- Mansour, S. M., Bahgat, A. K., El-khatib, A. S., y Khayyal, M. T. (2011). Ginkgo biloba extract (EGb 761) normalizes hypertension in 2K, 1C hypertensive rats: Role of antioxidant mechanisms, ACE inhibiting activity and improvement of endothelial dysfunction. *Phytomedicine*, 18, 641-647.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., y Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*, 17 (6), 271-278.
- McKay, D. L., C-Y., O. C., Saltzman, E., y Blumberg, J. B. (2009). Hibiscus Sabdariffa L. Tea (Tisane) Lowers Blood Pressure in Prehypertensive and Mildly Hypertensive Adults. *The Journal of Nutrition Nutrition and Disease*, 298-303.
- Merken, H. M., y Beecher, G. R. (2000). Measurement of Food Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48 (3), 577-599.
- Mijangos, R. O., Ruiz-Jiménez, J., Lagunez-Rivera, L., y Luque de Castro, M. (2011). Fast ultrasound-assisted Extraction of polar (phenols) and non polar (lipids) fractions in *Heterotheca inuloides* cass. *Phytochemical Analysis*, 22, 484-491.
- Mohammad-Hadi , M., Masoud, S., Habib-Allah, E., Omid, R., y Hossein, H. (2008). Safety evaluation of saffron (*Crocus sativus*) tablets in healthy volunteers. *Phytomedicine*, 15, 1032–1037.
- Morales, C. G. (2018). *Recursos destinados al Sector Salud en el Presupuesto de Egresos de la Federación 2018*. México: Instituto Belisario Domínguez.
- Moreno-Salazar, S. F., Robles-Zepeda, R. E., y Johnson, D. E. (2008). Plant folk medicines for gastrointestinal disorders among the main tribes of Sonora, México. *Fitoterapia*, 79, 132-141.
- Mosby. (2009). *Mosby's Medical Dictionary*. Elsevier.

- Mucalo, I., Jovanovski, E., Rahelić, D., Božikov, V., Romić, Ž., y Vuksan, V. (2013). Effect of American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) on arterial stiffness in subjects with type-2 diabetes and concomitant hypertension. *Journal of Ethnopharmacology*, 150, 148-153.
- Munné-Bosch, S., y Pintó-Marijuan, M. (2017). Free Radicals, Oxidative Stress and Antioxidants. *Elsevier*, 9-16.
- Muñoz C., W., Chavez R., W., Pabón, L. C., Rendón F., M. R., Patricia-Chaparro, M., y Octávalo-Álvarez, Á. M. (2015). Extracción de compuestos fenólicos con actividad antioxidante a partir de Champa (*Campomanesia lineatifolia*). *CENIC. Ciencias Químicas*, 46, 38-46.
- Muñoz-Velázquez, E. E., Rivas-Díaz, K., Loarca-Piña, M. F., Mendoza-Díaz, S., Reynoso-Camacho, R., y Ramos-Gómez, M. (2012). Comparación del contenido fenólico, capacidad antioxidante y actividad antiinflamatoria de infusiones herbales comerciales. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 3 (3), 481- 495.
- Murkovic, M. (2016). Phenolic Compounds: Occurrence, Classes, and Analysis. *Encyclopedia of Food and Health*, 346-351.
- Nesom, G. L. (1990). Taxonomy of *Heterotheca* sect. *Heterotheca* (Asteraceae: Astereae) in México, with comments on the taxa of the United States. *Phytologia*, 69, 282-294.
- Nuutila, A. M., Kammiovirta, K., y Oksman-Caldentey, K. M. (2002). Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. *Food Chemistry*, 76, 519-525.
- Pękal, A. y Pyrzynska, K. (2014). Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food Analytical Methods*, 1776-1782.
- Pinedo, A., García-Moroga, C., Lugo-Sepúlveda, E., y Enciso-Martínez, Y. (2017). Enfermedades crónico degenerativas en pacientes que acuden a Unidad de Especialidades Médicas. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 4 (5), 92-97.
- Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C. J., y Valko, M. (2017). Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38 (7), 592-607.
- Rawat, P., Singh, P. K., y Kumar, V. (2016). Anti-hypertensive medicinal plants and their mode of action. *Journal of Herbal Medicine*, 6, 107–118.

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231-1237.
- Reverte, C. D., Moreno, P. J., y Ferreira, P. E. (1998). Hipertensión arterial: actualización de su tratamiento. *Información terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, 22 (4), 81-94.
- Rodrigues, I. A., Azevedo, M. M., Chaves, F. C., Bizzo, H. R., Corte-Real, S., Alviano, D. S., . . . Vemelho, A. B. (2013). In vitro cytotoxic effects of the essential oil from *Croton cajucara* (red sacaca) and its major constituent 7-hydroxycalamenene against *Leishmania chagasi*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 1-9.
- Rodríguez-Chávez, J. L., Coballase-Urrutia, E., Nieto-Camacho, A., y Delgado-Lamas, G. (2015). Antioxidant capacity of "Mexican Árnica" *Heterotheca inuloides* Cass Natural products and some derivatives: Their Anti-inflammatory evaluation and effect on *C. elegans* life Span. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-10.
- Rodríguez-Chávez, J. L., Coballase-Urrutia, E., Sicilia-Argumedo, G., Ramírez-Apan, T., y Delgado, G. (2015). Toxicological evaluation of the natural products and some semi synthetic derivatives of *Heterotheca inuloides* Cass (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 175, 256–265.
- Rodríguez-Chávez, J. L., Egas, V., Linares, E., Bye, R., Hernández, T., Espinosa-García, F. J., y Delgado, G. (2017). Mexican Arnica (*Heterotheca inuloides* Cass. Asteraceae: Astereae): Ethnomedical uses, chemical constituents and biological properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 195, 39-63.
- Rodríguez-Chávez, J. L., Gómez-Vidales, V., Coballase-Urrutia, E., Oortega-Cuéllar, D., y Delgado-Lamas, G. (2016). *Heterotheca inuloides* (Mexican arnica) metabolites protect *Caenorhabditis elegans* from oxidative damage and inhibit nitric oxide production. *RSC Advances*, 6, 12032-12041.
- Rodríguez-Chávez, J. L., Rufino-González, Y., Ponce-Macotela, M., y Delgado, G. (2015). In vitro activity of 'Mexican Arnica' *Heterotheca inuloides* Cass natural products and some derivatives against *Giardia intestinalis*. *Parasitology*, 142, 576-584.
- Rojas-Llanes, J. P., Martínez, J. R., y Stashenko, E. E. (2014). Contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de extractos de mora (*Rubus glaucus* Benth) obtenidos bajo diferentes condiciones. *Vitae*, 21 (3), 218-227.

- Rosas, G. M. (2012). *Manual de producción de árnica (Heterotheca inuloides cass)*. Xalapa.
- Rosas-Piñón, Y., Mejía, A., Díaz-Ruiz, G., Aguilar, M. I., Sánchez-Nieto, S., y Rivero-Cruz, J. F. (2012). Ethnobotanical survey and antibacterial activity of plants used in the Altiplane region of Mexico for the treatment of oral cavity infections. *Journal of Ethnopharmacology*, 141, 860-865.
- Sagrero-Nieves, L. (1996). Volatile Components from the Leaves of *Heterotheca inuloides cass*. *Flavour and fragrance journal*, 11, 49-51.
- Sánchez-Moreno, C. (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science Technology*, 121-137.
- Secretaría de Salud. (2015). *Informe sobre la salud de los mexicanos 2015 Diagnóstico general de la salud poblacional*. México.
- Secretaría de Salud. (2016). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino*. Instituto Nacional de Salud Pública.
- Segura, L., Freixa, B., Ringbom, T., Vila, R., Perera, P., Adzet, T., . . . Cañigueral, S. (2000). Anti-inflammatory activity of dichloromethane extract of *Heterotheca inuloides* in vivo and in vitro. *Médic Plant*, 66 (6), 553–555.
- Silva, G. M. (2006). Fotometría y Espectrometría. En M. d. Silva García, *Técnicos Especialistas de Laboratorio Del Servicio Vasco de Salud-osakidetza* (págs. 231-235). España: MAD.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., y Crouch, S. R. (2008). Capítulo 13. Introducción a la espectrometría por absorción molecular ultravioleta y visible. En D. A. Skoog, F. J. Holler, & S. R. Crouch, *Principios de análisis instrumental* (págs. 336-346). México, D.F.: Cengage Learning Editores.
- Stipanovic, R. D., Puckhaber, L. S., Reibenspies, J. H., y Williams, H. J. (2006). The absolute configuration of (-)-3-hydroxy-alpha-calacorene. *Phytochemistry*, 67 (13), 1304-1308.
- Vargas-León, E. A., Díaz-Batalla, L., González-Cruz, L., Bernardino-Nicanor, A., Castro-Rosas, J., Reynoso-Camacho, R., y Gómez-Aldapa, C. (2018). Effects of acid hydrolysis on the free radical scavenging capacity and inhibitory activity of the angiotensin converting enzyme of phenolic compounds of two varieties of jamaica (*Hibiscus sabdariffa*). *Industrial Crops & Products* 116, 201-208.

- Vargas-León, E. A., Vargas-León, U. A., Cortés-López, H., Díaz-Batalla, L., González-Cruz, L., Bernardino-Nicanor, A., y Gómez-Aldapa, C. A. (2016). Potencial de la Etnobotánica Hidalguense ante la Hipertensión. En L. D. Batalla, C. A. Aldapa, J. c. Rosas, & A. T. Jurado, *Bioteología y Alimentos en Hidalgo: Transitando a la bioeconomía* (págs. 170-185). México: Amalgama.
- Villarreal, R. E., Mathew, Q. A., Garza-Elizondo, M. E., Núñez-Rocha, G., Salinas-Martínez, A. M., y Gallegos-Handal, M. (2002). Costo de la Atención de la Hipertensión Arterial y su Impacto en el Presupuesto Destinado a la Salud en México. *Salud pública Méx vol.44 no.1*, 7-13.
- Wang, J., Xiong, X., y Feng, B. (2013). Effect of Crataegus Usage in Cardiovascular Disease Prevention: An Evidence-Based Approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-17.
- Welihinda, J., Arvidson, G., Gylfe, E., Hellman, B., y Karlsson, E. (1982). The insulin-releasing activity of the tropical plant *Momordica charantia*. *Acta biologica et medica Germanica*, 41 (12), 1229-1240.

Parte de los resultados se presentaron en 13a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales.



LA UNIVERSIDAD MICHUACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Y LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE INVESTIGACIÓN EN PRODUCTOS NATURALES



extiende la presente

CONSTANCIA



A: Maribel Soto Islas, Enaim A. Vargas León, Luis Díaz Batalla, Javier Castro Rosas, Reyna N. Falfán Cortes, Carlos A. Gómez Aldapa

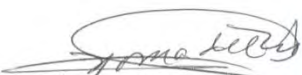
Por su valiosa asistencia y presentación de la ponencia en **Modalidad Cartel**

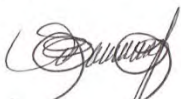
Caracterización de *Heterotheca inuloides* cass en dos estadios de desarrollo

En la 13a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales celebrada del 17 al 20 de mayo de 2017 en Morelia, Michoacán, México.

Amipronat




Dra. Rosa Elva Norma del Río Torres
Presidente del Comité Organizador


Dr. Sergio Rubén Peraza Sánchez
Presidente de AMIPRONAT